

响应面法优化井栏边草总黄酮提取工艺 及其提取物的生物活性^①

张亚芬¹, 管杨洋¹, 钟茂程^{1,2},
陈旭波¹, 童应鹏³, 杨 晖¹, 骆争荣¹

1. 丽水学院 生态学院, 浙江 丽水 323000; 2. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088;
3. 台州学院 高等研究院 天然产物与健康产品研究所, 浙江 台州 318000

摘要:为了更好地开发利用井栏边草总黄酮,利用微波辐射预处理材料,用硝酸铝作为显色剂来测定总黄酮质量分数,并通过响应面法优化汽化剂用量、微波功率和微波辐射时间3个提取工艺参数.通过CCK-8法检测乙酸乙酯提取物对人结肠腺癌细胞(RKO)、人回盲肠癌细胞(HCT8)、肺癌细胞(A549)和肝癌细胞(HepG2)4种癌细胞的毒性.结果表明,微波辐射预处理提取井栏边草总黄酮的最优条件为汽化剂用量5 mL,微波功率630 W,微波辐射时间90 s,此条件下总黄酮得率为37.916 mg/g.井栏边草乙酸乙酯提取物对4种癌细胞的抑制程度各有不同,对RKO、A549和HepG2的抑制率随着浓度的增加而上升,对HCT8抑制作用较弱,样品浓度对抑制率几乎没有影响.研究结果可以为井栏边草总黄酮的提取和活性研究提供参考.

关键词:井栏边草;总黄酮;微波辐射预处理;响应面法;抗癌细胞活性

中图分类号: R932

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2021)08-0066-08

井栏边草(*Pteris multifida* Poir),又名井口边草、凤尾草、乌脚鸡,属于凤尾蕨科植物,一般生长在井边、墙壁边缘、岩石缝隙或者灌木丛下方,资源丰富.据记载,井栏边草作为中草药的使用历史悠久,可以清热、去湿、消肿、止血,治疗扁桃体炎、肝炎等;畲族人民用来主治腹泻、肝炎、尿路感染等;现在临床上常将其根茎用于治疗糖尿病和抗肿瘤,抗肿瘤效果明显^[1-2].

黄酮类是井栏边草的主要活性成分,姜纪武等^[3]测出其总黄酮质量分数约为3.2%.胡浩斌等^[4-5]从井栏边草的根茎中分离得到了4个黄酮类化合物,分别是木香素(muxiangrine III)、槲皮素(queracetin)、5,2'-二羟基-7-甲氧基黄烷酮(dihydrochoidinin)、licoagrochalcone D.欧阳丹薇等^[6-7]通过乙醇回流从井栏边草中提取到了8种黄酮类成分,主要是芹菜素和木犀草素.舒积成等^[8-9]通过波谱分析分离得到的两种黄酮类成分,分别是新西兰牡荆苷和木犀草素-6-C- β -D-葡萄糖-8-C- β -D-木糖苷.

韦金育等^[10]通过体外抗肿瘤实验发现,稀释后的井栏边草浸膏对肝癌细胞有明显的抑制作用,抑制率为30%.王刚等^[11]通过小鼠移植性肿瘤体内实验发现,通过乙醇回流从井栏边草中提取到的物质可以很大程度上抑制体内移植的肉瘤株S180和肝癌细胞株H22的增殖,并且提高小鼠的胸腺指数.陈岩等^[12]采用MTT法研究发现井栏边草的乙酸乙酯提取物可以抑制人肝癌细胞株BLE-7402、小鼠黑色素瘤细胞株

① 收稿日期:2020-04-26

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFC1703903);浙江省教育厅一般科研项目(Y202045218);浙江省自然科学基金项目(LY20C030002).

作者简介:张亚芬,硕士,讲师,主要从事植物学的研究.

通信作者:陈旭波,高级实验师.

