

DOI:10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.2024080023-11

双水相提取朝鲜淫羊藿黄酮及其抗氧化活性

刘欣然^{1,2}, 张青瑾^{1,3}, 邵佳玫¹, 王迦南¹, 徐海波¹, 钱慧琴^{1*}

(1.豫北医学院,河南新乡 453003;2.河南医药大学,河南新乡 453000;3.郑州大学,河南郑州 450000)

[摘要] 为优化超声辅助双水相提取朝鲜淫羊藿总黄酮工艺,探究其抗氧化活性,本试验通过单因素逐步优化策略,采用响应面法对朝鲜淫羊藿总黄酮提取工艺中 PFG600 质量分数、硫酸铵质量分数、液料比、超声时间进行优化。采用 DPPH 自由基清除,还原力以及总抗氧化活性对朝鲜淫羊藿总黄酮抗氧化活性进行评价。结果表明:当提取条件为超声功率 300 W、PEG600 质量分数 16%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数 17%、液料比 40(mL/g)、超声时间 18 min 时,朝鲜淫羊藿总黄酮提取率最高,为 65.90 mg/g,与理论预测值接近。朝鲜淫羊藿总黄酮对 DPPH 自由基清除能力低于抗坏血酸但仍有显著的清除作用,其 IC_{50} 值为 0.05406 mg/mL。朝鲜淫羊藿总黄酮的铁还原力与抗坏血酸相近,而总抗氧化活性高于抗坏血酸。超声辅助双水相提取朝鲜淫羊藿总黄酮的方法绿色可行,可为朝鲜淫羊藿总黄酮的高效提取提供参考。

[关键词] 朝鲜淫羊藿;总黄酮;双水相;响应面;超声;抗氧化

[中图分类号] S816.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-3314(2025)23-0045-08

朝鲜淫羊藿(*Epimedium Koreanum* Nakai)是小檗科淫羊藿属多年生草本植物,其叶可作为中草药淫羊藿,具有补肾阳,强筋骨,祛风湿等功效(国家药典委员会,2020)。朝鲜淫羊藿中含多种活性成分,主要有黄酮类、木脂素类、生物碱类、挥发油等。其中,黄酮类被认为是淫羊藿属植物主要的化学成分(Qian 等,2024)。Zhao 等(2022、2018)发现,朝鲜淫羊藿总黄酮通过促进 AMPK 激活来缓解慢性肾功能衰竭,且朝鲜淫羊藿叶中黄酮含量与其抗氧化活性呈正相关。此外,朝鲜淫羊藿黄酮类成分还具有抗肺纤维化(Zhao 等,2023、2022),抗肿瘤(Zhang 等,2020)和抗动脉粥样硬化(Kim 等,2019)等生物活性。综上可知,朝鲜淫羊藿黄酮

类成分具有很大的潜在开发价值。

目前黄酮类成分的提取方法有热水提取法、醇加热回流提取法、碱提取酸沉淀法、微波辅助提取法等(石文茜等,2022)。热水提取法所用的溶剂为水,虽然成本相对较低但是提取液中含有的杂质多且提取率不高。醇提法提取率高但污染较大,碱提取酸沉淀法成本低收率高,但是操作时间长且会对环境造成污染。尽管微波辅助提取技术以其高效性著称,但其高温特性可能导致热敏感性成分的结构破坏。双水相体系是当两种不相容的聚合物或一种聚合物与一种盐在水性溶剂中超过一定浓度时就会形成。将双水相体系用于提取天然药物的活性成分已经引起研究人员的广泛关注。与传统的黄酮提取方法相比,双水相提取法具有提取条件相对温和、时间短、能量消耗低、分离物质纯度高、接近生理环境、不会导致生物活性成分变性或失活等优点。因此,本研究采用超声波辅助的双水相体系提取朝鲜淫羊藿中的总黄酮,并优化其提取工艺,同时系统评估其抗氧化活性,

基金项目:河南省科技攻关项目(222102310374);河南省高等学校重点科研项目(23B360007)

作者简介:刘欣然(2001-),女,硕士,研究方向为药物研发与转化,E-mail:liuxinran178@163.com

* 通讯作者:钱慧琴(1988-),副教授,研究方向为天然药物活性成分研究,E-mail:qianhuiqina@163.com

为寻找适合工业化生产的低成本、低能耗、高效率的朝鲜淫羊藿总黄酮提取工艺提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 朝鲜淫羊藿地上部分于 2022 年 6 月采集于辽宁丹东宽甸红石镇, 经由新乡医学院三全学院鉴定。

