

doi:10.3969/j.issn.1672-5425.2018.10.008

周艳红,唐静,张川. 响应面法优化超声辅助离子液体提取银杏叶总黄酮[J]. 化学与生物工程,2018,35(10):36-40.

ZHOU Y H, TANG J, ZHANG C, et al. Optimization in ionic liquid based ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves by response surface methodology[J]. Chemistry & Bioengineering, 2018, 35(10): 36-40.

响应面法优化超声辅助离子液体提取银杏叶总黄酮

周艳红,唐静,张川

(陕西国际商贸学院,陕西 咸阳 712046)

摘要:以离子液体浓度、提取时间、提取温度、料液比为考察因素,以银杏叶总黄酮提取率为评价指标,采用响应面法优化超声辅助离子液体提取银杏叶总黄酮。结果表明,在料液比为 1:40(g:mL)、提取时间为 22 min、离子液体浓度为 1.1 mol·L⁻¹、提取温度为 54 ℃ 的最优条件下,银杏叶总黄酮提取率可达到 26.48 mg·g⁻¹,与预测值(26.98 mg·g⁻¹)接近。该方法稳定可行,重复性好,可用于提取银杏叶总黄酮。

关键词:银杏叶;总黄酮;离子液体;超声辅助提取;响应面法

中图分类号:TQ041.8 R284.2

文献标识码:A

文章编号:1672-5425(2018)10-0036-05

Optimization in Ionic Liquid Based Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Flavonoids from *Ginkgo biloba* Leaves by Response Surface Methodology

ZHOU Yan-hong, TANG Jing, ZHANG Chuan

(Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712046, China)

Abstract: Using ionic liquid concentration, extraction time, extraction temperature, and solid-liquid ratio as influential factors, and the extraction rate of total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves as an evaluation index, we optimized the process of ionic liquid based ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves by response surface methodologies. The results show the extraction rate of total flavonoids reaches 26.48 mg·g⁻¹, which is closed to the predictive value(26.98 mg·g⁻¹) under the optimal conditions as follows: the solid-liquid ratio of 1:40(g:mL), the extraction time of 22 min, the ionic liquid concentration of 1.1 mol·L⁻¹, and the extraction temperature of 54 ℃. The method is stable and reproducible, and can be used to extract total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves.

Keywords: *Ginkgo biloba* leaf; total flavonoids; ionic liquid; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

离子液体是一种极具潜力的新型绿色溶剂^[1-2],与传统溶剂相比,具有黏度大、溶解性好、蒸气压低、萃取能力强、热稳定性好、可设计等特点。离子液体常与微波及超声技术联用,不仅对环境污染小,而且操作简单、提取时间短、对药材的浪费少、提取率高,是一种理想的中药提取新方法,已被广泛应用于植物活性成分

的提取^[3-9]。

银杏,又称白果,是我国特有的老树种之一^[10]。药理实验和临床研究证明,银杏黄酮在临床治疗中起着重要作用^[11-12]。银杏叶富含黄酮类活性物质,如何提高银杏叶提取物的质量已成为该领域的研究热点。

鉴于此,作者选择[C₄mim]Br 咪唑类离子液体作为溶剂,采用响应面法对超声辅助离子液体提取银杏

基金项目:陕西国际商贸院校级课题(SMXY201802)

收稿日期:2018-05-11

作者简介:周艳红(1983—),女,陕西咸阳人,实验师,研究方向:药物提取, E-mail:zhouyanhong8@126.com。

叶总黄酮的工艺条件进行优化,旨在为其工业化应用和深入研究提供理论依据和实验基础。

1 实验

1.1 材料、试剂与仪器

银杏叶,于4月份采自陕西西安西咸新区管委会的银杏林。

芦丁标准品(含量>98%,批号100080-201202),中国食品药品检定研究院;离子液体,阿拉丁试剂(上海)有限公司;硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

UV-2102PC型紫外可见分光光度计;KQ-250DE型医用数控超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司;D5-R2型离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;多功能粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司。

