

本文引文格式:王婷,王彦,项若璇,等. 响应面优化提取蝉翼藤树皮总多酚工艺及其二氯甲烷部位抗氧化活性研究[J]. 右江民族医学院学报, 2025, 47(3): 407-415.

【论著与临床报道】

响应面优化提取蝉翼藤树皮总多酚工艺 及其二氯甲烷部位抗氧化活性研究

王婷^{1,2,3}, 王彦^{1,2}, 项若璇^{1,2,3}, 刘欣^{1,2,3}, 周宇云^{1,2}, 叶小娟^{1,2}, 李海^{1,2}, 王国栋^{1,2,3,4,5}, 周玉燕^{1,2,3,4,5}

(1. 皖南医学院, 合肥综合性国家科学中心大健康研究院

新安医学与中医现代化中心, 安徽 芜湖 241002;

2. 皖南医学院药学院药物研发中心, 安徽 芜湖 241002;

3. 皖南医学院, 安徽代谢性疾病药物基础研究中心, 安徽 芜湖 241002;

4. 皖南医学院, 安徽省皖南中药活性化合物筛选与再评价工程实验室, 安徽 芜湖 241002;

5. 皖南医学院, 安徽省多糖药物工程技术研究中心, 安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 旨在研究蝉翼藤树皮总多酚的提取方法及其二氯甲烷部位提取物的抗氧化活性。方法 采用单因素实验结合响应面 Box-Behnken 设计对蝉翼藤树皮中多酚进行超声辅助提取工艺研究, 以多酚提取率为指标, 利用响应面法得出最佳提取工艺。且通过 DPPH、ABTS⁺ 自由基的清除能力判断其二氯甲烷部位提取物的抗氧化能力, 用 CCK-8 法检测蝉翼藤树皮二氯甲烷部位药物浓度毒性, 通过 SOD、CAT 和 MDA 水平评价其抗氧化活性。结果 蝉翼藤树皮总多酚的最佳提取条件为: 液料比 40 g/mL、乙醇浓度 75%、提取时间 60 min 和功率 400 W。此参数条件下, 测得蝉翼藤树皮多酚的产量为 (13.50 ± 0.43) mg/g, 与预测值非常接近。蝉翼藤树皮二氯甲烷提取物可显著提高 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 SOD 及 CAT 活力, 降低其 MDA 含量及 ROS 水平 ($P < 0.05$)。结论 该提取工艺稳定、可靠, 可用于蝉翼藤树皮总多酚的提取, 且蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物具有良好的抗氧化活性, 为深入研究蝉翼藤提供实验基础。

关键词: 蝉翼藤; 多酚; 抗氧化活性; 响应面法

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)03-0407-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2025.03.006

Optimization of total polyphenol extraction from *Securidaca inappendiculata* Hassk. bark by response surface methodology and antioxidant activity of its dichloromethane fraction

WANG Ting^{1,2,3}, WANG Yan^{1,2}, XIANG Ruoxuan^{1,2,3}, LIU Xin^{1,2,3}, ZHOU Yuyun^{1,2},
YE Xiaojuan^{1,2}, LI Hai^{1,2}, WANG Guodong^{1,2,3,4,5}, ZHOU Yuyan^{1,2,3,4,5}

(1. *Xin'an Medicine and Traditional Chinese Medicine Modernization Center, Institute of Health and Medicine, Hefei Comprehensive National Science Center, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China*; 2. *Drug Research and Development Center, School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China*; 3. *Anhui Provincial Research Center for Basic Research on Metabolic Disease Drugs, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China*;

基金项目: 合肥综合性国家科学中心大健康研究院新安医学中心与中医药现代化研究基金项目(2023CXMMTCM023); 国家级大学生创新创业训练项目(202410368046)

第一作者: 王婷, 在读硕士研究生, 研究方向: 分子药理学, E-mail: 2835204375@qq.com

通讯作者: 周玉燕, 教授, 研究方向: 分子药理学, E-mail: zhouyuyan@wnmc.edu.cn

4. *Engineering Laboratory for Screening and Re-evaluation of Active Compounds from Traditional Chinese Medicine in Southern Anhui, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China;*
5. *Anhui Provincial Engineering Technology Research Center for Polysaccharide Drugs, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)*

Abstract: **Objective** To investigate the extraction method of total polyphenols from *Securidaca inappendiculata* Hassk. bark and the antioxidant activity of its dichloromethane fraction extract. **Methods** A single-factor experimental approach combined with response surface methodology (RSM) using a Box-Behnken design (BBD) was employed to optimize the ultrasound-assisted extraction process for total polyphenols from *Securidaca inappendiculata* Hassk. bark. The extraction efficiency was evaluated based on polyphenol yield, and the optimal parameters were determined through RSM analysis. The antioxidant capacity of the dichloromethane fraction was assessed by measuring its scavenging activity against DPPH and ABTS⁺ radicals. Cytotoxicity was evaluated using the CCK-8 assay, while antioxidant activity was further evaluated by quantifying superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA) levels. **Results** The optimal extraction conditions for total polyphenols were determined as follows: liquid-to-material ratio of 40 mL/g, ethanol concentration of 75%, extraction time of 60 min, and ultrasound power of 400 W. Under these conditions, the experimental polyphenol yield reached (13.50 ± 0.43) mg/g, closely matching the predicted value. Dichloromethane fraction significantly enhanced SOD and CAT activities while reducing MDA content and reactive oxygen species (ROS) levels in LPS-stimulated RAW264.7 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The optimized extraction process is stable and efficient for isolating total polyphenols from *Securidaca inappendiculata* Hassk. bark. The dichloromethane fraction exhibits notable antioxidant activity, providing an experimental basis for further research on *Securidaca inappendiculata* Hassk.

