

离子液体辅助植物乳杆菌发酵刺五加 制备异嗪皮啶工艺优化

金爽¹, 赵华勇^{1*}, 任裕斌¹, 彭彩亮³, 刘维丽²,
吕晨¹, 程玉鹏¹, 李慧玲¹

(1. 黑龙江中医药大学 药学院 北药基础与应用研究省部共建重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040;
2. 黑龙江中医药大学 实验实训中心, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑
龙江 哈尔滨 150036)

摘要: 为提升刺五加苷 B1 生物转化制备异嗪皮啶的产量, 以刺五加为原材料, 建立离子液体辅助发酵菌发酵体系, 优选发酵菌种和离子液体类型, 采用单因素实验和响应面实验优化异嗪皮啶的生物转化、超声提取工艺, 考察了 pH、液固比 (mL : g, 下同)、发酵温度、发酵时间和离子液体浓度对异嗪皮啶生物转化的影响, 探究了超声功率、液固比 (mL : g)、超声时间对异嗪皮啶超声提取的影响。结果表明, 优选发酵菌种和离子液体分别为植物乳杆菌和 1-丁基-3-甲基咪唑溴盐 ([C₄MIM]Br), 异嗪皮啶生物转化优化工艺条件为: pH=6.0、液固比为 25 : 1、发酵温度 36.5 °C、发酵时间 36 h、[C₄MIM]Br 浓度 0.57 mol/L, 在该条件下, 异嗪皮啶的产量为 0.257 mg/g; 异嗪皮啶超声提取优化工艺为: 甲醇体积分数 100%、超声功率 480 W、液固比 19 : 1、超声时间 39 min, 在该条件下, 异嗪皮啶的产量为 0.312 mg/g。

关键词: 刺五加; 异嗪皮啶; 离子液体; 生物转化; 超声提取; 中药现代化技术

中图分类号: TQ920.6; O645.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 11-2482-11

Optimization in ionic liquid-assisted fermentation of *Eleutherococcus senticosus* by *Lactobacillus plantarum* for preparation of isofraxidin

JIN Shuang¹, ZHAO Huayong^{1*}, REN Yubin¹, PENG Cailiang³, LIU Weili²,
LYU Chen¹, CHENG Yupeng¹, LI Huiling¹

(1. Key Laboratory of Basic and Applied Research of North Medicine, College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Experimental Training Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 3. The First Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150036, Heilongjiang, China)

Abstract: To promote the yield of isoquinoline from biotransformation of eleutheroside B1, an ionic liquid-assisted fermentation system was established using *Eleutherococcus senticosus* as raw material. The optimal fermentation strain and ionic liquid type were selected, with the biotransformation of isoquinoline and the ultrasonic extraction process optimized using single-factor experiments and response surface methodology. The effects of pH, liquid-to-solid ratio (mL : g, the same below), fermentation temperature, fermentation time, and ionic liquid concentration on the biotransformation of isoquinoline were evaluated, while the influence of ultrasonic power, liquid-to-solid ratio, and ultrasonic time on the ultrasonic extraction of isoquinoline was analyzed. The results showed that the optimal fermentation strain and ionic liquid were *Lactobacillus plantarum* and 1-butyl-3-methylimidazolium bromide ([C₄MIM]Br), respectively. Under the

收稿日期: 2024-10-09; 定用日期: 2024-11-21; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240769

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82204776); 黑龙江省“春雁”支持计划青年英才项目 (2022CYQN0028); 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目 (S202410228061); 黑龙江省博士后启动金项目 (LBH-Q21184); 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2023B021); 黑龙江省省属本科高校中央支持地方高校改革发展资金优秀青年人才项目 (2021ZYYQLG002); 黑龙江省教育厅基本业务项目 (2022PT04)

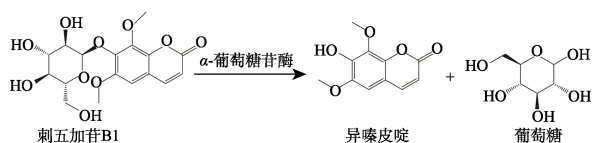
作者简介: 金爽 (1984—), 女, 副教授, E-mail: jinshuangzy@163.com. 联系人: 赵华勇 (2004—), 男, E-mail: zzhao9886@gmail.com.

optimum isoquinoline biotransformation process conditions of pH=6.0, liquid-to-solid ratio of 25 : 1, fermentation temperature 36.5 °C, fermentation time 36 h, and [C₄MIM]Br concentration 0.57 mol/L, the isoquinoline yield reached 0.257 mg/g. Under the optimum ultrasonic isoquinoline extraction conditions of methanol volume fraction 100%, ultrasonic power 480 W, liquid-to-solid ratio 19 : 1, and ultrasonic time 39 min, the isoquinoline yield was 0.312 mg/g.

Key words: *Acanthopanax senticosus*; isofraxidin; ionic liquids; biotransformation; ultrasonic extraction; modern technology of Chinese medicine

刺五加为五加科植物刺五加〔*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.〕的干燥根或茎, 又名五加参、刺拐棒, 作为传统中药材应用已久。刺五加活性成分主要有氨基酸类、微量元素、糖类、木脂素类、香豆素类、黄酮类等, 具有益气健脾、补肾安神的功效, 用于脾肺气虚、体虚乏力、食欲不振、心脾不足、失眠多梦等^[1]。现有刺五加的相关制剂以刺五加注射液与提取物为主^[2], 临床主要用于治疗肝肾不足所致的短暂性脑缺血疾病, 也用于治疗冠心病、心绞痛合并神经衰弱和更年期综合症等^[3]。刺五加作为东北地区的道地药材, 更有“寒地龙药之首”的美称^[4], 具有较高的产量。然而, 刺五加的天然异嗪皮啶含量较低, 长期以来, 其资源未能得到充分合理的开发与利用^[5]。

异嗪皮啶是一种存在于多种植物中的香豆素类化合物。高纯度的异嗪皮啶为白色结晶粉末, 易溶于甲醇、乙醇、氢氧化钠溶液, 难溶于冷水。异嗪皮啶作为中药刺五加的主要活性成分之一^[6], 具有镇静催眠^[7]、抗炎^[8]、抗氧化^[9]等功效, 但在刺五加中的含量很低, 大部分以结合的糖苷形式存在, 即刺五加苷 B1, 可通过 α -葡萄糖苷酶转化为异嗪皮啶, 如下所示。



为避免中药资源的浪费, 现阶段多采取酸碱水解法、生物转化法、多聚体转化法等方法转化合成异嗪皮啶。其中, 酸碱水解法的设备损耗大、反应剧烈, 对生态环境造成一定的损害; 生物转化法又可分为酶促转化法和微生物发酵转化法, 前者具有反应特异性强、条件温和、操作简便、环保安全等优点, 可定向转化中药原料, 提升目标产物的纯度和活性成分含量^[10]。然而, 由于酶的制备和纯化过程复杂且昂贵, 导致其成本较高。此外, 酶的活性和稳定性易受环境条件影响, 需精确控制, 且酶促转化法通常仅适用于特定底物, 处理复杂混合物的能力有限。相比之下, 微生物发酵转化法能够在更

宽松的条件下高效处理复杂混合物^[11]。通过微生物自繁殖提供所需酶类, 避免了昂贵的酶制备, 并且能够实现多步骤转化, 提高产物得率和生产效率, 适合大规模工业化生产。管立军等^[12]成功使用植物乳杆菌发酵提高了异嗪皮啶含量。然而, 微生物发酵也存在产物收率不稳定、转化效率受限等问题。离子液体 (IL) 在室温下以液体形式存在, 是由一种无机阴离子和有机阳离子或有机阴离子和有机阳离子组成的, 具有不对称取代基的有机盐类物质。离子液体具有蒸汽压不显著、热稳定性好^[13]、理化性质可调、毒性作用低甚至无毒等优良特性^[14], 可作为传统挥发性有机溶剂的优良替代品, 作为催化剂辅助酶促反应和全细胞生物转化^[15-16]。离子液体通过增强微生物对底物的利用率, 提高发酵效率, 缩短生产时间, 从而有效弥补传统发酵法的缺陷。洪立伟等^[17]研究表明, 离子液体可以显著改善微生物的生物转化, 保证酶良好的活性, 增强酶的稳定性, 使底物和酶充分接触, 解除底物竞争抑制, 大幅提高产物的收率。

