

离子液体辅助超声波法提取猫眼草中黄酮的研究

张彦^{1,2}, 简仕武³, 杨燕妮⁴, 夏俭华⁵, 杨黎燕¹, 唐一梅¹, 张寒¹, 余雨婷¹(1.西安医学院药学院, 西安 710021; 2.西安交通大学, 陕西省中医药管理局七药资源及抗肿瘤重点实验室, 西安 710065; 3.白河县中医医院药剂科, 陕西 安康 725899; 4.福建中医药大学, 福州 350108; 5.上海中医药大学, 上海 201203)

摘要: 目的 优化离子液体辅助超声波法提取猫眼草中的黄酮工艺, 为进一步提取猫眼草中的黄酮类化合物提供依据。

方法 以离子液体为提取溶剂, 辅助超声波法提取猫眼草中的黄酮。依次改变离子液体的种类、浓度, 提取溶剂总体积与药材质量比, 超声时间, 超声温度。以总黄酮提取率为指标, 确定单因素最佳条件, 在单因素试验结果的基础上结合响应曲面设计优化最佳提取条件, 再用 HPLC 测定山柰酚和金丝桃苷的含量探究不同离子液体对猫眼草中黄酮提取的变化规律。**结果** 最佳提取条件: 离子液体种类为 1-丁基-3-甲基咪唑溴盐、离子液体与醇的体积比为 1 : 6、提取溶剂总体积与药材质量比为 50 : 1、温度为 40 ℃、超声时间为 1 h。在最佳条件下提取率为(15.8±0.9)%, 相比传统提取率 5.14%, 提取率明显增加。**结论** 用离子液体法提取猫眼草植物黄酮可行。黄酮提取率与离子液体母核碳链长短不成正相关性。

关键词: 离子液体; 超声; 猫眼草; 黄酮; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)23-3055-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.23.002

引用本文: 张彦, 简仕武, 杨燕妮, 等. 离子液体辅助超声波法提取猫眼草中黄酮的研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(23): 3055-3061.

Study on the Extraction of Flavonoids from *Euphorbia Lunulata* Bge by Ionic Liquid Assisted Ultrasonic Method

ZHANG Yan^{1,2}, JIAN Shiwu³, YANG Yanni⁴, XIA Jianhua⁵, YANG Liyan¹, TANG Yimei¹, ZHANG Han¹, YU Yuting¹(1.College of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2.Xi'an Jiaotong University, Seven Pharmaceutical Resources and Anti-tumor Medicine Key Laboratory of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710065, China; 3.Pharmacy Division, Baihe County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ankang 725899, China; 4.Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 5.Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the process of extracting flavonoids from *Euphorbia lunulata* Bge by ionic liquid assisted ultrasonic method, and provide a basis for further extraction of flavonoids in *Euphorbia lunulata* Bge. **METHODS** Using ionic liquid as extraction solvent, extract flavonoids from *Euphorbia lunulata* Bge assisted with ultrasound method. The species and concentration of ionic liquids, the ratio of total volume of extracted solvent and the mass of medicinal materials, ultrasonic time, ultrasonic temperature were changed in turn. Taking the flavonoid extraction rate as the index, the optimal conditions of the single factor were determined, optimize the optimal extraction conditions based on the single factor experimental results combined with the responsive surface design. The contents of kaempferol and hypericin were then determined by HPLC to investigate the changes of different ionic liquids on flavonoid extraction in *Euphorbia lunulata* Bge. **RESULTS** The optimum extraction conditions: the type of ionic liquid was 1-butyl-3-methylimidazole bromide, the volume ratio of ionic liquid to alcohol was 1 : 6, the ratio of the total volume of the extracted solvent to the mass of the medicinal material was 50 : 1, the temperature was 40 ℃, and the ultrasonic time was 1 h. The extraction rate was (15.8±0.9)% under the optimal conditions, which was significantly increased compared to the conventional extraction rate of 5.14%. **CONCLUSION** It is feasible to extract flavonoids from *Euphorbia lunulata* Bge by using ionic liquid as solvent. Flavonoid extraction rate is not positively correlated with the carbon chain length of the ionic liquid parent nucleus.

KEYWORDS: ionic liquid; ultrasonography; *Euphorbia lunulata* Bge; flavonoids; HPLC

猫眼草为大戟科大戟属植物 *Euphorbia lunulata* Bge 的全草, 性微寒, 有祛痰镇咳、散结消肿、拔毒止痒的作用。长期以来一直作为民间

草药, 内服用于慢性支气管炎, 外用可治疗淋巴结核, 癰疮发痒^[1]。笔者所在课题组发现猫眼草具有抗肿瘤活性^[2-3]。已证实猫眼草中含有山柰酚、

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81903579); 榆林市科技局产学研项目(CXY-2020-092); 西安市科技局农业技术研发项目(21NYYF0062)

