

显齿蛇葡萄抗氧化活性与主要成分相关性研究

张命龙^{1,2}, 彭密军^{1,2*}, 杨秋玲², 王志宏¹, 王翔¹

¹广东省测试分析研究所 广东省分析测试技术公共实验室, 广州 510070;

²广东中测食品化妆品安全评价中心有限公司, 中山 528437

摘要:探究不同显齿蛇葡萄提取物抗氧化活性及其与多酚、黄酮、二氢杨梅素的相关性。实验分别用水和乙醇溶液提取制备四种显齿蛇葡萄提取物,并测定总多酚、总黄酮、二氢杨梅素含量。利用·OH、O₂⁻、DPPH 自由基清除实验以及还原力实验共四种体系,评价各提取物抗氧化活性;使用SPSS进行活性与成分的Pearson相关分析,并建立回归方程模型。结果显示,四种提取物均具有显著抗氧化活性,但差异明显,综合以二氢杨梅素提取物最强,醇提物居中,水提物最弱。Pearson相关分析显示不同提取物的抗氧化活性与总多酚、总黄酮、二氢杨梅素含量呈显著正相关($P < 0.01$),表明总多酚、总黄酮、二氢杨梅素均是显齿蛇葡萄中主要抗氧化功效因子,但不同抗氧化体系中三种成分的影响程度表现各异。

关键词:显齿蛇葡萄;多酚;黄酮;二氢杨梅素;抗氧化;相关性

中图分类号:R284.1;R961

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)3-0387-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.3.003

Antioxidant properties and correlation with major chemical components in *Ampelopsis grossedentata*

ZHANG Ming-long^{1,2}, PENG Mi-jun^{1,2*}, YANG Qiu-ling², WANG Zhi-hong¹, WANG Xiang¹

¹Guangdong Provincial Public Laboratory of Analysis and Testing Technology, Guangdong Institute of Analysis, Guangzhou 510070, China;

²GDZC food and cosmetics safety testing center Co., Ltd., Zhongshan 528437, China

Abstract:To explore the antioxidant properties of different extracts from *Ampelopsis grossedentata* and their correlation with polyphenols, flavonoids and dihydromyricetin. Four kinds of *A. grossedentata* extracts were prepared with water and ethanol. The content of total polyphenols, total flavonoids and dihydromyricetin in these extracts was determined respectively. Antioxidant properties of *A. grossedentata* extracts were evaluated by four experiments, including scavenging activity of Superoxide radical (O₂⁻), hydroxyl radicals (·OH), DPPH radical and reducing power test. Pearson correlation analysis between properties and components was conducted with SPSS software. Meanwhile regression equation model was established. The results showed that antioxidant properties were dramatically different for four extracts, dihydromyricetin extract top, ethanol extracts mediate, and water extract bottom. Total polyphenols, flavonoids, dihydromyricetin content and antioxidant properties were significantly corelative ($P < 0.01$), which showed that polyphenols, flavonoids, dihydromyricetin were dominant antioxidant factors. However, the influence degree of these three components was discrepant in different antioxidant systems.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; polyphenols; flavonoids; dihydromyricetin; antioxidant; correlation

显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand. Mazz.) W. T. wang, 俗称茅岩莓、藤茶, 主产于湖南、江西、福建等地, 系一种资源丰富的类茶植物。2013年由原卫计委批准成为新食品原料。在我国已有

700余年的饮用历史, 其味甘淡、性凉, 夏天泡茶多日不馊, 民间称之为“神草”。医药学专著记载其具有清热解毒、消胀止渴、治疗黄疸肝炎等功效^[1]。显齿蛇葡萄富含多酚、黄酮、鞣质、氨基酸及微量元素, 尤其以二氢杨梅素(Dihydromyricetin, DMY)的高含量而著名, 在其幼嫩茎叶部位含量可达15%~30%^[2]。药理学实验表明显齿蛇葡萄具有抗氧化、抑菌、消炎、降糖降脂、抗肿瘤等活性^[3,4]。

收稿日期:2018-09-17 接受日期:2019-01-23

基金项目:广东省科学院发展专题(2019GDASYL-0502003);国家自然科学基金(31660181);湖南省教育厅重点项目(16A175)

*通信作者 Tel:86-760-89969692; E-mail:pengmj163@163.com

作为典型的药食两用型植物,显齿蛇葡萄抗氧化活性研究一直较为活跃。研究显示,显齿蛇葡萄抗氧化活性与黄酮类^[5,6]和多酚类^[7]可能存在关联。二氢杨梅素作为一种多酚羟基双氢黄酮醇,既属于黄酮类又属于多酚类化合物,具有较强的抗氧化活性^[8]。然而基于现有研究报道,仍难以明确显齿蛇葡萄抗氧化活性与哪类成分最为相关,以及在不同抗氧化体系下各自的影响程度或贡献度如何,尚需要具体研究。

