

低共熔溶剂提取荔枝壳中的原花青素及其抗氧化活性

郑德瑜^{1,2}, 张瑞芬², 黄菲², 董丽红², 张名位², 郭朝万³, 贾栩超^{2*}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

(3. 广东九美生物技术股份有限公司, 广东广州 510530)

摘要: 该研究通过建立低共熔溶剂 (DES) 最佳提取工艺为荔枝壳原花青素的绿色高效制备提供技术支持。通过比较了 4 种低共熔溶剂与 70% (V/V) 乙醇提取对荔枝壳原花青素提取效率、化学构成及 ORAC 抗氧化活性的影响, 确定氯化胆碱-1,3-丁二醇为最佳提取溶剂。HPLC 分析表明 4 种低共熔溶剂与 70% (V/V) 乙醇提取的荔枝壳原花青素主要成分均为原花青素 A2、芦丁、表儿茶素、原花青素 B1 及山奈酚-3-O-芸香糖苷。进一步通过单因素试验结合正交优化确定了氯化胆碱-1,3-丁二醇提取最佳工艺条件: 料液比 1:20 (g/mL), 溶剂摩尔比 1:4, 溶剂含水量 50% (V/V), 提取温度 60 °C, 提取时间 90 min, 在该条件下提取液中的荔枝壳原花青素含量高达 5.07 mg PE/mL, 是 70% (V/V) 乙醇提取的 1.4 倍, 其 ORAC 值及 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 值分别为 5 496.25 μmol TE/mL、27.35 μg PE/mL 和 23.82 μg PE/mL, 均优于 70% (V/V) 乙醇提取的原花青素 (3 370.17 μmol TE/mL、36.41 μg PE/mL 和 31.56 μg PE/mL) ($P < 0.05$), 研究结果表明低共熔溶剂在荔枝壳原花青素提取方面具有显著优势。

关键词: 荔枝壳; 原花青素; 低共熔溶剂; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2024)02-246-256

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.0222

Extraction of Litchi Pericarp Procyanidins Using Deep Eutectic Solvents and Their Antioxidant Activity

ZHENG Deyu^{1,2}, ZHANG Ruifen², HUANG Fei², DONG Lihong², ZHANG Mingwei², GUO Chaowan³, JIA Xuchao^{2*}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China) (2. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

(3. Guangdong Marubi Biotechnology Co, Ltd., Guangzhou 510530, China)

Abstract: The optimal process for litchi pericarp procyanidin extraction using deep eutectic solvents (DESs) was established to provide technical support for the efficient green preparation of litchi pericarp procyanidins. Litchi pericarp procyanidins were extracted using four DES types and 70% (V/V) ethanol to investigate and compare the extraction efficiency

引文格式:

郑德瑜,张瑞芬,黄菲,等.低共熔溶剂提取荔枝壳中的原花青素及其抗氧化活性[J].现代食品科技,2024,40(2):246-256.

ZHENG Deyu, ZHANG Ruifen, HUANG Fei, et al. Extraction of litchi pericarp procyanidins using deep eutectic solvents and their antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 246-256.

收稿日期: 2023-02-26

基金项目: 广东特支计划项目 (2019BT02N112); 广州市科技计划项目 (201903010051; 202103000055); 广东省农业科学院农业优势产业学科团队建设项目 (202108TD)

作者简介: 郑德瑜 (1998-), 女, 在读硕士, 研究方向: 亚热带农产品贮藏与加工, E-mail: 1551410749@qq.com

通讯作者: 贾栩超 (1989-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然活性物质开发与利用, E-mail: jiaxuchao@gdaas.cn

and the chemical composition and antioxidant activity (oxygen radical absorbance capacity) of the obtained procyanidins. HPLC-DAD analysis revealed that two procyanidin compounds (procyanidin A2 and B1) and three flavonoids (rutin, epicatechin, and kaempferol-3-*O*-rutinoside) were present in the extracts acquired using the four DESs and ethanol. Choline chloride-1,3-butanediol was the best extractive solvent. Furthermore, single factor tests and orthogonal optimization suggested that the optimum extraction conditions for choline chloride-1,3-butanediol are as follows: a liquid ratio of 1:20 (g/mL), a solvent molar ratio of 1:4, a solvent water content of 50% (*V/V*), an extraction temperature of 60 °C, and an extraction time of 90 min. Under these conditions, the total procyanidin content reached 5.07 mg PE/mL, which is 1.4-fold that extracted using 70% ethanol. The oxygen radical absorbance capacity values and the IC₅₀ values of the DPPH and ABTS free radicals of the finished choline chloride-1,3-butanediol-extracted extract were 5 496.25 μmol TE/mL, 27.35 μg PE/mL, and 23.82 μg PE/mL, respectively. In short, these results indicate that DESs exert significant advantages in the extraction of litchi pericarp procyanidins.

Key words: litchi pericarp; proanthocyanidins; procyanidins; deep eutectic solvents; antioxidant

荔枝 (*Litchi chinensis*) 是一种广泛种植于全球热带至亚热带地区的水果作物, 中国、泰国、印度以及越南等亚洲国家是荔枝的主要产区^[1]。荔枝是非呼吸跃变型水果, 成熟期集中, 采后易腐败, 不宜长期储藏^[2]。开展荔枝加工可以缓解鲜销压力, 并能够提升荔枝的经济附加值。荔枝加工主要集中于荔枝果肉, 其果壳和果核则作为副产物被丢弃, 造成一定的资源浪费与损失^[3]。荔枝壳富含水溶性多糖以及黄酮、酚酸与原花青素等酚类活性物质, 其中原花青素是荔枝果壳的重要活性成分, 且构型以 A 型为主^[4,5]。前期研究表明荔枝壳具有抗氧化、抗炎以及美白等作用, 可作为活性物质用于功能食品和日化产品开发^[6]。

目前, 原花青素传统的提取方法是乙醇浸提法, 提取时间长、温度高, 对原花青素的稳定性和化学组成有一定的影响, 同时也会降低其生物活性^[7]。低共熔溶剂 (Deep Eutectic Solvent, DES) 是由两种或以上的试剂分别以氢键供体 (Hydrogen-bond Donor, HBD) 和氢键受体 (Hydrogen-bond Acceptor, HBA) 的形式在一定的温度下通过氢键作用结合形成的高粘度透亮的溶剂^[8]。低共熔溶剂具有较强的穿透植物细胞壁能力, 并且能与酚类、黄酮类物质形成氢键键合, 增加生物活性物质的提取率^[9]。此外, 低共熔溶剂还能增强生物活性物质的抗菌、抗氧化等活性, 改善生物活性物质的热稳定性和储藏稳定性^[10,11]。因此, 既能兼容安全性、环保性, 又能保证提取效率的低共熔溶剂有望成为原花青素的理想提取溶剂^[12]。目前, 低共熔溶剂广泛应用于橄榄、马铃薯、甜菜根等原料的多酚和黄酮物质提取, 而在原花青素的提取中应用还相对较少^[13]。