作者简介: 张彦, 女, 硕士, 副教授 E-mail: 110493988@qq.com

槲皮素等黄酮类成分,具有祛痰止咳作用^[4-5]。

离子液体是指全部由离子组成的液态物质^[6]。与传统溶剂相比,离子液体无色无味、溶解度好,溶解范围广、熔点低、不易燃、不易挥发、热稳定性好、具有可设计性^[6-7]等优点。不仅在电化学、有机合成、材料科学等领域得到广泛应用,在萃取分离方面也具有良好的效果,是一种能替代传统有机溶剂的新型绿色溶剂^[8]。

传统碱提、醇提、加热回流等方法提取黄酮,耗能高,提取率低^[9]。本研究创新性地运用超声辅助离子液体提取猫眼草中黄酮类化合物。用响应曲面设计确定最佳提取条件。采用 HPLC 检测提取的猫眼草黄酮中金丝桃苷与山柰酚含量的变化规律。旨在探究新型绿色离子液体提取猫眼草中黄酮的可行性,阐明离子液体提取活性成分的原理与影响因素,为绿色高效环保提取中药活性成分提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ-250B 型超声波清洗器、1510 型全波长酶标仪(昆山市超声仪器有限公司);FW-100D 型高速万能粉碎机(天津鑫博得仪器有限公司);ST8 高速冷冻低温离心机(ThermoSovall);1220 型液相色谱仪(Agilent 公司);SQP 分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

1.2 试剂与试药

猫眼草(*Euphorbia lunulata* Bge)由笔者于 2016 年 8 月在陕西汉中连城山采集,经西安医学院药学院生药教研室郑梦迪副教授鉴定。1-乙基-3-甲基咪唑溴盐([EMIM]Br)、1-丁基-3-甲基咪唑溴盐([BMIM]Br)、1-己基-3-甲基咪唑溴盐([HMIM]Br)、1-辛基-3-甲基咪唑溴盐([OMIM]Br)均购自中科院兰州化学物理研究所。对照品:金丝桃苷(成都埃法生物科技有限公司,批号:AF9020402;纯度 $\geq 98\%$);槲皮素(成都艾科达化学试剂有限公司,批号:201603181;纯度 $\geq 98\%$);山柰酚(成都埃法生物科技有限公司,批号:AF7061302;纯度 $\geq 98\%$)。乙腈(批号:20171117)、甲醇(批号:20160122)均为色谱纯,购自天津市大茂化学试剂厂;甲酸(色谱纯,Aladdin Industrial Corporation,批号:F112034);95%乙醇(分析纯,天津益力化学试剂有限公司,批号:20161115);亚硝酸钠(天津市巴斯夫化工有限公司);硝酸铝和氢

氧化钠(沈阳化学试剂厂);六氟磷酸钾(源叶生物,纯度 $\geq 99\%$,批号:J03GS150755);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法

2.1 猫眼草总黄酮测定方法

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取槲皮素对照品 10.00 mg,用 60%乙醇溶解,制得 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的槲皮素对照品溶液。然后分别量取槲皮素对照品溶液 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 mL 于 10 mL 量瓶中,加显色剂反应后,用 60%乙醇定容,配制成浓度为 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.2 药材中黄酮的提取与离子液体的去除 猫眼草药材粉碎后过 100 目筛,称取 0.5 g,按照一定比例与提取溶剂 60%乙醇混合后加入离子液体在一定温度和功率下超声提取^[10]。再按照六氟磷酸钾法^[11],取六氟磷酸钾粉末 5 g 溶于 50 mL 纯水超声后,室温静置待沉淀物不再增多时过滤得六氟磷酸钾饱和水溶液。取提取得到的猫眼草黄酮溶液 2 mL,加入 2 mL 六氟磷酸钾饱和水溶液,放置 4 h 产生六氟磷酸钾与离子液体复合盐沉淀,取上清液得不含离子液体的猫眼草黄酮溶液。

2.1.3 显色剂加入与酶标仪测定吸光度测定 取“2.1.1”项下对照品溶液或“2.1.2”项下样品溶液各 2 mL 分别依次加入 5% NaNO_2 溶液与 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液各 0.3 mL 均摇匀放置 6 min,再加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 4 mL 摇匀放置 10 min,取 200 μL 于 96 孔板,检测得到全波长酶标仪 510 nm 条件下的吸光度 A 。

2.1.4 总黄酮的测定与提取率计算 以吸光度 A 为纵坐标,槲皮素对照品浓度为横坐标得到槲皮素标准曲线^[3]: $y=4\,513.3x+0.047\,2$, $R^2=0.994\,4$ 。由标准曲线计算总黄酮的含量。按照公式(1)计算黄酮提取率。

$$\text{黄酮提取率}(\%) = \frac{\text{总黄酮质量}}{\text{猫眼草总质量}} \times 100\% \quad (1)$$

2.2 单因素考察黄酮提取工艺

2.2.1 离子液体的种类 取药材猫眼草 4 份,每份 0.5 g,按照提取溶剂与药材(30:1,离子液体与醇的体积为 1:6 的比例,分别加入 60%乙醇 12.86 mL 与 2.14 mL 的[EMIM]Br、[BMIM]Br、[HMIM]Br、[OMIM]Br),在 50 $^{\circ}\text{C}$ 超声功率 200 W 条件下提取 1 h,静置后取上清液 2 mL 按照“2.1”

