

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

刘宝亮, 曹桂萍

(常州工学院数理与化工学院, 江苏常州 213002)

摘要: 利用离子液体([Bmim]BF₄)双水相提取香樟叶中的黄酮, 首先确定稳定的双水相体系, 在单因素试验基础上, 选择浸提时间、浸提温度、溶液 pH 为影响因子, 应用 Box-Behnken 中心组合法进行 3 因素 3 水平试验设计, 以香樟叶总黄酮得率为响应值, 进行响应面分析, 利用 Al(NO₃)₃-NaNO₂-NaOH 分光光度法测定黄酮的含量。研究表明: 稳定的离子液体双水相体系: 成相盐为硫酸铵, 加入量为 0.8 g, [Bmim]BF₄ 与水的体积比为 2:2; 响应面分析法的优化提取条件: 0.1 g 的香樟叶粉末时, 得出对黄酮提取率影响大小的因素依次为提取时间、提取温度、pH, 最佳浸提条件为: 浸提时间 3.70 h, 浸提温度 82 °C, pH 为 9.60, 在此条件下黄酮提取率达 10.62%。同时建立了离子液体双水相提取香樟叶总黄酮的二次数学模型, 对目标产物提取具有良好的预测作用, 为该体系的放大实验或规模化生产提供理论指导。

关键词: 离子液体双水相; 黄酮; 响应面

文章编号: 1673-9078(2018)04-179-187

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.028

Response Surface Methodology for Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from Camphor Leaves by an Ionic Liquid/Aqueous Two-phase System

LIU Bao-liang, CAO Gui-ping

(College of Mathematical Physics and Chemical Engineering, Changzhou Institute of Technology, Changzhou 213002, China)

Abstract: Flavonoids of camphor leaves was extracted by an ionic liquid/aqueous two-phase system in this paper. First, the stability of aqueous two-phase was investigated. Based on single-factor tests, Box-Behnken center composite experiment was carried out with three factors and three levels of experimental design using extraction time, extraction temperature and pH as the influence factors. Besides, the content of flavonoids was determined by Al(NO₃)₃-NaNO₂-NaOH spectrophotometric method. For a stable ionic liquid aqueous two-phase system, the phase-forming salt is ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄); the addition amount is 0.8 g; and the volume ratio of the [Bmim] BF₄ to water was 2: 2. Response surface analysis showed that for 0.1 g of camphor leaves powder, the influence of factors that affected the extraction rate of flavonoids were in a descending order of extraction time, extraction temperature and pH. The optimized extraction conditions were as follows: extraction time 3.7 h, extraction temperature 82 °C, and the solution acidity 9.6. Under the optimum conditions, the extraction rate of flavonoids reached 10.62%. At the same time, the secondary mathematical model for extraction of total flavonoids from camphor leaves with ionic liquid aqueous two-phase system was established, which has a good predictive effect on target product extraction, and provided theoretical guidance for the scale-up experiment or large-scale production of this system.

Key words: ionic liquid-aqueous two-phase system; flavonoids; response surface methodology

香樟树又名木樟, 属于樟科类植物, 主要分布在

收稿日期: 2017-12-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (51704042); 常州工学院科研基金项目 (YN1210)

作者简介: 刘宝亮 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然有效成分提取及应用研究

我国长江以南及西南地区, 是国家二级重点保护野生植物, 它在我国资源丰富。研究表明, 香樟树的各个部位都含有丰富的黄酮类化合物, 黄酮类化合物具有捕获游离基^[1]、扩张脑血管^[2]、抗菌抗病毒^[3]和抗癌抗肿瘤^[4]等功能。

离子液体, 是指一般由有机阳离子和无机阴离子

组成的在室温条件下呈现液态的液体。离子液体的蒸汽压几乎为零、没有挥发性、无色、无味；温度范围较稳定，化学性质稳定；对阴离子和阳离子的组成进行调节设计，可以形成多种不同性质的离子液体，被称为“设计者溶剂”，是一种新型的绿色溶剂^[5,6]。

Gutowski 等^[7]于 2003 年首次提出了离子液体双水相的概念，通过研究发现了水合磷酸钾和亲水性离子液体[Bmim]Cl 可以形成离子液体为上相和磷酸钾溶液为下相的双水相体系。离子液体双水相操作条件温和，体系易于放大，耗能小。目前，离子液体双水相萃取技术在生物分析^[8-10]、药物分析^[11,12]以及天然有机物的提纯^[13-15]等方面有广泛的应用。

响应面设计方法(response surface methodology, RSM)最早是由数学家 Box 和 Wilson 于 1951 年提出来的，响应面设计方法是利用合理的试验设计方法并通过实验得到一定数据，采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系，通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数，解决多变量问题的一种统计方法。利用回归方程作为函数估算的工具，将多因子试验中因素与目标响应值的关系用多项式拟合，将因子与目标响应值的关系函数化，因而可对函数的响应面进行分析，研究因子与目标响应值之间、因子与因子之间的相互关系，并进行优化，得到最佳条件。它克服了正交试验只能对一个个孤立的试验点进行分析而不能给出直观图形的缺陷，响应面设计方法得到了广泛的应用^[16,17]。本文利用离子液体[Bmim]BF₄ 双水相技术，采用单因素试验和响应面分析法，以香樟叶中黄酮类化合物提取率为考察指标，对香樟叶中黄酮类化合物的提取工艺进行研究，旨在为进一步研究香樟中黄酮类化合物的化学结构和生物活性提供科学依据，为香樟叶的开发利用奠定理论基础。

