

响应曲面法联合遗传算法优化天然低共熔溶剂提取肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的工艺[△]

董佳妮^{1*}, 赵龙山², 薄或坤¹, 杨丹¹, 杨雪苗¹, 谭谊萌¹, 安明^{1#}, 邬国栋^{1#b}(1.包头医学院药学院, 内蒙古包头014060; 2.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)13-1605-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.13.12



摘要 目的 优化天然低共熔溶剂(NADESs)提取肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的工艺,为肉苁蓉的开发和利用提供参考。方法 首先,以松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的总提取效率为指标,筛选NADESs的类型;然后,在单因素实验基础上,通过响应曲面法优选最佳NADESs组成成分的摩尔比、NADESs含水量和液料比,并通过遗传算法对结果进行优化。以维生素C(VC)为阳性对照,从提取效率、体外抗氧化活性2个方面比较NADESs和传统溶剂(50%甲醇)的提取效果。**结果** 最佳提取溶剂为由1,4-丁二醇和丙二酸组成的NADES-11。最优提取工艺为:NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比1:2.5、NADES-11含水量18%、液料比30 mL/g、提取时间30 min、提取温度30 ℃。NADES-11的提取效率显著高于50%甲醇($P<0.05$);NADES-11提取物对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基和羟基自由基的半数清除浓度(261.17、744.34 $\mu\text{g/mL}$)均低于50%甲醇提取物(420.97、1 175.12 $\mu\text{g/mL}$),其抗坏血酸当量(17.19、360.80 mg VC/g)高于50%甲醇提取物(10.67、228.54 mg VC/g)。**结论** 本研究优化的NADESs提取肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的工艺环保、稳定、可行。

关键词 天然低共熔溶剂;肉苁蓉;苯乙醇苷类成分;响应曲面法;遗传算法;抗氧化活性;提取效率

Optimization of natural deep eutectic solvent extraction of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by response surface methodology coupled with genetic algorithm

DONG Jiani¹, ZHAO Longshan², BO Yukun¹, YANG Dan¹, YANG Xuemiao¹, TAN Yimeng¹, AN Ming¹, WU Guodong¹(1. School of Pharmacy, Baotou Medical College, Inner Mongolia Baotou 014060, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To optimize the extraction technology for phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by natural deep eutectic solvents (NADESs), and to provide reference for the development and utilization of *C. deserticola*. **METHODS** The optimal NADESs was selected using total extraction efficiency of echinacoside, acteoside and isoacteoside as indexes. Based on single factor test, response surface methodology was used to select the optimal NADESs molar ratio, the optimal NADESs water content, the optimal liquid-solid ratio; and the results were optimized by genetic algorithm. Using vitamin C (VC) as positive control, the extraction effects of NADESs and traditional solvent (50% methanol) were compared in respects of extraction efficiency and antioxidant activities. **RESULTS** The optimal extraction solution was NADES-11 composed of 1, 4-butanediol and malonic acid. The optimal extraction technology was as follows as the molar ratio of 1, 4-butanediol-malonic acid was 1:2.5, water content of NADES-11 was 18%, liquid-solid ratio was 30 mL/g, extraction time was 30 min and extraction temperature was 30 ℃. The extraction efficiency of NADES-11 was significantly higher than that of 50% methanol ($P<0.05$). IC₅₀ values of NADES-11 extract (261.17 and 744.34 $\mu\text{g/mL}$) to 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine radical and hydroxyl radical were all lower than those of 50% methanol extract (420.97 and 1 175.12 $\mu\text{g/mL}$). Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity of NADES-11 extract (17.19 and 360.80 mg VC/g) was higher than that of 50% methanol extract (10.67 and 228.54 mg VC/g). **CONCLUSIONS** The optimized extraction process of phenylethanoid glycosides from *C. deserticola* using NADESs is environmental, stable and feasible.

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中蒙药药效成分。E-mail: dongjiani369@126.com

#a 通信作者 教授, 硕士。研究方向:药物分析。E-mail: 610283014@qq.com

#b 通信作者 教授, 硕士。研究方向:天然药物提取分离。E-mail: wgdzd@126.com

肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y.C.Ma 或管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight 的干燥带鳞叶的肉质,主产于内蒙古、新疆、宁夏和甘肃等地区,素有“沙漠人参”之美誉^[1]。研究表明,苯乙醇苷类成分是肉苁蓉的主要功能性成分,且其含量最高,具有抗氧化、抗病毒、保护神经和保肝等作用^[2]。其中,松果菊苷是文献记载的首个,也是植物界具有代表性的苯乙醇苷类成分,同时其也是肉苁蓉中主要的指标性成分^[3]。支雅婧等^[4]从化学成分特有性、可测性、传统功效和药性等方面进行预测,指出毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和松果菊苷可作为肉苁蓉的质量标志物。

