

超声辅助深共晶溶剂高效提取枳实辛弗林的工艺优化及提取动力学分析

邵林子, 程玉娇*, 黄林华, 谈安群, 王 华

西南大学中国农业科学院柑桔研究所 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712

摘要:为了研究超声辅助深共晶溶剂提取枳实辛弗林的最佳工艺条件及该提取过程的传质动力学模型,本研究采用Plackett-Burman试验、最陡爬坡试验结合Box-Behnken响应面法对超声辅助深共晶溶剂提取枳实辛弗林的关键工艺参数进行优化,基于Fick第二定律建立超声辅助深共晶溶剂提取枳实辛弗林的提取动力学模型,通过测定在不同功率、不同提取时间下提取液中的辛弗林的质量浓度,对模型进行拟合验证,求解相应的动力学参数。结果表明,最优提取溶媒为一水甜菜碱-乳酸组成的深共晶溶剂(摩尔比1:3,含水量50%),最佳工艺为:液料比39 mL/g,超声功率220 W,超声时间20 min,在此条件下,辛弗林得率为0.4284%,与模型预测值接近,且优于传统水回流提取法、85%乙醇回流提取法、超声辅助14%乙醇提取法、超声辅助70%甲醇提取法和超声辅助水提法。对动力学实验数据拟合得到的动力学一般方程和指数方程与动力学模型相关性良好,推算出了相应的速率常数、相对萃余率等动力学相关参数,拟合得到了半衰期和有效扩散系数回归方程,为枳实辛弗林的提取工艺优化和深入理论研究提供数据参考。

关键词:枳实;辛弗林;深共晶溶剂;动力学模型;超声辅助提取

中图分类号:TS209

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)3-0499-14

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.3.013

Optimization of ultrasonic assisted deep eutectic solvent extraction process and extraction kinetics analysis of synephrine from Aurantii Fructus Immaturus

SHAO Lin-zi, CHENG Yu-jiao*, HUANG Lin-hua, TAN An-qun, WANG Hua*

Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Citrus Engineering Technology Research Center, Southwest University, Chongqing 400712, China

Abstract: To study the optimal process conditions and the mass transfer kinetic model of the extraction process, the Plackett Burman test, the steepest climbing test and the Box Behnken response surface method were used to optimize the key process parameters of ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction of synephrine from Aurantii Fructus Immaturus. Based on Fick's second law, the extraction kinetic model was established for the extraction of synephrine from Aurantii Fructus Immaturus with ultrasonic assisted deep eutectic solvent extraction. By measuring the mass concentration of synephrine in the extraction solution at different power and extraction time, the model was fitted and verified, and the corresponding kinetic parameters were solved. The results showed that the optimal extraction solvent was the deep eutectic solvent composed of betaine monohydrate and lactic acid (molar ratio 1:3, water content 50%). The optimal process was as follows: the liquid material ratio was 39 mL/g, ultrasonic power was 220 W, ultrasonic time was 20 min. Under these conditions, the yield of synephrine was 0.4284%, which was close to the predicted value of the model, and better than the traditional water reflux extraction method, 85% ethanol reflux extraction method, ultrasonic assisted 14% ethanol extraction method, ultrasound assisted 70% methanol extraction method and ultrasound-assisted water extraction method. The kinetic general equation and exponential equation ob-

收稿日期:2023-07-03 接受日期:2023-10-17

基金项目:浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2022C02012);国家自然科学基金青年基金(32101891);国家重点研发计划(2021YFD1600804)

*通信作者 E-mail:chengyujiao1@cric.cn;wanghua@cric.cn

tained by fitting the kinetic experimental data have a good correlation with the kinetic model. The corresponding kinetic parameters such as rate constant, relative extraction rate were calculated, and the regression equation of half-life and effective diffusion coefficient has been obtained by fitting, which provides data reference for the optimization of the extraction process and in-depth theoretical research of Aurantii Fructus Immaturus.

Key words: Aurantii Fructus Immaturus; synephrine; deep eutectic solvent; kinetics model; ultrasound assisted extraction

枳实作为我国传统中药材应用广泛且历史悠久,在许多经典名方中常与其他药材配伍使用,有破气消积、化痰散痞的功效^[1],现代药理学发现枳实的标志性生物活性成分主要为所属生物碱类的辛弗林,其存在3种异构体,即p-辛弗林(对位)、m-辛弗林(间位)和o-辛弗林(邻位),其结构式如图1所示,但天然存在于植物中且含量最高的主要是p-辛

弗林^[2]。美国等西方国家通常将辛弗林应用于减肥产品,在南非,它被用于治疗失眠、焦虑和癫痫等疾病。辛弗林还具有调节机体糖脂代谢^[3]、抗抑郁^[4]、改善胃肠道功能^[5]、抗癌^[6]等众多生理活性,除此之外,辛弗林对帕金森症^[7]、脱发^[8]的治疗也表现出巨大潜力。



图1 辛弗林的结构

Fig. 1 Structures of synephrine

目前,传统有机溶剂如甲醇、乙醇、氯仿和乙酸乙酯被广泛用于从植物中提取天然活性化合物,然而,这通常存在能耗高、污染环境和溶剂残留等固有缺陷,因此寻找新型高效的绿色溶剂应用于天然活性物质的提取显得十分必要。随着绿色提取概念的提出,深共晶溶剂(deep eutectic solvents, DES)在2003年被首次提出并将其定义为以氢键供体(hydrogen-bond acceptor, HBA)和氢键受体(hydrogen-bond donor, HBD)共同组成的混合物,二者主要通过氢键和范德华力结合在一起^[9]。DES因其价格低廉、配比灵活、低毒性、可回收和环境友好等特点而被应用于多个领域,如催化化学、电化学、材料化学、生物化学、生物学和有机合成^[10,11]。另外DES作为新型环保溶剂用于天然生物活性物质的提取已有多篇文献报道,对黄酮^[12,13]、多糖^[14]、酚酸^[12]、生物碱^[15]、皂苷和蒽醌^[12,13]等天然活性化合物均具有优良的提取效率。DES作为提取溶剂应用于提取枳实或枳壳中活性物质的研究虽已有少量文献报道^[16,17],但目前用于提取枳实、枳壳活性物质的DES种类较少,提取的目标物质也局限于黄酮类,还未见超声辅助DES提取枳实辛弗林的研究报道。

本研究以重庆潼南枳实为原料,首次提出以DES代替传统有机溶剂超声辅助提取枳实中辛弗林

的方法。制备DES时HBA选择常用的氯化胆碱和甜菜碱,HBD包含糖基类、醇基类、酰胺类和有机酸类,以筛选出提取效果最佳的DES。系统优化了液料比、提取时间和超声功率等工艺参数,并对枳实辛弗林提取过程进行初步的动力学分析,建立超声辅助深共晶提取枳实辛弗林的动力学模型,为DES的应用拓展和枳实辛弗林的提取工艺优化提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

