

基于绿色低共熔溶剂法高效提取鸡骨草中的黄酮和皂苷

陈冉,李德慧,阮桂发,刘珊,孙科*,黄锁义,欧阳熙林

右江民族医学院,百色 533000

摘要:为了研究鸡骨草中总黄酮和总皂苷的最佳提取工艺,通过单因素试验和星点设计-响应面法,对低共熔溶剂的性质(如种类、组分摩尔比、含水量)、提取温度、提取时间、液料比等多个因素进行考察。结果显示,总黄酮的最佳提取条件为:摩尔比1:2、含水量30%的氯化胆碱/乙二醇作溶剂,提取温度80℃,提取时间40min,液料比15:1(mL/g);总皂苷的最佳提取条件为:摩尔比1:4、含水量25%的氯化胆碱/乳酸作溶剂,提取温度80℃,提取时间64min,液料比56:1(mL/g)。在最佳条件下,总黄酮和总皂苷的提取率较传统提取溶剂分别提高了33.3%和96.4%。本研究为鸡骨草中黄酮和皂苷的高效、安全提取提供了一条新思路。

关键词:低共熔溶剂;鸡骨草;星点设计-响应面法;总黄酮;总皂苷

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)9-1632-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.9.022

Green and efficient extraction of flavonoids and saponins from *Abrus cantoniensis* Hance by deep eutectic solvents

CHEN Ran, LI De-hui, RUAN Gui-fa, LIU Shan, SUN Ke*, HUANG Suo-yi, OUYANG Xi-lin

Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China

Abstract: In order to research the optimal extraction process of total flavonoids and total saponins from *Abrus cantoniensis* Hance. Properties of DESs (including type, component mole ratio and water content), extraction temperature, extraction time, and liquid-solid ratio were studied by using single factor experiment and Box-Behnken experimental design combined with response surface methodology (BBD-RSM). The results indicated that the optimal extraction conditions for total flavonoids were as follows: ChCl/ethylene glycol with mole ratio of 1:2 and water content of 30% as solvent, extraction temperature of 80℃, extraction time of 40 min, and liquid-solid ratio of 15:1 (mL/g). The optimum conditions for total saponins were as follows: ChCl/lactic acid with mole ratio of 1:4 and water content of 25% as solvent, extraction temperature of 80℃, extraction time of 64 min, liquid-solid ratio of 56:1 (mL/g). Under the optimum conditions, the extraction yields of total flavonoids and total saponins increased by 33.3% and 96.4%, respectively, compared with conventional extraction solvents. The research could provide a new idea for efficient and safe extraction of flavonoids and saponins from *Abrus cantoniensis* Hance.

Key words: DESs; *Abrus cantoniensis* Hance; BBD-RSM; total flavonoids; total saponins

鸡骨草 (*Abrus cantoniensis* Hance) 属豆科植物广州相思子,盛产于广西、广东、云南等地。具有疏肝止痛、清热解毒、创面修复之功效,作为临床常用药多用于肝炎、胃痛、肝硬化腹水等疾病的治疗^[1,2]。研究显示鸡骨草中含有大量黄酮类、皂苷类、生物碱类、多酚类等生物活性成分^[3,4]。而作为其主成分的黄酮类和皂苷类化合物,具有良好的抗

肿瘤、抗心血管疾病、抗炎镇痛、抗病毒、降血压、抗氧化等药理作用,并且在保肝护肝方面疗效明显^[5-7]。目前,针对黄酮类和皂苷类的提取多采用传统有机试剂^[8-11],毒性大,给操作者和环境带来较大危害。因此,探索一种绿色高效的方法实现鸡骨草中黄酮类和皂苷类的快速提取十分必要。

低共熔溶剂(DESs)是继离子液体之后,被 Abbott 于 2003 年首次引入的一种新型绿色溶剂^[12],既继承了离子液体的大部分优点,又克服了其毒性高、成本高、生物降解性差等缺点。如经细胞毒性实验研究,大部分的 DESs 无毒性,且具有良好的生物可

收稿日期:2019-04-18 接受日期:2019-08-13

基金项目:右江民族医学院大学生创新创业训练项目(20171059 9114);广西自然科学基金(2017GXNSFAA198031)

*通信作者 Tel:86-776-2835991; E-mail:sun2019@ymun.edu.cn

降解性^[13,14]。DESs 主要由氢键供体 (HBD, 常用的季铵盐) 和氢键受体 (HBA, 如羧酸、多元醇、酰胺、氨基酸等) 通过较强的分子间氢键作用相结合, 这也是为何与传统溶剂相比, DESs 具有特殊的物理化学性质, 如可忽略的挥发性、粘度可调谐性等。并且, 在天然产物提取过程中, DESs 因能与溶质间形成较强的分子间氢键, 其萃取能力远高于传统溶剂, 甚至对不稳定生物活性成分具有良好的增稳作用^[15,16]。

DESs 因具有低毒性、生物降解性、可回收性、价格低廉、易于制备、易于储存等优点, 使其在代替传统有机试剂和离子液体用于天然产物提取方面具有很大的潜力, 被逐渐应用于中药生物活性成分的提取分离, 并取得良好效果^[13,14,17]。

