

# 民族药野棉花提取物的体外抗氧化活性研究

张振男<sup>1,2</sup> 张昆<sup>1,2</sup> 李茹<sup>1,2</sup> 王寒蕾<sup>1,2</sup> 赵霞<sup>1</sup> 陈雪林<sup>1</sup> 张玉梅<sup>1,2\*</sup>

1. 中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650223;

2. 中国科学院大学, 北京 100049

**【摘要】** 目的: 评估野棉花的体外抗氧化活性并探究其物质基础。方法: 通过总黄酮及总多酚含量实验、总抗氧化活性实验 (FRAP 法、ABTS 法及 DPPH 法) 对野棉花各粗分部位的体外抗氧化活性进行初步评估, 进一步结合氧化损伤实验 (DNA、蛋白质) 对其抗氧化作用进行确证; 再通过 UPLC-MS 分析优选活性部位的主要成分并结合文献挖掘其活性成分。结果: 乙酸乙酯部位 (AV-EAF) 具有最高的总黄酮及总多酚含量 [(137.73 ± 1.06) mg/g 和 (104.66 ± 0.93) mg/g], 同时表现出最强的抗氧化活性; 与其它部位相比其具有较优的  $\text{Fe}^{3+}$  还原能力 (1588.09 ± 61.61)  $\mu\text{mol Trolox/g}$ 、ABTS 自由基清除能力 (2005.56 ± 15.06)  $\mu\text{mol Trolox/g}$  及 DPPH 自由基清除能力 [ $\text{EC}_{50} = (168.80 \pm 8.40) \mu\text{g/mL}$ ]; 进一步研究结果显示, 与模型组对比, AV-EAF 能显著减轻 AAPH 诱导的 DNA 及蛋白质氧化损伤的程度 ( $P < 0.001$ )。UPLC-MS 分析结果显示, AV-EAF 中共有 57 个主要成分, 包括三萜类、甾体类、生物碱、酚类、黄酮类等化合物, 其中 isoquercitrin 等成分已被报道具有抗氧化活性。结论: 野棉花具有较好的体外抗氧化活性, 具有开发为天然抗氧化剂的潜力; 其中活性最强的部位为 AV-EAF, 其发挥活性的物质基础为三萜类、酚类、黄酮类化合物等。

**【关键词】** 野棉花; UPLC-MS; 抗氧化活性; DNA; 蛋白质

**【中图分类号】** R284.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1007-8517 (2025) 02-0036-09

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8517.2025.02.zgmzmjyyzz202502009

## Study on the in vitro Antioxidant Activity of Extracts from Ethnomedicine *Anemone vitifolia*

ZHANG Zhennan<sup>1,2</sup> ZHANG Kun<sup>1,2</sup> LI Ru<sup>1,2</sup> WANG Hanlei<sup>1,2</sup> ZHAO Xia<sup>1</sup> CHEN Xuelin<sup>1</sup> ZHANG Yumei<sup>1,2\*</sup>

1. CAS Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna

Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** **Objective** To evaluate the antioxidant activity in vitro of *Anemone vitifolia* and explore its material basis. **Methods** The in vitro antioxidant activity of crude fractions of *Anemone vitifolia* was initially evaluated through total flavonoid and total phenolic content experiments and total antioxidant activity experiments (FRAP method, ABTS method, and DPPH method). Oxidative damage experiments (DNA, protein) were further combined to confirm its antioxidant effect. Then, the main components of the preferred active fraction were analyzed by UPLC-MS and combined with literature to explore its active components. **Results** The ethyl acetate fraction of *Anemone vitifolia* (AV-EAF) had the highest total flavonoid and total phenolic content [(137.73 ± 1.06) mg/g and (104.66 ± 0.93) mg/g], respectively, and showed the strongest antioxidant activity. Compared with other fractions, it had superior  $\text{Fe}^{3+}$  reducing ability (1588.09 ± 61.61)  $\mu\text{mol Trolox/g}$ , ABTS radical scavenging ability (2005.56 ± 15.06)  $\mu\text{mol Trolox/g}$ , and DPPH radical scavenging ability [ $\text{EC}_{50} = (168.80 \pm 8.40) \mu\text{g/mL}$ ]. Further research showed that compared with the model group, AV-EAF significantly reduced the degree of oxidative damage to DNA and protein induced by AAPH ( $P < 0.001$ ). UPLC-MS analysis showed that there were 57 main components in AV-EAF, including triterpenoids, sterols, alkaloids, phenolic compounds, etc. Among them, isoquercitrin and other components have been reported to have antioxidant activity. **Conclusion** *Anemone vitifolia* showed good in vitro antioxidant activity and had the potential to be developed as a natural antioxidant. The crude fraction with the strongest activity was AV-EAF, and the material basis for its activity were triterpenoids, phenols, flavonoids, and other compounds.

**Key words:** *Anemone vitifolia*; UPLC-MS; Antioxidant Activity; DNA; Protein

基金项目: 云南省重大科技专项 (202102AA100014)。

作者简介: 张振男 (1999—), 男, 汉族, 硕士, 研究方向为天然创新药物研发。E-mail: 15101406910@163.com

通信作者: 张玉梅 (1973—), 女, 汉族, 博士, 研究员, 研究方向为天然创新药物研发。E-mail: zymei@xthbg.ac.cn

氧化应激 (oxidation stress, OS), 是指在一定条件下体内氧化还原作用失衡, 活性自由基过度积累, 从而损伤机体的病理状态<sup>[1]</sup>。氧化应激会通过损伤 DNA、蛋白质等关键生物分子, 诱发细胞、组织及器官的损伤和病理反应, 甚至引发一系列并发症<sup>[2]</sup>。近年来, 氧化应激在医学领域的关注度持续攀升, 抗氧化剂也已成为医药研发领域的新兴热点。由于合成抗氧化剂存在潜在的毒副作用, 从传统中草药中得到的高效、低毒、结构新颖的天然抗氧化剂更受青睐<sup>[3]</sup>。

野棉花 (*Anemone vitifolia* Buch. – Ham.), 是毛茛科银莲花属植物, 其药用部位主要为干燥全草<sup>[4]</sup>, 味苦, 性寒, 有小毒, 有清热解毒、散瘀止痛之功效, 主要用于痈疽肿毒、跌打损伤等病症<sup>[5]</sup>。野棉花主要分布于我国云南、四川等地, 是白族、彝族等民族的传统用药。近年来有关野棉花的化学成分研究结果显示, 其富含三萜、有机酸、多酚、黄酮等成分<sup>[6–7]</sup>; 现代药理活性研究<sup>[8]</sup>结果显示, 其提取物具有消炎镇痛、抗病毒、抗肿瘤等作用。但截至目前未见对野棉花抗氧化活性的报道。课题组在前期活性筛选中发现野棉花醇提物具有较好的抗氧化活性, 因此本研究拟在前期研究的基础上评价野棉花各粗分部位的抗氧化活性, 并结合 UPLC – MS 分析其物质基础, 为野棉花的进一步开发利用奠定了科学基础。

