

蓝靛果花青素的离子液体提取工艺优化及其体外抗氧化活性

王崑仑^{1,2},朱玲^{1,2},管立军^{1,2*},张馨笛^{1,2},陈凯新^{1,2},陈晴^{1,2},季妮娜³,樊晶^{1,2},周野^{1,2}

(1. 黑龙江省农业科学院食品加工研究所,黑龙江哈尔滨 150086;2. 黑龙江省食品加工重点实验室,黑龙江哈尔滨 150086;3. 黑龙江省农业科学院大豆研究所,黑龙江哈尔滨 150086)

摘要: 该文以蓝靛果为原料,采用离子液体提取具有生物活性的花青素,并对提取工艺参数进行优化。以蓝靛果花青素得率为评价指标,筛选出离子液体[C₈mim]Br为最佳提取溶剂,随后选取提取温度、离子液体浓度和液料比3个因素进行单因素试验,采用响应面Box-Behnken试验设计对提取工艺进行优化,确定最佳的提取条件为提取温度52℃、离子液体浓度12%、液料比13:1(mL/g)。在此最佳条件下,蓝靛果花青素得率为(3.53±0.18)%,明显高于超声辅助乙醇提取法和微波辅助乙醇提取法的得率。此外,蓝靛果花青素具有良好的清除DPPH自由基和ABTS⁺自由基的能力,IC₅₀值分别为13.350 mg/mL和6.558 mg/mL。综上,蓝靛果花青素具有作为天然抗氧化剂应用于食品工业中的潜力。

关键词: 蓝靛果;花青素;离子液体;工艺优化;抗氧化活性

Optimization of Ionic Liquid Extraction Process and *in vitro* Antioxidant Activity of

Lonicera caerulea L. Anthocyanin

WANG Kunlun^{1,2}, ZHU Ling^{1,2}, GUAN Lijun^{1,2*}, ZHANG Xindi^{1,2}, CHEN Kaixin^{1,2}, CHEN Qing^{1,2}, JI Nina³, FAN Jing^{1,2}, ZHOU Ye^{1,2}

(1. Food Processing Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China; 2. Heilongjiang Province Key Laboratory of Food Processing, Harbin 150086, Heilongjiang, China; 3. Soybean Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract: By employing *Lonicera caerulea* L. as the raw material, this paper adopted ionic liquids to extract anthocyanins with biological activity from *Lonicera caerulea* L., and optimized the parameters of the extraction process. Meanwhile, the yield of *Lonicera caerulea* L. anthocyanin was utilized as the evaluation index, and the ionic liquid [C₈mim]Br was screened as the optimal extraction solvent. Then the factors of extraction temperature, ionic liquid concentration, and liquid-to-feed ratio were selected for the single factor experiments. Additionally, the response surface Box-Behnken test design was employed to optimize the extraction process, and the optimal extraction conditions were determined, including the extraction temperature of 52 °C, ionic liquid concentration of 12%, and liquid-to-feed ratio of 13:1 (mL/g). In these optimal conditions, the anthocyanin yield was (3.53±0.18)%, significantly higher than that of anthocyanins obtained by ultrasound-assisted ethanol extraction and microwave-assisted ethanol extraction methods. In addition, *Lonicera caerulea* L. anthocyanins had a sound ability to scavenge DPPH free radicals and ABTS⁺ free radicals, with IC₅₀ values of 13.350 mg/mL and 6.558 mg/mL respectively. In conclusion, *Lonicera caerulea* L. anthocyanins had the potential to be adopted as natural antioxidants in the food industry.

Key words: *Lonicera caerulea* L.; anthocyanin; ionic liquid; process optimization; antioxidant activity

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFD1600505-6);黑龙江省农业科技创新跨越工程农业关键技术科技创新重点攻关项目(CX23GG16)

作者简介:王崑仑(1982—),男(汉),副研究员,博士,研究方向:植物有效成分,食品工程与营养。

*通信作者:管立军(1983—),男(回),研究员,博士,研究方向:植物有效成分,食品工程与营养。

引文格式:

王崑仑,朱玲,管立军,等. 蓝靛果花青素的离子液体提取工艺优化及其体外抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(4): 74-81.

WANG Kunlun, ZHU Ling, GUAN Lijun, et al. Optimization of Ionic Liquid Extraction Process and *in vitro* Antioxidant Activity of *Lonicera caerulea* L. Anthocyanin[J]. Food Research and Development, 2025, 46(4): 74-81.

蓝靛果(*Lonicera caerulea* L.)为忍冬科忍冬属多年生落叶灌木,果实多为椭圆形,呈蓝紫色,果被白霜^[1-2]。蓝靛果主要分布于中国东北、日本和俄罗斯等寒带地区,是一种营养价值和药用价值极高的寒地小浆果^[3-4]。花青素是蓝靛果中含量丰富的活性物质,在人类和小鼠细胞(肝癌细胞 SMMC-7721 和 H22)中证实了蓝靛果花青素的抗癌特性^[5]。研究表明,蓝靛果花青素可通过上调 NrF2 抗氧化途径对氧化应激引起的肝损伤起到保护作用^[6]。Fan 等^[7]研究发现,蓝靛果花青素中矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷是清除活性氧、发挥抗氧化性的关键组分。De Mello 等^[8]证实了蓝靛果花青素可以通过抑制促炎细胞因子和反映高水平氧化应激的分子的产生来抑制神经元损伤,这说明蓝靛果花青素抑制神经系统疾病方面具有很大的潜力。蓝靛果花青素可以抑制 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶和二肽基肽酶-4 的活性,从而抵抗糖尿病的发生^[9-10]。此外,蓝靛果花青素还被证实具有良好的抗菌、降脂、抗炎等作用,因此在食品和生物医药等行业中应用前景广阔^[11-12]。通常,从原料中提取花青素是有效利用花青素的首要 and 关键步骤。有机溶剂提取法是提取花青素最常用的方法,该方法利用相似相溶固液萃取的原理,从而达到提取分离的效果^[13]。此外,为提高花青素的提取效率,通常采用微波、超声、酶等手段辅助提取^[14]。但以有机溶剂为提取溶剂会造成环境中的化学污染和食品安全问题^[15]。

