

藏茜草不同溶剂提取物的 抗氧化活性研究

景临林¹, 马慧萍¹, 范小飞^{1,2}, 杨贝贝³, 彭晓霞³, 贾正平^{1,*}

(1. 兰州军区兰州总医院药剂科, 甘肃兰州 730050; 2. 兰州大学药学院, 甘肃兰州 730000;

3. 甘肃中医学院, 甘肃兰州 730000)

摘要:采用 DPPH 自由基清除法、ABTS 自由基清除法、羟自由基清除法、超氧阴离子清除法、还原力测定法和螯合力测定法六种抗氧化模型对藏茜草 95% 乙醇提取物以及石油醚相, 乙酸乙酯相, 正丁醇相和水相等 4 个不同极性部位的抗氧化活性进行评价, 同时分析抗氧化活性与总酚和总黄酮含量的关系。研究表明, 除水提部位外, 藏茜草其它 4 个极性部位提取物均表现出一定的抗氧化活性, 其抗氧化活性与多酚和总黄酮含量呈显著相关。其中, 乙酸乙酯部位总黄酮和总多酚含量最高, 抗氧化活性也最强, 其总黄酮和总多酚含量分别为 (232.03 ± 1.74) mg 芦丁当量/g 提取物和 (173.53 ± 1.75) mg 没食子酸当量/g 提取物, 其清除 DPPH 自由基、超氧阴离子、羟自由基和 ABTS 自由基的 EC_{50} 分别为 0.06 ± 0.01 、 0.17 ± 0.01 、 (0.24 ± 0.02) mg/mL 和 (1.75 ± 0.23) μ g/mL, 对金属离子螯合力的 EC_{50} 为 (0.11 ± 0.01) mg/mL。藏茜草的乙酸乙酯极性部位具有显著的抗氧化活性, 是天然抗氧化活性化合物的良好来源。

关键词:藏茜草, 抗氧化活性, 总黄酮, 总多酚

Study on the antioxidant activity of different extracts from *Rubia tibetica* Hook.F.

JING Lin-lin¹, MA Hui-ping¹, FAN Xiao-fei^{1,2}, YANG Bei-bei³, PENG Xiao-xia³, JIA Zheng-ping^{1,*}

(1. Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command of CPLA, Lanzhou 730050, China;

2. Department of Medicinal Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

3. Gansu college of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The present study was carried out to evaluate the antioxidant capacity of the 95% ethanol crude extracts and their four solvent fractions (petroleum ether, ethyl acetate, normal butyl alcohol and aqueous) of *Rubia tibetica* Hook.F. The extracts of the *Rubia tibetica* Hook.F. were evaluated for their total phenols, total flavonoids and antioxidant activity (DPPH radical, ABTS radical, hydroxyl radical, superoxide scavenging effect, reducing power and ferrous ions chelating activities). The relationship between the antioxidant activity and the content of total phenolics and total flavonoids was analysed. The results showed that all the fraction except water fraction had great antioxidant activity and the content of total phenolics and total flavonoids had a highly significant correlation with the activity. The ethyl acetate fraction was the most effective fraction with the highest content of total phenolics and total flavonoids and the content of them were (232.03 ± 1.74) mg rutin equivalent/g extract and (173.53 ± 1.75) gallic acid equivalent mg/g extract, respectively. The EC_{50} values of ethyl acetate fraction based on DPPH, superoxide, hydroxyl radical and ABTS was 0.06 ± 0.01 , 0.17 ± 0.01 , (0.24 ± 0.02) mg/mL and (1.75 ± 0.23) μ g/mL. The EC_{50} of ethyl acetate fraction on ferrous ions chelating activities was (0.11 ± 0.01) mg/mL. Ethyl acetate fraction of *Rubia tibetica* Hook.F, a strong ability to act as antioxidant, may be considered as a natural source of active compounds.

Key words: *Rubia tibetica* Hook.F; antioxidant activity; total flavonoids; total phenolics

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)01-0091-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.01.011

活性氧 (ROS) 是细胞有氧代谢过程中的产物,

其在低浓度时参与机体的免疫过程, 抵御外界刺激对机体的损害。但是过量 ROS 会诱导脂质过氧化, 破坏核酸、蛋白质、DNA 等生物大分子, 导致细胞衰老或死亡^[1]。研究表明: 心脑血管疾病、神经退行性疾病、癌症和衰老的发生发展都有 ROS 代谢异常有关^[2]。合理补充抗氧化剂能够保护机体免受 ROS 诱导的氧化应激损伤, 延缓人体衰老, 增强人体免疫力