显齿蛇葡萄采用水提工艺,在提取液冷却或浓缩条件下二氢杨梅素极易析出,难以与其他水溶性成分形成均质体,所以本研究从水提液中通过重结晶分离出二氢杨梅素,制得较高纯度的粗品。同时使用两种醇水体系制备醇提取物。获得四种提取物后,进行抗氧化活性评价,并检测其中的主要成分总多酚、总黄酮和二氢杨梅素,进而运用 SPSS 系统进行抗氧化活性与关键成分的相关性分析,探究相关程度,同时建立回归模型,旨在为显齿蛇葡萄的开发利用提供进一步的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

1.1.1 供试材料

显齿蛇葡萄产于湖南省张家界,2017年5月采收幼嫩茎叶部位,低温烘干后保存。

1.1.2 主要试剂

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)购自阿拉丁试剂公司。二氢杨梅素标准品(阿拉丁,纯度 $\geq 98\%$),没食子酸标准品(中国药检院,纯度 $\geq 95\%$),甲醇(色谱级)购自默克公司,水杨酸、铁氰化钾购自麦克林公司,福林酚购自国药集团,聚酰胺树脂(100~200目)购自台州市路桥四甲生化厂,乙醇、双氧水等购自广州化学试剂厂,超氧阴离子自由基测定试剂购自南京建成生物工程研究所。

1.2 主要设备

AS20500BT 超声波仪(天津奥特赛恩斯有限公司),R300 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司),小型喷雾干燥仪(上海那艾精密仪器有限公司),UV2700 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),LC-20A 高效液相色谱仪,配备紫外检测器(日本岛津公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

取干燥显齿蛇葡萄叶,照文献方法进行提

取^[9]。趁热过滤,合并滤液,减压浓缩至原体积的1/5,浓缩液于4℃冰箱静置48h,收集沉淀物,上清液经喷雾干燥得显齿蛇葡萄水提物(*A. grossedentata* extract-water, AGE-W)。利用二氢杨梅素易溶于乙醇和热溶冷析的特性,进行重结晶。沉淀物加入乙醇搅拌溶解,抽滤得澄清液,减压浓缩除去乙醇,浓缩物再加纯水90℃加热30min,中途不断搅拌,抽滤去不溶物,滤液4℃静置24h,收集沉淀,50℃真空干燥,得二氢杨梅素提取物(*dihydromyricetin* extract, DMYE)。

取干燥显齿蛇葡萄叶,分别以50%乙醇和95%乙醇溶液为溶剂,料液比1:20,回流提取1.5h,过滤得滤液,减压浓缩后,50℃真空干燥,获得两种不同醇提取物:50%显齿蛇葡萄醇提取物(*A. grossedentata* extract-50% EtOH, AGE-50EtOH)和95%显齿蛇葡萄醇提取物(*A. grossedentata* extract-95% EtOH, AGE-95EtOH)。

1.3.2 主要成分的测定

1.3.2.1 总多酚

参照文献方法^[10]进行测定。

1.3.2.2 总黄酮

称各样品0.1g,溶解并定容至25mL。取0.5~1mL样液于1g聚酰胺粉中拌匀,95℃水浴挥干,装入层析柱,先用20mL苯洗脱杂质,后用甲醇洗脱黄酮组分,收集洗脱液并定容至25mL。取1mL洗脱液照文献方法^[11]显色,测定总黄酮含量。

1.3.2.3 二氢杨梅素

参考文献方法^[2]并略加改动流动相,测定各提取物二氢杨梅素含量。色谱条件:色谱柱 TC-C₁₈ 色谱柱(250mm×4.6mm,5μm),流动相乙腈-0.1%磷酸溶液(25:75),流速0.8mL/min,柱温30℃,波长290nm,进样量10μL。

称取各样品0.1~0.3g于100mL容量瓶中,溶解并定容。稀释10倍,过膜后供HPLC分析。

1.3.3 抗氧化活性实验

1.3.3.1 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除率测定

利用 FeSO_4 与 H_2O_2 反应产生 $\cdot\text{OH}$,水杨酸分子的苯环结构被 $\cdot\text{OH}$ 攻击后,产生具有特征吸收的2,3-二羟基苯甲酸,以反应体系的吸光值表示 $\cdot\text{OH}$ 的相对量,吸光值愈大表示 $\cdot\text{OH}$ 愈多^[12]。若样品存在抗 $\cdot\text{OH}$ 成分时,使得 $\cdot\text{OH}$ 与水杨酸反应减弱,相应的产物会减少,以此表示样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力。参考文献方法^[13]测定 $\cdot\text{OH}$ 清除率。每

