

绿色低共熔溶剂提取野菊花中黄酮类化合物

黄文睿¹, 唐超凡², 陶雨峰³, 韩娟^{1*}, 吴嘉聪², 王贇^{2*}

(1. 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学 化学化工学院, 江苏 镇江 212013; 3. 南京邮电大学 材料科学与工程学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 研究氯化胆碱低共熔溶剂 (DES) 提取野菊花中的总黄酮、总槲皮素和槲皮苷。首先, 合成了 4 种性能优异的 DES, 并对其物理性质进行表征。其次, 以提取效果最好的氯化胆碱/尿素 DES 为溶剂, 通过改变单一变量优化提取效果, 在含水量 30%、提取时间 45 min、固液比 1 : 50 (g : mL, 下同)、提取温度 60 °C 的条件下, 总黄酮、总槲皮素、槲皮苷的提取得率分别为 72.32、12.97、10.06 mg/g, 提取效果优于传统有机溶剂。SEM 和 XRD 结果表明, 在提取过程中野菊花的晶体结构无明显变化, DES 使野菊花表面形貌发生较大改变, 使其具有更强的细胞破壁效果, 导致黄酮类化合物更易溶出。

关键词: 低共熔溶剂; 黄酮; 槲皮素; 槲皮苷; 野菊花; 分离提纯技术

中图分类号: TS201.2; TQ28 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2022) 03-0569-08

Extraction of flavonoids from *Chrysanthemum indicum* L. by green deep eutectic solvents

HUANG Wenrui¹, TANG Chaofan², TAO Yufeng³, HAN Juan^{1*}, WU Jiacong², WANG Yun^{2*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China; 3. School of Material Science and Engineering, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing 210023, Jiangsu, China)

Abstract: Green deep eutectic solvents (DES) synthesized by choline chloride (ChCl) were applied to extract the total flavonoids, total quercetin and quercitrin from *Chrysanthemum indicum* L. Firstly, four kinds of DES with excellent performance were synthesized and their physical properties were characterized. Secondly, urea-choline chloride with the best extraction effect was used as solvent to optimize several parameters affecting the extraction effect. Under the extraction conditions of water content of 30%, extraction time of 45 min, solid-liquid ratio of 1 : 50 (g : mL, the same below), extraction temperature of 60 °C, the extraction yields of total flavonoids, total quercetin and quercitrin were 72.32, 12.97 and 10.06 mg/g, respectively, better than that extracted by traditional organic solvents. SEM and XRD results showed that *Chrysanthemum indicum* L. had no obvious change in crystal structure during the extraction process, but the surface morphology change significantly. DES enabled *Chrysanthemum indicum* L. to have a stronger cell-breaking effect, resulting in easier dissolution of flavonoids.

Key words: deep eutectic solvents (DES); flavonoids; quercetin; quercitrin; *Chrysanthemum indicum* L.; separation and purification technology

野菊花黄酮作为一类有价值的次生代谢产物, 因具有抗炎^[1]、抗氧化、抗肿瘤^[2]等作用受到人们的广泛关注。在黄酮类化合物中, 槲皮素作为一种天

然膳食化合物, 可以猝灭自由基, 保护细胞免受氧化损伤^[3], 诱导肿瘤细胞凋亡和抑制癌细胞增殖^[4]。目前, 常用的黄酮类化合物提取方法有: 回流

收稿日期: 2021-07-18; 定用日期: 2021-11-03; DOI: 10.13550/j.jxhg.20210732

基金项目: 国家自然科学基金 (21878131, 22078133, U1904174)

作者简介: 黄文睿 (1997—), 女, 硕士生, E-mail: hwrkybg@163.com. 联系人: 韩娟 (1985—), 女, 教授, E-mail: hanjuan@ujs.edu.cn; 王贇 (1982—), 女, 教授, E-mail: yunwang@ujs.edu.cn.

法、微波提取法、超声提取法、微射流提取法、闪式提取法等^[5-6]。上述方法常用传统有机溶剂作为提取剂。但传统有机溶剂存在易挥发、安全性差、对人体有一定毒性等问题。因此,对黄酮类化合物提取溶剂的深入研究和优化成为目前更值得关注的问题。近年来,低共熔溶剂因具有无毒、储存方便、不易挥发^[7-8]、良好的可设计性和可调控性^[9-10]等优点受到人们的广泛关注。并且其合成成本低,易于处理且不需要纯化,因此可以大规模生产使用。OOMEN 等^[11]采用 4 种 DES 提取黄芩中的黄酮类化合物,发现与甲醇-水溶液相比,柠檬酸/脯氨酸 DES 对汉黄芩素的提取效果提高了 6.32 倍。陈冉等^[12]研究了鸡骨草中总黄酮的最佳提取工艺,发现氯化胆碱 (ChCl) / 乙二醇 DES 对总黄酮的提取率较传统提取溶剂提高了 33.3%。证实了 DES 作为黄酮类化合物提取溶剂的可行性和有效性。

野菊花黄酮常用的提取溶剂为有机溶剂^[13-16],对环境危害较大,生产过程很难保证安全性。此前,孙平等^[17]用 ChCl 和 1,4-丁二醇制备 DES,通过单因素实验和响应面实验优化了野菊花总黄酮的提取工艺,但并未对合成的 DES 进行详细表征,也未进一步分析 DES 对野菊花形貌、结构的影响。本研究以 ChCl 合成的绿色 DES 为溶剂提取野菊花中黄酮类化合物(总黄酮、总槲皮素和槲皮苷),对合成的 DES 物理性质进行表征,并结合物理性质探究影响野菊花黄酮提取率的因素,以传统有机溶剂为对比,对不同溶剂提取前后野菊花的结构和形貌进行分析,说明 DES 作为提取溶剂的有效性,为 DES 代替传统有机溶剂提取天然产物的研究提供可行性依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

