

双相深共熔溶剂提取的银杏果外种皮 活性成分的分离回收

董其惠^{1,2}, 吴蓉^{1,2}, 王慧敏^{1,2}, 张文^{1,2}, 曹福亮¹, 苏二正^{1,2*}

(1. 南京林业大学 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2. 南京林业大学 轻工与食品学院 食品科学与工程系, 江苏 南京 210037)

摘要: 用双相深共熔溶剂 (TP-DES) 体系同时提取分离银杏果外种皮中亲水性成分萜内酯、黄酮、原花青素和疏水性成分银杏酚酸, 分别利用环氧乙烷-环氧丙烷共聚物 (EOPO) 和大孔树脂对 TP-DES 中的亲水性和疏水性活性成分进行回收。萜内酯、黄酮和原花青素用分光光度法测定, 银杏酚酸用 HPLC 测定, 并根据回收过程中每一步的活性成分含量计算回收率。采用相对分子质量 (简称分子量) 为 2650, 质量分数为 90% 的 EOPO 水溶液与亲水相 DES 提取液按质量比 4 : 6 组成回收体系, 对 TP-DES 中萜内酯、黄酮和原花青素进行回收, 经两次形成双相, 最终其回收率分别可达 89.44%、53.27% 和 29.77%; HYA-502B 树脂静态吸附-解吸回收银杏酚酸, 回收率可达 93.33%。

关键词: 深共熔溶剂; 环氧乙烷-环氧丙烷共聚物; 大孔树脂; 回收; 银杏果外种皮; 分离技术
中图分类号: O629 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2022) 07-1402-09

Separation and recovery of bioactive ingredients from *Ginkgo biloba* exocarp by two-phase extraction with deep eutectic solvents

DONG Qihui^{1,2}, WU Rong^{1,2}, WANG Huimin^{1,2}, ZHANG Wen^{1,2}, CAO Fuliang^{1,2}, SU Erzheng^{1,2*}

(1. Co-innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. Department of Food Science and Technology, College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: Hydrophilic terpene lactones, flavonoids, procyanidines and hydrophobic ginkgolic acids were simultaneously extracted from *Ginkgo biloba* exocarp by using a two-phase system with deep eutectic solvents (TP-DES). And the hydrophilic and hydrophobic active components in TP-DES were further recovered by ethylene oxide-propylene oxide copolymer (EOPO) and macroporous resin, respectively. The extracted terpene lactones, flavonoids and procyanidins were confirmed by spectrophotometry while ginkgolic acids by HPLC, and the recovery rate was calculated based on the mass concentration of active components in each step. It was found that after forming biphasic phase twice the recovery rates of terpene lactones, flavonoids and procyanidins in TP-DES were 89.44%, 53.27% and 29.77% respectively when using EOPO aqueous solution with a relative molecular mass (short for molecular mass) of 2650 and a mass fraction of 90% composed a recovery system with hydrophilic phase DES. Meanwhile, ginkgolic acids recovery rate reached 93.33% by static adsorption-desorption with HYA-502B resin.

Key words: deep eutectic solvents; ethylene oxide-propylene oxide copolymer; macroporous resin; recovery; *Ginkgo biloba* exocarp; separation technology

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 是目前研究最广泛的药用植物之一^[1]。银杏果组成包括肉质外种皮、骨

收稿日期: 2022-01-18; 定用日期: 2022-03-11; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220066

基金项目: 中国博士后科学基金 (2016M600417, 2017T100373); 江苏省第五期“333 工程”培养资金资助项目 (BRA2017458)

作者简介: 董其惠 (1996—), 女, 博士生, E-mail: dongqihui0823@njfu.edu.cn。联系人: 苏二正 (1976—), 男, 教授, 博士生导师, E-mail: ezhshu@njfu.edu.cn。

质中种皮、膜质内种皮和胚乳, 其中, 外种皮质量约占整个银杏果质量的 70%, 但因其不愉快的气味以及可能致敏的缺陷常被作为废弃物丢弃, 不仅造成了资源浪费, 而且会对环境造成污染^[2-3]。近年来, 大量研究表明, 银杏果外种皮中也有诸多活性成分, 如萜内酯、黄酮、原花青素、银杏酚酸等, 具有杀虫、抑菌、抗氧化等作用^[3-5]。因此, 从银杏果外种皮中提取回收活性成分具有重要意义。

目前, 从银杏果外种皮中提取活性成分的常用方法为有机溶剂提取法、超声辅助提取法、超临界流体萃取法、微波辅助提取法等, 但这些方法通常使用大量有机溶剂作为提取溶剂, 存在有机溶剂用量大、能耗高、污染环境、易燃易爆等安全隐患^[3,5-7]。并且由于银杏酚酸与其他活性成分结构性质的区别, 无法利用传统的提取方法将其与其他亲水性活性成分同时提取分离出来。深共熔溶剂 (DESs) 是由一定物质的量比的氢键供体 (HBD) 和氢键受体 (HBA) 组合而成的低共熔混合物, 具有性质可调节、易生物降解等优点, 被广泛用作普通有机溶剂的替代品^[8-11]。DESs 根据溶剂的极性可分为亲水性 DESs

和疏水性 DESs, 根据相似相溶原理可以应用不同极性的 DESs 提取不同极性的生物活性成分^[12-13]。

由于 DESs 具有低蒸汽压, 传统提取物的回收方法如蒸馏法等并不适用。吴蓉等^[14-15]设计了一种亲水性 DES, 从红景天根中同步提取红景天苷和酪醇, 并利用大孔树脂 SP-825 从 DES 中成功回收红景天苷和酪醇。GAO 等^[16]利用环氧乙烷-环氧丙烷共聚物 (EOPO) 与亲水性 DES 形成热分离双相体系成功从亲水 DES 中回收多糖。上述方法中, 大孔树脂成功应用于亲水性 DES 中回收亲水性活性成分, EOPO 回收体系成功回收大分子物质多糖。

本课题组前期通过 DESs 筛选、设计以及提取条件优化等成功设计了双相深共熔溶剂体系 (TP-DES), 同时提取银杏果外种皮中的亲水性成分黄酮、萜内酯和原花青素以及疏水性成分银杏酚酸^[17]。在此基础上, 本文分别对亲水相和疏水相中活性成分回收方法进行了研究。应用大孔树脂回收疏水相 DES 中的疏水性成分银杏酚酸; 应用 EOPO 回收体系回收亲水相 DES 中的小分子物质萜内酯、黄酮和原花青素 (图 1), 为基于 DES 提取的活性成分回收提供解决方法。

