

[2]

合成[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2017, 51(3): 200-205.

[3]

韩琳娜, 周凤琴. 我国引种药用植物紫锥菊研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(8): 1799-1802.

[4]

肖培根. 国际流行的免疫调节剂——紫锥菊及其制剂[J]. 中草药, 1996, 27(1): 46-48.

[5]

岑国栋, 锥蓬铁, 高永翔. 紫锥菊药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(1): 15-18.

[6]

张英涛, 王 弘, 刘文芝, 等. 松果菊属药用植物的应用基础研究[J]. 北京大学学报 (医学版), 2004, 36(1): 90-93.

[7]

辛 杰, 韩琳娜, 周凤琴. 正交试验法优选紫锥菊中菊苣酸提取工艺[J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(6): 539-541.

[8]

窦德明, 崔树玉, 曹永智, 等. 引种紫锥菊有效成分菊苣酸含量研究[J]. 中草药, 2001, 32(11): 987-988.

[9]

李 健, 张爱均, 刘 雯, 等. 紫锥菊地上部分 4 种酚酸类成分的 HPLC 法测定研究[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(9): 1935-1937.

[10]

姚兴东, 聂园梅, Datta-Gupta N. 紫锥花种属中酚类化合物的 HPLC 分析[J]. 分析科学学报, 2006, 22(2): 199-201.

[11]

郭建伟. 紫锥菊中菊苣酸和单咖啡酰酒石酸纯化工艺及菊苣酸性质研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2009.

[12]

李 晶, 聂 斌, 武 力, 等. 引种紫锥菊中菊苣酸的定性定量分析[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(9): 1804-1807.

[13]

王 弘, 刘文芝, 鲁晓蕾, 等. 松果菊中有效成分菊苣酸的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 418-420.

[14]

李 峰, 李 健, 李 娜. 菊苣酸在制备抗呼吸道合胞病毒的 药物中的应用, 中国: CN107050010A [P]. 2017-08-18.

[15]

赵咏梅, 杨 力. 紫锥菊中菊苣酸喷雾提取工艺的研究[J]. 陕西农业科学, 2018, 64(10): 32-35.

[16]

肖正中, 邹苏晓. 紫锥菊提取物对小鼠免疫功能的影响[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 275-276.

[17]

胡 梅, 柴建亭, 邱 妍. 不同浓度紫锥菊多糖对鸡脾脏淋巴细胞的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013(6 下): 115-116.

[18]

宋红卫, 李秀菊, 岳 立. 紫锥菊提取物对肉仔鸡免疫功能的影响[J]. 饲料博览, 2014(6): 7-10.

[19]

吴启林, 袁其朋, 陈养文. 紫锥菊中菊苣酸提取纯化工艺研究[J]. 中草药, 2004, 1(9): 40-42.

[20]

曾 栋, 陈 波, 罗旭彪, 张 斐, 等. 大孔吸附树脂对紫锥菊提取物中菊苣酸分离纯化的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(2): 160-162.

[21]

The United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopoeia[S]. 2019: 365.

超声辅助低共熔溶剂提取红豆杉叶总黄酮工艺的优化

江石平, 朱婉萍*
(浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310007)

摘要: **目的** 优化超声辅助低共熔溶剂提取红豆杉叶总黄酮工艺。**方法** 在单因素试验基础上, 以低共熔溶剂(氯化胆碱-乙二醇-水)体积分数、液料比、提取时间为影响因素, 总黄酮提取率为评价指标, 响应面法优化提取工艺。**结果** 最佳条件低共熔溶剂体积分数 72%, 液料比 27:1, 提取时间 51 min, 总黄酮提取率 6.703%。**结论** 低共熔溶剂作为提取介质时, 具有高效、环保的特点, 可用于红豆杉叶总黄酮的提取。

关键词: 红豆杉叶; 总黄酮; 提取; 超声; 低共熔溶剂; 响应面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3442-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.034

低共熔溶剂是一种新型溶剂, 它是由某些固体有机分子与特定的离子型化合物按照一定比例混合, 在室温下呈液体状态的低共熔混合物^[1], 具有低熔点、低成本、低毒性、易制备、能再生、可生物降解等优点^[2]。现代研究表

明, 低共熔溶剂能显著提高多酚、黄酮、多糖等成分的提取率^[3-4], 是提取中药活性成分的理想溶剂。

南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* 是国内特有的红豆杉科红豆杉属植物^[5], 其叶中成分主要为紫杉萜、黄

