

雪松松花粉总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性评价

辛安琪¹, 李婉玉^{1,2}, 王梦凡¹, 李 彬¹, 马趣环^{1,2}, 石晓峰^{1,2*}
(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省医学科学研究所, 甘肃 兰州 730050)

摘要: **目的** 优化雪松松花粉总黄酮提取工艺, 并评价其抗氧化活性。**方法** 在单因素试验基础上, 以提取温度、乙醇体积分数、料液比为影响因素, 总黄酮含量为评价指标, 正交试验优化提取工艺。测定提取物对 DPPH、ABTS、OH 自由基的清除率。**结果** 最佳条件为提取温度 90 ℃, 乙醇体积分数 75%, 料液比 1 : 30, 总黄酮含量为 13.441 mg/g。提取物对 DPPH、ABTS、OH 自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.53、0.183、2.911 mg/mL。**结论** 该方法稳定可行, 可用于提取抗氧化活性较强的雪松松花粉总黄酮。
关键词: 雪松; 松花粉; 总黄酮; 提取工艺; 抗氧化活性; 正交试验
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2025)08-2530-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.007

Optimization of extraction process for total flavonoids from *Cedrus deodara* pine pollen and evaluation of their anti-oxidant activity

XIN An-qí¹, LI Wan-yu^{1,2}, WANG Meng-fan¹, LI Bin¹, MA Qu-huan^{1,2}, SHI Xiao-feng^{1,2*}
(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Provincial Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730050, China)

KEY WORDS: *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don; pine pollen; total flavonoids; extraction process; anti-oxidant activity; orthogonal test

松花粉是马尾松 *Pinus massoniana* Lamb.、油松 *Pinus tabulaeformis* Carr. 及其他松属植物的干燥花粉, 其味甘, 性平, 无毒, 归肝、脾经, 具有收敛止血、燥湿敛疮功效^[1], 作为少见的食药兼用花粉品种, 具有抗氧化、抗衰老、免疫调节等多种药理作用^[2], 并且黄酮类成分丰富^[3], 可清除自由基、抗脂质过氧化^[4-7]、防治糖尿病^[8]、保肝护肝^[9]等, 其中发挥抗氧化作用的主要活性物质为黄酮^[10]。虽然松花粉资源分布广泛, 但目前研究较多的为马尾松、油松、云南松, 尚未涉及其他松属植物。

雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don 为松科雪松属常绿乔木^[11], 分布广泛, 资源丰富, 课题组前期研究表明, 其针叶中活性物质丰富, 具有良好的抗氧化活性^[12-14], 但花粉是否也有上述作用尚不

明确。本实验采用加热回流提取雪松松花粉中总黄酮^[15], 正交试验优化该工艺, 并评价其抗氧化活性, 以期为该药材进一步开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 药材 雪松松花粉采自甘肃天水, 经甘肃省医学科学研究所石晓峰主任药师鉴定为正品, 去除杂质、自然晾干后室温干燥避光保存。

1.2 试剂 芦丁对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 100080-202012)。亚硝酸钠 (批号 20180110)、硫酸亚铁 (批号 20181130)、水杨酸 (批号 20161025) (天津市科密欧化学试剂有限公司); 硝酸铝 (天津市凯信化学工业有限公司, 批号 20180425); 氢氧化钠 (批号 20180701)、乙醇 (批号 20230806) (天津市百世化工有限公司); 抗坏血酸 (国药集团化学试剂有限公司, 批号

收稿日期: 2024-10-07
基金项目: 甘肃省科技计划资助项目 (23CXGA0038); 甘肃省科技重大专项 (23ZDFA013-1); 兰州市人才创新创业大赛项目 (2023)
作者简介: 辛安琪 (1999—), 女, 硕士, 从事中药药效物质及其质量评价研究。Tel: 15684610970, E-mail: 15684610970@163.com
* 通信作者: 石晓峰 (1964—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药有效成分及其质量标准研究。Tel: (0931) 2302664, E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

