

吴德智,田昌义,郑强,等.超声辅助双水相提取艾纳香总黄酮的工艺优化及抗氧化活性的研究[J].江苏农业科学,2017,45(15):153-156.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.041

# 超声辅助双水相提取艾纳香总黄酮的工艺优化及抗氧化活性的研究

吴德智,田昌义,郑强,王建超,李小红

(贵州理工学院,贵州贵阳 550003)

**摘要:**以艾纳香为原料、艾纳香总黄酮得率为指标,采用超声辅助乙醇-硫酸铵双水相体系对艾纳香总黄酮提取工艺进行单因素及 Box-Behnken 响应曲面试验优化,并用羟自由基清除力、DPPH 自由基清除力以及还原力与一般回流提取所得的总黄酮的抗氧化能力进行比较研究。结果表明,艾纳香总黄酮超声辅助双水相提取的最佳工艺条件为超声时间 31 min、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  用量 0.4 g/mL、液料比为 32 mL : 1 g,此条件下提取的艾纳香总黄酮得率为  $(13.31 \pm 0.21)\%$ 。对 DPPH 自由基、羟自由基有较强的清除能力以及较高的还原力,且超声辅助双水相提取的艾纳香总黄酮抗氧化能力显著高于一般回流提取。

**关键词:**艾纳香总黄酮;超声提取;双水相;Box-Behnken 响应曲面试验;抗氧化

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)15-0153-04

艾纳香,别称大风叶、大风艾等,为菊科艾纳香属植物艾纳香 [*Blumea balsamifera* (L.) DC] 新鲜或干燥地上部分,在我国主要分布于广西、贵州等长江以南地区。其性味辛温,具有温中活血、祛风除湿、杀菌止痒、消炎镇痛等功效。现代临床主要应用于抗菌、杀虫、保肝及降血压、扩张血管、抑制交感神经等<sup>[1-2]</sup>。主要含有黄酮类、挥发油等成分,其中艾纳香黄酮类成分有抗肿瘤活性、抗氧化活性、抗酪氨酸激酶活性,开发潜力大,市场前景广阔<sup>[3]</sup>。近年来“绿色化学”“环境友好型”提取工艺备受青睐<sup>[4]</sup>。超声辅助提取是利用超声波技术强化提取分离过程,能有效地缩短提取时间,提高产品的得率,还可以减少化学与物理危害,提高产品质量<sup>[5]</sup>。双水相提取是基于乙醇、异丙醇等有机物与无机盐形成的新型双水相体系与传统的双水相体系,根据被分离物质在不同相中分配系数的不同从而实现分离的方法<sup>[6-7]</sup>。目前醇-盐双水相体系已经被广泛用于提取分离天然小分子化合物,成本低,萃取相不含黏度大、难处理的聚合物,有利于醇类的回收和具有良好的分离性能<sup>[8-9]</sup>。因此本研究以艾纳香总黄酮提取率为指标,通过单因素及 Box-Behnken 响应曲面试验进行优化超声辅助双水相提取工艺条件,并用羟自由基清除力、DPPH 自由基清除力以及还原力对抗氧化能力进行研究,以期艾纳香黄酮的药用和食用研究提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

收稿日期:2017-02-12

基金项目:贵州省教育厅青年成长项目(编号:黔教合 KY 字[2016]233);国家大学生创新创业项目(编号:201514440021)。

作者简介:吴德智(1983—),男,江西南昌人,博士,副教授,主要从事食品与药品研究与开发。E-mail:18970080479@163.com。

通信作者:李小红,博士,副教授,主要从事食品与药品研究与开发。

E-mail:370145344@qq.com。

1.1.1 材料 艾纳香叶采自贵州省罗甸艾纳香种植基地。

1.1.2 试剂 无水乙醇、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、铁氰化钾、无水  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  等试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),芸香苷标准品(含量  $\geq 98\%$ ,西安汇林生物科技有限公司)。