Key words: *Securidaca inappendiculata*; polyphenols; antioxidant activity; response surface methodology

蝉翼藤 (*Securidaca inappendiculata* Hassk.) 属于远志科蝉翼藤属, 是一种珍稀植物, 全球仅有 43 种, 主要分布于热带美洲。在中国, 蝉翼藤及其近缘种瑶山蝉翼藤 (*S. yaoshanensis* Hao) 是该属的代表, 主要分布于广东、广西、云南和海南等地。这些地区的气候条件为蝉翼藤的生长提供了适宜的环境, 值得进一步的保护和研究^[1]。一些研究表明, 在蝉翼藤中存在氧杂蒽酮类、萜类、多酚、甾体和木脂素^[2-3]。类风湿性关节炎是一种慢性炎症性疾病, 该疾病通过长期的炎症浸润和骨及附属组织进行性损伤造成受累关节结构的破坏和活动功能丧失^[4]。作为民间药材, 蝉翼藤主要用于治疗炎症和类风湿性关节炎^[5]。多酚类化合物作为植物源性天然活性成分的典型代表, 广泛分布于药用植物及膳食植物的组织结构中^[6], 具有抗氧化、抗炎镇痛、抗肿瘤等作用^[7-8]。蝉翼藤作为传统民族药物, 虽然使用历史悠久, 临床疗效确切, 但对蝉翼藤树皮中多酚的提取工艺优化文献报道较少。此外, 有研究表明, 蝉翼藤二氯甲烷部位相较于乙酸乙酯、丙酮部位的抗炎效果更明显, 具有显著的抗炎、镇痛和免疫抑制作用, 是其抗风湿活性的主要物质基础^[9]。本研究通过乙醇提取, 优化蝉翼藤树皮中多酚的提取工艺, 并研究其二氯甲烷部位提取物的抗氧化活性, 以期对蝉翼藤

的后续开发提供理论依据。

1 材料

1.1 实验药材与主要试剂 蝉翼藤树皮购自安徽亳州草药市场, 由皖南医学院弋矶山医院左坚教授鉴定, 随后存放在皖南医学院植物标本中心。福林酚、没食子酸和无水碳酸钠均来自上海 MERYER 技术公司; ABTS 试剂和 DPPH 购自上海阿拉丁试剂有限公司; CCK-8 试剂盒 (批号 CR2401091) 购自武汉赛维尔科技有限公司; SOD、MDA、CAT 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20241118、20241113、20240425; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 122120210707) 购自上海碧云天生物科技有限公司; 脂多糖 (批号 09025001AZ) 及活性氧检测试剂盒 (批号 30224584ZA) 购自白鲨生物科技有限公司。无水乙醇及二氯甲烷购自天津市科密欧化学试剂有限公司。所用试剂均为分析纯, 实验用水均为纯水。

1.2 主要仪器 小型高速粉碎机 WK-2000A (青州市精诚医药装备制造有限公司); KQ-500DE CNC 超声波清洗机 (昆山超声波仪器有限公司); UV-2700 型紫外分光光度计 (日本岛津公司); BD FACSVerser 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 样品的预处理与提取工艺 将蝉翼藤树皮进行清洗,在温度设置为 30 ℃ 的烤箱中干燥。随后,用研磨机将干燥的蝉翼藤树皮粉碎后过 100 目筛备用。精确量取 50 g 蝉翼藤干燥粉末,并将其加入乙醇中浸泡过夜。随后使用超声波清洗机以指定的液料比、乙醇浓度、提取时间和超声功率进行提取。萃取后,以 4 000 r/min 离心样品,离心时间为 15 min。收集上清液并将其浓缩至最终体积为 15 min(相当于 1 g/mL 的原始蝉翼藤)。在测量总多酚浓度之前,让溶液达到平衡。

2.2 单因素试验

2.2.1 液料比对蝉翼藤树皮多酚得率的影响 在超声辅助提取时间为 60 min、溶剂为 75%乙醇、超声功率为 400 W 的条件下,将液料比设置为 10 mL/g、20 mL/g、30 mL/g、40 mL/g、50 mL/g 进行提取,计算蝉翼藤树皮中多酚的提取量。

2.2.2 乙醇体积分数对蝉翼藤树皮多酚得率的影响 在液料比 40 mL/g、超声功率 400 W、超声辅助提取时间 60 min 的条件下,将乙醇浓度设定为 15%、35%、55%、75%、95% 进行提取,计算蝉翼藤树皮中多酚的提取量。

2.2.3 超声功率对蝉翼藤树皮多酚得率的影响 在提取溶剂为 75%乙醇、液料比为 40 mL/g、超声提取时间 60 min 的条件下,超声功率分别 200 W、300 W、400 W、500 W、600 W 进行提取,计算蝉翼藤树皮中多酚的提取量。

2.2.4 提取时间对蝉翼藤树皮多酚得率的影响 在超声功率 400 W、液料比 40 mL/g、乙醇浓度为 75% 的条件下,超声提取时间分别选取为 0 min、30 min、60 min、90 min、120 min,计算蝉翼藤树皮中多酚的提取量。

2.3 蝉翼藤树皮多酚含量的测定 根据定量多酚含量的标准方法^[10],用纯化水配制浓度为 0.2 mg/mL 的没食子酸对照溶液;分别移取 0.5 mL、2 mL、4 mL、6 mL、8 mL、10 mL 的没食子酸对照溶液于 10 mL 容量瓶中。对于每 100 μL 制备的溶液,加入 300 μL 福林酚试剂和 400 μL 12% 的 Na₂CO₃ 溶液。随后,将最终体积调整至 1 mL。在暗处反应 10 min 后,测定 760 nm 处吸光度。以没食子酸浓度(X)为横坐标、吸光度(Y)为纵坐标绘制标准曲线,拟合得线性回归方程:Y=0.04684X-0.03257(R²=0.9987),浓度范围为 1~20 μg/mL。蝉翼藤树皮多酚的浓度可以通过以下公式确定:

$$\text{产量}(\text{mg/g}) = \frac{CVN}{M}$$

C:由标准曲线确定的多酚浓度(μg/mL);V:溶液的最终体积(mL);N:稀释倍数;M:蝉翼藤功率的质量(g)。

2.4 响应面试验 基于前期单因素实验分析结果,采用 Box-Behnken 中心组合设计策略,借助 Design-Expert 13.0 统计分析平台,构建 4 变量 3 阶次的响应面模型。响应面试验水平与因素设计,见表 1。

