

中药现代化技术

# 超声辅助离子液体提取荷叶黄酮及其抗氧化活性

张 华, 赵大利, 王 丹, 朱文彬

(滁州学院 材料与化学工程学院, 安徽 滁州 239000)

**摘要:** 以荷叶为原料, 在单因素实验基础上通过响应面法优化, 得到超声辅助离子液体提取荷叶黄酮的工艺参数, 并评价其抗氧化活性。结果表明, 荷叶黄酮的最佳提取工艺为: 0.9 mol/L 的 1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ( $[C_6mim]BF_4$ ) 水溶液作为提取溶剂, 固液比 1 : 25 (g : mL), 超声功率 186 W, 超声时间 24 min, 提取温度 70 °C。在该条件下, 荷叶黄酮提取率为 4.65%。荷叶黄酮对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH $\cdot$ )、 $\cdot OH$  具有良好的清除能力, 半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为 0.8847 和 1.1445 g/L。荷叶黄酮具有较强的还原力, 当质量浓度为 1.6 g/L 时, 吸光度最大值为 0.72 a.u.; 荷叶黄酮对猪油和花生油的氧化均有一定的抑制作用, 表现出良好的抗氧化活性。

**关键词:** 荷叶; 黄酮; 超声辅助提取; 离子液体; 抗氧化活性; 中药现代化技术

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2023)10-2241-08

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## Ultrasonic assisted ionic liquid extraction of flavonoids from lotus leaf and assessment of its antioxidant activity

ZHANG Hua, ZHAO Dali, WANG Dan, ZHU Wenbin

(School of Material Science and Chemical Engineering, Chuzhou University, Chuzhou 239000, Anhui, China)

**Abstract:** Ionic liquid-based ultrasonic assisted extraction parameters of flavonoids from lotus leaf were optimized *via* single factor experiment and response surface method. The flavonoids obtained was then evaluated for its antioxidant activity. The results showed the optimal conditions were as follows: 0.9 mol/L 1-hexyl-3-methylimidazole tetrafluoroborate ( $[C_6mim]BF_4$ ) aqueous solution as extraction solvent, solid-liquid ratio of 1 : 25 (g : mL), ultrasonic power of 186 W, ultrasonic time of 24 min, and extraction temperature of 70 °C. The extraction rate of lotus leaf flavonoids reached 4.65% under the optimized conditions. The extracted lotus leaf flavonoids showed good antioxidant activity for 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine free radical (DPPH $\cdot$ ) and  $\cdot OH$ , with a corresponding half inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 0.8847 and 1.1445 g/L respectively. The lotus leaf flavonoids displayed strong reducing power with the maximum absorbance of 0.72 a.u. at a mass concentration of 1.6 g/L. The lotus leaf flavonoids exhibited good inhibitory effect on the oxidation of lard and peanut oil, showing good antioxidant activity.

**Key words:** lotus leaf; flavonoids; ultrasonic assisted extraction; ionic liquids; antioxidant activity; Chinese medicine modernization technology

荷叶是睡莲科水生植物莲 (*Nelumbo nucifera*) 的叶片, 又名莲叶、藕叶, 主产于中国浙江、湖北等地区, 自古以来以药食两用的植物在民间应用<sup>[1-2]</sup>。荷叶中含有多种具有生理活性的物质。其中, 含量较高的黄酮类化合物具有抗氧化<sup>[3]</sup>、降血脂<sup>[4]</sup>、消炎<sup>[5]</sup>、抗人类免疫缺陷病毒 (HIV)<sup>[6]</sup>、抗肿瘤<sup>[7]</sup>等多种生

物活性。黄酮类化合物是色原酮或色原烷的衍生物, 普遍含有活性酚羟基, 此官能团对自由基有较强的捕捉作用, 能够直接清除自由基、抑制自由基的生成, 从而具有一定的抗氧化性<sup>[8]</sup>。研究表明, 荷叶黄酮对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH $\cdot$ )、羟基自由基 ( $\cdot OH$ )、超氧阴离子自由基 ( $\cdot O_2^-$ ) 具有一定的

收稿日期: 2022-12-02; 定用日期: 2023-03-02; DOI: 10.13550/j.jxhg.20221104

基金项目: 国家级大学生创新训练项目 (202210377071)

作者简介: 张 华 (1989—) 女, 硕士, 讲师, E-mail: zhanghuaczu@163.com。

清除能力,能够有效抑制油脂的氧化<sup>[9-11]</sup>。黄酮类化合物在人体中代谢较快,适量补充可以减缓氧化应激对细胞造成的功能性损伤,预防疾病的发生。目前,国内对荷叶黄酮的提取方法主要有水提醇沉法<sup>[12-13]</sup>、超声辅助提取法<sup>[14]</sup>、微波辅助提取法<sup>[15]</sup>、复合酶法<sup>[16]</sup>等。单一的提取方法普遍存在提取率低、提取时间长、需要大量挥发性试剂等缺点。

离子液体是一种新型的绿色溶剂,具有热稳定性好、萃取能力强、可重复利用等优点<sup>[17-18]</sup>,可通过调整阴阳离子的组成使其自身的物理化学性质发生变化,能够溶解植物细胞壁的纤维素,使活性成分更快速地溶出。同时,离子液体与被提取物的基团产生分子间作用力,从而显著提高提取率<sup>[19]</sup>。超声波技术在天然产物的提取中已得到广泛的应用,与离子液体结合能够显著节省时间、减少离子液体使用量<sup>[20]</sup>,具有提取率高、提取时间短、生物活性好等优点。目前,超声辅助离子液体提取已应用于沙棘叶黄酮<sup>[21]</sup>、艾草黄酮<sup>[22]</sup>、葛根黄酮<sup>[23]</sup>等的提取分离,且取得了较好的提取效果。表明超声波辅助离子液体提取法是一种有效可行的方法,但在荷叶黄酮提取中的应用鲜见报道。

本文采用超声波辅助离子液体的方法提取荷叶黄酮,通过单因素分析法,筛选最佳的离子液体类型,并考察了固液比、离子液体浓度、超声功率、超声时间、提取温度等因素对荷叶黄酮提取率的影响,应用响应面法优化提取工艺条件,并通过对 DPPH·和·OH 的清除能力、总还原力及抗油脂氧化能力进行测定,探索荷叶黄酮的体外抗氧化活性,为荷叶资源的综合开发利用提供理论参考。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

