

超声波辅助提取刺五加总黄酮及其工艺优化^{*}

张顺捷³, 张丹¹, 毕连东¹, 仇有文²

(1 黑龙江省林业科学院牡丹江分院, 黑龙江省 牡丹江 151700;

2 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江省 哈尔滨 150030)

摘要: **目的:** 优化刺五加总黄酮超声提取工艺, 对比分析黑龙江省四个地区的 21 种刺五加总黄酮含量情况。**方法:** 通过 Box-Behnken 响应面方法对超声提取工艺进行优化, 并对 21 种不同产地刺五加总黄酮含量进行聚类分析。**结果:** 确定最优工艺条件是超声时间 30min, 料液比 1:12, 超声功率 250w, 总黄酮得率平均为 1.453mg/g。**结论:** 实验通过优化超声辅助提取法, 比较不同产地刺五加总黄酮含量, 为今后提取工艺的优化提供一定的数据支持, 对中药材的品质分析奠定一定的理论基础。

关键词: 刺五加; 总黄酮; Box-Behnken 响应面试验; 超声辅助提取法; 聚类分析
中图分类号: R282.5 文献标志码: A

Determination of total flavonoids in *Acanthopanax senticosus* by enzymolysis and its technological optimization

ZHANG Shun-jie, ZHANG Dan, BI Lian-dong, QIU You-wen,

(1 Mudanjiang Branch of Heilongjiang Forestry Science College, Mudanjiang 151700, China; 2 Colleges of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: **Objective:** To optimize the ultrasonic extraction technology of total flavonoids from *Acanthopanax* and compare and analyze the content of total flavonoids from 21 kinds of *Acanthopanax* in four regions of Heilongjiang Province.**Methods:** The ultrasonic extraction technology was optimized by Box-Behnken response surface method, and the total flavonoids content of 21 kinds of *Acanthopanax* from different producing areas were analyzed by cluster analysis.**Results:** The optimal process conditions were determined as ultrasonic time 30min, solid-liquid ratio 1:12, ultrasonic power 250w, and the average yield of total flavonoids was 1.453mg/g.**Conclusion:** By optimizing the ultrasonic-assisted extraction method, the total flavonoid content of *Acanthopanax* from different producing areas was compared in the experiment, which provided certain data support for the optimization of the extraction process in the future and laid a certain theoretical foundation for the quality analysis of Chinese medicinal materials.

Key words: *Acanthopanax senticosus*; Total flavone; Box-Behnken response surface test; Ultrasonic-assisted extraction

刺五加又名五加参、五加皮, 属于五加科, 常用的药用部位是干燥的根和茎, 主要分布于我国东北和华北等地区, 是重要的药用植物之一, 具有补益强壮, 强劲健骨, 扶正抗衰的作用^[1]。刺五加的有效成分包括刺五加苷 B、刺五加苷 D、刺五加苷 C、刺五加苷 E、多糖和总黄酮等, 其中总黄酮具有抗氧化和抗菌消炎的作用, 并且能够通过提高动物体内抗氧化活性达到抑制溃疡性结肠炎的作用^[3]。

黄酮类化合物的检测法主要有滴定法、色谱法以及比色法等^[4]。其中比色法因为操作简单, 所以被广泛使用, 检测总黄酮最常用的是 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法, 检测设备大都使用紫外分光光度计。但用此设备, 效率低, 样品用量较大, 容易引起多次检测的误差, 全波长酶标仪能够很好的避免这些问题, 采用 96 孔平板能够一次检测大量样品, 一次滴样只需 200 μL -250 μL , 是一种非常好的比色检测仪器。黄

³ **基金项目:** 黑龙江省省属科研院所科研业务项目刺五加新品种选育技术研究 (CZKYF2022-1-B023)

作者简介: 张顺捷 (1981-), 男, 黑龙江省牡丹江人, 博士研究生, 研究方向: 药用植物培育技术。

酮类化合物的提取有多种方法,其中超声波提取法相较其他方法更加环保高效^[7-8-9],是植物提取黄酮类化合物最常用的方法之一,该方法可以使细胞壁之间形成许多小孔,增加细胞膜之间的通透性,从而提高化合物提取含量^[10-11]。

本研究主要对刺五加茎中总黄酮的提取工艺进行优化,从超声时间、超声功率和料液比三个方面进行响应面分析,确定最佳的工艺流程。并在此基础上,提取 21 种不同产地刺五加总黄酮含量。实验结果为后续刺五加中有效成分提取工艺的研究提供数据支持,对中药材的品质分析奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