## 1 材料与仪器

1.1 实验材料 野棉花干燥全草于 2022 年 7 月采自昆明, 由张玉梅研究员鉴定为毛茛科银莲花属植物野棉花 (*Anemone vitifolia* Buch. – Ham.), 植物标本保存于中国科学院西双版纳热带植物园创新药物研究组 (标本号: 2022002)。

1.2 实验仪器 1/100000 电子天平 (德国 Sartorius 公司), 1290uplc 型超高效液相色谱仪及 qt-of6550 型质谱仪 (美国 Agilent 公司), 全波长酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司), 垂直凝胶电泳系统 (美国 BIO – RAD 公司), 荧光化学发光凝胶成像系统 (中国森西赛智科技)。

1.3 实验药物及试剂 芦丁 (货号 H2124409, 上海阿拉丁公司), 没食子酸 (货号 C12504579, 上海麦克林公司), DPPH (货号 4240GR005, 德国 Bio-FROXX 公司), 抗坏血酸 (货号 A8100, 北京索莱宝公司), 牛血清蛋白 (货号 4240GR005, 德国 Bio-FROXX 公司), 总抗氧化能力 (FRAP 法) 测试盒、

总抗氧化能力 (ABTS 法) 测试盒 (苏州科铭公司), pBR322 DNA (货号 3050, 北京宝日医公司)。

## 2 方法

2.1 野棉花各粗分部位制备 乙醇提取物的制备: 取野棉花干燥全草, 粉碎后精密称取 28.00 g, 使用 500 mL 90% 乙醇浸泡 3 次, 每次 1 h, 合并提取液并过滤, 减压浓缩后得到野棉花醇提物 (AV – EF), 使用 DMSO 配制成浓度为 40 mg/mL 的母液储存, 临用前按需用 PBS (0.1 M) 溶剂稀释至所需浓度。

其它粗分部位的制备: 使用 300 mL 纯水将 AV – EF 充分混悬, 依次用 300 mL 石油醚、乙酸乙酯、正丁醇溶液, 各进行 3~5 次萃取, 分别合并萃取液并减压浓缩, 得到石油醚部位 (AV – PEF)、乙酸乙酯部位 (AV – EAF)、正丁醇部位 (AV – NBF) 及水部位 (AV – WF), 野棉花各粗分部位的配制及使用方法同上。

## 2.2 总黄酮及总多酚含量实验

2.2.1 方法学考察 本研究中所采用的方法学考察方法均参考胡宏凯等<sup>[9]</sup>并进行一定修改, 考察内容包括专属性试验、标准曲线的绘制、精密度试验、稳定性试验、重现性试验及加样回收率试验。

2.2.2 总黄酮含量的测定 实验方法参考 Banothua V 等<sup>[10]</sup>并根据实验情况修改, 通过比色法测定样品的总黄酮含量并以芦丁当量 (mg/g) 表示。首先使用 60% 乙醇溶液配制样品溶液 (40 mg/mL), 取 20  $\mu$ L 样品溶液加入 60  $\mu$ L 亚硝酸钠溶液 (5%, w/v), 混匀后室温下反应 6 min; 然后加入 60  $\mu$ L 硝酸铝溶液 (10%, w/v), 室温下反应 5 min; 最后加入 400  $\mu$ L NaOH 溶液 (1 M) 继续反应 20 min, 反应结束后测定样品孔在 510 nm 处的吸光度。

2.2.3 总多酚含量的测定 实验方法参考 Zhang K 等<sup>[11]</sup>并根据实验情况修改, 通过比色法测定样品的总多酚含量并以没食子酸当量 (mg/g) 表示。取 20  $\mu$ L 样品溶液 (40 mg/mL) 与 500  $\mu$ L 福林酚试剂 (1 M), 混匀后室温下反应 4 min; 然后加入 400  $\mu$ L 碳酸钠溶液 (500 mM) 继续反应 60 min。反应结束后测定样品孔在 760 nm 处的吸光度。

## 2.3 总抗氧化活性实验

2.3.1 FRAP 法 实验根据 FRAP 试剂盒说明书进行, 总抗氧化活性以活性当量 (即每克样品的自由基清除能力相当于 Trolox 的自由基清除能力的  $\mu$ mol 数) 表示。取 10  $\mu$ L 样品溶液 (400  $\mu$ g/mL)

加入 190  $\mu\text{L}$  FRAP 工作试剂，混匀后室温下孵育 20 min，孵育结束后测定样品孔在 593 nm 处的吸光度，其中空白对照组用等体积的 DMSO 代替样品，活性当量根据式（1）计算。

$$\text{活性当量} (\mu\text{mol Trolox/g}) = 2013.5 \times (O_{\text{样品}} - O_{\text{空白}} - 0.0134) \quad (1)$$

其中， $O_{\text{样品}}$  为样品组的吸光度， $O_{\text{空白}}$  为空白组的吸光度。

2.3.2 ABTS 法 实验根据 ABTS 试剂盒说明书进行，总抗氧化活性以活性当量表示。取 10  $\mu\text{L}$  样品溶液（400  $\mu\text{g/mL}$ ）加入 190  $\mu\text{L}$  ABTS 工作试剂，混匀后室温下孵育 5 min；孵育结束后测定样品孔在 734 nm 处的吸光度，其中空白对照组用等体积的 DMSO 代替样品，活性当量根据式（2）计算。

$$\text{活性当量} (\mu\text{mol Trolox/g}) = 3560 \times (O_{\text{空白}} - O_{\text{样品}} + 0.0012) \quad (2)$$

