

分类号：Q81

学校代码：10363

密 级：公开

学 号：2220520106

显齿蛇葡萄黄酮的分离纯化及其抗糖基化活性

ISOLATION AND PURIFICATION OF FLAVONOIDS FROM  
AMPELOPSIS GROSSEDENTATA AND THEIR ANTI-  
GLYCATION ACTIVITY

学生姓名：\_\_\_\_\_李紫嫚\_\_\_\_\_

指导教师：\_\_\_\_\_魏明 教授\_\_\_\_\_

校外导师：\_\_\_\_\_刘志刚\_\_\_\_\_

专 业：\_\_\_\_\_生物与医药（专硕）\_\_\_\_\_

研究方向：\_\_\_\_\_生物制药工程\_\_\_\_\_

论文答辩日期：\_\_\_\_\_2025 年 5 月 15 日\_\_\_\_\_

## 安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期：2025 年 5 月 15 日

## 安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 \_\_\_\_\_ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：李紫媛

指导教师签名：魏明

日期：2025 年 05 月 15 日

日期：2025 年 05 月 15 日

## 显齿蛇葡萄黄酮的分离纯化及其抗糖基化活性

### 摘 要

显齿蛇葡萄 (*Ampelopsis grossedentata*) 是一种重要的药用植物, 其叶片富含黄酮类、多酚类、有机酸及生物碱等多种生物活性成分, 在抗氧化、抗炎、抗肿瘤及抗糖尿病等方面展现出显著的药理作用。近年来, 糖基化终产物 (AGEs) 的过度积累已被证明与糖尿病和阿尔茨海默病等慢性疾病的发生密切相关, 因此, 开发具有天然抗糖基化活性的功能成分具有重要的应用价值。基于此, 本研究探讨了显齿蛇葡萄黄酮的提取、分离纯化及抗糖基化活性, 研究主要内容及结果如下:

(1) 考察不同溶剂、提取剂浓度、料液比、提取时间及提取温度等因素对黄酮提取效率的影响, 并运用响应面法对提取工艺进行优化。结果表明, 乙醇为较适合显齿蛇葡萄黄酮提取的溶剂, 黄酮最优提取条件为: 乙醇浓度为 69%、料液比为 1:28 (g/mL)、提取时间为 35 min、提取温度为 66.5°C 时, 黄酮的提取得率达到 96.52 mg/g。

(2) 通过比较 6 种不同类型的大孔树脂对显齿蛇葡萄黄酮的吸附-解吸性能, 从中筛选出最为适用的树脂, 并在此基础上进一步优化其分离纯化工艺。实验结果表明, D101 树脂在吸附和洗脱黄酮方面表现优异。最佳纯化条件为: 粗提黄酮溶液浓度为 7.5 mg/mL, pH 调至 2.0, 上样流速为 1.6 mL/min。在吸附达到平衡后, 采用体积分数

为 80% 的乙醇以 1.6 mL/min 的流速进行洗脱。通过 D101 大孔树脂纯化后，回收率为 69.12%，黄酮纯度从 40.7% 提升至 90.6%，纯度提高了 2.23 倍。

(3) 采用不同浓度的乙醇（20%、40% 和 80%）对黄酮进行梯度洗脱，获得 3 个洗脱组分，并利用高效液相色谱（HPLC）分析其主要化学成分，探讨了它们的抗氧化和抗糖基化作用。结果显示，20% 乙醇洗脱组分主要含二氢杨梅素及少量杨梅素；40% 乙醇洗脱组分含有二氢杨梅素、花旗松素、芦丁及较高含量的杨梅素；80% 乙醇洗脱组分则以槲皮素和山奈酚为主要成分。三种洗脱组分均表现出良好的抗氧化活性，同时在 AGEs 的生成抑制方面具有显著效果，其中 40% 乙醇洗脱组分对 AGEs 的抑制率达到 94.27%，展现出较强的抗糖基化潜力。

**关键词：**显齿蛇葡萄，黄酮，分离纯化，抗糖基化，AGEs

# ISOLATION AND PURIFICATION OF FLAVONOIDS FROM AMPELOPSIS GROSSEDENTATA AND THEIR ANTI- GLYCATION ACTIVITY

## ABSTRACT

*Ampelopsis grossedentata*, a precious medicinal plant in China is rich in bioactive compounds including flavonoids, polyphenols, organic acids, alkaloids and so on. *Ampelopsis grossedentata* had antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, and antidiabetic properties. In recent years, it has been proved that excessive accumulation of advanced glycation end products (AGEs) in the human body resulted in the progression of chronic diseases like diabetes and alzheimer's disease. Therefore, it is important for us to develop natural compounds with anti-glycation activity. The extraction and purification of *Ampelopsis grossedentata* flavonoids were studied. The anti-glycation activity of *Ampelopsis grossedentata* was investigated. The results were shown as follows:

(1) The effects of solvent type, solvent concentration, solid-liquid ratio, extraction time, and temperature on the extraction of *Ampelopsis grossedentata* flavonoids were investigated. The extraction conditions

were optimized by response surface. The ethanol was appropriate solvent for extracting *Ampelopsis grossedentata* flavonoids. The optimal conditions for extracting *Ampelopsis grossedentata* flavonoids were as follows: solvent concentration 69%, solid-liquid ratio 1:28 (g/mL), extraction time 35 min, and temperature 66.5°C. Under these conditions, the extraction rate of *Ampelopsis grossedentata* flavonoids was 96.52 mg/g.

(2) The purification of the crude flavonoids extracted from *Ampelopsis grossedentata* by using six different types of resins were studied. D101 macroporous resin was the best for the purification of *Ampelopsis grossedentata* flavonoids. The results indicated that crude flavonoids pH value, concentration, flow velocity of adsorption, ethanol concentration, and flow velocity of desorption were the major parameters in the process of purification of the *Ampelopsis grossedentata* flavonoids. The optimum conditions for the purification of the *Ampelopsis grossedentata* flavonoids were as follows: the concentration of crude flavonoids 7.5 mg/mL, at pH 2.0 with the flow velocity of 1.6 mL/min, elution flow rate of 1.6 mL/min with 80% ethanol. Under these conditions, the flavonoid recovery rate is 69.12% and the purity of *Ampelopsis grossedentata* flavonoids purity increased from 40.7% to 90.6% after purification by D101 resin, which increased by 2.23 times than that of the crude flavonoids.

(3) Three fractions eluted with ethanol of 20%, 40% and 80% were

collected, respectively. The flavonoids composition was analyzed by HPLC. The activities of antioxidant and anti-glycation of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* were investigated. The results showed that the fractions eluted with 20% ethanol mainly contained dihydromyricetin and a small amount of myricetin, the fractions eluted with 40% ethanol mainly contained dihydromyricetin, taxifolin, rutin, and a higher content of myricetin, and the fractions eluted with 80% ethanol mainly contained quercetin and kaempferol. Three fractions eluted with ethanol of 20%, 40% and 80% all exhibited good antioxidant activity and significantly inhibited AGEs formation. Especially, AGEs inhibition rate treated with the fraction eluted with 40% ethanol reached 94.27%, which indicated strongly anti-glycation potential.

KEY WORDS: *Ampelopsis grossedentata*, flavonoids, purification, anti-glycation, AGEs

## 目录

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| 摘 要.....                         | I   |
| ABSTRACT.....                    | III |
| 第 1 章 绪论.....                    | 1   |
| 1.1. 显齿蛇葡萄概述 .....               | 1   |
| 1.2. 黄酮类化合物的提取方法研究 .....         | 1   |
| 1.3. 黄酮类化合物的分离纯化技术 .....         | 4   |
| 1.4. 黄酮类化合物的功能活性 .....           | 6   |
| 1.5. 本论文研究目的意义及内容 .....          | 8   |
| 1.5.1. 研究目的意义 .....              | 8   |
| 1.5.2. 研究内容 .....                | 9   |
| 第 2 章 显齿蛇葡萄黄酮的提取条件优化研究.....      | 10  |
| 2.1. 引言 .....                    | 10  |
| 2.2. 材料试剂与仪器设备 .....             | 10  |
| 2.2.1. 材料与试剂 .....               | 10  |
| 2.2.2. 仪器与设备 .....               | 11  |
| 2.3. 试验方法 .....                  | 11  |
| 2.3.1. 显齿蛇葡萄粗黄酮的制备 .....         | 11  |
| 2.3.2. 黄酮含量的测定 .....             | 11  |
| 2.3.3. 显齿蛇葡萄黄酮提取的单因素实验 .....     | 12  |
| 2.3.4. 响应面优化处理显齿蛇葡萄黄酮得率的影响 ..... | 12  |
| 2.3.5. 数据处理 .....                | 13  |
| 2.3.6. 结果与分析 .....               | 13  |
| 2.3.7. 单因素试验结果分析 .....           | 13  |
| 2.3.8. 响应面优化结果分析 .....           | 16  |
| 2.3.9. 本章总结 .....                | 22  |
| 第 3 章 大孔树脂分离纯化显齿蛇葡萄黄酮的工艺研究.....  | 23  |
| 3.1. 引言 .....                    | 23  |

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 3.2. 材料试剂和仪器设备 .....                    | 23 |
| 3.2.1. 材料与试剂 .....                      | 23 |
| 3.2.2. 仪器和设备 .....                      | 24 |
| 3.3. 试验方法 .....                         | 24 |
| 3.3.1. 显齿蛇葡萄黄酮的制备及黄酮含量测定 .....          | 24 |
| 3.3.2. 大孔树脂的预处理 .....                   | 24 |
| 3.3.3. 不同种型号大孔树脂的筛选 .....               | 25 |
| 3.3.4. D101 大孔树脂静态吸附、解吸实验 .....         | 25 |
| 3.3.5. D101 大孔树脂的动态吸附与解吸试验 .....        | 26 |
| 3.3.6. 显齿蛇葡萄黄酮纯度和回收率 .....              | 27 |
| 3.3.7. 乙醇梯度洗脱用于黄酮的分离纯化 .....            | 27 |
| 3.3.8. 采用高效液相色谱法对样品中黄酮成分进行定性分析 .....    | 27 |
| 3.4. 数据分析 .....                         | 28 |
| 3.5. 实验结果与分析 .....                      | 28 |
| 3.5.1. 最佳大孔树脂的筛选 .....                  | 28 |
| 3.5.2. 静态吸附与解吸试验结果分析 .....              | 29 |
| 3.5.3. 大孔树脂动态吸附、解吸试验结果 .....            | 32 |
| 3.5.4. 乙醇梯度洗脱显齿蛇葡萄黄酮试验结果 .....          | 33 |
| 3.5.5. 高效液相色谱法（HPLC）对不同洗脱组分进行定性分析 ..... | 34 |
| 3.6. 本章总结 .....                         | 35 |
| 第 4 章 显齿蛇葡萄黄酮抗糖基化活性研究 .....             | 37 |
| 4.1. 引言 .....                           | 37 |
| 4.2. 材料试剂与仪器设备 .....                    | 37 |
| 4.2.1. 材料与试剂 .....                      | 37 |
| 4.2.2. 仪器和设备 .....                      | 38 |
| 4.3. 试验方法 .....                         | 38 |
| 4.3.1. 显齿蛇葡萄黄酮及不同洗脱组分抗氧化研究 .....        | 38 |
| 4.3.2. 体外抗糖基化模型构建 .....                 | 39 |
| 4.3.3. 果糖胺抑制作用 .....                    | 39 |

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 4.3.4. $\alpha$ -二羰基化合物抑制作用 .....       | 40 |
| 4.3.5. 晚期糖基化终末产物 AGEs 抑制作用 .....        | 40 |
| 4.3.6. 显齿蛇葡萄黄酮不同洗脱组分对 BSA 荧光光谱的影响 ..... | 40 |
| 4.3.7. 蛋白质氧化产物的测定 .....                 | 40 |
| 4.4. 结果与分析 .....                        | 41 |
| 4.4.1. 显齿蛇葡萄黄酮的抗氧化活性 .....              | 41 |
| 4.4.2. 对果糖胺的抑制 .....                    | 42 |
| 4.4.3. $\alpha$ -二羰基化合物的抑制 .....        | 43 |
| 4.4.4. 对晚期糖基化终末产物 AGEs 的抑制 .....        | 44 |
| 4.4.5. 不同洗脱组分对晚期末端产物抑制效果的荧光光谱对比 .....   | 45 |
| 4.4.6. 各组分对蛋白质氧化产物含量的影响 .....           | 47 |
| 4.5. 本章总结 .....                         | 48 |
| 第 5 章 研究结论与展望 .....                     | 50 |
| 5.1. 研究总结 .....                         | 50 |
| 5.2. 研究展望 .....                         | 51 |
| 参考文献 .....                              | 53 |
| 研究生在读期间发表的论文情况 .....                    | 63 |
| 致谢 .....                                | 64 |

## 第1章 绪论

### 1.1. 显齿蛇葡萄概述

显齿蛇葡萄 (*Ampelopsis grossedentata*), 俗称藤茶, 属于葡萄科蛇葡萄属, 一直被认为是中国流行的保健茶和传统草药, 已有数百年的应用历史<sup>[1]</sup>。主要分布在中国长江流域以南省份和地区, 通常集中或零散分布在湿度较高的山区灌丛或林地中, 已鉴定出约 57 种显齿蛇葡萄的化学成分<sup>[2]</sup>, 包括黄酮类<sup>[3, 4]</sup>、多酚类<sup>[5-8]</sup>、生物碱、多糖、甾体化合物、萜类、挥发性成分及其他化学成分<sup>[9-14]</sup>。

现代药理学研究表明, 显齿蛇葡萄展现出广泛的生物活性, 其功能涵盖抗菌、抗氧化、抗炎镇痛、抗肿瘤、护肝、降低血脂和血糖, 以及提升免疫力等多个方面<sup>[15, 16]</sup>。在临床实践中, 常用于缓解黄疸性肝炎、风热性感冒、咽喉肿痛以及各种过敏性皮肤病等相关症状<sup>[17]</sup>。目前尚未有关于显齿蛇葡萄黄酮抗糖基化作用的相关报道, 研究其抗糖基化活性对于开发新的功能具有重要意义。

### 1.2. 黄酮类化合物的提取方法研究

黄酮广泛存在于各类植物中, 其显著的生物活性和药理效应使其成为研究重点。为了实现黄酮高效提取及高纯度分离, 国内外学者不断改进和探索多种提取技术, 这些方法主要涵盖传统溶剂提取、超声辅助、微波辅助、酶辅助、超临界流体以及离子液体提取等技术。

#### (1) 溶剂提取法

溶剂提取法基于“相似相溶”的原理, 通过选用适宜的有机溶剂或其混合液体, 将原料中的黄酮成分溶解出来, 实现分离。王晨晨等<sup>[18]</sup>使用体积分数为 60% 的乙醇溶液对谷子的类黄酮进行提取。郑美瑜<sup>[19]</sup>等采用乙醇作为溶剂, 对桉柑皮中的多种黄酮进行提取, 并考察了体积分数为 45%、55%、65%、75%、85% 的乙醇对黄酮单体及总提取率的影响。研究表明, 当乙醇体积分数为 60%、料液比为 1:40、提取时间为 110 min、提取温度为 75℃ 时, 可获得最佳的提取效果, 此时黄酮单体的总提取率可达  $(72.63 \pm 1.53)$  mg/g。许钢等<sup>[20]</sup>用 75% 丙酮溶液对竹叶中的黄酮进行提取。

溶剂法提取操作相对简单, 设备投入较低, 可用于不同极性的黄酮类化合物

提取,且可结合超声、微波等辅助技术,提高提取效率。但同时,该方法的提取效率容易受到溶剂极性、温度、时间及液固比等因素的影响,且往往伴有杂质共溶问题,部分有机溶剂还可能引发毒性和环保隐患,可能还需要后续进一步纯化。

### (2) 超声辅助提取

超声辅助提取通过超声波在液体介质中的传播,利用空化效应、机械效应和热效应,使细胞壁破裂或提高其渗透性,从而加速目标成分的溶解和释放,提高提取效率。该方法能够增强溶剂的渗透能力,促进细胞内部物质的释放,使提取过程更加高效和温和<sup>[21]</sup>。

Zhang 等<sup>[22]</sup>利用超声辅助提取 *X. sorbifolia* 花总黄酮,优化后的提取条件为: 80%乙醇浓度、固液比 1:37 (g/mL)、84℃的提取温度以及 1 h 的提取时间,总黄酮的提取率达到  $3.956 \pm 0.04\%$ 。Jing 等<sup>[23]</sup>利用超声辅助,从紫花苜蓿地上部提取富含黄酮的抗氧化物,通过 ABTS 和 DPPH 法评估自由基清除能力,并建立了高拟合度的数学模型,在总黄酮提取模型下,优化后的条件为:液固比 57.16 mL/g,提取温度 62.33℃,提取时间 57.08 min,以及乙醇浓度为 52.14%。而在抗氧化活性模型中,根据不同检测方法又获得了不同的最佳参数,通过 DPPH 法,最佳条件为液固比 60.3 mL/g、温度 54.56℃、提取时间 45.59 min 和乙醇浓度 46.67%;通过 ABTS 法,最佳条件为液固比 47.29 mL/g、温度 63.73℃、提取时间 51.62 min 和乙醇浓度 60%。Yang 等<sup>[24]</sup>探讨了超声协同静电场提取 (UEE) 黄花菜总黄酮的工艺,UEE 不仅提高了黄花菜总黄酮的提取率,还在 DPPH、羟基和超氧阴离子自由基清除能力测试中表现出优异的抗氧化活性,超声空化效应可以支持 UEE 方法的可用性,这在 UEE 方法中起着最重要的作用。超声提取耗时短,溶剂用量少,不易破坏热敏性黄酮的结构。

### (3) 微波辅助提取

微波提取黄酮是通过磁控管产生的高频振动,产生的能量使药材内分子热运动加剧,破坏细胞壁以释放出黄酮成分,具有加热快、能耗低和提取效率高等优点<sup>[25]</sup>。

Niu 等<sup>[26]</sup>从 *Alpinia oxyphylla* Miq. 的叶片中提取总黄酮 (TFL),使用微波辅助法,采用正交试验。确定 TFL 的最佳提取条件为:乙醇浓度为 50%、液固比 1: 20,温度为 70℃以及循环指数 3,在此条件下,总黄酮的提取率达到 28.24%

微波提取具备温和的操作条件、高效的提取能力、节能且省时，并且能较好地保持目标化合物的结构完整性，具有显著优势。

#### （4）酶辅助提取

酶辅助提取黄酮是利用特定酶类分解植物细胞壁中的多糖和纤维结构，促进黄酮成分的释放和溶出，从而提高提取效率的一种温和高效技术。该方法在较低温度下运行，能够缩短提取时间并减少热敏成分的降解，同时借助酶促反应实现绿色环保提取。

张琪婧等<sup>[27]</sup>采用酶辅助闪式提取技术对覆盆子总黄酮进行提取，优化后的最佳提取条件为：酶质量浓度为 2 mg/mL，酶解温度为 46℃，提取次数为 3 次，液固比为 36:1 (mL/g)。在该条件下，覆盆子总黄酮的提取得率达到 1.40 mg/g。酶的活性易受温度、pH 的影响，酶制剂价格相对昂贵，在工业生产中可能会增大提取成本。

#### （5）超临界流体提取

超临界流体提取是当 CO<sub>2</sub>、乙醇、丙烷、氨、水等多种流体加压加热到一定条件下，它进入超临界状态，这时具有良好的渗透性和溶解能力，能迅速溶解并带走植物中的黄酮成分，而且提取过程温度较低，不易破坏黄酮的活性，同时也不会残留有害化学物质，这种方法效率高且环保。

董新艳等<sup>[28]</sup>人采用超临界 CO<sub>2</sub>技术对绿萝花中的总黄酮进行提取研究，优化后确定的最优提取参数为：提取温度 50℃、压力 30 MPa、时间 2 h，辅以 80% 乙醇作为夹带剂，流速控制在 0.4 mL/min。按照该条件，黄酮的提取率可达 0.868%，纯度为 8.298%。Liu 等<sup>[29]</sup>利用超临界二氧化碳提取玉米须中黄酮，最佳提取条件为：温度 50.88℃，压力 41.80 MPa，共溶剂用量为 2.488 mL/g，提取时间 120 min，粒径为 0.4 mm，并以 20%乙醇作为共溶剂，获得的黄酮最大提取率约为 4.24 mg/g。超临界流体萃取设备复杂，运行需高压环境，设备投资大、生产成本低、操作复杂等问题，限制了其推广应用。

#### （6）离子液体提取

离子液体由阴、阳离子构成，黏度高、密度大，在室温或接近室温附近温度下呈液态。离子液体种类繁多，根据阳离子的种类可分为吡啶类、咪唑类、季铵类和季磷类等，根据阴离子的种类可以分为 BF<sub>4</sub><sup>-</sup>、BF<sub>6</sub><sup>-</sup>、CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>、HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、

Br<sup>-</sup>等<sup>[30]</sup>。

赫丁轩等<sup>[31]</sup>采用离子液体对艾叶黄酮进行提取并优化工艺后,确定了最佳提取条件:将 1-丁基-3-甲基咪唑溴盐溶解在体积分数 60%的乙醇中,配成质量浓度为 8 mg/mL 的离子液体作为提取试剂,在料液比 1:30、超声时间 68 min 的条件下,艾叶黄酮的提取率达到 14.36%。

### 1.3. 黄酮类化合物的分离纯化技术

植物黄酮广泛存在于各种植物中,因其抗氧化、抗炎和抗糖基化等生物活性,成为食品、医药及化妆品行业的重要成分。由于黄酮通常与多酚、糖苷、生物碱等共存,因此需要合适的分离纯化技术来提高其纯度。目前常用的分离纯化方法有制备型液相色谱法、大孔吸附树脂柱层析法、离子沉淀分离法、膜分离法等。

#### (1) 制备型高效液相色谱法

是一种基于色谱分离原理,用于黄酮类化合物高纯度分离的技术。其基本原理依赖于目标化合物在固定相和流动相之间的分配行为,通过优化色谱条件,实现黄酮类物质的高效分离与纯化。

王知斌等<sup>[32]</sup>使用制备型高效液相色谱对膜荚黄芪叶中的黄酮进行分离纯化,根据波谱数据鉴定出 13 种黄酮类成分。许将等<sup>[33]</sup>人采用制备型高效液相色谱分离竹叶黄酮中的异荭草苷和荭草苷,优化条件:甲醇-0.3%乙酸水(32:68)为流动相,流速 5 mL/min,柱温 20℃,检测波长 330 nm,进样量 400  $\mu$ L,样品浓度 15.3 mg/mL。分离后,异荭草苷纯度大于 99%,荭草苷纯度大于 93%,加样回收率分别为  $92.7 \pm 2.92\%$ 和  $85.1 \pm 3.45\%$ 。

