

响应面法优化离子液体提取银杏叶中总黄酮的工艺研究

冯 靖, 彭效明*, 李翠清, 王 腾, 居瑞军, 邱 晓, 汤晨洋
(北京石油化工学院, 燃料清洁化及高效催化减排技术北京市重点实验室,
化学化工国家级示范中心, 北京 102617)

摘要:探究离子液体与银杏叶中黄酮类化合物的作用关系, 筛选可以显著提高银杏叶中黄酮类化合物提取量的离子液体, 并利用该离子液体与醇提法、微波-超声联合的新型提取方法提取银杏叶中总黄酮, 探究最佳实验条件, 并用响应面的方法优化实验条件。得到的最佳实验条件为: 离子液体为 0.75 mol/L [Bmim]Glu, 超声功率为 69 W, 超声时间为 6.5 min, 微波时间 2 min, 最佳提取量为 41.34 mg/g, 响应面与实际值相差 0.33%。最佳实验条件下, 提取量达到传统方法提取量的 4 倍, 提取时间缩短为传统提取方法的 1/10, 该方法操作方便、快捷、可靠。

关键词: [Bmim]Glu; 微波; 超声; 银杏叶; 总黄酮

中图分类号: TB46

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2019)12-0115-06

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2019.12.025

Optimization of extraction process of total flavonoids from Ginkgo biloba leaves with ionic liquid by response surface methodology

FENG Jing, PENG Xiao-ming*, LI Cui-qing, WANG Teng, JU Rui-jun,
QIU Xiao, TANG Chen-yang

(National Chemical and Chemical Demonstration Center, Beijing Key Laboratory of Fuels Cleaning and Advanced Catalytic Emission Reduction Technology, Beijing Institute of Petrochemical Technology, Beijing 102617, China)

Abstract: The action relationship between ionic liquid and the flavonoids in Ginkgo biloba leaves is explored to screen an ionic liquid that can significantly increase the extraction amount of flavonoids from Ginkgo biloba leaves. This ionic liquid combined with alcohol extraction and microwave-ultrasonic extraction together is used in extraction of flavonoids from Ginkgo biloba leaves. Response conditions are used to optimize the experimental conditions. The optimal experimental conditions obtained are as follows: the content of [Bmim]Glu ionic liquid is 0.75 mol·L⁻¹, ultrasonic power is 69 W, ultrasonic acts for 6.5 min and microwave acts for 2 min. The optimal extraction amount is 41.338 4 mg·g⁻¹, and the response surface is 0.33% different from the actual value. Under the optimal extraction conditions, the extraction amount by this method is 4 times that by the traditional method, and the needed extraction time is shortened to one tenth that the traditional extraction method needs. The operation is convenient, fast and reliable.

Key words: [Bmim]Glu; microwave; ultrasound; Ginkgo biloba leaves; total flavonoids

银杏叶在我国拥有悠久的药用历史, 药用价值主要有抗癌、抗炎以及对心脑血管的保护作用等, 近年来银杏叶药用价值倍受关注。

离子液体是一种新型溶剂, 相比传统有机溶剂有很多优点, 有望替代传统的有机溶剂, 并且在提取天然产物方面有良好的分离效率^[1-3]。

传统方法提取银杏黄酮效率低使其药用价值受到限制。因此, 笔者利用离子液体辅助提取银杏叶黄酮, 并用微波-超声联合提取的方法代替传统提取方法, 提取量达传统方法 4 倍, 提取时间缩短至传统提取方法 1/10, 为银杏叶黄酮广泛应用提供了强有力的支持^[4]。

1 实验仪器与试剂

1.1 实验仪器

实验所用主要仪器如表 1 所示。

表 1 实验仪器

仪器	型号	厂家
紫外-可见分光光度计	UV-2600 型	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
低速离心机	DT5-4B	北京时代北利离心机有限公司
超声波细胞粉碎机	JY-IIDN	宁波新芝生物科技股份有限公司
微波催化合成萃取仪	XH-100A	北京祥鹤科技发展技术有限公司