其中， $O_{\text{样品}}$  为样品组的吸光度， $O_{\text{空白}}$  为空白组的吸光度。

2.3.3 DPPH 法 实验方法参考刘琳等<sup>[12]</sup>进行，总抗氧化活性以清除率及  $\text{EC}_{50}$  值表示。首先，取 20  $\mu\text{L}$  不同浓度的样品溶液（终浓度分别为 6.25  $\mu\text{g/mL}$ 、12.5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ 、200  $\mu\text{g/mL}$ 、400  $\mu\text{g/mL}$ ）加入 180  $\mu\text{L}$  DPPH 溶液（0.1 mM），混匀后室温下避光孵育 30 min；孵育结束后测定样品孔在 517 nm 处的吸光度。其中，空白对照组用等体积 DMSO 代替样品，等体积 PBS 代替 DPPH 自由基溶液；阴性对照组采用等体积 DMSO 替代样品；样品对照组用等体积 PBS 替代 DPPH 自由基溶液；阳性对照组以等体积 VC 溶液（终浓度分别为 2.5  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、40  $\mu\text{g/mL}$ 、80  $\mu\text{g/mL}$ 、160  $\mu\text{g/mL}$ ）代替样品溶液。清除率根据式（3）计算。

$$\text{清除率} (\%) = [1 - (O_{\text{样品}} - O_{\text{样品对照}}) / (O_{\text{阴性}} - O_{\text{空白}})] \times 100\% \quad (3)$$

其中  $O_{\text{样品}}$  代表样品组的吸光度， $O_{\text{阴性}}$  代表样品对照组的吸光度， $O_{\text{空白}}$  代表阴性对照组的吸光度， $O_{\text{样品对照}}$  代表空白对照组的吸光度。

## 2.4 氧化损伤实验

2.4.1 DNA 氧化损伤实验 实验方法参考 Lin Z 等<sup>[13]</sup>的方法进行。首先，取 8  $\mu\text{L}$  pBR322 DNA 溶液（50  $\mu\text{g/mL}$ ）与 12  $\mu\text{L}$  不同浓度的样品溶液（终浓度分别为 5  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、30  $\mu\text{g/mL}$ 、40  $\mu\text{g/mL}$ ）混匀后 37 °C 下反应 30 min；其次，加入 5  $\mu\text{L}$  AAPH 溶液（50 mM），混匀后避

光继续反应 60 min；然后，将预处理后的样品与 5  $\times$  DNA 上样缓冲液混合，取 8  $\mu\text{L}$  混合物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 25 min，电泳后用溴化乙锭溶液（0.1%，w/v）染色 20 min；最后，在 DNA 凝胶成像系统下拍摄图像，利用 Image J 软件分析条带灰度值。其中空白对照组用等体积 PBS 代替 AAPH 溶液，阳性对照组用 VC 溶液（终浓度分别为 1.875  $\mu\text{g/mL}$ 、3.75  $\mu\text{g/mL}$ 、7.5  $\mu\text{g/mL}$ 、11.25  $\mu\text{g/mL}$ 、22.5  $\mu\text{g/mL}$ ）代替样品溶液。

2.4.2 蛋白质氧化损伤实验 实验方法参考 Yang S 等<sup>[14]</sup>的方法。首先，取 20  $\mu\text{L}$  BSA（1 mg/mL）溶液加入 40  $\mu\text{L}$  不同浓度的样品溶液（终浓度分别为 12.5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ 、200  $\mu\text{g/mL}$ ），混匀后 37 °C 下孵育 30 min；其次，加入 32  $\mu\text{L}$  AAPH 溶液（150 mM）反应 4 h；然后，将预处理后的样品与 5  $\times$  SDS 上样缓冲液混合，95 °C 水中变性 15 min，取 12  $\mu\text{L}$  混合物进行 10% SDS-PAGE 电泳 90 min（30 min 120 V，60 min 90 V）；电泳后，用考马斯亮蓝 R-250 染料（0.25%，w/v）染色凝胶，用脱色液对凝胶进行脱色；最后，在 SDS-PAGE 凝胶成像系统下拍摄图像，并使用 Image J 软件分析条带灰度值。其中空白对照组用等体积 PBS 代替 AAPH 溶液，阳性对照组以等体积 VC 溶液（终浓度分别为 6.25  $\mu\text{g/mL}$ 、12.5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ ）代替样品溶液。

2.5 UPLC-MS 分析 综合总黄酮及总多酚含量实验和总抗氧化活性实验中各粗分部位的抗氧化活性表现，优选活性最强的部位进行 UPLC-MS 分析，分析条件如下：

2.5.1 色谱条件 色谱柱：Waters BEH C<sub>18</sub> 柱（2.1 mm  $\times$  100 mm，1.7  $\mu\text{m}$ ）；柱温：35 °C；流动相：0.1% 甲酸水溶液（A）-甲醇溶液（B）梯度洗脱；梯度洗脱程序：0 ~ 1 min，60% B，1 ~ 60 min，60% ~ 100% B；分析时间：0 ~ 60 min；流速：0.3 mL/min；进样量：5  $\mu\text{L}$ 。

2.5.2 质谱条件 ESI 离子源，离子源温度：350 °C；正离子模式下：电离源电压 4000 V，毛细管电压 35 V，管透镜电压 110 V；负离子模式下：电离源电压 -3200 V，毛细管电压 -35 V，管透镜电压 -110 V；碰撞电压：6 ~ 10 V；气体体积流量 12 L/min。样品一级质谱图谱采用全扫描（质量扫描范围  $m/z$  为 50 ~ 1500）。

2.6 统计学方法 本研究均进行 3 次以上的独立

重复实验, 结果数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 运用 GraphPad 10 软件进行单因素方差分析处理, 组间差异采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

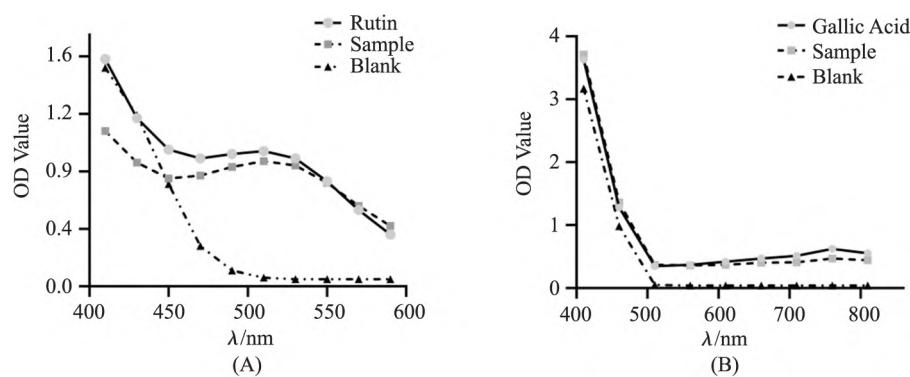
#### 3.1 总黄酮及总酚含量

##### 3.1.1 方法学考察

3.1.1.1 总黄酮含量测定实验方法学考察 专属性试验结果显示, 芦丁对照品溶液和样品溶液经显色后的吸收特征峰都在 510 nm 处 (如图 1 A 所示), 空白对照对检测无干扰, 因此选择 510 nm 为检测波长; 线性拟合得芦丁的标准曲线为  $y = 0.1730x + 0.0359$ ,  $R^2 = 0.9935$  (如图 2 A 所示), 线性范围为 0.078 ~ 5 mg/mL; 精密度试验结果显示同一份芦丁对照品溶液平行测定 6 次吸光度的 RSD 值为 0.12% ( $n = 6$ ); 稳定性试验结果显示芦丁对照品溶液和样品溶液在 0 min、20 min、40 min、60 min、80 min、100 min、120 min 内测定吸光度的 RSD 值分别为 1.73% 和 1.30% ( $n = 6$ ); 重现性试验结果显示分别配制的 6 份样品溶液吸光度的 RSD 值为 1.58% ( $n = 6$ ); 加样回收率试验结果显示, 平均加样回收率为  $(102.03 \pm 1.92)\%$ , RSD 值为 1.89%。

