

# 酸枣叶黄酮的提取工艺优化 及其抗秀丽隐杆线虫氧化损伤活性

孙 艳<sup>1</sup>, 崔旭盛<sup>2</sup>, 刘 静<sup>1</sup>, 田 贺<sup>1</sup>, 杨艳芳<sup>1</sup>, 李雅芬<sup>1</sup>, 鲍晶晶<sup>1</sup>, 李春林<sup>1</sup>, 王 轻<sup>1</sup>, 张彦青<sup>1,\*</sup>, 解军波<sup>3</sup>  
(1.天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134;  
2.石家庄以岭药业股份有限公司, 河北石家庄 050035;  
3.天津中医药大学中药学院, 天津 301617)

**摘 要:**运用响应面法优化酸枣叶黄酮的超声辅助提取工艺,并探究其抗氧化活性。在单因素基础上,筛选出液料比、乙醇浓度、超声功率和超声时间并设计响应面实验。结果表明最优工艺条件为,液料比 30.25:1 mL/g、乙醇浓度 79.00%、超声功率 301.00 W、超声时间 32.00 min,酸枣叶黄酮实际提取率 4.21%,与预测值 4.51% 相比,相对误差为 6.65%,证明模型理论预测值与实际值拟合效果良好。制得的酸枣叶黄酮对 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟自由基的半数清除浓度(IC<sub>50</sub>)分别为 111.51、23.06 和 253.73 μg/mL,具有较强的还原力。酸枣叶黄酮能有效增强秀丽隐杆线虫对热应激、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激的抗性,抑制氧化损伤导致的线虫体内 GSH-Px、SOD 酶活力的降低,抑制 MDA 含量的增加,具有良好的抗氧化损伤作用。

**关键词:**酸枣叶黄酮,超声辅助提取,响应面法,秀丽隐杆线虫,抗氧化损伤

## Optimization of Extraction Process of Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* Leaves and Its Antioxidant Damage Activity in *Caenorhabditis elegans*

SUN Yan<sup>1</sup>, CUI Xu-sheng<sup>2</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>, TIAN He<sup>1</sup>, YANG Yan-fang<sup>1</sup>, LI Ya-fen<sup>1</sup>, BAO Jing-jing<sup>1</sup>,  
LI Chun-lin<sup>1</sup>, WANG Qing<sup>1</sup>, ZHANG Yan-qing<sup>1,\*</sup>, XIE Jun-bo<sup>3</sup>

(1.College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;

2.Shijiazhuang Yiling pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang, 050035, China;

3.College of Traditional Chinese Pharmacy, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

**Abstract:** To optimize the ultrasonic-assisted extraction process of flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* leaves (ZSL), the response surface methodology was used and its antioxidant activity was explored. Based on the single factor experiment, the ratio of liquid to material, ethanol concentration, ultrasonic power and ultrasonic time were selected and response surface experiment was designed. The optimal extraction conditions were as follows: Ratio of liquid to material 30.25:1 mL/g, ethanol concentration 79.00%, ultrasonic power 301.00 W, and ultrasonic time 32.00 min. The actual extraction rate of was 4.21%. The relative error was 6.65% compared with the predicted value of 4.51%, which proved that the theoretical predicted value of the model fitted well with the actual value. The half maximal inhibitory concentration(IC<sub>50</sub>) of the flavonoids to DPPH, ABTS and ·OH radicals were 111.51, 23.06 and 253.73 μg/mL, respectively, indicated that it had strong reducing power. The flavonoids from ZSL could effectively enhance the resistance to heat stress and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative stress of *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*), inhibited the decrease of GSH-Px and SOD activity in worms caused by oxidative damage, inhibited the increasing of MDA content, and had a good role of the resistance to oxidative damage.

**Key words:** flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* leaves; ultrasonic assisted extraction; response surface methodology; *Caenorhabditis elegans*; antioxidant damage

中图分类号: TS201.4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2020)08-0143-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020.08.023

引文格式: 孙艳, 崔旭盛, 刘静, 等. 酸枣叶黄酮的提取工艺优化及其抗秀丽隐杆线虫氧化损伤活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(8): 143-150.

收稿日期: 2019-08-12

作者简介: 孙艳(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药食同源物质研究与开发, E-mail: syan0326@163.com。

\* 通讯作者: 张彦青(1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品、药品组分结构和营养功能研究, E-mail: zhyqing@tjcu.edu.cn。

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金项目(2017KJ175)。

酸枣叶又名棘叶,是鼠李科枣属植物酸枣(*Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chow)的叶子<sup>[1]</sup>,具敛疮解毒之效<sup>[2]</sup>。酸枣叶中含有丰富的三萜烯酸<sup>[3-4]</sup>、酚酸<sup>[5]</sup>、黄酮类化合物<sup>[6]</sup>及核苷类<sup>[7]</sup>等成分,具有显著的抗氧化、抗炎抑菌、抗病毒等多种活性<sup>[8-9]</sup>。另外,酸枣叶在宁心安神、提高睡眠质量等方面具有其独到功效,具有“东方睡叶”之美称<sup>[10]</sup>。

近年来,酸枣叶除少量药用和制茶外,主要用于其化学成分的检测分析,而对有效成分的提取方法和生物活性的研究较少。研究表明,黄酮类成分是酸枣叶中主要的活性成分<sup>[11]</sup>,具有广泛的生物活性。目前,黄酮类物质的提取方法多是浸提法和加热回流法<sup>[12]</sup>,但是浸提法提取时间太长,加热回流法所需温度太高,有效成分结构容易遭到破坏。近些年来超声辅助提取技术被广泛用于提取中药化学成分<sup>[13]</sup>,展现出了良好的应用前景。

本研究将超声辅助提取技术和响应面优化方法相结合,建立二项式回归模型,对影响酸枣叶黄酮提取率的主要因素及其交互作用进行分析探讨,优化最佳提取工艺参数。以 $V_c$ 为对照,采用多种体外抗氧化活性方法考察酸枣叶黄酮的抗氧化活性。以秀丽隐杆线虫为模型,通过考察热应激抗性、氧化应激抗性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量等方面,深入研究酸枣叶黄酮对秀丽隐杆线虫氧化损伤的保护作用,对于综合开发利用酸枣资源具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

