

超声辅助制备金乌贼墨黑色素及其对 Caco-2 细胞氧化损伤的保护作用

Preparation of ink melanin from *Sepia esculenta* by ultrasound-assisted and its protective effects on oxidative damage in Caco-2 cells

张景禹¹

解万翠^{1,2,3,4}

车红霞^{1,2}

杨锡洪^{1,2}

ZHANG Jing-yu¹ XIE Wan-cui^{1,2,3,4} CHE Hong-xia^{1,2} YANG Xi-hong^{1,2}

(1. 青岛科技大学海洋科学与生物工程学院, 山东 青岛 266042; 2. 山东省生化工程重点实验室, 山东 青岛 266042; 3. 青岛智科检验检测有限公司, 山东 青岛 266002; 4. 尚好科技有限公司, 山东 青岛 266002)

(1. College of Marine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266042, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Biochemical Engineering, Qingdao, Shandong 266042, China; 3. Qingdao Zhike Inspection and Testing Co., Ltd., Qingdao, Shandong 266002, China; 4. Shanghao Science and Technology Co., Ltd., Qingdao, Shandong 266002, China)

摘要:以金乌贼为原料,采用超声辅助法制备金乌贼墨黑色素并进行结构表征和抗氧化能力测定,利用150 $\mu\text{mol/L}$ 叔丁基过氧化氢(TBHP)诱导建立 Caco-2 细胞氧化损伤模型,MTT 法测定细胞存活率,并对细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量进行测定。结果表明,超声法提取的黑色素具备特征基团和吡咯结构,并且颗粒粒径变小。与氧化损伤模型组相比,黑色素组均能有效提升受损细胞的存活率。当浓度 $\geq 40 \mu\text{g/mL}$ 时,金乌贼墨黑色素干预能有效提升细胞内 SOD 活性和降低 MDA 水平,保护 Caco-2 细胞免受氧化应激造成的损伤。
关键词:金乌贼墨;黑色素;超声提取;Caco-2 细胞;氧化应激

Abstract: In order to investigate the protective effect of *Sepia esculenta* ink melanin on the oxidative damage of human cloned colon adenocarcinoma cells (Caco-2), the ultrasound-assisted method was used to prepare *Sepia esculenta* ink melanin and its structure characterization and antioxidant capacity were measured. In this study, 150 $\mu\text{mol/L}$ tert-butyl hydrogen peroxide (TBHP) was used to induce the oxidative damage model

of Caco-2 cells, and the cell survival rate was determined by the MTT method, as well as the activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in cells were determined. The experimental results showed that the melanin extracted by ultrasound retained the characteristic group and indole structure, and the particle size became smaller. Compared with the oxidative damage model group, the melanin group can effectively improve the survival rate of damaged cells. The interference of *S. esculenta* ink melanin with concentration above 40 mg/mL could effectively increase the activity of SOD and reduce the level of MDA in cells, and protect Caco-2 cells from the damage caused by oxidative stress.

Keywords: *Sepia esculenta* ink; melanin; ultrasonic extraction; Caco-2 cells; oxidative stress

金乌贼(*Sepia esculenta*)墨黑色素是天然色素的重要来源,是一种高度聚合的生物大分子,存在于墨囊中,是乌贼在防御和躲避危险时喷出墨汁的主要成分,具有光保护作用^[1]、抗氧化作用^[2]、清除自由基^[3]、金属离子螯合作用^[4]、抗炎作用^[5]等功能。目前,黑色素在调节免疫低下^[6]、保护糖尿病肾病对肾脏损伤^[7]、治疗侵袭性肺曲霉病^[8]、保护急性酒精肝损伤^[9]等方面具有良好的效果。

研究表明,氧化应激与糖尿病^[10]、阿尔茨海默病^[11]和肠道炎症^[12]等慢性疾病密切相关。氧化应激可使自由基、活性代谢物(ROS)和保护机制(抗氧化

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2018YFD0901105);国家自然科学基金项目(编号:31671825)

