

牡蒿总黄酮的提取、纯化及抗氧化活性分析

张宽朝^{1†*}, 徐晨阳^{1†}, 余佳琪¹, 苏鸿呈¹, 徐忠有^{2*}

¹安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; ²安徽沃土稻虾养殖专业合作社, 合肥 231252

摘要:牡蒿为我国多地常见的一种药食两用植物, 含有丰富的黄酮类化合物。为综合利用牡蒿植物资源, 以牡蒿地上部茎叶为原料, 利用响应面法分析乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取温度对牡蒿总黄酮提取含量影响, 探究大孔树脂纯化条件, 分析纯化前后牡蒿总黄酮的抗氧化活性。结果表明, 牡蒿总黄酮的最佳提取条件为乙醇体积分数 70%、乙醇用量 20 mL、提取时间 85 min、提取温度 40 °C。AB-8 是理想的适用于分离纯化牡蒿总黄酮的大孔树脂, 其静态吸附、解吸的最佳时间分别为 2 h 与 1.5 h, 上样质量浓度最佳为 1.2 mg/mL, 洗脱乙醇浓度最佳为 50%。体外实验表明, 牡蒿总黄酮粗提物和大孔树脂纯化物有较好的还原力, 对 ABTS⁺·、DPPH·、·OH、O₂⁻ 表现出较强的清除能力。牡蒿黄酮具有植物黄酮资源的挖掘潜力和价值。

关键词:牡蒿; 总黄酮; 提取纯化; 响应面优化; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)2-0281-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.2.012

Extraction and purification of total flavonoids from *Artemisia japonica* Thunb. and its antioxidant activity

ZHANG Kuan-chao^{1†*}, XU Chen-yang^{1†}, YU Jia-qi¹, SU Hong-cheng¹, XU Zhong-you^{2*}

¹School of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China;

²Anhui Fertile Soil Professional Cooperative of Rice and Shrimp Breeding, Hefei 231252, China

Abstract: *Artemisia japonica* is a kind of plant resource used both as medicine and food in China, which is rich in flavonoids. In order to realize the comprehensive utilization of plant resources, the stems and leaves of *A. japonica* were used as materials. The effects of ethanol volume fraction, ethanol dosage, extraction time and extraction temperature on the extraction content of total flavonoids in *A. japonica* were analyzed by response surface method, the purification conditions for total flavonoids by macroporous resin were studied, and the antioxidant activity of total flavonoids from *A. japonica* before and after purification was analyzed. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: ethanol volume fraction 70%, ethanol dosage 20 mL, extraction time 85 min and extraction temperature 40 °C. AB-8 was an ideal macroporous resin suitable for the separation and purification of total flavonoids from *A. japonica*. The optimal time of static adsorption and desorption were 2 h and 1.5 h respectively, and the optimal mass concentration of loading sample was 1.2 mg/mL, and the optimal concentration of eluting ethanol was 50%. The antioxidant experiment *in vitro* showed that the crude extract of total flavonoids from *A. japonica* (CFAJ) and purified product (PFAJ) with macroporous resin all had good reducing power, and showed strong scavenging ability to ABTS⁺·, DPPH·, ·OH, O₂⁻. The flavonoids of *A. japonica* have the potential and value of exploiting plant flavone resources.

Key words: *Artemisia japonica*; total flavonoids; extraction and purification; response surface optimization; antioxidant activity

牡蒿 (*Artemisia japonica* Thunb.) 是我国多地常见的一种菊科蒿属植物, 多年生草本, 植株有香气,

为药食两用植物, 其嫩茎叶可供食用, 风味甚佳^[1]。牡蒿味苦、微甘, 性凉, 可全草入药; 具清热、凉血、解毒之功效。现代药理学研究表明, 牡蒿含有丰富的黄酮类、多糖、多酚类、皂苷类以及挥发油等化合物, 具有消炎、抗氧化、抗衰老等多种保健功效^[2,3]。牡蒿含有的萜烯类、生物碱、类黄酮、甾类、酚类、独特的氨基酸和多糖等化学成分均具有驱虫杀虫、抗菌

收稿日期: 2022-07-26

接受日期: 2022-12-20

基金项目: 2022 年国家级大学生创新创业训练计划 (202210364045);

2021 年安徽省大学生创新创业训练计划 (S202110364231); 安

徽省第六批省级科技特派员工作站 (皖科农秘[2022]188 号)

† 共同第一作者

* 通信作者 Tel: 86-551-5786590; E-mail: zhangkch1980@126.com

杀菌的活性,可用于开发植物源杀虫剂^[4,5]。

黄酮类化合物是一类具有羰基的天然有机产物,因大多具有颜色,故名黄酮。作为植物中的一类重要次生代谢产物,黄酮类化合物具有重要的生理和药理作用。自然界中菊科、豆科、唇形科等双子叶植物一般含有黄酮类化合物较多。牡蒿作为菊科蒿属植物,其黄酮类化合物含量尤为丰富。

目前,牡蒿作为蔬菜食用或作为药材在传统中医药临床方剂中有较多应用,现代医药健康领域对牡蒿的药用资源开发程度仍处于较低水平^[6],国内外关于牡蒿总黄酮的研究报道较少。Gu等^[7]分析了牡蒿的化学成分,从中鉴定出的牡蒿黄酮类化合物主要为茵陈色原酮、8,4'-二羟基-3,7,2'-三甲氧基黄酮、3,5-二羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮等;Zhang等^[8]研究牡蒿总黄酮的提取方法,发现85%甲醇溶液索氏提取2 h条件下牡蒿总黄酮得率最高,70%乙醇溶液提取6 h得率较次但最适用于工业生产。尚未见牡蒿总黄酮的提取、纯化工艺优化及抗氧化活性相关报道。

