罗汉松种子总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性

陈凌[1,2]，沙弋[3]，曹巧巧[2]，朱兴娜[2]
（1.浙江广厦建设职业技术大学，浙江 东阳 322100；2.嘉兴职业技术学院 现代农业学院，浙江 嘉兴 314036；3.中国美术学院 风景建筑设计研究院，杭州 310000）

摘要：目的 采用响应面法优化罗汉松种子总黄酮超声提取工艺，并考查总黄酮的抗氧化活性。**方法** 基于单因素试验，以料液比、超声时间、超声温度为自变量，以总黄酮得率和 DPPH 自由基的清除率为因变量，采用三因素三水平的响应面分析法，确定最佳提取工艺条件。**结果** 得到最佳工艺参数：在超声频率为 40 kHz、超声功率为 200 W 时，料液比（g/mL）为 1∶50、超声温度为 70 ℃、超声时间为 2.7 h，其理论预测值总黄酮得率为 27.54 mg/g（n=3，相对标准偏差为 1.63%）。当添加稀释 10 倍的总黄酮提取液 0.50 mL 时，对 DPPH 自由基的清除率达到 87.2%、对 Ce（IV）还原率达到 84.2%；当添加稀释 10 倍的总黄酮提取液 0.90 mL 时，对 OH 自由基的清除率为 88.1%。**结论** 采用响应面法优化得到的超声波辅助提取工艺稳定、可靠，可用于罗汉松种子总黄酮的提取。罗汉松种子总黄酮可作为优良的天然抗氧化剂资源。

关键词：罗汉松；响应面法；总黄酮；抗氧化活性
中图分类号：TS255.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1001-3563(2023)07-0158-10
DOI：10.19554/j.cnki.1001-3563.2023.07.018

Optimization of Extraction Process and Antioxidant Activity of Flavonoids from *Podocarpus Macrophyllus* Seeds

CHEN Ling[1,2], *SHA Yi*[3], *CAO Qiao-qiao*[2], *ZHU Xing-na*[2]
(1. Zhejiang Guangsha Vocational and Technical University of Construction, Zhejiang Dongyang 322100, China;
2. School of Modern Agriculture, Jiaxing Vocational & Technical College, Zhejiang Jiaxing 314036, China;
3. Design Institute of Landscape Architecture of China Academy of Art, Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: The work aims to optimize the ultrasonic extraction process of flavonoids from *Podocarpus macrophyllus* seeds by response surface methodology and investigate the antioxidant activity of flavonoids. Based on the single factor test, with the material liquid ratio, ultrasonic time and ultrasonic temperature as independent variables and the yield of flavonoids and DPPH radical scavenging rate as dependent variables, the best extraction process conditions were determined by three-factor and three-level response surface analysis. The optimal process parameters were ultrasonic frequency of 40 kHz, ultrasonic power of 200 W, material liquid ratio (g/mL) of 1:50, ultrasonic temperature of 70 ℃ and ultrasonic time of 2.7 h. The theoretically predicted yield of flavonoids was 27.54 mg/g (n=3, relative standard deviation of 1.63%). When 0.50 mL of flavonoids extract diluted 10 times was added, the DPPH radical scavenging rate was 87.2% and the reduction rate of Ce (IV) was 84.2%. When 0.90 mL of flavonoids extract diluted 10 times was added, the scavenging rate of OH was 88.1%. The ultrasonic assisted extraction process optimized by response surface methodology is

收稿日期：2022−10−21
基金项目：嘉兴市科技局项目（2018AY11013）
作者简介：陈凌（1962—），女，教授，主要研究方向为植物源食品抗氧化剂。

stable and reliable, and can be used to extract flavonoids from *Podocarpus macrophyllus* seeds. The flavonoids of *Podocarpus macrophyllus* seeds can be used as excellent natural antioxidant resources.

KEY WORDS: *Podocarpus macrophyllus*; response surface methodology; flavonoids; antioxidant activity

罗汉松，又名罗汉杉、土杉，学名 *Podocarpus macrophyllus*（Thumb.) D. Don，为裸子植物门罗汉松科的一属，为绿乔木，是我国国家二级保护植物，主要分布于热带、亚热带及南温带[1]。近年来国内外学者对罗汉松药材的成分和药理[2]进行了研究，研究发现其中的双黄酮类、芹菜素等成分具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化[3-5]、抗炎及对血液系统和神经系统等多方面的药理作用[6-8]。罗汉松花托汁对实验动物无明显的毒性反应作用，罗汉松实醇提物有降低血脂、护肝及抗氧化作用[5]。王全泽等[9]采用闪式提取法提取罗汉松叶中的总黄酮，刘睿等[10]采用正交试验法提取罗汉松叶总黄酮，张东峰[11]采用响应面优化方法提取罗汉松茎中总黄酮，黄凤音等[12]用正交试验法优化罗汉松果实中总黄酮的提取工艺。目前未见采用响应面法优化罗汉松种子总黄酮提取的研究，响应面法比正交试验法对提取工艺的研究更加精准。对罗汉松总黄酮含量的测定方法主要有 $NaNO_2$–Al^{3+}–NaOH 显色法（芦丁为对照）。当测量波长为 500 nm 时，某些黄酮类物质如槲皮素、山萘酚显色后在波长 500 nm 处无最大吸收，而酚酸在波长 500 nm 处有较强吸收，对于酚酸含量较高的样品，可能会得到虚高的测定值[13]；当测量波长为 253 nm 时，测量的线性范围太窄（芦丁质量浓度为 0.639 ~ 1.758 μg/mL[14]）。由于稀释倍数的增多和稀释倍数的不同，对单因素和中心组合试验的比较带来较大的测量误差。本研究以总黄酮得率（测量波长 500 nm）和对 DPPH 的清除率为因变量（以校正 $NaNO_2$–Al^{3+}–NaOH 显色法的虚高值），采用响应面法优化超声波辅助提取罗汉松种子总黄酮的工艺，并进行其抗氧化性试验，为罗汉松种子总黄酮的开发利用提供技术支撑。