1.2 标准曲线的绘制

以芦丁为标准物,测定510 nm处吸光度,以芦丁溶液浓度(c)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线,拟合芦丁标准曲线,得到线性回归方程为: $A = 1.3643c + 0.0047 (R^2 = 0.9992)$ 。

1.3 银杏叶的预处理

将银杏叶于60℃烘干至恒重,粉碎,过筛;取干燥后的银杏叶粉若干,加入石油醚,用索氏提取器进行脱色处理;然后将得到的银杏叶粉置于阳光下,除去其中

的石油醚,装入密封袋中,备用。

1.4 银杏叶总黄酮的提取

称取一定质量的银杏叶粉,加入一定浓度的离子液体,在一定的料液比、提取时间、提取温度下超声提取;将提取液于4500 r·min⁻¹离心10 min,收集上清液,采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法测定银杏叶总黄酮含量。按下式计算银杏叶总黄酮提取率(mg·g⁻¹):

$$\text{提取率} = \frac{\text{提取液中总黄酮质量}}{\text{银杏叶粉质量}}$$

1.5 提取工艺优化

在超声功率为100 W的条件下,进行单因素实验,分别考察料液比、提取时间、提取温度和离子液体浓度对银杏叶总黄酮提取率的影响;依据Box-Behnken中心组合实验设计原理,在单因素实验的基础上选择提取时间(A)、离子液体浓度(B)、提取温度(C)为考察因素,利用响应面法优化银杏叶总黄酮的提取工艺参数。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

在超声功率为100 W的条件下,料液比、提取时间、提取温度和离子液体浓度对银杏叶总黄酮提取率的影响如图1所示。

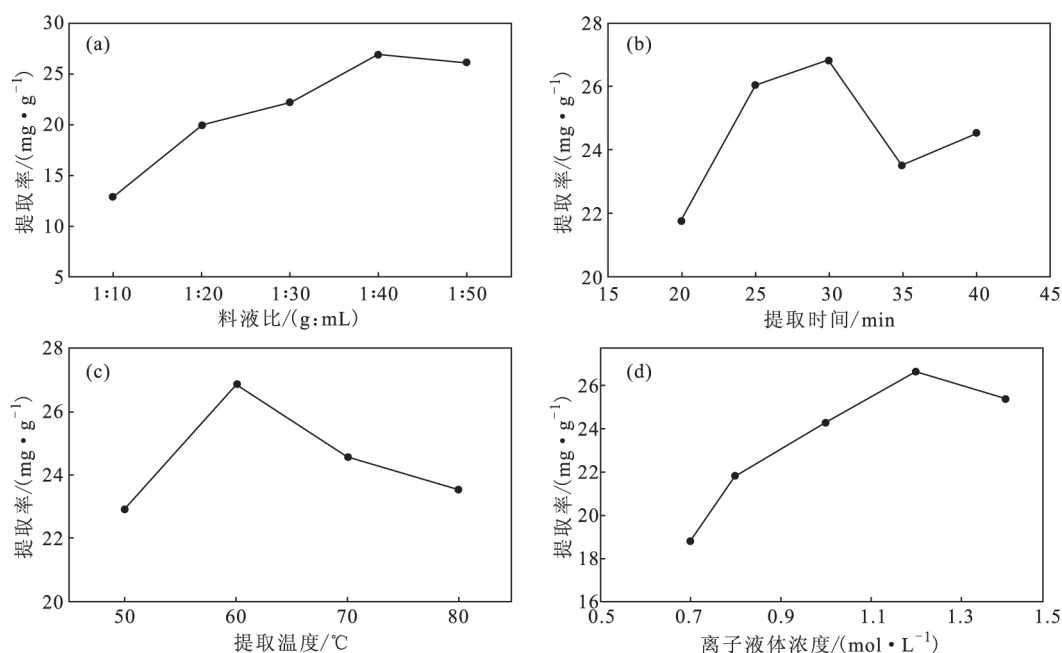


图1 单因素实验结果

Fig. 1 Results of single-factor experiments

由图 1a 可以看出,随着料液比的减小,即提取溶剂离子液体用量的增加,银杏叶总黄酮提取率先升高后略微降低;当料液比达到 1:40(g:mL,下同)时,提取率达到最高。这是因为,随着提取溶剂用量的增加,银杏叶其它成分也随之溶出,影响了黄酮类化合物的溶出。故,料液比以 1:40 较为适宜。