F20181016); 30% 过氧化氢 (成都金山化学试剂有限公司, 批号 20180126); 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) (美国 Sigma 公司); 2, 2-联氮-二 (3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) (上海麦克林生化科技有限公司, 批号 C10379058)。其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

1.3 仪器 UV-1800 240V 型紫外分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); AE260 型电子分析天平 (万分之一) (瑞士 Mettler-Toledo 公司); CP225D 型电子分析天平 (十万分之一, 德国 Sartorius 公司); DZHW 型调温电热套 (北京市永光明医疗仪器厂); SK3310LHC 型超声波清洗仪 (上海科导超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 总黄酮含量测定 采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法^[16]。

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 70% 乙醇超声溶解, 定容, 摇匀, 即得 (质量浓度为 1 mg/mL)。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取药材 2.00 g, 共 3 份, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 40 mL 70% 乙醇, 在 70 ℃ 下回流提取 1 h, 重复 3 次, 过滤, 合并滤液, 挥干溶剂, 70% 乙醇复溶, 定容至 25 mL, 即得。

2.1.3 线性关系考察 分别精密量取 “2.1.1” 项下对照品溶液 0.25、0.5、1、0.15、0.2、0.25 mL, 置于比色管中, 稀释至 5 mL, 加入 0.5 mL 5% 亚硝酸钠溶液, 静置 6 min, 加入 0.5 mL 10% 硝酸铝溶液, 静置 6 min, 加入 4 mL 4% 氢氧化钠溶液, 定容至 10 mL, 静置 15 min, 以空白样品为对照, 室温下在 508 nm 最大吸收波长处测定吸光度, 重复 3 次。以吸光度为纵坐标 (A), 对照品质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $A=3.959\ 5X+0.045$ ($R^2=0.999\ 3$), 在 0.05~0.5 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 取同一份供试品溶液, 按 “2.1.3” 项下方法测定吸光度 6 次, 测得其 RSD 为 1.96%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 精密称取同一批药材粉末 2.00 g, 共 6 份, 按 “2.1.2” 项下方法制备供试品溶液, 按 “2.1.3” 项下方法测定吸光度, 测得其 RSD 为 0.89%, 表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 按 “2.1.3” 项下方法测定吸光

度, 测得其 RSD 为 1.98%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取药材粉末 2.00 g, 共 6 份, 加入对照品适量, 按 “2.1.2” 项下方法制备供试品溶液, 按 “2.1.3” 项下方法测定吸光度, 计算回收率。结果, 芦丁平均加样回收率为 99.84%, RSD 为 0.98%。

2.2 单因素试验 精密称取药材 2.00 g, 在不同条件下提取, 过滤, 合并滤液, 溶剂挥干, 相应体积分数乙醇复溶, 定容至 25 mL, 吸取 0.5 mL, 按 “2.1.3” 项下方法测定吸光度, 计算总黄酮含量 Y , 公式为 $Y=nCV/m$, 其中 C 为提取液定容后质量浓度, V 为定容后溶液体积, n 为提取液稀释倍数, m 为药材质量。

2.2.1 乙醇体积分数 精密称取药材 2.00 g, 共 5 份, 每份平行 3 批, 分别用 20 倍量 70%、75%、80%、85%、90% 乙醇在 70 ℃ 下回流提取 3 次, 每次 1 h。

2.2.2 提取温度 精密称取药材 2.00 g, 共 5 份, 每份平行 3 批, 用 20 倍量 70% 乙醇分别在 60、70、80、90、100 ℃ 下回流提取 3 次, 每次 1 h。

2.2.3 提取时间 精密称取药材 2.00 g, 共 5 份, 每份平行 3 批, 用 20 倍量 80% 乙醇在 80 ℃ 下回流提取 3 次, 每次分别为 0.5、1、1.5、2、2.5 h。

2.2.4 料液比 精密称取药材 2.00 g, 共 5 份, 每份平行 3 批, 分别用 15、20、25、30、35 倍量 80% 乙醇在 80 ℃ 下回流提取 3 次, 每次 1 h。

