

三种红景天总黄酮类物质的抗氧化活性比较分析

崔晋龙¹, 郭婷婷^{1,2}, 王梦亮¹

(1. 山西大学应用化学研究所, 太原 030006;
2. 山西大学生物技术研究所, 太原 030006)

摘要: 对我国3种主要红景天品种植物的总黄酮物质进行提取, 分别对其1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH), $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, 以及亚硝酸盐的清除能力和 Fe^{2+} 螯合能力及总抗氧化能力进行评价, 从而比较分析其抗氧化活性。结果表明, 大花红景天(*Rhodiola crenulata*)中总黄酮类物质含量较柴胡红景天(*R. bupleuroides*)和长白红景天(*R. angusta*)多, 且其 Fe^{2+} 螯合能力、 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除能力、总抗氧化能力均高于其余两者; 柴胡红景天中总黄酮类物质对DPPH, $\cdot\text{OH}$, 亚硝酸盐的清除能力均高于大花红景天和长白红景天。

关键词: 中药资源学; 红景天; 总黄酮; 抗氧化; 自由基

中图分类号: Q81 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2015)17-1802-07

Comparison of antioxidant activity of total flavonoids from three *Rhodiola* species

CUI Jinlong¹, GUO Tingting^{1,2}, WANG Mengliang¹

(1. Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;
2. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The total flavonoids from 3 major species of *Rhodiola rosea* in China were extracted. The scavenging rates of DPPH, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, NO_2^- free radicals, chelating of Fe^{2+} , and total antioxidant capacity were adopted to evaluate the total flavonoids of three *Rhodiola* plants *in vitro*. The results show that the content of flavonoids in *R. crenulata* was higher than *R. bupleuroides* and *R. angusta*, and the scavenging effect of Fe^{2+} chelating, $\text{O}_2\cdot^-$ scavenging, and total antioxidant capacity of *R. crenulata* were also higher than the others. The scavenging effects of DPPH, $\cdot\text{OH}$ and nitrite of *R. bupleuroides* were the strongest.

Key words: science of Chinese medicinal material resources; *Rhodiola rosea*; total flavonoids; antioxidant; free radical

0 引言

红景天(*Rhodiola rosea*)系蔷薇目(Rosales)景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola*)植物, 为多年生草本, 主要分布于亚洲、欧洲、北美洲等高山地区^[1]。我国为红景天主要生产和消费国, 其中以青藏高原和东北长白山地区为主要分布区^[2]。红景天属国家卫生部确立的114种“可用于保健食品”的药食同源材料之一^[3]。其使用历史悠久, 民间自古即有用其根治疗咳血、咯血、“肺疾”和妇女白带等症的传统^[4]。现代医学及药理学表明, 其在抗缺氧、抗衰老、抗病毒、防辐射、抗疲劳、抗肿瘤、增强免

疫力等方面有着独特作用^[5-6],被认为是一种具有重要发展前景的环境适应源性药物^[7]和保健食品资源^[8]。

张璇等^[9]、刘海英等^[3]证明红景天提取物在 $\cdot\text{OH}$ 体系和 $\text{O}_2\cdot$ 体系中均有很好的抗氧化能力,且对后者的清除能力大于前者,铁离子还原法测得的总抗氧化值大于 2.35 mmol/g ,DPPH清除率大于85%。毛绍春等^[10]通过光度法和香烟烟气自由基检测法对红景天提取物的抗氧化性能进行研究,首次发现红景天能够较好地抑制油脂过氧化、降低香烟烟气自由基,表明其具有较强的抗氧化能力。同时,动物实验也表明,红景天具有抗氧化、提高机体耐缺氧的能力^[11-12]。

大花红景天(*R. crenulata*)、柴胡红景天(*R. bupleuroides*)和长白红景天(*R. angusta*)是我国青藏高原和长白山地区最重要的品种代表。由于其地理生长条件的不同,其抗氧化成分的含量和能力存在很大差异。这里通过提取它们的总黄酮类物质,采用6种方法对其抗氧化能力进行综合评价,通过比较3个主要消费品种之间的差异,为医疗、保健、食品等行业中的使用提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大花红景天(*R. crenulata*)和柴胡红景天(*R. bupleuroides*)于2012年9月采集于西藏米拉山口($\text{E}92^\circ22'50''$, $\text{N}29^\circ11'25''$),长白红景天(*R. angusta*)于2012年5月采集于吉林长白山($\text{E}128^\circ08'17''$, $\text{N}44^\circ11'20''$),由崔晋龙博士鉴定,标样保藏于山西大学应用化学研究所。

