

超声辅助低共熔溶剂提取韩信草总黄酮的工艺优化

禹晓梅*, 周忠云

江苏联合职业技术学院徐州医药分院, 徐州 221116

摘要: 为提高韩信草中总黄酮的提取率, 实验采用超声辅助低共熔溶剂——氯化胆碱-乙二醇提取韩信草中的总黄酮。首先采用冷冻干燥法合成氯化胆碱-乙二醇低共熔溶剂, 以单因素试验确定含水率、料液比、超声功率、超声时间对韩信草中总黄酮提取量的影响, 通过 Plackett-Burman 法结合 Box-Behnken 响应面法进一步对超声提取工艺进行优化。试验结果表明, 该提取工艺的最佳条件为含水率 59.30%, 液料比 25.90 : 1, 超声功率 121 W, 总黄酮含量为 7.924 mg/g。相同条件下采用氯化胆碱-乙二醇为提取溶剂明显高于其他传统溶剂, 可实现总黄酮高效提取的优点。因此, 通过优化后的超声辅助低共熔溶剂氯化胆碱-乙二醇法能明显提高总黄酮的提取率。

关键词: 低共熔溶剂; 超声提取; 响应面法; 韩信草总黄酮

中图分类号: O65

文献标识码: A

Optimization of extraction technology of total flavonoids from *Scutellariae Indicae Herba* with ultrasonic-assisted deep eutectic solvents

YU Xiao-mei*, ZHOU Zhong-yun

Xuzhou Medical Branch, Jiangsu Union Technical Institute, Xuzhou 221116, China

Abstract: To enhance the extracting amount of flavonoids in *Scutellariae Indicae Herba*, an experiment employed deep eutectic solvents(DESs) choline chloride-ethylene glycol approach to extract flavonoids from *Scutellariae Indicae Herba*. The extracting process was optimized through a combination of single factor experiment and Plackett-Burman design along with Box-Behnken response surface methodology, and the influential factors such as moisture content, liquid-solid ratio, and ultrasound power were utilized to assess the extraction yield of total flavonoids in *Scutellariae Indicae Herba*. The results demonstrated that the optimal extracting conditions were a moisture content of 59.30%, a liquid-solid ratio of 25.90 : 1, and an ultrasound power of 121 W, with amount of flavonoids 7.924 mg/g. Under the same circumstances, the extracting efficiency of flavonoids using choline chloride-ethylene glycol as the extraction solvent was significantly higher than that of other conventional solvents, and the advantage of efficient extracting amount of flavonoids was attained. Hence, the optimized ultrasound-assisted deep eutectic solvents choline chloride-ethylene glycol method can conspicuously improve the extracting amount of flavonoids.

Key words: deep eutectic solvents; ultrasound extraction; response surface methodology; total flavonoids from *Scutellariae Indicae Herba*

韩信草是唇形科黄芩属多年生草本植物韩信草 *Scutellaria indica* Linn.的干燥全草, 主要分布在我国江苏、安徽、陕西等地, 是我国地方传统药材^[1]。韩信草中主要活性成分为黄酮类化合物、氨基酸与有机酸等, 黄酮类化合物为主要有效成分, 其中含量较高的有汉黄芩苷、野黄芩苷、芹菜素等, 韩信草中黄酮类化学成分具有抗病毒、抗肿瘤的作用^[2]。

近年来, 黄酮类化合物在食品领域和药学领域的应用成了研究焦点, 传统的方法提取率低, 消耗大量有机试剂, 造成资源浪费和环境污染。因此, 寻求一种易操作、效率高、能耗少的“绿色溶剂”来提取总黄酮类化合物^[3,4]。目前新型绿色溶剂已成为现代提取工艺研究的热点, 如离子液体, 亚临界水, 低共熔溶剂。Li^[5]采用离子液体[EPy]BF₄提取卷柏中黄酮, 结果提取率比传统提取溶剂提高近两倍。虽然离子液体具有无污染、不易挥发、稳定性好等优点, 但是黏度较高, 传质阻力大, 提取过程中易流失。Wan等^[6]利用亚临界水法在橙皮、甜叶菊和柑橘皮中提取黄酮类化合物, 提取时间短, 试剂用量少, 但是亚临界水条件苛刻, 运行成本高。低共熔溶剂近年来受到研究者的广泛关注。研究者们将低共熔溶剂 (deep eutectic solvents, DESs) 替代传统的有机溶剂应用在中药领域, 尤其是活性成分的提取分离。低共熔溶剂具有合成方法简单、价格便宜、环保、不易挥发、溶解性强、效率高等优点。另外低共熔溶剂可回收利用, 可降低成本。目前 DESs 在中药活性成分提取工艺中被广泛使用, 如 Liu等^[7]用氯化胆碱与乙二醇提取菹草中黄酮、多酚和多糖类化合物, Yu等^[8]用氯化胆碱-乳酸提取银杏叶多酚, Feng等^[9]用氯化胆碱-乳酸提取铁皮石斛多糖, Xing等^[10]采用氯化胆碱-乳酸提取甘草黄酮, Tong等^[11]用甜菜碱与乳酸提取黄连中生物碱, Yang等^[12]用氯化胆碱与乙二醇提取肾茶黄酮和多酚。目前, 关于韩信草中黄酮化合物的提取已经有一定的研究, 如 Wang等^[13]用 60%乙醇为提取溶剂提取韩信草总黄酮。但未见低共熔溶剂提取韩信草中总黄酮的相关报道。

本文将超声波和低共熔溶剂结合起来提取韩信草中总黄酮, 通过对比不同种类的 DESs、传统溶剂等提取韩信草总黄酮, 采用单因素、Plackett-Burman 法结合 Box-Behnken 响应面法对韩信草总黄酮超声提取工艺进行优化。以最大限度提取韩信草中的总黄酮, 达到节约药材和提取溶剂降低对环境影响的目的, 为韩信草的开发提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

