

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.03.033

女贞子总黄酮超声辅助提取工艺及体外抗氧化活性研究

Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Ligustrum lucidum* Ait by response surface methodology

周旋 许明祥 蔡文卓 翟晓瑞

ZHOU Xuan XU Ming-xiang CAI Wen-zhuo ZHAI Xiao-rui

霍明洋 高锐 郝艳丽

HUO Ming-yang GAO Rui XI Yan-li

(吉林医药学院公共卫生学院, 吉林 吉林 132013)

(School of Public Health, Jilin Medical University, Jilin, Jilin 132013, China)

摘要:通过响应面试验优化超声辅助提取工艺,测定小鼠红细胞溶血、肝组织匀浆和肝线粒体丙二醛(malondialdehyde, MDA)的水平,分析总黄酮的抗氧化能力。结果表明:在提取时间为 110 min、提取功率为 640 W、乙醇体积分数为 60%、液料比为 65:1(mL/g)的条件下,提取的女贞子总黄酮含量为 47.40 mg/g。该条件下提取的女贞子总黄酮在 200~1 000 mg/L 时能抑制小鼠红细胞溶血,降低肝组织匀浆和肝线粒体 MDA 的生成,具有量效关系。

关键词:女贞子;黄酮;提取工艺;抗氧化活性

Abstract: On the basis of single factor test, response surface test were used to optimize the extraction process. In addition, by measuring the level of erythrocyte hemolysis, liver homogenate and liver mitochondrial malondialdehyde (MDA) in mice, the antioxidant capacities of total flavonoids were determined. The results showed that the total flavone content of *Ligustrum lucidum* was 47.40 mg/g when the extraction time was 110 min, extract power was 640 W, the ethanol volume fraction was 60% and the liquid ratio was 65:1 (mL/g). The total flavone of *Ligustrum lucidum* Ait extracted under this condition can inhibit the hemolysis of mice erythrocytes and reduce the formation of liver homogenate and liver mitochondrial MDA in the concentration

range of 200~1 000 mg/L, with a dose-effect relationship.

Keywords: *Ligustrum lucidum* Ait; flavonoids; extraction process; antioxidant activity

女贞子(*Fructus Ligustri Lucidi*)为木犀科植物女贞的干燥成熟果实,又名冬青子、女贞实等^[1]。女贞子是中国传统中药,始载于《神农本草经》,历代本草及《中国药典》(1963~2015 版)均有记载^[2]。现代研究发现,女贞子中主要含有黄酮类、萜类、多糖类及挥发油等化学成分^[3],女贞子黄酮是女贞属植物中常见的化学成分,具有降血脂^[4]、抗菌^[5]、抗氧化^[6]等功效。

目前,植物黄酮的主要提取方法有直接浸提法、超声辅助提取法、微波辅助提取法、酶辅助提取法等^[7],超声辅助提取法作为植物活性物质提取的新技术,具有节能、安全、高效等优点^[8]。在女贞子黄酮提取物活性方面,研究降血脂功效较多^[9-10],在体外抗氧化方面鲜见报道。因此,本研究以女贞子总黄酮含量为评价指标,利用响应曲面法进行优化,并分析提取物对小鼠红细胞、肝组织匀浆和肝线粒体丙二醛(malondialdehyde, MDA)生成量的影响,观察其生物活性,以期对女贞子总黄酮的深度开发提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

ICR 雄性清洁级小鼠:体重(20±2) g,长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,许可证号:SCXK(吉)-2016-0003;

颗粒饲料:长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,

基金项目:吉林省科技厅项目资助(编号:20170623093-11TC);吉林省卫生计生委资助项目(编号:2007Q047);吉林省大学生创新创业计划训练项目(编号:201708)

作者简介:周旋,男,吉林医药学院在读本科生。

通信作者:郝艳丽(1981—),女,吉林医药学院讲师,博士。

E-mail: jilin2534126@163.com

收稿日期:2018-10-02

许可证号:SCXK(吉)2015-0005;

女贞子:产地河北,吉林市售;

无水乙醇:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;

芦丁、硫酸亚铁:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

亚硝酸钠:分析纯,天津市福晨化学试剂厂;

硝酸铝:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

氢氧化钠:分析纯,西陇化工股份有限公司;

过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2):分析纯,北京辽宁泉瑞试剂有限公司;

V_C:生工生物工程上海股份有限公司;

PBS 固体粉末:北京索莱宝公司;

BCA 检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒:南京建成生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

可见分光光度计:722型,上海菁华科技有限公司;

电子天平:BS224S型,北京赛多利斯科学仪器有限公司;

高功率超声波清洗器:KQ-800KDE型,昆山舒美超声仪器有限公司;

中药粉碎机:ZN-200型,中南制药机械厂;

组织分散机:T10型,德国IKA公司;

