

日本落叶松凋落针叶总黄酮的提取工艺及抗氧化活性研究

骆娟¹, 侯静¹, 杨舒婷¹, 张傲来¹, 马晓娜¹, 白洁¹,
何廷美², 谭迎春², 刘明冲², 叶平², 朱大海³

(1. 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;
2. 四川卧龙国家级自然保护区管理局, 汶川 623000;
3. 龙溪-虹口国家级自然保护区, 都江堰 611830)

摘要:为促进日本落叶松废弃物的再利用,本研究以日本落叶松凋落针叶为原料,利用超声辅助浸提法对总黄酮提取工艺进行优化,并对其抗氧化活性进行初步研究.通过三因素三水平响应面分析,得到日本落叶松凋落针叶总黄酮提取的最佳工艺为:乙醇浓度 60%、液料比 33:1 mL/g、提取温度 80℃、超声功率 270 W、超声频率 40 kHz、提取时间 58 min.总黄酮不同萃取相表现出不同程度的体外抗氧化活性,从大到小依次为:正丁醇相>水余相>乙酸乙酯相>石油醚相,其中正丁醇对 DPPH 自由基的半抑制率 IC₅₀ 值为 7.438 μg/mL,略弱于维生素 C(7.259 μg/mL);清除 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值为 6.425 μg/mL,表现出了比维生素 C 更高的清除能力.该提取工艺稳定可行,总黄酮得率高,抗氧化活性较好.研究结果表明日本落叶松废弃物有开发成植物源的天然抗氧化剂的潜力.

关键词: 日本落叶松; 总黄酮; 响应面法; 抗氧化活性

中图分类号: Q946.889 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.036004

Study on extraction technology and antioxidant activity of total flavonoids from *Larix kaempferi* litter needles

LUO Juan¹, HOU Jing¹, YANG Shu-Ting¹, ZHANG Ao-Lai¹, MA Xiao-Na¹, BAI Jie¹,
HE Ting-Mei², TAN Ying-Chun², LIU Ming-Chong², YE Ping², ZHU Da-Hai³

(1. Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;
2. Sichuan Wolong National Nature Reserve Administration, Wenchuan 623000, China;
3. Longxi-Hongkou National Nature Reserve, Dujiangyan 611830, China)

Abstract: In order to promote the reuse of *Larix kaempferi* waste resources, this study used the litter needles of *Larix kaempferi* as raw materials to optimize the extraction process of total flavonoids by ultrasonic-assisted extraction method, and studied the antioxidant activity of flavonoids. By three-factor three-level response surface analysis, the best extraction process for total flavonoids from *Larix kaempferi* litter needles was: the ethanol concentration is 60%, the liquid-to-material ratio is 33:1 mL/

收稿日期: 2020-09-09
基金项目: 国家重点研发计划课题(2017YFC0504903); 四川省重大科技专项课题(2018SZDZX0037, 2019KJT0069-2018SZDZX0037)
作者简介: 骆娟(1996—), 女, 江苏南京人, 硕士生, 研究领域为植物资源与天然产物. E-mail: 2019222040008@stu.scu.edu.cn
通讯作者: 白洁. E-mail: baijie@scu.edu.cn

g, the extraction temperature is 80 °C, the ultrasonic power is 270 W, the ultrasonic frequency is 40 kHz, and the extraction time is 58 min. Studies on the antioxidant activity of different extraction phases in vitro showed that the antioxidant activity was n-butanol phase>water residue phase>ethyl acetate phase>petroleum ether phase from large to small. The semi-inhibitory rate of n-butanol on DPPH free radical was 7.438 $\mu\text{g/mL}$, which is slightly weaker than that of vitamin C (7.259 $\mu\text{g/mL}$); the IC_{50} value of ABTS radical scavenging was 6.425 $\mu\text{g/mL}$, showing a higher scavenging capacity than vitamin C. These results showed that the extraction process was stable and feasible, with a high yield of total flavonoids and good antioxidant activity. The research results show that *Larix kaempferi* waste has the potential to develop into plant-derived natural antioxidants.

