中图分类号：R932;R284.1;TQ460.6　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)01－0045－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.01.010

Box－Behnken 响应面法优选低共熔溶剂提取马蹄金总黄酮工艺

王志轩[1,2]，马　丽[1,2]，郭海平[2]，高　婧[1,2]，冯　超[2]，周维维[1,2△]

（1. 河北省燕山地区道地药材检验检测技术创新中心，河北 承德　067000；2. 河北省承德市食品药品检验检测中心，河北 承德　067000）

摘要：目的　优选低共熔溶剂提取马蹄金总黄酮的工艺。**方法**　以低共熔溶剂体系摩尔比、含水量、超声功率、超声时间为单因素变量，以马蹄金中黄酮类成分提取率为评价指标，采用 Box－Behnken 响应面法优选总黄酮提取工艺，并进行验证试验。**结果**　优选的提取工艺为低共熔溶剂氯化胆碱－乳酸（摩尔比 1∶2），含水量为 70%，超声（功率为 180 W）提取 30 min。验证试验结果显示，在此条件下的总黄酮提取率与回归模型预测值的相对误差为 0.55%。**结论**　该优选工艺操作简便、重复性好，可用于马蹄金总黄酮的提取。

关键词：Box－Behnken 响应面法；低共熔溶剂；马蹄金；总黄酮；提取工艺优选

Optimization of Deep Eutectic Solvents Extraction of Total Flavonoids from *Dichondra Repens* by Box－Behnken Response Surface Methodology

WANG Zhixuan[1,2], MA Li[1,2], GUO Haiping[2], GAO Jing[1,2], FENG Chao[2], ZHOU Weiwei[1,2]

(1. Hebei Yanshan District Genuine Medicinal Herbs Inspection and Testing Technology Innovation Center, Chengde, Hebei, China　067000; 2. Chengde Food and Drug Inspection and Testing Center, Chengde, Hebei, China　067000)

Abstract: Objective　To optimize the process of deep eutectic solvents extraction of total flavonoids from *Dichondra repens*. **Methods**　With the molar ratio, water content, ultrasound power, and ultrasound time of deep eutectic solvent system as single factor variables, and with the extraction rate of flavonoids in *Dichondra repens* as the evaluation index, the extraction process of the total flavonoid was optimized by the Box－Behnken response surface methodology, and the validation test was conducted. **Results**　The optimal extraction process was as follows: the deep eutectic solvent was choline chloride－lactic acid (molar ratio of 1∶2), with the water content of 70%, and ultrasonic extraction (power of 180 W) for 30 min. The validation test results showed that the relative error between the total flavonoid extraction rate under these conditions and the predicted value of the regression model was 0.55%. **Conclusion**　The optimal process is easy to operate and has good repeatability, which can be used for the extraction of total flavonoids from *Dichondra repens*.

Key words: Box－Behnken response surface methodology; deep eutectic solvents; *Dichondra repens*; total flavonoids; optimization of extraction process

马蹄金为旋花科植物马蹄金 *Dichondra repens* Forst. 属植物，主产于四川、贵州等地，是苗族常用植物药，全草入药，苗药名为“窝比赊溜”，具有清热活血、利湿解毒等功效，主治跌打损伤、黄疸、病毒性肝炎等症[1]。现代药理学研究表明，马蹄金中含有大量黄酮类、有机酸类等有效成分[2]，其中黄酮类成分具有抗氧化、抗肿瘤等药理学作用[3－4]。目前，多数采用有机溶剂提取黄酮类成分，但提取能耗大，效率低，有机溶剂污染严重[5－6]。因此，急需寻找新型提取溶剂及提取方法进行黄酮类成分提取。低共熔溶剂（DESs）是由 ABBOTT 等[7]首次提出的一种新型绿色溶剂，由一定的氢键受体（HBA）和氢键供体（HBD）组合而成，提取性能卓越，合成成本低廉，可回收利用，已应用于中药中多糖[8]、异黄酮[9]、多酚[10]等成分的提取，用于中药中有效成分提取的潜力巨大[11]。本研究中以苗药马蹄金为原料，通过合成不同类型的 DESs，采用单因素试验考察 DESs 体系摩尔比、含水量、超声功率、超声时间等因素对马蹄金总黄酮（FOD）提取率的影响，并在单因素试验的基础上以 FOD 提取率作为评价指标，采用 Box－Behnken 响应面法优选 DESs 的提取条件。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

