

内蒙古香青兰总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性成分分析

陈丽¹, 曹星月¹, 王占黎², 和彦苓^{1*}, 靳敏^{1*} (1.内蒙古科技大学包头医学院公共卫生学院, 内蒙古 包头 014040; 2.内蒙古自治区疾病相关生物标志物重点实验室, 内蒙古 包头 014040)

摘要: 目的 优化内蒙古香青兰总黄酮提取工艺, 并对抗氧化活性成分进行分析。方法 采用单因素试验法结合响应面法优化提取工艺, 并通过清除 DPPH 自由基试验、ABTS 自由基清除试验、抑制羟基自由基试验和抑制超氧阴离子自由基试验筛选提取物的抗氧化活性成分, 用高效液相色谱-电喷雾离子源-离子阱-飞行时间质谱联用技术(LC-MS-IT-TOF)对抗氧化活性成分进行分析。结果 内蒙古香青兰总黄酮最佳制备条件为提取温度 67 ℃、乙醇体积百分数 63%、料液比 1:58, 提取物中总黄酮含量 4.77%。香青兰总黄酮抗氧化活性成分为乙酸乙酯活性成分, 主要包含迷迭香酸、迷迭香酸甲酯、木犀草素、芹菜素、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷等化学成分。结论 首次建立内蒙古香青兰总黄酮制备方法, 该方法简单易操作, 提取物总黄酮含量丰富, 乙酸乙酯活性成分是香青兰总黄酮抗氧化活性成分, 含有多种黄酮类化合物。

关键词: 香青兰; 总黄酮; 响应面法; 抗氧化活性; 提取工艺

中图分类号: R283.6 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)09-1187-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221039

引用本文: 陈丽, 曹星月, 王占黎, 等. 内蒙古香青兰总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性成分分析[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(9): 1187-1193.

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Dracocephalum Moldavica* L. of Inner Mongolia and Analysis of Its Antioxidant Components

CHEN Li¹, CAO Xingyue¹, WANG Zhanli², HE Yanling^{1*}, JIN Min^{1*} (1.School of Public Health, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China; 2.Inner Mongolia Key Laboratory of Disease-Related Biomarkers, Baotou 014040, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction process of total flavonoids components from Inner Mongolia *Dracocephalum moldavica* L., and to analyze its antioxidant active ingredients. **METHODS** Single factor test combined with response surface method was used to optimize the extraction process. DPPH free radical scavenging experiment, ABTS free radical scavenging experiment, hydroxyl free radical inhibition experiment and superoxide anion free radical inhibition experiment were used to screen the antioxidant active components of the extract. The antioxidation active parts were analyzed by high performance liquid chromatography-electrospray ion source-ion trap-time of flight mass spectrometry(LC-MS-IT-TOF). **RESULTS** The optimum preparation conditions were as follows: extraction temperature of 67 ℃, volume percentage of ethanol 63%, solid-liquid ratio of 1:58, total flavonoid content of 4.77% in the extract. The antioxidant activity of the total flavonoids in *Dracocephalum moldavica* L. was ethyl acetate, which mainly contained rosmarinic acid, methyl rosmarinate, luteolin, apigenin, apigenin-7-O- β -D-glucoside and other chemical components. **CONCLUSION** The preparation method of total flavonoids of Inner Mongolia *Dracocephalum moldavica* L. is established for the first time. The method is simple and easy to operate, and rich in flavonoids. The ethyl acetate extract in total flavonoids in *Dracocephalum moldavica* L. is the main antioxidant components, containing a variety of flavonoids.

KEYWORDS: *Dracocephalum moldavica* L.; total flavonoids; response surface method; antioxidant activity; extraction process

香青兰(*Dracocephalum moldavica* L.)是唇形科青兰属的植物, 主要分布在中国华北、东北、西北等地区, 尤其是在内蒙古和新疆地区资源丰富。香青兰药用部分含有丰富的黄酮类、萜类、苯丙素类等成分, 迄今为止确定的黄酮类化合物种类约 37 种^[1]。目前, 人们以新疆香青兰为研究

对象, 对总黄酮提取物(简称“香青兰总黄酮”)的生物活性和药理作用展开了多项研究。研究显示, 香青兰总黄酮具有多种药理作用, 可保护心肌, 改善、调节血液流变性, 抗心衰, 抗动脉粥样硬化, 降血脂, 抗肿瘤, 增强机体免疫力^[1-4]。进一步研究显示, 香青兰总黄酮的多种药理作用主要基

基金项目: 包头医学院科研专项博士启动基金项目(BYJJ-BSJJ 202008)

作者简介: 陈丽, 女, 硕士生 E-mail: 2236444086@qq.com *通信作者: 和彦苓, 女, 硕士, 教授 E-mail: hyl1961@vip.sina.com
靳敏, 女, 博士, 副教授 E-mail: beautyjinmin2011@126.com