本文通过对比 4 种低共熔溶剂和 70% (*V/V*)

乙醇提取的荔枝壳原花青素的得率、平均聚合度、化学组成及抗氧化活性, 筛选出最佳的低共熔溶剂。并进一步考察料液比、DES 摩尔比、DES 含水量、提取时间及提取温度 5 个单因素对荔枝壳原花青素提取的影响, 结合正交优化, 明确荔枝壳原花青素的最佳提取工艺, 并对提取物的抗氧化活性进行分析。旨在为荔枝壳原花青素的绿色高效提取制备和高值化利用提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

荔枝壳 (妃子笑), 采购于广东省广州市; 氯化胆碱、1,3-丁二醇、4-二甲基氨基肉桂醛、香草醛, 上海麦克林生化有限公司; 尿素, 天津市永大化学试剂有限公司; 乳酸、甘油、无水乙醇, 天津市富宇精细化工有限公司; 无水甲醇, 广东光华科技股份有限公司; 磷酸氢二钠、亚硝酸钠, 天津市福晨化学试剂有限公司; 柠檬酸、过硫酸钾, 天津市百世化工有限公司; 福林酚试剂、荧光素钠、2,2'-偶氮二 (2-甲基丙基咪) 二盐酸盐 (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) Dihydrochloride, AAPH), 美国 Sigma 公司; 氢氧化钠、三氯化铝 (结晶), 天津市大茂化学试剂厂; 浓盐酸, 广州化学试剂厂; 2,2'-联氨-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid), ABTS), 上海阿拉丁试剂有限公司; 1,1-二苯-2-苦基肼 (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH), 上海源叶公司; 高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 级甲醇、乙酸和乙腈, Thermo Fisher Scientific 公司; 没食子酸、低聚原花青素 (UV≥95%)、水溶性维生素

素 E (Trolox)、原花青素 B1、表儿茶素、芦丁、原花青素 A2 以及山奈酚 -3-O- 芸香糖苷标准品购于上海源叶公司和 Sigma 公司, 其他试剂均为国产分析纯; 蒸馏水。

1.2 主要仪器与设备

EYELAN-1100 旋转蒸发器: 东京理化器械株式会社; T25 digital 分散机: 德国 IKA 公司; Infinite M200pro 多功能酶标仪: 瑞士 Tecan 公司; LC-20 高效液相色谱仪、UV-1800 紫外可见分光光度计: 日本岛津有限公司。

1.3 DES 的制备

按照表 1 的摩尔比分别称取一定质量的氢键受体和氢键供体于圆底烧瓶中, 并放入在 70 °C 水浴下旋蒸, 直至形成透亮无晶体的粘稠溶液的状态, 即得到 DES-1~4。

表 1 不同种类 DES 的配比

Table 1 Proportioning of different DESs

序号	氢键受体	氢键供体	摩尔比
DES-1	氯化胆碱	尿素	1:2
DES-2	氯化胆碱	乳酸	1:2
DES-3	氯化胆碱	1,3- 丁二醇	1:2
DES-4	氯化胆碱	甘油	1:2

1.4 荔枝壳原花青素的提取

将 1 g 荔枝壳 (剪刀剪碎) 分别加入 30 mL 的体积分数均为 70% (V/V) 的 DES 与乙醇溶剂当中, 使其料液比为 1:30 (g/mL), 在室温下通过 8 000 r/min 分散机均质 2 min 后, 置于 60 °C 水浴提取 120 min。待提取完成后, 冷却抽滤, 除去荔枝壳渣, 并旋蒸去除水分, 最后用无水甲醇定容至 50 mL, 即得到荔枝壳提取液。

1.5 荔枝壳提取液组成成分测定

1.5.1 总酚的测定

采用福林酚方法^[14]测定荔枝壳提取液的总酚含量。取 125 μ L 荔枝壳提取液与 500 μ L 蒸馏水和 125 μ L 福林酚试剂混匀, 避光反应 6 min, 再加入 1.25 mL 7% (m/V) 的 Na_2CO_3 避光反应 90 min, 在 760 nm 处测其吸光值。以没食子酸为标准品制作标准曲线 (0.03~0.30 mg/mL), 荔枝壳提取液的总酚含量以每毫升提取液中所含没食子酸当量 (Gallic Acid Equivalent, GAE) 表示, 即 mg GAE/mL。

1.5.2 总黄酮的测定

采用 $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O-NaOH}$ 方法^[15]测定荔枝壳提取液的总黄酮含量。取 300 μ L 荔枝壳提取液与 1.5 mL 蒸馏水和 90 μ L 5% (m/V) NaNO_2 试剂混匀, 静置反应 6 min, 再加入 180 μ L 10% (m/V) 的 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 静置反应 5 min, 最后加入 600 μ L 1 mol/L 的 NaOH 和 330 μ L 蒸馏水后, 在 510 nm 处测其吸光值。以芦丁为标准品制作标准曲线 (0.03~0.40 mg/mL), 荔枝壳提取液的总黄酮含量以每毫升提取液中所含芦丁当量 (Rutin Equivalent, RE) 表示, 即 mg RE/mL。

1.5.3 原花青素含量的测定

采用 4- 二甲基氨基肉桂醛 (DMAC) 方法^[16]测定荔枝壳提取液的原花青素含量。取 0.05 g DMAC 置于 50 mL 含有 12.5% (V/V) 浓盐酸的 70% (V/V) 酸化乙醇溶液混匀, 即为 DMAC 反应液。依次取 70 μ L 荔枝壳提取液和 210 μ L DMAC 反应液加到 96 孔板中, 避光静置反应 25 min, 在 640 nm 处测其吸光值。以酸化乙醇作试剂空白组; 用无水甲醇作样品空白组。以原花青素标准品制作标准曲线 (0.01~0.50 mg/mL), 荔枝壳提取液的原花青素含量以每毫升提取液中所含原花青素标品当量 (Procyanidins Equivalent, PE) 表示, 即 mg PE/mL。