2.3 正交试验 在单因素试验基础上, 以提取温度 (A)、乙醇体积分数 (B)、料液比 (C) 为影响因素, 总黄酮含量 (Y) 为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行设计, 因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平

Tab. 1 Factors and levels for orthogonal test			
水平	A 提取温度/℃	B 乙醇体积分数/%	C 料液比
1	70	75	1 : 20
2	80	80	1 : 25
3	90	85	1 : 30

2.4 抗氧化活性评价

2.4.1 溶液制备

2.4.1.1 DPPH 工作液 精密称取 DPPH 自由基 16 mg, 无水乙醇溶解后定容至 200 mL, 即得, 避光冷藏。

2.4.1.2 ABTS 工作液 分别精密称取 ABTS 自由基 96.1 mg、过硫酸钾 33.8 mg, 溶解定容至 25

mL，按 2：1 比例混匀，避光 12 h，临用时用无水乙醇稀释至吸光度为 0.6±0.1，即得。

2.4.1.3 OH 自由基检测试剂 精密称取硫酸亚铁 136 mg，溶于水中并定容至 100 mL，制成 9.0 mmol/L 溶液。精密称取水杨酸 124 mg，无水乙醇定容至 100 mL，制成 9.0 mmol/L 溶液。精密吸取 30% H₂O₂ 溶液 92 μL，纯化水定容至 100 mL，制成 9.0 mmol/L 溶液。

2.4.1.4 供试品溶液 将最优工艺下所得提取物烘干，75% 乙醇稀释成一定质量浓度，即得。

2.4.1.5 抗坏血酸溶液 精密称取抗坏血酸适量，75% 乙醇稀释成与供试品溶液相同的质量浓度，即得。

2.4.2 DPPH 自由基清除能力测定 将抗坏血酸和总黄酮依次稀释成 0.06、0.12、0.24、0.36、0.48、0.6、1.2 mg/mL 溶液，分别精密吸取 3 mL，置于 10 mL 离心管中，加入 3 mL DPPH 工作液，摇匀，室温避光反应 30 min，在 517 nm 波长处测定吸光度，计算 DPPH 自由基清除率，公式为清除率 = $\left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$ ，其中 A₀ 为 3 mL DPPH 工作液+3 mL 75% 乙醇吸光度，A₁ 为 3 mL DPPH 工作液+3 mL 总黄酮溶液吸光度，A₂ 为 3 mL 无水乙醇+3 mL 总黄酮溶液吸光度，再采用 SPSS 软件计算其 IC₅₀ 值。

2.4.3 ABTS 自由基清除能力测定 将抗坏血酸和总黄酮依次稀释成 0.06、0.12、0.18、0.3、0.48、0.6 mg/mL 溶液，分别精密吸取 1 mL，置于 10 mL 离心管中，加入 3 mL ABTS 工作液，摇匀，室温反应 10 min，在 734 nm 波长处测定吸光度，计算 ABTS 自由基清除率，公式为清除率 = $\left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$ ，其中 A₀ 为 3 mL ABTS 工作液+1 mL 75% 乙醇吸光度，A₁ 为 3 mL ABTS 工作液+1 mL 总黄酮溶液吸光度，A₂ 为 3 mL 无水乙醇+1 mL 总黄酮溶液吸光度，再采用 SPSS 软件计算其 IC₅₀ 值。

2.4.4 OH 自由基清除能力测定 将抗坏血酸和总黄酮依次稀释成 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3.5 mg/mL 溶液，分别精密吸取 2 mL，置于 10 mL 离心管中，加入 OH 自由基检测试剂各 2 mL，摇匀，37 ℃ 水浴反应 30 min，在 510 nm 波长处测定吸光度，计算 OH 自由基清除率，公式为清除率 =

$\left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$ ，其中 A₀ 为 75% 乙醇+反应液吸光度，A₁ 为样品+反应液吸光度，A₂ 为样品+反应液（水杨酸替换为纯水）吸光度，再采用 SPSS 软件计算其 IC₅₀ 值。