B16-BL6、人白血病细胞株 HL-60 的活性,并且抑制率与提取物的浓度呈正相关。

从前人的研究可以看出,井栏边草抗肿瘤活性与总黄酮有着较为密切的关系,但对其活性成分总黄酮的提取工艺研究较少,因此,本实验以井栏边草为材料,以余俊等^[13]实验得出的最佳井栏边草乙醇提取条件为基础,采用微波辐射预处理提取井栏边草总黄酮,测定总黄酮得率;利用响应面法优化汽化剂用量、微波功率、微波辐射时间等提取工艺参数;同时,对所获得的乙酸乙酯提取物进行抗癌细胞增值检测,为井栏边草的综合利用提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

井栏边草全株于 2018 年 1 月采自浙江省丽水市丽水学院校园,室外阴干后,粉碎,过 40 目筛,备用。无水乙醇、氢氧化钠和硝酸铝均由天津市大茂化学试剂厂提供,分析纯;磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清、DMEM 培养基、1%青霉素和 1%链霉素均购自美国 Hyclone 公司;芦丁,北京世纪奥科生物技术有限公司,高效液相色谱 HPLC $\geq 98\%$;亚硝酸钠,浙江省兰溪市化工试剂厂;胰蛋白酶,美国 GIBICO 公司。

本次实验所用肿瘤细胞为人结肠腺癌细胞(RKO)、人回盲肠癌细胞(HCT8)、肺癌细胞(A549)、肝癌细胞(HepG2),由丽水学院生态学院生态实验中心提供。

微波炉,Galanz, P70F20CN3P-SR(WO)型;紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司,UV752;循环水式多用真空泵,巩义市瑞力仪器设备有限公司,SHZ-95B;水浴锅,上海珂淮仪器有限公司,Grant SUB AQUA 12 PLUS;立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂, YXQ-LS-50SII;电子分析天平,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司,ME104;超净工作台,苏州净化设备有限公司,SW-CJ-2FD;烘箱,上海新苗医疗器械制造有限公司, DHG-9053BS-III;恒温培养箱,上海实验仪器有限公司, DHP060; CO₂ 培养箱,上海旦鼎国际贸易有限公司, Thermo Scientific 3110;倒置显微镜, Leica, DMI8 等。

1.2 实验方法

1.2.1 黄酮标准曲线的绘制

采用硝酸铝显色法^[14]绘制黄酮标准曲线。准确称取在 100 ℃干燥至恒质量的芦丁标准品 100 mg,用 75%的乙醇溶解并定容至 50 mL,用移液管准确吸取 10 mL,蒸馏水定容至 100 mL,制得浓度为 0.2 mg/mL 芦丁标准溶液。用移液管准确吸取 0.2 mg/mL 芦丁标准溶液 1,2,3,4,5,6 mL 分别置于 25 mL 容量瓶中,对照管用蒸馏水代替芦丁标准溶液,各加水至 6 mL,分别吸入 5% NaNO₂ 溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min,加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min,加入 4% NaOH 溶液 10 mL,用蒸馏水定容至刻度。摇匀,静置 15 min,在 510 nm 处测定吸光度。以芦丁浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.2 总黄酮的提取

精确称取井栏边草 5 g 放入玻璃培养皿中,边搅拌边加汽化剂(蒸馏水),使之湿润均匀,铺平,静置一段时间后,使汽化剂可以充分渗入细胞组织内,将充分湿透好的样品放入一定微波功率的微波炉中加热一段时间。将微波处理好的样品放入锥形瓶中,参考余俊等^[13]实验得出的最佳井栏边草乙醇提取法,加入 70%浓度的乙醇溶液,料液比为 1:20,置于 60 ℃恒温水浴提取 2 h,抽滤除渣,得黄酮提取液,待测。

1.2.3 总黄酮得率的测定

将井栏边草总黄酮提取液定容至 250 mL 后,用移液管吸取 1 mL 按照标准曲线测定方法进行显色反应,最后定容至 25 mL,重复 3 次,测定吸光度。依据标准曲线方程,求得总黄酮浓度。总黄酮得率(Y)计算公式为

$$Y = \frac{250 \times 25 \times C}{5}$$

式中,Y 为总黄酮得率,mg/g, C 为提取液总黄酮浓度,mg/mL。

1.2.4 单因素实验

参考王赵改等^[15]以井栏边草总黄酮得率为评价指标,选择微波辐射时间、微波功率、汽化剂用量分别

进行单因素实验,实验设计见表 1.

表 1 单因素实验

因 素	水 平
汽化剂用量/mL	0,2.5,5,10,20
微波功率/W	350,420,490,560,630,700
微波辐射时间/s	30,60,90,120,150

1.2.5 响应面法实验

根据单因素实验结果,以汽化剂用量(A)、微波功率(B)、微波辐射时间(C)3 个因素为自变量,以总黄酮得率为响应值,进行 3 因素 3 水平的中心组合实验,因素和水平见表 2.