韩信草产地江苏徐州, 购买于徐州惠春堂药店, 由江苏联合职业技术学院徐州医药分院中药教研室付宝慧教师鉴定为韩信草 *Scutellaria indica* Linn.干燥全草。

芦丁标准品 (北京标准生物检定所, 纯度≥99%); 硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醇、

甲醇、葡萄糖、蔗糖、柠檬酸、乳酸（均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；氯化胆碱、乙二醇、丙三醇（均为分析纯，天津市大茂化学试剂厂）。

1860 型紫外可见分光光度计（上海普元有限公司）；WS28 型 LCQ 电热恒温水浴锅（上海一恒科学仪器有限公司）；FA2204N 型电子天平（上海菁海仪器有限公司）；GL-21M 型高速冷冻离心机（上海市离心机械研究所）；JP-500C 型中药粉碎机（浙江永康久品工贸有限公司）；K8200LHC 型超声清洗器（上海超导超声仪器有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 DESs 的合成

用氯化胆碱作为氢键受体，按 1：2 摩尔比分别与丙三醇、乙二醇、葡萄糖、蔗糖、柠檬酸、乳酸 6 种氢键供体混合，采用冷冻干燥法合成。超纯水稀释成 5% 的水溶液，然后通过冷冻干燥去除水分，得透明溶液，冷却至常温备用^[14,15]。临用前将 DESs 与一定量的水混合。

1.2.2 供试品溶液制备

将韩信草药材全草粉碎，过 80 目筛，精密称取 2.0 g 与 DESs 水溶液混合，按照液料比 20：1（g/mL）、超声功率 125 W 和超声时间 30 min 进行提取。采用 PVP/PAN 纳米纤维膜过滤，即得待测液。

1.2.3 对照品溶液配制

芦丁标准溶液（0.500 mg/mL）：称取芦丁标准品 0.012 5 g 于烧杯中，加入适量乙醇使其溶解，转移到 25 mL 容量瓶，定容，摇匀。

芦丁标准使用液（0.200 mg/mL）：用量筒量取 20 mL 芦丁标准溶液于 50 mL 容量瓶中，加水定容至 50 mL。

1.2.4 测定方法

取供试品、对照品溶液适量，加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL，混匀静置，加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL，摇匀并静置，加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL，用蒸馏水定容，摇匀，于 500 nm 处测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 线性关系

准确移取芦丁标准溶液 0、1、2、3、4、5、6 mL，然后用“2.1.4”的方法测定吸光度。浓度为横坐标，吸光度为纵坐标进行回归分析，得方程为 $y=13.491x-0.0049$ ，相关系数 $R^2=0.999$ ，表明芦丁在浓度 0.010~0.050 mg/mL 范围内呈线性关系。

2.2 精密度试验

精密吸取芦丁标准品溶液 1.0 mL 于 6 只 25 mL 容量瓶中，按实验方法操作，在 500 nm 处测定其吸光度值，相对标准偏差（relative standard deviation, RSD）分别为 2.1%、2.5%、1.9%、3.6%、2.8%、2.0%。

2.3 稳定性试验

取样品溶液，于波长 499 nm 处，按实验方法操作，测定显色 5、10、15、20、25 min 的吸光度值，RSD 分别为 1.6%、2.4%、1.8%、3.3%、4.1%。

2.4 回收率实验

在样品溶液中加入一定体积由低到高浓度的标准品，于 25 mL 容量瓶中，定容。按实验方法操作，以干燥品计，计算回收率结果如下，芦丁添加水平 0.20 mg/mL，回收率 103.2%，RSD 为 1.5%；添加水平 0.05 mg/mL，回收率 98.2%，RSD 为 1.8%；添加水平 0.01 mg/mL，回收率 94.6%，RSD 为 2.3%。

2.5 单因素试验

采用单因素试验，研究提取溶剂（氯化胆碱按 1：3 摩尔比分别与丙三醇、乙二醇、葡萄糖、蔗糖、柠檬酸、乳酸）、含水率（20%、40%、60%、80%）、液料比（10：1、20：1、30：1、40：1、50：1）、超声功率（100、115、125、135、145 W）、超声时间（20、30、40、50 min）对韩信草黄酮类化合物提取量的影响。

2.5.1 提取溶剂

考察了廉价易得的季铵盐类化合物氯化胆碱（ChCl）作为氢键受体，以氢键供体的不同，将其分为 6 种 DESs 进行制备。氯化胆碱按 1：3 摩尔比分别与丙三醇、乙二醇、葡萄糖、蔗糖、柠檬酸、乳酸 6 种氢键供体混合以及 60%甲醇、60%乙醇对韩信草总黄酮提取量的影响，结果见图 1。