收稿日期: 2020-05-16

基金项目: 浙江省中医药科技计划重点研究项目 (2016ZZ002)

作者简介: 江石平 (1991—), 男, 硕士, 实习研究员, 从事中药有效成分分析及药效研究。Tel: 18258151352, E-mail: 805793833@qq.com

* 通信作者: 朱婉萍 (1974—), 女, 博士, 研究员, 从事中药有效成分分析及药效研究。Tel: (0571) 88849087, E-mail: zhwanp@163.com

酮、多糖、生物碱、挥发油等^[6]，其中黄酮具有抗癌、抗肝肝毒性、抗菌、抗氧化等多种药理作用^[7]。目前，中药中黄酮类成分的提取溶剂主要是水和有机溶剂^[8]，但均存在能耗高、制备周期长、提取率低、不够环保等缺点，故寻找绿色溶剂具有重要意义。本实验采用超声辅助提取技术，研究不同低共熔溶剂对总黄酮提取率的影响，并利用响应面对工艺进行优化，以期为该成分开发利用提供参考依据。

1 材料

紫外-可见分光光度计（型号 UV-1800，日本岛津公司）；电子分析天平（型号 Sartorius BS224S，德国赛多利斯公司）；超声清洗器（型号 KQ5200DE，昆山市超声仪器有限公司）；磁力搅拌器（型号 90-2，常州越新仪器制造有限公司）。

氯化胆碱 [阿拉丁试剂（上海）有限公司，批号 B1920039]；1，4-丁二醇（批号 B1807141）、丙三醇（批号 170315）、1，3-丁二醇（批号 D1726006）、乙二醇（批号 20170425）（西陇科学股份有限公司）；硝酸铝（美国 Mackin 公司，批号 C10373927）；亚硝酸钠（批号 20140107）、氢氧化钠（批号 20121114）（国药集团化学试剂有限公司）。芦丁对照品（中国食品药品检定研究院，批号 100080-201409）。红豆杉叶购于宁波泰康红豆杉生物科技有限公司，经浙江省中医药研究院药用资源研究中心浦锦宝研究员鉴定为南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* 枝叶。超纯水为自制。

2 方法与结果

2.1 低共熔溶剂制备 按照 1：1：1 摩尔比精密称取氯化胆碱-（1，4-丁二醇）-水、氯化胆碱-丙三醇-水、氯化胆碱-乙二醇-水、氯化胆碱-（1，3-丁二醇）-水适量，置于烧杯中，在 85℃ 下磁力搅拌器充分搅拌至产生均匀剔透的液体为止，冷却至室温，即得。

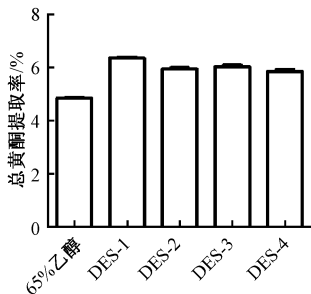
2.2 线性关系考察 参考文献 [8] 报道，精密称取芦丁对照品 5 mg，置于 25 mL 量瓶中，65% 乙醇定容至刻度，超声溶解，配制 0.2 mg/mL 母液，分别精密吸取 5、4、3、2、1、0 mL 至 10 mL 量瓶中，65% 乙醇定容至 5 mL，摇匀，加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL，摇匀，放置 6 min，加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL，摇匀，放置 6 min，加入 4% 氢氧化钠溶液 4 mL，65% 乙醇定容，摇匀，放置 15 min。采用紫外-可见分光光度计测定芦丁在 200~800 nm 波长处的吸光度，发现该成分在 508 nm 处有最大吸收。以芦丁质量浓度为横坐标（X），吸光度为纵坐标（A）进行回归，得到方程为 $A=11.958X+0.019$ ($R^2=0.9993$)，在 0.019~0.096 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.3 供试品溶液制备 取红豆杉叶末约 0.1 g，精密称定，加入一定体积不同体积分数（0、12.5%、25%、75%、100%）的低共熔溶剂水溶液，在一定温度下超声提取一段时间，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得供试品溶液，精密量取 0.2 mL，置于 10 mL 量瓶中，65% 乙醇定容 5 mL，摇

匀，加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL，摇匀，放置 6 min，加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL，摇匀，放置 6 min，加入 4% 氢氧化钠溶液 4 mL，再以 65% 乙醇定容，摇匀，放置 15 min，测定吸光度，计算总黄酮提取率，公式为提取率= $[(C \times V/0.2 \times N)/M] \times 100\%$ ，其中 C 为总黄酮质量浓度，V 为样品溶液体积，N 为稀释倍数（10 倍），M 为样品质量。