表 2 Box-Behnken 因素水平及编码

水 平	因素和编码		
	A 汽化剂用量/mL	B 微波功率/W	C 微波辐射时间/s
—1	0	560	90
0	2.5	630	120
1	5	700	150

1.2.6 井栏边草总黄酮提取液乙酸乙酯提取物的获取

根据响应面法确定的最佳条件大量提取井栏边草总黄酮,用乙酸乙酯萃取,旋转蒸发,干燥后置于 4℃冰箱中备用.

1.2.7 井栏边草总黄酮提取液乙酸乙酯提取物抗癌效果实验

采用 CCK-8 法来测定井栏边草总黄酮提取液乙酸乙酯提取物对 RKO, HCT8, A549 和 HepG2 4 种癌细胞的抑制作用^[16].

1.2.8 实验数据处理

采用 Excel 2010 和 Design-Expert V 8.0.6.1 进行 Box-Behnken 实验设计、数据分析及图表绘制.

2 结果与分析

2.1 芦丁标准曲线绘制

芦丁标准曲线见图 1. 线性回归方程为 $y = 9.2009x + 0.0086$, $R^2 = 0.9989$, 具有较好的相关性.

2.2 单因素实验

2.2.1 汽化剂用量对总黄酮得率的影响

设定微波功率 630 W,微波辐射时间 60 s,考察汽化剂用量 0,2.5,5,10,20 mL 对井栏边草总黄酮得率的影响.由图 2 可知,随着汽化剂用量的增加,总黄酮得率是先下降后平缓,当汽化剂用量为 0 时,总黄酮得率最高,达到 32.622 mg/g.其原因可能是汽化剂用量的增加,游离在原料外的汽化剂吸收了部分微波,从而导致到达原料内部的微波能减少,降低了黄酮得率^[15].

2.2.2 微波功率对总黄酮得率的影响

汽化剂用量为 0 mL,微波辐射时间 60 s,考察微波功率 350,420,490,560,630,700 W 对井栏边草总黄酮得率的影响.由图 3 可知,微波功率过高或过低对井栏边草总黄酮得率均有一定的影响,微波功率达到 630 W 时所提取的总黄酮质量分数最大,为 32.662 mg/g.随着微波功率增加,样品受到的微波能量增大,细胞结构破坏程度加大,所提取到的黄酮质量分数增加;630 W 后,随着微波功率的继续增大,样品受

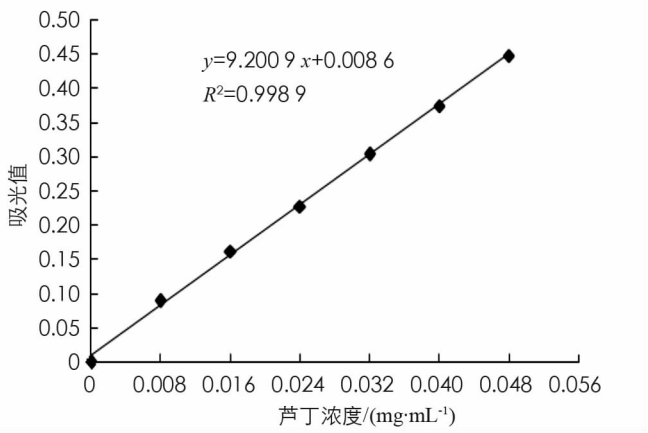


图 1 芦丁标准曲线

到的温度过高, 黄酮遭到破坏, 导致了井栏边草总黄酮得率反而下降.