本论文采用萃取香樟叶中的黄酮类化合物，利用响应面法优化浸提条件。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

香樟叶，校园内采集，烘干、粉碎备用；芦丁标准品，[Bmim]BF₄，硫酸铵，磷酸氢二钾，亚硝酸钠，硝酸铝，盐酸，氢氧化钠等试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV1102 紫外可见分光光度计，上海大普仪器有限公司；CQ-250S 超声清洗仪器，上海吉理超声仪器有限公司；SHB-III S 循环水式多用真空泵，常州长城科

工贸有限公司；FA1004 型电子天平，上海越平科学仪器有限公司；HH-601 超级恒温水浴，江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司；XH-MC-1 实验微波合成仪，北京祥鹤科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 四氟硼酸-1-丁基-3-甲基咪唑的制备

采用微波辐射两步合成法，首先利用 1-甲基咪唑和溴代正丁烷为原料，制备中间产物[Bmim]Br，然后再以丙酮为溶剂溶解[Bmim]Br，与硼氟酸钠进行取代反应，制备[Bmim]BF₄。该实验的加热过程是间歇式加热。

1.3.2 芦丁标准曲线的绘制

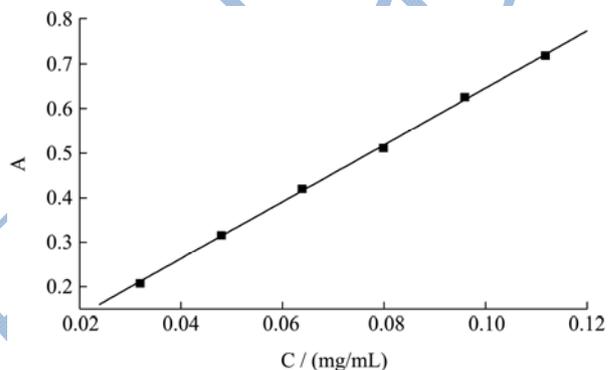


图 1 不同芦丁浓度的吸光度值

Fig.1 The absorbency value of different rutin concentration

配制浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁标准溶液 50 mL，分别吸取 0.0 mL，2.0 mL，4.0 mL，6.0 mL，8.0 mL，10.0 mL 储备液于 25 mL 容量瓶，加入 1 mL 浓度为 5% 的 NaNO₂ 溶液，摇匀，静置 6 min，再加入 1 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液，摇匀，静置 6 min，加入 4% NaOH 溶液 5 mL，加入 60% 乙醇定容至刻度，放置 15 min，用分光光度计在 510 nm 处测定其吸光度。实验结果见图 1。

由图 1 可知，该标准曲线的线性回归方程为 $A=6.3937 C+0.0054$ ，线性回归系数 $R^2=0.9994$ 。

1.3.3 香樟叶的预处理

香樟叶于四月份采自常州工学院新北校区二号楼旁边的落叶。将采集到的香樟叶浸泡 10 min，洗净除去泥土，于太阳下晒干，除去水分，并捣碎制成粉末放入干燥器中备用。取干燥后的香樟叶若干于密封的玻璃仪器内，以原料比 1:4 向其中加入石油醚脱脂，脱脂时间 25 min，用真空泵抽滤，除去石油醚，继续加入石油醚脱脂，重复上述操作，共三次，将得到的香樟叶粉末放入小烧杯中，置于阳光下挥发，除去其中的石油醚，装入密封袋中备用。

1.3.4 香樟叶中黄酮的提取及测定

1.3.4.1 稳定离子液体双水相的确定

通过改变成相盐的种类、成相盐的加入量、离子液体与水的体积比，以黄酮化合物提取率为指标，确定稳定高效离子液体双水相的组成。

1.3.4.2 单因素实验

分别以香樟叶的加入量、浸提时间、浸提温度、溶液的 pH 这几个因素做单因素试验，考察各因素对香樟叶中黄酮类化合物提取效果的影响，以黄酮类化合物提取率为指标。

1.3.4.3 响应曲面法优化提取工艺

在单因素试验基础上，利用 Box-Behnken 的中心组合设计原理，利用响应面法比较各种影响因素的重要性，对影响因素进行比较，确定香樟黄酮化合物提取的最佳条件。

1.3.4.4 黄酮类化合物提取率的计算

黄酮类化合物提取液定容 10 mL 的容量瓶中，移取 2 mL 于 25 mL 容量瓶中，按上述标准曲线的方法测定，香樟中黄酮类化合物的提取率：

$$R = \frac{C * 25 * 5 * 10^{-3}}{m} * 100\%$$

R-香樟叶中黄酮的提取率，%；C-溶液浓度，mg/L；m-香樟叶的质量，g。

2 结果与讨论

2.1 离子液体（四氟硼酸-1-丁基-3-甲基咪唑）

双水相体系的确立

2.1.1 成相盐的选择对双水相体系形成的影响

取 6 支 10 mL 的比色管，向其中加入 2 mL 的离子液体，2 mL 的去离子水，并向其中加入 0.8 g 的不同种类的盐，包括 NaHSO₄、NaCl、(NH₄)₂SO₄、KH₂PO₄、Na₂SO₃、KCl，震荡摇晃，使溶液混合均匀，于室温下放置 15 min，分别比较不同盐类对双水相成相的影响，实验结果见表 1。

表 1 盐对双水相体系成相的影响

Table 1 Effects of salt on the phase formation of ionic liquid-aqueous two-phase system