离心机:5810R型,德国艾本德有限公司;

旋转蒸发器:EV311型,北京莱伯泰科公司;

鼓风干燥箱:202-1型,天津泰森仪器股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 女贞子总黄酮的提取工艺流程 将女贞子粉碎后过60目筛,60℃干燥至恒重备用。称取1.25g女贞子粉末,加入一定量乙醇溶液,充分混匀后按一定的提取条件(提取时间、提取功率、乙醇体积分数、液料比)提取,3000 r/min离心10 min,取上清液过滤,置于旋转蒸发器中进行浓缩,将浓缩液定容至100 mL,即为女贞子总黄酮粗提液。

1.3.2 芦丁标准曲线的绘制 精确称取50.00 mg芦丁溶于体积分数为40%的乙醇溶液中,充分溶解后转移至25 mL容量瓶中定容,制成芦丁储备溶液,精密吸取0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 mL储备溶液,分别置于10 mL具塞试管中,加蒸馏水补至1.25 mL,加质量分数5%的亚硝酸钠水溶液0.25 mL,混匀后室温放置6 min,加质量分数为5%的硝酸铝水溶液0.25 mL,混匀后放置6 min,加1 mol/L氢氧化钠水溶液2.5 mL,加体积分数为40%的乙醇溶液定容至10 mL,混匀后放置反应15 min,于波长510 nm处测定吸光度,以体积分数为40%乙醇溶液作为空白调零,以吸光度为纵坐标,芦丁质量浓度为横坐标绘制芦丁标准曲线,线性回归方程为 $A = 2.625 4x + 0.067 8 (R^2 = 0.999 4)$,芦丁在50~250 mg/L质量浓度

范围内具有良好的线性关系。

1.3.3 女贞子提取液中总黄酮含量的计算 精确称取1.25 g女贞子粉末,按“1.3.1”方法进行提取,精确吸取1 mL粗提液采用“1.3.2”方法显色测定溶液吸光度,根据式(1)计算总黄酮含量。

$$c = \frac{m_1 \times m_2 \times m_3}{m_4} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——总黄酮含量,mg/g;

m_1 ——粗提液样品中黄酮的质量浓度,mg/L;

m_2 ——粗提液定容后的体积,L;

m_3 ——稀释倍数;

m_4 ——女贞子的质量,g。

1.3.4 单因素试验设计

(1) 提取时间:精确称取1.25 g女贞子样品放入三角瓶中按液料比50:1(mL/g)与体积分数为60%的乙醇混合,在提取功率560 W下分别超声提取20,40,60,80,100,120 min,分析提取时间对女贞子总黄酮提取效果的影响。

(2) 提取功率:精确称取1.25 g女贞子样品放入三角瓶中按液料比50:1(mL/g)与体积分数为60%的乙醇混合,分别在提取功率400,480,560,640,720,800 W下超声提取60 min,分析提取功率对女贞子总黄酮提取效果的影响。

(3) 乙醇体积分数:精确称取1.25 g女贞子样品放入三角瓶中按液料比50:1(mL/g)与体积分数分别为30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%的乙醇混合,在提取功率560 W下超声提取60 min,分析乙醇体积分数对女贞子总黄酮提取效果的影响。

(4) 液料比:精确称取1.25 g女贞子样品放入三角瓶中分别按液料比20:1,30:1,40:1,50:1,60:1,70:1,80:1(mL/g)与体积分数为60%的乙醇混合,在提取功率560 W下超声提取60 min,分析液料比对女贞子总黄酮提取效果的影响。

1.3.5 响应面试验设计 在单因素试验的基础上,依据Design-Expert 8.0.6软件的Box-Behnken试验设计原理,以女贞子提取液中总黄酮含量为响应值,以提取时间、提取功率、乙醇体积分数和液料比为因变量进行四因素三水平的响应面分析试验,优化超声波辅助提取女贞子总黄酮工艺参数。

1.3.6 女贞子总黄酮的体外抗氧化试验

(1) 女贞子总黄酮对小鼠红细胞氧化溶血的影响:试验小鼠饲养于温度20~24℃,湿度50%~70%,12 h明暗交替的环境。将小鼠摘除眼球取血,加入抗凝剂肝素钠后5000 r/min离心10 min,分离得到红细胞,以冷生理盐水洗涤3次,以生理盐水配置成0.5%的小鼠红细胞