酸枣叶 河北邢台;芦丁标准品(纯度>98%) 北京化学试剂公司;D-101型大孔吸附树脂 天津市南开大学化工厂;野生型秀丽隐杆线虫(N2)、大肠杆菌 OP50 *Caenorhabditis Genetics Center*;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒 南京建成生物工程研究所;DPPH、ABTS *Sigma-Aldrich*;铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、水杨酸、硫酸亚铁 天津市福晨化学试剂厂;30%  $H_2O_2$ 、DMSO、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、次氯酸钠、氢氧化钠、氯化钠 天津市赢达稀贵化学试剂厂;蛋白陈、琼脂、酵母粉、氯化钙、硫酸镁、胆固醇、5-氟尿嘧啶 北京博奥科技有限公司;实验中使用的所有试剂 均为分析纯。

SB25-12 DTD 型数控超声波清洗器(40 kHz) 宁波新芝生物科技有限公司;V-700 型旋转蒸发器 瑞士 Buchi 公司;ALPHA 1-2LD PLUS 型真空冷冻干燥机 德国 Marin Christ 公司;SpectraMax-M5 多功能读板机 Molecular Devices, USA;DZKW-D-2 电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器有限公司;HNY2102 恒温培养箱 天津市欧诺仪器仪表有限公司;体视显微镜 丹东市百特仪器有限公司;VD-650-U 超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 酸枣叶黄酮的提取 酸枣叶干燥(50~60℃下干燥至恒重)、粉碎、过40目筛后,按照一定的料液比加入一定浓度的乙醇,然后采用超声辅助提取法在一定的超声温度、一定的超声功率下超声一定的时间,提取酸枣叶黄酮,并通过单因素实验和响应面实验对提取工艺参数进行优化。

1.2.2 单因素实验 本研究选择影响黄酮提取率的液料比、乙醇浓度、提取温度、超声功率和超声时间<sup>[14]</sup>五个因素进行单因素考察,考察因素与水平如表1所示。

表1 单因素考察因素及水平  
Table 1 Investigation factors and levels of single factor experiment

| 因素        | 水平   |      |      |      |      |
|-----------|------|------|------|------|------|
| 液料比(mL/g) | 15:1 | 20:1 | 25:1 | 30:1 | 35:1 |
| 乙醇浓度(%)   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   |
| 超声温度(℃)   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| 超声功率(W)   | 200  | 250  | 300  | 350  | 400  |
| 超声时间(min) | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |

1.2.3 响应面优化实验 在单因素实验的基础上,筛选出液料比、乙醇浓度、超声功率、超声时间四个影响因素,以这四个因素为自变量,酸枣叶黄酮提取率(Y)为响应值设计响应面实验<sup>[15]</sup>,优化酸枣叶黄酮提取工艺,并在此基础上进行验证实验。

表2 响应面考察因素与水平  
Table 2 Factors and levels coding of response surface analysis

| 水平 | 因素          |           |           |             |
|----|-------------|-----------|-----------|-------------|
|    | A 液料比(mL/g) | B 乙醇浓度(%) | C 超声功率(W) | D 超声时间(min) |
| -1 | 25:1        | 70        | 250       | 30          |
| 0  | 30:1        | 80        | 300       | 40          |
| 1  | 35:1        | 90        | 350       | 50          |

1.2.4 酸枣叶黄酮提取率的测定 以芦丁标准品为对照,采用亚硝酸钠-硝酸铝法<sup>[16]</sup>测定黄酮含量。以芦丁含量(mg/mL)为横坐标,吸光度为纵坐标,得线性回归方程: $y = 18.88x - 0.006$  ( $R^2 = 0.9993$ ),在0.01~0.05 mg/mL 范围内线性关系良好。

所有样品低速(4000 r/min)离心3 min后,精密吸取上清液0.50 mL于10 mL量瓶中,依法测定吸光度,按标准方程计算提取液中黄酮的浓度,并计算提取率。

$$\text{黄酮提取率}(\%) = \frac{C \times N \times V}{W} \times 100$$

式中:C:提取液中黄酮的浓度,mg;N:稀释倍数;V:提取液体积,mL;W表示样品重量,mg。

1.2.5 酸枣叶黄酮的分离纯化 以最优工艺制备的酸枣叶醇提物为原料,D101型大孔吸附树脂分离纯化<sup>[17]</sup>,依次用纯水、20%、50%、70%、95%乙醇溶液洗脱,收集50%乙醇洗脱液,旋转蒸发浓缩,真空冷冻干燥,得到酸枣叶黄酮粉末。通过紫外检测法检测黄酮纯度为69.04%,用于后续的抗氧化活性研究。

1.2.6 酸枣叶黄酮体外抗氧化活性实验 采用铁氰化钾还原法<sup>[18]</sup>测定黄酮的总还原力; DPPH 法<sup>[19]</sup>测定黄酮对 DPPH 自由基的清除能力; ABTS 法<sup>[20]</sup>测定黄酮对 ABTS 自由基的清除率; 水杨酸法<sup>[21]</sup>测定黄酮对羟自由基的清除率, 并计算半数清除浓度 ( $IC_{50}$ ),  $V_c$  作为阳性对照。

1.2.7 秀丽隐杆线虫培养 野生型秀丽隐杆线虫在 20 ℃ 条件下于 NGM 固体培养基上培养, 并在 NGM 培养基表面涂布大肠杆菌 OP50 作为线虫的食物。采用次氯酸钠法<sup>[22]</sup>进行线虫的同步化, 同步化后的线虫培养至 L4 期, 转移到含有 50、100 和 200  $\mu\text{g/mL}$  的酸枣叶黄酮的培养基中培养 48 h, 1% DMSO 作为对照。

1.2.8 秀丽隐杆线虫急性氧化应激实验

1.2.8.1 热应激实验 将同步化至 L4 期的线虫分别在含有 50、100 和 200  $\mu\text{g/mL}$  酸枣叶黄酮的培养基上培养 48 h, 1% DMSO 作为对照。之后用 M9 缓冲液洗涤 3 次, 转移到含有 1% 5-氟尿嘧啶的 NGM 培养基中, 35 ℃ 恒温培养<sup>[23-24]</sup>, 每 2 h 记录线虫存活数量, 直至线虫全部死亡。

1.2.8.2  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激实验 将同步化至 L4 期的线虫分别在含有 50、100 和 200  $\mu\text{g/mL}$  酸枣叶黄酮的培养基上培养 48 h, 1% DMSO 作为对照。之后用

