doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.04.011

低功率超声醇提薄荷总黄酮工艺优化及抗氧化活性研究

肖牧原

（安徽省食品药品信息与举报中心，安徽 合肥 230051）

摘要：目的 优选乙醇提取薄荷总黄酮的最佳工艺，并考察薄荷总黄酮的抗氧化活性。**方法** 采用低功率超声法（50 ℃，100 W）提取薄荷总黄酮，在单因素试验基础上，采用响应面分析法优选最佳薄荷总黄酮醇提工艺；采用 Fetion 反应考察薄荷总黄酮的抗氧化活性。**结果** 最佳提取工艺为乙醇体积分数 41.14%，液料比 21.57∶1（mL/g），提取时间 91.4 min，提取率为 3.585%；自由基清除率达 50%前，随着薄荷总黄酮质量浓度的增大，其对羟基自由基的清除能力呈快速上升趋势。**结论** 该研究为薄荷总黄酮的提取和生产提供了参考。薄荷总黄酮对羟基自由基有一定清除能力，抗氧化活性良好。

关键词：低功率超声；醇提；薄荷；总黄酮；提取工艺；优化；抗氧化活性

中图分类号：R932；R284.2；TQ460.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1006－4931（2021）04－0041－05

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Mentha Haplocalyx* by Low－Intensity Ultrasound and Its Antioxidant Activity

XIAO Muyuan

（*Anhui Food and Drug Information and Reporting Center, Hefei, Anhui, China 230051*）

Abstract: Objective To optimize the ethanol extraction process of total flavonoids from *Mentha haplocalyx*, and to investigate the antioxidant activity of total flavonoids from *Mentha haplocalyx*. **Methods** Low－intensity ultrasound（50 ℃, 100 W）was used to extract total flavonoids from *Mentha haplocalyx*. On the basis of the single factor test, response surface methodology was used to optimize the ethanol extraction process of total flavonoids from *Mentha haplocalyx*. The antioxidant activity of total flavonoids from *Mentha haplocalyx* was investigated by Fetion reaction. **Results** The optimum extraction conditions were as follows: the volume fraction of ethanol was 41.14%, the liquid－solid ratio was 21.57∶1（mL/g）, the extraction time was 91.4 min, and the extraction rate was 3.585%. Before the scavenging rate of free radical reached 50%, the scavenging ability of total flavonoids from *Mentha haplocalyx* on hydroxyl radicals increased rapidly with the increase of its mass concentration. **Conclusion** This study provides a reference for the extraction and production of total flavonoids from *Mentha haplocalyx*. Meanwhile, the total flavonoids of *Mentha haplocalyx* have a certain scavenging ability to hydroxyl radicals and good antioxidant activity.

Key words: low－intensity ultrasound; alcohol extraction; *Mentha haplocalyx*; total flavonoids; extraction process; optimization; antioxidant activity

薄荷味辛、性凉[1]，常用于治疗头痛、牙痛、伤寒、目赤、喉痹、荨麻疹、咽喉肿痛等病症[2]。其含大量黄酮类物质，有抗自由基和抗氧化作用，治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病（简称冠心病）、老年性痴呆、癌症等也有一定效果。近年来，关于薄荷中黄酮类化合物的研究备受关注，多种相关药品[3]和保健食品随之上市。薄荷总黄酮的常见提取方法为回流提取法，操作简单，提取温度稳定，但提取时间长，耗能大，对产品结构有影响，提取效率不高。超声波提取法利用超声波所产生的高速、强烈空化效应，破坏动植物的细胞，加快提取剂的渗透作用，从而在较短时间内得到较高提取率[4]，但超声波的功率过高也可能破坏分子结构[5－6]。本研究中采用低功率超声法提取薄荷总黄酮，在单因素试验的基础上，采用响应面法[7]优选最佳醇提工艺，并采用 Fetion 反应考察薄荷总黄酮的抗氧化活性。现报道如下。