1.2 主要试剂与仪器 芦丁对照品, 中国食品药品检定研究院; L-抗坏血酸 (维生素 C; HPLC $\geq 99\%$), 上海源叶生物科技有限公司; PEG600, 无锡市亚泰联合化工有限公司; 硫酸铵、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 NaNO_2 、 NaOH , 天津科密欧化学试剂有限公司; 铁氰化钾, 天津市德恩化学试剂有限公司; Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、硫酸、磷酸钠、钼酸铵, 国药集团化学试剂有限公司; 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基 (DPPH $\cdot$), 东京化成工业株式会社, 以上试剂均为分析纯。

KQ-300DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; SynergyH1 型伯腾 Bio, Tek 酶标仪; T6 型新世纪紫外可见分光光度仪, 北京普析通用仪器有限公司; FA2004 型电子分析天平, 上海象平仪器仪表有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 朝鲜淫羊藿的预处理 将已干燥的朝鲜淫羊藿地上部分剪切成段, 粉碎并通过 14 目筛处理, 存放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中以备后续使用。

1.3.2 芦丁标准曲线的绘制 精确移取浓度为 0.107 mg/mL 的芦丁对照品溶液 0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL, 各份均放置于 10 mL 容量瓶中, 依次加入显色剂 NaNO_2 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 NaOH 显色, 在 510 nm 的波长下测定其吸光度 A, 由此得到芦丁浓度 C(mg/mL) 与吸光度 A 之间的一元线性回归分析方程: $y=10.134x+0.0254$, $R^2=0.9995$, 表明在 0.005 ~ 0.06 mg/mL 的浓度范围内, 芦丁浓度与其相应的吸光度表现出一种良好的线性关系。

1.3.3 单因素试验 选用 PEG600- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系提取朝鲜淫羊藿中总黄酮, 固定提取条件为超声功率 300 W, 提取温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 分别考察

PEG600 质量分数 (14%、15%、16%、17%、18%、19%)、硫酸铵质量分数 (15%、16%、17%、18%、19%、20%)、液料比 (20、30、40、50、60 mL/g)、超声时间 (10、20、30、40、50、60 min) 4 个因素对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响。朝鲜淫羊藿总黄酮得率 Y(mg/g) 按下式计算。

$$Y = \frac{C \times 10 \times V \times 10}{m};$$

式中: C 为上相提取液总黄酮质量浓度, mg/mL; V 为上相提取液体积, mL; m 为朝鲜淫羊藿粉末重量, g。

1.3.4 响应面试验及最佳提取条件 依据单因素试验结果, 以 PEG600 质量分数 (A)、硫酸铵质量分数 (B)、液料比 (C)、超声时间 (D) 为影响因素, 以朝鲜淫羊藿总黄酮得率为响应值, 采用 Design-Expert 13 进行 Box-Behnken 响应面设计 (表 1)。

表 1 响应面试验因素水平

水平	因素			
	A PEG600 质量分数/%	B 硫酸铵质量分数/%	C 液料比/(mL/g)	D 超声时间/min
-1	16	16	30	10
0	17	17	40	20
1	18	18	50	30

1.3.5 朝鲜淫羊藿总黄酮抗氧化活性分析

1.3.5.1 清除 DPPH 自由基的测定 参考张佳鑫等 (2024) 方法并稍作修改。具体为: 制备朝鲜淫羊藿不同质量浓度的样品溶液, 并以与朝鲜淫羊藿质量浓度梯度相匹配的抗坏血酸作为阳性对照。于 96 孔板中分别加 100 μL 的 0.7 mmol/L DPPH 自由基溶液和超纯水为 A_0 ; 100 μL 样品和 DPPH 自由基溶液为 A_1 ; 100 μL 样品和超纯水为 A_2 , 于酶标仪上振摇, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行 30 min 的孵育, 517 nm 测吸光度值。DPPH 自由基清除率按下式进行计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{[A_0 - (A_1 - A_2)]}{A_0};$$

式中: A_0 为阴性对照组的吸光度值; A_1 为样品组的吸光度值; A_2 为空白组的吸光度值。

1.3.5.2 还原力的测定 参考胡栋宝等 (2021) 方

法并稍作修改。具体为:分别吸取 20 μL 不同质量浓度朝鲜淫羊藿总黄酮样品溶液置于 96 孔板中,依次加入 40 μL 0.2 mol/L PBS 溶液和 80 μL 1%铁氰化钾溶液,振摇混匀,45 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,然后加 40 μL 的 10%三氯乙酸终止反应,再加 20 μL 的 0.1% FeCl_3 溶液显色,孵育 10 min,于 700 nm 处使用酶标仪测定吸光度值,该值越高说明样品的还原性越强。铁还原力的测定按照下式进行计算。