KQ－500DB 型超声波提取仪（昆山市超声仪器有限公司，功率为 500 W，频率为 40 kHz）；MS105DU 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司，精度为 0.01 g）；200PLUS 型紫外分光光度计（德国耶拿分析仪器股份公司）；3K15 型离心机（德国 Sigma 公司）；ST－02A 型粉碎机（上海树立仪器仪表有限公司）；101－2B 型恒温干

第一作者：王志轩，男，硕士，高级食品药品工程师，研究方向为食品药品检验检测，（电子信箱）330392355@qq.com。
△**通信作者：**周维维，女，硕士，食品药品工程师，研究方向为食品药品检验检测，（电话）0314－4326915（电子信箱）zwww525@163.com。

燥箱(拓赫机电科技<上海>有限公司);HMS-901D型磁力搅拌器(深圳市博大精科生物科技有限公司)。

1.2 试药

马蹄金(河北省承德市双滦区神洲药业开发有限公司,批号为M230113),经承德医学院中药研究所潘海峰教授鉴定为正品;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100080-202012,含量为92.2%);氯化胆碱、乙二醇、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇、丙三醇、1,4-丁二醇、乳酸、尿素、*D*-葡萄糖、甲醇、乙醇(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 DESs制备

设计8组DESs,HBA选取氯化胆碱,分别与1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、乙二醇、1,3-丙二醇、丙三醇、乳酸、尿素、*D*-葡萄糖8种HBD按摩尔比1∶2混合,于80 ℃温度加热磁力搅拌条件下制备至溶液澄清、无浑浊,冷却至室温,即得醇基、酸基、胺基、糖基等8种DESs,备用。

2.2 溶液制备

取经40 ℃恒温干燥的马蹄金,粉碎,过65目筛,取粉末0.2 g,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,加入一定量的DESs,设定超声功率180 W和超声时间30 min,提取液在5 000 r/min的转速下离心5 min,分离上清液,即得FOD提取液。

取芦丁对照品适量,置120 ℃恒温烘箱内干燥至恒定质量,取43.40 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,加乙醇溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为0.8 mg/mL的芦丁对照品溶液。

2.3 FOD提取率的测定方法

采用$NaNO_2-Al(NO_3)_3$显色法测定FOD提取率[12]。取FOD提取液1.0 mL,置25 mL容量瓶中,加水至6.0 mL,分别加入1 mL 5%亚硝酸钠溶液及1 mL 10%硝酸铝溶液后各反应6 min,最后加入10 mL氢氧化钠试液,加水定容,室温反应15 min,于510 nm波长处测定吸光度,按公式$Y(\%)=10^{-3}CVD/M\times100\%$计算提取率。式中,*Y*为FOD的提取率,*C*为从标准曲线计算得到的样品质量浓度,*V*为定容体积,*D*为稀释倍数,*M*为取样量。同法制备不含FOD提取液的溶液,以此为空白进行校正。所有样品均平行测量3次。

2.4 标准曲线建立

精密量取2.2项下芦丁对照品溶液0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL,分别置25 mL容量瓶中,加水至6.0 mL,同法制备空白溶液,按2.3项下方法处理,于510 nm波长处测定吸光度,以芦丁对照品的质量浓度(*X*,mg/mL)为横坐标、吸光度(*Y*)为纵坐标进行线性回归,得回归方程$Y=13.081X+0.0088$($R^2=0.9999$,$n=6$)。结果表明,芦丁对照品的质量浓度在0.016~0.096 mg/mL范围内与吸光度线性关系良好。

