

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.08.016

HPLC 法同时测定刺玫果提取物中的黄酮类成分及其体外活性测定

Simultaneous determination of flavonoids in fruits of *Rosa davurica* pall. by HPLC and measurement of their activities in vitro

邸松¹ 钟方丽¹ 张晓丽^{1,2} 王晓林¹ 雷永平¹

DI Song¹ ZHONG Fang-li¹ ZHANG Xiao-li^{1,2} WANG Xiao-lin¹ LEI Yong-ping¹

(1. 吉林化工学院, 吉林 吉林 132022; 2. 吉林大学, 吉林 长春 130012)

(1. *Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin, Jilin 132022, China;*

2. Jilin University, Changchun, Jilin 130012, China)

摘要:采用 HPLC 法同时测定刺玫果提取物中 4 种黄酮类成分的含量,并采用 UV 法测定刺玫果提取物、4 种黄酮类单体和单体复方配伍的体外活性。结果表明,刺玫果提取物中金丝桃苷、芦丁、槲皮素及木犀草素的含量分别为 607.98, 450.63, 187.32, 12.68 $\mu\text{g/g}$ 。刺玫果提取物、4 种黄酮类成分及其复方配伍均具有一定的体外抗氧化活性,且刺玫果提取物的活性强于黄酮类成分的复方配伍,但二者均弱于 V_C ;刺玫果提取物、4 种黄酮类成分及其复方配伍均具有清除亚硝酸盐、阻断亚硝酸胺合成及抑制 α -糖苷酶的活性,且刺玫果提取物的活性强于阿卡波糖、黄酮类成分的复方配伍。

关键词:刺玫果;黄酮;高效液相色谱法;抗氧化;活性

Abstract: Simultaneous determination of four flavonoids in extracts of the fruits of *Rosa davurica* pall. (FRDP) by high performance liquid chromatography (HPLC) was carried out, and the in vitro activities of extracts of FRDP, four flavonoids and their compound compatibility were measured by UV method. The results showed that the contents of hyperoside, rutin, quercetin and luteolin of the extract of FRDP were 607.98, 450.63, 187.32 and 12.68 $\mu\text{g/g}$ respectively. The extracts of FRDP, four flavonoids and their compound compatibility all have certain antioxidant activities in vitro, and the activity of extracts of FRDP was stronger than that of compound compatibility. However, both of them were weaker than that of V_C . The extracts of FRDP, four

flavonoids and their compound compatibility also had the activity of scavenging nitrite, blocking the synthesis of nitrosamine and inhibiting α -glucosidase, and the activity of extract of FRDP was stronger than those of acarbose and compound compatibility.

Keywords: the fruits of *Rosa davurica* pall. (FRDP); flavonoid; high performance liquid chromatography (HPLC); antioxidant; activity

刺玫果为野生山刺玫的成熟果实,又名花伞蔷薇,广泛分布于东北、内蒙等地^[1]。其果实呈卵型或球型,香甜气息浓郁,酸甜可食^[2]。刺玫果含有丰富的黄酮类、三萜类、皂苷、挥发油及氨基酸等成分,营养价值极高^[3-4]。因其具有抗衰老、预防心脑血管疾病作用,且抗氧化与治疗高血脂效果显著,近年来以刺玫果为主要原料的保健食品的开发受到了广泛的重视^[5]。

在刺玫果提取物黄酮类成分研究的报道中,采用 HPLC 法定性、定量黄酮类成分的研究较多,其中有同时测定芦丁、金丝桃苷与槲皮素^[6],木犀草素与金丝桃苷^[7],槲皮素和山奈酚^[8]的报道。但尚未见同时测定刺玫果提取物中金丝桃苷、芦丁、槲皮素及木犀草素的报道。有关黄酮类成分体外活性的研究,大多都是总黄酮提取物、或经过纯化的总黄酮提取物进行体外活性研究。例如:通过测定 DPPH 自由基清除率^[9]、ABTS 自由基阳离子清除率^[10]、羟基自由基清除率^[11]以及抗脂质过氧化作用^[12]来评价其抗氧化活性;通过测定清除亚硝酸盐活性、阻断亚硝酸胺合成能力评价其抗癌活性^[13];通过测定抑制 α -糖苷酶活性,评价供试品的降血糖活性^[14]。这类试验只表明了黄酮类成分协同作用的体外活性,未对其黄酮类单体成分及其单体复方配伍活性进行评价。同时也未有对刺玫果提取物中所含的黄酮类成分单体及单体复

基金项目:吉林省科技厅重点科技攻关项目(编号:20170204001YY);吉林省教育厅“十三五”科技计划项目(编号:JJKH20170225KJ)