$$\text{还原力} = A_0 - A_1;$$

式中: A_0 为样品组的吸光度值; A_1 为空白对照组的吸光度值。

1.3.5.3 总抗氧化活性的测定 参考 Jayaprakasha 等(2007)方法并稍作修改。具体为:取不同质量浓度朝鲜淫羊藿总黄酮提取液 1 mL 置于试管中,依次加入 1 mL 0.6 mol/L 硫酸溶液、1.5 mL 28 mmol/L 磷酸钠、1.5 mL 4 mmol/L 钼酸铵、0.6 mL 超纯水,摇匀。于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 min,冷却。在 695 nm 处测定样品吸光度值。总抗氧化活性按以下公式进行计算。

$$\text{总抗氧化活性} = A_1 - A_2;$$

式中: A_1 为样品组的吸光度值; A_2 为空白对照组的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 PEG600 质量分数对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响 由图 1 可知,当 PEG600 的质量分数在 14% ~ 17% 时,朝鲜淫羊藿总黄酮得率随着 PEG600 的质量分数的增大而增大,并在 PEG600 质量分数为 17% 时达到了最大,为 35.780 mg/g。这可能是因为疏水性的朝鲜淫羊藿总黄酮在 PEG600 和硫酸铵的双水相体系中,更倾向于聚集于 PEG600 形成的上相区域。随着 PEG600 质量分数增加,上相水合作用增强,同时上相的疏水特性也更为显著,这一系列的变化对于朝鲜淫羊藿总黄酮在上相的聚集是极其有利的。当 PEG600 的质量分数在 17% ~ 19% 内,朝鲜淫羊藿总黄酮得率反而随着 PEG600 质量分数的增大

而减小。这可能是因为 PEG600 质量分数过高导致双水相体系的黏度急剧增加,这使上相的空间结构更加拥挤,过大空间阻碍不利于总黄酮的聚集,最终导致朝鲜淫羊藿总黄酮得率降低(杨子敬等,2021)。故提取朝鲜淫羊藿总黄酮时 PEG600 的质量分数以 17% 为宜。

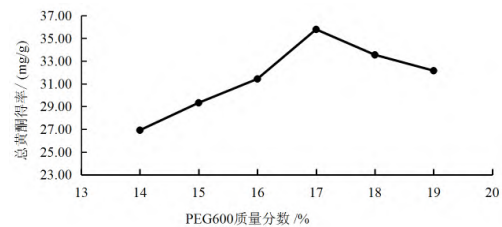


图 1 PEG600 质量分数对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响

2.1.2 硫酸铵质量分数对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响 由图 2 可知,当硫酸铵质量分数在 15% ~ 17% 时,朝鲜淫羊藿总黄酮得率随着硫酸铵质量分数的增大呈现递增的趋势,并在 17% 的时候达到了最大值,为 36.00 mg/g,这可能是因为一定范围内随着硫酸铵质量分数的增大,下相的盐析作用增加,使朝鲜淫羊藿总黄酮由下相向上相迁移,总黄酮得率升高。当硫酸铵质量分数在 17% ~ 20% 时,随着其增大朝鲜淫羊藿总黄酮得率呈现出逐渐降低的趋势。这可能是因为当硫酸铵浓度增大到一定程度时,下相盐析作用过强,朝鲜淫羊藿总黄酮被析出,黏度增大,总黄酮迁移能力受限,不利于其提取(张占霞等,2024)。故提取时硫酸铵的质量分数以 17% 为宜。

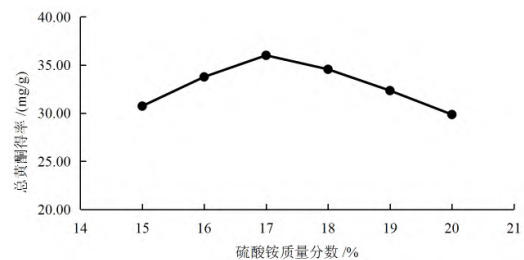


图 2 硫酸铵质量分数对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响

2.1.3 液料比对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响
由图 3 可知,当液料比在 20 ~ 40(mL/g)时,朝鲜淫羊藿总黄酮得率随着液料比的增大而增大,当液料比为 40(mL/g)时候达到最大,为 40.45(mg/g),这可能是因为随着液料比的增加,朝鲜淫羊藿粉末与双水相溶剂接触更加充分,朝鲜淫羊藿的植物细胞与双水相溶剂产生浓度差,利于黄酮类成分的溶出,所以朝鲜淫羊藿总黄酮提取率增加。当液料比设定在 40 ~ 60(mL/g)时,朝鲜淫羊藿中提取得到的总黄酮随着该比例的增大而下降。这可能是因为浓度差过大,传送黄酮的效率降低(玉澜等,2024)。故提取时液料比以 40(mL/g)为宜。

