

响应面法优化豫西山茱萸叶黄酮的提取及其抑菌和抗氧化活性

孙建瑞¹,赵君峰¹,原江锋¹,何容²,王大红^{1*}¹河南科技大学食品与生物工程学院 河南省食品微生物工程技术研究中心,洛阳 471023;²云南省供销合作社科学研究所,昆明 650223

摘要:通过响应面法对山茱萸叶黄酮的提取工艺进行优化,并对其体外抑菌和抗氧化活性进行研究。经优化后,山茱萸叶黄酮在超声功率 290 W、液料比 31:1 (mL/g)、乙醇体积分数 61%、提取时间 23 min 的工艺条件下提取得率最高,达到 6.31%,与模型预测值相符。抑菌实验结果表明山茱萸叶黄酮对沙门氏菌有较强的抑菌作用,对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和中华根霉有较弱的抑菌作用,说明山茱萸叶黄酮对细菌有较强的抑菌作用,对真菌有较弱的抑菌作用。山茱萸叶黄酮浓度为 1.2 mg/mL 时其对 DPPH 自由基的清除率为 77.24%,对羟基自由基的清除率达到 83.54%;山茱萸叶黄酮清除 DPPH 自由基和羟基自由基的 IC₅₀ 分别为 0.699 和 0.631 mg/L,表明山茱萸叶黄酮具有较强的抗氧化活性。

关键词:山茱萸叶;黄酮;响应面法;抑菌活性;抗氧化活性

中图分类号:Q946.8

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)4-0672-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.4.018

Extraction process optimization of flavonoids from *Cornus officinalis* leaves and its antibacterial and antioxidant activity

SUN Jian-rui¹, ZHAO Jun-feng¹, YUAN Jiang-feng¹, HE Rong², WANG Da-hong^{1*}

¹College of Food and Bioengineering, Henan Engineering Research Center of Food Microbiology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;

²Science and Research Institute of Yunnan Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Kunming 650223, China

Abstract: The extraction process of flavonoids from *Cornus officinalis* leaves was optimized by response surface methodology, and its antioxidant and antibacterial activity were studied *in vitro*. The extraction rate of flavonoids was the highest under the conditions of ultrasonic power 290 W, solvent to solid ratio 31:1 (mL/g), ethanol concentration 61% and extraction time 23 min, reaching 6.31%, which was consistent with the predicted value of the model. The results showed that flavonoids from *C. officinalis* leaves had a strong antibacterial activity against *Salmonella typhimurium* and weak antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Rhizopus chinensis*, indicating that the flavonoids had a strong inhibitory effect on bacteria and weak inhibitory effect on fungi. The clearance rates of DPPH radical and hydroxyl radical were 77.24% and 83.54%, respectively, when the concentration was 1.2 mg/mL. The IC₅₀ of DPPH radical and hydroxyl radical were 0.699 and 0.631 mg/mL, respectively, which indicated that the flavonoids from *C. officinalis* leaves had strong antioxidant activity.

Key words: *Cornus officinalis* leaves; flavonoids; response surface methodology; antibacterial activity; antioxidant activity

山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) 属于山茱萸科山茱萸属植物,主要分布于河南、山西、陕西等地。中药山茱萸是山茱萸成熟干燥的果实,也称山萸肉,最早载于《神农本草经》,味酸涩、微温、平,

入肝、肾二经,具有补益肝肾、收涩固脱的作用,对治疗眩晕耳鸣、腰膝酸痛、阳痿遗精、小便频数、心摇脉散、大汗虚脱、内热消渴等症有功效^[1]。山茱萸果肉是我国药食同源的传统中药材,是中医方剂中的常用药,在我国应用广泛^[2]。现代研究发现山茱萸成分复杂多样,不仅含有丰富的环烯醚萜类、皂苷、多糖、鞣质类、有机酸、黄酮、酯类等活性成分,还含

收稿日期:2019-10-08 接受日期:2020-04-15

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(31401672)

* 通信作者 Tel:86-015537970097;E-mail:wangdahong2003@163.com

有多种人体必需的微量元素^[3-5]。现代药理研究还发现山茱萸不仅在保肝、抗炎、抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤、保护心肌、降血糖、增强免疫力、调节心率等方面有功效,而且对治疗老年痴呆和不孕症有疗效^[6-8]。