作者简介:张景禹,男,青岛科技大学在读硕士研究生。

通信作者:解万翠(1969—),女,青岛科技大学教授,博士。

E-mail: xiewancui@163.com

杨锡洪(1963—),男,青岛科技大学教授,博士。

E-mail: yangxihong63@163.com

收稿日期:2020-03-11

剂)之间失衡^[13],损伤重要的生物分子和细胞,导致疾病。

关于黑色素抗氧化能力的研究多为化学法^[14-16],而在细胞水平上的功效研究鲜有报道。已有的报道^[17]仅通过测定细胞增殖活性探究黑色素对细胞的影响,无法反应细胞内指标的变化。化学法只能简单测定抗氧化剂的抗氧化能力,不能真实模拟或反映机体内部生理环境,不能有效评价其抗氧化活性与药理作用的关系。相比于水洗、酶解、酸碱等提取法,Guo 等^[18]通过超声辅助方法制备可溶性黑色素,说明超声法在改善黑色素溶解性方面具有很好的效果。试验拟以金乌贼为原料,采用超声辅助法提取制备黑色素,并利用叔丁基过氧化氢诱导 Caco-2 细胞建立氧化应激损伤模型,同时将不同浓度的黑色素溶液加入细胞中进行提前干预,研究金乌贼黑色素在 Caco-2 细胞氧化应激损伤中的保护作用,为黑色素作为一种食补或者营养性的外源抗氧化剂的开发和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料与试剂

冷冻金乌贼:山东青岛航海客公司;

人克隆结肠腺癌细胞 Caco-2 细胞:美国典型培养物保藏中心;

高糖 DMEM 细胞培养液:美国 Hyclone 公司;

胎牛血清:上海依科赛生物制品有限公司;

叔丁基过氧化氢(TBHP):美国 Sigma 公司;

四甲基偶氮唑蓝(MTT)细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、BCA 法总蛋白定量测定试剂盒、超氧化物歧化酶 SOD 测定试剂盒、丙二醛 MDA 测定试剂盒:南京建成生物工程研究所;

其余试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

超声波细胞破碎仪:JY92-IIN 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

紫外分光光度计:UV-1800PC 型,上海翊艺有限公司;

冷冻离心机:Happy-TL18 型,山东济南福的机械有限公司;

真空冷冻干燥机:FD-1A-50 型,北京博医康实验仪器有限公司;

傅里叶红外光谱仪:Nicolet iS10 型,赛默飞世尔科技有限公司;

扫描电子显微镜:JSM-6700F 型,日本电子公司;

酶标仪:BIO-RAD680 型,美国伯乐生命医学产品有限公司;

二氧化碳细胞培养箱:MCO-15AC 型,日本三洋公司。

1.2 方法

1.2.1 超声辅助提取及制备黑色素 参考 Guo 等^[19]

的方法并略作修改。取 0.5 g 干燥的黑色素样品,溶于 100 mL NaOH 溶液(1 mol/L)中。超声细胞破碎仪振幅 80%,温度上限 30 ℃,超声 1 s,间歇 1 s,总作用时间 1 h,冷却,加入 1 mol/L HCl 调节 pH 值,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,真空冷冻干燥,得黑色素样品。

1.2.2 紫外—可见光光谱和 FT-IR 光谱 将黑色素样品充分溶解,配置成 10 mg/L 的溶液,使用紫外—可见分光光度计在 200~700 nm 范围内扫描。称取 0.5 mg 黑色素样品,与 KBr 均匀混合并压制成片剂,使用傅立叶变换红外光谱仪在 4 000~400 cm⁻¹ 范围内扫描。

1.2.3 扫描电子显微镜和粒径统计 黑色素样品于真空喷金,通过扫描电子显微镜扫描图像,扫描电压 5.0 kV/10 kV,工作距离 8.4~8.8 mm。使用 Nano meterer 1.2 软件对黑色素粒径分布进行统计分析。

1.2.4 Caco-2 细胞培养 在含有 Caco-2 细胞的培养瓶中加入含 10% 的胎牛血清(经热灭活处理)和双抗(100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)的高糖 DMEM 细胞培养液,于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养,每天更换一次培养液。待细胞贴壁生长为单层后,对其进行消化传代。