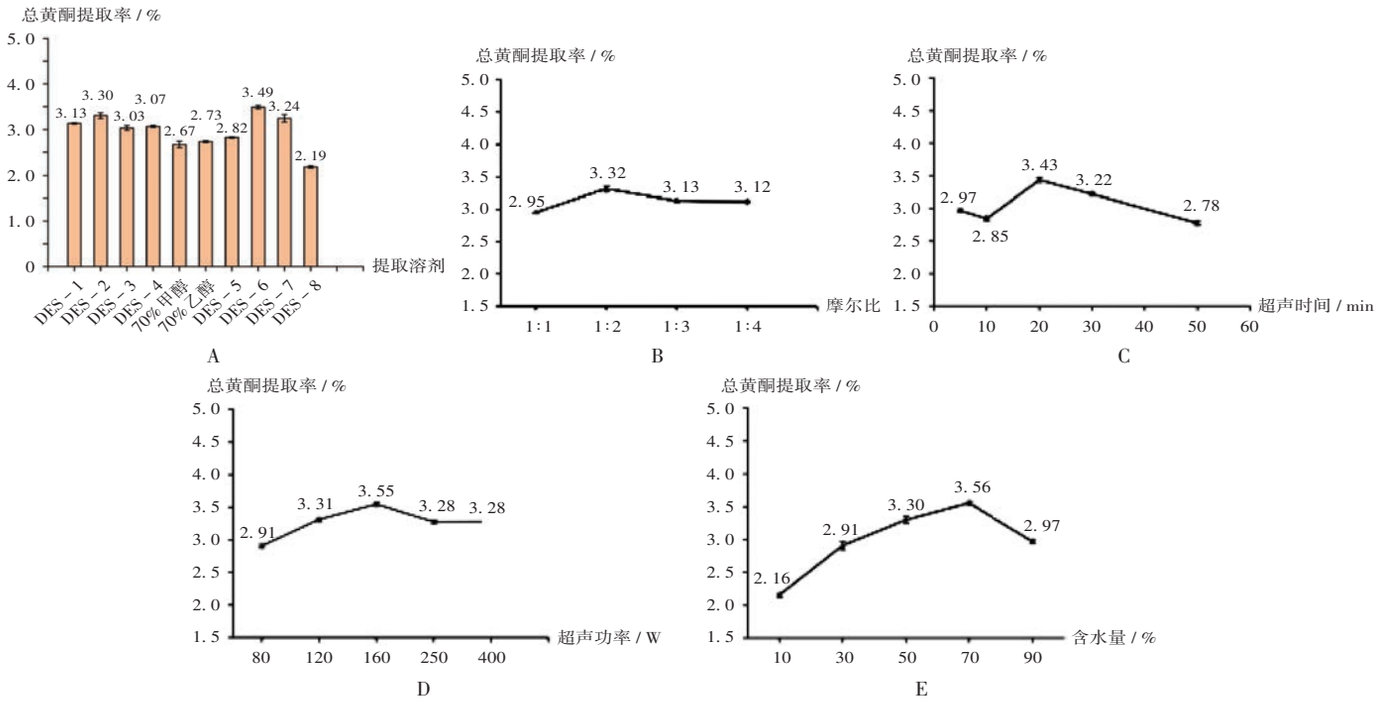
2.5 FOD提取率影响因素单因素考察

提取溶剂:溶剂的极性、表面张力、黏度等是目标化合物提取过程中的重要影响因素[13]。DESs的氢键网络可吸收外部电子或质子,与待提取的黄酮类化合物形成氢键,增加DESs的溶解度。同时,通过超声处理,黄酮类成分可更快溶出,升高FOD的提取率。本研究中考察了氯化胆碱-1,3-丁二醇(DES-1)、氯化胆碱-1,4-丁二醇(DES-2)、氯化胆碱-乙二醇(DES-3)、氯化胆碱-1,3-丙二醇(DES-4)、氯化胆碱-丙三醇(DES-5)、氯化胆碱-乳酸(DES-6)、氯化胆碱-尿素(DES-7)、氯化胆碱-*D*-葡萄糖(DES-8)及70%甲醇、70%乙醇对FOD提取率的影响,结果DES-6对FOD的提取率最高,故提取溶剂选择DES-6。详见图1 A。

摩尔比:取马蹄金粉末(过65目筛)0.2 g,精密称定,置锥形瓶中,在含水量30%、超声时间30 min、超声功率200 W的条件下,分别加入HBA-HBD摩尔比为1∶1、1∶2、1∶3、1∶4的DES-6 10 mL,按2.2项下方法制备FOD提取液,考察DESs体系的摩尔比对FOD提取率的影响。结果显示,随着HBA-HBD摩尔比的增加,FOD的提取率呈先升高后降低的趋势,故选择HBA-HBD的摩尔比为1∶2。详见图1 B。分析原因,HBA的极性相对较低,而酸性基团的极性相对较高,溶剂极性随体系酸性基团比例的增加而升高,黏度相应增加,虽有利于黄酮类物质的溶出,但影响黄酮类物质在系统中的扩散速率,导致提取率降低。

