热带亚热带植物学报
JOURNAL OF TROPICAL AND SUBTROPICAL BOTANY

毛车藤果实醇提物不同极性部位抗氧化活性研究

蒋蝶, 玉应拉, 郑婷婷, 刘聪, 彭文书, 刘丽, 严亮, 龚婉莹

引用本文:
蒋蝶, 玉应拉, 郑婷婷, 等. 毛车藤果实醇提物不同极性部位抗氧化活性研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2025, 33(6): 699–709.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11926/jtsb.4941

热带亚热带植物学报 2025, 33(6): 699 ~ 709
Journal of Tropical and Subtropical Botany

毛车藤果实醇提物不同极性部位抗氧化活性研究

蒋蝶[1,2], 玉应拉[1], 郑婷婷[1,2,3], 刘聪[1,3], 彭文书[1,3], 刘丽[1,3], 严亮[1,3*], 龚婉莹[1,2,3*]

(1. 滇西应用技术大学普洱茶学院, 云南 普洱 665000; 2. 云南农业大学食品科学技术学院, 昆明 650201; 3. 普洱茶研究院, 云南 普洱 665000)

摘要：为了解毛车藤(*Amalocalyx yunnanensis*)果实中的抗氧化活性成分，通过体外抗氧化实验和噻唑蓝(MTT)比色法评估其果实醇提物中不同极性部位的抗氧化活性和细胞毒性，同时测定各部位的总酸和总酚含量，并分析其与抗氧化活性间的相关性，采用超高效液相色谱-四极杆轨道阱质谱联用仪(UHPLC-QE-MS)对最优抗氧化活性部位进行化学成分分析，明确抗氧化活性成分。结果表明，毛车藤果实醇提物及其不同极性部位均有一定的抗氧化活性且对 LO_2 细胞无毒性，其总酸和总酚含量与抗氧化活性呈正相关；其中乙酸乙酯部位抗氧化活性最强，总酸、总酚含量最高，分别为 835 g/kg 和 14.49%；UHPLC-QE-MS 分析共鉴定出 98 种化合物，其中黄酮类和酚酸类物质相对占比分别为 30.21%和 14.58%，可能是乙酸乙酯部位的主要活性成分。本研究可为毛车藤果实作为天然安全的抗氧化剂的开发提供基础。

关键词：毛车藤；醇提物；极性部位；抗氧化活性；化学成分

doi: 10.11926/jtsb.4941 CSTR:32235.14.jtsb.4941

Study on the Antioxidant Activity of Different Polar Parts of the Ethanol Extract of *Amalocalyx yunnanensis* Fruit

JIANG Die[1,2], YU Yingla[1], ZHENG Tingting[1,2,3], LIU Cong[1,3], PENG Wenshu[1,3], LIU Li[1,3], YAN Liang[1,3*], GONG Wanying[1,2,3*]

(1. *College of Tea* (*Pu'er*), *West Yunnan University of Applied Sciences*, Pu'er 665000, Yunnan, China; 2. *College of Food Science and Technology*, *Yunnan Agricultural University*, Kunming 650201, China; 3. *Pu'er Institute of Pu-erh Tea*, Pu'er 665000, Yunnan, China)

Abstract: To understand the antioxidant active components in fruits of *Amalocalyx yunnanensis*, the antioxidant activity and cytotoxicity of different polar fractions of the fruit's ethanol extract were evaluated through *in vitro* antioxidant experiments and the MTT colorimetric method. Meanwhile, the total acid and total phenol contents of each fraction were determined, and their correlations with antioxidant activity were analyzed. The chemical components of the fraction with the best antioxidant activity were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography coupled with Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry (UHPLC-QE-MS) to identify the antioxidant active components. The results showed that the ethanol extract of *A. yunnanensis* fruits and its different polar fractions all had certain antioxidant activities and were non-toxic to LO_2 cells. The total acid and total phenol contents were positively correlated with antioxidant activity. Among them, the ethyl acetate fraction had the strongest antioxidant activity and the highest total acid and total phenol contents, which were 835 g/kg and 14.49%, respectively. Through UHPLC-QE-MS analysis, a total of 98 compounds were identified, among which flavonoids and phenolic acids accounted for 30.21% and 14.58%, respectively, which might be the main active components of the ethyl acetate fraction. Therefore, it could provide a basis for the development of *A.*

收稿日期: 2024-07-09 **接受日期:** 2024-10-15
基金项目: 云南省科技厅乡村振兴科技专项(202104BK090522)资助
This work was supported by Special Project for Science and Technology Department Rural Revitalization Yunnan Provincial (Grant No. 202104BK090522).
作者简介: 蒋蝶(1999 年生)，女，硕士研究生，研究方向为天然产物活性研究。E-mail: 2922660734@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yanliang@pecxy.com; gongwanying1206@163.com

yunnanensis fruits as natural and safe antioxidants.

Key words: *Amalocalyx yunnanensis*; Ethanol extract; Polar part; Antioxidant activity; Chemical composition

人体组织中许多生化反应会产生自由基，自由基过量会导致机体氧化损伤，引起机体炎症、加速衰老等问题[1–2]。研究表明抗氧化剂的作用机制可能是通过清除高剂量活性氧，从而抑制各种转录因子激活、抑制相关靶基因的表达[1,3–4]。市面上的抗氧化剂大多为人工合成[5]，长期使用会产生较大的副作用[2]。而植物提取物通常是较好的天然抗氧化剂[6–7]，具有安全高效、低毒低害等特点[8–9]。

毛车藤(*Amalocalyx yunnanensis*)属夹竹桃科(Apocynaceae)毛车藤属木质藤本植物[10]，广泛分布于云南西双版纳、普洱等热带、亚热带地区[11]。毛车藤是药食两用植物，其果实味道酸爽，人们常将其蘸蘸料生食或腌渍食用，能生津解渴、开胃化食[12]，其根可促进妇女产后的乳汁量[12–13]，与板蓝根、马兜铃配伍可用于治疗感冒咳嗽[14]；毛车藤活性成分丰富，史玉俊[15]从毛车藤根茎中分离出 5 类甾类化合物；胡英杰等[16]通过硅胶层析法从毛车藤醇提物乙酸乙酯部位分离得到 8 个化合物，并证实其中 6 个为孕烯类成分；曾廷等[13]对毛车藤叶、枝的化学成分进行分析，得到 3 个孕烯衍生物和 7 个其他成分。因此，毛车藤具有一定的药用和食用价值，但目前对其研究较少，且多数研究都集中在根部，对果实的研究鲜见报道。果实中的酸味主要由有机酸决定[17]，而有机酸通常具有较好的抗氧化活性[18–19]，因此，推断毛车藤果实有一定的抗氧化活性。

本研究通过测定毛车藤果实醇提物不同极性部位的抗氧化活性及其总酸、总酚含量，筛选最优抗氧化活性部位，并通过 UHPLC-QE-MS 分析最优抗氧化活性部位，以明确其化学成分，进一步用噻唑蓝(MTT)比色法评估各部位的 LO_2 细胞毒性，为其作为天然安全的抗氧化剂开发利用提供理论数据支撑。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