个实验处理平行3次。 $\cdot\text{OH}$ 清除率 $R_1(\%)$ 计算公式如式(1):

$$R_1 = [1 - (A_s - A_b) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 —溶剂空白测定的吸光度值;

A_s —样品某浓度下测定的吸光度值;

A_b —用水代替水杨酸钠溶液测定吸光度值(扣除样品本底)。

1.3.3.2 超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除率测定

模拟机体中黄嘌呤与黄嘌呤氧化酶反应系统,产生超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$,加入电子传递物质及显色剂,使反应体系呈现紫红色。当存在抗超氧阴离子的物质,可抑制该反应使超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 减少,故颜色变浅。依据形成物的颜色深浅计算出抑制超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力强弱。具体操作依据试剂盒要求进行。每个实验处理平行3次。以Vc作为阳性对照。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率 $R_2(\%)$ 计算公式如式(2):

$$R_2 = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 —溶剂空白测定的吸光度值;

A_s —样品某浓度下测定的吸光度值。

1.3.3.3 DPPH 自由基清除率测定

DPPH是一种有机自由基,溶于乙醇后呈现紫色,在517 nm处有最强吸收,当存在自由基清除剂时,DPPH单电子被配对使溶液颜色变浅,吸光值降低,其降低程度与DPPH被清除程度存在定量关系^[14]。参照文献方法^[5]测定DPPH清除率。每个实验处理平行3次。以Vc作为阳性对照。DPPH清除率 $R_3(\%)$ 公式如式(3):

$$R_3 = [1 - (A_s - A_b) / A_0] \times 100\% \quad (3)$$

1.3.3.4 还原力测定

样品的抗氧化成分将铁氰化钾 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 还原成亚铁氰化钾 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$,亚铁氰化钾再与

Fe^{3+} 反应,生成普鲁士蓝,以700 nm处反应体系的吸光值表示还原力强度,吸光值愈大,则样品的还原力愈强^[15]。参照文献^[16]并做适当改进,测定还原力。吸取1 mL不同浓度的样品溶液,加入磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L, pH6.6)2.5 mL,1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液2.5 mL于试管中混匀,在50℃水浴中反应20 min,取出,流水速冷后加入10%三氯乙酸2.5 mL,摇匀后静置10 min,加入纯水2.5 mL,0.1% FeCl_3 1 mL,摇匀,在700 nm处测定吸光值,以此表示还原力大小。以样品溶剂为空白,以Vc为阳性对照。

1.4 数据分析

所有数据以平均值 \pm 标准误表示。用统计分析软件SPSS 19.0对数据进行方差分析(LSD法)、Pearson相关性分析和回归分析。

2 结果与分析

2.1 主要成分含量

由表1可知四种提取物中总黄酮、总多酚及二氢杨梅素含量差异明显。AGE-W中该三种成分含量均为最低,醇提物居中,DMYE中含量最高。对比AGE-W、AGE-50EtOH和AGE-95EtOH可发现,显齿蛇葡萄中的黄酮、多酚及二氢杨梅素更易溶解在乙醇浓度高的溶剂中,这证实了它们较好的醇溶性^[9]。各提取物中二氢杨梅素为多酚和黄酮的重叠部分,除此之外,可能还含有没食子酸、没食子酰葡萄糖^[17]等多酚类成分,含量约占4%~16%;以及杨梅素、槲皮素、芦丁、木犀草素等黄酮类成分^[1,18],含量约占12%~20%。同时两种醇提物中总黄酮含量明显高于总多酚,表明显齿蛇葡萄中黄酮类物质总量多于多酚类,这与文献报道^[19]相符。由多酚和黄酮的结构推测,显齿蛇葡萄中可能存在一定量的非多酚类黄酮组分。

表1 不同显齿蛇葡萄提取物主要活性成分含量($n=3, \%$)

Table 1 The content of active components in four *A. grossedentata* extracts($n=3, \%$)

提取物样品 Sample	总多酚 Total polyphenols	总黄酮 Total flavonoids	二氢杨梅素 Dihydromyricetin
AGE-W	32.37 \pm 0.51	28.67 \pm 1.87	16.44 \pm 0.65
AGE-50EtOH	58.68 \pm 0.21**	66.18 \pm 0.02**	50.73 \pm 0.73**
AGE-95EtOH	61.83 \pm 1.55**	74.54 \pm 0.85**	57.37 \pm 1.27**
DMYE	87.06 \pm 2.05**	99.01 \pm 0.72**	79.99 \pm 3.04**

注:与AGE-W相比,**在 $P < 0.01$ 水平,有显著差异。

Note: compared with AGE-W, ** significant difference at $P < 0.01$.