于黄酮类化合物的抗氧化活性^[5-6]。而黄酮类化合物具体成分目前尚不清楚。因此,香青兰总黄酮抗氧化活性研究越来越受到研究者的重视。

目前,香青兰总黄酮的提取制备方法主要有溶剂浸提法、溶剂回流法和超声辅助提取法。但是这些方法都是以新疆香青兰为研究对象,而不同的种植环境和种植方式会导致提取物活性成分不同及活性成分含量不同^[7]。本研究以内蒙古香青兰为研究对象,选用溶剂回流法,通过单因素试验法结合响应面法优化总黄酮提取物制备方法,并通过体外抗氧化试验筛选了抗氧化活性成分,并对抗氧化活性成分进行化学组成分析,旨在为内蒙古香青兰进一步的研究奠定基础。

1 材料

1.1 试剂与药材

内蒙古地区种植香青兰于2021年购自上海科园信海通医药有限公司;芦丁对照品(上海市源叶生物科技有限公司,批号:T20N11Z131674;纯度>98%);田蓟苷、迷迭香酸、木犀草素、芹菜素和金合欢素对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为W02M9Z60269, Y16A9K67403, A22GB141264, M29GB150104, B16O9T72591,质量分数均>98%);抗超氧阴离子自由基及产生超氧阴离子自由基试剂盒(批号:20210315)、羟基自由基测定试剂盒(批号:20210301)均购自南京建成生物工程研究所;乙腈和甲酸均为色谱纯;其他试剂均为分析纯;实验用水均为娃哈哈纯净水。

1.2 仪器与设备

MVmini-1240 紫外可见分光光度计、MFLC 二元高压色谱系统、IT-TOF-MS 质谱仪(日本岛津);SZCL-2 数显智能控温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司);SHZ-Ⅲ循环水真空泵(上海知信实验仪器技术有限公司);RE-2000A、RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);TYXH-漩涡混合器(姜堰市天仪电子仪器有限公司);MSE66S-OCE-DM 百万分之一电子天平(德国赛多利斯公司);SJIA-10N-50C 双嘉冷冻干燥机(宁波市双嘉仪器有限公司)。

2 方法

2.1 内蒙古香青兰总黄酮提取及总黄酮和总酚测定方法

称取2.0 g香青兰粉末于250 mL三口烧瓶内,加入100 mL 60%乙醇水溶液,在60℃,回流提取4 h。提取液经过减压抽滤得提取物滤液,滤液经

过40~45℃旋转蒸发浓缩,浓缩物在冻干机上冻干48 h后成粉末,即内蒙古香青兰总黄酮提取物。

提取物总黄酮的含量测定采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法^[8]。以芦丁质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(A)进行回归,得线性方程为 $A=1.228\ 2X+0.003\ 3(R^2=0.999\ 2)$ 。

提取物总酚的含量测定采用福林比色法^[9]。以没食子酸质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(A)进行回归,得线性方程为 $A=173.12X-0.144\ 9(R^2=0.997\ 8)$ 。

2.2 单因素试验

分别考察提取温度(30, 40, 50, 60, 70, 80℃)、乙醇体积百分数(30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%)、料液比(g:mL)(1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80)和提取时间(1, 2, 3, 4, 5, 6 h)对香青兰总黄酮提取率的影响。

2.3 响应面法设计

在单因素试验设计基础上以提取物中总黄酮含量为评价指标,选择对其影响显著的提取温度、料液比和乙醇体积百分数为3个因素,采用Design-Expert 8.0 软件进行Box-Behnken 试验设计^[10]。Box-Behnken 设计的试验点分布情况见表1。

表1 Box-Behnken 设计因素与水平

Tab. 1 Box-Behnken design factors and levels

水平	因素		
	提取温度/℃	料液比(g:mL)	乙醇体积百分数/%
-1	40	1:30	50
0	60	1:50	65
1	80	1:70	80

2.4 抗氧化活性成分的筛选

2.4.1 不同活性成分的提取 取干燥的香青兰植物粉末150 g,加体积分数65%的乙醇溶液1 500 mL浸泡过夜,60℃恒温水浴回流提取2 h,冷却至室温减压抽滤,残渣进行第2遍回流提取。合并2次提取滤液,滤液于45℃旋转浓缩至无醇味,浓缩后的悬浊液依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,分别旋转浓缩、冻干成粉,得石油醚活性成分、二氯甲烷活性成分、乙酸乙酯活性成分和正丁醇活性成分^[11]。