枳实于2022年6月采自重庆潼南玮益大健康产业有限公司,由西南大学柑桔研究所王华研究员鉴定为芸香科柑橘属植物酸橙(*Citrus aurantium* L.)干燥幼果。

辛弗林(分析对照品, HPLC $\geq 98\%$)(色谱级, Solarbio公司, 批号719B021);甲醇、磷酸、十二烷基磺酸钠(色谱级, 上海麦克林生化科技有限公司, 批号:C13236982、C15587487、C12475132);一水甜菜碱、果糖、木糖醇、山梨糖醇、1,4-丁二醇、乙酰胺(分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司, 批号:C15119883、C15587450、C14528338、C14526881、C10375005、C14334228);氯化胆碱(分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司、批号:F2205152);葡

葡萄糖、蔗糖、乙二醇、丙三醇、尿素、柠檬酸、乳酸、草酸(分析纯,成都市科隆化学品有限公司,批号:2018110101、2019060101、2019061001、2016041101、2019060101、2017093001、2022120601、2017110101);尼罗红、苹果酸(分析纯,上海源叶生物科技有限公司,批号:M18HS175211、C02N9M74070);醋酸、甲醇、乙醇(分析纯,重庆川东化工有限公司,批号:20190701、20211201、20211001)。

1.1.2 仪器与设备

DP-800 超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司);Ultimate3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司);S230 Seven Compact 电导率仪(梅特勒-托利多

仪器上海有限公司);PHSJ-3F 雷磁 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);NDJ-79 型旋转粘度计(上海昌吉地质仪器有限公司);cary50 紫外分光光度计(美国 Agilent 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 DES 制备

采用直接加热法合成 DES,按照表 1 设定的摩尔比准确称取 HBA 和 HBD 于烧杯中,将其保持在 80~85 °C 条件下搅拌 2 h 左右,直至形成透明液体,必要时添加一定量的水以降低粘度,冷却至室温后备用。

表 1 深共晶溶剂的制备

Table 1 Preparation of deep eutectic solvent

编号 NO.	HBA	HBD	摩尔比 Molar ratio	含水量 Water content (W/W)	状态(室温) State (room temperature)
DES1	氯化胆碱	糖基类	葡萄糖	2:3 ^[16]	37.5%
DES 2			蔗糖	2:1 ^[18]	45%
DES 3			果糖	1:2 ^[15]	23%
DES 4	氯化胆碱	醇基类	木糖醇	1:2 ^[16]	23%
DES 5			山梨糖醇	2:3 ^[16]	23%
DES 6			乙二醇	1:5 ^[16]	23%
DES 7			1,4-丁二醇	1:2 ^[17]	23%
DES 8			丙三醇	1:2 ^[17]	23%
DES 9	氯化胆碱	酰胺类	尿素	2:5 ^[16]	23%
DES 10			乙酰胺	1:1 ^[12]	23%
DES 11	氯化胆碱	有机酸类	柠檬酸	2:1 ^[12]	23%
DES 12			乳酸	1:4 ^[16]	23%
DES 13			醋酸	1:2 ^[17]	23%
DES 14			苹果酸	3:2 ^[19]	23%
DES 15	一水甜菜碱	糖基类	蔗糖	2:1 ^[12]	45%
DES 16	一水甜菜碱	醇基类	乙二醇	1:2 ^[12]	23%
DES 17			丙三醇	1:4 ^[16]	23%
DES 18	一水甜菜碱	酰胺类	乙酰胺	1:2 ^[15]	23%
DES 19	一水甜菜碱	有机酸类	乳酸	1:2 ^[15]	23%
DES 20			草酸	2:3 ^[16]	23%

1.2.2 DES 理化性质测定 对制备好的 DES 测定相关理化指标:极性、粘度、pH、电导率、密度。

参照 Fu 等^[20]的方法,使用尼罗红染料作为溶剂显色探针,添加到 DES 中,在 400~800 nm 波长下光谱扫描,记录最大吸收波长,公式(1)用于计算尼罗红极性参数 E_{NR} 。

$$E_{NR} = \frac{h \cdot c \cdot N_A}{\lambda_{max}} = \frac{2858}{\lambda_{max}} \quad (1)$$

式中: E_{NR} 为尼罗红极性参数,kcal/mol; h 为普

朗克常数; c 为真空光速,m/s; N_A 为阿伏加德罗常数; λ_{max} 为最大紫外吸收波长。

使用旋转粘度计在室温下测定 DES 的粘度;使用 pH 计在室温下测量 DES 的 pH;使用电导率仪在室温下测量 DES 的电导率;采用等体积法测定 DES 的密度。

1.2.3 供试液的制备

精密称取 0.1 g 枳实粉末,按照一定的料液比(1:10~1:300)加入 DES,摇匀使其充分混合后,在

80~480 W 的功率(超声频率为 25 kHz)下超声 10~90 min, 超声结束后以 9 000 r/min 的转速离心 5 min, 上清液用蒸馏水稀释 10 倍后通过 0.22 μm 尼龙滤膜进行 HPLC 分析。每组试验 3 个平行, 取其平均值。

1.2.4 辛弗林含量测定

1.2.4.1 色谱条件

参照 Long^[21] 的测定方法并稍作修改: 色谱柱: ODS-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 流速: 1.00 mL/min; DAD 检测器; 进样量 20 μL; 流动相为甲醇:水相(含 0.06% 磷酸和 0.06% 十二烷基磺酸钠)(58:42); 检测波长: 225 nm。

1.2.4.2 标准曲线绘制

精密称取辛弗林 146 mg, 置 1 000 mL 容量瓶中, 50% 甲醇溶液溶解, 定容, 混匀, 得 146 μg/mL 的辛弗林标准储备液。将储备液逐级稀释为 0.365、3.65、7.3、14.6、29.2 和 36.6 μg/mL 的标准品溶液, 摆匀过 0.22 μm 尼龙滤膜后按上述色谱条件进行 HPLC 测定, 记录对应的色谱峰面积。以混合标准品的质量浓度为横坐标 x , 峰面积为纵坐标 y 绘制标准曲线, 得辛弗林的回归方程: $y = 1.103x + 0.144$, $R^2 = 0.9998$ 。

1.2.4.3 辛弗林得率的计算

枳实中辛弗林得率按公式(2)计算:

$$Y = \frac{C \times V \times N}{M \times 10^6} \times 100\% \quad (2)$$

式中: C —供试液的浓度, μg/mL; V —提取溶剂的体积, mL; N —稀释倍数, 10; M —枳实质量, g。

1.2.4.4 数据分析

实验设计与数据处理、绘图采用 OriginPro 2023、Excel 2019、SPSS 26.0、Design-Expert 13.0 和 ChemDraw 20.0 等软件; 所有样品平行试验三次, 结果取其平均值。