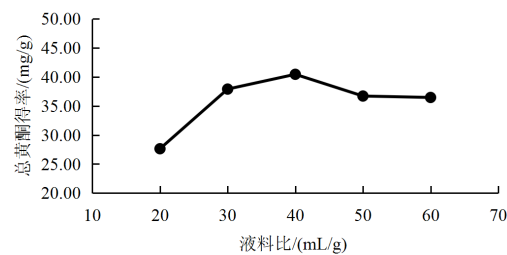


图 3 液料比对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响

2.1.4 超声时间对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响
由图 4 可知,当超声时间在 10 ~ 20 min 时,朝鲜淫羊藿总黄酮得率随着超声时间的增长而增大并在 20 min 的时候达到了最大值,为 37.06 mg/g,这可能是因为是在提取初期,细胞内外总黄酮浓度梯度较大,这使得总黄酮更易从细胞中扩散到溶剂中,进而提高朝鲜淫羊藿总黄酮得率。当超声时间在 20 ~ 60 min 时,朝鲜淫羊藿总黄酮得率随着其增大而减小。这可能是由于超声时间超过一定范围,促使朝鲜淫羊藿中其他物质溶出,且总黄酮的稳定性在一定程度也受到影响,因而导致淫羊藿总黄酮得率下降(杨兆艳等,2023)。故提取时的超声时间以 20 min 为宜。

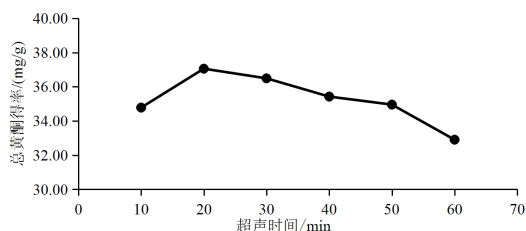


图 4 超声时间对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面总体设计与结果 在单因素试验结果的基础上,以(A)PEG600 质量分数、(B)硫酸铵质量分数、(C)液料比、(D)超声时间为试验的自变量,上相总黄酮得率为响应值,采用 Box-Behnken 中心试验设计对试验结果进行响应面优化分析,结果如表 2 所示。

表 2 响应面试验结果

序号	A PEG600/%	B 硫酸铵/%	C 液料比/(mL/g)	D 超声时间/min	Y 上相总黄酮得率/(mg/g)
1	17	17	40	20	66.29
2	17	16	40	10	48.55
3	16	17	30	20	65.92
4	17	18	40	10	60.07
5	17	16	50	20	47.97
6	17	17	50	30	65.1
7	16	17	40	10	63.59
8	18	16	40	20	48.54
9	16	16	40	20	57.5
10	17	17	50	10	60.99
11	17	18	40	30	64.72
12	17	17	40	20	64.76
13	17	17	30	10	61.09
14	18	18	40	20	62.6
15	18	17	50	20	63.16
16	16	17	40	30	64.46
17	16	17	50	20	66.7
18	17	16	40	30	51.09
19	17	17	30	30	61.36
20	17	17	40	20	64.15
21	18	17	40	10	59.88
22	17	17	40	20	64.15
23	17	18	30	20	59.88
24	18	17	30	20	62.69
25	17	18	50	20	65.64
26	16	18	40	20	63.83
27	17	17	40	20	64.24
28	17	16	30	20	54.97
29	18	17	40	30	64.93

2.2.2 方差结果与分析 在上述试验结果的基础上使用 Design-Expert 13 软件进行回归分析,结果如表 3 所示,根据软件分析得到以朝鲜淫羊藿总黄酮得率为目标函数的二次回归模型方程如下:

$$Y = 64.72 - 1.68A + 5.68B + 0.3042C + 1.46D + 1.93AB - 0.0775AC + 1.05AD + 3.19BC + 0.5275BD + 0.96CD + 0.3918A^2 - 6.91B^2 - 0.6432C^2 - 1.85D^2$$