本文拟以刺五加为原料, 通过离子液体辅助发酵菌进行生物转化, 优化刺五加的最佳生物转化条件, 考察离子液体辅助发酵菌转化过程中异嗪皮啶含量的变化, 提升其产量, 以期异嗪皮啶的规模化生产和食品工业应用提供可行策略。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* CICC20767)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus* CICC6082)、干酪乳杆菌 (*Lactocaseibacillus paracasei* CICC20280)、乳酸杆菌 (*Levilactobacillus brevis* CICC23470), 黑龙江微生物研究所提供; 刺五加, 产地黑龙江, 黑龙江哈尔滨同仁堂提供。

MRS 培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; 乙腈、甲醇、磷酸, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 1-乙基-3-甲基咪唑氯盐 ([C₂MIM]Cl)、1-乙基-3-甲基咪唑碘盐 ([C₂MIM]I)、1-乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ([C₂MIM]BF₄)、1-乙基-3-甲基咪唑

硫酸氢盐 ($[\text{C}_2\text{MIM}]\text{HSO}_4^-$)、1-乙基-3-甲基咪唑溴盐 ($[\text{C}_2\text{MIM}]\text{Br}$)、1-丁基-3-甲基咪唑溴盐 ($[\text{C}_4\text{MIM}]\text{Br}$)、1-己基-3-甲基咪唑溴盐 ($[\text{C}_6\text{MIM}]\text{Br}$)、1-辛基-3-甲基咪唑溴盐 ($[\text{C}_8\text{MIM}]\text{Br}$)，上海成捷化学有限公司。

H2Q-F100 型振荡培养箱，哈尔滨市东联电子技术开发有限公司；2500Y 型中药粉碎机，天津市泰斯特仪器有限公司；Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (HPLC)，美国 Agilent 公司；PB-21 型 pH 计，美国 Sartorius 公司；Milli-Q 型超纯水系统，美国 Millipore 公司；HVE-50 型自动电热压力蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂。

1.2 方法

1.2.1 异嗪皮啶的生物转化

将刺五加粉碎后烘干，过筛 (65 目)，得到刺五加粉末，经灭菌处理 (121 °C，20 min) 后，置于 4 °C 冰箱中保存备用。将刺五加粉末 1.000 g 加入到含有 0.4 mol/L 离子液体的 MRS 培养基的锥形瓶中，消毒杀菌。然后，在 MRS 培养基内活化好的菌中加入一定量的无菌水，制成 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液。最后，将 500 μL 细菌悬液加入到锥形瓶中，在 36 °C、130 r/min 的条件下振荡培养 24 h，进行发酵。

1.2.2 异嗪皮啶的超声提取

取发酵 24 h 后的发酵产物，置于自动电热压力蒸汽灭菌器中高温 (121 °C)、高压 (0.12 MPa) 灭菌 20 min，待自然冷却后，放入 90 °C 恒温烘箱，干燥 48 h。待完全干燥后，以体积分数 80% 的甲醇水溶液为提取溶剂，超声提取 30 min，减压抽滤，过 0.22 μm 滤膜，得到异嗪皮啶提取原液。

1.2.3 异嗪皮啶含量的测定

采用 HPLC 测定异嗪皮啶提取原液中异嗪皮啶的含量。采用 HPLC，Positasil[®] ODS-P 120A 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm \times 5 μm)，检测波长为 343 nm，流动相为体积比 20 : 80 的乙腈/质量分数 0.1% 磷酸溶液，柱温 25 °C，流速 1 mL/min^[18]。

称取异嗪皮啶，用甲醇定容，制成质量浓度为 1 g/L 溶液，稀释得到不同质量浓度的溶液。过 0.22 μm 滤膜后保存在 1.5 mL 瓶中，平行进样 3 次，测定峰面积，以异嗪皮啶的质量浓度 (x , g/L) 为横坐标、峰面积 (y) 为纵坐标，建立线性回归方程，得到标准曲线的方程为： $y=17123x+0.7136$ ， $R^2=0.9998$ 。

1.3 发酵菌种和离子液体的筛选

1.3.1 发酵菌种

采用 1.2.2 节实验方法，考察嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、乳酸杆菌发酵刺五加转化制备异嗪皮啶产量的差异，优选异嗪皮啶产量最高的

发酵菌种。按照式 (1) 计算异嗪皮啶产量：

$$Y=\rho V/m \quad (1)$$

式中： Y 为异嗪皮啶产量，mg/g； ρ 为提取原液中异嗪皮啶质量浓度，g/L； V 为提取原液体积，mL； m 为投入刺五加质量，g。

1.3.2 离子液体

在优选发酵菌种的基础上，采用 1.2.2 节实验方法，考察 1-乙基-3-甲基咪唑 (C_2MIM^+) 分别与 5 种不同阴离子 (Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 BF_4^- 、 HSO_4^-) 制备的离子液体对刺五加转化制备异嗪皮啶产量的差异，优选制备离子液体最佳的阴离子类型。

在优选制备离子液体最佳的阴离子类型的基础上，采用 1.2.2 节实验方法，考察系列 1-烷基-3-甲基咪唑阳离子 (C_2MIM^+ 、 C_4MIM^+ 、 C_6MIM^+ 和 C_8MIM^+) 制备的离子液体对刺五加转化制备异嗪皮啶产量的差异，优选制备离子液体最佳的阳离子类型。

1.4 异嗪皮啶生物转化制备单因素实验

1.4.1 pH 的影响

采用移液枪取 500 μL 冲洗后的细菌悬液，加入到含 5 g 无菌刺五加根粉和 150 mL 含有 0.6 mol/L 离子液体的 MRS 培养基的 200 mL 锥形瓶中，保持液固比 (mL : g，下同) 30 : 1，以质量分数 10% 盐酸或 1 mol/L 氢氧化钠水溶液调节 pH (4.5、5.0、5.5、6.0、6.5)，在 36 °C、130 r/min 的条件下振荡培养 24 h，进行生物转化，考察不同 pH 对异嗪皮啶产量的影响。

1.4.2 液固比的影响

采用移液枪取 500 μL 冲洗后的细菌悬液，加入到含 5 g 无菌刺五加根粉的 200 mL 锥形瓶中，调节 pH=6.0，加入不同体积含有 0.6 mol/L 离子液体的 MRS 培养基，使液固比 (10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1)，在 36 °C、130 r/min 的条件下振荡培养 24 h，进行生物转化，考察不同的液固比对异嗪皮啶产量的影响。

1.4.3 发酵时间的影响

采用移液枪取 500 μL 冲洗后的细菌悬液，加入到含 5 g 无菌刺五加根粉和 150 mL 含有 0.6 mol/L 离子液体的 MRS 培养基的 200 mL 锥形瓶中，保持液固比 30 : 1、pH=6.0，在 36 °C、130 r/min 的条件下振荡培养不同时间 (12、24、36、48、60 h)，进行生物转化，考察不同发酵时间对异嗪皮啶产量的影响。

1.4.4 发酵温度的影响

采用移液枪取 500 μL 冲洗后的细菌悬液，加入到含 5 g 无菌刺五加根粉和 150 mL 含有 0.6 mol/L 离子液体的 MRS 培养基的 200 mL 锥形瓶中，保持

pH=6.0, 调节反应温度 (35、36、37、38、39 °C), 在 130 r/min 的条件下振荡培养 24 h, 进行生物转化, 考察不同发酵温度对异嗪皮啶产量的影响。

1.4.5 离子液体浓度的影响

采用移液枪取 500 μ L 冲洗后的细菌悬液, 加入到含 5 g 无菌刺五加根粉和 150 mL 含有不同浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L) 的离子液体的 MRS 培养基的 200 mL 锥形瓶中, 在 pH=6.0、36 °C、130 r/min 的条件下振荡培养 24 h, 进行生物转化, 考察离子液体不同浓度对异嗪皮啶产量的影响。