超声时间:取马蹄金粉末(过65目筛)0.2 g,精密称定,置锥形瓶中,在含水量30%、超声功率200 W的条件下,加入HBA-HBD摩尔比为1∶2的DES-6 10 mL,按2.2项下方法制备FOD提取液,考察超声时间(5,10,20,30,50 min)对FOD提取率的影响。结果显示,随着超声时间的增加,FOD的提取率呈先升高后降低的趋势,故选择超声时间为20 min。详见图1 C。分析原因,增加超声时间会产生更大能量,使马蹄金的细胞壁破碎,同时在提取液内也会产生空化效应,利于黄酮类物质的溶出,30 min内会升高FOD的提取率,但长时间超声会破坏已溶出黄酮类物质的结构[14],使FOD的提取率降低。

超声功率:取马蹄金粉末(过65目筛)0.2 g,精密称定,置锥形瓶中,在含水量30%、超声时间30 min的条件下,加入HBA-HBD摩尔比为1∶2的DES-6 10 mL,按2.2项下方法制备FOD提取液,考察超声功率(80,120,160,250,400 W)对FOD提取率的影响。结果显示,



A. 提取溶剂　B. 摩尔比　C. 超声时间　D. 超声功率　E. 含水量

图 1　单因素试验结果

A. Extraction solvent　B. Molar ratio　C. Ultrasonic time　D. Ultrasonic power　E. Water content

Fig. 1　Results of the single factor test

当超声功率为 80 ~ 160 W 时，FOD 的提取率随超声功率的增加而升高，之后略有降低，故超声功率选择 160 W。详见图 1 D。分析原因，提高超声功率可增加溶剂的扩散效率，进而提高解吸率，促进目标成分的溶出，但超声功率增加到一定程度时会发生饱和效应，破坏目标成分的结构，导致提取率降低[15]。

含水量：取马蹄金粉末（过 65 目筛）0. 2 g，精密称定，置锥形瓶中，在超声时间 30 min、超声功率 160 W 的条件下，加入 HBA － HBD 摩尔比为 1∶2 的 DES － 6 10 mL，按 2. 2 项下方法制备 FOD 提取液，考察含水量（10%，30%，50%，70%，90%）对 FOD 提取率的影响。结果显示，当含水量为 10% ~ 70% 时，FOD 的提取率随含水量的增加而升高，之后略有降低，故含水量选择 70%。详见图 1 E。分析原因，黄酮类物质的提取率随 DESs 体系含水量的增加而升高，但含水量的增加会导致分子间氢键断裂，使提取率降低[16]。

2. 6　Box － Behnken 响应面法优选提取工艺

试验设计与结果：以 DESs 体系含水量（因素 A）、超声功率（因素 B）和超声时间（因素 C）为自变量[17]，以 FOD 提取率为响应值，在三因素和三水平下进行试验，因素与水平见表 1。采用 Design － Expert 12 软件设计 17 组交叉试验，其中包括 12 组析因点试验和 5 组重复零点试验，试验设计与结果见表 2。

方差分析：对试验数据进行分析，得回归方程 Y = 3. 64 － 0. 084 0 A + 0. 021 0 B + 0. 056 2 C － 0. 089 6 AB + 0. 108 2 AC + 0. 027 7 BC － 0. 495 7 A^2 － 0. 045 6 B^2 － 0. 355 7 C^2。采用 SPSS 19. 0 统计学软件进行方差显著性分析，采用 Origin 9. 0 软件绘图，采用 GraphPad Prism 8 软件进行图形拟合。结果见表 3。可见，此模型的显著性检验 F 值为 49. 64，具有极显著性（$P_{模型}$ < 0. 000 1），失拟项不显著（P = 0. 172 9 > 0. 05），满足统计学要求；方程的决定系数 R^2 = 0. 984 6，模型的 Adj R^2 = 0. 964 7、Pre R^2 = 0. 825 1，表明以 FOD 提取率的变化建立的方程对试验的拟合程度较好，试验误差较小，该模型可用于分析和预测 FOD 的提取工艺。由 F 值可知，各因素对 FOD 提取率的影响程度由大至小为含水率（A）> 超声时间（C）> 超声功率（B），因素 A，B，C，AB，A^2，B^2，C^2 的影响极显著（P < 0. 01），因素 BC 的影响显著（P < 0. 05），因素 AC 的影响不显著（P > 0. 05），表明该模型可靠。

