

# 黄芪茎叶总黄酮的超声辅助双水相提取工艺优化及其抗氧化活性

郭丽丽, 李小兰, 高欣缘, 龚玉凤, 秦楠\*

(山西中医药大学 中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619)

**摘要:** 该研究采用超声辅助乙醇-硫酸铵双水相体系提取黄芪茎叶总黄酮, 以总黄酮提取量为指标, 通过单因素试验结合响应面试验优化提取工艺, 并对所得总黄酮提取物的抗氧化活性进行分析。结果表明, 超声辅助双水相提取黄芪茎叶总黄酮的最佳工艺条件为乙醇体积分数 60%、硫酸铵质量浓度 0.20 g/mL、液料比 31:1 (mL/g)、超声时间 50 min、超声温度 46 °C、超声功率 480 W, 此条件下黄芪茎叶总黄酮提取量为 15.008 mg/g。所制备的黄芪茎叶总黄酮提取物表现出良好的抗氧化活性, 其清除 DPPH·、ABTS· 和 ·OH 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.933、0.691、0.965 mg/mL, 2.0 mg/mL 总黄酮提取物溶液的铁离子还原能力 (ferric ion reducing antioxidant power, FRAP) 为 1.384 mmol/L, 是同浓度阳性对照 V<sub>C</sub> 铁离子还原能力的 83.47%。

**关键词:** 黄芪茎叶; 超声波; 双水相; 总黄酮; 抗氧化

## Optimization of Ultrasonic-Assisted Aqueous Two-Phase Extraction Process of Total Flavonoids from *Astragalus membranaceus* Stems and Leaves and Their Antioxidant Activity

GUO Lili, LI Xiaolan, GAO Xinyuan, GONG Yufeng, QIN Nan\*

(College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, Shanxi, China)

**Abstract:** Total flavonoids of *Astragalus membranaceus* stems and leaves were obtained by ultrasonic-assisted extraction in an ethanol-ammonium sulfate aqueous two-phase system. With the extraction amount of total flavonoids as an index, the extraction process was optimized by combining the single-factor experiments with response surface analysis, and the antioxidant activity of the total flavonoids was also investigated. The results showed that the optimal conditions for ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of total flavonoids from *Astragalus membranaceus* stems and leaves were as follows: ethanol volume fraction of 60%, ammonium sulfate concentration of 0.20 g/mL, liquid-solid ratio of 31:1 (mL/g), ultrasonic time of 50 min, ultrasonic temperature of 46 °C, and ultrasonic power of 480 W. Under these conditions, the amount of total flavonoids was 15.008 mg/g. The prepared total flavonoid extracts from *Astragalus membranaceus* stems and leaves exhibited good antioxidant activity. The IC<sub>50</sub> values for scavenging DPPH·, ABTS·, and ·OH were 0.933, 0.691, and 0.965 mg/mL, respectively. When the concentration of the total flavonoids was 2.0 mg/mL, its ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) value was 1.384 mmol/L, which was 83.47% of that of the positive control V<sub>C</sub> at the same concentration.

**Key words:** *Astragalus membranaceus* stems and leaves; ultrasonic wave; aqueous two-phase system; total flavonoids; antioxidant activity

引文格式:

郭丽丽, 李小兰, 高欣缘, 等. 黄芪茎叶总黄酮的超声辅助双水相提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(5):94-101.

GUO Lili, LI Xiaolan, GAO Xinyuan, et al. Optimization of Ultrasonic-Assisted Aqueous Two-Phase Extraction Process of Total Flavonoids from *Astragalus membranaceus* Stems and Leaves and Their Antioxidant Activity[J]. Food Research and Development, 2025, 46(5):94-101.

基金项目: 山西省基础研究计划自然科学研究面上项目(202303021221160); 山西省现代农业产业技术体系建设项目(2023CYJSTX10-10); 山西中医药大学科技创新能力培育计划“太行本草”专项(2022PY-TH-04)

作者简介: 郭丽丽(1984—), 女(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 药食同源功能食品研究与开发。

\*通信作者: 秦楠(1981—), 男(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 药食同源功能食品研究与开发。

黄芪(*Astragalus membranaceus*)是豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,至今已有2 000多年的药用历史,是一种药食两用物质<sup>[1]</sup>。黄芪茎叶是植物黄芪的地上部分,其产量是植物黄芪地下入药根部的数倍。人们采挖黄芪根部时,大量地上茎叶部分往往被丢弃,如何加强对黄芪茎叶的开发利用成为拓宽药食两用黄芪产业链、挖掘中药副产物资源和促进黄芪产业绿色可持续发展领域的重要研究课题和方向<sup>[2]</sup>。研究表明,黄芪茎叶含有丰富的黄酮类化合物,是天然植物黄酮类物质的良好来源<sup>[3]</sup>,此外,黄芪中黄酮类物质被报道具有调节免疫、抗炎、抗基因突变、清除自由基等多种生理活性<sup>[4]</sup>,这为黄芪茎叶在功能食品领域的应用奠定了理论基础。目前关于黄芪茎叶中黄酮类成分的提取制备、作用功效等方面的研究报道较少,黄芪茎叶中黄酮类成分的最适富集方法和作用尚不明确,开展黄芪茎叶中黄酮类成分的基础研究具有很大的必要性。

黄酮类物质的传统提取方法有乙醇回流提取法、超声辅助提取法、酶辅助提取法等,然而这些方法耗时较长、耗能较大且提取率较低<sup>[5]</sup>。双水相体系提取法是一种新兴的提取方法,其原理是利用不同物质在不相溶的两相中分配系数的不同,从而实现目标成分的提取、分离或纯化,具有条件温和、处理量大、易于连续操作、不破坏活性成分化学结构等优点,现已成为黄酮类物质提取与分离的重要热点方法<sup>[6]</sup>。常见的双水相体系有聚合物-盐、表面活性剂-盐、离子液体-盐、小分子醇-盐等,其中小分子醇-盐体系具有黏度小、不易乳化、分离迅速、操作简便、易于回收等优点,已被广泛用于多种活性成分的提取与纯化中<sup>[7]</sup>。

