

一种新型天然低共熔溶剂用于玉竹总黄酮的绿色提取

熊苏慧^{1,2,3}, 唐洁^{1,2,3}, 李诗卉^{1,2,3}, 胡玉珍^{1,2,3}, 夏伯候^{1,2,3*}, 林丽美^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208

2. 湖南中医药大学 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208

3. 湖南中医药大学 中药有毒物质防控技术湖南省工程实验室, 湖南长沙 410208

摘要: 目的 采用新型绿色溶剂天然低共熔溶剂 (nature deep eutectic solvents, NADESs) 提取玉竹总黄酮, 并对其提取工艺、提取效率、溶剂回收利用率进行考察。方法 采用响应面法优化玉竹总黄酮提取工艺; 通过文献比较评价 NADESs 提取效率; 并结合大孔树脂吸附法回收 NADESs。结果 由醋酸钠和乳酸合成的 NADESs (物质的量比为 1:5) 具有最高的提取率, 经响应面法优化后, 在水比例 (水体积与溶液体积比) 22%, 提取温度 51 °C, 提取时间 21 min 和液固比 21 mL/g 下, 总黄酮提取率可达 20.13 mg/g; 而且, NADESs 提取率显著高于文献报道的已有方法; 回收实验表明, NAK-9 对总黄酮的吸附效率 (88.67%) 显著高于 D-101 (77.33%) 和 AB-8 (79.15%)。以甲醇为溶剂, 其解吸附率达 80.46%。回收后的 NADESs 重复使用的提取率达 18.79 mg/g, 回收利用率为 94.56%。结论 NADESs 作为提取介质具有高效、绿色环保及可重复利用等优点, 可用于玉竹总黄酮类化合物的提取, 同时为 NADESs 作为提取介质应用于其他中药有效组分的提取提供了新思路。

关键词: 天然低共熔溶剂; 绿色提取; 响应面法; 玉竹; 总黄酮

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2378-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.020

A new type of natural eutectic solvent for green extraction of total flavonoids from *Polygonati Odorati Rhizoma*

XIONG Su-hui^{1,2,3}, TANG Jie^{1,2,3}, LI Shi-hui^{1,2,3}, HU Yu-zhen^{1,2,3}, XIA Bo-hou^{1,2,3}, LIN Li-mei^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Hunan Engineering Laboratory for Prevention and Control Technology of Toxic Substances in Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To investigate the total flavonoids extraction process, solvent extraction rate, solvent recovery, and utilization using a new green solvent that nature deep eutectic solvents (NADESs) extraction of total flavonoids from *Polygonati Odorati Rhizoma*. **Methods** The extraction technology of total flavonoids was optimized by response surface methodology. The extraction efficiency of NADESs was evaluated by literature comparison and NADESs was recovered by macroporous resin adsorption. **Results** The NADESs (mole ratio 1:5) synthesized by sodium acetate and lactic acid was the best medium for extraction. After optimization by response surface methodology, the extraction rate of total flavonoids reached 20.13 mg/g at the best extraction condition of water 22%, extraction time 51 °C, extraction time 21 min and liquid solid ratio 21 mL/g. The extraction rate of NADESs was significantly higher than the existing methods reported in the literature. The recovery experiments showed that the adsorption efficiency of NAK-9 on total flavonoids (88.67%) was significantly higher than that of D-101 (77.33%), and AB-8 (79.15%). Using methanol as solvent, the total flavonoids in *Polygonati Odorati Rhizoma* desorption rate was 80.46%. The recovered NADESs can be used for the extraction of total flavonoids in the next round, the extraction rate was 18.79 mg/g, and the recovery and utilization rate of solvent is 94.56%.

收稿日期: 2017-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503041); 国家科技部公益性行业专项 (201507002); 湖南省自然科学基金项目 (2017JJ4045); 湖南省重点研发计划项目 (2017SK2125); 2017 年湖南省研究生科研创新项目 (CX2017B440)

作者简介: 熊苏慧 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及其质量标准化研究。Tel: 15274873714 E-mail: xsh1994@126.com

*通信作者 夏伯候, 男, 副教授, 研究方向为中药药效物质基础及其质量标准化研究。Tel: (0731)88458232 E-mail: xiabohou@163.com

林丽美, 女, 教授, 研究方向为中药质量标准化研究。Tel: (0731)88458232 E-mail: lizasmile@163.com

Conclusion NADESs has the advantages of high efficiency, green environmental protection and can be reused as extraction medium, can be used for the extraction of total flavonoids from *Polygonati Odorati Rhizoma*. Meanwhile, the result provides a new idea that NADESs as an extraction medium for the extraction of other effective components of traditional Chinese medicine.

