

艾叶黄酮的超声辅助离子液体提取及 抗氧化、降血糖活性

赫丁轩¹, 刁婷婷¹, 张少军¹, 李卓佳¹, 王海燕¹, 陈琼^{1,2*}

(1. 信阳农林学院 药学院, 河南 信阳 464000; 2. 河南省大别山艾草综合开发利用工程技术研究中心, 河南 信阳 464000)

摘要: 采用单因素实验及响应面分析法对超声辅助离子液体提取艾叶黄酮工艺进行了优化, 对艾叶黄酮体外抗氧化能力和降血糖活性进行了测试。结果表明, 在以质量浓度为 8 g/L 的 1-丁基-3-甲基咪唑溴盐 ([C₄mim]Br) 乙醇水溶液为提取溶剂、料液比 (g : mL) 为 1 : 30、超声时间 68 min 的最佳提取工艺条件下, 艾叶黄酮的提取率为 14.36%。艾叶黄酮对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH·)、2,2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐自由基 (ABTS⁺·) 和 ·OH 具有较好的清除能力, 对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶具有较好的活性抑制能力, 表现出一定的抗氧化性和降血糖功效。质量浓度为 0.5 g/L 艾叶黄酮对 DPPH· 和 ABTS⁺· 的清除率分别为 81.05% 和 93.81%, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.15、0.12 g/L; 质量浓度 1.0 g/L 艾叶黄酮对 ·OH 的清除率为 70.28%, IC₅₀ 为 0.60 g/L; 质量浓度 1.0 g/L 艾叶黄酮对 α-淀粉酶的抑制率为 64.70%, IC₅₀ 为 0.59 g/L; 质量浓度 0.5 g/L 艾叶黄酮对 α-葡萄糖苷酶的抑制率为 56.68%, IC₅₀ 为 0.37 g/L。

关键词: 艾叶; 黄酮; 离子液体; 抗氧化性; 降血糖活性; 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 (2024) 09-1978-09

Ultrasound-assisted ionic liquid extraction, antioxidant and hypoglycemic activities of *Artemisia argyi* leaves flavonoids

HE Dingxuan¹, DIAO Tingting¹, ZHANG Shaojun¹, LI Zhuojia¹,
WANG Haiyan¹, CHEN Qiong^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, Henan, China; 2. Henan Dabie Mountain *Argyi* Comprehensive Development and Utilization Engineering Technology Research Center, Xinyang 464000, Henan, China)

Abstract: The extraction process of flavonoids from *Artemisia argyi* leaves with ultrasound-assisted ionic liquid was optimized via single factor experiments and response surface analysis, and *Artemisia argyi* leaves flavonoids obtained was further analyzed for their *in vitro* antioxidant and hypoglycemic activities. The results showed that under the optimal extraction process of 1-butyl-3-methylimidazolium bromide ([C₄mim]Br) ethanol water solution with a mass concentration 8 g/L as extraction solvent, material-liquid ratio (g : mL) of 1 : 30 and ultrasonic time of 68 min, the extraction rate of *Artemisia argyi* leaves flavonoids was 14.36%. *Artemisia argyi* leaves flavonoids exhibited good scavenging abilities against 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine radicals (DPPH·), 2,2'-diazo-di(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid)diamine salts free radicals (ABTS⁺·) and ·OH, and good inhibition activity against α-amylase and α-glucosidase, indicating certain antioxidant and hypoglycemic activities. The clearance rates of *Artemisia argyi* leaves flavonoids with a mass concentration of 0.5 g/L on DPPH· and ABTS⁺· were 81.05% and 93.81%, and the median inhibitory concentration (IC₅₀) were 0.15 and 0.12 g/L, respectively. The clearance

收稿日期: 2024-02-09; 定用日期: 2024-04-07; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240140

基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (242102230094, 242102310575, 242102110243); 河南省重大专项创新示范项目 (201111310900)

作者简介: 赫丁轩 (1992—), 女, 博士生, E-mail: hdxmusic@163.com. 联系人: 陈琼 (1964—), 女, 教授, E-mail: 1989260013@xyafu.edu.cn.

rate of $\cdot\text{OH}$ at *Artemisia argyi* leaves flavonoids with a mass concentration of 1.0 g/L was 70.28%, and IC_{50} was 0.60 g/L. The inhibitory rate of α -amylase was 64.70% and IC_{50} was 0.59 g/L at *Artemisia argyi* leaves flavonoids with a mass concentration of 1.0 g/L. The inhibitory rate of α -glucosidase was 56.68% and IC_{50} was 0.37 g/L at *Artemisia argyi* leaves flavonoids with a mass concentration of 0.5 g/L.

Key words: *Artemisiae argyi* leaves; flavonoids; ionic liquids; antioxidation; hypoglycemic activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

菊科植物艾 (*Artemisiae argyi*) 广泛分布于东亚大部分地区, 艾叶为其干燥叶。在中医处方中, 艾叶用于治疗小腹冷痛、经寒不调等, 艾灸用于治疗哮喘、骨关节炎和失眠等慢性疾病。艾叶主要含有挥发油 (桉油精、樟脑和龙脑等成分)、三萜类化合物、黄酮类化合物、微量元素等, 具有抗炎、平喘、抗菌、抗病毒、镇痛、抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等多种药理活性。黄酮类化合物是植物中的主要次生代谢产物, 具有抗氧化、抗血栓、抗衰老、抗心率失常和降血脂等药理活性, 是植物药物和功能性食品补充剂的宝贵来源^[1]。研究表明, 植物提取物的抗氧化活性与黄酮、皂苷、多酚等物质的含量有关^[2-4]。黄酮类化合物还可以通过促进胰岛素的合成和分泌来调节血糖水平, 从而抑制葡萄糖的摄取和转运^[5]。

目前, 艾叶有效成分的提取工艺有浸提法、热回流法、超声辅助法、微波萃取法和超临界萃取法等。其中, 超声辅助提取技术也被广泛用于天然产物的提取, 其主要优点是成本低、效率高, 由于超声波的机械效应和声空化效应, 能使溶剂更好地进入组织内部, 更有效提取活性成分^[6]。离子液体是熔点 $< 100\text{ }^\circ\text{C}$ 的液态熔盐, 通常由大的不对称有机阳离子和有机或无机阴离子组成, 是一种对环境友好的“绿色”溶剂, 也是绿色萃取和分离生物活性化合物的最佳溶剂^[7-8], 广泛应用于酚酸^[9]、生物碱^[10]、脂肪^[11]、维生素^[12]、氨基酸^[13]等的提取和纯化。张华等^[14]利用超声辅助离子液体提取荷叶黄酮, 采用响应面法优化荷叶黄酮最佳提取工艺, 发现采用 1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ($[\text{C}_6\text{mim}]\text{BF}_4$) 提取荷叶黄酮的提取率最高, 且高于传统有机溶剂提取率。表明离子液体在萃取工艺领域是一种可替代传统溶剂的新溶剂, 但在艾叶黄酮提取中的应用鲜见报道。离子液体在制药行业中作为溶剂用来分离化学混合物、提取中间体和制备脂质体制剂^[15], 并有助于提高药物生物利用度^[16]。在食品工业中, 离子液体主要用于作为合成多糖和其他成分或添加剂的溶剂或助溶剂。为了降低成本和环境的影响, 研究人员通过蒸馏法、双水相萃取法、吸附法、膜分离技术、结晶法和力场分离法等多种技术从不同溶剂中回收