目前,针对肉苁蓉中苯乙醇苷类成分提取的研究大多采用50%甲醇为溶剂,具有毒性大、易挥发、易造成环境污染及提取效率低等缺点^[5-6]。Abbott等^[7]于2003年首次发现一种可替代传统溶剂和离子液体的新型绿色低共熔溶剂(deep eutectic solvents, DESs),其具有低蒸汽压、低成本、良好的生物降解性和生物相容性等优点。随着研究的深入,Choi等^[8]又发现了DESs的类似物——天然低共熔溶剂(natural deep eutectic solvents, NADESs)。与DESs相比,NADESs的组成成分均为天然化合物或生物体初级代谢产物,因此,其经济性和环境保护作用均优于DESs,已作为一种绿色可调节的提取介质应用于药物活性成分的提取中^[9]。

响应曲面法(response surface methodology, RSM)是一种优化工艺条件的有效方法,被广泛用于多因素的实验优化。箱式组合设计(Box-Behnken Design, BBD)是RSM中最常用的实验设计方案,具有实验次数少、简单和经济的优点^[10]。遗传算法(genetic algorithm, GA)具有全局寻优的特点,能取得较好的优化和预测效果,在生物活性物质提取方面具有很大潜力^[11]。鉴于此,本研究拟采用RSM结合GA优化NADESs提取肉苁蓉中苯乙醇苷类成分(松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷)的工艺,以期为肉苁蓉的绿色提取和高值化利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有 Thermo U3000 型高效液相色谱仪、Multiskan GO 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),BSA224S-CW 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),KQ-500E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

肉苁蓉药材(批号 190802003)购自内蒙古聚诚中药饮片有限公司,由包头医学院药学院安明教授鉴定为肉苁蓉 *C. deserticola* Y.C.Ma 的干燥带鳞叶的肉质。将其干燥,粉碎(过四号筛),备用。

松果菊苷对照品(批号 AF20051710,纯度 98%)、毛蕊花糖苷对照品(批号 AF20110904,纯度 98%)、异毛蕊花糖苷对照品(批号 AF20051701,纯度 98%)均购自成都埃法生物技术有限公司;1,3-丁二醇(批号 C11230698,纯度 99%)购自上海麦克林生化科技有限公司;氯化胆碱(批号 RH221064,纯度 98%)、1,3-丙二醇(批号 RH210167,纯度 98%)、1,4-丁二醇(批号 RH273071,纯度 99%)、丙二酸(批号 RH246485,纯度 99.5%)、DL-苹果酸(批号 RH246485,纯度 99.5%)、硫酸亚铁(批号 RH246512,纯度 98%)、1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(批号 RH207202,纯度 ≥98.5%)均购自上海易恩化学技术有限公司;维生素C(vitamin C, VC)(批号 20210525,纯度 ≥99.7%)购自天津市鼎盛鑫化工有限公司;尿素(批号 20190410,纯度 ≥99%)、葡萄糖(批号 20190529,纯度 ≥99%)均购自天津市凯通化学试剂有限公司;乳酸(批号 980826,纯度 90%)购自天津市化学试剂一厂;乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷含量测定

采用高效液相色谱法进行测定。色谱条件:采用 Supersil ODS2(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~9 min, 90% B→83% B; 9~18 min, 83% B→80% B; 18~30 min, 80% B);流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 ℃;检测器为紫外检测器;检测波长为 330 nm;进样量为 10 μL。按照 2020 年版《中国药典》(四部)“9101 分析方法验证指导原则”进行方法学考察^[12],结果均满足要求。

2.2 NADESs 的筛选

2.2.1 不同组成 NADESs 的制备 根据文献[13]方法,分别以氯化胆碱、多元醇和有机酸等为原料,以水为溶剂,制备 11 种 NADESs(表 1),具体方法为:按照组成成分摩尔比将原料置于各自锥形瓶中,在 80 ℃下加热搅拌,直至形成均匀透明的液体,冷却至室温后备用。

表 1 11 种 NADESs 的组成情况

NADESs 名称	原料 1	原料 2	原料 1 和原料 2 的摩尔比
NADES-1	氯化胆碱	1,3-丙二醇	1:2
NADES-2	氯化胆碱	1,3-丁二醇	1:2
NADES-3	氯化胆碱	1,4-丁二醇	1:2
NADES-4	氯化胆碱	乳酸	1:2
NADES-5	氯化胆碱	丙二酸	1:2
NADES-6	氯化胆碱	DL-苹果酸	1:2
NADES-7	氯化胆碱	尿素	1:2
NADES-8	氯化胆碱	葡萄糖	1:2
NADES-9	1,4-丁二醇	乳酸	1:2
NADES-10	1,4-丁二醇	DL-苹果酸	1:2
NADES-11	1,4-丁二醇	丙二酸	1:2