Key words: nature deep eutectic solvents; green extraction; response surface methodology; *Polygonati Odorati Rhizoma*; total flavonoids

玉竹为百合科植物玉竹 *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce 的干燥根茎, 含有黄酮、多糖、生物碱等多种活性物质。其中黄酮类化合物是经光合作用产生的黄色色素, 具有增强免疫力、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤等多种药理作用^[1-2]。因此, 从玉竹中提取黄酮应用于食品和药品领域具有重要意义。目前, 中药黄酮类成分主要以有机溶剂为提取介质, 存在提取效率低、成本投入高、有机溶剂污染严重等问题^[3-5]。因此, 寻找新型提取溶剂用于中药黄酮类成分的提取备受重视。

绿色溶剂的开发促进了现代绿色化学的发展, 其通过取代挥发性溶剂达到高利用率及低毒性^[6-7]。由 Abbott 等^[8]报道的低共熔溶剂 (deep eutectic solvents, DESs) 因其卓越的理化性能和低廉的合成成本, 被认为是一种新型绿色溶剂, 已用于电化学、纳米材料等领域^[9-10]。针对 DESs 诸多优点, 研究人员已将其运用于食品、药品等领域, 作为一种绿色提取介质, 用于酚酸类^[11]、生物碱类^[12]、多糖类^[13]等活性成分的提取。关于黄酮类成分的研究国外已有报道研究人员利用 DESs 已成功从淫羊藿^[14]、槐米^[15]、银杏叶^[16]等中药中提取黄酮类成分。随着研究的进展, 天然低共熔溶剂 (nature deep eutectic solvents, NADESs) 在 DESs 的基础上进一步降低毒性, 成为研究热点。NADESs 主要由细胞初级代谢产物组成, 通过加热, 固体卤化物盐的氢键受体 (hydrogen bond acceptor, HBA) 和氢键供体 (hydrogen bond donors, HBD) 组合, 形成一种低共熔混合物^[17]。目前, 研究人员已成功将 NADESs 应用于枸杞^[18]、降香^[19]等中药黄酮类成分的提取, 但相比于传统有机溶剂及 DESs, NADESs 提取中药黄酮类成分研究仍然有限, 且国内报道不多。

因此, 本研究为使 NADESs 在提取中药黄酮类成分中运用更加广泛, 以玉竹总黄酮为研究对象, 选择 NADESs 作为提取介质, 并结合 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 筛选最佳提取条件, 以期在最大限度下提取玉竹总黄酮; 同时以文献报道的较优传统有机溶剂提取作为参比, 评估

NADESs 提取效率; 并且采用大孔树脂吸附法回收玉竹总黄酮和 NADESs 溶剂, 评价该方法的可持续利用度, 以期为 NADESs 提取玉竹总黄酮提供可靠的理论基础, 具体流程见图 1。

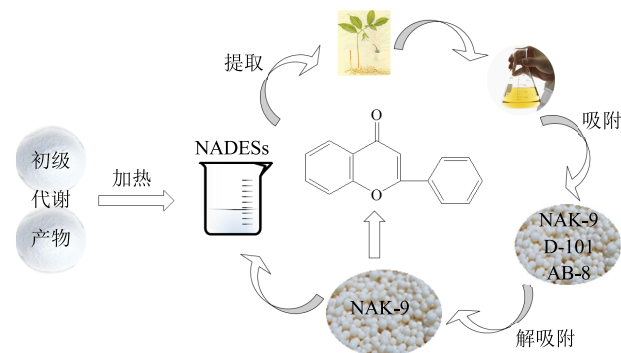


图 1 NADESs 提取玉竹总黄酮的流程

Fig. 1 Total flow chart of total flavonoids by NADESs extraction from *Polygonati Odorati Rhizoma*

1 材料与试剂

玉竹药材购于湖南省长沙市高桥市场, 经湖南中医药大学药学院王智讲师和龚力民副教授鉴定为百合科植物玉竹 *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce 干燥根茎。KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; CP114 型电子分析天平, 奥豪斯仪器 (上海) 有限公司; SN-268393 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; TDZ5-WS 低速多管架自动平衡离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

大孔树脂 NAK-9、大孔树脂 D-101、大孔树脂 AB-8、苹果酸、乳酸、甘氨酸、醋酸钠、醋酸铵、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝等均购于国药集团化学试剂有限公司; 芦丁对照品, 批号 0080-9705, 质量分数 ≥99.0%, 购于中国食品药品检定研究院; 葡萄糖, 批号 20110315, 质量分数 ≥82.5%, 购于广东光华科技股份有限公司; 蔗糖, 批号 1405211, 质量分数 ≥95.0%, 购于西陇化工股份有限公司。

2 方法

2.1 前处理

玉竹样品在 40 °C 下烘干 2 h 至恒定质量, 粉碎并过筛 (80 目), 备用。根据文献报道的方法制备 NADESs^[17-18], HBA 和 HBD 在 80 °C 下加热搅拌,

直至形成均匀的液体。HBA 与 HBD 组合形成不同种类的 NADESs, 如表 1 所示。参考文献报道的方法处理新购买的大孔吸附树脂^[11], 将其装入洁净的树脂柱内, 以 95%乙醇洗至流出液加 3 倍量水后无白色混浊现象, 改用蒸馏水冲洗至无醇味, 备用^[20]。

表 1 不同类型 NADESs

Table 1 Different systems of NADESs

编号	HBA	HBD	物质的量比
NADES-1	苹果酸	葡萄糖	1 : 3
NADES-2	苹果酸	蔗糖	1 : 3
NADES-3	乳酸	甘氨酸	1 : 3
NADES-4	醋酸钠	乳酸	1 : 3
NADES-5	醋酸铵	乳酸	1 : 3