离子液体是由无机阴离子和有机阳离子组成的盐类混合物,由于其热稳定性强、选择性高、不易挥发、可回收性强,可作为新型绿色溶剂代替传统有机溶剂,符合可持续发展理念^[16-17]。苏适等^[18]以离子液体作为提取溶剂,采用超声辅助提取法提取黑豆花青素,经工艺优化后黑豆花青素的提取率为 4.118 mg/g,相比传统的提取方法,该方法的提取效果更好、更加稳定可行。周凯旋^[19]采用传统乙醇回流法(80 °C, 2 h)提取山楂原花青素的得率仅为 3.8%,而采用超声辅助离子液体法(49 °C, 41 min)提取山楂原花青素的得率高达 6.23%。目前还未有采用离子液体提取蓝靛果花青素的研究,因此,本研究以离子液体为提取溶剂并辅以超声手段,通过单因素试验和响应面 Box-Behnken 试验设计,对提取工艺进行优化,以期为蓝靛果花青素的高效利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蓝靛果:产自黑龙江省七台河市;矢车菊素标准品(分析纯,纯度 $\geq 98\%$):陕西元贝贝生物科技有限公司;离子液体([C₄mim]PF₆、[C₆mim]PF₆、[C₈mim]PF₆、[C₁₀mim]PF₆、[C₄mim]BF₄、[C₆mim]BF₄、[C₈mim]BF₄、[C₁₀mim]BF₄、[C₄mim]Br、[C₆mim]Br、[C₈mim]Br、[C₁₀mim]Br、[C₄mim]NTF₂、[C₆mim]NTF₂、[C₈mim]NTF₂ 和 [C₁₀mim]NTF₂) (化学纯):沈阳赛达科技有限公司;甲醇(分析纯):天津市富宇精细化工有限公司;无水乙醇(分析纯):国药集团化学试剂有限公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS) (pH7.4)、2,2-联苯基-1-苦基肼基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS](均为分析纯):上海源叶生物科技有限公司;去离子水:杭州娃哈哈集团有限公司。

1.2 仪器与设备

KQ-400KDE 型高功率超声波清洗器:巩义市予华仪器有限责任公司;Alpha 1-4 LSC 型冻干机:德国 Christ 公司;CARY100 型紫外分光光度计:美国 VARIAN 公司;QT-1 型漩涡混合器:上海琪特分析仪器有限公司;3-18K 型离心机:德国希格玛公司;L10-C051 型打浆机:九阳股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 蓝靛果的预处理

将新鲜的蓝靛果用打浆机打碎成浆后冷冻干燥,得到蓝靛果冻干粉,备用。

1.3.2 花青素得率的测定

准确称取 10 mg 矢车菊素标准品于 50 mL 棕色容量瓶中,用盐酸-乙醇混合溶液(pH2)定容,得到的矢车菊素标准储备液于 4 °C 条件下避光保存。分别移取 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 mL 矢车菊素标准储备液于 50 mL 容量瓶中,再用盐酸-乙醇混合溶液(pH2)定容,配制成浓度分别为 1、2、4、6、8 mg/L 的矢车菊素标准液。取系列矢车菊素标准液于比色皿中,以盐酸-乙醇混合溶液(pH2)为空白,于 520 nm 波长处测定吸光度。以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。蓝靛果花青素得率计算公式如下。

$$X = \frac{C \times V \times D}{m \times 1000} \times 100$$

式中: X 为蓝靛果花青素得率,%; C 为根据标准曲线计算的溶液浓度,mg/L; V 为提取液体积,mL; D 为稀释倍数; m 为蓝靛果冻干粉质量,mg。

1.3.3 离子液体的筛选

将离子液体([C₄mim]PF₆、[C₆mim]PF₆、[C₈mim]PF₆、[C₁₀mim]PF₆、[C₄mim]BF₄、[C₆mim]BF₄、[C₈mim]BF₄、[C₁₀mim]BF₄、[C₄mim]Br、[C₆mim]Br、[C₈mim]Br、[C₁₀mim]Br、[C₄mim]NTF₂、[C₆mim]NTF₂、[C₈mim]NTF₂和[C₁₀mim]NTF₂)与去离子水充分混合,观察离子液体的溶解情况。将可溶于水的离子液体用去离子水分别稀释成质量分数为2%、10%的溶液,配制蓝靛果花青素提取溶剂,备用。

准确称取0.1g蓝靛果粉末,以上述离子液体为提取溶剂,在液料比10.0:1(mL/g)、超声功率280W、超声时间60min、提取温度50℃的条件下提取蓝靛果花青素,记录蓝靛果花青素的含量。随后分别以去离子水、乙醇溶液和甲醇溶液为提取溶剂,按照相同的条件提取蓝靛果花青素并检测提取液中花青素的含量。将检测结果与离子液体水溶液检测结果进行对比。

1.3.4 离子液体提取蓝靛果花青素单因素试验

1.3.4.1 离子液体浓度对花青素得率的影响

用去离子水将离子液体稀释成质量比浓度为4%、6%、8%、10%、12%、14%的溶液作为提取溶剂。控制液料比为10.0:1(mL/g)、超声功率为280W、超声时间为60min、提取温度为30℃,探究离子液体浓度对蓝靛果花青素得率的影响。