项下方法处理并计算, 比较不同离子液体提取的结果。

2.2.2 离子液体加入量 取药材猫眼草 5 份, 每份 0.5 g, 按照提取溶剂与药材质量体积 30 : 1, 离子液体与醇的体积比分别为 1 : 3, 1 : 6, 1 : 9, 1 : 12, 1 : 15^[12]分别加入 60%乙醇 11.25, 12.86, 13.5, 13.85, 14.06 mL 与[BMIM]Br 3.75, 2.14, 1.50, 1.15, 0.94 mL, 在功率 200 W 50 °C 的条件下超声提取 1 h, 静置后取上清液 2 mL 按照“2.1”项下方法处理并计算, 比较不同条件下黄酮的提取率。

2.2.3 液固比 取药材猫眼草 6 份, 每份 0.5 g, 按照提取溶剂体积与药材质量比分别为 10 : 1, 20 : 1, 30 : 1, 40 : 1, 50 : 1, 60 : 1^[13], 离子液体与醇的体积比为 1 : 9, 加入 60%乙醇 4.5, 9, 13.5, 18, 22.5, 27 mL 与[BMIM]Br 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mL, 在功率 200 W 50 °C 条件下超声提取 1 h, 静置后取上清液 2 mL 按照“2.1”项下方法处理并计算, 比较不同条件下黄酮的提取率。

2.2.4 超声时间 取药材猫眼草 6 份, 每份 0.5 g, 按照提取溶剂体积与药材质量比为 40 : 1, 离子液体与醇的体积比 1 : 9, 加入[BMIM]Br 2 mL 与 60%乙醇 18 mL, 在功率 200 W 50 °C 条件下分别超声提取 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 h^[14], 静置后取上清液 2 mL 按照“2.1”项下方法处理并计算, 比较不同条件下黄酮的提取率。

2.2.5 超声温度 取药材猫眼草 6 份, 每份 0.5 g, 按照提取溶剂与药材质量体积 40 : 1 的比例, 离子液体与醇的体积 1 : 9 的比例, 加入[BMIM]Br 2 mL 与 60%乙醇 18 mL, 分别在 30, 40, 50, 60, 70 °C^[15]功率 200 W 条件下超声提取 1.5 h, 静置后取上清液 2 mL 按照“2.1”项下方法处理并计算, 比较不同条件下黄酮的提取率。

2.3 响应面设计

利用 Box-Behnken 设计原理, 用 Design-Expert V8.0.6 软件分析处理, 根据单因素试验结果, 选取离子液体加入量(A)、液固比(B)、超声时间(C)、超声温度(D)4 个单因素为变量, 以黄酮提取率为响应值, 设计 4 因素 3 水平试验^[16-17]。根据软件设计 27 组试验方案并完成测定。

通过计算得到离子液体加入量(A)、液固比(B)、超声时间(C)、超声温度(D)与提取率(Y)之间的线性回归方程。对该模型方程进行方差分析和显著性检验。根据研究结果确定在试验范围内的 4

个因素对提取率的影响大小顺序。

根据响应面试验得预测最佳工艺条件, 在最佳工艺条件下做验证实验, 平行操作 3 次得平均提取率, 与理论值进行比较。

另外, 本研究通过与不加离子液体超声提取黄酮的结果进行比较。取药材猫眼草 1 g, 按照药材与提取溶剂质量体积 1 : 20 的比例加入 60%乙醇 20 mL, 在 50 °C, 功率 200 W 条件下超声提取 1 h, 静置后取上清液 2 mL, 后续操作同“2.1”项下方法计算提取率。

2.4 HPLC 测定提取黄酮含量^[18]

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Agilent HC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸(B), 梯度洗脱(0~18 min, 20%A; 18~40 min, 60%A, 40~45 min, 20%A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 波长 340 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备 分别称取金丝桃苷对照品 9.7 mg 和山柰酚对照品 10.3 mg, 各自用甲醇定容到 25 mL 量瓶中。精密吸取上述 2 种溶液各 1 mL, 合并, 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 混合均匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得到 0.038 8 mg·mL⁻¹ 金丝桃苷溶液和 0.041 2 mg·mL⁻¹ 山柰酚混合对照品溶液。

2.4.3 样品溶液的制备与含量测定 取“2.2.1”项下制得的 4 种离子液体提取猫眼草黄酮溶液 1 mL。用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得样品溶液。按照“2.4.1”项下色谱条件进样测定。