1.5 异嗪皮啶生物转化制备响应面实验

根据单因素实验结果, 按照 Box-Behnken Design (BBD) 原理设计响应面实验, 以 pH (A)、发酵温度 (B)、离子液体浓度 (C) 为自变量, 以异嗪皮啶产量为响应值, 对 3 个因素分别设置 3 个水平, 用 “-1、0、+1” 表示, pH、发酵温度、离子液体浓度根据单因素研究结果中心点取值。

1.6 异嗪皮啶超声提取单因素实验

取发酵 24 h 后的发酵产物, 置于高压灭菌锅中高温 (121 °C)、高压 (0.12 MPa) 灭菌 20 min, 待自然冷却后, 放入 90 °C 恒温烘箱, 干燥 48 h, 得干燥固形物, 记为异嗪皮啶粗品。

1.6.1 甲醇浓度的影响

取异嗪皮啶粗品 1 g, 保持液固比 (mL : g) 25 : 1, 分别以不同体积分数 (60%、70%、80%、90%、100%) 的甲醇水溶液为提取溶剂, 在超声温度 50 °C 的条件下, 400 W 超声提取 30 min, 减压抽滤, 过 0.22 μ m 滤膜, 得到异嗪皮啶提取原液。

1.6.2 超声功率的影响

取异嗪皮啶粗品 1 g, 保持液固比 25 : 1, 以体积分数 80% 的甲醇水溶液为提取溶剂, 在超声温度 50 °C 的条件下, 不同超声功率 (200、300、400、500、600 W) 超声提取 30 min, 减压抽滤, 过 0.22 μ m 滤膜, 得到异嗪皮啶提取原液。

1.6.3 液固比的影响

取异嗪皮啶粗品 1 g, 以体积分数 80% 的甲醇水溶液为提取溶剂, 使成不同液固比 (5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1), 在超声温度 50 °C 的条件下, 400 W 超声提取 30 min, 减压抽滤, 过 0.22 μ m 滤膜, 得到异嗪皮啶提取原液。

1.6.4 超声时间的影响

取异嗪皮啶粗品 1 g, 以体积分数 80% 的甲醇水溶液为提取溶剂, 在液固比为 20 : 1、超声温度 50 °C 的条件下, 400 W 超声提取 (20、30、40、50、60 min), 减压抽滤, 过 0.22 μ m 滤膜, 得到异嗪皮啶提取原液。

1.7 异嗪皮啶超声提取响应面实验

根据单因素实验结果, 按照 Box-Behnken Design (BBD) 原理设计响应面实验, 以超声功率 (A)、液固比 (B)、超声时间 (C) 为自变量, 以异嗪皮啶的提取量为响应值。对 3 个因素分别设置 3 个水平, 用 -1、0、+1 表示, 超声功率、液固比、超声时间根据单因素研究结果中心点取值。

1.8 数据处理

数据进行统计分析, 每组实验至少独立重复 3 次。结果以 “算数平均值 \pm 标准差” 形式表示, 统计学显著性为 $P < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 发酵菌种的筛选

图 1 为发酵菌种对异嗪皮啶产量的影响。

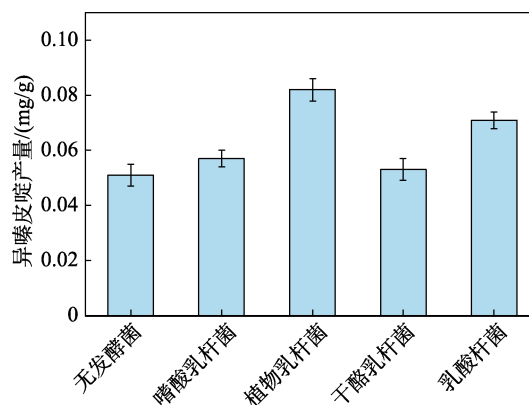


图 1 发酵菌种对异嗪皮啶产量的影响

Fig. 1 Effect of fermentation strains on yield of isofraxidin

从图 1 可以看出, 植物乳杆菌的发酵效果最佳, 异嗪皮啶产量达到 0.092 mg/g, 是无发酵菌条件下异嗪皮啶产量 (0.051 mg/g) 的 1.8 倍。相比之下, 嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌在相同条件下的发酵效果较差。可能的原因是, 植物乳杆菌所含的复杂酶系中富含 α -葡萄糖苷酶^[19], 这种关键酶能显著提高刺五加苷 B1 生物转化制备异嗪皮啶的效率。因此, 优选植物乳杆菌为最佳发酵菌种。

2.2 离子液体种类的筛选

图 2a 为不同阴离子组成的 1-乙基-3-甲基咪唑离子液体对异嗪皮啶产量的影响。

从图 2a 可以看出, 不同阴离子类型的 1-乙基-3-甲基咪唑离子液体的异嗪皮啶产量具有显著差异。其中, Br^- 为阴离子的离子液体 $[\text{C}_2\text{MIM}]\text{Br}$, 其异嗪皮啶产量 (0.101 mg/g) 显著高于其他阴离子 (Cl^- 、 I^- 、 BF_4^- 、 HSO_4^-) 的离子液体。 $[\text{C}_2\text{MIM}]\text{I}$ 效果较差的原因可能在于 I^- 具有较强的氧化性, 导致离子液体具有毒性; 而 $[\text{C}_2\text{MIM}]\text{BF}_4$ 低效可能与其在生物转化过程

中生成 HF, 导致发酵菌群失活有关^[20]。而[C₂MIM]Br 与化合物之间存在更强的多重相互作用, 包括 π - π 相互作用、离子/电荷相互作用以及氢键作用^[21]。

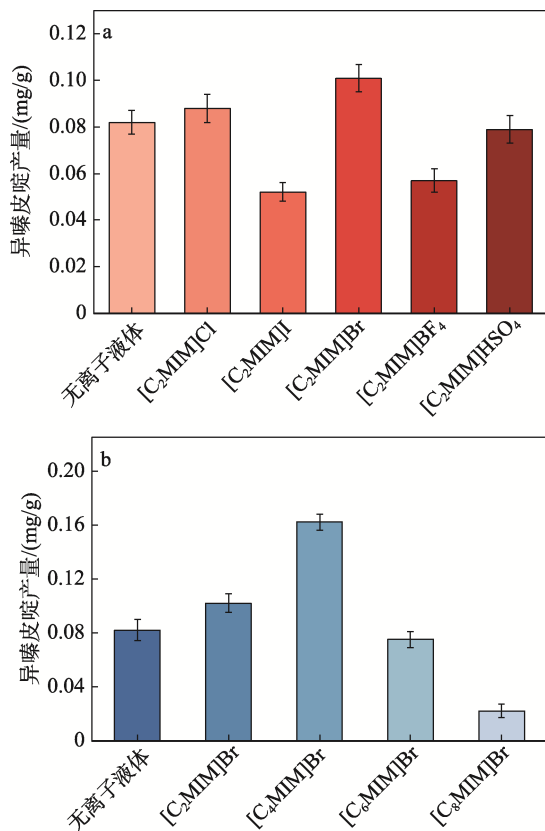


图 2 不同阴离子 (a) 和阳离子 (b) 的离子液体对异嗪皮啶产量的影响
Fig. 2 Effects of ionic liquids with different anions (a) and cations (b) on yield of isofraxidin

图 2b 为不同阳离子组成的 1-烷基-3-甲基咪唑离子液体对异嗪皮啶产量的影响。

从图 2b 可以看出, 随着烷基链长的增加, 异嗪皮啶产量先增加后减小。离子液体[C₄MIM]Br 的异嗪皮啶产量最高, 为 0.162 mg/g。这是因为, 与具有更长烷基链的离子液体[C₆MIM]Br 和[C₈MIM]Br 相比, [C₄MIM]Br 对植物乳杆菌的影响相对温和。RANKE 等^[22]研究表明, 烷基链长与离子液体的毒性呈正相关, 可能的机理是离子液体对发酵菌种具有静电吸附作用, 烷基链部分插入细胞膜中, 破坏细胞质的稳定性。因此, 优选[C₄MIM]Br 为最佳离子液体。