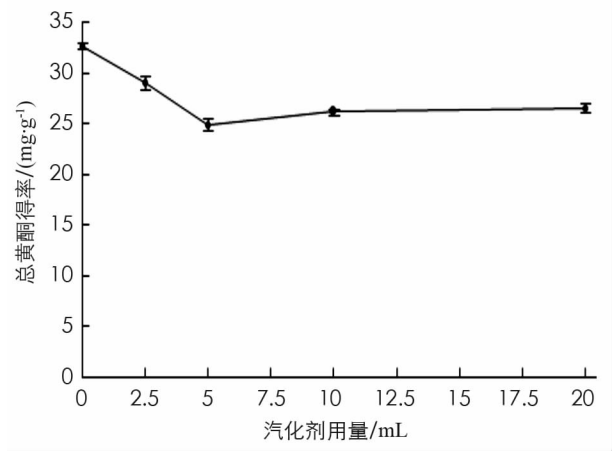


图 2 汽化剂用量对总黄酮得率的影响

2.2.3 微波辐射时间对总黄酮得率的影响

汽化剂用量为 0 mL, 微波功率为 630 W, 考察微波辐射时间 30, 60, 90, 120, 150 s 对井栏边草总黄酮得率的影响. 由图 4 可知, 总黄酮得率随着微波辐射时间的增加而呈上升趋势, 说明微波辐射时间的增加可以加剧井栏边草细胞壁的破坏, 使更多的黄酮溶入溶剂中. 当微波辐射时间为 180 s 时, 样品散发出焦味, 微波炉中有浓烟, 故放弃. 所以, 最佳微波辐射时间为 150 s, 此时, 黄酮得率为 35.870 mg/g.

2.3 响应面结果与分析

2.3.1 回归模型的建立与验证

采用 Design Expert 8.0.6.1 软件对表 3 数据进行多元回归拟合分析, 得到以总黄酮得率为响应值的回归方程: 总黄酮得率 $Y=35.26+0.24 A-0.59 B-1.24 C+0.99 AB-0.90 AC+0.19 BC+0.25 A^2-0.63 B^2+0.11 C^2$, 回归系数 $R^2=0.9312$, $R^2_{\text{adj}}=0.8427$, $CV=1.46\%$.

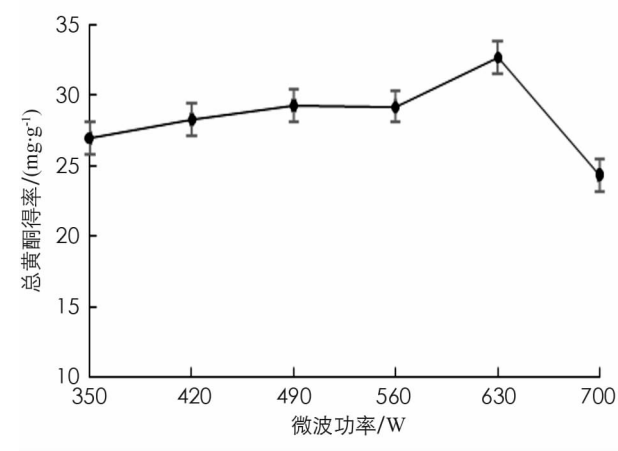


图 3 微波功率对总黄酮得率的影响

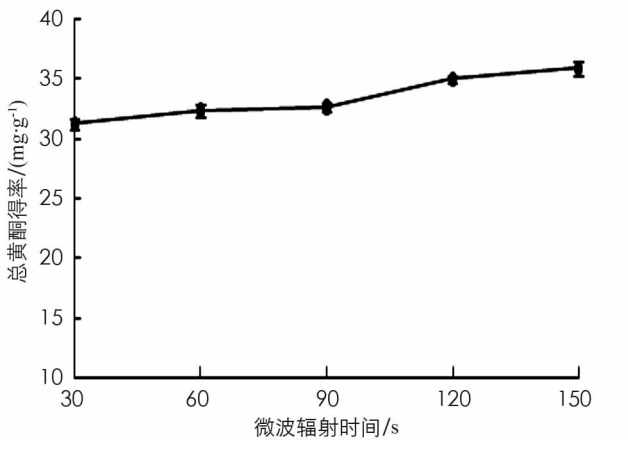


图 4 微波辐射时间对总黄酮得率的影响

表 3 井栏边草总黄酮响应面实验结果

序号	A 汽化剂用量 /mL	B 微波功率 /W	C 微波辐射时间 /s	总黄酮得率/(mg·g ⁻¹)	
				预测值	实验值
1	2.5	560	150	33.90	34.10±0.61
2	0	560	120	36.21	35.78±0.23
3	0	630	90	35.72	35.66±0.28
4	2.5	560	90	36.76	37.25±0.29
5	2.5	630	120	35.26	35.18±0.22
6	2.5	700	150	33.10	32.61±0.44
7	5	630	150	33.72	33.78±0.13
8	2.5	630	120	35.26	34.62±0.56
9	5	560	120	34.71	34.45±0.47
10	2.5	630	120	35.26	35.67±0.40
11	0	630	150	35.04	35.27±0.17
12	2.5	630	120	35.26	35.35±0.37
13	5	700	120	35.52	35.95±0.11
14	5	630	90	38.00	37.77±0.34
15	2.5	700	90	35.20	35.00±0.29
16	0	700	120	33.05	33.31±0.22
17	2.5	630	120	35.26	35.49±0.53