1　材料与方法

1.1　仪器与试药

仪器：UV－1100 型紫外－可见分光光度计（上海美普达仪器有限公司）；JK－100DVE 型双频数控超声波清洗仪（合肥金尼克机械制造有限公司）；FW100 型高速万能粉碎机（天津市泰斯特仪器有限公司）；FQA2104BS 型电子分析天平（上海越平科学仪器有限公司）。

试药：薄荷购于安徽省亳州市康美中药城；芦丁对照品（批号为 20191228，纯度＞98%）购于合肥博美生物技术有限公司；其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

1.2　方法

1.2.1　芦丁标准曲线绘制

参考文献[8]制备质量浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁对照品溶液，分别移入含芦丁对照品 1.0，2.0，3.0，

第一作者：肖牧原，男，大学本科，主管药师，研究方向为药物（医疗器械）分析技术，（电子信箱）7691197@qq.com。

4.0,5.0 mL的50 mL容量瓶中,加水稀释至12 mL,然后加入1 mL 5% NaOH溶液,再加入1 mL 10% $NaNO_2$溶液,摇匀,静置10 min,加入10 mL 4% $Al(NO_3)_3$溶液,充分显色,加水定容,测量508 nm波长处的吸光度(A),以A为纵坐标、质量浓度(C)为横坐标进行线性回归,绘制标准曲线。

1.2.2 薄荷总黄酮提取率计算[9-10]

按1.2.1项下方法进行显色反应,测定A,根据标准曲线查找对应的质量浓度,代入公式$Y = CVN/(M \times 1\,000) \times 100\%$计算薄荷总黄酮的提取率。其中$Y$为提取率(%),$C$为待测物质量浓度(mg/mL),$V$为提取液的体积(mL),$N$为稀释倍数,$M$为样品质量(g)。

1.3 单因素试验[11-13]

将阴干后的薄荷药材样品粉碎后过筛,称取1.00 g,精密称定,置相同规格比色管中,保持恒定的提取温度(50 ℃)和超声波功率(100 W),选取乙醇的体积分数、液料比和提取时间作为影响因素,每个因素确定6个水平,分别进行3次平行试验(见表1)。抽滤后取2 mL滤液按1.2.1项下方法显色,测定508 nm波长处的吸光度,并按1.2.2项下公式计算总黄酮提取率。

表1 影响因素及水平条件

Tab. 1 Influencing factors and their levels

因素	固定条件	水平条件
乙醇体积分数(%)	提取温度50 ℃ 超声波功率100 W 提取时间30 min 液料比20∶1(mL/g)	20%,30%,40%,60%,80%,95%
液料比(mL/g)	提取温度50 ℃ 超声波功率100 W 提取时间30 min 乙醇体积分数40%	5∶1,10∶1,15∶1,20∶1,25∶1,30∶1
提取时间(min)	提取温度50 ℃ 超声波功率100 W 液料比20∶1(mL/g) 乙醇体积分数40%	10,30,50,70,80,90,110

1.4 响应面试验设计[14-16]

根据单因素试验结果,将乙醇体积分数、液料比和提取时间设定为因素A、因素B、因素C,每个因素的3个水平编码为+1,0,-1,设计3因素3水平的响应面试验,试验方案见表2。

1.5 抗氧化活性试验[17-19]

根据Fetion反应,H_2O_2溶液和Fe^{2+}生成具有较高反应活性的羟基自由基(·OH),·OH与水杨酸反应,生成2,3-二羟基苯甲酸(显色反应机制见图1)。2,3-二羟基苯甲酸的紫外可见吸收峰出现在510 nm波长处,故将检测波长换为510 nm,按1.2.1项下方法操作,得回归方程$A = 10.475C - 0.0077$,$R^2 = 0.99892$($n = 5$),质量浓度线性范围为0.004~0.020 mg/mL。但当体系中有其他物质也能与·OH反应时,就会存在与水杨酸的竞争反应,从而降低2,3-二羟基苯甲酸在体系中的质量浓度,510 nm波长处的吸收峰会相应减小。