2.2 玉竹总黄酮的提取

精密称量玉竹粉末 2.00 g 置于圆底烧瓶中, 加入 NADESs 38.0 mL (含蒸馏水为 28%), 混合均匀, 充分浸泡后, 放入恒温水浴锅中, 在 51 °C 下超声提取 21 min, 冷却至室温并补足质量, 溶液转移至离心管内, 3 000 r/min 离心 30 min, 弃沉淀, 得上清液 30.0 mL (质量浓度为 52.6 mg/mL), 即为玉竹总黄酮粗提液。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒定质量的芦丁对照品 15.0 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加入无水乙醇稀释至刻度, 配制成质量浓度为 3.0 mg/mL 的芦丁对照品溶液。然后分别精密吸取此对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 于 1 mL 量瓶中, 用无水乙醇稀释至刻度, 即得。

2.4 最大吸收波长的确定

取上述“2.3”项对照品溶液, 采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法, 在波长 300~700 nm 下进行光谱扫描, 测得最大吸收波长为 510 nm。

2.5 线性关系考察

精密移取“2.3”项对照品溶液各 0.2 mL, 加入 5%的亚硝酸钠溶液 0.5 mL, 摇匀, 反应 6 min, 加入 10%的硝酸铝溶液 0.5 mL, 摇匀, 溶液络合 6 min, 最后加入 4%的氢氧化钠溶液 4 mL, 摇匀, 显色 15 min, 在 510 nm 波长处测定吸光度 (A)。以 0.2 mL 无水乙醇按同样操作作为空白, 横坐标为对照品溶液质量浓度, 纵坐标为 A 值, 绘制标准曲线, 得回归方程 $A=0.238 3 C+0.035 6$, $r^2=0.999 8$, 表明芦丁在 0.018~1.500 mg/mL 呈良好的线性关系。

2.6 玉竹总黄酮提取率的计算

精密移取玉竹总黄酮粗提液 0.2 mL, 加入 5%的亚硝酸钠溶液 0.5 mL, 摇匀, 反应 6 min, 加入 10%的硝酸铝溶液 0.5 mL, 摇匀, 溶液络合 6 min, 最后加入 4%的氢氧化钠溶液 4 mL, 摇匀, 显色 15 min, 在 510 nm 波长处测定 A 。将 A 值代入标准曲线求得对应的黄酮质量浓度, 再利用如下公式计算玉竹总黄酮的提取率。

$$Y=CVD/M$$

Y 为玉竹总黄酮的提取率, C 为根据标准曲线求得的总黄酮质量浓度, V 为反应液体积, D 为稀释倍数, M 为样品质量

2.7 NADESs 类型及提取方法考察

考察 5 种不同类型 NADESs 组合 (固定 HBA 与 HBD 物质的量比为 1 : 3), 寻找最佳 NADESs 类型。进而考察 6 种不同的物质的量比 (1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6、1 : 7), 选择对总黄酮提取率影响最大的物质的量比作为最佳 NADESs。考察 4 种不同提取方法常温搅拌、常温超声 ($P=79 W$)、加热搅拌 ($T=50 °C$) 和加热超声 ($T=50 °C$ 、 $P=79 W$), 寻找最佳提取方法用于玉竹总黄酮的提取。

2.8 单因素考察

考察水体积与溶液体积比 (以下简称水比例, 0、20%、40%、60%、80%)、提取温度 (30、40、50、60、70、80 °C)、提取时间 (10、20、30、40、50 min) 和液固比 (10、15、20、25、30 mL/g) 对总黄酮提取率的影响, 对 4 个单因素选择各自最佳水平进行后续 Box-Behnken 设计 (Box-Behnken design, BBD) 实验。

2.9 BBD 实验

采用 3 水平 4 因素 BBD 实验寻找玉竹总黄酮提取条件最优组合。选取水比例 (X_1)、提取温度 (X_2)、提取时间 (X_3) 和液固比 (X_4) 因素中影响最大的 3 水平, 分别以 -1、0、+1 编码, 因素与水平设计见表 2。BBD 实验模型方程式为 $y=b_0+\sum_{i=1}^4 b_i x_i+\sum_{i=1}^4 b_{ii} x_i^2+\sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} x_i x_j$, 其中 y 为玉竹总黄

表 2 因素与水平设计

Table 2 Design of factor and level

水平	$X_1/\%$	$X_2/°C$	X_3/min	$X_4/(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$
-1	10	40	10	10
0	20	50	20	15
+1	30	60	30	20

酮提取率, x_i 、 x_j 为不同的因素, b_0 、 b_i 、 b_{ii} 、 b_{ij} 分别为回归方程的截距、单因素系数、二次项系数和因素交叉系数。

2.10 总黄酮回收及 NADESs 重复利用实验

取已处理好的 3 种不同型号的大孔树脂 (NAK-9、D-101、AB-8) 进行玉竹总黄酮回收实验。在 NADESs 最佳提取条件下, 精密移取 NADESs 提取液 10 mL, 分别加入不同型号的大孔树脂 1.5 g 和 3 g, 混合均匀后, 在室温下于摇床振摇 12 h (150 r/min), 至大孔树脂充分吸附溶液后, 取上清液用于测定玉竹黄酮吸附率; 对吸附饱和的大孔树脂进行滤过, 大孔树脂中加入与 NADESs 提取液等量甲醇, 振摇 6 h (150 r/min), 滤过大孔树脂, 得甲醇解吸附溶液; NADESs 溶剂回收利用, 用于下一次玉竹总黄酮提取, 测定其重复利用的总黄酮提取率。