1　试验

1.1　材料与仪器

主要材料：罗汉松种子采于 2018−07 嘉兴职业技术学院校园内，洗净、杀青 5 min 后，于 60 ℃下干燥，粉碎后储存于−26℃冰箱；无水乙醇、NaOH、$NaHCO_3$、浓 H_2SO_4、$NaNO_2$、$Al(NO_3)_3$、Na_2SO_4 均为分析纯，上海联试化工试剂有限公司；维生素 C，天津博迪化工股份有限公司；芦丁（纯度≥95.0%），国药集团化学试剂有限公司；1,1–二苯基–2–三硝基苯肼（DPPH，纯度为 98%），东京化成工业株式会社；果胶酶（酶活力≥50.0 μ/g），国药集团化学试剂有限公司；硫酸铈（AR），北京康普汇科技有限公司。

主要仪器：UV–1800PC 紫外可见分光光度计，上海色谱仪器有限公司；ATY224 分析天平，日本岛津；KQ5200B 超声仪，昆山市超声仪器有限公司；CR21N 高速冷冻离心机，日本日立；DK–S24 型恒温水浴锅，上海森信实验仪器有限公司；电热恒温干燥箱，上海精宏实验设备有限公司；JYS–MO1 九阳磨粉机，九阳股份有限公司；Millipore 超纯水仪，美国密理博公司。

1.2　方法

1.2.1　总黄酮的提取及总黄酮得率的测定

称取罗汉松种子粉末 2.500 g，在超声频率为 40 kHz，超声功率为 200 W 时，改变料液比、超声温度和超声时间浸提，浸提液冷冻离心后，取上清液定容至一定体积，采用 $NaNO_2$–Al^{3+}–NaOH 显色法测黄酮含量[15]，按式（1）计算罗汉松种子总黄酮得率。

$$X = \frac{c \times n \times V}{m} \tag{1}$$

式中：X 为总黄酮得率，mg/g；c 为总黄酮质量浓度，mg/mL；n 为提取液稀释倍数；V 为供试液体积，mL；m 为样品质量，g。

1.2.2　抗氧化性测定

DPPH 自由基清除率参照陈凌等[16]的方法测定；OH 自由基清除率参照陈凌等[17]的方法测定；Ce(IV) 的还原率参照陈凌等[17]的方法测定。

1.2.3　单因素试验

以总黄酮质量浓度（吸光度大则浓度大，后文则用总黄酮吸光度表示总黄酮质量浓度）和 DPPH 清除率为指标，固定料液比（g/mL）为 1∶20、超声温度为 30 ℃、超声时间为 1 h，考查提取溶剂，如超纯水、超纯水+果胶酶（0.6 g/L）、95%乙醇、正丁醇、乙酸乙酯、丙酮对总黄酮吸光度的影响；固定提取溶剂的类型，设定超声温度为 40 ℃、超声时间为 1.5 h，考查料液比（g/mL）分别为 1∶10、1∶20、1∶30、1∶40、1∶50 时对总黄酮吸光度和抗氧化性的影响（浸提后，上清液稀释到相同体积，测总黄酮吸光度和对 DPPH 的清除率）；固定提取溶剂类型，设定料液比（g/mL）为 1∶40、超声温度为 70 ℃，考查超声时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 时对总黄酮吸光度和抗氧化性的影响；固定提取溶剂类型，设定料液比（g/mL）为 1∶40、超声时间为 2.5 h，考查超声温度分别为 50、60、70、80 ℃时对总黄酮吸光度和抗氧化性的影响。

1.2.4 响应面试验

在单因素试验的基础上，选取对总黄酮含量和 DPPH 清除率影响较大的料液比（*A*）、超声时间（*B*）、超声温度（*C*）3 个因素，采用 Box–Behnken 中心组合设计了三因素三水平的优化试验，试验因素及水平见表 1。

表 1 试验因素与水平
Tab.1 Test factors and levels

水平	料液比(*A*)/($g·mL^{-1}$)	超声时间(*B*)/h	超声温度(*C*)/℃
−1	1∶30	2.0	60
0	1∶40	2.5	70
1	1∶50	3.0	80

1.3 数据处理

所有试验均平行 3 次，用 Excel 2010 对试验数据进行记录和处理，采用 Origin 9.0 软件作图、Design–Expert 8.0.6 软件对试验进行设计及分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取溶剂

由表 2 可知，极性大的溶剂提取的总黄酮吸光度大，超纯水浸提总黄酮的吸光度最大。提取黄酮类物质常用的溶剂有丙酮、甲醇、乙醇等，但由于丙酮、甲醇的毒性较大，一般多采用乙醇为提取溶剂。据文献报道，体积分数为 90%以上的乙醇适于提取大多数极性较小的游离黄酮，体积分数为 70%的乙醇适于提取黄酮苷类和极性较大的游离黄酮（如羟基黄酮、双黄酮等）[18]。纯水提取罗汉松种子总黄酮吸光度最大，说明罗汉松种子总黄酮主要是极性较大的游离黄酮，且水经济易得，安全性高，因此提取溶剂选用水。

表 2 提取溶剂对罗汉松种子总黄酮含量的影响
Tab.2 Effect of extraction solvent on the concentration of flavonoids in *Podocarpus macrophyllus* seeds