盐的种类	现象	备注
NaHSO ₄	可形成双水相，溶解度不好，效果差	下相离子液体，上相盐
NaCl	不能形成双相	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	可形成双水相，效果较好	离子液体为上相，盐为下相
KH ₂ PO ₄	不能形成双水相	-
Na ₂ SO ₃	可形成双水相，溶解度小，效果差	下相离子液体，上相盐
KCl	不能形成双水相	-

由表 1 可知，NaCl、KH₂PO₄、KCl 三种盐无法与 [Bmim]BF₄ 形成双水相，而 NaHSO₄、(NH₄)₂SO₄、Na₂SO₃ 可以与 [Bmim]BF₄ 形成双水相，其中 NaHSO₄、Na₂SO₃ 虽然可以形成双水相，但是溶解度较小，分相效果较差，而 (NH₄)₂SO₄ 溶解效果好，且有明显分层，离子液体为上相，盐为下相，且盐用量很少，溶解也很快，在成相过程中会发生相转移，因此就可以根据所要分离目标的需要，通过控制盐的加入量改变离子液体双水相的相比，以能够更好地用于目标产物的纯化与分离，所以本实验选择硫酸铵作为 [Bmim]BF₄ 体系的成相盐。

由表 1 还可知，盐能否与离子液体形成双水相体系，与其包含的阴离子、阳离子都有关系，这可能是由于阴离子的水合导致其周围分子的电子结构紧缩，增强了水分子对半径适当的阳离子的作用力，从而增强了盐与水的聚合，使其表面张力发生变化，当其离子液体的表面张力差达到一定程度，就会分相形成双水相。

2.1.2 成相盐的加入量对双水相体系形成的影响

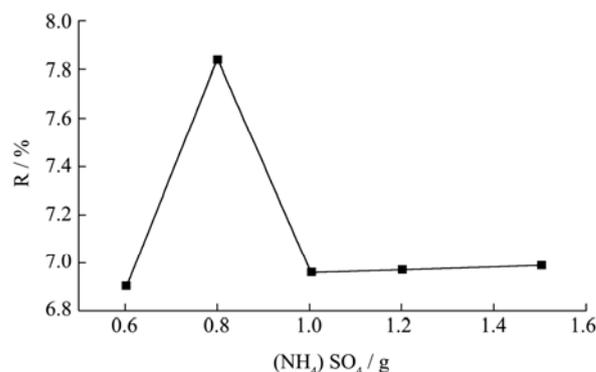


图 2 盐的加入量对双水相体系成相的影响

Fig.2 Effects of adding amount of salt on the phase formation of ionic liquid- aqueous two-phase system

取 10 mL 的比色管 5 支，向其中加入 2 mL 的离子液体，2 mL 的去离子水，改变硫酸铵盐的加入量，震荡摇晃，使溶液混合均匀，静置，待溶液出现明显分层后，向其中加入 0.10 g 的香樟叶粉末，上下摇晃，

充分混合均匀,在室温条件下,静置半小时,利用分光光度计测定吸光度,并计算出香樟叶黄酮的提取率,实验结果见图2。

由图2可知,硫酸铵盐的加入量在0.60~1.60 g时,盐均能完全溶解并且形成明显分层,双水相澄清透明,分相迅速,盐的加入量越大,富含离子液体的上相所占的体积比就越大。

当硫酸铵盐的加入量从0.60 g增加到0.80 g时,黄酮的提取率不断上升,硫酸铵盐的加入量为0.80 g时,黄酮的提取率最高,达到7.84%,出现这种现象的原因可能是随着硫酸铵盐的不断加入,盐与离子液体争夺水分子,下相的离子液体减少,转移至上相,而黄酮类化合物在离子液体中溶解度比较大,溶解在下相的黄酮类化合物上相,所以在硫酸铵质量分数从0.60变化到0.80,总的黄酮提取率不断增加。在硫酸铵盐的加入量继续增加时,黄酮的提取率趋于平稳,

但都低于0.80 g时的提取率,且硫酸铵盐的加入量为1.50 g时,硫酸铵无法完全溶解于2 mL的去离子水中。可能是由于当加入的硫酸铵盐过饱和时,在硫酸铵盐不断溶解、析出的过程中,部分黄酮类物质会被其吸附,造成吸光度值减小,并且硫酸铵盐的过饱和也会造成实验药品的浪费,所以本实验盐的加入量为0.80 g。

2.1.3 离子液体与水的体积比对双水相体系的影响

取10 mL的比色管5支,分别向其中加入不同体积的离子液体和不同体积的去离子水(1:3、2:5、2:4、2:3、2:2、2:1),0.80 g的硫酸铵盐,震荡摇晃,使溶液混合均匀,静置15 min,待完全分层后,向其中加入0.10 g的香樟叶粉末,摇晃均匀,于室温下放置半小时,利用分光光度计测定其吸光度,并计算香樟叶中黄酮的提取率,实验结果见表2。

表2 离子液体与水的体积比对黄酮提取率的影响

Table 2 Effects of volume ratio of ionic liquid to water on the extraction rate of flavonoids

离子液体与水的体积比	(NH ₄) ₂ SO ₄ 的质量/g	香樟叶的质量/g	吸光度 A	提取率 R/%	备注
1:3(0.3)	0.80	0.10	-	-	不能形成双水相
2:5(0.4)	0.80	0.10	-	-	离子液体由上相变为下相
2:4(0.5)	0.80	0.10	-	-	不能形成双水相
2:3(0.7)	0.80	0.10	0.30	5.62	-
2:2(1.0)	0.80	0.10	0.37	6.97	-
2:1(2.0)	0.80	0.10	-	-	盐无法完全溶解