1.5.4 原花青素平均聚合度 (mDP) 的测定

根据魏冠红等^[17]的方法测定荔枝壳提取液的平均聚合度。取一定量的荔枝壳提取液, 分别用无水甲醇或者乙酸稀释至一定体积。其中用无水甲醇稀释的荔枝壳提取液来测定原花青素的质量, 取 0.5 mL 样液依次与 3 mL 4 g/100 mL 的香草醛 - 甲醇溶液和 1.5 mL 浓盐酸混匀, 静置反应 15 min, 在 500 nm 处测其吸光值, 并以无水甲醇作试剂空白组。以儿茶素标准品制作标准曲线 (68.97~500.00 μ g/mL), 荔枝壳提取液的原花青素含量以每毫升提取液中所含儿茶素标品当量 (Catechin Equivalent, CE) 表示, 即 μ g CE/mL。而用乙酸稀释的荔枝壳提取液来测定原花青素的物质的量, 取 1 mL 样液与 5 mL 4% HCl (V/V) -0.5% 香草醛 (m/V) 乙酸溶液混匀, 静置反应 5 min, 在 500 nm 处测其吸光值, 并以 0.5% (m/V) 香草醛乙酸作试剂空白组。以儿茶素标准品制作标准曲线 (0.07~0.35 μ mol/mL), 荔枝壳提取液的原花青素物质的量以每毫升提取液中所含儿茶素标品当量 (Catechin Equivalent, CE) 表示, 即 μ mol CE/mL。其平均聚合度 (Mean Degree of

Polymerisation, mDP) 计算公式为:

$$D = \frac{m}{M \times n} \quad (1)$$

式中:

D ——原花青素平均聚合度 (mDP);

m ——原花青素的质量, $\mu\text{g CE/mL}$;

M ——儿茶素的相对分子质量, 为 290;

n ——原花青素物质的量, $\mu\text{mol CE/mL}$ 。

1.5.5 荔枝壳提取液中主要化学成分分析

采用 HPLC 测定荔枝壳提取液中主要化学成分的组成成分及含量。色谱柱为 ZORBAX SB-C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 相为 0.1% 乙酸水 (V/V), B 相为乙腈; 梯度洗脱程序如下: 0~35 min, 5%~32% B; 35~40 min, 32%~50% B; 40~45 min, 50%~60% B。检测波长为 254 nm; 流速为 1 mL/min; 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 10 μL 。通过与原花青素 B1、表儿茶素、芦丁、原花青素 A2 以及山奈酚-3-*O*-芸香糖苷等标准品的保留时间进行对比进行色谱峰的鉴定, 化合物的含量则通过峰面积代入标准物质的标准曲线进行计算确定。

1.6 DES 提取荔枝壳原花青素的单因素试验设计

在初始条件 (料液比为 1:30 (g/mL)、DES 含水量为 30%、DES 摩尔比为 1:2、提取时间为 120 min、提取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$) 下, 以提取物的原花青素含量为指标, 采用控制变量法分别对料液比 (1:10、1:20、1:30、1:40、1:50, g/mL)、DES 摩尔比 (1:2、1:3、1:4、1:5、1:6)、DES 含水量 (0%、15%、30%、50%、70%, V/V)、提取时间 (30、60、90、120 min) 以及提取温度 (40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$) 5 个因素进行单因素试验。

1.7 DES 提取荔枝壳原花青素的正交试验设计

在 1.6 单因素试验基础上, 分别选取 DES 摩尔比、DES 含水量、提取时间和提取温度, 进一步研究 4 个因素对荔枝壳原花青素提取含量的影响, 采用 $L_9(4^3)$ 进行正交试验, 因素水平见表 2。

表 2 正交试验因素与水平设计

Table 2 Orthogonal experimental design

水平	因素			
	(A) 摩尔比	(B) 含水量/%	(C) 提取时间/min	(D) 提取温度/ $^{\circ}\text{C}$
1	1:3	30	30	40
2	1:4	50	60	50
3	1:5	70	90	60

1.8 抗氧化活性

1.8.1 ORAC 抗氧化能力

根据卢琦等^[4]的方法测定荔枝壳提取液的氧自由基吸收能力 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)。以 75 mmol/mL pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) 作为稀释液, 将样品溶液稀释至一定体积, 并取 20 μL 加入黑色 96 孔板中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 再加入 200 μL 0.96 $\mu\text{mol/L}$ 荧光素钠溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 最后, 加入 20 μL 119 mmol/L AAPH 自由基溶液 (除空白孔外), 并置于激发波长 485 nm, 发射波长 520 nm 的酶标仪下测定各个孔的荧光值, 每 4.5 min 循环 1 次, 共循环 35 次。以 PBS 作为空白组, 不同质量浓度水溶性维生素 E (Trolox) 标准品 (6.25~50.00 $\mu\text{mol/L}$) 制作标准曲线, 计算提取液中的 ORAC 值, 结果以 Trolox 当量表示, 单位为 $\mu\text{mol TE/mL}$ 。

1.8.2 DPPH 自由基清除能力

称取 3.9 mg DPPH 溶解于 100 mL 甲醇配制成 0.1 mmol/L 的 DPPH 工作液, 并将样品配成不同体积的溶液。用移液枪移取 100 μL 样品溶液与现配制的 DPPH 工作液 200 μL 充分混匀。常温避光反应 30 min 后在 517 nm 处测定吸光值 A_1 (实验组), 同时测定 100 μL 样品溶液与 200 μL 甲醇溶液的吸光值 A_2 (实验空白组) 以及 100 μL 样品溶液与 200 μL DPPH 工作液的吸光值 A_0 (空白对照组), 根据以下公式 (2) 算出清除率 (Clearance, C), 结果以提取液中所含原花青素标品 (Procyanidins Equivalent, PE) 为当量, 单位为 $\mu\text{g PE/mL}$, 用 Graphpad Prism 7.0 软件求出 IC_{50} 值。

$$C_i = \left(1 - \frac{A_i - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C_i ——DPPH 自由基清除率;

A_0 ——空白对照组的吸光值;

A_i ——实验组的吸光值;

A_2 ——实验空白组的吸光值。

1.8.3 ABTS⁺ 自由基清除能力

称取 66.23 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶解于 100 mL 蒸馏水配制成 2.45 mmol/L 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液, 再称取 19.20 mg ABTS 溶解于 5 mL 2.45 mmol/L 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液制备成 7 mmol/L ABTS 储备液。将适量的 ABTS 储备液用 10 mmol/L pH 值 8.0 的磷酸盐缓冲液稀释至在 734 nm 处的吸光值为 (0.70±0.05), 配制成 ABTS 工作液。用移液枪移取不同体积的样品溶液 50 μL 与现配

制的 ABTS 工作液 200 μL 充分混匀。室温避光反应 6 min 后在 734 nm 处测定吸光值 A_1 (实验组), 同时测定 50 μL 样品溶液与 200 μL 磷酸盐缓冲溶液的吸光值 A_2 (实验空白组) 以及 50 μL 样品溶剂与 200 μL ABTS 工作液的吸光值 A_0 (空白对照组), 根据以下公式 (3) 算出清除率 (Clearance, C), 结果以提取液中所含原花青素标品为当量, 单位为 $\mu\text{g PE/mL}$, 用 Graphpad Prism 7.0 软件求出 IC_{50} 值。

$$C_2 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C_2 —ABTS⁺ 自由基清除率;

