

低共熔溶剂提取槲树叶中黄酮类物质的研究

沈豪玲¹, 郭晨思¹, 高翔宇¹, 陈俊英^{1,3*}, 韩秀丽^{1,3}, 常春^{1,3}, 陈志勇²

(1. 郑州大学化工学院, 河南 郑州 450000; 2. 河南省生物基化学品绿色制造重点实验室, 河南 濮阳 457000; 3. 河南省杰出外籍科学家工作室, 河南 郑州 450000)

摘要:研究了氯化胆碱-乙酸组成的低共熔溶剂在提取槲树叶中黄酮类物质的应用。考察了氯化胆碱-乙酸体系的摩尔比、含水质量分数、提取温度、提取时间、液固比对黄酮类物质芦丁提取量的影响;在单因素的基础上进行了响应面分析。得到最佳的实验条件: $n(\text{氯化胆碱}):n(\text{乙酸})=1:3$ 、含水质量分数为 30%、提取温度为 61℃、液固比为 51 mL/g、提取时间为 85 min, 此时, 芦丁平均提取量为 58.79 mg/g。

关键词:低共熔溶剂; 溶剂萃取; 芦丁; 响应面

中图分类号:TQ41; TK6

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2021)12-0160-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2021.12.032

Study on extraction of flavonoids from quercus leaves based on deep eutectic solvent

SHEN Hao-ling¹, GUO Chen-si¹, GAO Xiang-yu¹, CHEN Jun-ying^{1,3}, HAN Xiu-li^{1,3}, CHANG Chun^{1,3}, CHEN Zhi-yong²*

(1. School of Chemical Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China;

2. Henan Provincial Key Laboratory for Green Manufacture of Biobased Chemicals, Puyang 457000, China;

3. Henan Province Outstanding Foreign Scientists Workroom, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: The application of choline chloride-acetic acid eutectic solvent in the extraction of flavonoids from quercus leaves is studied. The effects of the composition ratio of choline chloride-acetic acid system, water content, extraction temperature, extraction time and liquid-solid ratio on the extraction amount of rutin are evaluated. Response surface analysis is carried out on the basis of single factor. The optimum conditions are determined as follows: the molar ratio of choline chloride to acetic acid is 1:3, water content is 30% (W/W), extraction temperature is at 61℃, the liquid-solid ratio is 51 mL·g⁻¹, and extraction lasts for 85 min. Under the optimal conditions, the average extraction amount of rutin reaches 58.79 mg·g⁻¹.

Key words: deep eutectic solvent; solvent extraction; rutin; response surface methodology

槲树主要分布在我国河南伏牛山、太行山等地。槲叶具有独特的香味和防腐功能,可作为一种季节性的绿色食品包装材料^[1]。研究表明槲叶中含有丰富的类黄酮、绿原酸、鞣质等活性物质^[2-5],对槲叶进行有效成分的提取,可以实现废弃资源的有效利用,提高槲叶的经济价值。

目前黄酮类物质传统上使用有机溶剂进行提取^[6-8],但有机溶剂大多有毒、易燃,且不能保证最终产品在溶剂痕量方面的安全性。为了解决上述问题,用低共熔溶剂(Deep eutectic solvent, DES)作提取溶剂。DES 具有较低的蒸汽压、热稳定性、生物降解性和较低的毒性^[9-10],具有与研究广泛的新型溶剂-离子液体相似的物理化学性质,但更加便宜和环保^[11],因此,DES 作为新一代绿色溶剂在萃取

分离方面应用广泛^[12-18]。

笔者利用 DES 提取槲树叶中的黄酮类物质芦丁。首先筛选出 DES 的最优体系,并对其摩尔比、含水质量分数、提取温度、提取时间、液固比进行单因素分析。然后,利用 D Box-Behnken 设计实验对提取工艺进行优化,考察了提取温度、提取时间、液固比之间的交互影响,确定最佳实验条件,以实现槲树叶中黄酮类物质的有效快速提取,促进槲树叶的资源化利用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

槲树叶来自河南省汝州山区,清洗后在室外将槲叶晾晒,晒干后在烘箱中 60℃ 烘至槲叶的质量不

收稿日期:2021-01-27;修回日期:2021-09-28

基金项目:生物质资源加工与高效利用杰出外籍科学家工作室项目资助(GZS2018004)