表 1 响应面试验设计水平与因素

水平	因素			
	液料比/ (mL·g ⁻¹)	乙醇 浓度/%	超声 时间/min	超声 功率/W
-1	30	65	30	300
0	40	75	60	400
1	50	85	90	500

2.5 蝉翼藤树皮提取物二氯甲烷部位体外抗氧化能力测定

2.5.1 蝉翼藤树皮提取物二氯甲烷部位制备 将上述乙醇提取物与硅胶合并加热至干燥,打成粗粉并全部过 40 目筛。随后使用二氯甲烷进行固液萃取,萃取至浸提液基本无色为止,使用旋转蒸发仪浓缩至干燥,最终得到蝉翼藤树皮二氯甲烷部位浸膏。

2.5.2 DPPH 自由基清除能力的测定 准确称量蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物,配制成浓度为 0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL 系列浓度供试液。同步以超纯水为溶剂,配制等浓度梯度的维生素 C(Vc)溶液作为标准参照体系。在避光条件下,分别移取 100 μL 样品液与等体积 0.2 mmol/L DPPH 溶液于 96 孔板中混合,经 30 min 暗处孵育后,使用酶标仪在 517 nm 波长下测定各孔吸光度,并计算 DPPH 自由基清除率:

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

式中 A₁指含有 DPPH 的吸光值;A₂为未添加 DPPH 样品溶液的吸光值;A₀为 DPPH 试剂的初始吸光值。

2.5.3 ABTS 自由基清除能力的测定 2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)可被氧化形成自由基阳离子 ABTS⁺,这一过程在抗氧化剂的存在下受到抑制^[11]。基于此原理,通过测量蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物和 ABTS 混合物在 743 nm 处的吸光度变化来检测蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物的抗氧化活性。

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

式中 A₁指待测样本加入 ABTS 工作液后的吸光

值; A_2 表示样品溶液的吸光值; A_0 表示 ABTS 工作液的初始吸光值。

2.5.4 实验细胞 实验采用的 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞采购自中国科学院上海细胞库。RAW264.7 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基中进行常规培养, 培养环境维持 37 °C 恒温、5% CO_2 。

2.5.5 细胞活力测定 将 RAW264.7 细胞接种在 96 孔板中(1×10^5 个), 37 °C、5% CO_2 环境中培养 24 h, 然后分别添加 SID, 至终质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 孵育 24 h 后加入 10 μL CCK-8, 继续孵育 2 h, 用酶标仪测量 450 nm 处光密度值(OD)值, 计算相对细胞活力。

2.5.6 提取物对 RAW264.7 细胞 MDA 含量、SOD 及 CAT 活力的影响 将 1×10^5 个/孔细胞接种于 6 孔板, 以 DMEM 培养液为空白组(Control 组), 以不经提取物处理的细胞为模型组即 LPS 组($n = 3$), 以 LPS 终浓度为 100 ng/mL 孵育细胞 1 h 后添加不同浓度的提取物(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蝉翼藤树皮二氯甲烷提取物)培养 24 h 为实验组[按浓度分为对应低剂量(LPS+L 组)、中剂量(LPS+M 组)、高剂量(LPS+H 组)], 根据制造商的方案, 通过试剂盒检测 CAT、MDA、SOD 的水平。

2.5.7 采用流式细胞术和共聚焦检测 RAW264.7 细胞 ROS 产生水平 细胞达到培养密度后收集细胞调整密度至 1×10^5 个/毫升细胞数, 每组设置 3 个复孔(即 3 个独立孔), 在 6 孔板的每孔中加入 2 mL 细胞悬液, 待细胞贴壁后弃去旧培养基, 分别加入完全培养基和不同浓度的蝉翼藤树皮二氯甲烷提取物浸提液(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 将细胞暴露于采用基础培养基 DMEM 配置好的浓度为 10 μM 的 DCFH-DA 荧光探针中, 于 CO_2 培养箱孵育 30 min, 用无血清培养基冲洗细胞 3 次, 最后用 500 μL 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞, 过滤并在流式细胞仪上测定。共聚焦检测时, 将细胞培养在共聚焦小皿中进行相同处理, FITC 荧光的激发和发射波长分别为 488 nm 和 507 nm。

2.6 数据处理 试验均设计 3 次平行实验, 用 GraphPad Prism 9.0 软件和 Design-Expert 13.0 等软件对数据进行处理以及统计分析。

3 结果

3.1 单因素试验结果

3.1.1 液料比对蝉翼藤树皮多酚提取率的影响 研究显示, 蝉翼藤树皮多酚提取率随液料比呈现先增后

减趋势。40 mL/g 时得率最高, 此时溶剂渗透与成分溶解协同最优; 过量溶剂则因浓度梯度削弱及杂质溶出竞争, 导致传质效率下降, 抑制多酚提取^[12]。见图 1。

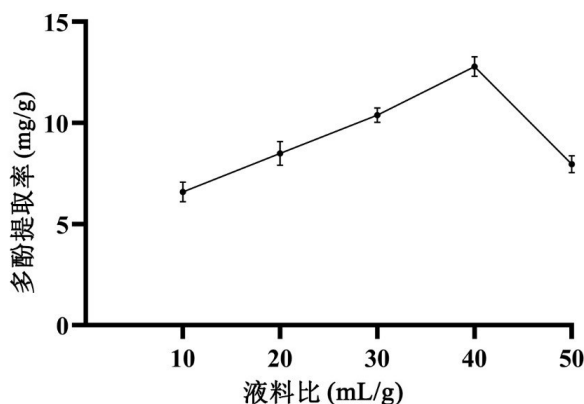


图 1 液料比对蝉翼藤树皮多酚提取率的影响

3.1.2 乙醇体积分数对蝉翼藤树皮多酚提取率的影响 提取溶剂乙醇的体积分数增多时, 蝉翼藤树皮多酚的提取率逐渐提高, 在乙醇体积分数为 55%~75% 时, 多酚提取率急剧提高, 当乙醇体积分数为 75% 时, 蝉翼藤树皮多酚提取率达到最高, 再提高乙醇体积分数, 多酚提取率反而下降, 可能因为蝉翼藤树皮中多酚的溶出特性随着溶剂极性的降低而下降, 从而导致多酚含量降低^[13]。见图 2。