荷叶购于安徽滁州市百姓缘大药房,产地湖南;花生油、新鲜肥猪肉,市售;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、·OH 清除能力检测试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;芦丁标准品(153-18-4),上海源叶生物科技有限公司;1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([C<sub>6</sub>mim]BF<sub>4</sub>),分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;其他试剂均为市售分析纯。

722 紫外分光光度计,上海上分仪器有限公司;HH-S 型水浴锅,巩义市英裕华仪器厂;微波超声波组合萃取仪,上海比朗仪器制造有限公司;BSM-120 电子分析天平,上海卓精电子科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 荷叶黄酮提取

荷叶在 50 °C 下干燥,粉碎过 60 目筛得到荷叶

粉末,密封放于干燥器内备用,精密称取 2.0 g 荷叶粉末,按照固液比 1 : 25 (g : mL) 加入浓度为 0.9 mol/L 的 [C<sub>6</sub>mim]BF<sub>4</sub> 水溶液,在提取温度 70 °C、超声功率 186 W 条件下进行超声提取 24 min,之后提取液在 3000 r/min 转速下离心 15 min,取上清液,旋蒸浓缩,用体积分数 70% 的乙醇将浓缩液定容至 50 mL,得荷叶黄酮样品溶液。

#### 1.2.2 芦丁标准曲线绘制与荷叶黄酮提取率测定

黄酮提取率的测定采用 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH 比色法<sup>[24]</sup>,以芦丁为对照品。以吸光度 (Y) 为纵坐标、芦丁质量浓度 (X, g/L) 为横坐标绘制标准曲线,得回归方程:  $Y=10.35X-0.0019$ ,  $R^2=0.9989$ 。在 0.05~0.30 g/L 范围内线性关系良好。

取一定量荷叶黄酮样品溶液,以无水乙醇为空白对照,在 510 nm 波长处测定吸光度,由标准回归方程得到荷叶黄酮质量浓度,按式 (1) 计算荷叶黄酮提取率。

$$\text{提取率} / \% = \frac{\rho V}{m} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $\rho$  为黄酮质量浓度, kg/L;  $V$  为提取物体积, mL;  $m$  为荷叶干料质量, g。

#### 1.2.3 单因素实验

##### 1.2.3.1 离子液体类型选择

在固液比 1 : 25 (g : mL)、离子液体浓度 0.2 mol/L、提取温度 70 °C、超声功率 100 W、超声时间 10 min 条件下,考察了 1-丁基-3-甲基咪唑溴盐 ([C<sub>4</sub>mim]Br)、1-己基-3-甲基咪唑溴盐 ([C<sub>6</sub>mim]Br)、1-辛基-3-甲基咪唑溴盐 ([C<sub>8</sub>mim]Br)、1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ([C<sub>4</sub>mim]BF<sub>4</sub>)、[C<sub>6</sub>mim]BF<sub>4</sub>、1-辛基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ([C<sub>8</sub>mim]BF<sub>4</sub>)、1-丁基-3-甲基咪唑六氟硼酸盐 ([C<sub>4</sub>mim]BF<sub>6</sub>)、1-己基-3-甲基咪唑六氟硼酸盐 ([C<sub>6</sub>mim]BF<sub>6</sub>) 和 1-辛基-3-甲基咪唑六氟硼酸盐 ([C<sub>8</sub>mim]BF<sub>6</sub>) 对荷叶黄酮提取率的影响。筛选出最佳的离子液体类型作为提取溶剂。

##### 1.2.3.2 固液比对荷叶黄酮提取率的影响

固定 [C<sub>6</sub>mim]BF<sub>4</sub> 为提取溶剂,设定离子液体浓度 0.2 mol/L、提取温度 70 °C、超声功率 100 W、超声时间 10 min,考察不同固液比 [1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35 (g : mL)] 对荷叶黄酮提取率的影响。选择最佳的固液比进行下一步实验。

##### 1.2.3.3 离子液体浓度对黄酮提取率的影响

固定 [C<sub>6</sub>mim]BF<sub>4</sub> 为提取溶剂,设定固液比 1 : 25 (g : mL)、提取温度 70 °C、超声功率 100 W、超声时间 10 min,考察不同浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mol/L) 的离子液体对荷叶黄酮提取率的影响。选择最佳的离子液体浓度进行下一步实验。

### 1.2.3.4 超声功率对黄酮提取率的影响

固定 $[C_6mim]BF_4$ 为提取溶剂, 设定固液比 1 : 25 (g : mL)、离子液体浓度 0.8 mol/L、提取温度 70 °C、超声时间 10 min, 考察超声功率 (50、100、150、200、250 W) 对荷叶黄酮提取率的影响。选择合适的超声功率进行后续实验。

### 1.2.3.5 超声时间对黄酮提取率的影响

固定 $[C_6mim]BF_4$ 为提取溶剂, 设定固液比 1 : 25 (g : mL)、离子液体浓度 0.8 mol/L、提取温度 70 °C、超声功率 150 W, 考察超声时间 15、20、25、30、35、40 min 对荷叶黄酮提取率的影响。找到最佳的超声时间。

### 1.2.3.6 提取温度对黄酮提取率的影响

固定 $[C_6mim]BF_4$ 为提取溶剂, 设定固液比 1 : 25 (g : mL)、离子液体浓度 0.8 mol/L、超声功率 150 W、超声时间 30min, 考察提取温度 (50、60、70、80、90 °C) 对荷叶黄酮提取率的影响。得到最佳的提取温度用于实验。

### 1.2.4 响应面实验

根据单因素实验, 选取了对荷叶黄酮提取率影响较大的 3 个单因素离子液体浓度 (A)、超声功率 (B)、超声时间 (C) 为独立变量, 以黄酮提取率为响应变量, 通过 Box-Behnken 中心组合设计进行了响应面优化, 实验水平设计见表 1。

表 1 响应面实验设计  
Table 1 Design of response surface experiment

因素	水平		
	-1	0	1
A 离子液体浓度 / (mol/L)	0.6	0.8	1.0
B 超声功率/W	100	150	200
C 超声时间/min	25	30	35

## 1.3 体外抗氧化实验

在最佳工艺条件下提取荷叶黄酮, 将提取液旋蒸, 浓缩, 以体积分数 50%乙醇进行梯度稀释, 配制质量浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 g/L 的样品溶液, 避光保存。