3 结果

3.1 单因素试验

结果显示, 提取率随着离子液体母核碳链的增加呈现先增加后下降的趋势, 分析原因可能是碳链的长短对提取率有影响, 合适碳链长度的离子液体与黄酮结合率大, 有利于提取该成分。[BMIM]Br 时提取率最高。随着提取溶剂中离子液体比例的增加, 提取率呈现的变化规律, 当离子液体与醇的体积比为 1 : 9 时提取率最高。随着液固比的增加, 提取率呈现的变化规律, 当液固比为 40 : 1 时提取率最高。当提取时间为 1.5 h 时提取率最高。当提取温度为 50 °C 时提取率最高。结果见图 1。

3.2 响应面试验

按照单因素试验结果, 以黄酮提取率为响应值, 设计 4 因素 3 水平试验, 根据软件设计 27 组试验方案并完成测定, 试验设计见表 1。结果显示,

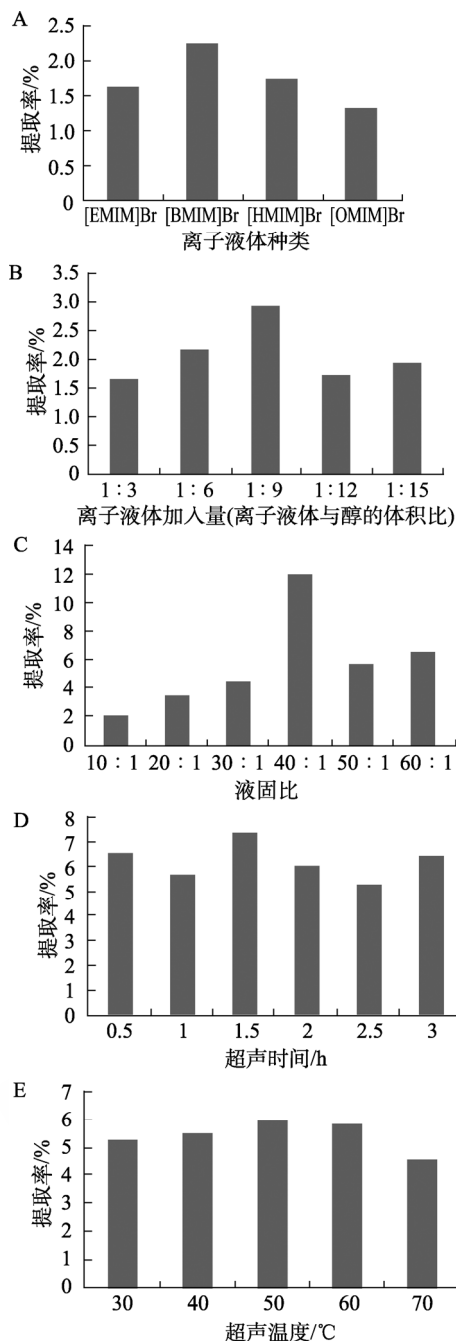


图1 单因素对猫眼草黄酮提取率的影响
A-离子液体种类; B-离子液体加入量; C-液固比; D-超声时间; E-超声温度。

Fig. 1 Effect of single factor on the extraction rate of flavonoids from the *Euphorbia lunulata* Bge
A-type of ionic liquid; B-amount of ionic liquid addition; C-liquid-solid ratio; D-ultrasonic time; E-ultrasonic temperature.

表1 因素及水平表

Tab. 1 Factors and levels table

编码水平	A[离子液体加入量(离子液体与醇的体积比)]	B(液固比)	C(超声时间)/h	D(超声温度)/℃
-1	1 : 6	30 : 1	1	40
0	1 : 9	40 : 1	1.5	50
1	1 : 12	50 : 1	2	60

离子液体加入量(A)、液固比(B)、超声时间(C)、超声温度(D)与提取率(Y)之间的线性回归方程:

$$Y=0.065+0.003\ 224A+0.009\ 363B-0.006\ 88C-0.008\ 302D-0.009\ 809AB+0.011AC+0.008\ 282AD-0.001\ 522BC-0.019BD+0.008\ 33CD+0.005\ 099A^2+0.002\ 764B^2+0.001\ 446C^2-0.007\ 682D^2$$
, 结果见表2。

