

汪传宝, 陈静文, 王可, 等. 仿野生种植三叶青不同部位总黄酮分析及其抗炎、抗氧化能力比较 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 321-329. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040159

WANG Chuanbao, CHEN Jingwen, WANG Ke, et al. Analysis of Total Flavonoids in Different Parts of Wild Planting *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg and Comparison of Their Anti-inflammatory and Antioxidant Capacity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(6): 321-329. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040159

· 营养与保健 ·

仿野生种植三叶青不同部位总黄酮分析及其 抗炎、抗氧化能力比较

汪传宝¹, 陈静文¹, 王可², 仇凤梅¹, 黄真¹, 钟晓明^{1*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江杭州 310053;

2. 嘉兴学院医学院, 浙江嘉兴 314001)

摘要:目的: 比较仿野生种植三叶青不同部位中总黄酮含量、抗氧化活性以及抗炎能力差异。方法: 采用醇提工艺对仿野生种植三叶青茎叶、块根、根须进行提取, 比较不同部位间总黄酮含量差异; 通过 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、羟自由基清除实验以及铁离子还原力测定, 比较仿野生种植三叶青不同部位间抗氧化能力的强弱; 采用脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞作为炎症模型, 通过细胞 NO 的释放量比较仿野生种植三叶青不同部位间的抗炎能力差异。结果: 在最佳提取工艺条件下, 测得仿野生种植三叶青茎叶、块根、根须总黄酮含量分别为 11.86±0.23、8.48±0.10、7.52±0.02 mg·g⁻¹; 建立三叶青 HPLC 指纹图谱, 共标定了 10 个共有峰, 通过对照品指认出 6 号峰为芦丁、8 号峰为槲皮素、9 号峰为山奈酚, 并对其含量进行检测, 结果显示块根中三种指标成分含量均最高, 其次根须, 茎叶最低。检测仿野生种植三叶青不同部位对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基以及羟自由基的 IC₅₀ 值, 茎叶分别为 0.2107、0.2315、0.7625 mg/mL; 块根分别为 0.3134、0.3758、0.8967 mg/mL; 根须分别为 0.2058、0.2587、0.7856 mg/mL。三叶青茎叶、块根、根须对铁离子还原能力的吸光度值分别为 0.172、0.153、0.184。当仿野生种植三叶青三部位的质量浓度在 25~200 μg/mL 之间时, 它们不会对 RAW264.7 细胞造成毒性, 能够有效地抑制 LPS 诱导的 NO 释放, 从而达到良好的抗炎效果。结论: 本研究结果为仿野生种植三叶青不同部位的质量评价提供参考, 并对仿野生种植三叶青非药用部位废物再利用及后续全资源开发提供理论依据。

关键词: 仿野生种植三叶青, 不同部位, 总黄酮含量, 指纹图谱, 抗氧化能力, 抗炎能力, 质量评价

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)06-0321-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040159



本文网刊:

Analysis of Total Flavonoids in Different Parts of Wild Planting *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg and Comparison of Their Anti-inflammatory and Antioxidant Capacity

WANG Chuanbao¹, CHEN Jingwen¹, WANG Ke², QIU Fengmei¹, HUANG Zhen¹, ZHONG Xiaoming^{1*}

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Jiaxing University College of Medicine, Jiaxing 314001, China)

Abstract: Objective: The content of total flavonoids, antioxidant activity and anti-inflammatory capacity in different parts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg which imitated wild planting were compared. Methods: Stems, leaves, root tubers and root whiskers of wild imitating-planted *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg were first extracted by alcohol extraction technology, and the content of total flavonoids was compared among different parts. Then DPPH free radical scavenging rate, ABTS⁺ free radical scavenging rate, hydroxyl free radical scavenging rate and ferric ion reducing power

收稿日期: 2023-04-18

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LQ23H290004); 2022 年浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才培养项目 (2022R410C061)。

作者简介: 汪传宝 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药品质评价和资源开发利用研究, E-mail: 1712740643@qq.com。

* 通信作者: 钟晓明 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药品质评价和资源开发利用研究工作, E-mail: zxm_k6@sina.com。

were used to evaluate the antioxidant capacity of different parts of plants. Meanwhile, lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cell inflammation model was established to compare anti-inflammatory ability of different parts of wild planting *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg by measuring the release of NO. Results: Under the optimal extraction conditions, the contents of total flavonoids in stem leaves, root tubers and root whiskers were 11.86 ± 0.23 , 8.48 ± 0.10 and $7.52 \pm 0.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. A total of 10 common peaks of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg were identified by HPLC fingerprint. Rutin (peak 6), quercetin (peak 8) and kaempferol (peak 9) were identified via comparisons with reference standards. The content of the three indexes was the highest in roots, followed by stems and leaves. The IC_{50} values of DPPH free radicals, ABTS⁺ free radicals and hydroxyl free radicals in different parts of the plant were detected, and the values of stem leaves were 0.2107, 0.2315 and 0.7625 mg/mL. Root tubers were 0.3134, 0.3758 and 0.8967 mg/mL. The roots were 0.2058, 0.2587 and 0.7856 mg/mL, respectively. The absorbance values of the reducing capacity of ferric ions in stem, tuber and root were 0.172, 0.153 and 0.184. Three parts of the wild imitating-wild plant were not toxic to RAW264.7 cells at the concentrations between 25~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and could effectively inhibit the release of NO induced by LPS that achieving a good anti-inflammatory effect. Conclusion: The results of this study provided a reference for the quality evaluation and a theoretical basis for waste recycling as well as subsequent whole resource development to the non-medicinal parts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg from the wild.