2.3 异嗪皮啶生物转化制备单因素实验分析

2.3.1 pH 的影响

图 3a 为 pH 对异嗪皮啶产量的影响。

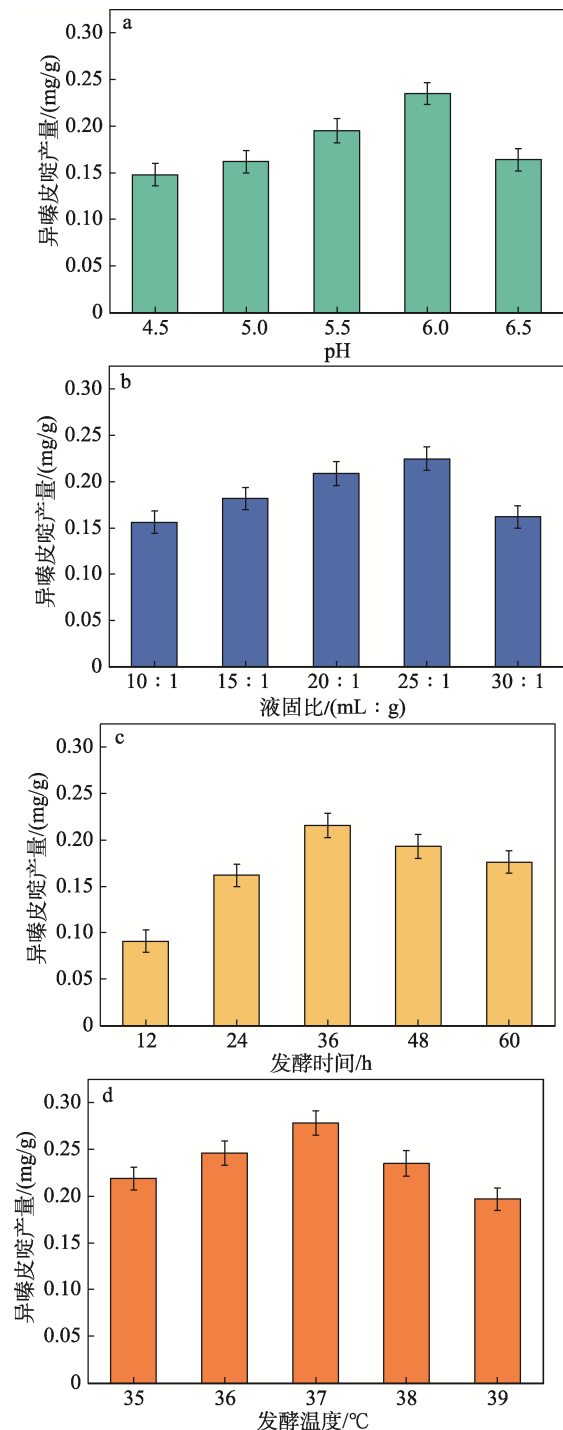
从图 3a 可以看出, 随着 pH 的增加, 异嗪皮啶产量呈先增加后减小的趋势。当 pH=6.0 时, 异嗪皮啶产量最大, 为 0.235 mg/g。这是因为, pH 较低或较高时, 酸碱性会抑制酶的活性及改变酶的构象,

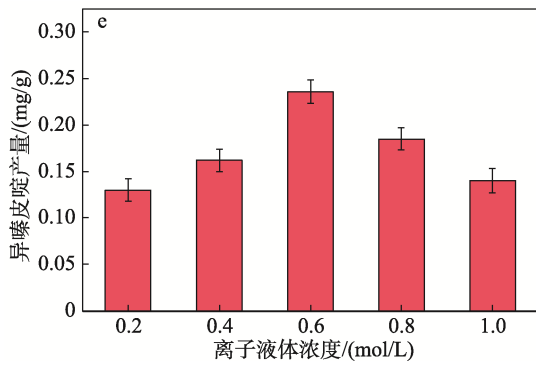
进而影响植物乳杆菌活力^[23], 降低异嗪皮啶产量。因此, 优选最佳 pH=6.0。

2.3.2 液固比的影响

图 3b 为液固比对异嗪皮啶产量的影响。

从图 3b 可以看出, 随着液固比的增加, 异嗪皮啶产量呈先增加后减小的趋势。当液固比为 25 : 1 时, 异嗪皮啶产量最大, 为 0.225 mg/g。这是因为, 离子液体用量的增加可以为菌株提供足够的氧气, 产生更多的酶促进发酵。但过高的液固比会导致底物相对浓度下降, 抑制反应进程。因此, 优选最佳液固比为 25 : 1。





a—pH; b—液固比; c—发酵时间; d—发酵温度; e—离子液体浓度

图 3 不同因素对异嗪皮啶生物转化的影响

Fig. 3 Effects of different factors on biotransformation of isofraxidin

2.3.3 发酵时间的影响

图 3c 为发酵时间对异嗪皮啶产量的影响。

从图 3c 可以看出,随着发酵时间的增加,异嗪皮啶产量呈先增加后减小的趋势。当发酵时间为 36 h 时,异嗪皮啶产量最高,为 0.216 mg/g。可能因为,前期充足底物增加了苷元转化速率,后期菌株中复杂酶系流出导致异嗪皮啶分解,产量降低。因此,优选最佳发酵时间为 36 h。

2.3.4 发酵温度的影响

图 3d 为发酵温度对异嗪皮啶产量的影响。

从图 3d 可以看出,随着发酵温度的升高,异嗪皮啶产量呈先增加后减小的趋势。当发酵温度为 37 °C 时,异嗪皮啶产量最大,为 0.278 mg/g。这是因为,在酶的适宜温度内提高温度,会提升生物转化效率,若超出适宜温度继续提高温度,会抑制酶的活性。因此,优选最佳发酵温度为 37 °C。

2.3.5 离子液体浓度的影响

图 3e 为离子液体[C₄MIM]Br 浓度对异嗪皮啶产量的影响。

从图 3e 可以看出,随着[C₄MIM]Br 浓度的增加,异嗪皮啶产量呈先增加后减小的趋势。当 [C₄MIM]Br 浓度为 0.6 mol/L 时,异嗪皮啶产量最大,为 0.236 mg/g。这是因为,当离子液体浓度过低时,会对无需生物酶催化协助的化学水解反应速率造成影响,当离子浓度过高时,会降低传质速率,降低生物转化效率。因此,优选[C₄MIM]Br 浓度为 0.6 mol/L。

2.4 异嗪皮啶生物转化制备响应面实验

2.4.1 响应面实验结果

采用 Design Expert 13.0 软件对表 1 中的数据进行二项式拟合,并对模型进行方差分析,得到二项式拟合方程为 $Y=0.2548+0.0016A-0.0091B-0.0108C+0.0002AB+0.0110BC-0.0358A^2-0.0163B^2-0.0505C^2$ ($P<0.01$, $R^2=0.9955$)。

表 1 响应面实验编码值与实际值对照

Table 1 Response surface experiment coded values vs. actual values

序号	编码值			实际值			Y/ (mg/g)
	A	B	C	pH	发酵 温度/°C	离子液体浓 度/ (mol/L)	
1	-1	0	1	5.5	37	0.8	0.156
2	0	1	-1	6.0	38	0.4	0.179
3	0	0	0	6.0	37	0.6	0.249
4	0	-1	1	6.0	36	0.8	0.175
5	1	0	1	6.5	37	0.8	0.159
6	-1	0	-1	5.5	37	0.4	0.178
7	0	0	0	6.0	37	0.6	0.261
8	-1	1	0	5.5	38	0.6	0.191
9	-1	-1	0	5.5	36	0.6	0.211
10	1	1	0	6.5	38	0.6	0.195
11	0	-1	-1	6.0	36	0.4	0.218
12	1	-1	0	6.5	36	0.6	0.214
13	1	0	-1	6.5	37	0.4	0.181
14	0	0	0	6.0	37	0.6	0.258
15	0	0	0	6.0	37	0.6	0.254
16	0	0	0	6.0	37	0.6	0.252
17	0	1	1	6.0	38	0.8	0.180