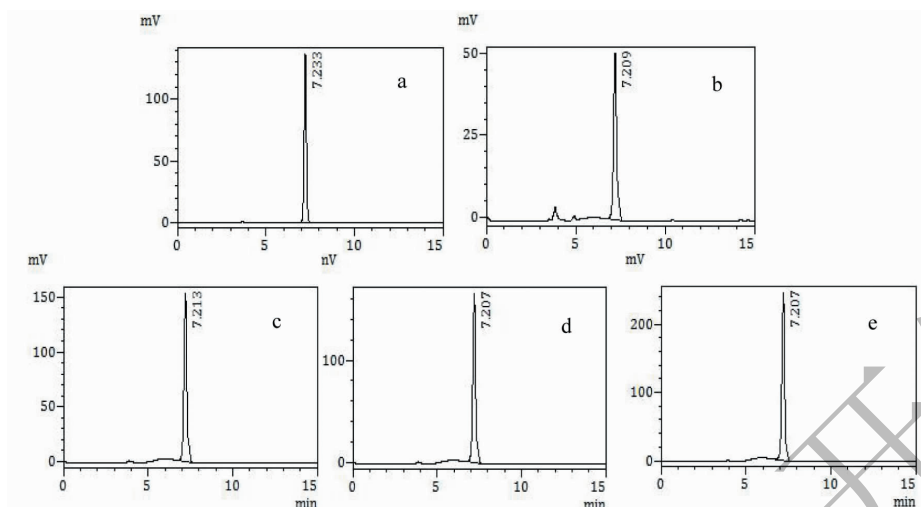


图1 二氢杨梅素标准品(a)、AGE-W(b)、AGE-50EtOH(c)、AGE-95EtOH(d)、DMYE(e)高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of DMY standard(a), AGE-W(b), AGE-50EtOH(c), AGE-95EtOH(d) and DMYE(e)

2.2 抗氧化活性

2.2.1 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除活性

羟基自由基($\cdot\text{OH}$)是细胞代谢过程中产生的生理自由基,化学性质活泼,容易攻击蛋白质,核酸和脂质等大分子物质,从而损伤细胞的正常功能^[20]。图2为不同显齿蛇葡萄提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果。由图2可知,四种提取物对 $\cdot\text{OH}$ 均具有强烈清除作用,且呈现量效正相关,其中DMYE的清除效果最强,AGE-50EtOH和AGE-95EtOH较接近,AGE-W相对较弱。通过计算 IC_{50} 可知四种提取物的 $\cdot\text{OH}$ 清除活性强弱顺序为DMYE(IC_{50} 值 $10.29\ \mu\text{g}/\text{mL}$)、AGE-50EtOH($24.62\ \mu\text{g}/\text{mL}$)、AGE-95EtOH($40.60\ \mu\text{g}/\text{mL}$)、AGE-W($140.31\ \mu\text{g}/\text{mL}$),而对照样Vc的 IC_{50} 为 $76.54\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。这表明显齿蛇葡萄醇提物清除 $\cdot\text{OH}$ 活性优于水提物,且优于Vc。

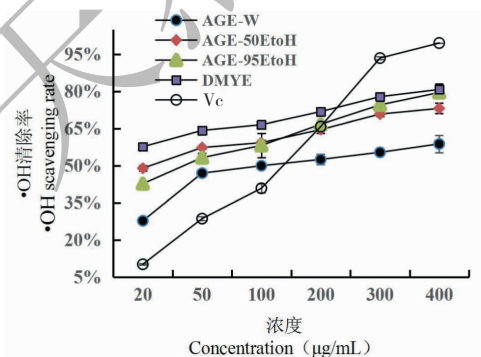


图2 不同提取物对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除效果

Fig. 2 Effect on $\cdot\text{OH}$ scavenging of different extracts

2.2.2 超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除活性

超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)是细胞线粒体内产生的生理自由基,具有较强氧化毒性,人体的衰老与其有一定关联^[21]。图3为不同显齿蛇葡萄提取物对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除效果。由图3可知,四种提取物对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 都有一定清除作用。其中DMYE、AGE-50EtOH和AGE-95EtOH的清除效果接近,最大清除率在40%~50%之间,而AGE-W相对最弱。这表明显齿蛇葡萄醇提物的清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性优于水提物。在实验浓度范围内各提取物 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除效果均强于对照Vc,这提示在实验浓度下,显齿蛇葡萄水提和醇提物 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除活性优于Vc。