1.1.3 仪器 数控超声清洗器(KQ5200DE,昆山市超声仪器有限公司);电子天平(FA1004B,上海越平科学仪器有限公司);旋转蒸发器(上海上天精密仪器有限公司);紫外-可见分光光度计(UV-2550 型,梅特勒-托利多国际股份有限公司)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 双水相体系的确定及超声辅助双水相提取艾纳香总黄酮的工艺 准确称取一定量艾纳香叶,经 40 °C 干燥后粉碎装入三角烧瓶中。加入适量的乙醇-硫酸铵溶液,按试验要求在超声辅助条件下提取艾纳香总黄酮。浸提后以 3 000 r/min 冷冻高速离心 20 min。取上清液于 40 °C 下真空旋转蒸发回收溶剂,所得浓缩液真空冷冻干燥,得艾纳香总黄酮提取物。据前期预试验可知,当乙醇体积分数为 40% 时, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  用量在 0.2 ~ 0.6 g/mL 能形成较稳定的双水相体系。因此本试验固定乙醇体积分数为 40% 进行其他工艺参数的考察。

1.3.2 标准曲线的绘制 精确称取芸香苷标准品,40% 乙醇配制得 135.0 mg/L 的芸香苷储备液。精确吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 芸香苷储备液,依次加入 40% 乙醇 4.0 mL、5% 亚硝酸钠溶液 0.5 mL、10% 硝酸铝溶液 0.5 mL,摇匀,静置 5 min,最后加入 4% 氢氧化钠溶液 3 mL,乙醇定容至 10 mL。充分摇匀,静置 15 min 后,509 nm 下测定吸光度。得吸光度  $Y$  与浓度  $X$  (mg/L) 的标准回归方程  $Y = 0.1012X - 0.0005$ ,  $r^2 = 0.9992$ 。

1.3.3 单因素考察超声提取工艺 本试验针对超声时间(10、20、30、40、50 min)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  用量(0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g/mL)液料比[20 : 1、25 : 1、30 : 1、35 : 1、40 : 1

(mL : g)] 3 个因素,保持其中 2 个变量固定不变,对另一个变量进行单因素试验,以艾纳香总黄酮提取率为指标<sup>[10-11]</sup>,以确定 Box - Behnken 响应曲面设计所需的水平范围。

1.3.4 Box - Behnken 响应曲面法优选艾纳香总黄酮提取工艺 在单因素试验的基础上,选取微波功率、提取时间、液料比 3 个对艾纳香总黄酮提取率影响较大的因素,采用 Design - Expert 8.0.6 提供的 Box - Behnken 试验,以艾纳香总黄酮提取率为指标优化提取工艺参数,试验设计如表 1、表 2 所示。

表 1 Box - Behnken 响应面试验因子与水平

水平	因素		
	A:超声时间 (min)	B:(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 用量(g/mL)	C:液料比 (mL : g)
-1	20	0.3	25 : 1
0	30	0.4	30 : 1
1	40	0.5	35 : 1

表 2 艾纳香总黄酮提取的 Box - Behnken 响应曲面试验设计及评价指标

序号	A:超声时间 (min)	B:(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 用量(g/mL)	C:液料比 (mL : g)	总黄酮提取率(%)
1	30	0.4	30 : 1	13.29
2	30	0.4	30 : 1	13.28
3	30	0.4	30 : 1	13.21
4	30	0.3	25 : 1	12.89
5	30	0.5	25 : 1	13.02
6	30	0.4	30 : 1	13.18
7	20	0.4	35 : 1	12.55
8	40	0.4	35 : 1	12.88
9	30	0.4	30 : 1	13.25
10	40	0.3	30 : 1	12.65
11	20	0.3	30 : 1	12.17
12	20	0.4	25 : 1	12.58
13	40	0.4	25 : 1	12.36
14	20	0.5	30 : 1	12.46
15	30	0.5	35 : 1	13.09
16	30	0.3	35 : 1	13.14
17	40	0.5	30 : 1	12.45

1.3.5 DPPH 自由基清除能力测定 以无水乙醇为溶剂,将总黄酮配制成 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的溶液备用。精确吸取上述不同浓度的溶液 300 μL,与 2 mL 0.004% DPPH 溶液充分混合后室温下静置 20 min,在 517 nm 处测其吸光度( $D_1$ )。以不加提取液的 DPPH 为空白对照,测定溶液

在 517 nm 处的吸光度( $D_0$ )。精确吸取上述不同质量浓度总黄酮溶液 300 μL,分别与 2 mL 无水乙醇混合均匀后,以无水乙醇为对照,测定各溶液在 517 nm 处的吸光度( $D_2$ )<sup>[12]</sup>。同法对回流提取得到的总黄酮的 DPPH 自由基清除能力进行测定。计算公式为:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = (1 - \frac{D_1 - D_2}{D_0}) \times 100\%$$