A_0 —空白对照组的吸光值;

A_1 —实验组的吸光值;

A_2 —实验空白组的吸光值。

1.9 数据分析

所有实验均重复三次, 实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行 Duncan 检验和独立样本 T 检验统计分析, 采用 Graphpad Prism 7.0 和 Origin 2018 作图。定量数据采用“平均值 \pm 标准差”表示, 不同字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 DES 种类筛选

不同 DES 对荔枝壳多酚类物质的提取效果如

表 3 所示, 提取液中原花青素含量 $\text{DES-3} > \text{DES-2} > \text{DES-4} > \text{DES-1} > 70\% (V/V)$ 乙醇, 其中 DES-3 提取的原花青素含量可达 3.71 mg PE/mL, 为 70% (V/V) 乙醇提取的 1.3 倍。呈酸性的 DES-2、DES-3、DES-4 比 70% 乙醇及碱性溶剂 DES-1 拥有更高的极性, 因此能与原花青素更稳定地结合, 进而表现出更高的提取得率^[18]。而 DES-1 溶剂呈碱性, 且原花青素在碱性条件下易降解, 因此原花青素含量在四种低共熔溶剂中最低^[19]。Zain 等^[20]采用了 6 种不同 DES 提取油棕黄酮, 发现氯化胆碱-丁二醇提取的油棕黄酮的含量最高。Wang 等^[21]通过筛选 9 种不同醇基、酸基与糖基的 DES 提取槐花中的黄酮类物质, 最终发现氯化胆碱-丁二醇为溶剂时提取槐花黄酮的效果最好。这可能因为以丁二醇为 HBD 的 DES 含有的羟基更多, 流动性更好, 且对活性物质的氢键结合作用更强的缘故^[22]。此外, 也考察了 DES 提取对原花青素 mDP 的影响。从表 3 中可以发现在 DES 中, 只有碱性 DES-1 提取原花青素的 mDP 显著低于乙醇提取。根据马焯^[23]的研究表明, 原花青素在 pH 值大于 7 的碱性环境下的稳定性显著降低, 多聚体的原花青素结构被破坏降解成低分子量物质, 因而其原花青素的 mDP 和提取得率都较低, 所以 DES-1 不适合荔枝壳原花青素的提取。

表 3 不同溶剂提取荔枝壳原花青素的分析比较

Table 3 Analysis of litchi pericarp procyanidins extracted with different solvents

溶剂	原花青素含量 (mg PE/mL)	总酚 (mg GAE/mL)	总黄酮 (mg RE/mL)	平均聚合度 (mDP)	ORAC ($\mu\text{mol TE/mL}$)
DES-1	2.95 \pm 0.06 ^d	2.50 \pm 0.03 ^{bc}	2.76 \pm 0.05 ^{bc}	1.80 \pm 0.02 ^c	1 685.09 \pm 65.40 ^d
DES-2	3.45 \pm 0.13 ^b	2.66 \pm 0.17 ^b	2.78 \pm 0.02 ^{bc}	2.26 \pm 0.12 ^{ab}	3 102.75 \pm 97.18 ^b
DES-3	3.71 \pm 0.17 ^a	2.92 \pm 0.13 ^a	2.99 \pm 0.17 ^a	2.16 \pm 0.08 ^b	3 406.05 \pm 169.30 ^a
DES-4	3.20 \pm 0.09 ^c	2.69 \pm 0.06 ^b	2.85 \pm 0.11 ^{ab}	2.49 \pm 0.12 ^a	2 939.73 \pm 50.60 ^b
$\varphi=70\%$ 乙醇	2.84 \pm 0.15 ^d	2.31 \pm 0.13 ^c	2.59 \pm 0.13 ^c	2.29 \pm 0.08 ^{ab}	2 448.23 \pm 101.42 ^c

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$), 下同; PE: 原花青素当量, GAE: 没食子酸当量, RE: 芦丁当量, TE: Trolox 当量。

进一步比较了不同低共熔溶剂提取液中酚和黄酮的含量, DES-2、DES-3 和 DES-4 提取液中的黄酮含量高于乙醇提取 ($P < 0.05$), 而只有 DES-3 提取液中的总酚含量 (2.92 mg GAE/mL) 显著高于乙醇提取液 ($P < 0.05$)。氧自由基清除能力结果表明三种低共熔溶剂提取液 (DES-2、DES-3、DES-4) 的 ORAC 值显著高于乙醇提取 ($P < 0.05$), 其中 DES-3 的 ORAC 活性最强 (3 406.05 $\mu\text{mol TE/mL}$),

而 DES-1 的抗氧化能力显著低于乙醇提取液。结合不同溶剂提取液的原花青素、总酚、总黄酮含量和 mDP 以及抗氧化活性结果可知, DES-3 最适合作为荔枝壳原花青素的提取溶剂。

同时, 通过 HPLC 分析 4 种 DES 与 70% (V/V) 乙醇作为溶剂时提取物的化学组成, 结果如图 1 所示, 4 种 DES 与 70% (V/V) 乙醇提取物中的主要成分较为类似, 主要色谱峰基本一致。通过比对酚

类标准品的保留时间，鉴定出 5 种单体物质，分别是原花青素 B1、表儿茶素、芦丁、原花青素 A2 以及山奈酚 -3-O- 芸香糖苷，与已报道的荔枝壳原花青素的主要化学成分结果一致^[24,25]。进一步测定了 5 种单体酚类的含量，结果表明（表 4）5 种溶剂的提取物中均为原花青素 A2 含量最高，其次是芦丁，山奈酚 -3-O- 芸香糖苷含量最少。杨丽珍^[25]通过 UPLC-Q-TOF/MS 分析鉴定出荔枝壳含有原花青素 A2、儿茶素、山奈酚 -3-O- 葡萄糖苷、芦丁等 12 种酚类物质，并也发现原花青素 A2 的含量最高（96.04 mg/g）。此外，4 种 DES 提取原花青素 A2 与芦丁的能力都高于 70%（V/V）乙醇，其中以 DES-3 提取的能力最强。所以，DES-3 被选为后续的提取溶剂。