悬浮液备用。根据参考文献[11],修改如下:样品组取试管分别加入 0.3 mL 不同质量浓度的总黄酮提取液,然后再加入 1.0 mL 的小鼠红细胞悬浮液,混匀后加入 0.1 mL 100 mmol/L 的 H_2O_2 启动反应,37 °C 温育 1 h 后加入 5.2 mL 生理盐水,4 000 r/min 离心 10 min,取上清,415 nm 处测定吸光度(m_1)。正常对照组以等体积的生理盐水代替样品和 H_2O_2 溶液,诱导对照组以等体积的生理盐水代替样品(m_2)。溶血率和抑制率按式(2)和(3)进行计算。

$$c_1 = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (2)$$

$$c_2 = \frac{m_2 - m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

c_1 ——溶血率,%;

c_2 ——抑制率,%;

m_1 ——正常对照组吸光度,A;

m_2 ——诱导对照组吸光度,A。

(2) 女贞子总黄酮对小鼠肝线粒体脂质过氧化的影响:根据参考文献[12],修改如下:取新鲜的小鼠肝组织,冷生理盐水清洗血渍,滤纸吸干水分后,在组织匀浆机中用 5 mmol/L 的 PBS 缓冲液制成 10% 的组织匀浆液,4 °C、3 000 r/min 离心 15 min,取上清,4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 PBS 洗涤 2 次,加入 PBS 溶解沉淀,配置成肝线粒体悬浮液,以 BCA 试剂盒测定悬浮液蛋白质含量,配置成蛋白质浓度为 10 mg/mL 的肝线粒体悬浮液。样品组取 0.25 mL 肝线粒体悬浮液于各试管中,加入 0.1 mL 不同质量浓度的总黄酮提取液,混匀后加入 0.5 mmol/L $FeSO_4$ 和 0.5 mmol/L 的 V_c 溶液各 0.1 mL;正常对照组以等体积的 PBS 代替 $FeSO_4$ 和 V_c 溶液,诱导对照组以等体积 PBS 代替样品溶液,混匀后 37 °C 温育 1 h,以 MDA 试剂盒说明书的方法测定 532 nm 处的吸光度并计算 MDA 含量。

(3) 女贞子总黄酮对小鼠肝组织匀浆体外生成 MDA 的影响:参照文献[13],修改如下:取 10% 肝组织匀浆液,5 000 r/min 离心 15 min,取上清备用。用 BCA 蛋白试剂盒测定上清液中蛋白质的浓度。样品组取 1.0 mL 10% 肝组织匀浆液与 0.1 mL 不同质量浓度的总黄酮提取液混合,加 10 mmol/L 的 $FeSO_4$ 30 μ L、60 mmol/L 的 H_2O_2 20 μ L,37 °C 温育 1 h 后,冰育 10 min 终止反应。以 MDA 试剂盒说明书的方法测定 532 nm 处的吸光度并计算 MDA 含量。以等体积的生理盐水代替样品溶液作为对照组。

1.4 数据统计与分析

试验重复 3 次,结果取平均值。数据用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,采用方差分析中的 LSD 法进行样本均

数的两两比较, $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取时间对女贞子总黄酮含量的影响 由图 1 可知,当超声时间从 20 min 增加到 100 min 时,总黄酮的含量随着提取时间的延长逐渐增加,当提取时间达到 100 min 时,总黄酮的含量达到最大值;随着提取时间的继续延长,总黄酮的含量反而呈下降趋势,可能与提取时间太长,黄酮结构发生破坏或者发生降解有关^[14]。因此选择最佳提取时间为 80 min。

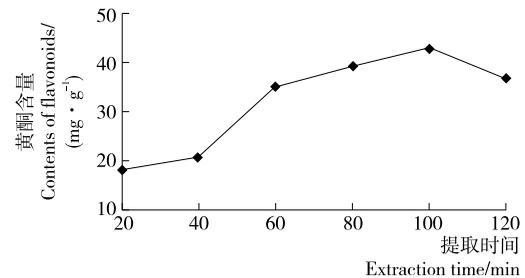


图 1 提取时间对女贞子总黄酮含量的影响

Figure 1 Effect of the extraction time on total flavonoids yield from *Ligustrum lucidum* Ait

2.1.2 提取功率对女贞子总黄酮含量的影响 由图 2 可知,随着提取功率的增大,女贞子中总黄酮的含量呈现先上升后下降的趋势,在 640 W 时总黄酮的含量达到最大。可能是黄酮作为次生代谢产物,大部分存在于细胞膜中,样品超声后可使媒介粒子的速度和加速度增大,导致界面扩散层上的分子扩散速度加快,使黄酮加速溶出,当超声波功率 > 640 W 时,超声波产生的空化效应会使黄酮分子与其他成分反应使黄酮的结构遭到破坏,导致提取量下降^[15]。因此,选择最佳提取功率为 640 W。

2.1.3 乙醇体积分数对女贞子总黄酮含量的影响 由图 3 可知,当乙醇体积分数从 30% 增加到 50% 时,总黄酮含量呈现上升的趋势,随着乙醇体积分数的增加,材料细胞溶胀增强,提取剂能有效地向材料细胞内部渗透,从