表 3 方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	847.47	14	60.53	51.53	< 0.0001	***
A-PEG600	34	1	34	28.94	< 0.0001	***
B-硫酸铵	386.69	1	386.69	329.15	< 0.0001	***
C-液料比	1.11	1	1.11	0.945	0.3475	
D-时间	25.49	1	25.49	21.7	0.0004	***
AB	14.94	1	14.94	12.72	0.0031	***
AC	0.024	1	0.024	0.0205	0.8883	
AD	4.37	1	4.37	3.72	0.0744	
BC	40.7	1	40.7	34.65	< 0.0001	***
BD	1.11	1	1.11	0.9474	0.3469	
CD	3.69	1	3.69	3.14	0.0983	
A ²	1.03	1	1.03	0.875	0.3654	
B ²	309.44	1	309.44	263.4	< 0.0001	***
C ²	2.68	1	2.68	2.28	0.153	
D ²	22.16	1	22.16	18.86	0.0007	***
残差	16.45	14	1.17			
失拟率	13.1	10	1.31	1.57	0.3532	Not significant
纯误差	3.35	4	0.8367			
总误差	863.92	28				
标准差	1.08		R ²	0.981		
平均值	60.99		R ² _{Adj}	0.9619		
CV/%	1.78		R ² _{Pur}	0.9066	Precision	23.0044

注：*表示差异显著(P<0.05)，**表示差异极显著(P<0.01)。

由表 3 可知,回归模型 $F=51.53, P<0.0001$, 模型极显著,失拟项 P 值为 0.3532,失拟项不显著,说明模型可行。模型的相关系数 R^2 为 0.981,校正系数 R^2_{Adj} 为 0.9619,变异系数 $CV=1.78\%$,这意味着模型拟合度很高。一次项 A、B、D,交互项 AB、BC 以及二次项 B^2 、 D^2 的 P 值均小于 0.05,对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响极显著。而一次项 C,交互项 AC、AD、BD、CD 以及二次项 A^2 、 C^2 的 P 值均大于 0.01,对朝鲜淫羊藿总黄酮得率的影响差异不显著。由表 3 可知,PEG600 质量分数 F 值为 28.94,硫酸铵质量分数的 F 值为 329.15,液料比的 F 值为 0.945,超声时间的 F 值为 21.7,各因素对总黄酮得率的影响程度由大到小依次为:(B)硫酸铵质量分数>(A)PEG600 质量分数>(D)

超声时间>(C)液料比。

2.2.3 响应面分析 利用 Design-Expert 13 软件拟合绘制各因素交互作用对朝鲜淫羊藿总黄酮得率影响的响应曲面和等高线图,见图 5 和图 6。本试验研究结果显示,PEG600 质量分数和硫酸铵质量分数、硫酸铵质量分数和液料比对应的响应面最陡,且硫酸铵质量分数和液料比对应的等高线图的椭圆形扁平程度最大,说明 PEG600 质量分数和硫酸铵质量分数、硫酸铵质量分数和液料比这两组的交互作用最为显著。这与表 3 交互项的分析结果相同。

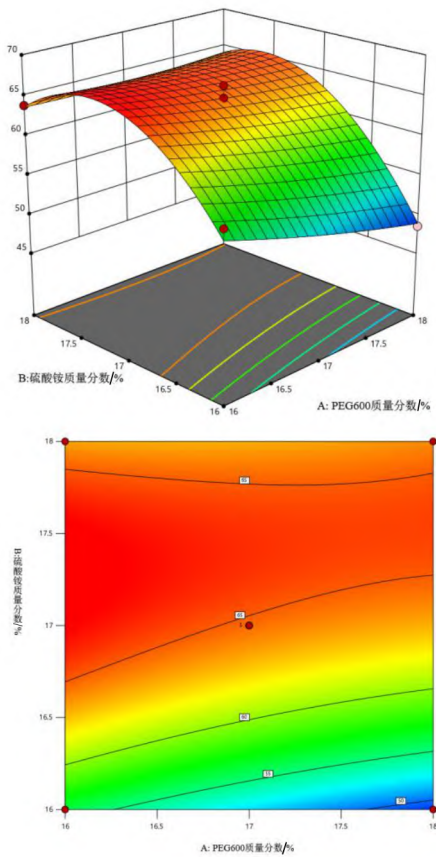


图 5 PEG600 质量分数和硫酸铵质量分数的响应曲线和等高线图

2.2.4 最优工艺及验证试验 使用 Design-Expert 13 软件求解,得到回归方程,得出朝鲜淫羊藿总黄酮最优提取工艺为:PEG600 质量分数 16.082%, 硫酸铵质量分数 17.196%, 液料比 40.525(mL/g),超声时间 18.457 min。此条件下总黄酮得率可达 67.003 mg/g。为了方便操作,实际