1.2 实验试剂

实验所用主要试剂如表 2 所示。

收稿日期: 2019-02-20; 修回日期: 2019-10-08

基金项目: 国家青年科学基金项目(21406015); 北京市教委科研计划项目(KM201510017006); 北京石油化工学院校内学科平台建设项目(2018XK002); 北京市大兴区科技发展计划项目(KT201806402); 北京市教委科技计划一般项目(KM201810017002); 国家自然科学基金项目(81703453); 北京市优秀人才培养自主项目(201600002012G058)

作者简介: 冯靖(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物分离及中药学, 1030482679@qq.com; 彭效明(1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为天然产物分离及中药学, 通讯联系人, pengxiaoming@bipt.edu.cn。

表 2 实验试剂

原料与试剂	厂家	纯度
银杏叶	胜毫生物科技有限公司	饮片级
芦丁标准品	北京世纪奥科生物技术 有限公司	≥98%
1-乙基-3-甲基咪唑啉谷氨酸盐	上海成捷化学有限公司	99%
1-丙基-3-甲基咪唑啉谷氨酸盐	上海成捷化学有限公司	99%
1-丁基-3-甲基咪唑啉谷氨酸盐	上海成捷化学有限公司	99%
1-戊基-3-甲基咪唑啉谷氨酸盐	上海成捷化学有限公司	99%
1-己基-3-甲基咪唑啉谷氨酸盐	上海成捷化学有限公司	99%

2 实验方法

2.1 总黄酮的提取方法和含量测量

2.1.1 总黄酮的提取方法

银杏叶打磨成粉,过 60 目筛,密封避光保存。取 0.5 g 银杏叶粉,加入 10 mL 70%乙醇与离子液体混合溶液中,使液料比为 20:1(mL/g),放入微波催化合成萃取仪中,提取参数为:功率为 100 W,时间为 2.0 min。完成微波提取后,放入超声波细胞粉碎仪中进行超声波提取,设置提取参数:超声间隙和超声时间均为 2 s,功率为 66 W,时间为 6 min。完成后将溶液放入低速离心机,取上清液备用,沉淀物进行二次提取,将 2 次上清液混合,记录提取液体积^[5-7]。

2.1.2 总黄酮的含量测量

芦丁标准曲线溶液的配制:取芦丁标准品 5.0 mg,以去离子水定容至 50 mL,配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 标准溶液。分别取标准溶液 0.0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.4、1.6 mL 到 10 mL 容量瓶中,加入 70%乙醇使溶液体积为 2 mL,加入 5% NaNO₂ 0.3 mL,静置 6 min,加入 10% Al(NO₃)₃ 0.3 mL,静置 6 min,加入 10% NaOH 3.0 mL,静置 15 min。配制芦丁质量浓度为 0、0.001 8、0.003 6、0.007 1、0.010 7、0.014 3、0.017 9、0.025、0.022 6 mg/mL 的标准品溶液^[11]。于 510 nm 处测量吸光度,记录吸光度值,绘制标准曲线^[8-11]。

黄酮含量的测量:取提取液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,按标准曲线方法进行检测,吸光度带入标准曲线中,计算黄酮的质量分数:

$$\text{黄酮类化合物含量 (mg/g)} = \left\{ \left[\frac{A - 0.00396}{12.2567} \right] \times B \right\} \times V / m \quad (1)$$