Key words: imitation wild planting *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg; different parts; total flavonoids content; fingerprints; antioxidant capacity; anti-inflammatory capacity; quality evaluation

三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg), 又称金线吊葫芦、蛇附子、石抱子、三叶对, 是一种具有重要药用价值的多年生常绿藤本植物^[1]。作为一种珍贵的中草药材, 三叶青在我国分布较广, 常见于浙江、江西、福建、广西等地, 全草皆可入药, 以块根最佳^[2]。药理研究表明, 三叶青具有抗肿瘤^[3]、抗病毒^[4]、抗氧化^[5]、抗炎^[6]等生理活性。作为浙产地道药材, 三叶青常被用于小儿高热惊厥、痢疾、活血散结、祛风化痰等治疗^[7]。也有研究将三叶青添加到食用油中用作保健食品从而更有利于保留功效^[8]; 将钙果和三叶青为主料加工成钙果三叶青营养片等。三叶青的黄酮类物质被广泛认为是其重要的药物组成部分^[9], 已有研究证实多种药理活性与黄酮类密切相关^[10-12]。目前, 因为三叶青药用价值较高, 市场需求越来越大, 导致三叶青市场价格突飞猛进, 人们对于三叶青野生资源的过度采挖, 造成其自然条件下的野生资源逐渐减少。三叶青人工种植是解决这一现状的主要手段之一^[13]。又因其药用部位以块根为主, 种植采收后的地上部分和根须^[14]极少被合理利用, 存在大量的资源浪费。近年来, 已有学者从三叶青块根中分离出具有抗炎活性的物质, 证实三叶青块根具有良好的抗炎活性^[15]。本文从物质基础和功效方面比较仿野生种植三叶青不同部位间的差异, 以期为仿野生种植三叶青质量控制提供参考依据, 并对仿野生种植三叶青资源的合理开发利用提供更多选择。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

三叶青样品 浙江丽水仿野生种植栽培基地 2021年8月份采收, 经浙江中医药大学药学院资源研究所黄真教授鉴定为葡萄科崖爬藤属植物三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 的干燥全株; 芦丁(纯度均>98%)、槲皮素(纯度均>98%)、山奈酚

(纯度均>98%)、1,1-苯基-2-苦肼基自由基(DPPH)

上海源叶生物科技有限公司; 乙腈、甲醇 色谱纯, 美国 Tedia 公司; 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS⁺) 酷尔化学; L-抗坏血酸(VC)、脂多糖(LPS) Sigma 公司; RAW264.7 小鼠巨噬细胞 由浙江省医学科学院惠赠; 胎牛血清 四季青公司; DMEM 培养基 Gibco公司; 青霉素-链霉素溶液、PBS 缓冲液 Biosharp 公司; 二甲基亚砜 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; NO 检测试剂盒 碧云天; 其他试剂为分析纯; 超纯水 Milli-Q 超纯水系统制备。

ME203E 电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; GZX-9140MBE 数显鼓风干燥箱 上海帅登仪器有限公司; HH-2 恒温水浴锅 上海宜昌仪器厂; UV-1800 紫外分光光度计 杭州宗灿科技有限公司; Waters 高效液相(HPLC)色谱仪 美国 Waters 公司; ELX800 酶标仪 美国博腾仪器有限公司; 二氧化碳培养箱 美国赛默飞世尔科技公司; 超净工作台 丹麦 Labogene 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 三叶青不同部位总黄酮提取与含量测定

1.2.1.1 三叶青不同部位总黄酮的提取 仿野生种植三叶青茎叶、块根、根须置于阴凉干燥处, 自然干燥、粉碎、过 50 目筛处理后, 收集作为样品粉末。精密称取三叶青样品粉末 1.00 g, 按照如下热回流提取工艺进行提取, 料液比 $1:30 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 温度 $83 \text{ }^\circ\text{C}$, 提取时间 65 min, 乙醇浓度 60%。滤液经抽滤后, 用 50 mL 容量瓶定容, 备用^[16]。

1.2.1.2 芦丁标准曲线的绘制 参考文献 [17] 并加以修改, 标准品的制备: 精密称取芦丁 10.0 mg, 用 60% 乙醇进行溶解, 定容至 10 mL 容量瓶中, 摇匀后

即得。测定方法:精密吸取配制好的芦丁对照品 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别加入到 25 mL 容量瓶中,先加入 1 mL 5% 亚硝酸钠溶液,静置 6 min 后再加入 1 mL 10% 硝酸铝溶液,静置 6 min 后加入 10 mL 4% 氢氧化钠溶液,用纯水定容至 25 mL,混匀后静置 15 min。以纯水作为空白对照,采用紫外分光光度计测量各样品在 510 nm 波长处的吸光度值,以吸光度(A)对芦丁质量浓度(X)进行回归,得到回归方程: $A=10.613X-0.0171(R^2=0.9999)$ 。

1.2.1.3 三叶青不同部位总黄酮的测定 精密量取三叶青试样溶液 2.0 mL,并置于 25 mL 容量瓶中进行定容,按照“1.2.1.2”中所述方法操作,测定三叶青总黄酮得率,以如下公式进行计算:

$$Y = \frac{C \times V \times N}{M} \quad \text{式 (1)}$$

式中, Y 为三叶青总黄酮得率, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; C 为三叶青总黄酮的质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; V 为三叶青提取液体积, mL; N 为稀释倍数; M 为三叶青样品质量, mg。

1.2.2 三叶青不同部位指标成分的含量差异测定

1.2.2.1 标准品溶液的制备 精密称取芦丁、山奈酚、槲皮素标准品各 1.0 mg,向其中分别加入 1 mL 纯甲醇,使其完全溶解,稀释至 1.0 mg/mL,储存备用。

1.2.2.2 供试品溶液的制备 取三叶青样品适量,粉碎后精密称量各不同部位粉末 1.0 mg,置于圆底烧瓶中,采用醇提工艺^[15]进行提取,滤液用旋转蒸发仪蒸干,用甲醇转移并定容至 5 mL 容量瓶中,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品。

1.2.2.3 色谱条件 采用 Waters Sunfire C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 为色谱柱,以 0.1% 磷酸水为水相(A 相)-乙腈为有机相(B 相),梯度洗脱条件为 (0~5 min, 10% B; 5~15 min, 10%~12% B; 15~30 min, 12% B; 30~35 min, 12%~13% B; 35~75 min, 13%~43% B; 75~90 min, 43%~73% B; 90~110 min, 73%~100% B); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 360 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

1.2.2.4 线性关系考察 精密吸取适当的混合标准品溶液配制成浓度均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准品溶液,再依次稀释成 50、20、10、5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列溶液,分别进样,在 360 nm 波长下测定各组分的峰面积,以峰面积对标准品浓度进行线性回归,绘制标准曲线,并测定各成分的线性范围。