黄酮类化合物具有止咳、抗抑郁、抗氧化、抗癌、抗炎、抗衰老及保护心血管、免疫调节等生物活性^[9]。Shu 等^[10]发现山茱萸总苷对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、白菜软腐病菌、姜瘟病菌、柑桔溃疡病菌都具有较强的抑菌效果。山茱萸中鉴定出的黄酮类化合物主要有花色苷、黄酮醇两类和二氢黄酮类,包括3-*O*- β -吡喃型半乳糖苷-飞燕草苷元、3-*O*- β -吡喃型半乳糖苷-矢车菊苷元、3-*O*- β -吡喃型半乳糖苷-天竺葵苷元、山奈酚、槲皮素、山奈酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷、柚皮素等^[11,12]。Seeram 等^[12]研究发现山茱萸3-*O*- β -吡喃型半乳糖苷-飞燕草苷元、3-*O*- β -吡喃型半乳糖苷-矢车菊苷元和3-*O*- β -吡喃型半乳糖苷-天竺葵苷元均具有很强的抗氧化活性。Ding 等^[13]研究表明山茱萸的黄酮提取液对超氧阴离子和羟自由基具有较强的清除能力,对猪油也有显著的抗氧化效果。Bolleddula 等^[14]研究发现山茱萸中的花色苷能够促进体内胰岛素的分泌,降低血糖水平,抑制肥胖的产生。

山茱萸传统的药用部分为其果实,而其果核和叶资源丰富,却基本都被丢弃。近年来,已有科研工作者对山茱萸果核进行研究,发现山茱萸果核富含鞣质类、不饱和脂肪酸、熊果酸、没食子酸、氨基酸、维生素等活性成分,同样在抗炎、抑菌、抗肿瘤、心肌保护、抗衰老、抗疲劳等方面有功效^[15,16]。然而,目前还未见有关山茱萸叶活性成分研究的报道。本研究通过响应面法对豫西山茱萸叶黄酮的提取工艺进行优化,并对其体外抑菌和抗氧化活性进行研究,以期如山茱萸叶资源的综合开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

山茱萸叶采自河南省嵩县山区,经烘干粉碎后,过40目筛备用;受试菌种由河南科技大学食品与生物工程学院提供。

实验用芦丁(CAS号:153-18-4)天津市德恩化学试剂有限公司;硫酸亚铁、邻苯三酚、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、无水乙醇、过氧化氢、二丁基羟基甲苯(BHT)等化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器公

司);HX-IID 超声波细胞破碎仪(上海沪析实业有限公司);H2050R 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 山茱萸叶黄酮的提取

定量称取粉碎后的山茱萸叶1.0 g,置于索氏提取器中用石油醚进行脱脂,晾干;加入适量乙醇溶液作为提取介质,混合均匀后,超声波破碎;经过滤浓缩后,用50 mL的容量瓶进行定容,测定其在510 nm波长处的吸光值。

1.3.2 山茱萸叶黄酮提取率的测定

以芦丁作为标准品,采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_2)_3$ - NaOH 法绘制标准曲线^[17],检测山茱萸叶黄酮的浓度。黄酮浓度的计算采用线性方程: $Y = 9.0049X - 0.0149$, $R^2 = 0.9973$ 。黄酮提取率的计算公式如下:

$$\text{黄酮提取率} = \frac{C \times V_0}{m} \times 100\%$$

式中: C 为提取液样品中黄酮的浓度(mg/mL), V_0 为定容后提取液样品的体积(mL), m 为山茱萸叶的质量(mg)。

1.3.3 单因素试验

分别考察超声功率(100、200、300、400、500、600 W)、液料比(10:1、20:1、30:1、40:1、50:1(mL/g))、乙醇体积分数(30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%)和提取时间(5、10、15、20、25、30、35、40 min)对山茱萸叶中黄酮提取率的影响。

1.3.4 中心组合试验设计

在单因素试验结果的基础上,对超声功率(X_1)、液料比(X_2)、乙醇体积分数(X_3)和提取时间(X_4)进行四因素三水平的中心组合试验设计,各个因素的水平见表1。

1.3.5 抑菌实验

将受试菌分别接种在对应的细菌和真菌培养基上,置于恒温培养箱中进行培养(真菌28℃,2天;细菌37℃,1天),然后用接种环挑取活化后的菌种一环于灭菌的蒸馏水中,混合均匀后制成菌悬液。

抑菌试验采用滤纸片法^[18]:将灭菌过的直径6 mm的圆形滤纸片烘干后,浸泡于制备好的山茱萸叶黄酮提取液中12 h,然后晾干;然后将制备好的各种菌悬液(200 μL)置于相应的固体培养基表面,涂布均匀;用灭过菌的镊子将浸泡好晾干后的滤纸片贴在培养基表面,之后将细菌放在37℃培养箱中培

表 1 中心组合试验设计因素及水平
Table 1 Factors and levels of central composite design

因素 Factor	水平 Level				
	-2	-1	0	1	2
X ₁ 超声功率 Ultrasonic power(W)	200	250	300	350	400
X ₂ 液料比 Solvent to solid ratio(mL/g)	20:1	25:1	30:1	35:1	40:1
X ₃ 乙醇体积分数 Ethanol concentration(%)	50	55	60	65	70
X ₄ 提取时间 Extraction time(min)	10	15	20	25	30