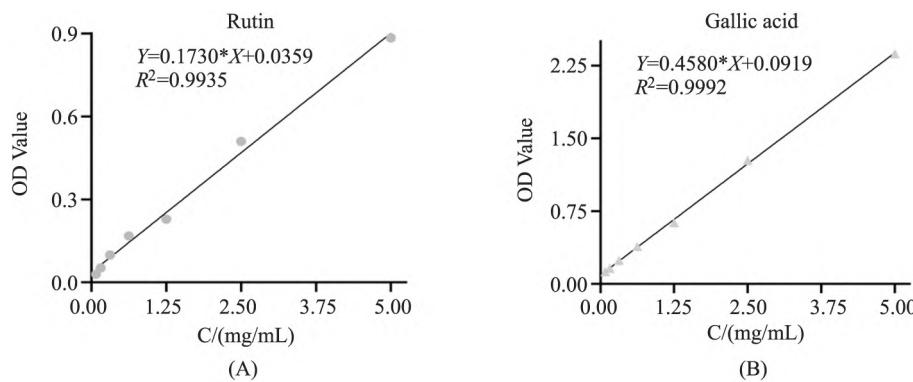
3.1.1.2 总多酚含量测定实验方法学考察 专属性试验结果显示, 没食子酸对照品溶液和样品溶液经显色后的吸收特征峰都在 760 nm 处 (如图 1 B 所示), 空白对照对检测无干扰, 因此选择 760 nm 为检测波长; 线性拟合得没食子酸的标准曲线为  $y = 0.4580x + 0.0919$ ,  $R^2 = 0.9992$  (如图 2 B 所示), 线性范围为 0.078 ~ 5 mg/mL; 精密度试验结果显示同一份没食子酸对照品溶液平行检测 6 次吸光度的 RSD 值为 0.23% ( $n = 6$ ); 稳定性试验结果显示没食子酸对照品溶液和样品溶液在 0 min、20 min、40 min、60 min、80 min、100 min、120 min 内检测吸光度的 RSD 值分别为 1.69% 和 1.19% ( $n = 6$ ); 重现性试验结果显示分别配制的 6 份样品溶液吸光度的 RSD 值为 1.57% ( $n = 6$ ); 加样回收率试验结果显示, 平均加样回收率为  $(102.57 \pm 1.84)\%$ , RSD 值为 1.79%。

通过方法学考察实验确定了黄酮和总酚含量实验的检测波长, 线性拟合得到芦丁和没食子酸的标准曲线及其线性范围, 实验结果表明两种含量测定方法均具有良好的精密度、稳定性、重现性及准确度。



A: 芦丁、样品及空白对照的吸收曲线; B: 没食子酸、样品及空白对照的吸收曲线

图 1 对照品、样品及空白对照的吸收曲线图



A: 芦丁; B: 没食子酸  
图 2 对照品的标准曲线图

### 3.1.2 野棉花各粗分部位的总黄酮及总酚含量

实验结果见表 1, 结果显示 AV-EAF 的总黄酮及总酚含量都较高, 芦丁当量和没食子酸当量分别为 (137.73 ± 1.06) mg/g 和 (104.66 ± 0.93) mg/g, 表明其可能具有较好的抗氧化活性。

表 1 野棉花各粗分部位的总黄酮及总酚含量 ( $\bar{x} \pm s$ )

部位	总黄酮含量/mg/g	总酚含量/mg/g
AV-EF	61.94 ± 1.63	31.87 ± 0.17
AV-PEF	3.95 ± 2.00	13.00 ± 0.78
AV-EAF	137.73 ± 1.06	104.66 ± 0.93
AV-NBF	42.05 ± 1.98	13.12 ± 0.32
AV-WF	54.45 ± 1.06	15.71 ± 1.67

3.2 AV-EAF 的总抗氧化活性 在 ABTS 自由基清除实验和 FRAP 铁离子还原实验中, 样品总抗氧化活性强弱与活性当量大小呈正相关。由实验结果 (表 2) 可知, AV-EAF 还原铁离子及清除 ABTS 自由基的能力明显高于其它粗分部位, 活性当量分别为 (1588.09 ± 61.61)  $\mu\text{mol Trolox/g}$

和 (2005.56 ± 15.06)  $\mu\text{mol Trolox/g}$ 。

在 DPPH 自由基清除实验中, 样品的抗氧化活性的强弱与  $\text{EC}_{50}$  值的大小呈负相关。由实验结果 (如图 3) 可得, AV-NBF 具有最强的 DPPH 自由基清除能力 [ $\text{EC}_{50} = (28.1 \pm 2.01) \mu\text{g/mL}$ ], 高于野棉花其它粗分部位及阳性对照组; AV-EF 与 AV-EAF 也都具有较强的清除 DPPH 自由基的能力 ( $\text{EC}_{50}$  值处于 100 ~ 200  $\mu\text{g/mL}$  之间), 而 AV-WF 则无显著的 DPPH 自由基清除能力 ( $\text{EC}_{50}$  值大于 200  $\mu\text{g/mL}$ )。

表 2 野棉花各粗分部位的总抗氧化能力 ( $\bar{x} \pm s$ )

部位	FRAP	ABTS
	/ $\mu\text{mol Trolox/g}$	/ $\mu\text{mol Trolox/g}$
AV-EF	435.56 ± 13.84	897.71 ± 39.28
AV-PEF	160.68 ± 12.23	273.64 ± 19.73
AV-EAF	1588.09 ± 61.61	2005.56 ± 15.06
AV-NBF	154.91 ± 9.11	299.75 ± 28.41
AV-WF	613.98 ± 34.88	697.88 ± 15.57