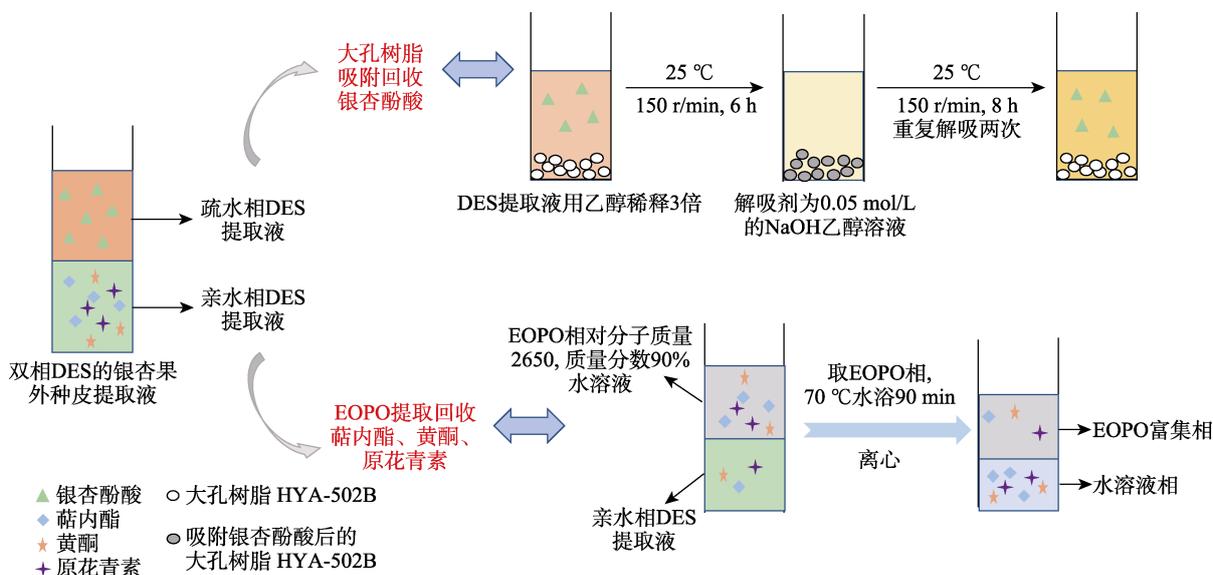


Fig. 1 Schematic diagram of recovery of bioactive ingredients from two-phase deep eutectic solvent extract of *Ginkgo biloba* exocarpe

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

银杏果外种皮采自江苏省邳州市国家银杏良种基地, 经干制后粉碎, 过 40 目筛得银杏果外种皮粉末。

薄荷醇 (AR)、乙酸 (色谱纯), 上海麦克林生化科技有限公司; 正己醇 (AR), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乙二醇、氯化胆碱、月桂酸、柠檬酸 (AR), 中国医药集团有限公司; 甲醇 (色谱纯), 美

国 Tedia 试剂公司; 芦丁标准品, 上海源叶生物科技有限公司; 银杏内酯 A 标准品, 南京狄尔格医药科技有限公司; 原花青素标准提取物, 浙江康恩贝制药股份有限公司; 白果新酸标准品 (以白果新酸标准品建立银杏酚酸标准曲线), 四川省维克奇生物科技有限公司; 环氧乙烷-环氧丙烷共聚物 (EOPO), 江苏海安石油化工厂; 大孔树脂 HPD5000, 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 大孔树脂 LK02, 艾美科健 (中国) 生物医疗有限公司; 大孔树脂 D201、LXD200, 西安

蓝晓科技新材料股份有限公司; 大孔树脂 HYA-502B, 西安瀚宇树脂科技有限公司; 大孔树脂 A654, 科海思(北京)科技有限公司。

JY-2 型恒温搅拌油浴锅, 金坛市天竟实验仪器厂; e2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 分析仪器有限公司; TGL-18MS 型台式高速离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; THZ-320 型恒温摇床, 上海精宏实验设备有限公司; UV-1200 型紫外-可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司。

1.2 DESs 及双相 DES 提取物制备

采用热制备法^[9]制备 DESs。分别称取疏水相 DES 和亲水相 DES 组分在 80 °C 加热搅拌至形成均一液体。其中, 疏水相 DES 由薄荷醇、正己醇、月桂酸按照物质的量比 1 : 1.6 : 0.4 组成; 亲水相 DES 由氯化胆碱、柠檬酸、乙二醇按照物质的量比 3 : 2 : 1 组成, 含水量为 45%。TP-DES 体系由疏水相 DES 与亲水相 DES 以体积比 8 : 2 组成。

以料液比〔即固料质量(g)与液体体积(mL)之比〕1 : 30, 向 TP-DES 体系中加入银杏果外种皮粉末, 在 30 °C 下恒温振荡提取 40 min 后离心分层, 得到上相疏水相 DES 提取液和下相亲水相 DES 提取液。

1.3 活性成分检测方法

银杏黄酮、萜内酯和原花青素含量采用分光光度法检测^[18-20], 银杏酚酸含量采用 HPLC 法检测^[21]。建立的标准曲线如下: 萜内酯: $y=0.081x-0.0021$ ($R^2=0.9994$) (线性范围 0.154~1.540 g/L); 黄酮: $y=0.2963x-0.0081$ ($R^2=0.9996$) (线性范围 0.09~0.90 g/L); 原花青素: $y=0.0031x+0.0123$ ($R^2=0.9997$) (线性范围 0~250 $\mu\text{g/mL}$); 银杏酚酸: $y=37.186x-$

3.5356 ($R^2=0.9999$) (线性范围 1~50 μg)。测定溶液的吸光度后根据标准曲线得到溶液中萜内酯、黄酮、原花青素的质量, HPLC 测定得到峰面积根据标准曲线得到溶液中银杏酚酸的质量。

1.4 基于 EOPO 的亲水相 DES 提取液中活性成分的回收

1.4.1 EOPO 回收活性成分方法

称取 4 g EOPO 水溶液和 6 g 亲水相 DES 提取液于离心管中, 1500 r/min 下振荡混匀后, 在 3000 r/min 下离心, 得到 EOPO 富集相和 DES 富集相, 此时活性成分从 DES 提取液中被反萃至 EOPO 富集相中。相分离后, 将 EOPO 富集相置于 65 °C 水浴 60 min 进行温度诱导相分离, 在 3000 r/min 下离心得到 EOPO 富集相和水溶液相, 此时活性成分富集在下相水溶液中。具体回收过程示意图如图 2 所示。

EOPO 对活性成分的萃取率 (E_1) 和活性成分的回收率 (E_2) 分别按照下式计算。

$$E_1 / \% = \frac{\rho_1 V_1 - \rho_2 V_2}{\rho_1 V_1} \times 100 \quad (1)$$

$$E_2 / \% = \frac{\rho_3 V_3}{\rho_1 V_1} \times 100 \quad (2)$$

其中, E_1 —EOPO 对目标成分的萃取率, %; ρ_1 —DES 提取液中目标成分的质量浓度, g/L; V_1 —DES 提取液的体积, mL; ρ_2 —第 1 次重新形成双相后 DES 富集相中目标成分的质量浓度, g/L; V_2 —第 1 次重新形成双相后 DES 富集相的体积, mL; E_2 —目标成分的回收率, %; ρ_3 —第 2 次重新形成双相后水溶液中目标成分的质量浓度, g/L; V_3 —第 2 次重新形成双相后水溶液的体积, mL。