2.4.2 体外抗氧化试验 清除DPPH 自由基试验参考文献[12]的试验方法,稍作调整。ABTS 自由基清除试验参考文献[13]的试验方法。抑制羟基自

由基和抑制超氧阴离子自由基试验操作分别按照羟基自由基测定试剂盒说明书和抗超氧阴离子自由基及产生超氧阴离子自由基试剂盒说明书操作步骤进行。

2.5 抗氧化活性成分组成分析

2.5.1 供试品制备 精密称取乙酸乙酯活性成分 1 mg, 用 DMSO 溶解, 乙腈稀释成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经微孔滤膜($0.45 \mu\text{m}$)过滤, 即得。

2.5.2 色谱条件 色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶柱 Intertsil ODS-4 C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相 B 为 0.1% 甲酸水, 流动相 A 为乙腈; 梯度洗脱程序见表 2; 总流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为 330 nm, 色谱柱柱温为 35°C , 样品进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。

表 2 LC-MS 梯度洗脱程序及流动相比例

Tab. 2 LC-MS gradient elution procedures and mobile phase ratio

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	15	85
5	20	80
10	30	70
40	50	50
50	70	30
51	15	85
60	15	85

2.5.3 质谱条件 离子源 ESI, 扫描方式为正、负离子模式, 质量扫描范围 $\text{MS}^{1-2}(m/z 100 \sim 1100)$, 典型脱溶剂管(CDL)和加热模块温度为 200°C , 喷雾室毛细管电压为 4.5 kV, 检测电压 1.7 kV, 雾

化气(N_2)流量为 $1.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, CID 碰撞能量为 70%, 离子分离宽度为 3.0 M。数据采集及处理使用 LC-MS-Solution version 3.8 色谱工作站软件(日本岛津公司)。

3 结果与分析

3.1 提取方法的优化

3.1.1 单因素试验 提取温度、乙醇体积百分数、料液比和提取时间对香青兰总黄酮提取率影响结果见图 1。提取温度在 $30 \sim 60^\circ\text{C}$ 内, 提取率与提取温度呈正相关, 且提取温度为 60°C 时, 总黄酮提取率达到极大值, 为 4.50%。乙醇体积百分数对总黄酮提取率影响同样显著, 当乙醇体积百分数 $< 50\%$ 时, 水溶性黄酮易溶出^[14-15], 且在乙醇体积百分数为 40% 时得较大提取率 4.19%。当乙醇体积百分数 $> 50\%$ 时, 总黄酮提取率又逐渐上升, 乙醇体积百分数为 65% 时得最大提取率 4.50%; 当乙醇体积百分数 $> 65\%$ 时, 水溶性黄酮不易溶出, 而脂溶性杂质如色素、鞣质等的溶出增多, 导致提取物中黄酮含量降低^[16]。当料液比在 1:50 以下时, 随着溶剂占比增大, 总黄酮提取率逐渐上升; 当料液比在 1:50 以上, 随着溶剂占比增大, 总黄酮提取率有所下降, 这可能因为料液比到一定程度后, 已经浸出的总黄酮可能对未浸出的总黄酮有协同阻隔浸提作用^[17]。此外, 提取时间对抗氧化活性成分总黄酮含量的影响较小^[18-19]。随着提取时间的增加, 总黄酮提取率缓慢增加。因此, 最佳的提取条件为提取温度为 60°C , 乙醇体积百分数为 65%, 料液比 1:50, 提取时间为 4 h。单因素试验结果见图 1。

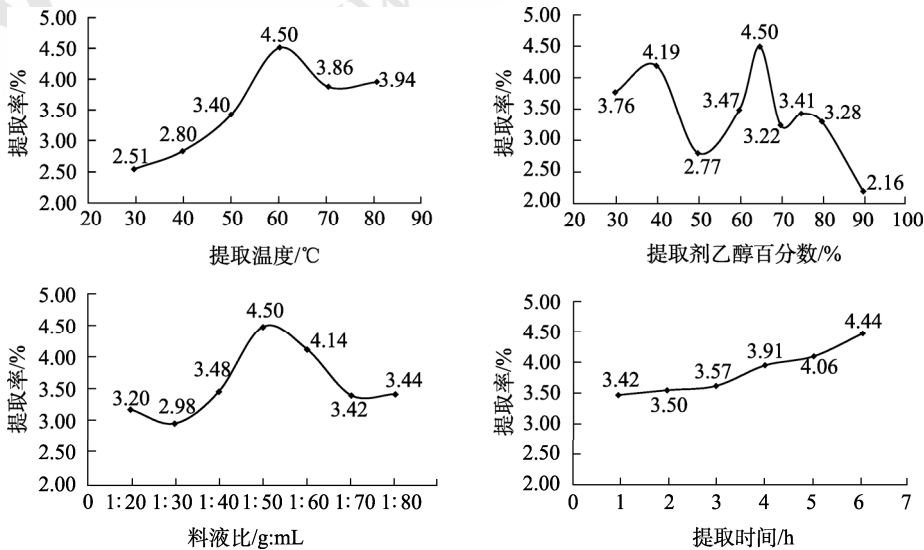


图 1 提取温度、乙醇体积百分数、料液比、提取时间对抗氧化活性成分总黄酮含量的影响

Fig. 1 Effects of extraction temperature, ethanol volume percentage, solid-liquid ratio and extraction time on the content of total flavonoids