### 1.3.1 荷叶黄酮对 DPPH• 的清除能力

参考文献[23]方法并稍作修改, 测定荷叶黄酮对 DPPH• 的清除能力。制备 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液。取 2.0 mL 不同浓度的样品溶液溶于试管中, 加入 2 mL DPPH 乙醇溶液混合均匀, 避光静置 30 min, 测定 517 nm 处的吸光度  $A_1$ 。另取 2.0 mL 样品溶液, 加入 2 mL 无水乙醇, 测定吸光度  $A_2$ 。空白组以无水乙醇代替样品溶液测定吸光度  $A_0$ 。以相同浓度的  $V_C$  为阳性对照, DPPH• 清除率按式 (2) 计算。

$$DPPH\cdot\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A_0$  为空白组的吸光度;  $A_1$  为 DPPH• 和样品的吸光度;  $A_2$  为样品溶液本身的吸光度。

### 1.3.2 荷叶黄酮对 •OH 的清除能力

参照 Fenton 法<sup>[25]</sup>并适当改进, 取 3 支试管, 加入 6 mmol/L 水杨酸的乙醇溶液、6 mmol/L  $FeSO_4$  溶液、不同浓度的样品溶液各 2 mL, 混合后加入 6 mmol/L 的  $H_2O_2$  溶液 2 mL, 于 37 °C 恒温水浴加热 30 min, 在 510 nm 处测定样品吸光度  $A'_1$ , 以去离子水代替水杨酸溶液, 测定吸光度  $A'_2$ 。空白组以去离子水代替样品溶液测定吸光度  $A'_0$ 。以相同浓度的  $V_C$  为阳性对照, 按式 (3) 计算 •OH 清除率。

$$\cdot OH\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A'_1 - A'_2}{A'_0}\right) \times 100 \quad (3)$$

式中:  $A'_0$  为空白组的吸光度;  $A'_1$  为样品和水杨酸溶液的吸光度;  $A'_2$  为去离子水代替水杨酸的吸光度。

### 1.3.3 荷叶黄酮还原力测定

参考文献[26]的方法, 分别吸取 2.0 mL 不同浓度的荷叶黄酮样品溶液于试管中, 依次加入质量浓度 1 g/L 的铁氯化钾溶液和磷酸盐溶液 (pH 6.6) 各 2.0 mL, 振荡均匀后于 50 °C 水浴条件下反应 30 min, 迅速冷却后加入 2.0 mL 0.6 mol/L 的三氟乙酸溶液, 离心机 4500 r/min 条件下处理 5 min, 取上清液 1.0 mL, 依次加入 1 mL 蒸馏水、0.5 mL 质量分数为 1 g/L 的  $FeCl_3$  溶液, 混合均匀, 于 700 nm 波长处测定吸光度, 以相同浓度的  $V_C$  作阳性对照。通过测定的吸光度比较相同浓度下荷叶黄酮和  $V_C$  还原力的强弱, 吸光度越大, 说明还原力越强。

### 1.3.4 荷叶黄酮对油脂的抗氧化测定

采用 Schaal 烘箱法<sup>[27]</sup>设计两组实验, 一组为新炼制猪油 (猪油的炼制: 将市售新鲜猪肥膘去皮洗净, 切成 1 cm × 1 cm 小块, 每 kg 加入 50 mL 水混合, 油浴锅 120 °C 下恒温炼制 20 min, 过滤除渣, 冷却至 50 °C, 冷藏保存), 一组为花生油。称取 3 份 20 g 猪油放入 3 只锥形瓶中, 其中 2 份分别加入 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (BHT)、黄酮提取液, 添加量均为油脂质量的 0.02%, 第 3 份不做任何添加作为空白对照, 另一组花生油做同上处理。将试样放入烘箱 (60 ± 1) °C 中保温, 每隔 12 h 摇匀 1 次, 每隔 2 h 测定油脂过氧化值 (POV, mmol/kg), 连续测定 18 d, 参考 GB5009.227—2016 方法测定过氧化值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验

各因素对黄酮提取率的影响见图 1。

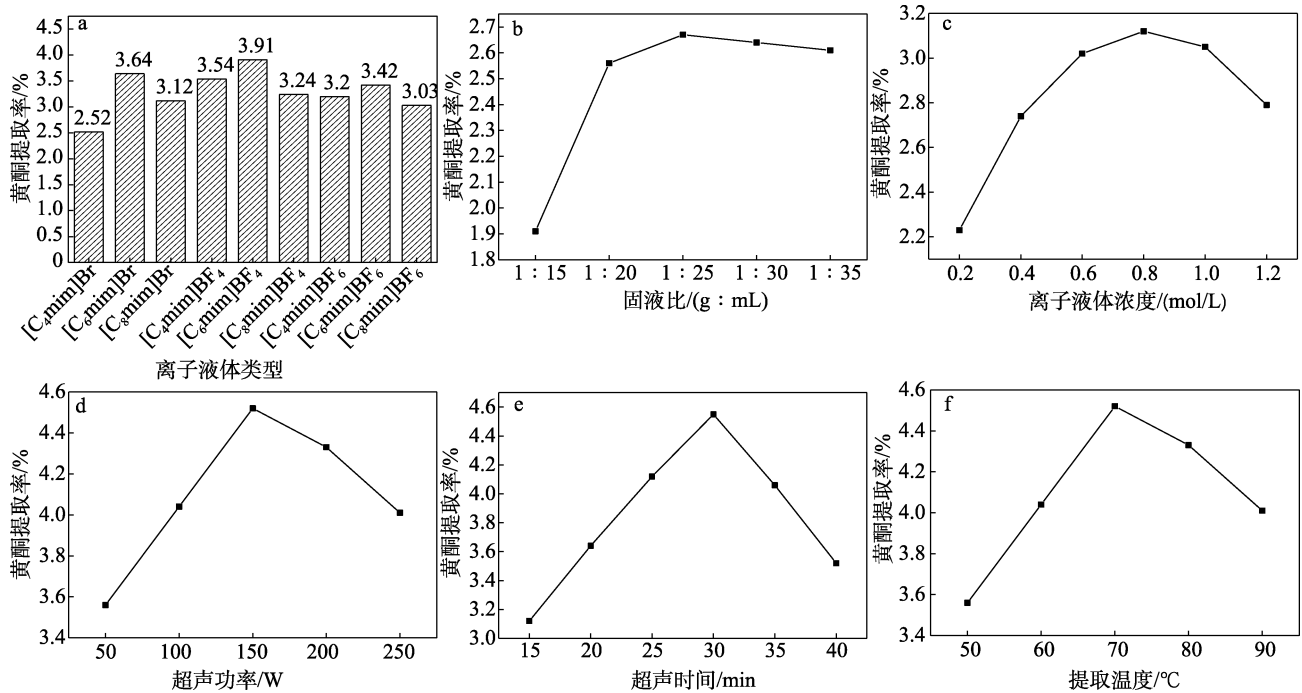


图 1 各因素对黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effects of various factors on extraction rate of flavonoids