基于此,本研究以牡蒿地上部茎叶为试验材料,利用响应面法优化牡蒿总黄酮乙醇浸提法工艺,在此基础上探究大孔树脂对牡蒿总黄酮纯化条件,分析牡蒿总黄酮的抗氧化活性,以期在医药、保健和食品等领域的开发应用提供理论依据和数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验原料

牡蒿鲜样于2021年4月采自安徽省肥西县境内。安徽农业大学生命科学学院植物学教研室鉴定为菊科蒿属牡蒿。将牡蒿鲜样于烘箱中杀青并烘干即得到牡蒿干样。干样经粉碎后过100目筛,备用。

1.2 主要药品试剂

芦丁标准品(批号 MUST-21121201,中国药品生物制品检定所);维生素C(批号 211026,国药集团);2,2-二(4-叔辛基苯基)-1-苦肼基自由基(DP-PH,批号 211229,上海源聚生物科技有限公司);2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS,批号 220123,上海源聚生物科技有限公司);AB-8大孔吸附树脂(上海源叶生物科技有限公司);X-5大孔吸附树脂(上海源叶生物科技有限公司);CD-180大孔吸附树脂(蚌埠天星树脂有限公司);无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、硫酸亚铁、水杨酸、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、邻苯三酚等均为

国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 芦丁标准曲线绘制

参照亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法测定总黄酮含量^[9]。

准确吸取0.10 mg/mL芦丁标准液0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL,加30%乙醇溶液至5 mL,再加5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,震荡后放置5 min,加入10%硝酸铝溶液0.3 mL,摇匀后放置6 min,加1.0 mol/mL NaOH溶液2 mL,30%乙醇定容至10 mL,摇匀,510 nm处测定吸光度值。以芦丁含量(μg)为横坐标,反应体系在510 nm下的吸光度为纵坐标,绘制标准曲线方程: $y = 0.0012x - 0.0078$, $R^2 = 0.9993$ 。

1.3.2 单因素试验

1.3.2.1 乙醇体积分数对牡蒿总黄酮提取的影响

取牡蒿待测样品1.0 g,分别加入体积分数为30%、40%、50%、60%、70%、80%的乙醇溶液40 mL,50℃水浴加热60 min,取出样品振摇,冷却,5 000 r/min离心。取0.5 mL上清液测定,探究不同乙醇体积分数对牡蒿总黄酮提取的影响。

1.3.2.2 乙醇用量对牡蒿总黄酮提取的影响

按上述最佳乙醇体积分数,固定提取温度为50℃,提取时间为60 min,乙醇用量分别为10、20、30、40、50、60、70 mL,取出样品振摇,冷却,5 000 r/min离心。取0.5 mL上清液测定,探究不同乙醇用量对牡蒿总黄酮提取的影响。

1.3.2.3 提取时间对牡蒿总黄酮提取的影响

取上述最佳乙醇体积分数及用量,固定提取温度为50℃,时间分别为40、60、80、100、120、140、160 min,取出样品振摇,冷却,5 000 r/min离心。取0.5 mL上清液测定,探究不同提取时间对牡蒿总黄酮提取的影响。

1.3.2.4 提取温度对牡蒿总黄酮提取的影响

取上述最佳乙醇体积分数、乙醇用量及提取时间,控制提取温度分别为30、40、50、60、70、80℃,取出样品振摇,冷却,5 000 r/min离心。取0.5 mL上清液测定,探究不同提取温度对牡蒿总黄酮提取的影响。

1.3.3 响应面法试验因素水平设计

在单因素试验的基础上,利用Design Expert 10.0软件的Box-Behnken中心组合试验设计原理进行响应面试验。试验选取A-乙醇体积分数(%),B-

乙醇用量 (mL)、C-提取时间 (min)、D-提取温度 (°C) 4 个因素作为自变量, 设定编码水平为 -1、0、1,

以牡蒿提取液总黄酮含量 (Y) 为响应值。响应面试验因素及水平见表 1。

表 1 响应曲面优化设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface method

水平 Level	因素 Factor			
	A 乙醇体积分数 Ethanol volume fraction (%)	B 乙醇用量 Ethanol dosage (mL)	C 提取时间 Extraction time (min)	D 提取温度 Extraction temperature (°C)
-1	50	20	60	40
0	60	30	80	50
1	70	40	100	60

1.3.4 大孔树脂纯化条件的优化

1.3.4.1 不同大孔树脂对牡蒿总黄酮纯化效果的比较

选择 AB-8、X-5 和 CD-180 3 种大孔树脂作为研究对象。以树脂对总黄酮的饱和吸附量、吸附率以及解析率作为指标来确定大孔树脂吸附法纯化牡蒿总黄酮的最佳树脂种类。

1.3.4.2 大孔树脂纯化条件的优化

根据“1.3.4.1”项下确定的树脂, 从静态吸附与解吸的最佳时间选择、溶液质量浓度对静态吸附的影响、乙醇浓度对大孔吸附树脂解吸的影响等进行纯化条件的优化。

1.3.5 牡蒿总黄酮的抗氧化活性测定

参考铁氰化钾法测定还原力^[10]。

参考 Yan 等^[11-14]方法测定清除 ABTS⁺·、DPH·、·OH 及 O₂⁻ 能力。按公式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中: A_i 为样品吸光度, A_j 分别为纯水代替 ABTS⁺· 体系、无水乙醇溶液代替 DPPH 乙醇溶液、纯水代替 H₂O₂ 及邻苯三酚溶液的吸光度; A₀ 为空白样品吸光度。

1.4 数据处理

所有试验均重复三次。采用 Excel 2016 和 Design Expert 10.0 软件进行数据统计、作图和响应面分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