表2 响应面试验设计方案

Tab. 2 Design of response surface methodology

序号	因素A	因素B	因素C	序号	因素A	因素B	因素C
1	0	0	0	10	-1	-1	0
2	0	0	0	11	0	-1	1
3	0	1	-1	12	0	0	0
4	-1	1	0	13	1	-1	0
5	1	1	0	14	0	0	0
6	1	0	1	15	-1	0	-1
7	0	1	1	16	1	0	-1
8	0	-1	-1	17	-1	0	1
9	0	0	0				

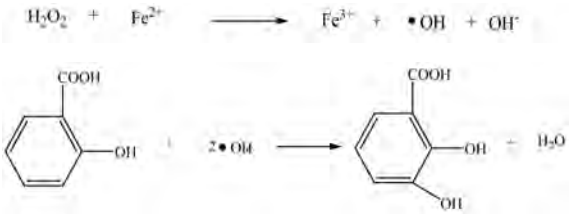


图1 显色反应机制

Fig. 1 The mechanism of color reaction

用固定反应时间的方法,在5根比色管中均加入9 mmol/L的H_2O_2、$FeSO_4$溶液、水杨酸乙醇溶液各1 mL,将薄荷总黄酮提取液分别稀释至20%,40%,60%,80%,100%,各取1 mL,在35 ℃条件下,水浴40 min,测量508 nm波长处的吸光度(A_X),并以去离子水作空白对照,同法得空白吸光度(A_0),由于样品溶液本身具有吸光度,测其本底值时用超纯水作本底对照,同法得本底吸光度(A_{X0}),计算清除率(P)。$P = [A_0 - (A_X - A_{X0})]/A_0 \times 100\%$。

2 结果

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数

结果见图2。随着乙醇体积分数从20%升至40%,薄荷总黄酮的提取率逐渐升高,当乙醇体积分数继续上升,提取率反而快速下降。主要原因可能是乙醇的体积分数对提取液极性的影响。40%乙醇的极性与被提取化合物的极性最接近,相似相容的效果最好,当乙醇体积分数小于或大于40%时,薄荷总黄酮类化合物的溶解性变小,同时部分脂溶性物质的溶解度增加,使得薄荷总黄酮类化合物不能完全浸出[20]。故40%乙醇体积分数为最佳。

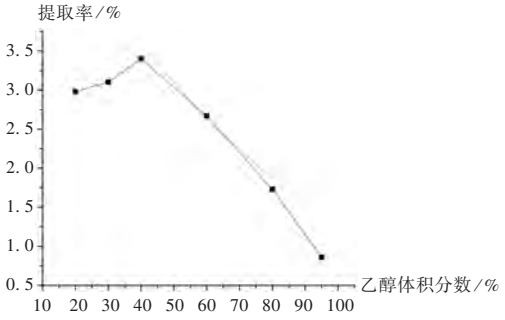


图 2 体积分数与提取率的变化关系

Fig. 2 Relationship between volume fraction and extraction rate

2.1.2 液料比与提取率的变化关系

结果见图 3。薄荷总黄酮的提取率随着液料比的增大，先增后减。液料比为 20∶1 时提取率达到最大值，之后下降。因为随着溶剂量增多，传递功率增大，薄荷总黄酮在溶剂中分散量增大。同时，扩散溶解和吸附是固相和液相两者之间的动态平衡，当体系产生的热量相同时，液料比的增大会降低提取液的温度，此时吸附作用增强，提取率会下降。故 20∶1 为合适液料比[21]。