由图 1b 可以看出,随着提取时间的延长,银杏叶总黄酮提取率逐渐升高;30 min 时,提取率达到最高;30 min 后,提取率开始降低。这可能是因为,随着提取时间的延长,提取溶剂损失量增加,导致部分有效成分结构破坏,致使提取率降低。故,提取时间以 30 min 较为适宜。

由图 1c 可以看出,随着提取温度的升高,银杏叶总黄酮提取率先升高后降低,在提取温度为 60 ℃时,提取率达到最高。这是因为,一方面,升高温度可以减小溶剂的黏度,增大黄酮的溶解度,使得有效成分迅速扩散,提取率相应升高;另一方面,当提取温度升高到一定值时可能对黄酮产生一定程度的破坏,使得黄酮损失,不利于提取。故,提取温度以 60 ℃较为适宜。

由图 1d 可以看出,随着离子液体浓度的增加,银杏叶总黄酮提取率逐渐升高;当离子液体浓度达到 1.2 mol·L⁻¹时,离子液体极性与黄酮类化合物相近,根据相似相溶的原理,黄酮类化合物快速溶出,提取率达到最高;继续增加离子液体浓度,其极性占据主要因素,与黄酮类化合物的极性相差越来越大,导致提取率降低。故,离子液体浓度以 1.2 mol·L⁻¹较为适宜。

2.2 响应面法实验结果

2.2.1 方案设计与结果

在单因素实验的基础上,设计因素实验 12 次、重复中心组合实验 5 次,利用响应面法优化银杏叶总黄酮的提取工艺参数。响应面法实验的因素与水平见表 1,设计方案与结果见表 2。

表 1 响应面法实验的因素与水平

Tab. 1 Factors and levels of response surface methodologies

水平	因素		
	A. 提取时间	B. 离子液体浓度	C. 提取温度
	min	mol·L ⁻¹	℃
-1	20	0.70	50
0	25	0.95	55
1	30	1.20	60

2.2.2 回归方程和方差分析

以银杏叶总黄酮提取率为指标,采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 数据进行分析,得到回归方程

为: $Y=26.68+0.24A+2.50B+0.068C+0.20AB+0.077AC-0.20BC-0.22A^2-2.55B^2-0.70C^2$ 。

表 2 响应面法实验的设计方案与结果

Tab. 2 Design and results of response surface methodologies

序号	A	B	C	Y. 总黄酮提取率/(mg·g ⁻¹)
1	0	0	0	25.58
2	0	0	0	21.64
3	-1	0	-1	20.97
4	0	0	0	25.05
5	-1	0	1	26.89
6	0	0	0	26.28
7	1	1	0	26.12
8	0	-1	-1	26.58
9	0	1	1	25.89
10	1	0	1	26.23
11	0	1	-1	21.20
12	1	0	-1	20.89
13	1	-1	0	25.48
14	0	-1	1	26.53
15	0	0	0	26.45
16	-1	1	0	26.63
17	-1	-1	0	26.58

方差分析见表 3。

表 3 回归模型的方差分析

Tab. 3 Variance analysis of regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	81.74	9	9.08	57.66	<0.0001
A	0.46	1	0.46	2.90	0.1326
B	49.93	1	49.93	317.00	<0.0001
C	0.037	1	0.037	0.24	0.6415
AB	0.16	1	0.16	1.02	0.3471
AC	0.024	1	0.024	0.15	0.7077
BC	0.15	1	0.15	0.98	0.3562
A ²	0.20	1	0.20	1.28	0.2948
B ²	27.36	1	27.36	173.69	<0.0001
C ²	2.07	1	2.07	13.12	0.0085
残差	1.10	7	0.16	—	—
失拟项	0.94	3	0.31	7.60	0.0916
纯误差	0.16	4	0.041	—	—
总和	82.84	16	—	—	—