表2 响应面试验方案及试验结果

Tab. 2 Response surface experimental scheme and results

实验组数	A[离子液体加入量(离子液体与醇的体积比)]	B(液固比)	C(超声时间)/h	D(超声温度)/℃	提取率/%
1	1 : 9	40 : 1	2.0	60	4.045 53
2	1 : 9	40 : 1	2.0	40	4.492 89
3	1 : 12	50 : 1	1.5	50	5.121 33
4	1 : 6	40 : 1	1.5	60	4.108 50
5	1 : 9	40 : 1	1.0	60	4.289 85
6	1 : 9	50 : 1	1.5	60	4.218 78
7	1 : 9	30 : 1	1.5	40	3.651 76
8	1 : 9	40 : 1	1.5	50	3.813 17
9	1 : 6	40 : 1	2.0	50	4.189 09
10	1 : 12	40 : 1	1.0	50	7.503 46
11	1 : 12	40 : 1	1.5	60	8.121 66
12	1 : 9	50 : 1	1.5	40	9.044 03
13	1 : 9	40 : 1	1.5	50	8.058 57
14	1 : 12	40 : 1	1.5	40	8.235 50
15	1 : 9	30 : 1	1.5	60	6.282 03
16	1 : 12	40 : 1	2.0	50	7.795 80
17	1 : 9	50 : 1	1.0	50	9.580 66
18	1 : 9	30 : 1	2.0	50	6.082 66
19	1 : 6	40 : 1	1.0	50	8.293 67
20	1 : 6	30 : 1	1.5	50	6.185 54
21	1 : 6	40 : 1	1.5	40	7.535 22
22	1 : 9	40 : 1	1.0	40	8.069 30
23	1 : 6	50 : 1	1.5	50	8.913 77
24	1 : 9	40 : 1	1.5	50	7.525 69
25	1 : 9	30 : 1	1.0	50	6.089 51
26	1 : 12	30 : 1	1.5	50	6.316 58
27	1 : 9	50 : 1	2.0	50	8.964 88

对该模型方程进行方差分析和显著性检验,结果显示,回归方程模型 F 值为 1.55, P 值为 0.004 9,表明模型是显著的,失拟项 $P=0.849\ 9$,表明失拟项不显著,表明响应面试验的回归方程预测猫眼草中的黄酮提取率可行。由 P 值可知,在此实验范围内的 4 个因素对提取率的影响大小顺序为 B(液固比)>D(超声温度)>C(超声时间)>A(离子液体加入量),因素 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对提取效果的线性效应均不显著,因素 AB、AC、AD、BC、CD 对提取效率的交互影响不显著,见表 3。各单因素的交互作用提取率的影响趋势见图 2~7。

表 3 黄酮得率模型的显著性检验及方差分析

Tab. 3 Significance test and variance analysis of flavonoid yield model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	6.145×10^{-3}	14	4.389×10^{-3}	1.55	0.004 9	显著
A	1.247×10^{-4}	1	1.247×10^{-4}	0.44	0.518 9	
B	1.052×10^{-3}	1	1.052×10^{-3}	3.72	0.077 6	
C	5.680×10^{-4}	1	5.680×10^{-4}	2.01	0.181 6	
D	8.271×10^{-4}	1	8.271×10^{-4}	2.93	0.112 7	
AB	3.848×10^{-4}	1	3.848×10^{-4}	1.36	0.265 8	
AC	4.833×10^{-4}	1	4.833×10^{-4}	1.71	0.215 3	
AD	2.744×10^{-4}	1	2.744×10^{-4}	0.97	0.343 8	
BC	9.270×10^{-6}	1	9.270×10^{-6}	0.033	0.859 3	
BD	1.390×10^{-3}	1	1.390×10^{-3}	4.92	0.046 6	
CD	2.776×10^{-4}	1	2.776×10^{-4}	0.98	0.341 1	
A ²	1.387×10^{-4}	1	1.387×10^{-4}	0.49	0.496 8	
B ²	4.074×10^{-5}	1	4.074×10^{-5}	0.14	0.710 7	
C ²	1.115×10^{-5}	1	1.115×10^{-5}	0.039	0.845 8	
D ²	3.147×10^{-4}	1	3.147×10^{-4}	1.11	0.319 9	
残差误差	3.389×10^{-3}	12	2.824×10^{-4}			
失拟项	2.319×10^{-3}	10	2.319×10^{-4}	0.43	0.849 9	不失拟
纯误差	1.070×10^{-3}	2	5.348×10^{-4}			
合计	9.534×10^{-3}	26				

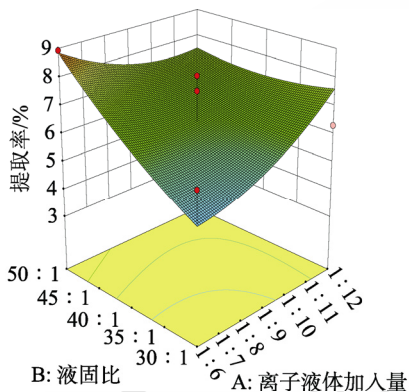


图 2 液固比与离子液体加入量的响应面图
Fig. 2 Response surface diagram of liquid-solid ratio and amount of ionic liquid

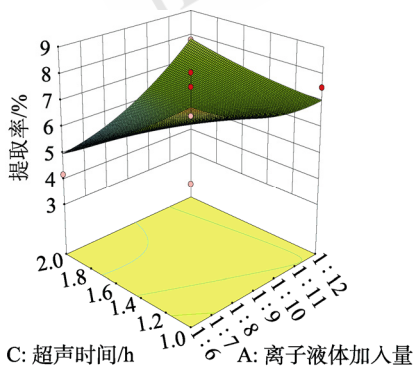


图 3 超声时间与离子液体加入量的响应面图
Fig. 3 Response surface diagram of ultrasonic time and amount of ionic liquid