1.2.5 DES 的筛选

精密称取枳实粉末 0.1 g 于 50 mL 离心管中, 分别加入 20 种自制 DES 10 mL, 将其置于超声波清洗器中, 设定超声功率为 320 W, 在室温下超声 30 min。超声完成后, 离心, 取上清液过滤进行辛弗林含量测定。筛选出萃取效果最佳的 DES 后, 进一步优化 HBA/HBD 的摩尔比(1:0.5~1:4)和含水量(10%~60%), 确定 DES 各组分的最佳比例, 在此基础上进行后续的提取工艺优化实验。

1.2.6 提取工艺优化

1.2.6.1 单因素试验

按照“1.2.3”的提取方法分别考察不同液料比(10、20、50、100、150、200、300 mL/g)、提取时间(10、20、30、40、50、60 min)、超声功率(160、240、320、400、480 W)和提取温度(30、40、50、60 °C)对枳实辛弗林的提取效果。

1.2.6.2 Plackett-Burman 实验

在单因素实验的基础上, 对每个因素取高(1)、低(-1)2 种水平, 考察每种因素的影响水平及显著性, 选择对辛弗林得率有显著影响的因素进行响应面设计。

1.2.6.3 最陡爬坡实验

根据 Plackett-Burman 实验选择显著影响辛弗林得率的因素, 根据各因素的正负效应, 设置合适的步长和爬坡方向, 有效选择各因素具有最大响应值的水平范围。

1.2.6.4 响应面分析设计

基于 Plackett-Burman 实验结果, 选取对辛弗林得率影响较大的液料比、超声功率、提取时间三个因素作为自变量, 以枳实辛弗林得率为响应值, 采用 Design-Expert 13.0 软件中的 Box-Behnken 模式对其进行工艺优化: 3 因素 3 水平 3 中心点, 共 17 次试验。

1.2.7 超声提取枳实中辛弗林过程的动力学模型

与大部分中药活性成分的提取过程一样, 本研究中枳实辛弗林的提取过程实质是辛弗林从药材细胞扩散至 DES 的传质过程, 随着提取时间的延长, 枳实内部的辛弗林含量不断减少, 这是一个非稳态扩散过程, 因此本研究基于 Fick 第二定律对枳实辛弗林的提取动力学进行探讨。为了便于后续研究, 作以下假设: ① 枳实粉末为大小均匀的球状颗粒; ② 辛弗林在枳实颗粒内部分布均匀且扩散方向为径向; ③ 枳实颗粒在溶剂中分布均匀且与溶剂温度保持一致; ④ 枳实颗粒表面的传质阻力为 0。

设定枳实颗粒半径为 R ; 枳实颗粒与溶剂的接触面积为 S ; 枳实颗粒内部距表面 r 处在任意时刻 t 的辛弗林浓度为 C ; 超声影响下的提取扩散系数为 D_u ; 枳实辛弗林分子本身的扩散系数为 D_0 ; 辛弗林初始浓度为 C_0 , 平衡浓度为 C_∞ 。模型表达式的具体推导过程可参考 Gu 等^[22] 对三七药渣中多糖提取动力学模型的建立。超声辅助 DES 提取枳实辛弗林的动力学过程表达式如式(3)所示。

$$\ln\left(\frac{C_\infty}{C_\infty - C_0}\right) = kt + \ln\left[\frac{\pi C_\infty}{6(C_\infty - C_0)}\right], \text{ 其中 } k = \frac{\pi^2(D_0 + D_u)}{R^2} \quad (3)$$

但由于在超声辅助提取过程中 $D_u > D_0$, 故 $D_s = D_0 + D_u \approx D_u$, 即有:

$$\ln\left(\frac{C_\infty}{C_\infty - C_0}\right) = kt + \ln\left[\frac{\pi C_\infty}{6(C_\infty - C_0)}\right], \text{ 其中 } k = \frac{\pi^2 D_u}{R^2} \quad (4)$$

公式(4)即为超声作用下枳实辛弗林的提取动力学模型,该式可反映颗粒半径、温度、提取时间与辛弗林浓度间的关系。

1.2.8 超声提取枳实中辛弗林过程的动力学分析

在单因素实验的基础上,测定在不同功率(160、200、240、280、320 W)、不同时间下提取液中辛弗林浓度,以验证所推导的动力学模型对该提取体系的适用性,计算提取速率常数、相对萃余率、半衰期及有效扩散系数等动力学参数。

2 结果与分析

2.1 DES 的筛选

制备的 20 种 DES 相关理化指标见表 2, 体系的组成对 DES 电导率的影响有显著差异, DES 体系表现出比水更高的密度。一般情况下,物质的溶解性可根据极性的“相似相溶”原理来判定, E_{NR} 值可反映 DES 的极性大小, E_{NR} 值越小, 极性越大。溶剂的粘度是影响目标物质提取效果的重要因素,降低溶

剂粘度可获得更快的传质速率。由于辛弗林分子结构中同时存在酚羟基和氨基,故具有两性性质,与酸碱均能结合成盐,因此 DES 的 pH 也会显著影响辛弗林提取效果。

DES 的种类、摩尔比和含水量对辛弗林得率的影响如图 2 所示。从图 2a 可知,70% 甲醇的辛弗林得率为 0.341 9%, DES16、DES17、DES18、DES19 的辛弗林得率分别为 0.396 9%、0.390 8%、0.376 9% 和 0.400 4%, 提取效果均显著优于 70% 甲醇, 四种 DES 均具有强极性、低粘度的特点。尽管 DES11 ~ DES14 的 pH 低于 DES19, 但由于粘度的影响而限制了对辛弗林的提取效果。最后选择提取效果最好的 DES19 作为提取溶媒从枳实中提取辛弗林, 进一步考察 DES19 摩尔比和含水量对提取效果的影响。由图 2b 可知, 当一水甜菜碱:乳酸的摩尔比为 1:3 时, 辛弗林得率最高。从图 2c 可知, 含水量对辛弗林得率的整体趋势为随着含水量的增多先上升后下降。这可能是因为水的加入可显著降低粘度从而获得更快的传质速率^[10]。然而, 过量的水会破坏 DES 的氢键网络结构, 导致目标化合物的萃取率降低^[16]。因此, 选择含水量为 50% 的一水甜菜碱: 乳酸(1:3)作为后续实验的提取溶剂。