收稿日期: 2014-03-18

作者简介: 景临林 (1982-), 男, 博士, 研究方向: 天然产物化学。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81202458); 全军医药科研“十二五”面上项目 (CLZ12JA04); 中国博士后科学基金 (2012M521926)。

力,对多种疾病具有预防作用^[3]。人工合成抗氧化剂,如丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)等,虽有一定抗氧化作用,但是可能会引起肝脏损伤,甚至诱导癌症的发生^[4]。因此,从食用及药用植物中寻找广谱、低毒、安全、有效的天然抗氧化剂已成为抗氧化剂发展的必然趋势。

藏茜草是一种传统藏药,藏药名:佐,以茜草科植物西藏茜草(*Rubia tibetica* Hook.F)的干燥根及根茎入药,具有清热凉血等功效,主治血病、扩散伤热、肺肾热邪和大小肠热^[5]。藏茜草生长于海拔3600m处河滩砾石上,主要产自西藏阿里札达,通过千百年的进化选择,适应了高原缺氧、寒冷干燥的气候环境,体内含有的特殊产物可能具有很好的抗氧化活性,但是关于藏茜草抗氧化研究未见报道。本文采用DPPH、ABTS、羟自由基、超氧阴离子、还原力和螯合力六种体外抗氧化模型对藏茜草95%乙醇提取物以及石油醚相,乙酸乙酯相,正丁醇相和水相等4个极性部位的抗氧化活性进行研究,并测定其总多酚和总黄酮含量,进行相关性分析,为藏茜草资源开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

藏茜草 购自青海西宁三江宝商贸有限公司,并经兰州大学药学院生药研究所杨永健教授鉴定为西藏茜草(*Rubia tibetica* Hook.F)。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、菲罗嗪(Ferrozine) sigma公司;还原型辅酶I(NADH)、吩嗪硫酸甲酯(PMS)、抗坏血酸(V_c)、钼酸铵、硫代巴比妥酸(TBA) 阿拉丁试剂公司;芦丁标准品、水杨酸标准品 中国食品药品检定研究院;钨酸钠、钼酸钠、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、过硫酸钾磷酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、三氯乙酸(TCA)、硫酸、盐酸等均为市售分析纯试剂。

DJ-04B 小型中药粉碎机 上海鼎广机械设备有限公司;Spectramax i3 多功能酶标仪 Molecular Devices公司;RE52CS 型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;AE204 型电子天平 梅特勒-托利多仪器有限公司;SK3300L 超声清洗器 上海精密仪器仪表有限公司;UV2800SPC 紫外可见分光光度计 上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 提取方法 藏茜草的提取按照文献方法^[6]进行,具体步骤为:干药材用粉碎机粉碎,准确称量100g药材粉末,用500mL 95%乙醇浸泡12h,超声提取30min,再回流提取2h,重复提取两次,趁热过滤,合并滤液,减压浓缩得到浅棕色浸膏,为藏茜草95%醇提部位(15.61g)。提取物加5倍量的蒸馏水超声30min后得到悬浮液,将其移置500mL分液漏斗中,依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分别萃取3次,合并各自萃取液并保留水相,减压除去溶剂后,真空干燥至恒重,得到不同溶剂萃取物,分别为石油

醚部位(0.77g),乙酸乙酯部位(4.18g),正丁醇部位(3.50g)和水提部位(3.16g)。

1.2.2 抗氧化活性的测定

1.2.2.1 DPPH 自由基清除实验 不同质量浓度(0.1~0.4mg/mL)的样品和 V_c 溶液125 μ L,分别加入125 μ L 0.1mmol/L DPPH 95%乙醇溶液中,暗处室温反应30min,以95%乙醇溶剂做空白对照,测量其在波长517nm处的吸光度(A_i)。测定125 μ L DPPH 95%乙醇溶液与125 μ L 95%乙醇混合后在波长517nm处的吸光度(A_0);测定125 μ L 95%乙醇溶液与125 μ L 样品溶液在波长517nm处的吸光度(A_j)^[7]。按式(1)计算其清除率,并计算其 EC_{50} 。

$$\text{清除率}(\%) = (1 - (A_i - A_j) / A_0) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.2.2 ABTS⁺·清除实验 将等体积的7mmol/L ABTS溶液与2.45mmol/L过硫酸钾混合使之反应并置于暗处12~16h,制备ABTS⁺·。用95%乙醇将ABTS⁺·溶液稀释至其在波长734nm处吸光度为0.70 $\pm$ 0.02。将100 μ L不同质量浓度(0.025~0.4mg/mL)样品和 V_c 溶液加入3.9mL ABTS⁺·溶液中,室温放置10min,测量其在波长734nm处的吸光度(A_i)。测定3.9mL ABTS⁺·溶液与100 μ L 95%乙醇混合后在波长734nm处的吸光度(A_0);测定3.9mL 95%乙醇溶液与100 μ L 样品溶液在波长734nm处的吸光度(A_j)^[8]。按式(1)计算其清除率,并计算其 EC_{50} 。