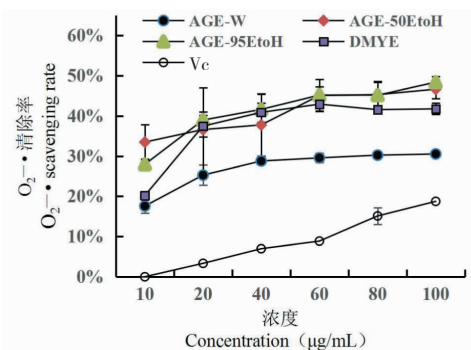


图3 不同提取物对超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除效果

Fig. 3 Effect on $\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenging of different extracts

2.2.3 DPPH清除活性

DPPH是一种较稳定的有机自由基。图4为不同显齿蛇葡萄提取物对DPPH的清除效果。由图4可知,四种提取物对DPPH均有显著清除作用,呈现

明显的量效正相关。其中 DMYE、AGE-50EtOH 和 AGE-95EtOH 的最大清除率约为 85%，AGE-W 最大清除率约 50%。表明显齿蛇葡萄醇提取物 DPPH 清除活性强于水提取物。通过计算 IC_{50} 可知 4 种提取物 DPPH 清除活性强弱顺序为 DMYE ($IC_{50} = 6.17 \mu\text{g}/\text{mL}$)、AGE-95EtOH ($8.20 \mu\text{g}/\text{mL}$)、AGE-50EtOH ($9.27 \mu\text{g}/\text{mL}$)、AGE-W ($20.89 \mu\text{g}/\text{mL}$)，而对照样 Vc 的 IC_{50} 为 $17.93 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。这提示显齿蛇葡萄醇提取物 DPPH 清除活性优于水提取物，且优于 Vc。

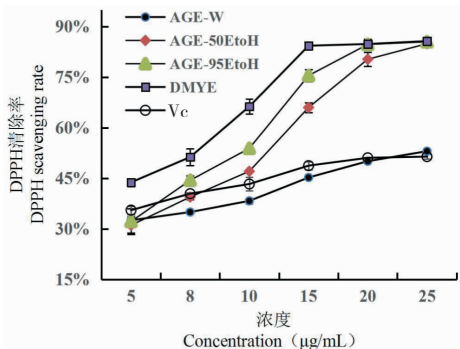


图4 不同提取物对 DPPH 的清除效果

Fig. 4 Effect on DPPH scavenging of different extracts

2.2.4 还原力

还原力测定用来检验样品中抗氧化成分的电子供应,通过还原作用给出电子,清除自由基,还原力越强,抗氧化性越强,因此可作为抗氧化性能的指标。图5为不同显齿蛇葡萄提取物还原力测试结果。由图5可知,四种提取物具有较强的还原能力,呈现良好的量效正相关。在实验浓度范围内,随着作用浓度增大,还原力几乎与之呈现线性正相关。总体上,DMYE 还原力最强,与 Vc 相当,AGE-95EtOH 还原力略强于 AGE-50EtOH,AGE-W 相对较弱。由此表明,不同显齿蛇葡萄提取物均具有抗氧化性能。

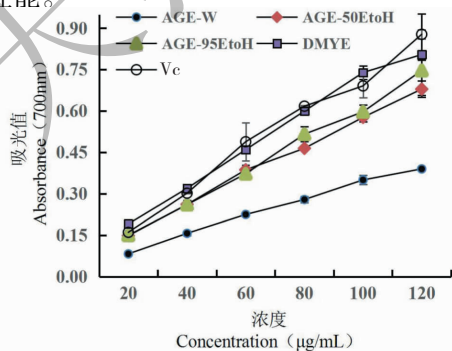


图5 不同提取物的还原力

Fig. 5 Reducing power of different extracts

综上所述,显齿蛇葡萄四种提取物均表现较强抗氧化活性,但差异明显。DMYE 的抗氧化活性最强,其次为 AGE-95EtOH 和 AGE-50EtOH、AGE-W 最低。肖晓莹^[5]发现显齿蛇葡萄醇提取物和水提取物对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 DPPH 有较强清除能力,但前者强于后者,推测提取物中黄酮的抗氧化活性占主导地位,同时认为多酚也起到一定作用。欧贤红等^[6]发现二氢杨梅素对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除活性强于总黄酮,DPPH 清除活性不及总黄酮。肖浩等^[7]进行藤茶(显齿蛇葡萄)多酚抗氧化研究,得出清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的 IC_{50} 分别为 $159 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $31 \mu\text{g}/\text{mL}$,且强于 Vc,但未提及多酚的具体含量。虽然不同研究者的实验均证实显齿蛇葡萄提取物具有抗氧化活性,尤其明确了二氢杨梅素的抗氧化活性,但不同抗氧化体系下对实验结果起主导作用且最为相关的成分仍未确定,需进行具体的相关性分析。