其中:A 为吸光度;B 为稀释倍数;V 为提取液总体积^[12]。

2.2 离子液体的筛选

2.2.1 离子液体阳离子碳链长度的选择

将不同碳链长度的谷氨酸类离子液体以 0.75 mol/L 放入 70%乙醇水溶液中^[12],配制离子液体提取液,按实验所述方法进行提取,测得提取量并记录。

2.2.2 离子液体浓度的选择

实验参数:液料比为 20:1(mL/g),微波功率为 100 W,超声功率为 67.5 W,超声时间为 6 min,微波时间为 2 min,将筛选出的离子液体分别按照 0.25、0.50、0.75、1.0、1.25 mol/L 加入 70%乙醇水溶液中,配制不同浓度提取液。按照提取方法探究浓度对提取量的影响^[13]。

2.3 单因素实验

2.3.1 超声功率的选择

实验参数:液料比为 20:1(mL/g),浓度为 0.75 mol/L,微波功率为 100 W,超声时间为 6 min,微波时间为 2 min,超声功率分别为 52.5、60、67.5、75、82.5 W。按照提取方法进行提取,探究超声功率对提取量的影响。

2.3.2 超声时间的选择

实验参数:液料比为 20:1(mL/g),离子液体浓度为 0.75 mol/L,微波功率为 100 W,微波时间为 2 min,超声功率为 67.5 W,超声时间分别为 2、4、6、8、10 min。按照提取方法进行提取,探究超声时间对提取量的影响。

2.3.3 微波时间的选择

实验参数:液料比为 20:1(mL/g),筛选出的离子液体浓度 0.75 mol/L,微波功率为 100 W,超声功率为 67.5 W,超声时间为 4 min,微波时间分别为 0、1、2、3、4 min。按照提取方法进行提取,探究微波时间对提取量的影响。

2.4 响应面实验

以超声功率(X_1)、超声时间(X_2)、微波时间(X_3)为影响因素,黄酮类化合物为响应值,对影响因素进行响应面优化实验,实验因素水平表如表 3 所示。

表 3 实验因素水平表

变量	代码	水平		
		-1	0	1
超声功率/W	X_1	60	67.5	75
超声时间/min	X_2	4	6	8
微波时间/min	X_3	1	2	3

利用 design expert 8.0 对所得数据进行分析拟合,得到黄酮类化合物对自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 的二次多

项回归方程,对黄酮类化合物进行3因素3水平的响应面实验。

2.5 提取方法对银杏叶微观结构的影响

为了进一步探究提取机理,利用电镜探究银杏叶微观结构。将银杏叶片、经微波与离子液体处理后的银杏叶粉末、经超声与离子液体处理后的银杏叶粉末、经微波-超声联合提取与离子液体处理后的银杏叶粉末分别进行干燥。对银杏叶进行喷金,调整样品距离、衬度和最佳倍数后,对样品进行照相。

2.6 黄酮类化合物的纯化及结构的鉴定

利用非极性大孔树脂HPD-100对非极性黄酮进行吸附,采用紫外法测量含量,采取静态吸附和动态吸附2种方法,得出HPD-100纯化最佳工艺。黄酮类化合物纯度由25%提升到74%。

