

微波辅助离子液体提取罗布麻叶总黄酮及其抗氧化活性研究

潘思源, 田英姿, 韦士鹏

(华南理工大学轻工科学与工程学院, 广东广州 510641)

摘要: 探究微波辅助离子液体提取罗布麻叶总黄酮的最佳提取工艺, 并评价其抗氧化活性。先通过单因素试验确定离子液体类型, 筛选出工艺中影响总黄酮提取量的显著性因素, 后设计“三因素五水平”的中心组合试验优化提取条件, 并建立响应面数学模型。试验所得最佳工艺为: 离子液体浓度 0.73 mol/L、液料比 19:1 mL/g、微波时间 10 min、微波功率 483 W、温度 70 °C, 此条件下总黄酮提取量的平均值为 14.10±0.202 mg/g, 与模型的预测值基本吻合, 提取量较传统提取工艺有明显提高。对提取量影响最显著的三个因素依次是离子液体浓度、液料比、微波功率。抗氧化活性试验显示, 羟自由基和 DPPH 自由基的清除率随罗布麻叶总黄酮质量浓度的升高而增大, 均表现出较好的量效关系, 对应的 IC₅₀ 值为 27.88 μg/mL、13.61 μg/mL, 分别是 Vc 的 1.71、2.26 倍, 表明罗布麻叶总黄酮具有较强的抗氧化能力。

关键词: 离子液体; 罗布麻叶; 总黄酮; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2019)07-182-190

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.25

Ionic Liquid-based Microwave-assisted Extraction and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Apocynum venetum* L. Leaves

PAN Si-yuan, TIAN Ying-zi, WEI Shi-peng

(College of Light Industry Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: The optimal ionic liquid-based microwave-assisted extraction process of the total flavonoids from *Apocynum venetum* L. leaves was investigated, and the antioxidant activity of the extract was evaluated. Firstly, the type of ionic liquid was determined in single factor experiments, and the significant factors affecting the extracted amount of total flavonoids in the process were screened out. The extraction conditions were optimized by the central composite post-design with three factors and five levels and the response surface mathematical model. The optimum process conditions were as follows: ionic liquid concentration 0.73 mol/L, liquid-solid ratio 19:1 mL/g, microwave time 10 min, microwave power 483 W, temperature 70 °C. Under these conditions, the average extraction rate of total flavonoids was 14.10±0.202 mg/g (which was essentially consistent with the predicted value), and the extraction yield was significantly improved compared with that for the conventional extraction process. The three factors affecting the most the extraction yield were ionic liquid concentration, liquid-solid ratio, and microwave power. The results of the antioxidant activity experiments showed that the scavenging rate of ·OH radical and DPPH free radical increased with the increase of the concentration of total flavonoids from *Apocynum venetum* L. leaves, and exhibited a good dose-effect relationship. The corresponding IC₅₀ values were 27.88 and 13.61 μg/mL (which were 1.71 and 2.26 times of those for Vc, respectively), indicating that the total flavonoids from *Apocynum venetum* L. leaves had strong antioxidant capacity.

Key words: ionic liquid; *Apocynum venetum* L. leaves; total flavonoids; antioxidant

罗布麻 (*Apocynum venetum* L.), 隶属夹竹桃科白麻属, 为直立半灌木, 主要分布在我国新疆、甘肃和

收稿日期: 2019-01-13

基金项目: 广东中烟工业有限责任公司科技项目 (粤烟工 05XM-QK [2015] 001)

作者简介: 潘思源 (1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物资源综合利用

通讯作者: 田英姿 (1966-), 女, 教授, 硕士, 研究方向: 植物资源综合利用

青海等中西部地区^[1]。研究表明, 罗布麻是一种可以全株入药的传统药用植物, 其中罗布麻叶因黄酮类物质 (异槲皮苷、金丝桃苷、芦丁等) 含量较高、泡水饮用口感优良、茶叶价格相对低廉等优势, 现已成为深受中老年人青睐的抗氧化保健饮品, 且在相关动物试验中表现出显著的清除自由基、降血压、抗抑郁、抗焦虑、消除炎症、抗神经衰弱等多种药理功效^[2-4]。近年来, 越来越多的学者关注到罗布麻叶的医学及经

济价值, 对其所含不同种抗氧化活性成分的鉴定、提取、分离纯化和应用研究逐渐深入。

当前罗布麻叶总黄酮的提取工艺主要有乙醇浸提法^[5]、超临界 CO₂ 萃取法^[6]、超声波辅助法^[7]等, 常用乙醇、甲醇等挥发性有机溶剂, 提取效率普遍不高, 还会造成环境污染。室温离子液体 (Room temperature ionic liquids, ILs) 作为一种环境友好型溶剂, 与水 and 常规有机溶剂相比, 具有离子导电性高、挥发性低、极性高、溶解及萃取能力好、化学稳定性高等特点, 可溶解纤维素并破坏植物细胞壁, 在天然产物萃取及分离领域的应用前景十分广阔^[8,9]。离子液体提取所得粗黄酮通常采用“双水相系统-有机醇反萃取”法进行分离纯化, 不同于柱层析、溶剂萃取等常规方法, 该法不仅纯化效率高且能回收离子液体。此外, 离子液体对微波有较强的吸收和热转化能力, 与超声波也可产生明显的协同效应^[10,11], 微波 (或超声波) 结合离子液体可有效提高天然产物的提取率、减少提取溶剂用量、缩短提取时间、降低分离纯化难度, 已被应用在不同原料黄酮类物质的提取工艺研究之中^[12-15]。