野菊花 (*Chrysanthemum indicum* L.) 产自湖北省阳新县野菊花良好农业生产规范 (GAP) 栽培基地; ChCl, AR, 上海阿拉丁科技股份有限公司; 甲醇 (色谱纯)、乙腈 (色谱纯)、乙二醇 (AR)、丙二醇 (AR)、乙酰胺 (AR)、尿素 (AR)、芦丁 (AR)、NaNO₂ (AR)、Al(NO₃)₃ (AR)、NaOH (AR)、甲醇 (AR)、磷酸 (AR)、盐酸 (AR)、槲皮素 (AR)、槲皮苷 (AR), 国药集团化学试剂有限公司。

RX-DD7 型折光率仪, 日本 Atago 公司; DDS 307A 型电导率仪, 上海仪电科学仪器股份有限公司; DV2-T 型黏度计, 美国 Brookfield 公司; Nicolet Nexus 470 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo Nicolet 公司; UV-2450 紫外-可见分光光度计、

XRD-6100Lab X 射线多晶衍射分析仪 (XRD), 日本 Shimadzu 公司; Agilent 1200 高效液相色谱系统 (配有可变波长紫外检测器和 Rev.B.03.02 色谱工作站), 美国 Agilent 公司; JSM-6010LA 扫描电子显微镜, 日本电子株式会社 (JEOL); KS-5200DB 型液晶超声波清洗器, 昆山洁力美超声仪器有限公司。

1.2 DES 的合成

以 ChCl 为氢键受体, 乙二醇、丙二醇、尿素、乙酰胺为氢键供体合成 4 种 DES。以 ChCl/尿素为例, 将 ChCl 放置在真空干燥箱中干燥 4~6 h, 按照 $n(\text{氢键受体}) : n(\text{氢键供体}) = 1 : 2$ 称取 ChCl 27.924 g (0.2 mol)、尿素 24.024 g (0.4 mol), 将二者混合置于烧杯中, 在 100 °C 恒温水浴中不断搅拌, 直到形成均匀的透明液体, 取出并冷却至室温, 制得产物命名为 DES-3, 保存在真空干燥器中备用。

其余 DES 的制备方法同上, 只需按照 $n(\text{氢键受体}) : n(\text{氢键供体}) = 1 : 2$, 将尿素改变为乙二醇、丙二醇、乙酰胺。各个 DES 的命名及状态见表 1。

表 1 制备的 4 种 DES
Table 1 Prepared four DES

	DES-1	DES-2	DES-3	DES-4
氢键受体	ChCl			
氢键供体	乙二醇	丙二醇	尿素	乙酰胺
熔融状态				

1.3 DES 的表征

FTIR: 将 DES 用少许无水乙醇稀释, 然后滴加适量于溴化钾压片上, 干燥后, 用傅里叶变换红外光谱仪在 400~4000 cm⁻¹ 范围内进行扫描, 以溴化钾为空白对照。

黏度: 采用黏度计进行测定, 选择合适的转子和转速, 将待测样品加入样品器中至完全浸没转子, 测试并读取数值。每组样品测 3 次取平均值。

电导率: 采用电导率仪进行测定, 校正仪器并清洗后对 DES 电导率进行测量, 测量时保证 DES 完全浸没电极, 待电导率测量值稳定时读取示数。每组样品测 3 次取平均值。

1.4 供试液的制备

野菊花样品在 45 °C 下干燥至恒重, 经粉碎机粉碎, 过 80 目筛后放入密封袋中备用。分别称取 0.5 g 野菊花粉末于具塞锥形瓶中, 加入 25 mL 1.2 节配制的 DES 溶剂, 超声提取 (功率 100 W, 频率

45 kHz) 30 min, 提取条件为:含水量 30%、提取时间 45 min、固液比 1:50 (g:mL)、提取温度 60 °C, 之后以 10000 r/min 离心 8 min, 回收上清液并用 0.22 μm 聚醚砜 (PES) 微孔滤膜过滤, 所得供试液用于总黄酮和槲皮苷化学成分分析。另取 0.9 mL 上述供试液, 加入 0.1 mL 4 mol/L 的盐酸, 于 80 °C 恒温水浴水解 1 h, 冷却后加入体积分数 70% 甲醇溶液定容至 1 mL, 所得溶液用于总槲皮素化学成分分析。

1.5 对照溶液的制备

称取野菊花粉末 0.5 g 于具塞锥形瓶中, 加入 25 mL 体积分数 70% 甲醇溶液, 后续操作与供试液制备方法相同。

1.6 总黄酮、总槲皮素和槲皮苷得率的测定

1.6.1 总黄酮得率的测定

利用亚硝酸钠-硝酸铝比色法^[18]测定提取后野菊花总黄酮的质量浓度。用体积分数 70% 甲醇溶液配制质量浓度为 1 g/L 的芦丁标准溶液。将芦丁标准溶液梯度稀释为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L, 分别取不同质量浓度的芦丁标准溶液 0.1 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 加入 0.3 mL 质量分数为 5% 的 NaNO₂ 溶液, 振荡均匀后放置 6 min; 再加入 0.3 mL 质量分数为 10% 的 Al(NO₃)₃ 溶液, 混匀后放置 6 min; 加入 4 mL 质量分数为 4% 的 NaOH 溶液, 最后加入体积分数 70% 甲醇定容至刻度, 振荡均匀后放置 15 min。通过紫外-可见分光光度计测定反应后不同质量浓度芦丁标准溶液在 510 nm 处的吸光度值。以标准品质量浓度为横坐标 (X)、吸光度为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。其线性回归方程为: $Y=0.1585X+0.0017$, $R^2=0.9996$ 。样品中总黄酮含量的测定方法为: 取 0.1 mL 待测样品于 10 mL 容量瓶中, 后续操作与标准曲线测定方法相同, 总黄酮得率计算公式如下:

$$A = \rho \times V_2 \times V / (m \times V_1) \quad (1)$$

式中: A 为总黄酮得率, mg/g; ρ 为标准曲线中总黄酮的质量浓度, g/L; V_1 为取样体积, mL; V_2 为稀释体积, mL; V 为提取液总体积, mL; m 为样品质量, g。