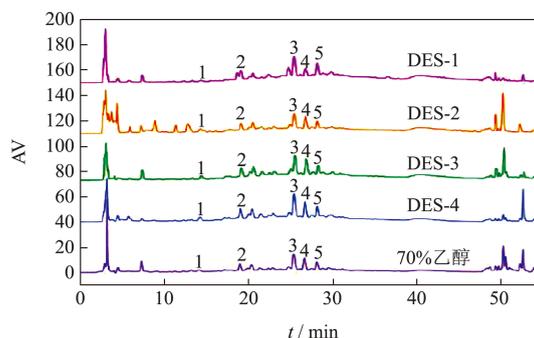


图 1 不同溶剂提取荔枝壳原花青素的高效液相分析图

Fig.1 Liquid chromatogram of litchi pericarp procyanidins extracted with different solvents

注：1. 原花青素 B1；2. 表儿茶素；3. 原花青素 A1；4. 芦丁；5. 山奈酚 -3-O- 芸香糖苷。

表 4 不同溶剂提取荔枝壳原花青素的主要化学成分分析

Table 4 Chemical constituents of litchi pericarp procyanidins extracted with different solvents (mg/mL)

溶剂	原花青 B1	表儿茶素	芦丁	原花青 A2	山奈酚 -3-O- 芸香糖苷
DES-1	0.06±0.00 ^b	0.17±0.00 ^c	1.50±0.07 ^a	1.40±0.07 ^b	0.02±0.00 ^b
DES-2	0.11±0.01 ^a	0.24±0.01 ^{ab}	1.31±0.06 ^{bc}	1.69±0.02 ^a	0.03±0.00 ^a
DES-3	0.11±0.01 ^a	0.25±0.01 ^a	1.57±0.04 ^a	1.76±0.12 ^a	0.03±0.00 ^a
DES-4	0.09±0.01 ^a	0.22±0.02 ^b	1.37±0.05 ^b	1.62±0.16 ^a	0.03±0.00 ^a
φ=70% 乙醇	0.07±0.01 ^b	0.16±0.02 ^c	1.23±0.04 ^c	1.38±0.04 ^b	0.02±0.00 ^b

2.2 单因素试验结果

2.2.1 料液比对提取物中原花青素含量的影响

料液比不仅是影响提取原花青素的因素之一，还是提取工艺的成本优化的主要参数。结果如图 2 所示，料液比从 1:10 (g/mL) 提高到 1:30 (g/mL) 时，原花青素的提取含量呈增加趋势，达到显著水平 ($P < 0.05$)。但随着料液比进一步增大，荔枝壳原花青素提取含量呈下降趋势，这可能是由于过量地增加 DES-3 量，DES-3 与原花青素的氢键作用减弱，反而使得原花青素提取含量下降^[26]。但因料液比在 1:20 与 1:30 (g/mL) 的提取含量差异不显著 ($P < 0.05$)，考虑成本节省，避免不必要的试剂浪费，故选择 1:20 为最佳料液比。

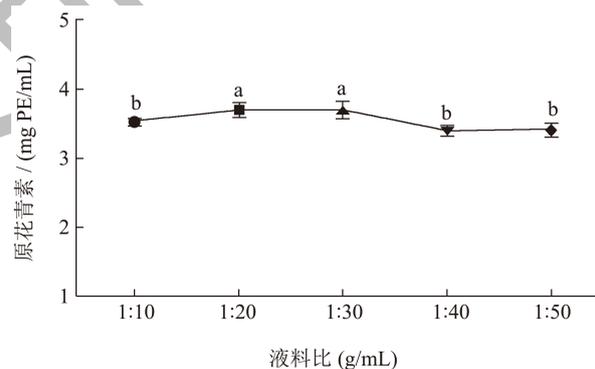


图 2 料液比对提取物中原花青素含量的影响

Fig.2 Effect of material-liquid ratio on the content of procyanidins in extracts

2.2.2 DES 摩尔比对提取物中原花青素含量的影响

DES 的 HBD 与 HBA 的选择能够直接决定其物理化学特性，所以 HBD 与 HBA 摩尔比能影响 DES 的分子性能^[27]。如图 3 所示，荔枝壳原花青素提取含量随着 DES-3 摩尔比 (HBA:HBD) 的增加出现先上升后下降，当 DES-3 摩尔比在 1:4 时，荔枝壳原花青素提取含量为 4.05 mg PE/mL，随着 DES-3 摩尔比的提高，DES-3 相互作用力的减弱，从而原花青素的提取量下降^[21]。因此，选择 DES-3 摩尔比的比值为 1:3~1:5 间作为工艺优化范围。

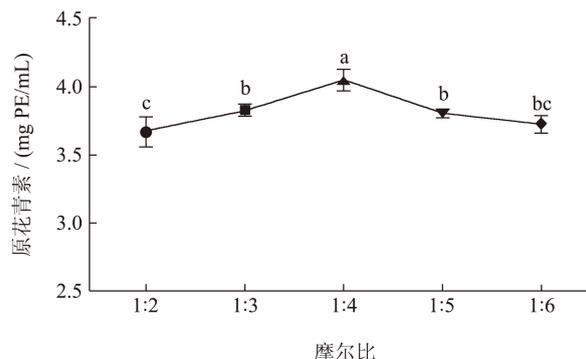


图 3 DES 摩尔比对提取物中原花青素含量的影响

Fig.3 Effect of molar ratio on the content of procyanidins in extracts

2.2.3 DES含水量对提取物中原花青素含量的影响

DES的含水量是影响荔枝壳原花青素提取含量的重要因素之一。DES是具有高粘度特性的溶剂,但因其特性使之流动性差,阻碍了分子的扩散作用,从而遏制DES与提取物之间的传质过程^[28]。随着DES-3含水量从0%~50%(V/V)增加,能使DES-3的粘度降低,流动性增强,促进DES-3与荔枝壳的传质过程,原花青素的提取率也逐渐升高至3.88 mg PE/mL^[29]。但当含水量高于50%(V/V)时,可能会削弱DES-3组分之间的氢键作用,破坏了DES-3的分子结构,致使荔枝壳原花青素的提取含量下降^[30]。因此,选择DES-3的含水量为30%~70%(V/V)作为考察水平。

