

# 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取淫羊藿中总多酚工艺的优化及其抗氧化活性

王文静<sup>1</sup>, 董泰玮<sup>2</sup>

(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137)

**摘要:** **目的** 优化超临界 CO<sub>2</sub> 萃取淫羊藿中总多酚工艺, 并评价其抗氧化活性。**方法** 在单因素试验基础上, 以温度、压力、CO<sub>2</sub> 体积流量、时间为影响因素, 总多酚萃取量为评价指标, Box-Behnken 设计优化萃取工艺。再测定总多酚对 DPPH 自由基的清除作用。**结果** 最佳条件为温度 41.6 ℃, 压力 30.5 MPa, CO<sub>2</sub> 体积流量 26.3 L/h, 时间 2.09 h, 总多酚萃取量 53.55 mg/g。250 μg/mL 总多酚对 DPPH 的清除率可达 81.26%, IC<sub>50</sub> 为 112.06 μg/mL。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于超临界 CO<sub>2</sub> 萃取淫羊藿中抗氧化活性较强的总多酚。

**关键词:** 淫羊藿; 总多酚; 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取; 抗氧化活性; Box-Behnken 设计

**中图分类号:** R284.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2018)11-2426-05

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.013

## Total polyphenols from *Epimedium brevicornu*, their supercritical CO<sub>2</sub> extraction technique optimization and the antioxidant activity

WANG Wen-jing<sup>1</sup>, DONG Tai-wei<sup>2</sup>

(1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To optimize the supercritical CO<sub>2</sub> extraction technique for total polyphenols from *Epimedium brevicornu* Maxim. and to evaluate the antioxidant activity. **METHODS** With temperature, pressure, CO<sub>2</sub> volume flow rate and time as influencing factors, total polyphenols extraction content as an evaluation index, Box-Behnken design was applied to optimizing the extraction on the basis of single factor experiment. Subsequently the scavenging effect of total polyphenols on DPPH free radical was determined. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 41.6 ℃ for temperature, 30.5 MPa for pressure, 26.3 L/h for CO<sub>2</sub> volume flow rate, and 2.09 h for time, the total polyphenols extraction content was 53.55 mg/g. The scavenging rate of total polyphenols (250 μg/mL) on DPPH free radical was 81.26% with the IC<sub>50</sub> of 112.06 μg/mL. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the supercritical CO<sub>2</sub> extraction for total polyphenols with strong antioxidant activity from *E. brevicornu*.

**KEY WORDS:** *Epimedium brevicornu* Maxim.; total polyphenols; supercritical CO<sub>2</sub> extraction; antioxidative activity; Box-Behnken design

淫羊藿在我国有 40 余种, 大多数分布于陕西、甘肃、山西、四川等地<sup>[1]</sup>, 主要含有多酚、多糖、挥发油、生物碱等成分<sup>[2]</sup>, 具有强筋健骨、壮阳补肾、祛风除湿等功效<sup>[3-5]</sup>, 所含的总多酚有着抗氧化、抗衰老、抗肿瘤等作用<sup>[6-7]</sup>。目前, 淫羊藿活性成分的提取工艺有溶剂提取法、超声波/微波辅助法、回流加热法、超临界萃取法等<sup>[8-14]</sup>, 但目

前鲜有超临界 CO<sub>2</sub> 萃取淫羊藿总多酚的报道。因此, 本实验采用该方法<sup>[15]</sup> 萃取淫羊藿总多酚, 并通过 Box-Behnken 设计优化萃取工艺, 最后评价该成分的抗氧化活性, 可为后续相关工业化生产提供实验基础。

### 1 材料

1.1 试药 淫羊藿产自陕西汉中, 经陕西中医药

收稿日期: 2018-05-29

作者简介: 王文静 (1986—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为临床与中药学。Tel: 18082269121, E-mail: 1641832137@qq.com

大学药学院赵鹏副教授鉴定为心叶淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的叶。食用级 CO<sub>2</sub> (西安腾龙气体有限公司); 没食子酸 (天津科密欧化学试剂有限公司); Folin-Ciocalteu 试剂 (天津威一化工科技有限公司); 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) (美国 Sigma 公司); 无水碳酸钠 (天津化学试剂有限公司); 乙醇 (西安化学试剂厂), 以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器 FA2004 电子分析天平 (上海恒平科学仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温水浴锅 (郑州市中原科技玻璃仪器厂); UV-1801 紫外可见分光光度计 [北京北分瑞利分析仪器 (集团) 公司]; DZ-1A II 真空干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司); HA120-50-01 超临界萃取装置 (江苏淮安超临界萃取设备有限公司)。