1.6.2 总槲皮素得率的测定

参照文献[19]方法, 不同之处为色谱条件: 流动相为 V(甲醇): V(水)=60:40, 磷酸调流动相 pH 至 3.0; 流速 1 mL/min; 紫外检测波长 253 nm; 进样量 10 μL。

用体积分数 70% 甲醇溶液配制质量浓度为 2 mg/L 的槲皮素标准溶液。将槲皮素标准品质量浓度稀释为 0、0.4、0.8、1.2、1.6 mg/L。以槲皮素质

量浓度为横坐标 (X'), 峰面积为纵坐标 (Y'), 绘制标准曲线, 其线性回归方程为: $Y'=2963.9X'+14.08$, $R^2=0.9996$ 。样品中总槲皮素含量的测定与标准曲线的测定方法相同, 总槲皮素得率计算公式如下:

$$B = \frac{\rho' \times V_2' \times V'}{m' \times V_1'} \quad (2)$$

式中: B 为总槲皮素得率, mg/g; ρ' 为标准曲线中总槲皮素的质量浓度, mg/L; V_1' 为取样体积, mL; V_2' 为稀释体积, mL; V' 为提取液总体积, mL; m' 为样品质量, g。

1.6.3 槲皮苷得率的测定

参照文献[20]方法, 不同之处为: 色谱柱 Athena C₁₈-WP (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 检测波长 348 nm; 流速 1 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 25 μL; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为体积分数 0.1% 磷酸水溶液; 梯度洗脱: 0~11 min, A 10%~18%, B 90%~82%; 11~30 min, A 18%~20%, B 82%~80%; 30~40 min, A 20%, B 80%。

用体积分数 70% 甲醇溶液配制质量浓度为 0.1 g/L 的槲皮苷标准溶液。将槲皮苷标准溶液质量浓度梯度稀释为 0、0.0175、0.035、0.0525、0.07 g/L, 采用高效液相色谱测定上述不同质量浓度的槲皮苷溶液。以槲皮苷质量浓度为横坐标 (X''), 峰面积为纵坐标 (Y'') 绘制标准曲线。其线性回归方程为: $Y''=25.087X''-13.396$, $R^2=0.9995$ 。样品中槲皮苷含量的测定与标准曲线的测定方法相同, 槲皮苷得率计算公式如下:

$$C = \rho'' \times V_2'' \times V'' / (m'' \times V_1'') \quad (3)$$

式中: C 为槲皮苷得率, mg/g; ρ'' 为标准曲线中槲皮苷的质量浓度, g/L; V_1'' 为取样体积, mL; V_2'' 为稀释体积, mL; V'' 为提取液总体积, mL; m'' 为样品质量, g。

1.7 DES 提取黄酮类化合物条件优化

为了提高提取得率, 对影响提取效果的因素进行优化, 如 DES 种类、DES 含水量、提取时间、固液比、提取温度, 每个实验均在只改变一个变量且其他因素不变的情况下进行。

2 结果与讨论

2.1 DES 的 FTIR 分析

图 1 为合成的 DES 及其单体的 FTIR 谱图。

图 1a 中, 乙二醇在 3293 cm⁻¹ 处的吸收峰由 O—H 振动引起, 在 DES-1 中该峰向 3287 cm⁻¹ 移动, 说明 ChCl 和乙二醇之间形成了 O—H···O、O—H···Cl 等氢键结构。