由表 4 可知,模型的 $p=0.002\ 6<0.01$,说明此二次方程模型差异有统计学意义.影响井栏边草总黄酮得率的因素由大到小依次为微波辐射时间、微波功率、汽化剂用量.一次项 C ,二次项 AB 、 AC 对黄酮得率影响有统计学意义($p<0.01$);一次项 B 、二次项 B^2 对黄酮得率达到统计学意义($p<0.05$).

表 4 回归模型方差分析

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	24.79	9	2.75	10.52	0.002 6
A	0.47	1	0.47	1.78	0.224 0
B	2.77	1	2.77	10.60	0.014 0
C	12.30	1	12.30	47.00	0.000 2
AB	3.94	1	3.94	15.06	0.006 1
AC	3.24	1	3.24	12.38	0.009 7
BC	0.14	1	0.14	0.55	0.481 8
A^2	0.25	1	0.25	0.97	0.358 0
B^2	1.70	1	1.70	6.48	0.038 3
C^2	0.05	1	0.05	0.20	0.664 8
残差	1.83	7	0.26		
失拟项	1.19	3	0.40	2.45	0.203 1
纯误差	0.65	4	0.16		
总和	26.62	16			

通过方程得到最优条件如下:汽化剂用量 5 mL,微波功率 641.83 W,微波辐射时间 90 s,理论上总黄酮得率为 38.019 mg/g.为了实验方便,对该条件进行修正,分别如下:汽化剂用量 5 mL,微波功率 630 W,微波辐射时间 90 s.以此优化条件进行验证,总黄酮平均得率为 37.916 mg/g,与理论值仅相差 0.103 mg/g(0.27%),说明修正条件可行.传统水浴条件下总黄酮平均得率为 36.194 mg/g,低于最优值.

2.3.2 响应面交互作用分析

2.3.2.1 汽化剂用量与微波功率的交互作用

图 5 为汽化剂用量和微波功率的交互作用对总黄酮得率的影响,曲面弧度明显,说明汽化剂用量和微波功率的交互作用显著,与方差分析所得结果相符合,且微波功率曲线变化幅度较汽化剂用量稍陡,说明了微波功率对总黄酮得率的影响略大.

2.3.2.2 汽化剂用量与微波辐射时间的交互作用

图 6 为汽化剂用量和微波辐射时间的交互作用对总黄酮得率的影响,曲面最高点在顶点上,说明随着汽化剂用量和微波辐射时间的增加,总黄酮得率先稍微下降再上升,汽化剂用量曲线变化平缓,微波辐射时间曲线较为陡峭,与方差分析结果一致.在一定辐射时间范围内,延长辐射时间可以使井栏边草中的黄酮更好地溶出.