高效、绿色、低成本是植物有效成分提取方法选择的基本原则, 传统有机溶剂浸提法仍是普遍采用的常规方法。溶剂的极性不同, 对植物有效成分萃

取的影响存在显著差异^[15]。黄酮类化合物不易溶于水, 易溶于极性强的有机溶剂。作为安全性高的有机浸提溶剂之一, 乙醇在植物黄酮提取中被广泛应用。

乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取温度对牡蒿总黄酮提取含量的影响如图 1~4 所示。可以发现, 随着乙醇体积分数的上升、乙醇用量的增加、提取时间的延长、提取温度的升高, 牡蒿提取液总黄酮含量均呈先升后降趋势。可能由于不同乙醇体积分数溶剂具有不同的极性而对黄酮的溶解力不同, 但过大的乙醇体积分数导致黄酮物质与溶剂的极性差增大, 溶解性降低; 乙醇用量较低时, 提取体系料液饱和, 黄酮物质析出不足, 而乙醇用量超过

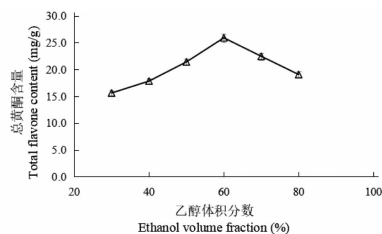


图 1 乙醇体积分数对牡蒿总黄酮提取的影响

Fig. 1 Effect of ethanol volume fraction on extraction of total flavonoids from *A. japonica*

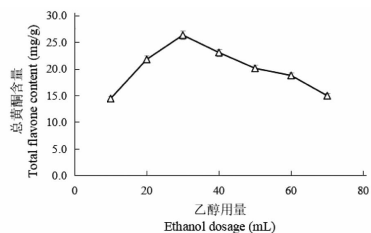


图 2 乙醇用量对牡蒿总黄酮提取的影响

Fig. 2 Effects of ethanol dosage on extraction of total flavonoids from *A. japonica*

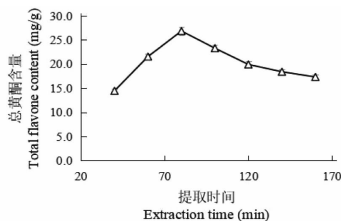


图3 提取时间对牡蒿总黄酮提取的影响

Fig. 3 Effects of time on extraction of total flavonoids from *A. japonica*

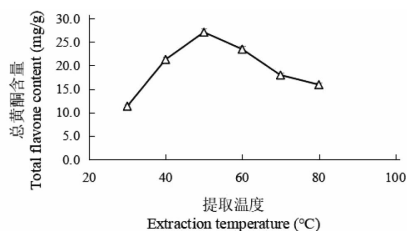


图4 提取温度对牡蒿总黄酮提取的影响

Fig. 4 Effects of temperatures on extraction of total flavonoids from *A. japonica*

30 mL时,醇溶性和脂溶性杂质溶出量增大,影响牡蒿黄酮物质的溶出;提取时间较短,牡蒿吸热不足,细胞破裂程度较低,溶出黄酮成分较少,提取时间过长,大部分活性成分溶出,含量不再升高,且易造成分解;提取温度的适度升高,体系扩散系数增加,分子运动加速,利于黄酮物质的溶出与扩散,但提取温度过高,导致乙醇溶剂挥发影响黄酮物质的溶解,以及黄酮物质结构的破坏造成有效成分的损失^[16,17]。

单因素试验条件下,乙醇体积分数60%、乙醇用量30 mL、提取时间80 min、提取温度50 °C时,提取液总黄酮含量最大,分别为25.90、26.32、26.84、27.09 mg/g。后续以乙醇体积分数60%、乙醇用量30 mL、提取时间80 min、提取温度50 °C进行响应面试验设计。

2.2 响应面优化

2.2.1 响应面分析

根据 Box-Behnken 试验设计原理,在单因素试验结果基础上,对总黄酮的提取工艺进行4因素3水平中心组合试验设计。试验设计与响应结果如表2所示。用 Design Expert 10.0 软件对表2数据进行回归模型方差分析。分析结果如表3所示。对各因素实验数据进行回归拟合,得回归方程为:牡蒿提取液总黄酮含量(mg/g) = 23.616 0 - 0.104 2A + 0.962 5B + 1.643 3C - 1.445 0D - 4.020 0AB + 4.345 0AC - 0.332 5AD + 0.347 5BC + 2.745 0BD + 0.092 0A² - 1.160 5B² - 2.776 8C² + 2.855 8D²。由表3分析可知,回归方差分析显著性检验表明该模型回归显著($P=0.0009 < 0.01$),失拟项不显著($P=0.9198 > 0.05$),该模型具有统计学意义。方程的1次项C、D对响应值的影响显著,2次项C²、D²对响应值的影响极显著;交互项AB、AC和CD对响应值的影响极显著,BD影响显著。试验中各因素的F值可以直观反映各因素影响的大小,F值越大,其对响应值的影响也越大。通过对各因素的影响程度进行分析可以发现, $F_A=0.024$, $F_B=2.08$, $F_C=6.07$, $F_D=4.69$,故可知各因素对牡蒿提取液总黄酮含量影响大小顺序为提取时间>提取温度>乙醇用量>乙醇体积分数。试验影响因素之间交互作用的响应面图和等高线图见图5,与表3所示回归模型方差分析结果一致。

响应面是一种有效的统计和优化方法,在植物源黄酮提取优化研究中的应用日趋广泛,其对数据的分析较传统的正交设计方法更为详细,可直观看出各影响因素的显著情况和两因素间的交互作用。试验与采用乙醇浸提法考察补骨脂总黄酮^[18]、采用乙醇-索氏法提取胡麻籽饼粕黄酮^[19]的响应面试验结果相一致。