2.4.2 模型拟合与方差分析

方差分析结果如表 2 所示。从二次多项式拟合结果来看,模型 $P<0.01$,表明该拟合模型具有极显著性,失拟项 $P>0.05$,模型相关系数 $R^2=0.9955$,说明二次多项式方程模型对数据拟合度较高,误差小,模型可靠,可作为异嗪皮啶生物转化制备工艺的分析测试模型。一次项 A (pH) 影响不显著, B (发酵温度)、C (离子液体浓度) 影响极显著,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 影响极显著,由此可知,各影响因素与异嗪皮啶产量之间并不是简单的线性关系。

表 2 方差分析结果

Table 2 Results of variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	显著性
模型	0.0210	9	0.0023	172.43	<0.0001	**
A pH	0	1	0	1.56	0.2513	○
B 发酵温度	0.0007	1	0.0007	49.32	0.0002	**
C 离子液体浓度	0.0009	1	0.0009	68.45	<0.0001	**
AB	0	1	0	0.02	0.8956	○
AC	0	1	0	0	1.0000	○
BC	0.0005	1	0.0005	35.83	0.0005	**
A^2	0.0054	1	0.0054	398.96	<0.0001	**
B^2	0.0011	1	0.0011	82.57	<0.0001	**
C^2	0.0107	1	0.0107	795.77	<0.0001	**
残差	0.0001	7	0			—
失拟项	0	3	0	0.06	0.9807	○
纯误差	0.0001	4	0			—
总和	0.0211	16				—

注: “**”表示差异极显著 ($P<0.01$); “*”表示差异显著 ($P<0.05$); “○”表示差异不显著 ($P>0.05$)。下同。

2.4.3 响应面分析

采用 Design Expert 13.0 软件绘制异嗪皮啶产量、pH、发酵温度、离子液体浓度之间的三维曲面图，结果如图 4~6 所示。

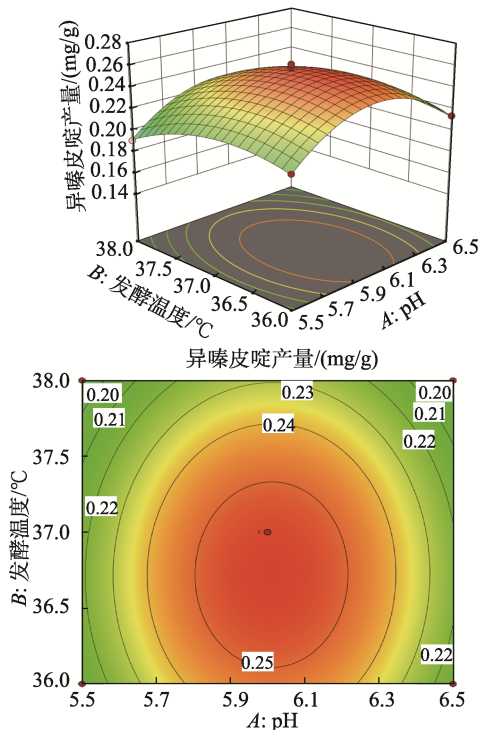


图 4 pH、发酵温度对异嗪皮啶产量的响应曲面及等高线图
Fig. 4 Response surface and contour plot of pH and fermentation temperature on yield of isofraxidin

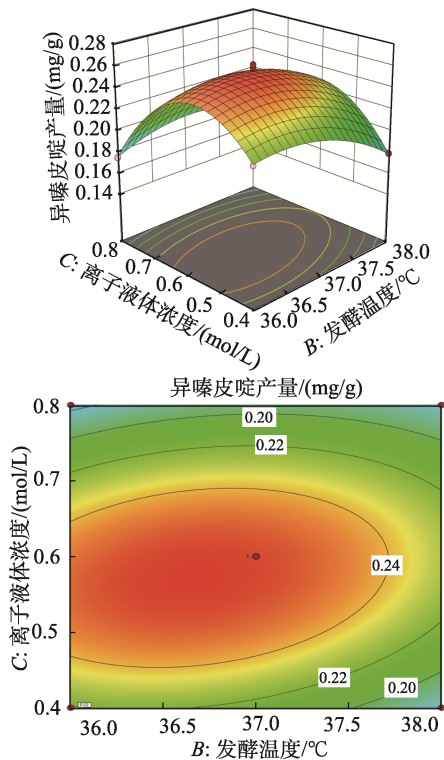


图 5 发酵温度、离子液体浓度对异嗪皮啶产量的响应曲面及等高线图
Fig. 5 Response surface and contour plot of fermentation temperature and ionic liquid concentration on yield of isofraxidin

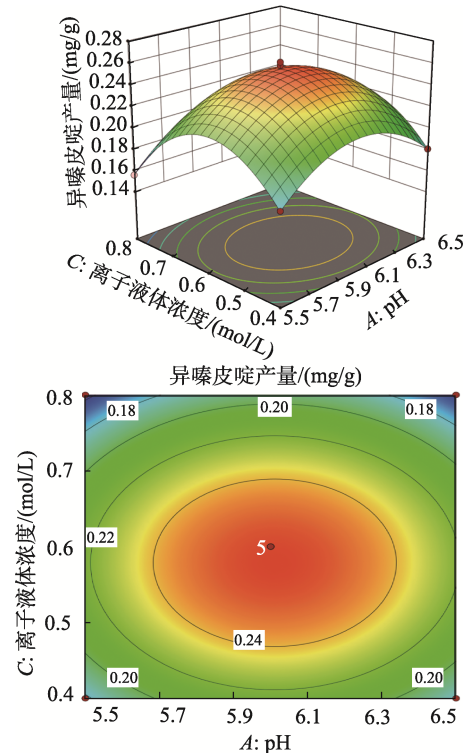


图 6 pH、离子液体浓度对异嗪皮啶产量的响应曲面及等高线图

Fig. 6 Response surface and contour plot of pH and ionic liquid concentration on yield of isofraxidin

由响应面图可得到优化条件为：pH=6.01、发酵温度 36.67 °C、离子液体浓度 0.57 mol/L。

2.4.4 工艺验证结果

根据 Design Expert 13.0 软件分析得到的优化条件 pH=6.0、发酵温度 36.5 °C、离子液体浓度 0.57 mol/L 进行验证实验，结果如表 3 所示。从表 3 可以看出，异嗪皮啶产量为 0.257 mg/g，与预测值之间的偏差为-0.20%，实验结果与预测值接近，说明该模型可靠，该优化条件是可行的。

表 3 工艺验证结果

Table 3 Verification test results

	实验次数			平均值	预测值
	1	2	3		
Y/(mg/g)	0.254	0.259	0.258	0.257	0.263
偏差/%	-0.35	-0.10	-0.15		