1.2.5 黑色素对 Caco-2 细胞存活率影响 取对数生长期的 Caco-2 细胞,以密度 5×10⁴ Cells/mL 接种至 96 孔板,每孔加入 100 μL 细胞悬液,置于培养箱中培养。待细胞贴壁后开始试验。试验组每孔加入 200 μL 样品溶液,黑色素最终浓度分别为 5,20,40,60,80,100 μg/mL,每个浓度设置 4 个复孔,同时设置对照组,对照组为正常细胞组。继续培养 24 h 后,采用 MTT 法^[19]检测,并按式(1)计算 Caco-2 细胞存活率。

$$C = \frac{A_1 - A_0 - A_3}{A_2 - A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C——Caco-2 细胞存活率,%;

A₁——黑色素干预组的吸光度;

A₀——空白组吸光度;

A₃——黑色素溶液吸光度;

A₂——对照组吸光度。

1.2.6 TBHP 诱导 Caco-2 细胞氧化损伤模型建立 取对数生长期的 Caco-2 细胞,以密度 5×10⁴ Cells/mL 接种至 96 孔板,每孔加入 100 μL 细胞悬液,于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁后开始试验。细胞贴壁后孵育不同浓度梯度的 TBHP(0,50,100,200,300,400 μmol/L),孵育时间 4 h,MTT 法检测细胞存活率,选择半抑制浓度

(IC_{50})为后续试验作用剂量。

1.2.7 不同浓度黑色素溶液对 Caco-2 细胞氧化损伤的影响 细胞板同 1.2.6, 细胞贴壁后分别加入 5, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的黑色素溶液, 每孔 200 μL , 每组 5 个复孔。孵育 24 h 后弃去上清, 加入 TBHP 损伤 4 h, MTT 法检测细胞存活率。

1.2.8 细胞中 SOD 活性和 MDA 含量的测定 将 Caco-2 细胞以密度 5×10^5 Cells/mL 接种至 6 孔板中。经不同浓度黑色素溶液和 TBHP 处理后, 用 PBS 洗涤细胞两次, 从平板上刮入到冷 PBS 中, 采用超声波细胞破碎仪进行均质化。将匀浆液于 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。通过 BCA 分析试剂盒测定上清液样品中的蛋白质浓度, 按测定试剂盒说明书进行 SOD、MDA 测定^[20]。

1.2.9 统计学分析 所有试验重复 3 次, 结果以(平均值 $\pm$ 标准偏差)表示。使用 SPSS 18.0 和 GraphPad Prism 8 软件分析, 采用 T 检验法对试验组和模型组进行统计分析和数据处理, ns 表示差异无显著性, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$; 采用 T 检验法对模型组和对照组进行统计分析, # # 表示 $P < 0.01$; 采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行试验组内比较, 字母不同表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 紫外—可见光光谱和 FT-IR 光谱

由图 1 可知, 金乌贼墨黑色素在 215 nm 处有一个最大吸收峰, 并且随波长的增加吸光度逐渐降低。这是由于黑色素分子中含有复杂的共轭结构, 因此宽光谱范围内的强吸收和随波长逐渐降低是黑色素的典型特性^[21]。此外, 260, 280 nm 处均未观察到吸收峰, 表明诸如蛋白质和脂质的杂质含量少。

由图 2 可知, 3 420 cm^{-1} 处的强而宽的谱带为—OH 和—NH 拉伸振动; 2 926, 2 852 cm^{-1} 处的小峰和尖峰分别对应于 CH_3 、 CH_2 的拉伸振动; 1 620 cm^{-1} 处的强吸收峰对应芳族 $\text{C}=\text{C}$ 和 $\text{C}=\text{O}$ 基团的拉伸振动; 1 372 cm^{-1} 处