表2 Box-Behnken 试验响应结果

Table 2 Response results of Box-Behnken test

试验号 Test number	各因素编码值 Code value of each factor				总黄酮含量 Total flavone content (mg/g)
	乙醇体积分数 Ethanol volume fraction (%)	乙醇用量 Ethanol dosage (mL)	提取时间 Extraction time (min)	提取温度 Extraction temperature (°C)	
1	1	0	0	-1	26.94
2	-1	0	0	1	26.47
3	1	1	0	0	20.54
4	0	0	1	1	28.96
5	1	0	1	0	26.19
6	-1	0	0	-1	27.26

续表 2(Continued Tab. 2)

试验号 Test number	各因素编码值 Code value of each factor				总黄酮含量 Total flavone content(mg/g)
	乙醇体积分数 Ethanol volume fraction (%)	乙醇用量 Ethanol dosage (mL)	提取时间 Extraction time (min)	提取温度 Extraction temperature (°C)	
7	0	1	-1	0	18.63
8	-1	0	-1	0	23.34
9	1	-1	0	0	25.38
10	0	0	0	0	23.24
11	0	-1	1	0	19.65
12	0	-1	-1	0	18.48
13	-1	0	1	0	16.56
14	0	1	0	1	27.65
15	0	0	0	0	24.54
16	0	1	0	-1	23.68
17	0	0	0	0	20.06
18	0	1	1	0	21.19
19	1	0	0	1	24.82
20	0	-1	0	-1	27.44
21	0	-1	0	1	20.43
22	0	0	0	0	21.82
23	0	0	1	-1	25.92
24	0	0	-1	-1	28.57
25	0	0	-1	1	14.14
26	1	0	-1	0	15.59
27	-1	-1	0	0	17.92
28	0	0	0	0	28.42
29	-1	1	0	0	29.16

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	453.05	14	32.36	6.06	0.000 9 **
A	0.13	1	0.13	0.024	0.878 1
B	11.12	1	11.12	2.08	0.170 9
C	32.41	1	32.41	6.07	0.027 3 *
D	25.06	1	25.06	4.69	0.048 0 *
AB	64.64	1	64.64	12.11	0.003 7 **
AC	75.52	1	75.52	14.15	0.002 1 **
AD	0.44	1	0.44	0.083	0.777 7
BC	0.48	1	0.48	0.091	0.768 0
BD	30.14	1	30.14	5.65	0.032 3 *
CD	76.30	1	76.30	14.30	0.002 0 **
A ²	0.06	1	0.06	0.010	0.920 7
B ²	8.74	1	8.74	1.64	0.221 6
C ²	50.01	1	50.01	9.37	0.008 5 **
D ²	52.90	1	52.90	9.91	0.007 1 **
残差 Residual	74.72	14	5.34		
失拟项 Lack of fit	34.77	10	3.48	0.35	0.919 8
纯误差 Pure error	39.94	4	9.99		
总误差 Cor total	527.77	28			

注: * 表示差异显著($P < 0.05$); ** 表示差异极显著($P < 0.01$)。Note: * Significant ($P < 0.05$); ** Very significant ($P < 0.01$).