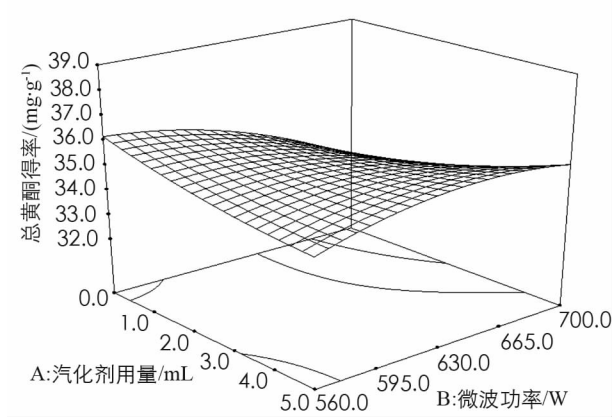


图 5 汽化剂用量和微波功率交互作用对总黄酮得率的影响

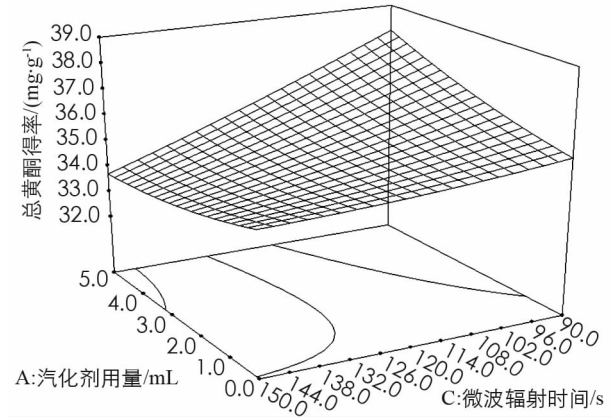


图 6 汽化剂用量和微波辐射时间交互作用对总黄酮得率的影响

2.3.2.3 微波功率与微波辐射时间的交互作用

图 7 为微波功率和微波辐射时间的交互作用对总黄酮得率的影响, 微波功率曲线先上升后下降, 变化弧度较平缓, 微波辐射时间曲线则随着时间增加而不断上升, 再次证明微波辐射时间对井栏边草总黄酮得率的影响要大于微波功率.

2.4 细胞活性实验结果

由图 8 可以看出, 井栏边草乙酸乙酯提取物均可抑制 RKO, HCT8, A549 和 HepG2 4 种癌细胞的活性, 且不同浓度配制液的抑制效果不同. 其中, 对 RKO 的抑制效果特别明显, 当提取物浓度为 200 mg/mL 时, 抑制率可以达到 95% 以上. 提取物浓度对 RKO, A549 和 HepG2 3 种癌细胞的抑制率在低浓度时变化较小, 但在高浓度时, 抑制率大小与样品浓度的高低具较好的线性关系, 对癌细胞的抑制率由大到小依次为 RKO, HepG2, A549. 井栏边草乙酸乙酯提取物对 HCT8 的抑制率较弱, 在实验浓度范围内, 其抑制率几乎不变.

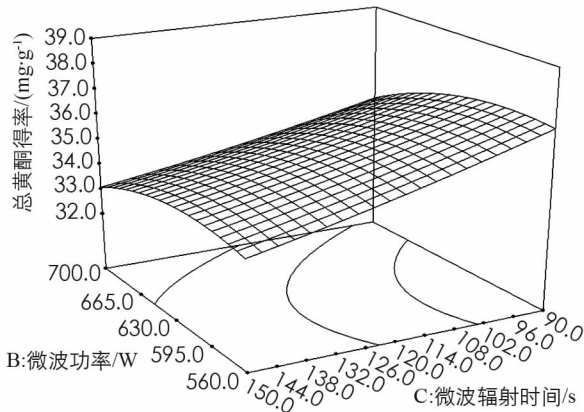


图 7 微波功率和微波辐射时间交互作用对总黄酮得率的影响

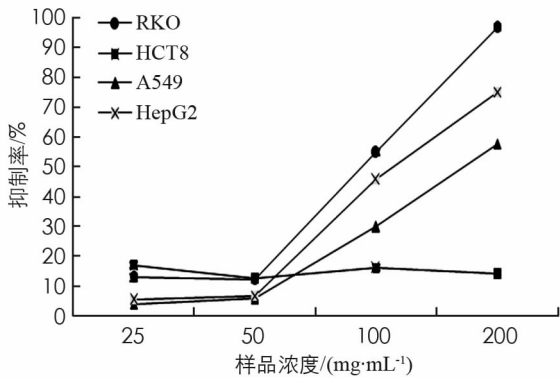


图 8 井栏边草总黄酮提取物乙酸乙酯提取物对 4 种癌细胞的抑制率

3 结论与讨论

微波处理可以破坏植物细胞壁, 使后续操作时植物中的活性物质能更好地溶出. 微波辅助提取降低了提取时间和成本, 逐渐成为一种理想的提取植物活性物质的方法^[17]. 微波提取有两种方法: 一种是将微波直接引入提取设备中, 耗能大, 且加入的乙醇为极性溶剂, 极性溶剂对微波的吸收能非常大, 会影响到植物细胞对微波的吸收; 另一种方法是先加入少量的蒸馏水浸润植物粉末, 微波时蒸馏水受热汽化, 破坏了细胞壁, 使细胞内有效成分更容易溶出, 且蒸馏水少量不会消耗太多微波能量^[17]. 本实验采用的方法即为后者, 结果表明, 直接传统水浴提取的总黄酮得率为 36.194 mg/g, 微波预处理的得率较传统水浴高出 1.722 mg/g. 陈睿等^[18]采用微波辐射预处理法提取花叶滇苦菜不同部位的总黄酮发现, 地上部分和地下部分的总黄酮得率比传统水浴提取分别提高了 12.415% 和 118.028%, 由此证明微波预处理效果明显.