和纯化离子液体^[17], 但发现, 离子液体仍有可能在食品中残留。经动物和体外实验表明, 低剂量的离子液体并不会造成细胞损伤^[18]。

本文拟采用超声辅助离子液体提取艾叶黄酮, 在单因素实验基础上, 采用响应面法优化提取工艺。考察艾叶黄酮的体外抗氧化活性和降血糖的能力, 以期艾叶食药价值研究开发、产业发展提供理论基础。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

艾叶, 产地安徽, 购于河南省信阳市张仲景大药房。

芦丁标准品, 分析纯, 飞净生物科技有限公司; 1-乙基-3-甲基咪唑溴盐 ($[\text{Emim}]\text{Br}$)、1-丁基-3-甲基咪唑溴盐 ($[\text{C}_4\text{mim}]\text{Br}$)、1-己基-3-甲基咪唑溴盐 ($[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$)、1-辛基-3-甲基咪唑溴盐 ($[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 ($\text{DPPH}\cdot$)、2,2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐阳离子自由基 ($\text{ABTS}^{+\cdot}$)、4-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷 (PNPG)、3,5-二硝基水杨酸 (DNS), AR, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; α -淀粉酶标准品、 α -葡萄糖苷酶标准品、维生素 C (V_C) 标准品, AR, 上海源叶生物科技有限公司; 水杨酸、无水乙醇、 NaOH 、 NaNO_2 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、 FeSO_4 , AR, 天津市福晨化学试剂有限公司; 纯净水, 自制。

RE-3000 型旋转蒸发器, 上海雅容生化仪器设备有限公司; SCQ-8201E 型超声清洗仪, 上海声彦超声波仪器设备有限公司; JP-500B-2 型多功能粉碎机, 上海久品工贸有限公司; HC-2062 型高速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; TU-1901 型紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; DNM-9876 型酶标仪, 上海赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 艾叶黄酮的提取

先将离子液体溶解在体积分数 60% 的乙醇水溶液中配成不同质量浓度的离子液体, 作为提取溶剂。然后将艾叶样品粉碎过 80 目筛, 称取艾叶粉末 2.5 g

置于 250 mL 锥形瓶中,按一定料液比(g:mL)加入不同质量浓度的离子液体浸提 2 h,再用超声波清洗仪提取一定时间,提取结束后于 3500 r/min 离心 10 min,收集全部滤液旋蒸浓缩至 10 mL,置于 50 mL 容量瓶中用体积分数 60%的乙醇水溶液定容,记为艾叶黄酮待测液。

1.2.2 艾叶黄酮提取率的测定

根据邵越楣等^[19]的方法,采用 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ 法,绘制芦丁标准曲线,得到以芦丁质量浓度(g/L)为横坐标,吸光度为纵坐标的线性回归方程 $y=11.171x-0.0564$ ($R^2=0.9952$)。精密量取 2.0 mL 艾叶黄酮待测液,与 1.0 mL 质量分数 5%的 NaNO_2 溶液混合,用体积分数 60%的乙醇水溶液稀释至 10 mL,静置 6 min;然后加入 1.0 mL 质量分数 10%的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,静置 6 min;最后加入 4 mL 质量分数 10%的 NaOH 溶液,用体积分数 60%的乙醇水溶液定容至 25 mL。立即用紫外-可见分光光度计在 510 nm 处测定其吸光度,根据标准曲线方程得到待测液中黄酮的质量浓度,根据公式(1)计算艾叶黄酮提取率(%)。

$$\text{提取率}/\%=\rho\times V\times V_1/(m\times V_2)\times 100 \quad (1)$$

式中: ρ 为艾叶黄酮待测液质量浓度,g/L; V 为艾叶黄酮待测液总体积,50 mL; V_1 为艾叶黄酮稀释体积,25 mL; V_2 为艾叶黄酮取样体积,2 mL; m 为艾叶粉末的质量,2.5 g。

1.3 单因素实验

1.3.1 溶剂类型的影响

先将离子液体溶解在体积分数 60%的乙醇中配成质量浓度为 8 g/L 的离子液体,作为提取溶剂。然后称取艾叶粉末 2.5 g,以料液比(g:mL)1:30 溶于质量浓度 8 g/L 的离子液体([Emim]Br、[C₄mim]Br、[C₆mim]Br、[C₈mim]Br)和体积分数为 60%乙醇水溶液中,提取温度 70 °C,超声时间 60 min,考察不同溶剂对艾叶黄酮提取率的影响。

1.3.2 超声时间的影响

精密称取艾叶粉末 2.5 g,以料液比(g:mL)1:30 溶于质量浓度 8 g/L 的[C₄mim]Br 乙醇溶液中,提取温度 70 °C,考察超声时间(40、50、60、70、80 min)对艾叶黄酮提取率的影响。

1.3.3 离子液体质量浓度的影响

精密称取艾叶粉末 2.5 g,以料液比(g:mL)1:30 溶于不同质量浓度的[C₄mim]Br 乙醇水溶液中,提取温度 70 °C,超声 60 min,考察离子液体质量浓度(2、4、6、8、10 g/L)对艾叶黄酮提取率的影响。

1.3.4 料液比的影响

精密称取艾叶粉末 2.5 g,溶于质量浓度 8 g/L 的[C₄mim]Br 乙醇水溶液中,提取温度 70 °C,超声 60 min,考察料液比(1:20、1:25、1:30、1:

35、1:40)对艾叶黄酮提取率的影响。

1.4 响应面实验

在单因素实验基础上,选取对艾叶黄酮提取率影响较大的 3 个因素:离子液体质量浓度(A)、料液比(g:mL)(B)、超声时间(C)为独立变量,以黄酮提取率(Y)为响应变量,通过 Box-Behnken 实验设计优化艾叶黄酮超声辅助离子液体提取工艺。离子液体质量浓度、料液比(g:mL)以及超声时间根据单因素实验结果中心点取值。