1.2.2.3 超氧阴离子自由基清除实验 不同质量浓度(0.2~1.6mg/mL)的样品和 V_c 溶液100 μ L,依次加入50 μ L 500 μ mol/L的NADH(溶解于0.2mol/L磷酸盐缓冲液,pH7.4)、50 μ L 200 μ mol/L的NBT和50 μ L 20 μ mol/L的PMS。置于25 $^{\circ}$ C条件下反应8min,测量其在波长560nm处的吸光度(A_i)。测定50 μ L NADH、50 μ L NBT和50 μ L PMS与100 μ L 95%乙醇混合后在波长560nm处的吸光度(A_0);测定50 μ L NADH、50 μ L NBT和50 μ L水与100 μ L 样品溶液在波长560nm处的吸光度(A_j)^[9]。按式(1)计算其清除率,并计算其 EC_{50} 。

1.2.2.4 羟自由基清除实验 不同质量浓度(0.0625~1.0mg/mL)样品和 V_c 溶液500 μ L,依次加入28mmol/L脱氧核糖(溶于pH7.0的0.2mmol PBS磷酸缓冲液)中50 μ L、1mmol/L的EDTA 50 μ L、1mmol/L的氯化亚铁50 μ L和1mmol/L的 H_2O_2 50 μ L,最后加入1mmol/L的抗坏血酸50 μ L启动反应,37 $^{\circ}$ C水浴孵育1h,加入10%三氯乙酸250 μ L终止反应,再加入0.5% TBA(溶于25mmol/L的NaOH溶液),105 $^{\circ}$ C孵育0.5h,于532nm处测得吸光度(A_i),用500 μ L蒸馏水代替样品溶液,测得吸光度(A_0),用PBS代替脱氧核糖测得吸光度(A_j)^[10]。按式(1)计算其清除率,并计算其 EC_{50} 。

1.2.2.5 金属离子螯合能力实验 不同质量浓度(0.03125~0.5mg/mL)的样品和EDTA溶液1mL,加入1mmol/L的 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 50 μ L和5mmol/L Ferrozine 40 μ L,振荡混匀。37 $^{\circ}$ C孵育10min后,测定波长562nm处吸光度(A_i)。用水代替Ferozine时测得吸光度(A_j),用95%乙醇代替样品溶液时测得吸

光度 (A_0)^[11]。按式(1)计算其螯合率,并计算其 EC_{50} 。

1.2.2.6 还原力测定实验 不同质量浓度(0.1~0.5mg/mL)的样品和 V_c 溶液 1.0mL,加入 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH6.6)2.5mL 和 1% 的铁氰化钾溶液 2.5mL,50℃ 水浴孵育 20min,快速冷却,然后加入 2.5mL 10% (w/v) 三氯乙酸溶液,混合溶液 3000r/min 离心 10min,精密吸取上清液 2.5mL,加入 2.5mL 蒸馏水和 0.5mL 0.1% 的三氯化铁溶液,在 700nm 处测吸光度 A ,吸光度值越大,还原力越强^[12]。

1.2.3 含量测定

1.2.3.1 总黄酮含量测定 将 0.5mL 不同质量浓度的芦丁标准品溶液(0~140 μ g/mL)置于 2mL 离心管中,加入 5% $NaNO_2$ 溶液 50 μ L,摇匀,静置 6min,加入 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液 50 μ L,摇匀,静置 6min,最后加入的 1mol/L $NaOH$ 溶液 250 μ L,摇匀,静置 15min,510nm 波长处测吸光值,重复三次,取平均值。以芦丁的质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。根据芦丁标准曲线,按照相同方法求得各样品中总黄酮含量^[13]。

1.2.3.2 总酚含量的测定 将 0.1mL 不同质量浓度的没食子酸标准品溶液(0~140 μ g/mL)置于 4mL 离心管中,加入 1mL Folin-Ciocalteu 试剂,振荡 5min 后加入 1mL 7% Na_2CO_3 溶液充分混匀,室温放置 5h,760nm 波长处测吸光值,重复三次,取平均值。以没食子酸的质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。根据没食子酸标准曲线按照相同方法求得各样品中总酚含量^[14]。