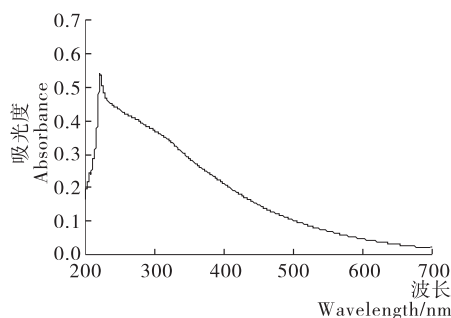


图 1 黑色素紫外—可见光谱图

Figure 1 Ultraviolet-visible spectra of melanin prepared

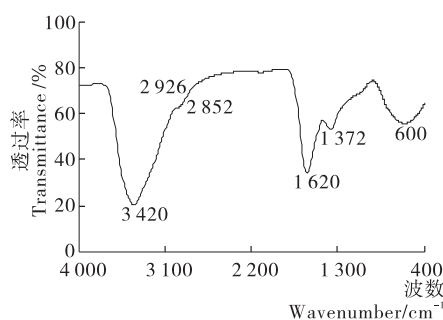


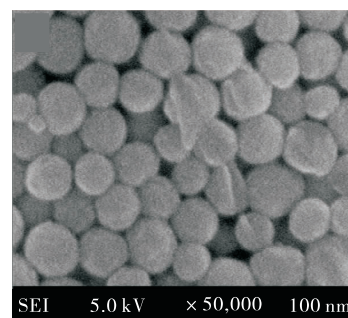
图 2 黑色素 FT-IR 光谱图

Figure 2 FT-IR spectra of melanin prepared

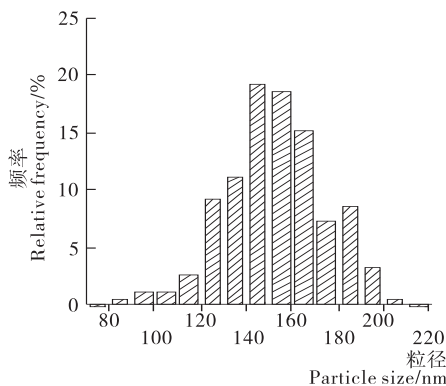
的吸收峰归属于酚 O—H 基团的 O—H 变形和 C—O 拉伸; 800~600 cm^{-1} 处的弱吸收峰表明芳香环的某些位置已被取代形成低芳族氢含量的共轭体系, 与报道的真黑色素标准品^[22]和天然鱿鱼黑色素^[18]高度一致。其中, 3 420, 1 620 cm^{-1} 处的吸收峰被认为是黑色素的代表特征, 说明超声辅助提取的黑色素保留了黑色素特征基团和吡啶结构。

2.2 扫描电子显微镜及粒径统计

由图 3 可知, 金乌贼墨黑色素呈纳球状, 具有不同的粒径, 主要分布于 80~210 nm 的范围内, 颗粒表面轻微的凸起。黑色素单体颗粒并不代表保持其功能的最小基



(a) 扫描电镜图



(b) 粒径分布

图 3 黑色素的显微结构

Figure 3 SEM images and particle size distribution of melanin prepared by ultrasound-assisted

本单位,而只是代表一种扩展的聚集^[23]。超声破碎后,黑色素部分颗粒发生形变,圆形颗粒的物理结构遭到一定程度地破坏,使黑色素产生了更小颗粒并释放更多的活性基团^[18]。

2.3 黑色素对 Caco-2 细胞存活率的影响

由图 4 可知,黑色素组的细胞存活率高于正常组,表明金乌贼墨黑色素对 Caco-2 细胞没有毒性,还可在一定程度上促进细胞的生长和增殖。雷敏^[17]研究发现不同分子量的水溶性鱿鱼墨黑色素在 48 h 内显著地促进了内皮细胞的增殖。杨亚杰等^[24]研究发现乌骨鸡黑色素对细胞增殖无影响。当浓度为 5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,金乌贼墨黑色素干预 Caco-2 细胞 24 h 未发现毒性作用,可在此条件下进行后续试验。