由表2可以看出,离子液体与水的体积比为2:2、2:3时可以形成双水相体系,且体积比为2:2时,香樟叶中黄酮的提取率最大为6.97%。而当离子液体与水的体积比为1:3和2:4时不能形成双水相,当离子液体与水的体积比为2:5时,离子液体由上相变为下相,体积比为2:1时加入的硫酸铵盐无法完全溶解,会造成实验药品的浪费。离子液体质量分数小时,由于无机盐与水分子的缔合作用使得加入的少量离子液体滞留其中,无法成相,之后随着离子液体量的增多,滞留其中离子液体释放出来,形成双水相。离子液体富集在上相,黄酮类化合物在离子液体中溶解度比较大,黄酮趋向于上相分配,离子液体质量分数的增大,萃取率提高。且黄酮类化合物具有一定极性,离子液体和水的体积比为2:2时,萃取剂极性与黄酮类化合物相近,根据相似相溶的性质,也有助于黄酮类化合物快速溶出。之后随着离子液体质量分数的再增加,溶剂极性占据主要因素,溶剂极性和黄酮类化合物极性相差越来越大,故而提取率降低。所以本实验选择的离子液体与水的体积比为2:2。

2.2 单因素实验对黄酮提取率的影响

2.2.1 香樟叶的加入量对黄酮提取率的影响

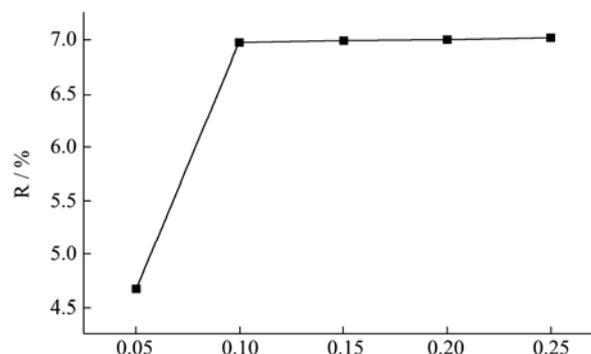


图3 香樟叶的加入量对双水相体系成相的影响

Fig.3 Effects of addition amount of camphor leaves on the phase formation of ionic liquid-aqueous two-phase system

注: 香樟叶的加入量/g。

取10 mL的比色管5支,向其中加入2 mL的离子液体,2 mL的去离子水,0.8 g的硫酸铵盐,震荡摇晃,使溶液混合均匀,静置15 min,待体系出现明

显分层,在向其中加入不同质量的香樟叶粉末(0.05 g、0.10 g、0.15 g、0.20 g、0.25 g),于室温条件静置 0.50 h,利用分光光度计测定吸光度,并计算香樟叶中黄酮的提取率,实验结果见图 3。

由图 3 可以看出香樟叶的加入量从 0.05 g 增加到 0.10 g,总黄酮类化合物的提取率不断增加,加入量大于 0.10 g,黄酮的提取率趋于水平,最大黄酮提取率为 6.97%。加入的香樟叶太多,相对的提取溶剂比较少,固相主体溶度和液相主体溶度的溶度差比较小,这样的结果是传质推动力比较小,有效成分流出速度慢,并且料液比太大加大过滤和纯化困难,之后随着比值的减小总黄酮提取率一直增加,到料液比 0.1 g 处之后曲线趋于水平,萃取效果稳定;并且实验中是固定的双水相的量,改变物料多少,一定的离子液体溶剂对黄酮的溶解度是一定的,所以在随着香樟叶加入量增加的情况下,提取率得以提高,到香樟叶加入为 0.1 g 时,溶剂能全部溶解其中黄酮类化合物,所以之后香樟叶量增加,黄酮的提取率变化不大。但是料液比也不是越小越好,在双水相体系中,料液比越小造成需要的分相盐也增多,增加成本。故而在综合考虑成本和提取效果这两方面因素,选择香樟叶加入量为 0.10 g。

2.2.2 浸提时间对黄酮提取率的影响

取 10 mL 的比色管 5 支,向其中加入 2 mL 的离子液体,2 mL 的去离子水,并向其中加入 0.80 g 的硫酸铵盐,震荡摇晃,使溶液混合均匀,静置 15 min,待溶液出现明显分层后,向其中加入 0.10 g 的香樟叶粉末,摇晃均匀,于室温条件放置不同的时间(0.50 h、1.50 h、2.50 h、3.50 h 和 4.50 h),利用分光光度计测定吸光度,并算出香樟叶中黄酮的提取率,实验结果见图 4。