注:P<0.0001,高度显著;P<0.01,极显著;P<0.05,显著。

由表3可知,模型 $P < 0.0001$, 达到高度显著水平;而失拟项 ($P = 0.0916 > 0.05$) 并不显著;模型变异系数 CV 为 1.58% , CV 值偏低,说明其置信度较高,模型方程能更好地反映真实的实验值;相关系数 $R^2 = 0.9867$, 决定系数 $R^2_{adj} = 0.9696$, 表明所建模型拟合度良好。各因素对银杏叶总黄酮提取率的影响大小依次为:离子液体浓度 $>$ 提取时间 $>$ 提取温度。 B 、 B^2 、 C^2

达到极显著水平 ($P < 0.01$), 其它均不显著,即各因素对银杏叶总黄酮提取率不是简单线性关系,而是存在一定交互作用。

2.2.3 响应面分析

固定回归方程中任意1个因素在编码值0的水平,研究剩余2个因素对银杏叶总黄酮提取率的影响,结果如图2所示。

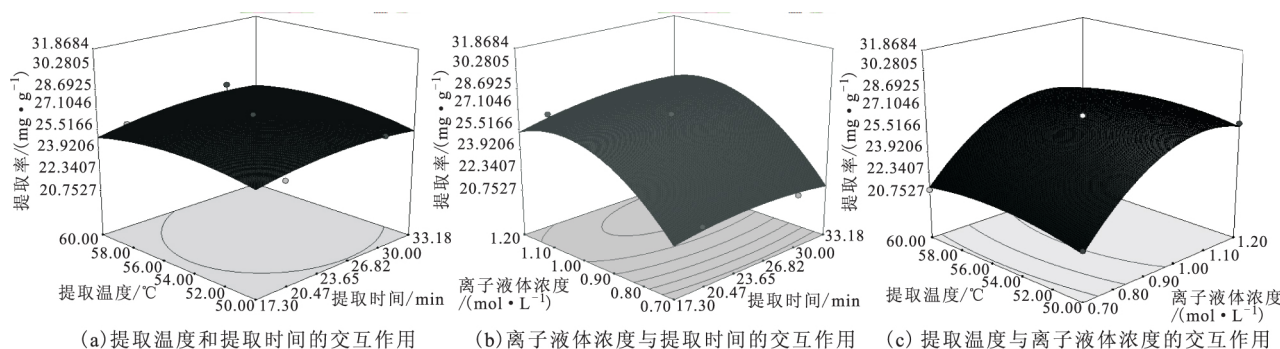


图2 因素交互作用对银杏叶总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of the interaction between two factors on the extraction rate of total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves

由图2a可知,当提取时间一定时,银杏叶总黄酮提取率随提取温度的升高呈上升趋势;提取温度一定时,提取率随提取时间的延长也呈上升趋势,而且响应面比较平滑,表明提取温度和提取时间的交互作用不显著。图2b和图2c的响应面变化较为明显,坡度较陡,等高线呈椭圆形,说明离子液体浓度和提取时间、提取温度的交互作用显著。离子液体浓度一定时,提取率随提取时间和提取温度的变化比较平稳;提取温度、提取时间一定时,提取率随离子液体浓度的变化较大,说明离子液体浓度对提取率的影响较大。

2.2.4 验证实验

通过回归模型预测的银杏叶总黄酮的最佳提取工艺条件为:提取时间 22.13 min 、离子液体浓度 $1.09 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、提取温度 $53.67 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 银杏叶总黄酮提取率理论上可达 $26.98 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。考虑实际操作的可行性,将其修正为:提取时间 22 min 、离子液体浓度 $1.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、提取温度 $54 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 在此工艺条件下进行验证实验,实际得到的银杏叶总黄酮提取率为 $26.48 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 与理论值相差不大。说明采用响应面法优化得到的提取工艺参数可靠,具有一定的实用价值。