1.3.4.2 提取温度对花青素得率的影响

在液料比10.0:1(mL/g)、离子液体浓度12%、超声功率280W、超声时间60min的条件下,探究不同提取温度(30、40、50、60、70、80℃)对花青素得率的影响。

1.3.4.3 液料比对花青素得率的影响

在提取温度30℃、离子液体浓度12%、超声功率280W、超声时间60min的条件下,探究不同液料比[5.0:1、7.5:1、10.0:1、12.5:1、15.0:1、17.5:1(mL/g)]对花青素得率的影响。

1.3.5 离子液体提取蓝靛果花青素响应面优化试验

在单因素试验结果的基础上,以花青素得率为响应值,提取温度(A)、离子液体浓度(B)、液料比(C)为自变量,采用三因素三水平的Box-Behnken设计对离子液体提取蓝靛果花青素的条件进行优化。响应面试验因素与水平见表1。

1.3.6 蓝靛果花青素体外抗氧化能力测定

1.3.6.1 DPPH 自由基清除率

将2.0mL DPPH-乙醇溶液(0.05mmol/L)与2.0mL

表1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of the response surface experiment

水平	因素		
	A 提取温度/℃	B 离子液体浓度/%	C 液料比/(mL/g)
-1	40	10	10.0:1
0	50	12	12.5:1
1	60	14	15.0:1

蓝靛果花青素-乙醇溶液(0.5、1、2、4、8、16、32mg/mL)混合,在室温下于黑暗处反应30min。随后测定反应溶液在517nm处的吸光度,以V_C(0.0625~32mg/mL)为阳性对照。蓝靛果花青素对DPPH自由基清除率(H ,%)计算公式如下。

$$H = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_0 为空白样品的吸光度; A 为待测样品的吸光度。

1.3.6.2 ABTS⁺自由基清除率

将10mL ABTS溶液(3.84mg/mL)与10mL过硫酸钾溶液(1.34mg/mL)混合,室温下避光反应15h后,用PBS溶液稀释(pH7.4),使稀释液在734nm处的吸光度稳定在0.70±0.02。然后将4.8mL的蓝靛果花青素溶液(0.25、0.5、1、2、4、8、16mg/mL)与0.2mL的ABTS稀释液混合,在黑暗中反应5min,测定反应溶液在734nm处的吸光度,以V_C(0.0156~16mg/mL)为阳性对照。蓝靛果花青素对ABTS⁺自由基清除率(R ,%)计算公式如下。

$$R = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_0 为ABTS溶液的吸光度; A_1 为反应溶液的吸光度。

1.4 数据处理

所有试验数据均以3次试验结果的平均数±标准差表示。分别采用Design-Expert 11.0、Origin 9.0和SPSS软件进行响应面设计、绘图和差异显著性分析,以 $p < 0.05$ 作为差异显著性标准。

2 结果与分析

2.1 花青素标准曲线的绘制

以矢车菊素浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制花青素标准曲线,如图1所示。

由图1可知,花青素的标准曲线方程为 $y = 0.0462x + 0.0002$,相关系数 $R^2 = 0.9999$,表明在1~8mg/L范围内,线性关系良好。

2.2 离子液体的筛选结果分析

将离子液体与水充分混合,发现离子液体[C₄mim]BF₄、[C₆mim]BF₄、[C₈mim]BF₄、[C₁₀mim]BF₄、[C₄mim]Br、

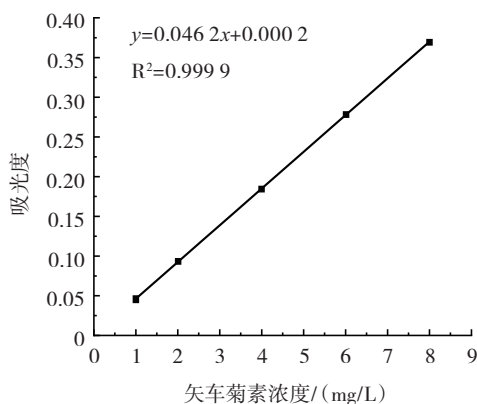


图1 花青素标准曲线

Fig.1 Anthocyanin standard curve

[C₆mim]Br、[C₈mim]Br 和 [C₁₀mim]Br 可溶于水,而离子液体[C₄mim]NTF₂、[C₆mim]NTF₂、[C₈mim]NTF₂、[C₁₀mim]NTF₂、[C₄mim]PF₆、[C₆mim]PF₆、[C₈mim]PF₆ 和 [C₁₀mim]PF₆ 不溶于水。随后,将可溶于水的离子液体稀释成浓度为 2%、10% 的溶液,结果发现离子液体[C₆mim]BF₄、[C₈mim]BF₄、[C₁₀mim]BF₄ 和 [C₁₀mim]Br 在浓度为 2% 时溶解性良好,浓度为 10% 时溶解性较差,且离心后出现分层现象,产生黄白色沉淀。离子液体[C₄mim]BF₄、[C₄mim]Br、[C₆mim]Br 和 [C₈mim]Br 在浓度为 2% 和 10% 时均可良好溶解,因此,选择 [C₄mim]BF₄、[C₄mim]Br、[C₆mim]Br 和 [C₈mim]Br 4 种离子液体进行后续蓝靛果花青素提取试验。不同离子液体提取蓝靛果花青素的得率见表 2。

表 2 不同离子液体提取的蓝靛果花青素得率

Table 2 Yield of anthocyanins from *Lonicera caerulea* L. extracted by different ionic liquids

离子液体类型	花青素得率/%	
	2% 离子液体浓度	10% 离子液体浓度
[C ₄ mim]BF ₄	2.17±0.07	3.14±0.09
[C ₄ mim]Br	2.33±0.05	2.49±0.07
[C ₆ mim]Br	2.72±0.06	3.29±0.08
[C ₈ mim]Br	3.38±0.11	3.42±0.09