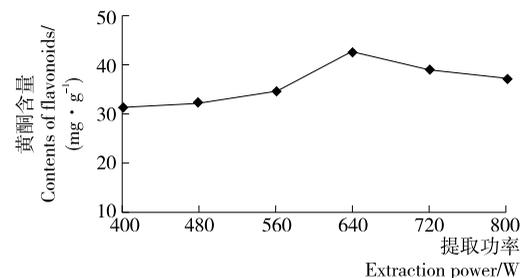


图 2 提取功率对女贞子总黄酮含量的影响

Figure 2 Effect of the extraction power on total flavonoids yield from *Ligustrum lucidum* Ait

而使提取的总黄酮含量增加^[16]。当乙醇体积分数超过60%后,随着乙醇体积分数的增加,提取物中黄酮含量有所下降,可能是溶剂极性下降,水溶性黄酮溶出减少,同时杂质溶出增多,使黄酮溶解度下降^[17]。因此选择最佳乙醇体积分数为60%。

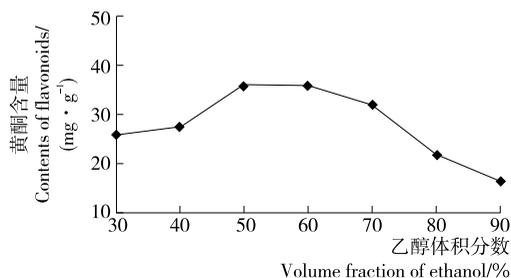


图3 乙醇体积分数对女贞子总黄酮含量的影响

Figure 3 Effect of the ethanol concentration on total flavonoids yield from *Ligustrum lucidum Ait*

2.1.4 液料比对女贞子总黄酮含量的影响 由图4可知,当液料比从20:1(mL/g)增加到60:1(mL/g)时,黄酮含量逐渐升高,这可能是液料比越大,溶剂中的黄酮质量越低,传质推动力越大,提取速率增加,使提取率增大,在液料比为60:1(mL/g)时提取溶液中总黄酮含量最高。当液料比继续增大时,黄酮的含量反而呈现下降的趋势,可能是女贞子中杂质的溶出,影响了黄酮的溶出率^[18];也可能是进入溶剂的黄酮对未溶出黄酮有协同浸提作用^[19],造成提取溶液中总黄酮含量的减少。此外,过度增加溶剂使用量,会造成浪费,也会增加成本,造成后续蒸发浓缩的负担,增加工作量,因此选择最佳液料比为60:1(mL/g)。

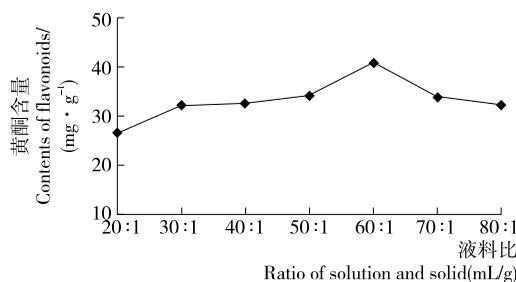


图4 液料比对女贞子总黄酮含量的影响

Figure 4 Effect of the ratio of solution and solid on total flavonoids yield from *Ligustrum lucidum Ait*

2.2 女贞子总黄酮提取工艺优化

2.2.1 模型方程建立与显著性检验 在单因素试验基础上,选用响应面法对女贞子总黄酮的提取工艺条件进行优化。利用Design-Expert 8.0.6软件的Box-Behnken设计,以提取时间、提取功率、乙醇体积分数、液料比为响应变量(见表1),以黄酮含量为响应值进行数据拟合,结果如表2所示。

表1 响应面试验设计因素水平表

Table 1 Design of factors and levels of response surface test

水平	A 提取时间/min	B 提取功率/W	C 乙醇体积分数/%	D 液料比/(mL·g ⁻¹)
-1	80	560	50	50:1
0	100	640	60	60:1
1	120	720	70	70:1

表2 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Design and data from the Box-Behnken test

试验号	A	B	C	D	黄酮含量/(mg·g ⁻¹)
1	0	-1	0	-1	45.47
2	0	1	-1	0	34.20
3	0	0	0	0	48.52
4	0	0	-1	1	38.77
5	0	0	0	0	46.99
6	0	1	0	-1	37.24
7	-1	0	1	0	43.03
8	1	1	0	0	38.46
9	0	-1	1	0	41.20
10	-1	-1	0	0	40.29
11	-1	0	-1	0	38.46
12	-1	0	0	1	41.20
13	1	-1	0	0	46.99
14	0	-1	-1	0	41.51
15	0	0	1	-1	31.76
16	0	1	1	0	39.07
17	0	0	0	0	46.08
18	1	0	-1	0	39.38
19	-1	0	0	-1	41.81
20	0	1	0	1	41.51
21	0	0	0	0	44.86
22	1	0	1	0	36.33
23	0	0	0	0	46.99
24	1	0	0	-1	33.28
25	1	0	0	1	47.91
26	0	0	1	1	42.73
27	0	0	-1	-1	43.95
28	-1	1	0	0	40.29
29	0	-1	0	1	42.12