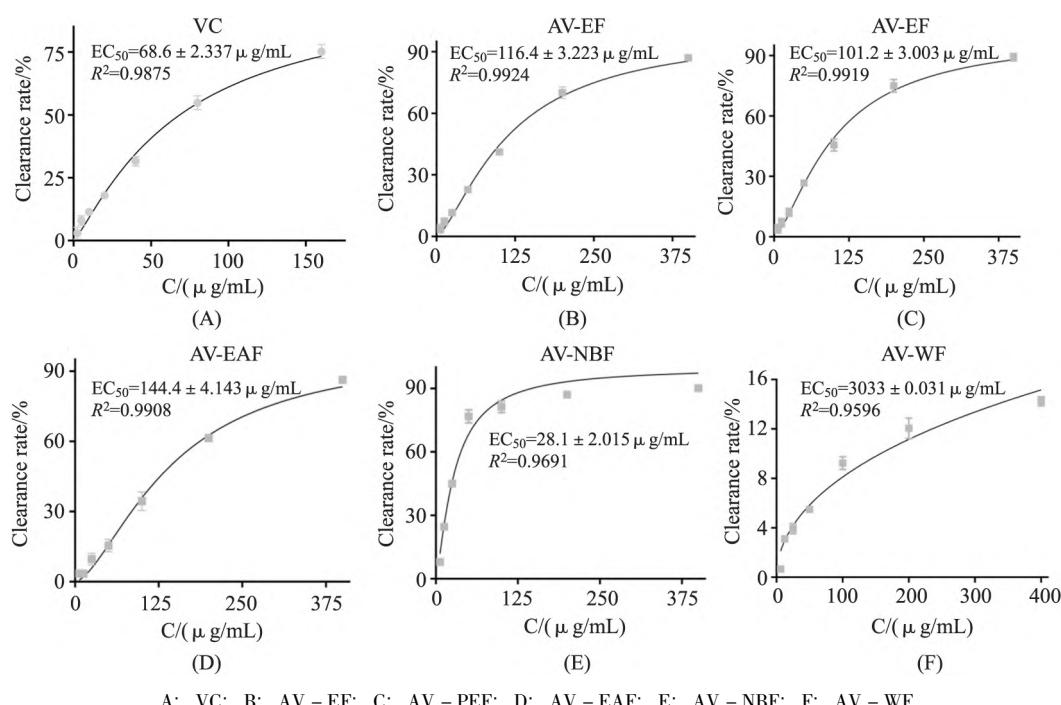


图 3 野棉花各粗分部位清除 DPPH 自由基的清除曲线图

### 3.2 氧化损伤实验

3.2.1 DNA 氧化损伤实验 样品的抗氧化能力强弱与超螺旋 DNA 含量高低呈正相关。实验结果 (如图 4) 显示, 未经 AAPH 处理的空白组 DNA 形态全部为超螺旋状, 而经 AAPH 诱导损伤后的模型组, 超螺旋 DNA 几乎全部转化为线状和开环的 DNA; 与模型组对比, 经 10  $\mu\text{g/mL}$  及以上浓度的

AV-EAF 处理后的 DNA 氧化损伤程度显著减轻 ( $P < 0.0001$ ), 在 20  $\mu\text{g/mL}$  浓度下几乎保护了全部 DNA, AV-EAF 对 DNA 的保护作用 (即抵抗氧化应激的能力) 与阳性对照组 (VC) 相当, 并明显高于 AV-EF 组及其余粗分部位, 提示 AV-EAF 可能是 AV-EF 发挥 DNA 保护作用的主要部位。