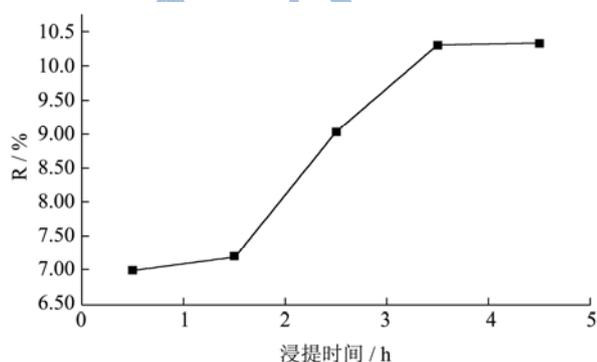


图 4 浸提时间对黄酮提取率的影响

Fig.4 Effects of extraction time on the extraction rate of flavonoids

由图 4 可知,随着提取时间的增加,香樟叶中黄酮的提取率一直处于上升的趋势,在 1.50~3.50 h 之间

上升趋势尤为明显,因为在浸提初期细胞内的黄酮物质被释放并扩散到离子液体中,随着时间的增加黄酮的提取率逐渐增高。在 3.50~4.50 h 之间,黄酮的提取率没有显著变化,趋于平缓,4.50 h 时的黄酮提取率达到 10.32%,3.50 h 的提取率在 10.29%,两者差别不大,表明时间超过 3.50 h,黄酮的提取率已经不会出现明显变化,这是因为随着浸提时间的逐渐增加,黄酮类物质几乎被全部释放,黄酮的提取率也会随之稳定下来,所以为了节约实验时间,提高实验效率,本实验选择的浸提时间为 3.50 h。

2.2.3 pH 对黄酮提取率的影响

取 10 mL 的比色管 5 支,向其中加入 2 mL 的离子液体,2 mL 的不同 pH 值的 B-R 缓冲溶液(3、5、7、9、11),0.80 g 的硫酸铵盐,震荡摇晃,使溶液混合均匀,静置 15 min,待双水相分层后,向其中加入 0.10 g 的香樟叶粉末,摇晃均匀,于室温条件下放置 3.50 h,利用分光光度计测定其吸光度,并计算出香樟叶中黄酮的提取率,实验结果见图 5。

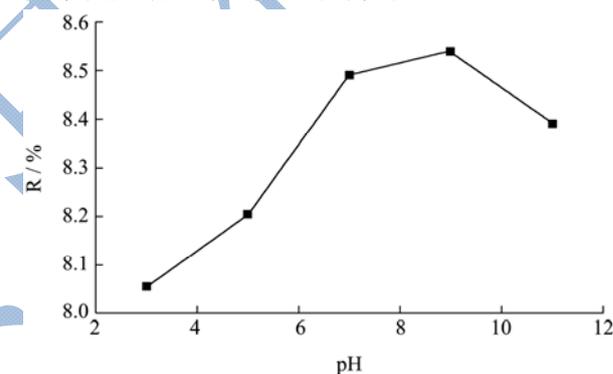


图 5 pH 对黄酮提取率的影响

Fig.5 Effects of pH on the extraction rate of flavonoids

由图 5 可以看出, pH 在 3~7 之间变化趋势很明显,陡峭上升, pH 7~9 之间变化幅度不是很大,并在 pH=9 时达到最大值,黄酮的提取率为 8.54%,这是由于黄酮类物质分子中含有游离酚羟基,可溶于碱性溶液中,并以酚羟基氧负离子的形式存在,随着 pH 值的增加,盐溶液中的负电荷逐渐增加,使得它对酚羟基氧负离子的排斥作用增强,黄酮不断被转移至上相,提取率不断上升。当 pH 大于 9,溶液碱性增强,黄酮提取率呈下降的趋势,原因可能是因为碱性过强,破坏了黄酮母核,导致黄酮的萃取率降低;另外碱性太强, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水解,释放氨气,造成双水相中盐的含量减少,影响到双水相的形成和双水相的体积比,从而会导致黄酮提取率也会降低。综上所述,溶液酸度为 9 时黄酮的提取率最大,所以本实验选择溶液酸度为 9。

2.2.4 浸提温度对黄酮提取率的影响

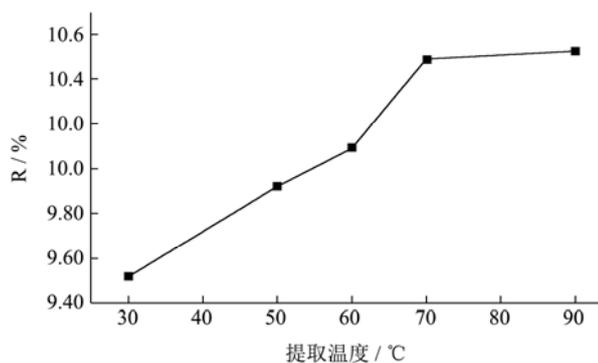


图6 浸提温度对黄酮提取率的影响

Fig.6 Effects of the extraction temperature on the extraction

取 10 mL 的比色管 5 支, 向其中加入 2 mL 离子液体, 2 mL 的 pH=9 的 B-R 缓冲溶液去离子水, 0.80 g 的硫酸铵盐, 震荡摇晃, 使溶液混合均匀, 静置 15 min, 待完全分层后, 向其中加入 0.10 g 的香樟叶粉末, 摇晃均匀, 改变浸提温度 (30 °C、50 °C、60 °C、70 °C 和 90 °C), 分别放置 3.50 h, 利用分光光度计测定其吸光度, 并计算香樟叶中黄酮的提取率, 实验结果见图 6。由图 6 可以看出, 随着温度的升高, 香樟叶中的黄酮提取率呈上升趋势。在 30 °C~60 °C 之间, 黄酮的提取率变化幅度不大, 但是在 60 °C~70 °C 时上升很快, 呈明显的陡峭上升趋势, 但在 70 °C~90 °C 时提取率增加趋势较为平缓, 90 °C 时的提取率略大于 70 °C, 提取率为 10.49%。这是因为温度升高可以降低溶剂的黏度, 增高黄酮的溶解度, 使得黄酮的有效成分迅速扩散, 从而使得率增大; 另一方面, 当浸提温度达到一定程度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, 得率逐渐趋于平稳。为了节约实验时间, 提高实验效率, 所以选择的实验浸提温度为 70 °C。