DPPH购于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;Ferrozine购于阿法埃莎(天津)化学有限公司;总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)试剂盒购于南京建成生物工程研究所;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

CS/50CXII型高速冷冻离心机(日本Hitachi公司);UV-2450型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);HEI-VAP/LR20旋转蒸发仪(德国Heidolph公司)。

1.3 方法

1.3.1 样品中总黄酮类物质的提取与含量测定

将3种红景天材料在避光、通风、阴凉环境下自然晾干,粉碎过3号筛。精确称取后置于具塞锥形瓶,按料:液(质量:体积)为1:20加入75%乙醇浸泡30 min,超声提取20 min,在转速4 000 r/min条件下,离心10 min,上清液于 45°C , $8\times 10^3\text{ Pa}$ 条件下旋转蒸发浓缩,得浓缩物,称重。加无菌去离子水使浓度为 6.0 g/L ,作为总黄酮类物质粗提物样液。另配制同浓度维生素C(vitamin C, VC)及EDTA-2Na作为阳性对照。

总黄酮类物质的定量分析是以芦丁为标准品,建立标准曲线。取6只10 mL比色管,分别加入 0.20 g/L 芦丁对照品溶液0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,每隔6 min依次加入5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,10%硝酸铝溶液0.3 mL,10%氢氧化钠溶液4.0 mL。最后用无菌去离子水定容至10 mL,摇匀。15 min后在510 nm处测定其吸光值。

1.3.2 DPPH 自由基清除能力的测定

采用LIU等^[13]的方法,向比色管中分别移取2 mL样液、4 mL 50 mg/L的DPPH,摇匀,在黑暗条件下, 37°C 反应30 min,于517 nm处测定OD值 A_i 。每个样品平行测定3次,取平均值。以VC作阳性对照,DPPH的甲醇溶液作空白对照(A_0)。根据下列公式计算样品对DPPH自由基的清除率:

$$\text{DPPH自由基清除率 (\%)} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100.$$

1.3.3 •OH⁻自由基清除能力测定

根据 WU 等^[14]的方法测定。依次将 20 mmol/L 水杨酸钠溶液 0.6 mL, 1.5 mmol/L 硫酸亚铁溶液 2 mL, 样液 1 mL 加入比色管中, 混匀, 加入 6 mmol/L 过氧化氢溶液 1.4 mL, 充分振荡。37℃ 反应 1 h, 于 510 nm 处测定 OD 值 A_i 。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以 VC 作阳性对照, 以蒸馏水作空白对照 (A_0)。根据下列公式计算样品对•OH⁻的清除率:

$$\bullet\text{OH}^- \text{清除率 (\%)} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100.$$

1.3.4 Fe²⁺螯合能力测定

采用 Ferrozine 比色法^[15]。分别移取 1 mL 样品溶液于不同试管, 依次加入 3.7 mL 55%乙醇、0.1 mL 2 mmol/L FeCl₂ 和 0.2 mL 5 mmol/L Ferrozine, 振荡混匀, 室温下静置 20 min. 于 562 nm 处测定 OD 值 A_i 。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以 EDTA-2Na 作阳性对照, 以 55%乙醇作空白对照 (A_0)。根据下列公式计算样品的 Fe²⁺螯合能力:

$$\text{Fe}^{2+} \text{螯合能力 (\%)} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100.$$

1.3.5 O₂⁻清除能力测定

参照邻苯三酚自氧化法^[16]。分别移取 3 mL pH 值为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液、1 mL 0.2 mmol/L 四氮唑蓝 (nitroblue, NBT) 溶液、1 mL 样品溶液、1 mL 10 mmol/L 邻苯三酚溶液至比色管中, 摇匀后用蒸馏水稀释至 10 mL, 37℃ 水浴反应 4 min, 加入 0.5 mL 10 mol/L HCl 以终止反应, 于 536 nm 处测定 OD 值 A_i 。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以 VC 作阳性对照, 以 80%乙醇作空白 (A_b) 同时测定不加 NBT 体系的 OD 值 A_0 。根据下列公式计算样品的 O₂⁻清除率:

$$\text{O}_2^{\bullet-} \text{清除率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_i - A_0}{A_b - A_0} \right) \times 100.$$