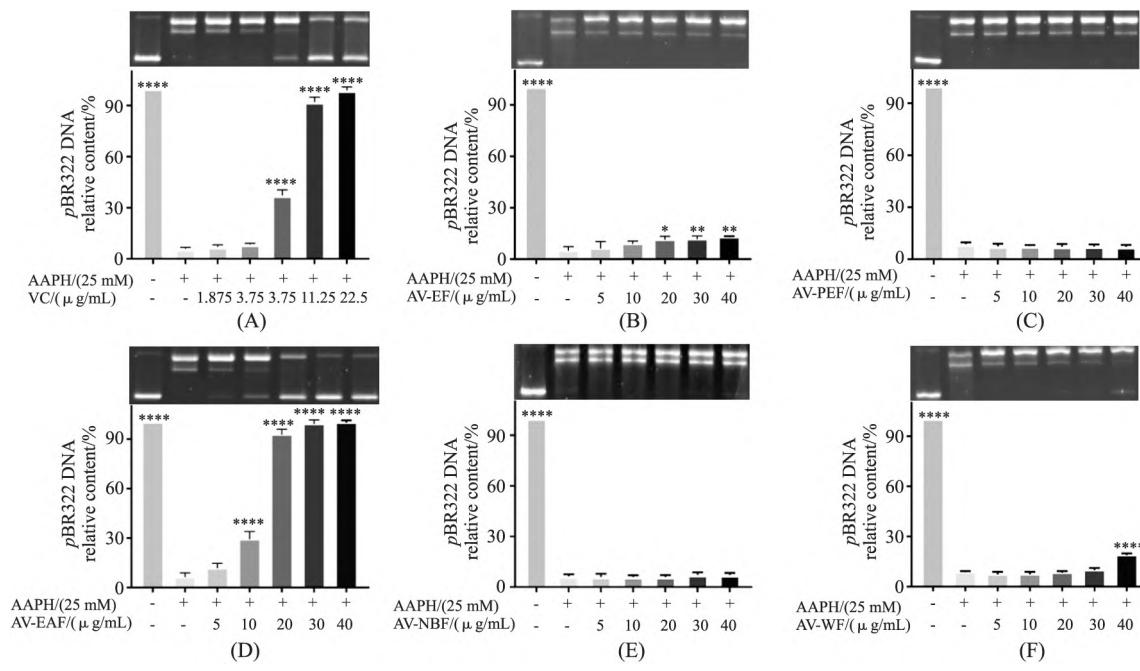


图 4 野棉花各粗分部位在氧化损伤实验中减轻 DNA 损伤的能力图

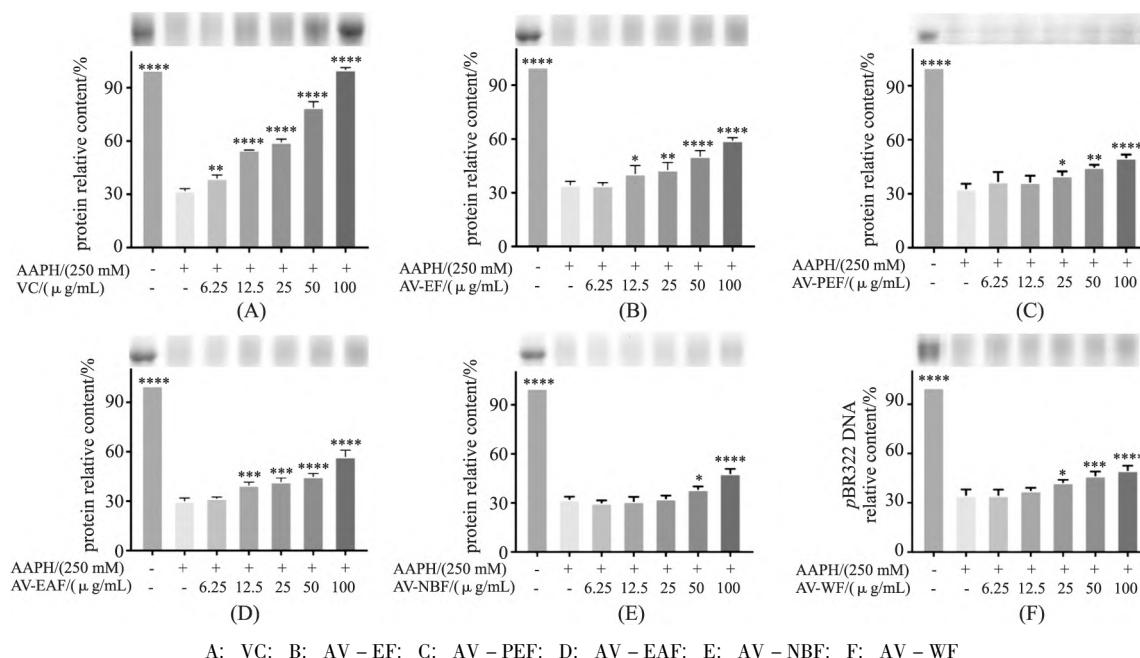


图 5 野棉花各粗分部位在氧化损伤实验中减轻蛋白损伤的能力图

3.2.2 蛋白质氧化损伤实验 样品的抗氧化能力强弱与蛋白质含量高低呈正相关。实验结果显示, 经 AAPH 诱导损伤后的模型组蛋白质含量下降至空白对照组含量的 30% 左右; 与模型组相比, 经 25~200 μg/mL 的 AV-EAF 干预后蛋白质含量显著升高 (P < 0.001), 且具有明显的量效关系; 100~200 μg/mL 的 AV-EF 和 AV-WF 干预后蛋

白质含量也显著提升, 与模型组相比差异具有统计学意义 (P < 0.001); 此外, 其余粗分部位也能一定程度地减轻 AAPH 诱导的蛋白质的氧化损伤。综上, 野棉花各粗分部位均具有一定减轻蛋白质氧化损伤的作用, 其中 AV-EAF 是野棉花发挥蛋白质损伤保护作用的重要组分。

### 3.3 UPLC-MS 分析 综合抗氧化活性相关实验

数据, 确定了综合活性最强的部位为 AV-EAF。AV-EAF 经 UPLC-MS 鉴定分析, 分别得到负离子流模式 (Neg) 和正离子流模式 (Pos) 的总离子流图 (如图 6 所示), 经鉴定共得到 10467 个峰, 通过“峰面积排名 <100, 匹配度 >95%”筛选

选得到 AV-EAF 中含量和可信度都较高的峰, 并去除重复峰, 共得到 57 个主要成分, 主要为三萜类、甾体类、生物碱、黄酮类、酚类化合物, 主要成分的保留时间、质荷比、分子式、名称及抗氧化活性报道等信息见表 3 及表 4。

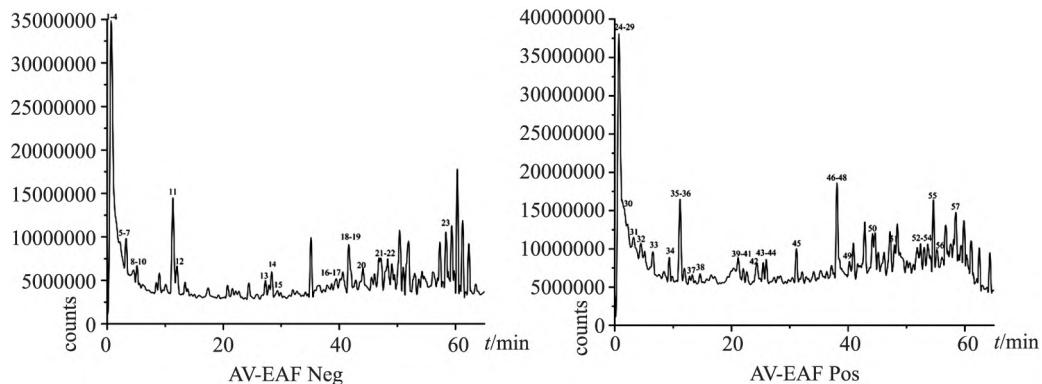


图 6 AV-EAF 的总离子流图 (TIC)