由表 2 可知,在相同浓度下,采用离子液体[C₈mim]Br 提取蓝靛果花青素的效果最好。此外,还对其他溶剂提取的蓝靛果花青素得率进行了研究,结果见表 3。

表 3 不同提取剂提取的蓝靛果花青素得率

Table 3 Yield of anthocyanins extracted from *Lonicera caerulea* L. with different extractants

%				
水	乙醇	甲醇	2% [C ₈ mim]Br	10% [C ₈ mim]Br
1.67±0.09	1.72±0.14	3.24±0.17	3.38±0.11	3.42±0.09

由表 3 可知,在相同条件下,以水、乙醇、甲醇、2% [C₈mim]Br 和 10% [C₈mim]Br 为溶剂提取的蓝靛果花青

素得率分别为 (1.67±0.09)%、(1.72±0.14)%、(3.24±0.17)%、(3.38±0.11)% 和 (3.42±0.09)%。显然以离子液体[C₈mim]Br 为溶剂提取蓝靛果花青素的得率较高,离子液体作为新兴的提取溶剂,具有提高提取效率、节省有机溶剂、绿色环保等优点。

2.3 离子液体提取蓝靛果花青素单因素试验结果与分析

2.3.1 离子液体浓度对蓝靛果花青素得率的影响

图 2 为离子液体浓度对蓝靛果花青素得率的影响。

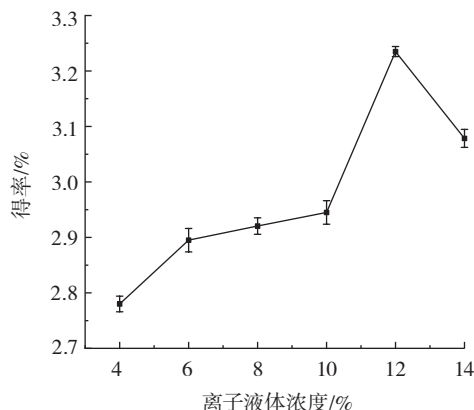


图 2 离子液体浓度对蓝靛果花青素得率的影响

Fig.2 Effect of ionic liquid concentration on the yield of *Lonicera caerulea* L. anthocyanins

由图 2 可知,随着离子液体浓度的增加,花青素得率随之升高,当离子液体浓度为 12% 时,蓝靛果花青素得率达到最大值,为 (3.24±0.01)%。当 [C₈mim]Br 浓度继续增大,花青素的得率降低,这是因为提取溶剂黏稠度过高,不利于向细胞内部扩散,从而导致蓝靛果花青素的溶出能力变差^[20]。因此,选择离子液体[C₈mim]Br 浓度为 10%、12%、14% 进行后续试验。

2.3.2 提取温度对蓝靛果花青素得率的影响

提取温度对蓝靛果花青素得率的影响见图 3。

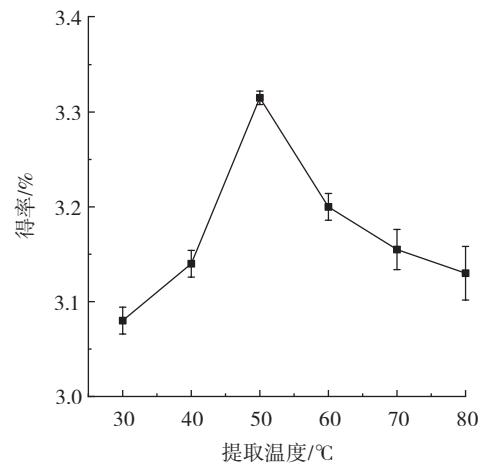


图 3 提取温度对蓝靛果花青素得率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on the yield of *Lonicera caerulea* L. anthocyanins

由图3可知,提取温度为30~50℃时,提取温度对蓝靛果花青素得率有正向的线性影响,这说明提取温度的升高加上超声的空化作用加速了溶质的溶出。当提取温度为50℃时,蓝靛果花青素得率达到最大值,为(3.32±0.07)%。然后,随着提取温度的升高,蓝靛果花青素得率逐渐下降,这是由于蓝靛果花青素不稳定,在提取温度较高的条件下易被氧化分解^[21-22]。因此,选择提取温度40、50、60℃进行后续试验。

2.3.3 液料比对蓝靛果花青素得率的影响结果与分析
液料比对蓝靛果花青素得率的影响见图4。

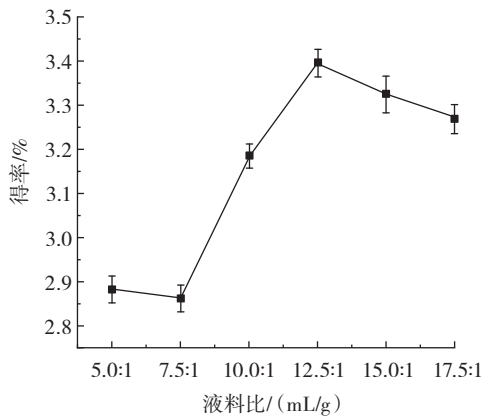


图4 液料比对蓝靛果花青素得率的影响

Fig.4 Effect of liquid-to-feed ratio on the yield of *Lonicera caerulea* L. anthocyanins

由图4可知,当液料比为12.5:1(mL/g)时,蓝靛果花青素得率达到最高,为(3.40±0.15)%。溶剂添加量的增加可能改善溶剂向细胞内的扩散能力,更有利于生物活性成分的溶解,从而导致更高的浸出速率^[23]。然而,过量的溶剂会吸收萃取系统中的空化能量,导致蓝靛果花青素产率下降^[18]。因此,选择液料比10.0:1、12.5:1、15.0:1(mL/g)进行后续试验。