Keywords: *Larix kaempferi*; Total flavonoids; Response surface design; Antioxidant activity

1 引言

日本落叶松(*Larix kaempferi*)系松科落叶松属高大乔木,原产于日本,于 19 世纪末作为人工造林树种引进至我国,由于生长迅速、适应性强的优点,在辽宁、四川等 14 个省市广为种植^[1]. 随着日本落叶松快速生长,在发挥经济和生态价值的同时,也带来系列严重问题. 由于日本落叶松生长迅速而造成其伴生树种大多枯死;随着大面积日本落叶松纯林的形成,其林下植物多样性降低,大量积累的凋落针叶层存在着火险、病虫害等严重隐患^[2]. 适当抚育间伐,对增加日本落叶松人工林群落层次结构,提高林下生物多样性具有促进作用^[3]. 因此有必要对大量废弃的日本落叶松枝叶展开综合化利用的研究.

松科植物的针叶中含有多种活性物质,如黄酮、挥发油、多糖、多酚等,具有抗氧化、降血脂、延缓衰老、抑菌及抗癌的功效^[4-8]. 近年来,许多学者围绕松科植物针叶的总黄酮提取和生物学活性进行了研究. Shi 等^[9]通过乙醇回流法从雪松的松针中提取总黄酮并发现其可以调节细胞周期和细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞的增殖. 王冉等^[10]利用超声波辅助乙醇提取红松松针中的总黄酮,结合响应面法优化了红松总黄酮提取工艺. 司传领等人^[11]从日本落叶松新鲜松针 95%乙醇提取物中检测到儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素等 7 种化合物,并对提取物进行了分级萃取,结果表明乙酸乙酯溶性部分抗氧化活性较强. 目前对日本落叶松凋落针叶的研究未见报道. 本研究在现有研究的基础上,超声提取结合响应面法优化了日本落叶松凋落针叶的总黄酮提取工艺,并检测提取产物的抗氧化活性,为进一步综合利用日本落叶松这一植物资源提供科学依据.

2 材料与方法

2.1 材料

40 林龄日本落叶松人工林的林下调落针叶,采自四川卧龙自然保护区. 对照品为芦丁.

乙醇,正丁醇,石油醚,乙酸乙酯,维生素 C 等所有试剂均为分析纯.

旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂, RE-52AA);电子精密分析天平(瑞士 Mettler 公司, MS 半微量);纯水仪(成都威思达智能公司, RM-220);电热套(北京中兴伟业仪器有限公司, ZDHW);多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司, SpectraMax M2)等.

2.2 实验方法

2.2.1 总黄酮含量测定 以芦丁为对照,制作标准曲线. 以吸光度为纵坐标,芦丁溶液浓度为横坐标,得到回归方程: $y = 0.9178x + 0.0722$ ($R^2 = 0.9993$). 日本落叶松凋落针叶提取物总黄酮含量用比色法测定. 将 20 μL 浓度为 1 mg/mL 的样品与 30 μL 5% NaNO_2 混合. 6 min 后,加入 10% AlCl_3 溶液 50 μL . 5 min 后,再加入 10% NaOH 溶液 100 μL ,振荡混匀,在 25 °C 下孵育 15 min. 用酶标仪在 510 nm 处测量吸光度. 根据回归方程计算提取液中总黄酮含量. 用芦丁当量(RE)表示每克干物质(dw)中的总黄酮含量,即 mgRE/gdw. 每个样品做 3 次平行实验.

2.2.2 单因素实验 0.1 g 日本落叶松凋落针叶粉末为样品,以总黄酮提取量为考察指标,分别以 6 个因素:乙醇浓度(40%、50%、60%、70%)、液料比(10:1、20:1、30:1、40:1 mL/g)、提取温度(45、60、75、80、85 °C)、提取时间(30、40、50、60 min)、超声功率(210、240、270、300 W)、超声频率(20、25、40、59 kHz)进行单因素试验,得到各因

素对凋落叶总黄酮提取量影响的实验结果.

2.2.3 响应面优化设计 基于单因素实验,选取乙醇浓度(A)、液料比(B)、提取时间(C)3 个因素为自变量,总黄酮量(Y)作为响应值,用 Design-Expert8.0 软件进行实验设计. 试验各因素及水平见表 1.