鉴于超声波辅助提取过程恒温控制难度大, 试验可重复性较差, 本研究采用微波辅助离子液体法从罗布麻叶中提取总黄酮, 通过单因素结合响应面试验优化提取工艺, 并评价其体外抗氧化活性, 为罗布麻叶总黄酮的提取工艺革新及应用研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

罗布麻叶, 2017 年 8 月采自新疆罗布泊, 筛选清洗后于 60 °C 真空干燥箱中烘干, 粉碎过 60 目筛备用。

1-烷基-3-甲基咪唑溴盐 ([C_nmim]Br, n=2, 4, 6, 8)、1-烷基-3-甲基咪唑氯盐 ([C_nmim]Cl, n=2, 4, 6)、1-烷基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ([C_nmim][BF₄], n=4, 6, 8) (纯度均≥97%), 阿拉丁公司; 芸香叶苷标准品 (HPLC≥98%)、2,2-联苯基-1-苦基肼基 (DPPH·) 标准品 (HPLC≥97%), 麦克林公司; 无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、硫酸亚铁、水杨酸、过氧化氢、L-抗坏血酸 (Vc), 均为市售分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-2600 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; XH-200A 微波固液相合成萃取工作站, 北京祥鹤科技发展有限公司; DZF-6096 真空干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; FW100 高速万能粉碎机, 天津泰斯特仪器有限公司; TGL20MC 台式高速冷冻离心机, 长

沙英泰仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的绘制

对文献^[16]方法稍作改进, 用 60%乙醇溶液配制浓度为 0.2 mg/mL 的芸香叶苷标准溶液, 分别移取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0 mL 至不同 10 mL 容量瓶中, 各加 5% NaNO₂ 溶液 0.2 mL, 摇匀后静置 6 min; 再加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.2 mL, 摇匀后静置 6 min; 最后加 4% NaOH 溶液 2.0 mL, 摇匀后定容, 避光静置 15 min。由于黄酮类化合物在紫外可见光波长 510 nm 处有最大吸收峰, 在此波长下测出待测液的吸光度值, 绘制芸香叶苷标准品质量 x (mg) 和吸光度值 y 的标准曲线, 所得回归方程为: $y=1.4512x-0.0074$ ($R^2=0.9998$)。

1.3.2 罗布麻叶总黄酮提取量的测定

精确称取 0.500 g 罗布麻叶样品, 以离子液体的水溶液为提取剂, 在不同条件下进行微波辅助法提取总黄酮。将所得提取液先经过 10 min 10000 r/min 冷冻离心处理, 再用 0.22 μm 的有机相针式滤器过滤上层清液, 待滤液温度恢复至室温后转移至 25 mL 容量瓶, 用 60%乙醇溶液定容。移取 2.0 mL 定容后提取液用于配制待测液, 测出吸光度值并代入标准曲线算出待测液中总黄酮质量, 方法同 1.3.1。由 (1) 式计算出罗布麻叶总黄酮提取量为:

$$\text{总黄酮提取量}/(\text{mg/g}) = \frac{m \times V_0}{M \times V_1} \quad (1)$$

式中: M 为罗布麻叶样品的质量, g; m 为待测提取液中总黄酮的质量, mg; V_0 为提取液的定容体积, mL; V_1 为待测提取液的体积, mL。

1.3.3 离子液体种类确定

以罗布麻叶样品总黄酮提取量为参考指标, 固定微波辅助提取的反应条件为离子液体浓度 1.0 mol/L、液料比 20:1 mL/g、微波时间 15 min、微波功率 400 W 及温度 80 °C, 改变离子液体种类, 对比选取最优离子液体类型。

1.3.4 单因素试验设计

确定离子液体浓度 0.8 mol/L、液料比 20:1 mL/g、微波时间 15 min、微波功率 400 W 和温度 80 °C 为固定因子, 分别考察离子液体浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mol/L)、液料比 (10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1 mL/g)、微波时间 (5、10、15、20、25、30、35、40 min)、微波功率 (200、300、400、500、600、700、800 W) 和温度 (30、40、50、60、70、80、90 °C) 对罗布麻叶总黄酮提取量的影响。

1.3.5 响应面试验优化提取工艺^[17]

以总黄酮提取量为响应值(Y),选取1.3.4中对总黄酮提取量影响较大的三个因素:离子液体浓度(A, mol/L)、液料比(B, mL/g)和微波功率(C, W)作为独立变量,采用中心组合设计法设计“三因素五水平”响应面试验,各因素及对应水平见表1。

表1 中心组合试验因素与水平

Table 1 Factors and their levels of central composite design test

因素	水平				
	-1.68	-1	0	1	1.68
A 离子液体浓度/(mol/L)	0.46	0.6	0.8	1.0	1.14
B 液料比/(mL/g)	11.6	15	20	25	28.4
C 微波功率/W	332	400	500	600	668

1.3.6 罗布麻叶中总黄酮抗氧化性能测定

1.3.6.1 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率测定^[16]