毛车藤(*Amalocalyx yunnanensis*)果实采自普洱市，通过冷冻干燥后粉碎并过 80 目筛，得到毛车藤果实粉末备用。LO_2 细胞株购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)，山东西亚化学股份有限公司；吩嗪硫酸甲酯(PMS)、2,2′-连氮基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸) ($ABTS^+$)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、福林酚、没食子酸，上海源叶生物科技有限公司；水杨酸、硫酸亚铁($FeSO_4$)、氢氧化钠、氯化铁，天津市风船化学试剂科技有限公司；抗坏血酸(Vc)，上海试四赫维化工有限公司；三氯乙酸，成都市科隆化学有限公司；甲醇、乙腈(LC-MS 级)，CNW Technologies；DMEM 培养基，大连美仑生物科技有限公司；磷酸盐缓冲液(PBS)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)，北京索莱宝科技有限公司；胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶消化液，Gibco Scientific。

XL-30C 新型高速连续式超微粉碎机，广州市旭朗机械设备有限公司；LGJ-12 冷冻干燥机，北京松源华兴科技发展有限公司；UV-1900 紫外分光光度仪，上海元析仪器有限公司；Multiskan FC 型酶标仪、Vanquish 超高效液相、Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱、C10281 自动细胞计数仪，Thermo Fisher Scientific；SW-CJ-2F 超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；BD 56-57L CO_2 细胞培养箱，Binder Scientific。

1.2 方法

极性部位的制备 准确称取 50 g 毛车藤果实粉末于锥形瓶中，按料液比 1:10 加入 70%乙醇溶液，60 ℃水浴 6 h，抽滤，将滤液旋蒸除去乙醇至无醇味，得到毛车藤果实 70%乙醇提取液。将毛车藤果实 70%乙醇提取液加水定容，按照极性从小到大依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇进行等体积萃取，多次萃取至萃取液澄清无色，合并相同极性提取液，减压浓缩除去有机溶剂后冻干，即得到各部位萃取物。精确称重，计算萃取得率。

DPPH 自由基清除能力测定 将毛车藤果实醇提物及其各极性部位和阳性对照 Vc 用 70%乙醇溶液配制为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL 质量浓度的样品溶液。参照 SÁNCHEZ-Moreno 等[20]的方法，配制 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液。将样品溶液与 DPPH 溶液 1:2 (*V*/*V*)混匀，室温避光反应 30 min，于

波长 517 nm 处测定吸光值，另设空白组和对照组。DPPH 自由基清除率计算公式为 X=[1–(A_1–A_0)/A_2]×100%，式中，X 为 DPPH 自由基清除率，A_0 为空白组吸光值，A_1 为样品组吸光值，A_2 为对照组吸光值。

ABTS$^+$自由基清除能力测定　将毛车藤果实醇提物各极性部位和阳性对照 Vc 用 70%乙醇溶液配制为 0.005、0.01、0.02、0.04、0.08 mg/mL 质量浓度的样品溶液。参照 Wang 等[21]的方法，将 2.45 mmol/L 过硫酸铵和 7 mmol/L ABTS$^+$溶液等体积混匀，避光反应 12 h，用 pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液稀释至 734 nm 波长下吸光值为 0.80±0.02。将样品溶液与 ABTS$^+$溶液以 1:2 (V/V)混合，室温反应 6 min 后测定吸光值，另设空白组和对照组。ABTS$^+$自由基清除率计算公式为 X=[1−(A_1−A_0)/A_2]×100%，式中，X 为 ABTS$^+$自由基清除率，A_0 为空白组吸光值，A_1 为样品组吸光值，A_2 为对照组吸光值。

超氧阴离子自由基清除能力测定　将毛车藤果实醇提物各极性部位和阳性对照 Vc 用 70%乙醇溶液配制为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 mg/mL 质量浓度的样品溶液。参照 Yu 等[22]的方法，配制 557 μmol/L NADH-Na、45 μmol/L PMS 和 108 μmol/L NBT 溶液。取样品与各试剂溶液等体积混匀，室温反应 5 min 于 510 nm 波长处测定吸光值，另设空白组和对照组。超氧阴离子自由基清除率计算公式为 X=[1–(A_1–A_0)/A_2]×100%，式中，X 为超氧阴离子自由基清除率，A_0 为空白组吸光值，A_1 为样品组吸光值，A_2 为对照组吸光值。

羟基自由基清除能力测定　将毛车藤果实醇提物各极性部位和阳性对照 Vc 用 70%乙醇溶液配制为 0.2、0.6、1、1.4、1.8 mg/mL 质量浓度的样品溶液。参照 Wang 等[23]的方法，取样品溶液、6 mmol/L $FeSO_4$ 溶液、6 mmol/L H_2O_2 溶液等体积混匀，37 ℃孵育 10 min 后加入与试样溶液等体积的 6 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液混匀，继续孵育 30 min，于 510 nm 波长处测定吸光值，另设空白组和对照组。羟基自由基清除率计算公式为 X=[1–(A_1–A_0)/A_2]×100%，式中，X 为羟基自由基清除率，A_0 为空白组吸光值，A_1 为样品组吸光值，A_2 为对照组吸光值。

铁离子还原力的测定　将毛车藤果实醇提物各极性部位和阳性对照 Vc 用 70%乙醇溶液配制为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 mg/mL 质量浓度的样品溶液。参照 Wang 等[23]的方法，分别取 200 μL 试样溶液与 400 μL 1%铁氰化钾、400 μL 0.2 mol/L PBS 缓冲液(pH 6.6)混合，50 ℃反应 20 min，加入 500 μL 10%三氯乙酸，混匀后于 1 006×g 离心 10 min，取上清加入 400 μL 去离子水、80 μL 0.1%氯化铁溶液，50 ℃反应 10 min，于 700 nm 波长处测定吸光值。

总酚含量测定　参照国标标准[24]，以没食子酸为标准品，用 Folin-Ciocalteu 法分别测量毛车藤果实醇提物及其各极性部位的总酚含量。取毛车藤果实醇提物和各极性部位提取物用 70%甲醇溶液稀释配制成一定浓度的样品溶液，取 1 mL 样品溶液和 5 mL 10%福林酚试剂混合反应 5 min，加入 4 mL 7.5% Na_2CO_3 溶液，室温静置 1 h，于波长 765 nm 处测定吸光值，绘制标准曲线为 y=0.013x–0.0458，R^2=0.997 7。总酸含量计算公式为 X=(C×V)/M×100%，式中，X 为总酚含量，C 为样品溶液中多酚质量浓度，V 为样品溶液体积，M 为样品质量。

总酸含量测定　通过酸碱滴定法[25]测量毛车藤果实醇提物及其各极性部位的总酸含量，用无二氧化碳的水配制 0.05%样品溶液，60 ℃水浴至样品完全溶解，滴加 2 滴 1%酚酞指示剂，用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液进行滴定，记录消耗 NaOH 标准溶液的体积。总酸含量计算公式为 X=[C×(V_1–V_2)]×k/m×1000，式中，X 为总酸含量，C 为 NaOH 标准滴定溶液的浓度，V_1 和 V_2 分别为样品组和空白组消耗的 NaOH 标准滴定溶液体积，k 为酸的换算系数，以酒石酸 0.075 计算，m 为样品的质量，1000 为换算系数。