2.2.5 比较实验

分别以甲醇、乙醇、离子液体作为溶剂,在溶剂质量分数为 20% 、料液比为 $1:40 (\text{g}:\text{mL})$ 、提取时间为 30 min 、提取温度为 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下提取银杏叶中总黄酮,提取率分别为 $11.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $13.74 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、

$20.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明,相同条件下,以离子液体为溶剂时,银杏叶总黄酮提取率最高,同时由于离子液体对环境污染小,可以重复利用,因此是一种理想的提取溶剂。

3 结论

通过响应面法优化超声辅助离子液体提取银杏叶总黄酮,最佳工艺条件为:料液比 $1:40 (\text{g}:\text{mL})$ 、提取时间 22 min 、离子液体浓度 $1.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、提取温度 $54 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 在此条件下,银杏叶总黄酮提取率为 $26.48 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 回归模型拟合度较高,实际应用价值高。该方法操作简单、提取率高、提取时间短,是一种理想的中药提取新方法,可作为不同类型中药有效成分提取方法的选择。

参考文献:

- [1] SEDDON K R. Ionic liquids for clean technology[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 1997, 68(4): 351-356.
 - [2] WILKES J S, ZAWOROTKO M J. Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids[J]. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1992, 13: 965-967.
 - [3] 刘宝亮, 曹桂萍. 响应面分析法优化离子液体双水相提取香樟叶中总黄酮的工艺条件[J]. 现代食品科技, 2018, 34(4): 179-187.
- LIU B L, CAO G P. Response surface methodology for optimization of extraction process of total flavonoids from camphor leaves by an ionic liquid/aqueous two-phase system[J]. Modern Food Science & Technology, 2018, 34(4): 179-187.

- [4] 王占一,张立华,王玉海,等.微波辅助离子液体提取发酵石榴籽总黄酮及其抑制亚硝化反应作用[J].中成药,2018,40(1):213-218.
- [5] 王新红,李雪梅,蔡晨,等.离子液体提取山楂绿原酸的工艺优化[J].农业工程学报,2014,30(10):270-276.
WANG X H, LI X M, CAI C, et al. Process optimization of chlorogenic acid extraction from *Crataegus pinnatifida* Bge using aqueous ionic liquid[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2014, 30(10): 270-276.
- [6] 李永祥,张玲玲,刘雁红,等.离子液体在食品领域中的应用研究进展[J].食品工业科技,2016,37(5):394-400.
LI Y X, ZHANG L L, LIU Y H, et al. Advance in research and application of ionic liquids in food science[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(5): 394-400.
- [7] 李明英.离子液体在天然活性物质提取中的应用研究进展[J].药学进展,2015,39(6):437-445.
LI M Y. Application progress of ionic liquids in extraction of natural active compounds[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2015, 39(6): 437-445.
- [8] 张丹丹,谭婷,刘鄂湖,等.离子液体在中药提取、分离与分析中的应用[J].中国药科大学学报,2013,44(4):380-384.
ZHANG D D, TAN T, LIU E H, et al. Applications of ionic liquids on extraction, separation and analysis of traditional Chinese medicines[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2013, 44(4): 380-384.
- [9] 王宏飞,刘旭,杨秋亚,等.离子液体在中草药有效成分提取中的应用研究进展[J].山东化工,2014,44(3):55-57.
WANG H F, LIU X, YANG Q Y, et al. Advances in application of ionic liquids in Chinese herbal medicine effective components extraction[J]. Shandong Chemical Industry, 2014, 44(3): 55-57.
- [10] 柳闽生,陈晔,徐常龙.银杏叶有效成分的研究与资源的开发利用[J].江西林业科技,2006(2):28-31.
LIU M S, CHEN Y, XU C L. Study on effective constituent and resource exploitation on *Ginkgo biloba* [J]. Jiangxi Forestry Science and Technology, 2006(2): 28-31.
- [11] 中国科学院植物研究所.治疗冠心病的银杏叶制剂及其药理实验[J].中草药通讯,1972(4):15-18.
- [12] 张红梅.天然药物银杏的化学成分和药理作用[J].首都师范大学学报(自然科学版),2014,35(3):41-46.
ZHANG H M. The chemical constituents and pharmacological activities of natural medicine, *Ginkgo biloba* [J]. Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition), 2014, 35(3): 41-46.