在最优条件下提取罗布麻叶样品中的总黄酮,并用提取溶剂(即0.73 mol/L $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 的水溶液)将提取液稀释成质量浓度为5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 $\mu\text{g/mL}$ 的罗布麻叶黄酮溶液,各取2.0 mL于10 mL具塞刻度试管中。依次加入0.006 mol/L FeSO_4 溶液和0.006 mol/L H_2O_2 溶液各2.0 mL,摇匀后静置10 min。后加入0.006 mol/L水杨酸溶液2.0 mL,摇匀后静置30 min作为试验组,并测出510 nm波长处的吸光度值 A_1 。再测出对照组(用2.0 mL超纯水替代试验组中2.0 mL水杨酸溶液)以及空白组(用2.0 mL超纯水替代试验组中2.0 mL各浓度黄酮溶液)的吸光度值分别为 A_2 、 A_0 。由(2)式计算出罗布麻叶总黄酮对羟自由基的清除率:

$$\text{羟自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (2)$$

用提取溶剂溶解阳性对照物Vc,并配制为上述浓度梯度的溶液,同法测定其对羟自由基的清除率。

1.3.6.2 DPPH自由基清除率测定^[18]

同1.3.6.1,稀释提取液得到质量浓度为5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 $\mu\text{g/mL}$ 的罗布麻叶黄酮溶液,各取2.0 mL于10 mL具塞刻度试管中。加入0.04 g/L用无水乙醇配制的DPPH溶液2.0 mL,摇匀避光静置30 min,离心后取上清液作为试验组,于517 nm波长处测出吸光度值 A_1 。再测出对照组(用2.0 mL无水乙醇替代试验组中2.0 mL DPPH溶液)以及空白组(用2.0 mL无水乙醇替代试验组中2.0 mL各浓度黄酮溶液)的吸光度值分别为 A_2 、 A_0 。由(3)式计算出DPPH自由基的清除率:

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (3)$$

用提取溶剂溶解阳性对照物Vc,并配制为上述浓度梯度的溶液,同法测定其对DPPH自由基的清除率。

1.4 数据分析

所有数据结果均以“平均值(单一试验做三组平行) $\pm$ 标准偏差”表示,即“ $\bar{x} \pm \text{SD}$ ”。数据处理及图像绘制采用分析软件Excel 2016和Design-Expert 8.0.6。

2 结果与讨论

2.1 离子液体种类的确定

选取阴离子或阳离子烷基链不同的10种咪唑类离子液体的水溶液作为提取剂,在相同提取条件下,对比其罗布麻叶总黄酮提取量。相关研究表明,影响该提取量的因素众多,主要取决于离子液体的疏水性、黏度、对黄酮类物质的溶解性以及氢键结合能力,且与提取样品本身相关,不同样品所适用的离子液体种类各不相同。

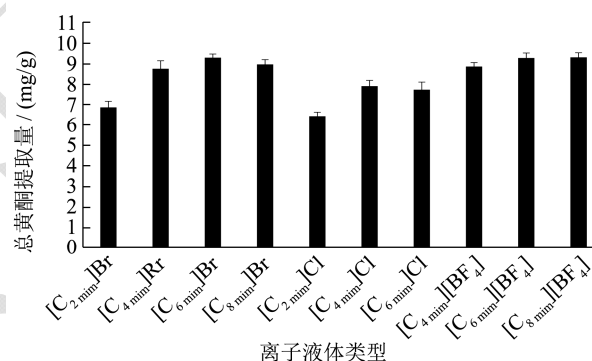


图1 离子液体种类对总黄酮提取量的影响

Fig.1 Effect of ionic liquid species on the extraction of total flavonoids

由图1可知,当离子液体的阴离子相同时,随着阳离子烷基链不断增长,溴盐和氯盐离子液体的总黄酮提取量先升后降,四氟硼酸盐离子液体的提取量升高后趋于不变。提取量上升是因为离子液体在提取过程中会和植物细胞壁中的纤维素形成氢键网状结构,较长的烷基链可以增大结构空隙,有利于提取成分的溶出;而提取量有所降低或无明显增加,一是因为烷基链越长离子液体的黏度越大,活性成分在提取溶剂中的传质阻力变大,二是因为过长的烷基链有很强的位阻效应,会显著减弱黄酮类化合物分子中芳香环与离子液体中咪唑环之间的色散力,两者共同作用阻碍了有效成分的溶出^[19]。

当离子液体的阳离子相同时,溴盐离子液体的总黄酮提取量与四氟硼酸盐离子液体较为接近,远高于氯盐离子液体。这是因为不同阴离子对黄酮类物质的

多重交互作用（如溶剂效应、 π - π 键等）不同，会影响活性成分在离子液体中的溶解性，且溶解性与提取量呈正相关。另外，由于四氟硼酸盐离子液体的水稳定性较差，会在水溶液发生水解反应，且水解程度会随温度升高而增大，当总黄酮提取量接近时优先考虑其他类型离子液体^[20]。