## 2 方法与结果

2.1 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺 将淫羊藿置于 50 ℃ 干燥箱中烘干 2 h, 粉碎过筛, 装入密封袋保存, 再称取 10 g 置于萃取釜中, 加入 50 mL 75% 乙醇作为夹带剂, 通入 CO<sub>2</sub> 进行连续萃取。分别调节不同萃取温度 (30、35、40、45、50 ℃)、压力 (15、20、25、30、35 MPa)、CO<sub>2</sub> 体积流量 (10、15、20、25、30 L/h)、时间 (0.5、1、1.5、2、2.5 h) 进行单因素试验, 最后过滤萃取液, 清洗残渣。

2.2 总多酚萃取量测定 精密称取没食子酸 0.500 0 g, 加入 10 mL 蒸馏水溶解, 定容至 100 mL, 取不同体积置于 50 mL 量瓶中, 分别加入 Folin-Ciocalteu 试剂 2 mL、10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 5 mL, 置于 25 ℃ 恒温水浴锅中显色 2 h, 在 765 nm 波长处测定吸光度, 以其为纵坐标 (*A*), 总多酚质量浓度为横坐标 (*C*) 进行回归, 得回归方程为  $A = 0.035\,8C + 0.024\,6$  ( $R^2 = 0.998\,6$ ), 在 0.005 ~ 0.5 mg/L 范围内线性关系良好。

取萃取液 1 mL 进行显色反应, 在相同条件下测定吸光度, 根据回归方程测定总多酚质量浓度, 再计算其萃取量, 公式为  $Y = \frac{C \times V \times N}{m \times 1\,000}$ , 其中 *Y* 为总多酚萃取量 (mg/g), *V* 为萃取液体积 (mL), *N* 为稀释倍数, *m* 为药材质量 (g)。

2.3 抗氧化活性实验 向 1 mL 萃取液加入 5 mL DPPH 乙醇溶液 (0.2 mmol/L), 振荡混匀, 于室温下避光静置 30 min, 在 510 nm 波长处测定吸光度。为了减小实验误差, 以同体积蒸馏水代替萃取

液作为空白试验, 以同体积乙醇溶液代替 DPPH 乙醇溶液作为对照试验, 计算 DPPH 清除率, 公式为  $I = \left(1 - \frac{A - A_1}{A_0}\right) \times 100\%$ , 其中 *I* 为 DPPH 清除率 (%) , *A* 为以萃取液为基准的吸光度, *A*<sub>1</sub> 为以乙醇为基准的吸光度, *A*<sub>0</sub> 为以蒸馏水为基准的吸光度。

### 2.4 单因素试验

2.4.1 温度 图 1 显示, 随着温度升高, 总多酚萃取量迅速上升, 在 40 ℃ 时最高, 之后略有降低, 这是因为温度升高可增加该成分扩散速率, 提高其萃取效果; 但温度过高可能破坏已萃取出的多酚结构, 也可能降低 CO<sub>2</sub> 密度, 使得萃取效果变差, 最终导致总多酚含量降低<sup>[16]</sup>。因此, 选择温度为 40 ℃。

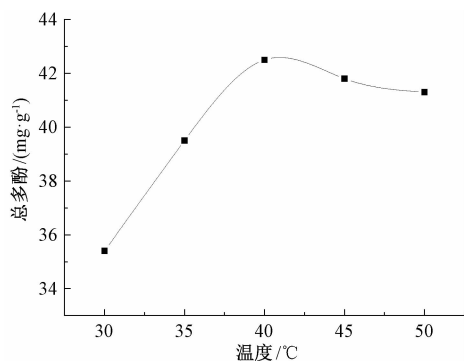


图 1 温度对总多酚萃取量的影响

Fig. 1 Effects of temperature on total polyphenols extraction content

2.4.2 压力 图 2 显示, 总多酚萃取量随压力升高而增大, 但后期增幅较小, 这是因为压力升高时增加 CO<sub>2</sub> 密度, 减少分子间传质距离, 从而提高萃取效果<sup>[17]</sup>; 继续增大压力时, CO<sub>2</sub> 黏度也会增大, 从而减弱萃取效果。因此, 选择压力为 30 MPa。