黑龙江省牡丹江、伊春、佳木斯和双鸭山四个地区的刺五加茎、芦丁标准品(上海源叶生物科技有限公司)、甲醇(分析纯)、乙醇(分析纯)、硝酸铝、亚硝酸钠和氢氧化钠等。

1.2 仪器

粉碎机、电子天平、分颈漏斗、全波长酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司)、SB-800 DTD 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、SHB-IV 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)和 Hei-VA P Core 旋转蒸发仪(德国 Heidolph)。

1.3 实验方法

1.3.1 总黄酮的提取 将不同产地的刺五加茎分成小段,放入打粉机中,打磨 3~5min,将打好的粉过 30 目的筛子。电子天平称取刺五加药粉 4g,精确度不超过 0.001g,使用 50%甲醇做为浸泡液,按照一定的料液比浸泡刺五加药粉,用玻璃棒匀速搅拌。在常温密封条件下静置 24h。使用超声波清洗机进行超声处理,静置 24h,使用分液漏斗抽滤,抽滤两次后,将两次滤液一起倒入到旋转蒸发仪中旋蒸、浓缩到挂壁状态,收集浓缩液,并用 50%的甲醇定容至 3.0mL。

1.3.2 总黄酮样品制备 采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色体系测定总黄酮。吸取 0.3mL 滤液置于 15mL 容量瓶中,依次加入 5%亚硝酸钠 0.5mL,摇匀,静置 6min;加入 10%硝酸铝 0.5mL,摇匀,静置 6min;加入 4%氢氧化钠 2.5mL,再加入 70%乙醇定容至 12.5mL(稀释 41.67 倍),摇匀,静置 15min,设置三个平行,各取 200 μL 按一定比例稀释,滴于 96 平板上,在酶标仪 510nm 处测定吸光度 A。

1.3.3 总黄酮含量标准曲线的绘制 配制总黄酮含量分别为 0.008、0.016、0.024、0.032、0.04、0.048mg/mL 的标准品,各取 200 μL ,滴于 96 平板上,在酶标仪 510nm 处测定吸光度 A。以总黄酮含量为横坐标,酶标仪的吸光度为纵坐标绘制标准曲线(图 1),线性范围在总黄酮含量 0.008-0.048mg/mL 相关性良好。

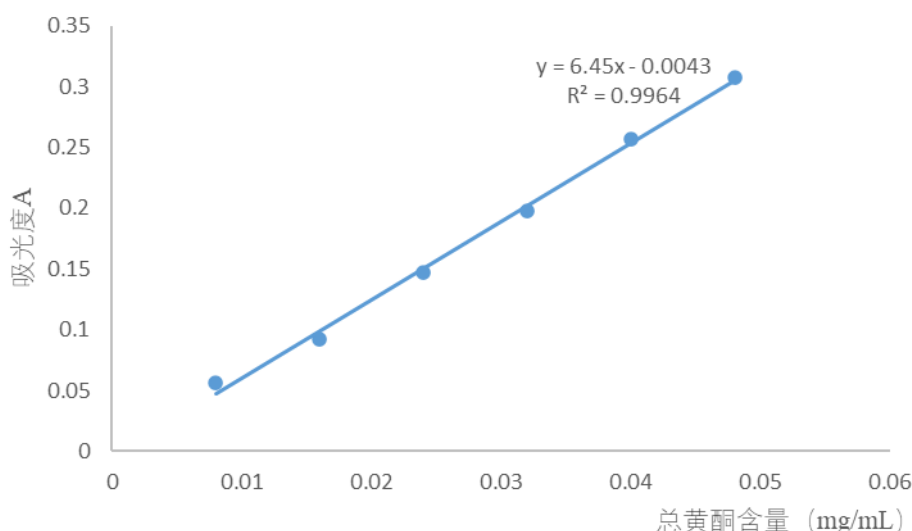


图1 总黄酮含量标准曲线

1.3.4 Box-Behnken 响应面试验 对超声时间、料液比和超声功率三个因素进行工艺优化（表格 1），结合 2020 年版中国药典一部附对刺五加超声辅助提取工艺流程（超声时间 30min，料液比 1:12.5，超声功率 250w）和 Design Expert 11 软件设置 17 个不同水平梯度的双鸭山 2 样品，根据 2.2.1 方法检测吸光值（表格 3）