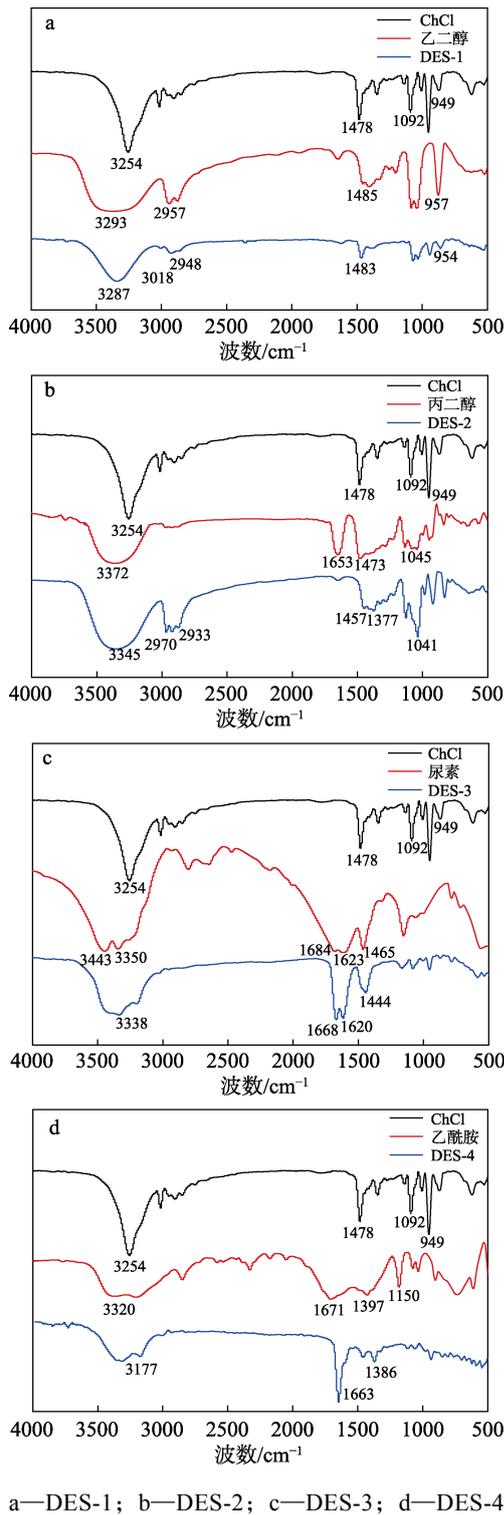


图 1 4 种 DES 的 FTIR 谱图
Fig. 1 FTIR spectra of four DES

图 1b 中, 丙二醇在 3372 和 1045 cm^{-1} 处出现对应 O—H 和 C—O 的伸缩振动吸收带, 在 DES-2 中其红移至 3345 和 1041 cm^{-1} , 说明 ChCl 和丙二醇之间存在氢键结合作用。图 1c 中, 尿素在 3443、3350 cm^{-1} 处存在 N—H 键的反对称和对称伸缩振动吸收带, 而 DES-3 中以上吸收带变宽。此外, 1684 cm^{-1} 处为尿素的 C=O 伸缩振动吸收峰 (酰胺 I 带), 1623 cm^{-1} 处为尿素的 NH₂ 面内变形振动吸收峰 (酰胺 II 带), 在 DES-3 中, 以上特征峰分别红移至 1668、1620 cm^{-1} , 表明 DES-3 中两组分存在氢键结合作用。图 1d 中, 乙酰胺在 3320 cm^{-1} 附近有 N—H 伸缩振动吸收带, 在 1671 cm^{-1} 处有 C=O 伸缩振动吸收峰 (酰胺 I 带), 而在 DES-4 中上述峰分别红移至 3177、1663 cm^{-1} , 说明 ChCl 和乙酰胺之间形成氢键。以上结果表明, 4 种 DES 被成功制备。

I 带), 1623 cm^{-1} 处为尿素的 NH₂ 面内变形振动吸收峰 (酰胺 II 带), 在 DES-3 中, 以上特征峰分别红移至 1668、1620 cm^{-1} , 表明 DES-3 中两组分存在氢键结合作用。图 1d 中, 乙酰胺在 3320 cm^{-1} 附近有 N—H 伸缩振动吸收带, 在 1671 cm^{-1} 处有 C=O 伸缩振动吸收峰 (酰胺 I 带), 而在 DES-4 中上述峰分别红移至 3177、1663 cm^{-1} , 说明 ChCl 和乙酰胺之间形成氢键。以上结果表明, 4 种 DES 被成功制备。

2.2 DES 的物理性质

2.2.1 黏度

黏度是流体的重要物理参数, DES 的黏度主要由体系中的氢键、范德华力和静电相互作用决定, 其大小对溶剂电导率及传质效率有重要影响。温度和含水量是影响 DES 黏度变化的关键因素, 本研究测定了 30、45、60、75、90 $^{\circ}\text{C}$ 下 DES 的黏度, 以及 30 $^{\circ}\text{C}$ 下不同含水量 DES 的黏度, 结果如图 2 所示 (图 2 中未显示的点不可测量, 即该条件下 DES 为固体状态, 下同)。

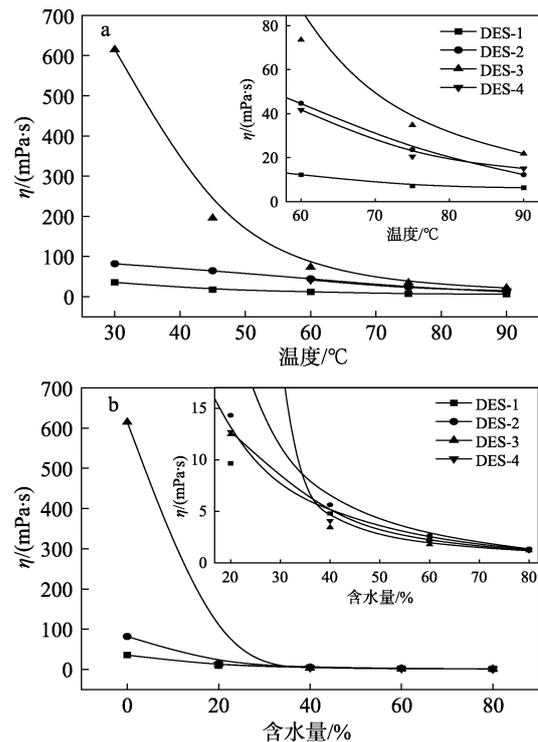


图 2 温度 (a) 和含水量 (b) 对 DES 黏度的影响
Fig. 2 Effects of temperature (a) and water content (b) on viscosity of DES

如图 2a 所示, 温度升高使 DES 获得更高的能量, 分子流动性提高, 黏度下降。如图 2b 所示, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下, 随着含水量的增加, DES 的黏度迅速下降, 然后趋于平缓。这可能是由于加入水后, 溶剂内部由氢键构建的超分子结构快速崩塌, 导致 DES 黏度下降^[21]。

2.2.2 电导率

电导率是描述物质中电荷流动难易程度的参数, 其大小与样品含水量和温度有很强的相关性。因此, 本实验测定了不同温度以及 30 °C 下不同含水量 DES 的电导率, 结果如图 3 所示。

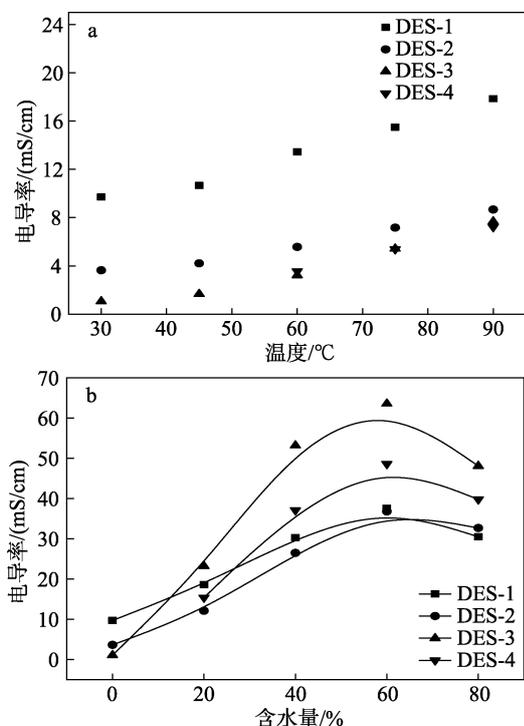


图 3 温度 (a) 和含水量 (b) 对 DES 电导率的影响
Fig. 3 Effects of temperature (a) and water content (b) on conductivity of DES