将纯化后的产品进行冷冻干燥,对粉末进行红外扫描。

3 实验结果与分析

3.1 标准曲线的绘制

芦丁的标准曲线如图1所示。

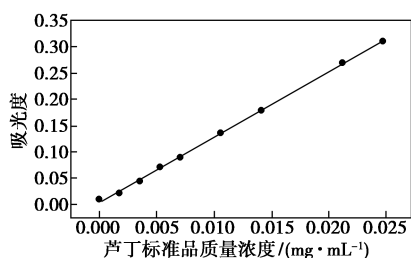


图1 芦丁标准曲线

得标准曲线方程为: $y = 12.2567x + 0.00396$, $R^2 = 0.99904$,符合药典要求。

3.2 离子液体的筛选

3.2.1 离子液体阳离子碳链长度的选择

阳离子碳链长度对黄酮类化合物提取量的影响如图2所示。

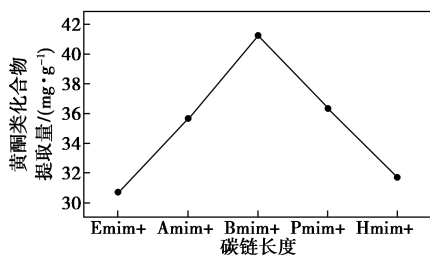


图2 阳离子碳链长度对黄酮类化合物提取量的影响

由图2可以看出,烷基链由乙基增大到丁基,提

取量逐渐增大。黄酮类化合物属于非极性物质,离子液体碳链增长,离子液体极性减弱,根据相似相溶原理,提取量随着碳链的增长依次上升。当碳链长度继续增长,提取量不增反降。这是由于烷基链过长,位阻效应减弱了离子液体咪唑环与黄酮之间的吸引力,除此之外,碳链长度增加会使离子液体黏度大幅度上升,过高的黏度使银杏叶粉不能在提取液中很好地分散,提取量降低。最终筛选出[Bmim]Glu为提取黄酮类化合物的离子液体。

3.2.2 离子液体浓度的选择

离子液体浓度对提取量的影响如图3所示。

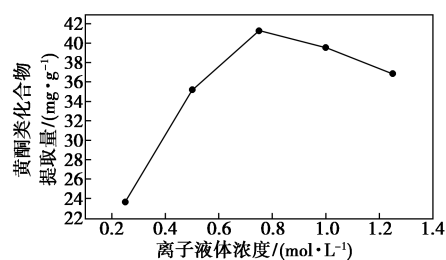


图3 离子液体浓度对黄酮类化合物提取量的影响

由图3可以看出,当离子液体浓度为0.75 mol/L时,提取率最高,达41.3384 mg/g。浓度过低,提取不完全;浓度过高,提取液的黏度大幅增加,银杏叶粉末在提取液中分散不均匀,黄酮类化合物不能充分提取,将最佳浓度定为0.75 mol/L。

3.3 单因素实验

3.3.1 超声功率的选择

超声功率对黄酮类化合物提取量的影响如图4所示。

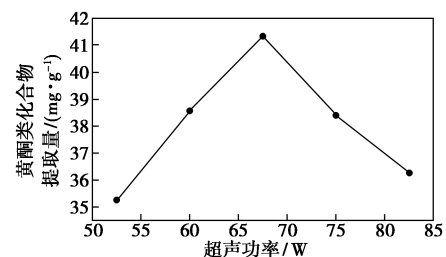


图4 超声功率对黄酮类化合物提取量的影响

由图4可以看出,超声功率为67.5 W时,提取效率最高,达41.3384 mg/g。超声功率过小,提取不完全;超声功率过大,过强的空化作用会破坏黄酮类化合物结构,使提取量降低,因此,最佳的超声功率定为67.5 W^[14]。

3.3.2 超声时间的选择

超声时间对黄酮类化合物提取量的影响如图5

所示。

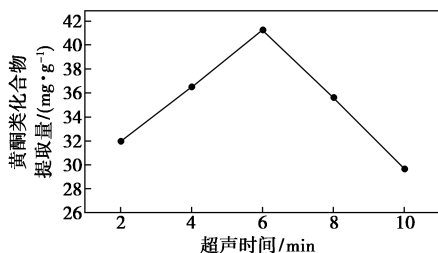


图 5 超声时间对黄酮类化合物提取量的影响

由图 5 可以看出,超声时间为 6 min 时,提取效率最高,达到 41.338 4 mg/g。当超声时间小于 6 min 时,提取不完全;超声时间大于 6 min 时,过强的空化作用破坏黄酮结构,导致提取量下降^[21]。因此,将最佳的超声时间定为 6 min。