1.3 数据处理

实验数据采用 Excel 处理、SPSS19.0 软件进行双变量相关性分析和线性回归,所有数据均以平均数 $\pm$ 标准偏差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果与分析

2.1 藏茜草不同极性部位对 DPPH 自由基的清除作用

由图 1 和表 1 可知,不同极性部位对 DPPH 自由基清除能力存在显著差异,且在 0.0125~0.2mg/mL 终浓度范围内呈明显的量效关系。其中,乙酸乙酯部位的 EC_{50} 为 (0.06 $\pm$ 0.01) mg/mL,随显著高于 V_c 的 EC_{50} (0.013 $\pm$ 0.002) mg/mL,但仍然表现出较高的

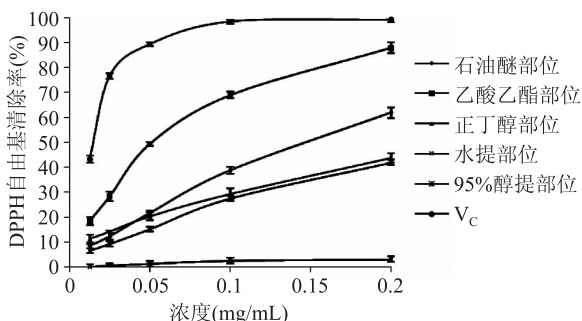


图 1 藏茜草不同极性部位对 DPPH 自由基的清除率

Fig.1 DPPH radical scavenging activity of different extract from *R. tibetica* Hook. F

自由基清除能力。正丁醇部位和 95% 醇提部位清除 DPPH 自由基能力相当,且活性较小,而水提部位对 DPPH 自由基几乎没有清除作用。

2.2 藏茜草不同极性部位对 ABTS 自由基的清除作用

由图 2 和表 1 可知,除水提部位外,其它四个极性部位对 $ABTS^+ \cdot$ 均表现出一定的清除能力,且有明显的量效关系。其中乙酸乙酯部位对 $ABTS^+ \cdot$ 清除能力最强,在质量终浓度 10 μ g/mL 时,清除率可达 97.89%。不同极性部位清除 $ABTS^+ \cdot$ 自由基的能力顺序为:乙酸乙酯部位 > 石油醚部位 > 95% 醇提部位 > 正丁醇部位 > 水提部位。

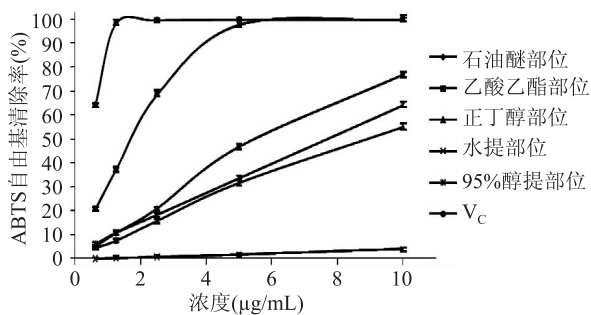


图 2 藏茜草不同极性部位对 ABTS 自由基的清除率

Fig.2 ABTS radical scavenging activity of different extract from *R. tibetica* Hook. F

2.3 藏茜草不同极性部位对超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 的清除作用

PMS 与 NADH 作用会产生超氧阴离子,超氧阴离子进一步将 NBT 转化成蓝色物质 formazane,该化合物在 560nm 处具有强吸光度,自由基清除剂可减少 formazane 的生成,使 560nm 波长处的吸光度降低,从而反映出对超氧阴离子清除能力。利用该方法测定藏茜草不同极性部位对超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 的清除作用(图 3 和表 1),结果表明:乙酸乙酯部位对超氧阴离子有较强的清除能力,且在高浓度时清除率高于 V_c 。石油醚部位在低浓度时清除率较弱,但是在高浓度时其清除能力与 V_c 相当。其他三个极性部位清除能力均较弱,其中,水提取部位对超氧阴离子自由基没有清除作用。清除能力顺序为:乙酸乙酯部位 > 石油醚部位 > 正丁醇部位 > 95% 醇提部位 > 水提部位。