养 18~24 h, 真菌放在 28 ℃ 培养箱中培养 48~72 h, 观察并测量抑菌圈直径; 用 61% 的乙醇溶液作为空白对照。

1.3.6 DPPH 自由基清除能力测定

参照 Yu 等^[19]的方法: 取质量浓度不同的山茱萸叶黄酮提取液 1.0 mL, 加入 0.004% 的 DPPH 溶液 4 mL, 充分混匀, 黑暗下静置 30 min, 以无水乙醇作空白对照, 相应浓度的 BHT 作阳性对照, 于 517 nm 处测定其吸光值。每一样品平行测 3 次, 取其平均值。清除率公式可表示为:

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

式中: A₁ 为样品或者阳性对照的吸光值; A₂ 为空白对照的吸光值。

1.3.7 羟基自由基清除能力测定

参照 Yu 等^[19]的方法: 在试管中分别加入 0.4 mL pH 7.4 的 PBS、0.25 mL 重蒸水、0.15 mL 5 mmol/L 的邻二氮菲溶液和 0.5 mL 7.5 mmol/L 的 FeSO₄ 后混合均匀。然后加入 1.0 mL 不同质量浓度的山茱萸叶黄酮提取液, 最后加入 1% 的过氧化氢溶液 0.1 mL, 37℃ 水浴保温 60 min, 536 nm 处测定吸光值。阳性对照采用对应浓度的 BHT, 损伤管中不加样品, 对照管中样品和过氧化氢都不加, 空白管中不加过氧化氢。每一样品平行测 3 次, 取其平均值。清除率公式可表示为:

$$\text{羟基自由基清除率} = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

式中 A_{样品} 为样品管的吸光值、A_{损伤} 为损伤管的吸光值、A_{对照} 为对照管的吸光值、A_{空白} 为空白管的吸光值。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 超声功率对山茱萸叶黄酮提取得率的影响

山茱萸叶黄酮的提取得率随着超声功率的增加

先迅速升高后逐渐降低, 当超声功率为 300 W 时, 提取得率达到最高的 3.46%; 之后提取得率逐渐降低(图 1)。超声波的机械和空化效应会破坏山茱萸叶细胞的细胞壁和细胞膜结构, 从而使黄酮更容易溶出, 且随着超声功率的增加细胞壁被破坏地越充分, 黄酮溶出越充分; 但过高的超声功率可能会使黄酮的结构发生变化, 而且可能使黄酮和其他成分之间产生反应, 从而导致黄酮提取得率下降^[20]。因此, 超声功率选择 300 W。

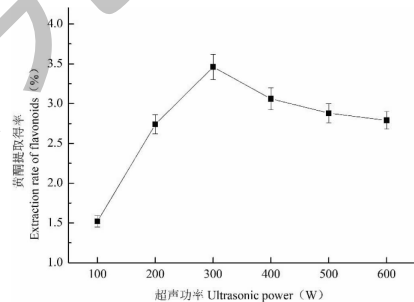


图 1 超声功率对山茱萸叶黄酮提取得率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic power on the extraction rate of flavonoids from *C. officinalis* leaves

2.1.2 液料比对山茱萸叶黄酮提取得率的影响

山茱萸叶黄酮的提取得率随着液料比的增加逐渐升高, 当液料比为 30:1 (mL/g) 时提取得率为 3.92%, 之后黄酮的提取得率逐渐趋于稳定(图 2)。这可能是因为山茱萸叶中黄酮总的溶出量会随着提取液用量的增加而升高, 液料比越大, 提取液中黄酮的浓度就越低, 传质的推动力就越大, 提取得率就越高^[21]。但过高的液料比不仅会增加原料和试剂的用量, 造成浪费, 使成本升高, 而且会增加后处理工序的困难。因此, 液料比选择 30:1 (mL/g), 既可以确保高的提取得率, 又可以减少提取溶液的用量。

2.1.3 乙醇体积分数对山茱萸叶黄酮提取得率的影响

随着乙醇体积分数的增大, 山茱萸叶黄酮的提

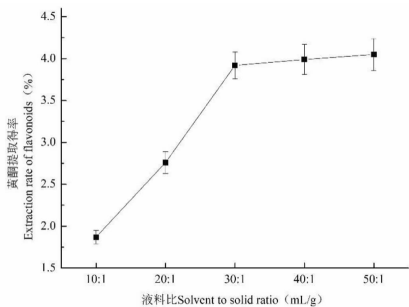


图2 液料比对山茺蔚叶黄酮提取得率的影响

Fig.2 Effect of solvent to solid ratio on the extraction rate of flavonoids from *C. officinalis* leaves

取得率先迅速升高后逐渐降低;提取得率在乙醇体积分数为60%时达到最高,为4.25%(图3)。这可能是因为山茺蔚叶细胞的溶胀会随着乙醇体积分数的升高而增强,从而使提取溶剂能够有效地渗透进细胞,导致提取得率增加;但当乙醇体积分数超过60%后,提取溶剂的极性降低,此时部分醇溶性、色素等杂质的溶出会增加,从而竞争性结合提取溶剂,导致黄酮类化合物的提取得率降低^[22]。因此,乙醇