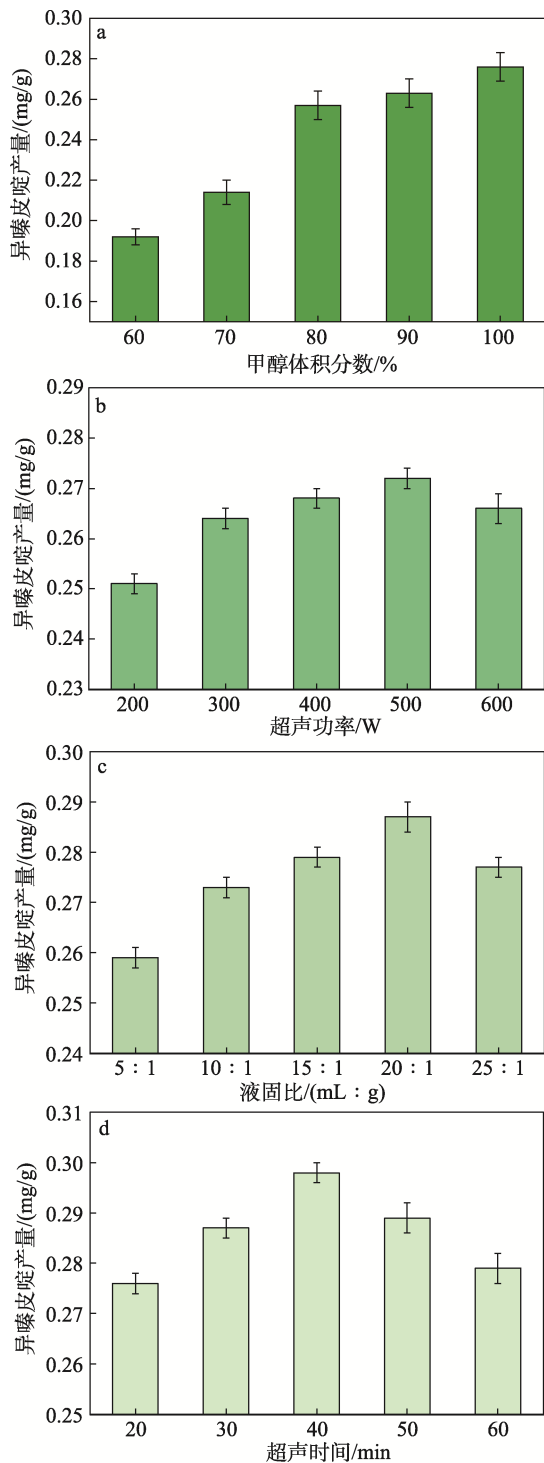
2.5 异嗪皮啶超声提取单因素实验

图 7 为不同超声提取条件对异嗪皮啶产量的影响。

2.5.1 提取剂体积分数的影响

图 7a 为甲醇体积分数对异嗪皮啶产量的影响。

从图 7a 可以看出，随着甲醇体积分数的增加，异嗪皮啶产量呈不断增加的趋势，甲醇体积分数为 100% 时提取效果达到最佳，异嗪皮啶产量为 0.276 mg/g，可能的原因是受异嗪皮啶溶解度的限制，在非极性溶剂中异嗪皮啶具有更高的溶解度。因此，最佳甲醇体积分数为 100%。



a—甲醇体积分数; b—超声功率; c—液固比; d—超声时间
图 7 不同超声提取条件对异嗪皮啶产量的影响

Fig. 7 Effect of different ultrasonic extraction conditions on yield of isofraxidin

2.5.2 超声功率的影响

图 7b 为超声功率对异嗪皮啶产量的影响。

从图 7b 可以看出,随着超声功率的增加,异嗪皮啶产量呈先增加后降低的趋势,当超声功率在 500 W 时,异嗪皮啶产量达到最大,为 0.272 mg/g。超声功率过低时,空化效应较弱,不利于提取的进行;超声功率过高时,气泡形成数量较多,并合成更大

的气泡,而大气泡内爆强度弱导致削弱超声效果影响提取效率^[24]。因此,最佳超声功率 500 W。

2.5.3 液固比的影响

图 7c 为液固比对异嗪皮啶产量的影响。

从图 7c 可以看出,随着液固比的增加,异嗪皮啶产量呈先增加后降低的趋势,当液固比为 20 : 1 时,异嗪皮啶产量达到最大,为 0.287 mg/g。随着液固比的增加,提取效率显著提高,但液固比进一步增加,异嗪皮啶的产量略有下降。当液固比增大时,超声空化的作用导致空化阈值降低,影响了溶剂系统中的声波传播^[25-26],从而导致异嗪皮啶提取效果下降。因此,最佳液固比为 20 : 1。

2.5.4 超声时间的影响

图 7d 为超声时间对异嗪皮啶产量的影响。

从图 7d 可以看出,随着超声时间的增加,异嗪皮啶产量呈先增加后降低的趋势,在提取时间 20~40 min 时间梯度内,异嗪皮啶产量增至 0.298 mg/g,但在 50~60 min 的时间梯度下,产量趋于稳定并略有下降,这可能由于到达一定时期后,异嗪皮啶在溶液中达到平衡^[27],导致产量不再提高。因此,最佳超声时间 40 min。

2.6 异嗪皮啶提取响应面实验

2.6.1 响应面实验结果

采用 Design Expert 13.0 软件对表 4 中的数据进行二项式拟合,并对模型进行方差分析,得到二项式拟合方程为 $Y=0.3122-0.0023A-0.0034B-0.0016C+0.0003AB+0.0008AC+0.0005BC-0.0071A^2-0.0129B^2-0.0089C^2$ ($P<0.01$, $R^2=0.9941$)。

表 4 响应面实验编码值与实际值对照

Table 4 Response surface experiment coded values vs. actual values

序号	编码值			实际值			Y/ (mg/g)
	A	B	C	超声 功率/W	液固比/ (mL/g)	超声 时间/min	
1	-1	1	0	400	25 : 1	40	0.290
2	-1	-1	0	400	15 : 1	40	0.299
3	-1	0	-1	400	20 : 1	30	0.301
4	-1	0	1	400	20 : 1	50	0.296
5	0	0	0	500	20 : 1	40	0.313
6	0	1	1	500	25 : 1	50	0.287
7	0	1	-1	500	25 : 1	30	0.289
8	0	0	0	500	20 : 1	40	0.312
9	0	0	0	500	20 : 1	40	0.311
10	0	-1	-1	500	15 : 1	30	0.295
11	0	-1	1	500	15 : 1	50	0.291
12	1	1	0	600	25 : 1	40	0.286
13	1	0	-1	600	20 : 1	30	0.295
14	1	0	1	600	20 : 1	50	0.293
15	1	-1	0	600	15 : 1	40	0.294
16	0	0	0	500	20 : 1	40	0.313
17	0	0	0	500	20 : 1	40	0.312

2.6.2 模型拟合与方差分析

方差分析结果如表 5 所示。从二次多项式拟合结果来看, 模型 $P < 0.01$, 表明该拟合模型具有极显著性, 失拟项 $P > 0.05$, 模型相关系数 $R^2 = 0.9941$, 说明二次多项式方程模型对数据拟合度较高, 误差小, 模型可靠, 可作为异嗪皮啶超声提取工艺的分析测试模型。一次项 A (超声功率)、 B (液固比)、 C (超声时间) 影响极显著, 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 影响极显著, 由此可知, 各影响因素与异嗪皮啶产量之间并不是简单的线性关系。

表 5 方差分析结果

Table 5 Results of variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	显著性
模型	0.0015	9	0.0002	131.22	< 0.0001	**
A 超声功率	0	1	0	31.33	0.0008	**
B 液固比	0.0001	1	0.0001	70.48	< 0.0001	**
C 超声时间	0	1	0	16.34	0.0049	**
AB	0	1	0	0.19	0.6734	○
AC	0	1	0	1.74	0.2286	○
BC	0	1	0	0.77	0.4083	**
A^2	0.0002	1	0.0002	164.17	< 0.0001	**
B^2	0.0007	1	0.0007	537.76	< 0.0001	**
C^2	0.0003	1	0.0003	255.08	< 0.0001	**
残差	0	7	0			—
失拟项	0	3	0	2.98	0.1597	○
纯误差	0	4	0			—
总和	0.0015	16				—

2.6.3 响应面分析

采用 Design Expert 13.0 软件绘制异嗪皮啶产量、超声功率、液固比、超声时间之间的三维曲面图, 结果如图 8~10 所示。

由响应面图可得到优化条件为: 超声功率 480 W、液固比 19 : 1、超声时间 39 min。

2.6.4 工艺验证结果

根据 Design Expert 13.0 软件分析得到的优化条件超声功率 480 W、液固比 19 : 1、超声时间 39 min 进行 3 次验证实验, 结果如表 6 所示。

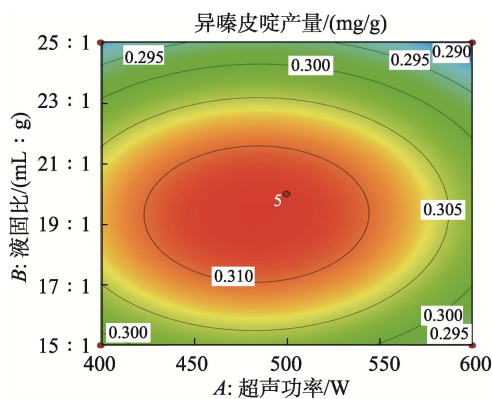


图 8 超声功率、液固比对异嗪皮啶产量的响应曲面及等高线图

Fig. 8 Response surface and contour plot of ultrasonic power and liquid-solid ratio on yield of isofraxidin