3 结果

3.1 单因素试验

3.1.1 乙醇体积分数 由图 1A 可知，随着乙醇体积分数增加，总黄酮含量呈先升后降的趋势，为 80% 时达到最大值，故确定 75%、80%、85% 作为正交试验水平。

3.1.2 提取温度 由图 1B 可知，随着提取温度增加，总黄酮含量呈先升后降的趋势，其原因可能是温度过低不利于该类物质溶出，而过高会破坏其结构而导致含量降低，为 80 ℃ 时达到最大值，故确定 70、80、90 ℃ 作为正交试验水平。

3.1.3 提取时间 由图 1C 可知，随着提取时间延长，总黄酮含量呈先升后降的趋势，但总体差距较小，为 1.5 h 时达到最大值，故确定为 1.5 h 并不再进行优化。

3.1.4 料液比 由图 1D 可知，料液比为 1：25 时，总黄酮含量达到最大值，故确定 1：20、1：25、1：30 作为正交试验水平。

3.2 正交试验 由表 2 可知，各因素影响程度依次为 A>B>C，最优工艺为 A₃B₁C₃，即提取温度 90 ℃，乙醇体积分数 75%，料液比 1：30。

表 2 正交试验设计与结果

Tab. 2 Design and results for orthogonal test					
试验号	A 提取 温度/℃	B 乙醇体积 分数/%	C 料液比	D(空白)	Y 总黄酮含量/ (mg·g ⁻¹)
1	70	75	1：20	1	9.954
2	70	80	1：25	2	9.473
3	70	85	1：30	3	10.370
4	80	75	1：25	3	11.703
5	80	80	1：30	1	10.124
6	80	85	1：20	2	8.238
7	90	75	1：30	2	13.368
8	90	80	1：20	3	13.016
9	90	85	1：25	1	11.301
K ₁	9.932	11.676	10.403	10.459	—
K ₂	10.023	10.870	10.826	10.360	—
K ₃	12.562	9.970	11.287	11.697	—
R	2.603	1.701	0.884	1.337	—