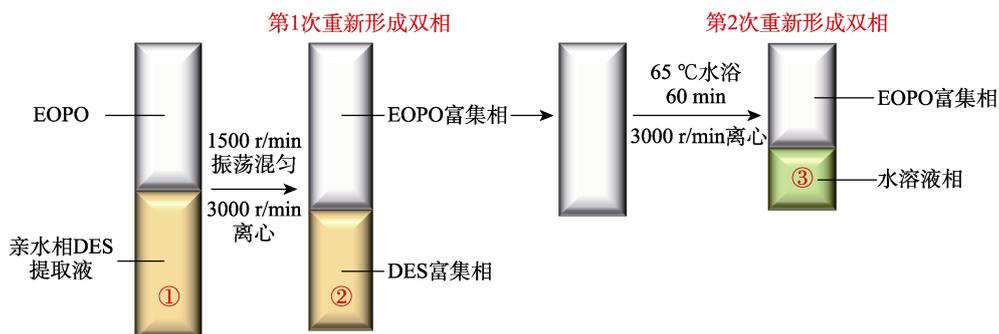


图 2 基于 EOPO 的亲水相 DES 中活性成分的回收

Fig. 2 Recovery of bioactive ingredients in hydrophilic phase DES based on EOPO

1.4.2 EOPO 回收体系优化

1.4.2.1 EOPO 相对分子质量及其水溶液质量分数优化

将 5 种 EOPO〔相对分子质量(简称分子量) 1100、1630、2200、2650 和 2900〕加水分别配制成质量分数为 10%~100% 的 EOPO 水溶液, 加入等质

量的亲水相 DES 提取液, 按图 2 所示方法和条件进行活性成分回收, 分别取图 2 中①、②、③相测定活性成分质量浓度并计算 E_1 和 E_2 , 选择最佳 EOPO 分子量和质量分数 EOPO 水溶液进行后续优化实验。

1.4.2.2 EOPO/DES 质量比优化

准确称取分子量 2650、质量分数 90% 的 EOPO

水溶液和亲水相 DES 提取液分别按照质量比 (简称 EOPO/DES 质量比) 1:9、2:8、3:7、4:6 和 5:5 组成回收体系, 按照图 2 所示方法和条件进行活性成分回收, 取图 2 中①、②相测定活性成分质量浓度并计算 E_1 , 确定最佳 EOPO/DES 质量比。

1.4.3 回收条件优化

选取最优质量分数 EOPO 水溶液和 EOPO/DES 质量比组成回收体系, 第 1 次形成双相后取出 EOPO 富集相进行回收条件优化。选取水浴温度范围 40~75 °C, 水浴时间 60 min, 每 5 °C 为间隔进行优化, 取图 2 中②、③相测定活性成分质量浓度并计算 E_2 , 确定最佳水浴温度。在最佳水浴温度 70 °C 下进行水浴时间优化, 选取水浴时间分别为 45、60、75、90、105、120、135 min 进行优化, 取图 2 中②、③相测定活性成分质量浓度并计算 E_2 , 确定最佳水浴时间。将完成回收的 EOPO 富集相 (加水至最优 EOPO 质量分数后) 与新的亲水相 DES 提取液重新组成回收体系, 在最佳回收条件下回收活性成分, 计算 E_1 和 E_2 , 重复 6 次, 考察 EOPO 重复利用的效果。

1.5 基于大孔树脂的疏水相 DES 提取液中活性成分的回

1.5.1 大孔树脂种类的初步筛选

称取预处理后^[14]抽滤至干的 6 种大孔树脂各 1 g 于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 用无水乙醇稀释 5 倍后的疏水相 DES 提取物, 在 25 °C、150 r/min 条件下振荡吸附 12 h, 按下式计算大孔树脂对银杏酚酸的吸附量 (A) 和吸附率 (B)。

$$A = \frac{(\rho_4 - \rho_5)V_4}{m} \quad (3)$$

$$B / \% = \frac{\rho_4 - \rho_5}{\rho_4} \times 100 \quad (4)$$

其中, A —吸附量, mg/g; B —吸附率, %; ρ_4 —吸附前 DES 提取液中银杏酚酸质量浓度, g/L; ρ_5 —吸附后 DES 中银杏酚酸质量浓度, g/L; V_4 —DES 提取液体积, mL; m —大孔树脂质量, g。

1.5.2 DES 提取液稀释剂及稀释倍数优化

分别用无水乙醇和疏水相 DES 将上相疏水相 DES 提取液稀释 1~5 倍, 分别取稀释后的样液 10 mL 于 50 mL 离心管中, 分别向离心管中加入 1 g 抽滤至干的 HYA-502B 和 D201 树脂, 在 25 °C、150 r/min 条件下振荡吸附 12 h 后测定吸附液中银杏酚酸质量浓度并计算吸附率。

1.5.3 吸附时间优化

分别称取抽滤至干的 HYA-502B 和 D201 大孔树脂 1 g 于 50 mL 离心管中, 分别向 HYA-502B 树脂中加入 10 mL 用无水乙醇稀释 3 倍的 DES 提取液, 向 D201 树脂中加入 10 mL 用无水乙醇稀释 5 倍的 DES 提取液, 在 25 °C、150 r/min 条件下振荡

吸附 12 h, 每 2 h 取样 1 次, 测定吸附液中银杏酚酸质量浓度并计算吸附率。

1.5.4 解吸剂种类优化

取静态吸附平衡后滤干的树脂 1 g 于 50 mL 离心管中, 分别加入 10 mL 体积分数为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70% 的乙醇水溶液进行静态解吸, 在 25 °C、150 r/min 条件下振荡解吸 12 h, 按照下式计算银杏酚酸的解吸率 (C)。

$$C / \% = \frac{\rho_6 V_6}{(\rho_4 - \rho_5) V_4} \times 100 \quad (5)$$

其中, C —解吸率, %; ρ_6 —解吸液中银杏酚酸质量浓度, g/L; V_6 —解吸液体积, mL。

1.5.5 解吸剂中酸碱添加量优化

取静态吸附平衡后滤干的树脂 1 g 于 50 mL 离心管中, 分别加入解吸剂 10 mL, 其中 HYA-502B 树脂解吸剂为无水乙醇、D201 树脂解吸剂为体积分数为 75% 乙醇水溶液。使用浓度为 10 mol/L 的 HCl 溶液和质量分数为 40% 的 NaOH 水溶液调节解吸剂中的酸碱添加量。酸添加量为 0.001、0.005 和 0.01 mol/L, 碱添加量为 0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04 和 0.05 mol/L。在 25 °C、150 r/min 条件下振荡解吸 12 h, 分别测定解吸液中银杏酚酸质量浓度并计算解吸率。

1.5.6 解吸时间优化

取静态吸附平衡后滤干的树脂 1 g 于 50 mL 离心管中, 分别加入解吸剂 10 mL, 其中 HYA-502B 树脂解吸剂为无水乙醇, 其中碱添加量为 0.05 mol/L; D201 树脂解吸剂为体积分数 75% 乙醇水溶液, 其中酸添加量为 0.01 mol/L。在 25 °C、150 r/min 条件下振荡解吸 12 h, 每 2 h 取样 1 次, 分别测定解吸液中银杏酚酸质量浓度并计算解吸率。