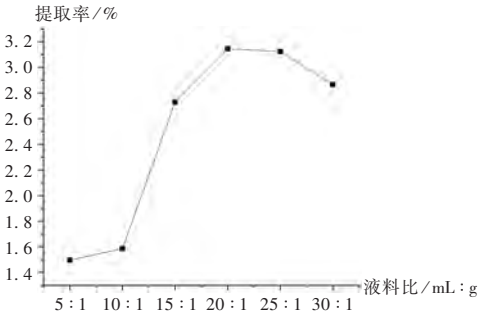


图 3 液料比与提取率的变化关系

Fig. 3 Relationship between the liquid – material ratio and extraction rate

2.1.3 提取时间与提取率的变化关系

结果见图 4。薄荷总黄酮提取率在提取 90 min 时达到峰值，90 min 前，由于升高温度可增大溶解性，提取率与时间呈正比，但提取时间过长，黄酮类化合物可能会发生系列化学变化，产生新的物质，从而导致提取率减小。故提取时间在 90 min 左右为宜[22]。

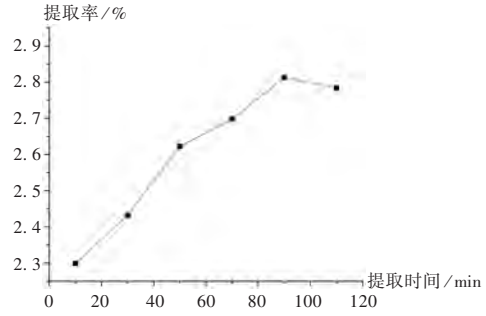


图 4 提取时间与提取率的变化关系

Fig. 4 Relationship between extraction time and extraction rate

2.2 响应面法优化工艺

响应面试验因素水平及结果见表 3、表 4，运用 Design – Expert8 软件对结果进行拟合分析，得方程 $Y = 3.65 - 0.002\ 95A + 0.29B + 0.086C + 0.01AB + 0.078AC - 0.015BC - 0.18A^2 - 0.47B^2 - 0.32C^2$。对该模型进行方差分析和显著性检验分析[23]（见表 5、表 6），显示该模型的失拟项不显著，说明模型能较好地对工艺进行模拟。模型回归的 F 值为 12.77，概率 P 值为 0.001，表明模型具有显著性。表中数据显示，B 和 B^2 两项有极显著影响（$P < 0.001$），A^2 和 C^2 两项有显著影响（$P < 0.05$），而 A，C，AB，AC，BC 项的影响不显著。校正决定系数为 0.868 9，表明方程拟合度较好。变异系数为 4.58 %，说明试验精确可行。决策系数为 0.942 6，说明模型响应值的变化 94.26 % 来自所选的因变量，回归方程能较好地描述其与响应值之间的关系。

2.3 响应曲面分析

结果见图 5 至图 7。3 个响应曲面均向下，具有最高

表 3 响应面试验因素水平及编码

Tab. 3 Factors′ levels and coding of response surface methodology

因素	水平		
	– 1	0	1
A	30	40	50
B	15	20	25
C	80	90	100

表 4 响应面试验结果

Tab. 4 Results of response surface methodology

序号	因素			提取率（%）
	A	B	C	
1	1	0	1	3.177 7
2	0	1	– 1	3.045 2
3	0	– 1	– 1	2.452 6
4	– 1	– 1	0	2.694 7
5	– 1	1	0	3.077 9
6	– 1	0	1	3.253 7
7	0	1	1	3.228 6
8	0	– 1	1	2.694 7
9	1	– 1	0	2.709 1
10	– 1	0	– 1	3.278 7
11	1	1	0	3.505 4
12	1	0	– 1	2.889 2
13	0	0	0	3.830 6
14	0	0	0	3.630 7
15	0	0	0	3.580 5
16	0	0	0	3.630 6
17	0	0	0	3.580 7

表5 回归方程误差统计分析

Tab. 5 Statistical analysis of regression equation errors

项目	数值	项目	数值
标准偏差	0.15	决定系数	0.942 6
均方误差	3.19	校正决定系数	0.868 9
变异系数	4.58	预测决定系数	0.320 2
预测平方和	1.77	信噪比	10.565 0