表 1　Box － Behnken 响应面法因素与水平

Tab. 1　Factors and levels of Box － Behnken response surface methodology

水平	因素 A（%）	因素 B（W）	因素 C（min）
－ 1	50	80	5
0	70	165	25
+ 1	90	250	45

响应面分析：响应面曲线由各种因素的相互作用而得到，通过观察图形曲面的倾斜度，可确定 2 个因素

对响应值的影响程度。坡度越陡，2 个因素间的相互作用越显著；曲面趋势平滑，2 个因素间的相互作用越不显著。采用 Design - Expert 12 软件进行响应面分析的结果见图 2。可见，随着超声功率的增加，FOD 提取率逐渐升高，功率为 170 W 时达最大值，然后趋于平缓；随着含水量的增加，FOD 提取率呈先升高后降低趋势，含水量为 68% 时达最大值；随着超声时间的增加，FOD 提取率呈先升高后降低趋势，超声 27 min 时达最大值。故最优提取工艺为含水量 68%，超声功率 170 W，超声时间 27 min。

验证试验：为操作简便，将最佳提取工艺修正为含水量 70%、超声功率 180 W、超声时间 30 min。在此条件

表 2　Box - Behnken 响应面法试验设计与结果

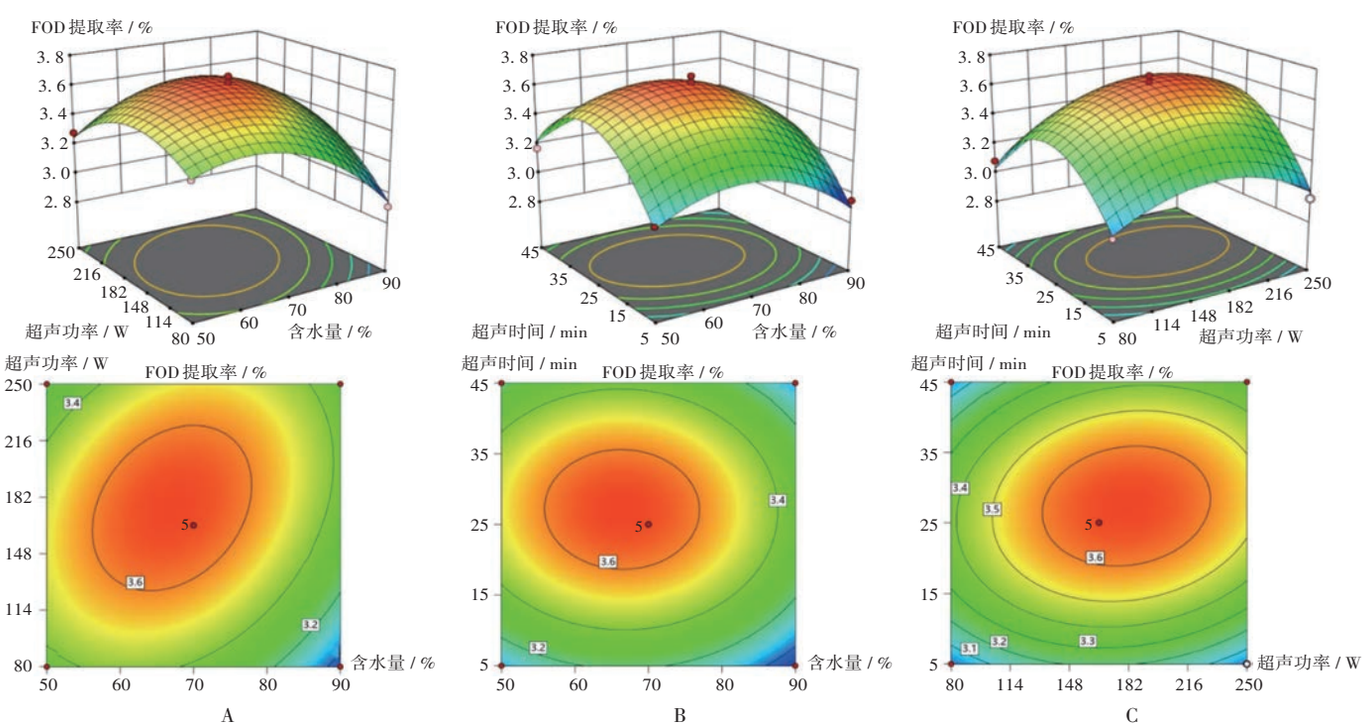
Tab. 2　Design and results of the Box - Behnken test