2.2.2 样品溶液的制备及提取效率的计算 取肉苁蓉粉末 0.3 g,精密称定,置于 100 mL 锥形瓶中,分别加入不同组成的 NADESs 及传统溶剂(50% 甲醇,对照)适

量,混匀后在一定温度下超声(功率为500 W,频率为40 kHz)提取一定时间,冷却至室温后,以5 000 r/min离心10 min,取上清液,用水稀释4倍,然后过0.45 μm滤膜,收集滤液,即得样品溶液。按“2.1”项下方法测定各样品溶液中松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量,并计算各成分的提取效率:提取效率(%)=(C×V×N/M×1 000)×100%。式中,C为样品中被测物质的质量浓度(mg/mL),V为样品溶液的体积(mL),N为稀释倍数,M为肉苁蓉粉末的质量(g)。

2.2.3 最佳NADESs的筛选 NADESs的组成成分会影响其理化性质,如极性、黏度、溶解度及表面张力等,从而决定其对目标成分的提取效率^[14]。因此,本研究以松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的总提取效率为考察指标筛选NADESs。结果显示,除NADES-7和NADES-8外,其余NADESs对目标成分的提取效率均优于50%甲醇。其中,以1,4-丁二醇和丙二酸为原料合成的NADES-11对松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的总提取效率达到最大值。因此,本研究选择NADES-11作为最佳提取溶剂。结果见图1。

2.3 单因素实验优化提取工艺

在肉苁蓉提取的过程中,NADESs组成成分的摩尔比、NADESs含水量和液料比等因素对提取效率有着重要影响^[15-16]。因此,本工艺优化实验中,笔者选择NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比、NADES-11含水量、液料比、提取时间和提取温度为因素进行考察。

2.3.1 NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比 固定NADES-11含水量为30%、液料比为15 mL/g、提取温

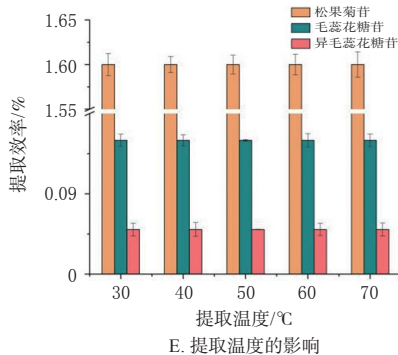
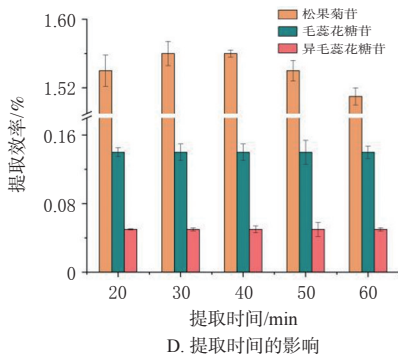
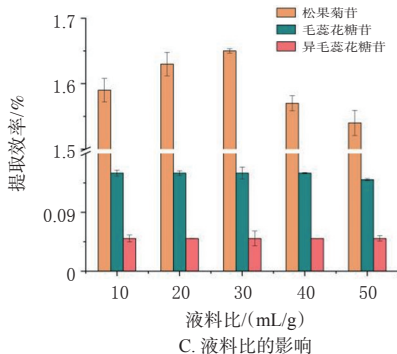
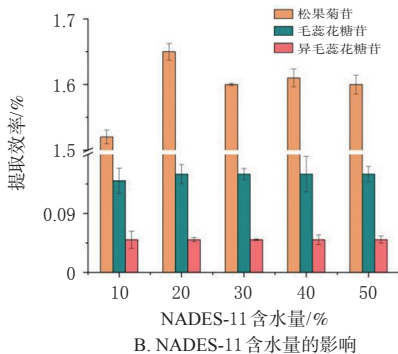
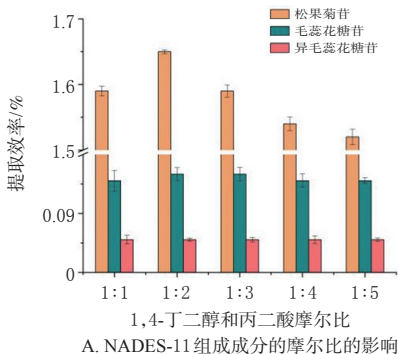