2.4 离子液体提取蓝靛果花青素响应面优化试验结果与分析

2.4.1 模型拟合与统计分析

根据Box-Behnken设计原则,试验设计方案及响应值如表4所示。

采用方差分析对试验数据进行多元回归分析,将二阶多项式方程拟合为 $Y=3.36+0.0613A+0.0175B+0.0437C-0.015AB-0.0125AC-0.06BC-0.0258A^2-0.0333B^2-0.0407C^2$ 。

为检验模型的充分性和适用性,方差分析结果见表5。

由表5可知,一次项A、C,交互项AC、BC和二次项A²、B²、C²对蓝靛果花青素得率有极显著影响(p<0.01)。交互项AB对蓝靛果花青素得率有显著影响(p<0.05)。决定系数(R²)和调整决定系数(R²_{Adj})分别为0.9833和0.9618,证实了实际值与预测值之间的高度相关性^[24]。此外,相对较低的变异系数(0.61%)表明数

表4 离子液体提取蓝靛果花青素的响应面分析方案及响应值
Table 4 Response surface analysis scheme and response values of anthocyanins extracted from *Lonicera caerulea* L. by ionic liquid

试验号	A 提取温度/℃	B 离子液体浓度/%	C 液料比/(mL/g)	得率/%
1	50	10	15.0:1	3.37±0.10
2	50	12	12.5:1	3.48±0.08
3	60	12	15.0:1	3.30±0.15
4	50	14	15.0:1	3.29±0.12
5	40	14	12.5:1	3.27±0.07
6	50	12	12.5:1	3.45±0.08
7	50	12	12.5:1	3.46±0.11
8	40	12	15.0:1	3.29±0.12
9	50	14	10.0:1	3.33±0.09
10	60	14	12.5:1	3.26±0.13
11	60	10	12.5:1	3.35±0.14
12	40	12	10.0:1	3.16±0.22
13	50	10	10.0:1	3.19±0.11
14	50	12	12.5:1	3.47±0.21
15	50	12	12.5:1	3.49±0.17
16	40	10	12.5:1	3.22±0.20
17	60	12	10.0:1	3.33±0.14

表5 蓝靛果花青素得率的方差分析结果

Table 5 ANOVA test results of the yield of *Lonicera caerulea* L. anthocyanins

来源	平方和	方差	均差	F值	p值	显著性
模型	0.17	9	0.019	45.78	<0.0001	**
A	0.011	1	0.011	27.16	0.0012	**
B	5×10 ⁻⁵	1	5×10 ⁻⁵	0.12	0.7385	
C	7.2×10 ⁻³	1	7.2×10 ⁻³	17.38	0.0042	**
AB	4.9×10 ⁻³	1	4.9×10 ⁻³	11.83	0.0109	*
AC	6.4×10 ⁻³	1	6.4×10 ⁻³	15.45	0.0057	**
BC	0.012	1	0.012	29.21	0.0010	**
A ²	0.051	1	0.051	122.98	<0.0001	**
B ²	0.030	1	0.030	73.43	<0.0001	**
C ²	0.034	1	0.034	82.32	<0.0001	**
残差	2.9×10 ⁻³	7	4.1×10 ⁻⁴			
失拟项	1.9×10 ⁻³	3	6.3×10 ⁻⁴	2.53	0.1954	
纯误差	1.0×10 ⁻³	4	2.5×10 ⁻⁴			
总离差	0.17	16				