1.5.7 银杏酚酸回收率计算

按照下式计算最终大孔树脂回收疏水相 DES 中银杏酚酸的回收率 (R)。

$$R / \% = B \times C \times 100 \quad (6)$$

其中, R —回收率, %; B —吸附率, %; C —解吸率, %。

1.6 数据分析

所得实验数据使用 Excel 软件进行分析与处理, 各项实验进行 3 次平行实验, 结果取其平均值。

2 结果与讨论

2.1 基于 EOPO 的亲水相 DES 提取液中活性成分的回收条件考察

2.1.1 回收体系优化结果

按照 1.4.2.1 节方法进行实验, 不同分子量及质量分数的 EOPO 水溶液与亲水相 DES 提取液经混合离心后有 10 组混合物重新形成双相, 可用于活性成

分回收。其对应回收效果如表 1 所示（未重新形成双相体系的 EOPO 没有列出）。

从表 1 可以看出，EOPO 分子量及水溶液中 EOPO 质量分数都对回收效果有影响。选取分子量为 2900 的 EOPO 与 DES 提取液无法形成双相体系，推测由于分子量增加，EOPO 黏度增加，影响其相形成能力。同一 EOPO 质量分数下，分子量 2650 的 EOPO 与 DES 提取液组成的回收体系的 E_1 和 E_2 都较高，这与 EOPO 的极性、链长、黏度等有关^[22]。对于同一分子量不同质量分数的 EOPO 水溶液而言，如分子量 1630，质量分数 40%~80% 的 EOPO 水溶液随着 EOPO 质量分数提高， E_1 大致呈增加趋势，可能是由于较高的 EOPO 质量分数增加了其与活性成分的接触面积，从而提高了 EOPO 对活性成分的提取率；而当 EOPO 质量分数过高时， E_1 反而降低，这可能是由于 EOPO 质量分数过高时，聚合物的熵效应占主导地位，同时出现了体积排斥效应，导致活性成分富集在 DES 相中^[16]。综合考虑，选择分子量 2650，质量分数 90% 的 EOPO 水溶液进行后续实验。

表 1 EOPO 分子量及其水溶液中质量分数优化结果
Table 1 Optimization results of molecular mass of EOPO and its mass fraction in aqueous solution

No.	EOPO 分子量	EOPO 水溶液中质量分数/%	蒽内酯		黄酮		原花青素	
			E_1 /%	E_2 /%	E_1 /%	E_2 /%	E_1 /%	E_2 /%
1	1100	100	15.59	0	18.39	0	30.91	0
2	1630	40	28.84	5.93	75.71	0	98.17	0.64
3	1630	50	23.19	2.34	81.36	0	100.00	0.27
4	1630	60	44.21	3.61	83.98	11.19	100.00	0.84
5	1630	70	37.54	19.08	82.75	6.37	100.69	0
6	1630	80	29.46	0	78.67	0.86	97.41	0
7	2200	90	92.12	26.93	100.00	33.76	100.00	4.97
8	2200	100	52.02	0	87.94	11.41	98.44	2.34
9	2650	90	93.37	75.50	100.00	67.45	100.00	11.99
10	2650	100	53.75	35.61	88.25	33.35	99.84	1.56

按照 1.4.2.2 节进行实验，回收体系的 EOPO/DES 质量比的优化结果如图 3 所示。

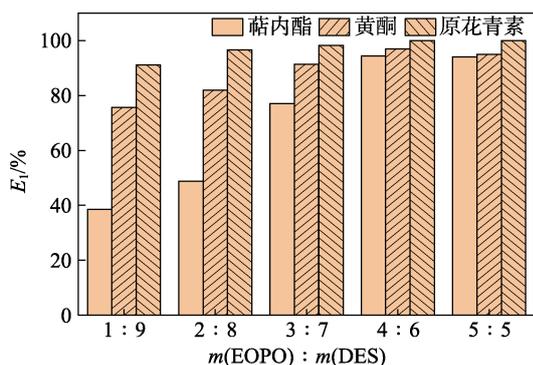


图 3 EOPO/DES 质量比对萃取率的影响

Fig. 3 Effect of EOPO/DES mass ratio on extraction yield

由图 3 可以看出，随着体系中 EOPO 占比的增加，活性成分与 EOPO 的接触面积增大，从而提高了 EOPO 对活性成分的提取效果，这与 GAO 等^[16]的研究结果一致。由于 DES 提取液中蒽内酯质量浓度远高于黄酮和原花青素，因此，EOPO/DES 质量比对蒽内酯的萃取效果影响最大，其次是黄酮，对原花青素的影响最小。当 EOPO/DES 质量比达到 4 : 6 时，EOPO 对 3 种活性成分的提取率达到稳定，因此，选择 EOPO/DES 质量比 4 : 6 进行后续优化实验。
2.1.2 回收条件优化结果

浊点温度是 EOPO 开始从水溶液中分离的温度，第 2 次重新形成双相时的水浴温度通常略高于 EOPO 的浊点温度，以达到促进相分离、缩短实验时间的目的，因此，选择从 40 °C 开始进行水浴温度的优化^[23]，结果如图 4a 所示。

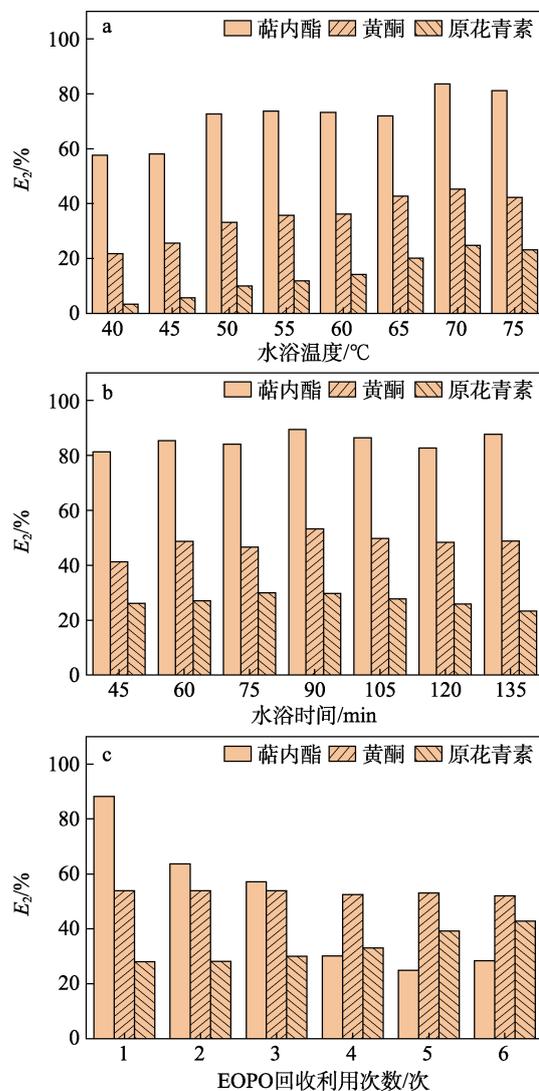


图 4 水浴温度 (a)、水浴时间 (b) 和 EOPO 重复利用次数 (c) 对活性成分回收率的影响

Fig. 4 Effects of water bath temperature (a), water bath time (b) and EOPO reuse times (c) on recovery rate of active ingredients