提取溶剂	总黄酮提取液的吸光度/($L·g^{-1}·cm^{-1}$)
超纯水	0.516±0.002
超纯水+酶	0.227±0.003
乙醇(95%)	0.101±0.002
正丁醇	0.021±0.002
乙酸乙酯	0.060±0.001
丙酮	0.047±0.001

2.1.2 料液比

由图 1a 可知，随着料液比的增加总黄酮吸光度和对 DPPH 的清除率先升后降，料液比（g/mL）为 1∶40 时，总黄酮吸光度和对 DPPH 的清除率最大。因为溶剂用量少，与物料接触不充分，黄酮类物质提取不完全，总黄酮吸光度小，随着溶剂用量的增加，物料和溶剂充分接触，黄酮类物质溶出量增大，但提取溶剂用量太大时可能使其他杂质溶出，导致总黄酮吸光度下降[19]。总黄酮吸光度大对 DPPH 的清除率就大，因此两者的变化一致。故选择料液比（g/mL）为 1∶40，这与黄凤音等[12]的研究结果一致。

2.1.3 超声时间

由图 1b 看出，随着超声时间的增加总黄酮吸光度和 DPPH 的清除率先增后降，在 2.5 h 时清除率最大。原因是超声波具有较强的声冲流和声空化作用，能加速细胞壁的破碎[20]，从而使黄酮类物质溶出率增大。超声时间进一步延长时，一方面机械的振动作用破坏黄酮的结构，另一方面与空气接触时间长，部分黄酮被氧化，从而使总黄酮的浓度降低。提取液的抗氧化性主要来自总黄酮，因此 DPPH 清除率的变化与总黄酮吸光度的变化相同。综上，选择超声时间为 2.5 h。

2.1.4 超声温度

从图 1c 得出，随超声温度的升高总黄酮吸光度先增后减，70 ℃时吸光度达到最大，这是因为温度升高会加速罗汉松种子中黄酮类物质溶出，但过高的温度会造成黄酮类物质被氧化、分解或缩合[21]，并且加速其他杂质的溶出，从而导致总黄酮吸光度降低。提取液对 DPPH 清除率随温度的升高而增加，这是因为超声温度高于 70 ℃时虽然总黄酮的吸光度下降，但是高温有利于抗氧化多糖溶出，所以提取液的抗氧化性不随黄酮吸光度的减小而降低。两者综合，选择超声温度为 70 ℃。温度是影响黄酮得率的一个重要因素，罗汉松黄酮提取工艺的研究目前未见对温度的考查。

2.2 响应面法优化罗汉松总黄酮提取工艺

2.2.1 Box–Benhken 试验设计及结果

以料液比（*A*）、超声时间（*B*）、超声温度（*C*）为自变量，以总黄酮得率（Y_1）和 DPPH 的清除率（Y_2）为因变量，采用 Box–Behnken 中心组合设计了三因素三水平的优化试验，试验设计及结果见表 3。