2.4.3 CO<sub>2</sub> 体积流量 图 3 显示, 随着 CO<sub>2</sub> 体积流量增加, 总多酚萃取量呈先增大后略有减小的趋势, 这是因为增大 CO<sub>2</sub> 体积流量有利于总多酚的萃取, 但其过大时不仅减少传质接触时间, 降低萃取效果, 而且增大了 CO<sub>2</sub> 用量, 造成浪费<sup>[18]</sup>。因此, 选择 CO<sub>2</sub> 体积流量为 25 L/h。

2.4.4 时间 图 4 显示, 在萃取开始 2 h 内, 总多酚萃取量达到最大, 为 46.2 mg/g, 之后略有减小, 这是因为此时其萃取量已达到饱和, 时间延长可能使该成分发生氧化, 导致其含量反而降低。因此, 选择时间为 2 h。

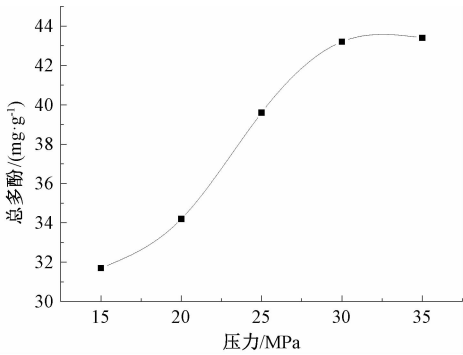


图 2 压力对总多酚萃取量的影响  
Fig. 2 Effects of pressure on total polyphenols extraction content

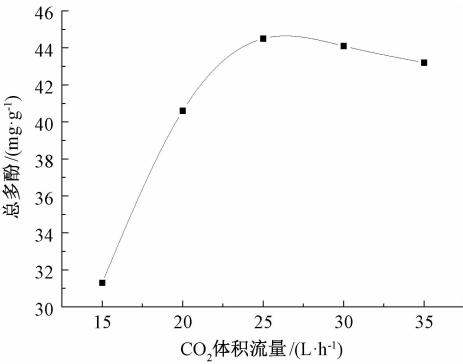


图 3 CO₂ 体积流量对总多酚萃取量的影响  
Fig. 3 Effects of CO₂ volume flow rate on total polyphenols extraction content

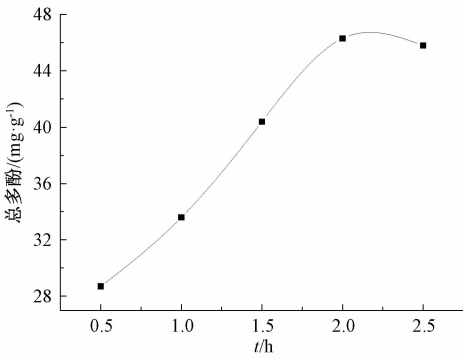


图 4 时间对总多酚萃取量的影响  
Fig. 4 Effects of time on total polyphenols extraction content

2.5 Box-Behnken 设计<sup>[19-20]</sup> 以温度 ( $X_1$ )、压力 ( $X_2$ )、CO<sub>2</sub> 体积流量 ( $X_3$ )、时间 ( $X_4$ ) 为影响因素, 总多酚萃取量为评价指标 ( $Y$ ), Box-Behnken 设计优化萃取工艺。因素水平见表 1, 结果见表 2。

然后, 对以上数据进行拟合, 得到多元二次回归方程为  $Y = 52.00 + 4.42X_1 + 1.67X_2 + 3.81X_3 + 2.41X_4 + 0.10X_1X_2 - 0.82X_1X_3 - 0.43X_1X_4 -$

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels				
水平	$X_1$ 温度/ ℃	$X_2$ 压力/ MPa	$X_3$ CO <sub>2</sub> 体积 流量/(L·h <sup>-1</sup> )	$X_4$ 时间/ h
-1	35	25	20	1.5
0	40	30	25	2
1	45	35	30	2.5