从图 4a 中可以看出,适当提高水浴温度有利于降低回收体系的黏度,促进活性成分在两相之间的转移。当温度过高时,一方面黄酮、萜内酯和原花青素在高温条件下稳定性降低,发生降解^[24-26];另一方面 EOPO 富集相趋于饱和,降低了活性成分的可利用空间,因此活性成分回收率有所降低^[16,23]。因此,选择 70 °C 为最佳水浴温度。

水浴时间优化结果如图 4b 所示。从图 4b 中可以看出,回收效果随水浴时间延长呈现先升高后下降的趋势。水浴时间低于 90 min,随着水浴时间的延长,活性成分的回收率有所提高;水浴 90 min 时,回收效果最好。活性成分在高温下保存时,随着时间的延长,其质量浓度会逐渐降低^[24,26];水浴时间过长(超过 90 min),3 种活性成分的回收率反而出现下降。综上所述,选择水浴 90 min 为最佳时长。

EOPO 重复利用效果如图 4c 所示。由图 4c 可知,经过 6 次重复使用,萜内酯的回收率显著降低,黄酮基本不变,原花青素略有提升。从前期研究结果可以发现,EOPO 对萜内酯的回收效果最好,由于在重复利用时不会对 EOPO 进行进一步的净化,所以 EOPO 中残留的萜内酯会较大程度影响其对萜内酯的重复提取效果^[23]。因此,以回收萜内酯为主时,EOPO 重复使用次数最好不超过 3 次,或者可以对 EOPO 进行净化后再重复使用;以回收黄酮和原花青素为主时,EOPO 至少可重复使用 6 次,且回收效果没有明显降低。

综上所述,最终确定亲水相 DES 中活性成分回收最优方法:选用分子量为 2650,质量分数为 90% 的 EOPO 水溶液与 DES 提取液按照质量比 4:6 组成回收体系,第 2 次形成双相的水浴温度为 70 °C,水浴时间为 90 min,最终萜内酯、黄酮、原花青素的回收率分别可达 89.44%、53.27%和 29.77%。

2.2 基于大孔树脂的疏水相 DES 提取液中活性成分的回收条件考察

2.2.1 大孔树脂种类初步筛选结果

选取了 6 种不同型号的树脂对疏水相 DES 提取液中的银杏酚酸进行静态吸附,银杏酚酸吸附率高低顺序为:HYA-502B (96.19%±0.34%)>D201 (84.51%±3.61%)>A654 (12.38%±2.91%)>HPD5000 (10.01%±1.21%)>LK02 (8.32%±1.34%)>LXD200 (7.35%±2.53%)。不同型号树脂的极性、孔径大小等因素都会影响树脂对银杏酚酸的吸附能力^[27]。由于银杏酚酸属于弱极性化合物且具有羧基有一定的氢离子电离能力,因此,弱极性树脂(HYA-502B)和强碱性阴离子交换树脂(D201)对银杏酚酸的吸附率较高。选择 HYA-502B 和 D201 树脂进行下一步实验。

2.2.2 DES 提取液稀释剂及稀释倍数优化结果

按照 1.5.2 节进行实验,相同条件下达到吸附平衡后的结果如图 5 所示。无水乙醇稀释同时改变了 DES 提取液的黏度和样液中银杏酚酸的浓度,而 DES 原液稀释主要改变了 DES 提取液中银杏酚酸的浓度。从图 5 可以看出,用无水乙醇稀释样液后两种树脂对银杏酚酸的吸附率明显高于用 DES 稀释后的效果,可能是由于无水乙醇中具有孤对电子的羟基能与 DES 的成分形成强氢键作用,破坏 DES 间的氢键作用,从而破坏了 DES 与银杏酚酸之间的作用力,进一步促进了树脂对银杏酚酸的吸附^[27]。当用无水乙醇稀释样液 3 倍时,HYA-502B 树脂对银杏酚酸的吸附率达到最高;当用无水乙醇稀释样液 5 倍时,D201 树脂对银杏酚酸的吸附率达到最高,分别为 95.52%和 81.32%。

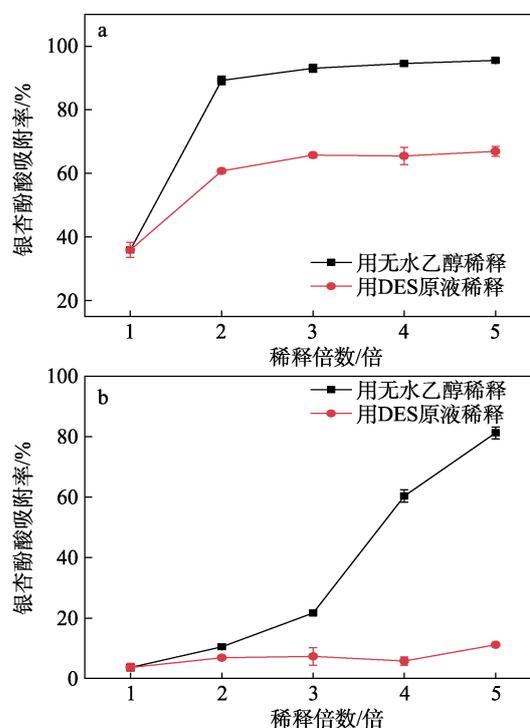


图 5 不同稀释剂及稀释倍数对大孔树脂 HYA-502B (a) 和 D201 (b) 银杏酚酸吸附率的影响

Fig. 5 Effects of different diluents and dilution multiple on adsorption rate of ginkgolic acids by macroporous resin HYA-502B (a) and D201 (b)

2.2.3 吸附时间优化

按照 1.5.3 节进行吸附时间优化,结果如图 6 所示。由图 6 可知,两种树脂对银杏酚酸的吸附行为都是快速平衡型,在前 2 h 吸附率快速上升,在 6 h 内达到吸附平衡,主要原因是吸附初始阶段,树脂上大量的活性点处于未吸附的活性状态,因此吸附速度较快,随着吸附的进行,可被利用的活性点越来越少,吸附趋于稳定。最终确定最优吸附时间为 6 h, HYA-502B 和 D201 树脂吸附率分别为 93.15%和 78.65%。

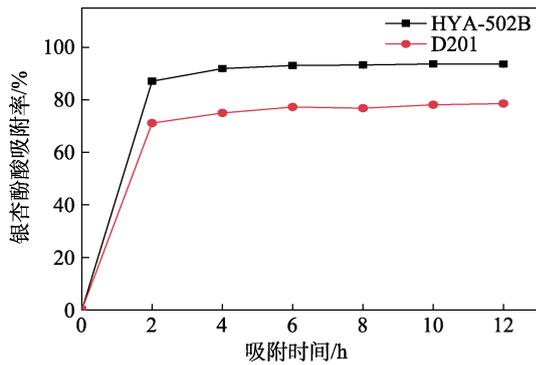


图 6 银杏酚酸在不同大孔树脂上的吸附等温线(25 °C)
Fig. 6 Adsorption isotherms of ginkgolic acids on different macroporous resins at 25 °C