M9 缓冲液洗涤 3 次, 转移到含有 1% 5-氟尿嘧啶和 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 NGM 培养基中<sup>[25]</sup>, 20 ℃ 恒温培养, 每小时记录线虫存活数量, 直至线虫全部死亡。

1.2.9 秀丽隐杆线虫体内抗氧化酶活力和丙二醛含量测定 将同步化至 L4 期的线虫设置两组, 均分别在含有 50、100 和 200  $\mu\text{g/mL}$  酸枣叶黄酮的培养基上培养 48 h, 1% DMSO 作为对照。其中一组转移到 35 ℃ 培养 6 h 诱导线虫氧化损伤, 一组 20 ℃ 培养 6 h, 生理盐水洗涤 3 次后, 加入 200  $\mu\text{L}$  生理盐水冰上匀浆, 离心, 取上清液<sup>[26]</sup>, 根据试剂盒的操作方法测定谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的活力和丙二醛 (MDA) 的含量。

### 1.3 数据处理

所有实验均重复三次, 结果以  $M \pm S$  表示。使用 Design-Expert (v8.0) 软件进行中心复合设计和数据处理。Graphpad Prism 5.0 进行统计分析, SPSS 16.0 进行单向方差分析 (ANOVA), 其中  $P < 0.05$  表示有显著性差异,  $P < 0.01$  表示极显著,  $P < 0.001$  表示高度显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

各因素对酸枣叶黄酮提取率的影响如图 1 所示。图 1a 中随着液料比的升高, 黄酮提取率呈现先

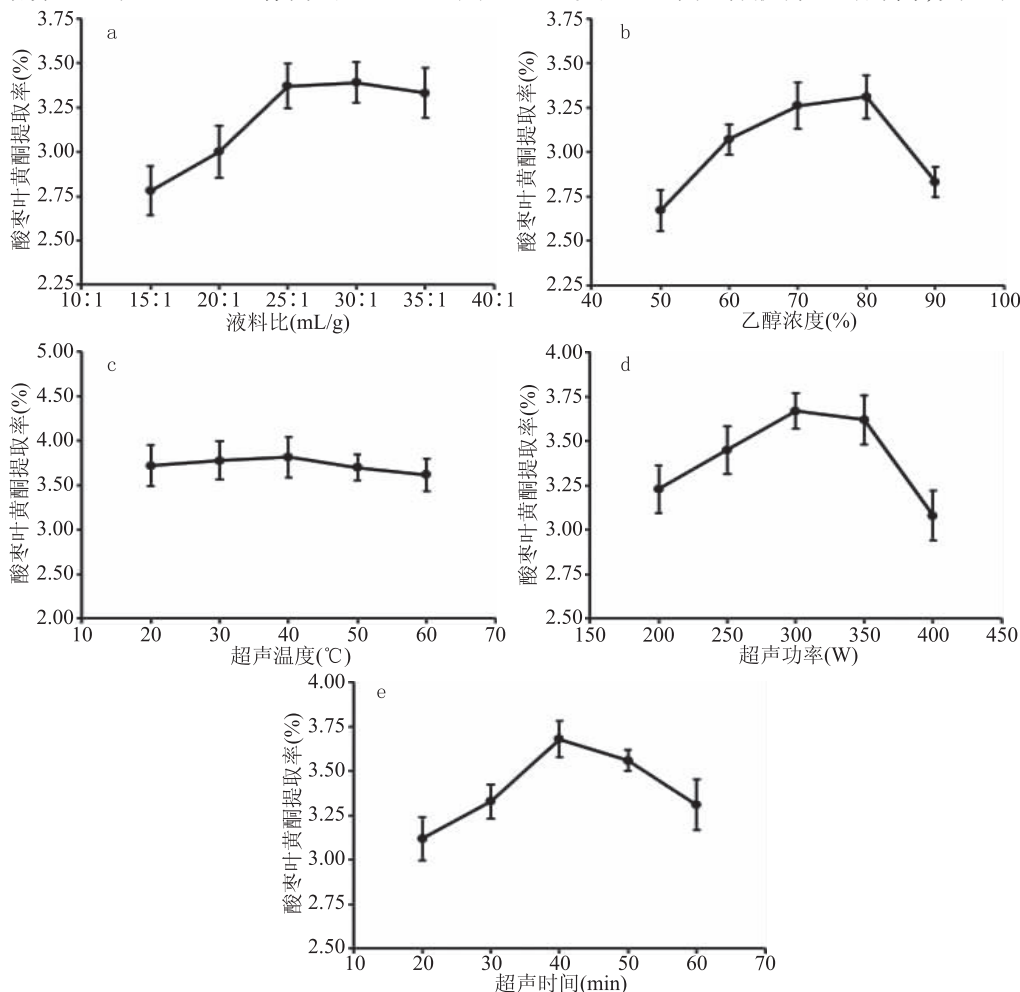


图 1 单因素水平对酸枣叶黄酮提取率的影响

Fig.1 Effect of single factor and level on the extraction rate of flavonoids from ZSL

升高后缓慢降低的趋势,当液料比为 30:1 mL/g 时,提取率达到最大值 3.39%,这可能是由于料液比在 30:1 mL/g 时绝大部分的有效成分已经溶出,继续增大料液比并不能提高有效成分的溶出率<sup>[27]</sup>。图 1b 可以看出,酸枣叶黄酮提取率随着乙醇浓度的升高而逐渐升高,当乙醇浓度为 50% 时,黄酮提取率最大,为 3.31%,之后随着乙醇浓度的升高,黄酮提取率逐渐降低,这可能与黄酮的极性相关,随着乙醇体积分数的变化,溶剂的极性发生变化,黄酮的提取率随之改变<sup>[28]</sup>。图 1d 可以看出,随着超声功率的增大,酸枣叶细胞壁的破碎程度增大,有效成分更易溶出,所以酸枣叶黄酮的提取率逐渐增大,在 300 W 时提取率为 3.67%,之后超声功率过大破坏了黄酮的分子结构从而使提取率降低<sup>[29]</sup>。图 1e 可以看出,酸枣叶中的黄酮类成分随着时间的延长溶出率逐渐增大,黄酮的提取率逐渐增大,在 40 min 时提取率出现最大值 3.68%,之后提取率降低可能是因为长时间的超声振动导致黄酮的结构遭到破坏,黄酮溶出率降低<sup>[30]</sup>。由图 1c 可以看出,超声温度在 20~60 ℃ 范围内对酸枣叶黄酮提取率无显著影响。所以选择液料比(25:1、30:1、35:1 mL/g)、乙醇浓度(70%、80%、90%)、超声功率(250、300、350 W)和超声时间(30、40、50 min)这四个因素设计响应面实验。