图2 各单因素对松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷提取效率的影响

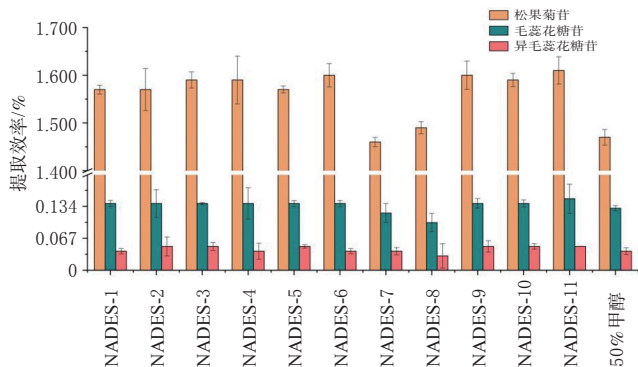


图1 不同组成的NADESs及50%甲醇对目标成分提取效率的影响

度为30℃、提取时间为40 min,考察不同比例1,4-丁二醇和丙二酸(摩尔比1:1、1:2、1:3、1:4、1:5)组成的NADES-11对提取效率的影响,结果见图2A。如图2A所示,当NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比为1:2时,松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的总提取效率达到最大值。因此,本实验确定NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比为1:2。

2.3.2 NADES-11含水量 固定NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比为1:2、液料比为15 mL/g、提取温度为30℃、提取时间为40 min,考察不同含水量(10%、20%、30%、40%、50%)的NADES-11对提取效率的影响,结果见图2B。如图2B所示,当NADES-11含水量为20%时,松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的总提取效率达到最大值。因此,本实验确定NADES-11的含水量为20%。

2.3.3 液料比 固定NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比为1:2、提取温度为30℃、NADES-11含水量为20%、提取时间为40 min,考察不同液料比(10、20、30、40、50 mL/g)对提取效率的影响,结果见图2C。如图2C所示,当液料比为30 mL/g时,松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的总提取效率达到最大值。因此,本实验确定液料比为30 mL/g。

2.3.4 提取时间 固定NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比为1:2、提取温度为30℃、NADES-11含水量为20%、液料比为30 mL/g,考察不同提取时间(20、30、40、50、60 min)对提取效率的影响,结果见图2D。如图2D所示,当提取时间为30 min时,松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的总提取效率达到最大值。因此,本实验确定提取时间为30 min。

2.3.5 提取温度 固定NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比为1:2、提取时间为30 min、NADES-11含水量为20%、液料比为30 mL/g,考察不同提取温度(30、40、50、60、70℃)对提取效率的影响,结果见图2E。如图2E所示,不同提取温度对松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的提取效率影响差别不大。因此,本研究从降低能耗的角度考虑,选择在30℃下进行样品提取。

2.4 BBD实验联合GA优化提取工艺

2.4.1 BBD实验设计及结果 本研究在单因素实验基础上,选择对松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷提取效率影响显著的3个因素——NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比(X_1)、NADES-11含水量(X_2)和液料比(X_3)为自变量,以肉苁蓉中松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷总提取效率(Y)为响应值,使用Design Expert 12.0软件设计3因素3水平的BBD实验。BBD实验的因素与水平见表2,实验方案与结果见表3。

表2 BBD实验的因素与水平

水平	X_1	X_2	X_3
-1	1:1	10	20
0	1:2	20	30
1	1:3	30	40

2.4.2 统计分析及模型拟合 采用Design Expert 12.0软件对表3的实验数据进行多元线性回归拟合,得到3种目标成分的二次多项回归方程: $Y=1.221\ 54+0.003\ 64X_1+0.018\ 18X_2+0.029\ 30X_3-0.001\ 71X_1X_2+0.003\ 17X_1X_3+0.000\ 06X_2X_3-0.013\ 38X_1^2-0.000\ 43X_2^2-0.000\ 64X_3^2$ 。同时,采用Design Expert 12.0软件对表3的实验数据进行方差分析,结果见表4。由表4可知,模型回归系数 R^2 为0.993 1、 R_{adj}^2 为0.984 2,表明该模型相关度良好,且与实测值能较好地拟合;总模型 $P<0.000\ 1$,表明此模型的建立显著;此外,模型失拟项 $P>0.05$,表明模型拟合良好。

表3 BBD实验方案与结果

实验编号	X_1	X_2	X_3	提取效率/%			Y
				松果菊苷	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	
1	-1	0	-1	1.594 1	0.145 0	0.050 5	1.789 6
2	0	-1	1	1.506 4	0.142 7	0.052 9	1.702 0
3	1	-1	0	1.599 1	0.149 1	0.056 0	1.804 2
4	-1	1	0	1.568 8	0.142 6	0.050 1	1.761 5
5	0	1	-1	1.523 5	0.141 4	0.050 3	1.715 2
6	0	0	0	1.618 9	0.150 0	0.052 3	1.821 2
7	1	0	-1	1.549 2	0.143 5	0.050 8	1.743 5
8	0	0	0	1.625 4	0.152 4	0.053 0	1.830 8
9	-1	0	1	1.497 5	0.137 5	0.047 7	1.682 7
10	0	-1	-1	1.546 9	0.144 0	0.051 4	1.742 3
11	0	0	0	1.619 0	0.150 0	0.052 5	1.821 5
12	0	0	0	1.613 6	0.151 1	0.052 3	1.817 0
13	1	1	0	1.557 0	0.144 7	0.051 6	1.753 3
14	0	0	0	1.617 8	0.151 5	0.052 9	1.822 2
15	0	1	1	1.508 3	0.141 4	0.049 6	1.699 3
16	1	0	1	1.563 7	0.146 1	0.053 4	1.763 2
17	-1	-1	0	1.553 5	0.141 1	0.049 3	1.743 9