本实验设计并制备一系列基于氯化胆碱的 DESs, 结合星点设计-响应面法 (BBD-RSM) 探索鸡骨草中总黄酮和总皂苷的提取工艺条件, 以期提供一个更绿色、经济、高效的提取新技术, 实现黄酮类和皂苷类化合物的有效快速提取, 促进鸡骨草药材的进一步开发利用。

1 材料和方法

1.1 植物药材

鸡骨草药材采购于广西玉林, 由右江民族医学

院药学院黄锁义教授鉴定为豆科植物广州相思子, 烘箱干燥后取茎部粉碎, 过 40 目筛, 保存备用。

1.2 仪器

UV-1750 紫外可见分光光度计 (岛津)、79HW-1 恒温磁力搅拌器 (江苏金坛市环宇科学仪器厂)、KQ-250DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)、HH-ZK600 智能恒温水浴箱 (巩义市英峪高科仪器厂)、FA2004N 型电子分析天平 (上海民析精密科学仪器公司)、101-3 型电热鼓风干燥箱 (上海齐欣科学仪器公司)、FW177 型中草药粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司)。

1.3 化学药品和试剂

芹菜素标准品 (98%, 百灵威)、熊果酸标准品 (98.5%, aladdin); 乳酸 (优级纯), 氯化胆碱 (98%, 百灵威)、乙二醇、丙三醇、1,3-丁二醇、果糖、木糖醇、葡萄糖、尿素、苹果酸、乳酸、三乙胺、冰乙酸、高氯酸、香草醛、乙醇, 均为分析纯。

1.4 低共熔溶剂的制备

参考文献方法^[13], 选用氯化胆碱作为氢键供体, 分别与 9 种氢键受体按一定的摩尔比混合, 在 80 °C 水浴中加热搅拌直至形成透明均一的液体, 最终得到 9 种不同类型的低共熔溶剂 (见表 1)。

表 1 不同类型的低共熔溶剂

Table 1 Different types of DESs

缩写 Abbreviation	氢键供体 HBD	氢键受体 HBA	摩尔比 Mole ratio	含水量 Water content
DES-1	氯化胆碱 ChCl	乙二醇 Ethylene glycol	1:2	20%
DES-2		丙三醇 Glycerol		
DES-3		1,3-丁二醇 Butanediol		
DES-4		果糖 Fructose		
DES-5		木糖醇 Xylitol		
DES-6		葡萄糖 Glucose		
DES-7		尿素 Urea		
DES-8		乳酸 Lactic acid		
DES-9		苹果酸 Malic acid		

1.5 低共熔溶剂种类的筛选

参考文献中的传统溶剂提取方法^[9], 作为总黄酮和总皂苷初步试验考察的提取条件。精确称取 1.0 g 鸡骨草粉末, 分别加入 20 mL 不同类型的低共熔溶剂, 45 °C 下超声提取 60 min, 并以等体积的 50% 乙醇代替其他有机试剂作为对照, 过滤, 待测。

1.6 单因素试验

选定最合适的低共熔溶剂后, 考察低共熔溶剂

组分的摩尔比 (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5) 和含水量 (10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%) 对总黄酮和总皂苷提取效果的影响, 并对提取温度、提取时间和液料比的影响进行初步研究。

1.7 含量测定方法

1.7.1 总黄酮含量的测定

文献报道三乙胺显色法 (TEA 法) 比较适用于芹菜素类黄酮成分的含量测定, 且以芹菜素或其糖

苷做标准品,结果更准确,而鸡骨草中含有丰富的芹菜素类黄酮,因此选用芹菜素做标准品^[9]。将标准品溶液和提取液中分别加入1%的三乙胺-乙醇溶液显色,再利用紫外可见分光光度计于200~600 nm波长进行扫描,对不加显色剂的提取液做相同处理,作样品空白对照。

基于光谱分析结果,参考文献方法进行含量测定^[9,18]。准确量取0.5 mL“1.5”项下所得提取液于10 mL的具塞比色管中,加入5 mL 1%的三乙胺-乙醇溶液作为显色剂,用50%乙醇定容至刻度线,摇匀,溶液呈黄色,以不加显色剂并稀释同等倍数的样品为空白,在400 nm处测吸光度。绘制标准曲线,计算提取液中总黄酮的含量。鸡骨草中总黄酮提取率的计算公式如下:

$$X = C \times V_2 \times V / (m \times V_1)$$

式中,X为鸡骨草中总黄酮提取率(mg/g),C为标准曲线中总黄酮的浓度(mg/mL), V_1 为取样体积(mL), V_2 为稀释体积(mL),V为提取液总体积(mL),m为样品重量(g)。

1.7.2 总皂苷含量的测定

选用熊果酸作标准品,对加入显色剂显色后的标准品溶液和提取液在200~800 nm波长范围扫描,以不加显色剂的提取液作空白对照。依据光谱分析结果,参考文献方法进行含量测定,并略作修改^[10,19]。准确量取0.1 mL“1.5”项下所得提取液于10 mL的具塞比色管中,先后加入0.4 mL 5%的香草醛-冰乙酸溶液,0.8 mL高氯酸,轻轻摇匀,于60℃水浴中加热15 min,接着用冰浴迅速冷却,再用冰乙酸定容至5 mL,摇匀,静置30 min,以不加显