2.3 响应曲面分析法优化工艺条件

2.3.1 Box-Behnken 试验设计(BBD)方案的确定

表3 Box-Behnken 试验因子水平编码表

Table 3 Factor coding and levels of Box-Behnken experiment

变量	代码	编码水平		
		-1	0	1
浸提时间	A X ₁	2.50	3.50	4.50
浸提温度	B X ₂	60	70	80
溶液酸度	C X ₃	7	9	11

综合单因素实验结果, 选择浸提时间、浸提温度以及溶液 pH 值三个因素所确定的水平范围, 使用 Design-Expert 7.0 软件设计响应面实验, 选择 Box-Behnken 试验设计, 以黄酮的提取率为响应值,

进行三因素三水平共 17 个实验点的响应面分析实验, 各因素的编码值与真实值见表 3。实验以随机次序进行, 实验结果见表 4。

2.3.2 回归模型分析

利用 Design-Expert 软件对试验数据进行二次多项式逐步回归拟合, 建立二次多元回归方程, 对该方程的回归分析与方差分析结果见各因素经多元回归拟合, 得到回归方程为:

$$Y=9.69+0.44A+0.35B+0.27C-0.16AB+0.5AC+0.57BC-0.65A^2-0.095B^2-0.43C^2$$

由表 5 方差分析可以看出, 模型 *p* 小于 0.01, 表明该模型方程极显著, 不同处理间的差异高度显著。模型相关系数 R² 为 94.91%, 大于 90%, 说明模型拟合程度良好, 试验误差小, 该模型是合适的。因此可以用该模型方程来分析和预测不同提取条件下黑花生衣中黄酮提取率的变化。由表 5 可知, 对黄酮提取率作用显著的是 A、B、C、AC、BC、A²、C², 它们的 *p* 值分别为 0.0017、0.0058、0.0200、0.0053、0.0027、0.0011、0.0098。由表 5 的 *p* 值可以知道, 因素 A、B、C 对响应值的线性效应显著, A²、C² 对响应值的曲面效应显著, AC、BC 对响应值的交互影响显著, AB 对响应值的交互影响不显著。通过直接比较方程中一次项系数绝对值的大小, 可以判断因素影响的主次性。对香樟叶中黄酮提取率影响最大的是提取时间, 其次是提取温度, 最后是溶液的 pH。

表4 设计方案及结果

Table 4 Design scheme and results

实验序号	时间/h	温度/°C	溶液酸度 pH	提取率/%
1	-1	0	1	7.86
2	0	0	0	9.69
3	1	1	0	9.35
4	0	-1	1	8.36
5	1	-1	0	9.02
6	-1	0	-1	8.08
7	0	1	-1	8.82
8	0	1	1	10.25
9	0	0	0	9.69
10	-1	1	0	9.19
11	0	0	0	9.69
12	0	-1	-1	9.22
13	1	0	-1	8.35
14	-1	-1	0	8.22
15	0	0	0	9.69
16	1	0	1	10.14
17	0	0	0	9.69

表 5 回归方程方差分析表

Table 5 Variance analysis of mathematical regression model

Source	Sum of Squares	Df	Mean square	F-value	p-value Prob>F	significant
model	8.309487	9	0.923276	14.50633	0.0010	**
A-时间	1.540013	1	1.540013	24.19637	0.0017	**
B-温度	0.973013	1	0.973013	15.28778	0.0058	**
C-pH	0.57245	1	0.57245	8.99422	0.0200	*
AB	0.1024	1	0.1024	1.608888	0.2452	
AC	1.010025	1	1.010025	15.86931	0.0053	**
BC	1.311025	1	1.311025	20.59856	0.0027	**
A ²	1.778947	1	1.778947	27.95047	0.0011	**
B ²	0.038	1	0.038	0.597048	0.4650	
C ²	0.787605	1	0.787605	12.3747	0.0098	**
Residual	0.445525	7	0.063646			
Lack of fit	0.445525	3	0.148508			
Pure error	0	4	0			
Cor Total	8.755012	16				

注: 模型的 $R^2=0.9491$, $R_{Adj}^2=0.8837$; ***为差异极其的显著($p<0.0001$); **为差异高度的显著($p<0.01$); *为差异显著($p<0.05$)。

2.3.3 响应面交互作用分析

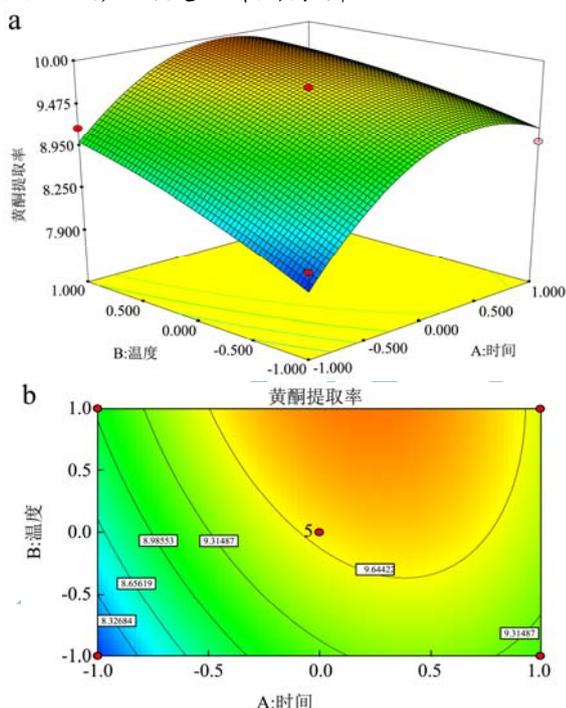


图 7 浸提时间和浸提温度对黄酮提取率的交互作用图

Fig.7 The interaction of extraction time and extraction temperature on the extraction rate of flavonoids