2.11 统计学方法

响应曲面模型的回归方程式和显著性统计采用 Design Expert 8.0.6 软件进行计算和分析。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据结果采用 SPSS 21.0 统计软件进行方差分析。多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异, $P < 0.01$ 具有极显著性差异。模型的准确性及显著性由 F 值、回归系数 R^2 和失拟项决定。回归系数 R^2 越接近 1, 则说明模型越可靠。预测系数和调整系数越高, 模型越可靠。

3 结果与分析

3.1 NADESs 类型及提取方法实验结果

3.1.1 不同种类 NADESs 对总黄酮提取率影响 扩散度、溶解度、黏度、表面张力、极性和醇基等条件是 NADESs 提取活性成分的重要因素, 选择合适的 NADESs 有利于有效成分的充分溶出^[21]。本研究探讨 5 种不同 NADESs 类型 ($n_{\text{HBA}}-n_{\text{HBD}}=1:3$) 在超声加热条件 ($P=79 \text{ W}$ 、 $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $t=20 \text{ min}$) 下对玉竹总黄酮提取率的影响。结果 NADES-1、NADES-2、NADES-3、NADES-4、NADES-5 的提取率分别为 (5.73 ± 0.13) 、 (5.42 ± 0.15) 、 (11.85 ± 0.90) 、 (13.16 ± 0.22) 、 $(12.20 \pm 0.43) \text{ mg/g}$ ($n=3$)。由结果可知, 总黄酮提取率大小为 NADES-4 (醋酸钠/乳酸) > NADES-5 (醋酸铵/乳酸) > NADES-3 (乳酸/甘氨酸) > NADES-1 (苹果酸/葡萄糖) > NADES-2 (苹果酸/蔗糖), 其中 NADES-4 总黄酮提取率最高, 达 13.16 mg/g , 而 NADES-2 黄酮提取率最低, 只有 5.42 mg/g 。

3.1.2 HBA 与 HBD 不同物质的量比对总黄酮提取率影响 HBA 与 HBD 之间物质的量比值降低, NADESs 的黏度和表面张力也随着减低, 可以增加黄酮提取率, 但比值过度的降低则会导致盐浓度降低, 从而影响黄酮提取率^[17]。因此合适的比值对总黄酮的提取效率具有很大的影响。为寻找 NADES-4 (醋酸钠/乳酸) 最佳提取效率, 考察 6 种不同物质的量比 (1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7)。结果 HBA-HBD 比例为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7 时的提取率分别为 (8.16 ± 0.19) 、 (11.46 ± 0.46) 、 (13.07 ± 0.13) 、 (14.02 ± 0.32) 、 (15.87 ± 0.45) 、 (14.97 ± 0.24) 、 $(14.59 \pm 0.30) \text{ mg/g}$ ($n=3$)。由结果可知, NADESs-4 物质的量比从 1:1 到 1:5 的增加过程中, 玉竹总黄酮的提取率逐渐增加, 当物质的量比为 1:5 时, 提取率达 15.87 mg/g , 但是, 随着物质的量比的继续增加, 总黄酮提取率出现降低趋势。因此, 选择物质的量比 1:5 为最佳配比。

3.1.3 不同提取方法对总黄酮提取率的影响 本实验比较了加热超声 ($P=79 \text{ W}$ 、 $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$)、常温超声 ($P=79 \text{ W}$)、加热搅拌 ($T=50 \text{ }^\circ\text{C}$) 和常温搅拌 4 种不同提取方法对玉竹总黄酮提取率的影响。结果加热超声、常温超声、加热搅拌、常温搅拌的提取率分别为 (15.97 ± 0.37) 、 (8.24 ± 0.65) 、 (10.93 ± 0.64) 、 $(6.33 \pm 0.98) \text{ mg/g}$ ($n=3$)。由结果可知, 常温搅拌的方法总黄酮提取率较低, 只有 6.33 mg/g , 而采用加热超声方法, 总黄酮提取率最高, 达 15.97 mg/g 。由此说明超声和温度是促进总黄酮浸出的重要因素。

3.2 单因素实验结果

3.2.1 不同水比例对总黄酮提取率的影响 水比例是影响 NADESs 提取效率的重要参数, 具有调节 NADESs 黏度和极性作用^[22]。固定提取温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 、提取时间 30 min、液固比 10 mL/g, 考察不同水比例梯度 (0、20%、40%、60%、80%) 对玉竹总黄酮提取率的影响, 结果水比例为 0、20%、40%、60%、80% 时的提取率分别为 (13.07 ± 0.09) 、 (15.54 ± 0.37) 、 (14.15 ± 0.75) 、 (10.20 ± 0.46) 、 $(6.58 \pm 0.29) \text{ mg/g}$ ($n=3$)。通过实验结果可得, 当水比例为 0 时, 总黄酮提取率达 13.07 mg/g , 随着水比例的增加, 当达到 20% 时, 总黄酮提取率为 15.54 mg/g , 而后续实验中逐渐增加水比例, 总黄酮提取率下降。故选择 20% 作为水比例因素最佳水平。