按上述优化工艺进行 3 批验证试验，测得总黄酮平均含量为 13.441 mg/g，RSD<3%，表明该工艺稳定可行。

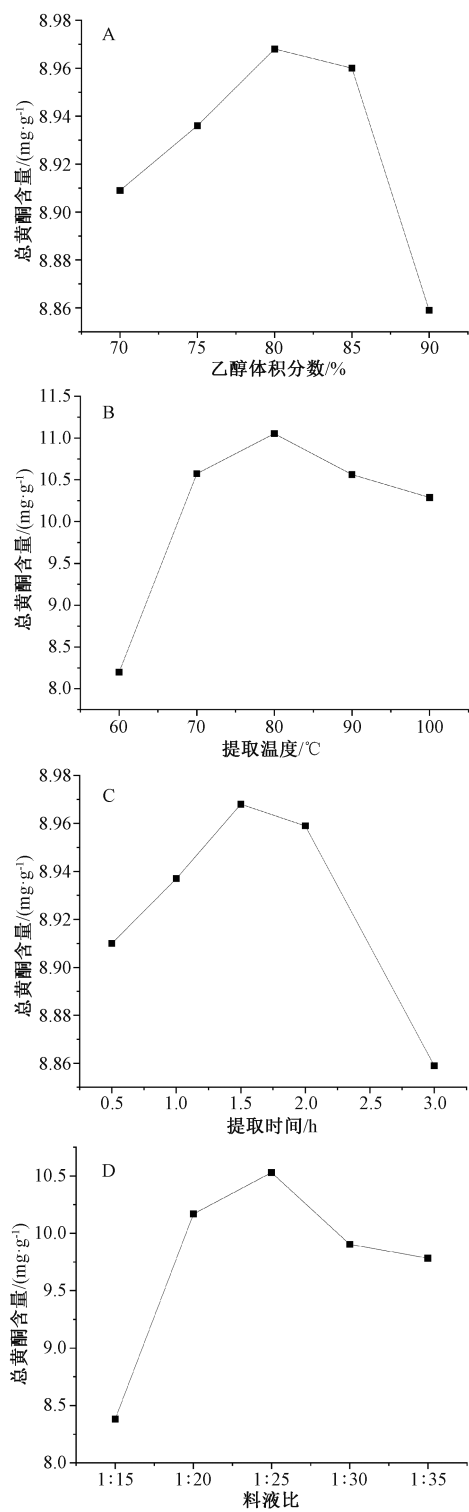


图 1 单因素试验结果
Fig. 1 Results for single factor test

3.3 抗氧化活性研究

3.3.1 DPPH 自由基清除能力 由图 2 可知，提取液对 DPPH 自由基的清除率与其质量浓度呈正相关性，其 IC₅₀ 值为 0.53 mg/mL。

3.3.2 ABTS 自由基清除能力 由图 3 可知，提取

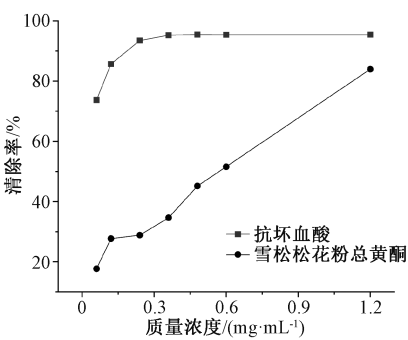


图 2 雪松松花粉总黄酮对 DPPH 自由基的清除率
Fig. 2 Scavenging rates of total flavonoids from *C. deodara* pine pollen on DPPH free radical

液对 ABTS 自由基的清除率与其质量浓度呈正相关性，其 IC₅₀ 值为 0.183 mg/mL，并且质量浓度为 0.6 mg/mL 时作用与抗坏血酸接近。

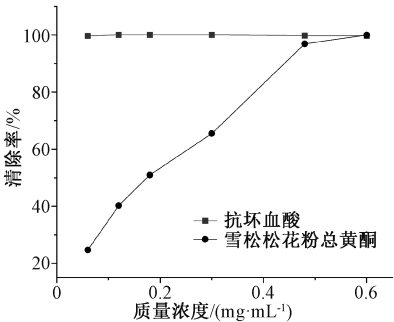


图 3 雪松松花粉总黄酮对 ABTS 自由基的清除率
Fig. 3 Scavenging rates of total flavonoids from *C. deodara* pine pollen on ABTS free radical

3.3.3 OH 自由基清除能力 由图 4 可知，提取液对 OH 自由基的清除率与其质量浓度呈正相关性，其 IC₅₀ 为 2.911 mg/mL，但作用明显弱于抗坏血酸。

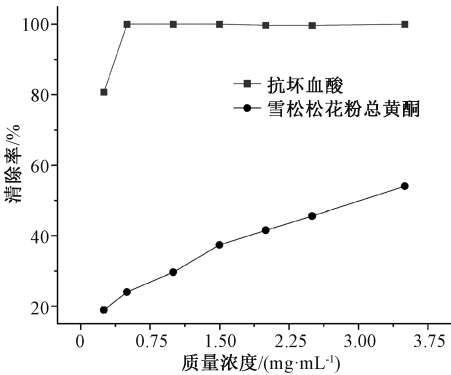


图 4 雪松松花粉总黄酮对 OH 自由基的清除率
Fig. 4 Scavenging rates of total flavonoids from *C. deodara* pine pollen on OH free radical

4 讨论与结论

抗氧化在生物体内具有至关重要的作用，其核心是维持氧化还原平衡，减少过多有害自由基，保护细胞免受氧化应激引起的损伤^[17]。氧化应激会导致多种慢性疾病，包括心血管疾病^[18]、糖尿病肾病^[19]、神经退行性疾病等^[20]，而且与细胞衰老、突变及凋亡密切相关。抗氧化剂能通过降低体内产生的过多活性氧及其他有害自由基水平，从而减少炎症反应和细胞损伤，在维持健康、预防疾病方面具有重要作用^[21]。