1.3.6 铁氰化钾还原法测定还原力 配制不同浓度的总黄酮样品溶液,取 1.5 mL 样品,加入 1.5 mL、pH 值 6.6 的磷酸盐缓冲液和 1.5 mL 六氰合铁酸钾溶液,混匀后于 50 ℃ 恒温 20 min,快速冷却后加入 1 mL 10% 三氯乙酸溶液,于 3 000 r/min 下离心 10 min,取上清液 1 mL 再加入 1 mL 蒸馏水和 1 mL 0.1% 三氯化铁溶液,充分混匀静置后,于 700 nm 处测定吸光度,以吸光度表示还原能力<sup>[13]</sup>。同法对回流提取得到的总黄酮还原力进行测定。

1.3.7 羟自由基清除率 配制不同浓度的总黄酮样品溶液,取 1.5 mL 样品,分别加入 1.0 mL 2.5 mmol/L 的水杨酸溶液、1.0 mL 5 mmol/L 的 FeSO<sub>4</sub> 溶液和 2.0 mL 蒸馏水,充分混匀,加入 1.0 mL 5 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,置于 37 ℃ 恒温水浴锅中反应 30 min,再置于 510 nm 处测定其吸光度,以蒸馏水作空白参比<sup>[14]</sup>。同法对回流提取得到的总黄酮羟自由基清除率进行测定。

$$\text{羟自由基清除率} = \left[ \frac{D_0 - (D_2 - D_1)}{D_0} \right] \times 100\%$$

式中: $D_0$  为空白对照吸光度; $D_2$  为加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 样品溶液吸光度; $D_1$  为不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 样品溶液吸光度。

2 结果与分析

2.1 单因素考察艾纳香总黄酮超声辅助提取工艺  
2.1.1 超声时间对艾纳香总黄酮提取率的影响 由图 1 - a 可知,随着超声时间的增加,艾纳香总黄酮提取率呈现先上升后下降再保持稳定状态的趋势。当超声时间为 30 min 时,艾纳香总黄酮提取率为 12.98%,继续延长超声时间,总黄酮提取率维持在 12.40% 左右波动。这主要是由于超声波破坏了某些黄酮类成分的结构而有所损失,造成提取率下降。因此选定 20 ~ 30 min 为超声时间所需的水平范围。

2.1.2 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 用量对艾纳香总黄酮提取率的影响 由图 1 - b 可知,随着 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 用量的增加,艾纳香总黄酮提取率先上升后稳定在一定水平。当 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 用量大于 0.4 g/mL 时,提取率稳定在 12.78% 左右波动,当继续增加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 用量时总黄酮提取率并没有显著增加。这主要

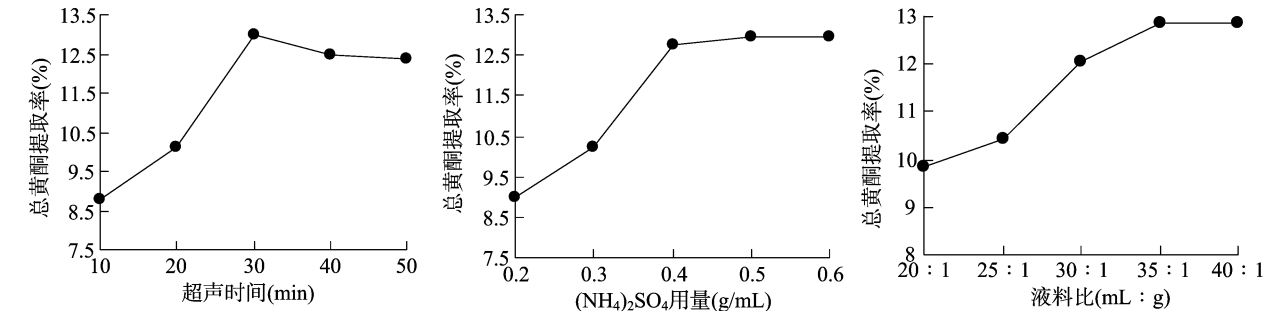


图1 不同提取因素对艾纳香总黄酮提取率的影响

是由于 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量增加会与乙醇争夺体系中的水,使总黄酮在乙醇相的含量减少,导致提取率下降。因此选定 $0.3 \sim 0.5 \text{ g/mL}$ 为响应面设计 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量的水平范围。