1.2.3 指纹图谱方法学考察

1.2.3.1 精密度实验 取同一批供试品溶液,在“1.2.2.3”条件下连续进样 6 次^[18],计算得出槲皮素峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。

1.2.3.2 稳定性实验 取同一批供试品溶液,在“1.2.2.3”条件下,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样

测定^[18],计算得出槲皮素峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。

1.2.3.3 重复性实验 取 6 份供试品溶液,在“1.2.2.3”条件下进样^[18],计算得出槲皮素峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。

1.2.4 三叶青不同部位黄酮提取物体外抗氧化能力测定

1.2.4.1 DPPH 自由基清除率测定 参考文献 [19] 并加以改进,将该提取工艺下得到的不同部位三叶青样品配制成 0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mg/mL 质量浓度的样品溶液。精密量取三叶青待测液各 2 mL,和含有 2 mL 1×10^{-4} mol/L 的 DPPH 溶液充分摇匀后避光静置 30 min,以纯水作为空白组,在 517 nm 波长处测定吸光度,以 V_C 为对照品。按下式计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{[A_0 - (A_x - A_{x_0})]}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: A_0 表示纯水和 DPPH 溶液的吸光值; A_x 表示三叶青样品和 DPPH 溶液的吸光值; A_{x_0} 表示三叶青样品和无水乙醇的吸光值。

1.2.4.2 ABTS⁺自由基清除率测定 参考文献 [20] 并加以改进,提前配制好 7.4 mmol/L 的 ABTS 溶液与 2.6 mmol/L 的过硫酸钾溶液 1:1 混合均匀,避光静置过夜后,制成 ABTS 储备液。实验时用 95% 乙醇稀释,使其在 734 nm 波长下的 A 值为 0.700 ± 0.020 。

将该提取工艺下得到的不同部位三叶青样品配制成 0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mg/mL 质量浓度的样品溶液。取 0.2 mL 样品溶液,加入 0.8 mL ABTS 工作液,混匀,在室温下避光反应 10 min,空白组选择用 95% 乙醇代替,在 734 nm 波长下测定吸光度,以 V_C 为对照品,按式(3)计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{(A_0 - A)}{A} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: A_0 表示 95% 乙醇和 ABTS⁺溶液的吸光度; A 表示三叶青样品和 ABTS⁺溶液的吸光度。

1.2.4.3 羟自由基清除率测定 参考文献 [21] 并加以改进,将该提取工艺下得到的三叶青不同部位配制成 0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mg/mL 质量浓度的样品溶液。吸取 2 mL 三叶青待测液于试管中,依次加入 9 mmol/L 的硫酸亚铁溶液 2 mL、9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液 2 mL 和 9 mmol/L 的过氧化氢溶液 2 mL,摇匀,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30 min,冷却后于 510 nm 波长处测量吸光度,以纯水作为空白组,以同浓度的 V_C 作为对照组,按式(4)计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{[A_0 - (A_x - A_{x_0})]}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: A_0 表示纯水+ FeSO_4 溶液+水杨酸-乙醇溶液+ H_2O_2 溶液的吸光值; A_x 表示三叶青样品+ FeSO_4

溶液+水杨酸-乙醇溶液+H₂O₂溶液的吸光值; A_{xo}表示三叶青样品+FeSO₄溶液+水杨酸-乙醇溶液的吸光值。

1.2.4.4 铁离子还原力测定 参考文献 [22] 并加以改进, 将该提取工艺下得到的不同部位三叶青样品配制成 0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mg/mL 质量浓度的样品溶液。取 1 mL 三叶青样品于试管中, 加入 2.5 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L, pH7.4), 2.5 mL 1.0% 铁氰化钾溶液混合均匀后置于 50 °C 条件下反应 20 min, 加入 2.5 mL 10% 三氯化铁溶液, 于 4000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 2.5 mL 于另一试管中, 加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 三氯化铁溶液 (0.1%), 混匀后静置 10 min, 以同浓度的 Vc 为对照品在 700 nm 波长处测定吸光度值, 吸光度值越大, 说明该样品对铁离子的还原能力越强。

1.2.5 三叶青不同部位黄酮提取物抗炎能力测定

1.2.5.1 RAW264.7 细胞培养 将 RAW 264.7 细胞培养于 DMEM 完全培养基中 (含 10% 胎牛血清), 培养条件为 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 待细胞处于对数生长期后进行后续实验。

1.2.5.2 MTT 法筛选给药安全浓度 参考文献 [23] 并加以改进, 待 RAW264.7 细胞密度达到 70%~80% 时, 调整细胞密度为 1×10⁵ cell/mL, 吹打均匀后, 接种至 96 孔细胞培养板中, 设置空白组, 正常组和给药组, 给药组加入 100 μL/孔的 25、50、100、200、400、800、1600 μg/mL 系列浓度的三叶青提取物溶液, 正常组不添加药物, 代之等量的培养基; 空白组不接种细胞, 加入等量的培养基。每组设置 6 个复孔, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度环境下培养 24 h 后, 弃去培养液, 用 PBS 溶液洗涤 2 次, 每孔加入 5 mg/mL MTT 工作液 100 μL, 于细胞培养箱中培养 4 h 后, 用移液枪吸去上清液, 补加 150 μL DMSO 溶液, 震荡溶解 13 min, 立即至酶标仪检测 490 nm 波长下的吸光度值, 实验重复三次, 按式(5)计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{给药组}A_{490} - \text{空白组}A_{490}}{\text{正常组}A_{490} - \text{空白组}A_{490}} \times 100$$

式 (5)

1.2.5.3 Griess 法测定 NO 释放量 参考文献 [23] 并加以改进, 待 RAW264.7 细胞密度达到 70%~80% 时, 调整细胞密度为 1×10⁵ cell/mL, 吹打均匀后, 将细胞分为正常组、模型组、阿司匹林 (Aspirin, 阳性药) 组和给药低中高组, 分别接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 模型组不加入药物, 加入等量的培养基; 阳性药组加入含阿司匹林的培养基溶液, 使终浓度为 100 μg/mL; 给药组添加含待测样品的培养基溶液, 分别以终浓度为 50、100、200 μg/mL。每组设置 3 个复孔, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度环境下培养 24 h。其中模