作者简介:沈豪玲(1995-),女,硕士研究生,研究方向为生物质研究,shl18595836034@163.com;陈俊英(1972-),女,博士,副教授,研究生导师,研究方向为生物质资源化研究,通讯联系人,chenjy@zzu.edu.cn。

再发生变化,用粉碎机粉碎,过 40 目筛,保存;芦丁标准品(纯度 98%),罗恩试剂有限公司生产;无水乙醇、氯化胆碱、苹果酸、乙酸、柠檬酸、丙三醇、乙二醇、尿素、亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝,均为分析纯。

TU-1810 紫外-可见光分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司生产;AS3120A 超声仪,天津奥特赛恩斯仪器有限公司生产;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,上海力辰邦西仪器科技有限公司生产;高速离心机,河南捷隆科技有限公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 芦丁的提取

采用加热法制备 DES。将氢键供体与氢键受体按照 1:1 的摩尔比混合,在 80℃ 的水浴锅中搅拌,直至形成透明均一的液体。取槲树叶粉末,按一定的液固比加入 DES。水浴加热搅拌反应一定时间,取出。在 8 000 r/min 的转速下离心 10 min,弃去槲树叶残渣,收集上清液,即得芦丁提取液。

1.2.2 DES 体系的优化

采用氯化胆碱作为氢键受体,氢键供体则按酸基、醇基、胺基分为 3 类。酸基 DES 体系选择了氯化胆碱-苹果酸、氯化胆碱-乙酸和氯化胆碱-柠檬酸;醇基 DES 体系选择了氯化胆碱-乙二醇、氯化胆碱-丙三醇;胺基 DES 体系选择了氯化胆碱-尿素。

实验条件固定为:氢键供体和氢键受体的摩尔比为 1:1、含水质量分数为 20%、反应温度为 50℃、反应时间为 60 min、液固比为 20:1(mL/g)。根据芦丁的提取量,筛选最优的 DES 体系。

1.2.3 单因素试验

氢键受体和氢键供体的摩尔比设定为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5,根据芦丁提取量的变化情况,确定氢键受体和氢键供体的最优配比。含水质量分数从 0 增加到 50%。通过分析芦丁提取量的变化确定最佳含水质量分数。

在 DES 的最优组成体系、组成摩尔比及含水质量分数确定的基础上,考察了提取温度、液固比、提取时间对芦丁提取量的影响,结果如表 1 所示。

表 1 单因素试验

序号	提取温度/℃	液固比/(mL·g ⁻¹)	提取时间/min
1	40、50、60、70、80	20	60
2	50	20	30、60、90、120、140、180
3	50	10、20、30、40、50、60	60

1.2.4 响应面设计

在单因素试验的基础上,探讨提取温度、液固比、提取时间之间的交互作用对芦丁提取量的影响,进行了响应面实验。根据 Box-Behnken 实验设计原理,设定提取温度、液固比、提取时间为三因素变量,芦丁提取量为响应值,通过响应面设计对提取条件进行优化。各因素范围和水平如表 2 所示。

表 2 实验各变量范围和水平

水平	提取温度(A)/ ℃	液固比(B)/ (mL·g ⁻¹)	提取时间(C)/ min
-1	40	20	60
0	55	40	90
1	70	60	120

1.2.5 芦丁的测定方法^[3]

利用 70% 的乙醇溶解芦丁标准品制成质量浓度为 0.02 mg/mL 的标准溶液,避光放置。移取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 的芦丁标准溶液置于 10 mL 比色管中,加入 70% 的乙醇定容至 5.0 mL;加入 0.3 mL 5% 亚硝酸钠,放置 6 min;加入 0.3 mL 10% 硝酸铝溶液,放置 6 min;加入 4.0 mL 1 mol/L 的氢氧化钠、0.4 mL 蒸馏水,放置 15 min。在 505 nm 波长处用可见光分光光度计分别测定标准液吸光度值。以芦丁标准品质量浓度 C (mg/mL) 为横坐标,吸光度 A (abs) 为纵坐标绘制标准曲线,得标准曲线方程为: $A = 0.01232C + 0.00457$ ($R^2 = 0.999$)。