表 3 AV-EAF 在负离子模式下鉴定得到的主要成分及相关信息表

序号	保留时间 /min	质荷比 (m/z)	分子式	化合物名称	类型
1	0.48	136.05	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2-hydroxy-4-methylbenzaldehyde	酚类 (酚醛类)
2	0.64	194.05	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	dimethyl phthalate	其它
3	0.66	138.03	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	protocatechualdehyde <sup>[15]</sup>	酚类 (酚酸类)
4	0.78	138.03	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	capillartemisin A	酚类 (酚酸类)
5	1.13	286.04	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	5,7,2',3'-tetrahydroxyflavone	黄酮类 (黄酮型)
6	1.33	464.41	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	isoquercitrin <sup>[16]</sup>	黄酮类 (黄酮型)
7	1.83	794.44	C <sub>42</sub> H <sub>66</sub> O <sub>14</sub>	3-O-[β-D-Glucopyranosyl-(1-3)-O-β-D-glucuronopyranosyl]-15-α-hydroxyolean-12-en-16-one	五环三萜类 (齐墩果烷型)
8	3.16	294.18	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	embelin	有机酸
9	3.20	311.18	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	spiradine A	生物碱
10	4.21	916.53	C <sub>47</sub> H <sub>80</sub> O <sub>17</sub>	gypenoside IX	四环三萜类 (达玛烷型)
11	11.36	882.49	C <sub>46</sub> H <sub>74</sub> O <sub>16</sub>	araloside D <sup>[17]</sup>	五环三萜类 (齐墩果烷型)
12	12.09	796.45	C <sub>42</sub> H <sub>68</sub> O <sub>14</sub>	saikosaponin L <sup>[18]</sup>	五环三萜类 (齐墩果烷型)
13	27.83	256.24	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	methyl 12-methyltetradecanoate	其它
14	28.07	388.26	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	28-acetoxy-15α-hydroxymansumbinone	甾体类 (5α-雄甾烷型)
15	29.08	390.27	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	3α-hydroxy-6-oxo-5α-cholanic acid	五环三萜类 (齐墩果烷型)
16	39.16	634.40	C <sub>36</sub> H <sub>58</sub> O <sub>9</sub>	16β-hydroxy-18β-H-oleanolic acid-28-O-β-D-glucopyranoside	五环三萜类 (齐墩果烷型)
17	39.45	654.43	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>10</sub>	gycomoside III <sup>[19]</sup>	四环三萜类 (达玛烷型)
18	40.30	309.27	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	gondoic acid	有机酸 (脂肪酸)
19	40.44	447.34	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	irisoquin E	其它 (苯醌类)
20	42.69	181.08	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	2,3,5-trimethoxytoluene	其它
21	49.97	416.32	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	episarsasapogenin	甾体类 (螺甾烷型)
22	50.083	440.38	C <sub>27</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>	bifloride A	其它 (内酯素)
23	58.34	451.44	C <sub>28</sub> H <sub>57</sub> N <sub>3</sub> O	solapalmitenine	生物碱

表 4 AV-EAF 在正离子模式下鉴定得到的主要成分及相关信息表

序号	保留时间 /min	质荷比 (m/z)	分子式	化合物名称	类型
24	0.56	372.15	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	fargesone A	酚类 (多酚类)
25	0.57	354.14	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	3'-methoxyglabridin	黄酮类 (异黄酮)
26	0.62	196.10	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	loliolide	其它 (内酯类)
27	0.71	202.09	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	tremetone <sup>[20]</sup>	其它 (内酯类)
28	0.72	150.06	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	β-solamarine	甾体类 (螺旋烷型)
29	0.73	370.14	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	5'-prenylhomoeordictyol	黄酮类 (二氢黄酮型)
30	2.19	184.10	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	3-methyl-1-(3-methylfuran-2-yl)butane-2,3-diol	其它 (内酯类)
31	3.72	164.11	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	2-isopropyl-5-methylanisole	其它
32	4.31	414.20	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	armillaripin	其它
33	6.57	180.07	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	3,5-dimethyl-4-methoxybenzoic acid	其它 (苯甲酸)
34	9.33	204.07	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	senkyunolide C	其它 (苯酞类)
35	11.16	618.41	C <sub>36</sub> H <sub>58</sub> O <sub>8</sub>	oleanolic acid-28-O-β-D-glucopyranoside <sup>[21]</sup>	五环三萜类 (齐墩果酸型)
36	11.18	750.45	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>12</sub>	anemoside A3	四环三萜类 (达玛烷型)
37	12.74	337.23	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	palustridine	生物碱
38	14.58	282.21	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	gloeosteretriol	其它 (倍半萜)
39	21.05	292.23	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	3α,17α-dihydroxy-5β-androstane	甾体类 (5α-雄甾烷型)
40	22.60	342.27	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	eicosanedioic acid	有机酸 (脂肪酸)
41	22.91	520.33	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	cucurbitacin IIb	四环三萜类 (葫芦烷型)
42	23.62	179.07	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde	其它 (苯酚类)
43	24.45	278.22	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	linolenic acid <sup>[22]</sup>	有机酸 (脂肪酸)
44	25.43	294.25	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	methyl linoleate	其它
45	31.12	330.27	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	2,3-dihydroxypropyl hexadecanoate	其它
46	38.067	162.03	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	3-hydroxycoumarin <sup>[23]</sup>	香豆素
47	38.42	498.31	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>8</sub>	microlepin	其它 (糖苷)
48	38.44	428.32	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	ergosterol peroxide <sup>[24]</sup>	甾体类 (雄甾烷型)
49	40.92	606.28	C <sub>35</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	2-deacetoxytaxinine B	其它
50	44.59	462.37	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>	irisoquin F	其它 (苯醌类)
51	47.80	392.30	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O	ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one <sup>[25]</sup>	甾体类 (雄甾烷烯酮型)
52	51.99	571.51	C <sub>34</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>5</sub>	trufflesphingolipid D	生物碱
53	52.36	398.35	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O	ergosta-5,7-dien-3β-ol	甾体类 (麦角烷烯醇型)
54	53.70	412.36	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	14α-methyl-5α-ergosta-9(11),24(28)-dien-3β-ol	甾体类 (麦角烷烯醇型)
55	54.93	396.33	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	ergosterol	甾体类 (麦角烷烯醇型)
56	55.267	410.35	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O	(24S)-ethylcholesta-5,22,25-trans-3β-ol	其它
57	58.432	478.37	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	pseudocarpaine <sup>[26]</sup>	生物碱

#### 4 结论与讨论

氧化应激是引发生物衰老及多种重大疾病的重要元凶之一，随着现代人群健康意识地不断提高，抗氧化剂地补充成为人们减轻氧化应激状态的主要选择，其中植物来源的天然抗氧化剂相比合成抗氧化剂具有绿色健康、活性良好、较易获得等不可取代的优势。野棉花是多民族的传统用药，其分布广泛且资源量大，易于获取和人工培植；并且从中分离得到的 isoquercitrin<sup>[16]</sup>、arctigenin<sup>[27]</sup>、cinnamic acid<sup>[28]</sup>等成分已具有抗氧化活性报道。因此，开展野棉花的抗氧化活性研究对其

资源的进一步利用和开发具有重要意义。

本研究通过抗氧化活性实验及氧化应激实验对野棉花各粗分部位的体外抗氧化活性进行评估与比较。结果显示，野棉花醇提物具有较好的抗氧化活性，各粗分部位均具有不同程度的抗氧化活性，其中活性最强的部位为 AV-EAF，AV-NBF 也表现出较强的 DPPH 自由基清除能力；通过总黄酮及总酚含量实验探究野棉花“成分-活性”间的联系，结果显示野棉花各粗分部位的黄酮类和多酚类成分含量与其抗氧化活性有一定相关性；通过 UPLC-MS 分析探究 AV-EAF 发挥活性的物质基础，分析表明其富含三萜、甾体、生物碱、