表 1 响应面实验设计中的各因素及水平
Tab.1 Factors and levels used in response surface methodology

因素	symbols	水平		
		-1	0	+1
乙醇浓度/%	A	40	50	60
液料比/mL/g	B	20 : 1	30 : 1	40 : 1
提取时间/min	C	40	50	60

2.2.4 日本落叶松凋落针叶总黄酮提取物不同萃取相制备 称取 10 g 日本落叶松凋落针叶粉末于 500 mL 锥形瓶中,在优化的提取条件下超声提取 2 次,合并提取液,旋蒸成浸膏,加入蒸馏水 200 mL 重悬,重悬液依次用石油醚(沸程 30~60 ℃)、乙酸乙酯、水饱和和正丁醇萃取,萃取液经减压浓缩,氮吹仪干燥后,获得日本落叶松凋落针叶的四个萃取相:石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水余相.

2.2.5 日本落叶松凋落针叶总黄酮不同萃取相抗氧化活性比较

(1) DPPH 清除能力测定^[12]. DPPH 配成 1 mmol/L 的乙醇溶液,使用前用无水乙醇稀释至 0.1 mmol/L 的工作浓度,不同萃取相和 Vc 用 50%乙醇溶液配成不同浓度. 96 孔板加入 100 μL 不同浓度样品、Vc(10~100 μg/mL)和 50%乙醇,分别作为实验组、阳性对照和空白组,加 100 μLDPPH 工作液,混匀室温放置 30min,酶标仪测定 517 nm 处吸收值. DPPH 自由基清除率(%)=(1-As/Ac)×100. 式中,As 表示样品或阳性对照 Vc 的吸收值;Ac 为空白组吸收值.

(2) ABTS 清除能力测定^[13]. 磷酸盐缓冲液 PBS 备用(pH 7.4,0.2 mmol/L),以 PBS 为溶剂配制终浓度为 7 mmol/L ABTS 和 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液,暗藏 12~16 h 生成 ABTS 自由基. 实验前用 PBS 将 ABTS 自由基溶液稀释到 A₇₃₄为 0.7±0.02,作为 ABTS 工作液. 实验时在 96 孔板中加入 100 μL 不同浓度的样品和阳性对照 Vc(10~100 μg/mL)和 50%乙醇溶液,加入 100 μL ABTS 工作液,混匀,室温放置 30 min,测定 734 nm 处吸收值. ABTS 自由基清除率(%)=(1-As/Ac) ×

100. 式中,As 表示样品或阳性对照 Vc 的吸收值;Ac 为空白组吸收值.

(3) 总还原力测定^[14]. 配制磷酸盐缓冲液 PBS 备用(pH 6.6,0.2 mmol/L),在 96 孔板中加入 25 μL 不同浓度样品和阳性对照 Vc(10~100 μg/mL)及 50%乙醇分别作为实验组、阳性对照和空白组. 加入 50 μL PBS 和 25 μL 1%的铁氰化钾水溶液,混匀后于 45 ℃条件下孵育 1 h,再加入 50 μL 10%的三氯乙酸水溶液和 60 μL 0.1%的 FeCl₃水溶液,混匀后测定 700 nm 处吸收值. A₇₀₀ 越大表明样品的总还原力越强.

上述实验重复 3 次.

2.2.6 数据分析 GraphPad Prism 用于统计分析和 IC₅₀ 的计算,组建方差分析采用 ANOVA 单因素方差分析,并辅以 Dunnett's *t* 多重检验,*P*<0.05 被认为具有显著性差异.

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果

各因素对日本落叶松凋落针叶总黄酮提取率的影响见图 1. 乙醇浓度、液料比、提取时间对总黄酮的提取率均呈现先升后降的趋势. 经差异显著性分析,三者对总黄酮提取率影响较大,因此选择这三个因素进行响应面优化设计. 随着温度的提高,总黄酮提取率不断增加(图 1c). 考虑到操作的可行性、安全性和成本等,将提取温度固定为 80 ℃,超声功率选择 270 W(图 1e),超声频率定为 40 kHz(图 1f).