雪松作为松花粉的新型来源植物，其总黄酮含量较高，抗氧化能力较强，具有良好的开发潜力，但对成分组成及作用机制需作进一步研究。另外，雪松松花粉体内抗氧化活性尚未考察，故后续也应加以关注，以期全面评价其在保健预防方面的应用价值。

综上所述，本实验优化的雪松松花粉总黄酮提取工艺稳定可行，体外抗氧化活性良好，为其药理作用进一步研究奠定了基础，也为其他天然抗氧化剂开发利用提供了依据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 版[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：215.

[2] 李荣胜，付庆帅，郭俊红，等. 中药松花粉的化学成分及现代应用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报，2024，41(10)：1275-1286；1297.

[3] 秦玉琴，李羽晗，张 旭，等. 马尾松花粉的化学成分研究[J]. 华西药学杂志，2018，33(1)：13-16.

[4] 李 东，姚氏丽，张小勤，等. 微波辅助萃取法提取葛根总黄酮工艺优化[J]. 食品工业，2022，43(10)：19-23.

[5] 姜立春，张雨洁，蒋道玉，等. 响应面优化超声波微波协同提取猕猴桃茎黄酮工艺及抗氧化活性分析[J]. 四川大学学报（自然科学版），2024，61(3)：314-322.

[6] Peluso I, Miglio C, Morabito G, *et al.* Flavonoids and immune function in human: a systematic review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 55(3)：383-395.

[7] Calis Z, Mogulkoc R, Baltaci A K. The roles of flavonols/

flavonoids in neurodegeneration and neuroinflammation[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20(15)：1475-1488.

[8] 何婉如，张晓熙，徐长玉，等. 黄酮类化合物防治糖尿病及其并发症研究进展[J]. 浙江中医药大学学报，2024，48(2)：241-246.

[9] 黄爱招，李亦聪，梁超峰，等. 松花粉总黄酮对小鼠化学性肝损伤保护效应探析[J]. 世界中医药，2020，15(16)：2373-2376.

[10] 何小平，戴承恩，李海龙，等. 松花粉功能成分及马尾松花粉抗氧化性[J]. 食品工业，2022，43(5)：151-154.

[11] 郑万钧，傅立国. 中国植物志（第七卷）[M]. 北京：科学出版社，1978：167-203.

[12] 刘东彦，石晓峰，王 信，等. 甘肃产不同品种松针的抗氧化活性研究[J]. 林产工业，2024，61(1)：39-44.

[13] 马趣环，王 信，石晓峰，等. 雪松松针多糖的醇沉、脱蛋白工艺及抗氧化活性研究[J]. 林产化学与工业，2023，43(5)：81-88.

[14] 石晓峰，沈 薇，宁红霞，等. 雪松松针总多酚的纯化工艺和抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发，2016，28(8)：1325-1331.

[15] 李雪梅，陈 辉，李书国，等. 马尾松花粉中总黄酮类物质提取条件的研究[J]. 食品工业科技，2011，32(9)：264-266.

[16] Liu X M, Liu Y, Shan C H, *et al.* Effects of five extraction methods on total content, composition, and stability of flavonoids in jujube[J]. *Food Chem X*, 2022，14(6)：100287.

[17] Kandola K, Bowman A, Birch-Machin M A. Oxidative stress—a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics[J]. *Int J Cosmet Sci*, 2015, 37 Suppl 2：1-8.

[18] Mei Y, Thompson M D, Cohen R A, *et al.* Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2)：243-251.

[19] 翟艳会，梁永林，安 冬，等. 2 型糖尿病胰岛 β 细胞损伤机制的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志，2024，40(16)：2442-2446.

[20] Xie W L, Wan O W, Chung K K. New insights into the role of mitochondrial dysfunction and protein aggregation in Parkinson’s disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(11)：935-941.

[21] Pham-Huy L A, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health[J]. *Int J Biomed Sci*, 2008，4(2)：89-96.