制备型高效液相色谱源自柱色谱技术,主要用于目标化合物的最终分离纯化阶段,能够获得高纯度的单体成分<sup>[34]</sup>。

#### (2) 大孔吸附树脂柱层析法

大孔树脂是一种高分子吸附材料,具有多孔立体结构和较大的比表面积。其内部孔道结构提供了大量的吸附位点,使其能够通过分子间作用力(如范德华力、氢键和疏水作用),从复杂的溶液体系中选择性吸附黄酮类化合物。随后利用适当的洗脱剂进行解析,使黄酮有效释放,从而获得纯度较高的提取物。研究表明,相较于极性树脂,弱极性、比表面积大、孔径适中的大孔树脂对黄酮的吸

附能力更强<sup>[35]</sup>。

Zhang 等<sup>[36]</sup>对 D101、D201、AB-8、HPD400、D301 和 D311 六种大孔树脂进行评估, 研究结果表明, AB-8 树脂对三种银杏黄酮 O-糖苷的吸附和解吸能力最佳, 银杏提取物中三种主要黄酮 O-糖苷(I、II、III)的含量分别从 8.93%、9.88%和 6.11%提高至 30.12%、35.21%和 14.14%。同时, 其回收率也分别增长至 88.76%、93.78%和 60.90%。翟连林等<sup>[37]</sup>将 AB-8、D101、HPD400、X-5、NKA-9、DM301 型号大孔树脂纯化凉粉草总黄酮进行吸附和解吸性能的比较, AB-8 大孔树脂表现较好, 最佳纯化条件: 上样液质量浓度 1.7 mg/mL、pH 4.2, 以 1.0 mL/min 上样后, 采取体积分数 73.6%乙醇溶液以 1.5 mL/min 流速进行洗脱, 凉粉草总黄酮含量可达到  $68.1\% \pm 0.2\%$ 。

大孔树脂纯化黄酮的优点在于选择性强、操作简便、环保安全、可重复使用且适合工业化, 同时在低温条件下进行分离, 有助于保持黄酮的生物活性, 因此广泛应用于天然产物的提取与纯化<sup>[38]</sup>。

### (3) 离子沉淀分离法

离子沉淀分离法通过黄酮分子中的羟基或羰基与特定金属离子(如铝离子、钙离子)或沉淀剂形成不溶性络合物, 使黄酮从溶液中沉淀析出。通过调节 pH、离子浓度和沉淀剂种类优化沉淀效果, 随后采用离心、过滤或溶剂洗脱获得高纯度黄酮。

林华婷等<sup>[39]</sup>采用金属络合法, 以乙酸锌作为络合剂对鼠曲草黄酮进行分离纯化, 优化后的工艺条件如下: 粗提物以无水乙醇溶解(初始浓度 1.5 mg/mL), pH 调节至 8.0, 乙酸锌溶液浓度为 9 mg/mL, 络合反应时间 10 min, 随后加入 0.15 g 乙二胺四乙酸进行解离。在此条件下, 黄酮纯度由 20.21%提升至 67.47%, 提高 3.4 倍。欧阳玉祝等<sup>[40]</sup>采用钙离子沉淀法分离葛根总黄酮, 优化条件为: 50 mL 葛根提取液中加入 70 mL 饱和石灰水作为沉淀剂, 在 60℃下反应 45 min。最终葛根总黄酮提取率达 0.6589%。

该方法操作简便、成本较低, 但可能存在选择性较低的问题, 因此常与其他纯化技术结合使用, 以提高分离效果。

### (4) 膜分离法

膜分离法利用半透膜的选择性透过性, 通过压力或浓度梯度驱动, 根据黄酮

分子大小和极性实现分离。有微滤膜、超滤膜、纳滤膜、反渗透膜电渗析膜等，超滤可去除大分子杂质，纳滤进一步提高黄酮纯度。

范敬宜等<sup>[41]</sup>采用不同配比的制膜液制备不同孔径的超滤膜，用于牡丹黄酮粗提液的预过滤，使黄酮纯度提升至 15.6%。随后，经两级不同孔径的纳滤膜分级过滤，黄酮纯度进一步提高至 79%。

该方法无化学污染、能耗低、易操作，但可能受膜污染和选择性限制，常与其他纯化技术联用以优化效果<sup>[42]</sup>。

#### 1.4. 黄酮类化合物的功能活性

黄酮类化合物展现出多种生物活性，包括抗氧化、抗菌抗病毒、抗肿瘤、抗糖基化，以及心血管和神经系统保护作用<sup>[43]</sup>。

##### (1) 抗氧化

黄酮具备多种生物学特性，其中清除自由基并发挥抗氧化作用是最重要的功能之一。Li 等<sup>[44]</sup>对 7 月至 11 月不同成熟阶段采集的黑松露进行总酚、总黄酮含量及抗氧化活性分析，结果表明，7 月采集的未成熟样品中黄酮含量最高（3.89 mg/g），并表现出最强的 ABTS+自由基清除活性（ $EC_{50}=3.73\text{ mg/mL}$ ）；8 月采集的样品总酚含量最高（4.78 mg/g），在 DPPH 自由基清除活性及铁还原能力方面表现最佳。Kamiyama 等<sup>[45]</sup>在大麦幼叶中发现了一种黄酮苷，其作用机制主要表现为抑制紫外线或 Fenton 试剂氧化脂质时生成的丙二醛（MA），具有强抗氧化活性。Zhang 等<sup>[46]</sup>比较了不同干燥预处理对蕨类植物黄酮含量及抗氧化活性的影响，研究发现，先阴干再 75℃烘干的样品黄酮含量最高（7.6%），而直接 75℃烘干的样品含量最低（2.17%）。在抗氧化性方面，这两组均表现出相对较强的抗氧化活性。

##### (2) 抗菌抗病毒

黄酮类化合物通过多种机制对抗细菌，它们能破坏细菌的脂双层膜，抑制生物膜形成、细胞包膜合成、核酸合成、电子传递链以及 ATP 合成等关键过程<sup>[47]</sup>。此外，黄酮类化合物能够阻止病毒与细胞结合和侵入，干扰病毒的复制或翻译，并抑制病毒的释放<sup>[48]</sup>。表没食子儿茶素没食子酸酯和黄芩素还能阻断细菌 ATP 合成，影响其能量代谢，从而抑制细菌生长<sup>[49]</sup>。Wu 等<sup>[50]</sup>研究证实，槲皮素、山

奈酚和表没食子儿茶素没食子酸酯对多种流感病毒株表现出抗病毒活性。

### (3) 抗肿瘤

Zhang 等<sup>[51]</sup>从柳树花芽中提取并纯化了总黄酮, MTT 检测显示, 该黄酮在不同浓度下均能显著抑制宫颈癌 (HeLa)、结肠癌 (HT-29) 和乳腺癌 (MCF7) 细胞的增殖, 其  $IC_{50}$  分别为 1.432、0.3476 和 2.297 mg/mL。Jiang 等<sup>[52]</sup>综述了在不同类型癌细胞的研究中, 发现杨梅素能抑制癌细胞的侵袭和转移, 诱导癌细胞的细胞周期停滞和凋亡, 并抑制其增殖。Wang 等<sup>[53]</sup>研究旨在制备以磷脂为基础、经 Labrasol/Pluronic F68 改性修饰的负载黄酮的纳米胶束, 用于定向输送药物至目标脑肿瘤。研究发现, 负载杨梅素的纳米黄酮在体内各靶向组织分布更为均匀, 并显著提高了抗肿瘤效率, 同时对 Caco-2 细胞的细胞毒性和跨上皮电阻无明显影响。

### (4) 抗糖基化

糖基化反应是生物体内广泛存在的一类非酶促反应, 主要表现为还原糖 (如葡萄糖、果糖等) 与蛋白质、脂质或核酸中的游离氨基基团之间发生的一系列复杂反应过程。该反应最初阶段为羰基与氨基间的 Schiff 碱 (席夫碱) 形成过程, 随后席夫碱经 Amadori 重排生成较为稳定的 Amadori 产物。在长期的氧化和降解反应下, Amadori 产物进一步形成一系列复杂且稳定的高级糖基化终产物 (Advanced Glycation End products, AGEs)<sup>[54-57]</sup>。

抗糖基化作用是指通过干扰糖基化反应不同阶段, 抑制 AGEs 形成或促进其降解的过程。在糖基化反应前期, 抗糖基化物质能够通过捕获羰基化合物或氨基基团, 阻止席夫碱形成; 中期则主要表现为抑制 Amadori 产物的生成及其氧化反应; 后期则侧重于阻断 AGEs 的交联或促使其降解。此外, 氧化应激<sup>[58]</sup>在糖基化反应中发挥着催化作用, 加速 AGEs 的形成与积累, 因此具有抗氧化活性的天然成分常用于抗糖基化研究。抗氧化物质能够减少自由基产生, 降低氧化应激水平, 间接抑制 AGEs 的产生。

大量研究证实, AGEs 在多种慢性疾病的病理进程中发挥了关键作用, 例如糖尿病及其并发症、心脑血管疾病、阿尔茨海默病以及机体衰老过程中, 均可发现 AGEs 的异常升高。其致病机制主要包括直接改变蛋白质结构与功能、激活氧化应激反应、诱导慢性炎症反应及与 AGEs 受体 (RAGE) 的特异性结合并激活

下游信号通路，导致细胞功能异常。

Mohammadpour 等<sup>[59]</sup>研究了五种黄酮——芹菜素（AP）、柚皮素（NA）、木樨草素（LU）、槲皮素（QU）和甲基槲皮素（MQ）在抑制人血清白蛋白/葡萄糖体系中 AGEs 生成方面的化学特性效应。研究显示，所有黄酮均能在体外淬灭 AGEs 的荧光强度，且黄酮的抗 AGE 效果依次为：LU>QU>MQ>AP>NA。Gutierrez 等<sup>[60]</sup>探讨从菠菜中分离出的 10 种已知葡萄糖吡喃苷黄酮对晚期糖基化终末产物和大鼠晶状体醛糖还原酶生成的体内外抑制作用，结果显示，在 AGEs 生成的抑制实验中显示出显著的抑制效果，其抑制作用均优于各实验中所用的阳性对照，表明菠菜中所含的葡萄糖吡喃苷黄酮可能具有降低蛋白糖化水平的治疗潜力。Li 等<sup>[61]</sup>研究探讨了荞麦壳黄酮在体外降解 AGEs 的作用机制，并通过蛋白质组学分析评估其对 db/db 小鼠肾脏蛋白表达的影响。结果表明，荞麦壳黄酮可有效降解 AGEs，并通过调控 AGE-RAGE 信号通路发挥肾脏保护作用。

## 1.5. 本论文研究目的意义及内容

### 1.5.1. 研究目的意义

藤茶是葡萄科蛇葡萄属植物，因其丰富的黄酮类化合物而备受关注。其主要活性成分为二氢杨梅素<sup>[62-64]</sup>，并含有多种黄酮类物质，具有抗氧化、抗炎、抗糖基化等多种生物学功能。其中，抗糖基化作用可有效抑制晚期糖基化终产物（AGEs）的生成，降低蛋白质糖化损伤，从而在糖尿病及相关并发症防治方面具有潜在价值。近年来，尽管国内外对蛇葡萄的研究主要集中在抗氧化、抗菌、抗肿瘤等领域，但针对蛇葡萄黄酮的分离纯化及其抗糖基化作用的研究仍较为有限，亟待进一步探索。由于 AGEs 的形成及其所介导的病理变化是不可逆的，且难以降解和清除，因此阻断 AGEs 的形成或抑制其作用靶点成为当前研究的重要方向。植物源天然抗糖基化成分的研究受到广泛关注，这些物质能够通过抑制 AGEs 的生成、清除 AGEs 前体以及降低 AGEs 诱导的氧化应激等方式发挥保护作用。

显齿蛇葡萄富含的黄酮类物质具有良好的抗氧化能力，可有效减少糖基化过程中产生的自由基，从而抑制氧化反应，减少 AGEs 的形成。因此，将显齿蛇葡萄黄酮类物质的抗氧化和抗糖基化活性结合研究，有助于全面评价其潜在的保健

作用与治疗价值。本研究旨在通过系统分离和纯化显齿蛇葡萄中的黄酮类活性组分，探讨其抗氧化活性与抗糖基化活性的协同作用，为显齿蛇葡萄功能产品的开发提供科学依据和理论支持。

### 1.5.2. 研究内容

本研究主要围绕显齿蛇葡萄黄酮的提取、分离纯化及其抗糖基化活性展开，具体包括以下方面：

（1）优化提取工艺：研究提取溶剂、提取时间、提取温度、料液比等因素对显齿蛇葡萄黄酮提取率的影响，并利用响应面分析优化提取条件，以提高黄酮产率。

（2）分离纯化显齿蛇葡萄黄酮：利用大孔树脂吸附法进行分离纯化，筛选合适的树脂类型，并优化静态吸附和动态洗脱工艺。通过不同极性的洗脱溶剂分级洗脱黄酮，获得多个洗脱组分，并采用 HPLC 分析其成分组成，分析不同组分的抗氧化活性。

（3）抗糖基化活性研究：构建体外 BSA-葡萄糖糖基化模型，考察不同黄酮组分对 AGEs 形成的抑制效果，筛选活性最佳的组分，以探讨其抗糖基化作用的物质基础。

## 第2章 显齿蛇葡萄黄酮的提取条件优化研究

### 2.1. 引言

显齿蛇葡萄广泛分布于我国南方地区。其富含黄酮类化合物，尤其是二氢杨梅素，被证实具有抗氧化、抗炎、抗糖基化等多种生物活性，因此在食品、医药及保健品领域具有较高的研究价值<sup>[65]</sup>。黄酮类物质的提取与分离是开发其功能性产品的关键环节。

本研究在传统溶剂提取的基础上，旨在提高显齿蛇葡萄黄酮的提取效率，并减少因高温导致的活性成分损失。通过单因素实验与响应面优化分析，系统研究了提取溶剂类型、料液比、提取时间、提取温度及提取剂浓度对黄酮得率的影响，从而筛选出最佳提取工艺条件。本研究不仅为显齿蛇葡萄黄酮的提取工艺优化提供了有效途径，提升其利用价值，也为黄酮类化合物的工业化开发与应用奠定了重要的理论与实践基础。

### 2.2. 材料试剂与仪器设备

#### 2.2.1. 材料与试剂

(1) 材料：显齿蛇葡萄干叶（湖南省张家界罗塔坪乡长寿村）

(2) 主要试剂如下表 2-1 所示，仪器与设备如表 2-2 所示。

表 2-1 主要实验试剂  
Table 2-1 Main experimental reagents

| 试剂名称  | 规格 | 生产厂家          |
|-------|----|---------------|
| 无水乙醇  | AR | 中国医药集团有限公司    |
| 亚硝酸钠  | AR | 中国医药集团有限公司    |
| 硝酸铝   | AR | 中国医药集团有限公司    |
| 氢氧化钠  | AR | 中国医药集团有限公司    |
| 芦丁标准品 | AR | 上海阿拉丁生化科技有限公司 |
| 正丁醇   | AR | 中国医药集团有限公司    |
| 甲醇    | AR | 中国医药集团有限公司    |
| 丙酮    | AR | 中国医药集团有限公司    |
| 乙酸乙酯  | AR | 中国医药集团有限公司    |

## 2.2.2. 仪器与设备

表 2-2 仪器与设备  
Table 2-2 Instruments and equipment

| 仪器名称       | 型号        | 生产厂家            |
|------------|-----------|-----------------|
| 电子天平       | LE104E/02 | 梅特勒-托利多仪器有限公司   |
| 超声波清洗机     | AK-040SD  | 深圳市钰洁清洗设备有限公司   |
| 旋转蒸发器      | RE52-AA   | 上海亚荣生化仪器厂       |
| 循环水真空泵     | SHZ-III   | 上海贤德实验仪器有限公司    |
| 台式冷冻离心机    | L600-A    | 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司 |
| 恒温水浴锅      | HWS-24    | 上海一恒科学仪器公司      |
| 紫外-可见分光光度计 | UV755B    | 上海佑科仪表有限公司      |
| 微型旋涡混合仪    | Mixer 4K  | 生工生物工程股份有限公司    |

## 2.3. 试验方法

### 2.3.1. 显齿蛇葡萄粗黄酮的制备

将干燥的显齿蛇葡萄用多功能研磨机磨成粉，过 60 目筛备用。取 40 g 显齿蛇葡萄粉末，按照料液比 1:30 的比例加入体积分数为 70%乙醇水溶液 1200 mL，再放入 60℃下水浴 30 min。将滤液在 25℃、4000 r/min 条件下离心 10 min,过滤沉淀，将滤液用 8 μm 的滤膜过滤两次后旋转蒸发浓缩，将浓缩后的液体放置于真空冷冻干燥机内冻干 48 h，得到显齿蛇葡萄粗黄酮(*crude ampelopsis grossedentata flavonoids*, CAGF)备用。

### 2.3.2. 黄酮含量的测定

参照王令智<sup>[66]</sup>的方法并进行修改，取芦丁标准品 20 mg，用 60%乙醇定容至 50 mL 配置芦丁原液 0.4 mg/mL，浓度分别为 0、0.08、0.16、0.24、0.32、0.4 mg/mL，将 2 mL 芦丁标准溶液，先加入 0.5 mL 5%亚硝酸钠溶液，混匀后静置 5 min，再加入 0.5 mL 10%硝酸铝溶液，继续静置 5 min，再加入 4 mL 4%氢氧化钠溶液，混匀并避光静置 15 min，在 510 nm 波长下使用分光光度计进行测定。以芦丁标准液的吸光度为 y 值，浓度为 x 值，绘制标准曲线并拟合回归方程  $y=3.8393x-0.0015$ ， $R^2=0.9996$ 。利用公式(2-1)测定黄酮含量。

$$\text{黄酮含量 (mg/g)} = \frac{C \times V \times N}{M} \quad (2-1)$$

式中：C 为提取液中黄酮的浓度（mg/mL），V 为提取液的体积（mL），N 为稀释倍数，M 为样品质量（g）

### 2.3.3. 显齿蛇葡萄黄酮提取的单因素实验

#### （1）提取剂种类对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

分别取 1.0 g 显齿蛇葡萄粉末 6 份置于锥形瓶中，按 1:30（g/mL）的比例分别加入正丁醇、蒸馏水、50%乙醇、90%乙醇、丙酮和乙酸乙酯。随后用旋涡仪混匀 1 min，在室温下水浴 30 min。接着以 4000 r/min 离心 10 min，弃去沉淀后保留上清液，用以测定黄酮浓度。

#### （2）提取剂浓度对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

分别称取 6 份 1.0 g 显齿蛇葡萄粉末，放置于锥形瓶中，按照料液比 1:30（g/mL），分别加入不同体积分数的提取剂于锥形瓶中（20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇、100%乙醇），用旋涡仪混匀 1 min，接着将锥形瓶置于室温下水浴 30 min，随后将提取液在 4000 r/min 的转速下离心 10 min，离心后弃去沉淀保留上清液，取上清液测定黄酮浓度。

#### （3）料液比对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

取 6 份各 1.0 g 显齿蛇葡萄粉末置于锥形瓶中，按 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50（g/mL）比例分别加入 60%乙醇，混匀 1 min，接着室温水浴 30 min。最后以 4000 r/min 离心 10 min，弃去沉淀，保留上清液测定黄酮含量。

#### （4）提取时间对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

分别称取 6 份 1.0 g 显齿蛇葡萄粉末，放置于锥形瓶中，按照料液比 1:30（g/mL），加入 60%乙醇溶液于锥形瓶中，用旋涡仪混匀 1 min，将各个锥形瓶分别在室温水浴中提取 15、30、45、60、75 min，随后将提取液在 4000 r/min 的转速下离心 10 min，离心后弃去沉淀保留上清液，取部分上清液测定黄酮浓度。

#### （5）提取温度对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

取 6 份各 1.0 g 显齿蛇葡萄粉末置于锥形瓶中，按料液比 1:30 比例加入 60%乙醇。旋涡混匀 1 min，将各瓶分别在 5℃、20℃、40℃、60℃及 80℃水浴 30 min，再以 4000 r/min 离心 10 min，弃去沉淀，保留上清液测定黄酮浓度。

### 2.3.4. 响应面优化处理显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

基于单因素实验结果，利用 Design Expert 13 软件对提取剂浓度、料液比、提取时间及提取温度进行响应面实验设计，在四因素三水平的基础上优化提取条件。响应面因素水平见表 2-3。

表 2-3 响应面分析各因素水平表  
Table 2-3 Response surface analysis factor level table

| 因素           | 编码水平 |    |     |
|--------------|------|----|-----|
|              | -1   | 0  | 1   |
| A 提取剂浓度 (%)  | 20   | 60 | 100 |
| B 料液比 (g/mL) | 20   | 30 | 40  |
| C 提取时间 (min) | 10   | 30 | 50  |
| D 提取温度 (°C)  | 40   | 60 | 80  |

### 2.3.5. 数据处理

每个试验均重复三次，数据采用 Excel 2019、IBM SPSS Statistics 26 和 Design-Expert 13 进行分析处理。

### 2.3.6. 结果与分析

### 2.3.7. 单因素试验结果分析

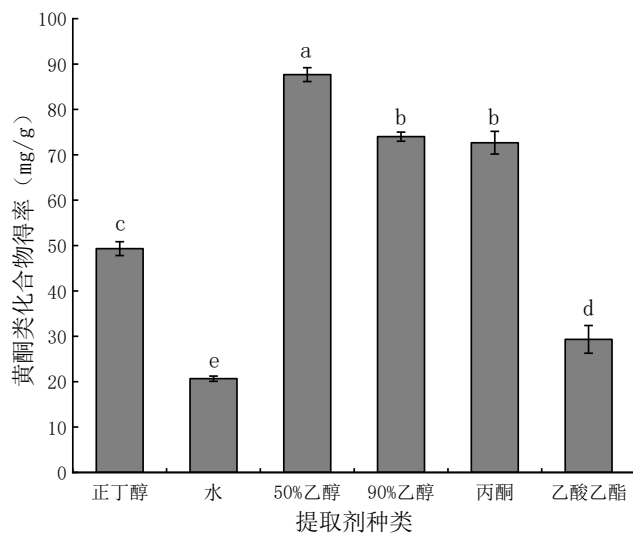
#### (1) 不同种提取剂对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