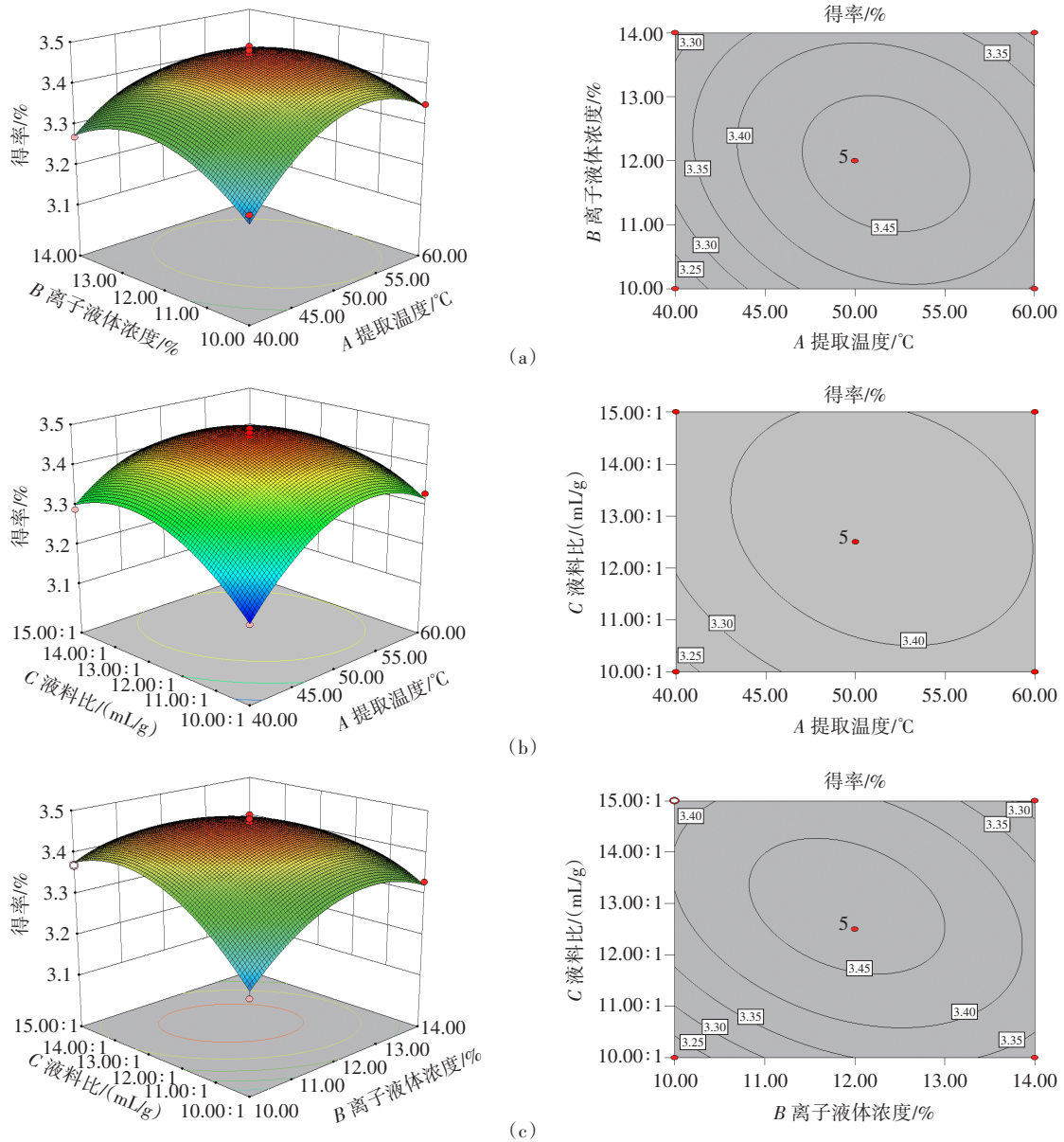
注:*表示影响显著,p<0.05;**表示影响极显著,p<0.01。

据离散程度低,试验值是可靠的^[25]。根据F值^[26],3个因素对蓝靛果花青素得率的影响大小顺序为提取温度(A)>液料比(C)>离子液体浓度(B)。

2.4.2 响应面分析

两个因素之间的交互作用对蓝靛果花青素得率的影响可以用三维响应曲面图来解释,结果如图5所示。

由图5可知,各因素交互作用的响应面图均为中心上凸,表明曲面顶点处对应的试验条件能使得蓝靛果花青素的得率尽可能大,这一现象是合理的,符合试验预期^[27]。并且3D图深色部分主要集中在3.46%附



(a)提取温度和离子液体浓度;(b)提取温度和液料比;(c)离子液体浓度和液料比。

图5 离子液体提取蓝靛果花青素的3D响应面图和2D等高线图

Fig.5 3D response surface and 2D contour of anthocyanin extracted from *Lonicera caerulea* L. by ionic liquid

近,说明响应面模型拟合出的最佳蓝靛果花青素得率高于3.46%。椭圆等高线图表示变量之间的交互作用显著,而圆形等高线图则相反^[28]。由等高线图可知,提取温度与离子液体浓度、提取温度与液料比、离子液体浓度与液料比之间的交互作用均对蓝靛果花青素的得率有显著影响,这与方差分析结果相一致。

2.4.3 预测模型的验证

根据回归模型,确定最佳蓝靛果花青素提取条件为提取温度51.54℃、离子液体浓度11.87%、液料比12.88:1(mL/g),该条件下蓝靛果花青素得率预测结果为3.48%。考虑到实际操作的方便性和局限性,调整靛果花青素提取条件为提取温度52℃、离子液体浓度12%、液料比13:1(mL/g),在此条件下得到的蓝靛果

花青素得率为(3.53±0.18)%,与响应面预测值接近,这说明响应面法可用于优化离子液体提取蓝靛果花青素的工艺条件。

2.4.4 不同提取方法的比较

不同提取方法提取的蓝靛果花青素得率如表6所示。

表6 不同提取方法提取的蓝靛果花青素得率

Table 6 Yield of *Lonicera caerulea* L. anthocyanins by various extracting methods

方法	液料比/ (mL/g)	超声功 率/W	微波功 率/W	提取温 度/℃	提取时 间/min	得率/%
离子液体提取	13:1	280	-	52	20	3.53±0.18
超声辅助乙醇提取	13:1	280	-	52	20	1.65±0.39
微波辅助乙醇提取	13:1	-	280	52	20	2.07±0.44

注:-表示不涉及此条件下的试验。

由表6可知,采用离子液体提取、超声辅助乙醇提取和微波辅助乙醇提取的蓝靛果花青素得率分别为(3.53±0.18)%、(1.65±0.39)%和(2.07±0.44)%。其中,离子液体提取蓝靛果花青素的效果更好。采用离子液体不仅提高了提取效率,还节省了有机溶剂,在一定程度上保护了环境。综上,离子液体提取花青素更加有意义,为离子液体作为提取剂提取花青素提供了重要的理论依据。

2.5 体外抗氧化试验结果与分析

2.5.1 DPPH 自由基清除率

DPPH 自由基是稳定的单电子自由基,可广泛用于评估物质的抗氧化能力^[29]。图6为蓝靛果花青素清除 DPPH 自由基的能力。

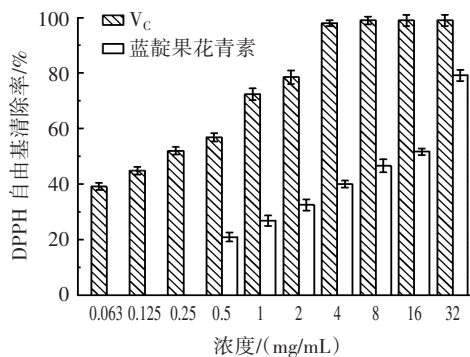


图6 蓝靛果花青素清除 DPPH 自由基的能力

Fig.6 DPPH free radical scavenging ability of *Lonicera caerulea* L. anthocyanins