表 2 20 种 DES 的极性参数、粘度、pH、电导率和密度

Table 2 Polarity parameters, viscosity, pH, conductivity, and density of 20 DES

编号 No.	E_{NR} (kcal/mol)	粘度 Viscosity (mPa·s)	pH	电导率 Conductivity (ms/cm)	密度 Density (g/mL)
DES1	67.36	15.00	6.66	169.600	1.199
DES2	47.83	6.62	7.56	225.000	1.175
DES3	48.26	170.00	6.22	25.500	1.270
DES4	48.94	45.00	7.15	53.400	1.228
DES5	48.92	68.10	4.08	37.900	1.238
DES6	49.21	10.55	4.19	165.800	1.095
DES7	49.57	23.30	5.38	108.200	1.055
DES8	49.02	22.50	4.27	130.200	1.149
DES9	49.07	11.40	8.19	302.000	1.155
DES10	49.95	16.00	5.95	222.000	1.085
DES11	47.81	77.00	0.63	80.800	1.201
DES12	48.04	35.10	0.78	142.800	1.145
DES13	48.89	29.90	1.54	259.000	1.092
DES14	47.90	30.80	0.80	155.300	1.184
DES15	53.03	10.00	6.75	0.391	1.176
DES16	49.64	12.20	7.97	0.037	1.109
DES17	48.99	29.00	7.35	0.054	1.177
DES18	49.92	12.40	6.21	5.620	1.089
DES19	49.07	18.20	3.40	22.600	1.161
DES20	44.64	23.90	1.40	234.000	1.234

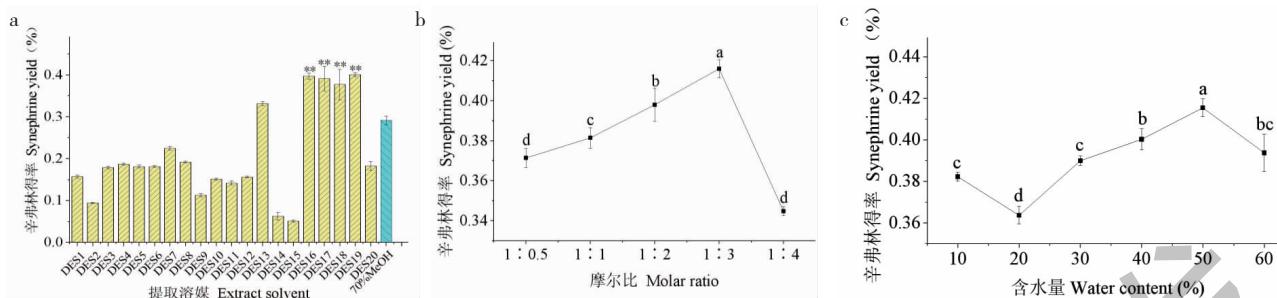


图 2 提取溶剂对枳实辛弗林得率的影响

Fig. 2 Effects of extraction solvents on the yield of synephrine from *Aurantii Fructus Immaturus*

注:在图 2a 中,与 70% 甲醇作比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 在图 2b、2c 中,不同小写字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。Note: In Fig. 2a, compared with 70% methanol, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; In Fig. 2b and 2c, different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.2 提取工艺优化

2.2.1 单因素实验

液料比是影响萃取工艺运行成本的主要参数,液料比过高会造成溶剂浪费,增加工艺成本。由图 3a 可知,液料比为 50 g/mL 时辛弗林得率达到最高。由图 3b 可知,随着超声功率的增大,辛弗林得率呈现先升高后降低的趋势。适当的超声功率可有

效破碎枳实细胞壁,利于目标物质的溶出。当超声功率大于 240 W 时,辛弗林得率随超声功率增强而降低,这可能是由于强烈的超声波作用和/或热效应导致已溶出的目标物质发生降解^[17]。因此,选择超声波功率 240 W 较为适宜。由图 3c 可知,提取时间为 20 min 时,辛弗林得率最高。随着提取时间的延长,辛弗林得率先上升后下降。这是因为破碎枳实

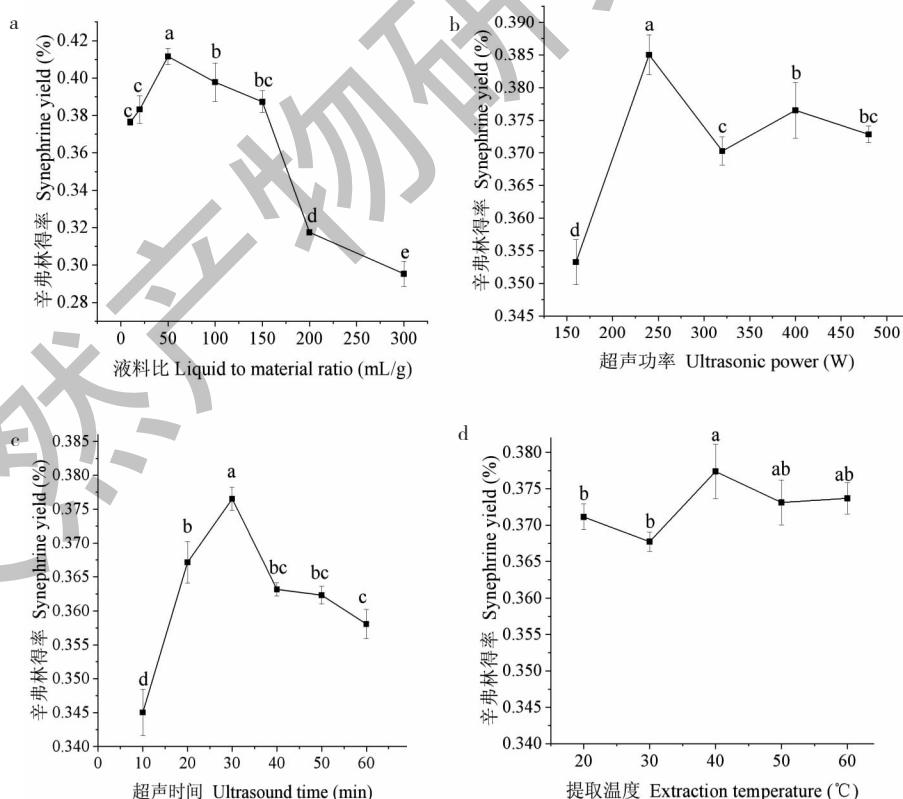


图 3 不同样单因素对枳实辛弗林得率的影响

Fig. 3 Effects of different single factors on the yield of synephrine from *Aurantii Fructus Immaturus*

注:不同小写字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

细胞壁需要一定的时间,但长时间的超声波作用可能会破坏已经溶出的目标物质,从而导致得率降低。因此,超声时间选择 20 min 较为适宜。由图 3d 可知,在所设的温度范围内,辛弗林得率在 40 ℃处最高,这可能是因为提高温度可降低 DES 粘度,但过高的温度会降解目标物质。在提取过程中由于超声热效应会导致温度升高,设定温度与实际温度存在偏差,因此出现部分实验误差范围波动较大的现象。