型组、阳性药组、给药组, 在培养 24 h 后, 弃去原先培养基, 加入 200 μL 含 1 μg/mL LPS 的 DMEM 培养基, 正常组代之等量的培养基, 继续培养 24 h。待测样品孔中加入各组培养上清液 50 μL, 标准品孔加入浓度 0、1、2、5、10、20、40、60、100 μmol/L 各 50 μL, 零孔加入培养基 50 μL。各孔中分别加入 50 μL 的 Griess Reagent I, 再加入 50 μL 的 Griess Reagent II, 在 540 nm 波长下测定 OD 值, 根据试剂盒说明书计算 NO 释放量, 实验重复 3 次。

1.3 数据处理

实验数据用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行统计分析, 数据均为 3 次平行实验的平均值, 结果用平均值±标准偏差表示, 并对实验结果进行配对 *t* 检验, *P*<0.05 为差异显著; 采用 GraphPad Prism 8 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 三叶青不同部位总黄酮含量

2.1.1 三叶青不同部位黄酮提取物得率比较 分别称取三叶青茎叶, 块根, 根须三个部位药材粉末 33.30 g, 以最佳提取工艺提取, 抽滤, 旋蒸, 烘干, 计算提取物得率。结果显示, 茎叶的提取物得率为 8.96%±0.02%; 块根的提取物得率为 12.06%±0.02%; 根须的提取物得率为 7.23%±0.01%。

2.1.2 三叶青不同部位总黄酮含量差异 结果显示, 茎叶总黄酮含量为 11.86±0.23 mg·g⁻¹; 块根总黄酮含量为 8.48±0.10 mg·g⁻¹; 根须总黄酮含量为 7.52±0.02 mg·g⁻¹。从得率和总黄酮含量比较看, 茎叶部分的总黄酮含量最高, 得率次于块根部分, 在资源开发方面保证了产量, 这有利于后续对三叶青茎叶部分的开发利用。

2.2 三叶青不同部位总黄酮 HPLC 指纹图谱的建立

通过将三叶青色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”中, 如图 1 所示, 根据相同的保留时间共标定了 10 个共有峰, 三个部位的液相色谱图比较, 茎叶的色谱峰更多, 表明成分更丰富。从出峰的强度来看, 茎叶样品的总峰面积更多,

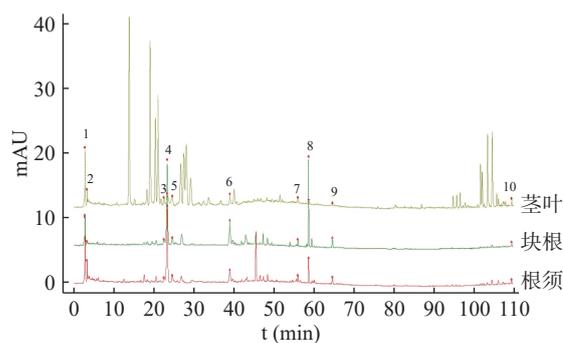


图 1 三叶青样品 HPLC 指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprint of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg

注: 通过与对照品比对, 6: 芦丁; 8: 槲皮素; 9: 山奈酚。

所含有化学成分含量更多,这对三叶青茎叶化学成分进一步研究提供了参考。与混合对照品比对,指认其中三个指标成分,确认 6 号峰为芦丁,8 号峰为槲皮素,9 号峰为山奈酚,可以进一步进行含量测定。

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度实验 取同一批块根样品为供试品,连续进样 6 次,以 8 号峰为参考峰,计算得出各样品峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.5%、0.9%,表明该仪器的精密度良好。

2.3.2 稳定性实验 取同一批块根样品为供试品,分别在配制后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,以 8 号峰为参考峰,计算得出各样品峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.1%、1.0%,表明供试品在 24 h 内的稳定性良好。

2.3.3 重复性实验 取 6 份块根样品为供试品,分别进样,以 8 号峰为参考峰,计算得出各样品峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.5%、1.3%,表明该方法的重复性良好。

2.4 标准曲线的绘制与线性范围的确定

通过查看各标准品在 200~400 nm 下的光谱图,发现芦丁、槲皮素、山奈酚在 360 nm 左右有较强吸收,于是对各标准品在 360 nm 波长下对各峰进行积分。以标准品对应峰的峰面积为纵坐标,标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,如图 2 所示,线性方程分别为:芦丁, $y=878.39x-689.21$, $R^2=0.9993$; 槲皮素, $y=3199.5x-5555.1$, $R^2=0.9992$; 山奈酚, $y=3725.6x-2189.5$, $R^2=0.9994$ 。芦丁、槲皮素、山奈酚均在 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈现线性关系。

2.5 三叶青不同部位指标成分的含量差异

将三叶青的三个不同部位进行 HPLC 检测,对三个指标成分进行分析。结果表明,芦丁、槲皮素和山奈酚在块根样品中含量都是最高。芦丁含量由高到低依次为块根(4.99 mg/kg)、根须(2.79 mg/kg)、茎叶(2.49 mg/kg)。槲皮素含量由高到低依次为块根(30.93 mg/kg)、根须(14.75 mg/kg)、茎叶(9.59 mg/kg)。山奈酚含量由高到低依次为块根(4.89 mg/kg)、根须(4.28 mg/kg)、茎叶(3.43 mg/kg)。从总体上看,块根中的三种指标成分含量最多^[24],但是从总黄酮含量以及高效液相色谱图分析,茎叶中有着更加丰富的成分,表明三叶青不同部位间各化学成分不同,各成分含量也不尽相同,这与蓝艳等^[25]对不同产地三叶青中化学成分测定的结果相似。可能的原因是三叶青在生长过程中化学成分富集的部位不同,且茎叶部位的成分种类更多可能跟光合作用有关,值得进一步开发利用。

