

# 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、防衰老、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

大学药学院赵鹏副教授鉴定为心叶淫羊藿 *Epimedum 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-Ciocalteau 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 (江苏华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-Ciocalteau 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  $A = 0.0358C + 0.0246$  ( $R^2 = 0.9986$ ), 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  $Y = \frac{C \times V \times N}{m \times 1000}$ , 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, 最终导致总多酚含有量降低<sup>[16]</sup>。因此, 选择温度为 40 ℃。

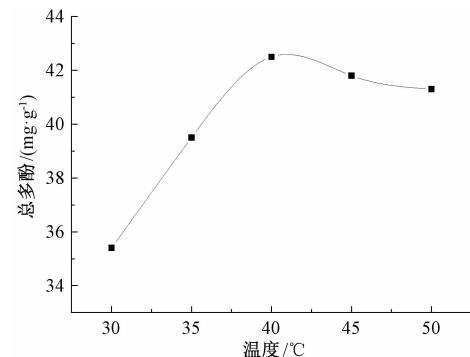


图 1 温度对总多酚萃取量的影响

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, 导致其含有量反而降低。因此, 选择时间为 2 h。

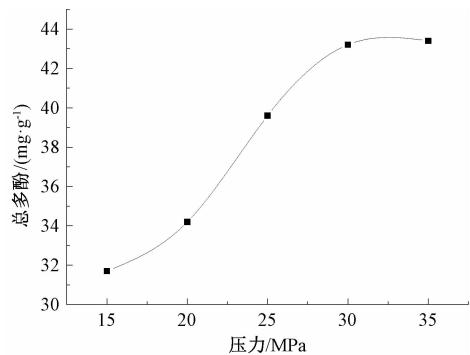


图2 压力对总多酚萃取量的影响

Fig. 2 Effects of pressure on total polyphenols extraction content

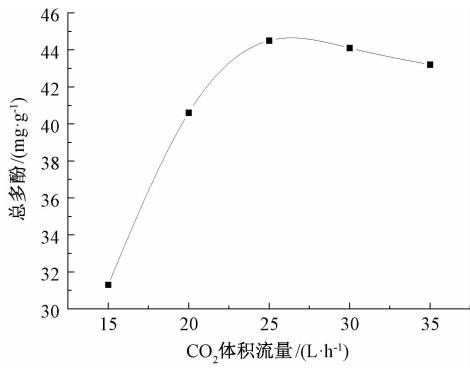


图3 CO₂ 体积流量对总多酚萃取量的影响

Fig. 3 Effects of CO₂ volume flow rate on total polyphenols extraction content

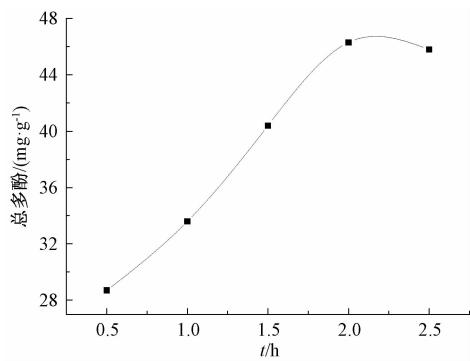


图4 时间对总多酚萃取量的影响

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 <sub>1</sub> 温度/℃	X <sub>2</sub> 压力/MPa	X <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> 体积流量/(L·h <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub> 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 <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	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

1.33 $X_2X_3 - 0.57X_2X_4 + 0.47X_3X_4 - 6.16X_1^2 - 6.16X_2^2 - 6.50X_3^2 - 6.55X_4^2$ ，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、

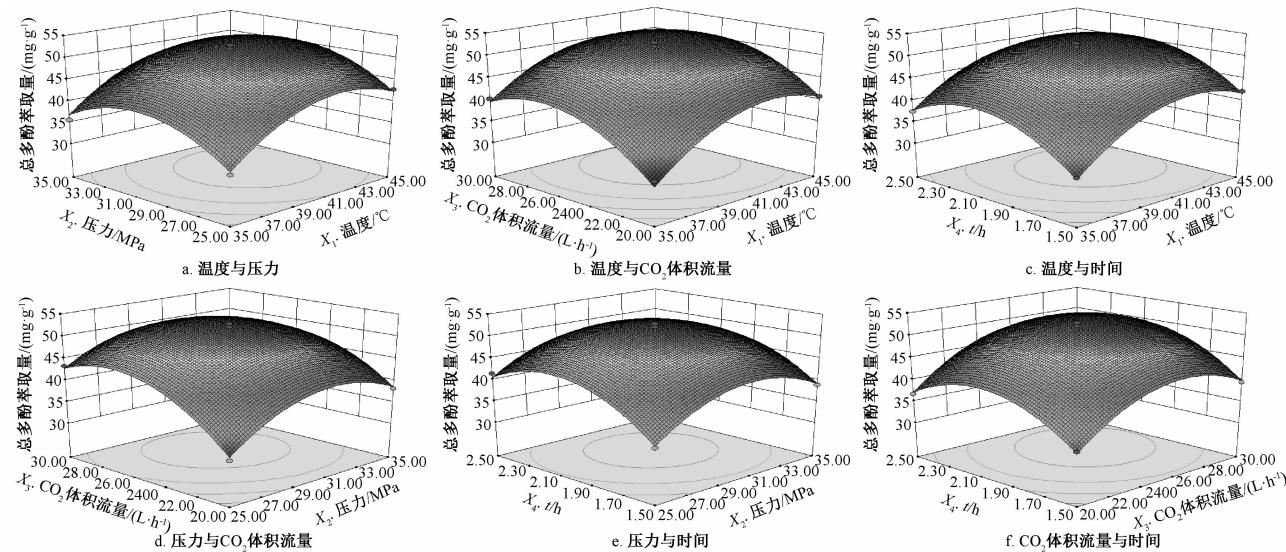


图5 各因素响应面图

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	<0.0001
X <sub>1</sub>	234.08	1	234.08	287.62	<0.0001
X <sub>2</sub>	33.33	1	33.33	40.96	<0.0001
X <sub>3</sub>	174.04	1	174.04	213.84	<0.0001
X <sub>4</sub>	69.60	1	69.60	85.52	<0.0001
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.04	1	0.04	0.05	0.8278
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2.72	1	2.72	3.35	0.0888
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0.72	1	0.72	0.89	0.3621
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	7.02	1	7.02	8.63	0.0108
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	1.32	1	1.32	1.62	0.2232
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0.90	1	0.90	1.11	0.3102
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	246.33	1	246.33	302.67	<0.0001
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	246.33	1	246.33	302.67	<0.0001
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	274.05	1	274.05	336.73	<0.0001
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	278.29	1	278.29	341.93	<0.0001
残差	11.39	14	0.81	—	—
失拟误差	10.19	10	1.02	3.40	0.1249
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，考虑到实际操作情况，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。

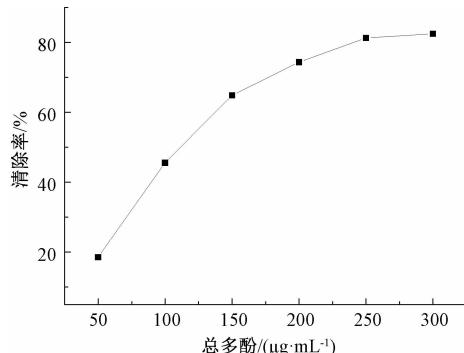


图6 抗氧化活性实验结果

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 pharma-cokinetic 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, 余信. 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2.5 h, PVP质量浓度45 mg/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