2.2.4 解吸剂种类优化结果

按照 1.5.4 节实验对解吸剂进行优化,结果表明,各体积分数的乙醇溶液对两种树脂的解吸率都很低,说明两种树脂对银杏酚酸的死吸附作用太强。对于 HYA-502B 树脂,随着乙醇体积分数的减少,解吸率逐渐降低,无水乙醇解吸率最高为 8.98%;对于 D201 树脂,随着乙醇体积分数的减少,解吸率逐渐增加,在乙醇体积分数为 75%时解吸率最高为 9.13%。因此,分别选择 HYA-502B 树脂解吸剂为无水乙醇, D201 树脂解吸剂为体积分数 75%乙醇进行后续实验。

2.2.5 解吸剂酸碱添加量优化结果

按照 1.5.5 节实验对解吸剂酸碱添加量进行优化,结果如图 7 所示。

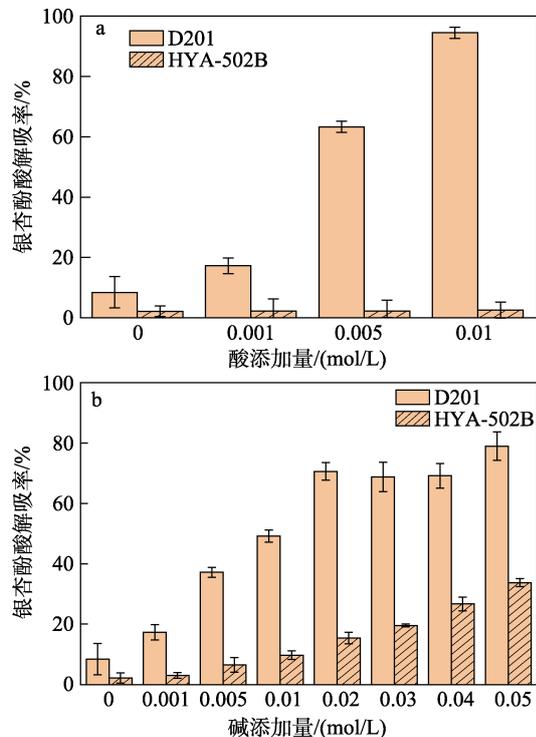


图 7 解吸剂中 HCl (a)、NaOH (b) 添加量对银杏酚酸解吸率的影响

Fig. 7 Effects of HCl (a) and NaOH (b) additive amount in desorption solvent on desorption rate of ginkgolic acids

D201 是强碱型阴离子交换树脂,其吸附银杏酚酸的原理是树脂上的正电基团与电离出氢离子后的酚酸结合,产生阴离子交换作用。由图 7a 可见,加入酸后破坏了 D201 树脂与酚酸之间的作用力,提高其解吸效果。HYA-502B 树脂吸附银杏酚酸的原理主要是依靠它与酚酸之间的范德华引力,通过其巨大的比表面积进行物理吸附,因此,解吸剂中加入酸对其解吸效果没有太大影响。由图 7b 可以看出,向解吸剂中加入碱后,两种树脂解吸效果都有一定提高,原因是银杏酚酸结构上有一个羧基,一定程度上能电离出氢离子,带有一定的酸性,而树脂的洗脱过程其实是一种中和反应,因此,往解吸剂中加入一定量碱有利于提高银杏酚酸的解吸效果,这与张端的研究结果一致^[28]。随着酸、碱添加量增大,银杏酚酸的解吸率随之增大,说明树脂与银杏酚酸之间的作用力较强,只有解吸剂中的酸、碱添加量较高时才能有效破坏它们之间的作用力,从而提高解吸效果。但当酸碱添加量过高时,过低或过高的 pH 不利于 HPLC 检测,最终选择 HYA-502B 树脂解吸剂为无水乙醇,NaOH 添加量为 0.05 mol/L; D201 树脂解吸剂为体积分数 75%的乙醇水溶液, HCl 添加量为 0.01 mol/L,最终解吸率分别可达到 33.77%和 94.47%。

2.2.6 解吸时间优化结果

按照 1.5.6 节进行实验,结果如图 8 所示。由图 8 可知,随着解吸时间的延长,银杏酚酸的解吸率逐渐增加, D201 树脂在解吸 2 h 后即可达到解吸平衡状态,解吸率为 91.97%; HYA-502B 树脂解吸 8 h 后达到解吸平衡状态,解吸率为 31.61%。

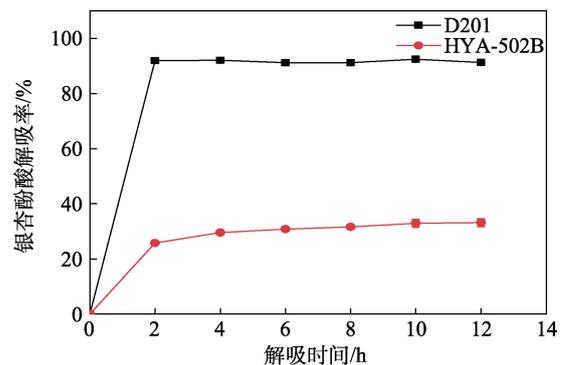


图 8 不同大孔树脂解吸时间优化
Fig. 8 Optimization of desorption time of different macroporous resins

2.2.7 验证实验

根据上述优化结果,分别在 HYA-502B 和 D201 树脂的最佳回收条件下对疏水相 DES 提取液中银杏酚酸进行静态吸附-解吸验证实验。HYA-502B 树脂:疏水相 DES 提取液用无水乙醇稀释 3 倍, 25 °C 吸

附 6 h, 解吸剂为无水乙醇(其中, NaOH 添加量为 0.05 mol/L), 静态解吸 8 h。D201 树脂: 疏水相 DES 提取液用无水乙醇稀释 5 倍, 25 °C 吸附 6 h, 解吸剂为体积分数 75% 的乙醇水溶液(其中, HCl 添加量为 0.01 mol/L), 静态解吸 2 h, 在此条件下 D201 树脂对银杏酚酸的吸附率为 71.73%, 1 次解吸率为 94.54%, 银杏酚酸回收率为 67.81%。由于 HYA-502B 树脂的 1 次解吸率为 33.43%, 因此, 对 HYA-502B 树脂进行两次解吸实验, HYA-502B 树脂第 2 次解吸率为 66.08%, 两次总解吸率可达 99.51%, 推测是因为第 2 次静态解吸过程中树脂有一部分破损, 有利于树脂中银杏酚酸的释放, 因此, 第 2 次的解吸效果要明显优于第 1 次的解吸效果。最终选择 HYA502 树脂为疏水相 DES 提取液中银杏酚酸回收的最佳树脂, 其对银杏酚酸的吸附率可达 93.79%, 总解吸率可达 99.51%, 最终银杏酚酸回收率可达 93.33%。