色剂稀释同等倍数的样品为空白,在550 nm处测定吸光度。绘制标准曲线,计算提取液中总皂苷的含量。鸡骨草中总皂苷提取率的计算公式同上。

1.8 试验设计和统计分析

基于单因素实验结果,优选出最适合总黄酮和总皂苷提取的低共熔溶剂及其成分比例、含水量。以提取温度(X_1)、提取时间(X_2)、液料比(X_3)3个主要影响因素为独立变量,以总黄酮的提取率(Y_1)或总皂苷的提取率(Y_2)为响应变量,利用BBD和RSM设计得到三因素三水平试验,其真实值和编码水平分别见表3、表4。

由BBD试验所得数据均采用Design-Expert 8.06进行多元回归分析和方差统计分析。

2 结果与讨论

2.1 紫外可见吸收光谱图

为了验证检测方法及标准品的选择是否准确合适,扫描得到标准品和提取液的紫外可见光谱图。图1A为采用三乙胺显色所得到的芹菜素标准品和提取液的光谱图,如图所示,标准品和提取液在370~450 nm范围内均有一个较高的吸收峰,且 λ_{max} 为400 nm,而样品空白在此波长范围内无吸收峰,说明以芹菜素为标准品的三乙胺显色法适用于鸡骨草中总黄酮的检测,最佳波长为400 nm。图1B为基于香草醛-冰乙酸-高氯酸显色所得的熊果酸标准品和提取液的光谱图,很显然,选择在高波长进行检测时背景干扰可忽略不计,标准品和提取液均在550 nm左右有吸收峰,峰位置一致,说明采用熊果酸作标准品测定鸡骨草中的总皂苷是合适的。

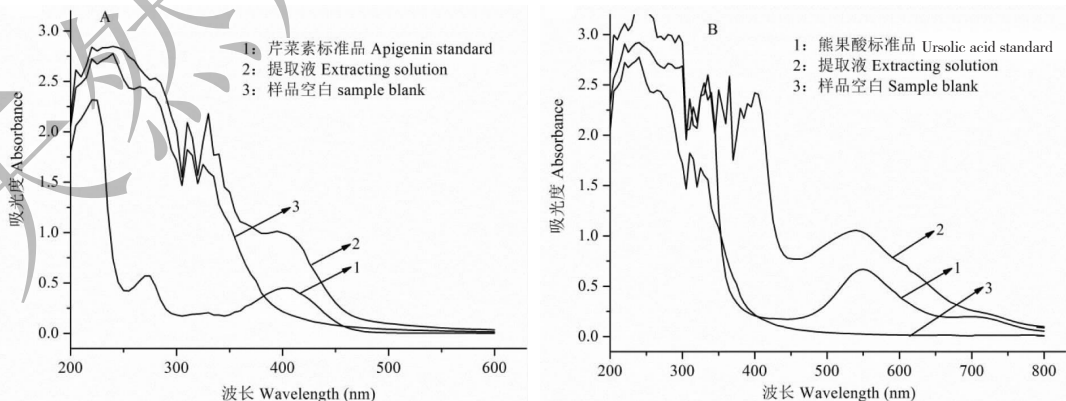


图1 紫外可见吸收光谱图

Fig. 1 Uv-vis absorption spectrum

注:(A)基于三乙胺显色;(B)基于香草醛-冰乙酸-高氯酸显色。Note:(A) color development based on triethylamine;(B) color development based on vanillin-glacial acetic acid-perchloric acid.

2.2 低共熔溶剂的筛选

低共熔溶剂具有独特的性质,如极性可调谐性、黏度可调谐性、增溶能力等,直接影响目标化合物的提取效率,因此选择合适的 DESs 十分重要。但在研究的 9 种 DESs 中,有 4 种 DESs (DES-2, DES-3, DES-4, DES-6) 与测定总皂苷的显色剂之间发生显色反应。最终,采用 9 种 DESs 用于鸡骨草中总黄酮的提取研究,5 种 DESs 用于总皂苷的提取研究,并以 50% 乙醇提取作对照,结果见表 2。

表 2 DESs 对鸡骨草中总黄酮和总皂苷提取率的影响

Table 2 Effects of DESs on the extraction yields of total flavonoids and total saponins from *Abrus cantoniensis* Hance

不同 DESs Different DESs	目标化合物的提取率 Extraction yields of target compound (mg/g)	
	总黄酮 Total flavonoids	总皂苷 Total saponins
	DES-1	4.041
DES-2	3.499	-
DES-3	3.559	-
DES-4	2.807	-
DES-5	2.973	15.37
DES-6	2.912	-
DES-7	3.34	13.83
DES-8	0.997	17.63
DES-9	0.914	17.04
50% 乙醇 Ethanol	3.602	15.71