2.6 三叶青不同部位体外抗氧化能力差异

2.6.1 三叶青黄酮提取物对 DPPH 自由基的清除能力 由图 3 可知,随着样品质量浓度的增大,三叶青不同部位对 DPPH 自由基的清除率逐渐提高,在质

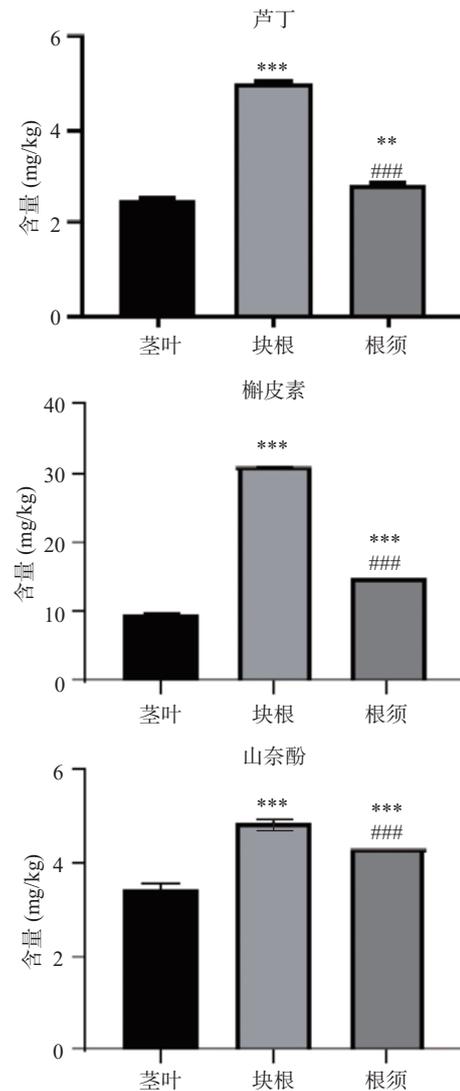


图 2 三叶青不同部位指标成分含量比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig.2 Comparison of contents of index components in different parts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

注:与茎叶相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与块根相比, ### $P<0.001$ 。

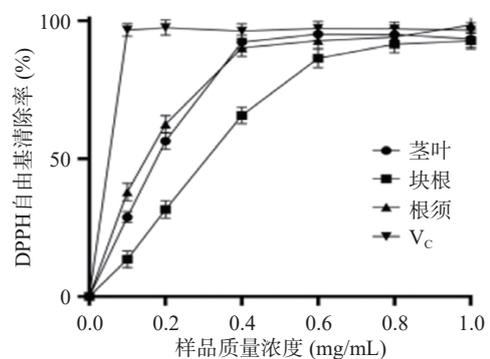


图 3 三叶青对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.3 Scavenging effect of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg on DPPH radical

量浓度为 0.8 mg/mL 时,三叶青茎叶的清除率为 95.08%, IC_{50} 值为 0.2107 mg/mL;块根的清除率为 91.53%, IC_{50} 值为 0.3134 mg/mL;根须的清除率为 94.12%, IC_{50} 值为 0.2058 mg/mL。而 V_C 对 DPPH

的清除率在 0~0.1 mg/mL 的范围内急剧增加, 达到 96.67%, 此后基本维持在此水平。由此可见, 三叶青提取物对 DPPH 自由基具有一定的清除能力, 但与 Vc 相比能力较弱。且三叶青不同部位之间也有差异, 茎叶和根须的清除能力较块根强一些。张进军等^[26]对浙产三叶青地上部分抗氧化活性评价, 测得对 DPPH 自由基清除率的 IC₅₀ 值为 0.1902 mg/mL, 与本实验所得结果相符, 为仿野生种植三叶青更全面、客观的评价抗氧化能力提供了参考。

2.6.2 三叶青黄酮提取物对 ABTS⁺ 自由基的清除能力 由图 4 可知, 随着质量浓度的增大, 三叶青不同部位对 ABTS⁺ 自由基的清除率逐渐提高, 在质量浓度为 0.6 mg/mL 时, 三叶青茎叶的清除率为 97.56%, IC₅₀ 值为 0.2315 mg/mL; 块根的清除率为 89.64%, IC₅₀ 值为 0.3758 mg/mL; 根须的清除率为 99.91%, IC₅₀ 值为 0.2587 mg/mL。而 Vc 对 ABTS⁺ 自由基的清除率在 0~0.1 mg/mL 的范围内急剧增加, 达到 99.70%, 此后基本维持在此水平。由此可见, 三叶青提取物对 ABTS⁺ 自由基具有一定的清除能力, 但与 Vc 相比能力较弱。且三叶青不同部位之间也有差异, 茎叶和根须的清除能力较块根强一些。

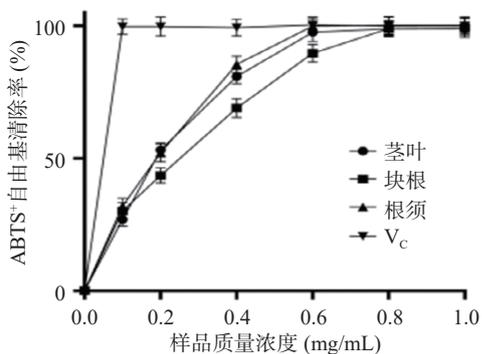


图 4 三叶青对 ABTS⁺ 自由基清除率的影响

Fig.4 Scavenging effect of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg on ABTS⁺ radical

2.6.3 三叶青黄酮提取物对羟自由基清除能力 由图 5 可知, 随着质量浓度的增大, 三叶青不同部位对羟自由基的清除率呈现上升趋势。当浓度达到

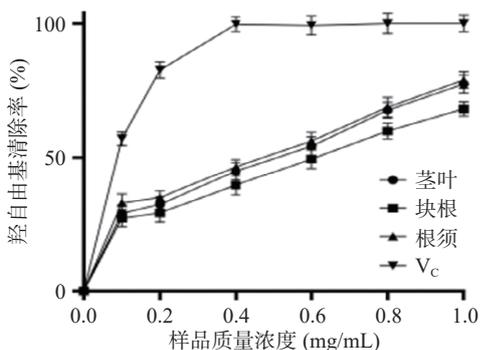


图 5 三叶青对羟自由基清除率的影响

Fig.5 Scavenging effect of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg on hydroxyl radical

1.0 mg/mL 时, 三叶青茎叶的清除率为 77.50%, IC₅₀ 值为 0.7625 mg/mL; 块根的清除率为 68.21%, IC₅₀ 值为 0.8967 mg/mL; 根须的清除率为 78.96%, IC₅₀ 值为 0.7856 mg/mL。而 Vc 对羟自由基的清除率在 0~0.4 mg/mL 的范围内呈上升趋势, 在 0.4 mg/mL 时达到 100%。由此可见, 三叶青提取物对羟自由基具有一定的清除能力, 但与 Vc 相比能力较弱。且三叶青不同部位之间也有差异, 茎叶和根须的清除能力较块根强一些。