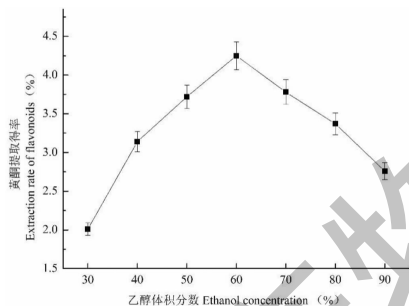


图3 乙醇体积分数对山茺蔚叶黄酮提取得率的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of flavonoids from *C. officinalis* leaves

体积分数选择60%较为合适。

2.1.4 提取时间对山茺蔚叶黄酮提取得率的影响

由图4可知,在提取时间5~20 min内,山茺蔚叶黄酮的提取得率随提取时间的增加而增加,当提取时间为20 min时,提取得率达到最大值4.52%;之后,提取得率随着提取时间的增加呈下降趋势。提取时间越长,越有利于山茺蔚叶黄酮的溶出,因此在一定时间内提取得率呈升高趋势;但提取时间过长会导致杂质的溶出量增加,不仅会与提取溶剂竞争性结合,而不溶性杂质也可能会吸附黄酮类化合物,从而导致黄酮提取得率的降低。因此,提取时间选择20 min。

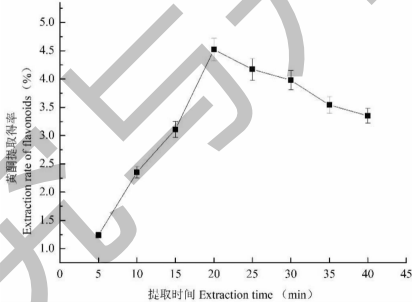


图4 提取时间对山茺蔚叶黄酮提取得率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on the extraction rate of flavonoids from *C. officinalis* leaves

2.2 山茺蔚叶黄酮提取的中心组合试验结果与分析

2.2.1 中心组合试验结果

采用 Design expert 软件设计四因素三水平的中心组合试验,以山茺蔚叶黄酮的提取得率作为响应值,27个试验组合的设计方案及结果见表2。

表2 中心组合试验方案与结果

Table 2 Scheme and results of central composite design

试验号 No.	因素水平 Factor and level				黄酮提取率 Extraction rate of flavonoids (%)
	X ₁ 超声功率 Ultrasonic power	X ₂ 液料比 Solvent to solid ratio	X ₃ 乙醇体积分数 Ethanol concentration	X ₄ 提取时间 Extraction time	
1	1	-1	1	-1	3.92 ± 0.16
2	1	1	1	1	5.18 ± 0.23
3	0	0	-2	0	5.42 ± 0.25
4	1	-1	1	1	4.57 ± 0.21
5	-1	1	-1	1	5.20 ± 0.22
6	-1	-1	-1	1	5.39 ± 0.24
7	0	0	0	-2	5.10 ± 0.22

续表 2 (Continued Tab. 2)

试验号 No.	因素水平 Factor and level				黄酮提取得率 Extraction rate of flavonoids (%)
	X_1 超声功率 Ultrasonic power	X_2 液料比 Solvent to solid ratio	X_3 乙醇体积分数 Ethanol concentration	X_4 提取时间 Extraction time	
8	-2	0	0	0	4.68 ± 0.19
9	0	0	0	2	5.97 ± 0.27
10	0	0	0	0	6.13 ± 0.29
11	-1	1	1	1	5.79 ± 0.26
12	0	2	0	0	5.69 ± 0.25
13	0	0	2	0	5.49 ± 0.26
14	-1	-1	-1	-1	5.08 ± 0.21
15	1	1	1	-1	4.60 ± 0.18
16	1	-1	-1	-1	4.54 ± 0.21
17	-1	-1	1	1	5.23 ± 0.23
18	-1	-1	1	-1	4.87 ± 0.20
19	2	0	0	0	4.08 ± 0.18
20	1	1	-1	-1	4.62 ± 0.21
21	1	1	-1	1	5.09 ± 0.23
22	-1	1	-1	-1	4.52 ± 0.22
23	0	0	0	0	6.26 ± 0.31
24	0	0	0	0	6.34 ± 0.30
25	-1	1	1	-1	5.42 ± 0.24
26	1	-1	-1	1	5.32 ± 0.23
27	0	-2	0	0	5.24 ± 0.23