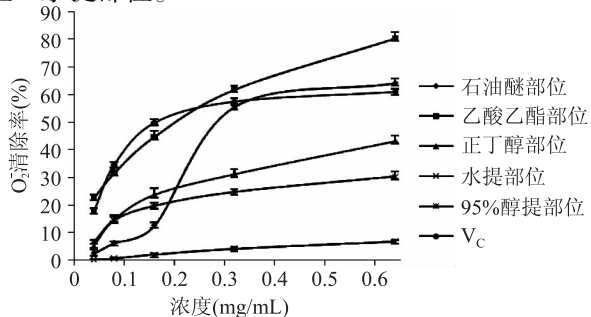


图 3 藏茜草不同极性部位对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率

Fig.3 Superoxide radical scavenging activity of different extract from *R. tibetica* Hook. F

表1 藏茜草不同极性部位对5种抗氧化评价方法的清除率 EC_{50} Table 1 The EC_{50} of different extracts from *R tibetica* Hook.F by five antioxidant assays

有效部位	DPPH· (mg/mL)	ABTS ⁺ · (μg/mL)	·OH (mg/mL)	O ₂ ⁻ · (mg/mL)	螯合力 (mg/mL)
95% 醇提部位	0.26 ± 0.01	7.75 ± 0.52	0.19 ± 0.01	> 1.00	0.28 ± 0.02
石油醚部位	0.15 ± 0.01	5.50 ± 0.67	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.22 ± 0.01
乙酸乙酯部位	0.06 ± 0.01	1.75 ± 0.23	0.24 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.01
正丁醇部位	0.23 ± 0.01	9.00 ± 0.34	0.17 ± 0.02	> 1.00	0.16 ± 0.01
水提部位	> 1.00	> 1.00	0.80 ± 0.06	> 1.00	> 0.50
V _c	0.013 ± 0.002	0.40 ± 0.06	0.029 ± 0.003	0.23 ± 0.01	-
EDTA	-	-	-	-	0.062 ± 0.008

2.4 藏茜草不同极性部位对羟自由基 (OH·) 清除作用

Fenton 反应产生的羟自由基能将脱氧核糖降解为丙二醛,丙二醛与硫代巴比妥酸反应生成的红色物质在 532nm 处有最大吸收,通过检测吸光度值的变化可以反映羟自由基清除能力。从图 4 和表 1 可知,在测试浓度范围内,藏茜草不同极性部位清除羟基自由基的能力随样品浓度增大而逐渐增强,但均弱于 V_c。各极性部位对羟基自由基的清除能力的顺序为正丁醇部位 > 95% 醇提部位 > 乙酸乙酯部位 > 石油醚部位 > 水提部位

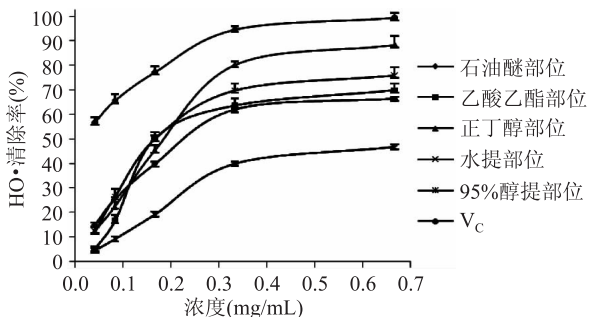


图4 藏茜草不同极性部位对 OH·的清除率

Fig4 Hydroxyl radical scavenging activity of different extract from *R tibetica* Hook.F

2.5 藏茜草不同极性部位对金属的螯合能力测定

测定亚铁离子螯合能力的大小是评价氧化剂抗氧化性能常用的方法之一,金属离子螯合后可降低其在自由基氧化过程中催化作用,减少自由基生成。螯合能力越强被评价的抗氧化剂潜在的抗氧化性就愈强。Ferrozine 能够与 Fe²⁺ 形成紫红色的螯合物,当其他有竞争力的螯合剂存在时,紫红色会变浅。通过螯合物颜色的变化,可以评价物质对 Fe²⁺ 的螯合能力。图 5 和表 1 所示的结果表明,EDTA 具有极强的金属螯合活性;除水提部位外,藏茜草不同极性部位均具有很强的螯合作用,在低浓度 (0.125mg/mL) 时,各极性部位对 Fe²⁺ 的螯合率顺序为乙酸乙酯部位 > 正丁醇部位 > 石油醚部位 > 95% 醇提部位,但是在高浓度 (0.5mg/mL) 时,各极性部位对 Fe²⁺ 的螯合率差别不大,分别为 95% 醇提部位 (89.36%)、正丁醇部位 (86.12%)、乙酸乙酯部位 (81.13%)、石油醚部位 (75.58%)。