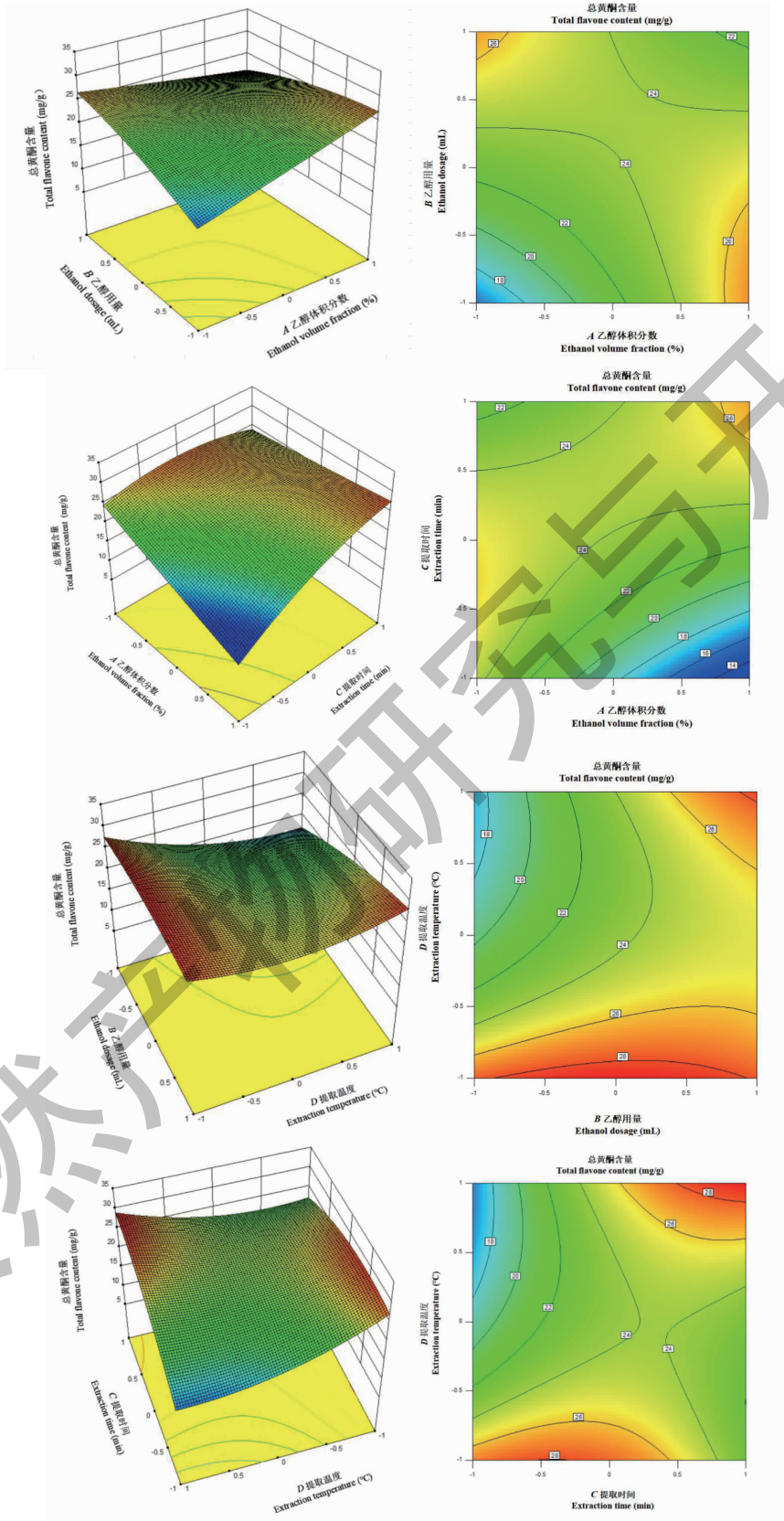


图5 交互项 AB、AC、BD、CD 交互作用的响应面图和等高线图

Fig. 5 Response surface plot and contour diagram of interaction items AB, AC, BD and CD

2.2.2 最优工艺条件确定与模型验证

通过响应面软件进一步分析可知,牡蒿总黄酮提取的最佳条件为乙醇体积分数 70%、乙醇用量 20 mL、提取时间 84.52 min、提取温度 40 ℃,在此条件下总黄酮含量的预测值为 33.024 mg/g。由于对条件可操作性考虑,将牡蒿总黄酮最佳提取工艺条件修正为乙醇体积分数 70%、乙醇用量 20 mL、提取时间 85 min、提取温度 40 ℃,经过 3 次重复试验验证,调整后工艺条件下牡蒿提取液总黄酮含量为 32.68 mg/g,与预测值相偏差为 0.01%,具有理想的实际应用价值。试验条件下牡蒿总黄酮的提取效率与以 85% 甲醇溶液索式提取 2 h 的效率基本相同,但甲醇对人体有害不适于工业和食品生产,而乙醇则原料易得,安全性较高,且本方法耗能较低,设备需求简单,操作控制容易,稳定性好^[8]。

2.3 大孔树脂纯化条件的优化

2.3.1 大孔树脂的筛选

重结晶法、树脂法、膜分离法、高速离心分离法等是常见的黄酮类化合物分离纯化方法,大孔树脂因具有较好的选择性,而且成本低、吸附量大、吸附速度快、再生处理方便,被广泛应用于黄酮化合物的初步纯化^[20]。

不同树脂对牡蒿提取液总黄酮的吸附性能测定结果如表 4 所示。在相同条件下,大孔树脂的种类不同,吸附和解吸能力也不同。综合比较,AB-8 的吸附率和解吸率都较高,为 74.36% 和 85.32%,是理想的适用于吸附分离牡蒿总黄酮的大孔树脂。

表 4 不同树脂对牡蒿总黄酮的吸附性能

Table 4 Adsorption properties of different resins on total flavonoids from *A. japonica*

树脂类型 Resin type	吸附量 Adsorption capacity (mg/g)	吸附率 Adsorption rate (%)	解吸率 Desorption rate (%)
AB-8	11.15	74.36	85.32
X-5	6.60	44.02	45.59
CD-180	9.08	60.52	53.23

2.3.2 AB-8 树脂的静态吸附及静态解吸的动力学曲线

AB-8 树脂的静态吸附动力学曲线如图 6 所示。AB-8 树脂对牡蒿总黄酮的吸附率随吸附时间先快速上升后停滞。在吸附开始 1 h 内,AB-8 树脂吸附呈指数上升,达到 49.30%;之后 1~2 h 增速逐步减慢;在吸附 2 h 后,AB-8 树脂的静态吸附开始停滞,

最后整体趋于稳定。说明 AB-8 树脂静态吸附牡蒿提取液总黄酮的时间控制在 2 h 为宜,静态吸附率为 65.47%。

AB-8 树脂对牡蒿总黄酮的静态解吸曲线如图 7 所示,解吸率随吸附时间先快速上升后停滞。在解吸开始后的 1.5 h 内,AB-8 树脂解吸率随时间整体呈线性关系;之后 AB-8 树脂解吸停滞,整体在长时间范围内变化不大。说明 AB-8 树脂静态解吸牡蒿提取液总黄酮的时间控制在 1.5 h 为宜,静态解吸率为 74.63%。

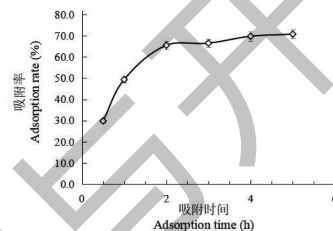


图 6 AB-8 树脂的静态吸附动力学曲线

Fig. 6 Static adsorption kinetics curve of AB-8 resin

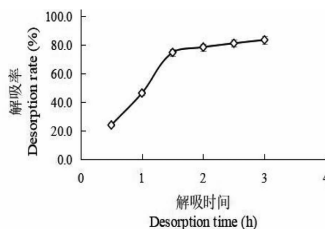


图 7 AB-8 树脂的静态解吸动力学曲线

Fig. 7 Static desorption kinetics curve of AB-8 resin

2.3.3 AB-8 树脂的静态吸附及静态解吸的影响因素

AB-8 树脂静态吸附牡蒿提取液总黄酮随溶液质量浓度呈上升趋势,且在 0.4~0.6 mg/mL 范围上升显著,溶液质量浓度在 1.2 mg/mL 时 AB-8 树脂吸附率达到最大,为 72.41%,之后有略下降趋势(见图 8)。综合比较可知,牡蒿总黄酮提取液质量浓度在 1.2 mg/mL 时为 AB-8 树脂的静态吸附的最佳浓度。