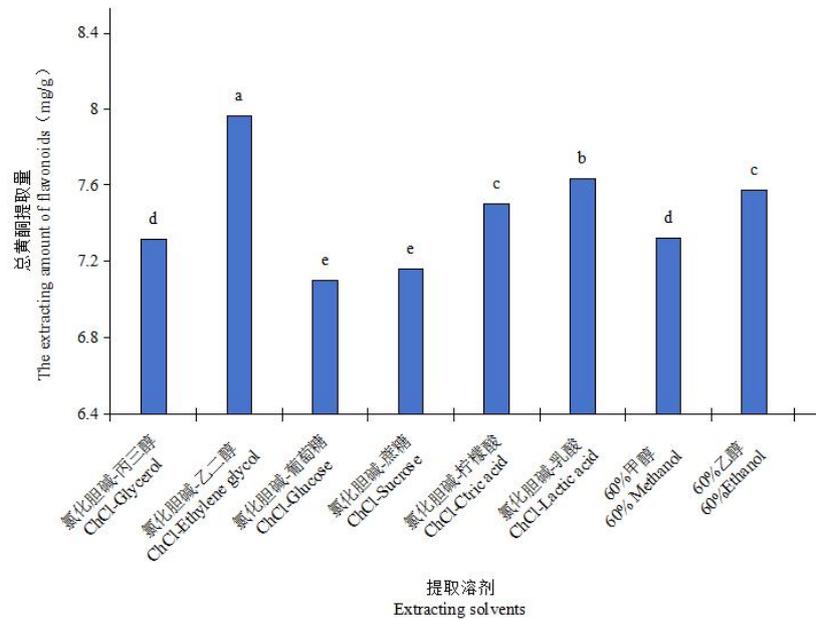


图 1 不同提取溶剂对韩信草中总黄酮提取量的影响

Fig. 1 Effect of different extracting solvents on the extracting amountt of flavonoids from Scutellariae Indicae

Herba

注：不同小写字母表示差异显著。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences.

由图 1 可知，相同条件下提取溶剂为氯化胆碱-乙二醇（1：3）总黄酮的提取量最高，含量为 7.964 mg/g，其次为 ChCl-乳酸，ChCl-柠檬酸和 60%乙醇，ChCl-丙三醇和 60%甲醇，ChCl-蔗糖，最后为 ChCl-葡萄糖。氯化胆碱-乙二醇（1：3）提取的总黄酮量明显高于其他传统溶剂，比 ChCl-葡萄糖提取总黄酮量高出 12.15%，故选择氯化胆碱-乙二醇为最合适的提取溶剂。原因可能是由于该组合与韩信草总黄酮提取液的极性比较接近，从而增加了总黄酮在其中的溶解度，有利于黄酮的溶解和扩散^[16]。

氢键受体和氢键供体摩尔比是影响 DESs 密度、分子间作用力、黏度、极性等物理化学性质的因素。因此设置了低共熔溶剂体系氯化胆碱-乙二醇摩尔比实验，如图 2 所示。

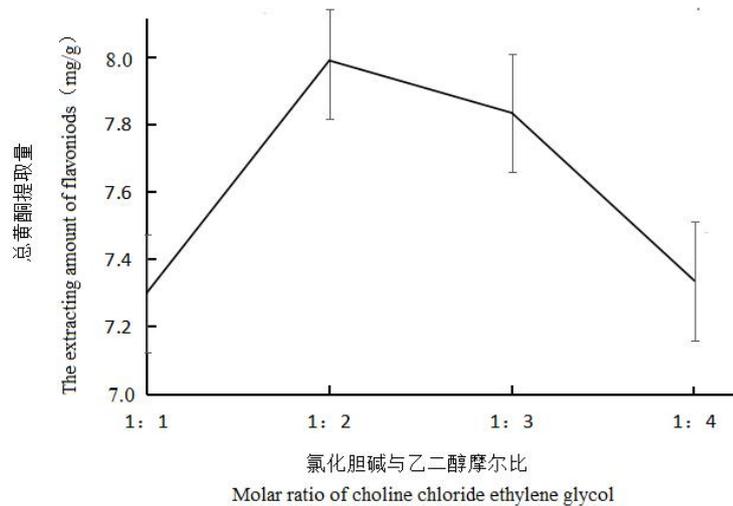


图 2 不同比例的低共熔溶剂体系对韩信草中总黄酮提取量影响

Fig. 2 Effect of different proportions of deep eutectic solvent systems on the extracting amount of flavonoids from *Scutellariae Indicae Herba*

由图 2 可知, 当乙二醇逐渐增加时, 总黄酮提取率先升后降, 当氯化胆碱与乙二醇摩尔比为 1:2 时, 总黄酮提取量增加到 7.89 mg/g, 若继续增加乙二醇的比例会导致总黄酮提取量显著下降, 因为此时形成氢键的数目已经达到最大, 过多氢键受体的竞争反而使氢键的形成不稳定, 导致提取量下降。因此选择氯化胆碱与乙二醇为 1:2 的体系为最佳摩尔比。

2.5.2 含水率

考察含水率 (20%、40%、60%、80%) 对提取率的影响。在相同的提取条件下, 加入不同比例的水会使得所制备的低共熔溶剂的黏度、极性、及表面张力有所不同, 会对总黄酮提取量产生影响^[17]。由图 3 可知, 当含水量为 20%~40% 时, 总黄酮的提取量随含水量的增加而升高, 之后 40%~60% 总黄酮提取量增加幅度加大, 含水率由 60%~80% 有所降低。当含水率为 60% 时, 总黄酮的提取量达到最大 7.7527 mg/g。开始黄酮类物质的提取量随 DESs 体系含水率的增加而升高, 因为随着含水率的增大, DESs 的黏度减小, 有利于总黄酮物质的溶出, 但含水率的继续增加反而会导致分子间氢键断裂, 因而提取量降低^[18]。故含水量选择 60%。