表 1 正交实验各因素梯度

水平梯度	超声时间 (min)	料液比(mL/g)	超声功率 w
-1	25	1:10	240
0	30	1:12.5	250
1	35	1:15	260

1.3.5 不同产地刺五加总黄酮含量检测 采购黑龙江省牡丹江、伊春、佳木斯和双鸭山四个地区共 21 种不同品种的刺五加茎，按照响应面分析最优工艺提取条件和 2.1 方法提取总黄酮，根据 2.2.1 方法检测吸光度并按照标准曲线计算不同产地刺五加总黄酮的含量，并以此将不同产地刺五加分类。

2.实验结果

2.1 响应面拟合回归分析

根据总黄酮含量标准曲线（图1）和吸光度 A 得到酶标仪样品中总黄酮含量，根据下述公式得到总黄酮得率（mg/g）。

$$\text{总黄酮得率 } Y = \omega n v / M \text{ ①}$$

其中 ω 为测得总黄酮含量（mg/mL）， n 为稀释倍数， v 为定容体积（mL）， M 为药粉质量(g)，根据公式①得到响应面试验不同条件下刺五加总黄酮得率（表格 2）并以此作为响应值，对响应面试验结果中的数据进行回归拟合，可得回归方程如下：

刺五加总黄酮得率：=1.46+0.0870A+0.1155B+0.0733C+0.1085AB+0.0170AC+0.0100BC-0.2324A²-0.1869B²-0.1009C²。从回归方程中可以得到最优工艺提取条件为超声时间 30min、料液比 1:12、超声功率为 250W。

表 2 Box-Behnken 响应面试验结果

序号	A-超声时间	B-料液比	C-超声功率	总黄酮得率 (mg/g)
1	-1	0	-1	0.949
2	0	0	0	1.382
3	0	1	1	1.348
4	0	0	0	1.391
5	0	-1	1	1.001
6	-1	-1	0	0.956
7	1	0	1	1.316
8	0	0	0	1.443
9	1	0	-1	1.016
10	0	-1	-1	0.994

11	1	-1	0	0.986
12	0	0	0	1.518
13	0	1	-1	1.301
14	0	0	0	1.555
15	-1	1	0	0.874
16	1	1	0	1.338
17	-1	0	1	1.181

2.2 二项式模型的 ANOVA 方差分析

从 ANOVA 方差分析 (表 3) 模型的 F 为 $6.99 > 2$, P 为 $0.0089 < 0.01$, 属于非常显著水平, 说明模型可靠性较好。失拟项表现为不显著 ($P_{\text{失拟}}=0.1411 > 0.05$), 说明二次数拟合良好, 不需要引入更高次项。一次项 B-料液比达到显著水平 ($P=0.0190$), A-超声时间和 B-超声功率均未达到显著水平。而在超声时间和料液比的二次项上均达到了显著水平 ($P_A^2=0.003$, $P_B^2=0.0092$), 而在交互项上, 超声时间与料液比、超声时间与超声功率、料液比与超声功率的 P_{AB} 、 P_{AC} 、 P_{BC} 均大于 0.05, 交互作用不显著。

表 3 二项式模型的 ANOVA 方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.7288	9	0.0810	6.99	0.0089	**
A-超声时间	0.0606	1	0.0606	5.22	0.0562	
B-料液比	0.1067	1	0.1067	9.21	0.0190	*
C-超声功率	0.0429	1	0.0429	3.70	0.0957	
AB	0.0471	1	0.0471	4.06	0.0837	
AC	0.0012	1	0.0012	0.0997	0.7614	
BC	0.0004	1	0.0004	0.0345	0.8579	
A^2	0.2274	1	0.2274	19.62	0.0030	
B^2	0.1471	1	0.1471	12.69	0.0092	
C^2	0.0509	1	0.0509	4.39	0.0745	
残差	0.0811	7	0.0116			
失拟项	0.0577	3	0.0192	3.27	0.1411	不显著
绝对误差	0.0235	4	0.0059			
总和	0.8100	16				

注: ** $P < 0.01$, 差异显著; * $P < 0.05$, 显著

在响应面曲线中, 曲面的陡度代表因素对实验结果的影响, 曲面越陡该因素对结果影响越大, 反之则相反。在本实验响应面图 (图 2) 中刺五加总黄酮的得率都随超声时间、料液比和超声功率增加而上升,