基于以上原因，选择溴盐离子液体中总黄酮提取量最高的溴化 1-己基-3-甲基咪唑（[C₆mim]Br）用于后续试验。

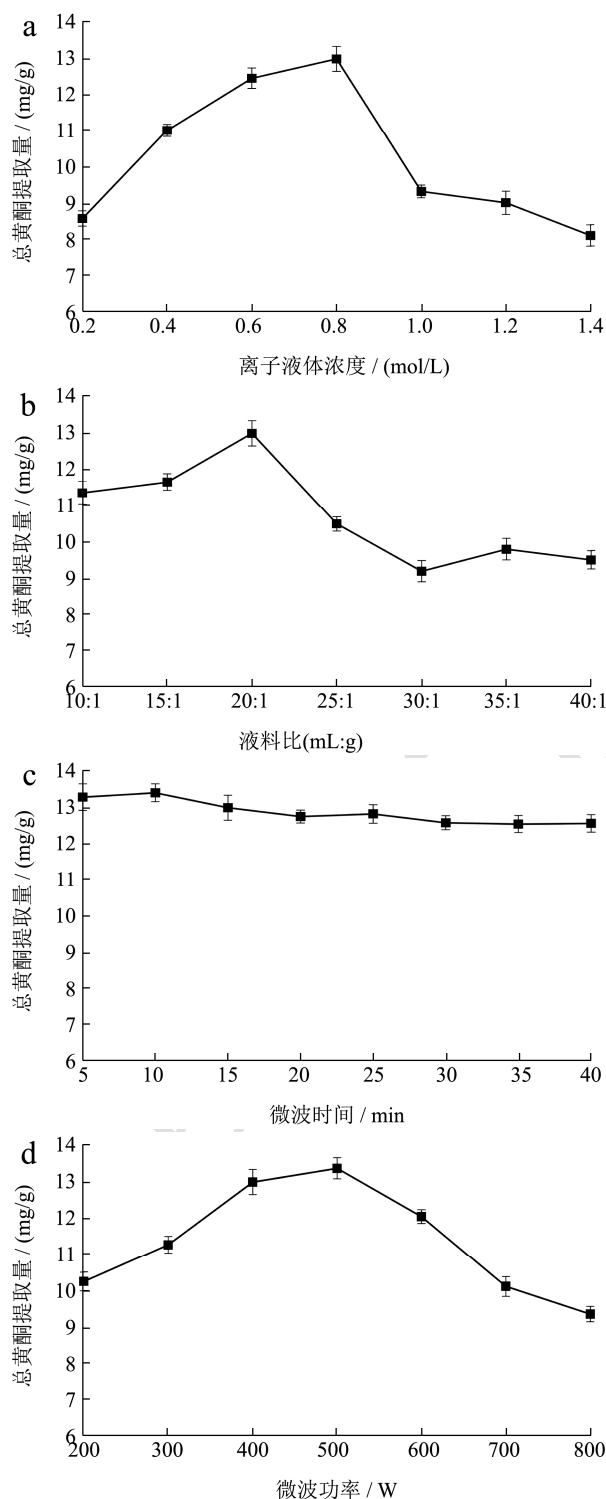


图2 各因素对总黄酮提取量的影响

Fig.2 Effect of various factors on the extraction rate of total flavonoids

注: a: 离子液体浓度; b: 液料比; c: 微波时间; d: 微波功率; e: 温度。

2.2 单因素试验分析

2.2.1 离子液体浓度

由图 2a 所示，随着离子液体浓度逐渐增加，总黄酮提取量稳定升高后出现骤降，且浓度为 0.8 mol/L 时有最大提取量 12.98 ± 0.345 mg/g。由于离子液体自身黏度较大，其水溶液的浓度与提取溶剂的黏度呈正相关，黏度过大不利于黄酮类物质的溶出，提取量显著降低，也影响了冷冻离心的分离效果。因此，选择离子液体浓度为 0.8 mol/L。

2.2.2 液料比

由图 2b 所示，当液料比从 10:1 mL/g 增大到 20:1 mL/g 时，总黄酮提取量随提取溶剂的增多而升高，当液料比大于 20:1 mL/g 后，提取量先显著降低，后略有升降起伏。由此可知，增大液料比只能在一定范围内提升总黄酮提取量，液料比过高导致提取量下降的原因可能是，原料在浸润程度达到最大后，过多提取溶剂导致非黄酮类杂质大量溶出，而竞争溶出关系会限制有效成分溶出，同时加大了溶剂的消耗量。因此，选择液料比为 20:1 mL/g。

2.2.3 微波时间

如图 2c 所示，提取时间从 5 min 增长到 10 min 时，总黄酮提取量略有升高，10 min 时有最大提取量为 13.39 ± 0.247 mg/g。10 min 后提取量总体上小幅下降，原因可能是提取时间的延长在促进黄酮类物质完全溶出的同时，也使其在微波环境下发生部分氧化或分解，导致提取量略有降低。另外，随着提取时间的增长，罗布麻叶细胞中部分色素和胶质等也随之大量溶出，给后续分离操作带来不便。因此，选择微波时间为 10 min。

2.2.4 微波功率

由图 2d 所示, 随微波功率的升高, 罗布麻叶总黄酮提取量呈现先升后降的趋势, 功率为 500 W 时有最大提取量 13.36 ± 0.289 mg/g。在一定范围内增大微波功率, 可使离子液体溶液迅速升温, 加快传质速率, 有利于提取溶剂进入细胞内, 促进黄酮类物质的溶出; 但微波功率过大, 不仅增加能耗和提取成本, 微波的强热效应还可能破坏黄酮类物质的结构, 并造成杂质成分过多溶出, 从而导致总黄酮提取量下降。因此, 选择微波功率为 500 W。

2.2.5 温度

由图 2e 所示, 随着提取温度的升高, 总黄酮提取量先缓慢升高后略有降低, 总体受温度的影响不大, 温度为 70 °C 时有最大提取量 13.10 ± 0.251 mg/g。一定范围内升温, 可有效提高黄酮类物质与离子液体溶质的扩散速率, 溶出量增大; 但在较高温度时 (70 °C 以上), 杂质成分溶出速率的加快会干扰黄酮的溶出, 且部分黄酮类物质在高温下会发生氧化反应而结构被破坏, 故总黄酮提取量有所下降。因此, 选择提取温度为 70 °C。