3.2 总黄酮提取工艺的响应面优化设计

采用 Box-Behnken 实验设计方法^[15],以乙醇浓度(A)、液料比(B)和提取时间(C)为待优化因素,进行三因素三水平的响应面优化设计,见表 2.

以总黄酮含量为响应值进行多元回归拟合分析,得到拟合二次回归方程: $Y=136.2-3.25\times A+4.93\times B+2.11\times C+1.72\times AB+1.37\times AC+0.53\times BC-28.34\times A^2-10.69\times B^2-1.22\times C^2$. 本模型的 *F* 值为 16.8,*P*<0.01,具有显著性;失拟项的 *P* 值为 0.083,不显著,说明所建模型适宜. 回归方程相关系数 $R^2=0.9558$,线性关系良好. 实验中的变异系数 2.07%,实验操作可靠,模拟方差能够很好的模拟真实的实验值. *B*、*A*²、*B*² 三项的 *P*<0.05,具有显著性,说明液料比、乙醇浓度的平方和液料比的平方对实验结果也有显著影响.

表 2 响应面优化设计和实验结果

Tab.2 Experiment design of three level, three variable central composite rotatable design and results

Std	Run	A 乙醇浓度/%	B 液料比/mL/g	C 提取时间/min	总黄酮含量/mgRE/gdw	Std	Run	A 乙醇浓度/%	B 液料比/mL/g	C 提取时间/min	总黄酮含量/mgRE/gdw
4	1	60	40	50	103.351	13	9	50	30	50	139.9
7	2	40	30	60	108.94	12	10	50	40	60	127.915
15	3	50	30	50	136.304	2	11	60	20	50	81.619
3	4	40	40	50	109.27	14	12	50	30	50	139.036
8	5	60	30	60	108.048	16	13	50	30	50	132.265
9	6	50	20	40	121.728	5	14	40	30	40	107.976
1	7	40	20	50	94.428	6	15	60	30	40	101.619
11	8	50	20	60	125.409	17	16	50	30	50	133.503
10	17	50	40	40	122.116						

