

超声辅助天然低共熔溶剂萃取法在蒺藜黄酮类成分提取中的应用

杨雪苗, 徐楠冰, 杨丹, 薄彧坤, 安明*
(包头医学院, 内蒙古包头 014040)

摘要:研究了甜菜碱-L-脯氨酸-1,3-丁二醇组成的三元天然低共熔溶剂(NADESs)在蒺藜黄酮类成分提取中的应用。考察了 NADESs 的摩尔比、含水量、液固比和超声时间 4 个因素对蒺藜总黄酮提取量的影响,在此基础上采用响应曲面法优化提取工艺,得到最佳实验条件: $n(\text{甜菜碱}):n(\text{L-脯氨酸}):n(1,3\text{-丁二醇})=0.5:0.5:2$,超声时间 53 min,含水量 31%,料固比(NADESs 与蒺藜比)50 mL:1 g。在此条件下,蒺藜总黄酮提取量为 10.82 mg/g,与预测值接近并高于传统有机溶剂的提取量。

关键词:天然低共熔溶剂;蒺藜;超声提取;响应曲面法

中图分类号:TQ41;TK6

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2022)S2-0239-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.S2.047

Application of ultrasonic-assisted natural deep eutectic solvents in extraction of flavonoid from *Tribulus terrestris* L.

YANG Xue-miao, XU Nan-bing, YANG Dan, BO Yu-kun, AN Ming*

(Baotou Medical College, Baotou 014040, China)

Abstract:The application of natural deep eutectic solvents (NADESs) composing of betaine, L-proline and 1,3-butanediol in extraction of flavonoid from *Tribulus terrestris* L. is studied. The effects of the molar ratio of NADESs system, water content, liquid-solid ratio and ultrasonic time on the extraction of flavonoids from *Tribulus terrestris* L. are investigated. On this basis, response surface method is utilized to optimize the extraction process. The optimum experimental conditions are obtained as follows: $n(\text{betaine}):n(\text{L-proline}):n(1,3\text{-butanediol})=0.5:0.5:2$, ultrasonic time is 53 min, water content is 31%, and the ratio between NADESs and *Tribulus terrestris* L. is 50 mL:1 g. Under these conditions, the extraction amount of total flavonoids from *Tribulus terrestris* L. is 10.82 mg·g⁻¹, which approaches to the predicted value and higher than that by traditional organic solvents.

Key words: natural deep eutectic solvents; *Tribulus terrestris* L.; ultrasonic extraction; response surface method

黄酮化合物作为一种重要的天然化合物受到研究者的广泛关注。黄酮类成分在抗炎^[1]、抗癌^[2]、抗氧化^[3]、保护心血管疾病^[4]等方面具有显著功效;黄酮类成分不仅可以医用还能食用,其广泛存在于水果、蔬菜中。由于黄酮化合物溶解性差导致机体难以吸收,多数情况下其被水解为苷元以 O-苷键形式吸收,目前有关药代动力学方面的研究已经在临床前及临床实验中取得一定进展^[5]。

“绿色化学”逐渐得到人们的高度认可,天然低共熔溶剂(NADESs)是以植物和动物的初生代谢产物为基础的绿色溶剂,如氨基酸、糖类、生物碱和醇类等,具有绿色和低毒的特性,可作为传统有机溶剂的替代品。相比于离子液体,其具有更好的降解性、生物相容性和可持续性^[6-7]。有研究表明 NADESs 可以参与植物细胞间的各种生化反应并影响生理功能,其作为一种溶剂在细胞代谢过程中发挥重要作用^[8],更重要的是 NADESs 不需经过额外的净化处理就可以加入食品中^[9]。这些显著优势使 NADESs 在科学界的发展突飞猛进。

NADESs 均由氢键受体(HBA,如季铵盐和氨基酸等)和氢键供体(HBD,如碳水化合物和有机酸等)两部分通过分子内氢键形成均一、透明的液体,而醇、胺、醛、酮和羧基既可作为氢键的受体又可作为氢键供体^[10]。NADESs 介质的基本结构单元主要依赖于其组分之间的范德华力,从而干扰初始化合物的结晶能力^[10],这使 NADESs 基质容易受到各种因素的影响,如含水量、温度和摩尔比^[11]。因此,对以上条件的优化是研究目标化合物的关键。