为了进一步考察 3 个试验因子: 提取时间 (A)、提取温度 (B) 及 pH (C) 的交互作用以及确定最优点, 对回归模型采用降维法分析, 即可得到两因子的回归模型, 并通过 Design-Expert 软件绘制出响应面曲线图来进行直观的分析。响应面图可以直观地反应出

两变量交互作用的显著程度。极值条件出现在等高线的圆心处; 等高线图最圆, 说明它们之间相互作用对香樟叶中黄酮的提取率的影响最大; 而等高线图越扁平, 表示因素之间的相互影响越小。图 7~9 分别显示了 3 组以香樟叶黄酮提取率为响应值的趋势图。

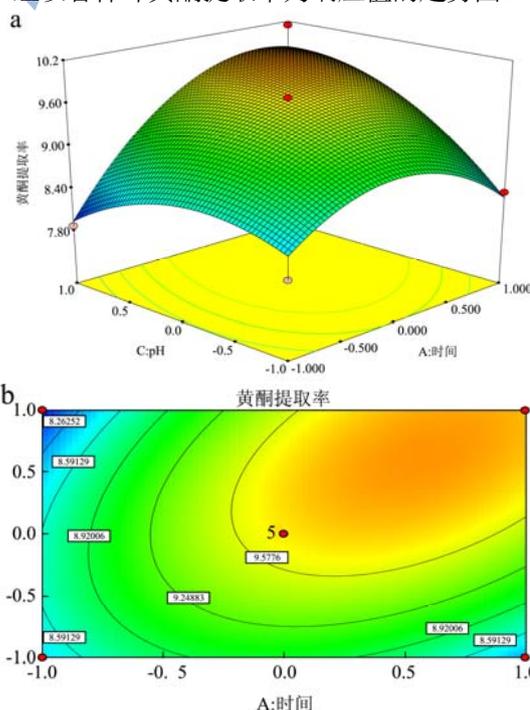


图 8 浸提时间和 pH 值对黄酮提取率的交互作用

Fig.8 The interaction of extraction time and pH on the extraction rate of flavonoids

图 7 显示浸提时间与浸提温度对黄酮提取率的交

相互作用,随着提取时间的延长和提取温度的增大,香樟叶中黄酮的含量不断上升,最后趋于稳定;图8显示浸提时间与浸提溶液pH对黄酮提取率的交互作用,随着提取时间的延长和溶液pH的增大,香樟叶中黄酮提取含量不断上升,达到较高点后又缓慢下降;图9显示浸提温度与浸提溶液pH对黄酮提取率的交互作用,随着提取时间的延长和溶液pH的增大,香樟叶中黄酮提取含量增加趋势。综合以上情况可以得出,浸提时间与浸提温度、溶液pH之间交互作用均较显著,浸提温度与溶液pH间交互作用不明显。

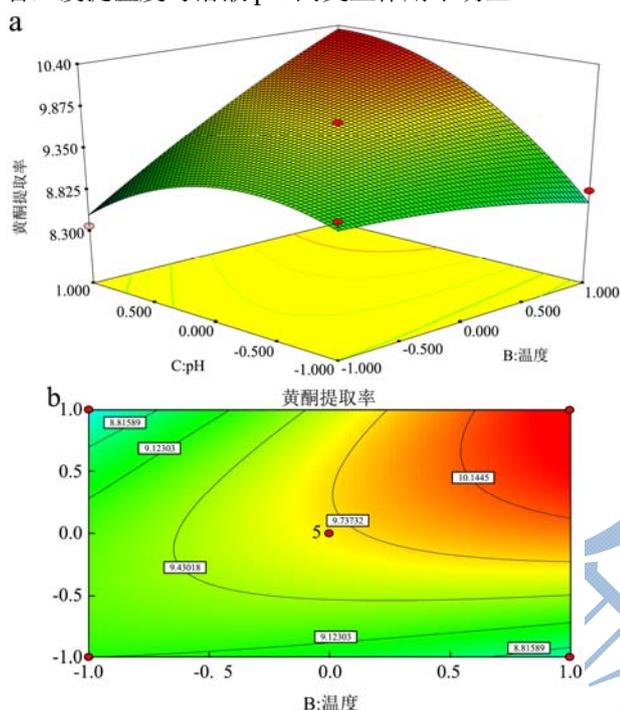


图9 浸提温度和pH值对黄酮提取率的交互作用

Fig.9 The interaction of extraction time and pH on the extraction rate of flavonoids

通过 Design-Expert 7.0 软件分析,建立了一个以香樟叶黄酮提取率为目标值,以浸提时间、浸提温度和溶液pH为因子的数学模型。通过对回归方程的优化计算,得出最优提取工艺条件为:浸提时间为3.7 h,浸提温度为81.90 °C,溶液酸度为9.59。考虑到实际操作的影响,将各因子进行修正:浸提时间为3.70 h,浸提温度为82 °C,溶液酸度为9.60。