从图 1a 看出,  $[C_6mim]BF_4$  对荷叶黄酮的提取率最高, 达到 3.91%。荷叶黄酮的提取率随烷基链长度的增加而升高, 原因可能是阳离子碳链越长, 提取剂的极性越接近黄酮的极性, 分子间作用力越强, 使提取率升高, 但当碳链过长时, 氢键碱性增强, 亲水性降低, 传质推动力降低, 提取率反而随之降低。因此, 选定最佳离子液体  $[C_6mim]BF_4$  进行下一步实验。

由图 1b 可知, 在固液比 1 : 15~1 : 25 (g : mL) 范围内, 荷叶黄酮的提取率随固液比的降低而升高, 当固液比达到 1 : 25 (g : mL) 时, 黄酮提取率达到最大值 2.63%。溶剂用量的增加, 使细胞与溶剂的浓度差增大, 有利于黄酮的溶出。当荷叶黄酮的溶出量基本达到平衡时, 继续增加溶剂的用量, 部分超声波能量被过量的溶剂吸收, 降低了超声波对细胞的破碎能力<sup>[28]</sup>, 荷叶黄酮的提取率反而降低。因此, 选择液料比 1 : 25 (g : mL) 进行后续实验。

由图 1c 可知, 随着离子液体浓度的增大, 黄酮提取率逐渐增大。在离子液体浓度为 0.8 mol/L 时达到最大值, 继续增大离子液体浓度, 提取率开始下降。适量的离子液体可提高对植物细胞壁的破坏效果, 有利于荷叶黄酮加速迁移到溶剂中。但是离子液体浓度过大会导致提取液的黏度明显增加, 影响超声过程中空化效应的作用<sup>[29]</sup>, 使黄酮提取率下降。因此, 选择离子液体浓度为 0.8 mol/L 继续下一步实验。

由图 1d 可知, 随着超声功率的增大, 黄酮提取

率先升高后下降, 在 150 W 时达到最大值, 之后继续增大超声功率, 提取率下降。可能原因是功率过大, 破坏了黄酮化合物的结构。因此, 选择超声功率为 150 W 进行后续实验。

由图 1e 可知, 在 0~30 min 内, 荷叶黄酮提取率随着超声时间增加而升高; 达到最大值以后, 再继续延长超声时间, 提取率开始降低。原因可能是超声时间过长使部分黄酮物质分解, 另外, 随着超声时间的延长, 荷叶中糖类和蛋白质等物质溶出增加, 使得溶液黏度增大, 部分黄酮会吸附在固体基质上而不易被分离出来。因此, 选择超声时间为 30 min。

由图 1f 可知, 随提取温度升高荷叶黄酮的提取率呈先上升后下降的趋势。温度升高使离子液体的运动速率增大, 更容易渗透到荷叶的细胞中, 有利于黄酮的溶出和扩散, 但温度过高会使黄酮的结构受到破坏。因此, 选择提取温度为 70 °C。

## 2.2 响应面实验

响应面实验结果见表 2。

运用 Design-Expert 8.0.6 软件对实验数据进行多元回归拟合, 得到荷叶黄酮提取率 ( $Y$ ) 的回归方程:

$$Y = 4.57 + 0.053A + 0.38B - 0.19C - 0.09AB - 0.01AC + 0.13BC - 0.14A^2 - 0.72B^2 - 0.4C^2$$

Box-Behnken 中心组合设计实验结果的方差分析如表 3 所示。

由表 3 可知, 模型  $P < 0.0001$ , 失拟项  $P > 0.05$ , 表明模型失拟不显著, 除模型研究外的因素对响应

值影响较小。模型的总决定系数  $R^2=0.9846$ , 调整后  $R^2_{adj}=0.9648$ , 都接近于 1, 说明该模型与实验数据拟合程度良好; 由表 3 中的  $F$  值可知, 各因素的影响程度从大到小依次为: 超声功率>超声时间>离子液体浓度。

表 2 实验设计及结果  
Table 2 Experiment design and results

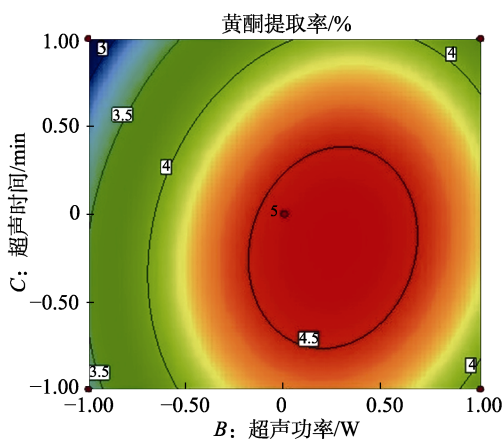
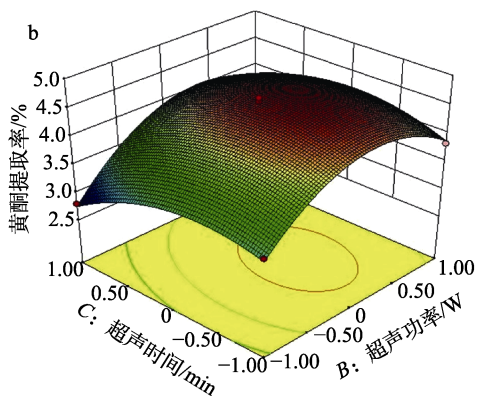
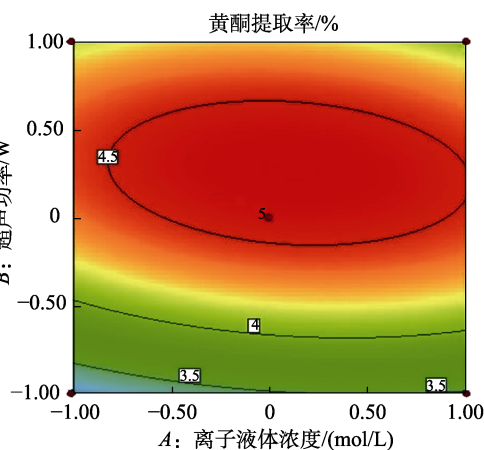
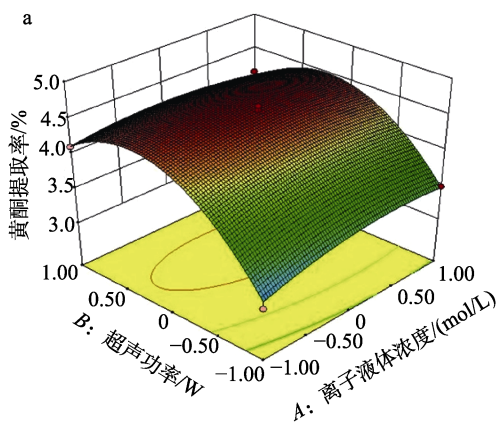
实验号	A 离子液体浓度/(mol/L)	B 超声功率/W	C 超声时间/min	黄酮提取率/%
1	1	0	1	3.82
2	-1	1	0	4.11
3	0	0	0	4.55
4	1	-1	0	3.48
5	0	-1	-1	3.43
6	0	0	0	4.43
7	0	0	0	4.59
8	-1	0	-1	4.2
9	0	1	-1	3.83
10	1	1	0	4.15
11	0	0	0	4.65
12	-1	-1	0	3.08
13	1	0	-1	4.21
14	0	1	1	3.72
15	0	-1	1	2.80
16	0	0	0	4.62
17	-1	0	1	3.85