如图 3a 所示, 电导率随温度的升高而增大。这可能是因为温度升高, DES 的黏度降低, 离子间作用力减弱、离子迁移速度加快, 导致电导率增加。如图 3b 所示, 30 °C 下, 含水量增加使 DES 电导率先变大后降低, 这是因为水分子中存在大量氢键, 破坏了 DES 原有的氢键网络, 体系中离子间的静电引力下降, 流动性增强, 电导率增加^[22]。当含水量为 60% 时, 电导率最大, 继续加水后电导率下降。这是因为过度加水导致 DES 原有结构被完全破坏, 解离度不断下降, 电导率下降。

2.3 DES 溶剂的筛选

以提取得率为指标, 筛选出对野菊花中总黄酮、总槲皮素及槲皮苷提取效果最佳的 DES。在相同的提取条件下 (温度 50 °C、时间 30 min、固液比 1 : 50、含水量 30%), 提取效果如图 4 所示。

如图 4 所示, 4 种 DESs 的提取效果均优于体积分数 70% 甲醇溶液 (70% 甲醇)。这可能是因为黄酮类化合物能与 DES 分子间形成较强的分子间氢键^[21,23-24]和静电相互作用, 增加了黄酮类物质的溶

解, 所以提取效果优于传统溶剂。其中, DES-1、DES-2、DES-3 对总黄酮的提取效果较好, 提取得率分别为 70.09、67.49 和 67.49 mg/g; DES-3 和 DES-4 对总槲皮素的提取效果较好, 提取得率分别为 10.61 和 11.08 mg/g; DES-2 和 DES-3 对槲皮苷的提取效果较好, 提取得率分别为 9.33 和 9.69 mg/g。综上, DES-3 同时对总黄酮、总槲皮素及槲皮苷有较好的提取效果。这可能是因为温度 50 °C、含水量 30% 时, DES-3 的黏度降低至适当范围, 使溶剂具有较大空隙, 离子可以在溶剂体系内自由移动, 离子迁移率增加, 电导率升高。而植物中的木质素溶解度在一定范围内随 ChCl DESs 黏度降低及电导率升高而增大^[25], 使野菊花表面产生较多孔隙, 促进黄酮类化合物溶出。因此, 在后续的研究中以 DES-3 为溶剂, 探讨其对黄酮类化合物的最佳提取条件及作用机理。

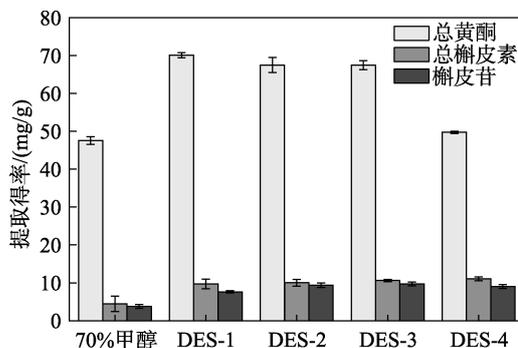


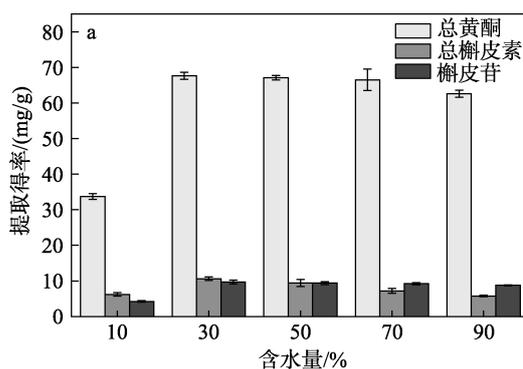
图 4 不同 DES 对野菊花中总黄酮、总槲皮素及槲皮苷提取得率的影响
Fig. 4 Effects of different DES on extraction yields of total flavonoids, total quercetin and quercitrin from *Chrysanthemum indicum* L.

解, 所以提取效果优于传统溶剂。其中, DES-1、DES-2、DES-3 对总黄酮的提取效果较好, 提取得率分别为 70.09、67.49 和 67.49 mg/g; DES-3 和 DES-4 对总槲皮素的提取效果较好, 提取得率分别为 10.61 和 11.08 mg/g; DES-2 和 DES-3 对槲皮苷的提取效果较好, 提取得率分别为 9.33 和 9.69 mg/g。综上, DES-3 同时对总黄酮、总槲皮素及槲皮苷有较好的提取效果。这可能是因为温度 50 °C、含水量 30% 时, DES-3 的黏度降低至适当范围, 使溶剂具有较大空隙, 离子可以在溶剂体系内自由移动, 离子迁移率增加, 电导率升高。而植物中的木质素溶解度在一定范围内随 ChCl DESs 黏度降低及电导率升高而增大^[25], 使野菊花表面产生较多孔隙, 促进黄酮类化合物溶出。因此, 在后续的研究中以 DES-3 为溶剂, 探讨其对黄酮类化合物的最佳提取条件及作用机理。

2.4 DESs 提取条件优化

2.4.1 含水量和提取温度

虽然 DES 本身可以作为提取介质, 但其黏度过高不利于物质扩散, 严重阻碍提取速度。因此, 本实验通过改变 DES-3 的含水量和反应温度调节其黏度和电导率, 并测定不同条件下黄酮类化合物的提取得率, 结果如图 5 所示, 其他反应条件同 1.4 节。



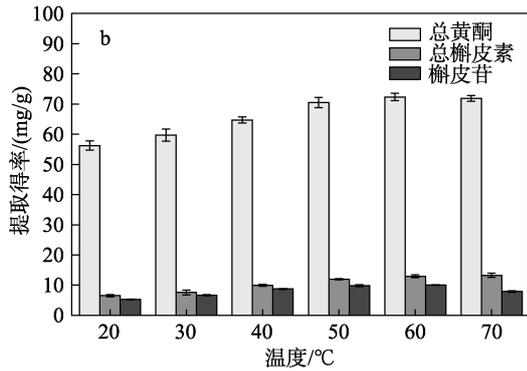


图 5 不同含水量 (a) 和温度 (b) 对野菊花中总黄酮、总槲皮素及槲皮苷提取得率的影响

Fig. 5 Effects of different water content (a) and temperature (b) on extraction yields of total flavonoids, total quercetin and quercitrin from *Chrysanthemum indicum* L.