3.2.2 不同提取温度对总黄酮提取率的影响 根据学者前期研究^[21], 适当增加温度能降低 NADESs 的黏度、增加扩散系数、破坏分子间的相互作用, 从而提高活性物质的溶解。固定水比例 20%、提取时间 30 min 以及液固比 10 mL/g, 考察不同温度梯度 (30、40、50、60、70、80 °C) 对玉竹总黄酮提取率的影响, 结果提取温度为 30、40、50、60、70、80 °C 时的提取率分别为 (12.80±0.38)、(15.73±0.33)、(17.83±0.69)、(16.00±0.43)、(14.62±0.88)、(12.21±0.45) mg/g ($n=3$)。通过实验结果可得, 随着提取温度的增加, 总黄酮提取率先增加后降低, 当提取温度达 50 °C 时, 总黄酮提取率最高, 为 17.83 mg/g。故选择 50 °C 作为提取温度最佳水平。

3.2.3 不同提取时间对总黄酮提取率的影响 提取时间对总黄酮提取率有着重要的影响。研究表明, 在一定时间段内, 活性成分溶出率随着时间的增加而增加, 然而达到一定时间后, 溶液体系渗透压达到平衡时溶出率变化不大^[23]。固定提取温度 50 °C、水比例 20%、液固比 10 mL/g, 考察不同时间梯度 (10、20、30、40、50 min) 对玉竹总黄酮提取率的影响, 结果提取时间为 10、20、30、40、50 min 时的提取率分别为 (15.31±0.54)、(18.13±0.76)、(17.01±0.56)、(15.18±0.89)、(15.17±0.69) mg/g ($n=3$)。通过实验结果可得, 在 20 min 内, 总黄酮提取率随着提取时间的增加而增加, 最高可达 18.13 mg/g, 再次增加提取时间, 总黄酮提取率出现下降趋势, 这可能是由于时间过长, 析出的某些物质变性或与黄酮反应, 也可能是超声时间过长对黄酮类化合物的稳定性有一定影响, 使提取率下降。故选择 20 min 作为提取时间最佳水平。

3.2.4 不同液固比对黄酮提取率的影响 NADESs 的体积决定了药材是否能充分浸润、目标化合物能否有效溶出, 因此考察液固比对玉竹总黄酮提取率具有重要作用。固定水比例 20%、提取温度 50 °C、提取时间 20 min, 考察不同液固比梯度 (10、15、20、25、30 mL/g) 对玉竹总黄酮提取率的影响, 结果液固比为 10、15、20、25、30 mL/g 时的提取率分别为 (16.64±1.41)、(18.29±0.47)、(19.46±0.49)、(19.10±0.83)、(18.74±0.82) mg/g ($n=3$)。通过结果可得, 随着液固比的增加, 药材充分浸润, 总黄酮提取率不断增加, 当液固比达到 20 mL/g 时, 总黄酮提取率达到最大值, 为 19.46 mg/g, 此时再

次增加液固比, 总黄酮提取率变化不大。故选择 20 mL/g 作为液固比最佳水平。

3.3 响应面 (RSM) 优化提取条件结果分析

3.3.1 统计分析和模型拟合 采用 BBD 实验涉及到 3 个水平、4 个因素, 具有 5 个重复数据用于评价模型变异性和稳定性。BBD 实验表格设计及其实验数据如表 3 所示。对数据进行分析, 回归方程为 $Y = -90.71197 + 0.73544X_1 + 2.67007X_2 + 0.73975X_3 + 2.53683X_4 - 4.81 \times 10^{-3}X_1X_2 - 6.125 \times 10^{-3}X_1X_3 + 0.022585X_1X_4 + 7.7 \times 10^{-3}X_2X_3 + 0.02542X_2X_4 - 0.0101X_3X_4 - 0.019162X_1^2 - 0.032068X_2^2 - 0.019006X_3^2 - 0.096339X_4^2$ 。

由表 4 可知, 模型回归系数 $r^2=0.9826$, $P<0.01$, 说明该模型回归极为显著, 可用于玉竹总黄酮的试验设计。根据显著性标准, 一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 , 交互项 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_1X_4 、 X_2X_3 、 X_2X_4 、 X_3X_4 以及二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对玉竹总黄酮提取率的影响均具有显著性 ($P<0.05$)。方程的失拟项 P 值为 0.2969, 表明其对实验结果的影响不显著, 说明模型良好; $R_{adj}^2=0.9653$ 可解释本模型中 96.53% 响应值的变化; $R_{pred}^2=0.9131$, $R_{adj}^2=0.9653$, 二者差异在合理范围内 ($|R_{adj}^2 - R_{pred}^2| < 0.2$), 说明该模型具有较好的回归性。精密度为 $25.367 > 4$ 进一步表明本模型设计合理。

3.3.2 RSM 分析 响应面三维图和等高线图不仅可以解释自变量之间的相互作用, 而且可以反映量间相互作用。通过观察曲面的倾斜度确定两者对响应值的影响程度, 倾斜度越高, 即坡度越陡, 说明两者交互作用越显著。 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 对玉竹总黄酮提取率的影响如图 2 所示, 4 因素之间的交互曲面均具有较大的倾斜度, 说明两两因素之间对玉竹总黄酮提取率的影响较大。曲面图结果与表 4 方差分析结果相符合 ($P<0.01$)。因此, 根据拟合方程和方差分析结果可得反应变量的最优提取条件: X_1 为 22.12%、 X_2 为 50.97 °C、 X_3 为 20.75 min、 X_4 为 21.36 mL/g。在最优条件下, 玉竹总黄酮提取率达到最大预测值 20.13 mg/g。为了实验便利性, 对 4 个因素最佳值进行适当修改如下: $X_1=22\%$ 、 $X_2=51$ °C、 $X_3=21$ min、 $X_4=21$ mL/g。为了证实预测值的准确性, 在最优条件下进行验证实验, 得到玉竹总黄酮提取率实测值为 (19.87±0.21) mg/g ($n=3$), 与预测值 20.13 mg/g 非常接近 ($P>0.05$), 说明模型预测良好, 可用于玉竹总黄酮的提取。