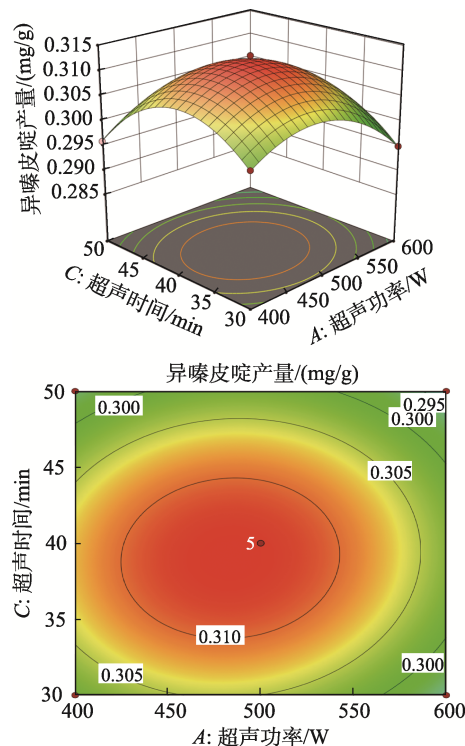
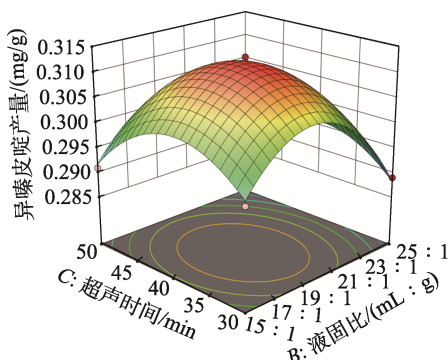
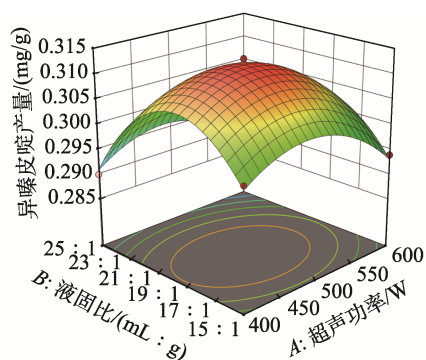


图 9 超声功率、超声时间对异嗪皮啶产量的响应曲面及等高线图

Fig. 9 Response surface and contour plot of ultrasonic power and ultrasonic time on yield of isofraxidin



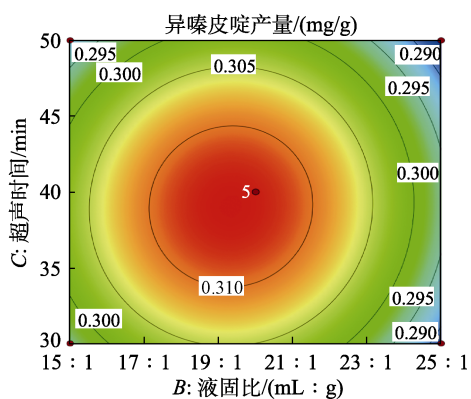


图 10 液固比、超声时间对异嗪皮啶产量的响应曲面及等高线图

Fig. 10 Response surface and contour plot of liquid-solid ratio and ultrasonic time on yield of isofraxidin

表 6 验证结果

Table 6 Verification test results

	实验次数			平均值	预测值
	1	2	3		
Y/(mg/g)	0.314	0.309	0.313	0.312	0.316
偏差/%	-0.10	-0.35	-0.15		

从表 6 可以看出, 异嗪皮啶产量为 0.312 mg/g, 与预测值之间的偏差为-0.20%, 实验结果与预测值接近, 说明该模型可靠, 该优化条件是可行的。

3 结论

通过离子液体辅助发酵菌生物转化刺五加苷 B1, 并通过超声提取制备异嗪皮啶, 通过单因素实验和响应面实验优化制备工艺。

(1) 经筛选, 最佳的发酵菌种为植物乳杆菌; 最佳的离子液体为[C₄MIM]Br。

(2) 异嗪皮啶生物转化制备单因素实验和响应面实验确定, 最优反应条件为 pH=6.0、液固比为 25:1、发酵温度 36.5 °C、发酵时间 36 h、[C₄MIM]Br 浓度 0.57 mol/L。在此条件下, 异嗪皮啶产量为 0.257 mg/g。

(3) 异嗪皮啶超声提取单因素实验和响应面实验确定, 最优反应条件为甲醇体积分数 100%、超声功率 480 W、液固比 19:1、超声时间 39 min。在此条件下, 异嗪皮啶产量为 0.312 mg/g。

采用离子液体辅助植物乳杆菌发酵中药刺五加, 并通过超声提取, 可以显著提高异嗪皮啶的产量。本文对异嗪皮啶的制备方法可以为食品工业和规模化生产提供参考。

参考文献:

[1] TU Z W (涂正伟), ZHOU W W (周渭渭), SHAN Q (单洪), *et al.* Research progress on american ginseng[J]. Drug Evaluation

Research (药物评价研究), 2011, 34(3): 213-216.

[2] CHENG G T (程国亭), HU H J (胡海锦), XU D Q (徐登球), *et al.* Evaluation of the rationality of acupuncture and aconitum injection based on attribute hierarchical model[J]. Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China (中国医院用药评价与分析), 2024, 24(6): 717-721.

[3] DU X F (杜秀芳), LIU W N (刘伟娜), ZHAN W H (詹文红). Progress in the clinical application of acanthopanax injection[J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine (现代中西医结合杂志), 2007, 16(24): 3603-3604.

[4] BI L D (毕连东), LYU Y (吕焯), ZHANG D (张丹), *et al.* Problems and analysis of american ginseng cultivation techniques in heilongjiang province[J]. Forest By-Product and Speciality in China (中国林副特产), 2024(3): 76-77.

[5] ZHANG S J (张顺捷), LI X L (李晓琳). Exploitation and utilization of acanthopanax resources[J]. China Food Drug Administration (中国食品药品监管), 2021(5): 108-111.

[6] XIA Y G, GONG F Q, GUO X D, *et al.* Rapid screening and characterization of triterpene saponins in *Acanthopanax senticosus* leaves via untargeted MS(All) and SWATH techniques on a quadrupole time of flight mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 170: 68-82.

[7] CHEN G, SONG X, LIN D, *et al.* Isofraxidin alleviates myocardial infarction through NLRP3 inflammasome inhibition[J]. Inflammation, 2020, 43(2): 712-721.

[8] JIN L, YING Z H, YU C H, *et al.* Isofraxidin ameliorated influenza viral inflammation in rodents via inhibiting platelet aggregation[J]. International Immunopharmacology, 2020, 84: 106521.

[9] XIA Y, LI W, ZHANG Z, *et al.* Decreased biomass recalcitrance effect and enhanced hydrolysis using ionic liquids: Toward improvements in isofraxidin extraction[J]. ACS Omega, 2019, 4(3): 6000-6009.

[10] DAS S, ROSAZZA J P. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(3): 499-508.

[11] MA S (马莎), LI G X (李桂香), LANG Q (郎茜), *et al.* Microbial transformation technology in the application of traditional Chinese medicine[J]. China Journal of Pharmaceutical Economics (中国药物经济学), 2022, 17(3): 125-128.

[12] GUAN L J (管立军), LI J L (李家磊), WANG K L (王崑仑), *et al.* Lactic acid bacteria fermentation affects the active components of *Acanthopanax* leaves, *in vitro* antioxidant effects, and hypoglycemic related enzymes[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2022, 43(7): 155-162.

[13] CHEN Y, LIANG H, BI Z, *et al.* Evaluating thermal decomposition of ionic liquids and deep eutectic solvents for reliable and consistent thermal analysis: Issues, factors, classifications and suggestions[J]. Thermochimica Acta, 2023, 723: 179471.