**2.1.3 液料比对艾纳香总黄酮提取率的影响** 由图 1-c 可知,随着液料比的增加,艾纳香总黄酮提取率先上升后稳定在一定水平,没有显著性增加。当液料比超过 $35 \text{ mL} : 1 \text{ g}$ 时,总黄酮提取率稳定在 $12.89\%$ 左右波动。主要是因为提取液的增加可使艾纳香叶与提取溶剂充分接触,有利于总黄酮的浸出,当液料比超过 $35 \text{ mL} : 1 \text{ g}$ 时,总黄酮的提取基本达到饱和状态。因此选定 $(25 \sim 35) \text{ mL} : 1 \text{ g}$ 为响应面设计的水平。

**2.2 Box - Behnken 响应曲面设计优化艾纳香总黄酮微波辅助提取工艺**

采用 Design - Expert 8.0.6 提供的 Box - Behnken 试验,对各因素进行拟合,得到多元回归方程为:

$$R_{\text{提取率}} = 2.8410 + 0.3494A + 21.2675B + 0.0302C - 0.1225AB + 2.7500 \times 10^{-3}AC - 0.0900BC - 6.2600 \times 10^{-3}A^2 - 18.3500B^2 - 9.4000 \times 10^{-4}C^2。$$

对艾纳香总黄酮提取率的回归模型进行方差及显著性分析,结果见表 3。该模型方程有显著性影响( $P < 0.0001$ ),失拟项不显著( $P = 0.2021 > 0.05$ ),说明在本试验条件下,该回归模型所考察的因素足以反映试验中各提取工艺参数对总黄酮提取率的影响。判定系数 $R^2 = 0.9868$ , $R^2_{\text{adj}} = 0.9699$ ,说明回归模型与试验值拟合均较好,可用于艾纳香总黄酮提取率的理论推测和分析,各因素影响大小依次为液料比 > 超声时间 >  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量。由 $F$ 检验可知,一次项中液料比对总黄酮的提取率具有极显著影响( $P < 0.01$ ),超声时间对总黄酮的提取率具有显著影响( $P < 0.05$ );交互项中超声时间与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量、超声时间与液料比之间的交互作用对总黄酮提取率具有极显著影响( $P < 0.01$ );在二次项中超声时间、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量对总黄酮提取率具有极显著影响( $P < 0.01$ );其他因素之间不显著( $P > 0.05$ ),这与图 2 中 3D 效应面图反映出的各因素间的交互作用相吻合。

表 3 试验结果方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
回归模型	2.14	9	0.24	58.37	<0.0001
A	0.042	1	0.042	10.33	0.0148
B	$3.613 \times 10^{-3}$	1	$3.613 \times 10^{-3}$	0.89	0.3776
C	0.082	1	0.082	20.14	0.0028
AB	0.060	1	0.060	14.74	0.0064
AC	0.076	1	0.076	18.57	0.0035
BC	$8.100 \times 10^{-3}$	1	$8.100 \times 10^{-3}$	1.99	0.2013
A <sup>2</sup>	1.65	1	1.65	405.19	<0.0001
B <sup>2</sup>	0.14	1	0.14	34.82	0.0006
C <sup>2</sup>	$2.325 \times 10^{-3}$	1	$2.325 \times 10^{-3}$	0.57	0.4745
残差	0.029	7	$4.072 \times 10^{-3}$		
失拟项	0.020	3	$6.608 \times 10^{-3}$	3.05	0.1551
净误差	$8.680 \times 10^{-3}$	4	$2.170 \times 10^{-3}$		
总和	2.17	16			

由 Design - Expert 8.0.6 软件得出艾纳香总黄酮提取的最佳工艺参数是超声时间 $30.92 \text{ min}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量 $0.4 \text{ g/mL}$ 、液料比为 $32.25 \text{ mL} : 1 \text{ g}$ ,总黄酮提取率的预测值为 $13.29\%$ 。为便于生产试验需求,定为超声时间 $31 \text{ min}$ 、