2.6.4 三叶青黄酮提取物的还原能力 由图 6 可知, 在测试的质量浓度范围内, Vc 和三叶青的还原能力随着浓度的升高而增强。在 1.0 mg/mL 时, Vc 的吸光度值为 0.785; 三叶青茎叶、块根、根须的吸光度值分别为 0.172、0.153、0.184。虽然三叶青的还原力较 Vc 弱, 但也表现出一定的还原力, 且茎叶和根须的还原能力较块根更强。

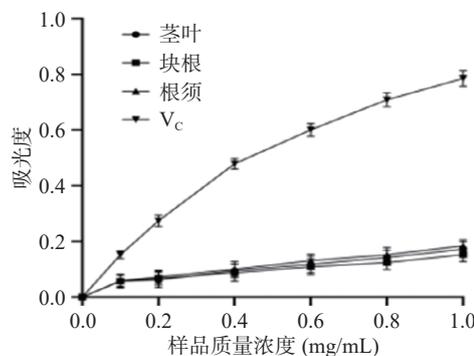


图 6 三叶青还原能力的影响

Fig.6 Reducing force of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg

2.7 三叶青不同部位抗炎能力测定

2.7.1 MTT 法筛选给药安全浓度 如图 7 所示, 三叶青三部位的给药浓度在 25~200 μg/mL 范围内时, RAW264.7 细胞存活率无明显下降, 表明三叶青提取物在此浓度范围内无细胞毒性, 可作为安全给药剂量范围。当三叶青给药浓度上升到 400 μg/mL 时, 细胞存活率显著性下降 (P<0.05), 表明此时已产生细胞毒性。故本实验选用 25~200 μg/mL 作为安全剂量浓度, 用于后续实验。

2.7.2 三叶青对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放的影响 炎症是生物体对抗外来有害物质或损伤的防御性反应, 通过释放 NO 等炎症介质或因子对抗细菌、病毒等入侵物质, 以维持机体平衡。NO 是一种独特的内源性信号分子, 参与正常生理活动; 然而, 炎症反应过度爆发时, NO 会异常过量表达, 导致炎症加剧, 其与多种炎症疾病的发生和发展密切相关, 通常被认为是炎症产生的标志和用作体外抗炎药物筛选模型^[27-28]。本实验采用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞产生炎症介质 NO 对待测样品进行抗炎活性筛选, 结合 MTT 法所得的安全浓度影响, 实验结果表

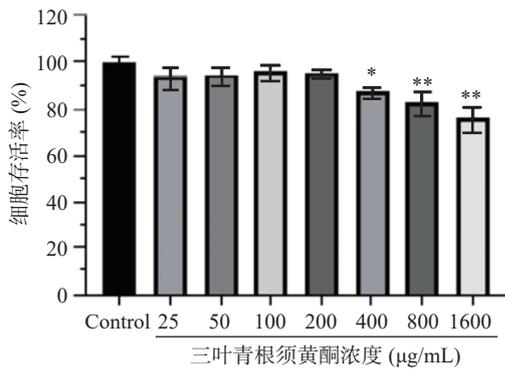
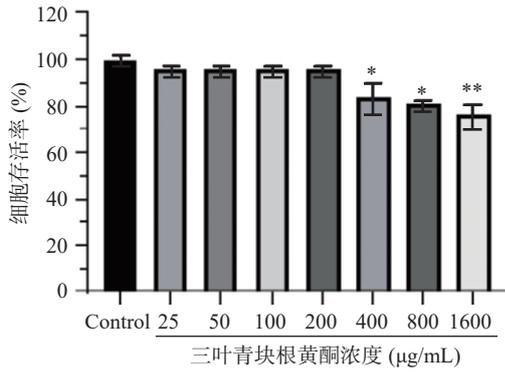
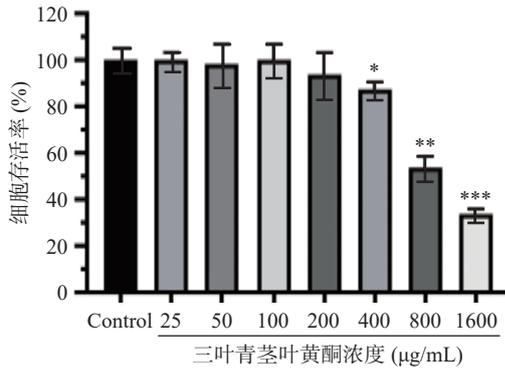


图 7 三叶青黄酮提取物对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.7 Effect of flavonoid extract of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg on the viability of RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注: 与 Control 相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

明, 与正常组相比, 模型组细胞 NO 含量极显著上升 ($P<0.001$); 与模型组相比, 阿司匹林组细胞 NO 释放量极显著性降低 ($P<0.001$)。三叶青不同部位各给药组 NO 释放量呈剂量依赖性降低, 均有显著性差异 ($P<0.01$), 三叶青三个部位提取物均可以降低