2.2.2 Plackett-Burman 实验

在单因素实验基础上,利用 Plackett-Burman 实验筛选出显著影响因素,实验设计及结果见表 3,对数据进行回归分析,其分析结果见表 4,得到 4 个因素和响应值辛弗林得率的回归方程: $Y = 0.3935 + 0.0113A - 0.0069B + 0.0071C - 0.0044D$, 其中液料比、超声功率和超声时间均为显著性正效应因素,提取温度对辛弗林得率的影响无显著性。

表 3 Plackett-Burman 实验设计与结果

Table 3 Plackett Burman Experimental Design and Results

实验号 No.	A 液料比 Liquid to material ratio (mL/g)	B 功率 Power (W)	C 时间 Time (min)	D 温度 Temperature (℃)	得率 Yield (%)
1	20	320	30	30	0.4014
2	20	160	30	50	0.3699
3	100	160	30	50	0.4099
4	100	320	10	50	0.3996
5	20	160	10	30	0.3671
6	100	320	30	30	0.4166
7	100	160	10	30	0.4051
8	100	160	30	30	0.4052
9	20	320	30	50	0.4006
10	100	320	10	50	0.3924
11	20	320	10	30	0.3918
12	20	160	10	50	0.3625

表 4 Plackett-Burman 实验影响因子的显著性分析

Table 4 Significance analysis of influencing factors in Plackett Burman experiment

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	0.0029	4	0.0007	10.03	0.005	**
A	0.0015	1	0.0015	20.93	0.0026	**
B	0.0006	1	0.0006	7.80	0.0268	**
C	0.0006	1	0.0006	8.26	0.0239	**
D	0.0002	1	0.00032	3.12	0.1208	-
残差 Residual	0.0005	7	0.0001	-	-	-
失拟项 Lack of fit	0.0005	6	0.0001	3.12	0.408	-
总离差 Cor total	0.0034	11	-	-	-	-

$$R^2 = 0.8514; \text{Adj } R^2 = 0.7665; \text{Pred } R^2 = 0.5633; \text{Adeq Precisior} = 10.7392; \text{CV} = 2.17\%$$

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2.3 最陡爬坡实验

在 Plackett-Burman 实验结果基础上,选择 A(液

料比)、B(超声功率)、C(超声时间)三个显著因素进行正向爬坡,最陡爬坡实验设计及结果见表 5,随

着三个显著因素逐渐增大,辛弗林得率呈先升高后

试验的中心点。

降低的整体趋势。因此,选取试验组 2 作为响应面

表 5 最陡爬坡实验设计及结果

Table 5 Design and results of the steepest climbing experiment

实验号 No.	A 液料比 Liquid to material ratio (mL/g)	B 功率 Power (W)	C 时间 Time (min)	Y 得率 Yield (%)
1	30	200	15	0.409 9
2	40	220	20	0.413 5
3	50	240	25	0.396 1
4	60	260	30	0.388 5
5	70	280	35	0.392 5
6	80	300	40	0.358 4

2.2.4 响应面分析

根据 Plackett-Burman 实验和最陡爬坡实验确定关键变量及水平,选取对辛弗林得率影响较大的 A(液料比)、B(超声功率)、C(超声时间)三个因素

作为自变量,以辛弗林得率为响应值,采用 Design-Expert 13.0 软件中的 Box-Behnken 模式对其进行工艺优化:3 因素 3 水平 3 中心点,共 17 次试验,重复 3 次,Box-Behnken 设计及实验结果见表 6。

表 6 Box-Behnken 设计及实验结果

Table 6 Box-Behnken experimental results

实验号 No.	A (mL/g)	B (W)	C (min)	Y (%)
1	40	220	20	0.422 5
2	40	240	15	0.343 9
3	40	220	20	0.425 8
4	50	240	20	0.325 0
5	50	220	15	0.349 6
6	40	240	25	0.376 0
7	50	220	25	0.362 7
8	30	200	20	0.361 9
9	30	240	20	0.382 2
10	40	200	15	0.377 8
11	50	200	20	0.376 5
12	40	220	20	0.420 9
13	40	220	20	0.421 0
14	40	220	20	0.421 3
15	30	220	25	0.370 1
16	30	220	15	0.370 4
17	40	200	25	0.374 1

根据表 6 的实验结果,对实验数据进行回归线性分析,得回归方程: $Y(\%) = 0.422 3 - 0.008 8A - 0.007 9B + 0.005 2C - 0.017 9AB + 0.003 4AC +$

$0.009BC - 0.032 8A^2 - 0.028 1B^2 - 0.026 3C^2$,其方差分析结果见表 7。

回归模型相关系数 $R^2 = 0.995 1$,矫正决定系数

表 7 拟合回归模型的方差分析
Table 7 Analysis of variance for the fitting regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> -value	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	显著性 Significance
模型 Model	0.015	9	0.001 7	158.87	< 0.000 1	**
<i>A</i>	0.000 6	1	0.000 6	59.71	0.000 1	**
<i>B</i>	0.000 5	1	0.000 5	47.54	0.000 2	**
<i>C</i>	0.000 2	1	0.000 2	20.25	0.002 8	**
<i>AB</i>	0.001 3	1	0.001 3	122.82	< 0.000 1	**
<i>AC</i>	0.000 0	1	0.000 0	4.28	0.077 4	**
<i>BC</i>	0.000 3	1	0.000 3	30.53	0.000 9	**
<i>A</i> ²	0.004 5	1	0.004 5	432.34	< 0.000 1	**
<i>B</i> ²	0.003 3	1	0.003 3	316.27	< 0.000 1	**
<i>C</i> ²	0.002 9	1	0.002 9	277.01	< 0.000 1	**
残差 Residual	0.0001	7	0.000 0	-	-	-
失拟项 Lack of fit	0.0001	3	0.000 0	4.45	0.091 7	-
纯误差 Pure error	0.000 0	4	4.235E-06	-	-	-
总离差 Cor total	0.015 1	16	-	-	-	-

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

$\text{Adj } R^2 = 0.988\ 9$, 变异系数 $\text{CV} = 0.849\ 6\%$, 说明模型相关度良好。通过 *P* 值判定模型显著、失拟项不显著, 说明该模型稳定性好, 实验误差小。根据显著性标准, 一次项 *A*、*B*、*C*, 交互项 *AB*、*AC*、*BC* 和二次项 *A*²、*B*²、*C*² 对辛弗林得率均有极显著影响 ($P < 0.01$), 说明各因素对辛弗林得率的影响较复杂, 不是简单的线性关系。通过 *F* 值大小可以看出各因素对辛弗林得率的影响大小依次为 *A* (液料比) > *B* (超声功率) > *C* (超声时间)。