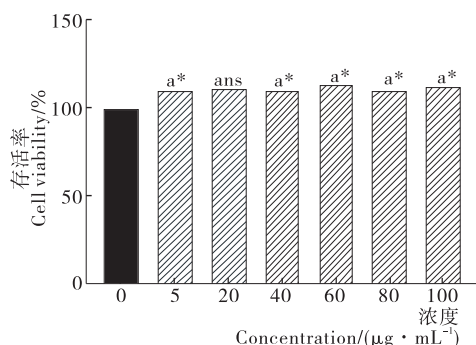


图 4 黑色素对 Caco-2 细胞存活率的影响

Figure 4 Effect of melanin on the survival rate of Caco-2 cells

2.4 TBHP 诱导 Caco-2 细胞氧化损伤模型的建立

由图 5 可知,当叔丁基过氧化氢浓度为 0~400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,细胞存活率逐渐下降。当叔丁基过氧化氢浓度为 300~400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,细胞存活率缓慢降低。当叔丁基过氧化氢浓度为 400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,细胞存活率最低(10%),细胞严重受损,此时叔丁基过氧化氢细胞损伤的 IC_{50} 值为 146.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。故后续采用 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的叔丁基过氧化氢建立 Caco-2 细胞损伤。

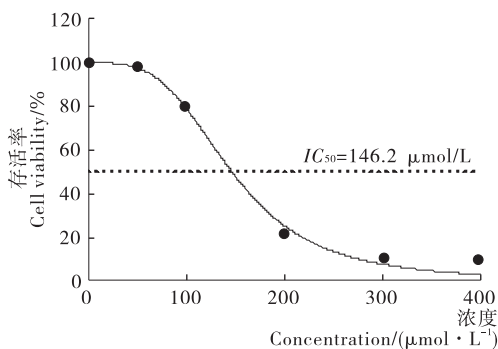


图 5 TBHP 对 Caco-2 细胞存活率的影响

Figure 5 Effect of TBHP on the survival rate of Caco-2 cells

2.5 不同浓度黑色素溶液对 Caco-2 细胞氧化损伤的影响

由图 6 可知,叔丁基过氧化氢组的细胞存活率为 59%,显著低于正常组($P < 0.05$),说明采用 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 叔丁基过氧化氢能成功建立细胞损伤模型。黑色素组的细胞存活率均高于叔丁基过氧化氢组,且差异显著($P < 0.05$)。其中,黑色素浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的存活率与黑色素浓度为 5, 20, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的差异显著,而与黑色素浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的无统计学意义($P > 0.05$)。综上,金乌贼墨黑色素具有保护 Caco-2 细胞免受氧化应激诱导损伤的能力。

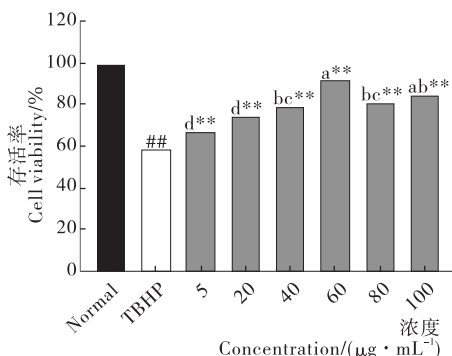


图 6 黑色素浓度对 Caco-2 细胞氧化损伤的影响

Figure 6 Effects of different concentrations of melanin on oxidative damage in Caco-2 cells

2.6 细胞中 SOD 活性和 MDA 含量的测定

由图 7 可知,叔丁基过氧化氢能显著提升 Caco-2 细胞中 MDA 含量($P < 0.05$);经 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黑色素提前干预后,受损细胞中 MDA 含量下降,且与模型组差异显著($P < 0.05$)。而黑色素组间 MDA 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。当黑色素浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, Caco-2 细胞中 MDA 含量为 0.933 $\text{nmol}/\text{mg} \cdot \text{Pro}$,为模型组的 60%。经叔丁基过氧化氢氧化损伤的 Caco-2 细胞中 SOD 酶活性显著降低($P < 0.05$);而经 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黑色素干预后,细胞中的 SOD 酶活显著升高($P < 0.05$),其中,黑色素浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的细胞中 SOD 酶活为 39.37 $\text{U}/\text{mg} \cdot \text{Pro}$,为叔丁基过氧化氢模型组的 1.86 倍。综上,黑色素可以通过降低细胞内不饱和脂肪酸发生过氧化反应所产生的氧化产物来降低细胞氧化损伤的程度;同时提高细胞中抗氧化物酶的活性,从而降低细胞氧化应激损伤水平。黑色素对细胞氧化损伤的保护机制可能与其他天然活性物质并不相同,但都可通过提高细胞内源性抗氧化物酶活性、降低自由基对细胞损伤来提高细胞的存活率^[25]。