由表 2 可知,对于黄酮化合物来说,DES-1、DES-2、DES-3 和 DES-7 这 4 种 DESs 拥有较高的提取率,但 DES-8 和 DES-9 的提取效果却很差,低于传统试剂—50% 乙醇。然而,对于皂苷化合物来说,结果却截然相反,DES-8 和 DES-9 的提取效率远高于 50% 乙醇,其次为 DES-1、DES-5,而 DES-7 的提取效果较差。研究的 9 种 DESs 中,以 DES-4、DES-5、DES-9 的黏度最高,其次为 DES-2、DES-3 和 DES-8,黏度最低的是 DES-1、DES-7。由此可见,DESs 的黏度并非是决定提取能力的关键因素。

为了进一步探索低共熔溶剂的性质与提取效率的关系,本实验将不同浓度的乙醇(40%、50%、60%、70%、80%)用于鸡骨草中总黄酮和总皂苷的提取。结果显示,采用 60% 乙醇作提取溶剂时,总黄酮和总皂苷的提取率均达到最大值,说明鸡骨草

中黄酮类和皂苷类化合物的极性相近。因此,若依据“相似相溶”的原理,理论上这几种 DESs 对总黄酮和总皂苷的提取效率具有相似的规律。但实验结果并非如此,说明 DESs 的极性不是影响提取能力的主要因素。

前人研究显示 DESs 主要通过目标物形成分子间氢键和静电作用而增加其溶解度。研究的 9 种 DESs 中,DES1-6 含有大量的羟基,DES-7 含有大量的氨基,DES8-9 含有大量的羧基,均能与黄酮和皂苷化合物形成分子间氢键^[18-20]。黄酮化合物因含有多个苯环结构,形成 $\pi-\pi$ 大共轭体系,具有很高的电子云密度,而 DES 的羧基因 C=O 键的电负性强而具有较高的电子云密度,当二者接近时,电子云会因相互排斥而影响氢键的稳定性;然而皂苷类化合物没有 $\pi-\pi$ 共轭体系,不存在电子云相排斥的问题,且较强电负性的 C=O 有利于氢键的形成,这也可以解释为何含羧基的 DESs 对总黄酮的提取效果最差而对总皂苷的提取效果最好。因此,在筛选溶剂种类时,推测 DESs 的组成和结构是影响提取效率的关键因素而不是黏度或极性。最终选择 DES-1、DES-8 分别作为总黄酮和总皂苷的提取溶剂进行后续研究。

2.3 低共熔溶剂组分摩尔比的影响

DESs 组分的比例会直接影响其物理化学性质,如黏度、极性、表面张力等,从而影响提取效果。因此本实验考察氯化胆碱-乙二醇及氯化胆碱-乳酸的不同摩尔比例分别对总黄酮和总皂苷提取效率的影响,结果见图 2A-B。随着乙二醇比例的增加,总黄酮的提取效率大幅度提高,当氯化胆碱-乙二醇的比例为 1:2 时达到最大值,继续增加乙二醇,提取率反而降低。造成这种现象的原因是,增加乙二醇含量可降低低共熔溶剂的粘度和表面张力,从而增加目标组分的扩散和质量转移能力,改善提取效率;但是,氯化胆碱含量太低却会导致目标组分与低共熔溶剂的相互作用减弱。而氯化胆碱-乳酸的比例对总皂苷提取效率的影响呈相似趋势,并在 1:4 时提取率达到最大值。最终选择氯化胆碱-乙二醇的比例为 1:2,氯化胆碱-乳酸的比例为 1:4 进行后续的试验研究。

2.4 低共熔溶剂含水量的影响

DESs 的含水量是影响目标组分提取效果的重要因素,因此,对不同含水量 DESs 的影响做考察,结果见图 3A-B。当 DESs 的含水量由 10% 上升到

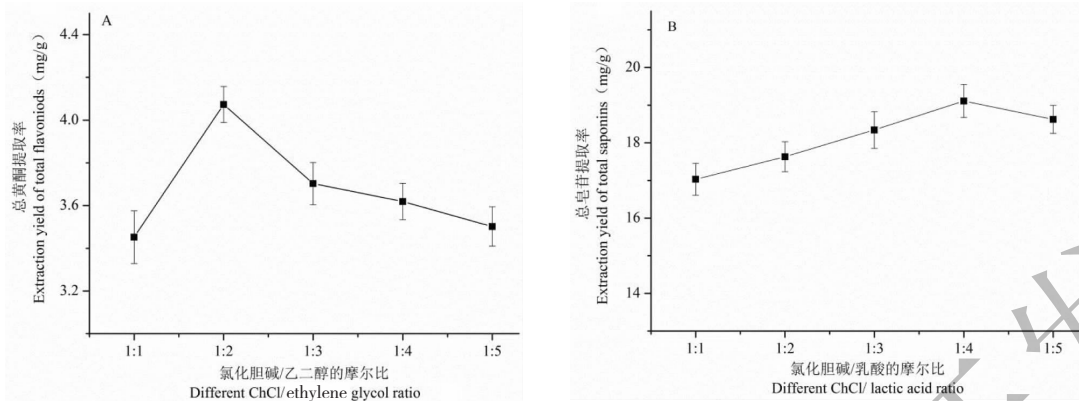


图2 DESs(氯化胆碱/乙二醇、氯化胆碱/乳酸)的组成比例对总黄酮(A)和总皂苷(B)提取率的影响

Fig. 2 Extraction yields of total flavonoids (A) and total saponins (B) using the DESs (ChCl/ethylene glycol and ChCl/lactic acid) with different ratios