3.1.2 响应面法优化试验结果及验证试验 通过 Design-Expert 8.0.6 程序辅助设计 Box-Behnken 3 因素 3 水平优化试验。试验设计与结果见表 3，方差分析见表 4。

表 3 Box-Behnken 响应面试验设计及结果

Tab. 3 Scheme and results of Box-Behnken response surface design

序号	A	B	C	实际总黄酮含量/%	预测总黄酮含量/%
1	-1	-1	0	3.83	3.76
2	1	-1	0	3.17	3.22
3	-1	1	0	4.63	4.58
4	1	1	0	3.92	3.99
5	-1	0	-1	4.05	4.21
6	1	0	-1	3.31	3.35
7	-1	0	1	4.45	4.41
8	1	0	1	4.30	4.14
9	0	-1	-1	3.39	3.30
10	0	1	-1	4.44	4.33
11	0	-1	1	3.92	4.03
12	0	1	1	4.50	4.59
13	0	0	0	4.88	4.74
14	0	0	0	4.72	4.74
15	0	0	0	4.65	4.74
16	0	0	0	4.77	4.74
17	0	0	0	4.68	4.74

注：A-乙醇体积百分数(%)；B-提取温度(℃)；C-料液比(g : mL)。
Note: A-ethanol volume percentage(%); B-extraction temperature(℃); C-solid-liquid ratio(g : mL).

表 4 多元回归模型方差分析

Tab. 4 Analysis of variance on multiple regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Model	4.58	9	0.51	25.03	0.000 2
A-乙醇体积百分数	0.64	1	0.64	31.43	0.000 8
B-提取温度	1.26	1	1.26	62.22	<0.000 1
C-料液比	0.49	1	0.49	24.12	0.001 7
AB	0.000 6	1	0.000 6	0.031	0.865 7
AC	0.087	1	0.087	4.28	0.077 2
BC	0.055	1	0.055	2.72	0.143 2
A ²	0.83	1	0.83	40.81	0.000 4
B ²	0.70	1	0.70	34.63	0.000 6
C ²	0.30	1	0.30	14.97	0.006 1
残差	0.14	7	0.020		
失拟项	0.11	3	0.037	4.48	0.090 7
纯误差	0.033	4	0.008 2		
总离差	4.72	16			
R ²	0.969 9				
R ² _{Adj}	0.931 1				

经回归拟合后，回归方程为提取率 $Y = -8.983\ 99 + 0.215\ 47A + 0.159\ 90B + 0.065\ 229C -$

$4.166\ 67 \times 10^{-5}AB + 4.916\ 67 \times 10^{-4}AC - 2.937\ 50 \times 10^{-4}BC - 1.972\ 22 \times 10^{-3}A^2 - 1.021\ 88 \times 10^{-3}B^2 - 6.718\ 75 \times 10^{-4}C^2$ ，由表 4 结果可知模型显著($P < 0.05$)，失拟项不显著， R^2 、 R^2_{Adj} 在可接受范围内，表明模型具有较高的拟合度和可信度；变异系数 $CV = 3.38\%$ 和精密度为 13.905 说明试验的可信度及精确度较好^[20-21]。由表 4 可知，该模型中一次项 A、B、C，二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对响应值的影响显著($P < 0.05$)，说明乙醇体积百分数、提取温度和料液比及其平方项对内蒙古香青兰总黄酮有较大影响^[22-23]。各因素的影响程度依次为乙醇体积百分数>提取温度>料液比。