表 3 BBD 实验设计与结果

Table 3 Result and experiment design of BBD

编号	$X_1/\%$	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/min	$X_4/(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$	提取率/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	编号	$X_1/\%$	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/min	$X_4/(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$	提取率/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
1	0	1	0	1	16.280	16	-1	0	0	-1	15.434
2	0	1	-1	0	19.920	17	0	-1	1	0	14.234
3	1	0	-1	0	20.010	18	0	0	-1	-1	20.123
4	0	0	0	0	14.120	19	0	0	-1	1	13.634
5	-1	0	-1	0	19.330	20	0	1	0	-1	16.470
6	0	0	0	0	14.030	21	-1	1	0	0	15.110
7	0	0	0	0	15.090	22	-1	0	1	0	15.410
8	0	0	1	-1	16.820	23	-1	-1	0	0	13.800
9	1	0	0	1	16.634	24	0	0	0	0	16.810
10	0	0	1	1	16.870	25	1	0	1	0	15.133
11	0	0	0	0	14.720	26	0	-1	-1	0	20.130
12	0	-1	0	-1	13.530	27	0	1	1	0	13.720
13	0	-1	0	1	12.420	28	1	0	0	-1	14.754
14	-1	0	0	1	16.170	29	1	-1	0	0	14.550
15	1	1	0	0	18.734						

表 4 回归模型方差分析

Table 4 ANOVA for response surface regression mode

方差源	方差	自由度	F 值	P 值	显著性	方差源	方差	自由度	F 值	P 值	显著性
总模型	137.87	14	56.57	<0.000 1	极显著	X_2^2	66.71	1	383.18	<0.000 1	极显著
X_1	3.99	1	22.92	0.000 3	极显著	X_3^2	23.43	1	134.60	<0.000 1	极显著
X_2	1.04	1	5.97	0.028 4	显著	X_4^2	37.63	1	216.14	<0.000 1	极显著
X_3	1.92	1	11.04	0.005 0	极显著	残差	2.44	14			
X_4	12.48	1	71.71	<0.000 1	极显著	失拟项	2.00	10	1.82	0.296 9	
X_1X_2	0.93	1	5.32	0.037 0	显著	纯误差	0.44	4			
X_1X_3	1.50	1	8.62	0.010 8	显著	总和	140.30	28			
X_1X_4	5.10	1	29.30	<0.000 1	极显著	R^2	0.982 6				
X_2X_3	2.37	1	13.62	0.002 4	极显著	R_{adj}^2	0.965 3				
X_2X_4	6.46	1	37.12	<0.000 1	极显著	R_{pred}^2	0.913 1				
X_3X_4	1.02	1	5.86	0.029 7	显著	精密度	25.367				
X_1^2	23.82	1	136.82	<0.000 1	极显著						

3.4 传统方法提取玉竹总黄酮

目前,文献报道的玉竹总黄酮提取主要以乙醇、丙酮作为提取溶剂。选取文献报道的玉竹总黄酮的最优提取方法(乙醇提取法^[24]、丙酮提取法^[25]),在同等条件下,与本研究最优提取条件下 NADESs 提取法进行比较。由表 5 可知,比较 3 种提取方法,发现 NADESs 总黄酮提取率最高,达 19.16 mg/g; 其次为 85%丙酮,总黄酮提取率达 13.31 mg/g; 而 70%乙醇提取率最低,只有 8.88 mg/g。t

检验结果表明,NADESs 作为玉竹总黄酮提取溶剂提取率极显著高于 70%乙醇和 85%丙酮($P<0.01$)。而且,乙醇和丙酮作为有机提取溶剂,对环境及人体具有一定的毒害作用,且总黄酮醇提液存放易变质^[26]。因此,NADESs 作为黄酮提取溶剂具有一定优势。