对表2数据进行多元回归拟合,得到多元回归方程:

$$Y=46.69-0.23A-2.35B+0.047C+2.07D-2.13AB-1.90AC+3.81AD+1.30BC+2.25BD+3.36CD-2.53A^2-2.59B^2-5.00C^2-3.01D^2 \quad (4)$$

由表3可知,方程中的一次项B、D和二次项A²、B²、C²、D²分别对女贞子提取液中总黄酮含量的影响极

表 3 回归方程方差分析[†]

Table 3 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	492.53	14	35.18	9.30	<0.000 1	** *
A	0.63	1	0.63	0.17	0.690 1	
B	66.34	1	66.34	17.54	0.000 9	** *
C	0.03	1	0.03	0.01	0.934 1	
D	51.34	1	51.34	13.57	0.002 5	** *
AB	18.20	1	18.20	4.81	0.045 7	*
AC	14.51	1	14.51	3.84	0.070 4	
AD	58.03	1	58.03	15.34	0.001 5	** *
BC	6.71	1	6.71	1.77	0.204 2	
BD	20.33	1	20.33	5.37	0.036 1	*
CD	45.23	1	45.23	11.96	0.003 8	** *
A ²	41.63	1	41.63	11.01	0.005 1	** *
B ²	43.65	1	43.65	11.54	0.004 3	** *
C ²	162.42	1	162.42	42.94	<0.000 1	** *
D ²	58.69	1	58.69	15.51	0.001 5	** *
残差	52.96	14	3.78			
失拟项	45.72	10	4.57	2.53	0.192 8	
净误差	7.24	4	1.81			
总离差	545.49	28				

† * . P<0.05, 差异显著; ** . P<0.01, 差异极显著。

显著;交互项 AD、CD 对女贞子提取液中总黄酮含量的影响极显著,AB 和 BD 项对总黄酮的影响显著。由此可知,各试验因素对响应值的影响是复杂的线性关系,各因素之间均存在显著的交互作用。回归模型的 F 值为 9.30 (P<0.000 1),表明该模型达到了显著水平;失拟项 F 为 2.53(P>0.05),说明失拟项差异不显著,试验无失拟因素存在,进一步说明模型拟合度良好。试验模型的相关系数 R² 达到 0.902 9,说明模型能解释 90.29% 响应值的变化,校正系数 R_{adj}²=0.805 8,说明模型可信度好,结果与模型预测有着良好的一致性。变异系数值为 5.29%,说明该模型能较好地反应真实值。由 F 值可知,在试验范围内各因素对总黄酮含量的影响大小依次为提取功率>液料比>提取时间>乙醇体积分数。

2.2.2 响应面分析 响应面图能够直接反映各因素与响应值之间的关系以及两因素间交互作用类型,并能形象描述回归方程。由图 5(a)、(c)可知,当提取功率的水平为 0 时,女贞子总黄酮的含量随着提取时间的延长呈先上升后下降的趋势,当提取功率的水平变化到 1 时,随着提取时间的延长,女贞子总黄酮的含量先趋于平稳后不断下降,这与提取功率单因素试验结果一致,即在较高提取功率的条件下,女贞子总黄酮的含量呈现下滑的趋势;由图 5(b)、(d)可知,当一个因素一定时,女贞子总黄酮的含量随另一个因素增加呈现先上升后下降的趋势。