表 3 回归模型方差分析结果  
Table 3 Variance analysis results of regression model

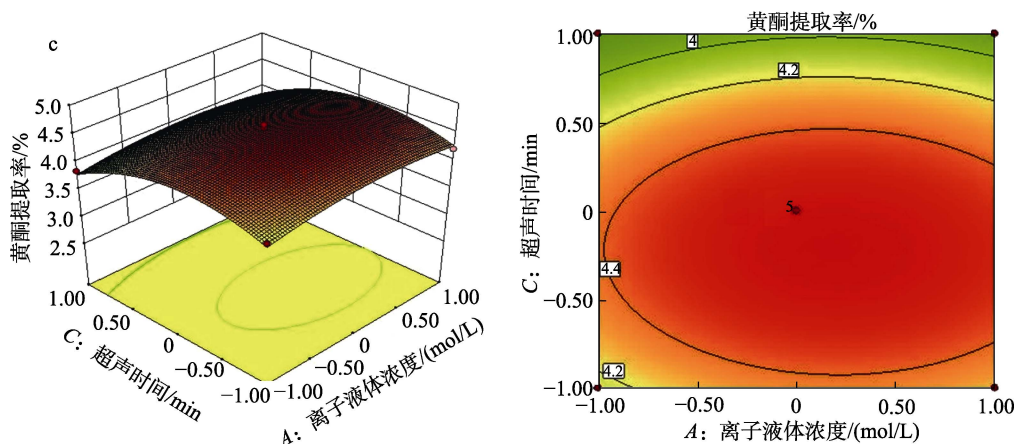
来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	4.72	9	0.52	49.73	< 0.0001
A-离子液体浓度	0.022	1	0.022	2.09	0.1913
B-超声功率	1.14	1	1.14	108.16	< 0.0001
C-超声时间	0.27	1	0.27	25.98	0.0014
AB	0.032	1	0.032	3.07	0.1230
AC	$4.00 \times 10^{-4}$	1	$4.00 \times 10^{-4}$	0.038	0.8511
BC	0.068	1	0.068	6.41	0.0391
A <sup>2</sup>	0.087	1	0.087	8.28	0.0237
B <sup>2</sup>	2.18	1	2.18	206.52	< 0.0001
C <sup>2</sup>	0.69	1	0.69	65.2	< 0.0001
残差	0.074	7	0.011		
失拟项	0.045	3	0.015	2.03	0.2527
纯误差	0.029	4	$7.32 \times 10^{-3}$		
总差	4.79	16			

$R^2=0.9846$ ,  $R^2_{adj}=0.9648$ ,  $CV\%=2.58\%$

响应面及等高线分析见图 2。响应面图越陡, 等高线的形状越偏离圆形, 交互作用越明显, 在中心点附近, 荷叶黄酮的提取率最高。由图 2 可以看出, 超声功率和超声时间的交互作用最强, 离子液体浓度和超声功率的交互作用次之, 离子液体浓度和超声时间交互作用影响最小。由等高线形状可以看出, 超声功率对黄酮提取率影响最为显著, 超声时间次之, 离子液体浓度影响最小, 与表 3 的方差分析结果一致。







a—离子液体浓度和超声功率；b—超声功率和超声时间；c—离子液体浓度和超声时间

图 2 交互作用响应面图

Fig. 2 Response surface plots for various factors

通过 Design-Expert 8.0.6 软件进行拟合，得到最优工艺为：离子液体浓度 0.88 mol/L，超声功率 185.70 W，超声时间 24.24 min。在此条件下黄酮的提取率为 4.634%。考虑到实际操作方便，将其修正为固液比 1 : 25 (g : mL)、离子液体浓度 0.9 mol/L、超声功率 186 W、超声时间 24 min、提取温度 70 °C，测定荷叶黄酮 3 次平均提取率为 4.65%，与预测值接近，表明该模型稳定可靠。为验证工艺效果，在相同的提取工艺条件下，用体积分数 70% 的乙醇代替离子液体进行对比实验，荷叶黄酮的提取率为 2.94%，与传统有机溶剂相比，离子液体可以提高荷叶黄酮的提取率。蔡敏等<sup>[13]</sup>采用乙醇溶剂提取法对荷叶黄酮进行提取，当乙醇体积分数 70%、浸提温度为 70 °C、提取时间为 1 h、固液比为 1 : 60 (g : mL) 时，荷叶黄酮提取率为 7.88 mg/g；禹淞文等<sup>[14]</sup>采用超声波辅助浸提荷叶中黄酮，当超声功率为 150 W、超声时间为 18 min、料液比为 1 : 150 (g : mL) 时，荷叶黄酮提取率为 2.76%。可以看出，超声辅助离子液体对荷叶黄酮类化合物的提取效果更好。