稳定的小分子醇-盐双水相体系对于目标成分的有效提取至关重要,由于该体系中存在盐离子和水之间的离子偶极作用以及醇和水之间的氢键作用,这两种作用相互竞争的结果直接影响到双水相体系的形成及目标成分的提取率<sup>[8]</sup>,因此有必要对影响这两种作用相互竞争的因素予以考察,如醇的浓度、盐的浓度、温度、时间等,从而构建最适的双水相体系。基于此,本研究采用乙醇-硫酸铵双水相体系,同时结合超声辅助提取,通过单因素结合响应面法优化黄芪茎叶总黄酮的超声辅助双水相提取工艺,以期黄芪茎叶总黄酮的高效提取及其资源化利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黄芪茎叶:采自山西省朔州市应县,经山西中医药大学中药鉴定教研室刘计权教授鉴定为蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*)的茎叶。

芦丁标准品(98%):上海融禾医药科技有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、硫酸铵(均为

分析纯):天津市天力化学试剂有限公司;硫酸亚铁、醋酸钠、水杨酸(均为分析纯):天津市凯通化学试剂有限公司;抗坏血酸(分析纯):天津市科密欧化学试剂有限公司;30% $H_2O_2$ (分析纯):天津市大茂化学试剂厂;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)、2,2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS]、2,4,6-三吡啶基三嗪[2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine, TPTZ](均为分析纯):上海麦克林生化科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

多功能粉碎机(ZT-600):永康市展帆工贸有限公司;紫外可见分光光度计(Ultra-3000):北京普源精电科技有限公司;电子分析天平(BSA224S):赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;超声波清洗机(SB-5200DT):宁波新芝生物科技股份有限公司;真空抽滤装置(SHZ-D):上海卫凯仪器设备有限公司;真空干燥箱(DZF-6050MBE):上海博迅医疗生物仪器股份有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 黄芪茎叶总黄酮的提取

将低温烘干的黄芪茎叶粉碎并过60目筛,精密称取一定量黄芪茎叶粉末置于三角瓶中,按设定体系组成加入一定量的硫酸铵、蒸馏水和无水乙醇,在超声波清洗器中超声辅助提取一定时间后,对双水相体系进行减压抽滤,收集滤液于分液漏斗中进行静置分层,记录上相体积,并保留上相溶液用于总黄酮提取量的测定。

#### 1.3.2 总黄酮提取量的测定

##### 1.3.2.1 芦丁标准曲线的绘制

配制0.4 mg/mL的芦丁标准溶液,分别取0、1、2、3、4、5 mL标准液于25 mL容量瓶中,加入1 mL 5%亚硝酸钠溶液,摇匀后静置6 min,再加1 mL 10%硝酸铝溶液,摇匀后静置6 min,再加10 mL 4%氢氧化钠溶液,用30%乙醇定容至刻度线,静置15 min后于波长510 nm处测定吸光度<sup>[9]</sup>。以芦丁标准品浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $y = 4.3987x + 0.0038$ ,  $R^2 = 0.9982$ 。

##### 1.3.2.2 总黄酮提取量的计算

取2.5 mL适当稀释后的上相溶液,按1.3.2.1所述方法进行显色反应后,测得510 nm处吸光度,根据回归方程计算得到测定液的浓度,按下式计算黄芪茎叶总黄酮提取量( $Y$ , mg/g)。

$$Y = C \times n \times V / m$$

式中: $C$ 为测定液浓度,mg/mL; $n$ 为稀释倍数; $V$ 为上相溶液体积,mL; $m$ 为称取黄芪茎叶粉末的质量,g。

#### 1.3.3 单因素试验

分别考察乙醇体积分数(40%、45%、50%、55%、60%)、

硫酸铵质量浓度(0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 g/mL)、液料比[15:1、20:1、25:1、30:1、35:1 (mL/g)]、超声功率(240、320、400、480、560 W)、超声时间(20、30、40、50、60 min)和超声温度(30、40、50、60、70 °C)对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响。其中各因素的固定水平为乙醇体积分数 50%、硫酸铵质量浓度 0.15 g/mL、液料比 15:1 (mL/g)、超声功率 320 W、超声时间 20 min、超声温度 60 °C。

#### 1.3.4 响应面优化试验

根据单因素试验结果,进一步选择对总黄酮提取量有较大影响的乙醇体积分数(A)、液料比(B)和超声温度(C)作为考察因素,以总黄酮提取量为指标,采用 Box-Behnken 法设计三因素三水平响应面分析试验,确定黄芪茎叶总黄酮的最佳提取工艺。响应面试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平	因素		
	A 乙醇体积分数/%	B 液料比/(mL/g)	C 超声温度/°C
-1	50	25:1	40
0	55	30:1	50
1	60	35:1	60