由图6可知,在试验浓度范围(0.5~32 mg/mL)内,随着浓度的增加,蓝靛果花青素对 DPPH 自由基的清除能力逐渐增强,当浓度达到 32 mg/mL 时,蓝靛果花青素 DPPH 自由基清除率为(79.17±2.00)%,低于 V_c 对 DPPH 自由基的清除率(99.04±2.02)%。经计算,蓝靛果花青素清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 13.350 mg/mL。综上,蓝靛果花青素具有良好的清除 DPPH 自由基的能力,但弱于 V_c。

2.5.2 ABTS⁺自由基清除率

ABTS⁺在 734 nm 波长下具有特征的紫外吸收。当抗氧化剂存在时,吸光度降低^[30]。图7为蓝靛果花青素清除 ABTS⁺自由基的能力。

由图7可知,在试验浓度范围(0.25~16 mg/mL)内,随着浓度的增加,蓝靛果花青素清除 ABTS⁺自由基的能力逐渐增大。当花青素浓度为 16 mg/mL 时,蓝靛果花青素的 ABTS⁺自由基清除率为(82.99±2.14)%。经计算,蓝靛果花青素清除 ABTS⁺自由基的 IC₅₀ 值为 6.558 mg/mL,而 V_c 的 IC₅₀ 值为 0.217 mg/mL。综上,蓝靛果花青素具有良好的体外抗氧化能力。

3 结论

花青素是蓝靛果中重要的活性物质,具有良好的

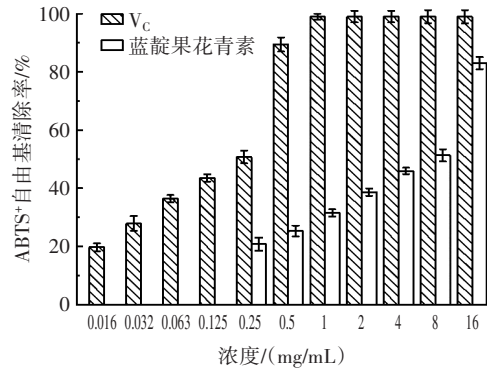


图7 蓝靛果花青素清除 ABTS⁺自由基的能力

Fig.7 ABTS free radical scavenging ability of *Lonicera caerulea* L. anthocyanins

药用价值。从原料中提取花青素对花青素的应用至关重要。本研究采用离子液体提取蓝靛果花青素,首先对离子液体进行筛选,得到最佳提取溶剂为[C₈mim]Br。然后评价提取温度、离子液体浓度及液料比3个因素对蓝靛果花青素得率的影响。根据单因素试验结果,利用响应面 Box-Behnken 试验优化离子液体提取蓝靛果花青素的最佳条件为提取温度 52 °C、离子液体浓度 12%、液料比 13:1 (mL/g),此条件下蓝靛果花青素得率为(3.53±0.18)%,高于超声辅助乙醇提取法和微波辅助乙醇提取法的得率。最后研究了蓝靛果花青素的体外抗氧化能力,研究发现当蓝靛果花青素浓度为 32 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率为(79.17±2.00)%;当浓度为 16 mg/mL 时,对 ABTS⁺自由基的清除率为(82.99±2.14)%。综上,蓝靛果花青素具有良好的抗氧化活性,可作为抗氧化剂应用于食品、生物医药等领域。

参考文献:

- [1] 张星. 蓝莓与蓝靛果复合冻干粉加工贮藏稳定性及产品开发生态学[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
ZHANG Xing. Processing and storage stability and product development of blueberry and *Lonicera edulis* composite freeze-dried powder[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [2] 李江飞. 低温等离子体辅助酶解蓝靛果高效提取花色苷研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
LI Jiangfei. Study on efficient extraction of anthocyanins from *Lonicera caerulea* L. with low-temperature plasma-assisted enzymatic[D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [3] 张龄予. 蓝靛果多酚类成分分析及微胶囊制备[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
ZHANG Lingyu. Analysis of polyphenols in *Lonicera edulis* and preparation of microcapsules[D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2023.
- [4] ZHANG B X, HUANG X W, NIU L J, et al. *Lonicera caerulea* pomace alleviates DSS-induced colitis via intestinal barrier improvement and gut microbiota modulation[J]. Foods, 2023, 12(18): 3329.
- [5] ZHOU L P, WANG H, YI J J, et al. Anti-tumor properties of anthocyanins from *Lonicera caerulea* 'Beilei' fruit on human hepatocellular carcinoma: *in vitro* and *in vivo* study[J]. Biomedicine & Pharma-