2 结果与讨论

2.1 DES 体系的优化

探讨了 6 种不同 DES 体系的提取情况,并与传统溶剂(水、乙醇、甲醇)的提取量进行对比,结果如表 3 所示。在酸基 DES 中,当乙酸为氢键供体时,芦丁的提取量高,这是由于乙酸本身为液体,配制出的 DES 黏度低,有利于提取。醇基 DES 中,丙三醇体系的 DES 提取效果好,这是由于随着多元醇中羟基数目的减少,能形成的氢键的数目减少^[19],提取量减少。由表 1 可以看出,乙酸、丙三醇、尿素作氢键供体时,芦丁提取量比传统溶剂高。其中,氯化胆碱-乙酸组成的 DES 体系的提取效果最好,芦丁得率达 44.51 mg/g。这是因为在相同的条件下,氯化胆碱-乙酸组成的 DES 体系液体的流动性较好、黏度较小、扩散率较大,使得芦丁能够更好地从样品材料的孔隙中渗透出来,利于芦丁的提取。因此,氯化胆碱-乙酸被选作为最佳的提取体系。

表 3 不同 DES 体系对芦丁提取量的影响

溶剂	芦丁提取量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	溶剂	芦丁提取量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
氯化胆碱-苹果酸	33.05	氯化胆碱-尿素	38.69
氯化胆碱-乙酸	44.51	水	18.83
氯化胆碱-柠檬酸	31.43	乙醇	35.20
氯化胆碱-乙二醇	35.05	甲醇	30.14
氯化胆碱-丙三醇	42.62		

2.2 单因素试验

2.2.1 DES 体系组成摩尔比对芦丁提取量的影响

氢键供体和氢键受体的组成摩尔比是影响溶剂性质的关键因素^[20]。组成摩尔比对提取量的影响如图 1(a)所示。由图 1(a)中可以看出,氯化胆碱和乙酸摩尔比由 1:1 增加到 1:3 时,芦丁提取量由 43.03 mg/g 增加到 47.12 mg/g , 达到最大值;组成摩尔比为 1:4 到 1:5 时,芦丁提取量开始下降,故选择 1:3 为最佳组成摩尔比。不同 DES 体系组成摩尔比的提取效果不同,这是因为不同摩尔比制备出来的 DES 的黏度及氢键的数目不同。

2.2.2 DES 的含水质量分数对芦丁提取量的影响

与常规溶剂相比,DES 的主要缺点是其本身的黏度高。黏度会导致质量传递缓慢,从而降低 DES 作为萃取溶剂的效率。为了解决该问题,可以通过加入适量的水降低 DES 的黏度,从而提高芦丁的提取量。DES 的含水质量分数对芦丁提取量的影响如图 1(b)所示。由图 1(b)中可以看出,在含水质量分数为 30% 时,芦丁提取量达到最大值 49.35 mg/g 。这是因为随着水加入,黏度降低,使提取溶剂更容易渗透到植物细胞内部^[21],芦丁提取量不断增加。但加水量过多,水的过度集中冲断氢键受体与氢键供体之间的氢键,故提取量开始下降。

2.2.3 提取温度对芦丁提取量的影响

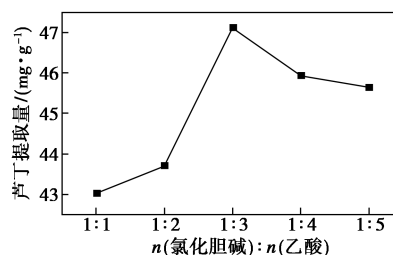
提取温度对芦丁提取量的影响如图 1(c)所示。由图 1(c)中可以看出,当温度由 40 $^{\circ}\text{C}$ 上升到 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,芦丁提取量由 45.63 mg/g 增加到 49.56 mg/g 。这是由于随着温度的增加,溶剂黏度降低,扩散率和溶解度增加,有利于目标化合物从植物细胞渗透到溶剂中^[22]。故随着温度的上升,芦丁提取率也增加,但当温度超过 60 $^{\circ}\text{C}$ 之后,芦丁提取量基本稳定,温度升高 80 $^{\circ}\text{C}$ 时,提取量达到 49.71 mg/g ,与 60 $^{\circ}\text{C}$ 时的提取量相差不大。同时温度越高,样液颜色加重,提取物成分更加复杂,不利于后期的分离纯化,故选择 60 $^{\circ}\text{C}$ 为提取温度。