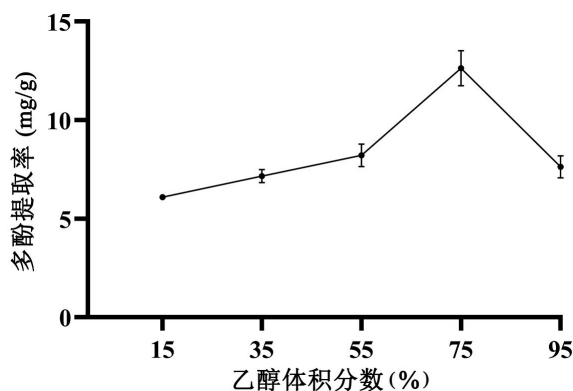


图 2 乙醇体积分数对蝉翼藤树皮多酚提取率的影响

3.1.3 超声功率对蝉翼藤树皮多酚提取率的影响 超声功率对蝉翼藤树皮多酚的溶出过程具有显著调控作用。实验结果显示, 在 400 W 时蝉翼藤树皮多酚的提取率最高。超声功率超过 400 W 时提取率减少, 可能是由于超声处理可促进植物细胞壁解离使蝉翼藤结构变得松散, 促使多酚类物质释放^[12], 但提取功率过大会使多酚结构被破坏, 同时引发脂溶性杂质的竞争性溶出, 导致多酚含量降低^[14]。见图 3。

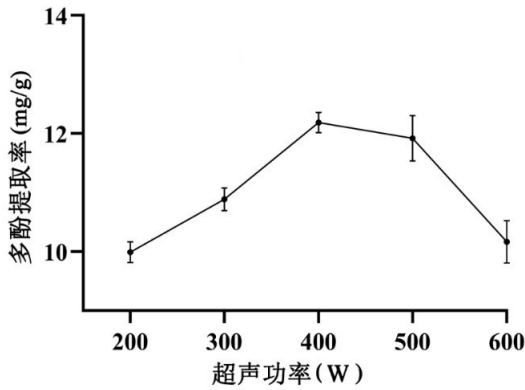


图 3 超声功率对蝉翼藤树皮多酚提取率的影响

3.1.4 提取时间对蝉翼藤树皮多酚提取率的影响

研究表明,在 0~120 min 内,蝉翼藤树皮多酚提取率随超声时间呈先增后降趋势,60 min 时达到峰值。随着提取时间延长,可能导致蝉翼藤树皮多酚的结构被破坏^[15]或者蝉翼藤中的杂质竞争溶出导致多酚提取率降低。见图 4。

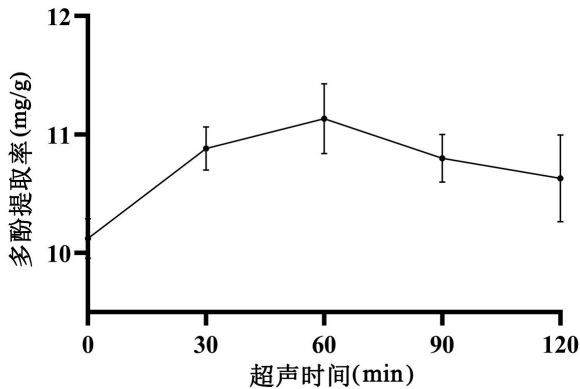


图 4 超声时间对蝉翼藤树皮多酚提取率的影响

3.2 响应面实验结果与分析

3.2.1 响应面实验设计与结果

基于单因素实验的结果,使用 Design-Expert 13.0 软件中的 Box-Behnken 模型来设计实验,并在表 2 中展示了响应面分析的方案和结果。

表 2 超声波辅助提取多酚的响应面实验设计及结果

试验号	液料比/ (mL · g ⁻¹)	乙醇体积 分数/%	时间/ min	超声功 率/W	多酚提取量 /(mg · g ⁻¹)
1	40	75	90	300	10.66
2	40	65	90	400	10.52
3	50	75	30	400	8.07
4	40	75	30	300	9.39
5	30	75	30	400	7.66
6	50	75	60	500	9.71
7	50	85	60	400	5.93
8	40	85	60	500	8.49
9	50	75	60	300	7.11

表 2(续) 超声波辅助提取多酚的响应面实验设计及结果

试验号	液料比/ (mL · g ⁻¹)	乙醇体积 分数/%	时间/ min	超声功 率/W	多酚提取量 /(mg · g ⁻¹)
10	40	75	60	400	13.25
11	40	65	60	300	10.82
12	40	65	30	400	12.55
13	30	75	60	500	8.64
14	40	85	30	400	7.71
15	30	85	60	400	7.53
16	40	75	60	400	13.07
17	40	75	90	500	11.17
18	40	75	60	400	12.69
19	40	75	30	500	11.59
20	50	75	90	400	8.51
21	30	75	60	300	10.33
22	40	85	60	300	8.08
23	50	65	60	400	7.90
24	40	65	60	500	12.58
25	40	75	60	400	12.28
26	30	65	60	400	9.84
27	40	85	90	400	10.57
28	40	75	60	400	14.09
29	30	75	90	400	10.16