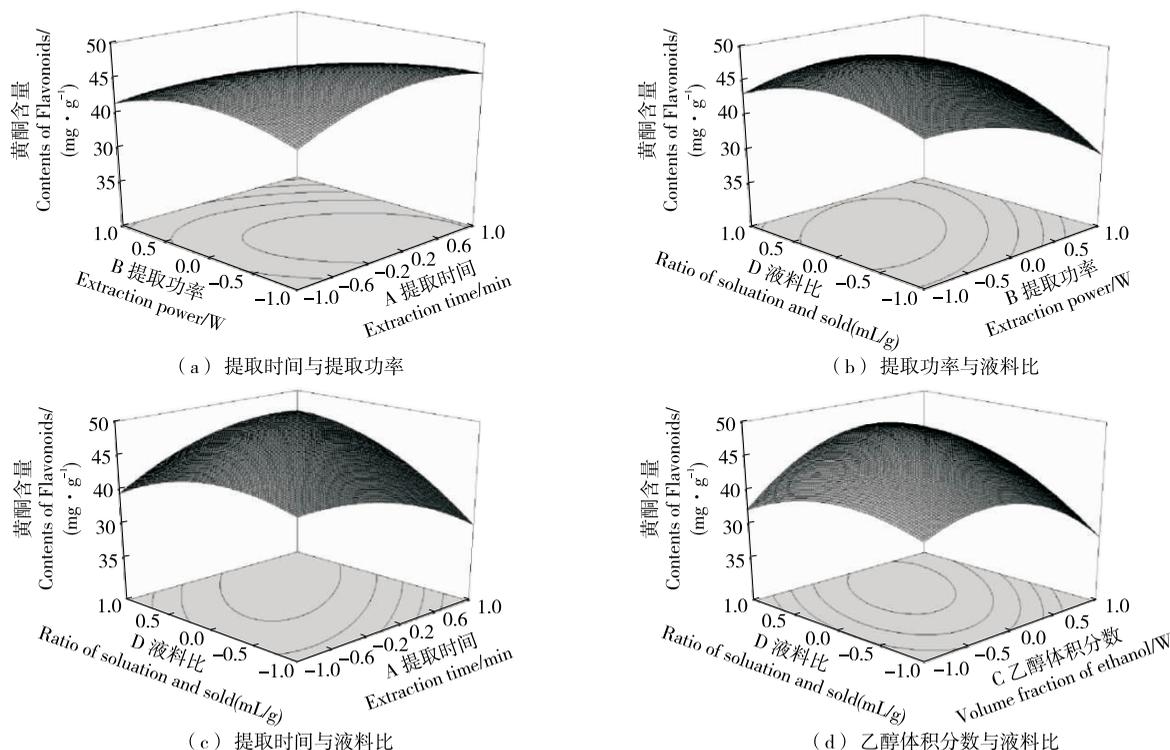


图 5 各因素交互作用对女贞子总黄酮含量影响

Figure 5 Response surface plots showing the interactive effects of various factors on total flavonoids yield from *Ligustrum lucidum* Ait

由 Design-Expert 8.0.6 软件得出女贞子总黄酮的最佳提取条件为:提取时间 110.49 min、提取功率 605.52 W、乙醇体积分数 60.27%、液料比 65.30 : 1 (mL/g)。考虑到实际操作的可行性,将最佳提取工艺调整为:提取时间 110 min、提取功率 640 W、乙醇体积分数 60%、液料比 65 : 1 (mL/g)。在此条件下进行 3 次验证实验,所得女贞子提取液中总黄酮含量平均值为 47.40 mg/g 与预测值 47.68 mg/g 接近,说明该模型对女贞子总黄酮提取工艺条件参数优化可靠,具有较好的应用价值。

2.3 女贞子总黄酮的体外抗氧化研究

2.3.1 女贞子总黄酮对小鼠红细胞氧化溶血的影响 由表 4 可知, H₂O₂ 可诱导细胞氧化损伤,加速细胞溶血,一定质量浓度范围的总黄酮能抑制 H₂O₂ 诱导的红细胞出现自氧化溶血现象。随着总黄酮质量浓度升高,红细胞溶血率逐渐下降,总黄酮抑制红细胞溶血的抑制率反而逐渐升高,提取物中总黄酮浓度与抑制率之间呈剂量依赖关系。当女贞子总黄酮浓度达到 1 000 mg/L 时,红细胞溶血的抑制率可高达 39.05%,显著高于其他各剂量组。

表 4 女贞子总黄酮对 H₂O₂ 诱导小鼠红细胞自氧化溶血的影响[†]

Table 4 Effectof total flavonoid extracts from *Ligustrum lucidum Ait* on the hemolysis of mouse RBCs

总黄酮浓度/ (mg · L ⁻¹)	A ₄₁₅	溶血率/%	抑制率/%
对照组	0.16 ± 0.02 ^{bcdef}	—	—
诱导组	1.94 ± 0.04 ^a	100	—
200	1.78 ± 0.01 ^b	85.40 ± 0.57 ^a	13.28 ± 3.58 ^{abcd}
400	1.77 ± 0.13 ^{bc}	82.25 ± 6.39 ^{ab}	16.48 ± 6.49 ^{abcd}
600	1.67 ± 0.07 ^{bcd}	74.37 ± 3.66 ^{bc}	24.48 ± 3.72 ^{abc}
800	1.53 ± 0.07 ^{bcde}	66.37 ± 3.56 ^{bc}	32.60 ± 3.61 ^{ab}
1 000	1.49 ± 0.03 ^{bcde}	60.02 ± 1.40 ^{bcd}	39.05 ± 1.42 ^a