本实验所探究的 3 个因素中, 汽化剂用量对总黄酮得率的影响主要在于分走了部分微波能量, 所以导致总黄酮得率随着汽化剂用量的增加而下降. 微波辐射是将微波能直接转化为热能, 因此当微波功率过高时就会破坏井栏边草中的黄酮成分, 所以实验得出的结果是总黄酮得率随着微波功率的升高先上升后下降. 持续的加热可以导致细胞壁破坏更完全, 所以总黄酮得率会随着辐射时间的延长而不断上升, 但是, 长时间的辐射加热会焦化材料, 破坏黄酮. 这一结论与王赵改等^[15]的结论基本一致, 而汽化剂用量的变化趋势可能与材料本身密切相关. 响应面优化提取工艺是目前的热点, 能很好地反应各个因素之间的交互作用, 这在本实验的结果中也得到了很好的体现^[19-21].

近年来, 科学家们开始热衷于从天然植物中寻找可以抗肿瘤的药物, 而中草药逐渐被证明疗效好、毒性低, 因此用中草药来代替化学合成药发挥抗肿瘤作用成为未来的研究热门. CCK-8 法是近年来常被用来

检测细胞毒性的检测方法, 比起传统的 MTT 法, CCK-8 法灵敏度更高, 无放射性, 对实验者的危害小, 且检测方便直观, 实验的误差小^[22]. 检验结果证明井栏边草乙酸乙酯提取物对 RKO, A549 和 HepG2 均有明显抑制作用, 且抑制率随着浓度的增加而增大, 当提取物浓度为 200 mg/g 时, 对 RKO 的抑制效果大于 95%. 研究结论与陈岩等^[12]利用相同材料对其他癌细胞的抑制效果一致. 生物活性实验结果证明, 井栏边草中的总黄酮提取液乙酸乙酯提取物具有抗肿瘤作用, 有很好的研究与应用前景. 另外, 植物总黄酮的生物活性与植物体的来源以及不同部位密切相关, 研究时应加以区别^[23].