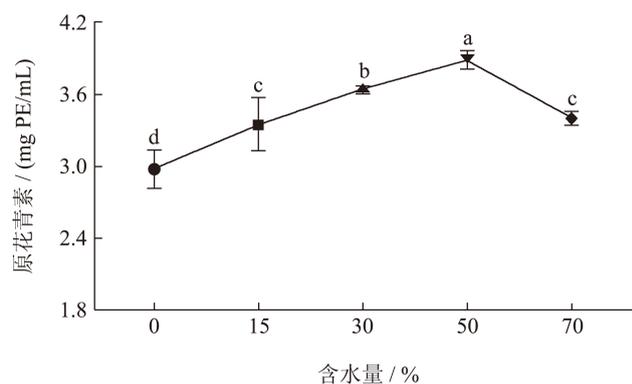


图4 DES含水量对提取物中原花青素含量的影响

Fig.4 Effect of water content of DES on the content of procyanidins in extracts

2.2.4 提取时间对提取物中原花青素含量的影响

在60 min提取时间下,随着提取时间的增加,DES-3充分渗透于荔枝壳中,促进固液相的传质过程,而随提取时间延长,提取物和提取溶剂之间达到一定平衡^[31]。由图5可知,在提取时间长达60 min时,原花青素在DES-3的溶解度达到最大值3.96 mg PE/mL。但是,60℃下过长的提取时间不仅不能增加原花青素的提取含量,反而会使原有的原花青素发生分解反应,导致其含量降低^[32]。因此,选择30~90 min的提取时间为正交因素水平。

由图6可知,当温度从40℃升高到50℃时,荔枝壳原花青素提取含量达到3.77 mg PE/mL,可归因于提取温度的升高能使DES-3热膨胀,分子

的动能和迁移率升高,有利于DES-3对荔枝壳细胞的渗透以及促进与荔枝壳原花青素之间的氢键结合^[33,34]。但温度从50℃到70℃进一步增加时,原花青素热稳定性下降,且易发生氧化反应,致使原花青素的含量下降^[35]。

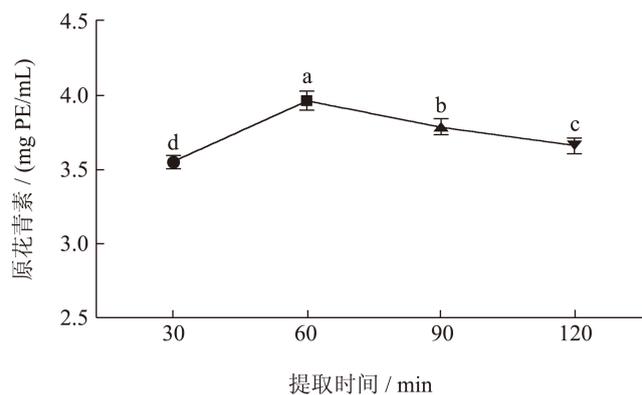


图5 提取时间对提取物中原花青素含量的影响

Fig.5 Effect of extraction time on the content of procyanidins in extracts

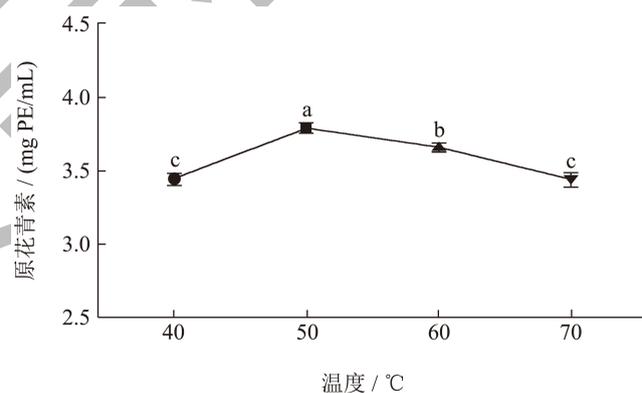


图6 提取温度对提取物中原花青素含量的影响

Fig.6 Effect of extraction temperature on the content of procyanidins in extracts

2.3 正交试验结果

DES-3提取荔枝壳原花青素正交优化工艺如表5所示,以原花青素含量为指标,其各个因素通过极差分析可得到影响原花青素提取量的主次顺序: B>C>D>A,即DES含水量>提取时间>提取温度>DES摩尔比。由表6的试验结果方差分析可知,各个单因素(DES摩尔比、DES含水量、提取时间及提取温度)均对原花青素提取量有显著性影响($P<0.05$)。

表 5 正交试验结果

Table 5 Results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	实验方案	原花青素含量 (mg PE/mL)
1	1	1	1	1	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	3.92
2	1	2	2	2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	4.10
3	1	3	3	3	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	3.85
4	2	1	2	3	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	4.15
5	2	2	3	1	A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	4.74
6	2	3	1	2	A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	3.20
7	3	1	3	2	A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	4.24
8	3	2	1	3	A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	4.43
9	3	3	2	1	A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	2.80

K ₁	11.87	12.31	11.56	11.46		
K ₂	12.09	13.28	11.05	11.54		
K ₃	11.48	9.85	12.83	12.44		
k ₁	3.96	4.10	3.85	3.82		
k ₂	4.03	4.43	3.68	3.85		
k ₃	3.83	3.28	4.28	4.15		

极差 R	0.20	1.14	0.59	0.32		

因素 主次				B>C>D>A		

最优 方案				A ₂ B ₂ C ₃ D ₃		

表 6 试验结果方差分析

Table 6 Analysis of variance of orthogonal experiment results

方差来源	III型平方和	df	均方	F	Sig.
校正模型	4.059 ^a	8	0.507	91.329	0.003
截距	147.778	1	147.778	26600.013	0.000
A	0.069	2	0.034	6.187	0.009
B	2.220	2	1.110	199.839	0.002
C	0.626	2	0.313	56.342	0.003
D	0.223	2	0.111	20.047	0.005
误差	5.556E ⁻⁶	1	5.556E ⁻⁶		
总计	168.165	10			
校正的总计	4.059	9			

注: R²=1.000 (调整后 R²=1.000)。

2.4 验证实验

为了更深入研究正交试验结果的可靠性, 将正交试验结果得到的最优工艺 A₂B₂C₃D₃, 即 DES 摩尔比为 1:4、DES 含水量为 50% (V/V)、提取时间

为 90 min、提取温度为 60 °C, 进行验证试验, 并重复 3 次。在此优化工艺条件下, 荔枝壳原花青素提取量达到 5.07 mg PE/mL, 确证为最优提取条件, 故确定该条件为 DES 提取荔枝壳原花青素最优提取工艺。在最优提取工艺的条件下, 氯化胆碱-1,3-丁二醇提取荔枝壳原花青素含量为乙醇提取原花青素 (3.61 mg PE/mL) 的 1.40 倍。

2.5 抗氧化活性试验结果

2.5.1 ORAC 结果

氯化胆碱-1,3-丁二醇与乙醇提取液的荔枝壳原花青素的氧自由基吸收能力 (ORAC) 结果如表 7 所示, 其 ORAC 值分别为 5 496.25 μmol TE/mL 及 3 370.17 μmol TE/mL, 且前者是后者的 1.63 倍, 表明氯化胆碱-1,3-丁二醇提取的原花青素氧自由基吸收能力更强。