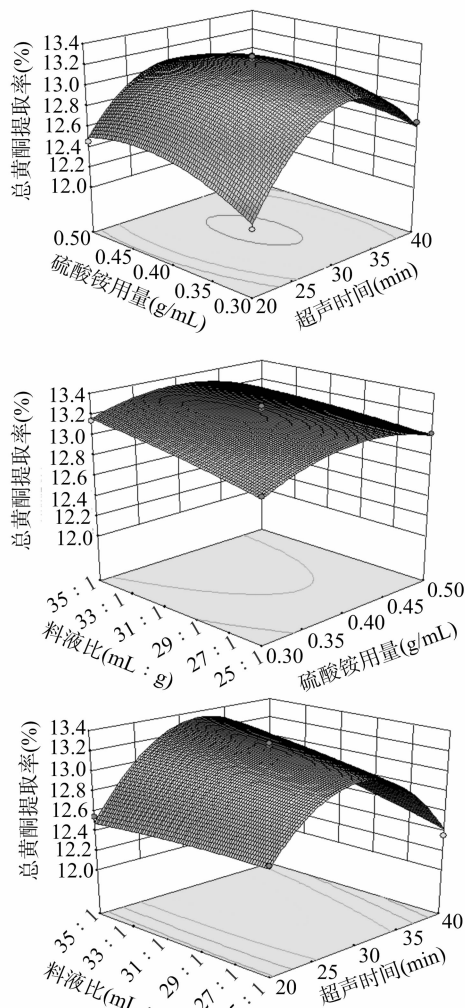


图 2 各提取工艺参数对提取率的交互作用影响的 3D 效应面图

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量 $0.4 \text{ g/mL}$ 、液料比为 $32 \text{ mL} : 1 \text{ g}$ ,进一步验证试验,得出的总黄酮提取率为 $(13.31 \pm 0.21)\%$ 。该值与预测值比较接近,因此选取此为超声辅助双水相体系提取艾纳香总黄酮的工艺参数。

**2.3 不同提取工艺提取的艾纳香总黄酮抗氧化活性**

**2.3.1 DPPH 自由基清除能力测定结果** 由图 3 可知,回流提取与超声辅助双水相提取得到的艾纳香总黄酮对 DPPH 自由基均有较强的清除能力。浓度与 DPPH 自由基清除率存在正相关关系,且超声辅助双水相提取的清除能力显著高于一般回流提取( $P < 0.05$ )。当浓度为 $0.5 \text{ mg/mL}$ 时,超声辅助双水相提取法提取的艾纳香总黄酮对 DPPH 自由基清除率为 $78.8\%$ ,而回流提取的为 $73.9\%$ 。

**2.3.2 还原力测定结果** 吸光度与样品的还原力具有正相关关系,吸光度越大,样品的还原力越强。由图 4 可知,回流提取与超声辅助双水相得到的艾纳香总黄酮均具有较强的还原能力,说明不同提取法也均具有较强的抗氧化能力。在测定的质量浓度范围内,艾纳香总黄酮的还原力随着浓度的升高而增强,且超声辅助双水相提取的艾纳香总黄酮还原力显著高于一般回流提取( $P < 0.05$ )。当浓度为 $0.5 \text{ mg/mL}$ 时,超声辅助双水相提取的吸光度 $D_{700 \text{ nm}}$ 为 $1.35$ 。

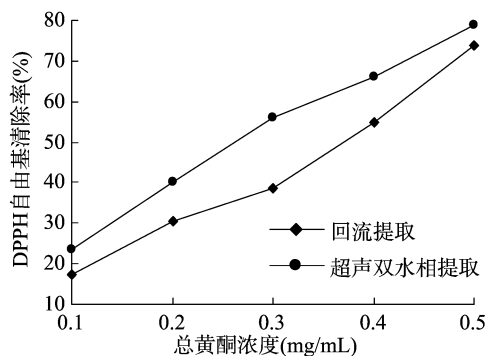


图3 不同提取方法对 DPPH 自由基清除率的影响

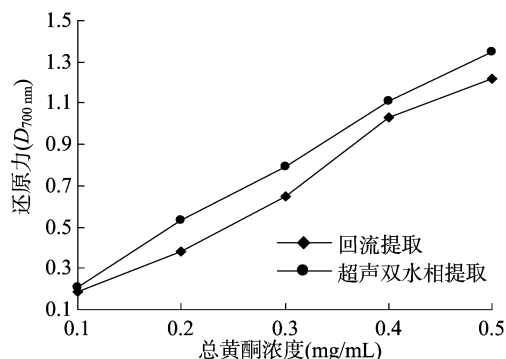


图4 不同提取方法对还原力的影响

2.3.3 羟自由基清除率 由图 5 可知,回流提取与超声辅助双水相提取得到的艾纳香总黄酮对羟自由基均有较强的清除能力。随着总黄酮浓度的增加清除率也随之提高,且超声辅助双水相提取的清除能力显著高于一般回流提取 ( $P < 0.05$ )。当浓度为 0.5 mg/mL 时,超声辅助提取法的清除率为 75.9%,而回流提取为 69.1%。