2.4 单因素试验

2.4.1 低共熔溶剂种类 考察氯化胆碱-（1，4-丁二醇）-水、氯化胆碱-丙三醇-水、氯化胆碱-乙二醇-水、氯化胆碱-（1，3-丁二醇）-水对总黄酮提取率的影响，结果见图 1。由此可知，4 种低共熔溶剂的提取率均高于 65% 乙醇提取，以氯化胆碱-乙二醇-水更明显，故选择其作为提取溶剂。



注：DES-1 为氯化胆碱-乙二醇-水，DES-2 为氯化胆碱-丙三醇-水，DES-3 为氯化胆碱-（1，4-丁二醇）-水，DES-4 为氯化胆碱-（1，3-丁二醇）-水。

图 1 低共熔溶剂种类对总黄酮提取率的影响

2.4.2 低共熔溶剂体积分数 考察 0、12.5%、25%、75%、100% 对总黄酮提取率的影响，结果见图 2。由此可知，在 75% 时总黄酮提取率最高，故选择其作为低共熔溶剂体积分数。

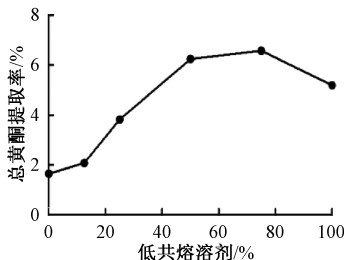


图 2 低共熔溶剂体积分数对总黄酮提取率的影响

2.4.3 液料比 考察 10：1、20：1、30：1、40：1、50：1 对总黄酮提取率的影响，结果见图 3。由此可知，总黄酮提取率随着液料比增加先显著升高，后略有降低，在 30：1 时最高，故选择其作为液料比。

2.4.4 提取时间 考察 30、40、50、60、70 min 对总黄酮提取率的影响，结果见图 4。由此可知，提取 60 min 时提取率最高，故选择其作为提取时间。

2.4.5 提取温度 考察 30、40、50、60、70℃ 对总黄酮提取率的影响，结果见图 5。由此可知，提取率随着提取温度增加先升后降，在 60℃ 时最高，故选择其作为提取温度。

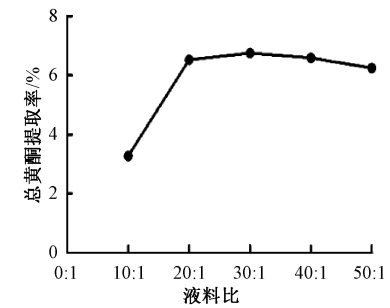


图 3 液料比对总黄酮提取率的影响

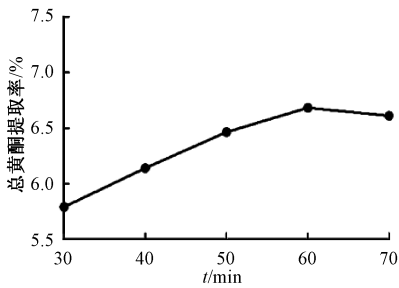


图 4 提取时间对总黄酮提取率的影响

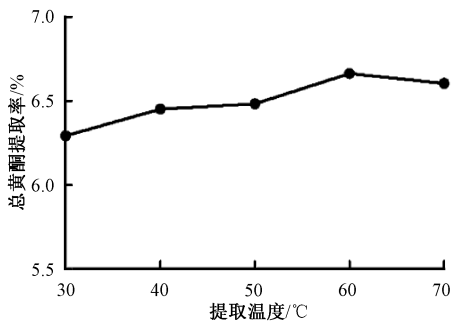


图 5 提取温度对总黄酮提取率的影响

2.5 响应面试验 依据单因素试验结果，选择对总黄酮提取率影响较大的低共熔溶剂体积分数（A）、液料比（B）、提取时间（C）作为影响因素，总黄酮提取率作为评价指标（Y），依据 Box-Behnken 设计原理进行 3 因素 3 水平试验，共 17 组，因素水平见表 1，结果见表 2。

表 1 因素水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 低共熔溶剂/%	50	75	100
B 液料比	20 : 1	30 : 1	40 : 1
C 提取时间/min	40	50	60