如图 5a 所示,含水量增加,黄酮类化合物的提取得率呈先上升后下降的趋势。这是因为加入适量的水能有效降低黏度,增加电导率,促使 DES-3 与样品充分混合,提高提取效率。从总槲皮素的提取效果来看,含水量超过 30% 时,提取得率逐渐降低。这是因为水的过度集中会使 DES 失去现有的氢键,特殊结构消失,同时降低了部分黄酮类化合物的溶解性,导致提取得率下降。因此,选择含水量为 30% 进行后续研究。

如图 5b 所示,总槲皮素的提取得率随温度的升高不断增加。60 °C 之前,总黄酮与槲皮苷的提取得率呈上升趋势,随后开始下降。这可能是因为总黄酮中苷元类化合物在一定温度下会发生水解,导致糖苷键断裂生成槲皮素^[26-27]。为了降低能耗、减少总黄酮和槲皮苷的损失,选择 60 °C 为提取温度。

2.4.2 固液比和提取时间

样品与溶剂的接触面积与固液比有关。固液比指处理每克样品所用溶剂的体积 (mL)。样品量过大,其在溶剂中分散较慢,提取不完全;样品量过少,一定时间内只有少量样品被处理,溶剂利用不充分。因此,本实验以不同固液比提取黄酮类化合物,并比较了不同提取时间对黄酮类化合物提取得率的影响,结果如图 6 所示,其他反应条件同 1.4 节。

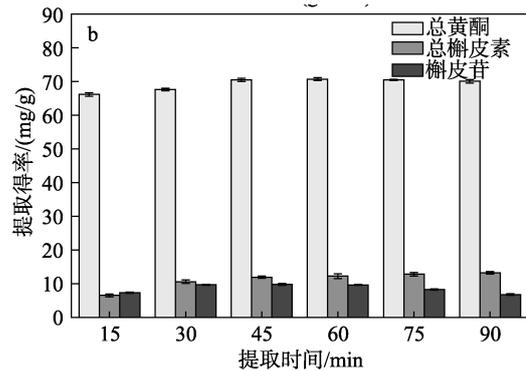
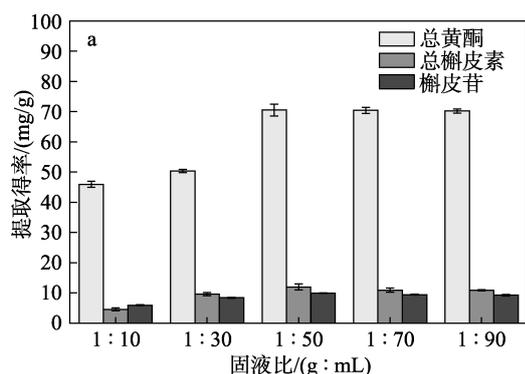


图 6 不同固液比 (a) 和提取时间 (b) 对野菊花中总黄酮、总槲皮素及槲皮苷提取得率的影响

Fig. 6 Effects of different solid-liquid ratio (a) and extract time (b) on extraction yields of total flavonoids, total quercetin and quercitrin from *Chrysanthemum indicum* L.

如图 6a 所示,当固液比为 1:50 时,总黄酮、总槲皮素和槲皮苷的提取得率较高,分别为 70.52、11.97、9.86 mg/g。随着 DES 用量进一步增加,总槲皮素与槲皮苷的提取得率有一定的下降趋势。这可能是由于含水量过高导致黄酮类化合物分解。因此,选择固液比 1:50 作为提取条件。

如图 6b 所示,总黄酮与槲皮苷的提取得率随提取时间的延长逐渐增加,但 45 min 后呈下降趋势,其中槲皮苷的下降趋势较总黄酮更加明显。这可能是由于槲皮苷等苷类化合物中的苷键在水溶液中会发生裂解,酚羟基也可能被氧化而降解,从而导致提取得率下降。而总槲皮素的提取得率随时间的增加不断升高,在 30 min 后增长幅度逐渐变小。综合考虑,选择 45 min 作为提取时间。

2.5 DES 提取黄酮类化合物的效果对比

本研究的方法使总黄酮、总槲皮素、槲皮苷的提取得率分别为 72.32、12.97、10.06 mg/g,而在相同的处理条件下,体积分数 70% 甲醇溶液提取野菊花总黄酮、总槲皮素、槲皮苷的提取得率分别为 47.58、4.44、3.77 mg/g。白现广等^[13]采用乙醇提取法提取野菊花中的总黄酮,当乙醇体积分数为 80%、提取时间为 2 h、料液比为 1:25、温度为 80 °C 时,提取得率为 49.01 mg/g。孙平等^[17]采用超声波辅助 DES 提取野菊花中的总黄酮,当 ChCl/1,4-丁二醇含水量为 28%、料液比为 1:25、温度为 65 °C 时,总黄酮得率为 62.16 mg/g。因此可以证明,与传统有机溶剂相比,DES 对野菊花黄酮类化合物的提取效果更好。

2.6 DES 提取前后野菊花结构和形貌分析

2.6.1 XRD 分析

原野菊花、体积分数 70% 甲醇溶液提取野菊花和 DES-3 提取后野菊花的 XRD 结果如图 7 所示。

原野菊花、体积分数 70% 甲醇溶液提取后和 DES-3 提取后的野菊花结构基本相同, 表明在提取过程中晶体结构没有发生变化。

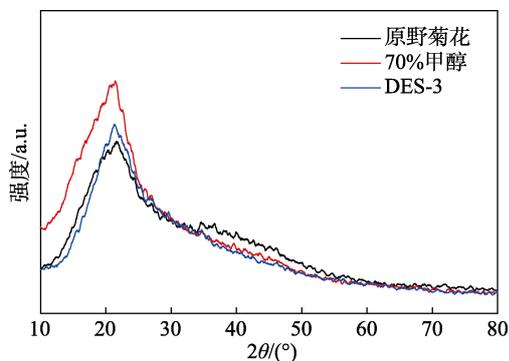


图 7 样品的 XRD 谱图
Fig. 7 XRD patterns of samples

但是体积分数 70% 甲醇提取后的野菊花结晶峰强度略高于原野菊花和 DES-3 提取后的野菊花, 结

晶度升高使野菊花具有较高的生物质抗降解屏障^[28], 导致破壁难度加大, 不利于黄酮类化合物的提取。所以, 相对于传统有机溶剂, DES 提取野菊花中黄酮类化合物具有一定的优势。