2.3 相关性分析

2.3.1 Pearson 相关分析

相关分析旨在表征不同变量间相互关系的强弱程度。表2为抗氧化活性与总黄酮、总多酚及二氢杨梅素含量 Pearson 相关分析结果。由表2可知,各提取物的 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、DPPH 清除率及还原力与总黄酮、总多酚及二氢杨梅素含量均呈显著正相关($P < 0.01$)。这表明黄酮、多酚及二氢杨梅素对显齿蛇葡萄抗氧化活性起决定性作用,但在不同抗氧化体系中它们的影响程度不完全一致。其中 $\cdot\text{OH}$ 清除率与二氢杨梅素相关性最高,相关系数为 0.864; $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率与总黄酮相关性最高,相关系数为 0.820,DPPH 清除率和还原力与总多酚和黄酮高度显著相关,相关系数在 0.95 以上。有研究显示显齿蛇葡萄对 DPPH 的清除能力主要由黄酮类和酚类^[18]物质决定。通过研究铁皮石斛提取物多酚和黄酮与抗氧化活性相关性,证实 DPPH 清除率和还原力与黄酮相关性较强,与多酚相关性较弱^[22],这点有别于显齿蛇葡萄。多酚、黄酮抗氧化活性与分子中羟基数和位置有关,植物中多酚和黄酮的种类不同可能会导致它们在抗氧化性能的侧重点有所差异。

2.3.2 回归模型分析

回归分析侧重考察变量之间的数量变化规律,并通过一定的数学模型来表征这种关系,进而确定一个或几个变量的变化对另一个变量的影响程度。根据 2.3.1 的相关性分析结果选择与抗氧化活性相

表2 抗氧化活性与主要成分的 Pearson 相关分析结果

Table 2 Pearson relevance analysis between antioxidant activity and three main components

成分 Components	·OH 清除率 DPPH scavenging rate		O ₂ ⁻ 清除率 O ₂ ⁻ scavenging rate		DPPH 清除率 DPPH scavenging rate		还原力 Reducing power	
	相关系数 <i>r</i>	<i>P</i>	相关系数 <i>r</i>	<i>P</i>	相关系数 <i>r</i>	<i>P</i>	相关系数 <i>r</i>	<i>P</i>
	总多酚 Total polyphenols	0.853 **	0.000 1	0.813 **	0.000 1	0.958 **	0.000 1	0.992 **
总黄酮 Total flavonoids	0.863 **	0.000 1	0.820 **	0.000 1	0.948 **	0.000 1	0.987 **	0.000 2
二氢杨梅素 Dihydromyricetin	0.864 **	0.000 1	0.809 **	0.000 1	0.887 **	0.000 1	0.971 **	0.000 2

注: ** 表示在 $P < 0.01$ 水平呈现显著相关,下同。

Note: ** mean significantly relevant at $P < 0.01$, the same as below.

关系数最大的成分运用 SPSS 进行多模型曲线拟合,建立回归方程,见表 3 及图 6~9。由表 3 可知,对于 ·OH 清除活性,对数曲线的决定系数 R^2 最高,且有显著性意义,故选择曲线模型建立回归方程,由 SPSS 分析结果得到回归方程为 $Y = 0.212 + 0.101 \ln X$,其中 X 为显齿蛇葡萄提取物中二氢杨梅素浓度 ($\mu\text{g/mL}$), Y 为该提取物对 ·OH 的清除率。

对于 O₂⁻ 清除活性,同样是对数曲线的决定系数 R^2 最高,且有显著性意义,故选择对数模型建立回归方程,回归方程为 $Y = 0.126 + 0.066 \ln X$,其中 X 为显齿蛇葡萄提取物中黄酮浓度 ($\mu\text{g/mL}$), Y 为

该提取物对 O₂⁻ 的清除率。

对于 DPPH 清除活性,二次和三次曲线的决定系数 R^2 最高,且有显著性意义,故选择二次模型建立回归方程,回归方程为 $Y = 0.263 + 0.025X + 0.002X^2$,其中 X 为显齿蛇葡萄提取物中总多酚浓度 ($\mu\text{g/mL}$), Y 为该提取物对 DPPH 清除率。

对于还原力,同样是二次和三次曲线的决定系数 R^2 最高,且有显著性意义,故选择二次模型建立回归方程,回归方程 $Y = 0.022 + 0.01X - 2.03 \times 10^{-5}X^2$,其中 X 为显齿蛇葡萄中总多酚浓度, Y 为还原力大小。