2.2.2 回归模型的建立与显著性分析

利用 Design–Expert 8. 0. 6 软件对表 3 试验的 Y_1 和 Y_2 响应值拟合，得回归模型的模拟方程：

$$Y_1=27.73-0.025A+3B+2.28C-0.7AB-1.38AC+0.53BC-1.28A^2-3.38B^2-12.68C^2$$

$$Y_2=68.73+0.81A+7.36B+5.18C+2.38AB-3.4AC-7BC+3A^2-9B^2-20.83C^2$$

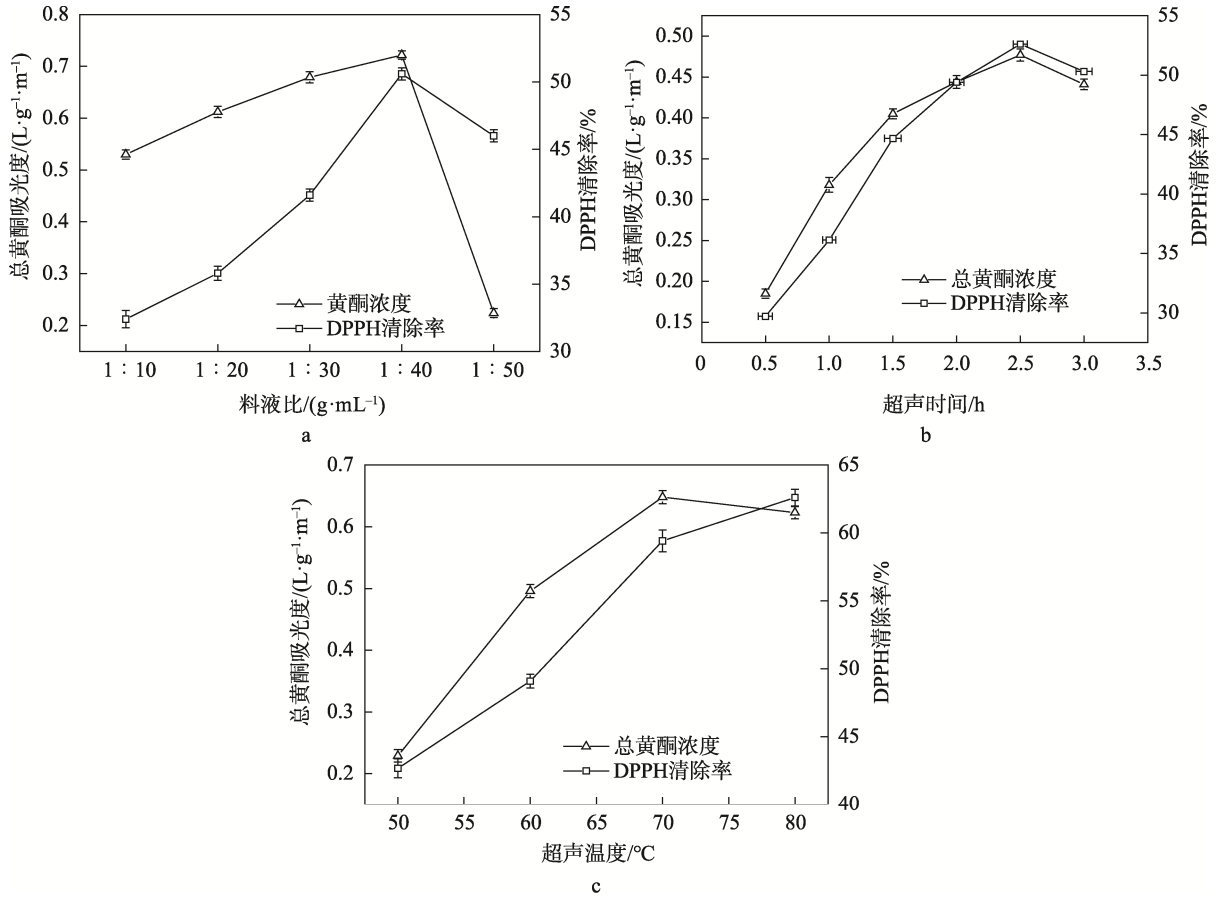


图 1　各因素对总黄酮吸光度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.1 Effect of various factors on concentration of flavonoids and DPPH radical scavenging rate

表 3　Box-Behnken 试验设计及响应值

Tab.3 Design and response values of Box-Behnken test

序号	料液比（A）	超声时间（B）	超声温度（C）	总黄酮得率（Y_1）/(mg·g^{-1})		DPPH 的清除（Y_2）率/%	
				实测值	预测值	实测值	预测值
1	−1	−1	0	18.7	18.88	56.9	56.93
2	−1	1	0	19.9	20.38	53.4	53.8
3	1	−1	0	26.9	26.43	67.3	66.9
4	1	1	0	25	24.83	73.3	73.28
5	0	−1	−1	9	10.15	41	41.51
6	0	−1	1	12	12.85	49.8	49.94
7	0	1	−1	18.3	17.45	58.8	58.66
8	0	1	1	15.8	14.65	54	53.49
9	−1	0	−1	7.8	6.47	19.9	19.36
10	1	0	−1	12.1	11.42	48.2	48.09
11	−1	0	1	9.3	9.97	43.6	43.71
12	1	0	1	15.7	17.02	43.9	44.44
13	0	0	0	28.5	27.73	67.6	68.73
14	0	0	0	27.5	27.73	69.7	68.73
15	0	0	0	27.2	27.73	68.9	68.73

由表 4 可知，该模型极显著（P<0.001），失拟项不显著（F>0.05），说明该模型与实际结果拟合性很好。模型的总黄酮校正相关系数 R^2_{Adj}=0.963 3，表明响应值 Y_1 有 96.33%受模型中所涉及的各因素的影响。模型的总黄酮相关系数 R^2=0.986 9，相对标准偏差（RSD）为 7.73%，说明响应值 Y_1 与模型预测的试验结果相匹配。模型的 DPPH 校正相关系数 R^2_{Adj}=0.996 3，表明响应值 Y_2 有 99.63%受模型中所涉及的各因素的影响。模型的 DPPH 相关系数 R^2=0.998 7，变异系数（CV）为 1.59%，说明响应值 Y_2 与模型拟合度良好，进一步说明该模型的可靠性。由 F 值可判断各因素对总黄酮得率和 DPPH 清除率的影响程度，F 值越大，影响越强。对总黄酮得率影响因素的顺序从大到小为超声时间（B）、超声温度（C）、料液比（A），对 DPPH 清除率的影响顺序同总黄酮得率的影响顺序。

2.2.3　响应曲面分析

响应面为响应值与两两交互因素所构成的三维空间曲线图，响应曲面越陡峭表示该因素对响应值 Y 的影响越显著[22]。与响应面相对应的等高线越密集形成椭圆形或马蹄形，表示两因素交互作用越强，反之则形成圆形[23]。如图 2—3 所示，对总黄酮得率及 DPPH 的清除率的影响因素 B、C 之间的交互作用很强。

2.2.4　试验结果验证

通过 Design–Expert 8.0.6 软件，以总黄酮得率和对 DPPH 的清除率为指标分析确定了最佳工艺参数：在超声频率为 40 kHz、超声功率为 200 W 时，料液比（g/mL）为 1∶47、超声温度为 70.4 ℃、超声时间为 2.7 h，理论预测总黄酮得率为 27.53 mg/g，对 DPPH 的清除率为 72.8%。结合实际操作过程中仪器设备的可行性，将提取工艺参数修正为料液比（g/mL）为 1∶50、超声时间为 2.7 h、超声温度为 70 ℃，总黄酮平均得率为 27.54 mg/g（n=3，RSD 值为 1.63%）。修正后的值与预测值非常接近，证明该结果合理可靠。