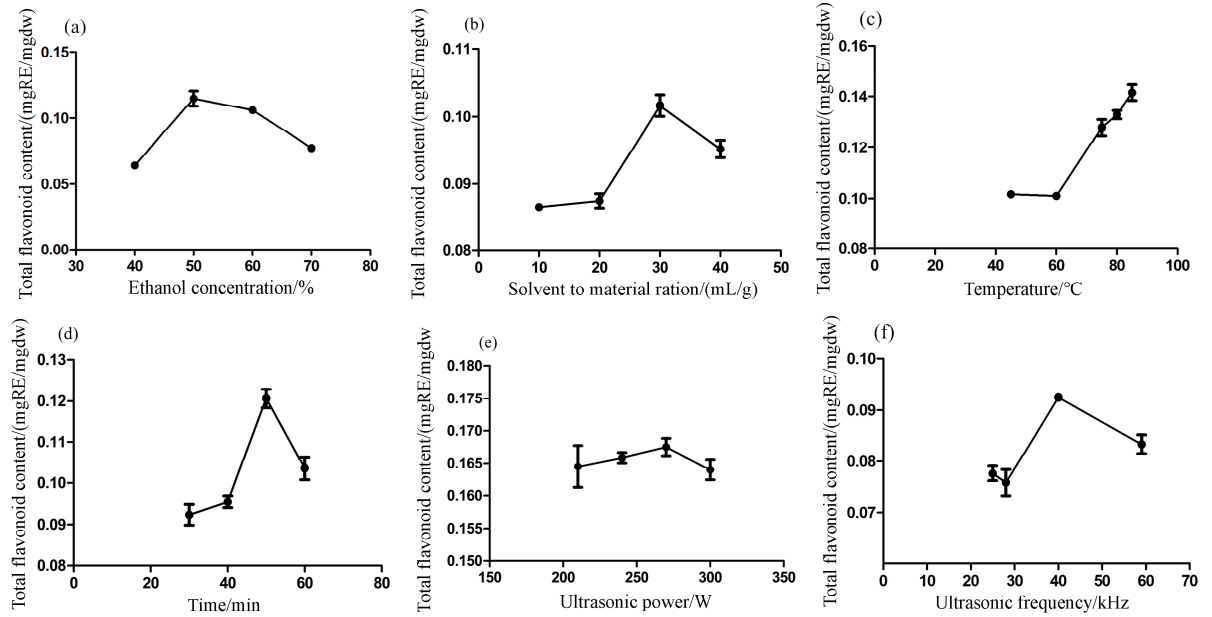


图 1 单因素对日本落叶松凋落针叶总黄酮提取率的影响

(a)乙醇浓度, (b)液料比, (c)提取温度, (d)提取时间, (e)超声功率, (f)超声频率

Fig. 1 The effect of single factor on the extraction efficiency of total flavonoids from litter needles of *Larix kaempferi*

(a) Ethanol concentration, (b) solvent to material ratio, (c) extraction temperature, (d) extraction time, (e) ultrasonic power, (f) ultrasonic frequency

表 3 以总黄酮含量为响应值的响应面回归方程方差分析

Tab.3 Analysis of variance (ANOVA) for TPC as response

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	4 392.39	9	488.04	16.8	0.000 6 **
A-乙醇浓度	84.35	1	84.35	2.9	0.132 1
B-液料比	194.72	1	194.72	6.7	0.036 0 *
C-提取时间	35.59	1	35.59	1.23	0.304 9
AB	11.87	1	11.87	0.41	0.543 0
AC	7.47	1	7.47	0.26	0.627 7
BC	1.12	1	1.12	0.039	0.849 8
A ²	3 381.81	1	3 381.81	116.44	<0.000 1 **
B ²	481.54	1	481.54	16.58	0.004 7 **
C ²	6.22	1	6.22	0.21	0.657 6
残差	203.31	7	29.04		
失拟项	158.81	3	52.94	4.76	0.083 0
纯误差	44.50	4	11.13		
总和	4 595.7	16			

* $P<0.05$ ** $P<0.01$

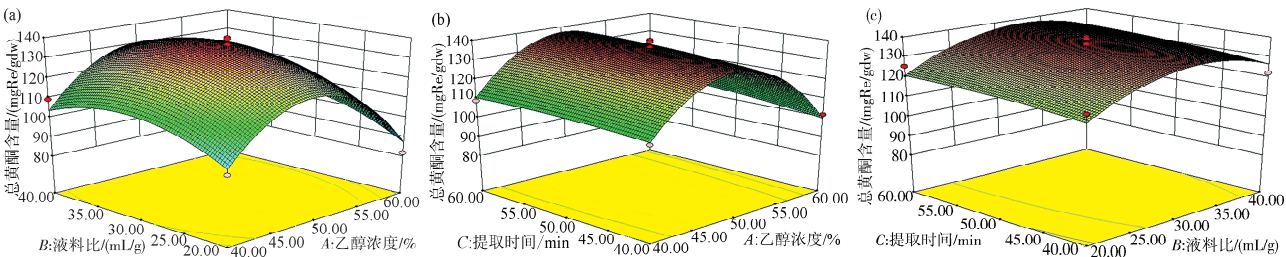


图 2 超声辅助浸提法提取日本落叶松凋落针叶总黄酮的响应曲面线

Fig. 2 Response surface for extraction of total flavonoids from litter needles of *Larix kaempferi* by ultrasound-assisted extraction

图 2 是根据回归方程,以总黄酮含量为响应值绘出的乙醇浓度、液料比和提取时间相互影响的响应面曲线. 经 Design-Expert8.0 软件分析,得到超声辅助提取法提取日本落叶松凋落针叶总黄酮成分的最佳条件是:乙醇浓度 59.12%、液料比 32.71 : 1 mL/g、提取时间 58.25 min,提取温度 80 ℃、超声功率 270 W、超声频率 40 kHz,在此条件下,总黄酮含量模拟为 112.911 mgRE/gdw. 出于可操作性的考虑,验证时乙醇浓度选择 60%,液料比 33 : 1 mL/g,提取时间 58 min,其他条件与响应面实验条件保持一致. 实验验证的总黄酮含量达到 117.353 ± 5.016 mgRE/gdw,两者没有显著性差异($P > 0.05$),符合响应面优化的预测值.