AB-8 树脂静态解吸率随乙醇浓度呈先上升后下降趋势,且不同乙醇浓度阶梯之间变化显著(见图 9)。50% 乙醇浓度洗脱时牡蒿总黄酮解吸率最大,为 82.17%,之后迅速下降。综合比较可知,乙醇浓度在 50% 时为 AB-8 树脂的静态解吸的最佳浓度。

2.3.4 纯化后牡蒿总黄酮纯度的测定

经 AB-8 树脂吸附纯化后,牡蒿总黄酮精制品的纯度为 56.17%,其结果较为理想。

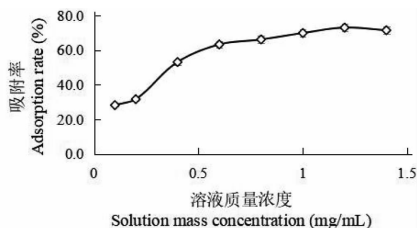


图 8 溶液质量浓度对 AB-8 树脂静态吸附率的影响

Fig. 8 Effect of solution mass concentration on static adsorption rate of AB-8 resin

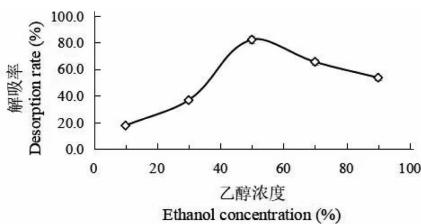


图 9 乙醇浓度对 AB-8 树脂静态解吸率的影响

Fig. 9 Effect of ethanol concentration on static desorption rate of AB-8 resin

2.4 牡蒿总黄酮的抗氧化活性

2.4.1 牡蒿总黄酮的还原能力

试验条件下,在一定浓度范围内,牡蒿总黄酮粗提物(crude extract of total flavonoids from *A. japonica*, CFAJ)和大孔树脂纯化物(purified product of total flavonoids from *A. japonica*, PFAJ)还原能力的强弱与其浓度表现出剂量效应,提取物总黄酮浓度越高,则反应体系 700 nm 处的吸光度越高,还原能力越强(见图 10)。吸光度值达到 0.5 时,所需的牡蒿总黄酮粗提物、纯化物和 V_c 的质量浓度分别为 0.30、0.20、0.14 mg/mL,牡蒿总黄酮粗提物和纯化物的还原力均低于对照物 V_c。各阶段浓度下,牡蒿总黄酮纯化物的还原力均大于粗提物,且随着浓度的增大,二者差异也呈明显趋势。说明牡蒿总黄酮提取物经过纯化后还原能力增强,可能由于牡蒿总黄酮提取物内的杂质在反应中影响了其还原力,且杂质

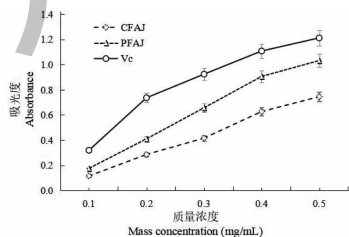


图 10 牡蒿总黄酮的还原力

Fig. 10 Reducing power of total flavonoids from *A. japonica*

的影响随浓度的上升而增大。

2.4.2 牡蒿总黄酮对 ABTS⁺·清除率的测定

牡蒿总黄酮对 ABTS⁺·清除率的测定如图 11 所示。试验条件下,牡蒿总黄酮对 ABTS⁺·清除能力的强弱与其浓度成表现出一定的正相关性,浓度越高,清除率越大。牡蒿总黄酮粗提物、纯化物和 V_c 对 ABTS⁺·清除作用的 IC₅₀ 值分别为 49.87、25.11、19.49 μg/mL,表明牡蒿总黄酮粗提物和纯化物对 ABTS⁺·清除率均低于对照物 V_c。分析发现,各阶段浓度下,牡蒿总黄酮纯化物对 ABTS⁺·清除率均大于粗提物,且变化趋势近似,说明牡蒿总黄酮提取物经过纯化后对 ABTS⁺·清除能力增强。

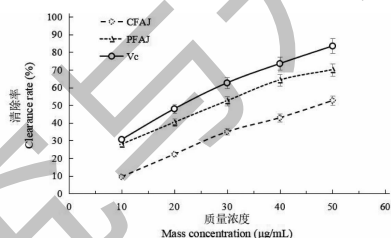


图 11 牡蒿总黄酮对 ABTS⁺·清除率

Fig. 11 Scavenging effect of flavonoids from *A. japonica* on ABTS⁺·

2.4.3 牡蒿总黄酮对 DPPH·清除率的测定

牡蒿总黄酮对 DPPH·清除率的测定如图 12。试验条件下,随着牡蒿总黄酮浓度的增大,其对 DPPH·清除能力逐渐增强。牡蒿总黄酮粗提物、纯化物和 V_c 对 DPPH·清除作用的 IC₅₀ 值分别为 51.70、16.48、29.37 μg/mL,表明三组处理对 DPPH·清除能力的强弱大小关系为牡蒿总黄酮纯化物 > V_c > 牡蒿总黄酮粗提物,说明牡蒿总黄酮提取物经过纯化后对 DPPH·清除能力增强,且超过了对照 V_c。