2.3　罗汉松种子总黄酮体外抗氧化能力

2.3.1　对 DPPH 自由基的清除能力

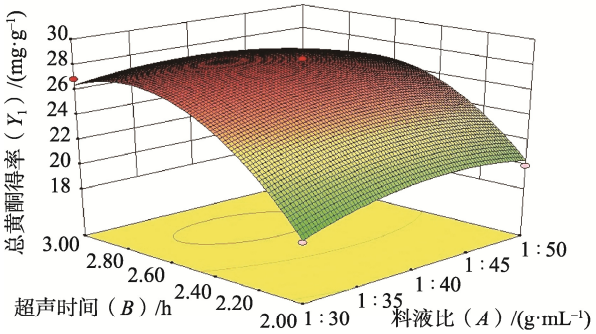
从图 4a 可知，稀释 10 倍的罗汉松种子总黄酮提取液对 DPPH 的清除率大于质量分数为 0.05%的维生素 C 对 DPPH 的清除率。当添加量为 0.50 mL 时，总黄酮提取液对 DPPH 的清除率为 87.2%，质量分数为 0.05%的维生素 C 对 DPPH 的清除率为 77.3%。在质量浓度为 0~34.4 μg/mL 时，罗汉松种子总黄酮对 DPPH 自由基

表 4　Y_1 和 Y_2 二项式回归模型系数显著性检验

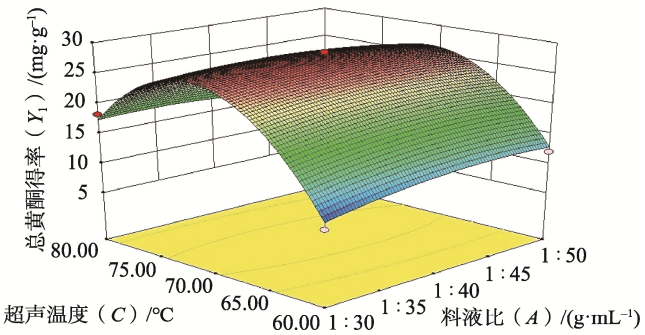
Tab.4 Significance test of coefficients in binomial regression model of Y_1 and Y_2

方差来源	总黄酮得率（Y_1）					DPPH 的清除率（Y_2）				
	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	748.35	9	83.15	41.78	0.000 4**	2 821.53	9	313.5	419.78	<0.000 1**
A	5.00×10^{-3}	1	5.00×10^{-3}	2.51×10^{-3}	0.962	5.28	1	5.28	7.07	0.044 9*
B	72	1	72	36.17	0.001 8**	433.65	1	433.65	580.65	<0.000 1**
C	41.41	1	41.41	20.8	0.006 1**	214.24	1	214.24	286.87	<0.000 1**
AB	2.4	1	2.4	1.21	0.322	22.56	1	22.56	30.21	0.002 7**
AC	7.56	1	7.56	3.8	0.108 8	46.24	1	46.24	61.91	0.000 5**
BC	1.1	1	1.1	0.55	0.490 2	196	1	196	262.44	<0.000 1**
A^2	6.04	1	6.04	3.04	0.141 9	33.14	1	33.14	44.37	0.001 2**
B^2	54.14	1	54.14	27.2	0.003 4**	299.35	1	299.35	400.83	<0.000 1**
C^2	593.58	1	593.58	298.23	<0.000 1**	1 601.92	1	1 601.92	2 144.95	<0.000 1**
残差	9.95	5	1.99			3.73	5	0.75		
失拟	9.02	3	3.01	6.49	0.136 4	1.49	3	0.5	0.44	0.748 6
纯误差	0.93	2	0.46			2.25	2	1.12		
总和	758.3	14				2 825.26	14			