2.6.2 SEM 分析

黄酮类等天然产物通常分布在细胞(如细胞壁)和亚细胞(如液泡)组织中, 破坏细胞壁有助于黄酮类物质更快流出, 提高提取效率。本研究使用 SEM 观察了提取前后野菊花粉末形貌结构的变化, 结果如图 8 所示。由图 8 可以看出, 未经提取溶剂处理的野菊花呈球状结构且表面光滑; 经体积分数 70% 甲醇溶液提取后球状结构明显减少; 经 DES-3 处理后, 野菊花的球状结构几乎消失且颗粒表面粗糙。这可能是由于在提取野菊花黄酮类化合物的过程中, DES 对野菊花表面的木质素有溶解作用^[29], 使其具有更强的细胞破壁效果, 导致黄酮类化合物更易溶出。

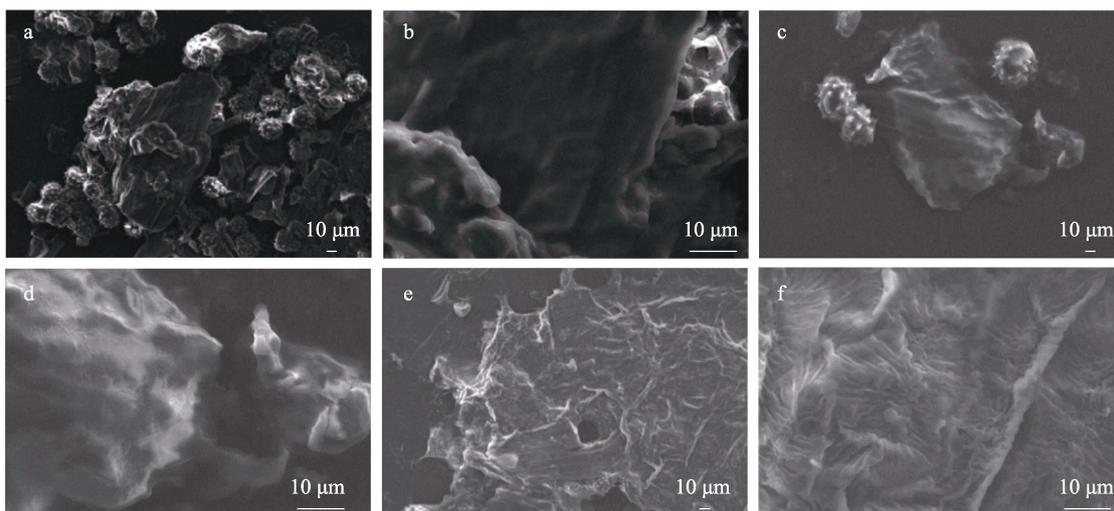


图 8 不同放大倍数下未经处理 (a、b)、体积分数 70% 甲醇溶液提取后 (c、d) 和 DES-3 (e、f) 提取后野菊花的 SEM 图
Fig. 8 SEM images of untreated *Chrysanthemum indicum* L. (a, b), *Chrysanthemum indicum* L. extracted with 70% volume fraction methanol solution (c, d) and DES-3 (e, f) at different magnifications

3 结论

建立了一种从野菊花粉末中快速高效提取总黄酮、总槲皮素和槲皮苷的方法。合成了 4 种 DES, 通过红外光谱证实其成功合成, 并对其物理性质进行表征。比较了传统有机溶剂(体积分数 70% 甲醇溶液)和不同 DES 提取野菊花黄酮类化合物的提取得率, 由 ChCl 与尿素 [$n(\text{ChCl}) : n(\text{尿素}) = 1 : 2$] 合成的 DES 提取效果较好, 在含水量 30%、提取时间 45 min、固液比 1 : 50、提取温度 60 °C 的条件下, 总黄酮、总槲皮素、槲皮苷的提取得率分别为 72.32、12.97、10.06 mg/g, 这一结果显著高于传统