3.3.3 微波时间的选择

微波时间对黄酮类化合物提取量的影响如图 6 所示。

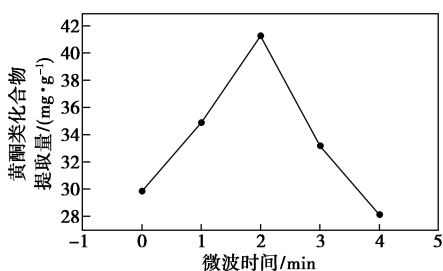


图 6 微波时间对黄酮类化合物提取量的影响

由图 6 可以看出,当微波时间为 2 min 时,提取效率最高,达 41.338 4 mg/g。当微波时间小于 2 min 时,黄酮类化合物提取不完全;当微波时间大于 2 min 时,微波加热温度上升速度过快,提取液温度上升过高,使黄酮类化合物的结构被破坏。因此,最佳微波时间确定为 2 min。

3.4 响应面实验

以超声功率(X_1)、超声时间(X_2)、微波时间(X_3)为影响因素,黄酮类化合物为响应值,对影响因素进行响应面优化实验,实验因素水平结果如表 4 所示。利用 design expert 8.0 对所得数据进行分析拟合,得到黄酮对自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 的二次多项回归方程为:

$$Y = 49.88540 - 0.72 \times A + 0.68 \times B - 1.22 \times C - 0.34A \times B - 0.49 \times A \times C + 0.88 \times B \times C - 0.74A^2 - 3.16 \times B^2 - 3.51 \times C^2$$

对黄酮类化合物进行 3 因素 3 水平的 17 组响应面实验,结果如表 4 所示。

表 4 黄酮类化合物响应面设计数据

Run	超声功率 (A)/W	超声时间 (B)/min	微波时间 (C)/min	黄酮类化合物提取量/(mg·g ⁻¹)
1	0	-1	-1	31.5436
2	0	-1	1	31.2258
3	0	0	0	41.3386
4	0	0	0	41.3386
5	1	0	1	28.2214
6	-1	1	0	27.8386
7	-1	0	1	34.2236
8	-1	0	-1	27.8317
9	0	0	0	41.3386
10	0	0	0	41.3386
11	1	1	0	31.3384
12	0	1	1	28.3386
13	1	-1	0	28.2652
14	-1	-1	0	29.5276
15	0	1	-1	40.2253
16	0	0	0	41.3386
17	1	0	-1	32.0254

响应面所得到的回归方程显著性参数如表 5 所示。

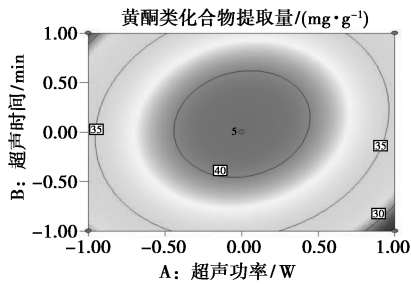
表 5 回归方程显著性参数

方差来源	平方和 SS	自由度 DF	均方	F 值	P 值	R ²
模型 Model	487.03	9	54.11	11.82	0.0018	0.9383
超声功率(A)	0.037	1	0.037	0.008082	0.9309	
超声时间(B)	4.77	1	4.77	1.04	0.3413	
微波时间(C)	11.62	1	11.62	2.54	0.1551	
AB	8.30	1	8.30	1.81	0.2201	
AC	26.13	1	26.13	5.71	0.0483	
BC	33.46	1	33.46	7.31	0.0305	
A ²	209.19	1	209.19	45.69	0.0003	
B ²	96.91	1	96.91	21.17	0.0025	
C ²	57.88	1	57.88	12.64	0.0093	
残差	32.05	7	4.58			
失拟项	32.05	3	10.68			
误差	0.000	4	0.000			
总和	519.08	16				