3.3 不同萃取相的总黄酮含量比较

采用优化后的工艺提取日本落叶松凋落针叶的总黄酮,经分级萃取后得到的各萃取相总黄酮含量见图 3. 正丁醇相的总黄酮含量显著高于其他萃取相,为 736.4013 ± 38.5852 mgRE/gdw.

3.4 不同萃取相的抗氧化活性比较

不同萃取相对 DPPH 自由基的清除能力随着

浓度增加逐渐增强,即抗氧化能力随浓度增大而增强(图 4a). 抗氧化活性从大到小依次是正丁醇相 > 水余相 > 乙酸乙酯相 > 石油醚相,但都弱于 Vc,其 IC_{50} 值分别为 7.438 μ g/mL、14.09 μ g/mL、29.79 μ g/mL、103.6 μ g/mL,对照品 Vc 的 IC_{50} 值为 7.259 μ g/mL.

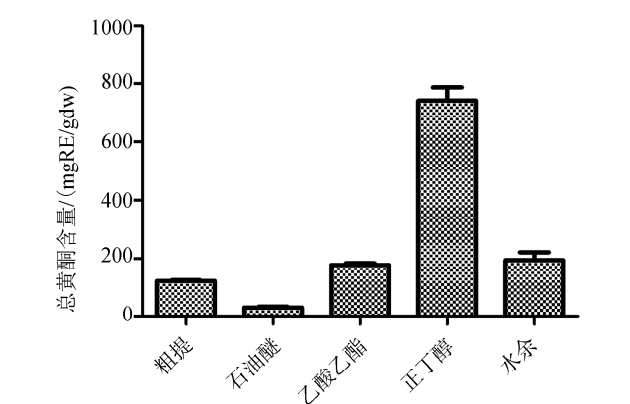


图 3 日本落叶松凋落针叶不同萃取相的总黄酮含量

Fig. 3 Total flavonoids content of different extracted phases of litter needles of *Larix kaempferi*

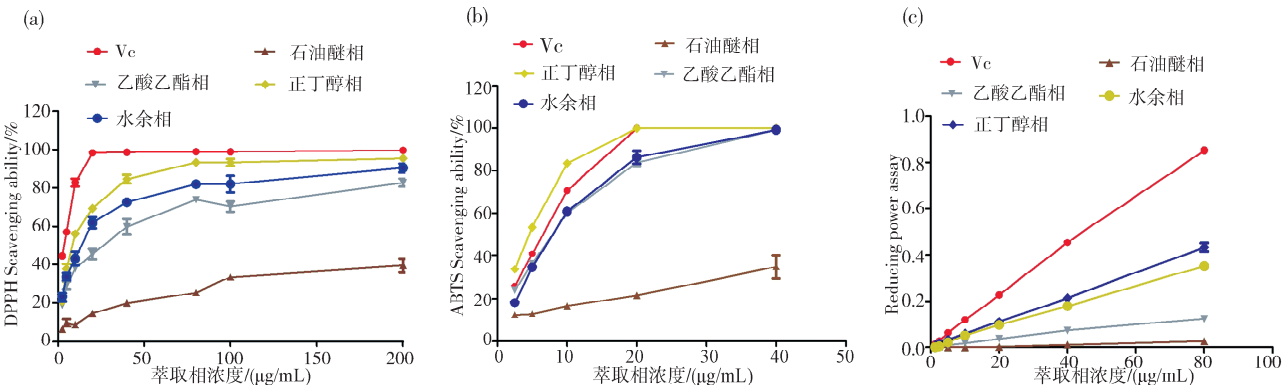


图 4 日本落叶松凋落针叶不同萃取相的抗氧化活性

(a) DPPH 自由基清除实验, (b) ABTS 自由基清除实验, (c) 还原力测定. 数据表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差 (SEM, $n=3$).