2.3 响应面试验设计与结果

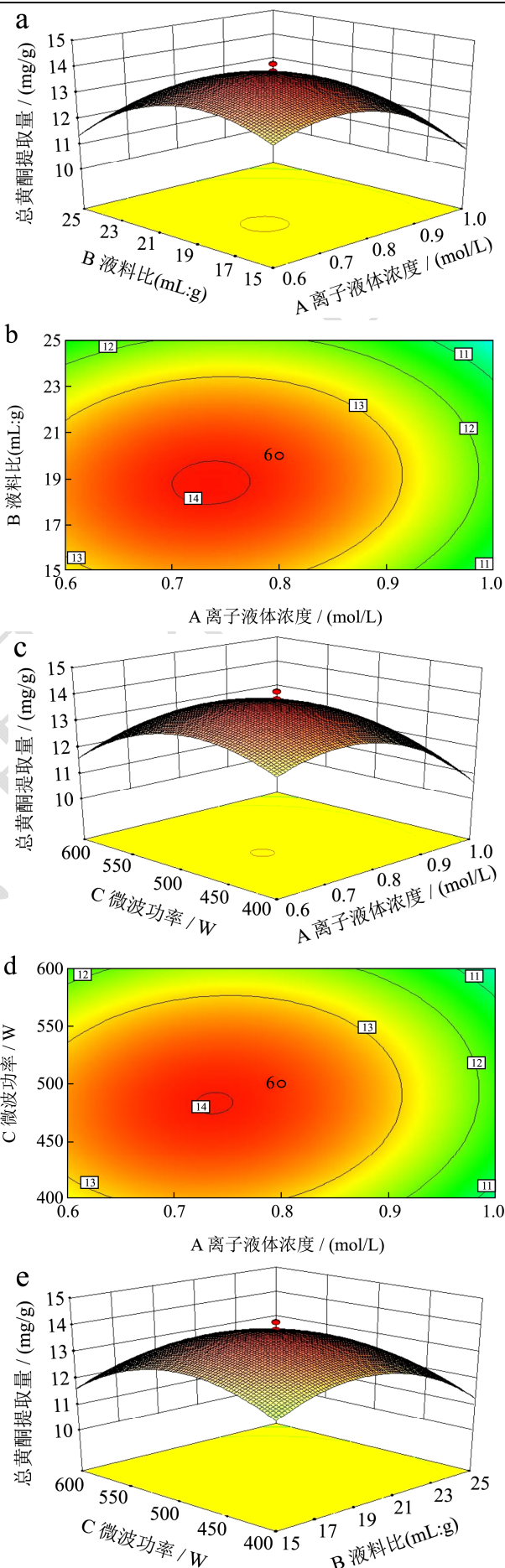
固定微波时间 10 min、提取温度 70 °C, 按照表 2 中所设计的中心组合方案进行响应面试验, 后通过 Design-Expert 8.0.6 软件处理试验数据, 方差分析结果见表 3, 响应面立体图及等高线图见图 3。

由表 3 可得, 该响应面二次模型的 F 值为 51.54 ($p < 0.0001$), 模型相关系数 $R^2 = 0.9789$, 模型校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9599$, 变异系数 C.V. = 3.46%, 失拟检验 $P = 0.0683 > 0.05$, 表明模型显著性极高, 试验数据与模型预测结果的拟合程度和相关性良好, 可以用于相应工艺条件下罗布麻叶总黄酮提取量的理论预测并确定最优工艺。经软件拟合可得回归方程:

$$Y = 13.86 - 0.80A - 0.52B - 0.33C + 0.20AB + 0.21AC - 0.17BC - 1.32A^2 - 1.25B^2 - 1.17C^2$$

若回归方程中系数的绝对值越大, 方差分析中 P 值越小, 则该项对罗布麻叶总黄酮提取量的影响程度较大。因此, 模型中因素 A、B、C、 A^2 、 B^2 及 C^2 对响应值的影响显著, 其中 A、B、 A^2 、 B^2 及 C^2 的影响达到极显著水平 ($p < 0.01$), 仅各交互项 AB、AC、BC 影响不显著。三因素的影响程度大小为: $A > B > C$, 即离子液体浓度 > 液料比 > 微波功率。

响应面 3D 曲面图和等高线图能够直观体现出各因素和两因素间交互作用对响应值影响的显著性, 图 3a 和 b、3c 和 d、3e 和 f 分别为因素 AB、因素 AC、因素 BC 的响应面 3D 曲面图和等高线图。



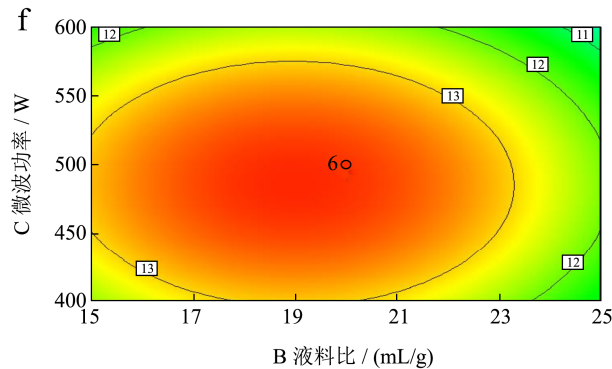


图3 两因素交互作用对总黄酮提取量的响应面图和等高线图

Fig.3 Response surface and corresponding contour plots showing the effects of two operating parameters on the extraction rate of total flavonoids

三个曲面图均为上凸形，总黄酮提取量随各因素升高均呈现先增大后减小的趋势，说明中心组合设计中所选择的因素水平合理。由曲面弯曲程度可知，离子液体浓度 A 对响应值的影响最为显著，高于液料比 B 和微波功率 C，且 AB 间和 AC 间的交互作用大于 BC，与交互项的方差分析结果一致。等高线图中，最大响应值出现在三因素-1~0~1 水平区间内，图 3b 和

3d 中等高线在离子液体浓度升高方向上分布最密集，因此增大离子液体浓度可以显著影响总黄酮提取量。

通过响应面模型所得到的最佳工艺为：离子液体浓度 0.73 mol/L、液料比 18.84:1 mL/g、微波功率 483.09 W，此时罗布麻叶总黄酮最大提取量的理论预测值为 14.08 mg/g。根据实际试验条件调整最佳工艺为：离子液体浓度 0.73 mol/L、液料比 19:1 mL/g、微波功率 483 W，五次平行试验所得罗布麻叶总黄酮提取量为 14.10±0.202 mg/g，与模型预测值十分接近，模型可靠性和试验可重复性较好。