作者简介:邸松,男,吉林化工学院在读硕士研究生。

通信作者:钟方丽(1970—),女,吉林化工学院教授,博士。

E-mail: zhongfl@jlct.edu.cn

收稿日期:2019-04-22

方配伍的活性研究。

试验拟使用 HPLC 法,建立同时测定刺玫果提取物中 4 种黄酮类单体成分的方法,并分析对比各成分及单体对应复方配伍的体外活性,以期刺玫果提取物的开发利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

刺玫果:安徽亳州医药材料总公司,由吉林化工学院药 学系薛健飞博士鉴定为成熟果实;

木犀草素、芦丁、金丝桃苷、槲皮素对照品:纯度 $\geq 98.5\%$,成都曼思特生物科技有限公司;

乙腈、甲醇:HPLC 级,天津市大茂化学试剂厂;

α -糖苷酶(酶活 ≥ 34 U/mg)、PNPG:生物试剂,上海 生物科技有限公司;

其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

高效液相色谱仪:Agilent-1260 型,搭载 DAD 阵列检测器,安捷伦科技有限公司;

紫外分光光度计:TU-1810 型,北京普析通用仪器有限公司;

酶标仪:PL-9602 型,北京普朗新科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 溶液配制

(1) 供试品溶液的制备:参考杨扬等^[15]对刺玫果总黄酮的提取纯化工艺制备刺玫果提取物,采用乙醇热回流法提取刺玫果总黄酮,使用 D-101 大孔树脂对提取的刺玫果总黄酮进行纯化,得到刺玫果提取物。精密称取刺玫果提取物 0.5 g,置于 25 mL 容量瓶中,加入 60% 乙醇水溶液 15 mL,超声处理 30 min 使其完全溶解后定容,过滤,取滤液 5 mL 置于 10 mL 容量瓶中定容,采用 0.45 μ m 滤膜过滤,即得供试品溶液。

(2) 对照品溶液的制备:精密称取金丝桃苷对照品 4.2 mg、芦丁、木犀草素、槲皮素对照品各 4.1 mg,分别置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并定容,精密吸取上述各对照品溶液 2.5 mL 于 25 mL 容量瓶中并定容,得混合对照品溶液,放置在冰箱(4 $^{\circ}$ C)内避光保存备用。

1.2.2 刺玫果提取物中 4 种黄酮类单体成分的含量测定

(1) 色谱条件及流动相考察:使用紫外分光光度计,在 200~600 nm 对芦丁、金丝桃苷、槲皮素及木犀草素的甲醇溶液进行全波长扫描,对比扫描图谱,选择 4 种黄酮类单体成分均具有较大吸收的波长作为检测波长。使用依利特 ODS₂ C₁₈ 色谱柱,柱温 35 $^{\circ}$ C,进样量 20 μ L。分别考察乙腈—0.1% 磷酸水溶液、甲醇—0.1% 磷酸水溶液、乙腈—甲醇—0.1% 磷酸水溶液等度洗脱系统及梯度洗脱

系统。根据理论塔板数、分离度、保留时间及峰型因素,从中优选出流动相。

(2) 线性关系的考察:精密吸取混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中,定容,在色谱条件下进样 20 μ L,测定峰面积,以进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归。

(3) 方法学考察:① 精密吸取同一混合对照品溶液,在色谱条件下连续进样 6 次,分别记录 4 种黄酮类单体成分的峰面积,并计算 RSD 值。精密吸取供试品溶液 20 μ L,进样 6 次,分别记录 4 种黄酮类单体成分的峰面积,计算 RSD 值,考察仪器精密性。② 取同一批刺玫果提取物,按照供试品溶液制备方法进行溶液制备。按照色谱条件进样 6 次,分别记录 4 种黄酮类单体成分的峰面积,并计算 RSD 值。③ 吸取同一供试品溶液,分别在 0, 6, 12, 24, 36, 48 h 进样,分别记录 4 种黄酮类单体成分峰面积,计算 RSD 值。

(4) 加样回收率试验及含量测定:称取 6 份已知含量的刺玫果提取物,每份 0.5 g,精密称定。每份中分别加入金丝桃苷 305 μ g、芦丁 225 μ g、槲皮素 94 μ g、木犀草素 6 μ g,按照供试品溶液制备方法进行制备。在 1.2.2(1)所选择的色谱条件下分别进样 20 μ L,计算回收率。称取 0.5 g 刺玫果提取物,按供试品溶液配制方法配制供试品溶液,平行进样 3 次,记录 4 种黄酮类单体成分峰面积,将平均值代入线性关系计算刺玫果提取物中 4 种黄酮类单体成分含量。