1.5 体外抗氧化实验

1.5.1 DPPH·清除能力测试

参考文献[20]方法并略作修改。在避光条件下精密称取 0.0197 g 的 DPPH·,用无水乙醇溶解并定容至 10 mL,得到浓度为 0.5 mmol/L 的 DPPH·-无水乙醇溶液,避光保存备用。向 96 孔板中依次加入 240 μL 不同质量浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L)艾叶黄酮溶液和 60 μL 的 DPPH·-无水乙醇溶液,混匀,于 25 °C 下反应 30 min,用酶标仪测定其在 510 nm 处的吸光度(A_1);精密量取 240 μL 不同质量浓度的艾叶黄酮溶液和 60 μL 无水乙醇,混匀,作为对照组,测定其吸光度(A_2);精密量取 240 μL 无水乙醇和 60 μL 的 DPPH·-无水乙醇溶液,混匀,作空白对照组,测定吸光度(A_0)。以 V_C 溶液作为阳性对照,测定其对 DPPH·的清除率,计算待测样品清除 DPPH·的半数抑制浓度(IC₅₀)。根据公式(2)计算 DPPH·清除率(%)。

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

1.5.2 ABTS⁺清除能力测试

参考文献[21]方法并略作修改。在避光条件下精密称取 0.0384 g 的 ABTS⁺和 0.0134 g 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$,用纯净水溶解并定容至 10 mL,在室温下进行遮光反应 16 h,获得 ABTS⁺母液。用纯净水对 ABTS⁺母液进行稀释,用酶标仪测定其在 734 nm 处吸光度稳定在 0.70 ± 0.02 ,即可获得 ABTS⁺工作液。在 96 孔板中依次加入 50 μL 不同质量浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L)艾叶黄酮溶液和 200 μL 的 ABTS⁺工作液,混匀后,于 37 °C 反应 10 min,用酶标仪测定其在 734 nm 处的吸光度(A'_1);精密量取 50 μL 艾叶黄酮溶液和 200 μL 纯净水,混匀,作对照组,用酶标仪测定其在 734 nm 处的吸光度(A'_2);精密量取 50 μL 纯净水和 200 μL 的 ABTS⁺工作液,混匀,作空白对照组,用酶标仪测定其在 734 nm 处的吸光度(A'_0);以 V_C 溶液作为阳性对照测定其对 ABTS⁺的清除率,计算待测样品清除 ABTS⁺的 IC₅₀。根据公式(3)计算 ABTS⁺清除率(%)。

$$\text{ABTS}\cdot\text{清除率}/\%=[1-(A'_1-A'_2)]/A'_0\times 100 \quad (3)$$

1.5.3 羟基自由基清除能力测试

参考文献[22]方法并略作改动。依次配制浓度为 9 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液、9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液和 8.8 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液, 避光保存备用。在 96 孔板中依次加入不同质量浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L) 艾叶黄酮溶液、9 mmol/L FeSO₄ 溶液、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、8.8 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液各 50 μL, 混匀后, 于 37 °C 反应 30 min, 用酶标仪测定其在 510 nm 处的吸光度 (A₃); 另精密量取艾叶黄酮溶液、9 mmol/L FeSO₄ 溶液、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、纯净水各 50 μL 混匀, 作对照组, 用酶标仪测定其在 510 nm 处的吸光度 (A₄); 精密量取 9 mmol/L FeSO₄、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、纯净水、8.8 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液各 50 μL, 混匀, 作空白对照组, 用酶标仪测定其在 510 nm 处的吸光度 (A₅); 以 V_C 溶液作为阳性对照测定其对羟基自由基 (•OH) 的清除率, 计算待测样品清除 •OH 的 IC₅₀。根据公式 (4) 计算 •OH 清除率 (%)。

$$\bullet\text{OH 清除率}/\%=[1-(A_3-A_4)]/A_5 \times 100 \quad (4)$$

1.6 体外降血糖实验

1.6.1 α-淀粉酶活性抑制能力测试

参考文献[23]方法并略作改动。精密量取 50 μL 不同质量浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L) 艾叶黄酮溶液于 96 孔板中, 首先分别加入 50 μL 质量浓度为 1.5 g/L 的 α-淀粉酶溶液(磷酸盐缓冲溶液配制, pH=6.8), 于 37 °C 孵育 10 min; 然后加入 50 μL 的质量分数 1% 可溶性淀粉溶液于混合液中, 于 37 °C 孵育 10 min; 最后加入 100 μL 的 DNS 试剂, 沸水浴终止反应 5 min 后立即取出, 冷却至室温。加入 1 mL 纯净水稀释混合液, 混匀, 用酶标仪测定样品在 540 nm 处的吸光度 (A_i); 另用等量的磷酸盐缓冲溶液代替 α-淀粉酶溶液作对照组, 用酶标仪测定其在 540 nm 处的吸光度 (A_j); 用纯净水代替艾叶黄酮作空白对照组, 用酶标仪测定其在 540 nm 处的吸光度 (A₀); 以阿卡波糖作为阳性对照, 计算待测样品对 α-淀粉酶的 IC₅₀。根据公式 (5) 计算 α-淀粉酶抑制率 (%)。

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率}/\%=[1-(A_i-A_j)]/A_0 \times 100 \quad (5)$$

1.6.2 α-葡萄糖苷酶活性抑制能力测试

参考文献[24]方法并略作改动。精密量取 20 μL 不同质量浓度 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L) 艾叶黄酮溶液于 96 孔板中, 首先分别加入 20 μL 的 0.5 U/mL 的 α-葡萄糖苷酶溶液和 110 μL 磷酸盐缓冲溶液 (pH=6.86), 混合均匀后于 37 °C 孵育 10 min; 然后加入 20 μL 浓度为 1 mol/L 的 PNPG 溶液, 于 37 °C 反应 15 min; 最后加入 100 μL 浓度为 1 mol/L 碳酸钠溶液, 沸水浴终止反应 5 min 后立即取出, 冷却至室

温, 用酶标仪测定其在 405 nm 处的吸光度 (A_a); 用等量的磷酸盐缓冲溶液代替 α-葡萄糖苷酶溶液作对照组, 用酶标仪测定其在 405 nm 处的吸光度 (A_c); 用纯净水代替艾叶黄酮作为空白对照组, 用酶标仪测定其在 405 nm 处的吸光度 (A_b); 以阿卡波糖作为阳性对照, 计算待测样品对 α-葡萄糖苷酶的 IC₅₀。根据公式 (6) 计算 α-葡萄糖苷酶抑制率 (%)。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}/\%=(A_c-A_a)/(A_c-A_b) \times 100 \quad (6)$$