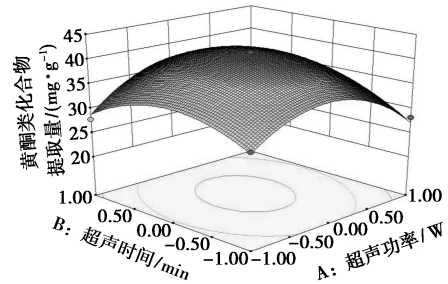
由表 5 中可以看出,模型的 P 值为 0.001 8,远小于 0.01,回归方程相关系数为 0.938 3,证明该模型的显著性为显著,拟合模型较好,该实验的设计合理,回归方程可以较好地反映因素对于提取量的影响,最佳工艺条件合理。各因素影响顺序为:微波时间>超声时间>超声功率,交互项影响顺序为:微波时间与超声时间>超声功率与微波时间>超声功率

与超声时间。二次项影响顺序为:超声功率>超声时间>微波时间。

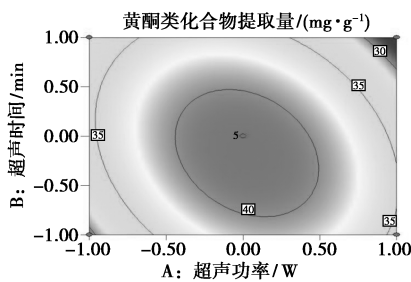
各个因素对提取效率作用的等高线图和 3D 图如图 7 所示。



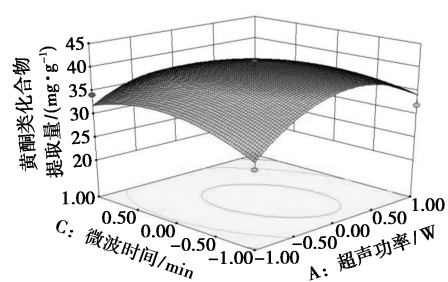
(a) 超声功率与超声时间交互作用等高线图



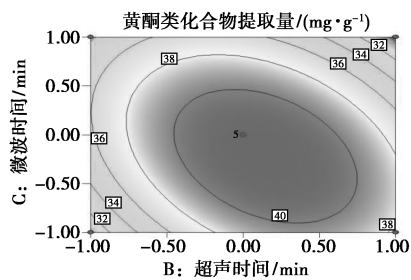
(b) 超声功率与超声时间交互作用 3D 图



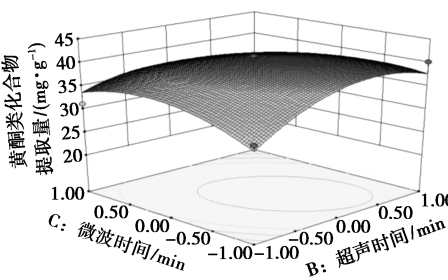
(c) 超声功率与微波时间交互作用等高线图



(d) 超声功率与微波时间交互作用 3D 图



(e) 超声时间与微波时间交互作用等高线图



(f) 超声时间与微波时间交互作用 3D 图

图 7 黄酮类化合物响应面的等高线图与 3D 图

由图 7 可以看出,微波时间与超声时间的交互作用最明显,而超声功率与超声时间交互作用最弱。同时,由图 7 中 3D 图可以看出,最高点对应的各个因素值即为最佳实验条件,对应的纵坐标即为最高提取量。

根据响应面分析得到的最佳实验条件为:超声功率为 68.453 W,超声时间为 6.544 min,微波时间为 1.74 min。为方便实验操作,将最佳条件设定为:超声功率为 69 W,超声时间为 6.5 min,微波时间为 2 min。利用最佳工艺条件提取黄酮,提取量为 41.338 4 mg/g,理论提取量为 41.473 1 mg/g,相对误差为 0.33%^[15-18]。