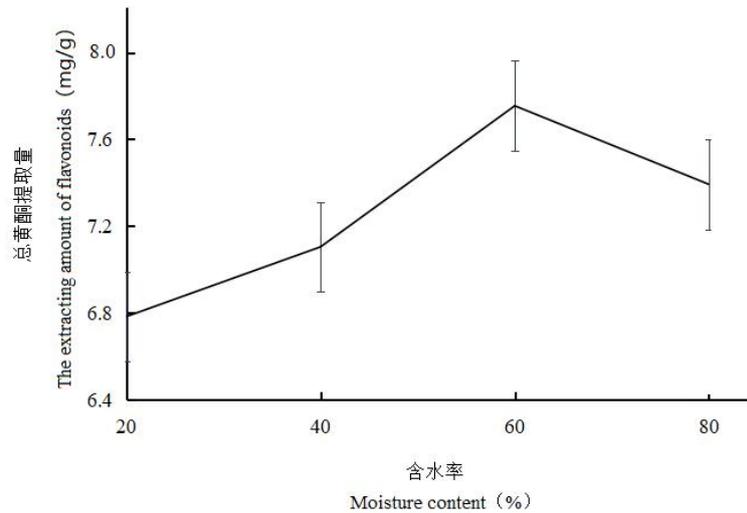


图3 不同含水率对韩信草中总黄酮提取量影响

Fig. 3 Effect of different water content on the extracting amount of flavonoids from Scutellariae Indicae Herba

2.5.3 液料比

称取 2 g 韩信草药材粉末，按液料比 10 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1，低共熔溶剂含水率 60%，按照供试品溶液的制备，然后测定并计算。从图 4 可以看出，当液料比为 10 : 1~20 : 1 时，总黄酮提取量显著升高，当液料比 20 : 1~30 : 1 时，提取量明显下降，当 30 : 1~40 : 1 时，又有小幅提升，当 40 : 1~50 : 1 时，开始下降。提取过程中，韩信草粉末会吸收部分水分，当液料比太小，会影响总黄酮提取量。增大液料比从而提高了提取溶剂与韩信草粉末的接触面积，使得目标组分溶出；但液料比过大反而不利于目标成分的溶出，致使目标成分总黄酮提取量下降^[19]。因此，综上所述选择液料比 20 : 1。

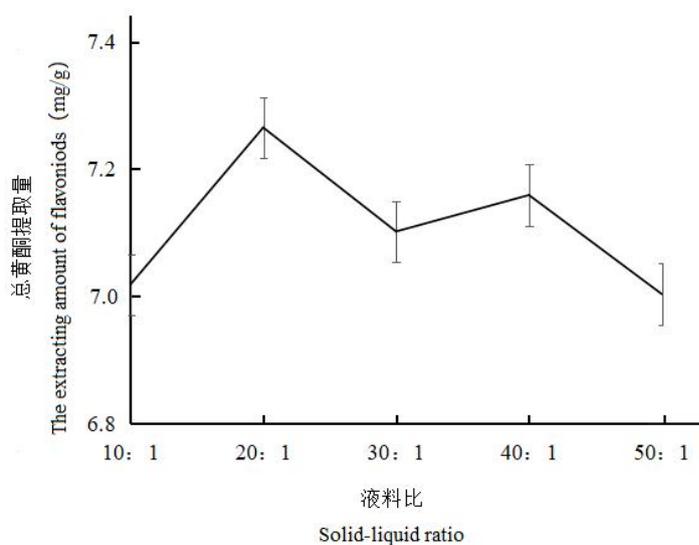


图4 不同料液比对韩信草中总黄酮提取量影响

Fig. 4 Effect of different solid-liquid ratio on the extracting amount of flavonoids from *Scutellariae Indicae*

Herba

2.5.4 超声功率

称取 2 g 韩信草药材粉末，按料液比 20 : 1，含水率 60%，考察超声功率分别为 100、115、125、135、145 W，按照供试品溶液的制备，然后测定总黄酮并计算其含量。

如图 5 所示，随着超声功率从 100W 逐渐增大至 145W，韩信草中总黄酮化合物的提取量先升高后降低。在相同的提取时间内，超声功率越大，细胞壁的破碎程度越大，总黄酮提取量越高；超声功率增加到一定程度时会发生饱和效应，破坏总黄酮成分的分子结构，从而导致提取率下降^[18,19]。基于以上原因，选择超声功率 125 W。

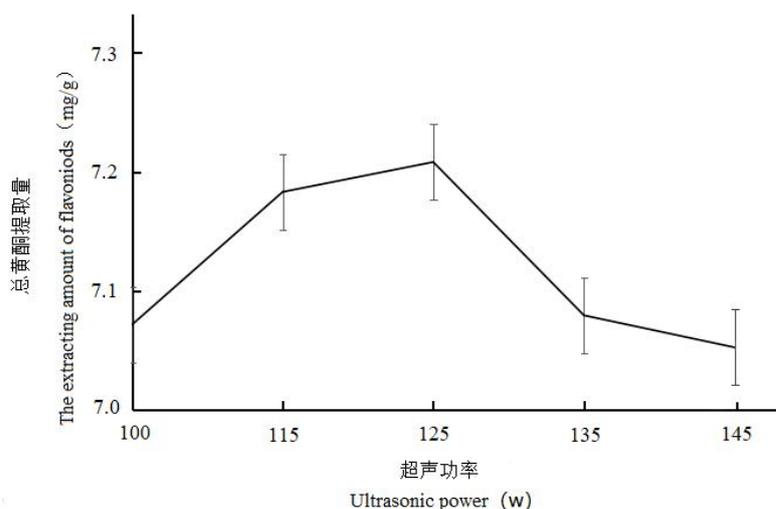


图 5 不同超声功率对韩信草中总黄酮提取量影响

Fig. 5 Effect of different ultrasonic power on the extracting amount of flavonoids from *Scutellariae Indicae*

Herba

2.5.5 超声时间

称取 2 g 韩信草药材粉末，按料液比 20 : 1，含水率 60%，超声功率 125 W，考察超声时间分别为 20、30、40、50 min，按照供试品溶液的制备，测定总黄酮并计算其含量。如图 6 所示，当超声时间 20~30 min，总黄酮化合物的提取量急剧增加，30~40 min，先是急速下降，然后 40~50min 缓慢降低。超声时间的延长，有利于总黄酮类成分溶出，但过长时间会破坏已溶出总黄酮物质的结构，使得总黄酮提取量有所降低^[19]。因此，超声时间选择 30 min。