为了验证微波辅助离子液体提取法的工艺优势，用乙醇热回流提取法和微波辅助乙醇提取法进行对比。参照文献^[5-7]中提取罗布麻叶总黄酮的最佳工艺，选择 60%乙醇溶液作为两种传统方法的提取溶剂，各提取方法所用液料比、微波功率、温度及时间见表 4。三种方法的总黄酮提取量由高到低依次为：微波辅助离子液体提取法、微波辅助乙醇提取法、乙醇热回流提取法。因此，在相同提取温度下，采用微波辅助离子液体提取法可以获得更高的总黄酮得率，且提取时间大幅缩短、提取溶剂消耗量降低。

表2 中心组合试验设计及结果

Table 2 Program and experimental results of central composite design test

试验号	A 离子液体浓度/(mol/L)	B 液料比/(mL/g)	C 微波功率/W	Y 总黄酮提取量/(mg/g)
1	1.14	20	500	9.07
2	1.0	15	400	9.38
3	0.8	20	500	13.77
4	0.8	20	332	11.39
5	1.0	15	600	9.22
6	0.8	11.6	500	11.81
7	0.6	25	600	9.59
8	0.8	20	500	14.13
9	1.0	25	600	8.76
10	0.8	20	500	13.53
11	0.6	15	600	10.72
12	0.8	28.4	500	9.41
13	0.6	15	400	11.82
14	0.8	20	500	14.10
15	0.6	25	400	10.65
16	0.8	20	500	13.65
17	0.46	20	500	11.77
18	0.8	20	500	13.86
19	1.0	25	400	9.10
20	0.8	20	668	10.27

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis of the regression model					
方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	70.82	9	7.87	51.54	<0.0001**
A 离子液体浓度/(mol/L)	8.64	1	8.64	56.57	<0.0001**
B 液料比/(mL/g)	3.67	1	3.67	24.01	0.0006**
C 微波功率/W	1.51	1	1.51	9.90	0.0104*
AB	0.30	1	0.30	1.99	0.1885
AC	0.34	1	0.34	2.26	0.1640
BC	2.45×10 ⁻³	1	2.45×10 ⁻³	0.016	0.9017
A ²	25.07	1	25.07	164.16	<0.0001**
B ²	22.58	1	22.58	147.86	<0.0001**
C ²	19.86	1	19.86	130.05	<0.0001**
剩余项	1.53	10	0.15		
失拟检验	1.24	5	0.25	4.28	0.0683
纯误差	0.29	5	0.06		
总离差	72.35	19			

注: ** $p < 0.01$, 表示差异极显著; * $p < 0.05$, 表示差异显著。

表 4 微波辅助离子液体提取法与传统提取方法的比较

Table 4 Comparison of ionic liquid-based microwave-assisted extraction with traditional extraction methods						
提取方法	提取溶剂	液料比/(mL/g)	功率/W	温度/℃	时间/min	总黄酮提取量/(mg/g)
乙醇热回流法	60%乙醇	40:1	-	70	240	7.22±0.286
微波乙醇法	60%乙醇	40:1	500	70	10	10.39±0.247
微波乙醇法	60%乙醇	20:1	500	70	10	9.47±0.175
微波离子液体法	0.8 mol/L [C ₆ mim]Br	20:1	500	70	10	13.84±0.241

2.4 抗氧化活性分析

以羟自由基清除率和 DPPH 自由基清除率为参考指标, 对优化条件下所提取的罗布麻叶总黄酮进行体外抗氧化活性评价。

2.4.1 羟自由基清除率

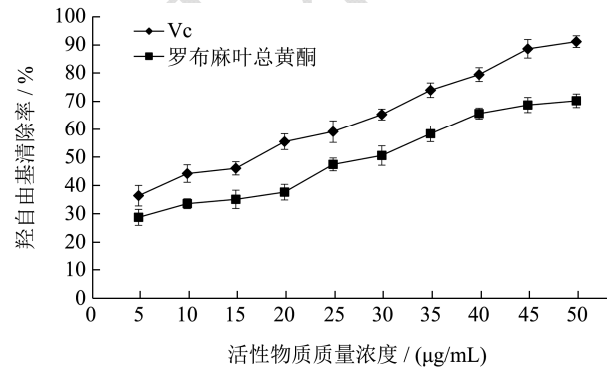


图 4 罗布麻叶总黄酮和 Vc 对羟自由基的清除作用

Fig.4 Hydroxyl radicals scavenging effects of total flavonoids of *Apocynum venetum* L. leaves and Vc

羟自由基性质活泼, 得电子能力极强, 很多物质都能被其氧化, 而 Vc、黄酮、多酚等抗氧化剂对羟自

由基具有清除或抑制其产生的作用, 进而阻断了氧化反应发生的路径^[18]。图 4 结果显示, 在质量浓度为 5~50 μg/mL 范围内, 罗布麻叶总黄酮清除·OH 的能力小于同浓度的阳性对照物。随着质量浓度的增大, 罗布麻叶总黄酮和 Vc 对·OH 的清除能力逐渐增强, 整体变化趋势相近且相关性较好, 回归方程的相关性系数分别为 0.977、0.992。当浓度为 50 μg/mL 时, 两种物质对·OH 的清除率均达到最大值, 其中罗布麻叶总黄酮为 70.21%±2.41%, 低于 Vc 的 91.15%±2.07%, 这可能与提取所得总黄酮的纯度较低有关^[21]。另外, Vc 的 IC₅₀ (半数清除率浓度) 为 16.29 μg/mL, 而罗布麻叶总黄酮的 IC₅₀ 为 27.88 μg/mL, 是 Vc 的 1.71 倍。由此可见, 罗布麻叶总黄酮对于·OH 的清除能力弱于强抗氧化剂 Vc, 但仍有较好的清除效果, 且与其质量浓度有一定的量效关系。