[14] LIU F S (刘福胜), CHENG X (程鑫), HE L (何亮), *et al.* A review of functionalized ionic liquid catalyzed CO₂ conversion to synthesize high-value chemicals[J]. Journal of Qingdao University of Science and Technology (Natural Science Edition) (青岛科技大学学报: 自然科学版), 2023, 44(1): 12-26.

[15] GONG L X (龚凌霄), FENG D N (冯丹宁), WANG J (王静). Highly efficient and green preparation of natural phenolic substances based on ionic liquid technology[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2021, 21(9): 336-345.

[16] HE D X (赫丁轩), DIAO T T (刁婷婷), ZHANG S J (张少军), *et al.* Ultrasound-assisted ionic liquid extraction, antioxidant and hypoglycemic activities of *Artemisiae argyi* leaves flavonoids[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2024, 41(9): 1978-1986.

[17] HONG L W (洪立伟), WU P F (吴鹏飞). Application research of ionic liquids in biocatalytic systems[J]. Modern Chemical Research (当代化工研究), 2018(3): 75-76.

[18] WAN L (万璐), YAN J J (闫佳佳), ZHENG C Y (郑春英). Effects on the biosynthesis of isofraxidin in fermented *Acanthopanax senticosus* by endophytic fungus[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin (中国农学通报), 2021, 37(13): 122-126.

[19] BEHERA S S, RAY R C, ZDOLEC N. *Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods[J]. BioMed Research International, 2018(1):

- 9361614.
- [20] JASTORFF M M A S. The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery[J]. *Green Chemistry*, 2007, 9: 1198-1207.
- [21] JIN S, YANG B, CHENG Y, *et al.* Improvement of resveratrol production from waste residue of grape seed by biotransformation of edible immobilized *Aspergillus oryzae* cells and negative pressure cavitation bioreactor using biphasic ionic liquid aqueous system pretreatment[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2017, 102: 177-185.
- [22] RANKE J, MÖLTER K, STOCK F, *et al.* Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 58(3): 396-404.
- [23] GIRAUD E, LELONG B, RAIMBAULT M. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 36(1): 96-99.
- [24] BOSILJKOV T, DUJMIĆ F, CVJETKO B M, *et al.* Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2017, 102: 195-203.
- [25] SANTOS F F P, RODRIGUES S, FERNANDES F A N. Optimization of the production of biodiesel from soybean oil by ultrasound assisted methanolysis[J]. *Fuel Processing Technology*, 2009, 90(2): 312-316.
- [26] PATIL S S, PATHAK A, RATHOD V K. Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent based extraction: A greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 70: 105267.
- [27] RASHID R, MOHD WANI S, MANZOOR S, *et al.* Green extraction of bioactive compounds from apple pomace by ultrasound assisted natural deep eutectic solvent extraction: Optimization, comparison and bioactivity[J]. *Food Chemistry*, 2023, 398: 133871.

(上接第 2455 页)

- [18] XU Z Q, LIU Y. The behavior of carbonized polymer dots at the nano-bio interface and their luminescent mechanism: A physical chemistry perspective[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2021, 39(2): 265-273.
- [19] SHEN J, XU B, WANG Z F, *et al.* Aggregation-induced room temperature phosphorescent carbonized polymer dots with wide-range tunable lifetimes for optical multiplexing[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2021, 9(21): 6781-6788.
- [20] ZHANG M X, ZHAO Z H, HUI B, *et al.* Carbonized polymer dots activated hierarchical tungsten oxide for efficient and stable triethylamine sensor[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 416(15): 126161.
- [21] HUANG S, ZHU F W, QIU H N, *et al.* A sensitive quantum dots-based "OFF-ON" fluorescent sensor for ruthenium anticancer drugs and ctDNA[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 117(1): 240-247.
- [22] XIONG Y, SCHNEIDER J, USHAKOVA E V, *et al.* Influence of molecular fluorophores on the research field of chemically synthesized carbon dots[J]. *Nanotoday*, 2018, 23: 124-139.
- [23] KHAN M I, MUKHERJEE K, SHOUKAT R, *et al.* A review on pH sensitive materials for sensors and detection methods[J]. *Microsystem Technologies*, 2017, 23(10): 4391-4404.
- [24] MONDAL T K, SAHA S K. Facile approach to synthesize nitrogen- and oxygen-rich carbon quantum dots for pH sensor, fluorescent indicator, and invisible ink applications[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7(24): 19669-19678.
- [25] WANG R, GU W W, LIU Z L, *et al.* Simple and green synthesis of carbonized polymer dots from nylon 66 waste fibers and its potential application[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(48): 32888-32895.

(上接第 2463 页)

- [24] LI B (李波). Total petroleum hydrocarbons pollution and its detection methods[J]. *Guangdong Chemical Industry (广东化工)*, 2010, 37(4): 269-271.
- [25] WANG R J (王瑞娟), LI G S (李刚森), YAN H T (闫海涛), *et al.* Synthesis and performance of a sulfonate Gemini surfactant[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2017, 34(2): 166-171.
- [26] JI T (季通). Synthesis and surface aggregation performance research of multi-head surfactants containing sulfonic acid group[D]. Jinan: Shandong University (山东大学), 2023.
- [27] MEI P (梅平), HOU C (侯聪), LAI L (赖璐), *et al.* Study on synthesis of sulfonate Gemini surfactants and interaction with polyacrylamide[J]. *Chemistry (Huaxue Tongbao) (化学通报)*, 2013, 76(11): 1034-1039.
- [28] JIANG Y J, GENG T, LI Q X, *et al.* Equilibrium and dynamic surface tension properties of salt-free cationic surfactants with different hydrocarbon chain lengths[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2015, 204: 126-131.
- [29] MA T, FENG H S, WU H R, *et al.* Property evaluation of synthesized anionic-nonionic Gemini surfactants for chemical enhanced oil recovery[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, 581: 123800.
- [30] ABO-RIYA M A, BAKER S A. Novel synthesized anionic Gemini and monomeric surfactants bearing sulphonate group as petro-dispersing/collecting agents: Design, characterization and surface-active properties[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2023, 1274: 134502.
- [31] WANG P Y (王培义), YIN H (尹浩), ZHANG Y J (张应军). Synthesis and properties of sodium dilaurolyterephthalamide propionate acid[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2010, 27(7): 650-653.
- [32] YOU Y (游毅), DENG Y S (邓永淑), LI E J (李二军), *et al.* Hydrophobic synergism between the alkyl tails of Gemini surfactants during adsorption and aggregation[J]. *Acta Physico-Chimica Sinica (物理化学学报)*, 2010, 26(8): 2200-2204.
- [33] LIU J W, WEI K H, XU S W, *et al.* Surfactant-enhanced remediation of oil-contaminated soil and groundwater: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 756: 144142.
- [34] ZHANG R (张瑞), WANG J X (王吉星), PENG Z G (彭志刚), *et al.* Synthesis and performance evaluation of a star shaped benzene sulfonate surfactant[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2017, 34(3): 262-267.
- [35] WANG Y K, JIANG Y J, GENG T, *et al.* Synthesis, surface/interfacial properties, and biological activity of amide-based Gemini cationic surfactants with hydroxyl in the spacer group[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, 563: 1-10.
- [36] CHEN H, HAN L J, LUO P Y, *et al.* The interfacial tension between oil and Gemini surfactant solution[J]. *Surface Science*, 2004, 552(1/2/3): L53-L57.
- [37] MPELWA M, TANG S F, JIN L J, *et al.* New sulfonate Gemini surfactants: Synthesis and evaluation for enhanced oil recovery applications[J]. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2020, 41(14): 2091-2099.
- [38] HOU Y F, LI J B, REN X D, *et al.* Preparation and the synergism with other surfactants in mixed systems of a novel Gemini sulfonate surfactant[J]. *Materials Today Communications*, 2023, 34: 105370.
- [39] YANG Y (杨阳). Interfacial properties and interaction mechanisms of soil minerals-crude oil components[D]. Xuzhou: China University of Mining and Technology (中国矿业大学), 2024.