细胞活力测定　采用 MTT 比色法[26]测定毛车藤果实醇提物及其各极性部位对人肝 LO_2 细胞存活率的影响。取对数生长期的 LO_2 细胞，用 0.25%胰蛋白酶消化后加入含有 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬，以 1×10^5 CFU/mL 的浓度接种于 96 孔板，每孔 200 μL，于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 12 h。吸弃培养基，分别加入不同浓度的样品，设置 6 个复孔，孵育 24 h 后，每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液，避光孵育 4 h，吸弃孔内液体，每孔加入 200 μL DMSO，摇床混匀 15 min 后于酶标仪 492 nm 波长处测定吸光值，计算细胞的存活率 X=(A_2–A_0)/(A_1–A_0)×100%，式中，X 为细胞存活率，A_0 为调零孔吸光值，A_1 为空白对照孔吸光值，A_2 为 DMSO 对照孔或药物孔吸光值。

果实乙酸乙酯部位化学成分的鉴定　由各部位抗氧化活性结果可知，毛车藤果实最优抗氧化活性部位是乙酸乙酯部位。因此，采用 UHPLC-

QE-MS 技术对乙酸乙酯部位进行化学成分分析。用含同位素内标混合物提取液(甲醇:乙腈:水=2:2:1 (*V*/*V*))配制 0.02 g/mL 质量浓度的试样溶液。将试样溶液于 35 Hz 研磨 4 min，冰水浴超声 5 min，重复 3 次。–40 ℃静置 1 h，于 4 024×*g*、4 ℃离心 15 min，用 0.22 μm 有机系滤膜过滤上清液。色谱条件为 Phenomenex KinetexC18 (2.1 mm×100 mm, 2.6 μm) 液相色谱柱；流动相 A 为 0.1%乙酸水，流动相 B 为乙腈:异丙醇=1:1 (*V*/*V*)，梯度洗脱(0~1 min, 1% B; 1~9 min, 1%~99% B; 9~12 min, 1% B)，进样室温度 4 ℃，进样量 2 μL，柱温 25 ℃，流速 0.3 mL/min。质谱条件为加热电喷雾离子源(HESI)，正、负离子模式扫描，正离子模式(POS)喷雾电压为 3.8 kV，负离子模式(NEG)喷雾电压为–3.4 kV，扫描范围为 70~1 200 Hz；鞘气流速 50 Arb、辅助气体流速 15 Arb；离子传输管温度 320 ℃。

1.3 数据的统计分析

采用 Excel 2021 计算数据的平均值与标准偏差，IBM SPSS Statistics 26 进行显著性分析，GraphPad prism 7 软件计算抗氧化活性的 IC_{50} 值，还原能力的 IC_{50} 值以吸光值为 0.5 时对应的样品浓度表示，采用 Origin 2021 进行绘图。实验数据重复测定 3 次，结果均以平均值±标准误差表示。

2 结果和分析

2.1 果实醇提物不同极性部位萃取得率

毛车藤果实粉末经 70%乙醇提取后得到乙醇提取物，用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、和正丁醇依次对醇提物水溶液进行萃取，可分离为 5 个极性部位，不同极性部位的萃取率均有显著差异(*P*<0.05)，正丁醇部位萃取率为 19.35%，显著高于其他部位，二氯甲烷部位的萃取率最低为 0.7%。各部位的萃取率依次为正丁醇部位>水部位(14.42%)>乙酸乙酯部位(4.14%)>石油醚部位(1.42%)>二氯甲烷部位。

2.2 极性部位提取物抗氧化活性

DPPH 自由基清除能力 毛车藤果实中的乙醇提取物及其不同极性部位均表现出良好的清除 DPPH 自由基的能力(图 1)。随浓度从 0.05~0.8 mg/mL 的增加，毛车藤果实各部位对 DPPH 自由基的清除率呈现出浓度依赖性，清除率随浓度增加而增大。其中，乙酸乙酯部位表现出最佳的清除能力，在 0.1 mg/mL 的浓度下清除率达到 48.87%；其次为石油醚部位、二氯甲烷部位、正丁醇部位，当浓度为 0.2 mg/mL 时的清除率均超过了 50%；而水部位效果最弱。在 0.8 mg/mL 的浓度下，除了水部位和石油醚部位外，其他极性部位对 DPPH 自由基的清除能力均超过 80%，接近 Vc 的清除能力，表现出良好的抗氧化活性，对 DPPH 自由基的清除能力依次为 Vc>乙酸乙酯部位>石油醚部位>二氯甲烷部位>正丁醇部位>醇提物>水部位，表明经过分级萃取后，醇提物的抗氧化活性得到了提高。因此，本研究的抗氧化实验将重点对醇提物的不同极性萃取物进行分析。

$ABTS^+$自由基清除能力 在 0.005~0.08 mg/mL 浓度范围内，毛车藤果实醇提取物的不同极性部位在清除 $ABTS^+$自由基方面表现出差异(图 2)。随着各部位提取物浓度的增加，对 $ABTS^+$自由基的清除能力也增强，呈现出浓度依赖性。在 0.04 mg/mL 浓度下，各部位的清除率分别为石油醚部位 41.06%、二氯甲烷部位 55.82%、乙酸乙酯部位 99.85%、正

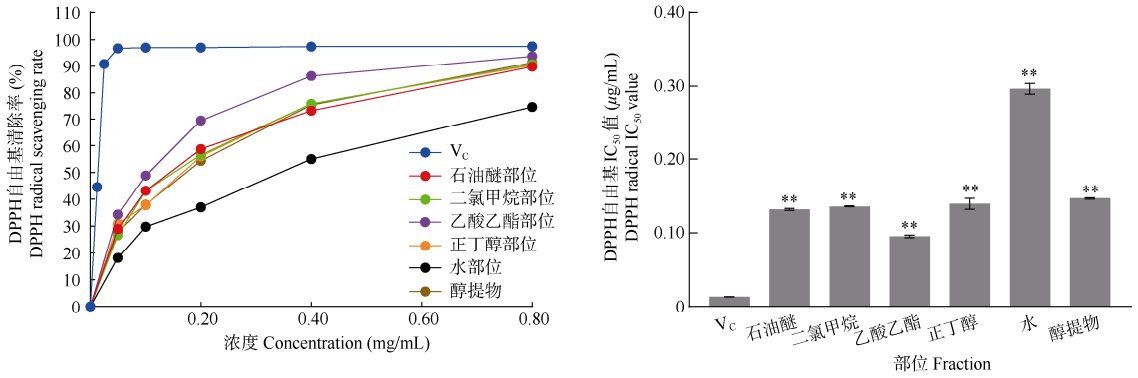

图 1 不同极性部位清除 DPPH 自由基能力。ns: *P*>0.05; *: *P*<0.05; **: *P*<0.01; ***: *P*<0.001。下同

Fig. 1 Scavenge DPPH radical ability of different polar fractions. ns: *P*>0.05; *: *P*<0.05; **: *P*<0.01; ***: *P*<0.001. The same below