液料比、超声功率、超声时间对辛弗林得率的影响及两两交互作用见图 4。可通过观察 3D 响应面图的曲线倾斜度、等高线图的线条密集度和扁平度来分析因素交互作用对响应值的影响程度: 倾斜度越高, 等高线越密集、越扁平, 影响越显著。从图 4 可以看出, 液料比-超声功率和超声功率-超声时间的响应面图均有较好的倾斜度, 等高线较密集且呈椭圆形, 说明两两变量的相互作用对辛弗林得率均显著。其中液料比和超声时间交互作用的等高线扁平度低, 因此二者的交互作用不显著。通过 Design-Expert 13.0 软件分析, 得到最佳提取条件: 液料比 38.95 mL/g, 超声功率 218.09 W, 超声时间 20.37 min。

2.2.5 验证实验与对比实验

考虑到操作方便和实际的仪器限制, 将最优提取方案修正为液料比 39 mL/g、超声功率 220 W、超声时间 20 min, 在此条件下进行 3 组平行实验, 辛弗林得率分别为 0.426 8%、0.429 7%、0.428 7%, 平均得率为 0.428 4%, 与理论值 0.423 0% 的相对误差为 1.26%, 说明采用 Box-Behnken 响应面法优选的工艺稳定可靠。为进一步证明新工艺的优异性, 将该提取方法与传统提取工艺进行了对比, 结果见表 8。由表 8 可知, 不管是提取时间还是提取效果, 超声辅助深共晶溶剂提取法均优于传统提取方法, 说明超声辅助深共晶溶剂提取法具有提取时间短、得率高的优点。

2.3 超声辅助 DES 提取枳实中辛弗林过程的动力学分析

2.3.1 不同超声功率下枳实辛弗林的提取结果

不同超声功率下提取液中辛弗林随提取时间的质量浓度变化见表 9, 平衡浓度见表 10。枳实辛弗林达到平衡浓度的时间随着超声功率的增大而缩短, 但平衡浓度在 200 W 达到最高, 这可能是因为过低的超声功率无法使更多的辛弗林溶出, 而超声功率过高会导致辛弗林的降解速率高于溶出速率, 因此超声功率高于 200 W 时平衡浓度反而有所降低。

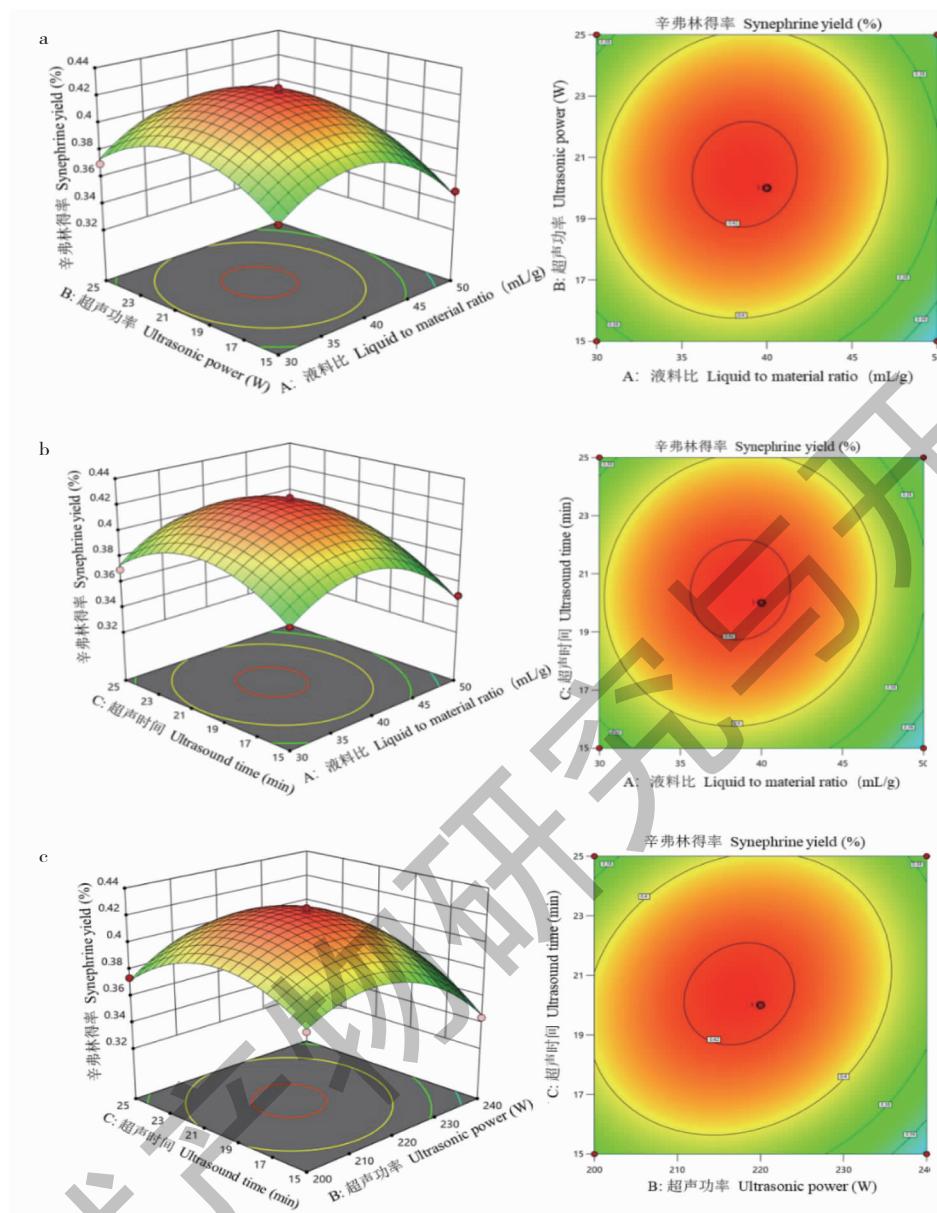


图4 各因素对辛弗林得率影响的响应曲面图和等高线图

Fig. 4 Response surface and contour plots of the effects of various factors on the yield of synephrine

表8 对比实验

Table 8 Contrast experiment

提取方法 Extraction method	提取溶剂 Extract solvent	提取时间 Extraction time(min)	辛弗林得率 Synephrine yield(%)
超声法	DES	20	0.428 4 ± 0.001 5 ^a
超声法	70% 甲醇	30	0.333 8 ± 0.074 ^b
回流法	85% 乙醇	120	0.312 4 ± 0.014 8 ^{bc}
超声法	14% 乙醇	30	0.306 7 ± 0.007 6 ^{bc}
回流法	水	120	0.301 2 ± 0.002 4 ^{bc}
超声法	水	30	0.252 9 ± 0.063 8 ^c

注:不同小写字母表示有显著性差异, $P < 0.05$ 。

Note : Different lowercase letters indicate significant differences, $P < 0.05$.