有机溶剂。

提取前后野菊花的 SEM 图和 XRD 图表明, 与传统有机溶剂相比, 以 DES 为溶剂提取野菊花中黄酮类化合物时, 野菊花的晶体结构没有发生变化, 表面的形貌特征发生较大改变, 使其具有更强的细胞破壁效果, 导致黄酮类化合物更易溶出, 从而提高了其提取效率。此方法避免了在提取过程中使用传统的有毒有害溶剂, 并且其提取效果远优于传统有机溶剂, 具有绿色、便捷、高效等优点, 为 DES 代替传统有机溶剂提取天然产物的研究提供了可行性依据。该方法在食品、医药、化工领域有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] AZAB A, NASSAR A, AZAB A N. Anti-inflammatory activity of natural products[J]. *Molecules*, 2016, 21(10): 1321.
- [2] WEI Q Q (魏强强), YIN C C (殷嫦娥), ZHOU H Y (周湖燕), *et al.* Effects of total flavones of *Chrysanthemum indicum* on proliferation and apoptosis of human osteosarcoma Saos-2 cells[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials (中药材)*, 2013, 36(11): 1823-1827.
- [3] MILTONPRABU S, TOMCZYK M, SKALICKA-WONIAK K, *et al.* Hepatoprotective effect of quercetin: From chemistry to medicine[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, 108 (Part B): 365-374.
- [4] TANG S M, DENG X T, ZHOU J, *et al.* Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 121: 109604.
- [5] ZHANG L (张磊), XIANG F Z (项芳芝), MIAO W J (苗文娟), *et al.* Advances in research on extraction technologies of bioactive substances from *Chrysanthemum*[J]. *Food & Machinery (食品与机械)*, 2017, 33(4): 205-210.
- [6] ZHANG X (张雪). Research progress on extraction technology of total flavonoids in *Chrysanthemum*[J]. *Agricultural Science & Technology and Equipment (农业科技与装备)*, 2017, (5): 68-69.
- [7] DAI Y T, VAN SPRONSEN J, WITKAMP G J, *et al.* Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 766(5): 61-68.
- [8] ILGEN F, OTT D, KRALISCH D, *et al.* Conversion of carbohydrates into 5-hydroxymethylfurfural in highly concentrated low melting mixtures[J]. *Green Chemistry*, 2009, 11: 1948-1954.
- [9] SONG Z, LI X X, CHAO H, *et al.* Computer-aided ionic liquid design for alkane/cycloalkane extractive distillation process[J]. *Green Energy & Environment*, 2019, 4(2): 154-156.
- [10] SONG Z, ZHOU T, ZHANG J N, *et al.* Screening of ionic liquids for solvent-sensitive extraction with deep desulfurization as an example[J]. *Chemical Engineering Science*, 2015, 129: 69-77.
- [11] OOMEN W W, BEGINES P, MUSTAFA N R, *et al.* Natural deep eutectic solvent extraction of flavonoids of *scutellaria baicalensis* as a replacement for conventional organic solvents[J]. *Molecules*, 2020, 25(3): 617.
- [12] CHEN R (陈冉), LI D H (李德慧), RUAN G F (阮桂发), *et al.* Green and efficient extraction of flavonoids and saponins from *Abrus cantoniensis* Hance by deep eutectic solvents[J]. *Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发)*, 2019, 31(9): 1632-1640.
- [13] BAI X G (白现广), WANG H P (王惠平), LIU Y Y (刘永莹), *et al.* Study on extraction technology of total flavonoids from *Chrysanthemum indicum*[J]. *Scientific & Technical Information of Gansu (甘肃科技纵横)*, 2020, 49(8): 33-35, 32.
- [14] MENG Q Y (孟庆玉), FU L (符玲), GAO Z (高振), *et al.* Comparison on different extraction processes of total flavonoids in *Chrysanthemum indicum* and its anti-oxidant effect[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药)*, 2015, 46(21): 3194-3197.
- [15] WANG L J (王立江), JIANG Y (蒋玥). Total flavonoid extraction from *Chrysanthemum Indicum* L. flower in Changbai Mountain by microwave[J]. *Food Research and Development (食品研究与开发)*, 2013, 34(7): 45-49.
- [16] RUAN H S (阮洪生), CAO L (曹玲). Study on extraction technology of *Chrysanthemum Indicum* L. by ultrasonic wave and microwave[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences (安徽农业科学)*, 2010, 38(8): 4026-4027, 4033.
- [17] SUN P (孙平), DONG P P (董萍萍), DONG D H (董丹华), *et al.* Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of total flavonoids from *Chrysanthemum indicum*[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2020, 41(20): 147-152.
- [18] REN Y Y (任园宇), WEI D W (魏东伟), WANG Z W (王中伟), *et al.* Total flavonoids in maize seedlings before and after drought stress: Determination with sodium nitrite-aluminum nitrate colorimetry[J]. *Journal of Agriculture (农学报)*, 2020, 10(5): 15-20.
- [19] WU D F (吴冬凡), LI J H (李洁环). Determination of quercetin in *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn from different areas by HPLC[J]. *Guangdong Chemical Industry (广东化工)*, 2018, 45(7): 230-231.
- [20] WANG L (王亮), WANG T (汪涛), GUO Q S (郭巧生), *et al.* Comparative study on four major active compounds of *Sanvitalia procumbens* and *Chrysanthemum morifolium* cv 'Hangju' and 'Gongju'[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志)*, 2013, 38(20): 3442-3445.
- [21] DAI Y T, WITKAMP G J, VERPOORTE R, *et al.* Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications[J]. *Food Chemistry*, 2015, 187(15): 14-19.
- [22] LI M (李苗), CHEN B Q (陈必清), HE M (何敏). The viscosity and conductivity of choline chloride-urea ionic liquids[J]. *Journal of Hubei University (Natural Science) (湖北大学学报: 自然科学版)*, 2018, 40(1): 96-102.
- [23] LIU Z W (刘卓伟), QUE Z L (阙兆麟), YE Z W (叶志文), *et al.* Chemical constituents from the aerial parts of *abrus mollis*[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines (中国天然药物)*, 2008, 6: 415-417.
- [24] LAI H F (赖红芳), DENG Q F (邓秋芬). Optimization of extraction technology for total triterpene acids from *abri herba* by semi-bionic method[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (中国实验方剂学杂志)*, 2013, 19(24): 46-48.
- [25] NEW E K, WU T Y, LEE C B T L, *et al.* Potential use of pure and diluted choline chloride-based deep eutectic solvent in delignification of oil palm fronds[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2019, 123: 190-198.
- [26] NUUTILA A M, KAMMIOVIRTA K, OKSMAN-CALDENTY K M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis[J]. *Food Chemistry*, 2002, 76(4): 519-525.
- [27] KIM D S, LIM S B. Optimization of subcritical water hydrolysis of rutin into isoquercetin and quercetin[J]. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2017, 22(2): 131-137.
- [28] LING Z (凌喆), LAI C H (赖晨欢), HUANG C X (黄曹兴), *et al.* Research progress in variations of cellulose supramolecular structures via biomass pretreatment[J]. *Journal of Forestry Engineering (林业工程学报)*, 2021, 6(4): 24-34.
- [29] WANG X P (汪心婷), YU J (余璟), ZHU R Q (朱瑞琦), *et al.* Research progress on selective dissolution of lignocellulosic materials in deep eutectic solvents[J]. *Transactions of China Pulp and Paper (中国造纸学报)*, 2021, 36(2): 79-86.