达到中心值后开始下降。并且料液比的曲面最陡，其次分别为超声时间、超声功率，说明刺五加总黄酮的得率影响： $B>A>C$ ，因此，在提取总黄酮时要严格把控料液比。响应曲面的等高线代表交互项对实验结果的影响，越接近椭圆该交互项对实验结果影响越大，反之则相反。交互项 AB 在响应面图（图 2）的等高线的变化中可以看出，超声时间和料液比交互作用的等高线更接近于椭圆，因此交互项 AB 相对其他两个交互项对总黄酮得率更有影响力。这与 ANOVA 方差分析一致综上，所述该模型能够很好的揭示响应值的变化。

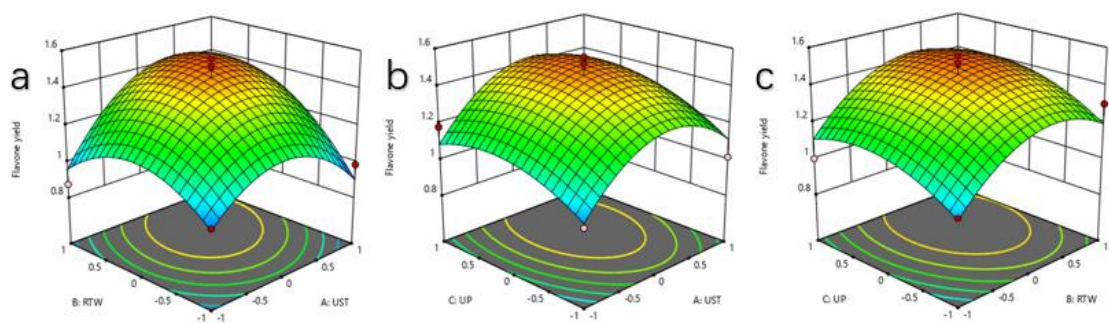


图2 两种因素的交互作用响应面图及等高线

a.超声时间与料液比b.料液比与超声功率c.超声时间与超声功率

2.3 不同产地刺五加聚类分析

根据公式①得到总黄酮的得率并以此代表不同产地刺五加总黄酮的含量（表格4）。

表 4 21 种刺五加样品含量

产地	编号	含量 (mg/g)
牡丹江	牡 1	1.08
	牡 2	1.66
	牡 3	0.72
	牡 4	0.81
	牡 5	0.52
伊春	伊 1	0.89
	伊 2	0.89
	伊 3	0.91
	伊 4	0.81
	伊 5	0.87
佳木斯	佳 1	1.04
	佳 2	0.51
	佳 3	1.11

	佳 4	0.65
	佳 5	0.81
	双 1	0.93
	双 2	1.43
	双 3	0.67
双鸭山	双 4	0.19
	双 5	1.02
	双 6	0.51

为了进一步比较不同产地刺五加总黄酮含量的差异，以刺五加测得总黄酮的含量为变量，采用IBM SPSS Statistics 26对数据进行标准化处理，以平方欧式距离为测量方法，聚类方法采用组间联接，绘制谱系图（图3）。从图3a中可以得到称取药粉质量、定容体积以及酶标仪进样量对总黄酮得率无明显相关性，总黄酮得率与酶标值相关。在图3b中将双鸭山1、佳木斯5、牡丹江4以及伊春五个品种归为一类，其平均得率为0.856mg/g，佳木斯1、3，双鸭山4、5以及牡丹江1归为一类，其平均得率为1.088mg/g，牡丹江3、5，双鸭山3、6以及佳木斯4归为一类，其平均得率为0.614mg/g，最后佳木斯2，双鸭山2和牡丹江2归为一类，其平均得率为1.2mg/g。综上得出不同地域刺五加总黄酮的含量存在差异。