交互项对响应值影响不显著，应进一步做响应面分析，结果见图 2。当乙醇体积百分数固定时，料液比和提取温度相互作用见图 2A。料液比一定时，随着提取温度改变，总黄酮得率先显著增大后降低；提取温度一定时，随着料液比改变，总黄酮得率先增加后降低，但降低不明显，该结果表明料液比和提取温度交互作用显著。当提取温度固定时，料液比和乙醇体积百分数相互作用见图 2B。料液比一定时，随着乙醇体积百分数改变，总黄酮得率先增大后显著降低；乙醇体积百分数一定时，随着料液比改变，总黄酮得率变化不大，响应面坡度较平缓。当料液比固定时，提取温度和乙醇体积百分数相互作用见图 2C。提取温度一定时，随着乙醇体积百分数改变，总黄酮得率先增大后降低；乙醇体积百分数一定时，随着提取温度改变，总黄酮得率先增大后趋于平缓。各因素响应面图中显示响应曲面开口向下，坡度变化陡峭，表明各因素间交互作用对总黄酮得率的影响都较为显著。通过分析回归模型，在各因素编码水平范围得到香青兰总黄酮提取的最佳条件为乙醇体积百分数为 62.66%，提取温度为 66.91℃，料液比为 1 : 57.56，在此条件下总黄酮提取率的预测值为 4.893%。为验证响应面 Box-Behnken 试验设计所得结果的可靠性，采用上述响应面法优化的提取条件进行验证试验。为实际操作方便，将提取条件调整为乙醇体积百分数为 63%，提取温度为 67℃，料液比为 1 : 58，重复进行 5 次试验，所得提取率分别为 4.69%，4.81%，4.75%，4.87%，4.74%，平均值为 4.77%，相对标准偏差为 1.45%，说明该条件下试验结果稳定，试验平均值与预测值的相差仅为 0.12%，说明该响应面优化

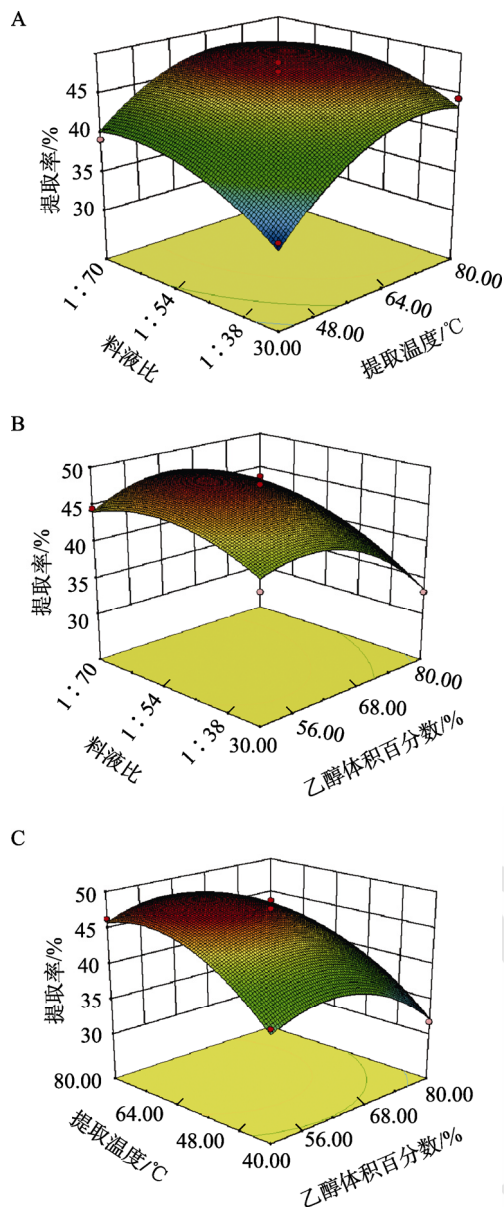


图2 各因素响应面图

A-料液比和提取温度对香青兰总黄酮含量的影响；B-料液比和乙醇百分数对香青兰总黄酮含量的影响；C-提取温度和乙醇体积百分数对香青兰总黄酮含量的影响。

Fig. 2 Response surface diagram of each factor

A-Effect of solid-liquid ratio and extraction temperature on total flavonoids content of *Dracocephalum moldavica* L.; B-effect of solid-liquid ratio and ethanol volume percentage on total flavonoid content of *Dracocephalum moldavica* L.; C-effect of extraction temperature and ethanol volume percentage on total flavonoid content of *Dracocephalum moldavica* L..

结果可靠。因此响应面法对蒙香青兰抗氧化活性成分最佳优化提取工艺为乙醇体积百分数为63%，提取温度为67℃，料液比为1:58，最终总黄酮得率为4.77%。

3.2 抗氧化活性成分的筛选结果

3.2.1 不同活性成分总黄酮和总酚含量

内蒙古香青兰总黄酮提取物的不同活性成分中总黄酮和

总酚含量大小存在差异，结果见表5。顺序为乙酸乙酯活性成分>正丁醇活性成分>二氯甲烷活性成分>石油醚活性成分。乙酸乙酯活性成分总黄酮和总酚含量最高。

表5 不同活性成分总黄酮和总酚含量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Tab. 5 Contents of total flavonoids and total phenols of different active components($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

不同活性成分	总黄酮含量/mg RE·g ⁻¹	总酚含量/mg GAE·g ⁻¹
石油醚活性成分	7.65±0.75	16.49±1.15
二氯甲烷活性成分	19.15±1.80	142.45±1.77
乙酸乙酯活性成分	65.04±1.89	511.05±5.98
正丁醇活性成分	50.13±1.98	294.38±2.10