3 结论

在本课题组前期研究基础上建立了回收银杏果外种皮活性成分的方法。经过一系列的优化实验, 最终结果如下:

(1) 对于亲水相 DES 提取液中的活性成分——萜内酯、黄酮、原花青素, 采用 EOPO 萃取回收的方法。选用 EOPO 分子量 2650, 质量分数为 90% 的 EOPO 水溶液与亲水相 DES 提取液按质量比 4:6 组成回收体系, 混合离心后第 1 次重新形成双相, 此时活性成分富集在 EOPO 相中, 分离出 EOPO 富集相, 在 70 °C 下水浴 90 min, 离心后第 2 次重新形成双相, 此时活性成分富集在下相水溶液中, 其中萜内酯、黄酮和原花青素的回收率分别可达 89.44%、53.27% 和 29.77%。

(2) 对于疏水相 DES 提取液中活性成分——银杏酚酸, 采用大孔树脂吸附回收的方法。选用 HYA-502B 树脂进行静态吸附-解吸回收, 疏水相 DES 提取液用无水乙醇稀释 3 倍后用树脂静态吸附 6 h, 样液体积为 10 mL, 树脂用量为 1 g。解吸剂为碱添加量为 0.05 mol/L 的无水乙醇, 解吸剂用量为 10 mL。静态解吸 8 h, 重复解吸 2 次, 在此条件下, 大孔树脂对银杏酚酸吸附率为 93.79%, 总解吸率为 99.51%, 银杏酚酸的回收率可达 93.33%。

本研究成功建立了分别从亲水相 DES 和疏水相 DES 中回收银杏果外种皮中萜内酯、黄酮、原花青素和银杏酚酸的方法, 该法具有高效、绿色、安全、操作简便等优点, 具有良好应用前景。

参考文献:

[1] UDE C, SCHUBERT-ZSILAVECZ M, WURGLICS M, et al. *Ginkgo*

- biloba* extracts: A review of the pharmacokinetics of the active ingredients[J]. *Clinical Pharmacokinetics*, 2013, 52(9): 727-749.
- [2] ZHANG X H (张心慧), GUO Q R (郭起荣), WANG G B (汪贵斌), et al. Research progress of *Ginkgo biloba* sarcotesta[J]. *Heilongjiang Agriculture Science* (黑龙江农业科学), 2018, (11): 156-160.
- [3] CUI N, ZHANG L L, QUAN M P, et al. Profile of the main bioactive compounds and *in vitro* biological activity of different solvent extracts from *Ginkgo biloba* exocarp[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(73): 45105-45111.
- [4] ZHANG C, LING F, YI Y L, et al. Algicidal activity and potential mechanisms of ginkgolic acids isolated from *Ginkgo biloba* exocarp on *Microcystis aeruginosa*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(1): 323-332.
- [5] ZHANG M N (张梦南). Study on the comprehensive extraction of active substance from the exocarps of *Ginkgo biloba*[D]. Beijing: Beijing Institute of Technology (北京理工大学), 2018.
- [6] TANG S R (唐仕荣), SONG J (宋洁), GU S H (顾绍辉), et al. Separation and purification for ginkgolic acids from *Ginkgo biloba* sarcotesta by microporous adsorption resin and high-speed countercurrent chromatography[J]. *Food Science and Technology* (食品科技), 2020, 45(1): 280-285, 293.
- [7] ZHANG H Y (张洪玉), ZHAO M J (赵明军), ZHOU Z (周状), et al. Research advance on extraction technology of exopleura of *Ginkgo biloba* L.[J]. *Guangzhou Chemical Industry* (广州化工), 2010, 38(11): 3-5.
- [8] PLOTKA-WASYLKA J, DA LA GUARDIA M, ANDRUCH V, et al. Deep eutectic solvents vs ionic liquids: Similarities and differences[J]. *Microchemical Journal*, 2020, 159: 105539.
- [9] CAO J, YANG M, CAO F L, et al. Well-designed hydrophobic deep eutectic solvents as green and efficient media for the extraction of artemisinin from *Artemisia annua* leaves[J]. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2017, 5(4): 3270-3278.
- [10] GAO J, YOU J Y, KANG J H, et al. Recovery of astaxanthin from shrimp (*Penaeus vannamei*) waste by ultrasonic-assisted extraction using ionic liquid-in-water microemulsions[J]. *Food Chemistry*, 2020, 325: 126850.
- [11] WANG T, WANG Q, GUO Q, et al. A hydrophobic deep eutectic solvents-based integrated method for efficient and green extraction and recovery of natural products from *Rosmarinus officinalis* leaves, *Ginkgo biloba* leaves and *Salvia miltiorrhiza* roots[J]. *Food Chemistry*, 2021, 363: 130282.
- [12] LIU Y J, ZHANG H, YU H M, et al. Deep eutectic solvent as a green solvent for enhanced extraction of naringin, naringin, hesperidin and neohesperidin from *Aurantii Fructus*[J]. *Phytochemical Analysis*, 2019, 30(2): 156-163.
- [13] CAO J, YANG M, CAO F L, et al. Tailor-made hydrophobic deep eutectic solvents for cleaner extraction of polyprenyl acetates from *Ginkgo biloba* leaves[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2017, 152: 399-405.
- [14] WU R (吴蓉), ZHANG W (张薇), CHEN L Y (陈璐瑶), et al. Simultaneous extraction of salidroside and tyrosol using deep eutectic solvent: Optimization and recovery[J]. *Fine Chemicals* (精细化工), 2019, 36(5): 865-874.
- [15] WU R (吴蓉), WANG H M (王慧敏), CAO J (曹君), et al. Simultaneous extraction of salidroside and tyrosol from *Rhodiolarosea* L. using tailor-made deep eutectic solvents[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2019, 40(5): 918-926.
- [16] GAO C, CAI C Y, LIU J J, et al. Extraction and preliminary purification of polysaccharides from *Camellia oleifera* Abel. seed cake using a thermoseparating aqueous two-phase system based on EOPO copolymer and deep eutectic solvents[J]. *Food Chemistry*, 2020, 313: 126164.
- [17] SU E Z, DONG Q H, WU R, et al. A two-phase deep eutectic solvent and the preparation method for simultaneous separation and extraction of a variety of active components from the waste *Ginkgo biloba* exocarp: CN 202111447037.5[P]. 2021-12-01.