### 2.3 体外抗氧化活性测试

#### 2.3.1 荷叶黄酮对 DPPH·清除效果

荷叶黄酮对 DPPH·的清除能力见图 3。

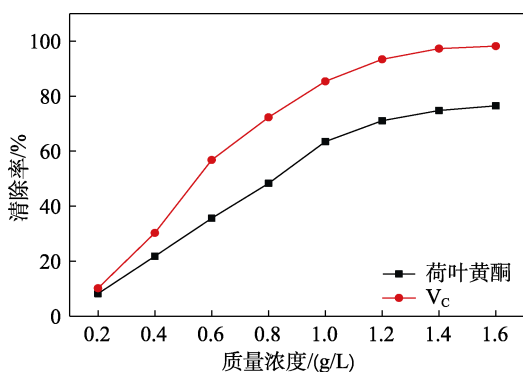


图 3 荷叶黄酮对 DPPH·的清除能力

Fig. 3 Scavenging ability of lotus leaf flavonoids for DPPH·

由图 3 可知，随荷叶黄酮质量浓度的增加，其对 DPPH·的清除率逐渐提高，两者呈正相关。当荷叶黄酮质量浓度为 1.6 g/L 时，其对 DPPH·的清除率达到 76.5%，荷叶黄酮与 V<sub>c</sub> 的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.8847 和 0.4017 g/L。荷叶黄酮表现出较好的清除 DPPH·的能力。

#### 2.3.2 荷叶黄酮对·OH 清除效果

荷叶黄酮对·OH 的清除能力见图 4。

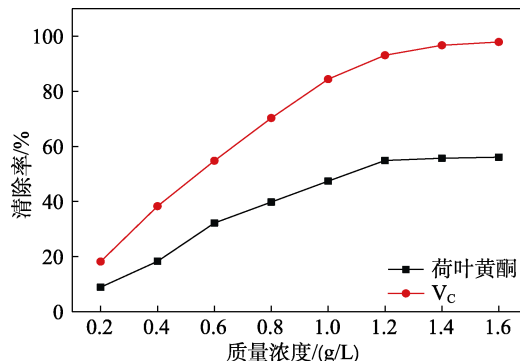


图 4 荷叶黄酮对·OH 的清除能力

Fig. 4 Scavenging ability of lotus leaf flavonoids for ·OH

由图 4 可知，随荷叶黄酮质量浓度的增加，其对·OH 的清除率不断升高，但黄酮质量浓度增大到一定数值后对·OH 的清除率趋于平缓。荷叶黄酮质量浓度为 1.6 g/L 时，对·OH 清除率最高，为 56.1%，黄酮与阳性对照 V<sub>c</sub> 的 IC<sub>50</sub> 分别为 1.1445、0.4521 g/L。在实验浓度范围内清除效果弱于 V<sub>c</sub>。

#### 2.3.3 荷叶黄酮还原力测定

还原力分析法是反映黄酮化合物抗氧化能力的有效方法。不同质量浓度荷叶黄酮的粗提液还原力测定结果如图 5 所示。由图 5 可知，荷叶黄酮和 V<sub>c</sub> 还原力都随着质量浓度上升而升高，荷叶黄酮质量浓度为 1.6 g/L 时，吸光度达到 0.72 a.u.，在 0.4~1.6 g/L 质量浓度范围内，荷叶黄酮的还原力低于相同质量浓度下的 V<sub>c</sub>。

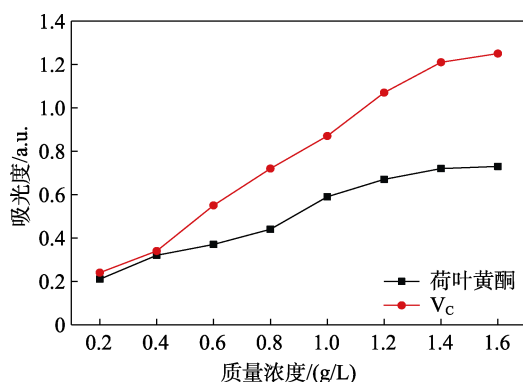


图 5 黄酮的还原力

Fig. 5 Reducing power of flavonoids

### 2.3.4 荷叶黄酮对油脂的抗氧化效果

不同抗氧化剂对油脂抗氧化效果见图 6。

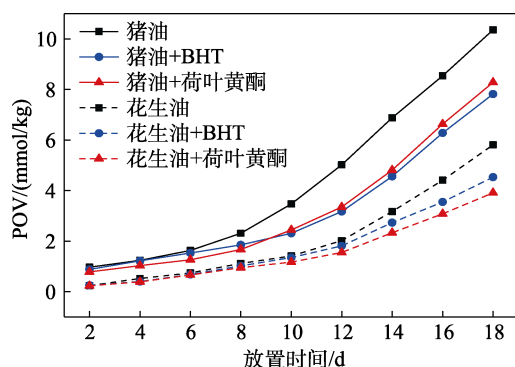


图 6 不同抗氧化剂对油脂抗氧化效果

Fig. 6 Antioxidation effect of different antioxidants on lipid

从图 6 可以看出, 猪油和花生油自氧化反应程度随放置时间增长而增大。添加荷叶黄酮提取液、BHT 后, 油脂的过氧化值均有不同程度的降低, 表明这两种物质均能有效抑制猪油和花生油的氧化反应。BHT 干扰自由基反应, 对于油脂的氧化有强烈的抑制作用, 黄酮类化合物可以与油脂中的金属离子产生络合作用, 降低油脂中过氧化物的产生速率。

对于猪油, 空白组随着时间的进行在第 6 d 后过氧化值明显升高, 发生迅速氧化; 添加荷叶黄酮提取液、BHT 后的过氧化值低于空白组, 荷叶黄酮对猪油的抗氧化活性在 10 d 后略高于 BHT 组, 表明荷叶黄酮对猪油具有明显的抗氧化活性。对于花生油, 空白组在第 8 d 后过氧化值发生明显变化, 添加荷叶黄酮提取液、BHT 与空白组的过氧化值差别较小, 荷叶黄酮对花生油的抗氧化效果与 BHT 的效果接近, 但不如 BHT 组, 这可能与植物油脂中含有一些具有抗氧化作用的天然  $V_E$  和  $V_K$  有关<sup>[30]</sup>。

## 3 结论

采用超声辅助离子液体提取荷叶黄酮, 在单因素实验基础上进行响应面优化, 得出最佳工艺条件

为:  $[C_6mim]BF_4$  溶液作为提取溶剂, 离子液体浓度 0.9 mol/L, 固液比 1 : 25 (g : mL), 超声功率 186 W, 超声时间 24 min, 提取温度 70 °C。在此条件下荷叶黄酮提取率为 4.65%。该工艺合理可行, 提取时间短, 操作简单。