#### 1.3.5 黄芪茎叶总黄酮提取物的抗氧化活性测定

##### 1.3.5.1 对 DPPH 自由基的清除能力测定

参照李国峰等<sup>[10]</sup>的方法对 DPPH 自由基的清除能力进行测定,取 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液 2 mL,分别加入 2 mL 不同浓度(0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL)黄芪茎叶总黄酮提取物溶液中,混合均匀后室温避光反应 30 min,在波长 517 nm 处测量溶液的吸光度,记作  $A_1$ 。对照组以等体积无水乙醇替换 DPPH 溶液,测定溶液的吸光度,记作  $A_2$ 。空白组以等体积无水乙醇替换样品溶液,测定吸光度,记作  $A_0$ 。按上述方法测得不同浓度阳性对照  $V_C$ (0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL)对 DPPH·清除率。DPPH·清除率(Y,%)计算公式如下。

$$Y = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

##### 1.3.5.2 对 ABTS·+ 的清除能力测定

参照张艳莉等<sup>[11]</sup>的方法测定 ABTS·+ 自由基的清除能力,将浓度为 7 mmol/L ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液等体积混合均匀,室温避光反应 12~16 h,得 ABTS 储备液。使用时用无水乙醇稀释,调节至吸光度为  $0.70 \pm 0.02$  即得 ABTS 工作液。向试管中分别加入 2 mL ABTS 工作液和 2 mL 不同浓度(0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL)黄芪茎叶总黄酮提取物溶液,混合均匀后避光反应 30 min,在 734 nm 波长处测定吸光度,记作  $A_1$ 。对照组用无水乙醇替换 ABTS 工作液,测得的吸光度记作  $A_2$ 。空白组则用无水乙醇替换样品

溶液,将测得的吸光度记作  $A_0$ 。按上述方法测得不同浓度阳性对照  $V_C$ (0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL)对 ABTS·+ 的清除率。ABTS·+ 清除率(Y,%)计算公式如下。

$$Y = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

##### 1.3.5.3 铁离子还原能力测定

参照只德贤等<sup>[12]</sup>的方法,分别配制浓度为 20 mmol/L 的三氯化铁溶液、10 mmol/L 的 TPTZ 溶液和 0.3 mol/L 的醋酸钠缓冲液(pH3.6),将上述溶液按照 1:1:10 体积比混合得铁离子还原能力(ferric ion reducing antioxidant power,FRAP)测定工作液。分别取 1 mL 浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L 的  $FeSO_4$  标准液,加入 3 mL FRAP 工作液,避光条件下反应 20 min,在波长 593 nm 下测定吸光度并绘制标准曲线,得回归方程  $y = 1.404x + 0.3244$  ( $R^2 = 0.9907$ )。分别取 1 mL 不同浓度黄芪茎叶总黄酮提取物溶液(0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL),加入 3 mL FRAP 工作液,避光反应 20 min 后于 593 nm 波长下测定吸光度,将该吸光度代入上述回归方程,计算得出对应的  $FeSO_4$  摩尔浓度,以此表示不同浓度样品的铁离子还原能力(即 FRAP 值),FRAP 值越大表明还原能力越强。类似地,按照上述样品的 FRAP 值测定方法,测得不同浓度阳性对照  $V_C$ (0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL)的 FRAP 值。

##### 1.3.5.4 对·OH 的清除能力测定

参照李杰等<sup>[13]</sup>的方法,分别配制浓度为 8.8 mmol/L 的  $H_2O_2$  溶液、9 mmol/L 的  $FeSO_4$  溶液和 9 mmol/L 的水杨酸溶液,将上述溶液按照体积比 1:1:1 混合均匀,配制得工作液。将 3 mL 工作液和 1 mL 不同浓度黄芪茎叶总黄酮提取物溶液(0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL)混合均匀,在 37 °C 下反应 30 min,测定 510 nm 波长处吸光度,记作  $A_1$ 。将上述操作中的  $H_2O_2$  溶液替换为等体积蒸馏水,测得样品本底吸光度,记作  $A_2$ 。再将样品溶液替换为等体积蒸馏水,测得空白对照的吸光度,记作  $A_0$ 。按上述方法测得不同浓度阳性对照  $V_C$ (0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL)对·OH 的清除率。·OH 清除率(Y,%)计算公式如下。

$$Y = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

#### 1.4 数据处理

采用 Origin 软件进行绘图,结果表示为平均值±标准差。采用 Design-Expert 软件进行响应面试验设计及数据分析。通过 SPSS 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异显著, $P > 0.05$  为差异不显著。采用 SPSS 软件计算抗氧化活性中的半数抑制浓度  $IC_{50}$  值。

## 2 结果与分析

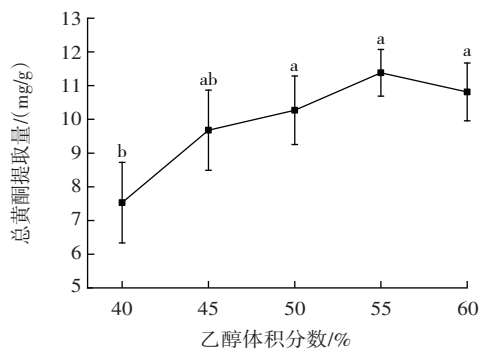
### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 乙醇体积分数对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响

乙醇体积分数对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响



见图1。



不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

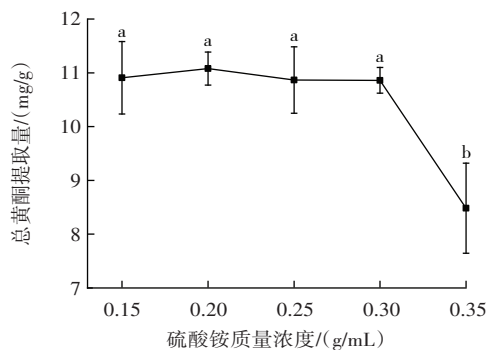
图1 乙醇体积分数对总黄酮提取量的影响

Fig.1 Effect of ethanol volume fraction on the extraction amount of total flavonoids

由图1可知,随着乙醇体积分数的增加,黄芪茎叶总黄酮提取量呈先上升后下降趋势( $P < 0.05$ ),55%乙醇体积分数下所得的总黄酮提取量最高。可能由于黄酮类化合物易溶于乙醇,故总黄酮提取量会随乙醇体积分数的升高而增大,但当乙醇体积分数超过一定程度时,上相中其他物质的溶出增加,影响黄酮类物质的提取,使提取量下降<sup>[14]</sup>。因此,选择乙醇体积分数为50%、55%、60%进行后续响应面试验。