## 2.2 响应面法优化提取工艺

2.2.1 响应面实验结果与分析 根据表 2 中的因素与水平值,建立四因素三水平响应面实验优化提取工艺。响应面实验设计与结果见表 3。

2.2.2 方差分析和二次多项回归方程拟合 由 Box-Behnken 实验拟合出的回归方程为:

$$Y = 4.38 + 0.12A - 0.12B + 3.333E - 0.003C - 0.28D + 0.18AB - 0.098AC + 0.073AD + 0.12BC + 0.087BD - 0.055CD - 0.30A^2 - 0.63B^2 - 0.57C^2 - 0.18D^2$$

二项式回归模型系数的显著性分析结果见表 4。A(液料比)对酸枣叶黄酮提取率有极显著影响( $P < 0.01$ ),B(乙醇浓度)对酸枣叶黄酮提取率有显著影响( $P < 0.05$ ),D(超声时间)对酸枣叶黄酮提取率有高度显著影响( $P < 0.001$ ),C(超声功率)对酸枣叶黄酮提取率无显著影响( $P > 0.05$ ),二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  和  $D^2$  达到高度显著水平( $P < 0.001$ )。各因素的影响重要性依次为:超声时间(D) > 液料比(A) > 乙醇浓度(B) > 超声功率(C)。

2.2.3 因素间的交互效应分析 通过 Design-expert.V8.0.6 软件设计三维响应面来反映最佳区域,固定两个影响因素为中值,代入模型方程考察其余两个因素间的相互作用<sup>[31-32]</sup>,结果见图 2。

由图 2 可以看出,随着各因素的水平在一定范围的增大,酸枣叶黄酮提取率先升高后降低。液料比和乙醇浓度之间的交互作用,乙醇浓度和超声功率之间的交互作用均对响应值有显著影响,其余两两因素间交互作用对响应值没有显著的影响。

2.2.4 最佳提取率验证 从三维响应面图中选取 Y 较理想的区域,求其代码对应的实际值,结合实际得出最佳提取工艺,由响应面软件分析得到酸枣叶黄

表 3 响应面实验设计与结果

Table 3 Design and results of response surface experiment

| 实验号 | A 液料比<br>(mL/g) | B 乙醇<br>浓度<br>(%) | C 超声<br>功率<br>(W) | D 超声<br>时间<br>(min) | 黄酮<br>提取率<br>(%) |
|-----|-----------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------|
| 1   | -1              | -1                | 0                 | 0                   | 3.68             |
| 2   | 1               | -1                | 0                 | 0                   | 3.56             |
| 3   | -1              | 1                 | 0                 | 0                   | 2.98             |
| 4   | 1               | 1                 | 0                 | 0                   | 3.59             |
| 5   | 0               | 0                 | -1                | -1                  | 3.80             |
| 6   | 0               | 0                 | 1                 | -1                  | 3.96             |
| 7   | 0               | 0                 | -1                | 1                   | 3.42             |
| 8   | 0               | 0                 | 1                 | 1                   | 3.36             |
| 9   | -1              | 0                 | 0                 | -1                  | 4.07             |
| 10  | 1               | 0                 | 0                 | -1                  | 4.30             |
| 11  | -1              | 0                 | 0                 | 1                   | 3.38             |
| 12  | 1               | 0                 | 0                 | 1                   | 3.90             |
| 13  | 0               | -1                | -1                | 0                   | 3.42             |
| 14  | 0               | 1                 | -1                | 0                   | 2.97             |
| 15  | 0               | -1                | 1                 | 0                   | 3.17             |
| 16  | 0               | 1                 | 1                 | 0                   | 3.21             |
| 17  | -1              | 0                 | -1                | 0                   | 3.39             |
| 18  | 1               | 0                 | -1                | 0                   | 3.68             |
| 19  | -1              | 0                 | 1                 | 0                   | 3.56             |
| 20  | 1               | 0                 | 1                 | 0                   | 3.46             |
| 21  | 0               | -1                | 0                 | -1                  | 4.08             |
| 22  | 0               | 1                 | 0                 | -1                  | 3.75             |
| 23  | 0               | -1                | 0                 | 1                   | 3.24             |
| 24  | 0               | 1                 | 0                 | 1                   | 3.26             |
| 25  | 0               | 0                 | 0                 | 0                   | 4.27             |
| 26  | 0               | 0                 | 0                 | 0                   | 4.43             |
| 27  | 0               | 0                 | 0                 | 0                   | 4.58             |
| 28  | 0               | 0                 | 0                 | 0                   | 4.30             |
| 29  | 0               | 0                 | 0                 | 0                   | 4.33             |

酮最高提取率为 4.51%。最佳提取工艺条件为液料比 30.25:1 mL/g、乙醇浓度 79.00%、超声功率 301.00 W、超声时间 32.00 min。

在最佳提取工艺条件下提取酸枣叶黄酮,平行实验三组,测得黄酮提取率为 4.21%,与预测值 4.51% 相比,相对误差为 6.65%,且 t 检验的结果差异不显著( $P > 0.05$ ),说明该模型能够真实反映变量与响应值之间的变化关系。

## 2.3 酸枣叶黄酮的体外抗氧化作用

由图 3a 可知,在 100~500  $\mu\text{g/mL}$  内,酸枣叶黄酮的总还原力随着样品浓度的升高而增强,其中 113.03  $\mu\text{g/mL}$  的酸枣叶黄酮的总还原力与 60.00  $\mu\text{g/mL}$  的  $V_c$  相当,酸枣叶黄酮的总还原力约是  $V_c$  的 0.531 倍,具有较强的总还原力;酸枣叶黄酮对 DPPH 自由基(图 3b)、ABTS 自由基(图 3c)、羟自由基(图 3d)均具有清除作用,且存在剂量依赖关系,均呈现出良好的线性关系,由此可计算出酸枣叶黄酮对 DPPH 自由基的半数清除浓度( $IC_{50}$ )为 111.51  $\mu\text{g/mL}$  ( $V_c$  的