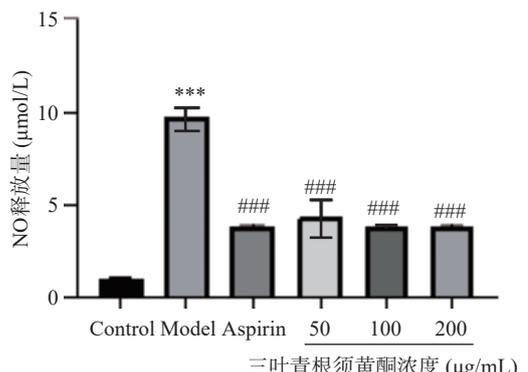
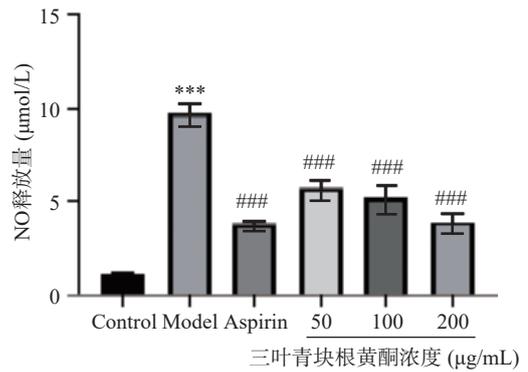
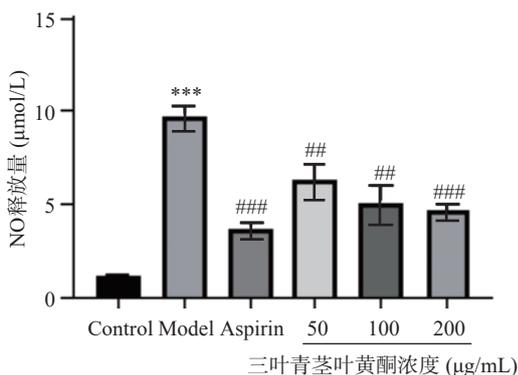


图 8 三叶青黄酮提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.8 Effect of flavonoid extract of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg on LPS-induced NO release in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注: 与 Control 相比, *** $P<0.001$; 与 Model 相比, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 含量, 且块根和根须样品在浓度达到 200 µg/mL 时, 表现出比阿司匹林更好的抗炎活性图 8。

3 讨论与结论

本研究采用醇提工艺, 测出的结果与吉庆勇等^[29]测定的人工种植和野生三叶青地下块茎的总黄酮含量相近, 各部位之间总黄酮含量没有显著性差异。从指纹图谱分析可知, 三叶青茎叶中的成分更多, 提示三叶青茎叶可以作为三叶青功效性部位的可能。

常用的体外抗氧化活性^[30]评价包括自由基清除能力和还原能力, 指在自由基溶液中加入抗氧化剂, 两者反应产生的光学变化差异来反映抗氧化活性或根据抗氧化剂能将铁氰化钾还原, 在 700 nm 处有最大吸收峰。吸光值越大, 表明样品还原力越强。本实验采用 DPPH、ABTS⁺、羟自由基法及铁离子还原法进行分析, 三叶青三部位均具有一定的抗氧化活性, 茎叶和根须的 IC₅₀ 值均比块根高, 显示出三叶青茎叶和根须具有更强的抗氧化活性。

有研究报道三叶青黄酮可以通过减轻 LPS 诱导的炎症细胞渗出和促炎因子分泌达到抗炎的作用^[31], 故本实验使用 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞对三叶青不同部位进行抗炎活性研究, 结果表明在安全

浓度范围内,三叶青不同部位的黄酮提取物均能使细胞培养液中的 NO 含量显著降低,这说明三叶青三部位均表现出良好的抗炎作用。

对于种植采收时抛弃的三叶青茎叶和根须而言,是一种很大的资源浪费。本实验为仿野生种植三叶青茎叶和根须的资源开发利用提供参考依据,也为加快三叶青药材全资源利用和食品、保健品的开发奠定基础。