2.1.2 硫酸铵质量浓度对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响

硫酸铵质量浓度对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响见图2。



不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图2 硫酸铵质量浓度对总黄酮提取量的影响

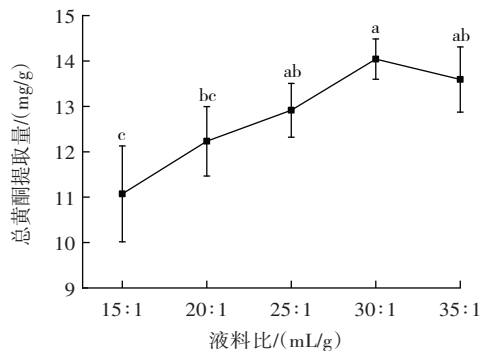
Fig.2 Effect of ammonium sulfate mass concentration on the extraction amount of total flavonoids

如图2所示,硫酸铵质量浓度为0.15~0.30 g/mL时,黄芪茎叶总黄酮提取量变化不明显( $P > 0.05$ ),硫酸铵质量浓度为0.20 g/mL时总黄酮提取量最大;当硫酸铵质量浓度继续增加到0.35 g/mL时,总黄酮提取量大幅下降( $P < 0.05$ )。可能与硫酸铵对双水相体系中水分子的束缚能力有关。随着硫酸铵质量浓度的增加,其对水分子的束缚力随之增强,从而会提高上相中的乙醇浓度,进而促进总黄酮的释放<sup>[15]</sup>。但随着硫酸铵质量浓度

的继续增加,上相体积逐渐减小,总黄酮的溶出受到抑制,使总黄酮提取量下降。综合考虑,将黄芪茎叶总黄酮提取的最适硫酸铵质量浓度确定为0.20 g/mL。

2.1.3 液料比对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响

液料比对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响见图3。



不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

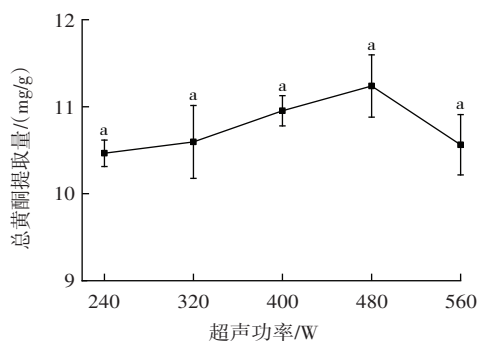
图3 液料比对总黄酮提取量的影响

Fig.3 Effect of liquid-solid ratio on the extraction amount of total flavonoids

由图3可知,随着提取溶剂用量的增大,黄酮提取量呈先增加后下降的趋势( $P < 0.05$ ),当液料比为30:1 (mL/g)时,黄芪茎叶总黄酮提取量达到最高。这是由于提取溶剂量的适当增大可以加大传质推动力,也可使样品与溶剂充分接触,从而有利于黄酮的溶出,表现为总黄酮提取量的逐渐增加。但溶剂量的继续增加也会使其他物质的溶出加剧,抑制黄酮提取<sup>[16]</sup>,使总黄酮提取量反而下降。因此,选择液料比为25:1、30:1、35:1 (mL/g)进行后续响应面试验。

2.1.4 超声功率对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响

超声功率对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响见图4。



相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。

图4 超声功率对总黄酮提取量的影响

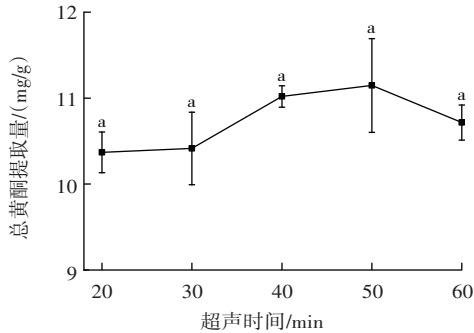
Fig.4 Effect of ultrasonic power on the extraction amount of total flavonoids

由图4可知,随着超声功率的加大,黄芪茎叶总黄酮提取量呈先增大后减小的趋势( $P > 0.05$ ),480 W超声功率下所得的总黄酮提取量达到最大。这可能是由于超声功率越大,产生的空穴作用和液体振动越强,促进黄芪茎叶粉末在提取液中的运动,从而增加黄酮的

溶出,但功率过高可能会导致部分黄酮活性成分发生降解、聚合等一系列反应<sup>[17]</sup>,造成总黄酮提取量下降。因此,480 W 是黄芪茎叶总黄酮提取的最佳超声功率。

### 2.1.5 超声时间对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响

超声时间对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响见图 5。



相同小写字母表示差异不显著( $P>0.05$ )。

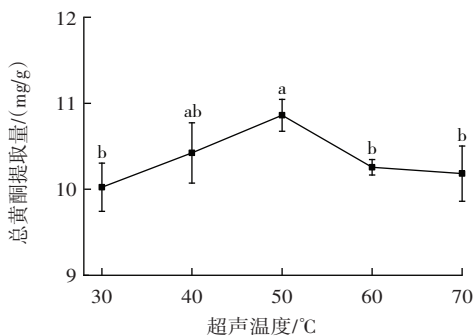
图 5 超声时间对总黄酮提取量的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic time on the extraction amount of total flavonoids

由图 5 可知,黄芪茎叶总黄酮提取量随超声时间的延长呈先增大而后减小的趋势( $P>0.05$ ),超声时间为 50 min 时,总黄酮提取量最高。这是由于超声时间越长,植物细胞壁被破坏越充分,有利于总黄酮的释放和溶出。但超声时间过长,会使黄芪茎叶中皂苷类物质的溶出增加<sup>[18]</sup>,从而导致总黄酮提取量减少。因此,超声时间确定为 50 min。