表3 抗氧化活性实验的多模型拟合效果

Table 3 Multi-model fitting effect for antioxidant properties

模型 Model	决定系数 R^2			
	·OH 清除率 ·OH scavenging rate	O ₂ ⁻ 清除率 O ₂ ⁻ scavenging rate	DPPH 清除率 DPPH scavenging rate	还原力 Reducing power
线性 Linear	0.746 **	0.673 **	0.917 **	0.983 **
对数 Logarithm	0.913 **	0.849 **	0.822 **	0.905 **
二次 Quadratic	0.823 **	0.841 **	0.925 **	0.988 **
三次 Cubic	0.847 **	0.597 **	0.925 **	0.988 **
指数 Exponential	0.592 **	0.597 **	0.916 **	0.869 **
Logistic	0.592 **	0.673 **	0.916 **	0.869 **

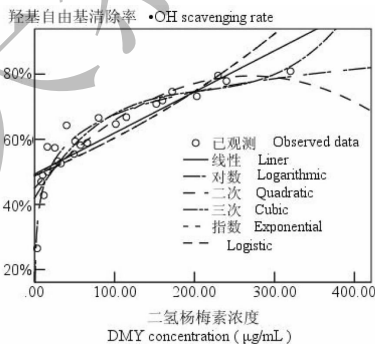
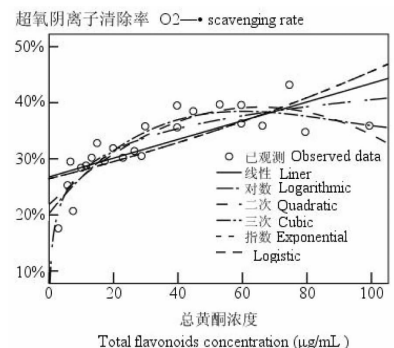


图6 ·OH 清除率与二氢杨梅素的曲线拟合图

Fig. 6 Fitting curve between ·OH scavenging rate and dihydromyricetin

图7 O₂⁻ 清除率与总黄酮的曲线拟合图Fig. 7 Fitting curve between O₂⁻ scavenging rate and total flavonoids

3 结语

本文制备了四种提取物,确定总多酚、总黄酮及二氢杨梅素为考察因素,探究显齿蛇葡萄提取物抗氧化活性与它们的相关程度,并建立回归方程模型。四种提取物中 AGE-W 的总多酚、总黄酮和二氢杨梅素含量均最低,醇提物居中,DMYE 中最高。这表明总多酚和总黄酮的醇溶性优于水溶性。AGE-50EtOH、AGE-95EtOH、DMYE 提取物中该三种成分含量之和大于 100%,这提示它们之间可能存在重叠组分。同时推测显齿蛇葡萄中可能存在一定量的非多酚类黄酮组分。

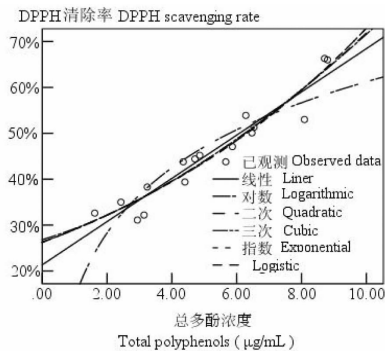


图 8 DPPH 清除率与总多酚的曲线拟合图

Fig. 8 Fitting curve between DPPH scavenging rate and total polyphenols

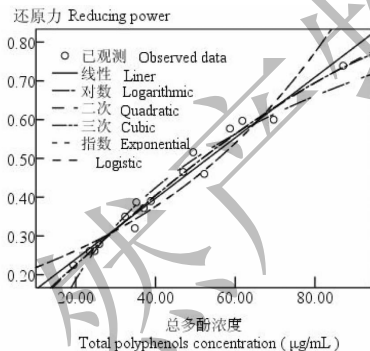


图 9 还原力与总多酚的曲线拟合图

Fig. 9 Fitting curve between reducing power and total polyphenols

实验表明四种提取物均具有良好的抗氧化活性,但差异明显。综合而言,其强弱大小为:DMYE > AGE-95EtOH > AGE-50EtOH > AGE-W。抗氧化活性的差异与三种成分含量不同存在显著相关性 ($P < 0.01$)。Pearson 相关分析表明总黄酮、总多酚及二氢杨梅素均是显齿蛇葡萄抗氧化活性的主要功效因子。具体表现为:·OH 清除活性与二氢杨梅

素最为相关 ($P < 0.01$); O_2^- 清除活性与总黄酮相关性最高 ($P < 0.01$); DPPH 清除活性和还原力与总多酚相关性最高 ($P < 0.01$)。选择与抗氧化活性相关性最大的成分,构建了回归方程模型,以此直观地表征显齿蛇葡萄提取物中总多酚、总黄酮及二氢杨梅素的含量与抗氧化能力之间的数学关系。