根据黄酮极性间的差异来选择较合适的提取剂<sup>[67]</sup>，选取了正丁醇、蒸馏水、不同体积分数的乙醇、丙酮、乙酸乙酯对显齿蛇葡萄黄酮进行提取实验，由图 2-1 可知，6 种提取剂对显齿蛇葡萄的提取率存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )，其中 50% 乙醇提取得率最高，90% 乙醇提取率与丙酮相近，蒸馏水的提取效果最差。考虑到丙酮易挥发，且其毒性表现为对中枢神经系统的抑制作用，高浓度暴露可能引发意识模糊或昏迷，并刺激呼吸道、眼部与皮肤，甚至导致灼伤或皮炎，因此不利于人体内应用，故选择乙醇作为提取试剂更适合。

#### (2) 提取剂浓度对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

从图 2-2 可见，随着乙醇体积分数的上升，黄酮得率呈现一定的上升趋势，但在达到某一浓度后，黄酮得率逐渐平稳，后又逐渐下降。其原因在于：中等乙醇浓度既能满足黄酮部分疏水基团的溶解需求，又能保留一定极性环境，提升细胞壁渗透性，从而使黄酮更易释出。当乙醇含量过低时，溶解能力不足，提取率

难以提高；而过高浓度则会导致溶剂极性下降，疏水性增强，但对黄酮中极性基团的溶解力减弱，导致黄酮整体溶解度下降。综上，中等的乙醇浓度可提供良好的溶解环境并兼顾渗透性，使得黄酮获得更高的提取率，故选择体积分数为 60% 乙醇对黄酮的提取较佳。



注：字母不同表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ) (下同)

图 2-1 提取剂种类对黄酮提取率的影响

Fig.2-1 The effect of extraction reagent type on flavonoid extraction yield

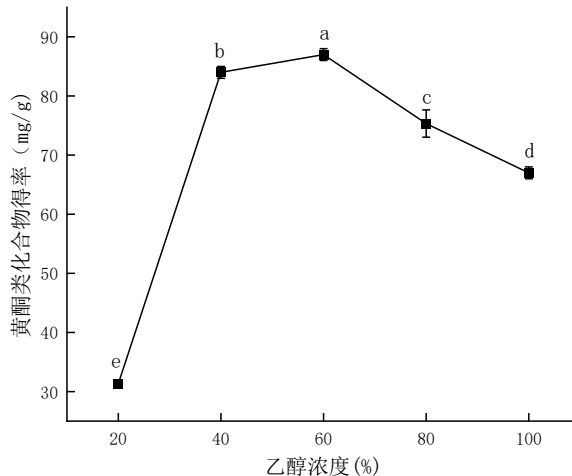


图 2-2 提取剂浓度对黄酮提取率的影响

Fig.2-2 The effect of extraction reagent concentration on flavonoid extraction yield

### (3) 料液比对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

料液比是影响提取工艺经济效益的关键参数之一，它直接影响提取工厂的运行成本和资本成本。由图 2-3 可见，随着提取溶剂量增多，黄酮化合物得率先升高后略降低。可能原因是：固液比的增加显著提高了总酚含量的提取效率，这可以归因于固体物质与溶剂体系之间更大的浓度梯度，根据菲克定律，浓度梯度

越大, 扩散速率越快。此外, 溶剂量的增加增强了固体物质与液体溶剂体系之间的相互作用, 从而提高了提取率; 当溶剂体积继续增大时, 样品中可溶性黄酮成分被过度稀释, 溶液浓度梯度和传质驱动力随之下降, 导致黄酮成分向溶剂中的扩散效率降低, 从而使得提取率反而下降<sup>[68]</sup>。综合来看, 料液比为 1:30 较佳。

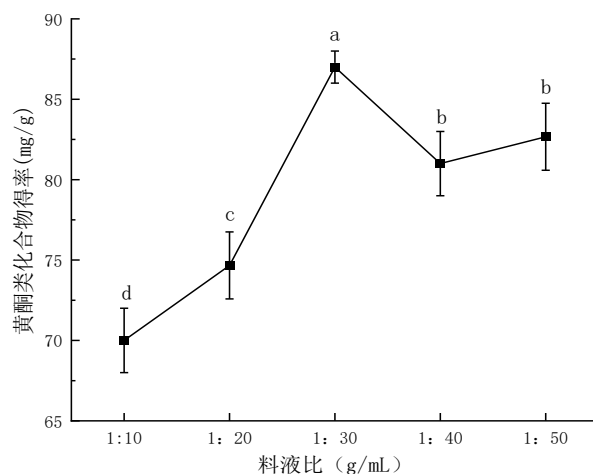


图 2-3 料液比对黄酮提取率的影响

Fig.2-3 The effect of solid-to-liquid ratio on flavonoid extraction yield

#### (4) 提取时间对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

图 2-4 所见, 黄酮得率随提取时间延长先升高, 随后趋于稳定并略有下降。在初始阶段, 溶质与溶剂间浓度差较大, 传质速率快, 黄酮成分易被溶剂浸出, 导致提取率快速提高, 随着时间推移, 溶剂逐渐饱和, 浓度梯度减小, 部分成分可能发生降解或氧化, 提取率增幅放缓甚至略有下降。综合来看, 合理的提取时长能使黄酮充分释放并避免过度延长带来的不利影响, 因此选择提取时间 30min 较为合适。

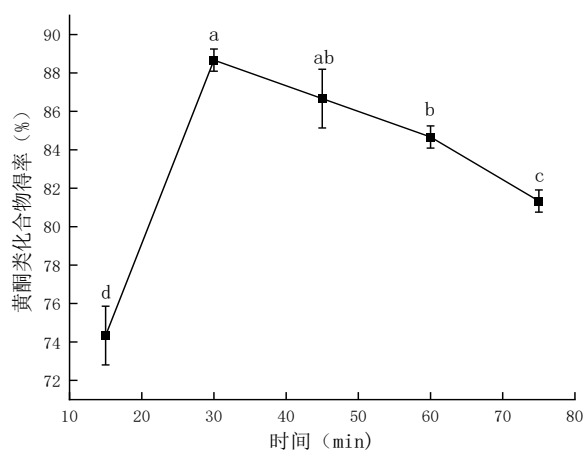


图 2-4 提取时间对黄酮提取效果的影响

Fig.2-4 Effect of extraction time on flavonoid extraction efficiency

#### (4) 提取温度对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响

根据图 2-5，提取温度对黄酮提取率具有显著影响。根据分子热运动与扩散原理，随着温度升高，分子动能增大，扩散速率加快，从而提高了黄酮向溶剂中的传质效率，其次，较高温度有助于溶剂与植物细胞的接触，增强细胞壁的渗透性，从而促使黄酮从植物组织中释放出来，使得黄酮得率在初期呈上升趋势。但当温度过高时，可能导致部分黄酮成分的热降解或化学结构改变，降低提取率，甚至可能对活性成分造成损害<sup>[69]</sup>。因此，适合的提取温度有助于黄酮的提取，故提取温度选择 60℃ 较为合理。

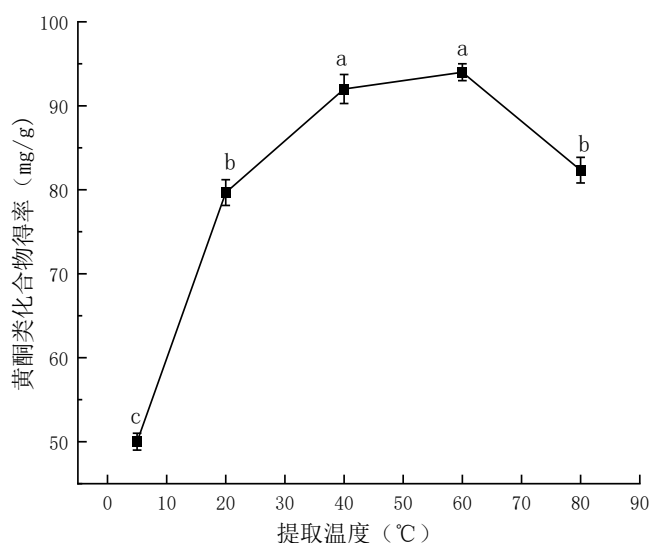


图 2-5 提取温度对黄酮提取效果的影响

Fig.2-5 Effect of extraction temperature on flavonoid extraction efficiency

### 2.3.8. 响应面优化结果分析

#### (1) 响应面设计及结果

根据单因素试验结果，以提取剂浓度、料液比、提取时间、提取温度为四因素变量，对显齿蛇葡萄黄酮的提取条件进行响应面优化，结果见表 2-4。

#### (2) 黄酮得率模型的构建与分析

使用 Design Expert 13 数据分析软件进行多元回归拟合，A、B、C、D 分别为提取剂浓度、料液比、提取时间和提取温度，Y 为显齿蛇葡萄黄酮得率，得到二次多项式回归方程：

$$Y = 95.11 + 3.07 A + 1.15 B + 0.79 C + 3.82 D - 2.81 AB - 1.7 AC - 1.34 AD - 0.025 BC - 6.44 BD + 4.63 CD - 5.97 A^2 - 4.38 B^2 - 3.88 C^2 - 8.93 D^2$$

表 2-4 响应面优化试验设计及结果

Table 2-4 Design and results of response surface optimization experiments

| 试验号 | A-提取剂浓度<br>(%) | B-料液比<br>(g/mL) | C-提取时间<br>(min) | D-提取温度<br>(°C) | 黄酮得率<br>(mg/g) |
|-----|----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| 1   | 20             | 20              | 30              | 60             | 77.05          |
| 2   | 100            | 20              | 30              | 60             | 89.67          |
| 3   | 20             | 40              | 30              | 60             | 85.92          |
| 4   | 100            | 40              | 30              | 60             | 87.32          |
| 5   | 60             | 30              | 10              | 40             | 81.51          |
| 6   | 60             | 30              | 50              | 40             | 76.02          |
| 7   | 60             | 30              | 10              | 80             | 79.79          |
| 8   | 60             | 30              | 50              | 80             | 92.82          |
| 9   | 20             | 30              | 30              | 40             | 70.17          |
| 10  | 100            | 30              | 30              | 40             | 79.59          |
| 11  | 20             | 30              | 30              | 80             | 82.99          |
| 12  | 100            | 30              | 30              | 80             | 87.07          |
| 13  | 60             | 20              | 10              | 60             | 85.84          |
| 14  | 60             | 40              | 10              | 60             | 87.82          |
| 15  | 60             | 20              | 50              | 60             | 85.44          |
| 16  | 60             | 40              | 50              | 60             | 87.32          |
| 17  | 20             | 30              | 10              | 60             | 80.55          |
| 18  | 100            | 30              | 10              | 60             | 88.62          |
| 19  | 20             | 30              | 50              | 60             | 85.35          |
| 20  | 100            | 30              | 50              | 60             | 86.62          |
| 21  | 60             | 20              | 30              | 40             | 71.91          |
| 22  | 60             | 40              | 30              | 40             | 86.51          |
| 23  | 60             | 20              | 30              | 80             | 90.01          |
| 24  | 60             | 40              | 30              | 80             | 78.86          |
| 25  | 60             | 30              | 30              | 60             | 96.87          |
| 26  | 60             | 30              | 30              | 60             | 93.86          |
| 27  | 60             | 30              | 30              | 60             | 94.97          |
| 28  | 60             | 30              | 30              | 60             | 94.97          |
| 29  | 60             | 30              | 30              | 60             | 94.89          |

从表 2-5 可知，回归模型非常显著 ( $P < 0.01$ )，失拟项则不显著 ( $P = 0.2257 > 0.05$ )。模型的回归系数为  $R^2 = 0.9762$ ，调整后的  $R^2$  为 0.9525，意味着 95.25%

的数据可以通过该模型进行解释,表明方程具有较高的可靠性,试验误差小,因此该模型可用于显齿蛇葡萄黄酮得率的分析。

F 值是评估各变量对响应值影响程度的重要指标, F 值越大,说明相应的模型分量对响应变量的贡献越高。当显著性检验的 P 值小于 0.05 时,表明该变量对响应值的影响是显著的,具有统计学意义。根据方差分析结果,可得出结论:提取温度和提取剂浓度的一次项对黄酮得率具有极显著影响 ( $P<0.01$ ),料液比对黄酮得率具有显著影响 ( $P<0.05$ ),而提取时间对黄酮得率的影响则不显著 ( $P>0.05$ )。可得对显齿蛇葡萄黄酮提取的影响因素:提取温度>提取剂浓度>料液比>提取时间。分析结果显示,AB、BD、CD 对黄酮得率有极显著的影响 ( $P<0.01$ ),而 AC 的影响则显著 ( $P<0.05$ )。

表 2-5 黄酮得率回归模型的分析结果

Table 2-5 Analysis results of the flavonoid yield regression model

| 来源                                                                                     | 离差平方和   | 自由度 | 均方     | F 值      | P 值      | 显著性 |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----|--------|----------|----------|-----|
| 模型                                                                                     | 1292.65 | 14  | 92.33  | 41.1     | < 0.0001 | **  |
| A-提取剂浓度                                                                                | 113.22  | 1   | 113.22 | 50.39    | < 0.0001 | **  |
| B-料液比                                                                                  | 15.94   | 1   | 15.94  | 7.09     | 0.0185   | *   |
| C-提取时间                                                                                 | 7.43    | 1   | 7.43   | 3.31     | 0.0905   |     |
| D-提取温度                                                                                 | 175.03  | 1   | 175.03 | 77.9     | < 0.0001 | **  |
| AB                                                                                     | 31.47   | 1   | 31.47  | 14.01    | 0.0022   | **  |
| AC                                                                                     | 11.56   | 1   | 11.56  | 5.15     | 0.0397   | *   |
| AD                                                                                     | 7.13    | 1   | 7.13   | 3.17     | 0.0966   |     |
| BC                                                                                     | 0.0025  | 1   | 0.0025 | 0.001113 | 0.9739   |     |
| BD                                                                                     | 165.77  | 1   | 165.77 | 73.78    | < 0.0001 | **  |
| CD                                                                                     | 85.75   | 1   | 85.75  | 38.16    | < 0.0001 | **  |
| A <sup>2</sup>                                                                         | 231.42  | 1   | 231.42 | 103      | < 0.0001 | **  |
| B <sup>2</sup>                                                                         | 124.4   | 1   | 124.4  | 55.37    | < 0.0001 | **  |
| C <sup>2</sup>                                                                         | 97.43   | 1   | 97.43  | 43.36    | < 0.0001 | **  |
| D <sup>2</sup>                                                                         | 517.48  | 1   | 517.48 | 230.32   | < 0.0001 | **  |
| 残差                                                                                     | 31.46   | 14  | 2.25   |          |          |     |
| 失拟项                                                                                    | 26.71   | 10  | 2.67   | 2.25     | 0.2257   | ns  |
| 纯误差                                                                                    | 4.75    | 4   | 1.19   |          |          |     |
| 总和                                                                                     | 1324.1  | 28  |        |          |          |     |
| R <sup>2</sup> =0.9762      Adj R <sup>2</sup> =0.9525      Pre R <sup>2</sup> =0.8782 |         |     |        |          |          |     |

注:  $P < 0.01$  表示极显著, 用\*\*表示;  $P < 0.05$  表示显著, 用\*表示;  $P > 0.05$  表示不显著, 用 ns 表示

### (3) 交互作用分析各因素之间的关系

依据分析结果绘制并展示了响应面图与等高线图(图 2-6~图 2-11), 有助于直观展示各因素对显齿蛇葡萄黄酮得率的影响规律以及它们之间的交互作用。下图展示了提取剂浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)和提取温度(D)对黄酮得率的影响。

如图 2-6 所示, AB 响应曲面图展示了提取剂浓度和料液比对黄酮得率的交互作用。随着提取剂浓度的提高, 黄酮得率先增加然后下降。当提取剂浓度较低时, 黄酮得率随着料液比的增加呈先上升后趋于平稳的趋势, 在较高的提取剂浓度下, 黄酮得率随着料液比的增加呈现先增后缓慢下降的趋势。由此可见, 料液比与提取剂浓度之间的交互作用对黄酮得率有显著影响。综合考虑二者的交互作用, 当提取剂浓度在 40%~80% 范围内, 料液比约为 1:25~35 g/mL 时, 黄酮得率较高。

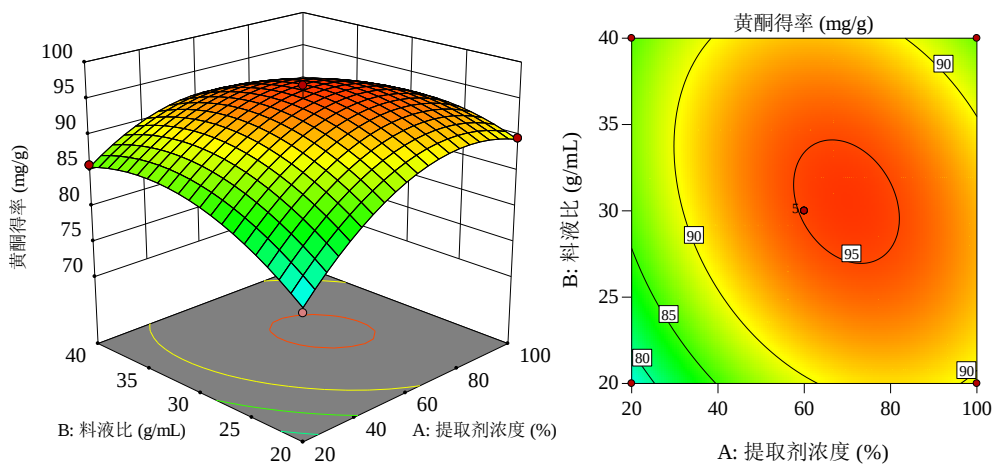


图 2-6 提取剂浓度与料液比的交互作用对黄酮得率的影响

Fig.2-6 Effect of the interaction between extractant concentration and solid-liquid ratio on flavonoid yield

如图 2-7 所示, AC 响应曲面显示, 随着提取剂浓度升高, 黄酮得率先增加后又下降。在较低浓度范围内, 延长提取时间可使黄酮得率逐渐上升并趋于稳定; 而在浓度较高时, 延长提取时间虽能提高黄酮得率, 但随后会出现下滑。这说明提取剂浓度与提取时间之间具有明显的交互效应。当仅考虑两者的交互影响时, 结果表明, 当提取剂浓度在 60%~100% 之间、提取时间在 20~40 min 左右时, 黄酮得率更高。

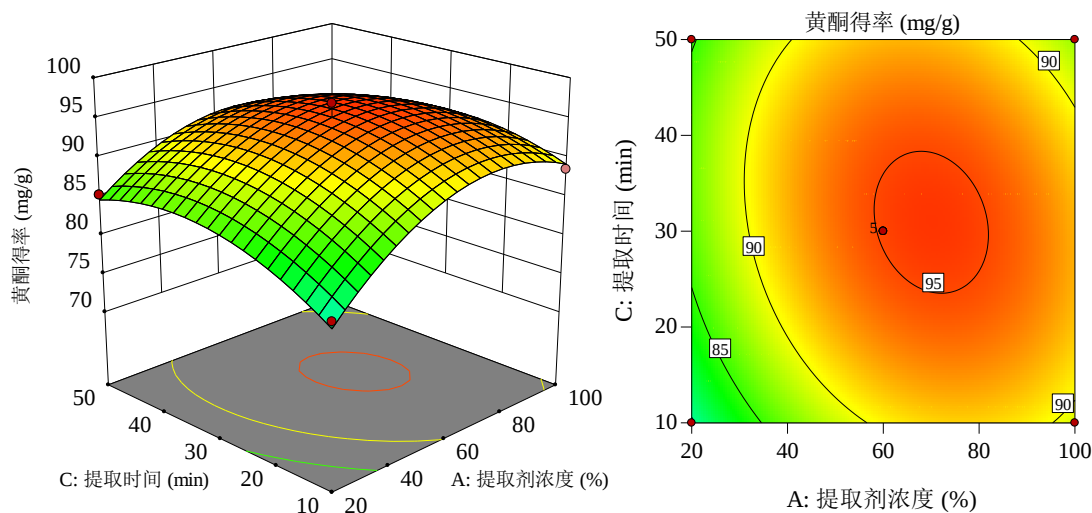


图 2-7 提取剂浓度与提取时间的交互作用对黄酮得率的影响

Fig.2-7 The effect of the interaction between extractant concentration and extraction time on flavonoid yield

如图 2-8 所示的 AD 响应曲面图中, 随着提取剂浓度和提取温度的增加, 黄酮得率先增加然后下降, 仅考虑二者交互作用的情况下, 得知当提取剂浓度 40~80% 左右, 提取温度在 50~70℃ 左右时, 黄酮得率较大。

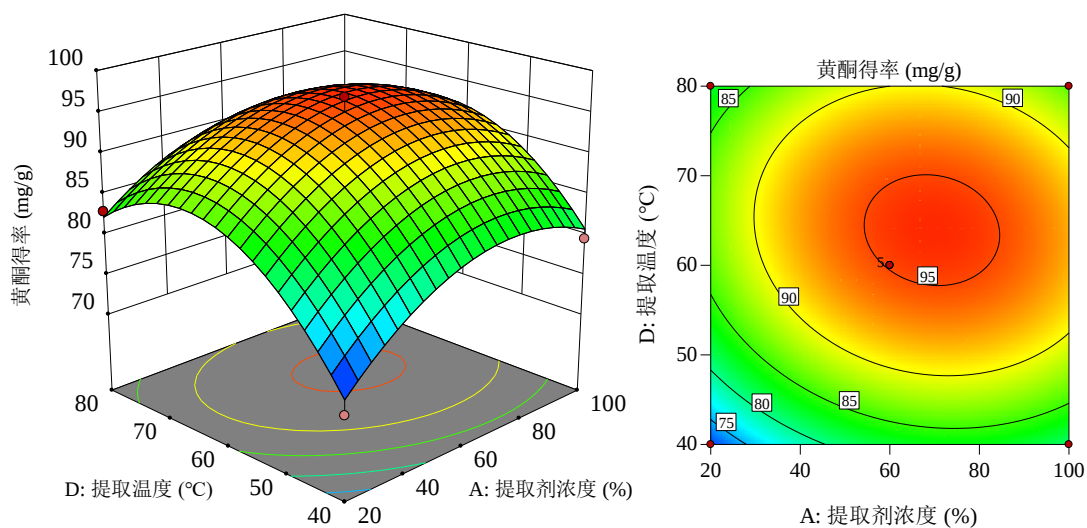


图 2-8 提取剂浓度和提取温度交互作用对黄酮得率的影响

Fig.2-8 The effect of the interaction between extractant concentration and extraction temperature on the flavonoid yield.