### 2.1.6 超声温度对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响

超声温度对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响见图 6。



不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图 6 超声温度对总黄酮提取量的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic temperature on the extraction amount of total flavonoids

如图 6 所示,黄芪茎叶总黄酮提取量随超声温度的升高呈先上升后下降的趋势( $P<0.05$ ),当超声温度为 50 °C 时,黄芪茎叶总黄酮提取量最高。这可能是由于温度的适当升高可以加剧分子运动,促进黄酮的溶出,但温度过高可能会破坏黄酮类成分的分子结构,从而导致黄芪茎叶总黄酮提取量开始下降<sup>[19]</sup>。因此,选择超声温度为 40、50、60 °C 进行后续响应面试验。

## 2.2 响应面试验结果

### 2.2.1 响应面试验结果及方差分析

Box-Behnken 试验设计与结果见表 2,回归模型的方差分析见表 3。

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Box-Behnken design and experimental results

序号	A 乙醇体积分数	B 液料比	C 超声温度	总黄酮提取量/(mg/g)
1	1	0	1	13.773
2	0	-1	1	10.892
3	0	-1	-1	10.971
4	0	1	1	12.388
5	0	1	-1	12.265
6	-1	0	-1	13.321
7	1	-1	0	13.059
8	-1	1	0	12.735
9	-1	0	1	12.857
10	0	0	0	14.491
11	1	1	0	13.585
12	0	0	0	13.923
13	0	0	0	14.150
14	-1	-1	0	11.290
15	1	0	-1	14.802
16	0	0	0	14.966
17	0	0	0	14.521

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	25.82	9	2.87	19.72	0.000 4	**
A 乙醇体积分数	3.15	1	3.15	21.62	0.002 3	**
B 液料比	2.83	1	2.83	19.48	0.003 1	**
C 超声温度	0.26	1	0.26	1.80	0.221 1	
AB	0.21	1	0.21	1.45	0.267 4	
AC	0.08	1	0.08	0.55	0.482 9	
BC	0.01	1	0.01	0.07	0.798 8	
A <sup>2</sup>	0.11	1	0.11	0.72	0.423 0	
B <sup>2</sup>	15.22	1	15.22	104.63	<0.000 1	**
C <sup>2</sup>	3.26	1	3.26	22.42	0.002 1	**
残差	1.02	7	0.15			
失拟项	0.39	3	0.13	0.81	0.550 1	
纯误差	0.63	4	0.16			
总和	26.83	16				

注:\*\*表示影响极显著( $P<0.01$ )。

对试验数据采用二次多元回归拟合后得到回归模型方程:总黄酮提取量=14.41+0.63A+0.60B-0.18C-0.23AB-0.14AC+0.05BC+0.16A<sup>2</sup>-1.90B<sup>2</sup>-0.88C<sup>2</sup>。由表 3 的回归方程方差分析可见,回归模型为极显著水平( $P<0.01$ ),F 值为 19.72,失拟项不显著( $P>0.05$ );变异系数为 2.89%,表明模型拟合程度较好;模型的决定系数

( $R^2$ )为 0.962 1,校正决定系数( $R^2_{Adj}$ )为 0.913 3,说明该模型能解释 91.33% 的响应值变化,能准确分析和预测黄芪茎叶总黄酮提取工艺优化试验。模型的显著性检验显示,乙醇体积分数(A)和液料比(B)对响应值具有极显著影响( $P<0.01$ ),二次项  $B^2$  和  $C^2$  的影响也达到极显著水平( $P<0.01$ )。各因素对总黄酮提取量的影响大小排序为  $A>B>C$ 。

利用 Design-Expert 软件对回归方程进行分析,得到黄芪茎叶总黄酮提取量各因素交互影响的三维响应面图,如图 7 所示。

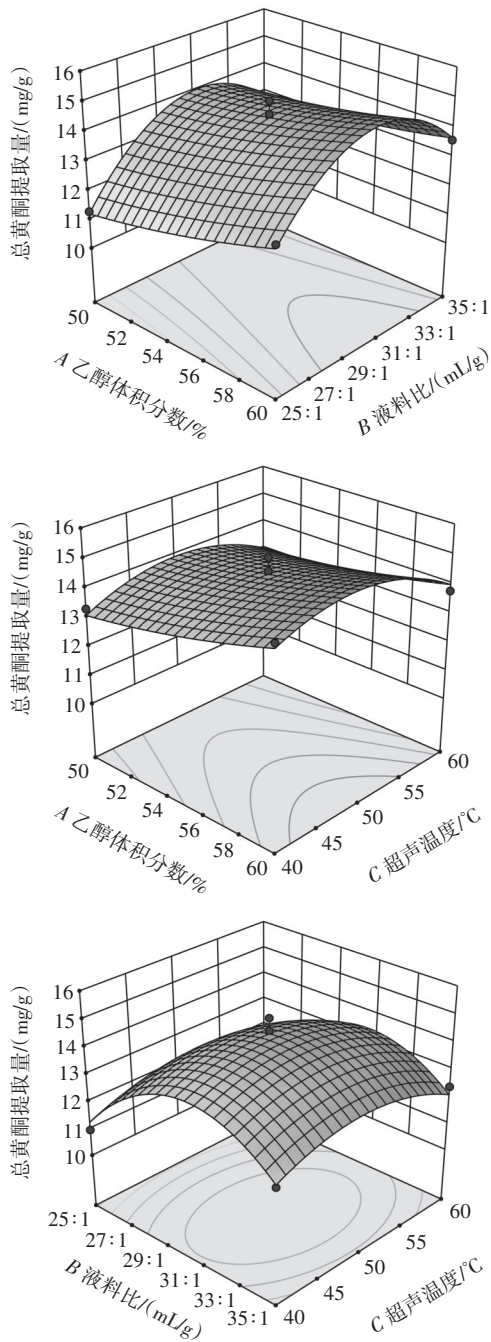


图 7 两因素交互作用的响应曲面

Fig.7 Response surface plots of interaction between two factors

响应曲面越陡峭,等高线越偏椭圆,两因素间的交互作用越明显<sup>[20]</sup>。由图 7 可知,AB 等高线椭圆度最大,其交互作用对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响较大;AC 等高线椭圆度次之,其交互作用对黄芪茎叶总黄酮提取量的影响次之;BC 等高线椭圆度最小,说明其交互作用对响应值的影响最小,与方差分析结果相一致。