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 沈晓霞, 梅旭东, 王志安. 中国畚药植物图鉴: 下卷 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2019.
- [3] 姜纪武, 蒋建伟, 金 明. 比色法测定凤尾草中黄酮类化合物的含量 [J]. 中国药理学杂志, 1996(10): 42.
- [4] 胡浩斌, 郑旭东. 青蕨根化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(2): 169-171.
- [5] HU H B, ZHENG X D, CAO H. Xanthone O-Glycosides from the Roots of *Pteris Multifida* [J]. Journal of the Chinese Chemical Society, 2006, 53(2): 459-464.
- [6] 欧阳丹薇, 杨培明, 孔德云. 凤尾草化学成分的研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(12): 898-900.
- [7] 欧阳丹薇, 孔德云, 许海燕, 等. 高速逆流色谱法分离凤尾草中的芹菜素和木犀草素 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(5): 822-825, 839.
- [8] 舒积成, 张 锐, 张 维, 等. 凤尾草中黄酮类化学成分研究 [J]. 中成药, 2012, 34(6): 1122-1126.
- [9] 舒积成, 潘景行, 张 锐, 等. 凤尾草中倍半萜类成分研究 [J]. 中成药, 2011, 33(12): 2104-2107.
- [10] 韦金育, 李 延, 韦 涛, 等. 50 种广西常用中草药、壮药抗肿瘤作用的筛选研究 [J]. 广西中医学院学报, 2003, 6(4): 3-7.
- [11] 王 刚, 张利敏. 凤尾草提取物的抗肿瘤活性的研究 [J]. 河北省科学院学报, 2008, 25(4): 52-54.
- [12] 陈 岩, 杨丽杰, 黄智坤, 等. 凤尾草提取物对不同肿瘤细胞生长抑制作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(7): 1610-1611.
- [13] 余 俊, 陈晓青, 蒋新宇, 等. 凤尾草中总黄酮的提取工艺研究 [J]. 中成药, 2007, 29(11): 1683-1685.
- [14] 钟仙龙. 淡竹叶不同部位总黄酮含量的测定 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(11): 4983, 4987.
- [15] 王赵改, 王晓敏, 杨 慧, 等. 微波辐射预处理提取香椿老叶总黄酮工艺研究 [J]. 核农学报, 2016, 30(10): 1989-1996.
- [16] 蔡文涛. MTT 法和 CCK-8 法检测中药抗病毒活性成分细胞毒性的比较 [J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2017, 39(3): 305-310.
- [17] 杨 解, 崔政伟. 微波预处理强化提取植物有效成分的发展和应用 [J]. 包装与食品机械, 2009, 27(3): 46-50.
- [18] 陈 睿, 钟茂程, 杨燕红, 等. 微波辐射预处理提取花叶滇苦菜总黄酮工艺及其乙酸乙酯萃取物的抑菌活性研究 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(4): 120-126.
- [19] GHASEMZADEH A, BAGHDADI A, JAAFAR H Z E, et al. Optimization of Flavonoid Extraction from Red and Brown Rice Bran and Evaluation of the Antioxidant Properties [J]. Molecules, 2018, 23(8): 1863.
- [20] WANG B X, QU J P, LUO S Y, et al. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Flavonoids from Olive (*Olea Europaea*) Leaves, and Evaluation of Their Antioxidant and Anticancer Activities [J]. Molecules, 2018, 23(10): 2513.
- [21] 罗亚兰, 张吉仲, 陶 伟, 等. 响应面法优化超声提取黄花倒水莲总皂苷提取工艺 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2017, 42(10): 56-60.
- [22] FAILLI A, LEGITIMO A, ORSINI G, et al. Antiproliferative Effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin in Colon Cancer Cell Lines: Comparison of Three Different Cytotoxicity Assays [J]. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2013, 27(1): 275-284.
- [23] 王 鹏, 刘明秀, 李晓林, 等. 普通枇杷与野生枇杷总黄酮、总酚及抗氧化活性分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(12): 33-39.

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids from *Pteris multifida* Poir by Response Surface Method and Its Bioactivity

ZHANG Ya-fen¹, GUAN Yang-yang¹, ZHONG Mao-chen^{1,2},
CHEN Xu-bo¹, TONG Ying-peng³, YANG Hui¹, LUO Zheng-rong¹

1. Faculty of Ecology, Lishui University, Lishui Zhejiang 323000, China;

2. Fishery college, Guangdong Ocean University, Zhanjiang Guangdong 524088, China;

3. Institute of Natural Medicine and Health Products, School of Advanced Study, Taizhou University, Taizhou Zhejiang 318000, China

Abstract: In order to better exploit and utilize the total flavonoids of *Pteris multifida* Poir, the content of total flavonoids was determined by using aluminium nitrate as chromogenic reagent based on the materials pretreated with microwaves. Then, the three extraction parameters including vaporizer dosage, microwave power and microwave radiation time, were optimized by response surface methodology (RSM). The cytotoxicity of total flavonoids (ethyl acetate extract) to four kinds of cancer cells including human colonic adenocarcinoma cells (RKO), human ileocecal cancer cells (HCT8) lung cancer (A549) and liver cancer (HepG2) was detected by CCK-8. The results show that the optimal conditions were as follows: the dosage of vaporizer was 5 mL, microwave power was 630 W, microwave radiation time was 90 s, Under this conditions, the yield of total flavonoids was 37.916 mg/g. The inhibitory effects of ethyl acetate extract on four kinds of cancer cells were different. The inhibitory rate of RKO, A549 and HepG2 increased with the increase of concentration, and the inhibitory effect on HCT8 was weak, the concentration of the sample had little effect on the inhibition rate. The results can be used as reference for the extraction and activity study of total flavonoids from *Pteris multifida* Poir.

Key words: *Pteris multifida* Poir; total flavonoids; microwave irradiation pretreatment; response surface methodology; anticancer activity

责任编辑 周仁惠