2.2.4 液固比对芦丁提取量的影响

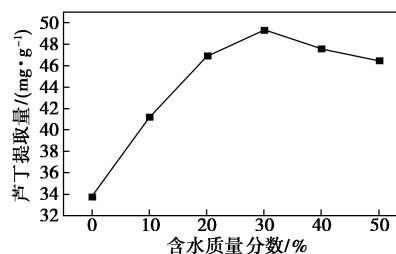
液固比对芦丁提取量的影响如图 1(d)所示。由图 1(d)中可以看出,当液料比为 40:1 (mL/g) 时,芦丁提取量达到最大值 53.71 mg/g 。这是由于溶剂量的增加使物料与溶剂接触面积、溶液传质推动力均增大,浓度梯度变大,有利于芦丁的溶出^[23],溶剂用量再进一步加大,就会浪费。因此,选择 40:1 (mL/g) 为最佳液固比。

2.2.5 提取时间对芦丁提取量的影响

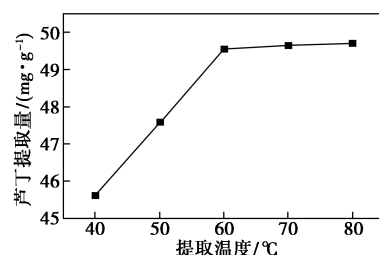
反应时间对芦丁提取量的影响如图 1(e)所示。一般情况下,提取量随着提取时间的增加而增加^[4],但是提取时间过长,芦丁会发生分解,不利于提取。由图 1(e)中可以看出,在 90 min 时,芦丁的提取量为 47.68 mg/g ,相比 120 min 时的 47.91 mg/g ,差别不大,故选择 90 min 为最佳提取时间。



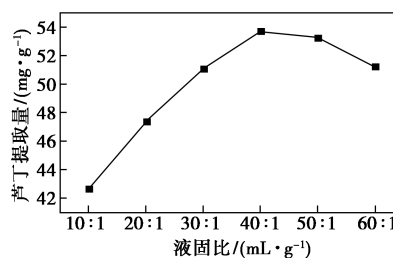
(a) DES 体系组成摩尔比对芦丁提取量的影响



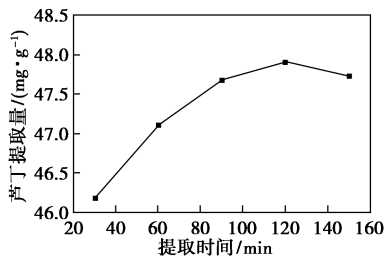
(b) DES 的含水质量分数对芦丁提取量的影响



(c) 提取温度对芦丁提取量的影响



(d) 液固比对芦丁提取量的影响



(e) 提取时间对芦丁提取量的影响

图 1 单因素试验结果分析

2.3 响应面实验结果分析

RSM 可以评估变量之间的交互作用,通过较少的实验对整个范围进行变量优化^[24]。采用 Box - Behnken Design (BBD) 模型考察了温度 ($A, ^\circ\text{C}$)、液固比 ($B, \text{mg/L}$)、提取时间 (C, min) 对槲叶中芦丁提取量 ($Y, \text{mg/g}$) 的影响,通过响应面设计对提取条件进行优化,结果如表 4 所示。通过对实验数据进行多元回归分析,得回归方程:

$$Y = 55.34 + 2.66 \times A + 3.73 \times B - 0.017 \times C - 0.13 \times AB + 0.098AC - 0.053BC - 2.84A^2 - 3.45B^2 - 0.94C^2$$

表 4 响应面结果分析

实验号	提取温度 (A)/ $^\circ\text{C}$	液固比 (B)/($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	提取时间 (C)/min	芦丁提取量 (Y)/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	0.000	0.000	0.000	56.83
2	1.000	-1.000	0.000	47.55
3	-1.000	0.000	1.000	48.53
4	-1.000	0.000	-1.000	49.09
5	1.000	0.000	1.000	54.21
6	0.000	0.000	0.000	54.47
7	1.000	0.000	-1.000	54.38
8	0.000	0.000	0.000	54.75
9	-1.000	-1.000	0.000	42.15
10	0.000	1.000	-1.000	54.12
11	0.000	0.000	0.000	55.17
12	0.000	-1.000	-1.000	47.48
13	0.000	0.000	0.000	55.49
14	0.000	-1.000	1.000	47.88
15	-1.000	1.000	0.000	50.81
16	1.000	1.000	0.000	55.68
17	0.000	1.000	1.000	54.31