### 2.2.2 最佳提取工艺的预测与验证

软件预测超声辅助提取黄芪茎叶总黄酮的最佳工艺条件为乙醇体积分数 59.72%、液料比 30.98:1 (mL/g)、超声温度 45.52 °C,此条件下总黄酮提取量的理论值为 15.104 mg/g。考虑到实际应用性,将最佳工艺条件调整为乙醇体积分数 60%、液料比 31:1 (mL/g)、超声温度 46 °C,在此条件下进行 3 次平行验证试验,测得黄芪茎叶总黄酮的平均提取量为 15.008 mg/g,接近理论预测值,表明模型可用于黄芪茎叶总黄酮的提取。

### 2.2.3 超声辅助双水相工艺与传统方法的比较

分别采用乙醇回流法与超声辅助提取法提取黄芪茎叶总黄酮,乙醇回流法的工艺参数为乙醇体积分数 60%、液料比 31:1 (mL/g)、回流提取温度 46 °C、回流提取时间 50 min;超声辅助提取法的工艺参数为乙醇体积分数 60%、液料比 31:1 (mL/g)、超声温度 46 °C、超声时间 50 min、超声功率 480 W。平行提取 3 次,得两种提取方法的黄芪茎叶总黄酮平均提取量分别为 11.449 mg/g 和 12.861 mg/g。由此可见,采用超声辅助双水相法可提高黄芪茎叶总黄酮的提取量,其较传统的乙醇回流法和超声辅助提取法分别提高了 31.09% 和 16.69%,进一步表明超声辅助双水相法是有效、可靠的黄芪茎叶总黄酮提取方法。

## 2.3 黄芪茎叶总黄酮提取物的抗氧化活性分析

### 2.3.1 DPPH·的清除能力

黄芪茎叶总黄酮提取物对 DPPH· 的清除能力见图 8。

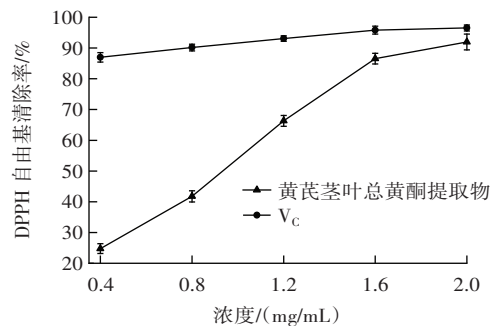


图 8 黄芪茎叶总黄酮提取物对 DPPH· 的清除能力

Fig.8 Scavenging activity of total flavonoids from *Astragalus membranaceus* stems and leaves for DPPH free radical

由图 8 可知,黄芪茎叶总黄酮提取物对 DPPH· 的清除能力与浓度呈正相关,2.0 mg/mL 黄芪茎叶总黄酮提取物溶液对 DPPH· 的清除率为 91.97%,是同浓度阳



性对照  $V_C$  对 DPPH· 清除率(96.53%)的 95.28%。此外,经 SPSS 软件计算得黄芪茎叶总黄酮提取物清除 DPPH· 的  $IC_{50}$  值为 0.933 mg/mL,表明黄芪茎叶总黄酮对 DPPH· 具有较强的清除活性。Dai 等<sup>[21]</sup>研究表明云南地方食品三七茎叶具有较强的抗氧化活性,其总黄酮清除 DPPH· 的  $IC_{50}$  值为 2.893 mg/mL,而本研究中黄芪茎叶总黄酮对 DPPH· 的清除活性更强,说明黄芪茎叶是一种潜在的良好抗氧化资源。

### 2.3.2 ABTS<sup>+</sup>· 的清除能力

黄芪茎叶总黄酮提取物对 ABTS<sup>+</sup>· 的清除能力见图 9。

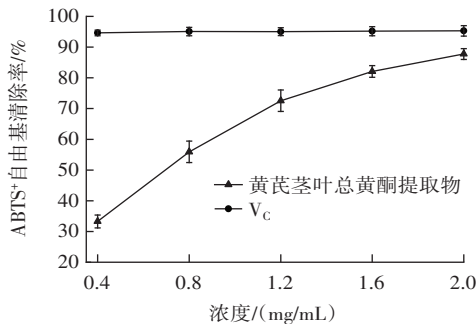


图9 黄芪茎叶总黄酮提取物对 ABTS<sup>+</sup>· 的清除能力

Fig.9 Scavenging activity of total flavonoids from *Astragalus membranaceus* stems and leaves for ABTS<sup>+</sup> free radical

如图 9 所示,黄芪茎叶总黄酮提取物对 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力与浓度成正比,当浓度为 2.0 mg/mL 时,黄芪茎叶总黄酮提取物对 ABTS<sup>+</sup>· 的清除率为 87.75%,是同浓度阳性对照  $V_C$  对 ABTS<sup>+</sup>· 清除率(95.29%)的 92.09%。计算得黄芪茎叶总黄酮提取物清除 ABTS<sup>+</sup>· 的  $IC_{50}$  值为 0.691 mg/mL,说明黄芪茎叶总黄酮对 ABTS<sup>+</sup>· 也具有较强的清除活性。该活性优于食药同源资源淡竹叶的 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力( $IC_{50}$ >1.2 mg/mL)<sup>[22]</sup>。