表 9 不同超声功率下提取液中辛弗林的浓度

Table 9 Concentration of synephrine in extract under different ultrasonic power

超声时间 Ultrasound time (min)	辛弗林的浓度 Concentration of synephrine($\mu\text{g/mL}$)				
	160 W	200 W	240 W	280 W	320 W
2	62.958 4	60.582 5	67.464 4	62.139 1	58.452 4
4	64.269 2	64.842 7	68.447 5	63.531 9	69.348 7
6	65.907 8	69.102 9	70.495 7	65.989 7	71.888 4
8	69.594 5	70.086 0	71.314 9	68.365 6	71.560 7
10	70.659 5	71.970 3	71.806 5	72.298 1	73.527 0
15	71.642 6	75.902 8	73.608 9	73.035 4	75.411 3
20	72.134 2	80.081 1	74.510 1	74.346 2	75.820 9
25	74.100 4	81.228 1	75.329 3	76.804 0	76.394 4
30	77.131 7	84.259 4	76.312 5	76.558 3	72.543 8
40	77.049 8	78.032 9	75.984 8	76.394 4	67.628 2

表 10 超声辅助提取辛弗林的平衡浓度

Table 10 Equilibrium concentration of ultrasound assisted extraction of synephrine

超声功率 Ultrasound power (W)	平衡浓度 Equilibrium concentration($\mu\text{g/mL}$)
160	77.131 7
200	84.259 4
240	76.312 5
280	76.804 0
320	76.394 4

2.3.2 速率常数的求解

利用表 9 的实验数据对 $\ln[C_\infty / (C_\infty - C)]$ 与提取时间 t 进行线性回归分析, 结果见图 5 和表 11。由表 11 可知, 在不同超声功率条件所得线性回归方

程相关系数 R^2 均大于 0.93, 表明拟合精度良好。表观速率常数 k 随超声功率增大而增大, 表明超声作用的加强有利于枳实辛弗林的溶出。

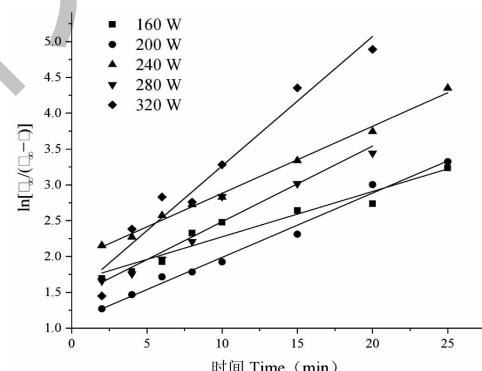
图 5 不同超声功率下 $\ln[C_\infty / (C_\infty - C)]$ 与 t 的关系Fig. 5 The relationship between $\ln[C_\infty / (C_\infty - C)]$ and t under different ultrasound powers

表 11 不同超声功率下线性回归方程

Table 11 Linear regression equation under different ultrasound powers

超声功率 Ultrasound power (W)	回归方程 Regression equation	R^2	C_∞ ($\mu\text{g/mL}$)	$k \times 10^{-3}$ (s^{-1})
160	$y = 0.063 22t + 1.642 76$	0.933 6	77.131 7	1.053 7
200	$y = 0.089 79t + 1.089 88$	0.988 6	84.259 4	1.496 5
240	$y = 0.093 6t + 1.946 24$	0.994 9	76.312 5	1.560 0
280	$y = 0.105 65t + 1.429 37$	0.944 9	76.804 0	1.760 8
320	$y = 0.180 71t + 1.457 73$	0.945 3	76.394 4	3.011 8

2.3.3 相对萃余率的求解

在提取前枳实粉未经浸泡,初始浓度 $C_0 = 0$,可设相对萃余率 $y = (C_\infty - C)/C_\infty$, 式(3)即转化为 $y = (6/\pi^2) \exp(-kt)$, 利用表 9 的实验数据对 $(C_\infty - C)/C_\infty$ 与提取时间 t 进行拟合, 结果见图 6 和表 12。由表 12 可知, 在不同超声功率条件下, 所得拟合方程的相关系数 R^2 均大于 0.93, 说明拟合良好。虽然用指数方程拟合得到的速率常数与表 11 得到的速率常数存在一定误差, 这可能是由于使用的拟合方法不同, 但速率常数随超声功率的变化趋势相同, 均表明超声作用的加强有利于枳实辛弗林的溶出。

表 12 不同超声功率下相对萃余率对时间回归方程
Table 12 Regression equation of relative extraction rate versus time under different ultrasound powers

超声功率 Ultrasonic power (W)	回归方程 Regression equation	R^2
160	$y = 0.21146 \exp(-0.07365t)$	0.93941
200	$y = 0.32798 \exp(-0.08643t)$	0.98996
240	$y = 0.14105 \exp(-0.09206t)$	0.99236
280	$y = 0.25109 \exp(-0.11047t)$	0.95692
320	$y = 0.40623 \exp(-0.30104t)$	0.93822

2.3.4 半衰期的求解

以超声功率 P 为横坐标、半衰期 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 为纵坐标作图, 并对其进行线性回归拟合, 结果见图 7, 得线性回归方程 $t_{1/2} = -0.00566P + 4.35078$, $R^2 = 0.8841$ 。半衰期表示提取枳实中一半辛弗林所需的时间, 可反映提取效率的高低。由图 7 可知, 随着超声高功率的增大, 其半衰期逐渐缩减, 表明超声功率越大, 提取效率越高。

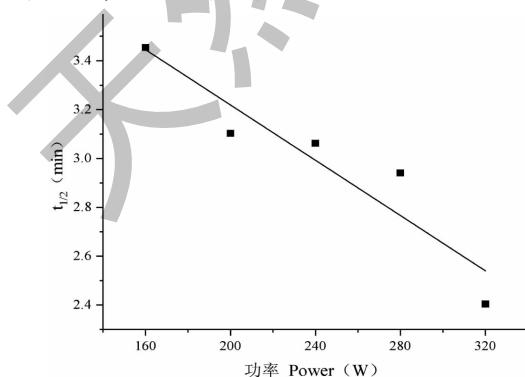


图 7 $t_{1/2}$ 与超声功率的关系

Fig. 7 The relationship between $t_{1/2}$ and ultrasound power

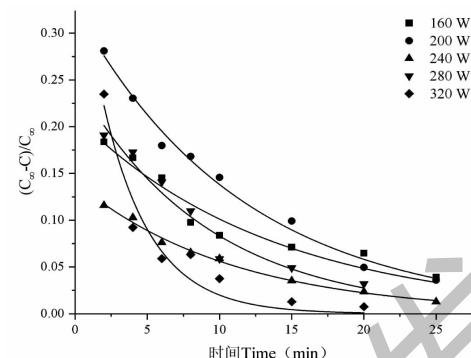


图 6 不同超声功率下 $(C_\infty - C)/C_\infty$ 与 t 的关系

Fig. 6 The relationship between $(C_\infty - C)/C_\infty$ and t under different ultrasound powers