2.2.2 模型的建立及显著性分析

采用 Design-Expert 软件对实验结果进行分析, 得到的拟合方程如下:

$$Y = 7.00 - 0.23X_1 + 0.11X_2 - 0.011X_3 + 0.28X_4 + 0.055X_1X_2 - 0.17X_1X_3 + 0.054X_1X_4 + 0.23X_2X_3 +$$

$$0.000X_2X_4 - 0.020X_3X_4 - 0.57X_1^2 - 0.27X_2^2 - 0.26X_3^2 - 0.25X_4^2$$

同时, 利用分析软件对回归方程的方差分析结果如表 3 所示。

表 3 方差分析表

Table 3 Variance analysis (ANOVA) of test results

方差来源 Source	离差平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	9.51	14	0.68	16.97	< 0.000 1	Significant
X_1	0.98	1	0.98	24.60	0.000 3	**
X_2	0.24	1	0.24	6.00	0.030 6	*
X_3	6.667E-005	1	6.667E-005	1.666E-003	0.968 1	
X_4	1.47	1	1.47	36.75	< 0.000 1	**
X_1X_2	0.038	1	0.038	0.95	0.348 8	
X_1X_3	0.37	1	0.37	9.15	0.010 6	*
X_1X_4	0.036	1	0.036	0.90	0.360 9	

续表 3 (Continued Tab. 3)

方差来源 Source	离差平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
X_2X_3	0.68	1	0.68	17.01	0.001 4	**
X_2X_4	0.000	1	0.000	0.000	1.000 0	
X_3X_4	4.900E-003	1	4.900E-003	0.12	0.732 4	
X_{12}	5.49	1	5.49	137.34	< 0.000 1	**
X_{22}	1.19	1	1.19	29.76	0.000 1	**
X_{32}	1.22	1	1.22	30.40	0.000 1	**
X_{42}	1.02	1	1.02	25.52	0.000 3	**
残差 Residual	0.48	12	0.040			
失拟项 Lack of fit	0.46	10	0.046	4.07	0.213 1	Not significant
纯误差 Pure error	0.022	2	0.011			

注: * 差异显著, $P < 0.05$; ** 差异极显著, $P < 0.01$ 。

Note: * Significant, $P < 0.05$; ** Very significant, $P < 0.01$.

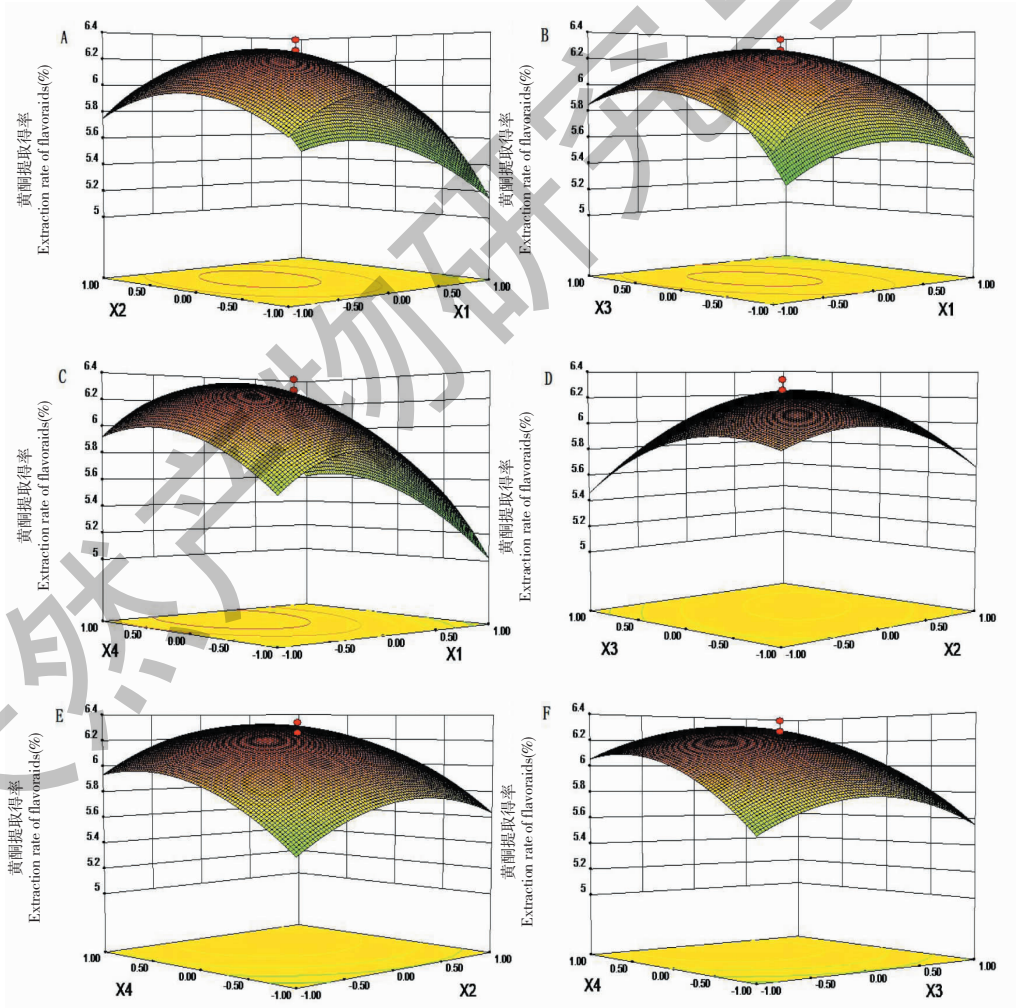


图 5 各因素交互作用对山茺蔚叶黄酮提取得率的影响

Fig. 5 Response surface showing the interactive effect of various factors on the extraction rate of flavonoids from *C. officinalis* leaves