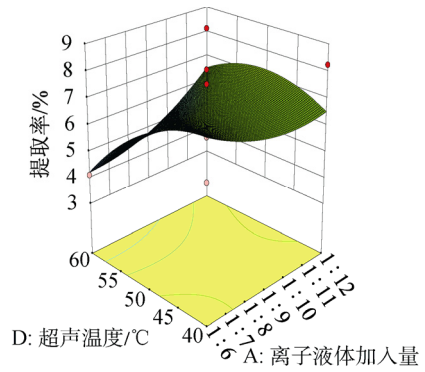


图 4 超声温度与离子液体加入量的响应面图
Fig. 4 Response surface diagram of ultrasonic temperature and amount of ionic liquid

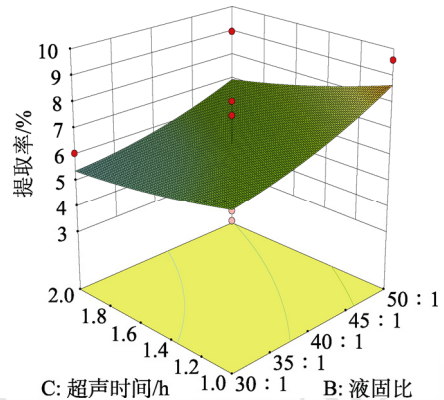


图 5 超声时间与液固比的响应面图
Fig. 5 Response surface diagram of ultrasonic time and liquid-solid ratio

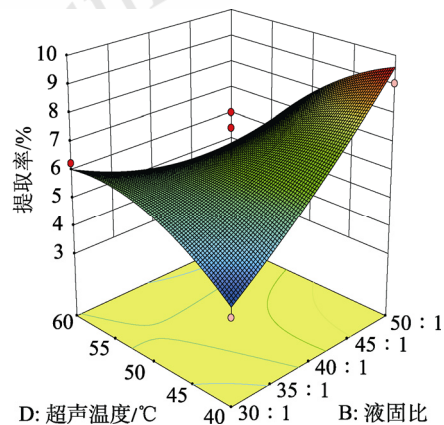


图 6 超声温度与液固比的响应面图
Fig. 6 Response surface diagram of ultrasonic temperature and liquid-solid ratio

根据响应面试验结果预测最佳工艺条件：离子液体与醇体积比为 1 : 6、提取溶剂总体积与药材质量比为 49.98 : 1、超声时间为 1 h，超声温度 40.1 °C，在该最佳工艺条件下提取猫眼草黄酮的提取率预测值为 14.5%。按照响应面预测最佳工艺条件验证实验，3 次提取率分别为 15.8%，14.9%，

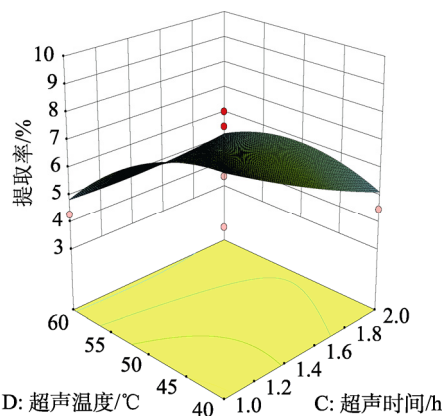


图7 超声温度与超声时间的响应面图

Fig. 7 Response surface diagram of ultrasonic temperature and ultrasonic time

16.7%,平均提取率为 $(15.8\pm0.9)\%$,与理论值 14.5%基本吻合。不加离子液体超声提取率仅为 5.14%。

3.3 HPLC 含量测定

结果显示, 4 种离子液体提取猫眼草黄酮中, [OMIM]Br 提取的金丝桃苷含量最高, [BMIM]Br 提取的山柰酚含量最高, 结果见图 8 和表 4。

表 4 样品溶液中各成分含量

Tab. 4 Content of control article in sample solution mg

样品种类	金丝桃苷含量	山柰酚含量
1-乙基-3-甲基咪唑溴盐 ([EMIM]Br)	0.001 789	5.94×10^{-6}
1-丁基-3-甲基咪唑溴盐 ([BMIM]Br)	0.001 600	6.86×10^{-6}
1-己基-3-甲基咪唑溴盐 ([HMIM]Br)	0.001 337	3.00×10^{-6}
1-辛基-3-甲基咪唑溴盐 ([OMIM]Br)	0.001 981	2.31×10^{-6}