2.4.2 DPPH 自由基清除率

DPPH 自由基性质较为稳定, 可被具有抗氧化性的活性物质清除, 且自由基清除率与该物质抗氧化能力呈正相关^[18]。试验结果如图 5 所示, 罗布麻叶总黄酮清除 DPPH 自由基的能力弱于同浓度的阳性对照,

两种活性物质对 DPPH 自由基的清除率随质量浓度的增加而增大, 到达一定浓度后增长趋于平缓, 剂量依赖性降低。在质量浓度为 5~25 $\mu\text{g/mL}$ 范围时, Vc 对 DPPH 自由基的清除率与其质量浓度间相关性较好, 回归方程为 $y=1.944x+38.32$ ($R^2=0.990$); 在质量浓度为 5~40 $\mu\text{g/mL}$ 范围时, 罗布麻叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除率与其质量浓度间相关性较好, 回归方程为 $y=1.461x+30.12$ ($R^2=0.950$)。由回归方程得 Vc 的 IC_{50} 为 6.01 $\mu\text{g/mL}$, 而罗布麻叶总黄酮的 IC_{50} 为 13.61 $\mu\text{g/mL}$, 是 Vc 的 2.26 倍。当质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 罗布麻叶总黄酮的最大清除率高达 $86.67\%\pm 3.03\%$, 仅与 Vc 相差 6.93%。因此, 罗布麻叶总黄酮对 DPPH 自由基具有较强的清除能力, 但清除效果不及 Vc^[22,23]。

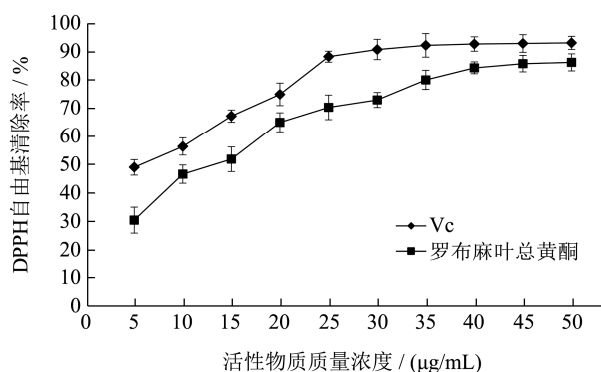


图5 罗布麻叶总黄酮和 Vc 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.5 DPPH radicals scavenging effects of total flavonoids of *Apocynum venetum* L. leaves and Vc

3 结论

3.1 以离子液体溴化 1-己基-3-甲基咪唑($[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$)的水溶液为提取溶剂, 采用微波辅助法提取罗布麻叶总黄酮, 通过单因素试验探究了不同因素对总黄酮提取量的影响, 并设计响应面中心组合试验优化提取工艺。试验建立的响应面模型极显著, 且失拟检验不显著, 对响应值影响较大的因素按其显著性排列依次为离子液体浓度、液料比、微波功率。确定最佳工艺为: 离子液体浓度 0.73 mol/L、液料比 19:1 mL/g、微波时间 10 min、微波功率 483 W、温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 此工艺下总黄酮提取量可达 14.10 ± 0.202 mg/g, 与响应面模型的理论预测值接近。

3.2 抗氧化活性试验结果表明, 最佳工艺条件下提取的罗布麻叶总黄酮对羟自由基和 DPPH 自由基具有一定的清除作用, 其质量浓度与自由基清除率线性相关性较好, 相应的 IC_{50} 值为 27.88 $\mu\text{g/mL}$ 、13.61 $\mu\text{g/mL}$, 分别是 Vc 的 1.71、2.26 倍, 最大清除率可达 $70.21\%\pm 2.41\%$ 、 $86.67\%\pm 3.03\%$, 表明罗布麻叶总黄酮

的抗氧化能力较强。自由基清除效果不及 Vc 可能是因为提取液中罗布麻叶总黄酮的纯度不高, 因此后续的分纯化处理对提升自由基清除率有重大意义。本研究所得罗布麻叶总黄酮的提取工艺较传统提取工艺耗时短、溶剂少、得率高, 抗氧化性评价结果也为罗布麻叶在食品及保健品行业的进一步开发利用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 陈敏,赵学勇,左小安,等.荒漠生境罗布麻传粉生物学比较[J].中国沙漠,2016,36(1):124-130
CHEN Min, ZHAO Xue-yong, ZUO Xiao-an, et al. Comparison of pollination biology of *Apocynum venetum* L. (Luobuma) in desert habitats [J]. Journal of Desert Research, 2016, 36(1): 124-130
- [2] Xie W, Zhang X, Wang T, et al. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Apocynum venetum* L. (Luobuma): A review [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 141(1): 1-8
- [3] Zheng M, Fan Y, Shi D, et al. Antidepressant-like effect of flavonoids extracted from *Apocynum venetum* leaves on brain monoamine levels and dopaminergic system [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 147(1): 108-113
- [4] 郑梅竹,吴山力,时东方,等.罗布麻叶总黄酮抗抑郁作用及其机制研究[J].中草药,2012,43(12):2468-2470
ZHENG Mei-zhu, WU Shan-li, SHI Dong-fang, et al. Antidepressant-like effects of total flavonoids from *Apocynum venetum* leaves and their mechanisms [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(12): 2468-2470
- [5] 杨永涛,潘思源,田英姿,等.正交试验优化罗布麻茎中总黄酮的提取工艺[J].安徽农业科学,2017,45(29):114-116
YANG Yong-tao, PAN Si-yuan, TIAN Ying-zi, et al. Optimization of extraction technology of total flavonoids from stems of *Apocynum venetum* L. (Luobuma) by orthogonal experiment [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(29): 114-116
- [6] 史俊友,景年华,李彩霞.大叶白麻中总黄酮超临界 CO_2 萃取工艺优化[J].食品与机械,2015,31(5):231-233,249
SHI Jun-you, JING Nian-hua, LI Cai-xia. Study on extraction of flavonoids from *Poacynum hendersonii* by supercritical CO_2 [J]. Food and Machinery, 2015, 31(5): 231-233, 249
- [7] 王慧竹,陈盟杰,石琳,等.BP 神经网络结合响应面优化罗布麻总黄酮的提取工艺[J].中国酿造,2017,36(6):153-157
WANG Hui-zhu, CHEN Meng-jie, SHI Lin, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from