2.3.5 有效扩散系数的求解

通过速率常数可计算辛弗林提取过程中的有效扩散系数, 由公式(4)可知 $D_u = kR^2/\pi^2$ 。枳实粉过 50 目(297 μm)筛, 故 $R = 0.1485 \text{ mm}$ 。采用指数方程对 D_u 和超声功率 P 进行拟合, 结果见图 8。所得回归方程为 $D_u = 0.46331 \exp(0.00653P) \times 10^{-4}$, $R^2 = 0.87897$, 其拟合精度稍差, 这是由于拟合时假

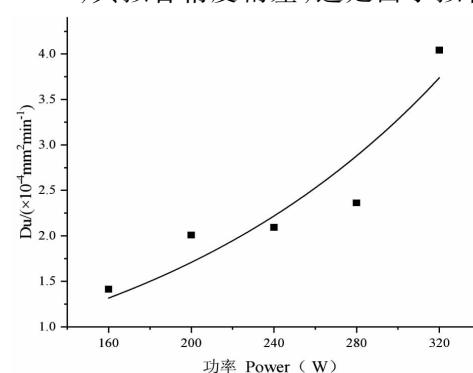


图 8 有效扩散系数 D_u 与超声功率的关系

Fig. 8 The relationship between effective diffusion coefficient D_u and ultrasound power

定枳实颗粒半径固定不变,但在实际提取过程中,超声作用会使枳实颗粒破碎,半径 R 发生改变从而导致拟合精度降低。

3 结论

本研究首次以深共晶溶剂为提取溶媒,建立了一种从中药枳实中提取辛弗林的超声辅助提取方法。在所筛选的 20 种深共晶溶剂中,一水甜菜碱:乳酸(1:3)组成的 DES(含水量 50%)具有较优的提取效果。最佳提取条件为:液料比为 39 mL/g,超声功率为 220 W,超声时间为 20 min。在最佳提取条件下,辛弗林得率为 0.428 4%。相较于常见的萃取溶剂和萃取方法,一水甜菜碱-乳酸 DES 萃取得率高、萃取时间短。因此该方法能成功应用于植物基质中辛弗林的提取,为复杂样品中辛弗林的分析制备提供了一种可持续、安全的提取工艺,有潜力用于大规模的工业应用。

建立植物活性成分的提取动力学模型是定量研究其溶出规律的基础,本研究通过测定在不同超声功率、不同提取时间下辛弗林的质量浓度,以 Fick 第二定律为理论基础,建立并推导验证了超声辅助深共晶溶剂提取枳实辛弗林的动力学模型。对数据进行计算拟合得到动力学相关参数,随着超声功率的增大,速率常数增大,半衰期减小,扩散系数增大,相对萃余率下降。研究结果可为从植物材料中提取活性成分的深入研究提供理论参考。

参考文献

- Fang YS, Shan DM, Liu JW, et al. Effect of constituents from *Fructus Aurantii Immaturus* and *Radix Paeoniae Alba* on gastrointestinal movement [J]. *Planta Med*, 2009, 75:24-31.
- Ruiz-Moreno C, Del Coso J, Giraldez-Costas V, et al. Effects of *p*-synephrine during exercise: a brief narrative review [J]. *Nutrients*, 2021, 13:233.
- Parmar HS, Kar A. Antiperoxidative, antithyroidal, antihyperglycemic and cardioprotective role of *Citrus sinensis* peel extract in male mice [J]. *Phytotherapy Research*, 2010, 22: 791-795.
- Chen H. Target screening of paeoniflorin and synphrine by three G protein-coupled receptors and its mechanism [D]. Kunming: Kunming university of science and technology(昆明理工大学), 2021.
- Song YP, Chen HF, Hu YX, et al. Effect of *Pericarpium Citri Reticulatae* and its main active ingredients on gastrin in serum, acetylcholine, motilin, substance P and vasoactive intestinal peptide in plasma of rats [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床)*, 2017, 33:79-83.
- Xu WW, Zheng CC, Huang YN, et al. Synephrine hydrochloride suppresses esophageal cancer tumor growth and metastatic potential through inhibition of galectin-3-AKT/ERK signaling [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66:9248-9258.
- Ghanem SS, Fayed HS, Zhu Q, et al. Natural alkaloid compounds as inhibitors for alpha-synuclein seeded fibril formation and toxicity [J]. *Molecules*, 2021, 26:3736.
- John M, Andy G, Maja K, et al. Styling without shedding: novel topical formula reduces hair shedding by contracting the arrector pili muscle [J]. *Controlled Clinical Trial*, 2018, 31: e12575.
- Liu JM, Wang H, Zhang H, et al. Research progress on extraction of active ingredients and pretreatment of food analysis by ultrasound-assisted deep eutectic solvent method [J]. *Sci Technol Food Ind(食品工业科技)*, 2021, 42:399-407.
- Tang B, Zhang H, Row KH. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38:1053-1064.
- Li YB, Hsieh YH, Pan ZC, et al. Extraction of alkaloids from *Coptidis Rhizoma* via betaine-based deep eutectic solvents [J]. *ChemistrySelect*, 2020, 5:4973-4978.
- Duan L, Dou LL, Guo L, et al. Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products [J]. *J Biotechnol*, 2016, 4:2405-2411.
- Chen R, Li DH, Ruan GF, et al. Green and efficient extraction of flavonoids and saponins from *Abrus cantoniensis* Hance by deep eutectic solvents [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2019, 31:1632-1640.
- Zhang LJ, Wang MS. Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95: 675-681.
- Jiang ZM, Wang LJ, Gao Z, et al. Green and efficient extraction of different types of bioactive alkaloids using deep eutectic solvents [J]. *Microchem J*, 2019, 145:345-353.
- Liu YJ, Zhang H, Yu HM, et al. Deep eutectic solvent as a green solvent for enhanced extraction of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin from *Aurantii Fructus* [J]. *Phytochem Anal*, 2019, 30:156-163.
- Liu DN, Huang JY, Yang LJ, et al. Ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction of narirutin, naringin and hesperidin in *Aurantii Fructus Immaturus* [J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2020, 43:155-160.