由表 3 可以看出,该模型是高度显著的($P < 0.01$)。同时,模型中 X_1 、 X_2 、 X_4 、 X_1X_3 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 的 P 值均小于 0.05,说明它们都是显著的,即它们对山茱萸叶黄酮提取得率的影响均显著。该模型的失拟项不显著($P > 0.05$),说明模型选择合适。

另外,该模型相关系数 R^2 为 0.951 9,能够解释 95.19% 的实验结果,说明该模型相关度很好;模型的变异系数为 3.86%,说明实验操作可靠,可以准确反映实验结果。总之,该模型拟合度好,实验误差小,能够用来分析和预测山茱萸叶黄酮的提取得率。

四个因素中液料比对山茱萸叶黄酮提取得率的影响显著($P < 0.05$),超声功率和提取时间对提取得率的影响极显著($P < 0.01$),四个因素对提取得率的影响顺序依次为:提取时间 > 超声功率 > 液料比 > 乙醇体积分数。

2.2.3 响应曲面分析

为了进一步分析各个因素之间的交互作用及确定最佳实验点,通过 Design-expert 软件绘制响应曲面图以评价各个因素对山茱萸叶黄酮提取效果影响的两两交互作用。响应曲面图可以形象地看出各因素之间的相互作用及最佳参数^[22],图 5 是各个因素交互作用的响应曲面图。图 5B 和 5D 的响应面坡度都比较陡峭,说明超声功率(X_1)与乙醇体积分数(X_3)和液料比(X_2)与乙醇体积分数(X_3)的交互作用对山茱萸叶黄酮提取得率的影响较显著;而图 5A、5C、5E 和 5F 的响应面坡度都比较平缓,说明其他因素之间的交互作用对提取得率的影响不显著。

2.2.4 验证性实验

通过软件的进一步分析可以得到最大响应值(Y)时各因素(X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4)对应的值分别为: $X_1 = 290.82$ W, $X_2 = 31.28:1$ (mL/g), $X_3 = 60.72\%$, $X_4 = 22.70$ min。在此条件下,理论上山茱萸叶黄酮的提取得率为 6.341 43%。

按照响应面确定的各因素的最优值,来验证所得结果的可靠性。根据实际操作的可行性,将最优工艺条件修正为超声功率 290 W、液料比 31:1 (mL/g)、乙醇体积分数 61%、提取时间 23 min。在修正的最优实验条件下,进行多次重复实验,测得山茱萸叶黄酮提取得率的平均值为 6.31%,与理论值很接近,相对误差仅为 0.50%,说明该回归模型准确度高。

2.3 山茱萸叶黄酮抑菌实验结果

山茱萸叶黄酮抑菌实验结果如表 4 所示,山茱萸叶黄酮对沙门氏菌具有较强的抑菌作用,抑菌圈直径达到 12.04 mm;对绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌有较弱的抑菌作用,抑菌圈直径较小;对大肠杆菌、禽巴氏杆菌和枯草芽孢杆菌没有抑菌作用。山茱萸叶黄酮对中华根霉也有较弱的抑菌作用,但抑菌圈直径只有 7.55 mm;对黑曲霉和酿酒酵母没有抑菌作用。

有研究表明,山茱萸果肉总苷对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌均有较好的抑菌效果,抑菌圈直径分别为 20.0 mm、17.3 mm 和 16.7 mm^[10]。山茱萸叶黄酮的抑菌效果虽然没有山茱萸果肉强,但对细菌和真菌均有一定的抑菌作用;其对沙门氏

表 4 山茱萸叶黄酮的抑菌效果

Table 4 Antibacterial effect of flavonoids from *C. officinalis* leaves

类别 Type	菌种 Strain	抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter(mm)
细菌 Bacteria	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-
	绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.57 ± 0.21
	沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	12.04 ± 0.25
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	9.96 ± 0.26
	禽巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>	-
	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-
真菌 Fungi	中华根霉 <i>Rhizopus chinensis</i>	7.55 ± 0.16
	黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	-
	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
空白对照 Blank control	乙醇溶液 Ethanol solution	-

注:“-”表示没有抑菌活性。

Note:“-”indicates no antimicrobial activity.