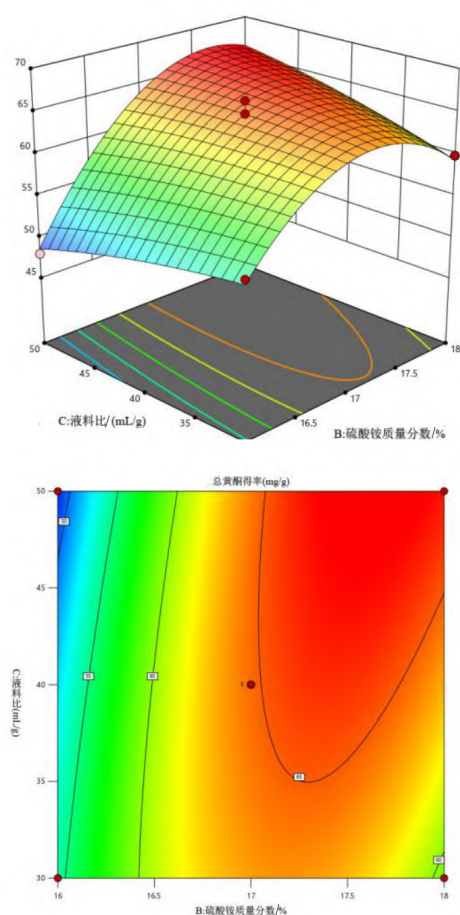


图6 硫酸铵质量分数和液料比的响应曲线和等高线图

试验时将条件改为 PEG600 质量分数 16%, 硫酸铵质量分数 17%, 液料比 40(mL/g), 超声时间 18 min, 朝鲜淫羊藿总黄酮得率平均为 65.90 mg/g, 3 次验证试验获得的总黄酮与模型预测的数值 (67.003 mg/g) 相接近, 表明该模型可以用来预测朝鲜淫羊藿中的总黄酮得率, 且具有一定的可靠性。有望应用于朝鲜淫羊藿总黄酮的工业化提取生产。

2.3 朝鲜淫羊藿总黄酮抗氧化结果与分析

2.3.1 DPPH 自由基清除率结果与分析 由图 7 可知, 当朝鲜淫羊藿总黄酮浓度在 0.04 ~ 0.20 mg/mL 时, 朝鲜淫羊藿总黄酮以及抗坏血酸对 DPPH 自由基清除能力随着浓度的增加而增加。使用软件 IBM SPSS Statistics 26 计算后得到朝鲜淫羊藿总黄酮和抗坏血酸对 DPPH 自由基清除的 IC_{50} 值分别为 0.05406 mg/mL 和 0.03716 mg/mL。由此可

见, 在试验所测浓度范围内朝鲜淫羊藿总黄酮对 DPPH 自由基的清除率小于抗坏血酸。

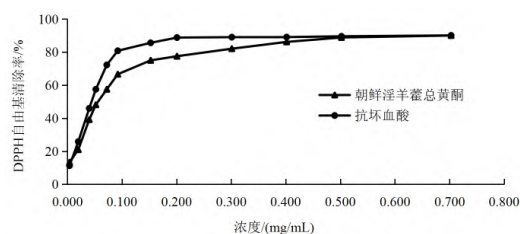


图7 朝鲜淫羊藿总黄酮对 DPPH 自由基的清除活性

2.3.2 还原力结果与分析 由图 8 可知, 朝鲜淫羊藿总黄酮和抗坏血酸的还原力随浓度的升高而升高并逐渐达到平稳。当朝鲜淫羊藿总黄酮浓度在 0.01 ~ 0.3 mg/mL 时, 朝鲜淫羊藿总黄酮的还原力略低于抗坏血酸, 当浓度在 0.3 ~ 1.3 mg/mL 时, 朝鲜淫羊藿总黄酮还原力与抗坏血酸相当, 当浓度高于 1.3 mg/mL 时抗坏血酸还原力相对较高。

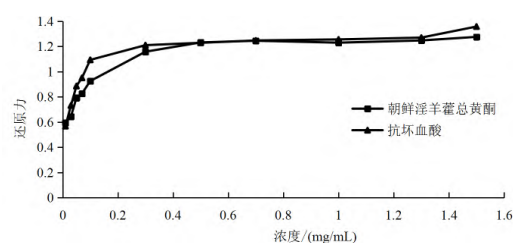


图8 朝鲜淫羊藿总黄酮的还原力

2.3.3 总抗氧化活性结果与分析 由图 9 可知, 当朝鲜淫羊藿总黄酮浓度在 0.01 ~ 0.16 mg/mL 时, 朝鲜淫羊藿总黄酮和抗坏血酸随浓度的升高总抗氧化能力显著提高, 其中, 朝鲜淫羊藿总黄酮而随浓度的升高总抗氧化能力上升较快而最终达到平衡。值得注意的是, 朝鲜淫羊藿总黄酮在所有测试浓度下展现的总抗氧化能力均超越了抗坏血酸。