蒺藜(*Tribulus terrestris* L.)为蒺藜科蒺藜属一年生草本植物的干燥成熟果实,别名刺蒺藜、硬蒺藜和白蒺藜等,是中国传统中药,具有广泛的药理作用。目前,蒺藜总黄酮的提取方法大多数为传统有机溶

收稿日期:2022-01-13;修回日期:2022-02-28

基金项目:内蒙古自治区科技创新引导项目(00120209);内蒙古自治区卫生健康科技计划项目(202201367,202202226);包头医学院“花蕾计划”项目(HL2021043,HL2021046)

作者简介:杨雪苗(1996-),女,硕士生,研究方向为药物分析,2017006513@163.qq.com;安明(1972-),男,硕士,教授,研究方向为药物分析和药理学,通讯联系人,610283014@qq.com。

剂,如甲醇和乙醇。有机溶剂提取中药中活性成分的优点在于其与大多数化合物的相容性较好。Tian 等^[12]考察了不同浓度乙醇溶液对蒺藜叶中黄酮类成分的提取率,采用 Box-Behnken Design (BBD) 实验将提取条件优化,结果表明总黄酮提取率为 0.46%。但有机溶剂的易挥发性、不稳定性和毒性等固有性质给研究者增加了难度。因此,绿色、低毒和环保的提取溶剂在医药、食品、农业中的应用备受青睐。

本研究将探讨超声辅助 NADESs 对蒺藜总黄酮提取效率的影响。首先,筛选出最佳的 NADESs 体系,采用单因素实验分别对摩尔比、含水量、超声时间和液固比进行考察。最后,采用响应曲面法考察含水量、超声时间和液固比间的交互影响,以确定最优提取条件。NADESs 在蒺藜总黄酮中的有效、快速提取利于促进蒺藜的资源利用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蒺藜购自内蒙古聚诚中药饮片有限公司(批号 180516002);对照品槲皮素购自南京源植生物科技有限公司(纯度 98%,批号 yz180312);氯化胆碱、甜菜碱、1,2-丙二醇、1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、山梨醇、丙二酸、L-脯氨酸、甘氨酸均购自成都埃法有限公司;山梨醇购自浙江一诺生物科技有限公司;乙醇、无水醋酸钠、冰醋酸、三氯化铝为分析纯,水为去离子水。

TU-1810PC 紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;SartoriusBSA224S-CW 电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;AS10200 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;MR Hei-Tec 磁力加热搅拌器,德国海道尔公司;800Y 粉碎机,铂欧五金制品有限公司;TDZS-WS 多管架自动平衡离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 NADESs 的合成

用磁力加热搅拌器合成 NADESs。分别以氯化胆碱、甜菜碱、甘氨酸和 L-脯氨酸为 HBA,乙二醇、1,2-丙二醇、1,4-丁二醇、1,3-丁二醇和丙二酸为 HBD,按照摩尔比 1:2,在 80℃ 下以 800 r/min 的恒定磁搅动搅拌形成均一、透明的液体。

1.2.2 总黄酮的提取

蒺藜样品于粉碎机粉碎后过 40 目筛,放入密封袋中保存备用。精密称定蒺藜粉末约 0.5 g 至锥形

瓶,加入 5 mL NADESs,超声提取 30 min,室温冷却,于 5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,测定总黄酮量。通过分析总黄酮提取量确定最佳的 NADESs 体系。

1.2.3 单因素实验

本研究分别从摩尔比、含水量、液固比和超声时间 4 个因素考察最佳 NADESs 的提取条件。三元 NADESs 体系摩尔比分别设定为 0.5:0.5:1、1:1:3、0.5:0.5:2、1:1:5;含水量分别设定为 20%、30%、40%、50%;液固比(mL/g)分别设定为 30:1、40:1、50:1、60:1;超声时间分别设定为 30、40、50、60 min。以总黄酮的提取量为评价指标,选出较好的提取条件,平行测定 3 次,取平均值。

1.2.4 响应曲面法分析

在单因素实验基础上,分析各因素对总黄酮提取率的交互作用,由于摩尔比对总黄酮提取量影响较小,因此后续研究将对含水量、液固比和超声时间之间的交互作用进行探讨。BBD 可以对影响生物过程的因子及其交互作用进行评价,确定最佳水平范围,BBD 设计每个自变量下有 3 个水平,各因素及水平如表 1 所示。本实验通过响应曲面法优化含水量、液固比、超声时间的交互作用,实现对蒺藜中总黄酮的快速、高效提取。