† 同列不同字母表示差异显著(P<0.05)。

2.3.2 女贞子总黄酮对小鼠肝线粒体脂质过氧化的影响

由表 5 可知,总黄酮处理组小鼠肝线粒体 MDA 水平均低于正常诱导组,且随着总黄酮浓度的增加,小鼠肝线粒体 MDA 水平逐渐降低,有效地抑制了脂质过氧化物 MDA 的生成,总黄酮浓度与 MDA 水平呈剂量—效应关系。随着总黄酮浓度的增加,MDA 的抑制率逐渐增加,当总黄酮浓度达到 1 000 mg/L 时,抑制率可达到 53.24%,明显高于 200 mg/L 剂量组。

表 5 女贞子总黄酮对小鼠肝线粒体 MDA 生成的影响[†]

Table 5 Effectof total flavonoid extracts from *Ligustrum lucidum Ait* on MDA generation in mouse liver mitochondria

总黄酮浓度/ (mg · L ⁻¹)	MDA 含量/ (nmol · mg ⁻¹)	抑制率/%
对照组	1.48 ± 0.05 ^{bcd}	—
诱导组	2.17 ± 0.01 ^a	—
200	2.11 ± 0.07 ^{ab}	22.20 ± 2.56 ^{bcde}
400	1.76 ± 0.14 ^{bcd}	34.86 ± 5.12 ^{bcd}
600	1.47 ± 0.14 ^{bcd}	45.72 ± 5.12 ^{abc}
800	1.36 ± 0.03 ^{bed}	49.82 ± 1.00 ^{ab}
1 000	1.27 ± 0.15 ^{bc}	53.24 ± 5.41 ^a

† 同列不同字母表示差异显著(P<0.05)。

2.3.3 女贞子总黄酮对小鼠肝组织匀浆 MDA 生成的影响

如表 6 所示,在这 2 种体系中,女贞子总黄酮浓度在 200~1 000 mg/L 时,对小鼠肝组织匀浆 MDA 的生成具有抑制作用,且呈剂量—效应关系。当女贞子总黄酮浓度达到 1 000 mg/L 时,无诱导体系中 MDA 抑制率达到了 25.56%,Fe²⁺ + H₂O₂ 诱导体系中 MDA 抑制率达到了 36.10%。总体比较,女贞子总黄酮对诱导体系的小鼠肝组织匀浆 MDA 生成的抑制作用强于无诱导体系。

表 6 女贞子总黄酮对大鼠肝组织匀浆 MDA 生成的影响[†]

Table 6 Effect of total flavonoid extracts from *Ligustrum lucidum Ait* on MDA generation in mouse liver homogenate

总黄酮浓度/ (mg · L ⁻¹)	无诱导		Fe ²⁺ + H ₂ O ₂ 诱导	
	MDA 含量/(nmol · mg ⁻¹)	抑制率/%	MDA 含量/(nmol · mg ⁻¹)	抑制率/%
对照组	1.07 ± 0.13 ^a	—	1.32 ± 0.14 ^a	—
200	0.99 ± 0.04 ^{ab}	6.70 ± 3.38 ^a	1.28 ± 0.14 ^{ab}	3.24 ± 10.90 ^a
400	0.97 ± 0.07 ^{abc}	7.01 ± 5.28 ^{ab}	1.04 ± 0.10 ^{abc}	20.73 ± 7.88 ^{ab}
600	0.94 ± 0.11 ^{abcd}	14.25 ± 2.12 ^{abc}	0.94 ± 0.04 ^{bcd}	28.32 ± 2.85 ^{abc}
800	0.86 ± 0.06 ^{bed}	19.19 ± 2.04 ^{abc}	0.87 ± 0.14 ^{bcde}	34.20 ± 10.95 ^{abc}
1 000	0.69 ± 0.04 ^{bcde}	25.56 ± 1.25 ^{bcd}	0.84 ± 0.04 ^{bcdef}	36.10 ± 2.79 ^{bed}

† 同列不同字母表示差异显著(P<0.05)。

3 结论

本研究以女贞子总黄酮含量为指标,在单因素试验的基础上运用 Box-Behenken 试验设计原理,进行响应面分析,得到超声辅助提取总黄酮的最佳方案为:提取时间 110 min、提取功率 640 W、乙醇体积分数 60%、液料比 65:1 (mL/g),经试验验证提取的女贞子总黄酮含量平均值为 47.40 mg/g,与理论值基本一致。大量研究^[20]证实,植物黄酮有较好的抗氧化作用。因此通过体外抗氧化活性氧研究,适当剂量的女贞子黄酮能够显著抑制小鼠红细胞溶血($P<0.05$),抑制率最高为 39.05%;能够显著抑制小鼠肝线粒体 MDA 生成($P<0.05$),抑制率最高为 53.24%;能够显著抑制肝组织匀浆中 MDA 生成($P<0.05$)。上述表明,本研究优化的女贞子黄酮提取工艺,可获得抗氧化能力较高的黄酮类物质,具有较好的开发利用价值。