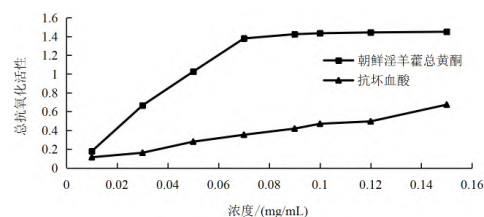


图9 朝鲜淫羊藿总黄酮的总抗氧化活性

3 讨论与结论

朝鲜淫羊藿是中草药“淫羊藿”的一个重要的基源植物,其是一种传统的补肾壮阳药物,常用于治疗肾阳虚、阳痿、遗精、阳痿、筋骨无力、风湿麻痺不适等疾病。现有研究显示,黄酮类成分是朝鲜淫羊藿主要活性成分,中国药典规定四种黄酮类:淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B 和朝藿定 C 作为控制淫羊藿的指标性成分(国家药典委员会,2020)。刘茂顺等(2018)采用正交试验优化朝鲜淫羊藿中总黄酮碱提酸沉法提取工艺,最佳工艺为提取溶剂 0.3% NaOH 溶液,回流提取 2 次,液料比 40(g/mL),提取时间 2 h,浓缩比例 1:4,盐酸调节 pH=3,此最佳工艺条件下朝鲜淫羊藿的总黄酮提取量达 6.67%。本试验采用超声辅助双水相提取朝鲜淫羊藿总黄酮,在单因素逐级进行优化的试验基础上进行 Box-Behnken 响应面设计,得到朝鲜淫羊藿总黄酮的最佳提取条件下的总黄酮得率为 65.90 mg/g。相较之下,本试验采用的超声辅助双水相提取朝鲜淫羊藿总黄酮得率略低。这可能是因为刘茂顺等(2018)采取的碱提酸沉法虽然能充分使朝鲜淫羊藿总黄酮溶出,但是其优化的最佳工艺中提取次数需要 2 次,提取时间需要 2 h,该提取工艺提取效率低。另外,碱提酸沉淀法提取黄酮虽然有一定优势,但是在提取过程中,碱度过高或酸度过低,可能会破坏朝鲜淫羊藿的黄酮类结构,或者生成一些其他杂质。本试验利用超声辅助双水相的方法进行提取,超声波让植物粉末中的细胞快速破裂,促进朝鲜淫羊藿中总黄酮在短时间内有效溶出。双水相集提取分离一步到位的优点,减少了溶剂转移过程中的黄酮成分损失,同时起到了进一步除杂的作用。此外,有研究发现东北产朝鲜淫羊藿中黄酮类成分含量有明显差异。辽宁省桓仁县所产朝鲜淫羊藿中黄酮含量高于吉林省临江市所产样品(王英哲等,2019)。王晶等(2013)报道,辽宁省产朝鲜淫羊藿的最佳产地是宽甸地区。本试验所使用朝鲜淫羊藿采集于辽宁丹东宽甸红石镇,这也是影响本试验朝鲜淫羊藿总黄酮得率的一个重要原因。