1.2.3 体外活性测定 根据含量测定结果,配制 4 种黄酮类单体成分的复方配伍,并对刺玫果提取物、4 种黄酮类单体及其复方配伍进行清除自由基、清除亚硝酸盐、阻断亚硝酸合成、抑制 α -糖苷酶活性的测试。

(1) 清除 DPPH 自由基清除试验:参照文献^[16]进行调整。吸取 0.1 mg/mL DPPH 自由基溶液 17 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入无水乙醇定容,制备 DPPH 自由基溶液。吸取 2 mL 不同质量浓度的各种供试品溶液(V_c 溶液、刺玫果提取物溶液、4 种黄酮类单体成分及复方配伍溶液)与 DPPH 自由基溶液,混合,混合液在室温下避光反应 30 min,在 517 nm 下测定吸光度 $A_{\text{样品}}$,按式(1)计算自由基清除率,并计算 IC_{50} 值。

$$R_{\text{DPPH}} = \frac{A_k - A_y + A_d}{A_k} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R_{DPPH} ——DPPH 自由基清除率, %;

A_k ——2 mL 无水乙醇与 2 mL DPPH 自由基溶液混合的吸光度;

A_d ——2 mL 供试品溶液与 2 mL 无水乙醇混合的吸光度。

(2) ABTS 自由基阳离子清除试验:参考文献^[17]配

制 ABTS 自由基阳离子工作液。取 0.1 mL 不同质量浓度的各种供试品溶液与 3.9 mL ABTS 自由基阳离子工作液混合, 23 °C 避光放置 6 min, 与 734 nm 测定吸光度, 每份样品平行操作 2 次, 按式(2)计算自由基清除率, 并计算 IC_{50} 值。通过对比 IC_{50} , 比较 V_c 、刺玫果提取物、4 种黄酮类单体成分及复方配伍体外抗氧化活性。

$$R_{ABTS} = \frac{A_k - A_y}{A_k} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R_{ABTS} ——ABTS 自由基阳离子清除率, %;

A_k ——0.1 mL 水与 3.9 mL ABTS 自由基阳离子混合吸光度;

A_y ——0.1 mL 供试品与 3.9 mL ABTS 自由基阳离子混合吸光度。

(3) 抗脂质过氧化试验: 以抑制率为指标, 参照文献[18]的试验方法, 对 V_c 、刺玫果提取物、4 种黄酮类成分单体及复方配伍的抗卵磷脂脂质过氧化作用进行测试。在具塞试管中依次加入 1 mL 卵磷脂溶液, 1 mL 0.4 mmol/L $FeSO_4$ 溶液及 1 mL 供试品溶液混匀。于 37 °C 避光水浴 60 min, 加入 2 mL TCA-TBA-HCl 混合液, 90~100 °C 水浴 15 min, 迅速冷却, 以 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液在波长 535 nm 处测定吸光度 A_s 。空白管以 1 mL 重蒸水代替 1 mL 供试品溶液测得 A_c , 按式(3)计算抗脂质过氧化抑制率。

$$R_z = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

R_z ——抗脂质过氧化抑制率, %。

(4) 清除亚硝酸盐活性试验: 采用盐酸萘乙二胺法^[19]。在 15 mL 模拟胃液(pH=3.0)中加入 2 mL 供试品溶液混合, 加入 10 μ g/mL 的亚硝酸钠溶液 2.5 mL, 37 °C 恒温水浴反应 30 min, 取出后立即加入 0.4% 对氨基苯磺酸溶液 0.5 mL, 混匀, 静置 15 min 后加入 0.2% 盐酸萘乙二胺溶液 0.25 mL 及蒸馏水 7 mL, 混合均匀, 放置 15 min。于 538 nm 处测定吸光度, 按式(4)计算自由基清除率, 并计算 IC_{50} 值。

$$R_Q = \frac{A_0 - A_i + A_j}{A_0} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

R_Q ——亚硝酸盐清除率, %;

A_i ——加入供试品溶液的吸光度;

A_j ——供试品溶液的吸光度;

A_0 ——不加供试品溶液的对照组吸光度。

(5) 阻断亚硝胺合成活性试验: 采用 α -萘胺法^[20]。取 pH 3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 2.0 mL, 加入