1.3.6 亚硝酸盐清除能力测定

按照表 1 依次加入各试剂, 反应完全后于 538 nm 处测定 OD 值 A_i 。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以 VC 作阳性对照, 以蒸馏水作空白对照 (A_0)。根据下列公式计算样品的亚硝酸盐清除率:

$$\text{亚硝酸盐清除率 (\%)} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100.$$

1.3.7 T-AOC 测定

采用 T-AOC 试剂盒测定 T-AOC. 本实验定义在 37℃ 时, 每分钟每毫升待测液使反应体系的 OD 值每增加 0.01 时, 为一个 T-AOC 单位 (U)。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以 VC 作阳性对照。根据下列公式计算样品的 T-AOC:

$$\text{总抗氧化能力 (U/mL)} = \frac{A_i - A_0}{0.01} \div 30 \times \frac{\text{反应液总量}}{\text{取样量}} \div \text{样品浓度},$$

表 1 亚硝酸盐清除能力测定方法

Tab. 1 Methods of scavenging effect of nitrite

试剂	体积/mL
5 mg/L 亚硝酸钠	3
柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH=3.0)	5
样液	2
37℃ 水浴反应 15 min	
0.4% 对氨基苯磺酸	2
室温静置 3~5 min	
0.2% 盐酸萘乙二胺	1
静置 15 min	

其中, A_0 为空白对照的 OD 值, A_i 为加有样品或阳性对照后的 OD 值。

2 结果与分析

2.1 样品中总黄酮类物质的含量

以芦丁为标准品建立标准曲线, 校准曲线方程为 $y=8.238\ 19x-0.009\ 5$, $R^2=0.999\ 3$, 曲线如图 1a 所示。在此基础上, 测定大花红景天、柴胡红景天、长白红景天黄酮粗提液的 OD 值, 测定波长为 510 nm。根据 OD 值及标准曲线获得 3 种植物的总黄酮含量数据。结果表明, 3 个不同品种的总黄酮含量差别较大, 其中柴胡红景天的总黄酮含量最高, 为 (106.30 ± 0.34) mg/g; 其次为大花红景天, 其含量为 (102.15 ± 0.16) mg/g; 长白红景天含量最低, 约等于前二者的 1/2, 为 (62.52 ± 0.20) mg/g, 具体如图 1b 所示。

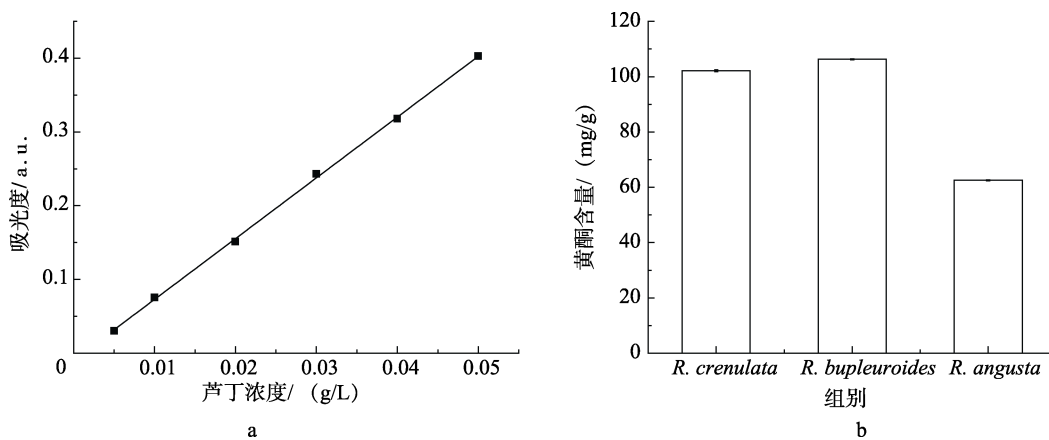


图 1 芦丁标准品对照曲线及样品中黄酮类物质的含量

Fig. 1 Standard curve of rutin reference and the content of flavonoids in samples