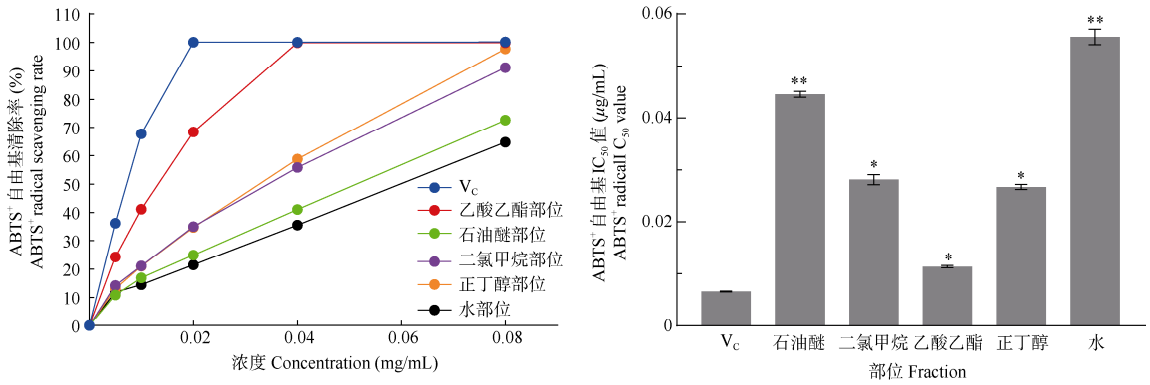

图 2　不同极性部位清除 ABTS$^+$自由基能力

Fig. 2 Scavenge ABTS$^+$ radical ability of different polar fractions

丁醇部位 58.85%、水部位 35.53%，其中乙酸乙酯部位表现出最佳的 ABTS$^+$自由基清除效果，接近 100%，具有与 Vc 相当的清除能力。对 ABTS 自由基的清除能力依次为 Vc>乙酸乙酯部位>正丁醇部位>二氯甲烷部位>石油醚部位>水部位。

清除超氧阴离子自由基的能力　毛车藤果实醇提物不同极性部位对超氧阴离子自由基表现出不同的清除效果，清除率均随着样品浓度的升高而增大(图 3)。在浓度为 0.05 mg/mL 时，乙酸乙酯部位的清除率超过了 Vc 的清除率，表现出很强的清除效果，并且在浓度范围为 0.2~0.4 mg/mL 时，乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位的清除率均与 Vc 相当，均有很强的抗氧化活性。超氧阴离子自由基清除率依次为乙酸乙酯部位>Vc>正丁醇部位>水部位>二氯甲烷部位>石油醚部位。

清除羟基自由基的能力　毛车藤果实醇提物各极性部位除二氯甲烷部位和石油醚部位外，其余部位对羟自由基的清除率均随着浓度的增加而提高(图 4)。在所测试的浓度范围内，乙酸乙酯部分对羟基自由基的清除效果最佳，当浓度为 1 mg/mL 时，清除率超过 60%，表现出良好的抗氧化活性。羟基自由基清除率依次为 Vc>乙酸乙酯部位>石油醚部位>正丁醇部位>水部位>二氯甲烷部位。

铁离子还原力　毛车藤果实醇提物不同极性部位的还原力随着浓度的升高而增大(图 5)。在浓度为 0.025~0.4 mg/mL 范围内，乙酸乙酯部位还原力最强，当浓度达到 0.4 mg/mL 时，乙酸乙酯部位与 Vc 的还原力接近。Vc 与各极性部位萃取物的还原力依次为 Vc>乙酸乙酯部位>正丁醇部位>水部位>二氯甲烷部位>石油醚部位。

总酚和总酸含量　从表 1 可见，毛车藤果实醇提物及不同极性部位中均含有酸类和酚类物质，且主要富集在乙酸乙酯部位。醇提物及其各极性部位的总酸含量差异显著(P<0.05)，依次为乙酸乙酯部位>正丁醇部位>醇提物>水部位>二氯甲烷部位>石油醚部位，除了石油醚部位，其他部位均含有高

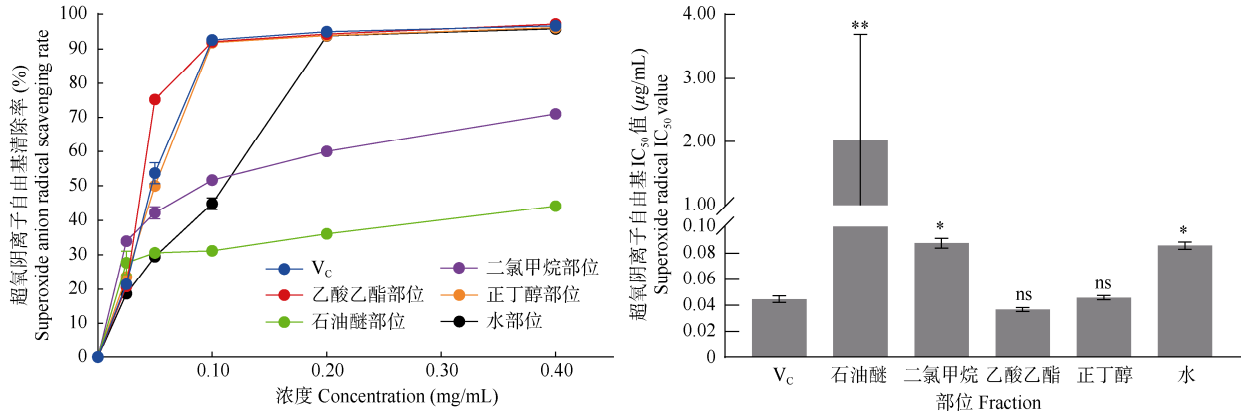

图 3　不同极性部位清除超氧阴离子自由基能力

Fig. 3 Scavenge superoxide anion free radical ability of different polar fractions