表6 回归模型方差分析

Tab. 6 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	2.460	9	0.271	12.772	0.001 4	**
A	0.000 7	1	0.001	0.003	0.956 1	
B	0.660	1	0.660	31.100	0.000 8	**
C	0.059	1	0.059	2.780	0.139 5	
AB	0.043	1	0.043	2.000	0.200 5	
AC	0.025	1	0.025	1.150	0.319 1	
BC	0.000 8	1	0.001	0.040	0.846 6	
A^2	0.140	1	0.140	6.360	0.039 7	*
B^2	0.950	1	0.950	44.310	0.000 3	**
C^2	0.430	1	0.430	20.320	0.002 8	**
残差	0.150	7	0.021			
失拟项	0.110	3	0.036	3.300	0.139 2	
纯误差	0.043	4	0.011			
离差	2.610	16				

注：*为差异显著（P<0.05），**为差异极显著（P<0.01）。

Note: * indicates that the difference was significant(P < 0.05), ** indicates that the difference was extremely significant(P < 0.01).

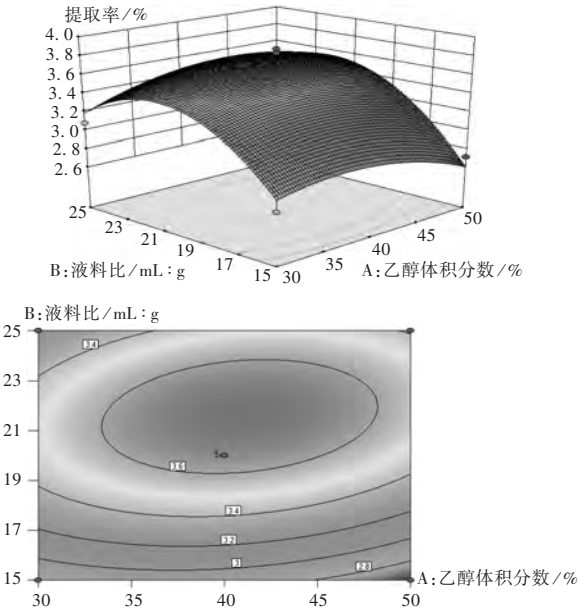


图5 乙醇体积分数和液料比的交互影响

Fig. 5 Interaction of ethanol volume fraction and liquid – solid ratio

的极值点。同时，等高线的中心在所选2个因素的变化范围内，说明响应值在3个因素设计的范围内存在最大值。图5、图6中的等高线呈椭圆形，说明各图2个影响因素间的交互效应较显著，图7中的等高线呈圆形，则说明2个影响因素间的交互效应不显著。