参考文献

[1] 刘静,赵海霞,袁丁,等.女贞子及其有效成分延缓衰老作用的研究进展[J].时珍国医国药,2016(12):2974-2977.
 [2] 女贞子 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定[J].中草药,2017(20):4198-4202.
 [3] 全会娟,胡魁伟,康琛,等.近十五年中药女贞子研究进展[J].中国实用医药,2009,4(36):1-5.
 [4] 曹兰秀,周永学,顿宝生,等.女贞子总黄酮对高脂模型大鼠脂代谢的影响[J].医学争鸣,2009(20):2129-2132.
 [5] 王晓洁,盛东峰.不同溶剂对女贞子黄酮提取效果和抑菌活性的影响[J].北方园艺,2014(9):137-139.
 [6] 戴一,宋祖荣,夏莲凤,等.女贞子酒抗氧化活性及相关成分浸出率测定[J].食品与发酵工业,2014,40(11):154-159.
 [7] 方芳,王凤忠.植物黄酮醇提取方法研究进展[J].食品工业科技,2018,39(7):323-328,334.

[8] 石峰,陈雨,张亚琴,等.泽泻总三萜超声辅助提取工艺优化[J].食品与机械,2018,34(3):175-179.
 [9] 曹兰秀,周永学,顿宝生,等.女贞子总黄酮对高脂模型小鼠脂代谢的分子靶点的研究[J].中成药,2010,32(10):1789-1790.
 [10] 曹兰秀.女贞子总黄酮对 HepG2 细胞脂代谢调节作用的研究[J].国际中医药杂志,2010,32(3):205-206.
 [11] STEVENS J F, MIRANDA C L, WOLTERS K R, et al. Identification and in Vitro Biological Activities of Hop Proanthocyanidins: Inhibition of nNOS Activity and Scavenging of Reactive Nitrogen Species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(12): 3435-3443.
 [12] HONG You-yu, BIN Lin-zhi. Antioxidant effect of Ganoderma polysaccharide peptide [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2003, 38(2): 85-88.
 [13] 余晓红,朱雪梅,李凤伟,等.芦苇叶黄酮类提取物体内体外抗氧化性研究[J].食品科学,2015,36(1):209-213.
 [14] 陈婷,徐文斌,洪怡蓝,等.响应面法优化甜叶菊残渣中总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J].食品科学,2016,37(18):52-57.
 [15] 林士惠,易运红,龙梓,等.超声波辅助提取香蕉叶多糖工艺的优化[J].南方农业学报,2014,45(2):295-298.
 [16] 罗磊,张冰洁,朱文学,等.响应面法优化超声辅助提取金银花叶黄酮工艺及其抗氧化活性[J].食品科学,2016,37(6):13-19.
 [17] 刘亚敏,刘玉民,马明,等.枫香树叶总黄酮提取工艺优化及含量动态变化[J].食品科学,2010,31(4):35-38.
 [18] 薛自萍,曹建康,姜微波.枣果皮中酚类物质提取工艺优化及抗氧化活性分析[J].农业工程学报,2009,25(S1):153-158.
 [19] 林启训.枇杷叶黄酮类化合物的水浸提工艺研究[J].农业工程学报,2005,21(7):190-193.
 [20] 张慧,张云,房燕茹,等.植物黄酮类化合物的药理活性研究进展[J].石化技术,2017,24(6):211.

(上接第 165 页)

[24] SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factor 1: Oxygen homeostasis and disease pathophysiology[J]. Trends in Molecular Medicine, 2001, 7(8): 345-350.
 [25] 楚秉泉.西藏羌活的抗缺氧功能成分分离及其作用机制研究[D].杭州:浙江大学,2017:65-67.
 [26] 郑晓佳,余婷,张华,等.表没食子儿茶素没食子酸酯对心肌细胞缺氧/复氧损伤的抑制作用及其机制[J].中国药理学通报,2017,33(11):1584-1588.
 [27] 庞晓斌,谢欣梅,赵清辉,等.红景天苷对人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响[J].中国药理学杂志,2014,49(3):195-198.
 [28] LIN Yi-huang, FANG Lian-hua, DU Guan-hua, et al. Pro-

gress in regulation of RhoA in myocardial ischemia/reperfusion[J]. Chin Pharmacol Bull, 2015, 31(10): 1336-1339.
 [29] ANJANA B, BHARAT B. Aggarwal. Receptor-Mediated Choreography of Life and Death[J]. Journal of Clinical Immunology, 2003, 23(5): 317-332.
 [30] BARFOLOMEEV E, GONCHAROV T, FEDOROVA A V, et al. c-IAP and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor α (TNF α) induced NF κ B activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(34): 12429-12434.
 [31] RAUERT H, WICOVSKY A, MÜLLER N, et al. Membrane Tumor Necrosis Factor (TNF) Induces p100 Processing via TNF Receptor-2 (TNFR2) [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(10): 7394-7404.