BC 响应曲面图 2-9 显示, 在提取时间增加的过程中, 黄酮得率呈现先增加后降低的趋势。同时, 随着料液比的增加, 黄酮得率也表现出先增大后下降的趋势, 仅考虑提取时间与料液比的交互作用时, 当提取时间处于 20~40 min 范围内, 且料液比为 1:25~35 g/mL 时, 黄酮得率较高。

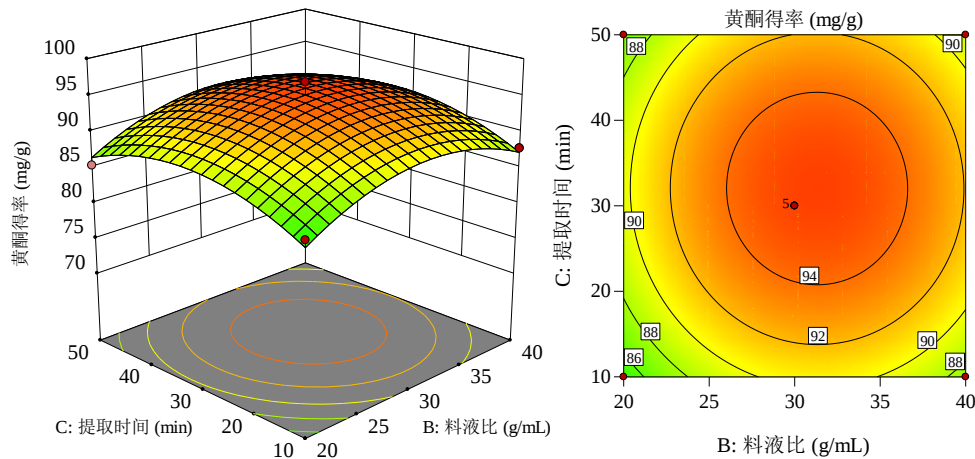


图 2-9 料液比与提取时间的交互作用对黄酮得率的影响

Fig.2-9 The effect of the interaction between the liquid-to-material ratio and extraction time on flavonoid yield.

如图 2-10 所示, 根据 BD 响应曲面可知, 当提取温度处于较低水平时, 随着料液比增加, 黄酮得率逐渐上升, 而在较高温度范围内, 黄酮得率先保持平缓, 随着料液比的进一步提高而下降。对于较低的料液比, 随着提取温度升高, 黄酮得率先升后趋于稳定, 但在较高的料液比条件下, 温度升高会导致黄酮得率先增后降, 这些现象表明提取温度与料液比之间有显著的交互作用, 结果显示当提取温度维持在 50~70℃、料液比控制在 1:25~35 g/mL 范围内时, 黄酮得率处于较高水平。

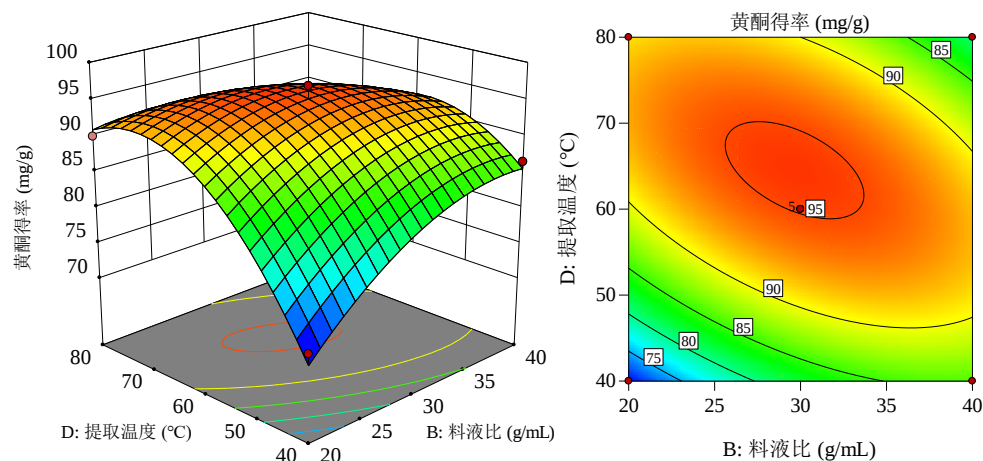


图 2-10 料液比与提取温度的交互作用对黄酮得率的影响

Fig.2-10 The effect of the interaction between solid-liquid ratio and extraction temperature on flavonoid yield

如图 2-11 所示, CD 响应曲面显示, 随提取温度升高, 黄酮得率先增后降, 在较低温度下, 延长提取时间使黄酮得率先升后趋于平稳并最终下降; 而在较高温度条件下, 则先增加后平稳。这表明提取时间与温度间存在显著交互效应, 若

仅考虑此交互影响，当提取时间约在 20~40 min、提取温度约为 50~70℃时，可获得最大黄酮得率。

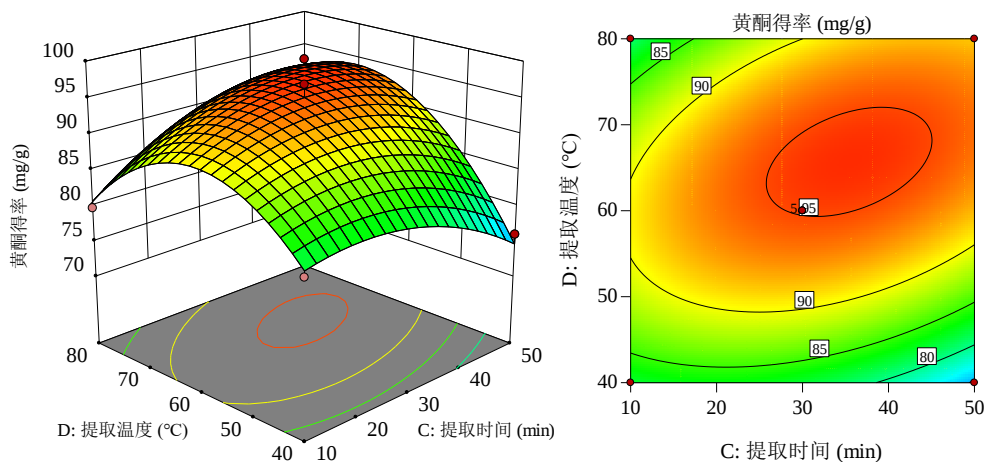


图 2-11 提取时间与提取温度的交互作用对黄酮得率的影响

Fig.2-11 The interaction between extraction time and extraction temperature on the flavonoid yield.

依据回归方程模型，并以黄酮得率最大化为优化目标，预测得到的最佳提取条件为：提取剂浓度 69%、料液比 1:28 g/mL、提取时间 35 min、提取温度 66.5℃。在最优条件下，经过三次平行试验，实际黄酮得率为  $96.52 \pm 0.66$  mg/g，与预测值 96.08 mg/g 相比，偏差在 5%以内，验证了预测值与实验值之间的良好相关性。

### 2.3.9. 本章总结

本章节针对显齿蛇葡萄黄酮的提取进行了研究，对提取溶剂的类型与浓度、提取时间和温度以及料液比等多个因素对黄酮提取得率的影响进行了全面研究。该方法操作简单，所用原料安全无毒，且能够显著提高黄酮的提取效率。通过响应面进行优化，确定了最佳提取条件：以乙醇为提取剂，浓度为 69%，料液比 1:28 g/mL，提取时间为 35 min，提取温度为 66.5℃。在该条件下，显齿蛇葡萄黄酮的提取得率可达到  $96.52 \pm 0.66$  mg/g，表明该方法具有优异的提取效果和广泛的应用潜力。

### 第3章 大孔树脂分离纯化显齿蛇葡萄黄酮的工艺研究

#### 3.1. 引言

显齿蛇葡萄富含黄酮类化合物，尤其是二氢杨梅素，在多种生理活性方面表现出显著优势。由于植物提取物通常含有复杂的杂质，如何高效地分离和纯化显齿蛇葡萄黄酮成为研究的重要课题。植物黄酮的主要分离纯化方法有溶剂提取法、柱层析法、超滤和膜分离技术、超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法、重结晶法、液相色谱法等<sup>[70, 71]</sup>，分离和纯化的方法各有特点，不同技术存在各自的优势和不足，大孔树脂以其分离纯度较高、成本较低、可重复使用、工艺流程简单以及良好的选择性而广受认可，非常适合大规模工业生产<sup>[72]</sup>。目前，这一技术已广泛应用于天然产物中目标化合物的富集，特别是在黄酮化合物的分离纯化中展现了显著的优势<sup>[73]</sup>。本研究根据黄酮化合物的极性差异，筛选了 6 种大孔树脂，通过静态-动态吸附和解吸附工艺，系统地评估了其对显齿蛇葡萄黄酮的吸附与解吸性能，优化分离纯化条件，通过使用不同浓度的乙醇洗脱出黄酮组分，并使用高效液相色谱(HPLC)对纯化后的显齿蛇葡萄黄酮各组分进行鉴定。

#### 3.2. 材料试剂和仪器设备

##### 3.2.1. 材料与试剂

表 3-1 主要化学试剂  
Table 3-1 Main reagents used in the experiments

| 主要试剂名称  | 规格  | 生产厂家       |
|---------|-----|------------|
| 6 种大孔树脂 | 6 种 | 安徽三星树脂有限公司 |
| 无水乙醇    | AR  | 中国医药集团有限公司 |
| 杨梅素     | 色谱级 | 中国医药集团有限公司 |
| 槲皮素     | 色谱级 | 中国医药集团有限公司 |
| 山奈酚     | 色谱级 | 中国医药集团有限公司 |
| 花旗松素    | 色谱级 | 中国医药集团有限公司 |
| 二氢杨梅素   | 色谱级 | 中国医药集团有限公司 |
| 甲酸      | AR  | 中国医药集团有限公司 |
| 甲醇      | 色谱纯 | 中国医药集团有限公司 |
| 芦丁      | 色谱级 | 中国医药集团有限公司 |

| 主要试剂名称 | 规格 | 生产厂家       |
|--------|----|------------|
| 亚硝酸钠   | AR | 中国医药集团有限公司 |
| 硝酸铝    | AR | 中国医药集团有限公司 |
| 氢氧化钠   | AR | 中国医药集团有限公司 |

### 3.2.2. 仪器和设备

表 3-2 主要实验仪器

Table 3-2 Main instruments used in the experiments

| 仪器名称      | 型号          | 生产厂家            |
|-----------|-------------|-----------------|
| 高效液相色谱仪   | LC-2030     | 日本岛津公司          |
| 电子天平      | HZK-FA110S  | 华志电子科技有限公司      |
| 真空冷冻干燥机   | LGJ-12      | 北京松源华兴科技发展有限公司  |
| 旋转蒸发仪     | RE-52AA     | 上海亚荣生化仪器厂       |
| 层析柱       | 20×300mm    | 杭州市拱墅区凯英仪器经营部   |
| 循环水多用真空泵  | SHB-3       | 郑州长城科工贸有限公司     |
| 台式冷冻离心机   | L600-A      | 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司 |
| 自动部份收集器   | BSZ-100-LCD | 上海琪特分析仪器有限公司    |
| 多功能研磨机    | CHY-7001    | 金华市莫菲家用电器有限公司   |
| 电热鼓风干燥机   | DHG-9140A   | 上海一恒科学仪器有限公司    |
| 紫外可见分光光度计 | UV755B      | 上海佑科仪器仪表有限公司    |

### 3.3. 试验方法

#### 3.3.1. 显齿蛇葡萄黄酮的制备及黄酮含量测定

参照第二章方法制备出的显齿蛇葡萄粗黄酮(*crude ampelopsis grossedentata flavonoids*, CAGF)。

#### 3.3.2. 大孔树脂的预处理

参照 Zhang 等<sup>[74]</sup>方法并略加修改, 将 D101、HZ-841、HPD400A、AB-8、ADS-7、NKA-9 六种型号的大孔树脂分别用体积分数为 95%的乙醇浸泡 24 h, 以确保其充分溶胀。用 95%乙醇冲洗树脂, 直到流出液不再出现白色浑浊现象, 接着, 用去离子水继续清洗, 洗至无醇味残留。最后将树脂用 5%盐酸溶液浸泡 4 h, 用去离子水洗涤至 pH 值恢复至中性, 再用 4%氢氧化钠溶液浸泡 4 h, 用去离子水洗涤至 pH 值恢复至中性, 抽滤树脂表面水分后, 放置阴凉处备用。含水

量测定见表 3-3。

### 3.3.3. 不同种型号大孔树脂的筛选

参考朱延胜<sup>[75]</sup>等方法,首先对大孔树脂进行预处理并风干备用。随后精确称取 10 g 预处理后的树脂,分别分装入 6 个 250 mL 具塞三角瓶中,并向每瓶中加入 50 mL 浓度为 5 mg/mL 的显齿蛇葡萄粗黄酮溶液。在室温条件下,以 100 r/min 的振荡速度处理 15 h 后,测定溶液中残留的黄酮浓度 ( $C_1$ )。在树脂吸附达到饱和后,先将溶液过滤,使用滤纸轻轻去除树脂表面残留的水分,接着在每个三角瓶中加入 50 mL 的 80%乙醇溶液,并在相同的条件下振荡 15 h。待解吸完成后,测定溶液中黄酮的浓度 ( $C_2$ )。并依据以下公式计算大孔树脂的吸附率、解吸率以及吸附量:

$$\text{吸附率}/\% = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \quad (3-1)$$

$$\text{解吸率}/\% = \frac{C_2}{C_0 - C_1} \times 100 \quad (3-2)$$

$$\text{吸附量}/(\text{mg/g}) = \frac{(C_0 - C_1) \times V_0}{M} \quad (3-3)$$

式中:

$C_0$  为吸附前溶液中黄酮的初始质量浓度 (mg/mL);

$C_1$  表示在吸附平衡后,溶液中残留的黄酮质量浓度 (mg/mL);

$C_2$  表示解吸达到平衡后溶液中黄酮的浓度 (mg/mL);

$V_0$  表示粗黄酮溶液的体积 (mL);

$M$  表示大孔树脂的质量 (g)。

表 3-3 大孔树脂性质及含水量

Table 3-3 Properties and moisture content of macroporous resins

| 树脂类型    | 极性         | 比表面积 ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) | 含水量 (%) |
|---------|------------|--------------------------------|---------|
| ADS-7   | 双功能 (非/极性) | 450-500                        | 55-65   |
| D101    | 非极性        | 500-550                        | 65-75   |
| HPD400A | 中极性        | 500-550                        | 60-70   |
| NKA-9   | 极性         | 250-290                        | 65-75   |
| HZ-841  | 弱极性        | 500-600                        | 57-64   |
| AB-8    | 弱极性        | 480-520                        | 60-70   |

### 3.3.4. D101 大孔树脂静态吸附、解吸实验

### (1) 时间对大孔树脂吸附效率的影响

称取已预处理的 D101 大孔树脂 10 g, 放入 250 mL 的具塞三角瓶中, 加入 5.0 mg/mL 的粗黄酮溶液 50 mL, 在室温下于 100 r/min 下分别振荡 30、60、90、120、150、180、210、240、270、300 min, 然后过滤测定滤液黄酮浓度, 计算吸附率。

### (2) 时间对大孔树脂解吸附效率的影响

将已经吸附饱和的树脂进行过滤, 将树脂放入 250 mL 的三角瓶中, 加入体积分数为 80%乙醇 50 mL, 在室温下于 100 r/min 下振荡, 分别在 60、120、180、240、300、360 min 测定三角瓶中黄酮浓度。

### (3) 不同黄酮质量浓度对大孔树脂吸附率的影响

精确称取 6 份 D101 大孔树脂, 每份 10 g, 并将其分别放入 250 mL 带塞的三角瓶中。向每个三角瓶中分别加入 50 mL 不同浓度 (2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 mg/mL) 的粗黄酮溶液, 在室温条件下, 以 100 r/min 的转速振荡 150 min。随后, 对滤液进行过滤, 并测定其中黄酮的浓度, 以计算吸附率。

### (4) 样品溶液的 pH 值对吸附率的影响

准确称取 6 份, 每份 10 g 的 D101 大孔树脂, 并分别置入 250 mL 具塞三角瓶中。向每个三角瓶中加入 50 mL 浓度为 7.5 mg/mL、pH 值分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0 的粗黄酮溶液。在室温条件下, 以 100 r/min 的振荡速率处理 150 min。随后, 过滤溶液并测定滤液中黄酮的浓度, 以计算吸附率。

### (5) 乙醇体积分数对黄酮解吸的影响

精确称取 6 份 10 g 的 D101 树脂, 分别置于 250 mL 具塞三角瓶中。向每个三角瓶中加入 50 mL 质量浓度为 7.5 mg/mL、pH 2.0 的粗黄酮溶液, 在室温条件下, 以 100 r/min 的速率振荡 150 min。随后过滤溶液并测定滤液中的黄酮浓度, 随后将过滤后的树脂分别转移至 50 mL 体积分数为 20%、40%、60%、80%和 100% 的乙醇溶液中, 在相同条件下振荡以完成解吸。测定各三角瓶中溶液的黄酮浓度, 并计算解吸率。

## 3.3.5. D101 大孔树脂的动态吸附与解吸试验

### (1) 上样流速对动态吸附过程的研究

采用湿法将 D101 大孔树脂装填至 20×300 mm 的层析柱，并用去离子水平衡柱子 1 h。随后，以 0.8、1.6 和 2.4 mL/min 的流速依次上样质量浓度为 7.5 mg/mL 的粗黄酮溶液。采用自动收集器，每管按 5 mL 的体积收集流出液，随后测定各管中黄酮的浓度。

#### (2) 黄酮在不同洗脱流速条件下的解吸率变化

在 D101 大孔树脂吸附饱和后，使用 80%乙醇作为洗脱剂，以流速分别为 0.8 mL/min、1.6 mL/min 和 2.4 mL/min 进行洗脱。洗脱液通过自动收集器按每管 5 mL 的体积进行收集，并测定各组洗脱液中的黄酮浓度。

#### 3.3.6. 显齿蛇葡萄黄酮纯度和回收率

在显齿蛇葡萄黄酮分离纯化过程中，纯度和回收率是评估纯化效果的两个重要指标。纯度反映目标黄酮在最终产品中的含量，指显齿蛇葡萄粗黄酮经过分离纯化后所含目标黄酮的量，测定粗黄酮和纯化后黄酮的纯度；而回收率衡量目标黄酮在整个提取和纯化过程中的保留情况。

$$\text{黄酮纯度}/\% = \frac{C \times V}{M} \times 100 \quad (3-4)$$

$$\text{黄酮回收率}/\% = \frac{M_2}{M_1} \times 100 \quad (3-5)$$

式中：C 为纯化后黄酮浓度，单位 mg/mL，V 为纯化后黄酮溶液体积，单位 mL，M 为纯化后样品总质量，单位为 g。M<sub>2</sub> 为纯化后样品中的黄酮总质量，M<sub>1</sub> 为原始提取物中的黄酮总质量。

#### 3.3.7. 乙醇梯度洗脱用于黄酮的分离纯化

将已吸附饱和的 D101 树脂依次用体积分数为 20%、40%和 80%的乙醇进行梯度洗脱，洗脱流速设定为 1.6 mL/min，通过自动收集器，每管收集 10 mL 的洗脱液，测定其中黄酮浓度。

#### 3.3.8. 采用高效液相色谱法对样品中黄酮成分进行定性分析

准确称取各黄酮标准品，并用甲醇制备成浓度为 1 mg/mL 的标准单溶液。分别测定各标准品后，每种标准溶液取 200 μL 混合，经过 0.22 μm 滤膜过滤后，于 280 nm 紫外检测条件下进行 HPLC 分析。

测定条件参照 Zheng 等<sup>[76]</sup>并进行修改：选用依利特 C<sub>18</sub> 色谱柱（100 mm × 4.6 mm, 5 μm），柱温设定为 30 °C，紫外检测波长为 280 nm，进样体积为 20 μL，流速为 0.6 mL/min，流动相为 A 相（甲醇）和 B 相（水，含 0.1%甲酸）；流动相梯度：0-5 min (85% B 相)，5-30 min (15% B 相)，30-35 min (85% B 相)。

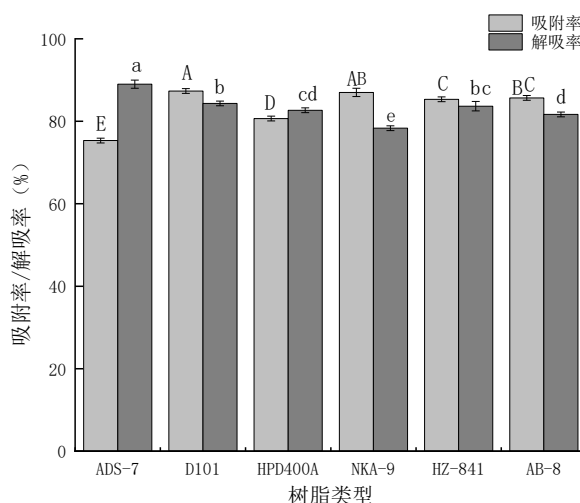
### 3.4. 数据分析

所有实验数据均进行三次平行测定，结果以平均值±标准差的形式表示。统计分析采用 IBM SPSS Statistics 26 软件，图表绘制则使用 Origin 2022 软件。显著性差异检验采用单因素方差分析（ANOVA），并通过多重比较法对组间差异进行深入分析，以确保实验数据的科学性和准确性。

### 3.5. 实验结果与分析

#### 3.5.1. 最佳大孔树脂的筛选

由图 3-1 可见，不同类型的大孔树脂在显齿蛇葡萄黄酮的吸附与解吸性能上表现出显著差异（ $P < 0.05$ ）。其中，D101 树脂的吸附率最高为 87.3%，而 ADS-7 的吸附率最低，仅为 75.3%。在解吸性能方面，ADS-7 的解吸率最高，达到 89.0%，尽管 NKA-9 树脂具有较高的吸附率为 87.0%，但其解吸率较低为 78.3%，综合考虑吸附和解吸性能，D101 树脂具有较高的吸附效率和优良的解吸特性，因此被选定为后续用于黄酮分离纯化的树脂。