表 2 试验及设计结果

Tab. 2 Design and results of tests					
试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	Y 总多酚萃取量/ (mg·g <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	0	0	33.0
2	1	-1	0	0	42.8
3	-1	1	0	0	35.6
4	1	1	0	0	45.8
5	0	0	-1	-1	33.5
6	0	0	1	-1	39.5
7	0	0	-1	1	36.7
8	0	0	1	1	44.6
9	-1	0	0	-1	32.4
10	1	0	0	-1	42.1
11	-1	0	0	1	37.4
12	1	0	0	1	45.4
13	0	-1	-1	0	31.8
14	0	1	-1	0	38.1
15	0	-1	1	0	43.3
16	0	1	1	0	44.3
17	-1	0	-1	0	31.5
18	1	0	-1	0	40.8
19	-1	0	1	0	40.2
20	1	0	1	0	46.2
21	0	-1	0	-1	34.2
22	0	1	0	-1	38.9
23	0	-1	0	1	41.5
24	0	1	0	1	43.9
25	0	0	0	0	51.6
26	0	0	0	0	52.2
27	0	0	0	0	51.4
28	0	0	0	0	52.8
29	0	0	0	0	52.0

$1.33X_2X_3 - 0.57X_2X_4 + 0.47X_3X_4 - 6.16X_1^2 - 6.16X_2^2 - 6.50X_3^2 - 6.55X_4^2$ , 方差分析见表 3。由表可知, 模型  $P < 0.0001$ , 表明具有高度显著关系; 失拟误差  $P > 0.05$ , 表明不存在失拟因素; 决定系数  $R^2$  为 0.9905, 表明各因素与总多酚萃取量之间的线性关系高度显著; 校正系数  $R_{adj}^2$  为 0.9810, 预测系数  $R_{pre}^2$  为 0.9496, 均较合理; 一次项 ( $X_1 \sim X_4$ )、二次项 ( $X_1^2 \sim X_4^2$ )  $P < 0.0001$ , 具有高度显著性。同时, 各因素影响程度依次为温度  $>$  CO<sub>2</sub> 体积流量  $>$  时间  $>$  压力。