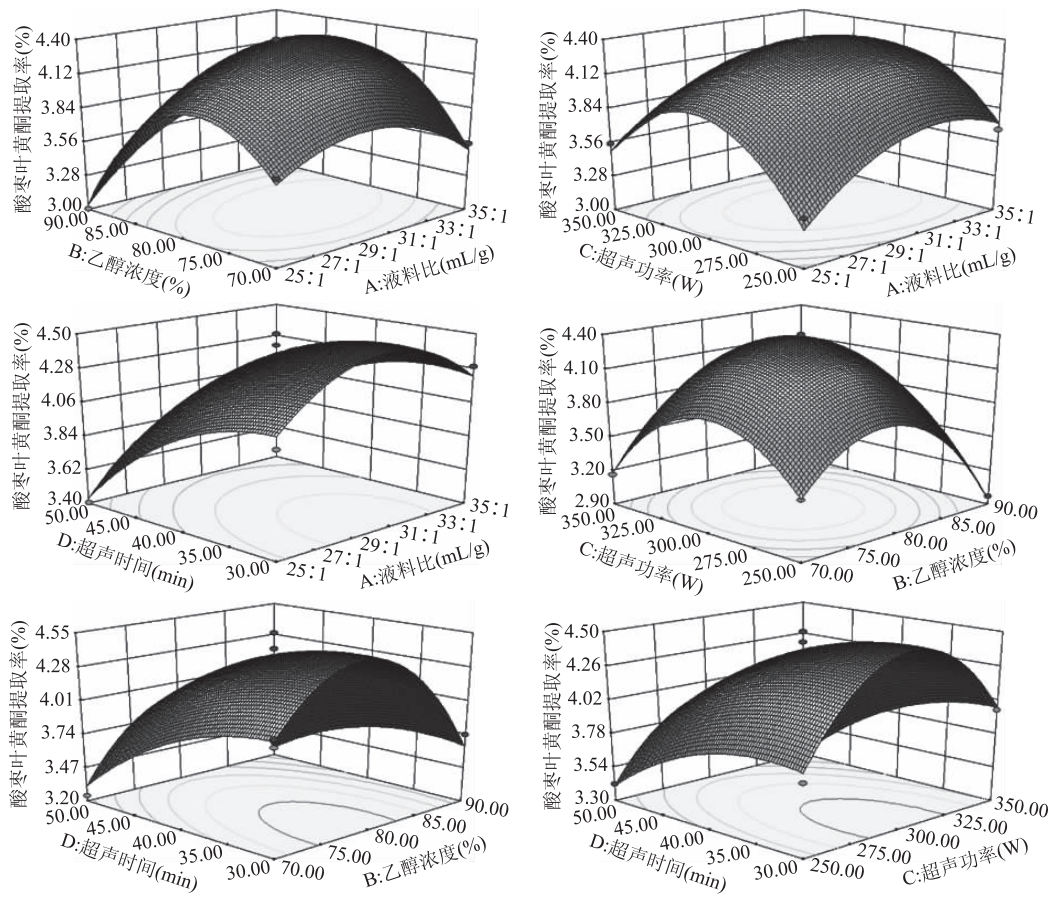


图2 两两因素交互作用对酸枣叶黄酮提取率影响的响应面图

Fig.2 Response surface plots of the interaction of various factors on the extraction rate of flavonoids from ZSL

表4 回归模型的方差分析结果

Table 4 Variance analysis of the regression model

| 方差来源                                                      | 平方和                    | 自由度 | 均方                     | F 值    | P 值     | 显著性 |
|-----------------------------------------------------------|------------------------|-----|------------------------|--------|---------|-----|
| 模型                                                        | 5.56                   | 14  | 0.40                   | 39.69  | <0.0001 | *** |
| A                                                         | 0.17                   | 1   | 0.17                   | 16.95  | 0.0010  | **  |
| B                                                         | 0.16                   | 1   | 0.16                   | 15.96  | 0.0013  | *   |
| C                                                         | $1.920 \times 10^{-4}$ | 1   | $1.920 \times 10^{-4}$ | 0.019  | 0.8918  | NS  |
| D                                                         | 0.96                   | 1   | 0.96                   | 95.78  | <0.0001 | *** |
| AB                                                        | 0.14                   | 1   | 0.14                   | 13.54  | 0.0025  | **  |
| AC                                                        | 0.037                  | 1   | 0.037                  | 3.69   | 0.0754  | NS  |
| AD                                                        | 0.021                  | 1   | 0.021                  | 2.10   | 0.1691  | NS  |
| BC                                                        | 0.058                  | 1   | 0.058                  | 5.81   | 0.0303  | *   |
| BD                                                        | 0.030                  | 1   | 0.030                  | 3.03   | 0.1038  | NS  |
| CD                                                        | 0.012                  | 1   | 0.012                  | 1.19   | 0.2941  | NS  |
| A <sup>2</sup>                                            | 0.57                   | 1   | 0.57                   | 57.46  | <0.0001 | *** |
| B <sup>2</sup>                                            | 2.55                   | 1   | 2.55                   | 254.93 | <0.0001 | *** |
| C <sup>2</sup>                                            | 2.07                   | 1   | 2.07                   | 207.00 | <0.0001 | *** |
| D <sup>2</sup>                                            | 0.2                    | 1   | 0.20                   | 20.01  | 0.0005  | *** |
| 残差                                                        | 0.14                   | 14  | $9.998 \times 10^{-3}$ |        |         |     |
| 失拟项                                                       | 0.075                  | 10  | $7.510 \times 10^{-3}$ | 0.90   | 0.8526  | NS  |
| 纯误差                                                       | 0.065                  | 4   | 0.016                  |        |         |     |
| 总和                                                        | 5.70                   | 28  |                        |        |         |     |
| $R^2 = 0.9754$ $R^2_{Adj} = 0.9508$ $R^2_{Pred} = 0.9063$ |                        |     |                        |        |         |     |
| Adep Precisor = 19.907      C.V.% = 2.71                  |                        |     |                        |        |         |     |

注：\* 表示有显著差异(0.01 < P ≤ 0.05)；\*\* 表示有极显著差异(0.001 < P ≤ 0.01)；\*\*\* 表示有高度显著差异(P ≤ 0.001)；NS 表示无显著差异(P > 0.05)。