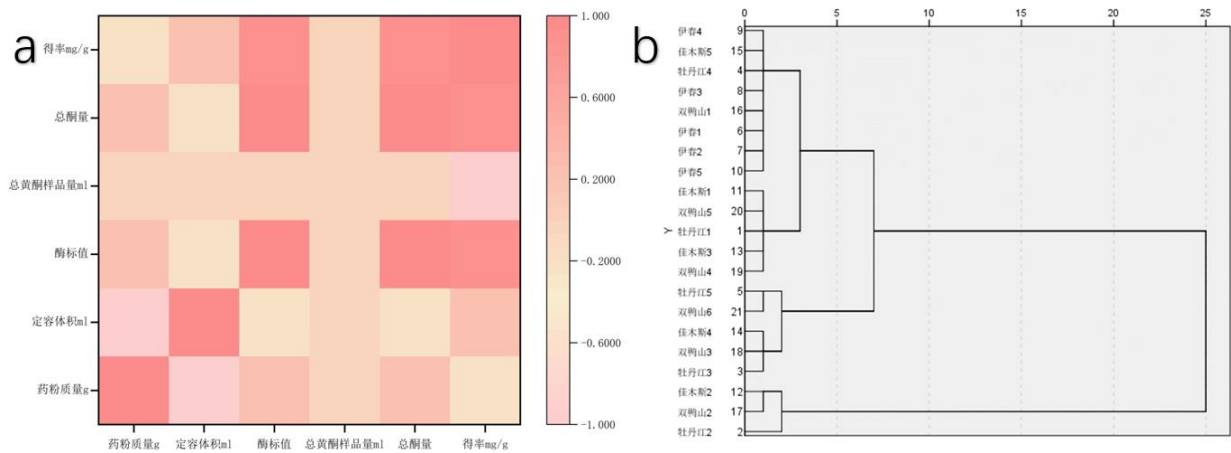


图 3 不同产地刺五加总黄酮含量谱系图
a.各种因素对总黄酮得率得相关性影响 b.不同产地刺五加总黄酮含量谱系图

3.讨论

近年来，刺五加的临床效果显著，在神经系统、内分泌系统以及心脑血管系统等方面都有很好的应用[13]，进而刺五加药效成分的研究得到了广泛的关注。随着检测技术的不断提高，刺五加黄酮类、木质素和多糖类等化合物被发现，对刺五加药理活性研究开拓更多的方向[14-15]。

目前，国内对植物中总黄酮提取有多种方法，包括超声辅助提取法、回流提取法和索氏提取法等[17]，大多数结果显示回流提取法所得总黄酮含量最高，但是超声辅助提取法流程较为简单。同时香豆黄酮类化合物提取实验中[18]，采用超声辅助提取法能够避免高温使得黄酮类化合物失活。现有的研究方法表明，采取的超声波辅助提取法，比一般提取工艺，具有时间短、提取效率高以及消耗提取剂少等优点[19]，相比传统的煎煮水提法更容易提取药材中的有效成分。确定刺五加总黄酮的最佳提取工艺，对刺五加提取方法的超声时间、料液比和超声功率进行了研究并结合药典对其进行了优化，对优化后的工艺对刺五加总黄酮含

量进行了检测。实验结果显示黑龙江省不同产地的刺五加总黄酮存在差异,其中牡丹江 2 刺五加总黄酮含量最高,为 1g 刺五加粉末得到 1.66mg 总黄酮。导致这样结果的原因除了植物遗传的影响^[19],还有可能与土壤、水分、海拔和日照时间等因素有关^[21]。

4.结论

本实验采用全波长酶标仪测定了黑龙江省不同产地刺五加中总黄酮含量,并通过 Box-Behnken 响应面试验得到的最优工艺提取条件为超声时间 30min、料液比 1:12、超声功率为 250w。实验结果对于提高中药材刺五加中有效成分的利用率提供技术支持,为对药材的品质分析奠定一定的理论基础。