响应面分析见图 5, 可知对总多酚萃取量影响程度最大的因素是温度, 其次是 CO<sub>2</sub> 体积流量、

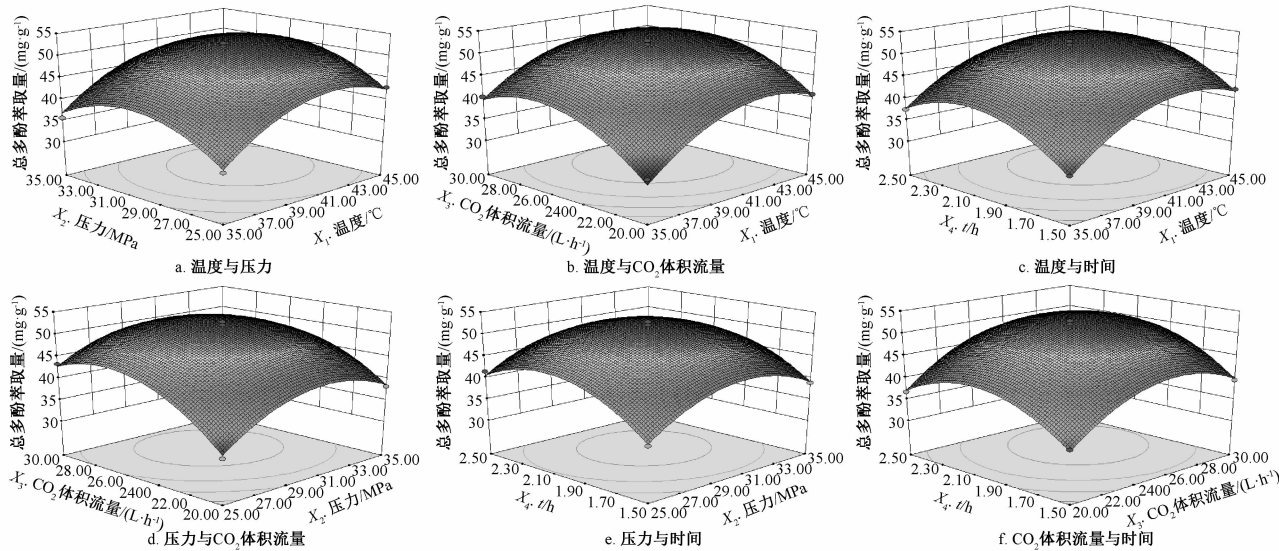


图 5 各因素响应面图

Fig. 5 Response surface plots for various factors

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 190. 95	14	85. 07	104. 52	<0. 000 1
X <sub>1</sub>	234. 08	1	234. 08	287. 62	<0. 000 1
X <sub>2</sub>	33. 33	1	33. 33	40. 96	<0. 000 1
X <sub>3</sub>	174. 04	1	174. 04	213. 84	<0. 000 1
X <sub>4</sub>	69. 60	1	69. 60	85. 52	<0. 000 1
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0. 04	1	0. 04	0. 05	0. 827 8
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2. 72	1	2. 72	3. 35	0. 088 8
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0. 72	1	0. 72	0. 89	0. 362 1
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	7. 02	1	7. 02	8. 63	0. 010 8
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	1. 32	1	1. 32	1. 62	0. 223 2
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0. 90	1	0. 90	1. 11	0. 310 2
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	246. 33	1	246. 33	302. 67	<0. 000 1
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	246. 33	1	246. 33	302. 67	<0. 000 1
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	274. 05	1	274. 05	336. 73	<0. 000 1
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	278. 29	1	278. 29	341. 93	<0. 000 1
残差	11. 39	14	0. 81	—	—
失拟误差	10. 19	10	1. 02	3. 40	0. 124 9
纯误差	1. 20	4	0. 30	—	—
总离差	1 202. 34	28	—	—	—

时间、压力，与方差分析结果一致。

由此可知，最优工艺为温度 41. 67 ℃，压力 30. 51 MPa，CO<sub>2</sub> 体 积 流 量 26. 34 L/h，时间 2. 09 h，考虑到实际情况，将其修正为温度 41. 6 ℃，压力 30. 5 MPa，CO<sub>2</sub> 体 积 流 量 26. 3 L/h，时间 2. 09 h。再进行 3 批验证试验，测得总多酚萃取量为 53. 55 mg/g，误差均在 5% 以内，表明该工艺准确可靠。

2. 6 抗氧化活性实验 图 6 显示，随着总多酚质量浓度增加，DPPH 清除率逐渐上升，在

250 μg/mL 时其清除率达到 81. 26%，之后增幅不明显。此外，通过 Logit 法测得清除 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 为 112. 06 μg/mL。

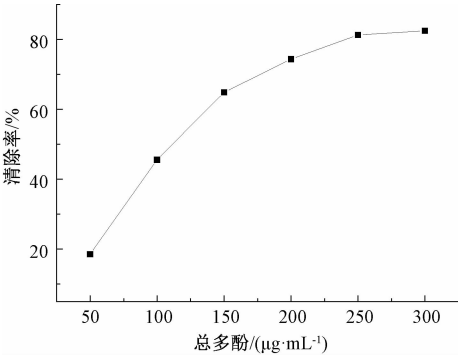


图 6 抗氧化活性实验结果

Fig. 6 Results of antioxidative activity tests

3 结论

本实验通过 Box-Behnken 设计优化超临界 CO<sub>2</sub> 萃取淫羊藿总多酚工艺，得到最佳条件为温度 41. 6 ℃，压力 30. 5 MPa，CO<sub>2</sub> 体 积 流 量 26. 3 L/h，时间 2. 09 h，总多酚萃取量 53. 55 mg/g。同时还发现，250 μg/mL 总多酚对 DPPH 的清除率可达 81. 26%，IC<sub>50</sub> 为 112. 06 μg/mL，表明该成分具有较强的抗氧化活性。该方法不仅稳定可靠，产率高，而且能有效保护淫羊藿总多酚的结构和活性，可为相关工业化生产提供实验基础。

参考文献：

[ 1 ] 李玉伟, 韩新宇. 淫羊藿仿生栽培[J]. 特种经济动植物, 2011, 14(11): 40.

[ 2 ]

张华峰, 杨晓华. 淫羊藿的生物活性成分及其开发策略研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 329-332.

[ 3 ]

刘春明, 刘志强, 窦建鹏, 等. 朝鲜淫羊藿中生物碱类新成分的分离提取及结构鉴定[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(12): 2215-2217.

[ 4 ]

Ma H P, He X R, Yang Y, *et al.* The genus *Epimedium*: an ethnopharmacological and phytochemical review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(3): 519-541.

[ 5 ]

Lu Y, Wang D Y, Hu Y L, *et al.* Sulfated modification of *Epimedium* polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV [J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 71(2): 180-186.

[ 6 ]

尹剑云, 陈红风. 淫羊藿及其有效成分抗肿瘤机制的研究进展[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(12): 1184-1187.