a—标准品对照曲线; b—黄酮含量

a-Standard curve of rutin; b-Content of flavonoids

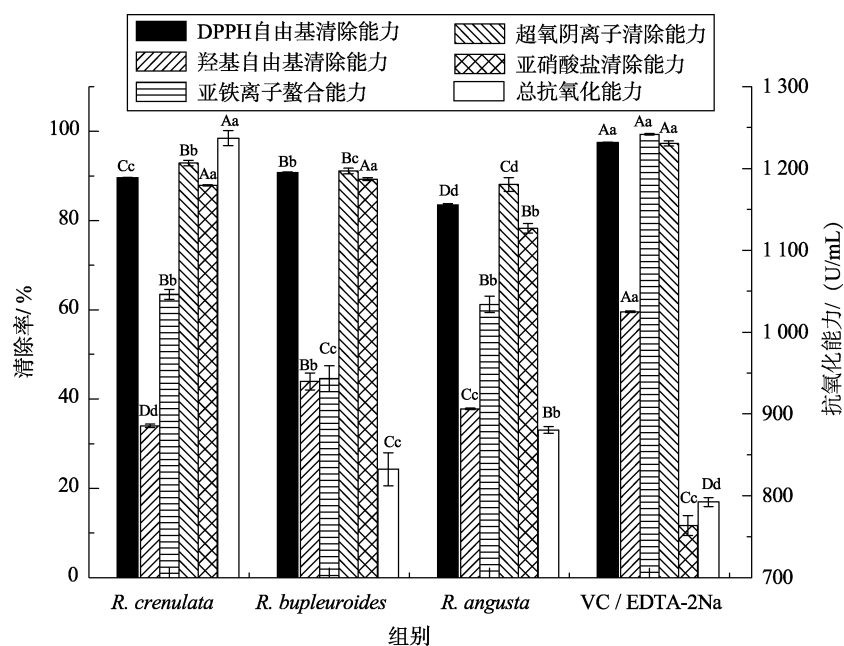
2.2 抗氧化能力测定结果

以 3 种植物的黄酮粗提液为基础, 进行抗氧化能力的测定。DPPH 自由基清除实验结果 (如图 2 所示) 表明, 3 个红景天品种均表现出较强的 DPPH 自由基清除活性。其中, 柴胡红景天黄酮粗提物的清除率最高, 达到 90.81%; 其次是大花红景天和长白红景天, 分别为 89.64% 和 83.51%, 三者间差异性极显著 ($P<0.01$)。但它们的清除率略低于阳性对照 VC 的清除率 97.50%。

3 种植物的黄酮粗提液对 $\cdot\text{OH}$ 的清除实验表明, 3 种植物清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的能力总体较弱, 均远低于阳性对照 VC 的清除率 59.55%。相对来讲, 柴胡红景天黄酮粗提液清除率最高, 为 43.95%; 其次为长白红景天和 大花红景天, 分别为 37.79% 和 34.29%, 三者间差异性极显著 ($P<0.01$)。

Fe^{2+} 螯合能力实验中, 3 种植物的黄酮粗提物的 Fe^{2+} 螯合能力均较低, 大花红景天和长白红景天的螯合能力相对较强, 分别为 63.49% 和 61.24%, 两者间无显著性差异。柴胡红景天 Fe^{2+} 螯合能力最差, 仅为 44.58%。而阳性对照 EDTA-2Na 的 Fe^{2+} 螯合能力高达 99.32%, 分别是三者的 1.56, 1.62, 2.23 倍。

$\text{O}_2\cdot$ 清除能力测定实验结果表明, 大花红景天、柴胡红景天的黄酮粗提液对 $\text{O}_2\cdot$ 的清除率较高, 分别达到 92.91% 和 91.12%, 两者间无显著性差异, 但二者均低于阳性对照 VC 的清除率 97.29%。长白红景天的黄酮粗提液清除能力最弱, 为 88.07%。



注: 不同大写字母表示差异性显著 ($P<0.05$), 小写字母表示差异性极显著 ($P<0.01$)