- cotherapy, 2018, 104: 520-529.
- [6] YU L, ZHANG S D, ZHAO X L, et al. Cyanidin-3-glucoside protects liver from oxidative damage through AMPK/Nrf2 mediated signaling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 73: 104148.
- [7] FAN L L, LIN L, ZHANG Y, et al. Component characteristics and reactive oxygen species scavenging activity of anthocyanins from fruits of *Lonicera caerulea* L.[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134391.
- [8] DE MELLO J E, LUDUVICO K P, DOS SANTOS A, et al. Therapeutic potential of blackberry extract in the preventing memory deficits and neurochemical alterations in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of a rat model with *Amnesia*[J]. Metabolic Brain Disease, 2023, 38(4): 1261-1272.
- [9] CHENG Z, BAO Y W, LI Z Y, et al. *Lonicera caerulea* (Haskap berries): A review of development traceability, functional value, product development status, future opportunities, and challenges[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(27): 8992-9016.
- [10] BILAWAL A, ISHFAQ M, GANTUMUR M A, et al. A review of the bioactive ingredients of berries and their applications in curing diseases[J]. Food Bioscience, 2021, 44: 101407.
- [11] GUO L C, QIAO J L, ZHANG L J, et al. Critical review on anthocyanins in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) and their function[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 204: 108090.
- [12] 李圣桡, 李若萌, 陈博朴, 等. 蓝靛果的营养价值与加工技术研究进展[J]. 农产品加工, 2020(2): 68-73.
- LI Shengrao, LI Ruomeng, CHEN Bopu, et al. Research progress on nutritional value and processing technology of blue rime fruit[J]. Farm Products Processing, 2020(2): 68-73.
- [13] 刘玟君, 李金洲, 陈子隽, 等. 原花青素的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(14): 5-9.
- LIU Minjun, LI Jinzhou, CHEN Zijun, et al. Research progress of procyanidins[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(14): 5-9.
- [14] 冯海博, 石惠宇, 罗财伟, 等. 花青素的提取分离纯化工艺、生理功能及在动物生产中应用的研究进展[J]. 饲料研究, 2022, 45(23): 139-143.
- FENG Haibo, SHI Huiyu, LUO Caiwei, et al. Research progress on extraction, separation and purification technology, physiological function and application in animal production of anthocyanin[J]. Feed Research, 2022, 45(23): 139-143.
- [15] SHEN H Y, HOU Y J, XI M H, et al. Electron beam irradiation enhanced extraction and antioxidant activity of active compounds in green walnut husk[J]. Food Chemistry, 2022, 373: 131520.
- [16] 焦傲傲, 金爽, 李慧玲, 等. 离子液体在中药化学成分提取中的研究进展[J]. 化学工程师, 2023, 37(10): 79-81, 102.
- JIAO Aoao, JIN Shuang, LI Huiling, et al. Research progress of ionic liquids in the extraction of chemical components in traditional Chinese medicine[J]. Chemical Engineer, 2023, 37(10): 79-81, 102.
- [17] LIN H M, ZHANG Y G, HAN M, et al. Aqueous ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of eight ginsenosides from ginseng root[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20(2): 680-684.
- [18] 苏适, 于德涵, 柴宝丽, 等. 响应面法优化超声辅助离子液体提取黑豆花青素工艺研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(7): 154-159.
- SU Shi, YU Dehan, CHAI Baoli, et al. Optimization of ultrasound-assisted ionic liquid extraction of anthocyanins from black beans by response surface methodology[J]. China Condiment, 2019, 44(7): 154-159.
- [19] 周凯旋. 山楂原花青素和多糖高效提取及体外模拟消化研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2023.
- ZHOU Kaixuan. Study on efficient extraction and simulated digestion of proanthocyanidins and polysaccharides from hawthorn *in vitro*[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2023.
- [20] 魏然, 林萱, 周凯旋, 等. 超声辅助离子液体提取藜麦麸皮总皂苷及其抑菌活性研究[J]. 食品科技, 2021, 46(11): 203-209.
- WEI Ran, LIN Xuan, ZHOU Kaixuan, et al. Extraction and antibacterial activities of saponins from quinoa wheat bran by ultrasound-assisted ionic liquids[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(11): 203-209.
- [21] 金周雨, 孟展冰, 郭凌霄, 等. 蓝靛果花青素稳定性研究[J]. 北方农业学报, 2019, 47(6): 108-112.
- JIN Zhouyu, MENG Zhanbing, GUO Lingxiao, et al. Study of the stability of anthocyanins in blue hazelnut[J]. Journal of Northern Agriculture, 2019, 47(6): 108-112.
- [22] 庄星光, 韩春然, 马蕊, 等. 蓝靛果花青素的提取及稳定性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2019, 35(3): 313-315, 338.
- ZHUANG Xingguang, HAN Chunran, MA Rui, et al. Extraction and stability of anthocyanin from *Lonicera edulis*[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2019, 35(3): 313-315, 338.
- [23] CHEN Z L, MA J, LI P, et al. Preparation of hypoglycemic anthocyanins from mulberry (*Fructus Mori*) fruits by ultrahigh pressure extraction[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2023, 84: 103255.
- [24] 邱菊, 陈昌琳, 陈冰艺, 等. 响应面法优化超声辅助乙醇提取桑葚花青素工艺及稳定性分析[J]. 中国调味品, 2023, 48(11): 176-182.
- QIU Ju, CHEN Changlin, CHEN Bingyi, et al. Optimization of process of ultrasonic-assisted ethanol extraction of anthocyanins from mulberry by response surface methodology and analysis of their stability[J]. China Condiment, 2023, 48(11): 176-182.
- [25] 胡媛博, 杨春. 响应面法优化紫芦笋花青素和多糖分步提取工艺[J]. 中国调味品, 2023, 48(10): 196-203.
- HU Yuanbo, YANG Chun. Optimization of stepwise extraction process of anthocyanin and polysaccharide from purple *Asparagus* by response surface method[J]. China Condiment, 2023, 48(10): 196-203.
- [26] YANG Y, LEI Z X, ZHAO M M, et al. Microwave-assisted extraction of an acidic polysaccharide from *Ribes nigrum* L.: Structural characteristics and biological activities[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 147: 112249.
- [27] AMEER K, CHUN B S, KWON J H. Optimization of supercritical fluid extraction of steviol glycosides and total phenolic content from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves using response surface methodology and artificial neural network modeling[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 109: 672-685.
- [28] FU X Q, ZHANG G L, DENG L, et al. Simultaneous extraction and enrichment of polyphenol and lutein from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower by an enzyme-assisted ethanol/ammonium sulfate system [J]. Food & Function, 2019, 10(1): 266-276.
- [29] ROZI P, ABUDUWAILI A, MA S J, et al. Isolations, characterizations and bioactivities of polysaccharides from the seeds of three species *Glycyrrhiza*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 364-371.
- [30] LI G Q, CHEN P F, ZHAO Y T, et al. Isolation, structural characterization and anti-oxidant activity of a novel polysaccharide from garlic bolt[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 267: 118194.