3 结论

以叔丁基过氧化氢诱导人克隆结肠腺癌 Caco-2 细胞建立氧化损伤模型,研究了金乌贼墨黑色素对 Caco-2 细

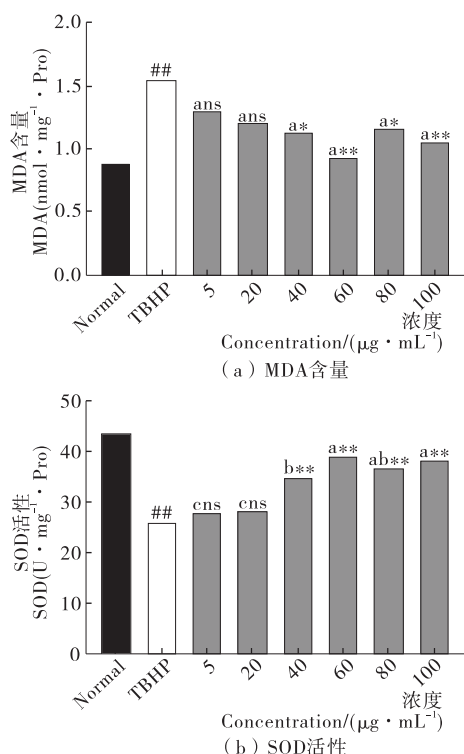


图7 黑色素对叔丁基过氧化氢诱导 Caco-2 细胞中 MDA 含量和 SOD 活性的影响

Figure 7 Effect of melanin on MDA content and SOD activity in Caco-2 cells induced by TBHP