序号	因素 A	因素 B	因素 C	FOD 提取率(%)
1	- 1	- 1	0	3. 35
2	+ 1	- 1	0	2. 91
3	- 1	+ 1	0	3. 28
4	+ 1	+ 1	0	3. 32
5	- 1	0	- 1	3. 07
6	+ 1	0	- 1	2. 95
7	- 1	0	+ 1	3. 17
8	+ 1	0	+ 1	3. 02
9	0	- 1	- 1	2. 99
10	0	+ 1	- 1	2. 96
11	0	- 1	+ 1	3. 08
12	0	+ 1	+ 1	3. 31
13	0	0	0	3. 60
14	0	0	0	3. 64
15	0	0	0	3. 71
16	0	0	0	3. 65
17	0	0	0	3. 67

表 3　方差分析结果

Tab. 3　Results of the analysis of variance

方差来源	离差平方和	*df*	*MS*	*F* 值	*P* 值
模型	1. 29	9	0. 143 2	49. 64	< 0. 000 1
A	0. 056 1	1	0. 056 1	19. 45	0. 003 1
B	0. 036 5	1	0. 036 5	12. 63	0. 009 3
C	0. 046 5	1	0. 046 5	16. 12	0. 005 1
AB	0. 057 6	1	0. 057 6	19. 97	0. 002 9
AC	0. 000 2	1	0. 000 2	0. 078	0. 788 1
BC	0. 016 9	1	0. 016 9	5. 86	0. 046 1
A^2	0. 234 0	1	0. 234 0	81. 11	< 0. 000 1
B^2	0. 173 9	1	0. 173 9	60. 29	< 0. 000 1
C^2	0. 563 3	1	0. 563 3	195. 24	< 0. 000 1
残差	0. 020 2	7	0. 002 9		
失拟项	0. 013 7	3	0. 004 6	2. 8	0. 172 9
纯误差	0. 006 5	4	0. 001 6		
合计	1. 31	16			



A. 含水量与超声功率　B. 含水量与超声时间　C. 超声功率与超声时间

图 2　Box - Behnken 响应面法考察各因素两两交互作用对 FOD 提取率影响的三维图和二维图

A. Water content and ultrasonic power　B. Water content and ultrasonic time　C. Ultrasonic power and ultrasonic time

Fig. 2　Three dimensional and two - dimensional graphs of the effects of pairwise interactions of various factors on FOD extraction rate by the Box - Behnken response surface methodology

下进行5组平行试验，测得FOD提取率分别为3.67%，3.64%，3.64%，3.62%，3.65%，平均值为3.64%，与理论值3.66%的相对误差为0.55%，表明该模型可较好地反映FOD的提取条件。故FOD最终优选提取工艺：DESs为氯化胆碱－乳酸（摩尔比为1∶2），含水量为70%，超声功率为180 W，超声时间为30 min。

3 讨论

植物中黄酮类物质的提取一般采用有机溶剂提取法，溶剂多选择甲醇、乙醇、乙酸乙酯等，但有机溶剂毒性大、易挥发、不易降解、污染环境、溶剂残留，限制了黄酮提取物在医药、食品等领域中的应用[18]。DESs价廉无毒，操作简便，可回收重复再利用，广泛用于各类物质的提取。本研究中比较了70%甲醇、70%乙醇与DESs对FOD提取率的影响，发现除氯化胆碱－*D*－葡萄糖体系外，其余DESs较有机溶剂均能提升马蹄金中FOD的提取率，其中以氯化胆碱－乳酸提取效率最高。分析原因，氯化胆碱和乳酸能形成良好的氢键体系，还具备合适的黏度，利于黄酮类物质的溶出；且氯化胆碱－乳酸组成的DESs对马蹄金中的FOD提取率为3.49%，较70%甲醇高30.71%，70%乙醇高27.84%。可见，DESs提取法是一种较高效、环保的提取方法。