表 7 荔枝壳原花青素的 ORAC 值

Table 7 ORAC value of litchi pericarp procyanidins

样品溶剂	ORAC 值/(μmol TE/mL)
氯化胆碱-1,3-丁二醇	5 496.25±127.88 ^a
70% 乙醇	3 370.17±128.80 ^b

2.5.2 清除 DPPH 自由基结果

氯化胆碱-1,3-丁二醇与乙醇提取液的 DPPH 自由基清除能力的结果见图 7, 在低质量浓度时, 氯化胆碱-1,3-丁二醇提取液的 DPPH 自由基清除能力显著优于乙醇提取液。而在高质量浓度时, 两者的 DPPH 自由基清除率皆达 90% 以上。两者的 DPPH 自由基的半清除率 (IC₅₀ 值) 分别为 27.35 μg PE/mL 与 36.41 μg PE/mL, 表明氯化胆碱-1,3-丁二醇提取的原花青素清除 DPPH 自由基能力更强。

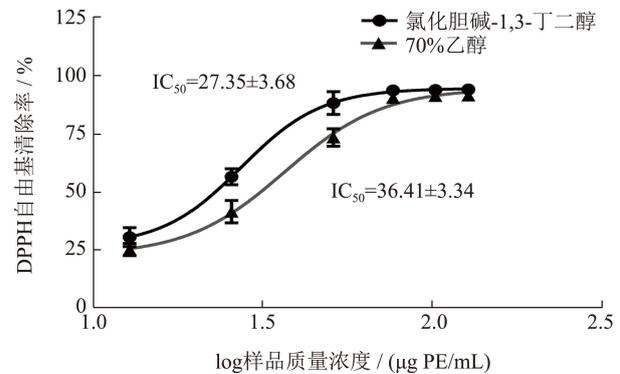


图 7 荔枝壳原花青素对 DPPH 自由基清除率曲线
Fig.7 DPPH free radical scavenging curve of litchi pericarp procyanidins

2.5.3 清除ABTS⁺自由基结果

氯化胆碱-1,3-丁二醇与乙醇提取的荔枝壳原花青素的ABTS⁺自由基清除能力结果见图8,结果显示,两种溶剂提取的原花青素都具有良好的ABTS⁺自由基清除能力,在76.72 μg/mL时两者清除率均可达100%,其IC₅₀值分别在23.82 μg PE/mL与31.56 μg PE/mL,氯化胆碱-1,3-丁二醇提取的原花青素清除ABTS⁺自由基能力更强。

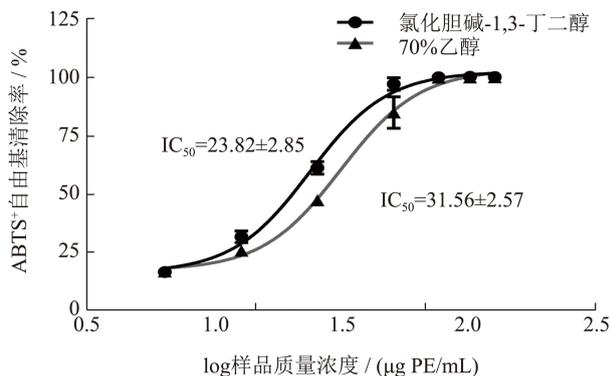


图8 荔枝壳原花青素对ABTS⁺自由基清除率曲线

Fig.8 ABTS free radical scavenging curve of litchi pericarp procyanidins

氯化胆碱-1,3-丁二醇提取的荔枝壳原花青素提取物具有更好的抗氧化活性,这可能与氯化胆碱-1,3-丁二醇荔枝壳提取液中总酚、总黄酮以及原花青素含量显著高于70%乙醇荔枝壳提取液有关($P < 0.05$)。抗氧化物质清除自由基的本质是电子的转移,即自由基从抗氧化物质上获得电子转变为中性分子的形式^[36,37]。Mirahmadi等^[38]认为酚类物质的含量与自由基清除之间存在显著相关性,酚类物质含量越高,其提供电子的能力越强,即自由基清除能力也就越强。而Bu^[39]和Fu等^[40]研究表明,相较于传统有机试剂,低共熔溶剂提取酚类物质的能力更强,其提取物的抗氧化能力也更强。所以,氯化胆碱-1,3-丁二醇提取物的酚类物质含量越高,其抗氧化能力就越强。

3 结论

本文通过比较4种低共熔溶剂与70%(V/V)乙醇提取法对荔枝壳提取液中原花青素含量及mDP、总酚和总黄酮含量、单体成分组成及ORAC活性的影响,筛选出氯化胆碱-1,3-丁二醇为最佳提取溶剂。进一步考察了料液比、DES摩尔比、DES含水量、提取时间及提取温度5个单因素对原花青素提取得

率的影响,结合正交试验优化得到荔枝壳原花青素的**最佳提取工艺**:氯化胆碱-1,3-丁二醇为溶剂,料液比1:20(g/mL),溶剂摩尔比1:4,含水量50%(V/V),提取温度60℃,提取时间90min。在此条件下测得的荔枝壳原花青素含量为5.07 mg PE/mL,是70%(V/V)乙醇提取液的1.4倍。氯化胆碱-1,3-丁二醇提取物的ORAC值以及清除DPPH和ABTS自由基的IC₅₀值分别为5 496.25 μmol TE/mL、27.35 μg PE/mL和23.82 μg PE/mL,均优于70%(V/V)乙醇提取液(3 370.17 μmol TE/mL、36.41 μg PE/mL和31.56 μg PE/mL)。本试验为荔枝壳原花青素的绿色高效提取和高值化利用提供理论依据和技术支撑。

参考文献

- [1] SNEH P, MANOJ K. Litchi (*Litchi chinensis*) seed: nutritional profile, bioactivities, and its industrial applications [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 108: 58-70.
- [2] 卢素珊,涂桢楷,赵锡和,等.我国荔枝加工技术研究现状[J].现代农业装备,2022,43(2): 14-17,48.
- [3] BANGAR S, KUMAR M, WHITESIDE S, et al. Litchi (*Litchi chinensis*) seed starch: structure, properties, and applications-A review [J]. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 2021, 2: 100080.
- [4] LIN S, WEN L R, YANG B, et al. Improved growth of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* as well as increased antioxidant activity by biotransforming litchi pericarp polysaccharide with *Aspergillus awamori* [J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 413793.
- [5] ZENG Q Z, XU Z H, DAI M R, et al. Effects of simulated digestion on the phenolic composition and antioxidant activity of different cultivars of lychee pericarp [J]. BMC Chemistry, 2019, 13(1): 27-37.
- [6] LOURITH N, KANLAYVATTANAKUI M. Formulation and clinical evaluation of the standardized *Litchi chinensis* extract for skin hyperpigmentation and aging treatments [J]. Annales Pharmaceutiques Françaises, 2010, 78(2): 142-149.
- [7] 王满生,王发祥,杨晶,等.莲房原花青素提取方法、生理功能及其在食品工业中应用的研究进展[J].食品工业科技,2021,42(5): 349-356.
- [8] MAXIMILIAN N, THOMAS W, SUSANNE L. Deep eutectic solvents as entrainers in extractive distillation-A review [J]. Chemical Engineering Research and Design, 2022, 184: 402-418.
- [9] JOAN G L, NARENDAR K, MARK J W. Deep eutectic solvents' ability to solubilize lignin, cellulose,