体外抗氧化实验结果表明, 荷叶黄酮对于 DPPH $\cdot$  和  $\cdot OH$  均具有一定的清除能力, 其清除率分别为 76.5% 和 56.1%,  $IC_{50}$  分别为 0.8847 和 1.1445 g/L。在 1.6 g/L 质量浓度条件下, 荷叶黄酮还原力的吸光度为 0.72 a.u.。抗油脂氧化实验表明, 荷叶黄酮在测试时间内可减缓猪油和花生油的氧化速度, 说明超声辅助离子液体提取的荷叶黄酮具有良好的抗氧化活性, 可作为天然抗氧化剂使用。此研究对荷叶黄酮的进一步开发利用具有一定的借鉴作用。

## 参考文献:

- [1] SHI F Y (石凤勇), LI Z C (李志超), FANG K (方望), *et al.* Study on alternative processing schemes for refiner[J]. Sino-Global Energy (中外能源), 2018, 23(4): 63-67.
- [2] PAN S Z (潘诗哲), DAN F (但凡), FAN J M (樊洁敏), *et al.* Optimization of extraction process by response surface methodology and purification of alkaloid salts from lotus leaves[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2019, 36(8): 1598-1609.
- [3] LING Z H (凌智辉), XIAO B (肖蓓), YUE Q Y (岳芊羽), *et al.* Isolation and identification of flavonoids from lotus leaf and effects of drying methods on the content of flavonoids and nuciferine[J]. Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发), 2020, 32(10): 1730-1736, 1746.
- [4] WU C H, YANG M Y, CHAN K C, *et al.* Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a *Nelumbo nucifera* leaf flavonoid-rich extract in mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(11): 7075-7081.
- [5] WANG D, TANG W, YANG G M, *et al.* Anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic activities of flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2010, 8(6): 461-465.
- [6] KASHIWADA Y, AOSHIMA A, IKESHIRO Y, *et al.* Anti-HIV benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13(2): 443-448.
- [7] NAKAMURA S, NAKASHIMA S, TANABE G, *et al.* Alkaloid constituents from flower buds and leaves of sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) with melanogenesis inhibitory activity in B16 melanoma cells[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013, 21(3): 779-787.
- [8] LI C, GOU Y T, QIAN Y, *et al.* Effect of lotus leaf flavonoids on liver injury induced by D-galactose in mice[J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2021, 47(21): 123-131.
- [9] LAN Y S (兰艳素), WANG A D (王爱东), NIU J X (牛江秀). Ultrasonic extraction of total flavonoids from *Sophora tonkinensis* and its antioxidants activities[J]. Chinese Traditional Patent Medicine (中成药), 2016, 38(3): 698-702.
- [10] LIN G R (林国荣). Separation of flavonoids in lotus leaves and study its lipid antioxidant activity[J]. Cereals & Oils (粮食与油脂), 2015, 28(1): 20-23.
- [11] JEDREJEK D, KONTEK B, LIS B, *et al.* Evaluation of antioxidant activity of phenolic fractions from the leaves and petals of dandelion in human plasma treated with  $H_2O_2$  and  $H_2O_2/Fe$ [J]. Chemico-biological Interactions, 2017, 262: 29-37.
- [12] YOU L H (游林红), JIE J (揭晶), YANG M L (杨明利), *et al.* Study on the extraction technology of flavonoids from lotus leaves[J]. Modern Agricultural Science and Technology (现代农业科技), 2014, 43(6): 97-98.
- [13] CAI M (蔡敏), LI C C (李长春), BI H G (毕宏光), *et al.* Study on extraction and purification process of flavonoids from lotus leaf[J]. Hubei Agricultural Sciences (湖北农业科学), 2015, 54(22): 15-18.

- [14] YU S W (禹淞文), ZHAO D X (赵大兴), ZHANG P X (张平喜), *et al.* Ultrasonic assisted digestion of flavanoid from lotus leaf[J]. *Hunan Agricultural Sciences (湖南农业科学)*, 2017, 47(11): 73-75.
- [15] LIU J B (刘军波), ZOU L G (邹礼根), ZHAO Y (赵芸), *et al.* Flavonoids extraction technology from lotus leaves[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin (安徽农学通报)*, 2014, 20(1): 134-136.
- [16] ZHANG S B, YE J, CHEN C. Optimizing conditions for enzymatic extraction of flavonoids from lotus leaves[J]. *Food Science*, 2012, 33(22): 149-153.
- [17] LIU L L (刘磊磊), WANG Y C (王艺聪). Research progress in application of ionic liquid in extraction and separation of natural products[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products (林产化学与工业)*, 2019, 39(6): 1-12.
- [18] ZUO L (左琳), AO X Q (敖先权), GUO Y (郭好). Application on extraction of natural products by imidazolium ionic liquid[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2019, 40(23): 324-330, 336.
- [19] LI M Y (李明英). Application progress of ionic liquids in extraction of natural active compounds[J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences (药学进展)*, 2015, 39(6): 437-445.
- [20] WONG K, LI G, LI K, *et al.* Optimisation of *Pueraria* isoflavonoids by response surface methodology using ultrasonic-assisted extraction[J]. *Food Chemistry*, 2017, 231: 231-237.
- [21] GAO G Y (高国燕), JIANG L S (蒋林树), NIAN F (年芳), *et al.* Antioxidant activity and the level of flavonoids in small fruit sea buckthorn leaves from different provinces[J]. *China Feed (中国饲料)*, 2022, 33(10): 30-35.
- [22] JIA X L (贾晓丽), XIAO J (肖江), ZHAO X Y (赵鑫悦), *et al.* Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from artemisia argyi by phosphonium ionic liquid[J]. *Chemical Reagents (化学试剂)*, 2020, 42(10): 1226-1232.
- [23] SONG Y (宋岩), GUAN Y N (关桦楠), LIU B (刘博), *et al.* Ionic liquid-based ultrasonic assisted extraction of pueraria flavones and its antioxidant activity[J]. *Food Research and Development (食品研究与开发)*, 2020, 41(20): 97-100, 107.
- [24] JIA X L (贾晓丽), LIU G M (刘改梅), ZHAO S H (赵三虎). Study on the extraction of total flavonoids from seabuckthorn leaves using imidazonium ionic liquids [J]. *China Food Additives (中国食品添加剂)*, 2020, 31(8): 1-8.
- [25] GAO J D (高建德), SONG K R (宋开蓉), ZHU X Y (朱晓玉), *et al.* Extraction optimization for total flavonoids from compound conrong granules and the antioxidant activity[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine (中成药)*, 2018, 40(7): 1496-1500.
- [26] YANG G L (杨观兰), ZHONG C L (钟朝玲), ZHANG Q (张强), *et al.* Optimization of extraction of total flavonoids from *Choerospondias axillaris* leaves by response surface methodology and analysis of antioxidant activity[J]. *Cereals & Oils (粮食与油脂)*, 2022, 35(9): 133-137.
- [27] XIONG J W (熊建文), XU J R (许金蓉), HE L Y (和丽媛), *et al.* Genetic algorithm on optimizing extraction process of *Hylocereus undatus* polysaccharose and its antioxidant activity[J]. *Journal of Henan University of Technology: Natural Science Edition (河南工业大学学报: 自然科学版)*, 2016, 37(3): 43-46.
- [28] SAHATSAPAN N, ROJANARATA T, NAGAWHIRUNPAT T, *et al.* 6-Maleimidohexanoic acid-grafted chitosan: A new generation mucoadhesive polymer[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 202: 258-264.
- [29] CAI J Y (蔡锦源), WEI K H (韦坤华), XIONG J W (熊建文), *et al.* Extraction of flavonoids from *Sophora tonkinensis* Gapnep and their antioxidant and antibacterial activities[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2017, 34(3): 285-293.
- [30] ZHANG W (张薇), JIANG X (姜旬), WANG X T (王小婷). Extraction process optimization of flavonoid from pyracantha and its liquid antioxidant activity analysis[J]. *Food and Nutrition in China (中国食物与营养)*, 2022, 28(7): 30-33, 57.