40%的过程中,总黄酮和总皂苷提取率均发生显著变化,呈先增加后降低的趋势,并且分别在含水量为30%和25%时达到最大值。这是因为少量水的加入能降低DESs的粘度和增加其极性。因此,适量的水能大大改善总黄酮和总皂苷提取效果。但过量

的水反而会破坏DESs因氢键构建的超分子结构,同时降低DESs与目标组分间的相互作用^[20]。最终,分别选择含水量30%的氯化胆碱-乙二醇和含水量25%的氯化胆碱-乳酸进行后续的试验研究。

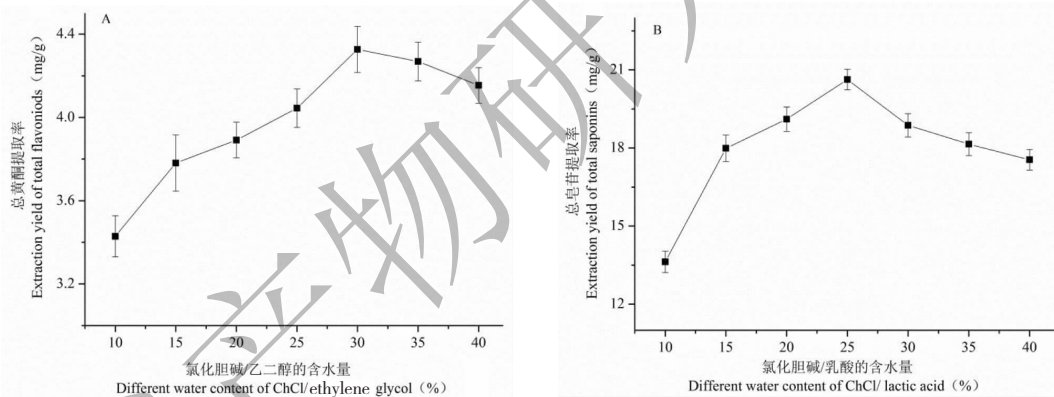


图3 低共熔溶剂(氯化胆碱/乙二醇、氯化胆碱/乳酸)的含水量对总黄酮(A)和总皂苷(B)提取率的影响

Fig. 3 Extraction yields of total flavonoids (A) and total saponins (B) using DESs (ChCl/ethylene glycol and ChCl/lactic acid) with different water content

2.5 提取温度、时间、液料比的影响

初步研究结果显示,这3个因素对总黄酮和总皂苷的提取效率均有一定影响,并且以提取温度影响最明显,因此选用其做星点设计试验研究。

2.6 星点设计试验

2.6.1 总黄酮的BBD试验

基于单因素实验结果,采用BBD和RSM进行试验设计和模型拟合。得到以提取温度(X_1 , °C)、提取时间(X_2 , min)、液料比(X_3 , mL/g)为独立变量,以总黄酮的提取率(Y_1 , mg/g)为响应变量的17个试验,结果见表3。通过对实验数据进行多元回

归分析,得到代表总黄酮提取率的二阶多项式方程:

$$Y_1 = 0.635 + 0.038X_1 - 5.566 \times 10^{-3} X_2 + 0.244 \times 10^{-4} X_3 + 1.494 \times 10^{-4} X_1 X_2 - 8.125 \times 10^{-4} X_1 X_3 + 2.7 \times 10^{-4} X_2 X_3 - 1.233 \times 10^{-4} X_1^2 - 6.763 \times 10^{-5} X_2^2 - 6.202 \times 10^{-3} X_3^2$$

方差分析(ANOVA)被用于评估独立变量和响应变量的关系以及提取方法的最佳条件,结果见表5。模型的F-value为47.08, $P < 0.0001$,说明建立的模型达到极显著水平,具有统计学意义。失拟项(Lack of fit)表示模型预测值与实际值不拟合的概率,其P值为0.2995,说明失拟项不显著,该模型选

表3 总黄酮的星点设计试验条件及结果

Table 3 Experimental conditions and results of BBD for total flavonoids

试验号 No.	因素 Factor			总黄酮提取率 Extraction yield of total flavonoids (mg/g)
	X_1 (°C)	X_2 (min)	X_3 (mL/g)	
1	-1 (40)	-1 (40)	0 (15)	4.234
2	1 (80)	-1 (40)	0 (15)	4.967
3	-1 (40)	1 (80)	0 (15)	4.022
4	1 (80)	1 (80)	0 (15)	5.017
5	-1 (40)	0 (60)	-1 (10)	3.694
6	1 (80)	0 (60)	-1 (10)	4.793
7	-1 (40)	0 (60)	1 (20)	4.224
8	1 (80)	0 (60)	1 (20)	4.965
9	0 (60)	-1 (40)	-1 (10)	4.362
10	0 (60)	1 (80)	-1 (10)	4.324
11	0 (60)	-1 (40)	1 (20)	4.503
12	0 (60)	1 (80)	1 (20)	4.585
13	0 (60)	0 (60)	0 (15)	4.685
14	0 (60)	0 (60)	0 (15)	4.607
15	0 (60)	0 (60)	0 (15)	4.568
16	0 (60)	0 (60)	0 (15)	4.716
17	0 (60)	0 (60)	0 (15)	4.643