注：字母不同表示组间差异显著（ $P < 0.05$ ）（下同）

图 3-1 不同大孔树脂吸附解吸性能的对比分析

Fig.3-1 Comparative analysis of the adsorption and desorption performance of different macroporous resins

### 3.5.2. 静态吸附与解吸试验结果分析

#### (1) D101 树脂静态吸附随时间变化曲线

从图 3-2 可知，D101 树脂的静态吸附前期过程呈现出时间依赖性。在吸附时间不超过 60 min 时，吸附率随着时间的延长而提高，表现为显著的正相关关系。这表明，在初始阶段树脂表面的有效吸附位点较多，对目标化合物的吸附效率较高。当吸附时间超过 60 min 时，吸附率的增长逐渐趋于平缓，在 150 min 内，黄酮吸附基本完成，所以吸附时间在 150 min 内较为合理。

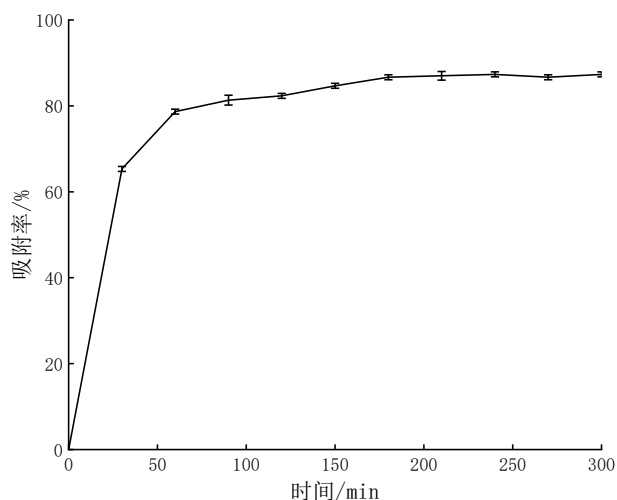


图 3-2 D101 树脂静态吸附的动力学变化曲线

Fig.3-2 Kinetic curve of static adsorption on D101 resin

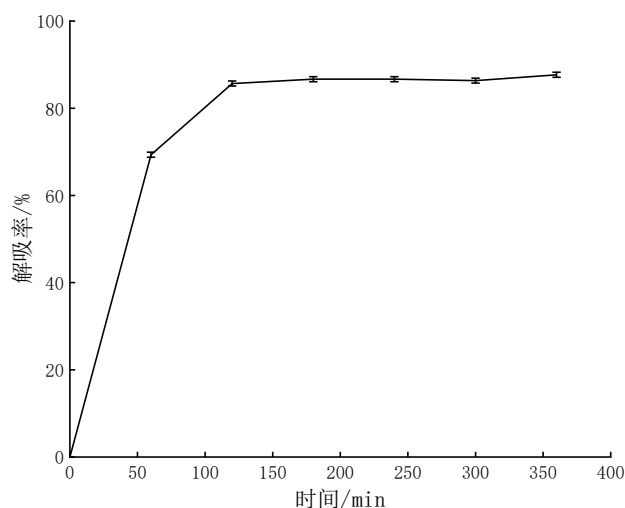


图 3-3 D101 树脂静态解吸动力学曲线

Fig.3-3 Static desorption kinetics curve of D101 resin

#### (2) D101 大孔树脂静态解吸随时间变化曲线

从图 3-3 中可以看出, D101 树脂的解吸率在前 120 min 内快速提升, 达到约 86%左右, 随后增长速度逐渐趋于稳定。这表明解吸的主要过程集中在前 120 min 内, 此阶段的解吸效率较高, 超过 120 min 后, 解吸率虽达到动态平衡。因此, 在实际操作中, 将解吸时间设定为 120 min 左右即可达到较高的解吸效率, 延长时间对解吸效果的提升作用有限, 同时也可能导致资源和时间的浪费。

### (3) 不同样品浓度下吸附率的变化

图 3-4 显示, 随着样品质量浓度的提高, 树脂对黄酮的吸附率先上升后下降, 并在样品浓度达到 7.5 mg/mL 时达到最大值。样品浓度较低时, 溶液中的黄酮分子与树脂接触机率降低, 从而导致黄酮吸附率较低, 当样品浓度较高时, 溶液中的黄酮浓度较高, 增加了黄酮分子与树脂的接触机率, 从而提高黄酮的吸附率。当样品浓度进一步提高时, 树脂表面可能会吸附过量的黄酮分子或伴随杂质, 影响其在树脂内部的扩散, 进而降低吸附效率, 导致吸附率下降。此外, 随着黄酮浓度的提高, 溶液中竞争吸附的杂质含量也随之增加, 进一步影响黄酮的吸附效果。因此, 为了实现最佳吸附性能, 将样品浓度控制在 7.5 mg/mL 左右较为合适。

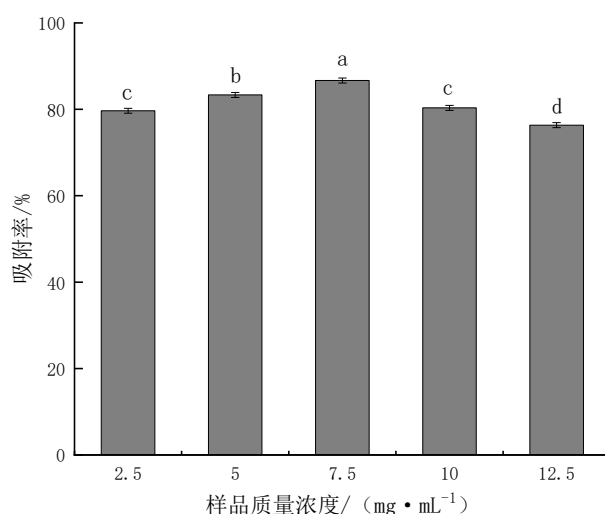


图 3-4 不同黄酮浓度下 D101 树脂吸附率的变化

Fig.3-4 Variation in the adsorption rate of D101 resin at different flavonoid concentrations

### (4) 样品溶液 pH 对吸附率的影响

从图 3-5 可以看出, 当 pH 值从 1 逐渐升高到 7 时, 整体趋势吸附率呈下降趋势。当样品溶液的 pH 为 2 时吸附率最高为 89.33%, 此时树脂的吸附能力达到最佳状态。当样品溶液的 pH > 2 时, 黄酮的吸附率明显下降, 此时树脂的吸附效果较弱。D101 树脂极性较弱, 样品溶液在较低 pH 条件下, 黄酮以分子状态存

在, 较为稳定, 很容易通过范德华力被树脂吸附, 随着溶液 pH 增大, 黄酮电离程度升高, 电荷效应和分解现象削弱了吸附能力<sup>[77]</sup>, 因此, 调节溶液 pH 在 2 左右, 可达到最佳纯化吸附效果。

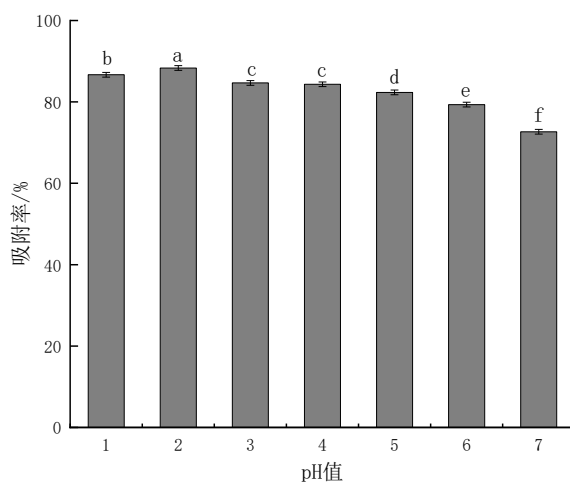


图 3-5 样品溶液 pH 对 D101 树脂吸附率的影响

Fig.3-5 Influence of sample solution pH on the adsorption efficiency of D101 resin

#### (5) 乙醇体积分数对黄酮解吸的影响

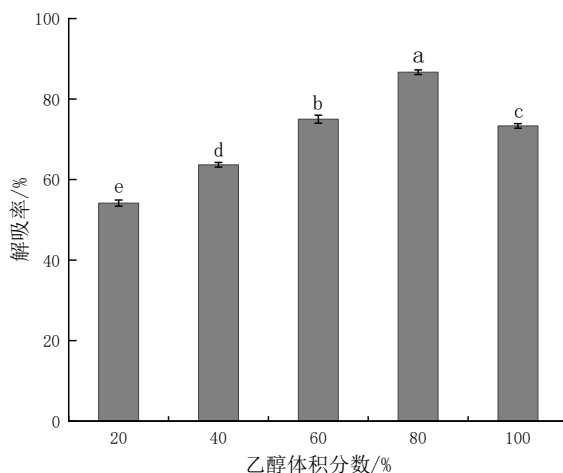


图 3-6 不同浓度乙醇对 D101 树脂中黄酮解吸率比较

Fig.3-6 Comparison of desorption rate of flavonoid in the D101 resin under different concentration of ethanol

从图 3-6 可以看出, 乙醇的体积分数对 D101 树脂的解吸率产生了明显影响。随着乙醇体积分数的增加, 解吸率逐渐提高, 并在 80% 时达到最高值为 86.67%, 继续增大乙醇浓度, 解吸率降低。由于不同浓度的乙醇溶液具有各自独特的极性, 根据“相似相溶”原理<sup>[78]</sup>, 低浓度乙醇更有利于解吸极性较强的成分, 而高浓度乙醇则更适用于解吸极性较弱的成分。实验结果表明, 乙醇浓度为 80% 时解吸率

最高，可能是由于此时藤茶黄酮类物质的极性与 80%乙醇溶液的极性较为匹配，从而提高了黄酮的解吸效率。

### 3.5.3. 大孔树脂动态吸附、解吸试验结果

#### (1) 上样液流速对动态吸附的影响

由图 3-7 可见，在动态吸附过程中，当流出液中黄酮的浓度达到上样液初始浓度的 10%时，即可判定为达到泄漏点<sup>[79]</sup>，这标志着大孔树脂吸附趋于饱和。随着流速的增加，泄漏点出现得越早，表明树脂对黄酮的吸附量随流速增加而减少。当黄酮样品的上样流速分别为 0.8、1.6 和 2.4 mL/min 时，对应的泄漏点体积依次为 155、135 和 120 mL，吸附量分别为 47.8、41.6 和 37.0 mg。实验结果表明，上样流速对树脂的黄酮吸附能力具有显著影响。综合考虑吸附效率和时间成本，1.6 mL/min 的上样流速在吸附量和操作效率之间取得了较好的平衡，因此被认为是较为合适的流速条件。

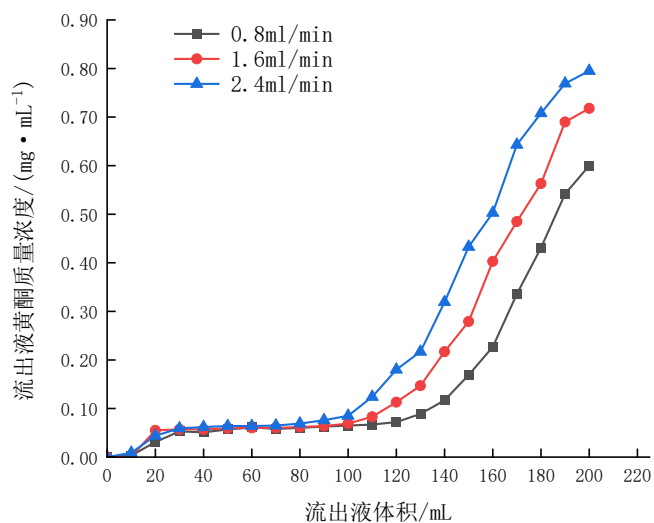


图 3-7 不同上样液流速下 D101 大孔树脂的动态吸附性能

Fig.3-7 Dynamic adsorption behavior of D101 macroporous resin under varying sample flow rates

#### (2) 洗脱流速对动态洗脱的影响

由图 3-8 可见，不同洗脱流速对黄酮的洗脱范围产生显著影响。当洗脱流速为 0.8 mL/min 时，黄酮主要分布在 25-70 mL 体积范围内；当流速提高至 1.6 mL/min 时，黄酮的主要洗脱范围缩小至 20-60 mL；而在 2.4 mL/min 的流速条件下，黄酮的洗脱范围扩大至 10-80 mL。洗脱速度会影响的黄酮的解吸速率，洗脱流速过快会缩短洗脱液与树脂的接触时间，从而降低黄酮的解吸效率，导致洗脱

不均匀，并引发拖尾现象；洗脱流速过慢有利于洗脱液和树脂的充分接触，同时也会导致洗脱下来的黄酮被重新吸附上去，导致解吸时间过长<sup>[80]</sup>。总之，选择 1.6 mL/min 的洗脱速度较为适宜，此时洗脱体积为 135 mL，黄酮回收率为 69.12%，黄酮纯度由 40.7% 提升到 90.6%，纯度提高了 2.23 倍。

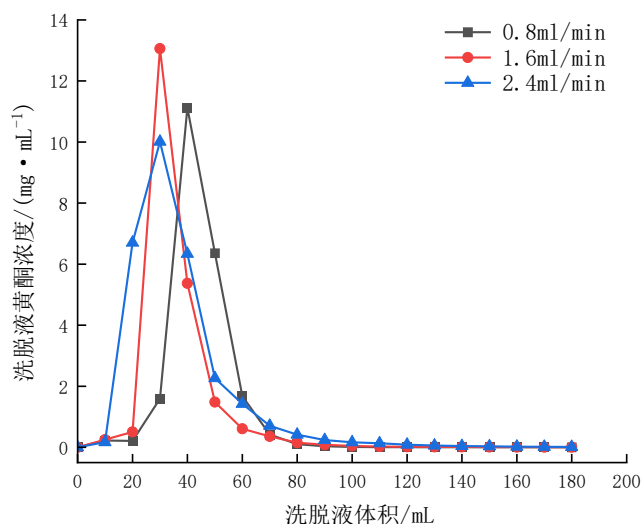


图 3-8 洗脱流速对 D101 树脂动态洗脱的影响

Fig.3-8 The effect of elution flow rate on the dynamic elution of D101 resin

#### 3.5.4. 乙醇梯度洗脱显齿蛇葡萄黄酮试验结果

用 20%、40% 和 80% 浓度的乙醇对显齿蛇葡萄黄酮粗提物（CAGF）进行梯度洗脱后，分别收集 20% 乙醇洗脱组分（CAGF-1）、40% 乙醇洗脱组分（CAGF-2）、80% 乙醇洗脱组分（CAGF-3）如图 3-9 所示。

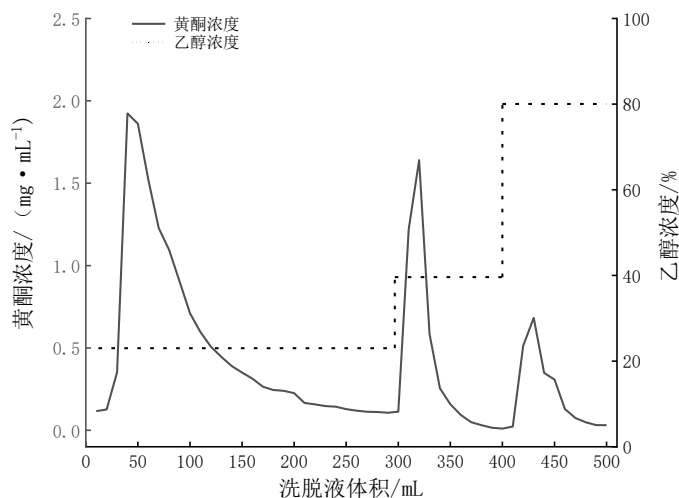
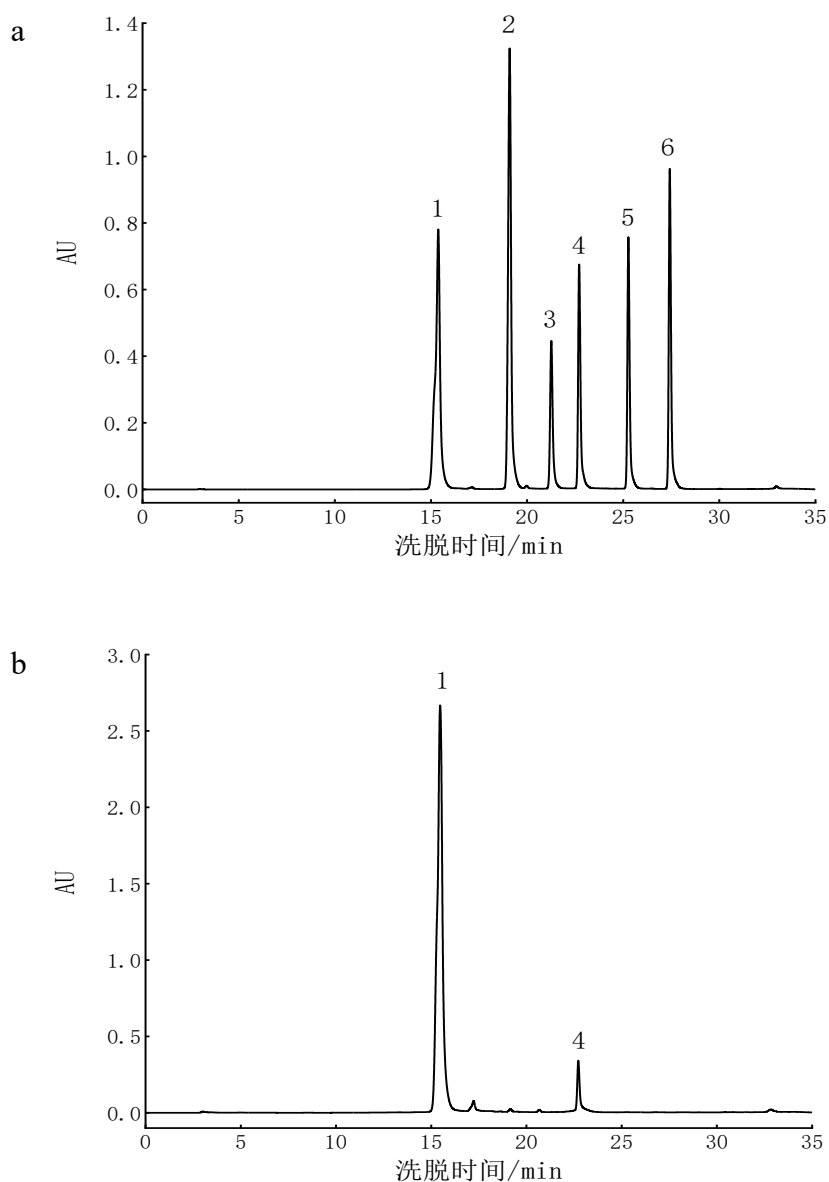


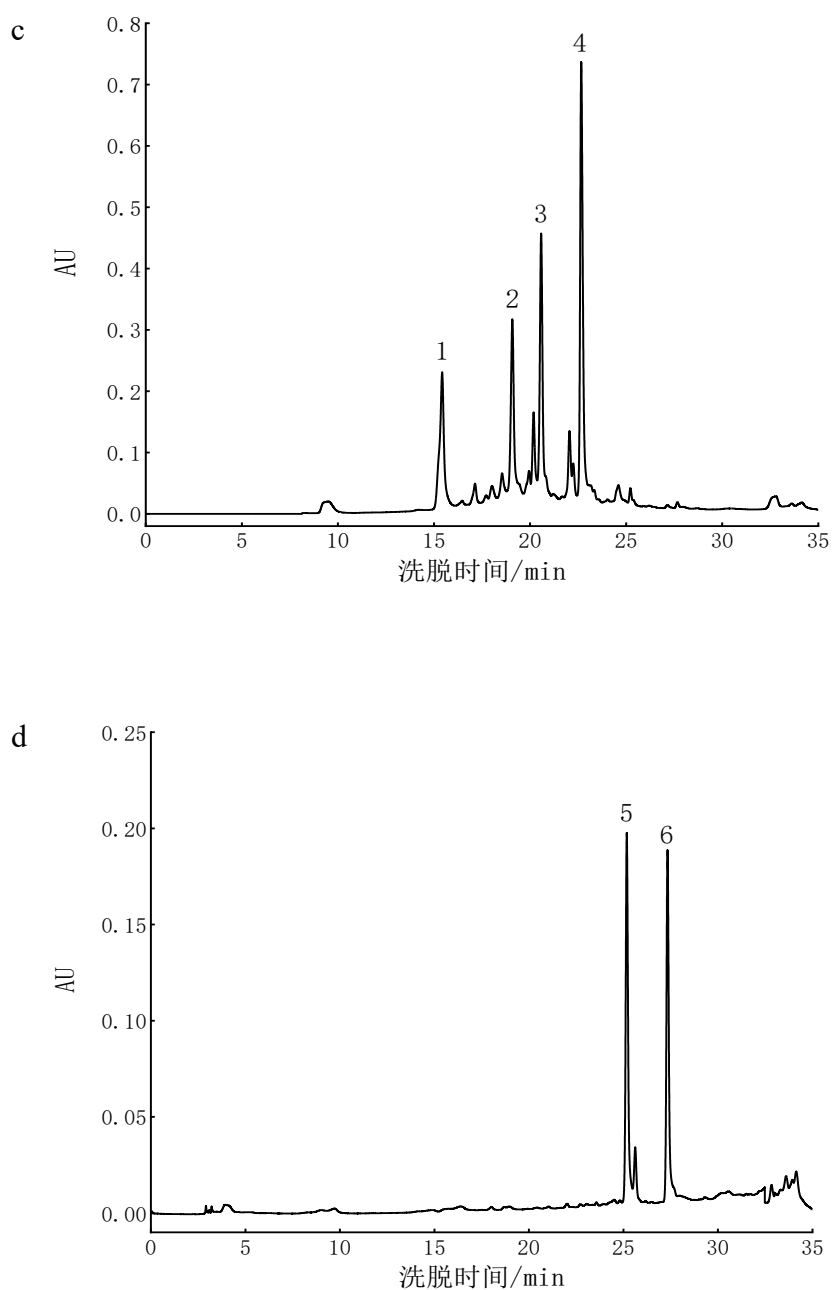
图 3-9 乙醇梯度洗脱黄酮图谱

Fig.3-9 Ethanol gradient elution chromatogram of flavonoids

### 3.5.5. 高效液相色谱法（HPLC）对不同洗脱组分进行定性分析

用 HPLC 对各组分进行分析，结果由图 3-10 显示。20%乙醇洗脱组分主要含二氢杨梅素，还含有少量杨梅素，其中二氢杨梅素、杨梅素分别占洗脱组分的 91.23%、8.77%；40%乙醇洗脱组分含有二氢杨梅素、花旗松素、芦丁和杨梅素，其中杨梅素含量相对较高，其中二氢杨梅素、花旗松素、芦丁和杨梅素分别占洗脱组分的 13.02%、17.75%、26.63%和 42.60%；80%乙醇洗脱组分主要含有槲皮素和山奈酚，槲皮素和山奈酚分别占洗脱组分的 54.29%、45.71%。