3.5 总黄酮回收及 NADESs 重复利用

绿色化学的发展在很大程度上得利于溶剂的回收。NADESs 作为合成溶剂,其蒸气压较低,常规

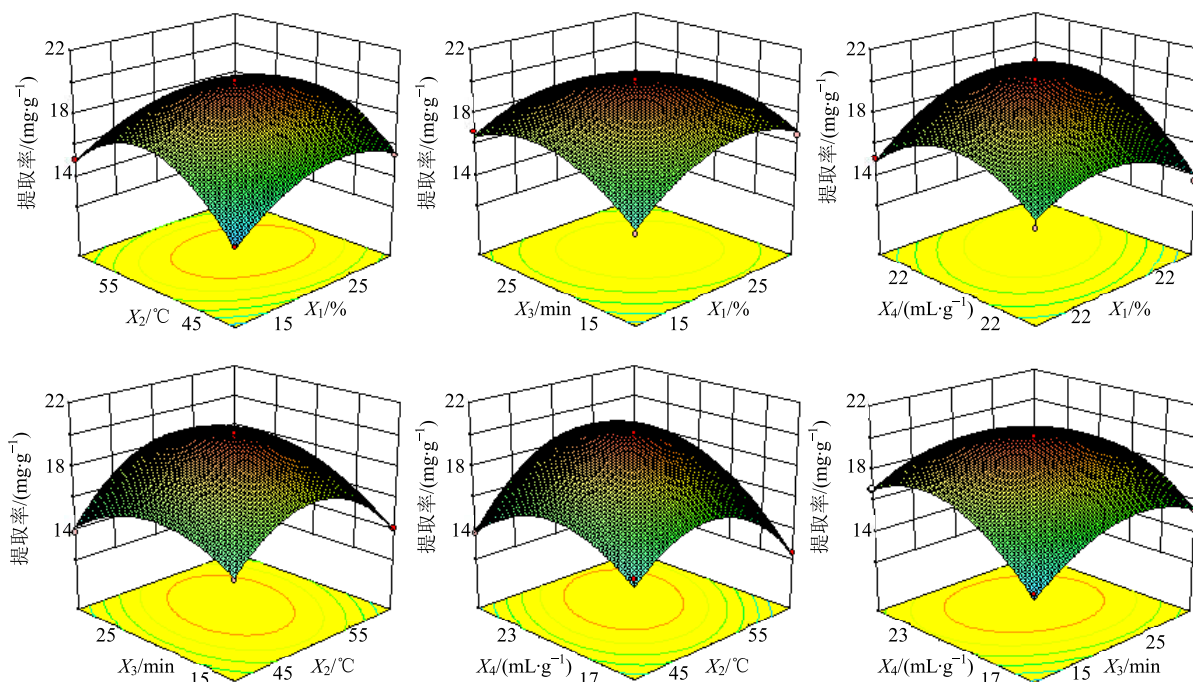


图 2 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 交互作用对玉竹总黄酮提取率影响的响应面

Fig. 2 Response surface (3D) showing effect of X_1 , X_2 , X_3 , and X_4 on yield of total flavonoids

表 5 不同提取方法对玉竹总黄酮的提取率比较 ($n = 3$)

Table 5 Extraction of yields of total flavonoids by different extraction methods ($n = 3$)

提取方法	提取率/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
70%乙醇	$8.88 \pm 1.60^{**}$
85%丙酮	$13.31 \pm 2.58^{**}$
NADESs	19.16 ± 1.15

与 NADESs 比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs NADESs

减压浓缩不适合回收溶剂。因此, 寻找合适的回收方法对 NADESs 的进一步发展至关重要。目前报道的文献中, NADESs 可用超临界二氧化碳、固相萃取等方法进行回收, 但其存在价格昂贵或操作复杂的劣势^[27-28]。相比于前者, 大孔树脂吸附法具有操作简单、成本低廉的优势, 已被用于回收 NADESs^[26]。本研究考察 3 种不同型号的大孔树脂 (NAK-9、D-101、AB-8) 对玉竹总黄酮吸附率的影响, 结果表明 (表 6), 3 种树脂具有一定的吸附率, 随着树脂的增加, 吸附率明显增加且效果较好, 其中 NAK-9 吸附率最高达 88.67%。当树脂用量均为 3 g 时, t 检验结果表明 NAK-9 吸附效果显著优于 D-101 和 AB-8 ($P < 0.05$)。同时, 采用甲醇对吸附饱和后的 NAK-9 解吸附, 解吸附率达 80.45%。因此, 采用大孔树脂回收 NADESs 简单、有效。

表 6 不同大孔树脂对玉竹总黄酮吸附率比较 ($n = 3$)

Table 6 Adsorption of total flavonoids from NADESs extraction solution with different macroporous resins ($n = 3$)

大孔树脂类型	用量/g	提取率/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
NAK-9	1.5	76.00 ± 2.31
	3.0	88.67 ± 2.60
D-101	1.5	72.33 ± 3.20
	3.0	$79.15 \pm 2.12^*$
AB-8	1.5	67.67 ± 1.45
	3.0	$77.33 \pm 0.88^*$

与 NAK-9 比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs NAK-9

总黄酮经大孔树脂吸附后, NADESs 溶液可被回收利用, 用于下一循环继续提取。扣除残留于 NADESs 中的总黄酮影响, 本实验回收后的 NADESs 第 2 次用于提取玉竹总黄酮, 其提取率达 18.79 mg/g ($n = 3$), 回收利用率为 94.56%。由此说明, NADESs 经大孔树脂吸附后, 溶剂完整性较好, 可再次回收利用。

4 结论

本研究考察了一种新型绿色提取溶剂 NADESs 用于玉竹总黄酮的提取, 发现由醋酸钠和乳酸合成的 (物质的量比为 1:5) 溶剂最适合作为其提取介质。经单因素考察和响应面法优化玉竹总黄酮最佳

提取条件, 及与传统有机溶剂对总黄酮提取率比较后发现, NADESs 作为玉竹总黄酮提取介质具有高效、绿色环保的优点。同时, NADESs 方法提取得到的总黄酮具有较高的回收率, 可进行重复使用。因此, 本研究结果表明, NADESs 作为提取介质具有高效、绿色环保及可重复利用等优点, 可用于玉竹总黄酮类化合物的提取, 同时, 本结果为 NADESs 作为提取介质应用于其他中药有效组分的提取提供新思路。