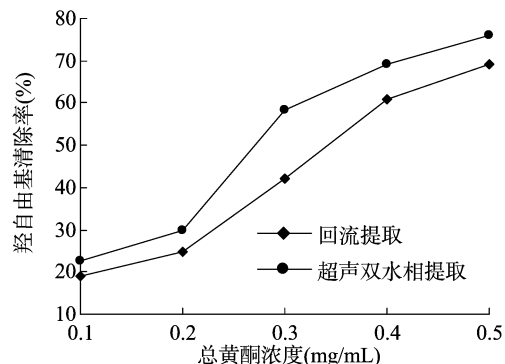


图5 不同提取方法对羟自由基清除率的影响

### 3 结论

超声波提取时间短、温度低、效率高,是高效、节能、环保式的提取方式<sup>[15-16]</sup>,结合乙醇-硫酸铵双水相体系操作,具有条件温和、处理量大、易于连续操作等优点,广泛应用于中药材提取、生物工程、药物分析和金属分离等方面。本研究以艾纳香为主要原料采用 Box-Behnken 响应曲面设计对其总

黄酮超声辅助双水相提取工艺条件进行优化,并比较该法与传统回流提取所得的总黄酮进行抗氧化能力比较。结果表明,超声辅助双水相提取艾纳香总黄酮的最佳工艺条件为超声时间 31 min、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的用量 0.4 g/mL、液料比为 32 mL : 1 g,此条件下提取的艾纳香总黄酮得率为  $(13.31 \pm 0.21)\%$ 。且对 DPPH 自由基、羟自由有较较强的清除能力以及较高的还原力,且超声辅助双水相提取的艾纳香总黄酮抗氧化能力显著高于一般回流提取。

### 参考文献:

- [1] 师琴丽,覃军章,王用平,等. 贵州优势苗族药物艾纳香及其产品[J]. 中药材,2003,26(增刊1):87-88.
- [2] 袁媛,庞玉新,王文全,等. 中国艾纳香属植物资源调查[J]. 热带生物学报,2011,2(1):78-82.
- [3] 韦睿斌,庞玉新,杨全,等. 艾纳香黄酮类化学成分研究进展[J]. 广东药学院学报,2014,30(1):123-127.
- [4] Tabaraki R, Nateghi A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(6): 1279-1286.
- [5] Chemat F, Zill-e-Huma Z, Khan M K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(4):813-835.
- [6] Zhi W B, Deng Q Y. Purification of salvianolic acid B from the crude extract of Salvia miltiorrhiza with hydrophilic organic/salt-containing aqueous twophase system by counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography, 2006, 16(11):149-152.
- [7] Shen S F, Chang Z D, Liu J, et al. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from Glycyrrhiza uralensis Fisch extract by three-liquid phase extraction systems[J]. Separation and Purification Technology, 2007, 53(3):216-223.
- [8] 王志华,马会民,马泉莉,等. 双水相萃取体系的研究[J]. 应用化学,2001,18(3):173-175.
- [9] 林金清,董军芳,李夏兰. 乙醇/硫酸铵双水相体系萃取甘草酸钾的研究[J]. 精细化工,2004,21(3):165-173.
- [10] 张艳霞,朱彩平,邓红,等. 超声辅助双水相提取石榴皮多酚[J]. 食品与发酵工业,2016,42(12):150-156.
- [11] 徐春明,李婷,王英英,等. 微波辅助双水相提取苦荞麦粉中黄酮类化合物[J]. 食品科学技术学报,2014,32(6):36-41.
- [12] Kim D, Lee K W, Lee H J, et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(13):3713-3717.
- [13] 陈美珍,余杰,郭慧敏,等. 大豆分离蛋白酶解物清除羟自由基作用的研究[J]. 食品科学,2002,23(1):43-47.
- [14] 刘水英,李新生,党娅,等. 响应面法优化紫山药花青苷提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学,2014,35(22):84-91.
- [15] 蓝峻峰,张春艳. 超声波辅助热提艾蒿黄酮工艺优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):267-269.
- [16] 刘彬,楚冬海. 超声波提取明日叶总黄酮的工艺研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):338-339.