表 1 BBD 设计各因素及其水平

水平	因素		
	超声时间(A)/ min	含水量(B)/ %	液固比(C)/ (mL·g ⁻¹)
-1	40	20	40
0	50	30	50
1	60	40	60

1.2.5 总槲皮素得率的测定

精密称定对照品槲皮素 39.1 mg 置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解定容至刻度,配制成 3.91 mg/mL 浓度的槲皮素母液,分别移取 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mL 槲皮素母液置于 5 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。分别吸取上述各溶液 200 μL 置于 10 mL 具塞试管中,加入 3 mL 1%三氯化铝和 3 mL 醋酸钠溶液(pH=3.6)置于上述各具塞试管中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,室温放置 10 min,267 nm 处测定吸光度。以槲皮素质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(Y)绘制标准曲线,标准曲线方程为 $Y=0.0699X+0.0766$ ($R^2=0.9997$)。样品中总黄酮提取量测定方法同对照品测定方法^[13-14]。

2 结果与讨论

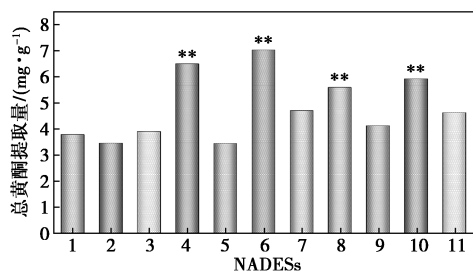
2.1 NADESs 体系的选择

本研究 HBA 分别选择碱基、氨基酸和醇基, HBD 分别选择酸基和醇基,共探讨了 10 种 NADESs 体系,同时与传统有机溶剂(乙醇)提取量作比较,结果见表 2 和图 1。以碱基和氨基酸为 HBA,酸基和醇基为相应的 HBD 时,提取率较高,与乙醇提取量相比,氯化胆碱-丙二酸、1,3-丁二醇-丙二酸、甘氨酸-丙二酸和甜菜碱-L-脯氨酸-1,3-丁二醇的提取量均具有显著性差异($p < 0.05$)。但丙二酸会影响显色,在含有丙二酸的 NADESs 中加入三氯化铝-醋酸-醋酸钠显色剂时,会产生沉淀,因此本研究以甜菜碱-L-脯氨酸-1,3-丁二醇三元体系为最佳 NADESs 体系,将甜菜碱-L-脯氨酸作为 HBA,1,3-丁二醇作为 HBD,因此,接下来的实验内容将对甜菜碱-L-脯氨酸-1,3-丁二醇三元 NADESs 体系进行优化。

表 2 NADESs 种类筛选

序号	NADESs	总黄酮 提取率/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	均值± 标准差 ($\text{M} \pm \text{SD}$)	<i>p</i>
1	氯化胆碱-1,2-丙二醇	3.7796	3.78±0.06	0.019
2	甜菜碱-1,3-丁二醇	3.4394	3.44±0.34	0.001
3	氯化胆碱-1,3-丁二醇	3.8986	3.90±0.13	0.054
4	氯化胆碱-丙二酸	6.4384	6.44±0.38	0.000
5	氯化胆碱-山梨醇	3.4413	3.44±0.36	0.001
6	1,3-丁二醇-丙二酸	7.1049	7.10±0.55	0.000
7	L-脯氨酸-丙二酸	4.6976	4.70±0.23	1.000
8	甘氨酸-丙二酸	5.5965	5.60±0.37	0.005
9	甜菜碱-1,4-丁二醇	4.1194	4.12±0.21	0.292
10	甜菜碱-L-脯氨酸- 1,3-丁二醇	5.9200	5.92±0.19	0.000
11	乙醇	4.6188	4.62±0.13	—

注: $p < 0.01$ 表明与乙醇提取量比较具有显著差异。



注: ** 表示与乙醇提取量相比具有显著差异。

图 1 不同种类 NADESs 对蒺藜总黄酮提取量的影响

2.2 单因素实验

2.2.1 NADESs 体系摩尔比的考察

HBA 和 HBD 的摩尔比会直接影响总黄酮的提取率^[15]。如图 2(a) 所示,当 HBD 逐渐增加时,蒺藜总黄酮提取率先升后降,当 HBA 与 HBD 摩尔比为 1:2 时,总黄酮提取量增加到 7.29 mg/g ,若继续增加 HBD 的摩尔量会导致总黄酮提取量显著下降,这可能是因为此时形成氢键的数目已经达到了最大,过多 HBD 的竞争反而使氢键的形成不稳定,导致提取量下降。因此选择 HBA 与 HBD 为 1:2 的体系为最佳摩尔比。