3.5 提取方法对银杏叶微观结构的影响

各样品扫描结果如图 8 所示。

由图 8(a) 可以看出,银杏叶表面呈规则椭圆形凸起且较为光滑。由图 8(b)、图 8(c) 可以看出,表面结构虽然被破坏,但均出现聚集的现象,使黄酮类

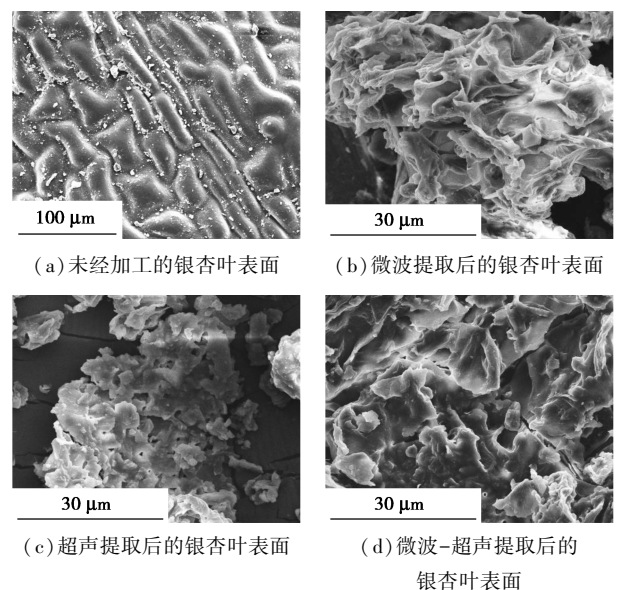


图 8 提取物电镜图

化合物不能被完全提取。由图 8(d) 可以看出,间隙

较密集,破坏程度较高,破裂叶片结构较均匀,未出现块状银杏叶结构,有效物质释放,提取较完全。

3.6 黄酮类化合物的纯化及结构的鉴定

纯化后黄酮类化合物红外扫描图谱如图 9 所示。

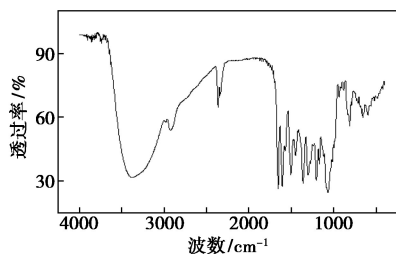


图 9 提取物的红外光谱图

由图 9 可以看出,芳香环 C—H 伸缩振动峰为 $3\ 364\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 657\ \text{cm}^{-1}$ 为羰基吸收峰,羰基峰红移是由于羰基与芳香基出现共轭而引起。 $1\ 607\ \text{cm}^{-1}$ 为苯环骨架的伸缩振动峰, $1\ 273\ \text{cm}^{-1}$ 为芳香醚的特征吸收峰。谱图结构与黄酮结构相同,因此判断提取物为黄酮类化合物。

4 结论

探究了离子液体阳离子、阴离子种类和阳离子碳链长度对银杏叶黄酮提取量的影响,采用 [Bmim] Glu 辅助提取方法,结合醇提法与微波-超声联合提取,利用响应面法优化实验条件,得出最佳提取条件为:超声功率为 69 W,超声时间为 6.5 min,微波时间为 2 min,离子液体浓度为 0.75 mol/L,此时,提取量提高到 41.338 4 mg/g,该方法对银杏叶黄酮的开发利用具有深远的研究意义。

参考文献

[1] Wang Shuya, Yang Ziwei, Peng Na, *et al.* Optimization of ionic liquids-based microwave-assisted hydrolysis of puerarin and daidzein derivatives from Radix Puerariae Lobatae extract[J]. Food Chemistry, 2018, 256: 149–155.

[2] Wei Zuofu, Zu Yuangang, Fu Yujie, *et al.* Ionic liquids-based microwave-assisted extraction of active components from pigeon pea leaves for quantitative analysis [J]. Separation and Purification Technology, 2013, 82: 75–81.

[3] Liu Ye, Yang Lei, Zu Yuangang, *et al.* Development of an ionic liquid-based microwave-assisted method for simultaneous extraction and distillation for determination of proanthocyanidins and essential oil in Cortex cinnamomi [J]. Food Chemistry, 2012, 135: 2514–2521.