1-二氢杨梅素 2-花旗松素 3-芦丁 4-杨梅素 5-槲皮素 6-山奈酚  
a-6 种标准品混合；b-20%乙醇洗脱组分（CAGF-1）；c-40%乙醇洗脱组分（CAGF-2）；d-80%乙醇洗脱组分（CAGF-3）

图 3-10 黄酮标准品和不同洗脱组分 HPLC 图谱

Fig.3-10 HPLC chromatograms of flavonoid standards and different elution fractions

### 3. 6. 本章总结

D101 树脂较适合显齿蛇葡萄黄酮的分离纯化，静态吸附 150 min，解吸时间

设定为 120 min, 黄酮浓度为 7.5 mg/mL, pH 为 2.0 左右, 上样液流速 1.6 mL/min。以流速 1.6 mL/min, 80%乙醇洗脱, 此时黄酮回收率为 69.12%, 黄酮纯度由 40.7% 提升到 90.6%, 纯度提高 2.23 倍。

采用乙醇梯度洗脱显齿蛇葡萄黄酮, 分别获得 CAGF-1、CAGF-2 和 CAGF-3 洗脱组分, CAGF-1 组分中含有二氢杨梅素和杨梅素, 其中二氢杨梅素、杨梅素分别占洗脱组分的 91.23%、8.77%; CAGF-2 中检测到二氢杨梅素、花旗松素、芦丁以及杨梅素, 其中二氢杨梅素、花旗松素、芦丁和杨梅素分别占洗脱组分的 13.02%、17.75%、26.63%和 42.60%; 而 CAGF-3 组分则检出槲皮素和山奈酚, 槲皮素和山奈酚分别占洗脱组分的 54.29%、45.71%。

## 第4章 显齿蛇葡萄黄酮抗糖基化活性研究

### 4.1. 引言

糖基化反应是指还原糖与蛋白质、脂质或核酸等生物大分子在非酶促条件下发生的自发反应，最终形成高级糖基化终产物（Advanced Glycation End Products, AGEs）<sup>[81]</sup>。这一过程广泛存在于生物体内，并在糖尿病、阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、神经病变、伤口愈合障碍等疾病的发生发展中起到重要作用<sup>[82]</sup>。AGEs的积累不仅会导致蛋白质结构和功能的改变，还会通过与其特异性受体（RAGE）结合，引发炎症反应和氧化应激，加剧机体损伤<sup>[83]</sup>。因此，抑制 AGEs 的生成已成为延缓衰老及预防糖基化相关疾病的重要研究方向。

氨基胍（AG）等合成抑制剂可通过捕获活性羰基中间体延缓 AGEs 形成，AG 的主要作用机制可能是与 Amadori 产物衍生的分解产物发生反应<sup>[84]</sup>。长期使用氨基胍可能导致肝脏毒性、肾功能损伤和血管炎等不良反应。因此，从天然来源中发掘具有高效、低毒特性的 AGEs 抑制剂，已成为近年来研究关注的重点方向。近年来，天然产物，特别是植物黄酮类化合物，因其良好的抗氧化和抗糖基化活性，受到广泛关注<sup>[85]</sup>。显齿蛇葡萄作为一种传统药用植物，其多种活性成分已被证实。然而关于其黄酮组分在糖基化反应中的干预机制及构效关系尚未阐明，本章基于前期对显齿蛇葡萄粗黄酮(*crude ampelopsis grossedentata flavonoids*, CAGF)用乙醇进行梯度洗脱，得到 20%乙醇洗脱组分（CAGF-1）、40%乙醇洗脱组分（CAGF-2）、80%乙醇洗脱组分（CAGF-3），通过体外抗糖基化模型，对自由基清除能力、糖基化中间产物的抑制效果、蛋白糖氧化产物生成的抑制等多角度探究其活性机制。

### 4.2. 材料试剂与仪器设备

#### 4.2.1. 材料与试剂

表 4-1 主要化学试剂

Table 4-1 Main reagents used in the experiments

| 试剂名称   | 规格 | 生产厂家         |
|--------|----|--------------|
| 牛血清白蛋白 | BR | 上海源叶试剂有限公司   |
| 氨基胍盐酸盐 | AR | 国药集团化学试剂有限公司 |

| 试剂名称                     | 规格 | 生产厂家          |
|--------------------------|----|---------------|
| L(+)-抗坏血酸                | AR | 上海沪试实验室器材有限公司 |
| 葡萄糖                      | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| D-果糖                     | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 吉拉尔特试剂 T                 | BR | 上海阿拉丁生化科技有限公司 |
| 甲酸钠                      | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 氯化硝基四氮唑蓝                 | AR | 上海阿拉丁生化科技有限公司 |
| 过硫酸钾                     | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 无水乙醇                     | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 二甲基亚砷                    | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基 (DPPH)  | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 过氧化氢                     | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 水杨酸                      | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 硫酸亚铁                     | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 磷酸氢二钠                    | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |
| 磷酸二氢钠                    | AR | 国药集团化学试剂有限公司  |

#### 4.2.2. 仪器和设备

表 4-2 主要实验仪器

Table 4-2 Main instruments used in the experiments

| 仪器名称       | 型号         | 生产厂家                |
|------------|------------|---------------------|
| 电子天平       | HZK-FA110S | 华志电子科技有限公司          |
| 真空冷冻干燥机    | LGJ 型      | 北京松源华兴科技发展有限公司      |
| 旋转蒸发器      | RE52-AA    | 上海亚荣生化仪器厂           |
| 隔水式培养箱     | GHP-9080   | 沙鹰科学仪器上海有限公司        |
| 循环水多用真空泵   | SHB-3      | 郑州长城科工贸有限公司         |
| 荧光分光光度计    | F-7100 型   | 日本株式会社日立高新技术科学那珂事业所 |
| 离心机        | L600-A     | 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司     |
| 紫外-可见分光光度计 | UV755B     | 上海佑科仪器仪表有限公司        |
| 酶标仪        | 1510       | 赛默飞世尔仪器有限公司         |

#### 4.3. 试验方法

##### 4.3.1. 显齿蛇葡萄黄酮及不同洗脱组分抗氧化研究

### (1) 不同组分对 DPPH 自由基清除率

DPPH 自由基清除能力测定参照文献<sup>[86]</sup>进行修改。用无水乙醇配制 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液，要求现配现用。用 60%乙醇溶解黄酮作为待测样品溶液，分别取 2 mL DPPH 溶液和 0.5 mL 不同浓度的待测样品溶液，混合均匀后，于室温避光条件下静置 30 min，在 517 nm 波长下使用酶标仪测定吸光度，记为  $A_1$ ，空白对照则以无水乙醇替代 DPPH 溶液和样品进行反应，记作  $A_2$ ，对照记作  $A_0$ 。抑制率计算公式（4-1）所示：

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = 1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (4-1)$$

### (2) 不同组分对 ABTS 自由基清除能力测定

参考文献<sup>[87]</sup>进行修改，配制 7 mmol/L 的 ABTS 和 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液，取等量进行混合，避光反应 16 h 所得 ABTS 储备液。取一定体积的储备液，以蒸馏水稀释至在 734 nm 波长处吸光度为  $0.70 \pm 0.05$ ，配制为 ABTS 反应体系，该反应液需现配现用。取 2 mL 反应液与 1 mL 待测样品溶液混合，避光反应 6 min，在 734 nm 波长处测定吸光值记  $A_1$ ，空白记  $A_2$ ，对照记  $A_0$ 。测定 ABTS 自由基清除率公式参照公式（4-2）：

$$\text{ABTS 自由基清除率 (\%)} = 1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (4-2)$$

## 4.3.2. 体外抗糖基化模型构建

参考文献<sup>[88]</sup>并进行适当调整：使用磷酸盐缓冲液（100 mmol/L pH=7.4）配制浓度为 10 mg/mL 的 BSA 溶液，以及 0.5 mol/L 的葡萄糖溶液。取 1.2 mL 葡萄糖与 2.4 mL BSA 溶液，混合后加入 5 mL 的 EP 管中。同时，将 CAGF、CAGF-1、CAGF-2、CAGF-3 溶解于 DMSO，使终浓度达到 0.028、0.055、0.166、0.28 mg/mL（确保 DMSO 含量低于 1%）。以同质量浓度氨基胍盐酸盐（AG）作为阳性对照。样品在 50℃ 隔水式培养箱中孵育 36 h 后作为糖基化溶液。

## 4.3.3. 果糖胺抑制作用

参照 Sun 等<sup>[89]</sup>方法进行修改，用 100 mmol/L 的碳酸盐缓冲液（pH=10.1）配制 0.5 mmol/L 的 NBT 溶液，取 360  $\mu$ L NBT 溶液与 40  $\mu$ L 糖基化溶液混匀后，室温下避光孵育 15 min，反应后在 530 nm 处测定吸光值，计算抑制率见公式（4-

3) 所示:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (4-3)$$

式中:  $A_0$  为不添加黄酮样品/氨基胍的糖基化反应组吸光值,  $A$  为添加黄酮样品/氨基胍的糖基化反应组吸光值

#### 4.3.4. $\alpha$ -二羰基化合物抑制作用

参照 Zhang 等<sup>[90]</sup>方法进行修改, 0.4 mL 的糖基化物质与 0.2 mL 的吉拉尔特试剂 T 原液 (0.5 mol/L) 和 3.4 mL 甲酸钠 (0.5 mol/L pH=2.9), 室温下避光反应 1 h, 在 294 nm 测定, 计算抑制率参照公式 (4-3)。

#### 4.3.5. 晚期糖基化终末产物 AGEs 抑制作用

参照 Wu 等<sup>[91]</sup>方法并加以调整后, 在激发波长 370 nm、发射波长 440 nm 条件下测定荧光性 AGEs 的荧光强度。显齿蛇葡萄黄酮类化合物对 AGEs 的抑制率计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (4-4)$$

式中:  $A_0$  为对照组的荧光强度 (仅为葡萄糖-BSA 体系),  $A_1$  为实验组荧光强度 (添加不同浓度黄酮样品/氨基胍)。

#### 4.3.6. 显齿蛇葡萄黄酮不同洗脱组分对 BSA 荧光光谱的影响

参照 Zhao 等<sup>[92]</sup>方法将 BSA 溶液与不同洗脱组分的黄酮充分混合后, 采用荧光分光光度计进行扫描测定, 以获得荧光猝灭曲线。实验扫描参数如下: 设定激发波长为 280 nm, 仪器的电压调整至 600 V, 扫描速度控制在 1200 nm/min。荧光发射波长的扫描范围设定在 300-500 nm 之间, 狭缝宽度设定为 5 nm。本实验旨在探讨不同黄酮洗脱组分对 BSA 分子荧光特性的影响, 以进一步分析其相互作用机制。

#### 4.3.7. 蛋白质氧化产物的测定

参照文献<sup>[93]</sup>测定方法进行修改, 从 4.3.2 中取一定量的蛋白糖基化孵化液, 分别在激发波长/发射波长为 330/415、365/480 和 325/434 nm 的特征荧光条件下, 测定并计算二酪氨酸、犬尿氨酸和 N-甲酰犬尿氨酸的抑制率, 根据公式 (4-5)

来计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (4-5)$$

式中： $A_0$  为对照组的荧光强度（仅为葡萄糖-BSA 体系）， $A_1$  为实验组荧光强度（添加不同浓度黄酮样品/氨基胍）。

#### 4.4. 结果与分析

##### 4.4.1. 显齿蛇葡萄黄酮的抗氧化活性

##### (1) DPPH 自由基清除率测定

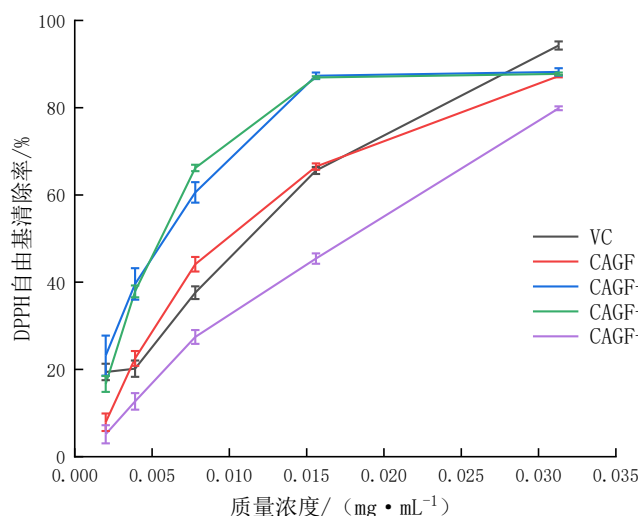


图 4-1 显齿蛇葡萄黄酮不同浓度乙醇洗脱组分对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.4-1 The scavenging effects of different fractions eluted with ethanol from *ampelopsis grossedentata* flavonoids on DPPH free radicals

DPPH 和 ABTS 是相对稳定的自由基化合物，已被广泛用于测试各种天然提取物的自由基清除活性。本实验测定了 CAGF、CAGF-1、CAGF-2、CAGF-3 对 DPPH 自由基的清除能力，并与抗坏血酸 (VC) 进行了对比。结果如图 4-1 所示，DPPH 自由基清除率随着样品质量浓度的增加而逐渐升高，但不同组分之间表现出一定差异。在低浓度范围内 (0.000–0.010 mg/mL)，各组分的 DPPH 清除率均呈快速上升趋势，其中 CAGF-2 组分的清除能力最强，CAGF-3 的清除能力最弱。在 0.010–0.020 mg/mL 时，CAGF-1、CAGF-2 的清除率已趋于稳定，达到 85% 以上，表明这些组分在一定浓度下可有效清除 DPPH 自由基。相对比，CAGF-3 的清除率虽然随浓度增加而上升，但整体水平低于其他组分，说明其抗氧化能力相对较弱。综合来看，显齿蛇葡萄黄酮的不同洗脱组分均具有一定的抗氧化活性，

其中 CAGF-2 表现出最佳的 DPPH 自由基清除能力, 接近 VC, 能有效的减少非酶糖基化过程中的氧化反应。

## (2) ABTS 自由基清除率测定

本研究采用 ABTS 自由基清除试验, 评估 CAGF、CAGF-1、CAGF-2、CAGF-3 的抗氧化活性, 并与 VC 进行对比。如图 4-2 所示, 各样品对 ABTS 自由基的清除率均呈现随质量浓度增加而上升的趋势, 不同洗脱组分在清除效果上存在差异。在低浓度范围内, 各样品的 ABTS 自由基清除率均迅速上升, CAGF-2 和 CAGF-1 的清除能力较强, 超过 VC; 随着浓度进一步升高, 在浓度为 0.004 mg/mL 时, CAGF、CAGF-1 和 CAGF-2 的清除率均趋于稳定并达到了 99.9% 以上, 显示出较强的抗氧化能力, 表明这些组分在较低浓度下即可有效清除 ABTS 自由基。相对比, CAGF-3 的清除率仍然略低于其他组分, 但随着浓度增加, 其清除能力也明显提升。综上所述, 显齿蛇葡萄黄酮及其不同洗脱组分均具有显著的 ABTS 自由基清除能力。

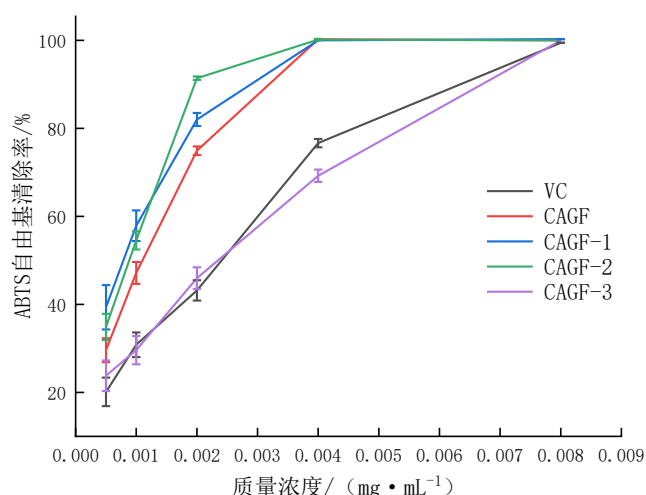


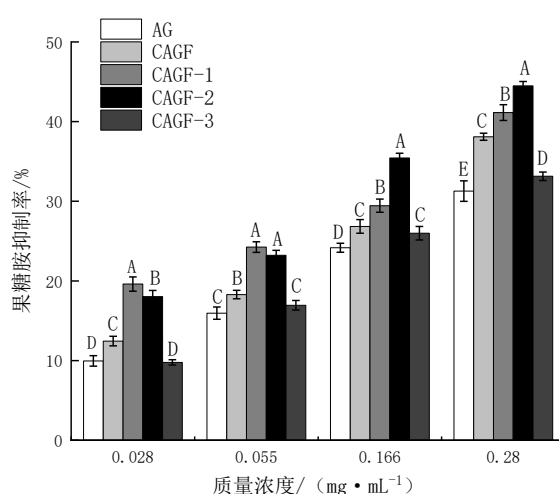
图 4-2 显齿蛇葡萄黄酮不同浓度乙醇洗脱组分对 ABTS 自由基的清除作用

Fig.4-2 The scavenging effects of different fractions eluted with ethanol from *ampelopsis grossedentata* flavonoids on ABTS free radicals

### 4.4.2. 对果糖胺的抑制

果糖胺是非酶糖基化的早期产物, 形成 Schiff 碱后经 Amadori 重排稳定为酮胺结构, 这一过程不仅是糖基化反应的起点, 也为 AGEs 的形成奠定了基础, 在糖尿病及其并发症的病理机制中具有重要作用<sup>[94]</sup>。图 4-3 反映了各种洗脱组分对早期糖基化产物的抑制作用。在一定浓度范围内 (0.028-0.28 mg/mL), 随着显齿

蛇葡萄黄酮各洗脱组分浓度的增大，果糖胺抑制率升高，当质量浓度为 0.028 mg/mL 时，CAGF-1 和 CAGF-2 对果糖胺的抑制作用较弱，抑制率为 19.61%和 18.03%，当浓度达到 0.28 mg/mL 时，CAGF-1 和 CAGF-2 对果糖胺的抑制率可达 41.13%和 44.5%，显齿蛇葡萄黄酮各洗脱组分对果糖胺的抑制作用强于阳性对照 AG，AG 在最大浓度时抑制率为 31.28%。马思佳<sup>[95]</sup>研究表明，相同浓度的芦丁和槲皮素也比 AG 对果糖胺的抑制效果强，与本研究结果一致。这表明黄酮各洗脱组分对非酶糖基化早期阶段起到了抑制作用，这种作用可能与黄酮的抗氧化能力有关，而自由基往往在糖基化反应的早期阶段产生，因此对果糖胺的抑制作用影响很大。



注：字母不同表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ) (下同)

图 4-3 显齿蛇葡萄黄酮不同浓度乙醇洗脱组分对果糖胺的抑制

Fig.4-3 Inhibitory activity of different fractions eluted with ethanol from *ampelopsis grossedentata* flavonoids on fructosamine

#### 4.4.3. $\alpha$ -二羰基化合物的抑制

$\alpha$ -二羰基化合物是在美拉德反应中级阶段生成的一类关键中间体，是高活性的羰基中间体，可直接作用于蛋白质的游离氨基，诱导蛋白质交联生成 AGEs<sup>[96]</sup>。如图 4-4 所示，显齿蛇葡萄黄酮各洗脱组分均以浓度依赖性的方式抑制二羰基化合物的形成，且抑制率随浓度的升高而增大。当浓度为 0.028 mg/mL 时，CAGF-2 对二羰基化合物的抑制率为 29.11%，当浓度增至 0.28 mg/mL 时，CAGF-2 的抑制率最高，可达 69.25%，高于相同浓度的 AG。此结果表明，黄酮化合物在抑制非酶糖基化中期阶段起着核心作用，这可能与它们具有较强的活性羰基清除能力有关。

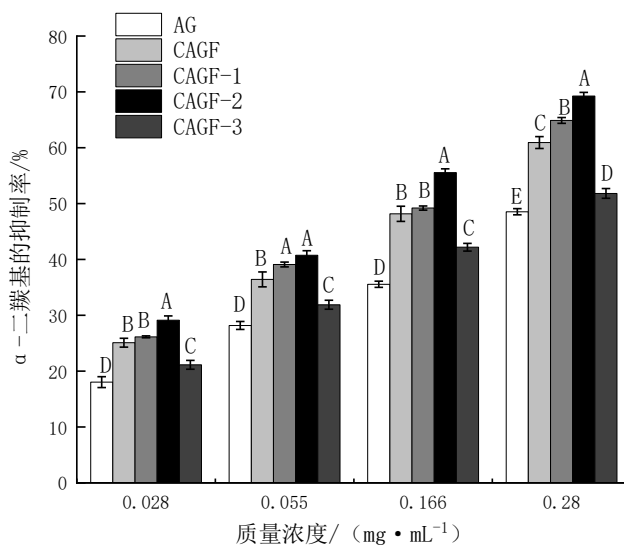


图 4-4 显齿蛇葡萄黄酮的不同洗脱组分对  $\alpha$ -二羰基化合物的抑制

Fig.4-4 Inhibitory activity of different fractions eluted with ethanol from *ampelopsis grossedentata* flavonoids on  $\alpha$ -dicarbonyl compounds