Fig. 4 Antioxidant activities of different extract phases of litter needles of *Larix kaempferi*

(a) DPPH scavenging radical assay, (b) ABTS scavenging radical assay, (c) reducing power assay. Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM, $n=3$).

不同萃取相对 ABTS 自由基的清除能力随着浓度增加呈现上升趋势(图 4b),各萃取相抗氧化活性从大到小依次是正丁醇相>水余相>乙酸乙酯相>石油醚相,其 IC_{50} 值分别为 6.425 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.169 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、805 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对照品 V_c 的 IC_{50} 值为 8.455 $\mu\text{g}/\text{mL}$,日本落叶松凋落针叶的正丁醇萃取相表现出了比 V_c 更高的清除能力。

各萃取相的总还原力均低于对照品 V_c ,且还原力强弱与 DPPH 和 ABTS 清除实验结果保持一致,正丁醇相的总还原力最强,其余按照总还原从大到小依次是水余相、乙酸乙酯相,石油醚相(图 4c)。该结论与不同萃取相的总黄酮含量比较结果相互佐证,表明总黄酮含量与体外抗氧化活性呈正相关的关系。

4 讨 论

黄酮类化合物广泛存在于自然界中,因其存在多种药理活性,被认为是一类重要的天然产物。本文采用超声辅助浸提法对日本落叶松凋落针叶总黄酮提取工艺进行研究和优化。单因素实验中,总黄酮提取率随提取温度的升高不断升高,可能与提取物中的成分有关。现有研究表明,松针黄酮主要是由一些黄酮、黄酮苷及多聚体酚化合物前花青素组成^[16]。刘东彦等^[17]从雪松松针中分离到大量以杨梅素、槲皮素、山奈酚、异鼠李素及它们的苷类为主的黄酮类化合物。徐丽珊等人^[18]优化了湿地松松针的总黄酮提取工艺,确定的最佳提取温度是 100 $^{\circ}\text{C}$;皮婷婷等人^[19]报道了马尾松的最佳提取温度是 73 $^{\circ}\text{C}$;向福等人^[20]得到大别山松针黄酮最佳提取温度是 80 $^{\circ}\text{C}$,说明松针黄酮存在提取温度高的现象。结合不同萃取相的总黄酮含量测定结果分析,日本落叶松凋落针叶中的黄酮类物质具有极性大、沸点高,稳定性强的特点。

经过优化,在 60%乙醇溶液、33:1 mL/g 的液料比、提取温度 80 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 270 W、超声频率 40 kHz 条件下提取 58 min,日本落叶松凋落针叶的总黄酮可以达到 $117.353 \pm 5.016 \text{ mgRE/gdw}$ 的提取量。分级萃取后,正丁醇相的总黄酮含量最高,可达到 $736.4013 \pm 38.5852 \text{ mgRE/gdw}$ 。总黄酮的不同萃取相中,抗氧化活性从大到小依次为正丁醇相>水余相>乙酸乙酯相>石油醚相,正丁醇相的 DPPH 自由基清除能力与抗坏血酸接近,ABTS 自由基清除能力则优于抗坏血酸,约是其

1.3 倍。本研究结果为日本落叶松凋落针叶总黄酮物质的研究开发提供了理论依据。

有研究发现,落叶松(*Larix gmelinii*)新鲜针叶总黄酮含量高于凋落针叶中的总黄酮含量,且对 DPPH 自由基的清除能力略高于凋落针叶^[21]。由于卧龙自然保护区的日本落叶松属于大熊猫栖息地关键地段的人工林,不允许采伐,而且大面积栽植的日本落叶松每年产生的凋落叶既影响林下植物多样性,也带来了火灾和病虫害隐患,因此本研究侧重于日本落叶松废弃物资源再利用的研究。研究结果表明日本落叶松凋落针叶可以作为一种潜在的抗氧化剂资源。今后将继续开展提取物成分的分析,以确定其可能的药理活性。

参考文献:

- [1] Chen X B, Xie Y H, Sun X M. Development and characterization of polymorphic genic-SSR markers in *Larix kaempferi* [J]. *Molecules*, 2015, 20: 6060.
- [2] 杜彦昌,于永明,郭小龙,等. 秦岭西段日本落叶松人工林不同龄期密度调控对林下植被结构及多样性的影响[J]. *林业科技通讯*, 2017(4): 8.
- [3] 汤景明,孙拥康,冯骏,等. 不同强度间伐对日本落叶松人工林生长及林下植物多样性的影响[J]. *中南林业科技大学学报*, 2018, 38: 90.
- [4] 刘康柯,曹小燕. 松针有效成分提取及药理活性研究进展[J]. *广州化工*, 2018, 13: 6.
- [5] 司建志,王硕,周小雷,等. 中药黄酮类成分延缓衰老作用研究进展[J]. *世界中西医结合杂志*, 2015, 10: 734.
- [6] Luo J, Cai W, Wu T, et al. Phytochemical distribution in hull and cotyledon of adzuki bean (*Vigna angularis* L.) and mung bean (*Vigna radiate* L.), and their contribution to antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic activities [J]. *Food Chem*, 2016, 201: 350.
- [7] 汤家泽,刘红星,黄初升,等. 黄酮化合物抗癌活性的研究进展[J]. *广西师范学院学报: 自然科学版*, 2013, 30: 37.
- [8] 曹侃,朱利. 松针黄酮类成分研究与应用进展[J]. *绵阳师范学院学报*, 2019, 38: 75.
- [9] Shi X, Liu D, Zhang J, et al. Extraction and purification of total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* contribute to anti-tumor in vitro[J]. *BMC Complem Altern Med*, 2016, 16: 245.
- [10] 王冉,李健,黎晨晨,等. 响应面法优化东北红松针总黄酮的超声辅助乙醇提取工艺[J]. *食品工业*

科技, 2018, 39: 143.

[11] 司传领, 刘忠, 权东周, 等. 日本落叶松新鲜松针的化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 林产化学与工业, 2007, 27: 21.

[12] Fu R, Zhang Y, Guo Y, *et al.* Antioxidant and tyrosinase inhibition activities of the ethanol-insoluble fraction of water extract of *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. Leaves [J]. S Afr J Bot, 2014, 93: 98.

[13] Fu R, Zhang Y, Guo Y, *et al.* Determination of phenolic contents and antioxidant activities of extracts of *Jatropha curcas* L. seed shell, a by-product, a new source of natural antioxidant[J]. Ind Crops Prod, 2014, 58: 265.

[14] Gülcin İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview [J]. Arch Toxicol, 2012, 86: 345.

[15] 杨朝君, 严培, 罗禹, 等. 响应面法优化黄精叶多糖水提工艺[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2020, 57: 791.

[16] 陈良胜, 方应权. 松针黄酮类物质药理作用研究进展[J]. 中外医疗, 2012, 31: 5.

[17] 刘东彦, 杜瑞琴, 石晓峰, 等. 酸水解雪松松针总黄酮制备杨梅素工艺的优化[J]. 中成药, 2020, 42: 1083.

[18] 徐丽珊, 张萍华, 张瑜, 等. 松针总黄酮的提取工艺优化研究[J]. 浙江师范大学学报: 自然科学版, 2009, 32: 207.

[19] 皮婷婷, 曹丹丹, 郑芳, 等. 武当地区马尾松松针中总黄酮的提取工艺优化及含量测定[J]. 湖北医药学院学报, 2017, 3: 33.

[20] 向福, 付建强, 胡淇淞, 等. 响应面法优化大别山松针黄酮的提取工艺[J]. 河南农业科学, 2015, 9: 151.

[21] 张桂芳, 张东杰, 郭希娟, 等. 三种松针活性成分含量及清除自由基能力的比较[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28: 1066.

引用本文格式:

中 文: 骆娟, 侯静, 杨舒婷, 等. 日本落叶松凋落针叶总黄酮的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 036004.

英 文: Luo J, Hou J, Yang S T, *et al.* Study on extraction technology and antioxidant activity of total flavonoids from *Larix kaempferi* litter needles [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2021, 58: 036004.