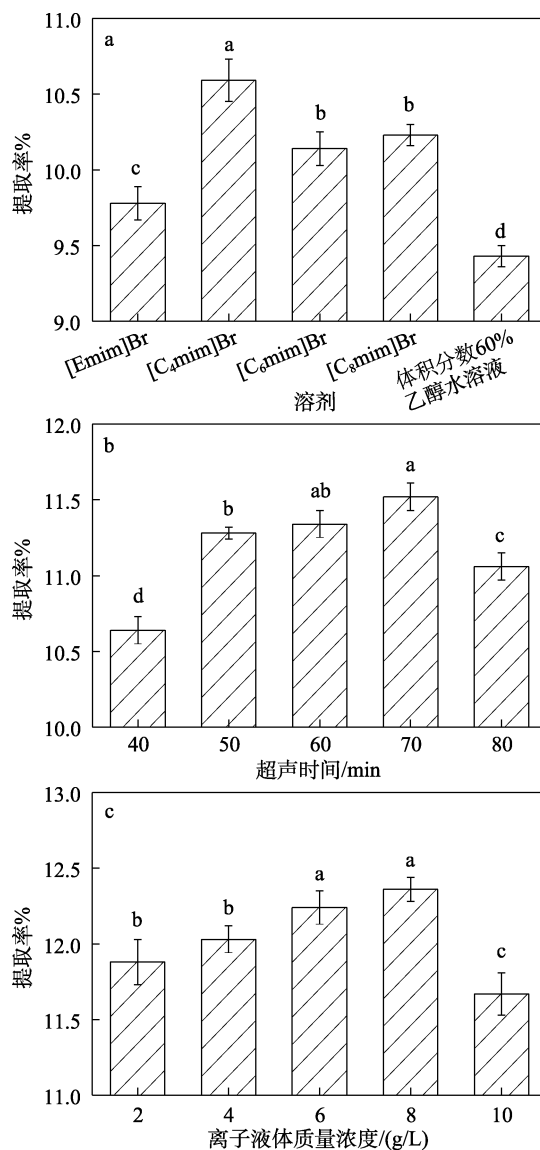
1.7 统计分析

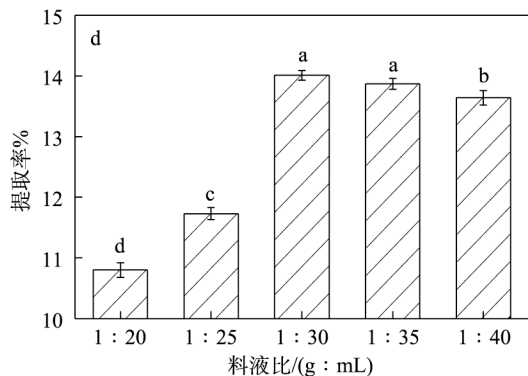
所有实验重复 3 次。使用 SPSS 20.0 对数据进行统计分析和 ANOVA 方差分析, 结果表示为算数平均值±标准差, 结果讨论中均使用算数平均值。显著性水平为 P<0.05。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

图 1 为单因素实验考察结果。





柱状图上不同小写字母代表有显著性差异, $P < 0.05$, 下同
图 1 溶剂 (a)、超声时间 (b)、离子液体质量浓度 (c)、料液比 (d) 对艾叶黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effects of solvent (a), ultrasonic time (b), ionic liquid mass concentration (c) and material-to-liquid rate (d) on extraction rate of *Artemisia argyi* leaves flavonoids

由图 1a 可知, 不同种类离子液体作为提取溶剂对艾叶黄酮的提取率均高于体积分数 60% 的乙醇水溶液, 其中 [C₄mim]Br 对艾叶黄酮的提取率最高, 为 10.59%, 比体积分数 60% 的乙醇水溶液提取率 (9.43%) 提高了 12.30%。这是因为, 选择合适的离子液体作为提取溶剂, 主要考虑离子液体的结构和物理化学性质。黄酮类化合物的溶解度具有较强的阴离子依赖性^[25], 而 [C₄mim]Br 中的溴离子可以与水形成氢键, 也可与目标化合物结合形成氢键, 后者氢键作用力更强。同时, [C₄mim]Br 中的阳离子与黄酮类化合物的母核提供 π - π 相互作用, 提高了艾叶黄酮提取率。在葛根中提取葛根素的研究结果也发现, [C₄mim]Br 是提取黄酮类化合物的最佳离子液体^[26]。因此, 选择 [C₄mim]Br 作为提取溶剂进行后续实验。

由图 1b 可知, 超声时间在 40~80 min 内, 随着超声时间的延长, 艾叶黄酮提取率呈先升高后降低的趋势, 在 70 min 时提取率达到最高, 为 11.52%, 比超声时间 40 min 提取率 (10.64%) 提高了 8.27%, 但超声时间 60 与 70 min 时没有显著性差异。这是因为, 随着超声时间的增加, 艾叶细胞破碎程度增加, 会大幅度提高艾叶黄酮提取率。但当超声时间过长时, 提取液中细胞内外黄酮类化合物保持平衡, 同时艾叶黄酮受超声波热效应和机械效应的影响, 其结构会遭到破坏。因此, 选择 70 min 作为超声时间进行后续实验。

由图 1c 可知, 离子液体质量浓度为 2~10 g/L 范围内, 随着离子液体质量浓度的增加, 艾叶黄酮提取率呈先上升后下降趋势, 当离子液体质量浓度为 8 g/L 时提取率最高, 为 12.36%, 且离子液体质量浓度为 6 和 8 g/L 时没有显著性差异。这是因为,

离子液体质量浓度的增加会提高提取液黏度, 导致离子液体与艾叶黄酮分子的接触概率变小, 从而降低了艾叶黄酮提取率^[27]。因此, 选择离子液体 [C₄mim]Br 的质量浓度为 8 g/L 作为后续实验条件。

由图 1d 可知, 料液比 (g : mL) 在 1 : 20~1 : 40 范围内, 随着料液比的减小, 艾叶黄酮提取率迅速增加, 然后缓慢降低。当料液比为 1 : 30 时, 提取率达到最大, 为 14.01%; 当料液比为 1 : 40 时, 提取率为 13.64%, 显著下降但并无显著性差异。这可能是由传质原理和提取溶液中超声波能量密度的分布不均匀造成的^[28], 料液比减小, 提取液相对充足, 会溶解更多的艾叶黄酮; 但提取液过量时, 提取液中超声波能量密度分布降低, 导致艾叶黄酮提取率下降。因此, 料液比为 1 : 30 时, 艾叶黄酮提取效果最佳。

2.2 响应面实验结果

2.2.1 响应面设计结果

采用 Design-Expert 11 软件对表 1 中的数据进行二项式拟合, 并对模型进行方差分析, 得到二项式拟合方程为:

$$Y = -65.83 + 5.39A + 1.67B + 0.98C - 0.01AB - 0.01AC + 0.01BC - 0.31A^2 - 0.04B^2 - 0.01C^2 \quad (P < 0.0001, R^2 = 0.9959)$$