(上接第25页)

- [8] XIONG J H, MENG Q Y, SUN W J. Luminescent properties and energy transfer mechanism from Tb^{3+} to Eu^{3+} in $CaMoO_4:Tb^{3+}$, Eu^{3+} phosphors[J]. Journal of Rare Earths, 2016, 34(3): 251-258.
- [9] 刘艳,姜营营,刘桂霞,等. $NaY(WO_4)_2:Eu^{3+}/Tb^{3+}/Tm^{3+}$ 白色荧光粉的制备与发光性能[J].无机化学学报,2013,29(2):277-282.
LIU Y, JIANG Y Y, LIU G X, et al. Preparation and luminescence properties of $NaY(WO_4)_2:Eu^{3+}/Tb^{3+}/Tm^{3+}$ white light phosphors[J]. Chinese Journal of Inorganic Chemistry, 2013, 29(2): 277-282.
- [10] NAG A, KUTTY T R N. The light induced valence change of europium in $Sr_2SiO_4:Eu$ involving transient crystal structure[J]. Journal of Materials Chemistry, 2004, 14(10): 1598-1604.
- [11] MADEJ A, ZYCH E. Controlled synthesis of the monoclinic and orthorhombic polymorphs of Sr_2SiO_4 activated with Ce^{3+} or Eu^{2+} [J]. RSC Advances, 2015, 5(126): 104441-104450.
- [12] GUPTA S K, NIGAM S, YADAV A K, et al. An insight into local environment of lanthanide ions in $Sr_2SiO_4:Ln$ ($Ln=Sm, Eu$ and Dy) [J]. New Journal of Chemistry, 2015, 39(8): 6531-6539.
- [13] JU L C, XU X, HAO L Y, et al. Modification of the coordination environment of Eu^{2+} in $Sr_2SiO_4:Eu^{2+}$ phosphors to achieve full color emission[J]. Journal of Materials Chemistry C, 2015, 3(7): 1567-1575.
- [14] BLACK A P, DENAULT K A, FRONTERA C, et al. Emission colour tuning through coupled N/La introduction in $Sr_2SiO_4:Eu^{2+}$ [J]. Journal of Materials Chemistry C, 2015, 3(43): 11471-11477.
- [15] ZHAO C, ZHU D C, GAO W, et al. Effect of doping Gd^{3+} on crystal structure and luminescent properties of $Sr_2SiO_4:Eu^{2+}$ phosphor[J]. Journal of Rare Earth, 2015, 33(7): 693-699.
- [16] 林慧,袁曦明,李永周,等. $Sr_2SiO_4:Eu^{3+}$ 荧光粉的燃烧法制备及其发光性能的研究[J].中国稀土学报,2010,28(1):120-123.
LIN H, YUAN X M, LI Y Z, et al. Combustion synthesis and luminescence properties of $Sr_2SiO_4:Eu^{3+}$ phosphor[J]. Journal of the Chinese Rare Earth Society, 2010, 28(1): 120-123.
- [17] 李盼来,杨志平,王志军,等. $Sr_2SiO_4:Dy^{3+}$ 材料制备及发光特性[J].高等学校化学学报,2008,29(3):457-460.
LI P L, YANG Z P, WANG Z J, et al. Preparation and luminescence characteristics of $Sr_2SiO_4:Dy^{3+}$ phosphor [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2008, 29(3): 457-460.
- [18] 韩王康,田蕾,徐宗利,等.无溶剂研磨合成双核席夫碱配合物及多组分自分类行为[J].无机化学学报,2017,33(4):550-559.
HAN W K, TIAN L, XU Z L, et al. Self-sorting of binuclear Schiff-base complexes under solvent-free grinding conditions[J]. Chinese Journal of Inorganic Chemistry, 2017, 33(4): 550-559.