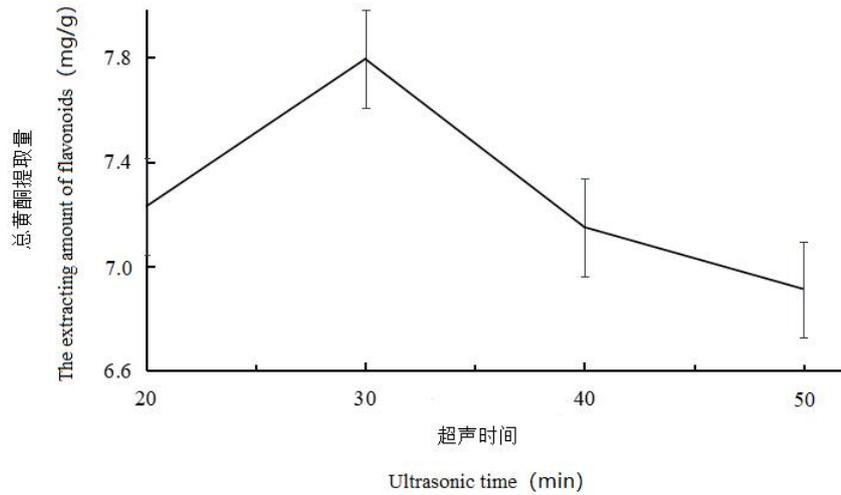


图 6 不同超声时间对韩信草中总黄酮提取量影响

Fig. 6 Effect of different ultrasonic time on the extracting amount of flavonoids from Scutellariae Indicae

Herba

2.6 Plackett-Burman 法

在单因素试验基础上，选取总黄酮含量的影响因素液料比 (*A*)、含水率 (*B*)、超声温度 (*C*)、超声时间 (*D*)、超声功率 (*E*) 等 5 个影响因素，并增加 6 个虚拟变量。实验设计中的因素与水平见表 1。以总黄酮含量为响应值，借助 Design-Expert 10.0.3 软件形成 Plackett-Burman 实验设计方案，通过回归分析筛选出总黄酮含量中的关键影响因素。

表 1 Plackett-Burman 实验设计因素与水平

Table 1 Plackett Burman experimental design factors and levels

水平 Level	因素 Factor				
	<i>A</i> 液料比	<i>B</i> 含水率	<i>C</i> 超声温度	<i>D</i> 超声时间	<i>E</i> 超声功率
	Solid- liquid ratio	Moisture content	Ultrasonic	Ultrasonic time	Ultrasonic
	(g/mL)	(%)	temperature (°C)	(min)	power (W)
-1	20	40	40	30	115
0	25	60	50	40	125
1	30	65	60	50	135

将表 1 中各影响因素及其对应的水平值输入到 Design-Expert 10.0.3 软件中，生成 Plackett-Burman 实验设计方案，根据此方案进行实验，并对其总黄酮含量进行测定结果见表 3。对表 2 中总黄酮含量进行回归模型分析结果见表 3。

表 2 Plackett-Burman 实验结果

Table 2 Plackett Burman experimental results

试验号 No.	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	总黄酮含量 Flavonoids amount (mg/g)
1	1	1	-1	1	1	6.53
2	-1	1	1	-1	1	5.11
3	1	-1	1	1	-1	6.54
4	-1	1	-1	1	1	4.81
5	-1	-1	1	-1	1	5.38
6	-1	-1	-1	1	-1	4.33
7	1	-1	-1	-1	1	7.42
8	1	1	-1	-1	-1	6.36
9	1	1	1	-1	-1	5.32
10	-1	1	1	1	-1	3.82
11	1	-1	1	1	1	7.16
12	-1	-1	-1	-1	-1	4.85

表 3 总黄酮含量回归模型

Table 3 Regression model for the flavonoids amount

因素 Factor	平方和 Square sum	均方 Mean square	回归系数 Regression coefficient	<i>F</i> 值 F value	<i>P</i> 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	13.75	5	2.75	25.77	0.000 5	**
<i>A</i>	10.14	1	10.14	94.99	< 0.000 1	**
<i>B</i>	1.16	1	1.16	10.86	0.016 5	*
<i>C</i>	0.078	1	0.078	0.73	0.424 3	-
<i>D</i>	0.13	1	0.13	1.22	0.311 7	-
<i>E</i>	2.24	1	2.24	21.03	0.003 7	**
残差 Residual	0.64	6	0.11	-	-	-

总和							
Sum	14.39	11	-	-	-	-	-
$R^2=0.9555$; $R_{Adj}^2=0.9184$; $R_{Pre}^2=0.8220$							

注: **极显著; *显著。

Note: **Extremely significant; *Significant.

由表 3 可知, 回归模型的 P 值小于 0.05, 表明该模型显著, 说明数据在整个回归区域拟合良好; 确定出液料比 (A)、超声功率 (E) 对总黄酮含量存在极显著性影响, 含水率 (B) 对总黄酮含量存在显著性影响, 其中液料比 (A) 最小, 对总黄酮含量的影响最显著, 其次是超声功率 (E), 再次为含水率 (B); 其他 2 个因素的 P 值均大于 0.05, 对总黄酮含量的影响不显著。

通过回归分析获得多元一次回归方程 (以编码值表示): $Y=5.64+0.92A-0.31B-0.081C-0.10D+0.43E$ 。其中: Y 为总黄酮含量。由结果可知, 决定系数为 $R^2=0.9555$, 说明相关性较好; 校正决定系数 $R_{Adj}^2=0.9184$, 说明该模型能解释 91.84% 的响应值变化。综合考虑筛选出液料比 (A)、含水率 (B)、超声功率 (E) 作为总黄酮含量条件中的关键影响因素。