表 1 Box-Behnken 实验设计及结果
Table 1 Box-Behnken design and results

序号	编码值			实际值			Y/%
	A	B	C	离子液体质量浓度/(g/L)	料液比/(g : mL)	超声时间/min	
1	0	-1	1	8	1 : 25	80	11.35
2	-1	-1	0	6	1 : 25	70	11.53
3	1	0	-1	10	1 : 30	60	11.82
4	0	1	1	8	1 : 35	80	11.89
5	-1	0	1	6	1 : 30	80	11.58
6	0	1	-1	8	1 : 35	60	11.78
7	0	0	0	8	1 : 30	70	13.68
8	1	1	0	10	1 : 35	70	11.48
9	-1	1	0	6	1 : 35	70	11.55
10	0	0	0	8	1 : 30	70	13.70
11	0	-1	-1	8	1 : 25	60	12.67
12	0	0	0	8	1 : 30	70	13.56
13	0	0	0	8	1 : 30	70	13.66
14	1	-1	0	10	1 : 25	70	11.50
15	0	0	0	8	1 : 30	70	13.72
16	1	0	1	10	1 : 30	80	11.04
17	-1	0	-1	6	1 : 30	60	11.88

2.2.2 模型拟合与方差分析

回归模型方差分析结果见表 2。

表 2 回归模型方差分析结果

Table 2 Variance analysis results of regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	15.68	9	1.74	190.01	<0.0001	**
A 离子液体质量浓度	0.0612	1	0.0612	6.68	0.0362	*
B 料液比	0.0153	1	0.0153	1.67	0.2373	o
C 超声时间	0.6555	1	0.6555	71.48	<0.0001	**
AB	0.0004	1	0.0004	0.04	0.8405	o
AC	0.0576	1	0.0576	6.28	0.0406	*
BC	0.5112	1	0.5112	55.75	0.0001	**
A ²	6.53	1	6.53	712.52	<0.0001	**
B ²	3.44	1	3.44	374.58	<0.0001	**
C ²	2.96	1	2.96	322.61	<0.0001	**
残差	0.0642	7	0.0092			
失拟项	0.0487	3	0.0162	4.18	0.1003	
纯误差	0.0155	4	0.0039			
总差	15.75	16				

注：“***”表示差异极显著 ($P<0.01$)；“*”表示差异显著 ($P<0.05$)；“o”表示差异不显著 ($P>0.05$)。

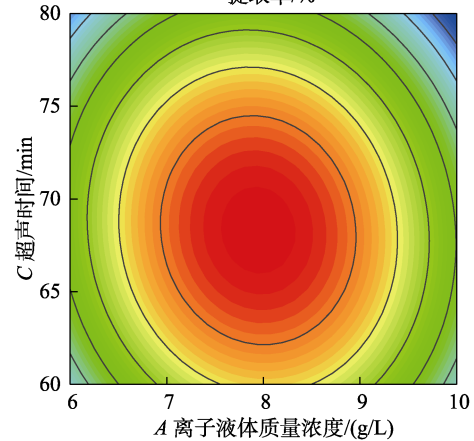
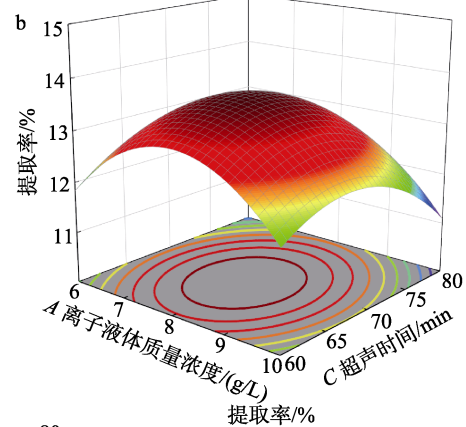
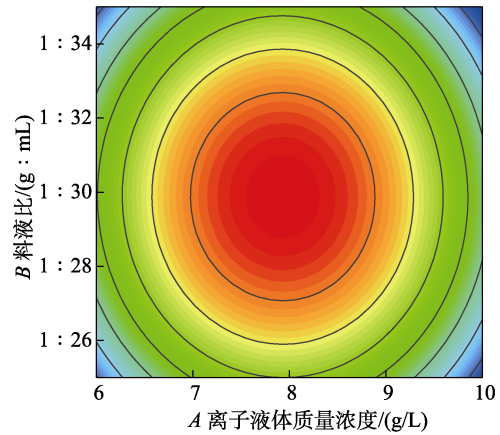
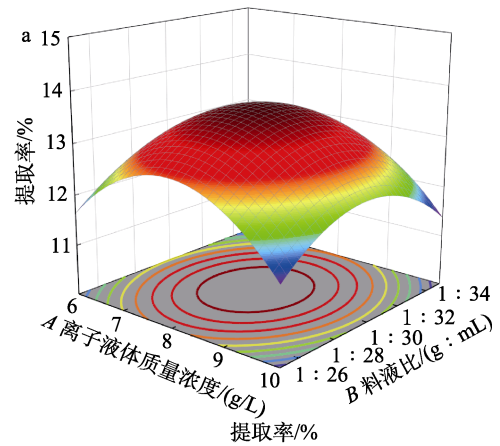
由表 2 的 F 值可知, 各因素对艾叶黄酮提取率的影响主次顺序为: $C>A>B$ 。模型方差分析表明, 一次项 C 、交互项 BC 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对响应值影响极显著 ($P<0.01$)；一次项 A 和交互项 AC 对响应值影响显著 ($P<0.05$)；交互项 AB 和一次项 B 对响应值影响不显著 ($P>0.05$)。实验数据所得拟合模型 $F=190.01$, $P<0.0001$, 说明该模型各项拟合良好。失拟项 $P=0.1003>0.05$, 表明实验值与预测值吻合较好。此模型的相关系数 $R^2=0.9959$, 表明 99.59% 的响应值变化归因于自变量, 调整决定系数 $R^2_{adj}=0.9907$, 也表明回归模型适用于实际情况。综上分析, 该响应面实验模型比较可靠。

2.2.3 响应面分析

采用 Design-Expert 11 软件绘制艾叶黄酮提取率、离子液体质量浓度、料液比以及超声时间之间的三维曲面图, 结果如图 2 所示。

响应面图越陡越倾斜, 表示该因素的交互作用对艾叶黄酮提取率影响越显著, 等高线越密集越接近椭圆形, 表示该因素的交互作用对艾叶黄酮提取率影响越显著^[29]。由图 2 可知, 交互作用下, 料液比 (B) 和超声时间 (C)、离子液体质量浓度 (A) 和超声时间 (C) 间交互作用对响应值的影响显著。离子液体质量浓度 (A) 和料液比 (B) 的交互作用不显著, 这与方差分析的结果一致。