### 2.3.3 铁离子还原能力

黄芪茎叶总黄酮提取物的铁离子还原能力见图 10。

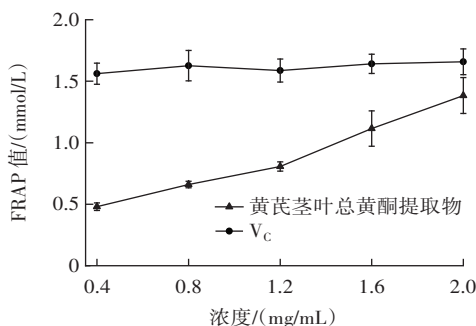


图10 黄芪茎叶总黄酮提取物的铁离子还原能力

Fig.10 Ferric reducing antioxidant power of total flavonoids from *Astragalus membranaceus* stems and leaves

由图 10 可知,黄芪茎叶总黄酮提取物的铁离子还

原能力与浓度成正比,浓度为 2.0 mg/mL 的黄芪茎叶总黄酮提取物溶液对铁离子还原能力达到最高,其 FRAP 值为 1.384 mmol/L,是同浓度阳性对照  $V_C$  FRAP 值(1.658 mmol/L)的 83.47%,说明黄芪茎叶总黄酮对铁离子具有较好的还原能力。

### 2.3.4 清除·OH 的能力分析

黄芪茎叶总黄酮提取物对·OH 的清除能力见图 11。

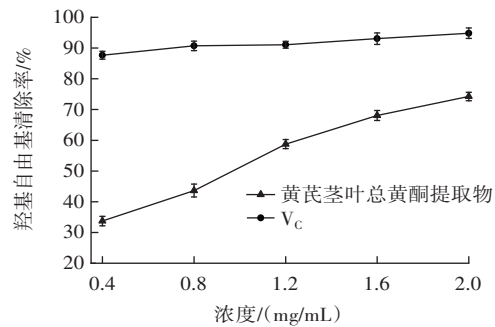


图11 黄芪茎叶总黄酮提取物对·OH 的清除能力

Fig.11 Scavenging activity of total flavonoids from *Astragalus membranaceus* stems and leaves for OH free radical

由图 11 可知,黄芪茎叶中总黄酮提取物清除·OH 能力也随浓度的增加而升高,浓度为 2.0 mg/mL 时,黄芪茎叶总黄酮提取物对·OH 的清除率为 74.24%,是同浓度  $V_C$  对·OH 清除率(94.83%)的 78.29%,表明黄芪茎叶总黄酮对·OH 有一定的清除能力。计算得黄芪茎叶总黄酮提取物清除·OH 的  $IC_{50}$  值为 0.965 mg/mL,比桑叶总黄酮提取物清除·OH 的  $IC_{50}$  值(1.829 mg/mL)小<sup>[23]</sup>,进一步说明黄芪茎叶是一种优良的天然抗氧化资源。

## 3 结论

本研究运用单因素结合响应面分析方法,优化了黄芪茎叶总黄酮的超声辅助双水相提取工艺,结果表明最佳的提取工艺条件为乙醇体积分数 60%、硫酸铵质量浓度 0.20 g/mL、液料比 31:1 (mL/g)、超声功率 480 W、超声时间 50 min、超声温度 46 °C,所得的黄芪茎叶总黄酮提取量为 15.008 mg/g,比传统的乙醇回流法和超声辅助提取法所得的提取量分别高 31.09% 和 16.69%。抗氧化活性分析结果表明,黄芪茎叶总黄酮提取物具有较强的 DPPH· 和 ABTS<sup>+</sup>· 清除活性,较好的铁离子还原能力和一定的·OH 清除活性,说明黄芪茎叶总黄酮是一种潜在的抗氧化资源。超声辅助双水相法具有条件温和、操作简单、效率高等优点,后续可进一步探索该技术的放大工艺,并对黄芪茎叶黄酮类化合物进行精细分离和纯化,探明其成分组成及各组分的抗氧化活性,从而促进黄芪茎叶在抗氧化功能食品中的开发与应用。