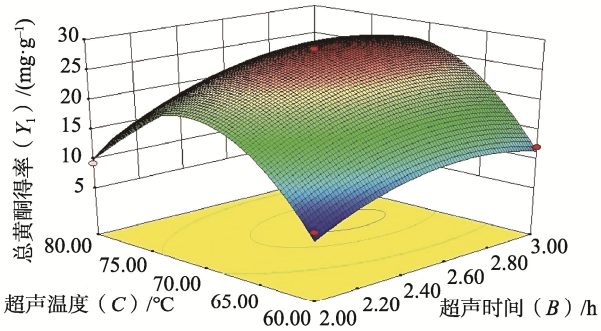
注：*表示差异显著，P<0.05；**表示差异极显著，P<0.01。



a 超声时间与料液比



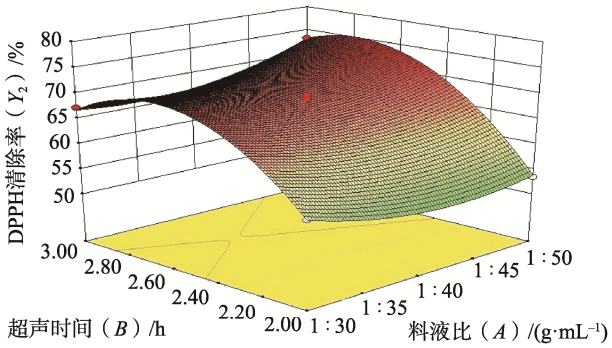
b 超声温度与料液比



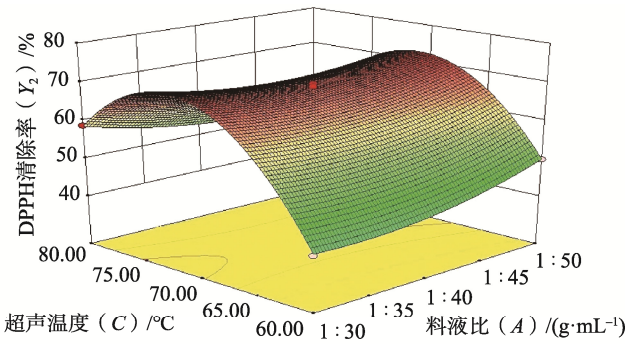
c 超声温度与超声时间

图 2　两因素交互作用对总黄酮得率的响应面

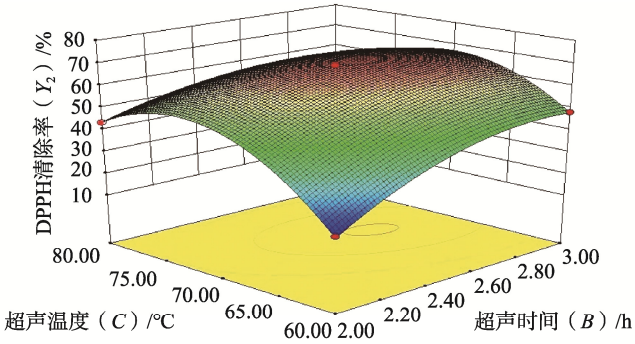
Fig.2 Response surface for the interaction of two factors on the yield of flavonoids



a 料液比与超声时间



b 料液比与超声温度



c 超声时间与超声温度

图 3　两因素交互作用对 DPPH 自由基清除率的响应面

Fig.3 Response surface for the interaction of two factors on DPPH radical scavenging rate

清除能力具有明显的剂效关系，罗汉松种子总黄酮和维生素 C 的半抑制浓度分别为 13.2 和 150.6 μg/mL，罗汉松种子总黄酮提取液对 DPPH 自由基清除的清除能力强于维生素 C 的。

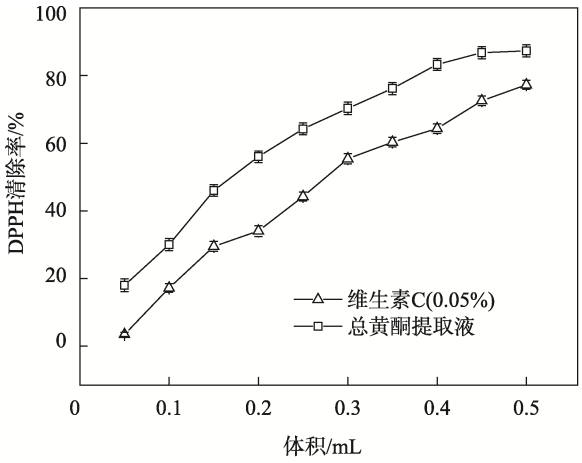
2.3.2　对 OH 自由基的清除能力

由图 4b 可知，稀释 10 倍的罗汉松种子总黄酮提取液添加体积为 0.1~0.7 mL 时，添加量越大，清除 OH 自由基的能力越强。添加量为 0.90 mL 时，总黄酮提取液对 OH 的清除率为 84.28%，质量分数为 0.02%的维生素 C 对 OH 的清除率为 61.96%。在质量浓度为 0~48.2 μg/mL 时，罗汉松种子总黄酮对 OH 自由基清除能力具有明显的剂效关系，罗汉松种子总黄酮和维生素 C 的半抑制浓度分别为 20.4 和 106.6 μg/mL，罗汉松种子总黄酮对 OH 自由基清除的清除能力强于维生素 C 的。

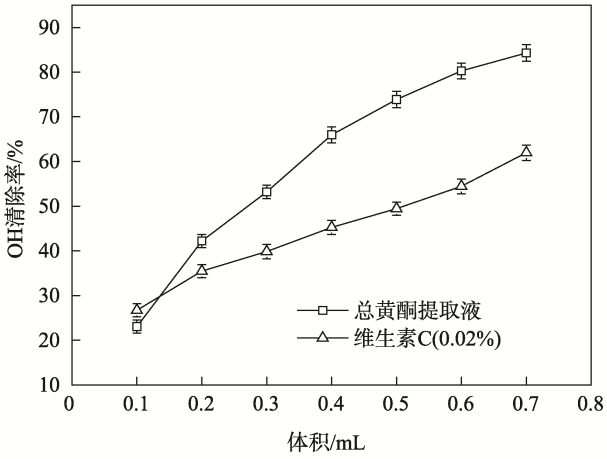
2.3.3　对 Ce(IV)的还原能力

从图 4c 看出，稀释 10 倍的罗汉松种子总黄酮添加体积为 0.05 ~ 0.5 mL 时，随着添加量的增加还原能力增强。当添加量为 0.05 mL 时，总黄酮提取液对 Ce(IV)还原率为 84.2%，质量分数为 0.05%的维生素 C 对 Ce(IV)还原率为 47.3%。在质量浓度为 0~34.4 μg/mL 时，罗汉松种子总黄酮对 Ce(IV)的还原能力具有良好的剂效关系，罗汉松种子总黄酮和维生素 C 的半抑制浓度分别为 15.4 和 277.4 μg/mL，罗汉松种子总黄酮对 Ce(IV)的还原能力强于维生素 C 的。