由响应面图可得到优化条件为: 离子液体质量浓度为 7.989 mol/L, 料液比为 1 : 30.418, 超声时间为 67.83 min。



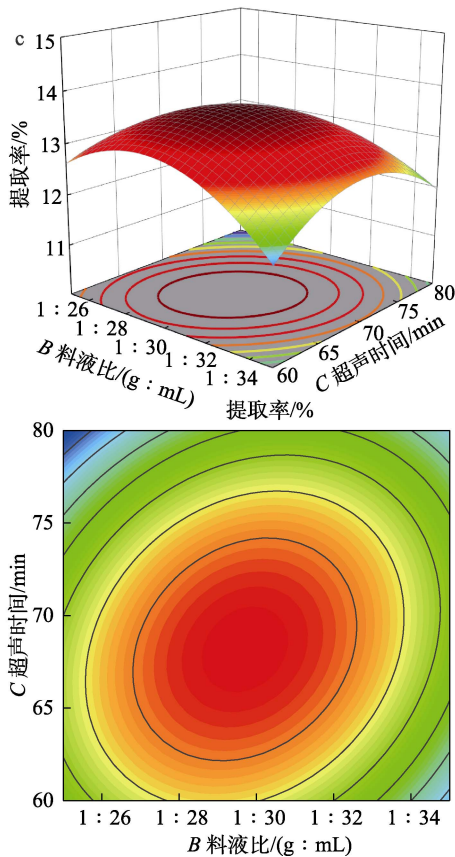


图 2 离子液体质量浓度、超声时间、料液比对提取率的交互作用响应曲面图和等高线图
Fig. 2 Response surface plots and contour lines of interaction effect of ionic liquid mass concentration, ultrasonic time and material-to-liquid rate

2.2.4 工艺验证结果

根据 Design-Expert 11 软件分析得到的优化条件: 离子液体质量浓度为 8 g/L、料液比 (g : mL) 为 1 : 30、超声时间为 68 min, 在此条件下进行 3 次重复验证实验, 艾叶黄酮的平均提取率为 14.36%, 高于预测值 13.67%, 表明该模型稳定可靠。刘志成等^[30]以乙醇作为提取溶剂采用微波辅助法提取艾叶黄酮, 在体积分数为 60%乙醇水溶液、回流温度为 90 °C、回流时间为 2 h、料液比 (g : mL) 为 1 : 35 的条件下, 艾叶黄酮提取率为 2.402%。蔡敏^[31]以乙醇作为提取溶剂, 用超声辅助法提取艾叶黄酮, 在体积分数为 60%乙醇水溶液、提取时间为 60 min、料液比 (g : mL) 为 1 : 20 的条件下, 艾叶黄酮提取率为 9.15%。基于提取工艺的优化结果表明, 采用离子液体作为提取溶剂比传统的有机溶剂具有更高的艾叶黄酮提取率。

2.3 艾叶黄酮的抗氧化活性分析

2.3.1 对 DPPH• 的清除能力

图 3 为不同质量浓度艾叶黄酮对 DPPH• 的清除能力测试结果。由图 3 可知, 艾叶黄酮质量浓度在 0.1~0.5 g/L 范围内, 随着艾叶黄酮质量浓度的增加,

其对 DPPH• 的清除能力呈增长趋势, 但 V_C 对 DPPH• 的清除能力始终高于艾叶黄酮。当质量浓度为 0.5 g/L 时, 艾叶黄酮和 V_C 对 DPPH• 的清除率分别达到 81.05% 和 98.47%, IC₅₀ 分别为 0.15 和 0.03 g/L。

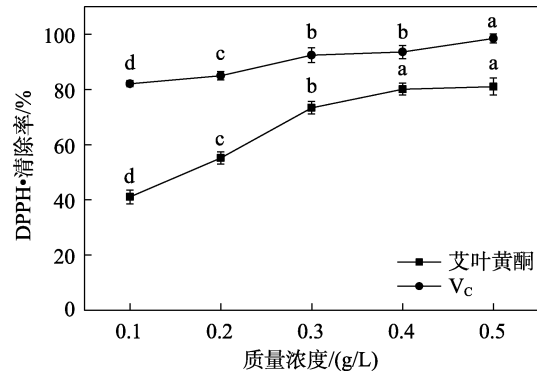


图 3 不同质量浓度艾叶黄酮对 DPPH• 的清除能力
Fig. 3 Scavenging ability of *Artemisia argyi* leaves flavonoids with different mass concentrations on DPPH•

2.3.2 对 ABTS⁺ 的清除能力

图 4 为不同质量浓度艾叶黄酮对 ABTS⁺ 的清除能力测试结果。由图 4 可知, 在质量浓度为 0.1~0.5 g/L 范围内, 随着艾叶黄酮质量浓度的增加, 其对 ABTS⁺ 的清除率逐渐升高后趋于稳定。当质量浓度为 0.5 g/L 时, 艾叶黄酮和 V_C 对 ABTS⁺ 的清除率分别达到 93.81% 和 100.00%, IC₅₀ 分别为 0.12 和 0.05 g/L。

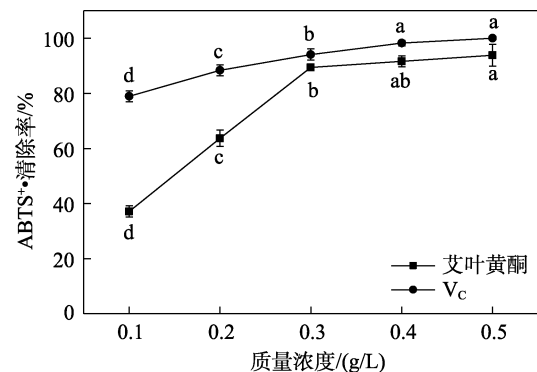


图 4 不同质量浓度艾叶黄酮对 ABTS⁺ 的清除能力
Fig. 4 Scavenging ability of *Artemisia argyi* leaves flavonoids with different mass concentrations on ABTS⁺

2.3.3 对 •OH 的清除能力

图 5 为艾叶黄酮对 •OH 的清除能力测试结果。由图 5 可知, 在质量浓度为 0.2~1.0 g/L 范围内, 随着艾叶黄酮质量浓度的增加, 其对 •OH 的清除率呈线性增加趋势。当质量浓度为 1.0 g/L 时, 艾叶黄酮和 V_C 对 •OH 清除率分别达到 70.28% 和 100.00%, IC₅₀ 分别为 0.60 和 0.05 g/L。