2.7 响应曲面实验法

在 Box-Behnken 法基础上, 选取液料比、含水率、超声功率三个影响因素, 采用 Design Expert 10.0.3 进行 3 因素 3 水平实验作进一步优化, 因素水平见表 4, 结果见表 5。

表 4 3 因素 3 水平响应曲面分析实验设计表

Table 4 Experimental Design Table for Horizontal Response Surface Analysis of 3 Factors

水平 Level	因素 Factor		
	A 液料比 Solid-liquid ratio (g/mL)	B 含水率 Moisture content (%)	E 超声功率 Ultrasonic power (W)
-1	20	40	115
0	25	60	125
1	30	65	135

表 5 响应曲面优化实验设计与结果

Table 5 Experimental design and results of response surface optimization

试验号 No.	A 液料比 Solid-liquidratio (g/mL)	B 含水率 Moisture content (%)	E 超声功率 Ultrasonic power(W)	总黄酮含量 Flavonoids amount (mg/g)

1	-1	-1	0	3.96
2	1	-1	0	6.11
3	-1	1	0	4.83
4	1	1	0	4.75
5	-1	0	-1	3.63
6	1	0	-1	5.51
7	-1	0	1	4.82
8	1	0	1	5.24
9	0	-1	-1	5.14
10	0	1	-1	4.56
11	0	-1	1	6.21
12	0	1	1	5.41
13	0	0	0	7.48
14	0	0	0	7.95
15	0	0	0	7.75
16	0	0	0	7.96
17	0	0	0	7.79

2.7.1 总黄酮含量模型建立与分析

运用 Design expert 10.0.3 软件对试验数据进行多元回归拟合，结果表明二次模型的拟合度较好，选用二次模型对数据进一步进行分析，得到二次多项回归模型： $Y = 7.79 + 0.55A - 0.23B + 0.36C - 0.56AB - 0.37AC - 0.055BC - 1.7A^2 - 1.17B^2 - 1.28C^2$ 。

表 6 总黄酮含量模型及回归系数的回归分析

Table 6 Regression analysis of flavonoids amount model and regression coefficients

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Source of variance	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value	Significance
模型						**
Model	33.36	9	3.71	67.79	< 0.000 1	**
A	2.39	1	2.39	43.66	0.000 3	**
B	0.44	1	0.44	7.99	0.025 5	*

<i>C</i>	1.01	1	1.01	18.44	0.003 6	**
<i>AB</i>	1.24	1	1.24	22.74	0.002	**
<i>AC</i>	0.53	1	0.53	9.75	0.016 8	*
<i>BC</i>	0.012	1	0.012	0.22	0.652 4	-
<i>A</i> ²	12.19	1	12.19	223.01	< 0.000 1	**
<i>B</i> ²	5.78	1	5.78	105.73	< 0.000 1	**
<i>C</i> ²	6.94	1	6.94	127.01	< 0.000 1	*
残差 Residual	0.38	7	0.055	-	-	-
失拟项 Lack of fit	0.23	3	0.077	2.02	0.253 4	ns
纯误差 Pure error	0.15	4	0.038	-	-	-
总和 Sum	33.74	16	-	-	-	-

$$R^2=0.988\ 7, R_{Adj}^2=0.974\ 1, R_{Pre}^2=0.883\ 6$$

注: **极显著; *显著; ns表示不显著。

Note: **Extremely significant; *Significant; ns means not significant.

F 值用来检验各变量对响应值影响的显著性的高低, *F* 值越大, 则相应变量的显著程度越高。当模型的显著性检验概率小于 0.05 时, 认为该模型具有统计学意义^[20]。由表 6 可知, 二次项交互作用 *AB* 对总黄酮含量具有极显著的影响), *AC* 对总黄酮含量具有显著的影响, *BC* 对总黄酮含量影响不显著, 且二次项交互作用对总黄酮含量影响大小程度为 *AB* > *AC* > *BC*。模型的决定系数 R^2 为 0.988 7, 说明模型具有较高显著性, 同时 $R_{Adj}^2=0.974\ 1$, 能够解释实验 97.41% 的响应值变异, 且与预测相关系数 $R_{Pre}^2=0.883\ 6$ 差值在 0.2 以内。试验数据进行多元回归拟合, 相关性分析 (见图 7) 显示两模型中各点均接近回归线, 说明实验值和预测值高度相关, 由此可以用该模型分析和预测总黄酮含量最优工艺。

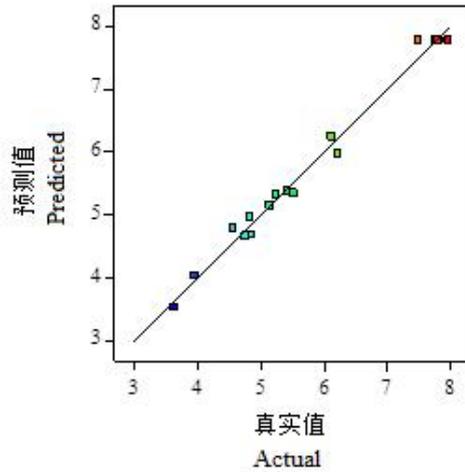


图 7 实际值和预测值相关性分析

Fig.7 Correlation analysis between actual and predicted values

2.7.2 因素的交互作用

响应面的坡度陡峭程度和等高线图椭圆形形状可以反映出 2 个因素交互作用的强弱。通过观察响应曲面图的坡度陡峭程度，确定两者对响应值的影响程度^[20]。各因素之间交互作用见图 8 所示。