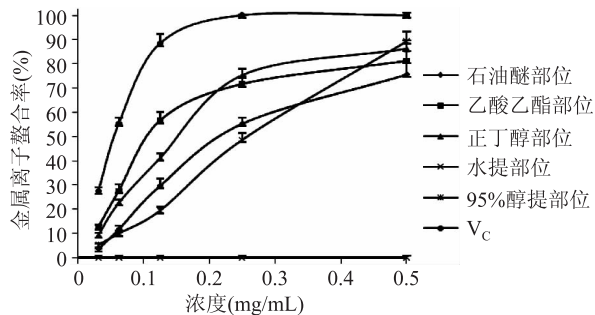


图5 藏茜草不同极性部位对金属离子的螯合率

Fig.5 Chelating ability of different extract from *R tibetica* Hook.F

2.6 藏茜草不同极性部位的还原力测定

物质的还原能力与其抗氧化活性之间有一定的相关性,铁氰化钾被抗氧化物质还原成亚铁氰化钾,亚铁氰化钾与三价铁离子反应,生成的普鲁士蓝在 700nm 有最大吸收峰。吸光度越大,还原能力越强。从图 6 可以看出:乙酸乙酯部位还原能力最强,石油醚部位、正丁醇部位和 95% 醇提部位的还原能力相当,表现出弱的还原力,而水提部位几乎没有还原能力。

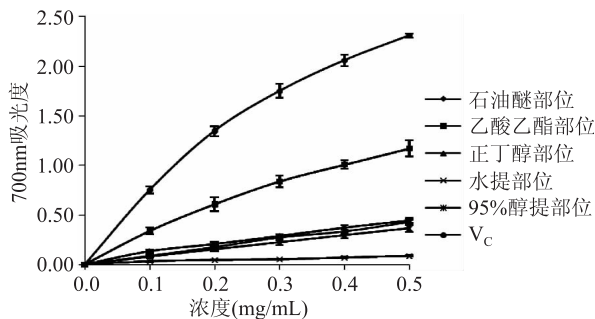


图6 藏茜草不同极性部位的还原力

Fig.6 Reduce power of different extract from *R tibetica* Hook.F

2.7 藏茜草不同极性部位总黄酮含量测定

样品中的总黄酮含量由芦丁标准曲线: $Y = 6.9399X - 0.0023$ ($R^2 = 0.9998$) 换算得来,各极性部位的总黄酮含量如表 2 所示:乙酸乙酯部位中总黄酮含量最高,为 (232.03 ± 1.74) mg 芦丁当量/g 提取物,水提部位的含量最低,仅 (1.87 ± 0.11) mg 芦丁当量/g 提取物;石油醚部位中总黄酮含量较多,为 $(84.59 \pm$

1.26) mg 芦丁当量/g 提取物, 然后依次是正丁醇部位和 95% 醇提部位, 分别是 (63.96 ± 0.77) 和 (48.78 ± 1.40) mg 芦丁当量/g 提取物。

2.8 藏茜草不同极性部位总多酚含量测定

样品中的多酚含量由没食子酸标准曲线: $Y = 5.8343X + 0.0086$ ($R^2 = 0.9988$) 换算得来, 各提取部位的多酚含量如表 2 所示: 乙酸乙酯部位中总多酚含量最高, 为 (173.53 ± 1.75) mg 没食子酸当量/g 提取物, 然后依次是石油醚部位、正丁醇部位和 95% 醇提部位, 分别是 42.29 ± 0.89、39.89 ± 1.03、(36.29 ± 0.72) mg 没食子酸当量/g 提取物。水提部位多酚含量最低, 仅为 (3.25 ± 1.04) mg 没食子酸当量/g 提取物。

表 2 藏茜草不同极性部位中总黄酮和总酚含量测定

Table 2 Total flavonoid and phenolic content in different extracts from *R tibetica* Hook.F

有效部位	总黄酮含量 (mg 芦丁当量 /g 提取物)	总酚含量 (mg 没食子酸当量 /g 提取物)
95% 醇提部位	48.78 ± 1.40	36.29 ± 0.72
石油醚部位	84.59 ± 1.26	39.89 ± 1.03
乙酸乙酯部位	232.03 ± 1.74	173.53 ± 1.75
正丁醇部位	63.96 ± 0.77	42.29 ± 0.89
水提部位	1.87 ± 0.11	3.25 ± 1.04

2.9 抗氧化活性间相关性分析

由表 3 可见藏茜草不同极性提取物对 DPPH·、ABTS⁺·、OH·、O₂⁻· 的清除能力和对金属离子的螯合能力基本一致。

表 3 藏茜草抗氧化活性测定方法间相关系数(r)