表4 回归模型的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	0.037 6	9	0.004 2	111.44	<0.000 1	显著
X_1	0.000 9	1	0.000 9	24.92	0.001 6	显著
X_2	0.000 5	1	0.000 5	13.26	0.008 3	显著
X_3	0.002 6	1	0.002 6	68.49	<0.000 1	显著
X_1X_2	0.001 2	1	0.001 2	31.25	0.000 8	显著
X_1X_3	0.004 0	1	0.004 0	106.76	<0.000 1	显著
X_2X_3	0.000 1	1	0.000 1	3.97	0.086 7	不显著
X_1^2	0.000 8	1	0.000 8	20.09	0.002 9	显著
X_2^2	0.007 9	1	0.007 9	211.62	<0.000 1	显著
X_3^2	0.017 5	1	0.017 5	465.37	<0.000 1	显著
失拟项	0.000 2	3	0.000 1	2.10	0.242 5	不显著
R^2	0.993 1					
R_{adj}^2	0.984 2					

2.4.3 响应面分析 在响应曲面图中,曲面坡度越陡,表明该因素影响越显著;等高线图的形状反映了两两因素交互影响的强弱,椭圆形表示显著,圆形表示不显著^[17]。运用Design Expert 12.0软件绘制各因素对目标成分总提取效率影响的响应曲面图和等高线图(图3)。通过响应曲面图可知,3个响应曲面均为开口向下的凸性曲面,表明最佳提取条件均在设定的条件范围内,且各因素对目标成分影响的强弱顺序为: $X_3>X_1>X_2$ 。通过等高线图可知, X_1 与 X_2 、 X_1 与 X_3 的交互影响较为显著。

2.4.4 GA优化及验证实验 利用BBD实验所建立的模型作为GA的适应度函数,使用Matlab R2020b软件中的GA优化工具箱进一步对实验数据进行优化。在迭代57次后,最佳适应度与平均适应度均基本保持稳定,表明总提取效率已达到最大值(图4)。GA优化求解的结果为:NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比1:2.49、NADES-11含水量18.11%、液料比29.74 mL/g,最佳适应度(目标成分的总提取效率)为1.83%。为便于操作,本研究将实验条件修正为:NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比1:2.5、NADES-11含水量18%、液