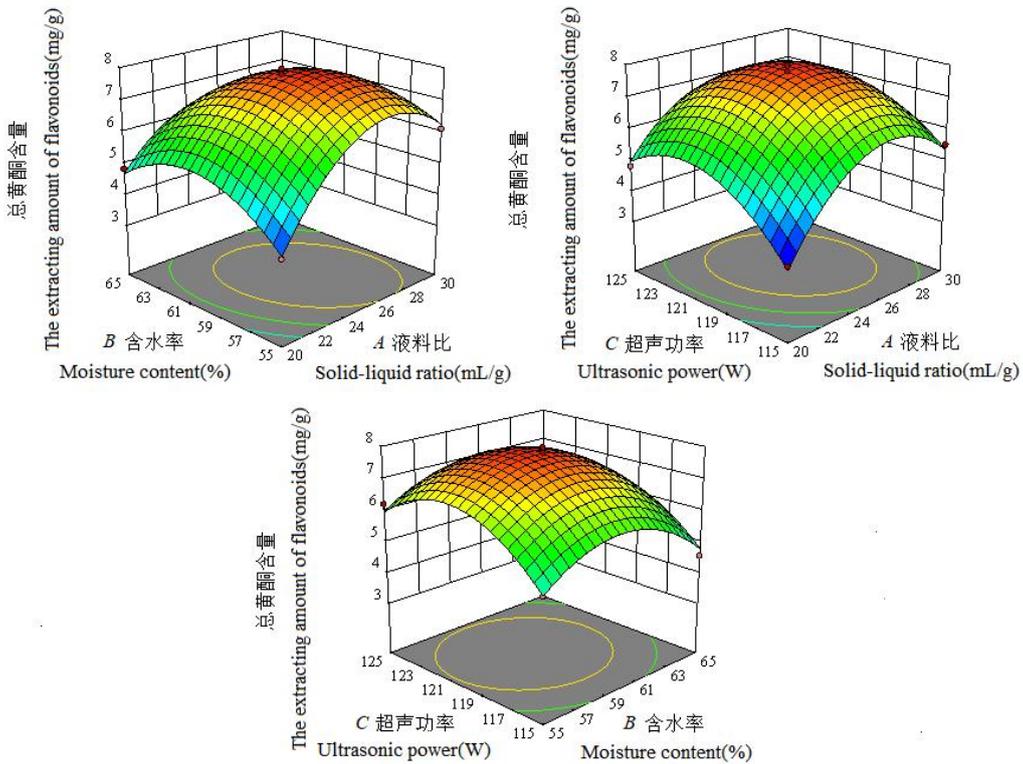


图 8 各因素交互作用对总黄酮提取量影响的响应面 3D 图

Fig. 8 Response surface 3D diagram of impact of interaction of various factors on the extracting amount of flavonoids

由图 8a 可知，当液料比较低时，总黄酮含量随乙醇浓度的增加呈先增加后降低的趋势，且在含水率在 61%~65%水平范围内降低幅度较小，当液料比较高时，总黄酮含量随含水率

的增加呈先缓慢增加后降低的趋势，在含水率为 59%之后，总黄酮含量降低的幅度较大，总黄酮含量随液料比的增加呈先增加后降低变化趋势，且当含水率取值不同时，总黄酮含量随液料比的增加变化趋势有所差异，由此说明液料比和含水率之间存在显著的交互作用，相较而言，在液料比方向响应曲面纵向跨度和等高线梯度变化幅度较大，表明液料比对总黄酮含量的影响较含水率的影响更大。当液料比在 22~28 mL/g、含水率 57%~63%水平区间组合时，可显著提高产物总黄酮含量。

由图 8b 可知，随着液料比的增加，总黄酮含量呈先增加后缓慢降低的趋势，随着超声功率的增加，总黄酮含量呈先增加后降低的趋势，且当液料比取值不同时，随着超声功率取值不同时，总黄酮含量变化幅度有所差异，由此说明液料比和超声功率之间存在显著的交互作用，相较而言，液料比方向曲面波动幅度较大，表明其对总黄酮含量影响较液料比影响更加显著^[20]。仅考虑二者交互作用影响下的总黄酮含量优化工艺条件集中于液料比 22~28 mL/g，超声功率为 117~123 W 区间组合。

由图 8c 可知，当液料比处于零水平时，总黄酮含量随含水率呈先缓慢增加后降低的趋势，总黄酮含量随超声功率呈先增加后降低的趋势，仅考虑二者交互作用的情况下，含水率为 57%~63%、超声功率在 117~123 W 为总黄酮含量的临界最佳工艺参数。

3 讨论与结论

Zhang^[7]用超临界 CO₂ 萃取法提取薄荷中黄酮类化合物，超临界溶剂安全无毒、可循环连续提取，适用挥发性组分、脂溶性成分、热敏性成分及贵重药材有效成分提取物得率高、纯度高。但是不适用含水量大的样品，对于极性大的黄酮类化合物提取率低，设备成本高。Li^[4]采用离子液体提取柑橘果皮中黄酮类化合物，比传统提取方法萃取率提高 2~4 倍，提取时间缩短 100 倍。离子液体虽然有诸多优点，但是黏度大，被提取物的溶解度降低，从而影响提取效率，另外不易回收。Wang^[13]采用的是 60%乙醇辅助超声提取韩信草中黄酮，提取溶剂易挥发对工作人员和环境都有不利的影 响。本文采用超声辅助低共熔溶剂提取韩信草中总黄酮，符合国家节能减排、双碳政策，低共熔溶剂能够回收对环境友好，回收率高，低共熔溶剂有利于总黄酮的溶出，所以提取率有所提高。以上数据表明，超声方法协同低共熔溶剂在提取韩信草黄酮工艺中具有可行性，与传统溶剂提取方法效率提升显著，方法绿色环保且提取成本较低。