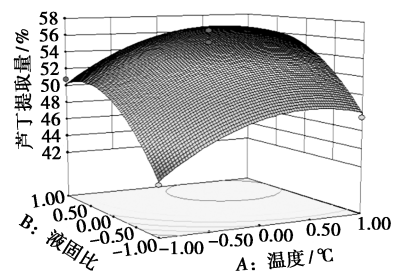
同时对方程进行了回归和方差分析,具体如表 5 所示。

表 5 回归模型和方差分析结果

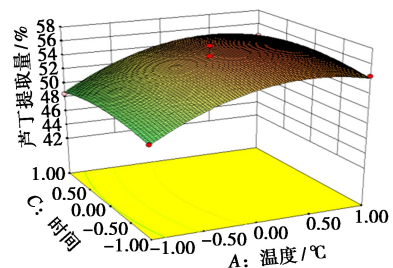
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	263.84	9	29.32	38.11	<0.0001
A-反应温度	56.39	1	56.39	73.30	<0.0001
B-液固比	111.45	1	111.45	144.87	<0.0001
C-反应时间	2.450× 10 ⁻³	1	2.450× 10 ⁻³	3.185× 10 ⁻³	0.9566
AB	0.070	1	0.070	0.091	0.7713
AC	0.038	1	0.038	0.049	0.8304
BC	0.011	1	0.011	0.014	0.9081
A ²	34.07	1	34.07	44.29	0.0003
B ²	50.11	1	50.11	65.13	<0.0001
C ²	3.76	1	3.76	4.88	0.0628
残差	5.39	7	0.77		
失拟项	2.01	3	0.67	0.79	0.5579
纯误差	3.38	4	0.84		
方差	0.9800				

由表 5 可知,模型 F 值为 38.11,当 $\text{Prob}>F$ 的值小于 0.000 1 时,表明该因子对模型影响显著,该模型 P 值小于 0.000 1,表明响应回归模型达到了显著水平。反应温度和固液比的 P 值均小于 0.000 1,表示其对芦丁提取量的影响具有显著性作用。根据 F 值大小可判定,各因素对芦丁提取量影响的大小顺序为:反应温度 (A) > 液固比 (B) > 反应时间 (C)。模型的回归系数 R^2 为 0.980 0,表明本模型的相关性很好。本实验的变异系数 ($C.V.\%$) 为 1.69,表明该测试操作可靠。信噪比为 19.049,大于 4,表明该模型可以分析和预测槲叶中芦丁的提取量。

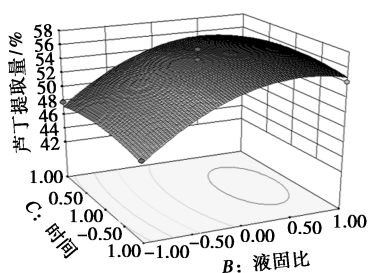
芦丁提取量的三维响应面图见图 2。



(a) 温度和液固比对芦丁提取量的影响



(b) 温度和时间对芦丁提取量的影响



(c) 液固比和时间对芦丁提取量的影响

图 2 芦丁提取量的三维响应曲面图

响应曲面的陡峭程度反映两因素交互作用的显著程度, 曲面越陡峭, 显著程度越高; 陡峭程度越小, 则表示交互作用程度越低。等高线的形状也反映出交互作用的强弱, 等高线越接近于圆形, 显著程度越弱, 形状越接近于椭圆形, 则表示交互作用越显著。由图 2 可看出, AB 曲面有较大的倾斜度, 说明两因素的交互项对芦丁提取量的影响较大 ($P < 0.01$)。

根据拟合方程与模型对提取条件的优化, 得到最佳实验条件: 提取温度为 60.63°C 、液固比为 51.09 mL/g 、提取时间为 84.47 min , 此时对芦丁提取量为 56.89 mg/g 。为了方便实验, 将提取参数修改为提取温度为 61°C 、液固比为 51 mL/g 、提取时间为 85 min , 重复 3 次实验, 得芦丁平均提取量为 58.79 mg/g , 与理论值接近。表明该模型可用于实验的设计和预测。