本研究采用 NADESs 替代传统有机溶剂提取玉竹总黄酮, 高效环保, 但存在一定不足有待后续研究, 主要表现为对大孔树脂进行解吸附采用的溶剂较为单一, 未综合比较其余溶剂对大孔树脂解吸附的效果, NADESs 重复利用率仍有待于提高。同时本实验表明, 经 NADESs 提取玉竹总黄酮比传统溶剂提取效率高, 但本实验后续对两者总黄酮活性研究不足。本研究采用超声加热提取玉竹总黄酮, 并用大孔树脂进行吸附, 该工艺更适合于实验室, 若应用于工业大生产, 仍需进一步优化。

参考文献

- [1] 钟建青, 李波, 贾琦, 等. 天然黄酮类化合物及其衍生物的构效关系研究进展 [J]. 药学学报, 2011, 46(6): 622-630.
- [2] 张轩铭, 王冬梅, 王瑾, 等. 不同产地玉竹黄酮提取物体外抗氧化活性研究 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(3): 628-631.
- [3] Lai T N H, André C M, Chirinos R, et al. Optimisation of extraction of piceatannol from *Rhodomyrtus tomentosa* seeds using response surface methodology [J]. *Sep Purif Technol*, 2014, 134(7): 139-146.
- [4] Pavlič B, Naffati A, Hojan T, et al. Microwave-assisted extraction of wild apple fruit dust—production of polyphenol-rich extracts from filter tea factory by-products [J]. *J Food Process Eng*, 2016, 40(4): 1-11.
- [5] 吴聪华, 程华, 李琳玲, 等. 药用植物黄酮类化合物的提取方法 [J]. 武汉工程大学学报, 2011, 33(9): 34-38.
- [6] Anastas P, Eghbali N. Green chemistry: Principles and practice [J]. *Chem Soc Rev*, 2010, 39(1): 301-312.
- [7] 郭立玮, 邢卫红, 朱华旭, 等. 中药膜技术的“绿色制造”特征、国家战略需求及其关键科学问题与应对策略 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3267-3279.
- [8] Abbott A P, Capper G, Davies D L, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [J]. *Chem Commun*, 2003, 9(1): 70-71.
- [9] Gomez F J V, Espino M, de los Angeles Fernandez M, et al. Enhanced electrochemical detection of quercetin by natural deep eutectic solvents [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 936(7): 91-96.
- [10] Söldner A, Zach J, Iwanow M, et al. Preparation of magnesium, cobalt and nickel ferrite nanoparticles from metal oxides using deep eutectic solvents [J]. *Chem-Eur J*, 2016, 22(37): 13108-13113.
- [11] Peng X, Duan M H, Yao X H, et al. Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae Japonicae Flos* with deep eutectic solvent [J]. *Sep Purif Technol*, 2016, 157(1): 249-257.
- [12] Tan T, Zhang M, Wan Y, et al. Utilization of deep eutectic solvents as novel mobile phase additives for improving the separation of bioactive quaternary alkaloids [J]. *Talanta*, 2016, 149(3): 85-90.
- [13] Zhang L, Wang M. Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb. [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95(11): 675-681.
- [14] Duan L, Dou L L, Guo L, et al. Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products [J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2016, 4(4): 2405-2411.
- [15] Zhao B Y, Xu P, Yang F X, et al. Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: Characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica* [J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2015, 3(11): 2746-2755.
- [16] Tang W, Li G, Chen B, et al. Evaluating ternary deep eutectic solvents as novel media for extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* [J]. *Sep Sci Technol*, 2017, 52(1): 91-99.
- [17] Wei Z F, Wang X Q, Peng X, et al. Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae* [J]. *Ind Crop Prod*, 2015, 63(4): 175-181.
- [18] Bajkacz S, Adamek J. Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples [J]. *Food Anal Method*, 2018, 11(5): 1330-1344.
- [19] Li L, Liu J Z, Luo M, et al. Efficient extraction and preparative separation of four main isoflavonoids from *Dalbergia odorifera* T. Chen leaves by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation extraction followed by macroporous resin column chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1033/1034(8): 40-48.
- [20] 何春喜, 余泽义, 何毓敏, 等. 竹节参总皂苷的大孔吸

- 附树脂纯化与离子交换树脂脱色工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1146-1152.
- [21] Bi W, Tian M, Row K H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1285(2): 22-30.
- [22] Dai Y, Witkamp G J, Verpoorte R, *et al.* Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications [J]. *Food Chem*, 2015, 187(3): 14-19.
- [23] Wang J, Wang C J, Zhao W Y, *et al.* Studies on the extracting technology of flavones in *Ginkgo* leaves assisted by microwave [J]. *Adv J Food Sci Technol*, 2016, 10(4): 254-256.
- [24] 彭秧锡, 陈启元, 钟世安, 等. 玉竹中总黄酮的提取工艺研究 [J]. 武汉理工大学学报, 2005, 27(12): 38-40.
- [25] 夏光辉, 魏凤云, 焦冬冬. 回流提取法在玉竹黄酮提取中的应用研究 [J]. 通化师范学院学报, 2016, 37(2): 11-14.
- [26] Dai Y, Rozema E, Verpoorte R, *et al.* Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1434(1): 50-56.
- [27] Nam M W, Zhao J, Lee M S, *et al.* Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos Sophorae* [J]. *Green Chem*, 2015, 17(3): 1718-1727.
- [28] Jeong K M, Lee M S, Nam M W, *et al.* Tailoring and recycling of deep eutectic solvents as sustainable and efficient extraction media [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1424(10): 10-17.