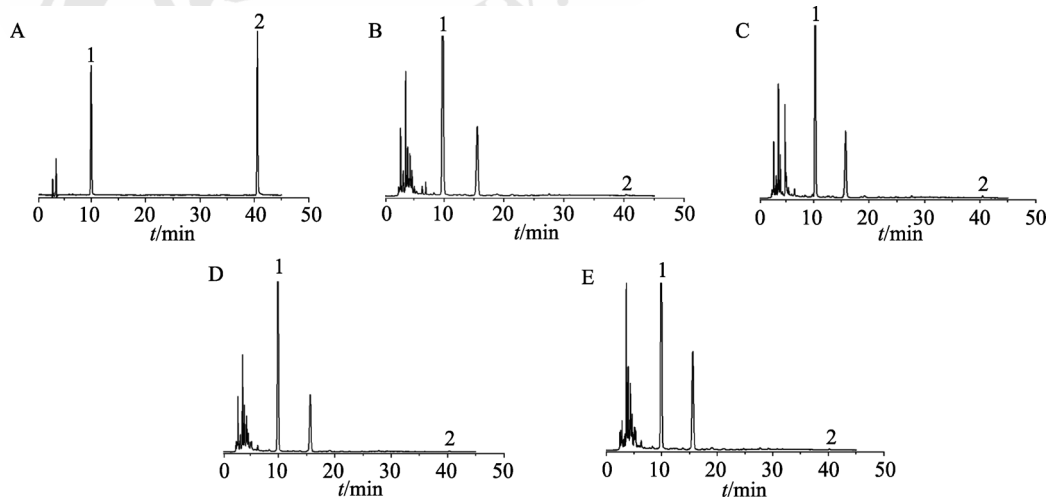


图8 标准品溶液及样品溶液 HPLC 图谱

A-混合对照品; B-1-乙基-3-甲基咪唑溴盐([EMIM]Br); C-1-丁基-3-甲基咪唑溴盐([BMIM]Br); D-1-己基-3-甲基咪唑溴盐([HMIM]Br); E-1-辛基-3-甲基咪唑溴盐([OMIM]Br); 1-金丝桃苷; 2-山柰酚。

Fig. 8 HPLC chromatography of standard solution and sample solution

A-mixed marking; B-1-ethyl-3-methimidazole bromine([EMIM]Br); C-1-butyl-3-methimidazole bromine([BMIM]Br); D-1-hexyl-3-methimidazole bromine([HMIM]Br); E-1-octyl-3-methimidazole bromine ([OMIM]Br); 1-hyperoside; 2-kaempferol.

4 结论

响应面优化最佳工艺: [BMIM]Br、离子液体与醇的体积比为 1 : 6、最佳液固比为 50 : 1、40 °C 超声 1 h。在此工艺条件下提取猫眼草黄酮的预测提取率为 14.5%。经实验验证黄酮平均提取率为 $(15.8\pm0.9)\%$,与预测值接近,说明响应面设计方案合理。若不加离子液体,黄酮提取率仅为 5.14%。新方法比传统方法提取率明显增高,说明本实验所优化的最佳提取方案可行,将离子液体运用于植物黄酮提取的方法可行。

本实验选取了咪唑型具有相同的阴离子的 4 种离子液体为研究对象,其母核的碳链由乙基到辛基依次增长。本研究结果初步推测,离子液体运用于植物黄酮提取时,黄酮提取率与离子液体母核碳链长短不成正相关性,并非碳链越长越好。

5 讨论

目前尚未有研究将离子液体运用于猫眼草黄酮的提取,而本实验初次采用新型绿色的有机溶剂离子液体提取猫眼草黄酮,该法为植物黄酮的提取与开发提供了思路。

离子液体种类繁多,本实验综合考虑离子液体的功能与实验成本因素,选取了咪唑类具有相同的阴离子的 4 种离子液体为研究对象。其母核的碳链长短由乙基到辛基依次增长。相同条件下碳链中等长度的[OMIM]Br 总黄酮提取率最高。从研究结果初步判断,离子液体应用于植物黄酮提取时,黄酮提取率与离子液体母核碳链长短不成正相关性,

并非碳链越长越好,即后续选用离子液体时可以考虑选择具有不同阴离子的离子液体进行考察。

本研究探讨离子液体增加植物黄酮提取率的具体原理。研究 4 种离子液体提取的总黄酮中极性不同的 2 种黄酮山柰酚和金丝桃苷的含量变化规律,发现对于极性较大的单体金丝桃苷,[OMIM]Br 的提取率最高,说明碳链越长,提取效果越好。而对于极性较小的单体山柰酚而言,碳链中等长度的[BMIM]Br 提取率最高。这一现象说明,离子液体增加植物黄酮提取率的具体原理极为复杂,可能与化合物的极性和离子液体的结合方式有关。也可能与化合物中酚羟基含量有关,因为酚羟基更容易与离子液体的阴离子 Br⁻ 形的氢键作用。还可与离子液体黏度及传质效果有关。溴离子与被提取物之间可能产生多重相互作用,包括 $\pi-\pi$ 、离子/电荷和氢键等与被提取物结构上的羧基、羰基等相互作用,从而增加其提取效果。因此咪唑类离子液体作为提取剂可用于植物中多种活性物质如生物碱类、黄酮类、果胶、色素、植物内酯等的提取^[19-20]。