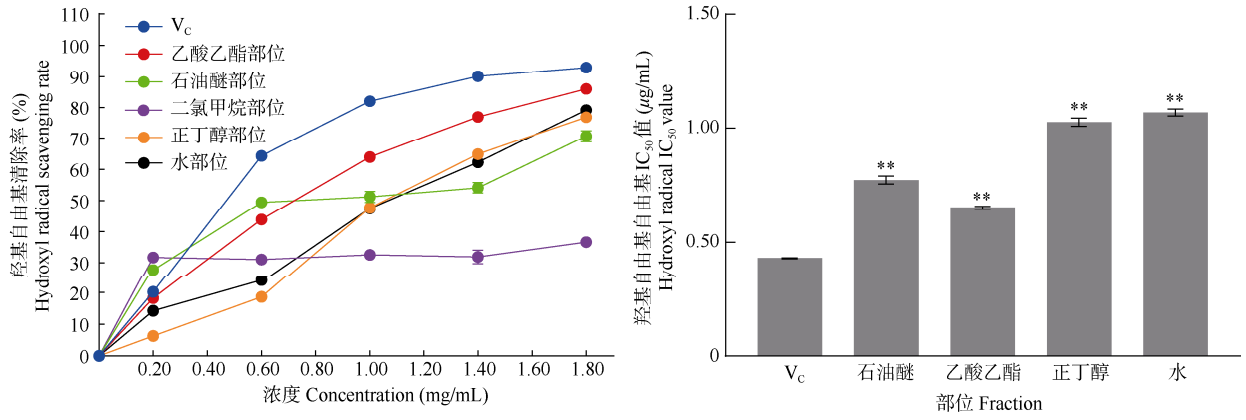

图 4 不同极性部位对羟基自由基清除能力

Fig. 4 Scavenge hydroxyl radical ability of different polar fractions

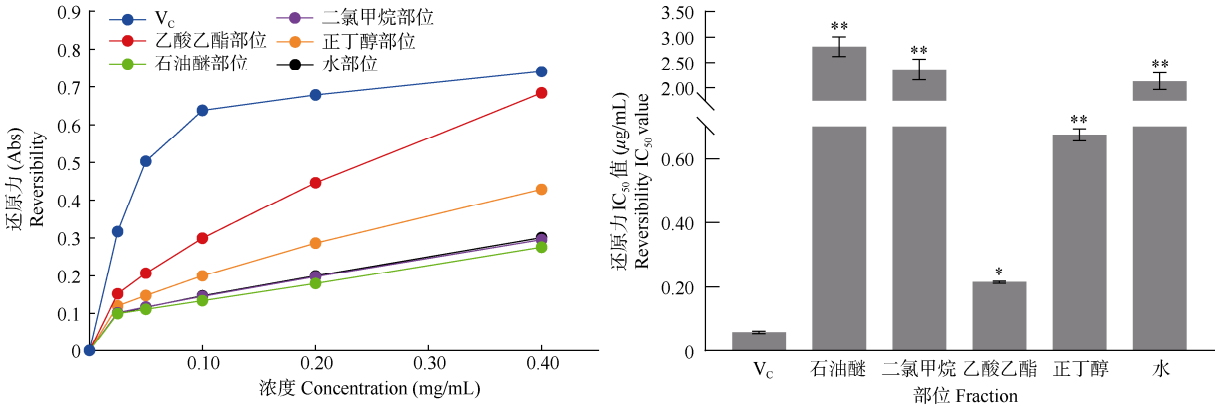

图 5 不同极性部位的 Fe^{3+}还原力

Fig. 5 Fe^{3+} reduction capacity of different polar fractions

表 1 醇提物及其不同极性部位的总酚与总酸含量

Table 1 Total phenol and total acid contents of ethanol extract and its different polar fractions

部位 Fraction	总酚含量 Total phenol content /%	总酸含量 Total acid content (g/kg)
石油醚 Petroleum ether	3.68±0.15^{d}	25.00±3.54^{f}
二氯甲烷 Dichloromethane	11.20±0.61^{b}	130.00±9.35^{e}
乙酸乙酯 Ethyl acetate	14.49±0.45^{a}	835.00±9.35^{a}
正丁醇 Butyl alcohol	6.07±0.12^{c}	632.50±9.35^{b}
水 Water	2.11±0.02^{e}	377.50±3.54^{d}
醇提物 Ethanol extract	10.55±0.47^{b}	570.00±10.61^{c}

同列数据后不同字母表示差异显著(P<0.05)。

Data followed different letters within column indicate significant differences at 0.05 level.

含量的酸类物质，其中，乙酸乙酯部位的总酸含量最高，为 835.00 g/kg。除醇提物和二氯甲烷部位外，其他部位的总酚含量差异显著(P<0.05)，总酚含量依次为乙酸乙酯部位>二氯甲烷部位>醇提物>正丁醇部位>石油醚部位>水部位。

抗氧化活性与总酚和总酸的相关性 由表 2 可知，毛车藤果实醇提物不同极性部位总酸、总酚含量与 5 个抗氧化活性指标之间呈现出良好的线性相关性，总酚含量与还原力 IC_{50} 值存在显著负相关(P<0.05)，总酚含量越高，其对应 IC_{50} 值越低，抗氧化效果越好。此外，总酚含量还与 DPPH 自由基 IC_{50} 值、$ABTS^{+}$自由基 IC_{50} 值、超氧阴离子自由基 IC_{50} 值呈高度线性负相关且极显著(P<0.01)，相关系数分别为–0.695、–0.913、–0.662，总酚含量与各抗

氧化活性指标的 IC_{50} 值相关性依次为 $ABTS^+$自由基>DPPH 自由基>超氧阴离子自由基>还原力>羟基自由基。总酸含量与抗氧化活性相关指标的 IC_{50} 值呈线性负相关，且与 $ABTS^+$自由基、还原力的 IC_{50} 值存在极显著差异(P<0.01)，相关系数分别为–0.620、–0.968，总酸含量与各抗氧化活性指标 IC_{50} 值的相关性依次为还原力>$ABTS^+$自由基>羟基自由基>DPPH 自由基>超氧阴离子自由基。由以上结果可推测毛车藤果实中的总酸与总酚均具有良好的抗氧化活性，且各部位中总酸含量远高于总酚含量，因此酸类物质可能是毛车藤果实醇提物各极性部位起抗氧化作用的主要成分。

2.3 细胞活力测定

采用 MTT 比色法对毛车藤果实醇提物及各极性部位进行 LO_2 细胞活力测定，结果表明(图 6), 与对照组相比，毛车藤果实醇提物及各极性部位在 3.125~200 μg/mL 浓度范围内均不会降低 LO_2 细胞存活率，甚至在 100~200 μg/mL 浓度范围能够显著提高 LO_2 细胞存活率(P<0.01)。因此，毛车藤果实醇提物及各极性部位在 3.125~200 μg/mL 浓度范围内均不具有肝细胞毒性。

2.4 乙酸乙酯部位化学成分分析

采用 UHPLC-QE-MS 对供试品溶液进行分析，得到正、负离子模式下的总离子流图(TIC, 图 7)。为保证数据的可靠性，选择高置信度(level MS2≥0.9)，通过分析准分子离子峰、碎片离子信息，结合标准品以及相关数据库，从毛车藤果实乙酸乙酯部位中共检测出 98 个成分(附录 1)，在正离子模式下从总离子色谱图中提取了 32 个特征，在负离子模式下提取了 66 个特征, 其中氨基酸类 10 个、聚酮类 2 个、莽草酸和苯丙酸类 60 个、生物碱类 6 个、碳水化合物 3 个、萜类 6 个、脂肪酸类 8 个、其他 3 个。说明该活性部位主要含莽草酸和苯丙酸类成分，在总化学成分中相对占比为 62.50% (图 8)。

表 2 毛车藤果实不同极性部位抗氧化活性指标 IC_{50} 值与总酚和总酸含量的皮尔逊相关系数

Table 2 Pearson correlation coefficients between antioxidant activity index IC_{50} value and total phenol and total acid contents in different polar fractions of *Amalocalyx ynnanensis* fruits

项目 Item	DPPH 自由基清除率 DPPH radical scavenging rate	$ABTS^+$自由基清除率 $ABTS^+$ radical scavenging rate	羟基自由基清除率 Hydroxyl radical scavenging rate	超氧阴离子自由基清除率 Superoxide anion radical scavenging rate	还原力 Reduction capacity
总酚含量 Total phenol content	–0.695**	–0.913**	–0.329	–0.662**	–0.546*
总酸含量 Total acid content	–0.177	–0.620**	–0.507	–0.124	–0.968**