2.2.2 NADESs 体系含水量的考察

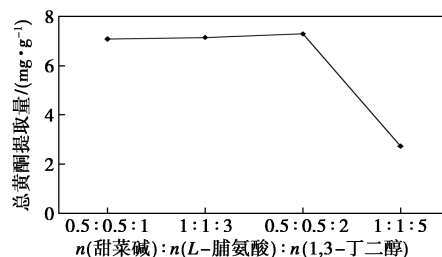
由于 NADESs 的黏度较大,可以用水加以稀释,从而提高传质效率;另一方面,水还能促进氢键的形成。如图 2(b) 所示,随着含水量的增加,总黄酮提取量先升后降,当 NADESs 含水量为 30% 时,总黄酮提取量达到最大值 7.58 mg/g ,但水加入的过多会破坏形成的氢键,因此提取量会下降。

2.2.3 NADESs 体系液固比的考察

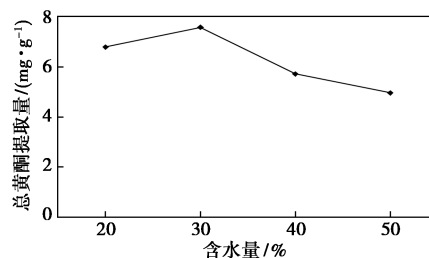
液固比是影响提取量的重要因素之一。如图 2(c) 所示,当液固比为 50 $\text{mL}:1 \text{g}$ 时,总黄酮提取量最高,达 9.75 mg/g 。这可能是由于溶剂的增加会使其与溶质接触面积增加,从而提高传质效率。但过大的溶剂量会产生稀释作用,故选择最佳液固比为 50 $\text{mL}:1 \text{g}$ 。

2.2.4 NADESs 超声时间的考察

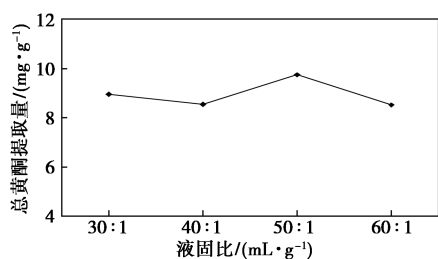
超声时间对总黄酮提取量的影响如图 2(d) 所示。随着超声时间的增加总黄酮提取量增加,当超声时间为 50 min 时,总黄酮提取量达到 10.28 mg/g ,但超声时间过长总黄酮提取量出现下降,这可能是



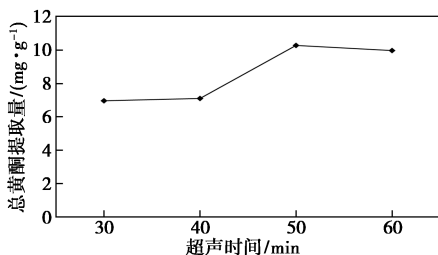
(a) 摩尔比考察



(b) 含水量考察



(c) 液固比考察



(d) 超声时间考察

图 2 单因素实验结果

因为超声会产生热,使黄酮类成分分解。因此最终选择 50 min 为最佳超声时间。

2.3 响应曲面分析

响应曲面法可以反映各因素间的交互作用,本研究设计了 17 次实验对所有变量进行优化。采用 BBD 法考察了超声时间(A)、含水量(B)和液固比(C)的交互作用对蒺藜总黄酮提取量的影响,结果见表 3。通过 Design Expert 进行多元回归分析,得到回归方程为: $Y = 10.9 + 0.3375A + 0.04B - 0.03C + 0.1225AB + 0.1375AC + 0.0625BC - 0.6073A^2 - 0.7473B^2 - 0.4972C^2$ 。

表 3 蒺藜总黄酮类成分的 BBD 实验设计及提取量结果 (n=3)