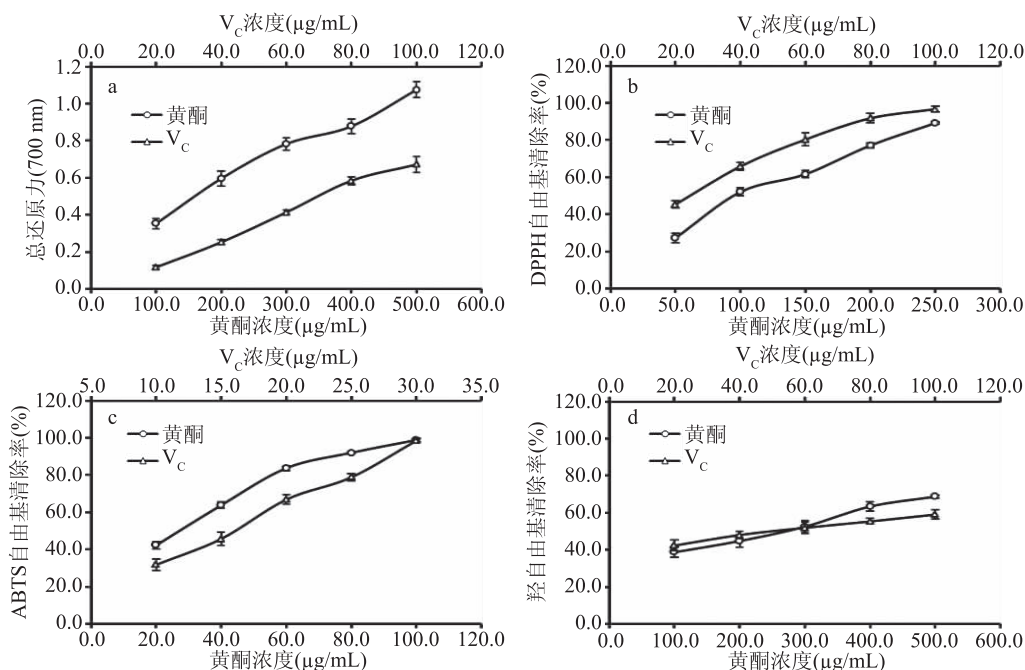


图3 酸枣叶黄酮的体外抗氧化活性

Fig.3 Antioxidant activity *in vitro* of flavonoids from ZSL

IC<sub>50</sub>为19.61 μg/mL),黄酮清除DPPH自由基的能力约是V<sub>c</sub>的0.176倍;黄酮对ABTS自由基的半数清除浓度(IC<sub>50</sub>)为23.06 μg/mL(V<sub>c</sub>的IC<sub>50</sub>为15.70 μg/mL),黄酮清除ABTS自由基的能力约是V<sub>c</sub>的0.681倍;黄酮对羟自由基的半数清除浓度(IC<sub>50</sub>)为253.73 μg/mL(V<sub>c</sub>的IC<sub>50</sub>为53.42 μg/mL),黄酮清除羟自由基的能力约是V<sub>c</sub>的0.211倍。综上,酸枣叶黄酮具有良好的抗氧化活性。

## 2.4 酸枣叶黄酮抗秀丽隐杆线虫氧化损伤作用

**2.4.1 酸枣叶黄酮抗秀丽隐杆线虫热应激作用的影响** 如图4所示,与对照组相比,经过酸枣叶黄酮给药培养后的N2线虫的存活率均明显提高,且存在显著差异,50、100和200 μg/mL酸枣叶黄酮分别延长线虫平均寿命11.70%、19.87%、38.95%,说明酸枣叶黄酮能有效提高线虫对热应激的抵抗能力。

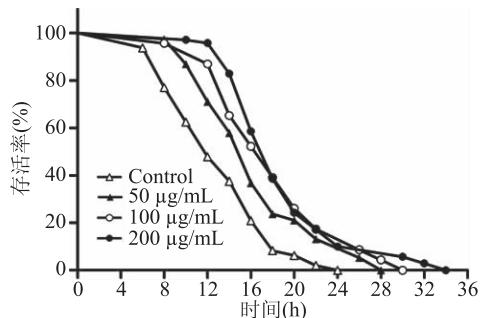


图4 酸枣叶黄酮抗秀丽隐杆线虫热应激作用的影响

Fig.4 Effect of flavonoids from ZSL on the heat stress resistance of *C. elegans*

**2.4.2 酸枣叶黄酮抗秀丽隐杆线虫H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化应激作用的影响** 如图5所示,与对照组相比,酸枣叶黄酮能有效延长H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化应激条件下N2线虫的存活时间,且存在显著差异,50、100和200 μg/mL

酸枣叶黄酮分别延长线虫平均寿命25.68%、42.82%、51.39%,说明酸枣叶黄酮能显著增强线虫对氧化应激的抗性。

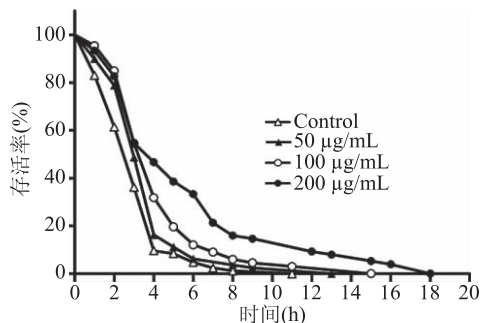


图5 酸枣叶黄酮抗秀丽隐杆线虫氧化应激作用的影响

Fig.5 Effect of flavonoids from ZSL on the oxidative stress resistance of *C. elegans*

**2.4.3 酸枣叶黄酮对秀丽隐杆线虫体内抗氧化酶活力和丙二醛含量的影响**

**2.4.3.1 酸枣叶黄酮对秀丽隐杆线虫体内GSH-Px酶活力的影响** 如图6所示,给药组与空白组相比,GSH-Px酶活力不存在显著性差异,说明酸枣叶黄酮对正常情况下线虫的GSH-Px酶活力无显著影响。35℃培养6h后,GSH-Px酶活力显著降低(40.25%),而50、100和200 μg/mL酸枣叶黄酮均能抑制氧化损伤导致的线虫体内GSH-Px酶活力减弱,且GSH-Px酶活力分别升高至43.50%、54.39%和75.90%,t-检验结果表明100、200 μg/mL酸枣叶黄酮组和对照组之间存在高度显著差异( $P < 0.001$ ),酸枣叶黄酮可以有效抑制氧化损伤导致的线虫体内GSH-Px酶活力降低。