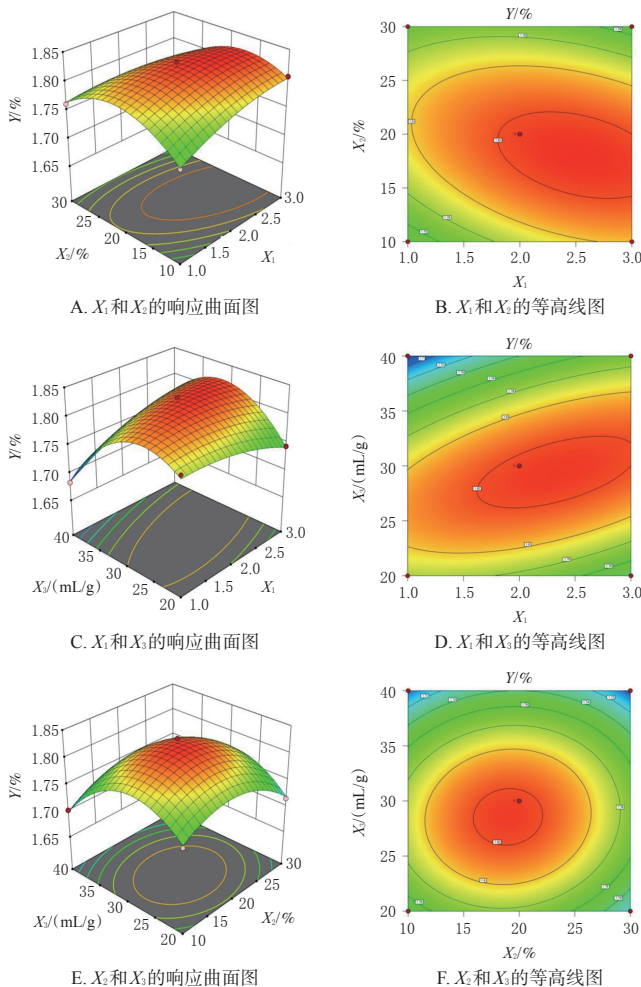


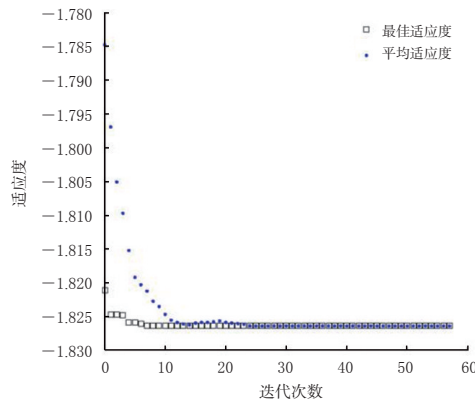
图3 各因素对目标成分总提取效率影响的响应曲面图和等高线图

料比 30 mL/g。按修正后的实验条件进行 3 次平行验证实验,得到 3 种目标成分的总提取效率为 $(1.82 \pm 0.01)\%$,与预测值 1.83% 接近,表明优化的工艺条件准确、可行。

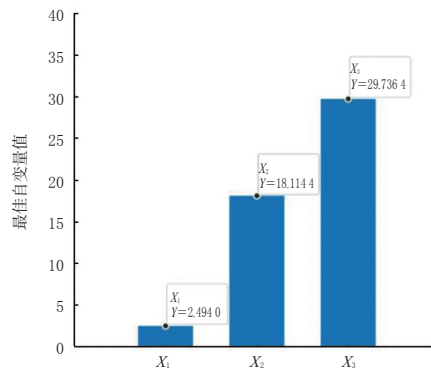
2.5 NADES-11 与传统溶剂的提取效果比较

2.5.1 提取效率的比较 分别以 NADES-11 为溶剂按“2.4.4”项下最优条件和以 2020 年版《中国药典》(一部)肉苁蓉项下传统溶剂(50% 甲醇)进行样品提取^[18],比较两者的提取效率。实验重复 3 次。采用 SPSS 18.0 软件中 *t* 检验对数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。结果显示,NADES-11 对松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的提取效率均显著高于 50% 甲醇 ($P < 0.05$)。结果见图 5。

2.5.2 抗氧化活性的比较 按“2.5.1”项下方法制备 2 种样品提取液,精密量取 2 种样品提取液 0、25、50、100、150、200、500、1 000 μL ,分别置于 10 mL 量瓶中,用水稀释得质量浓度为 0、0.08、0.17、0.33、0.50、0.67、1.67、3.34 mg/mL 的供试品溶液。并制备相同质量浓度的 VC 溶液,作为阳性对照检测液。

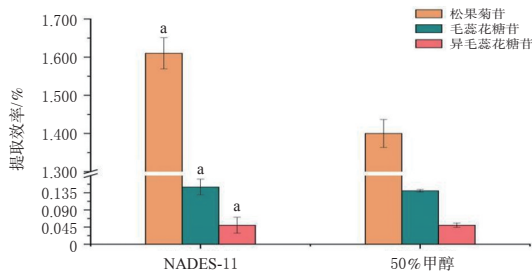


A. 迭代情况



B. 含量情况

图4 GA 优化结果



a: 与 50% 甲醇比较, $P < 0.05$

图5 NADES-11 与 50% 甲醇提取效率的比较

(1) DPPH 自由基清除实验。参考文献报道的方法^[19],吸取 100 μL NADES-11 提取物、50% 甲醇提取物、VC 溶液于 96 孔板中,加入 0.38 mmol/L DPPH 溶液 100 μL ,混匀,室温避光孵育 30 min,然后采用酶标仪在 517 nm 波长处检测各溶液的吸光度(*A*)。同时,将供试品溶液+DPPH 溶剂(无水乙醇)的检测结果记为 A_0 ,样品溶剂(水)+DPPH 溶液的检测结果记为 A_1 。计算各样品对 DPPH 自由基的清除率: $\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A - A_0)/A_1] \times 100\%$ 。每个质量浓度设置 3 个复孔。采用 SPSS 18.0 软件计算各样品对 DPPH 自由基的半数清除浓度(IC_{50})及抗坏血酸当量(ascorbic acid equivalent antioxidant capacity, AEAC)。结果显示,在研究质量浓度范围内,各样品对 DPPH 自由基均有一定的清除活性,其强弱顺序依次为 $\text{VC} > \text{NADES-11 提取物} > 50\% \text{ 甲醇提取物}$ 。结果见表 5。

表5 各样品对DPPH自由基和羟基自由基的IC₅₀和AEAC测定结果(n=3)

样品	DPPH自由基		羟基自由基	
	IC ₅₀ /(μg/mL)	AEAC/(mg VC/g)	IC ₅₀ /(μg/mL)	AEAC/(mg VC/g)
NADES-11提取物	261.17	17.19	744.34	360.80
50%甲醇提取物	420.97	10.67	1175.12	228.54
VC	4.49		268.56	