图2 不同品种红景天各抗氧化能力实验测定结果

Fig. 2 Antioxidant capacity of different kinds of *Rhodiola*

亚硝酸盐的清除能力测定实验表明, 对亚硝酸盐的清除能力最强的是柴胡红景天黄酮粗提液, 清除率达到 89.26%; 其次是大花红景天, 清除率为 87.90%, 两者间无显著性差异; 长白红景天的清除率最低, 为 78.25%. 3种植物的亚硝酸盐清除能力显著高于阳性对照 VC 清除率 11.68%, 分别高达阳性对照 VC 的 7.64, 7.53, 6.70 倍。

在 T-AOC 实验中, 3种植物黄酮粗提液的总抗氧化能力略有差距, 其中大花红景天的总抗氧化能力最高, 达到 1 237.06 U/mL; 长白红景天和柴胡红景天黄酮粗提液的总抗氧化能力为 880.40 U/mL 和 832.46 U/mL, 三者间差异性极显著 ($P<0.01$), 而且它们的总抗氧化能力均大于阳性对照 VC 的总抗氧化能力 793.17 U/mL。

3 讨论与结论

红景天是我国传统藏药之一, 全球共计 90 余种, 73 种分布于我国, 其中包括 2 个亚种, 7 个变种^[17]。目前, 人们以红景天为原料开发出了注射液、胶囊、口服液、饮料、保健品、化妆品等数十种产品。然而不同的生长地域、自然环境导致红景天不同品种间抗氧化能力各有差异, 在临床使用和作为食品添加剂等使用中效果不同。本实验选取了 3 种主要红景天作为实验对象, 其中, 大花红景天为我国《药典》^[18]指定的唯一基源药用植物, 它与柴胡红景天同为西藏民间使用量最大的药材品种; 而长白红景天为我国东北地区交易量最大的品种之一, 也是我国红景天种植面积最大的品种之一。它们在我国红景天药材的使用中均扮演着重要角色。研究将这 3 个品种的总黄酮类物质进行提取, 比较其抗氧化能力, 并对其主要药物活性进行评价, 为市场交易和使用提供参考数据。

黄酮类物质是红景天植物的主要化学成分^[19]。研究表明, 黄酮的种类决定抗氧化能力的强弱^[20]。毕会敏等^[21]对不同产地红景天提取物抗氧化能力检测发现, 云南产的大花红景天中黄酮类物质比吉林

和陕西红景天种类多、含量高,这与本实验得到的“大花红景天的总黄酮类物质比柴胡红景天和长白红景天含量高”这一结果相同。同时,本实验数据显示大花红景天中总黄酮类物质的 Fe^{2+} 螯合能力、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力、总抗氧化能力高于柴胡红景天;柴胡红景天中总黄酮类物质对 DPPH, $\cdot\text{OH}^-$, 亚硝酸盐的清除能力均高于大花红景天,表明大花红景天和柴胡红景天的抗氧化能力较长白山红景天强,二者均可作为良好的抗氧化剂。

[参考文献] (References)