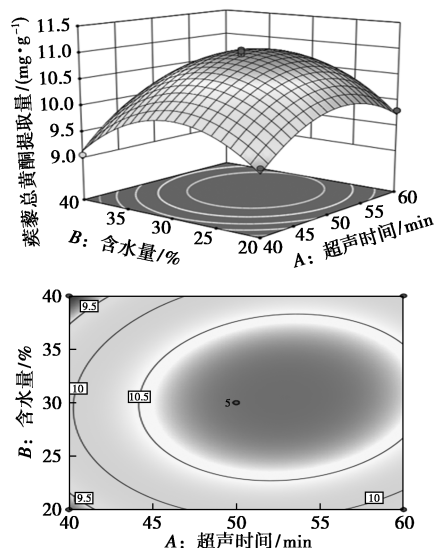
实验号	超声时间(A)/ min	含水量(B)/ %	液固比(C)/ (mL·g ⁻¹)	总黄酮提取量/ (mg·g ⁻¹)
1	40	20	50	9.39
2	50	40	60	9.76
3	50	30	50	10.93
4	50	20	60	9.38
5	40	30	60	9.34
6	60	30	40	9.98
7	40	40	50	9.05
8	50	30	50	10.76
9	50	30	50	10.99
10	50	40	40	9.81
11	40	30	40	9.56
12	60	30	60	10.31
13	50	30	50	10.81
14	60	40	50	9.95
15	60	20	50	9.80
16	50	20	40	9.68
17	50	30	50	11.02

对蒺藜总黄酮成分经过二次模型方差分析,结果见表 4。该模型 F 值为 36.70, P 值小于 0.0001,表明该模型具有显著性。根据 F 值判断各因素对蒺藜总黄酮提取量影响的顺序为超声时间(A) > 含水量(B) > 液固比(C)。该模型相关系数 R^2 为 0.9792,表明仅有 2.08% 的变量是不被模型识别的。预测的 R^2 为 0.7776,与调整后的 R^2 (0.9526) 较为吻合,这表明实验实际值与模型预测值具有良好的线性关系。信噪比为 16.3847 > 4,变异系数为 1.41% < 10%,说明实验的可信度和精确度较高,表明该模型可用于蒺藜总黄酮提取的分析。

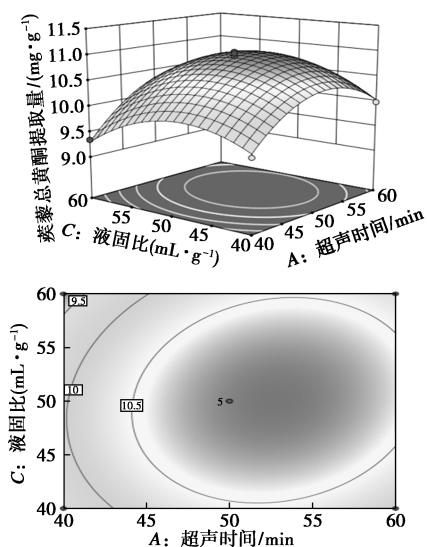
表 4 蒺藜总黄酮模型和方差分析结果

变量来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	6.59	9	0.7319	36.70	<0.0001
A	0.9113	1	0.9113	45.70	0.0003
B	0.0128	1	0.0128	0.6419	0.4494
C	0.0072	1	0.0072	0.3611	0.5668
AB	0.0600	1	0.0600	3.01	0.1263
AC	0.0756	1	0.0756	3.79	0.0925
BC	0.0156	1	0.0156	0.7836	0.4054
A ²	1.55	1	1.55	77.87	<0.0001
B ²	2.35	1	2.35	117.91	<0.0001
C ²	1.04	1	1.04	52.21	0.0002
残差	0.1396	7	0.0199		
失拟项	0.0885	3	0.0295	2.31	0.2180
纯误差	0.0511	4	0.0128		
R^2	0.9792				
调整 R^2	0.9526				
预测 R^2	0.7776				
信噪比	16.3847				
变异系数/%	1.41				

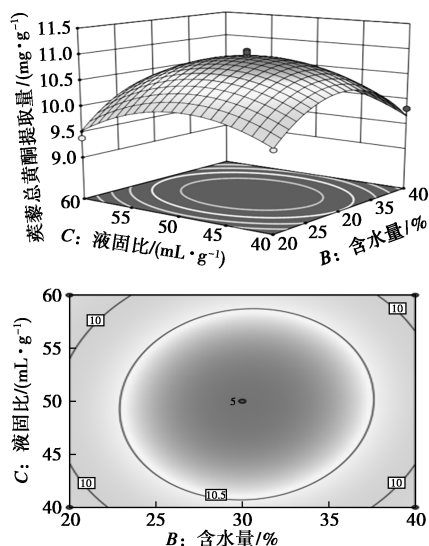
图 3 为超声时间(A)、含水量(B)和液固比(C)