菌的抑菌效果较强,对绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌也有较弱的抑菌效果,对真菌中的中华根霉也有较弱的抑菌效果。山茱萸叶黄酮对细菌的抑菌效果较强,对真菌的抑菌效果较弱;而且其对革兰氏阴性菌的抑菌效果强于革兰氏阳性菌。

2.4 山茱萸叶黄酮抗氧化活性实验结果

2.4.1 山茱萸叶黄酮对 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基是以氮为中心的化学性质比较稳定的自由基,它比较难被清除,如果能够被受试物清除,说明受试物有较强的自由基清除能力。由图 6 可知,山茱萸叶黄酮对 DPPH 自由基的清除率随着样品浓度的升高而增强,1.2 mg/mL 时山茱萸叶黄酮对 DPPH 自由基的清除率达到 77.24%;在检测的浓度范围内,山茱萸叶黄酮对 DPPH 自由基的清除能力略低于阳性对照 BHT。山茱萸叶黄酮清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 0.699 mg/L, BHT 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 0.269 mg/L。结果说明,山茱萸叶黄酮具有较强的清除 DPPH 自由基的能力,但比 BHT 稍弱。

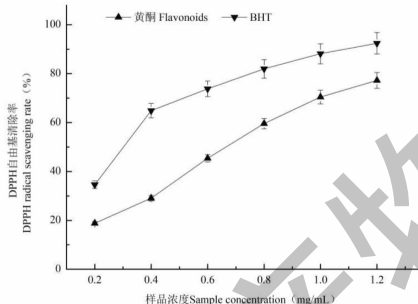


图 6 山茱萸叶黄酮对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 6 DPPH free radical scavenging capacity of flavonoids from *C. officinalis* leaves

2.4.2 山茱萸叶黄酮对羟基自由基清除能力

羟基自由基能够使蛋白质、核酸等生物大分子

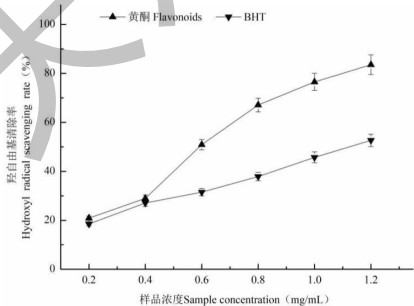


图 7 山茱萸叶黄酮对羟基自由基的清除能力

Fig. 7 Hydroxyl free radical scavenging capacity of flavonoids from *C. officinalis* leaves

损伤严重,故受试物对羟基自由基的清除效果也是衡量其抗氧化能力的一个重要指标^[23]。由图 7 可知,山茱萸叶黄酮对羟基自由基的清除率随着样品浓度的增加而增强,1.2 mg/mL 时山茱萸叶黄酮对羟基自由基的清除率达到 83.54%;在检测的质量浓度范围内,山茱萸叶黄酮对羟基自由基的清除能力高于阳性对照 BHT。山茱萸叶黄酮清除羟基自由基的 IC_{50} 为 0.631 mg/L, BHT 清除羟基自由基的 IC_{50} 为 1.134 mg/L。结果说明,山茱萸叶黄酮具有明显的清除羟基自由基的能力,强于 BHT。

Seeram 等^[12]研究发现山茱萸 3-O-β-吡喃型半乳糖苷-飞燕草苷元、3-O-β-吡喃型半乳糖苷-矢车菊苷元和 3-O-β-吡喃型半乳糖苷-天竺葵苷元的抗氧化活性分别为 70.2%、60.1% 和 40.3%。当山茱萸叶黄酮浓度为 1.2 mg/mL 时,其对 DPPH 自由基的清除率达到 77.24%,对羟基自由基的清除率达到 83.54%;山茱萸叶黄酮清除 DPPH 自由基和羟基自由基的 IC_{50} 分别为 0.699 mg/L 和 0.631 mg/L。结果表明,山茱萸叶黄酮具有较强的抗氧化活性。

3 结论

本研究通过响应面法对豫西山茱萸叶黄酮的提取工艺进行优化,并对其体外抑菌和抗氧化活性进行研究。通过中心组合试验得出提取山茱萸叶黄酮的优化回归数学模型的相关系数为 0.951 9,说明该模型相关度很好,能够准确预测山茱萸叶黄酮的提取得率。四个因素中超声功率和提取时间对山茱萸叶黄酮提取得率的影响极显著,液料比对提取得率的影响显著,且四个因素对提取得率的影响顺序为提取时间 > 超声功率 > 液料比 > 乙醇体积分数。经优化后,提取山茱萸叶黄酮的最优方案为:超声功率 290 W、液料比 31:1 (mL/g)、乙醇体积分数 61%、提取时间 23 min。在此条件下,山茱萸叶黄酮的提取得率为 6.31%,与理论值基本一致。超声辅助提取技术具有提取时间短、提取效率高等优点,广泛应用于天然产物的提取。超声波的机械效应和空化效应能够使溶剂向细胞的渗透量增大,并破坏细胞壁,有利于细胞内有效成分的溶出。