- [1] ZHANG J Q, MENG S Y, ALLEN G A, et al. Rapid radiation and dispersal out of the Qinghai-Tibetan plateau of an alpine plant lineage *Rhodiola* (Crassulaceae)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2014, 77: 147-158.
- [2] 中科院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
China Flora Editorial Board of Chinese Sciences Academy. Chinese flora[M]. Beijing: Science Press, 1984. (in Chinese)
- [3] 刘海英, 仇农学, 姚瑞祺, 等. 我国 86 种药食两用植物的抗氧化活性及其与总酚的相关性分析[J]. *西北农林科技大学学报*, 2009, 37 (2): 173-180.
LIU H Y, QIU N X, YAO R Q, et al. Correlation analysis between antioxidant capacity and total phenolic content of 86 Chinese edible herbal extracts[J]. *Journal of Northwest A&F University*, 2009, 37(2): 173-180. (in Chinese)
- [4] 宋月英, 韩慧文, 郝素云. 红景天研究进展[J]. *武警医学院学报*, 2013, 13 (1): 66-68.
SONG Y Y, HAN H W, HAO S Y. Progress in the research of *Rhodiola*[J]. *Acta Academiae Medicinae CPAPF*, 2013, 13(1): 66-68. (in Chinese)
- [5] MA C Y, TANG J, WANG H X, et al. Simultaneous determination of six active compounds in *Rhodiola* L. by RP-LC[J]. *Chromatographia*, 2008, 67: 383-388.
- [6] TAYADE A B, DHAR P, SHARMA M, et al. Antioxidant capacities, phenolic contents, and GC/MS analysis of *Rhodiola imbricata* edgewood root extracts from trans-himalaya[J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(3): 402-410.
- [7] ALEXANDER P, REBECCA H, GEORG W, et al. Mechanism of action of *Rhodiola*, salidroside, tyrosol and triandrin in isolated neuroglial cells: an interactive pathway analysis of the downstream effects using RNA microarray data[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 1325-1348.
- [8] SHAO K H, RACHEL P, EDZARD E. The effectiveness and efficacy of *Rhodiola rosea* L.: a systematic review of randomized clinical trials[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18: 235-244.
- [9] 张彧, 高云, 付蓉, 等. 中药红景天提取物抗氧化活性的研究[J]. *食品科学*, 2004, 25 (10): 315-318.
ZHANG Y, GAO Y, FU R, et al. Study on the antioxidant activity of the Chinese herb *Rhodiola sachalinensis* A. Bor extract[J]. *Food Science*, 2004, 25(10): 315-318. (in Chinese)
- [10] 毛绍春, 李竹英. 红景天提取物在抗氧化方面的应用[J]. *研究资源开发与市场*, 2006, 22 (5): 405-406.
MAO S C, LI Z Y. Applied research of *Rhodiola crenulate* H. ohba extracts on antioxidant action[J]. *Resource Development & Market*, 2006, 22(5): 405-406. (in Chinese)
- [11] 曹俊岭, 薛春苗, 王艳梅, 等. 红景天颗粒体内外抗氧化作用研究[J]. *中国药学杂志*, 2014, 49 (14): 1222-1225.
CAO J L, XUE C M, WANG Y M, et al. Antioxidative effect of *Rhodiola* granules *in vitro* and *in vivo*[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2014, 49(14): 1222-1225. (in Chinese)
- [12] 尤育洲, 刘慧, 全国辉, 等. 大花红景天对小鼠生化指标的影响[J]. *毒理学杂志*, 2014, 28 (4): 304-306.
YOU Y Z, LIU H, TONG G H, et al. Effect of *Rhodiola* on biochemical indexes in mice[J]. *Journal of Toxicology*, 2014, 28(4): 304-306. (in Chinese)
- [13] LIU X L, DONG M S, CHEN X H, et al. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*[J]. *Food Chemistry*, 2007, 105: 548-554.
- [14] WU G H, HU T, LI Z Y, et al. *In vitro* antioxidant activities of the polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) sing[J].

- Food Chemistry, 2014, 148: 351-356.
- [15] GUO T, WEI L, SUN J, et al. Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* Cooke & Massee[J]. Food Chemistry, 2011, 127: 1634-1640.
- [16] 龚钢明, 张赞彬, 王化田. 红景天多酚物质抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2008, 29 (2): 91-93.
GONG G M, ZHANG Y B, WANG H T. Study on antioxidant effects of polyphenol from *Rodiola rosea*[J]. Food Science, 2008, 29(2): 91-93. (in Chinese)
- [17] ZHOU J T, XU L, CHEN Y Y, et al. Chemical constituents from the *Rhodiola* genus plants[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2014, 23(7): 433-445.
- [18] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
The Commission of Pharmacopoeia. Chinese pharmacopoeia[M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2010. (in Chinese)
- [19] MA S F, HU L M, MA C Y, et al. Application and recovery of ionic liquids in the preparative separation of four flavonoids from *Rhodiola rosea* by on-line three-dimensional liquid chromatography[J]. Journal of Separation Science, 2014, 37(17): 2314-2321.
- [20] CHENG J, CHEN X Y, ZHAO S, et al. Antioxidant-capacity-based models for the prediction of acrylamide reduction by flavonoids[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 90-99.
- [21] 毕会敏, 张守勤, 刘长姣. 不同产地红景天提取物抗氧化活性的比较[J]. 吉林大学学报, 2008 (38): 209-213.
BI H M, ZHANG S Q, LIU C J. Antioxidant activity of *Rhodiola* extracts from different regions[J]. Journal of Jilin University, 2008(38): 209-213. (in Chinese)