*: P<0.05; **: P<0.01

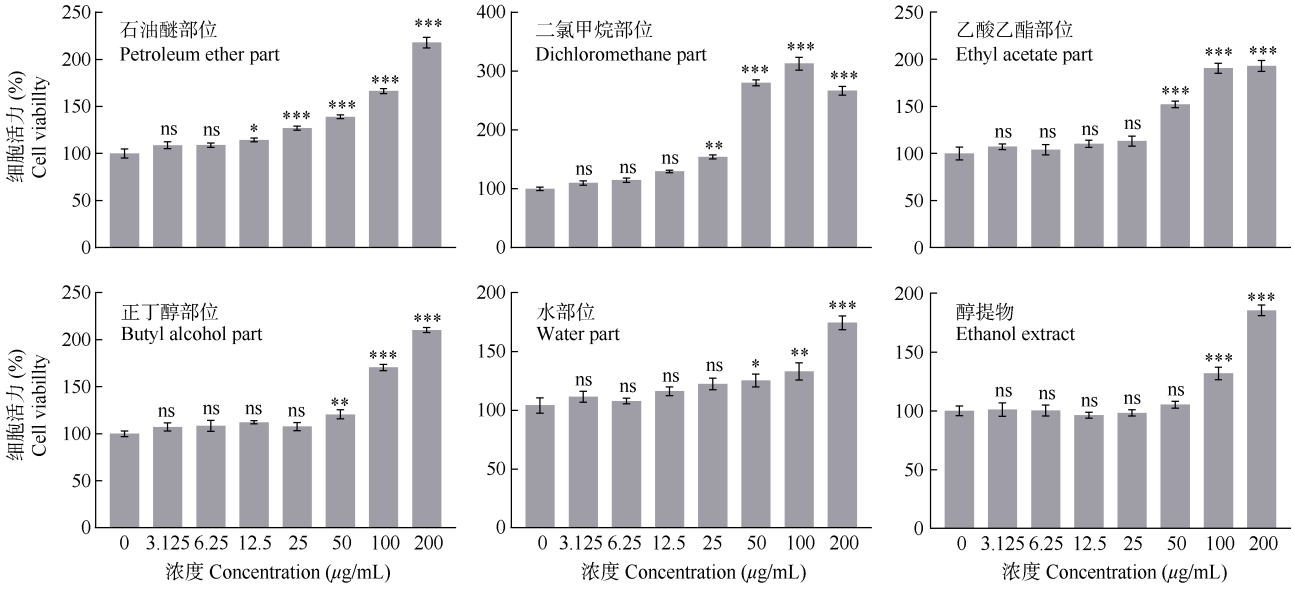

图 6 毛车藤果实醇提物及其不同极性部位对 LO_2 细胞存活率的影响

Fig. 6 Effect of alcoholic extracts and their different polar sites on the viability of LO_2 cells

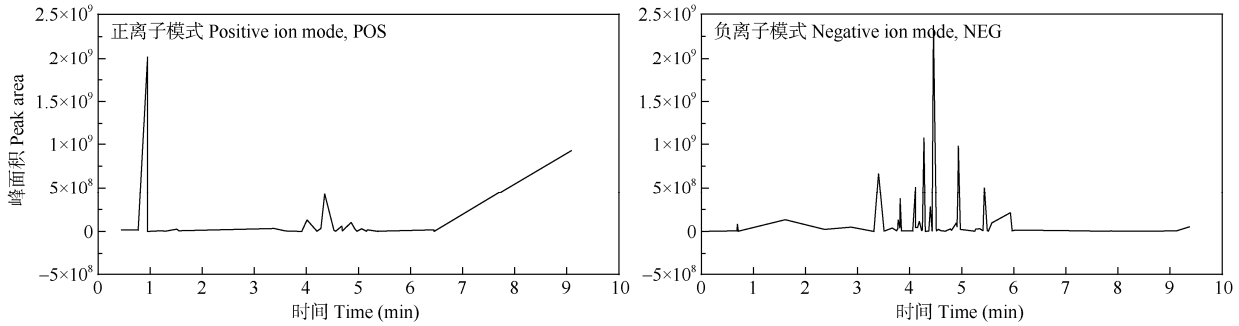

图 7 乙酸乙酯部位在不同离子模式下的总离子流。仅展示二级质谱(MS2)置信度大于 0.9 的离子。

Fig. 7 Total ion current of ethyl acetate fraction under different ion modes. Only ions with a confidence level more than 0.9 in the secondary mass spectrometry (MS2) are displayed.

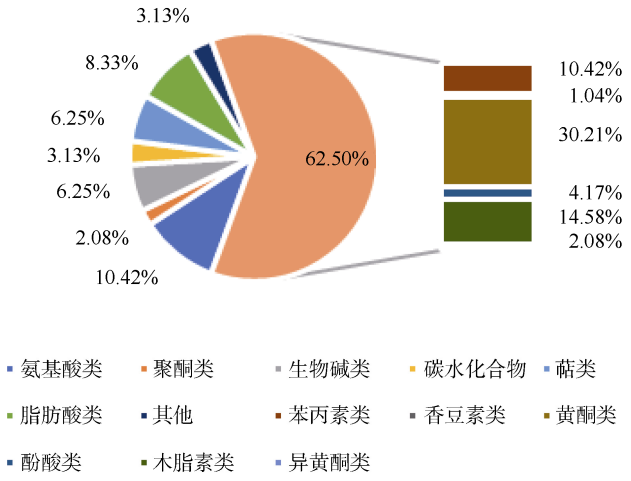

图 8 毛车藤果实乙酸乙酯部位化学成分的相对含量

Fig. 8 Relative contents of chemical compositions in ethyl acetate fraction from *Amalocalyx ynnanensis* fruits

3 讨论和结论

本研究通过采用 DPPH 自由基、$ABTS^+$自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基清除能力和三价铁离子还原力 5 种方法，对毛车藤果实醇提物不同极性萃取部位的抗氧化活性进行了评估。研究结果表明，毛车藤果实醇提物的各极性部位均表现出抗氧化活性，其中乙酸乙酯部位的抗氧化活性最强，并且在一定浓度下，其对 $ABTS^+$自由基和超氧阴离子自由基的清除效果与 Vc 相当。该研究结果与大多数植物提取物不同极性溶剂萃取部位抗氧化活性研究结果类似，即乙酸乙酯部位是抗氧化活性最强部位，如山茱萸(*Cornus oficinalis*)[27]、女贞子(*Ligustrum lucidum*)[28]、香椿(*Toona sinensis*)叶[29]、水柏(*Myricaria gerynanica*)枝[30]、铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)[31]、乌饭树(*Vaccinium bracteatum*)果[32]等。各极性部位总酸、总酚含量与抗氧化活性的相关性分析结果表明，总酚和总酸含量与 DPPH 自由基、$ABTS^+$自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基清除能力以及铁离子还原力之间呈正相关。乙酸乙酯部位的总酸和总酚含量最高，且抗氧化活性最强，其总酸、总酚含量与各项抗氧化指标的皮尔逊系数明显高于其他部位，是毛车藤果实醇提物的最优抗氧化活性部位。朱萱萱等[2]采用溶剂萃取法对金樱(*Rosa cymosa*)根的不同极性部位进行提取，结果表明金樱根乙酸乙酯部位的抗氧化活性与总三萜、总酚、总鞣质和缩合鞣质的皮尔逊系数明显高于其他部位，证实了金樱根发挥抗氧化作用的主要活性部位是乙酸乙酯部位，与本研究结论类似。对鹿角菜(*Pelvetia siliquosa*)[33]和广金钱草(*Desmodium styraci*)[34]醇提物不同极性部位活性成分的研究中也有相似结论。