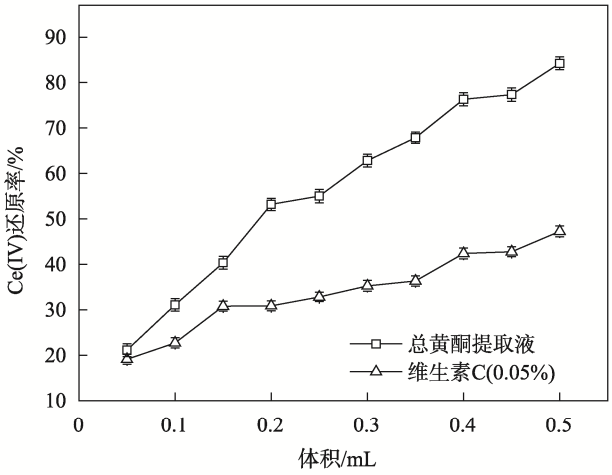
以上对 DPPH 自由基、OH 自由基清除率和对 Ce(IV)还原率测定结果表明，罗汉松种子总黄酮具有较强的抗氧化活性，抗氧化性强于维生素 C 的，罗汉松种子总黄酮对 DPPH 自由基、OH 自由基的清除能力强于罗汉松叶总黄酮的[9,11]，也强于罗汉松总二萜的[24]。罗汉松种子总黄酮对 DPPH 自由基、OH 自由基的清除力与对 Ce(IV)的还原力存在一定的差异性，可能与不同的抗氧化体系考察的抗氧化活性的不同有关。



a



b



c

图 4　罗汉松种子总黄酮与不同体积分数的维生素 C 的抗氧化性比较

Fig.4 Comparison of antioxidant activity between flavonoids in *Podocarpus macrophyllus* seeds and Vc with different volume fractions

3　结语

溶剂浸提法是实际生产中提取活性成分最传统的方法之一，因操作简单，其应用范围较为广泛。由于罗汉松种子总黄酮有较强的极性，水是一种良好溶剂，选择水为提取溶剂，对人体健康安全。

Box–Behnken Design 克服了正交试验只能给出每个试验因素的最佳组合，而无法找出整个区域内的因素最佳组合和最优响应值的缺点，使用方便、计算比较简便、优选条件预测性好。根据单因素试验采用Box–Behnken Design对罗汉松种子总黄酮的提取工艺进行优化，得出最佳提取工艺条件：在超声频率为 40 kHz、超声功率为 200 W 时，以水为提取剂、料液比（g/mL）为 1∶50、超声时间为 2.7 h、超声温度为 70 ℃，此条件下总黄酮平均得率为 27.54 mg/g（n=3，RSD 值为 1.63%），表明此最佳工艺可行。

抗氧化试验表明，罗汉松种子总黄酮具有较好的清除 DPPH 自由基、OH 自由基和还原 Ce(IV)的能力，在所试浓度范围呈现了较好的剂效关系。罗汉松种子总黄酮具有较强的抗氧化活性，其抗氧化性强于维生素 C 的，可作为优良的天然食品抗氧化剂和保健食品资源。

参考文献：

[1] FENG Zhe-ling, ZHANG Le-le, ZHENG Yuan-dong, et al. Norditerpenoids and Dinorditerpenoids from the Seeds of Podocarpus Nagi as Cytotoxic Agents and Autophagy Inducers[J]. Journal of Natural Products, 2017, 80(7): 2110-2117.

[2] 潘翠柳，甄汉深，丘琴，等. 广西产罗汉松不同药用部位的紫外-可见光谱鉴别研究[J]. 广西中医药大学学报, 2017, 20(2): 62-65.
PAN Cui-liu, ZHEN Han-shen, QIU Qin, et al. Identification of Different Medicinal Parts of Podocarpus from Guangxi by UV-Vis Spectroscopy[J]. Journal of Guangxi University of Chinese Medicine, 2017, 20(2): 62-65.

[3] 周燕. 罗汉松实醇提物对人胃癌细胞的抑制作用研究[D]. 湖北：湖北中医药大学, 2015.
ZHOU Yan. The Inhibitory Effects of *Podocarpus* Seeds and Its Tray Extract on Human Gastric Cancer Cells[D]. Hubei: Hubei University of Chinese Medicine, 2015.

[4] 隗磊. 罗汉松实种托醇提物降血脂、抗氧化及保肝作用的研究[D]. 武汉：湖北中医药大学, 2015.
KUI Lei. Study on Hypolipidemic, Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Alcohol Extracts from Podocarpus Podocarpus Seedlings[D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2015.

[5] 韦锦梅，陆梅元，韦秀梅，等. 罗汉松茎中总黄酮的提取工艺优化及其含量测定[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(18): 98-101.
WEI Jin-mei, LU Mei-yuan, WEI Xiu-mei, et al. Optimization of Extraction Technology and Content Determination of Total Flavonoids from Podocarpus Macrophyllus (Thunb.) D. Don[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2019, 58(18): 98-101.

[6] 黄增琼，林彩琴，庞逸敏，等. 罗汉松实急性毒性和亚慢性毒性实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(18): 2593-2595.
HUANG Zeng-qiong, LIN Cai-qin, PANG Yi-min, et al. Experimental Research on the Acute and Subchronic Toxicity of Podocarpus Macrophyllus Fruit[J]. China Industrial Economics, 2017, 27(18): 2593-2595.

[7] HWANG I W, CHUNG S K. Isolation and Identification of Myricitrin, an Antioxidant Flavonoid, from Daebong Persimmon Peel[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2018, 23(4): 341-346.

[8] NIU Qing, GAO Yu-mei, LIU Ping-huai. Optimization of Microwave-Assisted Extraction, Antioxidant Capacity, and Characterization of Total Flavonoids from the Leaves of Alpinia Oxyphylla Miq[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2020, 50(1): 82-90.

[9] 王全泽，袁堂丰，刘磊磊，等. 响应面法优化闪式提取罗汉松总黄酮及其抗氧化活性[J]. 精细化工, 2018, 35(1): 65-71.
WANG Quan-ze, YUAN Tang-feng, LIU Lei-lei, et al. Optimization of Flash Extraction of Total Flavonoids from Leaves of Podocarpus Macrophyllus by Response Surface Method and Their Antioxidant Activity[J]. Fine Chemicals, 2018, 35(1): 65-71.