#### 4. 4. 4. 对晚期糖基化终末产物 AGEs 的抑制

AGEs 是机体内因糖基化反应而产生的一大类化合物，过量的 AGEs 会导致蛋白质变性、细胞炎症和氧化应激等问题。抑制糖基化终末产物（AGEs）不仅能够延缓蛋白质交联导致的衰老进程，还可减轻炎症和氧化应激，进而降低糖尿病并发症、心血管疾病等慢性病的风险，对维持组织功能和整体健康具有重要的保护作用<sup>[97,98]</sup>。由图 4-5 可知，抗糖基化效果依次是 CAGF-2 > CAGF-1 > CAGF-3。不同洗脱组分对 AGEs 的抑制程度随质量浓度的增加呈正相关，不同洗脱组分抗糖基化效果存在一定差异，这与不同洗脱组分黄酮成分种类不同有关。CAGF-2 组分主要含有二氢杨梅素、花旗松素、芦丁及较高含量的杨梅素，这与文献<sup>[99]</sup>所报道的杨梅素具有较强的 AGEs 抑制活性相吻合。CAGF-1 组分主要含有二氢杨梅素和少量杨梅素，二氢杨梅素也有一定的抑制 AGEs 作用<sup>[100]</sup>。CAGF-3 组分含有槲皮素和山奈酚，与 Huang 等<sup>[101]</sup>发现槲皮素对 AGEs 具有一定的抑制作用一致。在相同质量浓度下，显齿蛇葡萄黄酮各洗脱组分对 AGEs 抑制能力强于其在早期和中期阶段的作用，这表明黄酮各洗脱组分通过阻断蛋白交联来抑制 AGEs 的最终作用，此外，这种现象的形成也可能是由于各黄酮组分在 AGE 前体还原的早中期起到了抑制作用，与 Zhou 等<sup>[102]</sup>研究结果相似。

DPPH、ABTS 自由基清除表明显齿蛇葡萄黄酮的不同洗脱组分均具有较强

的抗氧化能力。细胞在代谢过程中会产生大量自由基，过多自由基的积累会引起蛋白质氧化，诱导糖基化反应，促进 AGEs 的生成，加剧机体的氧化应激状态<sup>[103]</sup>。显齿蛇葡萄黄酮相关物质可以清除细胞内过多的自由基，阻碍糖基化反应，从而降低果糖胺、 $\alpha$ -二羰基、AGEs 的形成<sup>[104]</sup>。Miroliaei 等<sup>[105]</sup>研究发现柠檬香蜂草提取物具有抗糖基化特性，其抗 AGEs 作用与其抗氧化活性相一致，表明两者在生理机制上可能存在一定关联，尤其是通过清除自由基间接减少 AGEs 生成的可能性，为后续产品开发提供理论依据。

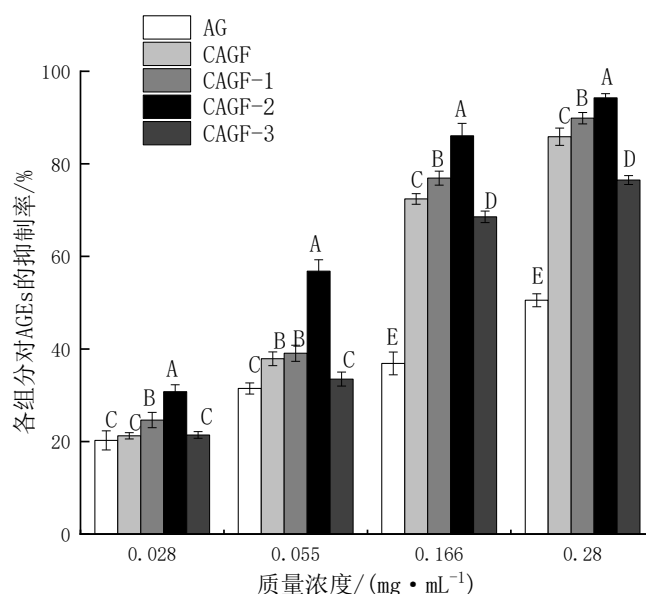
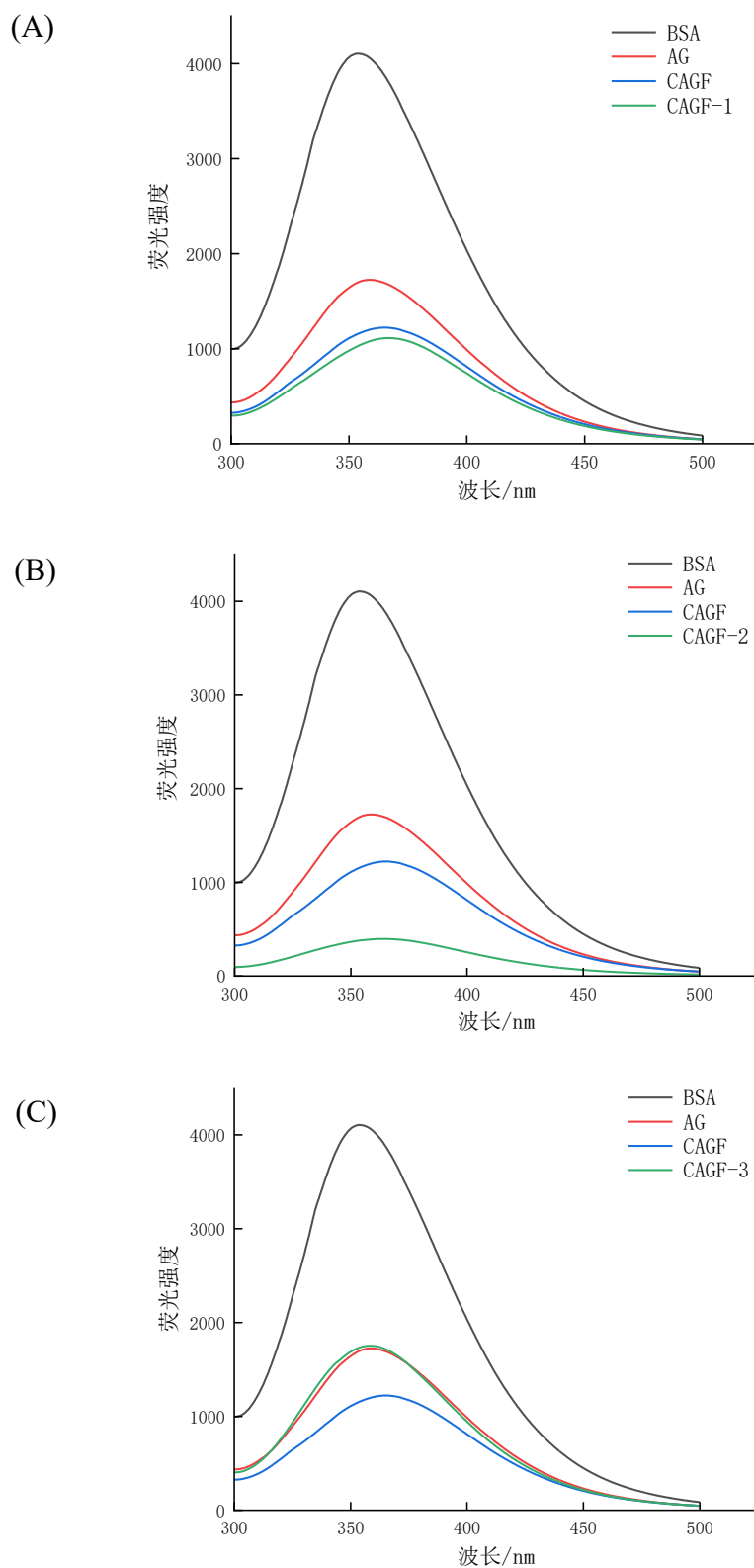


图 4-5 显齿蛇葡萄黄酮不同洗脱组分对 AGEs 的抑制作用

Fig.4-5 Inhibitory activity of different fractions eluted with ethanol from *ampelopsis grossedentata* flavonoids on AGEs.

#### 4.4.5. 不同洗脱组分对晚期末端产物抑制效果的荧光光谱对比

如图 4-6 所示，BSA 在 353.8 nm 处有特征性荧光峰，加入 CAGF-1、CAGF-2、CAGF-3 后，BSA 的荧光强度均下降且伴随红移现象，CAGF-1、CAGF-2、CAGF-3 的发射波长分别从 353.8 nm 红移至 366.6 nm、363.4 nm、358.6 nm，与阳性对照 AG 和阴性对照显齿蛇葡萄黄酮粗提物 CAGF 形成对比。这一结果表明，各黄酮组分与 BSA 发生结合，保护蛋白质的构象，可能通过疏水作用或氢键诱导是色氨酸和酪氨酸残基微环境改变，导致荧光猝灭，黄酮组分的荧光猝灭效应与其抗氧化活性及羰基捕获能力密切相关<sup>[106]</sup>。



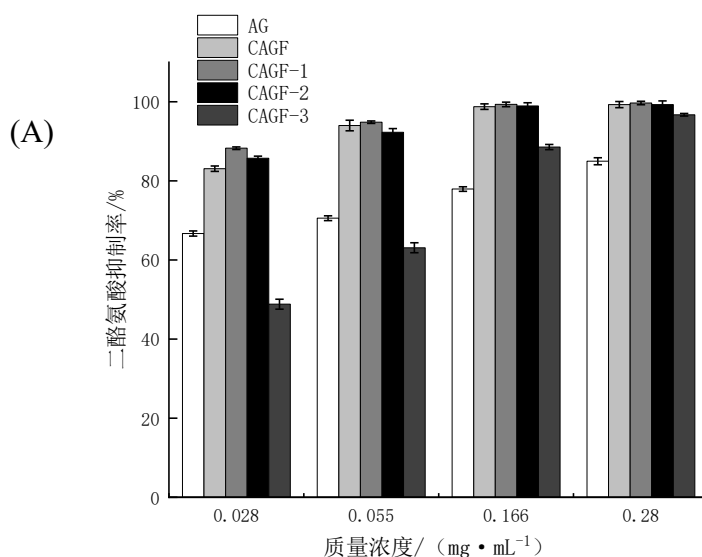
A-20%乙醇洗脱组分 (CAGF-1) B-40%乙醇洗脱组分 (CAGF-2) C-80%乙醇洗脱组分 (CAGF-3)

图 4-6 显齿蛇葡萄黄酮不同洗脱组分对 AGEs 抑制效果的荧光光谱图对比

Fig.4-6 Comparative analysis of fluorescence spectra of AGEs treated with different fractions eluted with ethanol from *ampelopsis grossedentata* flavonoids

#### 4.4.6. 各组分对蛋白质氧化产物含量的影响

蛋白质糖基化反应与氧化反应常协同发生,其氧化产物的积累可作为糖基化进程的关键生物标志物<sup>[107]</sup>。二酪氨酸、N-甲酰基犬尿氨酸和犬尿氨酸等蛋白氧化产物可以反映蛋白质糖基化的程度。实验结果如图 4-7。在 0.28 mg/mL 浓度下, CAGF、CAGF-1、CAGF-2 对二酪氨酸、N-甲酰基犬尿氨酸的抑制率均达到了 99%以上, CAGF-3 抑制率达到 90%以上, 均高于阳性对照 AG; CAGF-1 对犬尿氨酸的抑制率最高, 最大抑制率为 88.16%, CAGF-2 次之, 为 86.81%, 均高于 AG, AG 抑制率为 56.75%, 但 CAGF-3 抑制能力弱于 AG, 抑制率为 22.93%。BSA 的氨基酸组成中, 色氨酸残基有 2 个, 酪氨酸残基有 21 个, 蛋白中色氨酸残基被修饰为二酪氨酸和 N-甲酰基犬尿氨酸, 酪氨酸残基易被修饰为犬尿氨酸, 因此会有更多的酪氨酸被糖氧化为犬尿氨酸, 导致蛋白糖氧化产物中犬尿氨酸的含量较高, 因此不同黄酮洗脱组分和 AG 对犬尿氨酸的相对抑制率低于二酪氨酸和 N-甲酰基犬尿氨酸。综上所述, 显齿蛇葡萄黄酮不同洗脱组分对糖基化体系中蛋白糖氧化产物生成具有抑制作用。



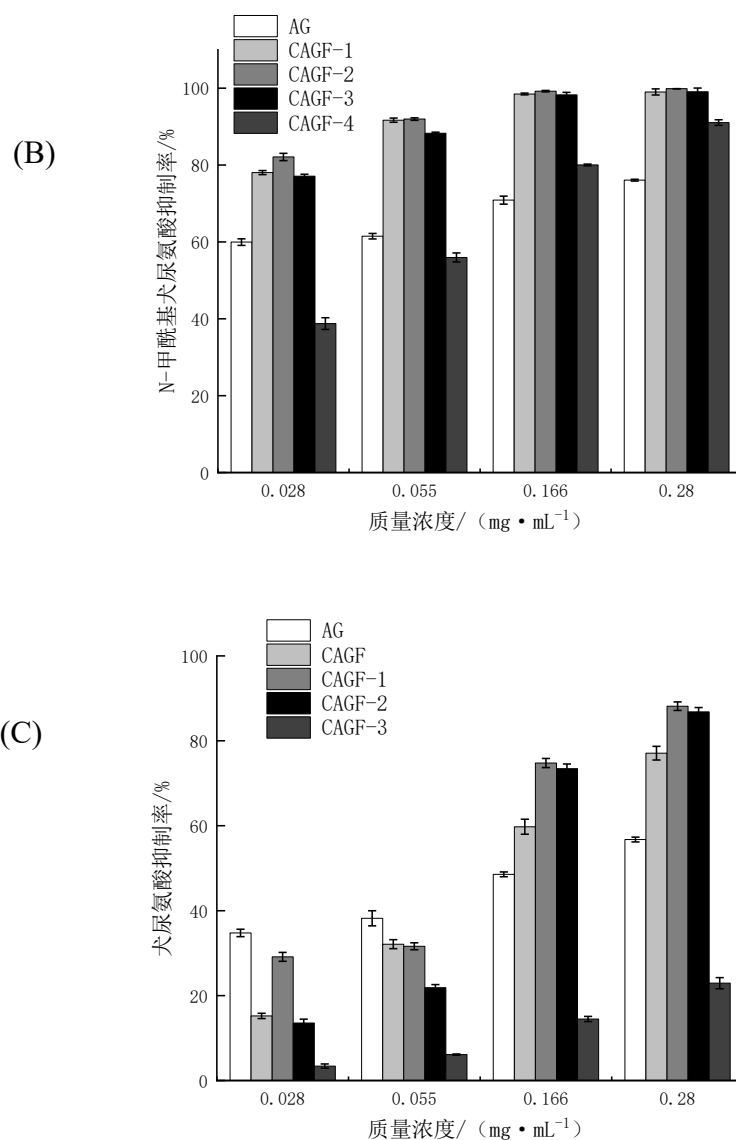


图 4-7 显齿蛇葡萄黄酮不同洗脱组分对蛋白糖氧化产物生成的抑制作用

Fig.4-7 Inhibitory activity of different fractions eluted with ethanol from *ampelopsis grossedentata* flavonoids on the formation of protein glycoxidation products.

#### 4.5. 本章总结

本章通过构建体外抗糖基化模型，系统探究了显齿蛇葡萄黄酮不同洗脱组分 CAGF-1、CAGF-2、CAGF-3 对糖基化反应的多阶段干预作用。实验表明，在样品浓度为 0.015 mg/mL 时，CAGF-1、CAGF-2 对 DPPH 自由基清除率达到 85% 以上，在样品浓度为 0.004 mg/mL 时，CAGF、CAGF-1 和 CAGF-2 的清除率均趋于稳定并达到了 99.9% 以上，可有效清除糖氧化初期产生的活性氧。可抑制糖基化反应前期产物果糖胺、 $\alpha$ -二羰基化合物的生成，对糖基化终末产物 AGEs 的

抑制活性强弱依次是 CAGF-2 > CAGF-1 > CAGF-3。显齿蛇葡萄黄酮不同洗脱组分对糖基化体系中蛋白糖氧化产物生成均具有抑制作用，且通过荧光光谱分析证实其与 BSA 结合后，荧光峰发生红移，通过疏水作用或氢键诱导是色氨酸和酪氨酸残基微环境改变，导致荧光猝灭。综上，显齿蛇葡萄黄酮尤其是 CAGF-2 组分，可通过“抗氧化-捕获中间体-抑制终产物”多靶点协同作用，有效干预糖基化进程，为天然抗糖基化功能成分的开发提供了理论依据。后续需结合分子对接及动物模型深入解析其构效关系及体内活性。

本研究虽然初步明确了不同洗脱组分的抗氧化与抗糖基化能力及其关联性，但仍存在一定局限性：一方面未对各组分的具体单体成分及其结构特征与活性之间的关系作深入剖析，其次抑制 AGEs 生成的具体靶点及路径尚不明确。因此，后续研究可进一步开展成分分离与结构鉴定，结合分子机制探讨关键黄酮单体在不同糖基化阶段的干预作用，从而为高效抗糖基化天然产物的筛选与开发提供更有力的理论依据。

## 第5章 研究结论与展望

### 5.1. 研究总结

本研究围绕显齿蛇葡萄黄酮的提取、分离纯化及其抗糖基化活性进行了系统而深入的探讨。对显齿蛇葡萄黄酮提取先进行单因素实验，又在单因素实验基础上进行响应面优化，来确定显齿蛇葡萄黄酮提取的最佳条件。采用 D101 大孔树脂对显齿蛇葡萄黄酮进行纯化，筛选出 D101 大孔树脂静态吸附-解吸的最佳条件，以此来确定动态吸附-解吸的最优条件，进而确定了最佳纯化工艺。并用不同体积分数的乙醇进行梯度洗脱，得到了 3 个洗脱组分，通过高效液相色谱对各组分进行成分鉴定，并考察了这 3 个组分抗氧化、抗糖基化的活性，得到的主要结论如下：

(1) 显齿蛇葡萄黄酮的提取条件优化研究中，通过单因素实验和响应面分析，对提取剂的选择、提取剂浓度、料液比、提取时间和提取温度进行了系统优化。实验结果显示，提取剂浓度为 69%、料液比为 1: 28 g/mL、提取时间为 35 min、提取温度为 66.5℃，在此最优条件下经 3 次平行试验实际黄酮得率为  $96.52 \pm 0.66$  mg/g。

(2) 通过吸附和解吸试验筛选出 D101 树脂较适合显齿蛇葡萄黄酮的分离纯化，静态吸附 150 min，解吸时间为 120 min，黄酮浓度为 7.5 mg/mL，pH 为 2.0 左右，上样液流速 1.6 mL/min。用体积分数 80%乙醇在流速为 1.6 mL/min 时进行洗脱，此时黄酮回收率为 69.12%，黄酮纯度由 40.7%提升到 90.6%，纯度提高 2.23 倍。

(3) 称取黄酮各个标准品，并用甲醇制备成浓度为 1 mg/mL 的标准单溶液。分别测定各标准品的出峰时间，随后从标准溶液中各取一部分混合，于 280 nm 紫外检测条件下进行 HPLC 检测。20%乙醇洗脱组分主要富含二氢杨梅素及少量杨梅素；40%乙醇洗脱组分含有二氢杨梅素、花旗松素、芦丁及较高含量的杨梅素；80%乙醇洗脱组分则以槲皮素和山奈酚为主要成分。

(4) 比较了 20%乙醇洗脱组分、40%乙醇洗脱组分和 80%乙醇洗脱组分抗氧化、抗糖基化活性。发现不同洗脱组分抗氧化抗糖基化的抑制效果随着质量浓度的增加呈现出明显的浓度依赖性。40%乙醇洗脱组分具有最强的抗糖基化活性，

在质量浓度为 0.28 mg/mL 时, 40%乙醇洗脱组分对 AGEs 的抑制率可达 94.27%, 表现出极强的抗 AGEs 活性。其他组分也均高于阳性对照 AG, AG 仅为 50.53%。

(5) 这些结果表明, 不同洗脱组分在抑制抗糖基化方面存在一定差异, 尤其是 CAGF-2 显示出极强的潜力, 该组分含有二氢杨梅素、花旗松素、芦丁和较高杨梅素, 为进一步研究高效抗糖基化物质奠定了基础。

## 5.2. 研究展望

虽然本研究已取得了初步成果, 但在实际应用和机制解析方面仍存在一些待解决的问题, 未来的研究工作可以从以下几个方面进一步深入:

(1) 本实验在大孔树脂分离纯化技术的研究上, 引入高效液相色谱(HPLC)、初步鉴定了不同洗脱组分中的黄酮类别和定量分析, 但对黄酮进行更精细的分离还需要借助制备型高效液相色谱(Preparative HPLC)来实现。通过单体黄酮成分的分离, 不仅能更准确地评估各单体的生物活性, 还可为后续的结构-活性关系研究提供充分的数据支持。

(2) 当前体外实验已证实显齿蛇葡萄黄酮具有抗糖基化活性, 但其具体分子机制尚未完全阐明。未来应进一步利用细胞模型、动物实验以及分子生物学技术, 探讨黄酮对糖基化相关关键酶(如醛糖还原酶、葡萄糖氧化酶等)的调控作用, 并结合分子对接、蛋白组学和信号通路分析, 揭示其在调控氧化应激、炎症反应及代谢调控中的内在机制。

(3) 为确保显齿蛇葡萄黄酮在实际应用中的效果和安全性, 未来需要开展系统的动物实验和临床前研究, 详细评估其体内吸收、分布、代谢和排泄特性, 并通过长期服用试验确认其安全性。此外, 可研究其在预防糖尿病、延缓衰老、保护肝脏等方面的作用, 为临床应用提供更好的数据支持。

(4) 为了更全面地理解显齿蛇葡萄黄酮的生物功能和应用前景, 未来研究可加强与材料科学、纳米技术和药物递送系统等领域的跨学科合作。通过构建新型载体系统或复合材料, 不仅有助于提高黄酮的生物利用度, 还可实现其在特定靶向疾病中的精准治疗应用。