**2.4.3.2 酸枣叶黄酮对秀丽隐杆线虫体内SOD酶活力的影响** 如图7所示,给药组与空白组相比,

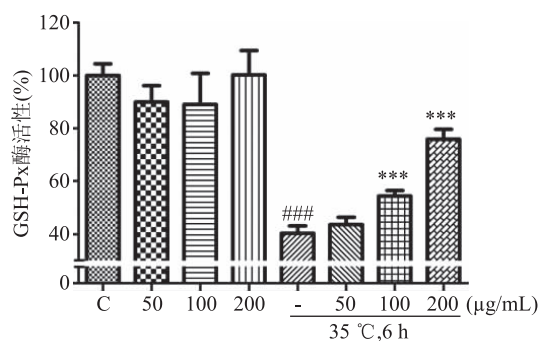


图6 酸枣叶黄酮对秀丽隐杆线虫体内GSH-Px酶活力的影响

Fig.6 Effect of flavonoids from ZSL on the vitality of GSH-Px in *C.elegans*

注: C: 20 °C, 1% DMSO; -: 35 °C, 1% DMSO;

#表示与C组比较, \*表示与-组比较, ##表示或\*表示  $P < 0.05$  差异显著, ###或\*\*\*表示  $P < 0.01$  差异极显著, \*\*\*或\*\*\*表示  $P < 0.001$  差异高度显著;图7、图8同。

T-SOD酶活力和CuZn-SOD酶活力均不存在显著性差异,说明酸枣叶黄酮对正常情况下线虫的SOD酶活力无显著影响。35 °C培养6 h后,酶活力显著降低,而酸枣叶黄酮能抑制氧化损伤线虫体内SOD酶活力的降低,且100 µg/mL酸枣叶黄酮组和对照组之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 200 µg/mL酸枣叶黄酮组和对照组之间存在高度显著差异 ( $P < 0.001$ ),说明酸枣叶黄酮可以有效抑制氧化损伤导致的线虫体内SOD酶活力降低。

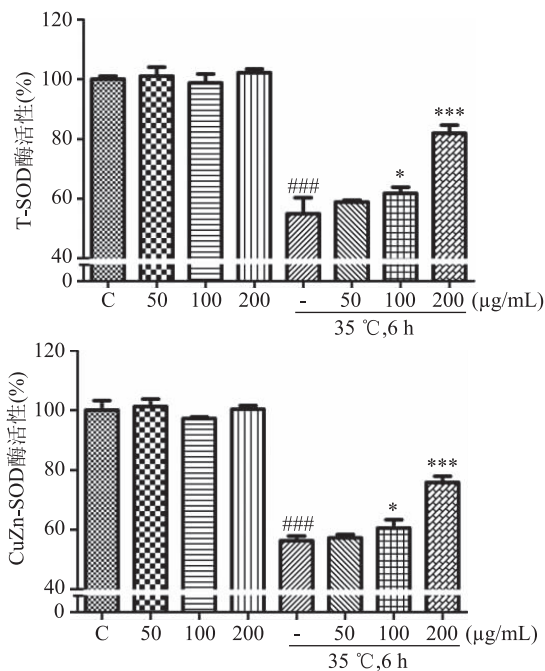


图7 酸枣叶黄酮对秀丽隐杆线虫体内SOD酶活力的影响

Fig.7 Effect of flavonoids from ZSL on the vitality of SOD in *C.elegans*

2.4.3.3 酸枣叶黄酮对秀丽隐杆线虫体内丙二醛含量的影响 如图8所示,给药组与空白组相比,MDA含量不存在显著性差异,说明酸枣叶黄酮对正常情况下线虫的MDA含量无显著影响。35 °C培养6 h

后,MDA含量显著升高(226.26%),而50、100和200 µg/mL酸枣叶黄酮均能抑制氧化损伤导致的线虫体内MDA含量升高,且MDA含量分别降低至211.03%、182.05%和156.62%。且100 µg/mL酸枣叶黄酮组和对照组之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 200 µg/mL酸枣叶黄酮组和对照组之间存在高度显著差异 ( $P < 0.001$ )。上述结果表明,酸枣叶黄酮可以有效抑制氧化损伤导致的线虫体内MDA含量的增加。

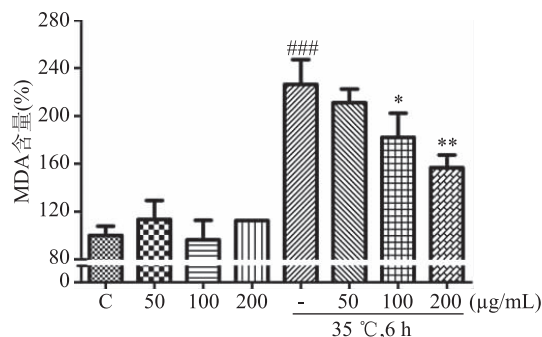


图8 酸枣叶黄酮对秀丽隐杆线虫体内MDA含量的影响

Fig.8 Effect of flavonoids from ZSL on the contents of MDA in *C.elegans*

### 3 结论

本文采用超声辅助法提取酸枣叶黄酮,在单因素实验的基础上设计响应面实验,优化酸枣叶黄酮提取工艺,得到最佳提取工艺条件为:液料比30.25:1 mL/g、乙醇浓度79.00%、超声功率301.00 W、超声时间32.00 min。酸枣叶黄酮实际提取率为4.21%,与预测值4.51%拟合效果良好。制得的酸枣叶黄酮对DPPH自由基、ABTS自由基、羟自由基的半数清除浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为111.51、23.06和253.73 µg/mL,还原能力较强,具有良好的体外抗氧化活性。酸枣叶黄酮能有效增强秀丽隐杆线虫对热应激、 $H_2O_2$ 氧化应激的抗性,抑制氧化损伤导致的线虫体内GSH-Px、SOD酶活力的降低,抑制MDA含量的增加,表现出良好的抗氧化损伤作用,具有广阔的开发前景。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 591.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第五册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 260-267.
- [3] 郭盛, 段金康, 钱大玮, 等. 枣属植物化学成分研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(6): 702-710.
- [4] Guo S, Duan J A, Tang Y P, et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of triterpenic acids, saponins and flavonoids in the leaves of two *Ziziphus* species by HPLC-PDA-MS/ELSD[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, 56(2): 264-270.
- [5] 徐变娜, 王敏, 曹静, 等. 不同时期梨枣叶茶抗氧化成分组成及活性差异的分析[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 34-38.
- [6] 李喜悦, 高哲, 崔璨, 等. 枣叶黄酮类成分的分离鉴定及其

抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2015,36(10):135-138.