[10] 刘睿，马家宝，陆峥琳，等. 不同产地罗汉松叶总黄酮提取工艺的优化与含量测定[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(20): 141-144.
LIU Rui, MA Jia-bao, LU Zheng-lin, et al. Optimization

of Extraction Process and Determination of Total Flavonoids in Leaves of Podocarpus Macrophyllus (Thunb.)D. Don from Different Origin[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(20): 141-144.

[11] 张东峰. 响应面优化罗汉松总黄酮提取工艺及其抗氧化性研究[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(7): 63-67.
ZHANG Dong-feng. Study on Optimization of Extraction Technology of Flavonoids from Podocarpus Macrophyllus by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(7): 63-67.

[12] 黄凤音, 甄丹丹, 丘琴, 等. 正交试验法优选罗汉松果实中总黄酮的提取工艺[J]. 广西中医药, 2018, 41(2): 69-71.
HUANG Feng-yin, ZHEN Dan-dan, QIU Qin, et al. Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids from Podocarpus Podocarpus Fruit by Orthogonal Test[J]. Guangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 41(2): 69-71.

[13] 热毛先, 热增才旦, 周加本, 等. 藏药甘青青兰总黄酮含量测定方法对比研究[J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(6): 49-51.
RE Mao-xian, RE Zeng-cai-dan, ZHOU Jia-ben, et al. Comparative Study on the Determination Methods of Total Flavonoids in Tibetan Medicine Dracocephalum Tanguticum Maxim[J]. Journal of Medicine and Pharmacy of Chinese Minorities, 2021, 27(6): 49-51.

[14] 刘欣宇, 吕玉媛, 林乐珍, 等. 罗汉松种子总黄酮含量测定[J]. 中国药业, 2020, 29(23): 21-23.
LIU Xin-yu, LYU Yu-yuan, LIN Le-zhen, et al. Content Determination of Total Flavonoids in the Seed of Podocarpus Macrophyllus[J]. Chinese Hospital Management, 2020, 29(23): 21-23.

[15] 陈凌, 骆卢佳, 曹巧巧, 等. 马齿苋不同溶剂提取物对核桃油的抗氧化动力学研究[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(11): 39-44.
CHEN Ling, LUO Lu-jia, CAO Qiao-qiao, et al. Antioxidant Kinetics Research of Different Solvent Extracts from Portulaca Oleracea L.on Walnut Oil[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(11): 39-44.

[16] 陈凌, 曹巧巧, 张建群. Box–Behnken 中心组合设计优化酶法提取马齿苋多糖的工艺[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 500-506.
CHEN Ling, CAO Qiao-qiao, ZHANG Jian-qun. Optimization on Enzymatic Extraction of Polysaccharides from Portulaca Oleracea L. by Box-Behnken Central Composite Design[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2020, 36(2): 500-506.

[17] 陈凌, 贺伟强, 曹巧巧. 干与鲜马齿苋多糖抗氧化动力学研究[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(9): 143-146.
CHEN Ling, HE Wei-qiang, CAO Qiao-qiao. Study on Antioxidant Kinetics of Dried and Fresh Portulaca Oleracea Polysaccharides[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(9): 143-146.

[18] 郑玉蓉, 吴慧仪, 潘素静, 等. 罗汉松叶中总黄酮的提取与纯化富集工艺研究[J]. 广东药学院学报, 2017, 33(1): 23-27.
ZHENG Yu-rong, WU Hui-yi, PAN Su-jing, et al. Extraction and Purification of Total Flavonoids from the Leaves of Podocarpus Macrophyllus by D101 Macroporous Resin[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2017, 33(1): 23-27.

[19] WANG G, CUI Q. Negative Pressure Cavitation Based Ultrasound-Assisted Extraction of Main Flavonoids from Flos Sophorae Immaturus and Evaluation of Its Extraction Kinetics[J]. Separation & Purification Technology, 2020(244): 115805.

[20] MEGATELI S, KREA M. Enhancement of Total Phenolic and Flavonoids Extraction from Rosmarinus Officinalis L Using Electromagnetic Induction Heating (EMIH) Process[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants: an International Journal of Functional Plant Biology, 2018, 24(5): 889-897.

[21] 卓微伟, 李凤, 胡君. 响应面法优化超声辅助提取肉豆蔻总黄酮工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(19): 126-133.
ZHUO Wei-wei, LI Feng, HU Jun. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Flavonoids from Nutmeg by Response Surface and Its Antioxidant Activity Analysis[J]. Food Research and Development, 2021, 42(19): 126-133.

[22] 吴进东, 董欣华, 朱旺生, 等. 霍山石斛花总黄酮微波辅助提取工艺的优化[J]. 中成药, 2021, 43(7):

1704-1707.
WU Jin-dong, DONG Xin-hua, ZHU Wang-sheng, et al. Optimization of Microwave-Assisted Extraction Process for Total Flavonoids from Dendrobidium Huoshanense Flowers[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2021, 43(7): 1704-1707.

[23] GHORBEL-BELLAAJ O, HAJJI S, YOUNES I, et al. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Waste with Bacillus Pumilus A1 Using Response Surface Methodology[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 61: 243-250.

[24] 袁堂丰，瞿利民，郭婕. 响应面法优化罗汉松总二萜提取及抗氧化研究[J]. 中南林业科技大学学报，2019, 39(6): 114-120.
YUAN Tang-feng, QU Li-min, GUO Jie. Response Surface Methodology for Optimization of Extracting Total Diterpenoids from Podocarpus Macrophyllus and Their Antioxidant Activity[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2019, 39(6): 114-120.

责任编辑：曾钰婵