择合适。 R^2 为 0.983 7 进一步表明该模型拟合成功。ANOVA 中, P -value 代表各因素对响应值影响的显著性, P 越小,该因素的影响越显著。因此,依据表 5 中数据可知,一次项 X_1 (提取温度)、 X_3 (液料比) 和二次项 X_3^2 对总黄酮提取率的影响均达到极显著水平 ($P < 0.01$),交互项 $X_1 X_3$ 则达到显著水平 ($P < 0.05$),而 X_2 (提取时间) 的影响较小。

三维响应面法能更形象的展示响应值与变量的关系及各变量间的相互影响。图 4A ~ C 为提取温度、提取时间、液料比的交互作用对总黄酮提取效果的影响结果。如图 4A,随着提取温度的升高,总黄酮的提取率大幅度增加,影响十分显著,因为高温能加快 DESs 的渗透作用,促进目标组分从植物体向 DESs 中转移;但改变提取时间,提取率只有微小的变化。如图 4B,液料比在低温下比在高温条件下对总黄酮的提取率的影响更大,说明这 2 种因素相互影响;随着液料比的增加,提取率呈先增加后降低的趋势,这是由于溶剂太少时药材和试剂接触不充分,不利于提取;而溶剂太多会引起其他杂质成分溶出增加,反而降低目标组分的溶出。

考虑到超声提取温度太高时不易控制,且提取

率的增加幅度在高温阶段趋于平缓,而提取时间的影响很小,为节省能源,最终选取提取温度为 80 °C,提取时间为 40 min。

2.6.2 BBD test for 总皂苷

采用 BBD 法,以提取温度 (X_1 , °C)、提取时间 (X_2 , min)、液料比 (X_3 , mL/g) 为独立变量,以总皂苷的提取率 (Y_2 , mg/g) 为响应变量设计 3 因素 3 水平的共 17 个试验,数据结果见表 4。通过对实验数据进行多元回归分析,得到代表总皂苷提取率的二阶多项式方程:

$$Y_2 = -3.464 + 0.204 X_1 + 0.206 X_2 + 0.506 X_3 + 4.375 \times 10^{-5} X_1 X_2 - 1.016 \times 10^{-3} X_1 X_3 - 3.281 \times 10^{-4} X_2 X_3 - 7.797 \times 10^{-4} X_1^2 - 1.489 \times 10^{-3} X_2^2 - 3.689 \times 10^{-3} X_3^2$$

方差分析 (ANOVA) 结果见表 5。模型的 F -value 为 23.77,说明该模型具有统计学意义。模型失拟项的 P 值为 0.425 3,说明失拟项不显著,该模型选择合适。较大的 R_2 值进一步表明该模型拟合成功。 X_1 (提取温度)、 X_3 (液料比)、 X_2^2 、 X_3^2 的 P -value 均小于 0.05,说明这几项对总皂苷的提取率影响显著。

图 4D-F 为提取温度、提取时间、液料比的交互作用对总皂苷提取效果的影响三维响应面图。图 4D 中,随着提取温度的升高,总皂苷的提取率明显提高,并在达到高温后,增幅趋于平缓。图 4E 中,随着液料比的增加,总皂苷的提取率呈先增加后降低的趋势,并且在低温条件下比在高温条件下的变化幅度大。提取时间对提取率的影响也是呈先增加

后降低的趋势,但变化幅度较小,见图 4F。

最终得到总皂苷的最佳提取条件:温度为 80 °C,时间为 64.18 min,液料比 56.12:1。

由图 4A-F 可看出,提取温度、提取时间、液料比及其交互作用对总黄酮和总皂苷提取率影响的趋势相似,各因素的影响显著性:提取温度 > 液料比 > 提取时间。

表 4 总皂苷的星点设计试验条件及结果

Table 4 Experimental conditions and results of BBD for total saponins

试验号 No.	因素 Factor			总皂苷提取率 Extraction yield of total saponins (mg/g)
	X_1 (°C)	X_2 (min)	X_3 (mL/g)	
1	-1(40)	-1(40)	0(50)	23.316
2	1(80)	-1(40)	0(50)	26.061
3	-1(40)	1(80)	0(50)	23.491
4	1(80)	1(80)	0(50)	26.306
5	-1(40)	0(60)	-1(30)	20.886
6	1(80)	0(60)	-1(30)	23.928
7	-1(40)	0(60)	1(70)	24.715
8	1(80)	0(60)	1(70)	26.131
9	0(60)	-1(40)	-1(30)	21.902
10	0(60)	1(80)	-1(30)	23.037
11	0(60)	-1(40)	1(70)	24.488
12	0(60)	1(80)	1(70)	25.101
13	0(60)	0(60)	0(50)	26.201
14	0(60)	0(60)	0(50)	25.117
15	0(60)	0(60)	0(50)	25.729
16	0(60)	0(60)	0(50)	25.956
17	0(60)	0(60)	0(50)	25.502