3.2.2 不同活性成分抗氧化活性评价 以人工合成抗氧化剂二丁基羟基甲苯(0.1~10 mg·mL⁻¹)作为阳性对照物，比较分析香青兰总黄酮提取物不同活性成分的抗氧化能力。结果显示，各活性成分对DPPH自由基清除能力有差异，清除能力依次为乙酸乙酯活性成分、正丁醇活性成分、二氯甲烷活性成分和石油醚活性成分。此外，各活性成分清除ABTS自由基能力与清除DPPH自由基能力大小结果相似，其顺序为乙酸乙酯活性成分>正丁醇活性成分>二氯甲烷活性成分>石油醚活性成分，结果见表6。另外乙酸乙酯活性成分、正丁醇活性成分和石油醚活性成分清除羟基自由基能力均大于二丁基羟基甲苯清除能力，其中乙酸乙酯活性成分清除能力与正丁醇活性成分差异无统计学意义。乙酸乙酯活性成分和正丁醇活性成分均是清除羟基自由基的活性成分。乙酸乙酯活性成分和正丁醇活性成分清除超氧阴离子自由基能力均大于二丁基羟基甲苯($P<0.05$)，其中乙酸乙酯活性成分清除能力最强^[24]。综合上述体外抗氧化试验结果可得，乙酸乙酯活性成分是香青兰总黄酮抗氧化活性成分。

3.3 乙酸乙酯活性成分组成分析结果

笔者利用LC-MS-IT-TOF高分辨液质联用技术，通过化合物的保留时间、质谱数据、裂解规律及文献报道建立的化合物数据库等，对内蒙古香青兰总黄酮乙酸乙酯活性成分中主要化学成分进行初步的分析鉴定^[25-26]，结果见表7。LC-MS-IT-TOF高分辨率分析方法分析结果显示，该活性成分的抗氧化物质基础主要是酚酸类和黄酮类化合物^[27]。初步鉴定包括迷迭香酸、迷迭香酸甲酯、木犀草素、芹菜素、金合欢素、田蓟苷、芹菜素-7-O-β-D-葡

表 6 不同活性成分清除自由基能力($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Tab. 6 Free scavenging ability of active components($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

不同活性成分	DPPH 清除能力	ABTS 清除能力	羟基自由基清除能力	超氧阴离子自由基清除能力
石油醚活性成分	6.60±0.07	7.81±0.12	77.35±1.57	27.35±1.21
二氯甲烷活性成分	14.41±1.16	31.23±1.26	28.96±1.53	48.96±1.67
乙酸乙酯活性成分	76.63±1.89	97.99±1.98	100.41±1.99	98.41±1.57
正丁醇活性成分	38.30±1.65	59.19±1.87	100.20±1.81	89.20±1.94
二丁基羟基甲苯	42.15±1.55	64.76±0.25	39.43±1.43	52.43±1.06

表 7 香青兰抗氧化活性成分提取物的乙酸乙酯部位化学成分 LC-MS-IT-TOF 分析结果
Tab. 7 Results of LC-MS-IT-TOF analysis of chemical constituents of ethyl acetate extract of the antioxidant active components in *Dracocephalum moldavica* L.

序号	保留时间/min	分子离子峰(m/z)	理论分子式	误差	二级质谱碎片(m/z)	推测化合物
1	7.188	359.076 0[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	2.2	133.034 5, 161.028 7, 179.038 6 和 197.048 2	迷迭香酸
2	7.692	433.120 0[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	2.1	271.060 5	芹菜素-7- <i>O</i> - β -D-半乳糖苷或 芹菜素-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷
3	8.988	373.090 0[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	2.6	135.051 7, 161.028 7, 179.038 6 和 197.048 2	迷迭香酸甲酯
4	9.170	287.053 4[M-H] ⁻ 285.040 0[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	3.1	无二级质谱图	木犀草素
5	9.777	447.130 0[M+H] ⁺ 491.119 4[M+Ac] ⁻	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	2.1	正离子模式 285.080 0 和 270.054 6; 负离子模 式 283.060 0 和 270.054 6	田蓟苷
6	10.120	283.060 2[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	3.0	268.037 3	金合欢素
7	10.194	269.044 6[M-H] ⁻ 271.052 8[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	2.9	无二级质谱图	芹菜素
8	10.603	533.130 0[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	2.2	285.080 0, 270.054 6 和 242.057 5	金合欢素-7- <i>O</i> - β -D-(6"- <i>O</i> -丙二 酰基-葡萄糖基)-葡萄糖苷
9	11.603	489.140 0[M+H] ⁺ 533.131 4[M+Ac] ⁻	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	2.4	285.080 0, 270.054 6 和 242.057 5	藿香苷或其同分异构体