多酚、黄酮等成分，与文献报道相符，且其中部分成分已有抗氧化活性报道，例如 protocatechualdehyde<sup>[15]</sup>（多酚类）、isoquercitrin<sup>[16]</sup>（黄酮类）及 ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one<sup>[25]</sup>（甾体类）均具有较强的体外抗氧化活性；gycomoside III<sup>[19]</sup>（三萜类）则能显著减轻糖尿病小鼠肾脏组织的氧化损伤。

综上，本研究表明野棉花提取物具有较好的体外抗氧化活性，其发挥活性的主要部位为 AV-EAF，结果表明其发挥抗氧化活性的物质基础为三萜、甾体、多酚及黄酮类成分，为野棉花在抗氧化剂方面的应用与开发提供了实验依据。

#### 参考文献

- [1] XU Y, TANG G Y, ZHANG C, et al. Gallic Acid and Diabetes Mellitus: Its Association with Oxidative Stress [J]. Molecules, 2021, 26 (23): 7115.
- [2] 杨雨鸣, 王淑英. UCP2/SIRT3 信号通路与氧化应激在疾病中的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44 (4): 1016–1020.
- [3] 王普善. 天然产物在新药发现中的地位与机会(Ⅱ)——天然产物仍是发现新药的一个重要领域 [J]. 中国医药导刊, 2006 (2): 133–136.
- [4] 谭文红, 韦群辉, 武文, 等. 民族药野棉花的生药学研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30 (9): 36–38.
- [5] 杨本雷. 中国彝族药学 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 2004: 479.
- [6] 牟林云. 紫红獐牙菜及野棉花的化学成分及生物活性研究 [D]. 昆明: 云南民族大学, 2018: 47–50.
- [7] 刘雨. 野棉花化学成分研究 [D]. 武汉: 湖北民族大学, 2019: 24–28.
- [8] 陈朝喜, 田语诗, 李丹, 等. 野棉花研究综述 [J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2017, 43 (3): 242–246.
- [9] 胡宏凯, 彭金年, 黄纯, 等. 紫外–可见分光光度法测定赣南风车子中总黄酮的含量 [J]. 化工设计通讯, 2024, 50 (3): 26–27.
- [10] BANOTHUA V, NEELAGIRIA C, ADEPALLY U, et al. Phytochemical screening and evaluation of in vitro-antioxidant and antimicrobial activities of the indigenous medicinal plant *Albizia odoratissima* [J]. Pharmaceutical Biology, 2017, 55 (1): 1155–1161.
- [11] ZHANG K, HANG M, ZHAO X, et al. Hypoglycemic and Antioxidant Properties of Extracts and Fractions from *Polygoni Avicularis Herba* [J]. Molecules, 2022, 27 (11): 3381.
- [12] 刘琳, 李生茂, 张帆, 等. 益智不同部位化学成分及清除 DPPH 自由基活性比较 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27 (12): 23–26.
- [13] LIN Z. Focus on Anti-Oxidative and Free Radical Scavenging Activity of *Ganoderma lucidum* [J]. Biomolecules and Therapeutics, 2004, 12 (3): 646–653.
- [14] YANG S, XIE Z, YU S, et al. Inhibitory Effect of Crude Walnut Leaf Polysaccharides on Oxidative Damage of Proteins and Proliferation of SGC-7901 Cells [J]. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2020, 16 (2): 199–207.
- [15] 刘梅, 夏鑫华, 张志敏, 等. 丹参素、原儿茶醛、咖啡酸和丹酚酸 B 体外抗氧化活性比较研究 [J]. 中药材, 2009, 32 (2): 265–267.
- [16] 甘小娜, 李廷钊, 李波. 基于 UPLC-ABTS-PDA-Triple TOF/MS 的辣木叶中抗氧化活性成分在线筛选 [J]. 中国现代中药, 2022, 24 (6): 1003–1008.
- [17] 杨志福, 汤海峰, 贾艳艳, 等. 太白楤木总皂苷对糖尿病小鼠血糖血脂及抗氧化作用的影响 [J]. 解放军药学学报, 2008 (2): 110–113.
- [18] 余刘勤, 贾爱梅, 宋永砚. 柴胡皂苷抗炎、抗氧化和降脂研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28 (1): 87–92.
- [19] 郎志芳, 董琦, 韩继成. 绞股蓝皂甙对糖尿病大鼠肾脏氧化应激影响的研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2005 (4): 5–8.
- [20] BENITES J, GUTIERREZ E, JOSÉ LÓPEZ, et al. Evaluation of analgesic activities of tremetone derivatives isolated from the Chilean altiplano medicine *Parastrephia lepidophylla* [J]. Natural Product Communications, 2012, 7 (5): 611.
- [21] GOHAR A, MAATOOQ G, MRAWAN E, et al. Two oleananes from *Ammannia auriculata* Willd [J]. Natural Product Research, 2012, 26 (14): 1328–1333.
- [22] 杨得坡, 李杰梅, 曾晓晖, 等. 共轭亚油酸的抗氧化活性及其抗氧化剂筛选 [J]. 中国食品添加剂, 2007 (2): 136–139.
- [23] PALMA A, MONTOYA M R, ARTEAGA J F. Analysis of the Interaction of Radical Scavengers with ROS Electrogenerated from Hydrogen Peroxide [J]. Journal of the Electrochemical Society, 2013, 160 (4): 213–218.
- [24] 黄毅, 雷传文, 宋航, 等. 高速逆流色谱法用于纵条纹炭角菌中过氧麦角甾醇的分离纯化 [J]. 食品工业科技, 2016, 37 (17): 262–266.
- [25] 王波涛, 杨晓莉, 李赛飞, 等. 蚁巢膝束霉次级代谢产物及生物活性(英文) [J]. 菌物学报, 2014, 33 (5): 1094–1102.
- [26] HANANI S, FAHMI I, FITRIEN H, et al. Bioassay-Guided Different Extraction Techniques of *Carica papaya* (Linn.) Leaves on In Vitro Wound-Healing Activities [J]. Molecules, 2020, 25 (3): 517.
- [27] FIERASCU C, GEORGIEV I, FIERACU I, et al. Mitodepressive, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory effects of wild-growing Romanian native *Arctium lappa* L. (Asteraceae) and *Veronica persica* Poiret (Plantaginaceae) [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018 (111): 44–52.
- [28] 张祺嘉钰, 孙毅, 冉娟, 等. 不同炮制方法对不同产地桂枝中有效成分含量及抗氧化作用的影响 [J]. 中南药学, 2019, 17 (7): 1018–1023.

(收稿日期: 2024-05-11 编辑: 陶希睿)