当前显齿蛇葡萄开发的产品有植物饮料、保健品(如拙牌清纯片)及药品(如显齿蛇葡萄总黄酮含片)。在进行产品开发过程中,大多采用水提或醇提工艺。极少使用其它有机试剂进行提取。本研究基于此现状,利用水或乙醇为溶剂,提取制备了四种不同的提取物,系统地考察它们的抗氧化活性,并分析其中的主要抗氧化成分。然而,多酚和黄酮的种类繁多、结构复杂,抗氧化活性的作用机制尚有待进一步阐明。

参考文献

- Zhang YS. Studies on isolation and identification of several compounds and purification of DMY in tea substitute *Ampelopsis grossedentata* [D]. Changsha: Hunan Agricultural University (湖南农业大学), 2001.
- He GX, Pei G, Yang WL, et al. Determination of dihydromyricetin in different harvest time and different parts of *Ampelopsis grossedentata* by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2004, 26: 210-212.
- Chen J, Wu YC, Zou JW, et al. α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and the flavonoid derivatives [J]. Bioorg Med Chem, 2016, 24: 1488-1494.
- Chen YL, Zhang YL, Dai YC, et al. Systems pharmacology approach reveals the anti-inflammatory effects of *Ampelopsis grossedentata* on dextran sodium sulfate-induced colitis [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24: 1398.
- Xiao XY. Study on extraction of flavonoids and antioxidant activity of the extracts from *Ampelopsis grossedentata* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture And Forestry University (福建农林大学), 2013.
- Ou XH, Ye Y, Huang QJ, et al. Antioxidant activity of *Ampelopsis grossedentata* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 245-248.
- Xiao H, Zheng XJ, Zhu YT. Antioxidant effects of polyphenol from *Ampelopsis grossedentata* [J]. J Food Sci Biotechnol (食品与生物技术学报), 2011, 30: 679-682.
- Ye LY, Wang HJ, Duncan SE, et al. Antioxidant activities of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) extract and its major

- component dihydromyricetin in soybean oil and cooked ground beef[J]. Food Chem,2015,172:416-422.
- 9 Chen ZZ, Chen YY, Wei CT, et al. Extraction of total polyphenols from *Ampelopsis grossedentata* and the biological activity of water extracts[J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2015, 36(3):24-27.
- 10 State Administration of quality supervision and inspection. Determination of tea polyphenols and catechins in tea[S]. Beijing:GB/T8313-2008(国家标准):2008-05-04.
- 11 Xiong HP, Yang WL, He GQ, et al. Determination on total flavanoids of *Ampelopsis grossedentata* by spectrophotometry[J]. Food Sci(食品科学), 2004, 25:144-145.
- 12 Huang YY. The separation, isolation and identification of polyphenol structures in Korean pine(*Pinus koraiensis*) and evaluation of its antioxidant and anticancer activity[D]. Harbin:Northeast Forestry University(东北林业大学), 2014.
- 13 Zuo LL. Characterization of antioxidant and anti-tumor of actinidia kolomikta polyphenol[D]. Harbin:Harbin Institute of Technology(哈尔滨工业大学), 2013.
- 14 Watanabe Y, Kuwabara K, Adachi S, et al. Production of saturated acyl L-ascorbate by immobilized lipase using a continuous stirred tank reactor[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51:4628-4632.
- 15 Sheng W, Fang XP, Wu P. Study on antioxidant activity of polysaccharides from *Pleurotus Nebrodensis*, *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ferulae*[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2008, 5:103-105.
- 16 Qiao DL, Ke CL, Hu B, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*[J]. Carbohydr Polym, 2009, 78:199-204.
- 17 Gong S. α -Glucosidase inhibitory and antioxidant activities of polyphenols in *Ampelopsis grossedentata* leaves[D]. Xinxiang:Hennan Institute of Science and Technology(河南科技学院), 2017.
- 18 Wang Y, Ying L, Sun D, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from *Ampelopsis grossedentata* stems:Process optimization and antioxidant activity[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12:6856-6870.
- 19 Xiong HP, He GQ, Yang WL, et al. Analysis of biochemical constituents in *Ampelopsis grossedentata*[J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2004, 4(3):68-71.
- 20 Zhang ML, Jiao CW, Xie YZ, et al. Antioxidant activity of intracellular polysaccharides from *Cordyceps militaris* mycelium *in vitro*[J]. China Edib Fungi(中国食用菌), 2015, 34(2):66-69.
- 21 Wu YY, Zhang W, Li LH, et al. Antioxidant capacity and category analysis of MAAs in *Gloiopeletis*[J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2018, 18:264-272.
- 22 Huang Q, Shen YX, Zhang CJ, et al. Correlation of the antioxidant property with the total phenolic content and total flavonoids of different *Dendrobium officinale* extracts[J]. Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报), 2014, 20:438-442.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社