(2)羟基自由基清除实验。参考文献报道的方法^[20],取7.5 mmol/L的邻二氮菲20 μL、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液40 μL和样品溶液30 μL于96孔板中,混匀,再加入7.5 mmol/L的FeSO₄溶液20 μL和0.1% H₂O₂溶液20 μL,在37 ℃下恒温反应60 min,采用酶标仪在536 nm波长处检测A。同时,将样品溶剂(水)代替样品同法操作后所得结果记为A₀;将样品溶剂(水)代替样品,同时以水代替0.1% H₂O₂同法操作后所得结果记为A₁。计算各样品对羟基自由基的清除率:羟基自由基清除率(%)=(A-A₀)/(A₁-A₀)×100%。每个质量浓度设置3个复孔。按照“2.5.2(1)”项下方法计算各样品对羟基自由基的IC₅₀和AEAC。结果显示,在研究质量浓度范围内,各样品对羟基自由基均有一定的清除活性,其强弱顺序依次为VC>NADES-11提取物>50%甲醇提取物。结果见表5。

3 讨论

NADESs作为一种新型的绿色可调节溶剂,与传统溶剂相比,具有较高的提取效率及良好的生物降解性、生物相容性、稳定性和可回收性等优点^[21]。Dai等^[22]研究表明,与水和40%乙醇相比,NADESs提高了红花中酚类物质在高温、光照和长期放置等条件下的稳定性。熊苏慧等^[23]对以NADESs为溶剂得到的玉竹总黄酮提取液进行纯化回收,发现NADESs可被回收再次利用,且回收后的NADESs再次用于提取时也取得了较好的提取效率(回收利用率为94.56%)。并且,NADESs的组成成分在自然界中大量存在,具有成本低和生物可再生的特性。此外,NADESs由天然的初级代谢物组成,被认为是低毒或无毒的环境友好型提取溶剂,可以直接纳入药物、食品等配方中,不需额外进行纯化^[24-25]。故本研究使用NADESs代替有机溶剂用于肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的提取,具有科学性和可行性。

本研究结果显示,不同组成的NADESs对松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的提取效率不同,笔者认为主要是黏度不同导致的——黏度较低的NADESs有利于目标成分的扩散。因此,在NADES-11含水量的考察中,随着其含水量的增加,黏度降低,目标成分提取效率也随之升高;然而当含水量大于20%时,目标成分提取效率呈降低趋势,这可能是由于过多的水会破坏NADES-11的氢键网络并改变其极性。随着液料比的增

加及提取时间的延长,目标成分的总提取效率均呈先升高后降低的趋势。合适的液料比有助于溶质中目标成分向溶剂扩散。过短的提取时间不足以破碎药物细胞壁,过长的提取时间则会使目标化合物发生降解。在单因素实验基础上,经BBD实验联合GA优化并进行修正后得NADES-11的最佳工艺条件为:NADES-11中1,4-丁二醇和丙二酸的摩尔比1:2.5、NADES-11含水量18%、液料比30 mL/g、提取时间30 min、提取温度30 ℃。经验证,目标成分总提取效率的实测值(1.82%)与预测值(1.83%)接近,表明模型优化工艺条件准确、可行。

综上所述,本研究以优化的NADESs为提取溶剂,提取肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的工艺稳定、可行,符合天然产物绿色提取的理念。但是,由于药物处理量的大小悬殊,实验室和工业生产之间的差别较大,而本实验样品量较小,很难对NADESs工业提取中的许多因素进行充分考察。因此,本提取工艺若要应用于工业大生产,还应该经过实验室放大、中试和工业放大的数据验证。

参考文献

- [1] 毕萃萃,刘银路,魏芬芬,等.肉苁蓉的主要化学成分及生物活性研究进展[J].药物评价研究,2019,42(9):1896-1900.
- [2] 熊慧,刘宇琦,屈文佳,等.酒苁蓉HPLC特征图谱及5个苯乙醇苷类成分含量测定[J].药物分析杂志,2019,39(2):233-239.
- [3] 颜贵卉,田金虎,龙本文,等.肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的研究进展[J].中南药学,2012,10(9):692-695.
- [4] 支雅婧,甄亚钦,田伟,等.肉苁蓉化学成分和药理作用研究进展及质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J].中草药,2021,52(9):2758-2767.
- [5] 孔征,毛乐静,霍仕霞,等.Box-Behnken响应面法优化管花肉苁蓉中毛蕊花糖苷的提取工艺研究[J].中国药房,2019,30(14):1970-1974.
- [6] 初侨,席兴军,杨丽.肉苁蓉中松果菊苷和毛蕊花糖苷提取工艺研究[J].食品研究与开发,2015,36(16):49-52.
- [7] ABBOTT A P, CAPPER G, DAVIES D L, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures[J]. Chem Commun (Camb),2003(1):70-71.
- [8] CHOI Y H, VAN SPRONSEN J, DAI Y T, et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?[J]. Plant Physiol, 2011,156(4):1701-1705.
- [9] 周立锦,董哲,杜会枝.低共熔溶剂在中药成分提取中的研究进展[J].中草药,2020,51(1):236-244.
- [10] 杨家强,车万莉,彭红艳,等.Box-Behnken响应面法优化葶苈总生物碱的提取工艺研究[J].中国药房,2018,29