3.2.2 模型方程的建立与方差分析

拟合多酚得率的结果,蝉翼藤树皮多酚提取率与液料比、乙醇体积分数、超声时间和超声功率建立二次多项式回归方程模型:

$$Y = 13.08 - 0.5778A - 1.33B + 0.3855C + 0.4837D + 0.0864AB - 0.5158AC + 1.07AD + 1.22BC - 0.3380BD - 0.4224CD - 3.26A^2 - 1.87B^2 - 1.11C^2 - 1.11D^2$$

(Y:多酚产量,A:液料比,B:乙醇体积分数,C:超声时间,D:超声功率),回归模型的方差分析结果见表 3。方差分析结果显示,该数学模型的 F 检验值达到 23.12, P < 0.001,证明该模型具有统计学意义。失拟项检验结果 (P = 0.6728) 未达显著性水平 (α = 0.05),表明方程式成立,方法可靠,模型与实验数据具有良好适配性。模型的复合相关系数 R² = 0.9585,表明相关性较强。可以用该模型优化蝉翼藤树皮中多酚的提取工艺。根据 F 值可知所考察的因素对响应值影响力的大小顺序为乙醇体积分数 (B) > 液料比 (A) > 超声功率 (D) > 超声时间 (C)。

表 3 回归方程方差分析

来源	平方和	自由度	R ²	F	P
模型	123.26	14	8.8	23.12	<0.001
A	4.01	1	4.01	10.52	0.0059
B	21.11	1	21.11	55.42	<0.001
C	106.8	1	106.8	4.68	0.0482
D	2.81	1	2.81	7.37	0.0168
AB	0.0298	1	0.0298	0.0783	0.7837
AC	1.06	1	1.06	2.79	0.1168

表 3(续) 回归方程方差分析

来源	平方和	自由度	R^2	F	P
AD	4.6	1	4.6	12.07	0.0037
BC	6	1	6	15.75	0.0014
BD	0.457	1	0.457	1.2	0.2919
CD	0.7137	1	0.7137	1.87	0.1926
A ²	69.06	1	69.06	181.33	< 0.0001
B ²	22.67	1	22.67	59.53	< 0.0001
C ²	8.06	1	8.06	21.15	0.0004
D ²	8.06	1	8.06	21.17	0.0004
残差	5.33	14	0.3809		
失拟项	3.49	10	0.3489	0.7571	0.6728
纯误差	1.84	4	0.4608		
总和	128.59	28			

注： $R^2 = 0.9585$, $R^2_{adj} = 0.9171$, $C.V. = 6.15\%$ 。

3.2.3 交互作用分析结果 使用 Design-Expert 13.0 软件得到 4 因素和蝉翼藤树皮多酚得率的响应面和等高线图, 结果见图 5。响应曲面的坡度越大, 表明该因素对响应面的影响越显著; 而等高线越接近椭圆形, 则表明两个因素之间的交互作用越明显^[16]。根据图 5, 乙醇体积分数与提取时间交互作用的响应面坡度较陡峭, 表明两者交互作用明显 ($P < 0.05$)。乙醇体积分数与提取时间之间的交互作用表现出较陡峭的响应面坡度, 这表明两者之间的交互作用非常显著 ($P < 0.05$)。通过表 3 的 F 值分析, 可以得出两者交互作用对蝉翼藤树皮多酚含量的影响程度依次为: $BC > AD > AC > CD > BD > AB$, 其中乙醇体积分数与提取时间的交互作用影响最大。