(a) 超声时间与含水量交互作用对蒺藜总黄酮提取量的影响



(b) 超声时间与液固比交互作用对蒺藜总黄酮提取量的影响



(c) 含水量与液固比交互作用对蒺藜总黄酮提取量的影响

图3 蒺藜总黄酮提取量的响应曲面图

3个因素间相互作用对蒺藜总黄酮提取量影响的3D响应曲面结果。

3D曲面图越陡峭,表明两个因素的交互作用显著程度越高;反之,曲面越平缓,表明两个因素的交互作用显著程度越低。图3表明,超声时间(A)和含水量(B)交互作用对蒺藜总黄酮提取量影响较大。

蒺藜总黄酮最佳提取条件如下:最优超声时间为52.842 min,含水量为30.504%,液固比为50.119 mL/g。模型预测蒺藜总黄酮提取率为10.95 mg/g。为实验操作方便,最终本研究选择超声时间为53 min、含水量为31%、液固比为50 mL:1 g,实验重复3次,得到蒺藜总黄酮提取量为10.82 mg/g,与预测值趋于一致,表明该模型可用于本实验的设计。

3 结论

本研究采用天然、绿色和易降解的三元NADESs,考察不同因素对蒺藜总黄酮提取量的影响,以蒺藜总黄酮为评价指标,采用单因素实验和响应曲面法对提取工艺进行优化。确定最佳实验条件为:超声时间为53 min、含水量为31%、液固比为50 mL:1 g。本研究仅对蒺藜中总黄酮成分进行测定,未对蒺藜中总黄酮进行纯化,并未明确黄酮中具体的成分,在后续研究中将继续进行相关内容的研究。

参考文献

- [1] Yi Y S. Regulatory roles of flavonoids on inflammasome activation during inflammatory responses [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62 (13). DOI: 10.1002/mnfr.201800147.
- [2] Raffa D, Maggio B, Raimondi M V, et al. Recent discoveries of anti-cancer flavonoids [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 142: 213–228.
- [3] Lahouar L, El Arem A, Ghrairi F, et al. Phytochemical content and antioxidant properties of diverse varieties of whole barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in Tunisia [J]. *Food Chem*, 2014, 145: 578–583.
- [4] Li C, He J, Gao Y, et al. Preventive effect of total flavones of *Cholesterol axillaries* on ischemia/reperfusion-induced myocardial infarction-related MAPK signaling pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2014, 14(2): 145–152.
- [5] Hostetler G L, Ralston R A, Schwartz S J. Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity [J]. *Adv Nutr*, 2017, 8 (3): 423–435.
- [6] Mišan A, Nađpal J, Stupar A, et al. The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(15): 2564–2592.
- [7] Alexandre P, Rita C, Ivo A, et al. Natural deep eutectic solvents—Solvents for the 21st century [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2014, 2(5): 1063–1071.
- [8] Choi Y H, Van Spronsen J, Dai Y, et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(4): 1701–1705.
- [9] Savi L K, Carpiné D, Waszczynskyj N, et al. Influence of temperature, water content and type of organic acid on the formation, stability and properties of functional natural deep eutectic solvents [J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2019, 488: 40–47.
- [10] Fernández M L Á, Boiteux J, Espino M, et al. Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1038: 1–10.
- [11] Liu Y, Friesen J B, McAlpine J B, et al. Natural deep eutectic solvents: Properties, applications, and perspectives [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(3): 679–690.
- [12] Tian C, Chang Y, Zhang Z, et al. Extraction technology, component analysis, antioxidant, antibacterial, analgesic and anti-inflammatory activities of flavonoids fraction from *Tribulus terrestris* L. leaves [J]. *Heliyon*, 2019, 5(8): 1–11.
- [13] 冯海燕, 何敬宇, 杨晓辉, 等. 响应曲面法优化莲须总黄酮超声提取工艺 [J]. *中成药*, 2016, 38(10): 2291–2294.
- [14] 胡嘉琳, 胡超男, 杨飞, 等. 北桑寄生总黄酮提取方法的优化 [J]. *中国医药指南*, 2019, 17(11): 1–2, 5.
- [15] 沈豪玲, 郭晨思, 高翔宇, 等. 低共熔溶剂提取槲树叶中黄酮类物质的研究 [J]. *现代化工*, 2021, 41(12): 160–164. ■