本研究运用超声辅助低共熔溶剂氯化胆碱-乙二醇提取韩信草中总黄酮，通过单因素试验考察 5 个因素对总黄酮得率影响，然后以单因素试验为基础，利用 Plackett-Burman 试验设计从影响因素中筛选影响较大的 3 个因素分别为液料比、含水率、超声功率，再通过

Box-Behnken 响应面优化, 得到最优工艺为液料比 25.86 mL/g、含水率 59.28%、超声功率为 120.59 W, 在此条件下总黄酮含量为 7.924 mg/g。韩信草总黄酮提取物可能在抗肿瘤、抗病毒药物中居有一席之地, 本文为韩信草中总黄酮高效提取提供思路和依据, 且此工艺可以进一步推广并应用于其他中草药中总黄酮成分的提取。

参考文献

- 1 Wang LD,Xu BX,Li YR,et al.UPLC fingerprint and LC-MS chemical composition analysis of *Scutellariae Indicae Herba*[J].*J Chin Med Mater*(中药材),2017,40:1870-1875.
- 2 Zhao Y,Chen D Q,Yang ZJ,et al.Simultaneous determination of 6 components in *Scutellariae Indicae Herba* by HPLC[J].*J Chin Med Mater*(中药材),2018,41:657-659.
- 3 Zhang QQ,Xing HH,Long ChH,Et al.Extraction process optimization and composition analysis of flavonoids from peppermint[J].*J Agric Sci Yanbian Univ*(延边大学农学学报),2022,44:67-72.
- 4 Li D,Sun C,Yang J,et al.Ionic liquid-microwave-based extraction of biflavonoids from *Selaginella sinensis*[J].*Molecules*,2019,24:2507.
- 5 Li M,Zhu X,Zeng HH,et al.Research progress of ionic liquid extraction of active components of traditional Chinese medicine[J].*World Chin Med*(世界中医药),2023,17:2541-2547.
- 6 Wan XH,Chen XM,Ma Sh.Application of new extraction methods of flavonoids[J].*Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2019,50:3691-3699.
- 7 Liu P,Cui YY,Yue L,et al.Extraction of flavonoids, polyphenols compounds and polysaccharides from submerged plant *Potamogeton crispus* L. by deep eutectic solvents[J].*Yunnan Chem Technol*(云南化工),2023,50:22-25.
- 8 Yu HR,Zhang JH,Niu J.Ultrasonic assisted methylamines bases eutectic solvent extraction of polyphenols in *Ginkgo biloba*[J/OL].*J Yunnan Minzu Univ:Nat Sci*(云南民族大学学报:自科版):1-10[2024-08-28].<https://kns.cnki.net/kcms2/detail/53.1192.N.20230614.1421.006.html>
- 9 Feng SM,Liao WX,Pan JF,et al.Optimization of deep eutectic solvent extraction process of polysaccharides from *Dendrobium officinale*[J].*Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2024,45:218-225.
- 10 Xing C,Cui WQ,Zhang Y,et al.Ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction of glabridin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza glabra*:optimization,extraction mechanism and *in vitro* bioactivities[J].*Ultrason Sonochem*,2022,83:105-946.
- 11 Tong MH,Zhu Y,Li JL,et al.Optimization of green extraction process of alkaloids from *Coptis coptis* with low eutectic solvent[J].*Chin Trad Pat Med*(中成药),2023,45:3014-3017.
- 12 Yang ZH,Zhang WP,Zhang L,et al.Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids and polyphenols from *Clerodendranthus spicatus* by deep eutectic solvents and its antioxidant activity[J].*J Yunnan Agric Univ:Nat Sci*(云南农业大学学报:自科版),2024,39:99-106.
- 13 Wang J,Huang PC,Yuan SL,et al.Study on extraction and antibacterial activity of total flavonoids from *Herba Sinense* by Box-Behnken response surface method[J].*China Food Addit*(中国食品添加剂),2021,6:69-76.
- 14 Wu J,Wu JT,Yang BW,et al.Study on the process optimization and antioxidant activity of extracting total flavonoids from mulberry leaves with ultrasonic-enzyme assisted eutectic solvent[J].*Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2019,45:31-39.
- 15 Zhang HL,Hao FL,Yao ZF,et al.Efficient extraction of flavonoids from *Polygonatum sibiricum* using a deep eutectic solvent as a green extraction solvent[J].*Microchem J*,2022,175:107168.

- 16 Du HX,Liu BX,Yan ZJ,et al.Optimization of extraction process of jasmine flavone with ultrasonic assisted green eutectic solvent[J].Mod Food Sci Technol(现代食品科技),2021,37:199-206.
- 17 Li J,Wu YF,Wang XSH,Zhao MM et al.Study on extraction of flavonoids from *Poncirus aurantii* with low eutectic solvent[J].Appl Chem Ind(应用化工),2020,49:3078-3082.
- 18 Yue DG,Cheng L,Guo QY.Antibacterial activities and optimization of fermentation conditions of lipopeptides produced by *Aureobasidium pullulans* PA-2[J].Acta Agric Zhejiang(浙江农业学报)2021,33:479-489.
- 19 Jiang Z.Optimization of fermentation conditions for emodin methyl ether from *Aspergillus sheva* BYST01[D].Hefei:Anhui Agricultural University(安徽农业大学),2024.
- 20 Pan BY,Meng XQ,Kang TG,et al.Optimization of extraction process of Arctii Fructus polysaccharide based on response surface method and its anti-inflammatory effect on cells[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:102-108.

收稿日期: 2024-04-25 接受日期:

基金项目: 徐州市科技局重点研发项目(KC22135)

*通信作者 E-mail:yuxiaomei_2007@163.com