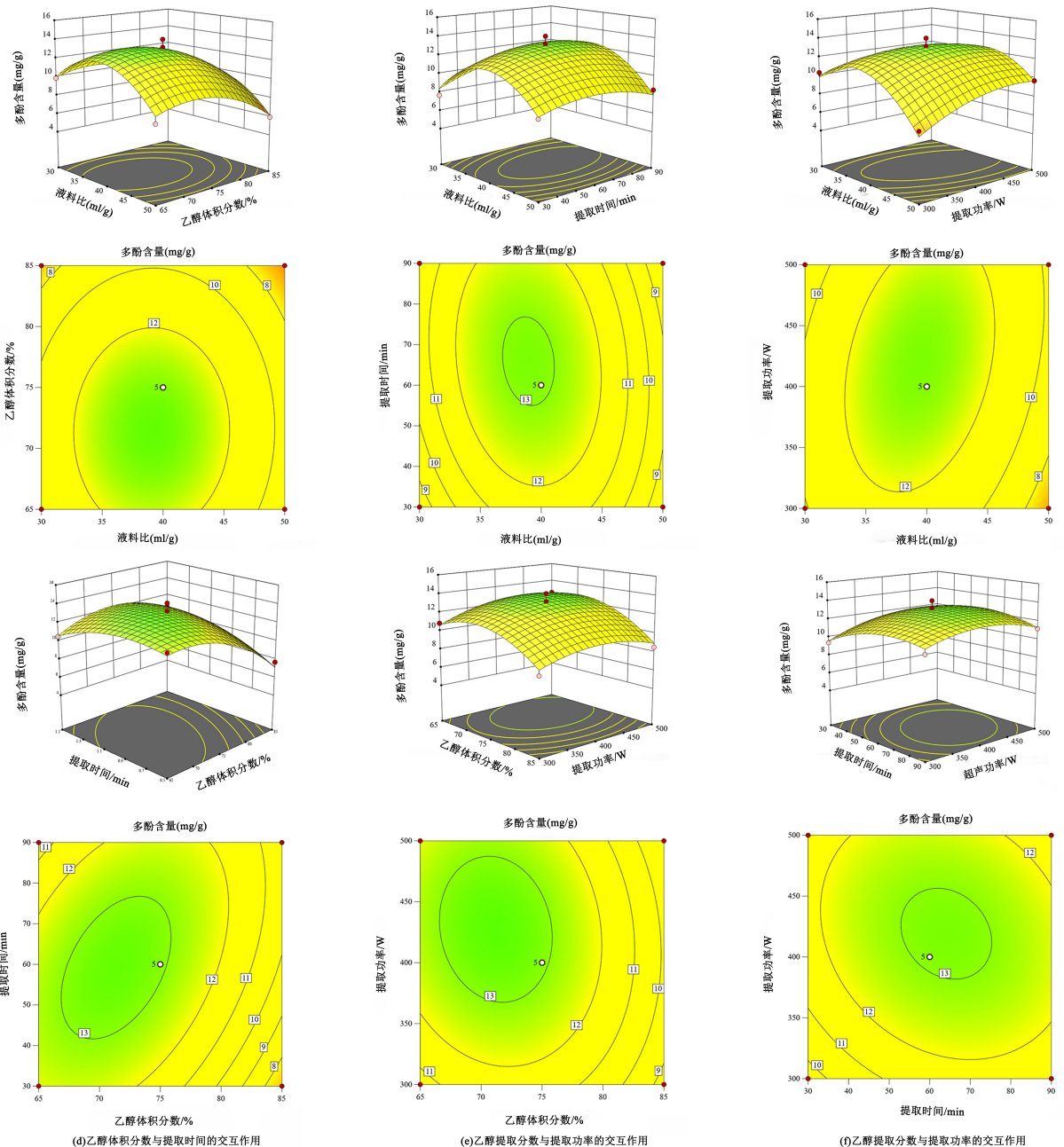


图 5 各因素相互作用对蝉翼藤树皮多酚含量影响的响应面图及等高线图

3.2.4 最佳工艺条件的预测及模型验证 通过使用 Design-Expert 13.0 软件,本研究优化了多酚的响应面模型,最终确定了最佳提取工艺参数:乙醇体积分数为 75%,料液比为 39.07 mL/g,超声时间为 59 min,超声功率为 400 W,从而实现了 13.34 mg/g 的最佳提取率。在实际应用中,将这些参数微调为:液料比调整至 40 mL/g,其余条件保持不变。在此条件下,进行了 3 次平行实验,测得多酚的实际得率为 (13.50 ± 0.43) mg/g,与预测值非常接近。这表明优化后的提取工艺不仅切实可行,而且具有较高的稳定性,能够有效应用于蝉翼藤树皮中多酚的提取工作。

3.3 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物抗氧化性活性评价

3.3.1 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基的清除能力 DPPH 自由基分析法作为评估天然产物抗氧化活性的经典方法^[17],该模型特别适用于植物源生物活性成分(如多酚、黄酮等)的活性筛选与定量评估。如图 6 所示,随着 SID 浓度的增加,DPPH 自由基的清除活性呈逐步上升趋势。SID 浓度为 0.2 mg/mL 时,自由基清除率仅为 33.6%,当 SID 浓度为 1.2 mg/mL 时,自由基清除率为 67%。尽管样品的清除能力低于维生素 C,但实验显示多酚成分对抗氧化活性有潜在影响。ABTS 是另一种常用于检测物质抗氧化活性的方法,它是以前离子自由基的脱色测定为基础的,对亲脂性和亲水性提取物都有很好的指示作用。蓝绿色发色团存在于稳定的自由基正离子中,抗氧化剂会降低颜色强度^[18]。SID 对 ABTS 自由基活性的清除率与浓度有关,如图 7 所示,当浓度为 0.2 mg/mL 时,自由基清除率仅为 20.5%,而当浓度为 1.2 mg/mL 时,自由基清除率达到 68.4%。

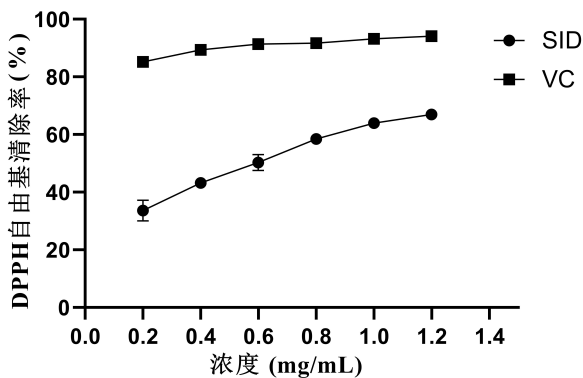


图 6 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物对 DPPH 自由基清除能力

3.3.2 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位对 RAW264.7 细胞存活率的影响 与 Control 组相比,蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物在 100 μ g/mL 以下,对 RAW264.7 细胞存活率无明显改变,故选取 25 μ g/mL、50 μ g/