- [18] CAO J, CHEN L Y, LI M H, *et al.* Two-phase systems developed with hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for simultaneously extracting various bioactive compounds with different polarities[J]. *Green Chemistry*, 2018, 20(8): 1879-1886.
- [19] CAO J, CHEN L Y, LI M H, *et al.* Efficient extraction of proanthocyanidin from *Ginkgo biloba* leaves employing rationally designed deep eutectic solvent-water mixture and evaluation of the antioxidant activity[J]. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 2018, 158: 317-326.
- [20] SU E Z, YANG M, CAO J, *et al.* Deep eutectic solvents as green media for efficient extraction of terpene trilactones from *Ginkgo biloba* leaves[J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2017, 40(8): 385-391.
- [21] DONG Q H, CAO J, WU R, *et al.* Efficient removal of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba* leaves crude extract by using hydrophobic deep eutectic solvents[J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 166(1): 113462.
- [22] NG H S, TEOH A N, LIM J C W, *et al.* Thermo-sensitive aqueous biphasic extraction of polyphenols from *Camellia sinensis var. assamica* leaves[J]. *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2017, 79: 151-157.
- [23] LEONG Y K, LAN J C W, LOH H S, *et al.* Cloud-point extraction of green-polymers from *Cupriavidus necator* lysate using thermoseparating-based aqueous two-phase extraction[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 123(3): 370-375.
- [24] FENG J (冯靖), PENG X M (彭效明), LI C Q (李翠清), *et al.* Antioxidant activity and stability of flavonoids from ginkgo leaves[J]. *Food Science and Technology (食品科技)*, 2019, 44(4): 244-249.
- [25] LIU K W (刘康万). Studies on the selective extraction and stability of ginkgolide A from *Ginkgo Biloba* L.[D]. Nanning: Guangxi University (广西大学), 2016.
- [26] YAN H B (严汉彬), LUO W S (骆玮诗), HAN Z (韩珍), *et al.* Extraction and qualitative analysis of proanthocyanidins from *Pitaya* pee[J]. *Farm Products Processing (农产品加工)*, 2021, (2): 9-13.
- [27] LEI K (雷凯). Dissolution mechanism and properties of collagen in nitrogenous-containing solvents[D]. Jinan: Qilu University of Technology (齐鲁工业大学), 2018.
- [28] ZHANG R (张瑞). Study on technology extraction, separation and purification of phytic acid[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2013.
- (上接第 1359 页)
- [18] FUJITA M. Metal-directed self-assembly of two- and three-dimensional synthetic receptors[J]. *Chemical Society Reviews*, 1998, 27: 417-425.
- [19] PILGRIM B S, CHAMPNESS N R. Metal-organic frameworks and metal-organic cages-A perspective[J]. *ChemPlusChem*, 2020, 85(8): 1842-1856.
- [20] JING X, HE C, YANG Y, *et al.* A metal-organic tetrahedron as a redox vehicle to encapsulate organic dyes for photocatalytic proton reduction[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(11): 3967-3974.
- [21] YANG L, HE C, LIU X, *et al.* Supramolecular photoinduced electron transfer between a redox-active hexanuclear metal-organic cylinder and an encapsulated Ruthenium(II) complex[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2016, 22(15): 5253-5260.
- [22] JING X, YANG Y, HE C, *et al.* Control of redox events by dye encapsulation applied to light-driven splitting of hydrogen sulfide[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(39): 11759-11763.
- [23] WU K, LI K, CHEN S, *et al.* The redox coupling effect in a photocatalytic Ru(II)-Pd(II) cage with TTF guest as electron relay mediator for visible-light hydrogen-evolving Promotion[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(7): 2639-2643.
- [24] LI K, ZHANG L, YAN C, *et al.* Stepwise assembly of Pd₆(RuL₃)₈ nanoscale rhombododecahedral metal-organic cages via metalloligand strategy for guest trapping and protection[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(12): 4456-4459.
- [25] CHEN Z, LONG Z, WANG X, *et al.* Cobalt-based metal-organic cages for visible-light-driven water oxidation[J]. *Inorganic Chemistry*, 2021, 60(14): 10380-10386.
- [26] QI X, ZHONG R, CHEN M, *et al.* Single metal-organic cage decorated with an Ir(III) complex for CO₂ photoreduction[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(12): 7241-7248.
- [27] SUTRADHAR M, GUEDES D, POMBEIRO A. A new cyclic binuclear Ni(III) complex as a catalyst towards nitroaldol (Henry) reaction[J]. *Catalysis Communications*, 2014, 57: 103-106.
- [28] WU X, HE C, WU X, *et al.* An L-proline functionalized metallo-organic triangle as size-selective homogeneous catalyst for asymmetry catalyzing aldol reactions[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47: 8415-8417.
- [29] YANG L, ZHAO L, ZHOU Z, *et al.* A thiourea-functionalized metal-organic macrocycle for the catalysis of Michael additions and prominent size-selective effect[J]. *Dalton Transactions*, 2017, 46(12): 4086-4092.
- [30] GUO J, XU Y W, LI K, *et al.* Regio- and enantioselective photodimerization within the confined space of a homochiral ruthenium/palladium heterometallic coordination cage[J]. *Angewandte Chemie*, 2017, 129(14): 3910-3914.
- [31] CHU D, GONG W, JIANG H, *et al.* Boosting enantioselectivity of chiral molecular catalysts with supramolecular metal-organic cages [J]. *CCS Chemistry*, 2021, 3: 1692-1700.
- [32] YOSHIKAWA M, TAKEYAMA Y, KUSUKAWA T, *et al.* Cavity-directed, highly stereoselective [2+2] photodimerization of olefins within self-assembled coordination cages[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41(8): 1347-1349.
- [33] YOSHIKAWA M, TAMURA M, FUJITA M, *et al.* Diels-Alder in aqueous molecular hosts: Unusual regioselectivity and efficient catalysis[J]. *Science*, 2006, 312(5771): 251-254.
- [34] MURASE T, NISHIJIMA Y, FUJITA M. Cage-catalyzed Knoevenagel condensation under neutral conditions in water[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(1): 162-164.
- [35] LI S C, CAI L X, ZHOU L P, *et al.* Supramolecular synthesis of coumarin derivatives catalyzed by a coordination-assembled cage in aqueous solution[J]. *Science China Chemistry*, 2019, 62: 713-718.
- [36] CAULDER D L, RAYMOND K N. The rational design of high symmetry coordination clusters[J]. *Journal of the Chemical Society Dalton Transactions*, 1999, 8(8): 1185-1200.
- [37] CAULDER D L, RAYMOND K N. Supermolecules by design[J]. *Accounts of Chemical Research*, 1999, 32(11): 975-982.
- [38] CAULDER D L, POWERS R E, PARAC T N, *et al.* The self-assembly of a pre-designed tetrahedral M₄L₆ supramolecular cluster[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1998, 37(13/14): 1840-1843.
- [39] BENDER T A, BERGMAN R G, RAYMOND K N, *et al.* A supramolecular strategy for selective catalytic hydrogenation independent of remote chain length[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(30): 11806-11810.
- [40] BENDER T A, MORIMOTO M, BERGMAN R G, *et al.* Supramolecular host-selective activation of iodoarenes by encapsulated organometallics [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(4): 1701-1706.
- [41] HE C, WANG J, ZHAO L, *et al.* A photoactive basket-like metal-organic tetragon worked as an enzymatic molecular flask for light driven H₂ production[J]. *Chemical Communications*, 2012, 49(6): 627-629.
- [42] ZHAO L, CAI J, LI Y, *et al.* A host-guest approach to combining enzymatic and artificial catalysis for catalyzing biomimetic monooxygenation[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2903.