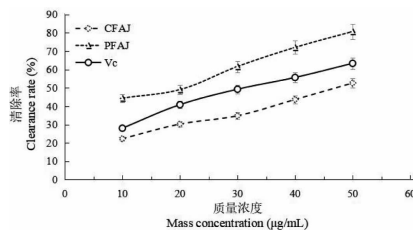


图 12 牡蒿总黄酮对 DPPH·清除率

Fig. 12 Scavenging effect of flavonoids from *A. japonica* on DPPH·

2.4.4 牡蒿总黄酮对·OH清除率的测定

试验条件下,牡蒿总黄酮对·OH有明显的清除作用,且随着质量浓度的增加,其清除能力逐渐增

强(见图 13)。牡蒿总黄酮粗提物、纯化物和 V_C 对 $\cdot OH$ 清除作用的 IC_{50} 值分别 0.31、0.24、0.18 mg/mL, 牡蒿总黄酮粗提物和纯化物对 $\cdot OH$ 清除率均低于对照物 V_C , 但牡蒿总黄酮纯化物对 $\cdot OH$ 清除率大于粗提物。

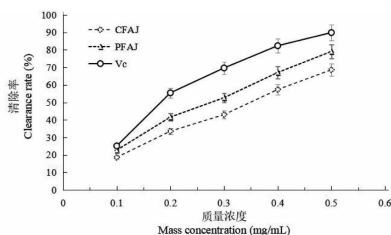


图 13 牡蒿总黄酮对 $\cdot OH$ 的清除率

Fig. 13 Scavenging effect of flavonoids from *A. japonica* on $\cdot OH$

2.4.5 牡蒿总黄酮对 $O_2^{\cdot -}$ 清除率的测定

牡蒿总黄酮对 $O_2^{\cdot -}$ 清除率的测定如图 14 所示。在试验条件下, 总黄酮纯化物和 V_C 的清除率在浓度为 0.4 mg/mL 之前远大于黄酮粗提物的清除率, 在浓度为 0.4 mg/mL 时, 纯化物对 $O_2^{\cdot -}$ 清除率超过 V_C 。牡蒿总黄酮粗提物、纯化物和 V_C 对 $O_2^{\cdot -}$ 清除作用的 IC_{50} 值分别为 0.51、0.33、0.34 mg/mL。

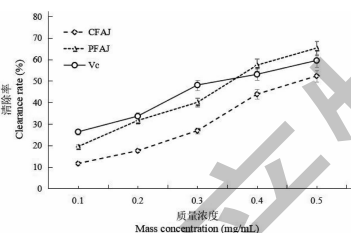


图 14 牡蒿总黄酮对 $O_2^{\cdot -}$ 清除率

Fig. 14 Scavenging effect of flavonoids from *A. japonica* on $O_2^{\cdot -}$

3 讨论与结论

研究以采自安徽省肥西县境内的牡蒿地上部为材料, 利用响应面法分析乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取温度对牡蒿总黄酮提取含量的影响, 确定了牡蒿总黄酮乙醇浸提法最佳工艺条件为乙醇体积分数 70%、乙醇用量 20 mL、提取时间 85 min、提取温度 40 $^{\circ}C$ 。与传统的乙醇浸提法相比, 本试验所得最佳提取工艺条件在一定程度上缩短提取时间, 避免长时间提取对活性成分的影响, 提高了牡蒿总黄酮的提取量和效率^[21]。

大孔树脂对牡蒿总黄酮纯化效果试验发现, AB-8 对牡蒿总黄酮的吸附率和解吸率都较高, 为

74.36% 和 85.32%, 是理想的适用于吸附分离牡蒿总黄酮的大孔树脂。纯化过程中, AB-8 树脂静态吸附牡蒿总黄酮的时间控制在 2 h 为宜, 静态吸附率为 65.47%; 静态解吸牡蒿总黄酮的时间控制在 1.5 h 较佳, 静态解吸率为 74.63%; 牡蒿总黄酮提取液质量浓度在 1.2 mg/mL 时为 AB-8 树脂的静态吸附的适宜浓度; 乙醇浓度在 50% 时为 AB-8 树脂的静态解吸的较佳浓度。

自由基过量严重影响人体健康, 可能破坏生物膜脂质、引起人体组织损伤、造成多种疾病的发生, 降低自由基对人体的危害具有重要研究意义^[22]。黄酮类化合物具有清除自由基的能力。试验选取了还原力以及清除 $ABTS^{\cdot +}$ 、 $DPPH^{\cdot}$ 、 $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 自由基等指标, 对牡蒿总黄酮的抗氧化活性进行了分析, 结果表明, 牡蒿总黄酮具有较强的还原力, 对 $ABTS^{\cdot +}$ 、 $DPPH^{\cdot}$ 、 $\cdot OH$ 及 $O_2^{\cdot -}$ 表现出较好的清除能力, 并呈现剂量效应, 且经过纯化后牡蒿总黄酮的抗氧化活性增强。牡蒿总黄酮有着作为植物黄酮资源的挖掘潜力和应用价值, 可以作为一种天然的抗氧化剂开展深入研究, 为进一步开发和应用牡蒿总黄酮提供了理论依据。