综合艾叶黄酮抗氧化活性实验结果表明, 艾叶

黄酮对 $ABTS^+$ 的清除效果优于对 $DPPH\cdot$ 和 $\cdot OH$ 的清除效果, 这可能与不同自由基的清除作用机制有关。清除自由基主要途径是通过抗氧化剂转移电子或转移氢给自由基, 以终止自由基链式反应。与 $DPPH\cdot$ 的疏水芳环结构相比, 黄酮类化合物更容易将电子或氢转移给 $ABTS^+$ 的两亲苯并噻唑结构实现清除效应^[32]。艾叶黄酮清除自由基的作用均低于 V_C , 可能与艾叶中黄酮类化合物的结构有关, 酚羟基和 B 环是黄酮类化合物清除自由基的关键活性部位, 艾叶黄酮可能具有较少的酚羟基, 因此, 供氢能力和形成稳定自由基中间体的能力较弱, 抗氧化活性略低。

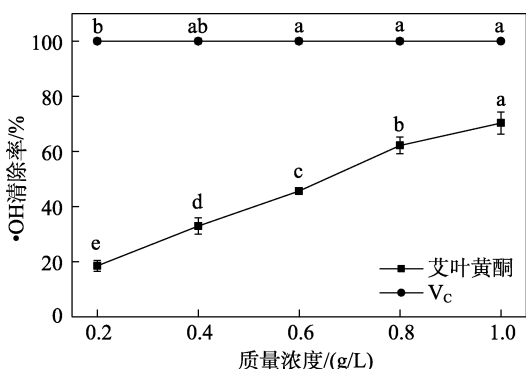


图 5 不同质量浓度艾叶黄酮对 $\cdot OH$ 的清除能力

Fig. 5 Scavenging ability of *Artemisia argyi* leaves flavonoids with different mass concentrations on $\cdot OH$

2.4 艾叶黄酮的降血糖能力分析

2.4.1 对 α -淀粉酶活性的抑制能力

图 6 为艾叶黄酮对 α -淀粉酶活性的抑制能力测试结果。由图 6 可知, 在质量浓度为 0.2~1.0 g/L 范围内, 随着艾叶黄酮质量浓度的增大, 其对 α -淀粉酶的抑制率呈增大趋势。当质量浓度为 1.0 g/L 时, 艾叶黄酮和阿卡波糖对 α -淀粉酶的抑制率分别为 64.70%和 100.00%, IC_{50} 分别为 0.59 和 0.06 g/L。

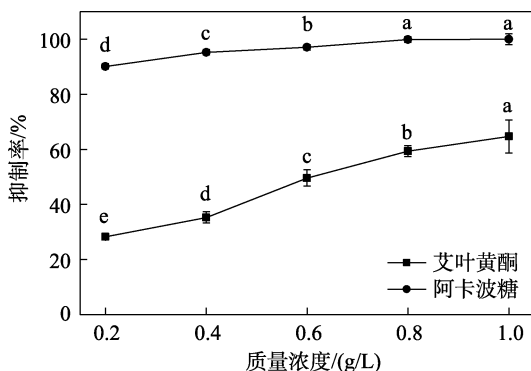


图 6 艾叶黄酮对 α -淀粉酶活性的抑制能力

Fig. 6 Inhibiting ability of *Artemisia argyi* leaves flavonoids on α -amylase

2.4.2 对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制能力

图 7 为艾叶黄酮对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制能力测试结果。由图 7 可知, 在质量浓度为 0.1~0.5 g/L 范围内, 随着艾叶黄酮质量浓度的增加, 其对 α -葡萄糖苷酶的抑制率呈逐渐上升趋势。当质量浓度 >0.2 g/L 后, 艾叶黄酮对 α -葡萄糖苷酶抑制率的增长趋势放缓。当质量浓度为 0.5 g/L 时, 艾叶黄酮和阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为 56.68%和 97.87%, IC_{50} 分别为 0.37 和 0.16 g/L。黄酮类化合物的抗糖尿病作用可能是由于其作为抗氧化剂、酶抑制剂、受体激动剂或拮抗剂的活性而实现, 而阿卡波糖作为一种 α -葡萄糖苷酶抑制剂能直接减缓肠道对于葡萄糖的吸收, 从而达到降低血糖的作用。虽然化学合成的药物 (阿卡波糖) 对降低血糖作用更明显, 但具有引起患者消化功能紊乱的副作用, 而药用植物及其提取物对 II 型糖尿病也有很好的治疗作用^[33], 不仅更安全, 而且有助于改善身体的抗氧化系统和胰岛素抵抗。

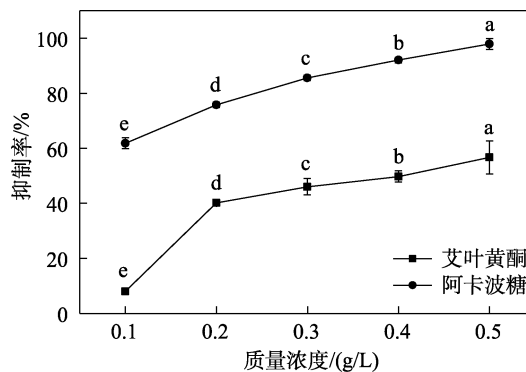


图 7 艾叶黄酮对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制能力

Fig. 7 Inhibiting ability of *Artemisia argyi* leaves flavonoids on α -glucosidase

3 结论

采用单因素实验和响应面实验对超声辅助离子液体提取艾叶黄酮的工艺进行了优化, 并对艾叶黄酮体外抗氧化和降血糖能力进行了测试。

(1) 超声辅助离子液体提取艾叶黄酮的最佳工艺条件: 质量浓度为 8 g/L 的 $[C_4mim]Br$ 乙醇水溶液作为提取溶剂, 料液比 (g : mL) 为 1 : 30, 超声时间为 68 min, 在此条件下艾叶黄酮提取率为 14.36%。

(2) 艾叶黄酮对 $DPPH\cdot$ 、 $ABTS^+$ 和 $\cdot OH$ 均能发挥一定的清除能力, 并对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶具有较好的抑制能力。质量浓度 0.5 g/L 的艾叶黄酮对 $DPPH\cdot$ 和 $ABTS^+$ 的清除率分别为 81.05%和 93.81%, 质量浓度 1.0 g/L 的艾叶黄酮对 $\cdot OH$ 的清除率为 70.28%, IC_{50} 分别为 0.15、0.12 和 0.60 g/L。质量浓度 1.0 g/L 的艾叶黄酮对 α -淀粉酶的抑制率为

64.70%, IC_{50} 为 0.59 g/L; 质量浓度 0.5 g/L 的艾叶黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为 56.68%, IC_{50} 为 0.37 g/L。

考虑到离子液体在食药成分制备工艺中的应用, 未来仍需优化离子液体回收过程并进行全面的毒性评估。本文可为天然抗氧化剂和降血糖产品的综合开发提供参考。

参考文献:

- [1] ZHOU Y (周宇). Extraction of total flavonoids from *Folium Artemisiae Argyi* by ultrasonic wave assisted extraction[J]. Chemical Industry Times (化工时刊), 2013, 27(8): 14-16.
- [2] SHAKYA S, DANSHITSOODOL N, SUGIMOTO S, et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory substance generated newly in paeoniae radix alba extract fermented with plant-derived *Lactobacillus brevis* 174A[J]. Antioxidants, 2021, 10(7): 1071.
- [3] WANG Z, LI C H, HE X, et al. *Platycodon grandiflorum* root fermentation broth reduces inflammation in a mouse IBD model through the AMPK/NF- κ B/NLRP3 pathway[J]. Food & Function, 2022, 13(7): 3946-3956.
- [4] TAN J Q, LI Q, XUE H K, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of anthocyanins from grape skins: Optimization, identification, and antitumor activity[J]. Journal of Food Science, 2020, 85(11): 3731-3745.
- [5] HANHINEVA K, TÖRRÖNEN R, BONDIA-PONS I, et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(4): 1365-1402.
- [6] ADU C, ZHU C C, JOLLY M, et al. Continuous and sustainable cellulose filaments from ionic liquid dissolved paper sludge nanofibres[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 280(7): 90-98.
- [7] LI B, ZHANG Q, PAN Y F, et al. Functionalized porous magnetic cellulose/Fe₃O₄ beads prepared from ionic liquid for removal of dyes from aqueous solution[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 163(3): 47-55.
- [8] WANG L L, BAI M G, QIN Y C, et al. Application of ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from bamboo leaves[J]. Molecules, 2018, 23(9): 2309.
- [9] ZHANG L J, LIU J F, ZHANG P P, et al. Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Lonicera japonica* thunb[J]. Chromatographia, 2011, 73: 129-133.
- [10] FREIRE M G, NEVES C M S S, MARRUCHO I M, et al. High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids[J]. Green Chemistry, 2010, 12(10): 1715-1718.
- [11] LATEEF H, GRIMES S, KEWCHAROENWONG P, et al. Ionic liquids in the selective recovery of fat from composite food stuffs[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2009, 84(11): 1681-1687.
- [12] BERTON P, MONASTERIO R P, WUILLOUD R G. Selective extraction and determination of vitamin B₁₂ in urine by ionic liquid-based aqueous two-phase system prior to high-performance liquid chromatography[J]. Talanta, 2012, 97: 521-526.
- [13] JIANG Q, QIU H D, WANG X S, et al. Effect of ionic liquids as additives on the separation of bases and amino acids in HPLC[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2008, 31(10): 1448-1457.
- [14] ZHANG H (张华), ZHAO D L (赵大利), WANG D (王丹), et al. Ultrasonic assisted ionic liquid extraction of flavonoids from lotus leaf and assessment of its antioxidant activity[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(10): 2241-2248.
- [15] CHARNAY C, BÉGU S, TOURNÉ-PÉTEILH C, et al. Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: Drug loading and release property[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004, 57(3): 533-540.
- [16] FLORINDO C, ARAÚJO J M, ALVES F, et al. Evaluation of solubility and partition properties of ampicillin-based ionic liquids[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2013, 456(2): 553-559.
- [17] ZHOU J J, SUI H, JIA Z D, et al. Recovery and purification of ionic liquids from solutions: A review[J]. Royal Society of Chemistry, 2018(8): 32832-32864.
- [18] JODYNIS-LIEBERT J, NOWICKI M, MURIAS M, et al. Cytotoxicity, acute and subchronic toxicity of ionic liquid, didecyltrimethylammonium saccharinate, in rats[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2010, 57(2/3): 266-273.
- [19] SHAO Y M (邵越楣), LI T T (李婷婷), WU C E (吴彩娥), et al. *Osmanthus fragrans* flavonoids extracted by different ultrasound-assisted processes and its antibacterial activity[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(12): 2705-2713, 2730.
- [20] YU Q J (于秋菊), SUN K (孙科), GENG F Y (耿凤英). Ultrasound-assisted deep eutectic solvent-based extraction of polysaccharides from *Phellinus igniarius* and its antioxidant activities[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2023, 44(5): 81-88, 105.
- [21] HUANG D T (黄冬婷), HUANG J S (黄俊生), TANG J J (汤静洁), et al. Ultrasonic-assisted ionic liquid extraction of ginseng polysaccharide and its antioxidant activity[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(9): 1851-1857, 1871.
- [22] ZHANG A L, SHEN Y W, CEN M P, et al. Polysaccharide and crocin contents, and antioxidant activity of saffron from different origins[J]. Industrial Crops and Products, 2019, 133: 111-117.
- [23] CHEN S H, CHEN H X, TIAN J G, et al. Chemical modification, antioxidant and α -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 428-437.
- [24] TENG H H (滕欢欢), WANG R Z (王仁中), WU D L (吴德玲), et al. The study on the antioxidant and hypoglycemic activities of different polar extracts from crude and steam-processed *Polygonatum cyrtoneema* Hua[J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2022, 48(8): 70-75.
- [25] GUO Z, LUE B M, THOMASEN K, et al. Predictions of flavonoid solubility in ionic liquids by COSMO-RS: Experimental verification, structural elucidation, and solvation characterization[J]. Green Chemistry, 2007, 9(12): 1362-1373.
- [26] FAN J P, CAO J, ZHANG X H, et al. Optimization of ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of puerarin from *Radix Puerariae Lobatae*, by response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 2299-2306.
- [27] LI X K (李学坤), LI L (李莉), TIAN P P (田盼盼), et al. Optimization for microwave and snailase assisted extraction process of flavonoid compounds from glossy privet fruit by responsive surfaces methodology[J]. Chemical Engineering (化学工程), 2014, 42(3): 6-10, 53.
- [28] ŞAHIN S, RAMLI R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20(1): 595-602.
- [29] YE C L, JIANG C J. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 495-502.
- [30] LIU Z C (刘志成), YANG M S (杨民生), SHEN X Z (申湘忠). Research on microwave extraction of flavonoids from *Argy Wormwood* leaves[J]. Journal of Hunan University of Humanities Science and Technology (湖南人文科技学院学报), 2008, 2: 12-15.
- [31] CAI M (蔡敏). Optimization of ultrasonic assisted extraction of total flavonoids from *Folium Artemisiae Argyi* by response surface methodology[J]. Shanxi Chemical Industry (山西化工), 2018, 38(6): 7-10, 22.
- [32] LIU H Q (李慧卿), CAO Y X (曹叶霞), HUANG F J (黄坊娇). Comparative study of DPPH• and ABTS⁺ methods on the antioxidant synergistic effects of polyphenols, flavonoids and polysaccharides of *Dracocephalum rupestre* Hance[J]. Journal of Shanxi Agricultural University: Natural Science Edition (山西农业大学学报: 自然科学版), 2022, 42(3): 98-105.
- [33] OTA A, ULRICH N P. An overview of herbal products and secondary metabolites used for management of type two diabetes[J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: 224659.