- (13):1802-1805.
- [11] 尹乐斌,邓鹏,何平,等.基于遗传算法-神经网络及响应面法优化龙牙百合总黄酮提取工艺[J].食品研究与开发,2021,42(7):105-113.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:374.
- [13] 宣婧婧,武喜营,戚建平,等.天然低共熔溶剂在药剂学中的应用[J].药学学报,2021,56(1):146-157.
- [14] 王继龙,陈方圆,刘晓霞,等.低共熔溶剂在中药领域的应用研究进展[J].中草药,2020,51(17):4559-4567.
- [15] 陈冉,李德慧,阮桂发,等.基于绿色低共熔溶剂法高效提取鸡骨草中的黄酮和皂苷[J].天然产物研究与开发,2019,31(9):1632-1640.
- [16] 刘丹宁,黄洁瑶,杨璐嘉,等.超声波辅助低共熔溶剂提取枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷[J].中药材,2020,43(1):155-160.
- [17] 李杰,李婧楠,王艺文,等.超声辅助低共熔溶剂法提取黄芩中3种黄酮类成分的工艺研究[J].中华中医药学刊,2021,39(2):143-146,277.
- [18] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:135.
- [19] 汪小玉,李婷,税丕先,等.仙茅总黄酮提取纯化工艺及其抗氧化、抗肿瘤活性[J].中成药,2022,44(3):907-912.
- [20] 刘晓飞,侯艳,马京求,等.发芽糙米提取物抗氧化性及活性成分分析[J].食品研究与开发,2021,42(13):40-47.
- [21] LIU Y, FRIESEN J B, MCALPINE J B, et al. Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives[J]. J Nat Prod, 2018, 81(3): 679-690.
- [22] DAI Y T, VERPOORTE R, CHOI Y H. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*) [J]. Food Chem, 2014, 159: 116-121.
- [23] 熊苏慧,唐洁,李诗卉,等.一种新型天然低共熔溶剂用于玉竹总黄酮的绿色提取[J].中草药,2018,49(10):2378-2386.
- [24] YANG Z. Natural deep eutectic solvents and their applications in biotechnology[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2019, 168: 31-59.
- [25] MIŠAN A, NAĐPAL J, STUPAR A, et al. The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020, 60(15): 2564-2592.
- (收稿日期:2022-01-15 修回日期:2022-05-24)
(编辑:林 静)

(上接第1604页)

- [4] 刘翔,孙飞.气相法测定麝香壮骨膏中樟脑、薄荷脑、冰片、水杨酸甲酯含量[J].中成药,2009,31(2):231-234.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:333.
- [6] 徐燕萍,陈光星.《金匱要略》论治风湿病[J].广州中医药大学学报,2019,36(3):431-435.
- [7] 谢榆,鲁璐,汪悦.应用麻黄治疗风湿痹病经验摘要[J].江苏中医药,2020,52(7):21-23.
- [8] 刘小妹,杨媛媛,胡静,等.丁公藤、大果飞蛾藤投料的冯了性风湿跌打药酒快速鉴别[J].中成药,2021,43(11):3093-3099.
- [9] 胡静,崔小敏,杨媛媛,等.HPLC法同时测定冯了性风湿跌打药酒中8个成分[J].时珍国医国药,2020,31(3):525-527.
- [10] 彭彩萍,黄炳泉,李欣.超高效液相色谱法测定风湿骨痛丸中5种成分的含量[J].中国医院药学杂志,2022,42(4):404-407.
- [11] 李佳莲,方磊,张永清,等.麻黄的化学成分和药理活性的研究进展[J].中国现代中药,2012,14(7):21-27.
- [12] 丁丽丽,施松善,崔健,等.麻黄化学成分与药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2006,31(20):1661-1664.
- [13] 杨艳芳,陆毅,吴高峰,等.麻黄根提取物对自发性高血压大鼠降压作用的观察[J].中国医院药学杂志,2010,30(17):1434-1436.
- [14] 王发英,吴查青,陈张金,等.市售麝香壮骨膏的质量评价[J].现代中医药,2021,41(5):41-47.
- [15] 郑孟凯,陶雪芬,钱微微,等.不同地区市售麻黄药材中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和总生物碱的含量测定[J].中国药房,2015,26(12):1682-1685.
- (收稿日期:2022-02-23 修回日期:2022-05-29)
(编辑:林 静)