总之, 本论文通过对显齿蛇葡萄黄酮从提取到功能验证的系统研究, 揭示了其在抗糖基化及抗氧化方面的巨大潜力, 并为其在健康领域的进一步开发提供了

坚实的科学基础。未来，随着提取、分离、纯化技术的不断改进和抗糖基化机制的深入解析，显齿蛇葡萄黄酮有望在食品、保健品和医药领域发挥更大的作用。

## 参考文献

- [1] 冯淳, 焦思棋, 余正文. 显齿蛇葡萄中黄酮类化合物的研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(20): 2871-2875.
- [2] Wu R, Li X, Cao Y, etc. China medicinal plants of the ampelopsis grossedentata—a review of their botanical characteristics, use, phytochemistry, active pharmacological components, and toxicology[J]. Molecules, 2023, 28(20): 7145.
- [3] 贺奥城, 郎一帆, 黄智超, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的显齿蛇葡萄化学成分分析[J]. 中药材, 2024,(08): 1986-1994.
- [4] 凌伟红, 陈燕, 冯淼, 等. 不同产地显齿蛇葡萄以及近缘种指纹图谱的建立及有效成分分析[J]. 中草药, 2023, 54(17): 5725-5733.
- [5] 潘佳妮, 洪侃, 于雷雷, 等. 藤茶多酚对小鼠衰老过程中骨质代谢及肠道菌群的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(04): 46-53.
- [6] 张朝阳, 陈芳, 黄忠浩, 等. 不同冲泡时间和次数对藤茶活性成分的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2024, 55(05): 767-773.
- [7] 胡百顺, 刘瑶, 杜兴媛, 等. 不同采收期和发育阶段的藤茶品质分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(03): 304-312.
- [8] Li X, Li B, Meng X, etc. Integrating Network Pharmacology and Experimental Validation to Reveal the Mechanism of Vine Grape Tea Polyphenols on Hyperuricemia-Induced Renal Injury in Mice[J]. Journal of Medicinal Food, 2024, 27(4): 312-329.
- [9] 徐静宜, 陈胜, 谭烨, 等. 响应面-主成分分析法优化大曲发酵藤茶工艺[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(01): 109-115.
- [10] 孙晓媛. 藤茶及其主要成分双氢杨梅素对慢性睡眠剥夺小鼠学习记忆能力的改善作用与机制初探[D]. 北京协和医学院, 2020.
- [11] 邵子键, 王艳华, 董婷婷. 天然甾体皂苷的体内抗肿瘤活性[J]. 国外医药(抗生素分册), 2022, 43(06): 368-374.
- [12] Carneiro R C, Wang H, Duncan S E, etc. Flavor compounds in vine tea

- (*Ampelopsis grossedentata*) infusions[J]. Food science & nutrition, 2020, 8(8): 4505-4511.
- [13] 张锦程, 余佶, 麻成金, 等. GC-MS结合ROAV分析评价加工工艺对藤茶香气成分的影响[J]. 食品与机械, 2021, 37(12): 20-25.
- [14] 张典典, 高家东, 戴彰言, 等. 藤茶的食用历史及安全性[J]. 现代食品科技, 2024, 40(07): 363-368.
- [15] Qiu P, Mi A, Hong C, etc. An integrated network pharmacology approach reveals that *Ampelopsis grossedentata* improves alcoholic liver disease via TLR4/NF- $\kappa$ B/MLKL pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155658.
- [16] 罗祖友, 付晓芳, 吴谋成. 藤茶的研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(08): 513-517.
- [17] 郭海姣, 刘云, 刘进宝, 等. 藤茶的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(08): 2595-2601.
- [18] 王晨晨, 李亚军, 马萃, 等. 播期对超早熟谷子产量和品质的影响[J]. 生态学杂志: 1-9.
- [19] 郑美瑜, 高浦, 陆胜民, 等. 椴柑皮中糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的同步提取与纯化[J]. 中国食品学报, 2025, 25(1): 221-227.
- [20] 许钢, 张虹, 胡剑. 竹叶中黄酮提取方法的研究[J]. 分析化学, 2000,(07): 857-859.
- [21] Wen C, Zhang J, Zhang H, etc. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review[J]. Ultrasonics sonochemistry, 2018, 48: 538-549.
- [22] Zhang H, Wang X, He D, etc. Optimization of flavonoid extraction from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge flowers, and the antioxidant and antibacterial capacity of the extract[J]. Molecules, 2022, 27(1): 113.
- [23] Jing C, Dong X, Tong J. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoid compounds and antioxidants from alfalfa using response surface method[J]. Molecules, 2015, 20(9): 15550-15571.
- [24] Yang R, Geng L, Lu H, etc. Ultrasound-synergized electrostatic field extraction

- p>of total flavonoids from
- Hemerocallis citrina baroni*
- [J].
- Ultrasonics Sonochemistry*
- , 2017, 34: 571-579.
- [25] 周建新, 赵莎, 杜杰, 等. 金荞麦中黄酮类成分提取工艺和生物活性研究进展[J]. *中国现代中药*, 27(3): 586-592.
- [26] Niu Q, Gao Y, Liu P. Optimization of microwave-assisted extraction, antioxidant capacity, and characterization of total flavonoids from the leaves of *Alpinia oxyphylla* Miq.[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2020, 50(1): 82-90.
- [27] 张琪婧, 耿振甲, 李敏, 等. 覆盆子总黄酮的酶辅助闪式提取及其抗氧化、降血糖和降血脂活性分析[J]. *粮食与油脂*, 2025, 38(01): 115-120.
- [28] 董新艳, 林胡敏, 吴孙杜, 等. 超临界CO<sub>2</sub>提取绿萝花中总黄酮的工艺研究[J]. *应用化工*, 2017, 46(01): 1-3.
- [29] Liu J, Lin S, Wang Z, etc. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Maydis stigma* and its nitrite-scavenging ability[J]. *Food and bioproducts processing*, 2011, 89(4): 333-339.
- [30] 李嫚, 朱鑫, 曾华辉, 等. 离子液体提取中药有效成分的研究进展[J]. *世界中医药*, 2023, 18(17): 2541-2547.
- [31] 赫丁轩, 刁婷婷, 张少军, 等. 艾叶黄酮的超声辅助离子液体提取及抗氧化、降血糖活性[J]. *精细化工*, 2024, 41(09): 1978-1986.
- [32] 王知斌, 祝文博, 陈亚军, 等. 膜荚黄芪叶黄酮类成分的研究[J]. *中成药*, 2017, 39(08): 1634-1638.
- [33] 许将, 范康梅, 钱俊青. 制备色谱分离竹叶黄酮中异荭草苷和荭草苷[J]. *中草药*, 2014, 45(15): 2184-2188.
- [34] 魏德舒, 孙延平, 王知斌, 等. 黄芪中黄酮类成分提取分离的研究进展[J]. *化学工程师*, 2024, 38(12): 58-62.
- [35] Aljawarneh R Y A, Che Zain M S, Zakaria F. Macroporous polymeric resin for the purification of flavonoids from medicinal plants: A review[J]. *Journal of Separation Science*, 2024, 47(15): 2400372.
- [36] Zhang L, Wu T, Xiao W, etc. Enrichment and purification of total ginkgo

- p>flavonoid O-glycosides from Ginkgo biloba extract with macroporous resin and evaluation of anti-inflammation activities in vitro[J].
- Molecules*
- , 2018, 23(5): 1167.
- [37] 翟连林, 赵静, 党丽娟. 响应面法优化凉粉草总黄酮纯化工艺及其成分分析与抗运动性疲劳作用研究[J]. *粮食与油脂*, 2024, 37(11): 123-129.
- [38] Lin X, Wu J, Jin X, etc. Selective separation of biobutanol from acetone – butanol – ethanol fermentation broth by means of sorption methodology based on a novel macroporous resin[J]. *Biotechnology progress*, 2012, 28(4): 962-972.
- [39] 林华婷, 吕峰, 黄国钞, 等. 金属络合法纯化鼠曲草类黄酮工艺[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(04): 116-122.
- [40] 欧阳玉祝, 朱露, 李雪峰. 响应面优化葛根总黄酮的钙离子沉淀分离工艺[J]. *食品科学*, 2014, 35(04): 35-38.
- [41] 范敬宜. 牡丹黄酮的膜法提纯及其美白活性研究[D]. 北京化工大学, 2020.
- [42] 顾天宇, 陈献富, 王思琪, 等. 膜技术在杜仲有效成分分离纯化中的应用研究进展[J]. *化工学报*, 2024, 75(11): 4005-4019.
- [43] Dias M C, Pinto D C, Silva A M. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity[J]. *Molecules*, 2021, 26(17): 5377.
- [44] Li Y, Liang H, Zhou D, etc. Phenolics, flavonoids content and antioxidant activities of Tuber indicum at different maturity stages[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2022, 19(3): e202100830.
- [45] Kamiyama M, Shibamoto T. Flavonoids with potent antioxidant activity found in young green barley leaves[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2012, 60(25): 6260-6267.
- [46] Zhang X, Wang X, Wang M, etc. Effects of different pretreatments on flavonoids and antioxidant activity of Dryopteris erythrosora leave[J]. *PloS one*, 2019, 14(1): e200174.
- [47] Górniak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids[J]. *Phytochemistry reviews*, 2019, 18: 241-272.

- 
- [48] Lalani S, Poh C L. Flavonoids as antiviral agents for enterovirus A71 (EV-A71)[J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 184.
  - [49] Xu X, Zhou X D, Wu C D. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing gtf genes[J]. *Archives of oral biology*, 2012, 57(6): 678-683.
  - [50] Wu W, Li R, Li X, etc. Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry[J]. *Viruses*, 2015, 8(1): 6.
  - [51] Zhang P, Fan L, Zhang D, etc. In Vitro Anti-tumor and Hypoglycemic effects of total flavonoids from Willow buds[J]. *Molecules*, 2023, 28(22): 7557.
  - [52] Jiang M, Zhu M, Wang L, etc. Anti-tumor effects and associated molecular mechanisms of myricetin[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 120: 109506.
  - [53] Wang G, Wang J, Guan R. Novel phospholipid-based labrasol nanomicelles loaded flavonoids for oral delivery with enhanced penetration and anti-brain tumor efficiency[J]. *Current Drug Delivery*, 2020, 17(3): 229-245.
  - [54] Wu C, Yen G. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53(8): 3167-3173.
  - [55] Matsuda H, Wang T, Managi H, etc. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities[J]. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2003, 11(24): 5317-5323.
  - [56] Ronsisvalle S, Panarello F, Longhitano G, etc. Natural flavones and flavonols: Relationships among antioxidant activity, glycation, and metalloproteinase inhibition[J]. *Cosmetics*, 2020, 7(3): 71.
  - [57] Suzuki R, Okada Y, Okuyama T. A new flavone C-glycoside from the style of *Zea mays* L. with glycation inhibitory activity[J]. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 2003, 51(10): 1186-1188.
  - [58] Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?[J]. *Comptes rendus biologies*, 2004, 327(7): 649-662.

- 
- [59] Mohammadpour A, Sadeghi M, Miroliaei M. Role of structural Peculiarities of flavonoids in Suppressing AGEs generated from HSA/Glucose System[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2024, 196(9): 6296-6314.
  - [60] Gutierrez R M P, Velazquez E G. Glucopyranoside flavonoids isolated from leaves of *Spinacia oleracea* (spinach) inhibit the formation of advanced glycation end products (AGEs) and aldose reductase activity (RLAR)[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 128: 110299.
  - [61] Li T, Yang Y, Wang X, etc. Flavonoids derived from buckwheat hull can break advanced glycation end-products and improve diabetic nephropathy[J]. *Food & Function*, 2021, 12(16): 7161-7170.
  - [62] Zhang R, Zhang H, Shi H, etc. Strategic developments in the drug delivery of natural product dihydromyricetin: Applications, prospects, and challenges[J]. *Drug Delivery*, 2022, 29(1): 3052-3070.
  - [63] Zhang Q, Zhao Y, Zhang M, etc. Recent advances in research on vine tea, a potential and functional herbal tea with dihydromyricetin and myricetin as major bioactive compounds[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2021, 11(5): 555-563.
  - [64] Chen J, Li M, Gao Q, etc. Dihydromyricetin, a flavonoid from vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) provides hepatoprotection by modulating gut microbiota-mediated bile acid homeostasis[J]. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2024, 18: 101376.
  - [65] Carneiro R C, Ye L, Baek N, etc. Vine tea (*Ampelopsis grossedentata*): A review of chemical composition, functional properties, and potential food applications[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 76: 104317.
  - [66] 王令智, 陈平, 郭振华, 等. 响应面优化超声辅助提取淫羊藿总黄酮工艺及抗氧化活性研究[J]. *饲料研究*, 2(4): 92-97.
  - [67] Tzanova M, Atanasov V, Yaneva Z, etc. Selectivity of current extraction techniques for flavonoids from plant materials[J]. *Processes*, 2020, 8(10): 1222.
  - [68] Rashid R, Wani S M, Manzoor S, etc. Green extraction of bioactive compounds

- from apple pomace by ultrasound assisted natural deep eutectic solvent extraction: Optimisation, comparison and bioactivity[J]. *Food Chemistry*, 2023, 398: 133871.
- [69] Ju X, Chen T, Ding Y, etc. Effects of Rhizopus-arrhizus-31-Assisted Pretreatment on the Extraction and Bioactivity of Total Flavonoids from *Hibiscus manihot* L.[J]. *Molecules*, 2024, 29(5): 1046.
- [70] 吕健, 巩继贤, 徐绚绚, 等. 罗布麻黄酮提取及纯化方法研究进展[J]. *针织工业*, 2024,(10): 81-86.
- [71] 邱志. 洋甘菊总黄酮的提取、分离及其护肤功效研究[D]. 华南理工大学, 2023.
- [72] 张宏民, 龙雯, 劳筱清, 等. 大孔吸附树脂分离纯化桃树根总黄酮工艺优化[J]. *中成药*, 2024, 46(11): 3759-3763.
- [73] Wang T, Wang W, Shi Z, etc. Enrichment, Antioxidant and Enzyme Inhibition Activities of Flavonoids from *Artemisia Selengensis* Turcz.[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2024, 22(10): e202401835.
- [74] Zhang X, Geng A, Cao D, etc. Identification of mulberry leaf flavonoids and evaluating their protective effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in equine skeletal muscle satellite cells[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2024, 11: 1-12.
- [75] 朱延胜, 魏明, 钱森和, 等. 紫山药多酚分离纯化及其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(16): 182-187.
- [76] Zheng S, Ma Z, Han H, etc. Post-column mobile phase adjustment: a strategy to eliminate the contradiction between liquid chromatography and mass spectrometry in the determination of flavonoids in rat plasma[J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2014, 95: 176-183.
- [77] Yang Y, Liang Q, Zhang B, etc. Adsorption and desorption characteristics of flavonoids from white tea using macroporous adsorption resin[J]. *Journal of Chromatography A*, 2024, 1715: 464621.
- [78] Zhu J, Cao X, Li J. Ethanol-induced aggregation of nonpolar nanoparticles in

- water/ethanol mixed solvents[J]. *Langmuir*, 2022, 38(45): 13910-13915.
- [79] 孙嘉莉, 江峻峰, 牟晓娟, 等. 沙棘果皮渣总黄酮的纯化、成分分析及对胰脂肪酶的抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(19): 206-215.
- [80] 巫永华, 张建萍, 赵节昌, 等. 大孔树脂纯化黄精多酚及其抗氧化性与组成分析[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(01): 318-326.
- [81] Vlassara H, Palace M R. Diabetes and advanced glycation endproducts[J]. *Journal of internal medicine*, 2002, 251(2): 87-101.
- [82] Ahmed N. Advanced glycation endproducts — role in pathology of diabetic complications[J]. *Diabetes research and clinical practice*, 2005, 67(1): 3-21.
- [83] Singh R, Barden A, Mori T, etc. Advanced glycation end-products: a review[J]. *Diabetologia*, 2001, 44: 129-146.
- [84] Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine[J]. *Diabetes*, 1992, 41(1): 26-29.
- [85] Asgary S, Naderi G H, Sarrafzadegan N, etc. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation[J]. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 1999, 73(5): 223-226.
- [86] Sharma O P, Bhat T K. DPPH antioxidant assay revisited[J]. *Food chemistry*, 2009, 113(4): 1202-1205.
- [87] Floegel A, Kim D, Chung S, etc. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods[J]. *Journal of food composition and analysis*, 2011, 24(7): 1043-1048.
- [88] Sasaki K, Chiba S, Yoshizaki F. Effect of natural flavonoids, stilbenes and caffeic acid oligomers on protein glycation[J]. *Biomedical reports*, 2014, 2(5): 628-632.
- [89] Liping S, Xuejiao S, Yongliang Z. Preparation, characterization and antiglycation activities of the novel polysaccharides from *Boletus snicus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92: 607-614.
- [90] Zhang L, Wang X, Dong L. Antioxidation and antiglycation of polysaccharides from *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Food chemistry*, 2011, 124(1): 183-187.
- [91] Wu S, Sun Y, Chen D, etc. The noncovalent conjugations of human serum

- albumin (HSA) with MS/AK and the effect on anti-oxidant capacity as well as anti-glycation activity of Monascus yellow pigments[J]. *Food & Function*, 2021, 12(8): 3692-3704.
- [92] Zhao L, Jin X, Li Y, etc. Effects of A-type oligomer procyanidins on protein glycation using two glycation models coupled with spectroscopy, chromatography, and molecular docking[J]. *Food Research International*, 2022, 155: 111068.
- [93] Arena E, Ballistreri G, Tomaselli F, etc. Survey of 1, 2 - dicarbonyl compounds in commercial honey of different floral origin[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(8): C1203-C1210.
- [94] Neelofar K M, Arif Z, Alam K, etc. Hyperglycemia induced structural and functional changes in human serum albumin of diabetic patients: a physico-chemical study[J]. *Molecular BioSystems*, 2016, 12(8): 2481-2489.
- [95] 马思佳. 苦荞中黄酮对淀粉消化酶及非酶糖基化的影响与应用[D]. 上海应用技术大学, 2021.
- [96] 董昌燕, 李超, 杨本旭, 等. 红曲发酵物抑制蛋白质非酶糖基化作用研究[J]. *食品科学技术学报*, 2025, 43(01): 74-84.
- [97] Alam M M, Ahmad I, Naseem I. Inhibitory effect of quercetin in the formation of advance glycation end products of human serum albumin: An in vitro and molecular interaction study[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2015, 79: 336-343.
- [98] Tessier F J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation[J]. *Pathologie Biologie*, 2010, 58(3): 214-219.
- [99] Wang Y, Li S, Zhang T, etc. Effects of myricetin and its derivatives on nonenzymatic glycation: A mechanism study based on proteomic modification and fluorescence spectroscopy analysis[J]. *Food Chemistry*, 2024, 455: 139880.
- [100] 陈静, 郭丽娜, 郑成. 二氢杨梅素对糖耐量异常大鼠氧化和非酶糖基化的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2008, 34(06): 994-997.
- [101] Huang C, Ng M Y, Lin T, etc. Quercetin ameliorates advanced glycation end

- product-induced wound healing impairment and inflammaging in human gingival fibroblasts[J]. *Journal of Dental Sciences*, 2024, 19(1): 268-275.
- [102] Zhou Y, Duan H, Chen J, etc. The mechanism of in vitro non-enzymatic glycosylation inhibition by Tartary buckwheat' s rutin and quercetin[J]. *Food Chemistry*, 2023, 406: 134956.
- [103] Poulsen M W, Hedegaard R V, Andersen J M, etc. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 60: 10-37.
- [104] De Geest B, Mishra M. Role of oxidative stress in diabetic cardiomyopathy[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(4): 784.
- [105] Miroliaei M, Khazaei S, Moshkelgosha S, etc. Inhibitory effects of Lemon balm (*Melissa officinalis*, L.) extract on the formation of advanced glycation end products[J]. *Food chemistry*, 2011, 129(2): 267-271.
- [106] Attaribo T, Jiang X, Huang G, etc. Studies on the interactional characterization of preheated silkworm pupae protein (SPP) with anthocyanins (C3G) and their effect on anthocyanin stability[J]. *Food Chemistry*, 2020, 326: 126904.
- [107] Lan M, Li H, Tao G, etc. Effects of four bamboo derived flavonoids on advanced glycation end products formation in vitro[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 71: 103976.

## 研究生在读期间发表的论文情况

- [1]李紫嫚, 魏明, 吴坤伟. 显齿蛇葡萄黄酮的分离纯化和抗糖基化[J]. 安徽工程大学学报, 2025 (已录用).
- [2] 吴坤伟, 魏明, 钱森和, 李紫嫚, 谢艳. 黄精粉对面团特性和面包品质的影响[J].食品与机械, 2025 (已录用).

## 致谢

三年的研究生生涯悄然接近尾声，回首这段旅程，内心充满感慨。从跨专业零基础考入生物与医药专业，到逐步适应科研生活，再到如今即将完成学业，这一路走来并不容易，所幸有许多人的支持与帮助，让我得以坚持下来。

初入研究生阶段，面对陌生的领域和全新的学习方式，我曾有过迷茫和焦虑。实验室的环境、科研的要求、专业知识的积累，每一样都需要从头开始。幸运的是，我遇到了魏明老师，他不仅在学术上给予我细致的指导，也在科研思维和实验技能上耐心引导。实验过程中遇到问题时，他的建议总能让我找到思路，论文写作时，他的修改意见让我对科研表达有了更清晰的认识。魏老师的严谨治学态度和细心培养，让我逐渐建立起对专业的信心，也让我深刻理解了科研的意义。

学习之外，家人的支持始终是最坚实的后盾。从决定辞职到跨专业考研，他们就无条件信任我的选择，让我青春不留遗憾，大胆去做就行了，背后还有他们呢。在备考的日子里，奶奶悉心照顾我的饮食起居，做我学习道路上最坚实的后备军。而在实验陷入困惑时，想到家人的陪伴和期待，就有了坚持下去的动力。这一路走来，他们给予我的理解和支持远超言语所能表达。

实验室的师兄师姐和同门，让我的科研道路上多了一些帮助，生活上多了一些乐趣。刚进实验室时，面对陌生的实验设备和繁琐的实验流程，我常常手足无措，吴萍香、丁凯莉师姐会毫无保留地分享经验，耐心解答我的疑问，才让我能逐步适应实验室的节奏，还有同门吴坤伟、师妹方婷、张秋妹、吴婉利的帮助。大家在生活上也相互照应，闲暇时一起聊天、一起聚餐，细数研究生生活里弥足珍贵的点滴。

此外，在即将迈入研三的暑假里，我遇到了叶彦雷，那个想要共度一生的人，这是意料之外的缘分，也是在紧张的科研生活中最温暖的收获，也让我在学习之外，收获了更多的幸福感。

三年的时光匆匆而过，这段经历不仅是让我掌握了科研技能，我觉得更是磨练了一个好的心态。一次次实验失败让我领悟到失败是人生的常态，成功才是偶然，而那偶然的成功其实是失败的蜕变。研究生生涯的结束并不意味着学习的终止，而是一段新篇章的开始。感谢所有给予我帮助和支持的人，更感恩我的母校

安徽工程大学，是它给我提供了一个好的科研平台，学到了许多知识，遇到了那么多有趣的人，为我的青春增添了色彩。行胜于言，未来需要始终保持一颗向上的心！