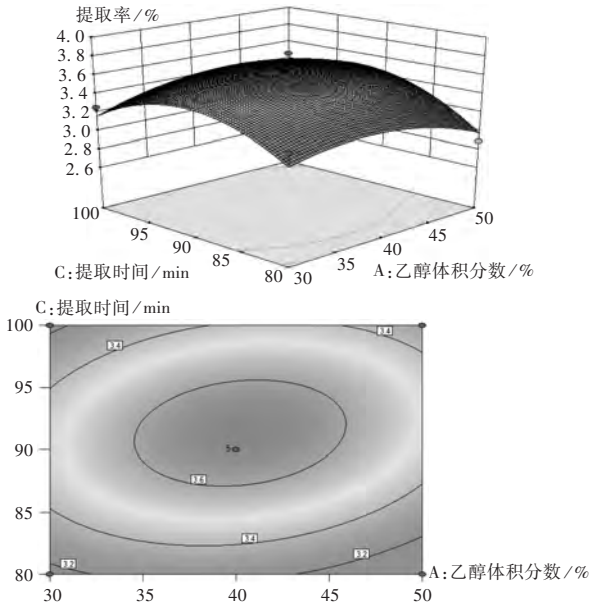


图6 乙醇体积分数与提取时间的交互影响

Fig. 6 Interaction of ethanol volume fraction and extraction time

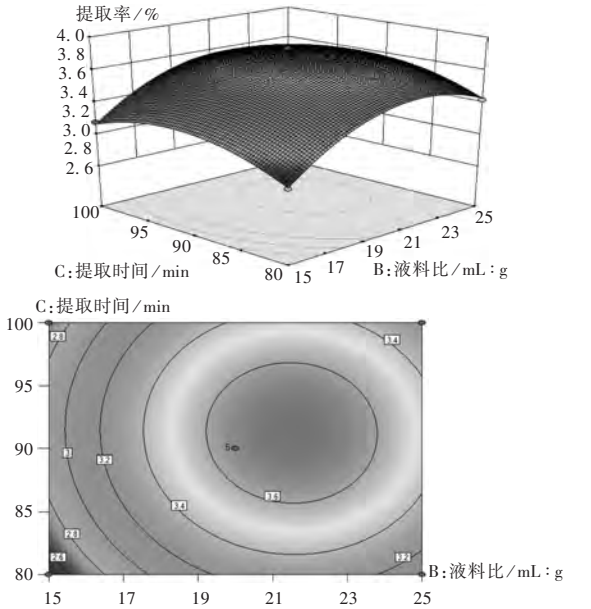


图7 液料比与提取时间的交互影响

Fig. 7 Interaction of liquid – solid ratio and extraction time

2.4 最佳工艺条件确定

根据回归模型，预测在50 ℃温度条件下，100 W超声提取薄荷总黄酮时最佳工艺条件为乙醇体积分数41.14 %，液料比21.57∶1（mL/g），提取时间91.4 min，此时提取率为3.585%。为进一步确定模型的可行性，将最佳提取工艺修正为乙醇体积分数41 %，液料比22∶1（mL/g），提取时间92 min，进行4次验证试

验，结果提取率分别为 3.486%，3.339%，3.452%，3.363%，平均为 3.426%，与理论预测值的标准误差为 3.04%，证明通过响应面法优化所得最佳工艺条件真实可靠。

2.5 抗氧化活性分析

随着薄荷总黄酮质量浓度的增大，其对羟基自由基的清除能力也呈快速上升趋势。当自由基清除率达 50% 后，清除率随薄荷总黄酮的质量浓度变化逐渐趋于平缓。详见图 8。

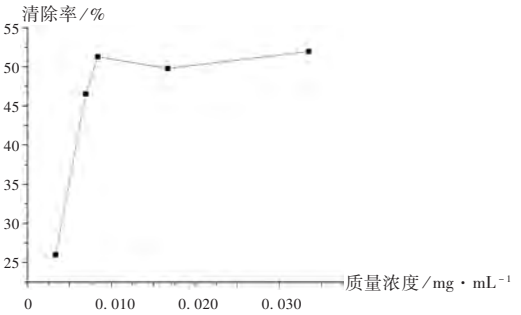


图 8 薄荷总黄酮质量浓度对自由基清除率的影响

Fig. 8 Effect of the concentration of total flavonoids from *Mentha haplocalyx* on the scavenging rate of free radical

3 讨论

本研究中在低功率超声作用下优选乙醇浸提薄荷总黄酮的工艺，首先通过单因素试验初步考察了乙醇体积分数（A）、液料比（B）和提取时间（C）3 个因素的工艺参数范围，然后运用响应面法进行工艺参数的优化。结果分析显示，100 W 超声作用下，50 ℃时，最佳的薄荷总黄酮提取工艺条件为，以 41.14 % 乙醇、液料比 21.57∶1（mL/g）提取 91.4 min，所得薄荷总黄酮的提取率为 3.585%。抗氧化活性试验结果表明，该提取物能去除 50% 的羟基自由基，具有稳定的抗氧化活性。本研究结果为薄荷总黄酮的提取和生产提供了参考。

参考文献

[1] 徐凌玉. 薄荷化学成分及其质量评价研究[D]. 南京：南京中医药大学，2014.