表 5 总黄酮和总皂苷提取率的二次模型的方差分析数据统计

Table 5 ANOVA statistics of the quadratic model for the extraction yields of total flavonoids and total saponins

来源 Source	总黄酮 Total flavonoids			总皂苷 Total saponins		
	均方 Mean square	F -value	P -value	均方 Mean square	F -value	P -value
模型 (Model)	0.22	47.08	< 0.000 1	4.44	23.77	0.000 2
X_1	1.59	346.66	< 0.000 1	12.55	67.17	< 0.000 1
X_2	1.740E-003	0.38	0.557 5	0.59	3.15	0.119 4
X_3	0.15	33.19	0.000 7	14.26	76.38	< 0.000 1
X_1X_2	0.017	3.74	0.094 4	1.225E-003	6.559E-003	0.937 7
X_1X_3	0.032	6.98	0.033 3	0.66	3.54	0.102 0
X_2X_3	3.600E-003	0.78	0.405 2	0.068	0.36	0.564 9
X_1^2	0.012	2.69	0.145 0	0.41	2.20	0.181 8
X_2^2	3.702E-003	0.81	0.399 0	1.49	7.99	0.025 5
X_3^2	0.12	26.71	0.001 3	9.15	48.96	0.000 2
失拟项 Lack of fit	6.041E-003	1.72	0.299 5	0.20	1.17	0.425 3
R^2	0.983 7			0.968 3		

注: $P < 0.05$, 表示差异显著; $P < 0.01$, 表示差异极显著。

Note: $P < 0.05$, indicated significant difference; $P < 0.01$, indicated extremely significant difference.

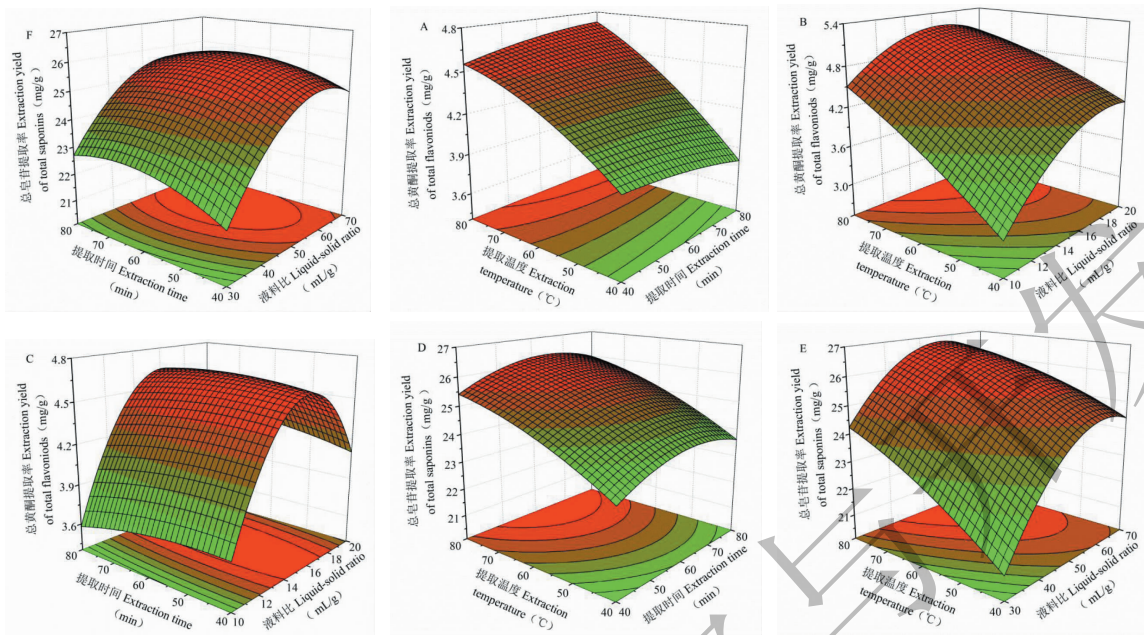


图4 总黄酮(A~C)和总皂苷(D~F)的响应面图

Fig. 4 The response surfaces of total flavonoids (A-C) and total saponins (D-F)

2.7 模型验证

根据建立的数学模型,得到总黄酮的优化提取条件为:提取温度 80 °C、提取时间 40 min、液料比 15.28:1,此条件下预测总黄酮的提取率为 4.956 mg/g;总皂苷的优化提取条件:提取温度 80 °C、提取时间 64.18 min、液料比 56.12:1,此条件下预测总皂苷的提取率为 26.814 mg/g。考虑到实际操作,将提取时间和液料比稍加调整为整数。按优选的工艺条件平行提取 3 次,得到总黄酮和总皂苷的平均提取率分别为 4.967、26.569 mg/g,与预测值十分接近,说明由建立的模型优选工艺条件是合理、可靠的。