Table 3 Correlation coefficient(r) of five models of antioxidant activity

抗氧化能力	相关系数(r)				
	DPPH·	ABTS ⁺ ·	OH·	O ₂ ⁻ ·	螯合力
DPPH· (EC ₅₀ 值)	1				
ABTS ⁺ · (EC ₅₀ 值)	0.977 **	1			
OH· (EC ₅₀ 值)	0.823	0.909 *	1		
O ₂ ⁻ · (EC ₅₀ 值)	0.967 **	0.993 **	0.955 *	1	
螯合率 (EC ₅₀ 值)	0.946 *	0.913 *	0.926 *	0.941 *	1

注: * 表示在 0.05 水平上显著相关, ** 表示在 0.01 水平上显著相关; 表 4 同。

2.10 多酚、黄酮含量与抗氧化活性相关性分析

研究表明: 植物的抗氧化活性与其多酚和黄酮含量有密切相关^[15], 通过对藏茜草不同极性部位的总多酚和总黄酮含量进行测定和相关性分析, 通过统计学分析藏茜草产生抗氧化活性的物质基础, 为进一步提取分离有效成分提供依据。

由表 4 可见, 藏茜草各极性部位对 DPPH·、ABTS⁺·、O₂⁻· 清除能力和金属离子螯合能力与多酚和总黄酮含量均显示出显著正相关性, 而各极性部位对 OH· 的清除能力与黄酮和多酚含量显示相关性不高。综合抗氧化实验结果可以看出: 藏茜草乙酸乙酯

部位抗氧化活性最好, 应与其总多酚和总黄酮的含量最高有关。藏茜草水提部位总黄酮和总多酚含量均较小, 其抗氧化活性也最差。说明: 藏茜草抗氧化的物质基础可能是具有中小极性的黄酮和多酚类化合物。

表 4 藏茜草抗氧化活性与其总黄酮含量和多酚含量的相关系数(r)

Table 4 Correlations between the antioxidant activity and total phenolics and flavonoids content of *R tibetica* Hook F

抗氧化能力	相关系数(r)	
	总黄酮含量	多酚含量
DPPH· (EC ₅₀ 值)	-0.847 **	-0.775 **
ABTS ⁺ · (EC ₅₀ 值)	-0.757 **	-0.691 **
OH· (EC ₅₀ 值)	-0.472	-0.451
O ₂ ⁻ · (EC ₅₀ 值)	-0.697 **	-0.651 **
螯合率 (EC ₅₀ 值)	-0.729 **	-0.671 **

3 结论

藏茜草提取物不同极性部位的体外抗氧化研究结果表明: 除水提部位外, 其它四个极性部位对 DPPH·、ABTS⁺·、HO·、O₂⁻·、还原力和螯合力均表现出一定的抗氧化能力, 且相关性基本一致, 其活性部位主要集中在中小极性化合物上。其中以中等极性部位乙酸乙酯的活性较强, 而极性较小的石油醚部位抗氧化活性中等, 极性较大的正丁醇和水部位抗氧化作用相对较弱, 这提示乙酸乙酯部位和石油醚部位是藏茜草提取物抗氧化活性的主要部位。经抗氧化活性与多酚和黄酮含量相关性数据分析显示, 藏茜草抗氧化活性与总黄酮和多酚含量密切关系相关, 提示黄酮和多酚类化合物可能是藏茜草抗氧化作用的物质基础。藏茜草中小极性部位提取物, 特别是乙酸乙酯部位提取物, 含有大量的黄酮和多酚类化合物, 具有很好的开发天然抗氧化物的潜力。

参考文献

[1] Circu M L, Aw T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48: 749-762.

[2] Halliwell B, Gutteridge J M. Role of free radicals and catalytic metal ions In human disease; an overview [J]. Methods Enzymol, 1990, 186: 1-85.

[3] Gordon M H. Significance of dietary antioxidants for health [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13: 173-179.

[4] Grice H C. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium [J]. Food Chem Toxicol, 1988, 26: 717-723.

[5] 才让草. 十种中藏药的辨析 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 22: 5.

[6] 马合木提·买买提明, 赛力慢·哈得尔, 玛尔哈巴·吾斯满. 芫菁籽不同溶剂提取物体外抗氧化活性研究 [J]. 化学研究与应用, 2013, 6: 829-833.

[7] Blois M S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [J]. Nature, 1958, 26: 1199-1200.

[8] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Rice - Evans C:

Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourisation assay [J]. Free Rad Biol Med, 1999, 26: 1231-1237.