[2] 石琰琴，邵小凤，马保桃，等. 薄荷黄酮抗疲劳作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报，2013，34(4)：292－295.

[3] 邱贺媛，章宋洁. 薄荷叶中黄酮类物质的提取及其抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学，2010，38(34)：19335－19337.

[4] 王玲玲，边祥雨，高蔚娜，等. 植物类黄酮提取纯化技术研究进展[J]. 营养学报，2019，41(6)：606－610.

[5] SINGANUSONG R，NIPORNRAM S，TOCHAMPA W，et al. Low power ultrasound－assisted extraction of phenolic compounds from mandarin（*Citrusreticulata Blanco* cv. Sainampueng）and lime（*Citrus aurantifolia*）peels and the antioxidant[J]. Food Analytical Methods，2015，8：1112－1123.

[6] SURIYAPORN N，WORASIT T，PUNTARIKA R，et al. Optimization of low power ultrasound－assisted extraction of phenolic compounds from mandarin（*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng）peel[J]. Food Chemistry，2018，241(15)：338－345.

[7] 李 莉，张 赛，何 强，等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索，2015，34(8)：41－45.

[8] 丁天宇，黄慧学，陈贻威，等. 咳特灵片（胶囊）总黄酮含量和抗氧化活性研究[J]. 中国当代医药，2019，26(35)：9－12.

[9] 邢 茜，高 兵. 林下仿生栽培灵芝总黄酮含量分析[J]. 农业技术与装备，2019(12)：28－31.

[10] 杨玉英，闫永利，李红英，等. 宁夏枸杞茶中黄酮含量测定方法[J]. 宁夏工程技术，2009，8(2)：135－136.

[11] 栾庆祥，赵 杨，周 欣，等. 单因素实验结合响应面分析法优化杜仲最佳提取工艺[J]. 药物分析杂志，2013，7(5)：46－48.

[12] 钟楚楚，赵晋彤，范 宇，等. 超声提取夏枯草总黄酮及抑菌活性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报（自然科学版），2019，35(6)：651－653.

[13] 张金凤，马 雪，李 杨，等. 山药皮中总黄酮的超声辅助乙醇提取工艺研究[J]. 绥化学院学报，2019，39(12)：152－157.

[14] 黄良芳，张振阳，潘 乐，等. 响应面法优化祁门红茶多酚浸提工艺的研究[J]. 安徽农业科学，2020，48(12)：186－189.

[15] 侯学敏，李林霞，张直峰，等. 响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学工艺技术，2013，34(6)：124－128.

[16] 符智荣，李雪峰，周登维，等. 响应面法优化八月瓜果皮总多酚的超声提取工艺[J]. 安徽农业科学，2017，45(34)：1－3.

[17] 禄 璐，米 佳，罗 青，等. 枸杞总黄酮提取工艺优化及其体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技，2019，40(24)：165－171.

[18] 陈智坤，梁呈元，李维林，等. 薄荷不同溶剂提取物抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技，2013，34(3)：100－103.

[19] 李培源，霍丽妮，贾智若，等. 龙胆草抗氧化活性和总黄酮含量测定研究[J]. 安徽农业科学，2018，46(31)：182－183.

[20] 任凤莲，谷芳芳，吴梅林，等. 利用响应面分析法优化山楂中总黄酮提取条件[J]. 天然产物研究与开发，2006，4(1)：43－45.

[21] 伍 春，徐 立，刘峻池，等. 响应曲面法优化新疆药桑桑皮多酚提取工艺[J]. 食品科学，2011，32(2)：104－107.

[22] 帕丽达，阿布力孜，丛媛媛，等. 响应面法优化牛舌草总黄酮的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，7(3)：61－64.

[23] LI JR，ZHU JL，YE LF. Determination of formaldehyde insquid by high－performance liquid chromatography[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition，2007，16(S1)：127－130.

（收稿日期：2020－09－09）