[7] Guo S, Duan J A, Qian D W, et al. Hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry for determination of nucleotides, nucleosides and nucleobases in Ziziphus plants[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1301: 147-155.

[8] 段金鑫. 中药资源化学-理论基础与循环利用[M]. 北京: 科学出版社, 2015.

[9] 白莉, 杜晨晖, 闫艳, 等. 山西不同产地野生酸枣叶总黄酮的含量测定[J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(4): 32.

[10] 王身艳, 留清飞, 秦明珠. 酸枣仁、叶、肉、根的研究进展[J]. 中草药, 2000, 22(11): 794-796.

[11] 路娟. 酸枣仁的质量评价和酸枣叶提取物的初步药效学研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2011: 31-33.

[12] 卢国勇, 孟江, 廖华卫. 酸枣仁黄酮组分提取纯化工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 671-673.

[13] Avila J A D, Ochoa M A V, Parrilla E A, et al. Interactions between four common plant-derived phenolic acids and pectin, and its effect on antioxidant capacity[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12(2): 992-1004.

[14] 胡卫成, 王新风, 沈婷, 等. 响应面试验优化莲蓬壳总黄酮超声提取条件及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 51-56.

[15] Guo L, Zhu W C, Xu F Q, et al. Optimized ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Cyclina sinensis* and evaluation of antioxidant activities *in vitro*[J]. CyTA-Journal of Food, 2013, 12: 32-39.

[16] 王迎进, 于蕾, 闫军, 等. 超声提取酸枣叶中总黄酮[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 229-232.

[17] 汤如莹, 王玉杰, 李伟, 等. D101 型大孔吸附树脂分离纯化沙苑子总黄酮工艺研究[J]. 中草药, 2017, 48(16): 3342-3346.

[18] 钱波, 廖衫, 刘斯悦, 等. 白茶乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(8): 39-43.

[19] Jiao L J, Yan C P, Zhang K S, et al. Comprehensive determination of nine polyphenols in *Polygoni avicularis herba* with a new HPLC-DAD method and their correlation with the antioxidant activities[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12: 1593-1600.

[20] Siddhuraju P. The antioxidant activity and free radical -

scavenging capacity of phenolics of raw and heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts[J]. Food Chemistry, 2006, 50: 149-157.

[21] Xiao S, Zhang Y Q, Xie J B, et al. Ultrasonic - assisted extraction of squalene and vitamin E based oil from *Zizyphi spinosae* Semen and evaluation of its antioxidant activity[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12: 2844-2854.

[22] Filippopoulou K, Papaevgeniou N, Lefaki M, et al. 2, 3-Dehydrosilybin A/B as a pro-longevity and anti-aggregation compound[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2017, 103: 256-267.

[23] Chen W, Lin H R, Wei C M, et al. Echinacoside, a phenylethanoid glycoside from *Cistanche deserticola*, extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* and protects from A beta-induced toxicity[J]. Biogerontology, 2018, 19: 47-65.

[24] 刘东. 紫薯提取物对秀丽隐杆线虫抗氧化作用影响[J]. 食品科技, 2017, 42(11): 248-252.

[25] Jattujan P, Chalorak P, Siangcham T, et al. *Holothuria scabra* extracts possess anti-oxidant activity and promote stress resistance and lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*[J]. Experimental Gerontology, 2018, 110: 158-171.

[26] 王红. 黑米提取物对黑腹果蝇和秀丽隐杆线虫抗氧化作用的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.

[27] 李游, 新爱仙, 梁宗锁, 等. 酸枣仁总黄酮提取工艺及其预测模型研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 37(10): 193-198.

[28] 蔡雨晴, 贾棹东, 吴茜茜, 等. 响应面法优化野生酸枣仁中总黄酮的提取工艺[J]. 中国饲料, 2016, 3: 23-27.

[29] 李慎欧, 郝庆红, 土常富, 等. 超声波提取酸枣仁总黄酮工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13790-13792.

[30] 王燕, 赖普辉. 采用 Box-Behnken Design 优化玉米须总黄酮提取工艺[J]. 西部林业科学, 2015, 44(3): 175-179.

[31] 林婷婷, 房雷雷, 张亚新, 等. 响应面法优化酸枣仁多糖的脱色工艺[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 198-202, 208.

[32] Diaz-de-Cerio E, Tylewicz U, Verardo V, et al. Design of sonotrode ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Psidium guajava* L. leaves[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10: 2781-2791.

(上接第 142 页)

*in vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of cyanidin 3-caffeoyl-p-hydroxybenzoylphosphoroside-5-glucoside, an anthocyanin isolated from purple-fleshed sweet potato[J]. Food chemistry, 2019, 272(0): 688-693.

[17] 蒋孟君, 王艺, 任建青, 等. 超声提取食用玫瑰花总酚及其大孔树脂纯化前后抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(23): 164-169.

[18] 王丽娟, 杨雪飞, 黄毅, 等. 挤压工艺参数对膨化杂粮粉感官品质的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 67-70.

[19] 曹晶, 赵建伟, 田耀旗, 等. 挤压工艺对保鲜方便米饭品质的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(4): 381-386.

[20] 唐传核, 彭志英. 天然花色苷类色素的生理功能及应用前景[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2000, 6(1): 26-28.

[21] 晏梦婷. 糙米重组米的糊化回生特性研究[D]. 武汉: 武

汉轻工大学, 2015.

[22] 米聪. 紫薯中花色苷的提取纯化及稳定性研究[D]. 厦门: 集美大学, 2014.

[23] Nilsuwan K, Benjakul S, Prodpran T. Properties and antioxidative activity of fish gelatin-based film incorporated with epigallocatechin gallate[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 80(0): 212-221.

[24] Chengcheng Ruan, Yumeng Zhang, Jiejie Wang, et al. Preparation and antioxidant activity of sodium alginate and carboxymethyl cellulose edible films with epigallocatechin gallate[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 134.

[25] 安红周, 金征宇, 赵晓文, 等. 机筒温度对挤压工程重组米理化特性和物性的影响[J]. 食品科技, 2005(3): 20-23.