葡萄糖苷或芹菜素-7-*O*- β -D-半乳糖苷、金合欢素-7-*O*- β -D-(6"-*O*-丙二酰基-葡萄糖基)-葡萄糖苷、藿香苷或金合欢素-7-*O*-(3"-乙酰基)-葡萄糖苷或金合欢素-7-*O*-(4"-乙酰基)-葡萄糖苷共 12 个化学成分^[28-29]。本研究未检出相关文献中香青兰总黄酮乙酸乙酯活性成分的阿魏酸、咖啡酸和山柰酚等化合物,可能是由于其含量较低^[30-31]。此外,乙酸乙酯活性成分中可能还存在其他具有抗氧化活性的化合物,需要在后续研究中进一步分析确定。

4 讨论

本研究采用单因素试验结合响应面法优化内蒙古香青兰总黄酮提取方法,得到最优提取条件为乙醇体积百分数为 63%、提取温度为 67℃,料液比 1:58,最终总黄酮的提取率高达 4.77%,同时验证试验结果与预测值一致,表明最优工艺稳定可靠。单因素试验初步确立单个因素对总黄酮提取率的影响,为响应面法选取影响因素水平提供范围^[32]。响应面法具有试验次数少,试验周期短、精密度较高、可得到精度高的回归方程,还可通过直观的等高线图和三维立体考察影响因素之间的交互作用等优势^[33-34]。同时可通过方差分析得出各因素对总黄酮提取率的影响权重。

本实验结果显示,内蒙古香青兰总黄酮抗氧

化能力最强的是乙酸乙酯活性成分,且乙酸乙酯活性成分中总黄酮和总酚含量最高,含有迷迭香酸、迷迭香酸甲酯、木犀草素等酚酸类和黄酮类化合物。这主要是由于乙酸乙酯极性与香青兰中酚类化合物的极性相似,从而使这些化合物更易溶出^[35]。并且,迷迭香酸、木犀草素、芹菜素和金合欢素、田蓟苷等酚酸类和黄酮类化合物都具有很强的抗氧化活性。

综上所述,本研究建立了内蒙古香青兰总黄酮的提取方法,并研究得出乙酸乙酯活性成分是香青兰总黄酮抗氧化活性成分,包含迷迭香酸、木犀草素、芹菜素、金合欢素和田蓟苷等多种酚酸类和黄酮类化合物。

REFERENCES

[1] ZHANG H R. Chemical and bioactive studies on *Dracocephalum moldavica*[D]. Jinan: Shandong University, 2019.
[2] LIU J Y, LIU Y M. Research advance in chemical compositions and pharmacological effects of *Dracocephalum* [J]. Food Sci(食品科学), 2012, 33(13): 314-319.
[3] JIN M, YU H, JIN X, et al. *Dracocephalum moldavica* L. extracts protect H9c2 cardiomyocytes against H₂O₂-induced apoptosis and oxidative stress[J]. Biomed Res Int, 2020(2020): 8379358.
[4] NIE L L, LI R, HUANG J, et al. Abietane diterpenoids from