取3支10 mL的比色管,向其中加入向其中加入2 mL的离子液体,2 mL的pH为9.60的缓冲溶液,0.80 g的硫酸铵盐,震荡摇晃,使溶液混合均匀,待溶液出现明显分层后,向其中加入0.10 g的香樟叶粉末,摇晃均匀,于82 °C条件下放置3.70 h,利用721 E分光光度计测定其吸光度,并计算香樟叶中黄酮的提取率,重复测定三次,得到黄酮的提取率分别为10.62%、10.65%和10.59%,三次平均值为10.62,回

归模型预测实验值为10.58%,其相对误差为0.38%,因此响应面法对香樟叶中黄酮提取条件的优化是可行的,得到的黄酮提取条件具有实际应用价值。

3 结论

3.1 本实验利用自制离子液体,确定了稳定的离子液体双水相体系为:离子液体为[Bmim]BF₄,成相盐为硫酸铵盐,硫酸铵盐的加入量为0.80 g,离子液体和水的体积比位2:2。

3.2 在单因素试验的基础上,采用Box-Behnken试验设计及响应面分析,建立香樟叶中黄酮类化合物提取的二次多项式回归模型。经检验证明该模型是合理可靠,能够较准确的预测香樟叶中黄酮类化合物的提取率。最终考虑实际操作的便利性得出香樟叶中黄酮类化合物的最佳提取条件为:通过单因素实验对香樟叶粉末的加入量、浸提温度、浸提时间以及溶液酸度进行探讨,得到最佳实验条件为:0.10 g的香樟叶粉末,浸提时间为3.70 h,浸提温度为82 °C,溶液酸度为9.60,最优条件下得到的黄酮最大提取率为10.62%,与预测值相符。响应面优化得到影响次序为:浸提时间>浸提温度>溶液酸度。响应面优化法得到的提取工艺科学合理,准确可靠。

参考文献

- [1] Feng R Z, Wang Q, Tong W Z, et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra* [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(12): 22328-22336
- [2] Lu W J, Lin K C, Liu C P, et al. Prevention of arterial thrombosis by nobiletin: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Nutritional Biochemistry*, 2016, 28(10): 1-8
- [3] 马霞,郭振环,刘永录,等.纳米蜂胶黄酮对猪细小病毒的体内抗病毒感染作用[J].*中国兽医学报*,2017,37(1):18-22,46
MA Xia, GUO Zhen-huan, LIU Yong-lu, et al. Anti-PPV activity of nanometer propolis flavone *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin. J. Vet. Sci.*, 2017, 37(1): 18-22, 46
- [4] Kasala E R, Bodduluru L N, Barua C C, et al. Chemopreventive effect of chrysin, a dietary flavone against benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice [J]. *Pharmacological Reports Pr*, 2016, 68(2): 310-318
- [5] Seddon K R. Ionic liquids for clean technology [J]. *Chem. Tech. Biotechnol.*, 1991, 68(7): 351-356
- [6] Wilkes J S, Zaworotko M J. Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquid [J]. *Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1992, 13(2): 965-967

- [7] Guowski K E, Broker G A, Willauer H D, et al. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125(22): 6632-6633
- [8] Capela E V, Quental M V, Domingues P, et al. Effective separation of aromatic and aliphatic amino acid mixtures using ionic-liquid-based aqueous biphasic systems [J]. *Green Chemistry*, 2017, 19(16): 1850-1854
- [9] Mondal D, Sharma M, Quental M, et al. Suitability of bio-based ionic liquids for the extraction and purification of IgG antibodies [J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(22): 6071-6081
- [10] 王伟涛,张海德,蒋志国,等. 离子液体双水相提取木瓜蛋白酶及条件优化[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 210-216
WANG Wei-tao, ZHANG Hai-de, JIANG Zhi-guo, et al. Extraction of papain by ionic liquid/aqueous two-phase system and optimization of process conditions [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(9): 210-216
- [11] Tan Z, Song S, Han J, et al. Optimization of partitioning process parameters of chloramphenicol in ionic liquid aqueous two-phase flotation using response surface methodology [J]. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2013, 10(3): 505-512
- [12] Pereira J F B, Vicente F, Santos-Ebinuma V C, et al. Extraction of tetracycline from fermentation broth using aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and cholinium-based salts [J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(4): 716-722
- [13] Santos J H, Ventura S P, Coutinho J A, et al. Ionic liquid-based aqueous biphasic system as a versatile tool for the recovery of antioxidant compounds [J]. *Biotechnology Progress*, 2015, 31(1): 70-77
- [14] Mafalda R A, Passos H, Pereira M M, et al. Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems [J]. *Separation and Purification Technology*, 2014, 128: 1-10
- [15] 范杰平,曹婧,孔涛,等. [Bmim]Br-K₂HPO₄ 双水相萃取与超声耦合法提取葛根中的葛根素及其优化[J]. 高校化学工程学报, 2011, 25(6): 955-960
FAN Jie-ping, CAO Jing, KONG Tao, et al. Optimization of ultrasonic-assisted [Bmim]Br-K₂HPO₄ aqueous two-phase system extraction of puerarin from pueraria [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2011, 25(6): 955-960
- [16] 彭芳刚,李绮丽,吴卫国. 响应面法优化红莲外皮原花青素的提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1349-1354
PENG Fang-gang, LI Qi-li, WU Wei-guo. Optimization of extraction of proanthocyanidins from skin of red locus seed using response surface methodology [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(6): 1349-1354
- [17] Xingli Liu, Taihua Mu, Hongnan Sun, et al. Optimization of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(6): 3034-3041