mL、100 μ g/mL 的浓度进行后续实验。见图 8。

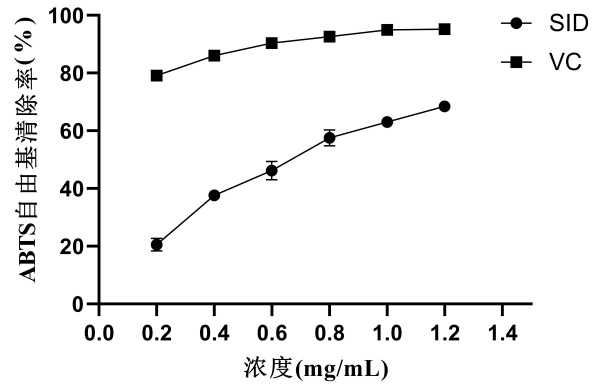


图 7 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物对 ABTS⁺ 自由基清除能力

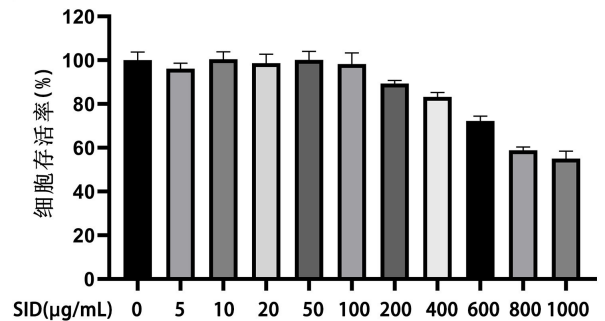
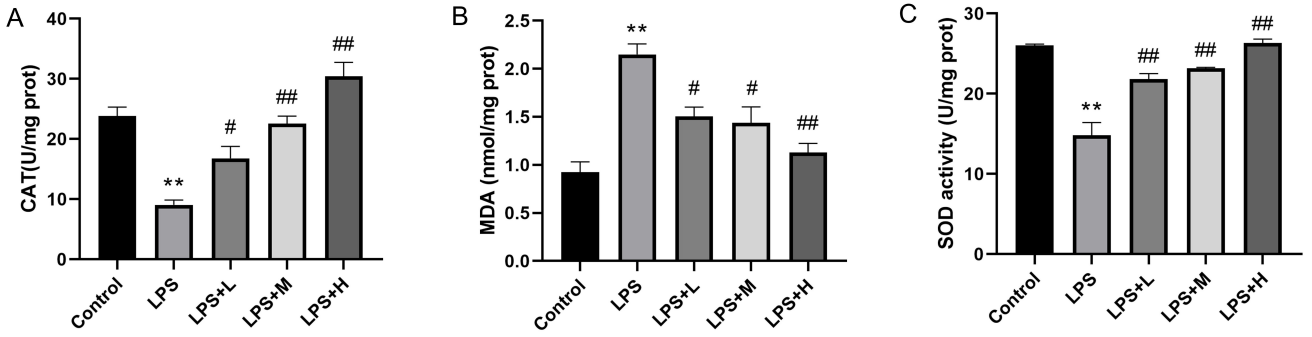


图 8 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物对 RAW264.7 细胞活力的影响

3.3.3 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位对 RAW264.7 细胞丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢酶(CAT)活力的影响 研究表明,人体抗氧化剂的评估在很大程度上依赖于 CAT、MDA 和 SOD,它们是氧化应激的重要调节剂。CAT 作为关键的过氧化氢分解酶,其活性水平直接反映生物体系的抗氧化效能。MDA 作为脂质过氧化反应的标志性代谢产物,其异常蓄积会导致细胞氧化损伤。SOD 则通过催化超氧自由基阴离子的歧化反应,有效减轻氧自由基对生物大分子的氧化损伤。基于此,本研究通过检测不同组别氧化损伤细胞模型中 MDA 含量及 SOD、CAT 活性水平,系统评估蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物的抗氧化应激能力。如图 9 所示,与 Control 组相比,LPS 组细胞 SOD、CAT 活性显著下降 ($P < 0.01$),MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$),证实成功构建氧化损伤细胞模型;而经蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物干预后,细胞 SOD、CAT 活性较 LPS 组显著提升 ($P < 0.05$),MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$),并且上述变化呈现剂量依赖性,其中 LPS+H 组的效果最为显著。结果表明,蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物可以显著改善 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞氧化损伤。

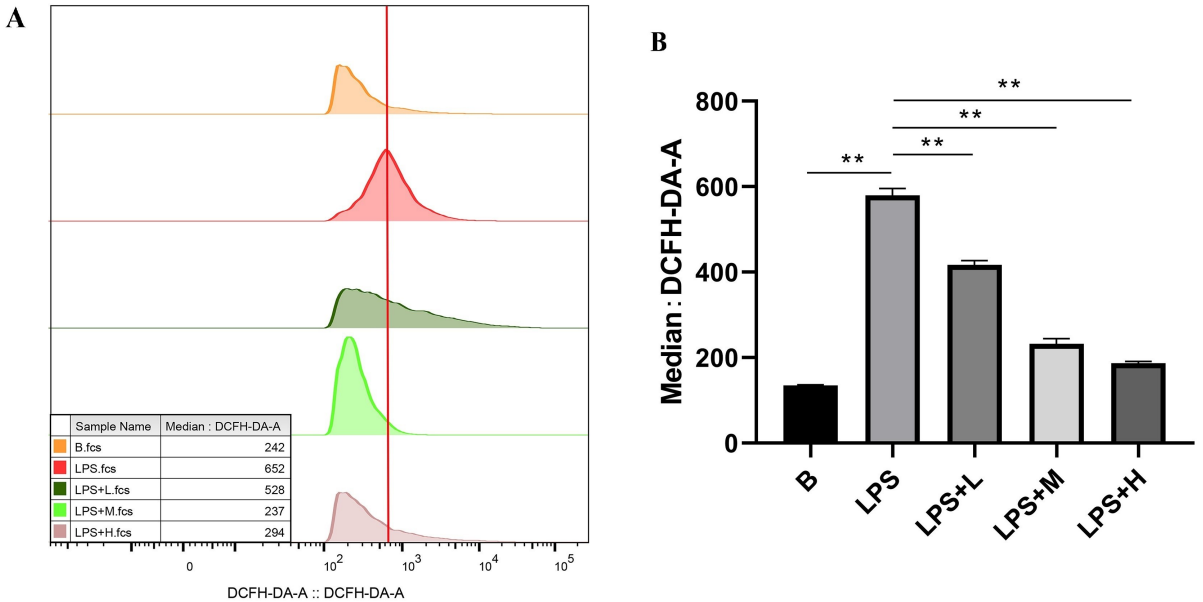


注:与 Control 组比较, ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 9 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物可以改善 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞氧化损伤

3.3.4 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 ROS 水平的影响 过量的 ROS 会诱导氧化应激引起细胞损伤,通过流式细胞术测量了不同分组内细胞 ROS 释放的情况。如图 10 所示,用 LPS 处理细胞后,与空白组相比,模型组的 ROS 水平显著升高 ($P < 0.01$),与模型组相比,低、中和高剂量组的 ROS 释放量均有不同程度的降低,其中,以高剂量组效果最为显著。综上,蝉翼藤树皮二氯甲烷部位

提取物可以显著提高细胞清除 ROS 的能力,降低细胞氧化损伤。使用共聚焦检测鉴定 RAW264.7 中 ROS 的表达。图 11 表明 LPS 组比空白组表现出更强的荧光。相比之下,与 LPS 组相比,不同浓度的蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物处理组的荧光逐渐减弱。此结果可知,蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物可减少 LPS 诱导 RAW264.7 后细胞内 ROS 的产生。