2.8 方法对比

将文献报道方法^[9,10]用于鸡骨草中总黄酮(50%乙醇,按液料比 20:1,超声提取 50 min)和总皂苷(50%乙醇,按液料比 25:1,超声提取 25 min)提取,并与本实验优化的条件进行对比。结果,总黄酮和总皂苷的提取率分别提高 33.3%、96.4%。说明本研究建立的方法更加高效、简单,具有较好的应用前景。

3 结论

本实验建立了一种绿色、高效、经济的提取方法。DESs 的性质,如粘度、极性及其组成影响对目标组分的提取率均有影响,而 DESs 的组成和结构在

改善目标组分提取效率中担任重要角色。在研究的 9 种 DESs 中,氯化胆碱-乙二醇和氯化胆碱-乳酸分别是最适用于总黄酮和总皂苷的提取溶剂。采用单因素试验,结合星点设计和响应面法能快速、准确筛选出工艺参数;总黄酮的最佳提取条件:摩尔比为 1:2、含水量为 30% 的氯化胆碱-乙二醇作溶剂,提取温度 80 °C,提取时间 40 min,液料比 15:1;总皂苷的最佳提取条件:摩尔比为 1:4、含水量为 25% 的氯化胆碱-乳酸作溶剂,提取温度 80 °C,提取时间 64 min,液料比 56:1。结果显示,与传统有机试剂提取方法相比,DESs 拥有明显优势,总黄酮和总皂苷的提取率分别提高 33.3%、96.4%。DESs 有望应用于更多植物源中生物活性成分的研究。

参考文献

- 1 Zeng Q, Xie H, Song HJ, et al. In vivo wound healing activity of *Abrus cantoniensis* extract [J]. Evid-Based Compl Alt, 2016;1-7.
- 2 Hong XW, Chen HL, Li QY, et al. Research progress on the prevention and treatment of fatty liver disease of *Abrus cantoniensis* Hance [J]. J Chin Med Mat (中药材), 2014, 37: 1491-1494.
- 3 Miyanoi H, Sakai Y, Takeshita T, et al. Triterpene saponins from *Abrus cantoniensis* (Leguminosae). II. Characterization of six new saponins having a branched-chain sugar [J]. Chem

- Pharm Bull, 1996, 44: 1228-1231.
- 4 Xu KX, Jia ZY, Wang BL, et al. Research progress on the chemical ingredients of *Abrus cantoniensis* hance [J]. J Liaoning University of TCM (辽宁中医药大学学报), 2017, 19: 125-129.
 - 5 Yang M, Shen Q, Li LQ, et al. Phytochemical profiles, antioxidant activities of functional herb *Abrus cantoniensis* and *Abrus mollis* [J]. Food Chem, 2015, 177: 304-312.
 - 6 Verspohl EJ, Fujii H, Homma K, et al. Testing of *Perilla frutescens* extract and vicenin 2 for their antispasmodic effect [J]. Phytomedicine, 2013, 20: 427-431.
 - 7 Nagaprashantha LD, Vatsyayan R, Singhal J, et al. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82: 1100-1109.
 - 8 Xu HB, Li B, Tang ZS, et al. Optimization of extraction of total flavonoids from *Hovenia acerba* and its xanthine oxidase inhibitory activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 595-600.
 - 9 Yuan XJ, Zhang P, Wu YH, et al. Determination of total flavonoids in *Abrus mollis* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2015, 21(11): 80-84.
 - 10 Liao CY, Huang M, Huang Y, et al. Ultrasonic-assisted extraction process of total saponins from *Abrus cantoniensis* [J]. Northern Horticul (北方园艺), 2013, 3: 161-163.
 - 11 Gao H, Zhang LZ, Jiao MY, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction process of total saponins in *Semen juglandis* by response surface methodology [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2019, 40: 105-109.
 - 12 Abbott AP, Capper G, Davies DL, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [J]. Chem Commun, 2003, 9(1): 70-71.
 - 13 Huang Y, Feng F, Jiang J, et al. Green and efficient extraction of rutin from *Tartary buckwheat* hull by using natural deep eutectic solvents [J]. Food Chem, 2017, 221: 1400-1405.
 - 14 Zhao BY, Xu P, Yang FX, et al. Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica* [J]. ACS Sustainable Chem Eng, 2015, 3: 2746-2755.
 - 15 Dai YT, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*) [J]. Food Chem, 2014, 159: 116-121.
 - 16 Dai YT, 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: 50-56.
 - 17 Bubalo MC, Curko N, Tomašević M, et al. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents [J]. Food Chem, 2016, 200: 159-166.
 - 18 Liu ZW, Que ZL, Ye ZW, et al. Chemical constituents from the aerial parts of *Abrus mollis* [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2008, 6: 415-417.
 - 19 Lai HF, Deng QF. Optimization of extraction technology for total triterpene acids from *Abri Herba* by semi-bionic method [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2013, 19(24): 46-48.
 - 20 Dai YT, Witkamp GJ, Verpoorte R, et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications [J]. Food Chem, 2015, 187(15): 14-19.