通过 Design Expert 8.0.6 软件进行多元回归拟合，得方程为 $Y = 65.45 - 1.80A - 1.26B + 0.96C + 0.35AB - 0.79AC - 0.64BC - 8.01A^2 - 1.83B^2 - 3.83C^2$ ，方差分析见表 3。由此可知，模型 $P < 0.01$ ，具有显著性差异；失拟项 $P > 0.05$ ，表明模型失拟度不显著，结果准确可靠；相关系数 R^2 为 0.980 8，表明可用该方程解释 98.08% 的数据；因素 A、B、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 对总黄酮提取率均有显著影响（ $P < 0.05$ ，

$P < 0.01$ ），影响程度依次为 $A > B > C$ 。

表 2 试验设计与结果

试验号	因素			Y 总黄酮提取率/%
	A 低共熔溶剂/%	B 液料比	C 提取时间/min	
1	50	30 : 1	60	5.655
2	75	20 : 1	60	6.356
3	50	20 : 1	50	5.871
4	50	40 : 1	50	5.589
5	75	40 : 1	60	5.935
6	75	30 : 1	50	6.500
7	100	40 : 1	50	5.320
8	100	30 : 1	40	5.224
9	100	20 : 1	50	5.462
10	75	30 : 1	50	6.721
11	75	30 : 1	50	6.721
12	50	30 : 1	40	5.447
13	75	20 : 1	40	5.894
14	75	30 : 1	50	6.721
15	75	40 : 1	40	5.731
16	100	30 : 1	60	5.117
17	75	30 : 1	50	6.721

表 3 方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	514.59	9	57.18	48.38	0.000 1
A	25.85	1	25.85	21.87	0.002 3
B	12.68	1	12.68	10.73	0.013 6
C	7.34	1	7.34	6.21	0.041 5
AB	0.49	1	0.49	0.42	0.539 4
AC	2.48	1	2.48	2.10	0.190 4
BC	1.66	1	1.66	1.41	0.274 2
A^2	316.83	1	316.83	268.12	0.000 1
B^2	26.13	1	26.13	22.11	0.002 2
C^2	84.86	1	84.86	71.81	0.000 1
残差	8.27	7	1.18	—	—
失拟项	4.38	3	1.46	1.50	0.343 2
纯误差	3.89	4	0.97	—	—
总计	522.86	16	—	—	—

响应面分析^[9]见图 6。由此可知，随着液料比、低共熔溶剂体积分数增加，总黄酮提取率先升后降，低共熔溶剂体积分数的变化曲面比液料比陡峭，等高线沿前者方向的变化相对密集，表明它对响应值峰值的影响更大；低共熔溶剂体积分数的变化曲面比提取时间陡峭，表明前者对响应值峰值的影响大于后者；液料比、提取时间的变化曲面坡度相差不大，两者交互作用不明显。

2.6 验证试验 根据 Design Expert 8.0.6 软件，得到最优工艺为低共熔溶剂体积分数 72.13%，液料比 27.22 : 1，提取时间 51.37 min，总黄酮提取率为 6.711%，为了后续实验方便操作，将其修正为低共熔溶剂体积分数 72%，液料比 27 : 1，提取时间 51 min。在此优化工艺下进行 3 批验证试验，测得总黄酮平均提取率为 6.703%，与预测值 6.711% 接近，表明该工艺稳定可靠。