- Dracocephalum moldavica* L. and their anti-inflammatory activities *in vitro*[J]. Phytochemistry, 2021(184): 112680.
- [5] ZULPIYE A, YANG T, SHI W H, et al. Protective effect of total flavones of *Dracocephalum moldavica* L. on lung injury induced by hypoxic environment in rats[J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2019, 53(5): 88-92.
 - [6] FAN X M, CAO W J, XING J G, et al. Protective effect of total flavones from *Dracocephalum moldavica* against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2013, 35(8): 1625-1629.
 - [7] LU P F. Chemical compositions and antioxidant activity research between the wild and cultivated *Dracocephalum moldavica* L[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
 - [8] TIAN S G, LIU C, ZHOU X Y. Determination of the total flavonoid content in *Dracocephalum moldavica* L by spectrophotometry[J]. J Xingjiang Norm Univ Nat Sci Ed(新疆师范大学学报: 自然科学版), 1999, 18(2): 21-23.
 - [9] HOU Y, SHI J G, LI D, et al. Single factor combined with response surface methodology to optimize the determination method of total phenol content in Mongolia *Dracocephalum moldavica* L[J]. J Med & Pharm Chin Minor(中国民族医药杂志), 2018, 24(9): 46-49.
 - [10] ZHENG Q, CHEN B Y, YANG L, et al. Optimization of simultaneous extraction of polyphenols and flavonoids from black garlic by response surface methodology and determination of antioxidant activity[J]. China Condiment(中国调味品), 2021, 46(5): 69-76.
 - [11] TAN M H, YU B, GU Y M, et al. Effects of *Dracocephalum moldavica* on hyperlipidemia[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(21): 209-213.
 - [12] APROTOSOAIE A C, MIHAI C T, VOCHITA G, et al. Antigenotoxic and antioxidant activities of a polyphenolic extract from European *Dracocephalum moldavica* L[J]. Ind Crops Prod, 2016(79): 248-257.
 - [13] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 26(9/10): 1231-1237.
 - [14] ZHANG X J, SUN L Q, LUO A Q, et al. Optimization of extraction technology of water-soluble flavonoids and total polysaccharides from *Aurea helianthus* flower by response surface methodology[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2019, 40(15): 135-142.
 - [15] TIAN Y, ZHOU D, ZOU S Y, et al. Water soluble flavonoids from *Coreopsis tinctoria* flowers improve learning and memory ability in *D*-galactose-induced aging mice[J]. Food Sci(食品科学), 2019, 40(1): 162-168.
 - [16] YUNUSJAN TURAHUN, TURGHUN MUHAMMAD. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Dracocephalum molodtzevii* L.[J]. Food Sci(食品科学), 2012, 33(24): 72-76.
 - [17] ZHOU X J, GAO Y X, ZHANG X. Optimization of extraction technology of total flavonoids from *Hemerocallis citrina* by response surface method[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(16): 29-32.
 - [18] WANG X, LIU S P, CHENG Q, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from bamboo leaves by response surface methodology[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2018, 46(12): 75-78, 105.
 - [19] LI Y, ZHANG W, HE X F, et al. Optimization of ultrasonic extraction of total flavonoids from *Clematis tangutica* by response surface method[J]. Central South Pharm(中南药学), 2018, 16(6): 745-748.
 - [20] GUAN K K, WANG L, LI C C, et al. Optimization of extraction process for total flavonoids and total phenolic acids from *Spenceria ramalana* and their anti-oxidant, anti-bacterial activities[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2022, 44(1): 6-12.
 - [21] ZHAO Y Y, LI Q, ZHAO X L, et al. Optimization of preparation process of ZnO-curcumin nanoparticles by Box-Behnken response surface methodology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(19): 2349-2355.
 - [22] ZHANG Y F, XU Y Y, WEI J G, et al. Analysis on Huangshan kiwifruit's polyphenols' extraction technique through response surface optimization[J]. J Guangdong Univ Educ(广东第二师范学院学报), 2019, 39(3): 79-83.
 - [23] LIU Y, HU M Z, REN H J, et al. Study on the enzyme-assisted ultrasonic extraction process of total flavonoids in *Coriandrum sativum*[J]. China Condiment(中国调味品), 2019, 44(3): 102-106.
 - [24] CHEN J X. Study on antioxidant structure-activity relationship and mechanism of phenolic acids[D]. Taiyuan: North University of China, 2020.
 - [25] ZHENG G D, CHAO Y X, LUO M X, et al. Construction and chemical profile on "activity fingerprint" of citri reticulatae pericarpium from different cultivars based on HPLC-UV, LC/MS-IT-TOF, and principal component analysis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020(2020): 4736152.
 - [26] CAO Y, WANG C Q, XU F, et al. A semimicro quality evaluation method on *Panax notoginseng* and its application in analysis of continuous cropping obstacles research samples[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(20): 3773-3781.
 - [27] LIU Z J, YANG X B, SU F, et al. Determination of antioxidant activity, free total polyphenols contents and total flavonoids contents of bark extracts from Guttiferae plants[J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2016, 14(12): 3536-3543.
 - [28] TESIO A Y, ROBLEDO S N. Analytical determinations of luteolin[J]. Biofactors, 2021, 47(2): 141-164.
 - [29] LIN Y, SHI R X, WANG X, et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(7): 634-646.
 - [30] ZHANG J L, YAN R J, YU N, et al. A new caffeic acid tetramer from the *Dracocephalum moldavica* L[J]. Nat Prod Res, 2018, 32(3): 370-373.
 - [31] JIANG H L, ASHRAF G M, LIU M M, et al. Tilianin ameliorates cognitive dysfunction and neuronal damage in rats with vascular dementia via p-CaMKII/ERK/CREB and ox-CaMKII-dependent MAPK/NF- κ B pathways[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021(2021): 6673967.
 - [32] LUAN Q X, ZHAO Y, ZHOU X, et al. Optimization on extraction technology for *Eucommia ulmoides* by single-factor experiment combined with response surface methodology[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(5): 859-865.
 - [33] 樊根遥, 孙收杰. 响应面法在优化中药提取工艺中的应用[J]. 科技风, 2015(6): 139.
 - [34] LI L, ZHANG S, HE Q, et al. Application of response surface methodology in experiment design and optimization[J]. Res Explor Lab(实验室研究与探索), 2015, 34(8): 41-45.
 - [35] ZHU W Q. Identification and antioxidant interaction of endogenous phenolic compounds in tea seed oil[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.

收稿日期: 2022-06-02
(本文责编: 陈怡心)