胞氧化应激损伤的保护作用。结果表明,金乌贼墨黑色素可以通过提高 Caco-2 细胞中超氧化物歧化酶 SOD 活性和降低丙二醛 MDA 含量,清除过量的活性氧自由基和减少脂质过氧化程度来保护细胞免受氧化应激损伤。由于细胞氧化应激损伤的复杂性,乌贼墨黑色素的抗氧化应激损伤分子机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] MENTER J M, WILLIS I. Electron transfer and photoprotective properties of melanins in solution[J]. *Pigment Cell Research*, 1997, 10(4): 214-217.
- [2] HUNG Yao-ching, SAVA V M, MAKAN S Y, et al. Antioxidant activity of melanins derived from tea: Comparison between different oxidative states [J]. *Food Chemistry*, 2002, 78(2): 233-240.
- [3] RÓZANOWSKA M, SARNA T, LAND E J, et al. Free radical scavenging properties of melanin; Interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(5/6): 518-525.
- [4] LIU Yan, Hong Lian, KEMPF V R, et al. Ion-exchange and adsorption of Fe (III) by Sepia melanin[J]. *Pigment Cell Research*, 2004, 17(3): 262-269.
- [5] KURIAN N K, NAIR H P, BHAT S G. Evaluation of anti-inflammatory property of melanin from marine *Bacillus* spp. BTCZ31[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical & Clinical Research*, 2015, 8(3): 251-255.
- [6] 董慧,王力东,王春琳,等. 曼氏无针乌贼墨汁黑色素对免疫低下模型小鼠的调节作用[J]. *生物学杂志*, 2016, 33(5): 27.
- [7] 董慧,徐洋洋,王春琳,等. 乌贼墨汁黑色素对糖尿病肾病小鼠肾脏的保护作用[J]. *食品科学*, 2018, 39(5): 192-198.
- [8] FAHMY S R, ALI E M, AHMED N S. Therapeutic effect of sepia ink extract against invasive pulmonary aspergillosis in mice[J]. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 2014, 67(5): 196-204.
- [9] HOU Ruo-lin, LIU Xin, YAN Jun-jie, et al. Characterization of natural melanin from *Auricularia auricula* and its hepatoprotective effect on acute alcohol liver injury in mice[J]. *Food & Function*, 2019, 10(2): 1 017-1 027.
- [10] 杨升华,尹卫东. 氧化应激与糖尿病研究进展[J]. *微量元素与健康研究*, 2011, 28(3): 54-57.
- [11] 宋玉菲,付剑亮. 阿尔茨海默病与氧化应激[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(3): 290-293.
- [12] 王啸春,陈小连,赵珂立,等. 动物肠道氧化应激及抗氧化剂干预作用研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(11): 73-78.
- [13] 何方婷,陈嘉熠,徐佳伊,等. 氧化应激细胞模型建立的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(7): 347-351.
- [14] 陈士国,薛长湖,薛勇,等. 鱿鱼墨黑色素的自由基清除活性研究[J]. *中国海洋药物*, 2007, 26(1): 24-27.
- [15] 何健,刘娥,李小娟,等. 乌贼墨黑色素粗提物的提取工艺优化及其抗氧化能力测定[J]. *福建水产*, 2019, 41(3): 217-224.
- [16] KHUDAIR I H, HANNA B A, SUGAR D K. Cytotoxic effect of ink extracted from cephalopoda on cancer cell line[J]. *Sci J Med Res*, 2019, 3(12): 139-145.
- [17] 雷敏. 鱿鱼墨黑色素及黑色素铁生物活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008: 100-114.
- [18] GUO Xin, CHEN Shi-guo, HU Ya-qin, et al. Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 51(12): 3 680-3 690.
- [19] CHE Hong-xia, FU Xue-yuan, ZHANG Ling-yu, et al. Neuroprotective effects of *n*-3 polyunsaturated fatty acid-enriched phosphatidylserine against oxidative damage in PC12 cells[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2018, 38(3): 657-668.
- [20] 王振,刘仲华,蔡淑贤,等. 绿茶水粗提物抗中波紫外线致人表皮细胞衰老作用[J]. *食品与机械*, 2017, 33(12): 129-134.

(下转第 181 页)

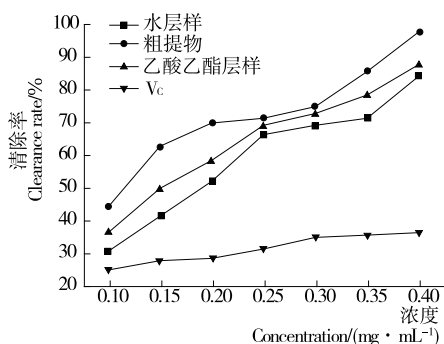


图 11 单性木兰枝多酚的 ·OH 清除能力

Figure 11 Scavenging effect of *M. kwangsiensis* branch polyphenols on ·OH

的清除率为 36.43%，而单性木兰枝多酚的清除作用均强于 V_c，粗提物、乙酸乙酯层样、水层样的清除率分别相当于 V_c 的 2.31, 2.69, 2.41 倍。

3 结论

试验采用响应面设计法优化单性木兰枝多酚超声波辅助提取法提取工艺最优条件: 丙酮浓度 67%，液固比 22:1 (mL/g)，提取时间 20 min，该条件下，单性木兰枝多酚得率达 1.45%。抗氧化性研究发现，单性木兰枝多酚具有一定的总抗氧化性，但具有良好的 DPPH· 和 ·OH 清除效果，说明单性木兰枝多酚可开发作为食品、药品、化妆品等行业的天然抗氧化物。试验并未对单性木兰枝多酚类物质进行深入的纯化分离，后续可采用大孔吸附树脂进行分析纯化，以及探究单性木兰枝多酚抗氧化性的量效关系。