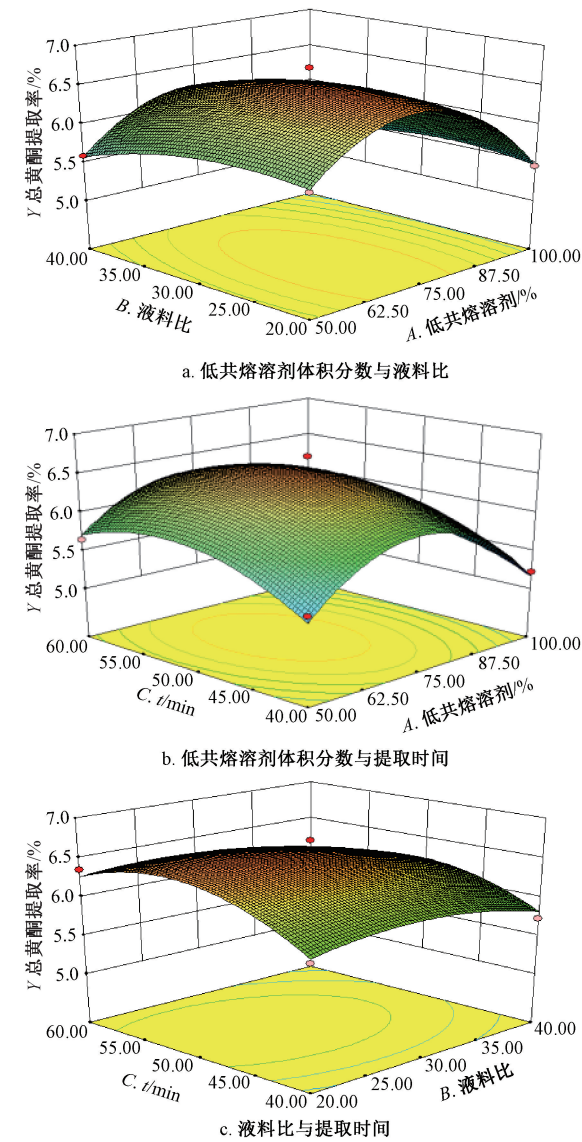


图 6 各因素响应面图

3 讨论

文献 [10] 报道, 提取红豆杉总黄酮最佳提取溶剂为 65% 乙醇; 本实验发现, 与 65% 乙醇提取比较, 4 种低共熔溶剂的提取率分别高出 23.17%、16.34%、19.07%、17.76%, 表明低共熔溶剂可显著提高总黄酮提取率, 其原因可能是它对植物细胞壁有较强的破坏作用^[11], 并且具有一定黏度, 有利于红豆杉叶粉末悬浮分散在溶剂中, 增大接触面积, 从而更有利于黄酮流出。结果表明, 低共熔溶剂种类不同, 提取率升高程度有所差异, 以丙二醇最明显, 推测可能是其本身溶解性、黏性、导电性等物理性质的差异所致。

另外, 低共熔溶剂体积分数对总黄酮提取率也有显著影响, 其较高时溶液比较黏稠, 不利于进入红豆杉叶基质内部, 导致提取率下降; 当加入一定量水后, 可显著降低黏度, 使其更好地渗入到基质内部, 破坏细胞壁, 促进黄酮流出, 但含水量过高时会破坏醇羟基与氯化胆碱之间的氢键, 减少低共熔溶剂与黄酮之间的相互作用^[12], 导致提取率下降。

综上所述, 本实验在单因素试验基础上采用响应面法优化超声辅助低共熔溶剂提取红豆杉叶总黄酮工艺, 发现该方法优于传统有机溶剂提取工艺, 可为该成分开发利用提供参考。

参考文献:

[1] 赵晶晶, 刘宝友, 魏福祥. 低共熔离子液体的性质及应用研究进展[J]. 河北工业科技, 2012, 29(3): 184-189.

[2] 刘丹宁, 黄洁瑶, 杨璐嘉, 等. 超声波辅助低共熔溶剂提取枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷[J]. 中药材, 2020, 43(1): 155-160.

[3] 李 梅, 卢秋榕, 韦迎春, 等. 微波辅助低共熔溶剂提取薏苡叶总黄酮的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(5): 49-53.

[4] Cao J, Yang M, Cao F, et al. Well-designed hydrophobic deep eutectic solvents as green and efficient media for the extraction of artemisinin from *Artemisia annua* leaves [J]. *Acs Sustain Chem Eng*, 2017, 5(4): 3270-3278.

[5] 薛 平, 汤 彬, 姚 晓, 等. 南方红豆杉枝叶化学成分研究[J]. 中成药, 2013, 35(5): 1017-1019.

[6] Meng A P, Li J, Pu S B. Chemical constituents of leaves of *Taxus chinensis*[J]. *Chem Nat Comp*, 2018, 54(5): 841-845.

[7] 王楷婷, 李春英, 倪玉娇, 等. 红豆杉的化学成分、药理作用和临床应用[J]. 黑龙江医药, 2017, 30(6): 1196-1199.

[8] 李石清, 张春椿, 年慧慧, 等. 响应面分析南方红豆杉黄酮微波提取工艺研究[J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(3): 6-9; 19.

[9] 熊苏慧, 夏伯候, 雷思敏, 等. 基于低共熔溶剂提取千斤拔多糖[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(9): 1003-1008.

[10] 王俊青, 汪 全, 焦阳阳, 等. 响应面法优化南方红豆杉叶总黄酮提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(2): 86-90.

[11] 阮怿航, 吴亮宇, 鲁 静, 等. 低共熔溶液提取铁观音茶多酚工艺的响应面法优化[J]. 福建农业学报, 2020, 35(2): 217-225.

[12] 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: 249-257.