参考文献

- [1] 陈耿, 陈东亚, 刘协, 等.复方刺五加片毒理学安全性及缓解体力疲劳功效研究[J].食品安全质量检测学报, 2022, 13(14):4724-4733.
- [2] 李庆伟, 安丽凤, 郝美玲等.刺五加苷药理作用及现代应用研究进展[J].现代中西医结合杂志, 2022, 31(24):3499-3504.
- [3] 阚琦缤. 刺五加总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性研究[D]. 聊城大学, 2021.
- [4] 陈慧娟, 唐芳瑞, 陈燕, 等. 中药复方多糖提取工艺研究进展[J]. 安徽医药, 2018, 22(02): 201-203.
- [5] 龚受基, 覃媚, 戴梓茹, 等.响应面法优化相思藤黄酮提取工艺及其体外抗氧化活性分析[J/OL].食品工业科技: 2023:1-18.
- [6] 石耀强, 张晗依, 刘双月. 酶标仪检测技术应用的研究进展[J]. 科技展望, 2016, 26(24): 73+107.
- [7] 刘建清, 林水森, 谢志新等.响应面法优化双柏散中总黄酮的超声波萃取工艺[J].食品与药品, 2023, 25(04):313-317.
- [8] 罗旭东, 李成义, 李俊岳, 等. 当归叶总黄酮提取工艺优化[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(07):1456-1459.
- [9] 崔福顺, 李官浩, 金清, 汪庭瑞. 响应面法优化超声辅助提取人参茎叶总黄酮的工艺研究[J]. 食品科技, 2013, 38(08):252-256.
- [10] 程立业, 杜连云, 李光等.基于响应面设计的北细辛抗炎镇痛成分超高压提取工艺优化研究[J].吉林中医药, 2023, 43(07):839-844.
- [11] 高腾, 丁婵, 苏建青. 响应面优化超声辅助提取刺五加茎皮黄酮工艺[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(08): 114-118.
- [12] 王佳, 徐学凡, 孙宁云等.Box-Behnken 设计-响应面法优化明胶胶皮处方[J].中国医药工业杂志, 2023, 54(05):773-778.
- [13] 王晶瑶. 刺五加和短梗五加叶及果镇静催眠活性对比研究[D].吉林农业大学, 2021.
- [14] 程甲波. 刺五加抗疲劳谱效关系及质量评价研究[D].东北林业大学, 2023.
- [15] 潘景芝, 金莎, 崔文玉, 等. 刺五加的化学成分及药理活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 353-360.
- [16] 李兰, 段政, 汤有宏等.金银花总黄酮的提取工艺及其抗氧化性研究[J].酿酒, 2022, 49(06):131-136.
- [17] 田存章, 贺新平, 曹乐乐, 等. 金银花叶总黄酮不同提取方法比较及其抗氧化活性研究[J]. 生物化工, 2021, 7(04): 53-56.
- [18] 李森林. 射干中异黄酮类化合物的分离提取及体外活性研究[D]. 长春师范大学, 2018.
- [19] 冯丽娟.沙棘果渣总黄酮不同提取方法比较[J].山西林业科技, 2022, 51(01):19-21.
- [20] 谈文权.不同设施栽培方式对刺五加采摘期及产量的影响[J].中国果菜, 2020, 40(07):72-75.
- [21] 谭艳, 王国庆, 陈赣, 等. 基于主成分及聚类分析的不同产地芦笋品质综合评价[J]. 现代食品科技, 2022, 38(07): 316-326.
- 21Yang, G., Luo, Y., Sun, L., Cao, M., & Luo, J. (2021). Influence of elevated atmospheric CO₂ levels on phytoremediation effect of *Festuca arundinacea* intercropped with *Echinochloa caudata*. *Chemosphere*, 270, 128654. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128654>
- 20Guo, H. Y., Zhang, J., Lin, L. M., Song, X., Zhang, D. D., Cui, M. H., Long, C. W., Long,

- Y. H. , & Xing , Z. B. (2022). Metabolome and transcriptome analysis of eleutheroside B biosynthesis pathway in *Eleutherococcus senticosus*. *Heliyon*, 8(6), e09665. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09665>
- 19Liu, X. M., Liu, Y., Shan, C. H., Yang, X. Q., Zhang, Q., Xu, N., Xu, L. Y., & Song, W. (2022). Effects of five extraction methods on total content, composition, and stability of flavonoids in jujube. *Food chemistry: X*, 14, 100287. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100287>
- 18Wu, E. Y., Sun, W. J., Wang, Y., Zhang, G. Y., Xu, B. C., Chen, X. G., Hao, K. Y., He, L. Z., & Si, H. B. (2022). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Flavonoids from *Abrus Cantoniensis* (*Abriherba*) by Response Surface Methodology and Evaluation of Its Anti-Inflammatory Effect. *Molecules (Basel , Switzerland)*, 27(7), 2036. <https://doi.org/10.3390/molecules27072036>
- 17Yu, J., Lou, Q., Zheng, X., Cui, Z., & Fu, J. (2017). Sequential Combination of Microwave- and Ultrasound-Assisted Extraction of Total Flavonoids from *Osmanthus fragrans* Lour. Flowers. *Molecules (Basel , Switzerland)*, 22(12), 2216. <https://doi.org/10.3390/molecules22122216>
- 16[1] Le, X. D. , Nguyen, M. C. , Vu, D. H. , Pham, M. Q. , & Tran, Q. T. . (2019). Optimization of microwave-assisted extraction of total phenolic and total flavonoid from fruits of *docynia indica* (wall.) decne. using response surface methodology. *Processes*, 7(8), 485.
- 15Gu, X., Zhang, G., Wang, Q., Song, J., Li, Y., Xia, C., Zhang, T., Yang, L., Sun, J., & Zhou, M. (2022). Integrated network pharmacology and hepatic metabolomics to reveal the mechanism of *Acanthopanax senticosus* against major depressive disorder. *Frontiers in cell and developmental biology* , 10 , 900637. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.900637>