抗氧化活性试验揭示朝鲜淫羊藿总黄酮显著的 DPPH 自由基清除活性,铁还原力和总抗氧化活性,进一步验证了其作为一种潜在的天然抗氧化剂资源的价值。为了全面揭示其抗氧化活性,在后续的研究中可采用超氧阴离子、羟基和 ABTS 自由基试验以进一步评价其抗氧化活性。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020:340.
- [2] 胡栋宝,杜薇,杨猛.响应面法优化巨大口蘑多糖提取工艺及抗氧化活性[J].中国调味品,2021,46(10):78~82.
- [3] 刘茂顺,葛乃嘉,苏益平,等.正交设计优化碱提朝鲜淫羊藿总黄酮的工艺研究[J].吉林医药学院学报,2018,39(6):426~429.
- [4] 石文茜,孔凡江,刘宝辉,等.大豆异黄酮提取方法研究进展[J].大豆科学,2022,41(5):610~616.
- [5] 王晶,何立华,路金才.辽宁不同产地朝鲜淫羊藿有效成分含量比较分析[J].辽宁林业科技,2013,2:7~8.
- [6] 王英哲,姜大成,容路生,等.东北产朝鲜淫羊藿中黄酮类成分的对比如分析[J].药物分析杂志,2019,39(11):2034~2040.
- [7] 杨兆艳,田艳花,卢洪秀.超声辅助双水相提取蓝莓花色苷工艺优化及其抗肿瘤活性研究[J].中国食品添加剂,2023,34(9):18~26.
- [8] 杨子敬,饶桂维,王磊.超声波辅助双水相提取枇杷花总黄酮工艺优化及其抗氧化性[J].食品工业科技,2021,42(19):218~225.
- [9] 王澜,肖云,陈燕萌,等.Box-Behnken 响应面优化超声波辅助双水相提取枇杷叶多糖及其抗氧化活性研究[J].饲料研究,2024,47(7):94~99.
- [10] 张佳鑫,梁思琪,肖强,等.黄精总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性分析[J].湖北林业科技,2024,53(1):37~44.
- [11] 张占霞,耿志峰,王一凡,等.双水相萃取地皮菜中藻蓝蛋白的研究[J].食品科技,2024,49(2):229~234.
- [12] Jayaprakasha G K,Patil B S.*In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange[J].Food Chemistry,2007,101(1):410~418.
- [13] Kim J Y,Shim S H.*Epimedium koreanum* extract and its flavonoids reduced atherosclerotic risk via suppressing modification of human HDL[J].Nutrients,2019,11(5):1110~1122.
- [14] Qian H Q,Wu D C,Li C Y,*et al.*A systematic review of traditional uses,phytochemistry,pharmacology and toxicity of *Epimedium koreanum* Nakai[J].J Ethnopharmacol,2024,318(Pt B):1~20.
- [15] Zhang H,Wu X,Wang J,*et al.*Flavonoids from the leaves of *Epimedium Koreanum* Nakai and their potential cytotoxic activities

- [J].Nat Prod Res,2020,34(9):1256 ~ 1263.
- [16] Zhao Y,Chen S,Wang Y,*et al.*Effect of drying processes on prenylflavonoid content and antioxidant activity of *Epimedium koreanum* Nakai[J].J Food Drug Anal,2018,26(2):796 ~ 806
- [17] Zhao Y D,Zhang X,Yang W Y,*et al.*New anti-pulmonary fibrosis prenylflavonoid glycosides from *Epimedium koreanum*[J].Chin J Nat Med,2022,20(3):221 ~ 228.
- [18] Zhao Y,Teng L,Zhang R,*et al.*Two new prenylated flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai leaves and their anti-pulmonary fibrosis activities[J].Nat Prod Res,2024,38(19):3336 ~ 3343.
- [19] Zhao Y,Zhang R,Mu L,*et al.*Total flavonoids in *Epimedium koreanum* Nakai alleviated chronic renal failure via promoting AMPK activation[J].Food Funct,2022,13(2):904 ~ 919.

Biphasic extraction of flavonoids from *Epimedium Koreanum* and their antioxidant activities

LIU Xinran^{1,2},ZHANG Qingjin^{1,3},SHAO Jiawen¹,WANG Jianan¹,XU Haibo¹,QIAN Huiqin^{1*}

(1.North Henan Medical University,Xinxiang,Henan Province 453003,China;2.Henan Medical University,Xinxiang,Henan Province 453000,China;3.Zhengzhou University,Zhengzhou,Henan Province 450000,China)

[Abstract] In order to optimize the ultrasound-assisted biphasic extraction process of total flavonoids from *Epimedium Koreanum* (EK) and to investigate their antioxidant activities,the response surface method was used to systematically optimize the extraction process of total flavonoids from EK using the one-factor step-by-step optimization strategy,including the mass fraction of PFG600,the mass fraction of ammonium sulphate,the liquid/feed ratio,and the ultrasonic time. DPPH radical scavenging,reducing power and total antioxidant activity were used to evaluate the antioxidant activity of total flavonoids of EK. The results showed that when the extraction conditions were ultrasonic power of 300 W,PEG600 mass fraction of 16%,ammonium sulfate mass fraction of 17%,liquid/feed ratio of 40 (mL/g),and ultrasonic time of 18 min,the total flavonoids of EK had the highest extraction rate of 65.90 mg/g,which was close to the theoretical predicted value. The DPPH radical scavenging ability of total flavonoids from EK was lower than that of ascorbic acid,but still had a significant scavenging effect,with an IC₅₀ value of 0.05406 mg/mL.The iron-reducing power of total flavonoids from EK was similar to that of ascorbic acid,while the total antioxidant activity was higher than that of ascorbic acid. The ultrasound-assisted bi-aqueous phase extraction of total flavonoids from EK was green and feasible,and could provide a reference for the efficient extraction of total flavonoids from EK.

[Key words] *Epimedium Koreanum*;total flavonoids;biphasic;response surface;ultrasound;antioxidant