- and hemicellulose; thermal stability; and density [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 238: 684-689.
- [10] ZHOU P F, TANG D B, ZOU J B, et al. An alternative strategy for enhancing stability and antimicrobial activity of catechins by natural deep eutectic solvents [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 153: 112558.
- [11] CHEN Z Q, WU K W, ZHU W Z, et al. Chemical compositions and bioactivities of essential oil from perilla leaf (*Perillae folium*) obtained by ultrasonic-assisted hydro-distillation with natural deep eutectic solvents [J]. *Food Chemistry*, 2022, 375: 131834.
- [12] ZHANG Q H, VIGIER K D O, ROYER S, et al. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(21): 7108-7146.
- [13] ANDREA P H, MYOLANDA G F, JOSE E B, et al. Obtaining green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic solvents [J]. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2022, 29: 100773.
- [14] 卢琦,贾翔超,邓梅,等.不同干制方式对沙田柚果渣酚类物质的影响[J].*中国农业科学*,2022,55(14): 2825-2836.
- [15] 赖婷,刘磊,张名位,等.不同乳酸菌发酵对桂圆肉中酚类物质及抗氧化活性的影响[J].*中国农业科学*,2016, 49(10):1979-1989.
- [16] WANG Y F, AJAY P S, WILLIAM J H, et al. Influence of degree-of-polymerization and linkage on the quantification of *Proanthocyanidins* using *4-Dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC)* assay [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(11): 2190-2199.
- [17] 魏冠红,魏作君,苏宝根,等.测定原花青素平均聚合度的一种新方法[J].*中国食品学报*,2006,6(6): 112-116.
- [18] YU Q, WANG F, JIAN Y T, et al. Extraction of flavonoids from *Glycyrrhiza* residues using deepeutectic solvents and its molecular mechanism [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 363: 119848.
- [19] GLORIA D R, MARIA L M, MERICHEL P. Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants [J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1514(8): 1-15.
- [20] MOHAMAD S C Z, JEN X Y, SOO Y L, et al. Physicochemical properties of choline chloride-based natural deep eutectic solvents (NaDES) and their applicability for extracting oil palm flavonoids [J]. *Sustainability*, 2021, 13(23): 12981.
- [21] WANG G, CUI Q, YIN L J, et al. Efficient extraction of flavonoids from *Flos sophorae immaturus* by tailored and sustainable deep eutectic solvent as green extraction media [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, 170: 285-294.
- [22] MDASRAFUL A, GUL M, MNURUZZAMAN K, et al. Choline chloride-based deep eutectic solvents as green extractants for the isolation of phenolic compounds from biomass [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 309: 127445.
- [23] 马焯.红米原花青素的提取纯化与抗氧化活性研究[D].南昌:南昌大学,2016.
- [24] 蔡灿军.不同MA包装对荔枝采后贮藏生理的影响[D].福州:福建农林大学,2020.
- [25] 杨丽珍.荔枝壳多酚抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的作用及其机制研究[D].广州:华南农业大学,2017.
- [26] ZHENG B L, YUAN Y, XIANG J L, et al. Green extraction of phenolic compounds from foxtail millet bran by ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction: optimization, comparison and bioactivities [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 154: 112740.
- [27] ELISABETE S C F, IULIA V V, FIGUEIREDO N, et al. Molecular dynamic study of alcohol-based deep eutectic solvents [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2021, 155(6): 064506.
- [28] CHUNYAN M, AATTO L, LIU C, et al. The peculiar effect of water on ionic liquids and deep eutectic solvents [J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(23): 8685-8720.
- [29] MARIA V, JUSTYNA P W, VASIL A. The role of water in deep eutectic solvent-base extraction [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 304: 112747.
- [30] 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 and Biomedical Analysis*, 2018, 158: 317-326.
- [31] VOLNEI B D S, AUGUSTO T H, MARCELO T, et al. Study of extraction kinetics and characterization of proanthocyanidin-rich extract from *Ceylon cinnamon (Cinnamomum zeylanicum)* [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2021, 45(5): e15429.
- [32] 都宏霞,缪领珍,胡梓恒,等.低共熔溶剂提取桂花黄酮的工艺优化[J].*现代食品科技*,2021,37(5): 203-211.
- [33] LINA B, FELIX I D, VYACHESLAV P. Effects of temperature and water content on physicochemical properties of ionic liquids containing $\text{CrCl}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ and choline chloride [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2016, 223: 48-53.
- [34] LIZANDRA K, DANIELLE C, NINA W, et al. Influence of temperature, water content and type of organic acid on the formation, stability and properties of functional natural deep eutectic solvents [J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2019, 488: 40-47.

- [35] 只德贤,张妮,李建颖.微波超声协同提取白刺果原花青素工艺及抗氧化性研究[J].食品工业科技,2022, 43(13): 171-179.
- [36] LI X C, OUYANG X J, CAI R X, et al. 3',8''-dimerization enhances the antioxidant capacity of flavonoids: evidence from acacetin and isoginkgetin [J]. *Molecules*, 2019, 24(11): 2039.
- [37] LI X C. Comparative study of 1,1-diphenyl -2-picrylhydrazyl radical (DPPH·) scavenging capacity of the antioxidant xanthones family [J]. *Chemistry Select*, 2018, 3(46): 13081-13086.
- [38] SEYED F, REZA N. Chemical composition, phenolic content, free radical scavenging and antifungal activities of *Achillea biebersteinii* [J]. *Food Bioscience*, 2017, 18: 53-59.
- [39] BU F Z, ZHAO Y Q, LI B, et al. The effect of choline *Chloride-butenediol* based deep eutectic solvents on ultrasound-assisted extraction, antioxidant activity and stability of anthocyanins extracted from *Perilla frutescens* (L.) Britt. [J]. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2023, 32: 101000.
- [40] FU X Z, TARUN W, HE Y H, et al. UPLC-Triple-TOF/MS characterization of phenolic constituents and the influence of natural deep eutectic solvents on extraction of *Carya cathayensis* sarg. peels: composition, extraction mechanism and in vitro biological activities [J]. *Food Chemistry*, 2022, 370: 131042.