参考文献

- [1] ZANIS Michael J, SOLTIS Pamela S, QIU Yin-long, et al. Phylogenetic analyses and perianth evolution in basal angiosperms[J]. Annals of the Missouri Botanical Garden, 2003, 90(2): 129-150.
- [2] 利健文. 木兰科植物精油的提取和 GC-MS 分析[D]. 广州: 华南理工大学, 2011: 28-36.
- [3] 黄品鲜, 周永红, 赖家业, 等. 珍稀濒危植物单性木兰种皮的挥发性成分分析[J]. 广西植物, 2010, 30(5): 691-695.
- [4] ZHENG Yan-fei, ZHANG Qiang, LIU Xiong-min, et al. Extraction of polysaccharides and its antitumor activity on *Magnolia kwangsiensis* figlar & noot.[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 142: 98-104.
- [5] 郑燕菲. 濒危植物单性木兰的有效成分及其生物活性研究[D]. 南宁: 广西大学, 2016.
- [6] ZHENG Yan-fei, LIU Xiong-ming, LAI Fang. Extraction and antioxidant activities of *Magnolia kwangsiensis* figlar & noot. leaf polyphenols [J]. Chemistry & Biodiverse, 2019, 16(2): e1800409.

- [7] 王婧, 郭阳, 包怡红, 等. 仙人掌多酚超声辅助醇提工艺优化及抗氧化、降脂能力分析[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 177-182.
- [8] 胡长玉, 戴毅, 王雅群, 等. 祁白术多酚提取工艺及抗氧化、抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(1): 170-176.
- [9] 于娟, 纪海玉, 白云, 等. 红茶多酚对 H22 荷瘤小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J]. 中国食品学报, 2019, 19(10): 49-55.
- [10] 杨谷良, 李士明, 邓昆, 等. 甜柿果实多酚类物质提取工艺的优化及其抗肺癌细胞生长的活性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(2): 212-216.
- [11] 夏婷, 赵超亚, 杜鹏, 等. 食品中多酚类化合物种类、提取方法和检测技术研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(5): 231-238.
- [12] WANG Zhen-bin, LI Ting-ting, LIU Feng-ye, et al. Effects of ultrasonic treatment on the maturation of Zhenjiang vinegar[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 39: 272-280.
- [13] 黄增. 巨尾桉有效成分的提取分离及其生物活性研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012: 42-63.
- [14] 延莎, 祁鹏煜, 张苏慧, 等. 不同米色小敏多酚提取物的体外抗氧化活性[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(10): 34-37.
- [15] 孙兴荣, 卞景阳, 刘琳帅, 等. 黑柿子多酚的提取及抗氧化作用的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2019(4): 85-89.
- [16] 唐晶晶. 石榴皮多酚类物质的提取、纯化及抗氧化性研究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2010: 44.
- [17] 王彦阳, 张中润, 郑晓瑞, 等. 腰果叶多酚超声波辅助提取工艺及其抗氧化能力测定[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(3): 53-58.
- [18] 胡会刚, 赵巧丽. 芒果皮渣多酚的提取分离及抗氧化活性分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(2): 53-62.
- [19] 金寒冰, 方丽, 赖蓓蕾, 等. 苦苣多酚超声辅助提取及抗氧化研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 211-215.

(上接第 159 页)

- [21] SUN Shu-jing, ZHANG Xiao-juan, SUN Shi-wei, et al. Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 801-807.
- [22] MAGARELLI M, PASSAMONTI P, RENIERI C. Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia Officinalis*) [J]. Revista CES Medicina Veterinaria Zootecnia, 2010, 5(2): 18-28.
- [23] 高然, 陈俊德, 李剑瑛, 等. 鱿鱼 (*Uroteuthis chinensis*) 黑色素酶法制备工艺优化及理化特征分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(18): 14-21.
- [24] 杨亚杰, 李慧, 胡清清, 等. 乌骨鸡黑色素的体外抗氧化活性及其对豚鼠静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2019, 43(1): 59.
- [25] 王明星, 张艳秋, 肖旭朗. 基于 H₂O₂ 诱导 Caco-2 细胞模型的猴头菌多糖抗溃疡性结肠炎活性研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2 355-2 357.