- Apocynum venetum* by BP neural network and response surface methodology [J]. China Brewing, 2017, 36(6): 153-157
- [8] Rogers R D. Reflections on ionic liquids [J]. Nature, 2007, 447: 917
- [9] Passos H, Freire M G, Coutinho J A. Ionic liquid solutions as extractive solvents for value-added compounds from biomass [J]. Green Chemistry, 2014, 16(12): 4786-4815
- [10] Wei Z, Zu Y, Fu Y, et al. Ionic liquids-based microwave-assisted extraction of active components from pigeon pea leaves for quantitative analysis [J]. Separation and Purification Technology, 2013, 102: 75-81
- [11] Chatel G, Macfarlane D R. Ionic liquids and ultrasound in combination: Synergies and challenges [J]. Chemical Society Reviews, 2014, 43(23): 8132-8149
- [12] 钟方丽,金龙哲,王晓林,等. 离子液体超声辅助提取香叶总黄酮及其抗氧化性研究[J]. 中国调味品, 2018, 43(4): 69-74
ZHONG Fang-li, JIN Long-zhe, WANG Xiao-lin, et al. Study on progress of ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Pelargonium graveolens* and their antioxidant effect [J]. China Condiment, 2018, 43(4): 69-74
- [13] 杨洁,关梦玉,吴霞,等. 枣叶黄酮微波-离子液体辅助提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2018, 1: 87-94
YANG Jie, GUAN Meng-yu, WU Xia, et al. Study on optimization of microwave-ionic liquids assisted extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill. Leaf [J]. China Food Additives, 2018, 1: 87-94
- [14] Zhang Q, Zhao S, Chen J, et al. Application of ionic liquid-based microwave-assisted extraction of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Journal of Chromatography B, 2015, 1002: 411-417
- [15] Gu H, Chen F, Zhang Q, et al. Application of ionic liquids in vacuum microwave-assisted extraction followed by macroporous resin isolation of three flavonoids rutin, hyperoside and hesperidin from *Sorbus tianschanica* leaves [J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1014: 45-55
- [16] 陈婷,徐文斌,洪怡蓝,等. 响应面法优化甜叶菊残渣中总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, 37(18): 52-57
CHEN Ting, XU Wen-bin, HONG Yi-lan, et al. Total flavonoids from *Stevia rebaudiana* residue: Optimization of extraction process by response surface methodology and antioxidant activity evaluation [J]. Food Science, 2016, 37(18): 52-57
- [17] Xu D, Zheng J, Zhou Y, et al. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 552-559
- [18] 赵楠楠,朱晓冉,李德海. 红松壳多酚、黄酮和多糖含量及抗氧化活性相关性的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(12): 44-49, 55
ZHAO Nan-nan, ZHU Xiao-ran, LI De-hai. Study on the correlation between contents of polyphenols, flavonoids, polysaccharides in *Pinus koraiensis* seed putamina and their antioxidant [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(12): 44-49, 55
- [19] 王占一,张立华,王玉海,等. 微波辅助离子液体提取发酵石榴籽总黄酮及其抑制亚硝化反应作用[J]. 中成药, 2018, 40(1): 213-218
WANG Zhan-yi, ZHANG Li-hua, WANG Yu-hai, et al. Microwave-assisted ionic liquid extraction of total flavonoids from fermented pomegranate seeds and its inhibition of nitrosation [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(1): 213-218
- [20] Archer D G, Widegren J A, Kirklin D R, et al. Enthalpy of solution of 1-Octyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate in water and in aqueous sodium fluoride [J]. Journal of Chemical & Engineering Data, 2005, 50(4): 1484-1491
- [21] 温晋芳,姜在民,苑文柯,等. 唐棣果黄酮类化合物的提取及抗氧化性研究[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(2): 218-224
WEN Jin-fang, JIANG Zai-min, YUAN Wen-ke, et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids from the fruit of *Amelanchier sinica* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(2): 218-224
- [22] 席红如,吴晖,赖富饶,等. 卡琪花蒂玛中黄酮类物质的组成及抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2018, 34(8): 52-56
XI Hong-ru, WU Hui, LAI Fu-rao, et al. Composition and antioxidant activity of flavonoids from *Kacip Fatimah* [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(8): 52-56
- [23] 周琦,曾莹,祝遵凌. 响应面法优化香水莲花多酚的提取工艺及其抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 200-207
ZHOU Qi, ZENG Ying, ZHU Zun-Ling. Extraction optimization through response surface methodology and antioxidant activity of polyphenols of *Nymphaea hybrid* [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(11): 200-207