响应面法是利用多项式函数拟合设计空间，可通过较少的试验在局部范围内精确地逼近函数关系，并通过回归模型用简单的代数表达式展现出来，系统性和实用性强，适用广泛。提取过程中的超声功率、超声时间、体系含水量等因素也会对黄酮类物质的提取率造成较大影响，为进一步确定氯化胆碱－乳酸体系提取FOD的最优条件，采用Box－Behnken响应面法设计了17组交叉试验，建立了回归方程，并进行了模型拟合，最终确定最佳提取工艺为超声功率180 W，超声时间30 min，含水量70%。在此条件下，FOD提取率为3.64%，与回归模型预测值的相对误差为0.55%，表明该模型可靠。

综上所述，优选的FOD提取工艺操作简便、适用性高，为苗药马蹄金的开发和利用提供了高效、节能、安全的工艺方案。后续研究中将进一步分离纯化马蹄金中黄酮类物质，对各有效成分进行分离鉴定，为合理开发和深度加工提供参考。

参考文献

[1] 龙冬艳，袁涛忠，孙玉丽，等. 苗药马蹄金（vob bix seix niub）的应用[J]. 中国民族医药杂志，2020，26(5)：51－53.
[2] 屈相玲，梁光义. 苗药马蹄金的现代研究进展[J]. 贵阳中医学院学报，2007，29(4)：49－51.
[3] 郭胜男，张　莉，吴深涛，等. 典型黄酮类化合物改善胰岛素抵抗研究进展[J]. 西部中医药，2022，35(11)：144－148.
[4] 董梦依. 几种黄酮类化合物抗氧化、抗肿瘤活性研究及构效关系初探[D]. 南昌：南昌大学，2019.
[5] WANG G, CUI Q, YIN LJ, et al. Negative pressure cavitation based ultrasound－assisted extraction of main flavonoids from *Flos Sophorae Immaturus* and evaluation of its extraction kinetics[J]. Separation and Purification Technology, 2020, 244: 115805.
[6] 吴海莹，倪春林，王　磊. 植物中黄酮类化合物的提取方法及其应用[J]. 广州化工，2022，50(18)：23－25.
[7] ABBOTT AP, CAPPER G, DAVIES DL, et al. Novel solvent properties of choline chloride－urea mixtures[J]. Chem Commun (Camb), 2003(1): 70－71.
[8] ZHANG LJ, WANG MS. Optimization of deep eutectic solvent－based ultrasound－assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb. [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 95(2): 675－681.
[9] BAJKACZ S, ADAMEK J. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products[J]. Talanta, 2017, 168: 329－335.
[10] ZHANG X, ZHANG Q, XUE H, et al. A green and highly efficient method of extracting polyphenols from *Lilium davidii* var. *unicolor Salisb* using deep eutectic solvents[J]. Chemical Engineering Communications, 2022, 209(2): 271－280.
[11] 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.
[12] 王　娟，马春梅，王　丹. 低共熔溶剂协同超声波提取麦冬总黄酮的工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂，2023，34(3)：125－134.
[13] MA YQ, LIU MH, TAN T, et al. Deep eutectic solvents used as extraction solvent for the determination of flavonoids from *Camellia oleifera* flowers by high－performance liquid chromatography[J]. Phytochem Anal, 2018, 29(6): 639－648.
[14] 王　月，赵彦巧，李建颖. 超声辅助提取紫苏叶花色苷及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发，2022，43(4)：128－135.
[15] PATIL SS, PATHAK A, RATHOD VK. Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent based extraction: A greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma Longa*[J]. Ultrason. Sonochem, 2021, 70: 105267.
[16] 都宏霞，刘宴秀，严忠杰，等. 超声波辅助－绿色低共熔溶剂提取茉莉花黄酮的工艺优化[J]. 现代食品科技，2021，37(1)：199－206.
[17] FENG CH, GUO HL, ZHAO XJ, et al. Extraction, separation and kinetics of phenylethanosides from *Plantago asiatica* L. by an innovative extraction technology－deep eutectic solvent－based ultrasound－assisted extraction[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2023, 53(8): 978－987.
[18] 付佳乐，耿　直. 绿色低共熔溶剂提取黄酮类化合物的研究进展[J]. 化学与生物工程，2022，39(7)：8－12.

（收稿日期：2023－04－10；修回日期：2023－09－26）