(上接第 2230 页)

- [16] ZHANG X, SI Y F, MO J L, *et al.* Robust micro-nanoscale flowerlike ZnO/epoxy resin superhydrophobic coating with rapid healing ability[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 313: 1152-1159.
- [17] KOTB Y, CAGNARD A, HOUSTON K R, *et al.* What makes epoxy-phenolic coatings on metals ubiquitous: Surface energetics and molecular adhesion characteristics[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2022, 608: 634-643.
- [18] KARAMI M H, KALAEI M, KHAJAVI R, *et al.* Thermal degradation kinetics of epoxy resin modified with elastomeric nanoparticles[J]. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 2022, 5(1): 390-401.
- [19] MOUSAVI S R, ESTAJI S, PAYDAYESH A, *et al.* A review of recent progress in improving the fracture toughness of epoxy-based composites using carbonaceous nanofillers[J]. *Polymer Composites*, 2022, 43(4): 1871-1886.
- [20] WAN T (万涛), WANG B (王博), HAN Q (韩庆), *et al.* Progress in the preparation technology and properties of nano-TiO<sub>2</sub> modified epoxy resin[J]. *Surface Technology (表面技术)*, 2022, 51(7): 11-26, 62.
- [21] CHEN Z H (陈子豪), RUAN Y B (阮英波), YANG J (杨杰). Research progress on toughening methods and mechanisms of epoxy resins[J]. *Thermosetting Resins (热固性树脂)*, 2022, 37(1): 64-69.
- [22] PENG J (彭军), DU Z K (杜柱康), ZHANG X W (张习文). Research progress of water-based technology and modification methods for epoxy resins[J]. *New Chemical Materials (化工新型材料)*, 2021, 49(10): 236-239.
- [23] ZHAO M Y (赵美云), KANG M (康萌), HE Q (何钱), *et al.* Preparation of silicone rubber powder/epoxy resin superhydrophobic coating and its application in anti-icing of overhead conductors[J]. *China Surface Engineering (中国表面工程)*, 2022, 35(2): 235-242.
- [24] LI J (李杰), ZHANG Y (张阳), SHI W T (石文天), *et al.* Preparation of epoxy resin/SiO<sub>2</sub> nanoparticle composite superhydrophobic surfaces[J]. *New Chemical Materials (化工新型材料)*, 2022, 50(4): 263-266.
- [25] ZHANG D H (张德虎), DENG J M (邓佳明), XUE S S (薛珊珊), *et al.* Preparation of silicon dioxide/epoxy resin/silicone rubber superhydrophobic coating and its performance study[J]. *Plastics Industry (塑料工业)*, 2020, 48(11): 170-173.
- [26] LYU X C (吕学超), LIU H (刘华), DUAN S S (段沙沙), *et al.* Preparation and study of modified epoxy resin superhydrophobic coatings[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition) (河北大学学报: 自然科学版)*, 2019, 39(4): 386-394.
- [27] ZHU Z B, KANG S M, CHEN H, *et al.* Construction of superhydrophobic alkyl siloxane-modified carbon nanotubes/epoxy coating[J]. *Diamond and Related Materials*, 2022, 129: 109351.
- [28] ZENG Q, KANG L, FAN J, *et al.* Durable superhydrophobic silica/epoxy resin coating for the enhanced corrosion protection of steel substrates in high salt and H<sub>2</sub>S environments[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2022, 654: 130137.
- [29] ZHU W C (朱文澄), GUI X F (桂雪峰), LI Z H (李志华), *et al.* Construction of PE-based polysiloxane/modified SiO<sub>2</sub> superhydrophobic film[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(10): 2050-2056, 2116.
- [30] WANG L Y, HUI L F, SU W Y. Superhydrophobic modification of nanocellulose based on an octadecylamine/dopamine system[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 275: 118710.
- [31] ZHANG Z Q, YU D F, XU X B, *et al.* Versatile snail-inspired superamphiphobic coatings with repeatable adhesion and recyclability[J]. *Chemical Engineering Science*, 2021, 230: 116182.
- [32] LIU M H, MAO T Y, ZHANG Y C, *et al.* General water-based strategy for the preparation of superhydrophobic coatings on smooth substrates[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2017, 56(46): 13783-13790.
- [33] WEI R X (韦任轩), XUE C H (薛朝华). Preparation and properties of wear-resistant superhydrophobic films with porous structure[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(5): 914-919.
- [34] ZHAO T T, YU R, HUANG W, *et al.* Aliphatic silicone-epoxy based hybrid photopolymers applied in stereolithography 3D printing[J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2021, 32(3): 980-987.
- [35] XUE C H, ZHAO L L, GUO X J, *et al.* Mechanically durable superhydrophobic surfaces by binding polystyrene nanoparticles on fibers with aluminum phosphate followed by hydrophobization[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 396: 125231.