注:A为 ROS 染色的流式结果图;B为每组 ROS 的中位荧光强度直方图。与 LPS 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 10 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物对 LPS 诱导的细胞氧化应激 ROS 流式细胞术结果

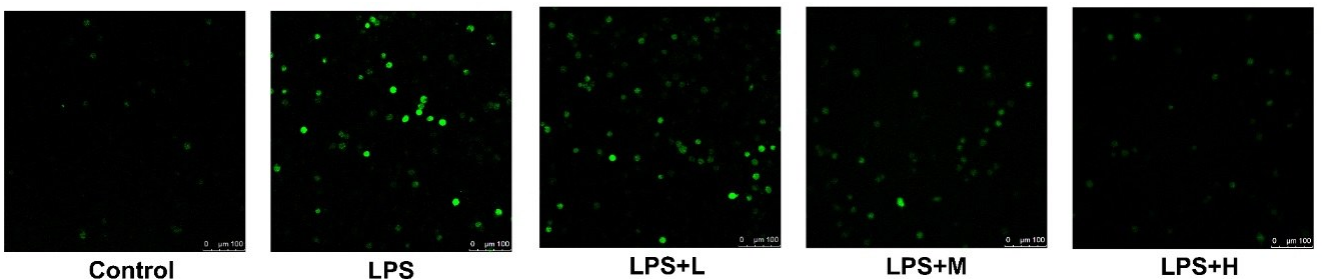


图 11 蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物对 LPS 诱导的细胞氧化应激 ROS 荧光共聚焦检测结果

4 结论

结合单因素实验的结果,本研究采用响应面法对蝉翼藤树皮多酚的提取工艺进行优化并最终确定了最佳提取条件为:乙醇浓度 75%、液料比 40 g/mL、提取时间 60 min 和提取功率 400 W。在此最优条件下,测得蝉翼藤树皮多酚的产量为 (13.50 ± 0.43) mg/g,与预测值非常接近,认为此次试验模型的设计是可行的,通过体外抗氧化试验得出蝉翼藤树皮二氯甲烷部位提取物具有抗氧化活性。蝉翼藤树皮二氯甲烷提取物可显著提高 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 SOD 及 CAT 活力,降低其 MDA 含量及 ROS 水平,从而对细胞的氧化应激损伤产生修复作用。作为具有开发潜力的药用植物,蝉翼藤的系统研究在现有文献中仍显匮乏。本研究通过对其多酚的最佳提取工艺进行研究,为构建蝉翼藤资源开发的药理学理论框架提供科学依据。

参考文献:

- [1] 杨学东,徐丽珍,杨世林,等. 蝉翼藤属药用植物的研究概况[J]. 中草药,2000,31(5):74-75.
- [2] ZUO J, MAO K J, YUAN F, et al. Xanthones with anti-tumor activity isolated from *Securidaca inappendiculata* [J]. Med Chem Res, 2014, 23(11):4865-4871.
- [3] JI C L, DAI S, LIU H, et al. Polyphenols from *Securidaca inappendiculata* alleviated acute lung injury in rats by inhibiting oxidative stress sensitive pathways [J]. Chin Herbal Med, 2021, 13(3):381-388.
- [4] FIRESTEIN G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. Nature, 2003, 423(6937):356-361.
- [5] JI J Y, WANG Q W, WANG M L, et al. Chemical constituents from the stems of *Securidaca inappendiculata* hassk[J]. Fitoterapia, 2019, 137:104271.
- [6] 白瑜,王武,陈启蓉. 多酚化合物对蛋白质构象疾病的抑制作用研究进展[J]. 生命科学, 2023, 35(2):140-147.
- [7] 张清安,范学辉. 多酚类物质抗氧化活性评价方法研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(11):169-172.
- [8] 排合尔丁·穆太力甫,木艾塔尔·努尔麦麦提,艾尼娅尔

·艾克木,等. 响应面法优化圆苞车前子多酚与总黄酮超声提取工艺及其抗氧化活性分析 [J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(10):1801-1809.

- [9] ZUO J, XIA Y, MAO K J, et al. Xanthone-rich dichloromethane fraction of *Securidaca inappendiculata*, the possible antirheumatic material base with anti-inflammatory, analgesic, and immunodepressive effects [J]. Pharm Biol, 2014, 52(11):1367-1373.
- [10] RAJAN V K, MURALEEDHARAN K. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid [J]. Food Chem, 2017, 220:93-99.
- [11] 林夕梦. 碱提枣渣多糖的结构表征及抗氧化活性研究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2020.
- [12] 王焕. 超声辅助水浸提薏米多酚的工艺优化及其抗氧化性研究 [J]. 化学工程师, 2023, 37(4):4-7, 20.
- [13] 李汝艳,杨申明,张旗麟,等. 超声-酶法辅助提取青叶胆多酚工艺优化及抗氧化性研究 [J]. 化学试剂, 2023, 45(5):106-112.
- [14] 陈建福,林洵,陈俊尧,等. 响应面法优化超声波辅助提取柚叶多酚的工艺研究 [J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(3):47-54.
- [15] 戴卿印,陆运龙,黄茜,等. 超声波辅助提取花生红衣工艺优化及抗菌抗氧化性能研究 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(20):66-72.
- [16] 徐兰程,杨佳燕,徐惠,等. 响应面法优化芒果核黄酮提取工艺研究 [J]. 中国饲料, 2023(8):18-22.
- [17] KANG Q Z, CHEN S S, LI S F, et al. Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 124:1137-1144.
- [18] BAEZA G, SARRIÁ B, BRAVO L, et al. Polyphenol content, in vitro bioaccessibility and antioxidant capacity of widely consumed beverages [J]. J Sci Food Agric, 2018, 98(4):1397-1406.

收稿日期:2025-04-05;修回日期:2025-05-18

(本文编辑 覃洪含)