UHPLC-QE-MS 分析表明毛车藤果实乙酸乙酯部位中含有 62.50%莽草酸和苯丙酸类物质，其中以黄酮类、酚酸类和苯丙素类含量最高，分别为 30.21%、14.58%和 10.42%。大量研究表明，多酚类、有机酸类、多糖类、生物碱类物质是植物中抗氧化的主要成分[35–36]。周文文等[37]通过偏最小二乘回归法分析酸枣仁(*Ziziphi spinosae*)不同极性部位的化学成分含量与抗氧化活性的相关性，得出酸枣仁的活性成分为总皂苷、总黄酮和斯皮诺，正丁醇萃取部位是最佳抗氧化活性部位。邱珊莲等[38]进行了对嘉宝果(*Myrciaria cauliflora*)嫩叶不同极性部位抗氧化活性、总多酚和总黄酮含量的测定，研究表明嘉宝果嫩叶乙酸乙酯和正丁醇部位含有最丰富的总多酚、总黄酮，且展现出最佳抗氧化活性效果。

因此推断黄酮类、酚酸类可能是毛车藤果实的主要抗氧化活性物质。

综上，本研究通过测定毛车藤果实醇提物及其不同极性萃取物的抗氧化活性，结果表明乙酸乙酯部位的抗氧化活性最强，并且总酸、总酚含量与抗氧化活性呈正相关；毛车藤果实乙酸乙酯抗氧化活性部位的主要成分为莽草酸及苯丙酸类，占总化学成分的 62.50%，其中黄酮类和酚酸类物质含量较高，因此推断黄酮类、酚酸类可能是毛车藤果实的主要抗氧化活性物质。MTT 实验表明毛车藤果实醇提物及其各极性部位在 3.125~200 μg/mL 范围内对人肝 LO_2 细胞均无细胞毒性，证实了毛车藤果实的生物安全性，为其作为天然安全的抗氧化剂开发利用提供参考。

参考文献

[1] LI X T, JI Y. Recent advances in mitochondrial oxidative stress and natural antioxidants [J]. Food Sci, 2015, 36(7): 268–277. [李兴太, 纪莹. 线粒体氧化应激与天然抗氧化剂研究进展 [J]. 食品科学, 2015, 36(7): 268–277. doi: 10.7506/spkx1002-6630-201507048.]

[2] ZHU X X, LIU X Q, LIANG Y H, et al. Investigation on *in vitro* antioxidant activity and chemical composition of different polar parts of extract of *Rosa cymosa* roots [J]. Chin J Exp Trad Med Formul, 2021, 27(8): 117–125. [朱萱萱, 刘晓谦, 梁曜华, 等. 金樱根提取物不同极性部位的体外抗氧化活性考察及其化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(8): 117–125. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20202357.]

[3] ARULSELVAN P, FARD M T, TAN W S, et al. Role of antioxidants and natural products in inflammation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 5276130. doi: 10.1155/2016/5276130.

[4] DENG W J, DU H Z, LIU D H, et al. Editorial: The role of natural products in chronic inflammation [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 901538. doi: 10.3389/fphar.2022.901538.

[5] LI S M. Advanxce in study of antioxidant effect from natural plant [J]. J Inner Mongolia Agric Univ, 2005, 26(4): 139–142. [李蜀眉. 天然植物抗氧化作用的研究进展 [J]. 内蒙古农业大学学报, 2005, 26(4): 139–142. doi: 10.3969/j.issn.1009-3575.2005.04.039.]

[6] GODLEWSKA K, PACYGA P, NAJDA A, et al. Investigation of chemical constituents and antioxidant activity of biologically active plant-derived natural products [J]. Molecules, 2023, 28(14): 5572. doi: 10.3390/molecules28145572.

[7] KARAHALIL F Y, BAKIRHAN F, KARA Y. *In vitro* determination of nitric oxide synthase inhibition, antioxidant capacity and phenolic content of various natural products (bee and herbal products) [J]. Chem Biodiv, 2024, 21(5): e202301330. doi: 10.1002/cbdv.202301330.

[8] SAHA S, PAL A, PAUL S. A review on pharmacological, anti-oxidant activities and phytochemical constituents of a novel Lichen *Parmotrema* species [J]. J Biol Act Prod Nat, 2021, 11(3): 190–203. doi: 10.1080/22311866.2021.1916596.

[9] YE Q Y, SONG S Y, QUAN Y J, et al. Study on antioxidation of natural antioxidants in edible oil [J]. Mod Food, 2022, 28(11): 177–180. [叶绮云, 宋思园, 全育集, 等. 天然抗氧化剂在食用油脂中抗氧化作用的研究 [J]. 现代食品, 2022, 28(11): 177–180. doi: 10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2022.11.045.]

[10] YIN C Y, YU J, TANG D Y, et al. Investigation on the medicinal and edible plant resources of Dai nationality in Xishuangbanna [J]. Biotic Resour, 2021, 43(4): 341–356. [尹翠云, 俞静, 唐德英, 等. 西双版纳傣族常用药食两用植物资源调查分析 [J]. 生物资源, 2021, 43(4): 341–356. doi: 10.14188/j.ajsh.2021.04.004.]

[11] LI X. The reseach of the resources of wild fruit plants in Puer District, Yunnan Province [J]. Chin Wild Plant Resour, 2011, 30(3): 26–29. [李秀. 云南普洱市野生果类植物资源研究 [J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(3): 26–29. doi: 10.3969/j.issn.1006-9690.2011.03.008.]

[12] WEI L P, TIAN Y H, LIU Y S, et al. Statistics and analysis of medicinal and edible plant resources under rubber forest in Xishuangbanna [J]. Trop Agric Sci Technol, 2019, 42(4): 21–28. [魏丽萍, 田耀华, 刘永顺, 等 西双版纳橡胶园药食两用野生植物资源调查 [J]. 热带农业科技, 2019, 42(4): 21–28. doi: 10.16005/j.cnki.tast.2019.04.005.]

[13] ZENG T, LIU J, YANG M R, et al. Chemical constituents of *Amalocalyx yunnanesis* and their cytotoxicity [J]. Chem Nat Compd, 2020, 56(1): 127–129.

[14] Ding'an County Health Bureau, Ding'an County Science and Technology Bureau, Hainan District Chronic Bronchitis Control Team. Clinical efficacy observation on 144 cases of chronic bronchitis treated with *Amalocalyx ynnanensis* Tsiang combination [J]. Hainan Health, 1976 (2): 67–68. [定安县卫生局, 定安县科技局, 海南区慢性气管炎防治队. 酸果藤合剂治疗慢性气管炎 144 例临床疗效观察 [J]. 海南卫生, 1976(2): 67–68.]

[15] SHI Y J. Steroidal compounds in *Amalocalyx ynnanensis* Tsiang [J]. Chin Trad Herb Drugs, 1994, 25(3): 133. [史玉俊. 毛车藤中的甾族化合物 [J]. 中草药, 1994, 25(3): 133.]

[16] HU Y J, SHEN X L, MU Q Z, et al. New steroidal constituents from *Amalocalyx yunnanesis* I [J]. Chin Chem Lett, 1991, 2(9): 685–686.

[17] SU L Y, ZHANG T, WU M, et al. Transcriptome and metabolome reveal sugar and organic acid accumulation in *Rosa roxburghii* fruit [J]. Plants (Basel), 2023, 12(17): 3036. doi: 10.3390/plants12173036.

[18] XIE H S, WEI A H, ZOU Y B, et al. Antioxidant activity and *in vitro* hypoglycemic activity of the fruit of *Stauntonia leucantha* [J]. China Pharm, 2023, 32(6): 42–46. [谢华松, 魏爱红, 邹玉冰, 等. 钝药野木瓜果实的抗氧化及体外降血糖活性研究 [J]. 中国药业, 2023, 32(6): 42–46. doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2023.06.011.]