[ 7 ]

Sharan K, Siddiqui J A, Swarnkar G, *et al.* Role of phytochemicals in the prevention of menopausal bone loss; evidence from *in vitro* and *in vivo*, human interventional and pharmacokinetic studies[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(9): 1138-1157.

[ 8 ]

李 倩, 李 晓, 魏 悦, 等. 淫羊藿总黄酮的碱提工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(7): 1141-1144.

[ 9 ]

侯莹莹, 赵 岩, 唐国胜, 等. 中心组合设计-响应曲面法优化淫羊藿苷超声波提取工艺[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(10): 175-181.

[ 10 ]

黄瑞华, 韩 伟, 周永传, 等. 微波辅助提取淫羊藿饮片中淫羊藿苷的热质同向传递数值模拟[J]. 化工学报, 2005, 56(7): 1300-1304.

[ 11 ]

肖红涛, 刘 雨, 张 伟, 等. 加热回流法提取淫羊藿苷的试验研究[J]. 生物技术世界, 2015(3): 70-72.

[ 12 ]

Guan Y Q, Zhang Y W, Zhang L. Optimization for supercritical CO<sub>2</sub> extraction of icariin by response surface method[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2011, 20(2): 159-163.

[ 13 ]

毛白杨, 郑 洁, 赵晓红, 等. 响应面优化淫羊藿抗氧化多酚超声提取工艺[J]. 广州化工, 2014, 42(23): 64-66.

[ 14 ]

张雯婧. 朝鲜淫羊藿的活性成分及三种淀粉冻融性质的研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.

[ 15 ]

关雅琼. 淫羊藿活性成分的超临界萃取工艺和分析方法研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2011.

[ 16 ]

刘玉梅, 顾小红, 汤 坚, 等. 超临界萃取啤酒花浸膏及其萃余物中多酚化合物提取的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(9): 155-158.

[ 17 ]

顾仁勇, 杨万根, 余 洁. 响应面优化超临界 CO<sub>2</sub> 萃取八月瓜幼果多酚工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(10): 76-80.

[ 18 ]

葛保胜, 王秀道, 孟 磊, 等. 超临界二氧化碳萃取核桃油的工艺研究[J]. 食品工业, 2003(2): 44-46.

[ 19 ]

Ferreira S L C, Bruns R E, Ferreira H S, *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 597(2): 179-186.

[ 20 ]

张南生, 孙卫军, 郭 虹, 等. Box-Behnken Design 效应面法在制剂处方优化中的应用[J]. 中国医药导报, 2015, 12(23): 34-37.

## 粉葛中葛根素提取工艺的优化及其提取物抗氧化活性

潘 俊<sup>1</sup>, 匡慕予<sup>2</sup>, 田 浩<sup>1</sup>, 王瀚墨<sup>1</sup>, 张 庭<sup>3</sup>, 杨 芳<sup>1</sup>, 侯朝祥<sup>1</sup>, 李智敏<sup>3\*</sup>

(1. 云南省农业科学院农产品加工研究所, 云南 昆明 650205; 2. 云南大学农学院, 云南 昆明 650504; 3. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南 昆明 650223)

**摘要:** **目的** 优化粉葛中葛根素提取工艺, 并评价其提取物抗氧化活性。**方法** 在单因素试验基础上, 以料液比、提取温度、提取时间、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)质量浓度为影响因素, 葛根素提取率为评价指标, 正交试验优化提取工艺。再测定粉葛提取物对·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·自由基的清除作用。**结果** 最佳条件为料液比1:16, 提取温度60℃, 提取时间2.5h, PVP质量浓度45mg/mL, 葛根素提取率1.604%。粉葛提取物对这2种自由基的清除作用显著增加。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于提取粉葛中葛根素, 并且加入助溶剂(PVP)可提高其提取物的抗氧化活性。

**关键词:** 粉葛; 葛根素; 提取; 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(2018)11-2430-07

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.014

收稿日期: 2018-06-11  
基金项目: 云南省农科院科技创新能力提升专项-农产品加工研究平台建设(2017YB26404); 云南省科技重点研发计划项目(2018BB024)  
作者简介: 潘 俊(1982—), 男, 副研究员, 从事天然产物及生物活性研究。E-mail: 38435992@qq.com  
\*通信作者: 李智敏(1979—), 女, 副研究员, 从事功能性食品与化妆品研发。E-mail: 393891330@qq.com