[9] Shukla S I, Mehta A, Mehta P, *et al.* Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert [J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64 (7-8): 807-811.

[10] Halliwell B, Gutteridge J M C, Amoma O L. The deoxyribose method: a simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical [J]. Anal Biochem, 1987, 165: 215-9.

[11] Dinis T C P, Madeira V M C, Almeida L M. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1994, 315: 161-169.

(上接第 80 页)

[9] Benzie IF, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. Analytical biochemistry, 1996, 239 (1): 70-76.

[10] Kim D - O, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums [J]. Food Chemistry, 2003, 81 (3): 321-326.

[11] 柳爱莲, 刘绣华. 天然产物抗 DPPH 自由基活性研究 [J]. 周口师范学院学报, 2007, 24 (5): 80-82.

[12] 侯微, 魏忠宝, 姜艳玲, 等. 五味子根藤茎体外抗氧化活性评价 [J]. 吉林中医药, 2010, 30 (12): 1086-1088.

(上接第 85 页)

Chemistry, 1979, 27 (5): 1104-1108.

[13] 俞海峰, 何芳, 周浙良. 水产品风味研究进展 [J]. 现代渔业信息, 2009, 24 (3): 14-16.

[14] 张晓鸣. 食品风味化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社. 2009: 60-169.

[15] 孙宝国, 刘玉平, 郑福平, 等. 肉味香精中单体香料的香

(上接第 90 页)

treatment (100 ~ 200MPa) at low temperature on turbot (*Scophthalmus maximus*) muscle [J]. Food Research International, 2001, 34: 425-429.

[6] Uresti M R, Velazquez G, Ramírez J, *et al.* Effect of high-pressure treatments on mechanical and functional properties of restructured products from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) [J]. Journal of the Science of Food Agriculture, 2004, 84: 1741-1749.

[7] Hsu KC, Jao CL. Effect of pretreatment of hydrostatic pressure on physicochemical properties of tilapia muscle protein gels induced by setting [J]. Journal of Food Science, 2007, 72: 73-78.

[8] Benjakul S, Chantarasuwan C, Visessanguan W. Effect of medium temperature setting on gelling characteristics of surimi

[12] Gulcin I, Sat I G, Beydemir S, *et al.* Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.) [J]. Food Chemistry, 2004, 87 (3): 393-400.

[13] Athukorala Y, Jeon Y, Kim K. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Eckloniacava* [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44: 1065-1074.

[14] Silva J K, Cazarin C B B, Colomeu T C, *et al.* Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *In vitro* and *in vivo* study [J]. Food Research International. 2013, 53 (2): 882-890.

[15] Riceevans C A, Miller N J, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1996, 20 (7): 933-956.

[13] 盛玮, 薛建平, 谢笔钧. 怀山药零余子提取物抗氧化活性的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30 (3): 92-94.

[14] 陈玉霞, 刘建华, 林峰, 等. DPPH 和 FRAP 法测定 41 种中草药抗氧化活性 [J]. 实验室研究与探索, 2011, 30 (6): 11-14.

[15] 张国友, 唐玲, 陈玮, 等. 分光光度法测定蒙古栎叶中多酚的含量 [J]. 中国科学院研究生院学报, 2009, 26 (3): 319-322.

[16] 刘曦, 祝连彩, 王伯初. 蓝莓叶不同溶剂提取物抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34 (12): 101-105.

味类型 [J]. 北京工商大学学报, 2003, 21 (1): 1-8.

[16] 孟绍凤. 虾风味的分析和虾风味基料的制备 [D]. 无锡: 江南大学, 2006.

[17] 董志俭, 李冬梅, 李世伟, 等. 低值海虾制备烧烤型虾味香精及 GC-MS 结合电子鼻技术分析 [J]. 食品工业科技, 2013, 34 (10): 101-107.

from some tropical fish [J]. Journal of Food Chemistry, 2003, 82 (4): 567-574.

[9] 胡飞华. 梅鱼鱼糜超高压凝胶化工艺及凝胶机理的研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2010.

[10] Pérez-Mateos M, Montero P. Response surface methodology multivariate analysis of properties of high-pressure-induced fish mince gel [J]. European Food Research Technology, 2000, 211: 79-85.

[11] Benjakul S, Visessanguan W. Transglutaminase-mediated setting in bigeye snapper surimi [J]. Food Research International, 2003, 36 (3): 253-266.

[12] 陆海霞. 秘鲁鲑鱼肌纤维蛋白质凝胶特性的研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009.