抑菌实验结果表明,山茱萸叶黄酮对沙门氏菌的抑菌效果较强,对绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌也有较弱的抑菌效果,对真菌中的中华根霉也有较弱的抑菌效果。

抗氧化活性实验结果表明,山茱萸叶黄酮具有较强的抗氧化活性;当山茱萸叶黄酮浓度为 1.2

mg/mL 时其对 DPPH 自由基的清除率达到 77.24%,对羟基自由基的清除率达到 83.54%;山茱萸叶黄酮清除 DPPH 自由基和羟基自由基的 IC₅₀ 分别为 0.699 和 0.631 mg/L。

本研究为山茱萸叶的进一步开发利用奠定了基础,同时也为筛选天然抗菌、抗氧化活性物质提供了一定的理论基础。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:一部)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2015.
- Wen YY, Wang L, Wang S, et al. Review on extraction, isolation and antioxidant activity of active components from *Cornus officinalis*[J]. World Latest Med Inform(世界最新医学信息文摘),2018,18(92):44-46.
- Ye SX, He J, Zhang JL, et al. Chemical constituents from ripe fruit of *Cornus officinalis*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2016,41:4605-4609.
- Li YC, Yang J, Li JK, et al. Two new secoiridoid glucosides from the twigs of *Cornus officinalis*[J]. Chem Nat Compd, 2016,52(4):647-650.
- Ji LL, Wang X, Zhong XJ, et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Cornus officinalis*[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技),2019,35(5):137-143.
- Czerwińska ME, Melzig MF. *Cornus mas* and *Cornus officinalis*-analogies and differences of two medicinal plants traditionally used[J]. Front Pharmacol,2018,9:894-921.
- Huang J, Zhang Y, Dong L, et al. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc[J]. J Ethnopharmacol,2018,213:280-301.
- Dong Y, Feng ZL, Chen HB, et al. *Corni Fructus*: a review of chemical constituents and pharmacological activities [J]. Chin Med,2018,13(1):34-53.
- Chen QX, Yang GM, Pan Y. Advances in extraction, separation and biological activity of functional components of *Comus officinalis*[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med(江苏中医药),2016,48(1):82-85.
- Shu XY, Ruan QP. Study on separation technology and antibacterial activity of glycosides from *Cornus officinalis* fruits [J]. Food Sci(食品科学),2008,29(12):353-357.
- Zhang YE, Liu E, Li HJ, et al. Chemical constituents from the fruit of *Comus officinalis*[J]. Chin J Nat Med,2009,7(5):365-367.
- Seeram NP, Schutzki R, Chandra A, et al. Characterization, quantification, and bioactivities of anthocyanins in *Cornus* species[J]. J Agr Food Chem,2002,50(9):2519-2523.
- Ding LJ, Qiu YX. Extraction of flavonoids from *Fructus Corni* and its antioxidant activity *in vitro* [J]. Orient diet health care(东方食疗与保健),2004,10:42-46.
- Bolleddula J, Karl O, Schutzki RE, et al. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*) [J]. J Agr Food Chem,2006,54:243-248.
- Nan MJ, Deng C, Zhang HW, et al. Antioxidant activity of different extracts of *Fructus Corni* fruit core *in vitro*[J]. J Liaoning Univ TCM(辽宁中医药大学学报),2019,21(3):64-67.
- Li XM. Study on the antioxidative activity of *Fructus Corni* fruit core [D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology(河南科技大学),2012.
- Guo YJ, Fan L, Wang XQ, et al. Discussion about NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH colorimetry for determination of total flavonoids[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志),2002,22(2):97-99.
- Sun JR. Evaluation of high additional value metabolites and research of polysaccharide metabolism regulation characteristic in oleaginous microalgae[D]. Chengdu:Sichuan University(四川大学),2014.
- Yu KC, Yang XJ, Wang Y, et al. Effect of different extraction methods on the antioxidant activity of polysaccharide in *Platycodon grandiflorum*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2016,28:251-256.
- Qiao M, Qu XQ, Ding ZN, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process for total flavonoids from *Malus hupehensis* leaves by response surface methodology [J]. Food Sci(食品科学),2013,34(2):143-147.
- Cacace JE, Mazza G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol [J]. J Food Sci,2006,68(1):240-248.
- Luo L, Zhang BJ, Zhu WX, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidation of flavonoids from *Lonicera japonica* Thunb. leaves: process optimization by response surface methodology and antioxidant activity evaluation[J]. Food Sci(食品科学),2016,37(6):13-19.
- Yuan JF, Zhao JF, Liu JL, et al. Extraction and antioxidant effect of forsythiaside A from *Forsythia suspense* leaves [J]. Food Sci(食品科学),2016,37(1):94-98.