[4] Collin Rudolf Nobbs Gerenui, Periaswamy Sivagnanam Saravana, Byung-Soo Chun. Recovery of carrageenan from Solomon Islands red

seaweed using ionic liquid-assisted subcritical water extraction[J]. Separation and Purification Technology, 2018, 196: 309–317.

[5] Chen Fengli, Zhang Qiang, Mo Kailin, *et al.* Optimization of ionic liquid-based homogenate extraction of orientin and vitexin from the flowers of Trollius chinensis and its application on a pilot scale[J]. Separation and Purification Technology, 2017, 175: 147–157.

[6] Wang Tong, Gu Chengbo, Wang Suixin, *et al.* Simultaneous extraction, transformation and purification of psoralen from fig leaves using pH-dependent ionic liquid solvent based aqueous two-phase system[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 172: 827–836.

[7] Ma Chunhui, Wang Shuya, Yang Lei, *et al.* Ionic liquid-aqueous solution ultrasonic-assisted extraction of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from camptotheca acuminata samara[J]. Food Chemistry, 2012, 58: 59–64.

[8] Muhammad Irfan, Tausif Ahmad, M Muhammad Moniruzzaman, *et al.* Ionic liquid mediated biosynthesis of gold nanoparticles using elaeis guineensis (oil palm) leaves extract [J]. Procedia Engineering, 2016, 148: 568–572.

[9] Liu Tingting, Sui Xiaoyu, Li Li, *et al.* Application of ionic liquids based enzyme-assisted extraction of chlorogenic acid from Eucommia ulmoides leaves [J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 903: 91–99.

[10] Miral R Thakker, Jigisha K Parikh, Meghal A Desai. Synergism between ionic liquid and ultrasound for greener extraction of geraniol: Optimization using different statistical tools, comparison and prediction [J]. Chemical Engineering Research and Design, 2018, 134: 162–171.

[11] Liu Zaizhi, Gu Huiyan, Yang Lei. A novel approach for the simultaneous extraction of dihydroquercetin and arabinogalactan from Larix gmelinii by homogenate-ultrasound synergistic technique using the ionic liquid [J]. Journal of Molecular Liquids, 2018, 261: 41–49.

[12] Tri Vo Dinh, Periaswamy Sivagnanam Saravana, Hee Chul Woo, *et al.* Ionic liquid-assisted subcritical water enhances the extraction of phenolics from brown seaweed and its antioxidant activity [J]. Separation and Purification Technology, 2016, 1014: 45–55.

[13] Liu Zaizhi, Qiao Lu, Gu Huiyan, *et al.* Development of Brønsted acidic ionic liquid based microwave assisted method for simultaneous extraction of pectin and naringin from pomelo peels [J]. Separation and Purification Technology, 2017, 172: 326–337.

[14] Liu Zaizhi, Qiao Lu, Gu Huiyan, *et al.* Development of Brønsted acidic ionic liquid based microwave assisted method for simultaneous extraction of pectin and naringin from pomelo peels [J]. Separation and Purification Technology, 2017, 172: 326–337.

[15] 杜若源, 谢晶, 王婷, 等. 超声波辅助提取银杏叶中总黄酮的工艺优化 [J]. 食品与机械, 2015, (1): 167–170.

[16] Chen Fengli, Zhang Qiang, Fei Shimin, *et al.* Optimization of ultrasonic circulating extraction of samara oil from Acer saccharum using combination of Plackett-Burman design and Box-Behnken design [J]. 2017, 35: 161–175.

[17] 石吉勇, 邹小波, 张德涛. 不同颜色银杏叶总黄酮含量分布高光谱图像检测 [J]. 农业机械学报, 2014, 45(11): 242–245.

[18] 王延峰, 李延清, 郝永红, 等. 超声法提取银杏叶黄酮的研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(8): 166–167. ■