本研究使用响应面法优化提取工艺,该方法应用随机过程的统计学实验方法,找出各因子水平的最佳组合,建立的复杂多维空间曲面较接近实际情况,所需的实验组数相对较少,节约时间和成本^[16-17]。同时采用超声波提取法作为提取手段,具有提取率高、提取时间短、温度低、操作简单、对设备要求低等优点。本研究将响应面设计与超声波萃取联合应用,有较强的创新性^[12,14]。但本研究在仍存溶剂量大、离子液体的安全性及可回收性与设备受限等问题,该工艺完全应用于工业生产的可行性问题仍待进一步研究。后期课题组将在离子液体的可回收性、毒性与环境安全性及提取工艺设备方面开展深入研究。

REFERENCES

- [1] ZHANG Y, BAI T, ZHANG H, et al. A study on the pharmacology and folk pharmacy of Maoyancao[J]. West J Tradit Chin Med(西部中医药), 2019, 32(11): 144-149.
- [2] ZHANG Y, LEI J J, ZHENG L, et al. The research of the inhibition activity of *Euphorbia lunulata* bge on the 2R-75-30 breast cancer cell[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报), 2017, 23(15): 34-35, 39.
- [3] ZHANG Y, ZHENG L, HE H, et al. Study on antitumor activity of ethyl acetate extract of *Euphorbia lunulata* bge[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2017, 19(10): 1729-1736.
- [4] ZHAO M, WU S, LI J, et al. Chemical constituents from *Euphorbia lunulata*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(12): 2289-2294.
- [5] RONG J H. Study on the effective ingredients and their antioxidant activity and anti-tumor activity of *Euphorbia lunulata* bag[D]. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology, 2014.
- [6] XIAO D M, MA D H, LIU L, et al. Application of ionic liquid in pharmaceutical field[J]. Sci Technol Chem Ind(化工科技), 2019, 27(6): 76-80.
- [7] HAO C, ZHAI L H, DONG H J, et al. Optimization of the extraction process of *Scutellaria baicalensis* by ionic liquids with Box-behnken response surface methodology and anti-inflammatory evaluation[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(11): 1031-1037.
- [8] FENG J. Study on extraction and purification of *Ginkgo biloba* leaf flavonoids[D]. Beijing: Beijing Institute of Petrochemical Technology, 2019.
- [9] YANG L B, LI K W, LIU S J, et al. Determination of total flavonoids in different sections of *Euphorbia lunulata* Bge. by UV spectrophotometry[J]. Appl Chem Ind(应用化工), 2014, 43(1): 187-188, 191.
- [10] ZHANG Y, DENG Y R, TANG Y M, et al. Process optimization of flavonoids extraction from pomegranate husk by ultrasonic assisted ionic liquid and semi-bionic enzyme[J]. Sci Technol Chem Ind(化工科技), 2019, 27(6): 15-18.
- [11] ZHAO G S. Adsorption of imidazolium ionic liquid[D]. Nanjing: Nanjing University, 2016.
- [12] ZHONG F L, JIN L Z, WANG X L, et al. Study on process of ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Pelargonium graveolens* and their antioxidant effect[J]. China Condiment(中国调味品), 2018, 43(4): 69-74.
- [13] ZENG S. Study of microwave-assisted extraction of flavonoids by ionic liquids[D]. Xiangtan: Xiangtan University, 2016.
- [14] 刘艳灿. 超声辅助离子液体提取红葱头风味物质[D]. 广州: 广州大学, 2016.
- [15] LI S L, LIU C M, HUANG Y, et al. Optimization of extraction technology of flavonoids from white clover by ionic liquids[J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2018, 45(7): 1445-1448.
- [16] SU S, ZHAO D J, WANG X Q, et al. Ultrasonic wave extraction of isoflavone from black soybean by response surface methodology and its antioxidative activity[J]. J Chin Cereals Oils Assoc(中国粮油学报), 2019, 34(11): 24-28.
- [17] ZHOU Y H, TANG J, ZHANG C. Optimization in ionic liquid based ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves by response surface methodology[J]. Chem Bioeng(化学与生物工程), 2018, 35(10): 36-40.
- [18] GUO J L, LI X X, ZHI L. Simultaneous determination of chlorogenic acid, rutin, hyperoside, quercetin and kaempferol in *Hypericum scabrum* by HPLC[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(11): 75-78.
- [19] ZUO L, AO X Q, GUO Y. Application on extraction of natural products by imidazolium ionic liquid[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2019, 40(23): 324-330, 336.
- [20] 李森林. 射干中异黄酮类化合物的分离提取及体外活性研究[D]. 长春: 长春师范大学, 2018.

收稿日期: 2022-02-25

(本文责编: 沈倩)