## 参考文献:

- [1] 宋沁洁, 李国峰, 李威慰, 等. 黄芪药食同源现状分析[J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(4): 509-517.  
SONG Qinjie, LI Guofeng, LI Xianwei, et al. Analysis of the current situation of *Astragalus* medicine food homologous[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2023, 40(4): 509-517.
- [2] MANH KHOA N, VIET PHONG N, YANG S Y, et al. Spectroscopic analysis, kinetic mechanism, computational docking, and molecular dynamics of active metabolites from the aerial parts of *Astragalus membranaceus* Bunge as tyrosinase inhibitors[J]. Bioorganic Chemistry, 2023, 134: 106464.
- [3] CUI L Y, MA Z N, WANG D F, et al. Ultrasound-assisted extraction, optimization, isolation, and antioxidant activity analysis of flavonoids from *Astragalus membranaceus* stems and leaves[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 90: 106190.
- [4] DONG M Y, LI J J, YANG D L, et al. Biosynthesis and pharmacological activities of flavonoids, triterpene saponins and polysaccharides derived from *Astragalus membranaceus*[J]. Molecules, 2023, 28(13): 5018.
- [5] 李亚军, 梁忠厚. 黄酮类化合物提取研究进展[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(11): 14-17.  
LI Yajun, LIANG Zhonghou. Research progress on extraction of flavonoids[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(11): 14-17.
- [6] XIANG C, CHANG J, YUE Y Y, et al. The application of aqueous two-phase system in the extraction of natural products from Chinese herbal medicine: A review[J]. Current Organic Chemistry, 2019, 23(6): 704-720.
- [7] XI J, ZHOU X B, WANG Y, et al. Short-chain alcohol/salt-based aqueous two-phase system as a novel solvent for extraction of plant active ingredients: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 138: 74-84.
- [8] 张莉莉, 李艳, 高静. 热可逆离子液体-低共熔溶剂双水相体系的相行为及理化特性研究[J]. 化工学报, 2021, 72(5): 2493-2505.  
ZHANG Lili, LI Yan, GAO Jing. Phase behavior and physicochemical properties of thermoreversible aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and deep eutectic solvents[J]. CIESC Journal, 2021, 72(5): 2493-2505.
- [9] 桂利利, 吴正坤, 余惠凡, 等. 黄药叶总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(19): 100-108.  
GUI Lili, WU Zhengkun, YU Huifan, et al. Optimization of extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. leaves[J]. Food Research and Development, 2021, 42(19): 100-108.
- [10] 李国峰, 陈海芳, 郎一帆, 等. 诃子总黄酮提取工艺的优化及其体外生物活性研究[J]. 中成药, 2021, 43(11): 2945-2951.  
LI Guofeng, CHEN Haifang, LANG Yifan, et al. Extraction process optimization and *in vitro* biological activities of total flavonoids from *Terminalia chebula*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2021, 43(11): 2945-2951.
- [11] 张艳莉, 王颖, 王迪, 等. 复合菌系发酵改性对豆渣膳食纤维结构及物化特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(7): 138-145.  
ZHANG Yanli, WANG Ying, WANG Di, et al. Effects of fermentation modification of compound strains on structure and physicochemical properties of soybean dregs dietary fiber[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(7): 138-145.
- [12] 只德贤, 张妮, 李建颖. 微波超声协同提取白刺果原花青素工艺及抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 171-179.  
ZHI Dexian, ZHANG Ni, LI Jianying. Microwave-ultrasonic extraction of proanthocyanidins from *Nitraria* and its antioxidant analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 171-179.
- [13] 李杰, 马艳莉, 刘尚军, 等. 超声波辅助溶剂法提取山茱萸黄酮工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(12): 81-88.  
LI Jie, MA Yanli, LIU Shangjun, et al. Study on ultrasonic-assisted solvent extraction technology of *Cornus officinalis* flavonoids and its anti-oxidation activity *in vitro*[J]. China Food Additives, 2022, 33(12): 81-88.
- [14] 朱杰帆, 陈忠航, 俞杰, 等. 超声波辅助双水相提取花生壳总黄酮及其抗氧化活性[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(7): 175-183.  
ZHU Jiefan, CHEN Zhonghang, YU Jie, et al. Ultrasonic assisted aqueous two-phase extraction of total flavonoids from peanut shells and its antioxidant activity[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2023, 38(7): 175-183.
- [15] YANG S X, LIU B, TANG M, et al. Extraction of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Juglandaceae) leaves using ethanol/salt aqueous two-phase system coupled with ultrasonic[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 44(6): e14469.
- [16] 俞耀文, 戴国庆, 华浩立, 等. 乙醇-硫酸铵双水相体系提取桃花总黄酮及其抗氧化性能[J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 187-195.  
YU Yaowen, DAI Guoqing, HUA Haoli, et al. Ethanol-ammonium sulfate aqueous two-phase extraction of total flavonoids from peach blossom and its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 187-195.
- [17] 薛宏坤, 谭佳琪, 刘成海, 等. 超声-闪式联合法制备蓝莓花色苷提取物及其体内外抗肿瘤活性评价[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 259-269.  
XUE Hongkun, TAN Jiaqi, LIU Chenghai, et al. Preparation of blueberry anthocyanin extract by ultrasound-assisted flash extraction and evaluation of its anti-tumor activity *in vivo* and *in vitro*[J]. Food Science, 2020, 41(6): 259-269.
- [18] 汪建红, 匡晨. 脐橙皮中黄酮的超声波辅助双水相提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(23): 50-55.  
WANG Jianhong, KUANG Chen. Study on extraction technological of flavonoid in navel orange peel by ultrasonic-assisted aqueous two-phase system[J]. Food Research and Development, 2016, 37(23): 50-55.
- [19] ZHOU H, FENG X Y, YAN Y, et al. Optimization of an ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction method for four flavonoids from *Lysionotus pauciflorus*[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2022, 52(7): 770-782.
- [20] 陈怡君, 王晓慧, 陈艳萍, 等. 响应面法优化超声波-微波协同辅助酸法提取猕猴桃果皮果胶工艺及果胶理化性质分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(13): 238-246.  
CHEN Yijun, WANG Xiaohui, CHEN Yanping, et al. Optimization of ultrasound-microwave assisted acid extraction of pectin from kiwifruit peel by response surface method and the analysis of physicochemical properties of pectin[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(13): 238-246.
- [21] DAI C Y, LIU P F, LIAO P R, et al. Optimization of flavonoids extraction process in *Panax notoginseng* stem leaf and a study of antioxidant activity and its effects on mouse melanoma B16 cells[J]. Molecules, 2018, 23(9): 2219.
- [22] LIU X K, WANG Y, GE W, et al. Spectrum-effect relationship between ultra-high-performance liquid chromatography fingerprints and antioxidant activities of *Lophatherum gracile* Brongn[J]. Food Science & Nutrition, 2022, 10(5): 1592-1601.
- [23] 张月, 唐钦悦, 代娟, 等. 桑叶黄酮提取物制备及其体外抗氧化作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(9): 47-52.  
ZHANG Yue, TANG Qinyue, DAI Juan, et al. Study on the preparation of flavonoids extracted from mulberry leaves and its anti-oxidative activity *in vitro*[J]. China Food Additives, 2020, 31(9): 47-52.