[19] SINGH B, SINGH J P, KAUR A, et al. Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of *Citrus* peel [J]. Food Res Int, 2020, 132: 109114. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109114.

[20] SÁNCHEZ-MORENO C, LARRAURI J A, SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols [J]. J Sci Food Agric, 1998, 76(2): 270–276. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9.

[21] WANG L, LI X Y. Preparation, physicochemical property and *in vitro* antioxidant activity of zinc-*Hohenbuehelia serotina* polysaccharides complex [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 121: 862–869. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.118.

[22] YU J B, HU M Q, WANG Y Y, et al. Extraction, partial characterization and bioactivity of polysaccharides from *Senecio scandens* Buch.-Ham. [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 109: 535–543. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.119.

[23] WANG L Y, GUO H Y, WANG J, et al. Effects of *Herba lophatheri* extract on the physicochemical properties and biological activities of the chitosan film [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 133: 51–57. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.067.

[24] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 21733—2008 Tea beverages [S]. Beijing: Standards Press of China, 2008: 12. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 21733—2008 茶饮料 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 12.]

[25] National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. GB 12456—2021 National standard for food safety Determination of total acid in food [S]. Beijing: Standards Press of China, 2021: 12. [中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. GB 12456—2021 食品安全国家标准 食品中总酸的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2021: 12.]

[26] ZHENG Z Z, CHEN D, LIU S S, et al. Screening and isolation of cytotoxicity *in vitro* from invasive plant *Macfadyena unguis-cati* L. (Bignoniaceae) [J]. J Trop Subtrop Bot, 2016, 24(4): 464–470. [郑志忠, 谌迪, 刘韶松, 等. 入侵植物猫爪藤体外细胞毒活性成分的筛选分离 [J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(4): 464–470. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.04.015.]

[27] ZHANG Y P, DAI Z Y. Antioxidant activity of extracts from *Cornus* [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2009, 24(3): 98–102. [张艳萍, 戴志远. 山茱萸提取物不同极性部位体外抗氧化活性研究 [J]. 中国粮油学报, 2009, 24(3): 98–102.]

[28] YAO W F, CHEN T, ZHANG L, et al. Study on antioxidative activities of different polarity parts in extracts with ethanol from *Ligustrum lucidum in vitro* [J]. Chin J Exp Trad Med Formul, 2011, 17(22): 138–140. [姚卫峰, 陈汀, 张丽, 等. 女贞子醇提物不同极性部位的体外抗氧化活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 138–140. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.2011.22.043.]

[29] ZHANG J F, WANG D M, ZHOU L, et al. Studies on antioxidative activities *in vitro* of different polarity fractions of extract from *Toona sinensis* leaves [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2007, 7(5): 12–17. [张京芳, 王冬梅, 周丽, 等. 香椿叶提取物不同极性部位体外抗氧化活性研究 [J]. 中国食品学报, 2007, 7(5): 12–17. doi: 10.3969/j.issn.1009-7848.2007.05.003.]

[30] LI F L, AJIA E B, LI J D, et al. Study on the antioxidant activity in vitro of different polar parts of ethanol extract of *Myricaria gerynanica* (L.) Desv. [J]. J Sichuan Agric Univ, 2021, 39(4): 512–517. [李芳龙, 阿呷尔布, 李家东, 等. 水柏枝乙醇提取物不同极性部位体外抗氧化活性研究 [J]. 四川农业大学学报, 2021, 39(4): 512–517. doi: 10.16036/j.issn.1000-2650.2021.04.012.]

[31] XIE Q F, XIE L L F, GONG X H, et al. Antioxidant activity of different extraction parts of Huoshan *Dendrobium officinale* [J]. Food Sci Technol, 2018, 43(9): 275–278. [谢庆芬, 谢鲁灵枫, 贡小辉, 等. 霍山铁皮石斛提取物不同极性部位抗氧化活性研究 [J]. 食品科技, 2018, 43(9): 275–278. doi: 10.13684/j.cnki.spkj.2018.09.047.]

[32] KANG B B, LIU L Y, GUO X Y, et al. Study on the *in vitro* antioxidant activity of different polarity fractions of ethanol extract obtained from *Vaccinium bracteatum* Thunb. fruits [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(10): 3124–3129. [康彬彬, 刘龙燕, 郭溪远, 等. 乌饭树果乙醇提取物不同极性分部的体外抗氧化活性研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(10): 3124–3129. doi: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2020.10.011.]

[33] JIN S Y, LI L Y, SONG X F, et al. Analysis of active components in different polar parts of *Pelvetia siliquosa* ethanol extract and their antioxidant activity *in vitro* [J]. China Food Addit, 2023, 34(11): 78–84. [金苏宇, 李乐瑶, 宋晓凡, 等. 鹿角菜醇提物不同极性部位活性成分及其体外抗氧化活性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(11): 78–84. doi: 10.19804/j.issn1006-2513.2023.11.011.]

[34] LIU T, LIU P P, HU S D, et al. Research on the antioxidant and antibacterial activity in different polar fraction of ethanol extracts from *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. [J]. Farm Prod Process, 2023(15): 19–23. [刘婷, 刘平平, 胡深德, 等. 广金钱草乙醇提取物

不同极性部位抗氧化抗菌活性研究 [J]. 农产品加工, 2023(15): 19–23. doi: 10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2023.08.005.]

[35] LU Y, XU X Q. Research progress of antioxidant active components in plants [J]. J Wuzhou Univ, 2017, 27(6): 11–16. [陆嫣, 徐星强. 植物抗氧化活性成分研究进展 [J]. 梧州学院学报, 2017, 27(6): 11–16.]

[36] NIU H R, JIANG L, DING Y Y, et al. The research progress of extraction technology of antioxidant active components in fruit shell [J]. J Wuhan Polytech Univ, 2022, 41(5): 15–20. [牛好荣, 蒋柳, 丁钰莹, 等. 果壳中抗氧化活性成分的提取技术研究进展 [J]. 武汉轻工大学学报, 2022, 41(5): 15–20. doi: 10.3969/j.issn.2095-7386.2022.05.003.]

[37] ZHOU W W, LIU H, XU Z J, et al. Content and antioxidant activity of components in different polar parts of semen *Ziziphi spinosae* and their correlation analysis [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(16): 288–296. [周文文, 刘晖, 徐志佳, 等. 酸枣仁不同极性部位成分含量与抗氧化活性及其相关性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(16): 288–296. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090054.]

[38] QIU S L, LIN B M, ZHANG S P, et al. Antioxidant and *α*-glucosidase inhibitory activities of different polarity fractions of the extracts of the young leaves of *Myrciaria cauliflora* [J]. Chin J Trop Crops, 2019, 40(7): 1373–1378. [邱珊莲, 林宝妹, 张少平, 等. 嘉宝果嫩叶提取物不同极性部位抗氧化及抑制 *α*-葡萄糖苷酶活性研究 [J]. 热带作物学报, 2019, 40(7): 1373–1378. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2019.07.018.]

附录 1 乙酸乙酯部位中化学成分的 UHPLC-QE-MS 鉴定

http://jtsb.ijournals.cn/ajax/common/download_attache_file.aspx?seq_id=20241015184944002&file_no