参考文献

- [1] 李朝奎. 中国植物志(葡萄科)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 122. [LI C L. Flora of China (Vitis)[M]. Beijing: Science Press, 1998: 122.]
- [2] HU W Y, ZHENG Y J, XIA P G, et al. The research progresses and future prospects of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg: A valuable Chinese herbal medicine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113836.
- [3] ZHOU F M, LU Y, SUN T, et al. Antitumor effects of polysaccharides from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg via regulation of intestinal flora and enhancing immunomodulatory effects *in vivo*[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1009530.
- [4] DING F J, LIU J T, DU R K, et al. Qualitative and quantitative analysis for the chemical constituents of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg using ultra-high performance liquid chromatography/hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry and preliminary screening for anti-influenza virus components[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 9414926.
- [5] DING L, ZHANG X M, ZHANG J J. Antioxidant activity *in vitro* guided screening and identification of flavonoids antioxidants in the extract from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg[J]. *Int J Anal Chem*, 2021, 2021: 7195125.
- [6] 刘丹丹. 三叶青黄酮的抗炎作用及 TLR4 介导的信号转导途径研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2016. [LIU D D. Study on anti-inflammatory effects of trifolium flavone and signal transduction pathway mediated by TLR4[D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medicine University, 2016.]
- [7] 刘培刚, 魏克民. 三叶青生物学、药理学及临床应用相关研究进展[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(6): 927-933. [LIU P G, WEI K M. Research progress in biology, pharmacology and clinical application of trifoliate[J]. *Chinese Science and Technology of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 25(6): 927-933.]
- [8] 杨章坚, 徐子金, 叶锡勇, 等. 中药三叶青专利技术分析[J]. *科技视界*, 2017(24): 49-50. [YANG Z J, XU Z J, YE X Y, et al. Patent analysis of traditional Chinese medicine *Triloba trifoliata*[J]. *Science and Technology Vision*, 2017(24): 49-50.]
- [9] 刘俊秋, 高语枫, 郑佳怡, 等. 三叶青化学成分及其抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 233-241. [LIU J Q, GAO Y F, ZHENG J Y, et al. Research progress on chemical constituents and antitumor effects of trifoliate[J]. *Chinese Journal of Experimental Formulae*, 2022, 28(9): 233-241.]
- [10] 徐帆, 梁宗锁, 韩蕊莲. 三叶青中黄酮类化合物及其药理活性研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(24): 3704-3716. [XU F, LIANG Z S, HAN R L. Advances in research on flavonoids and their pharmacological activities in *Trifolium L.*[J]. *Genomics & Applied Biology*, 2021, 40(24): 3704-3716.]
- [11] ZHAI Y F, SUN J, SUN C T, et al. Total flavonoids from the dried root of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg inhibit colorectal cancer growth through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Phytother Res*, 2022, 36(11): 4263-4277.
- [12] FENG Z Q, HAO W R, LIN X Y, et al. Antitumor activity of total flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg is associated with the inhibition of regulatory T cells in mice[J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 7: 947-956.
- [13] 金雅慧, 缪强. 基于文献计量学的三叶青研究现状分析[J]. 林业科技情报, 2022, 54(3): 54-58. [JIN Y H, MIAO Q. Analysis of research status of *Trifolium folium* based on bibliometrics[J]. *Forestry Science and Technology Information*, 2022, 54(3): 54-58.]
- [14] 蒋梦丹, 夏鹏国, 梁宗锁, 等. 基于显微结构、抗氧化活性和化学成分在三叶青须根入药的可行性研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(10): 2492-2495. [JIANG M D, XIA P G, LIANG Z S, et al. Study on the feasibility of *Rhizoma trifolia* root for medicinal application based on microstructure, antioxidant activity and chemical composition[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2020, 31(10): 2492-2495.]
- [15] CHU Q, JIA R Y, CHEN M, et al. *Tetrastigma hemsleyanum* tubers polysaccharide ameliorates LPS-induced inflammation in macrophages and *Caenorhabditis elegans*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 141: 611-621.
- [16] 徐志杰, 黄子涵, 马方芳, 等. 响应面法优化三叶青总黄酮提取工艺及不同产地三叶青的质量评价[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 158-167. [XU Z J, HUANG Z R, MA F F, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Cyanobacteria trifolata* by response surface method and quality evaluation of *Cyanobacteria trifolata* from different habitats[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(6): 158-167.]
- [17] 阮明颖. 不同产地三叶青总黄酮及多糖含量的测定[J]. 当代化工研究, 2021(22): 19-23. [RUAN M Y. Determination of total flavonoids and polysaccharide content of *Trifolium L.* from different producing areas[J]. *Contemporary Chemical Industry Research*, 2021(22): 19-23.]
- [18] 朱建丽, 张晓芹, 张娜娜, 等. HPLC 法同时测定不同产地三叶青中 6 种黄酮类成分[J]. 中药材, 2020, 43(6): 1431-1433. [ZHU J L, ZHANG X Q, ZHANG N N, et al. Simultaneous determination of six flavonoid components in *Lucidum chinensis* from different habitats by HPLC[J]. *Chinese Materia Medica*, 2020, 43(6): 1431-1433.]
- [19] 杨云成, 武文豪, 唐守春, 等. 草珊瑚不同提取物抗氧化活性比较研究[J]. 现代农业科技, 2022(17): 190-195. [YANG Y C, WU W H, TANG S C, et al. Comparative study on antioxidant activities of different extracts of *Coralla chinensis*[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2022(17): 190-195.]
- [20] 郑丹婷, 陈炼茹, 韩伟, 等. 灵芝菌丝体水溶性抗氧化活性成分的多指标提取工艺优化[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2022, 44(3): 349-356. [ZENG D T, CHEN L R, HAN W, et al. Optimization of multi-index extraction process of water-soluble antioxidant active components from *Ganoderma lucidum* mycelium[J]. *Journal of Nanjing University of Technology (Natural Science Edition)*, 2022, 44(3): 349-356.]
- [21] 丁丽, 王淑君, 徐冰婉, 等. 基于体外抗氧化试验的三叶青活性物质提取工艺的研究[J]. 食品科技, 2021, 46(12): 224-229. [DING L, WANG S J, XU B W, et al. Study on the extraction process of active substances from Clover based on *in vitro* antioxidant test[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(12): 224-229.]
- [22] 帅良, 廖玲燕, 段振华, 等. 百香果皮多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 150-156. [SHUAI L, LIAO L Y, DUAN Z H, et al. Optimization of extrac-

tion process and antioxidant activity of polysaccharide from passion fruit peel[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(18): 150–156.]

[23] HONG J M, KIM J E, MIN S K, et al. Anti-Inflammatory effects of antarctic lichen *Umbilicaria antarctica* methanol extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage cells and zebrafish model[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8812090.

[24] 李彩凤, 胡欣, 金鹏飞, 等. HPLC 法同时测定三叶青块根中 6 个黄酮类成分的含量[J]. *中国药房*, 2019, 30(13): 1755–1758.

[LI C F, HU X, JIN P F, et al. Simultaneous determination of 6 flavonoids in root tubers of *Sinifolia* L. by HPLC[J]. *Chinese Pharmacy*, 2019, 30(13): 1755–1758.]

[25] 蓝艳, 朱建丽, 张晓芹, 等. UPLC 同时测定不同产地三叶青不同部位中的 7 种活性成分[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(5): 628–632. [LAN Y, ZHU J L, ZHANG X Q, et al. Simultaneous determination of seven active components in different parts of *Trifolium* L. from different habitats by UPLC[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2022, 39(5): 628–632.]

[26] 张进军, 张作法, 吕国英等. 浙产三叶青地下地上部分抗氧化活性比较[J]. *浙江农业科学*, 2021, 62(4): 709–711. [ZHANG J J, ZHANG Z F, LÜ G Y, et al. Comparison of antioxidant activities of above-ground parts of *Trifolium chinensis* from Zhejiang[J].

Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2021, 62(4): 709–711.]

[27] GUZIK T J, KORBUT R, ADAMEK-GUZIK T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2003, 54(4): 469–487.

[28] GE J M, LIU Z, ZHONG Z C, et al. Natural terpenoids with anti-inflammatory activities: Potential leads for anti-inflammatory drug discovery[J]. *Bioorg Chem*, 2022, 124: 105817.

[29] 吉庆勇, 华金渭, 程文亮, 等. 人工种植和野生三叶青中总黄酮含量的比较[J]. *浙江农业科学*, 2012, 316(1): 37–38. [JI Q Y, HUA J W, CHENG W L, et al. Comparison of total flavonoids content between artificial and wild clover[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2012, 316(1): 37–38.]

[30] 魏江存, 秦祖杰, 覃丽萍, 等. 赧桐总黄酮抗炎作用及抗氧化活性研究[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(1): 135–140. [WEI J C, QIN Z J, QIN L P, et al. Study on anti-inflammatory effect and antioxidant activity of CLerod total flavones[J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2023, 38(1): 135–140.]

[31] 鞠正光, 许海顺, 王红珍, 等. 三叶青抗病毒及抗炎作用机制研究进展[J]. *山东医药*, 2021, 61(30): 113–115. [JÜ Z G, XU H S, WANG H Z, et al. Research progress of antiviral and anti-inflammatory mechanism of trifoliolate[J]. *Shandong Medicine*, 201, 61(30): 113–115.]