3 结论

探讨了不同因素对芦丁提取量的影响, 利用响应面分析得到最佳实验条件为: 提取温度为 61°C 、液固比为 51 mL/g 、提取时间为 85 min , 此时芦丁的提取量为 58.79 mg/g 。实验中仅对提取条件进行了优化, 缺少对于提取液的纯化富集的研究, 后期应将重点放在提取液的纯化富集。

参考文献

- [1] 赵森, 姜黎, 邹明. 槲树叶总黄酮片质量标准研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2016, 14(8): 143-144.
- [2] 卢军, 芦霜. 槲树叶氯仿提取部位化学成分的研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 399-401.
- [3] Conde T A, Lufs Mendes, Vitor M Gaspar, et al. Differential modulation of the phospholipidome of proinflammatory human macrophages by the flavonoids quercetin, naringin and naringenin [J]. *Molecules*, 2020, 25(15): 1-14.
- [4] Tian H, Wang J, Li Y, et al. Recovery of natural products from deep eutectic solvents by mimicking denaturation [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7(11): 9976-9981.
- [5] Wang Y, Huang F, Zhao L, et al. Protective effect of total flavones from *hippophae rhamnoides L.* against visible light-induced retinal

- degeneration in pigmented rabbits [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2015, 64(1): 161-170.
- [6] Jiang L. Preparation and antioxidant activity of *Lycium barbarum* oligosaccharides [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 99: 646-648.
- [7] 陈明玉. 均匀设计法优选漏芦中芦丁和槲皮素提取工艺 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1248-1249.
- [8] 张晓虎, 田西彬. 洛南连翘果实中芦丁和槲皮素提取方法研究 [J]. 陕西农业科学, 2015, 61(11): 26-30.
- [9] Dai Y, Van Spronsen J, Witkamp G J, et al. Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: mixtures of solids as extraction solvents [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2013, 76(11): 2162-2173.
- [10] Abbott A P, Capper G, Davies D, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [J]. *Chemical Communications*, 2003, 9(1): 70-71.
- [11] Zhang Q, Karine D O V, Royer, Sébastien, et al. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(21): 7108-7146.
- [12] 朱书强, 孙世琨, 周佳, 等. 低共熔溶剂在萃取分离中的应用 [J]. 分析测试学报, 2019, 38(6): 755-760.
- [13] Ali M C, Chen J, Zhang H, et al. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum L.* fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction [J]. *Talanta*, 2019, 203: 16-22.
- [14] Zhuang B, Dou L L, Li P, et al. Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen* [J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2017, 134: 214-219.
- [15] Espino M, María de los Angeles Fernández, Gomez F J V, et al. Natural designer solvents for greening analytical chemistry [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 76: 126-136.
- [16] Balaraman H B, Sivasubramaniyam A, Rathnasamy S K. High selective purification of Quercetin from Peanut hull using protic deep eutectic mixture based liquid-liquid microextraction [J]. *Microchemical Journal*, 2020, 152: 1-8.
- [17] Liu W, Fu X, Li Z. Extraction of tocopherol from soybean oil deodorizer distillate by deep eutectic solvents [J]. *Journal of Oleo Science*, 2019, 68(10): 951-958.
- [18] Ruesgas-Ramón, Mariana, Figueroa-Espinoza M C, Durand E. Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2017, 65(18): 3591-3601.
- [19] Wang H, Liu S, Zhao Y, et al. Insights into the hydrogen bond interactions in deep eutectic solvents composed of choline chloride and polyols [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7(8): 7760-7767.
- [20] Hao C, Chen L, Dong H, et al. Extraction of flavonoids from *scutellariae radix* using ultrasound-assisted deep eutectic solvents and evaluation of their anti-inflammatory activities [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(36): 23140-23147.
- [21] Dai Y, Witkamp G J, Verpoorte R, et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications [J]. *Food Chemistry*, 2015, 187: 14-19.
- [22] Cao J, Wang H, Zhang W, et al. Tailor-made deep eutectic solvents for simultaneous extraction of five aromatic acids from ginkgo biloba leaves [J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 1-18.
- [23] 孔方, 李莉, 刘言娟. 超声辅助低共熔溶剂提取苹果叶中的总黄酮 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(41): 1-15.
- [24] 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 Chemistry*, 2015, 17(3): 1718-1727. ■