参考文献

- Giang PM, Binh NT, Matsunami K, et al. Three new eudesmanes from *Artemisia japonica* [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28: 631-635.
- Huang TH, Lu XM, Chen SL, et al. Pharmacodynamics research and safety evaluation and of the folk herb- *Artemisia japonica* Thumb [J]. *J Chengdu Univ TCM* (成都中医药大学学报), 2010, 33: 77-79.
- Zhang DH, Cheng PF, Ling L. Antioxidation and genetic toxicity of *Artemisia japonica* extract [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23: 39-42.
- Wang H, Ma L, Han XB, et al. Extraction technique of botanical insecticide from six species of *Artemisia* in Northeast China [J]. *J Northeast Forest Univ* (东北林业大学学报), 2008, 36: 42-44.
- Yu LJ. The wild insecticidal plants in Heilongjiang province and its measurement of poison material to destroy insects [D]. Harbin: Northeast Forestry University (东北林业大学), 2004.
- Ma YY, Zhao J, Yao M, et al. Overview of pharmacological research on *Artemisia japonica* Thumb. [J]. *J Anhui Agr Sci* (安徽农业科学), 2011, 39: 20986-20987.
- Gu YC, Tu YY. Study on the chemical constituents of Japa-

- nese wormwood (*Artemisia japonica*) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1993, 24:122-124.
- 8 Zhang DH, Wang L, Zhao N. Study on the extraction methods of total flavonoids from *Artemisia japonica* T. [J]. J Biol(生物学杂志), 2008, 25:59-61.
 - 9 Wang LL, Lin QX, Song ZS, et al. Spectrophotometric determination of total flavonoids in tea[J]. Acta Tea Sin(茶叶学报), 2021, 62:1-6.
 - 10 Hu DB, Zhang JY, Yang M. Study on extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from *Dodonaea viscosa* seeds[J]. North Hortic(北方园艺), 2021:103-110.
 - 11 Yan Z, Zhang HH, Li YQ, et al. Antioxidant properties and stability of polyphenols in lotus seed hull [J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2019, 19:89-95.
 - 12 Choi IY, Song YJ, Lee WH. DPPH radical scavenging effect and antimicrobial activities of some herbal extracts[J]. Korean J Hortic Sci Technol, 2010, 28:871-876.
 - 13 Wei Y, Bao HY, Liu Y, et al. Content determination of total flavonoids, total alkaloids and antioxidant activity in different processed products of *Phellodendron amurense* Rupr. leaves [J]. Food Ind(食品工业), 2022, 43:161-165.
 - 14 Zhang KC, Wang WZ, Yu P, et al. Optimization of enzyme assisted extraction and antioxidant activity of anthocyanins from black bean seed coat[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2022, 34:83-92.
 - 15 Munhoz VM, Longhini R, Souza JR, et al. Extraction of flavonoids from *Tagetes patula*: process optimization and screening for biological activity [J]. Rev Bras Farmacogn, 2014, 24:576-583.
 - 16 Chen XQ, Liu LL, Sun TT, et al. Optimization of extraction of total phenolics and total flavonoids from *Phellodendron amurense* fruit by response surface method and their antioxidant activities[J]. Fine Chem(精细化工), 2020, 37:300-308.
 - 17 Zhang J, Xing YY, Jin X, et al. Optimizing the aqueous extraction process of *Artemisia argyi* by response surface methodology and its antioxidant activity analysis[J]. J Chin Agric Univ(中国农业大学学报), 2020, 25:99-108.
 - 18 Lu XK, Zhai XY, Li FH, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Psoralea corylifolia* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2022, 44:193-197.
 - 19 Mi Z, Liu L Z, Li H, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of flavonoids from flaxseed meal by response surface methodology[J]. J Chin Cereals Oils Assoc(中国粮油学报), 2022, 37:108-113.
 - 20 Li X, Zang XL, Xu YB, et al. Optimization of purification of flavonoids from mung bean coat by AB-8 macroporous resin and comparison of antioxidant capacity of crude and purified flavonoids[J]. Food Sci(食品科学) 2018, 39:283-290.
 - 21 Gui LL, Wu ZK, Xu HF, et al. Optimization of extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. leaves [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2021, 42:100-108.
 - 22 Shan KK, Wang HF, Xu F, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacity of total flavonoids from *Sonchus oleraceus* [J]. J Nucl Agric Sci(核农学报), 2019, 33:1755-1764.
-
- (上接第 309 页)
- 7 Yamamoto K, Yamazaki A, Takeuchi M, et al. A versatile method of identifying specific binding proteins on affinity resins [J]. Anal Biochem, 2006, 352:15-23.
 - 8 Guo JL, Lin H, Wang JC, et al. Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products [J]. J Pharmaceut Biomed, 2019, 165:182-197.
 - 9 Xiao Y, Guo JL, Ran D, et al. One-pot preparation of a sulfamethoxazole functionalized affinity monolithic column for selective isolation and purification of trypsin [J]. J Chromatogr A, 2015, 1400:47-53.
 - 10 Zhang Q, Guo J, Xiao Y, et al. Comparative evaluation of a one-pot strategy for the preparation of β -cyclodextrin-functionalized monoliths: Effect of the degree of amino substitution of β -cyclodextrin on the column performance [J]. J Sep Sci, 2015, 38:1813-1821.
 - 11 Yoshida T. Peptide separation by hydrophilic-interaction chromatography: a review [J]. J Biochem Bioph Meth, 2004, 60:265-280.
 - 12 Guo J, Xiao Y, Lin Y, et al. Influence of the linking spacer length and type on the enantioseparation ability of β -cyclodextrin functionalized monoliths [J]. Talanta, 2016, 152:259-268.
 - 13 Huang PP, Chen C, Xu XQ. Inhibitory activity of triterpenoids from *Inonotus obliquus* on α -glucosidase and α -amylase and identification of their effective compounds [J]. J Zhejiang Sci-Tech Univ: Nat Sci(浙江理工大学学报:自科版), 2020, 43:678-686.
 - 14 Wafaa B, Sad B, Mohamed B. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors [J]. Curr Diabetes Rev, 2010, 6:247-254.