2.0 mmol/L 亚硝酸钠溶液、2.0 mmol/L 二甲胺溶液各 0.6 mL、各供试品溶液 1.0 mL, 混合均匀, 加入 1.5 mL 蒸馏水, 37 °C 水浴恒温反应 1 h, 用移液管吸取 1.0 mL 溶液加到直径 7 cm 的培养皿中, 加入 0.5% 的碳酸钠溶液 0.5 mL, 在 254 nm 紫外灯下照射 15 min, 取出后分别加入 1% 对氨基苯磺酸溶液 1.5 mL、0.1% α -萘胺溶液 0.5 mL、蒸馏水 0.5 mL, 摇匀, 放置 15 min 后, 用紫外分光光度计在 525 nm 处分别测定吸光度值, 通过式(5)计算阻断率。

$$R_{ZD} = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

R_{ZD} ——亚硝胺合成阻断率, %;

A_0 ——未加提取液的比色管中亚硝酸钠的吸光度;

A_x ——加提取液的比色管中亚硝酸钠的吸光度。

(6) 抑制 α -糖苷酶活性试验: 根据赖小燕等^[21]试验方法进行调整。在 96 孔板中加入 80 μ L 磷酸盐缓冲液(pH=6.8)、20 μ L 2.5 mmol/L 的 PNPG 底物溶液以及 20 μ L 各供试品溶液, 37 °C 水浴 10 min。加入 20 μ L 1.4 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液反应 60 min, 用 100 μ L 0.2 mol/L 碳酸钠溶液终止反应, 室温放置 15 min, 用酶标仪在 405 nm 处测定样品吸光度值, 按式(6)计算抑制率, 并计算 IC_{50} 。

$$R_M = \frac{A_k - A_y + A_b}{A_k} \times 100\%, \quad (6)$$

式中:

R_M —— α -糖苷酶活性抑制率, %;

A_k ——20 μ L 磷酸盐缓冲液代替 20 μ L 供试品溶液的吸光度;

A_b ——20 μ L 磷酸盐缓冲液代替 20 μ L α -葡萄糖苷酶溶液的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 刺玫果提取物中 4 种黄酮类单体成分含量的测定

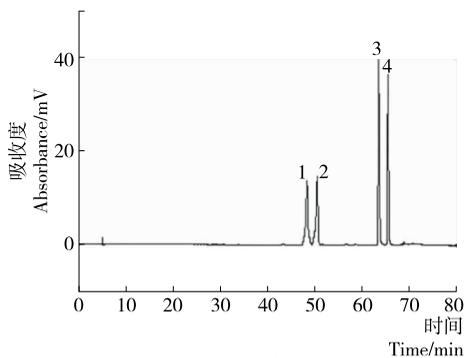
2.1.1 色谱条件及流动相考察结果 根据紫外分光光度计全波长扫描结果, 金丝桃苷、芦丁、槲皮素及木犀草素在 204, 256, 360 nm 均具有较大吸收。其中 204 nm 及 256 nm 处于干扰因素较多, 故选择 360 nm 作为检测波长。对比 4 种黄酮类单体成分在不同流动相下的分离度、理论塔板数及峰型, 结果表明: 使用甲醇—0.1% 磷酸水作为流动相, 金丝桃苷和芦丁相对应的峰重叠, 无法分离; 乙腈—0.1% 磷酸水作为流动相金丝桃苷和芦丁的分离效果较差; 最终确定采用乙腈(A)—甲醇(B)—0.1% 磷酸水溶液(C)梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。在色谱条件下分别进样混合对照品溶液及供试品溶液, 混合对照品溶液和供试品溶液谱图见图 1。

2.1.2 线性关系 以混合对照品中 4 种黄酮类成分质量浓度为横坐标,对应峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,结果见表 2。

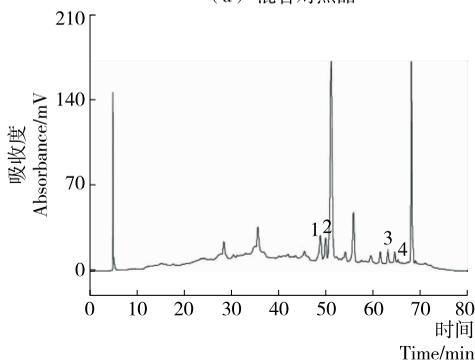
表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Flow phase gradient elution procedure

时间/min	A/%	B/%	C/%	流速/(mL·min ⁻¹)
0	0	5	95	1.0
1	0	5	95	0.7
57	10	25	65	0.7
68	15	30	55	1.0
75	10	25	65	1.0
85	0	5	95	1.0



(a) 混合对照品



(b) 供试品

1. 金丝桃苷 2. 芦丁 3. 槲皮素 4. 木犀草素

图 1 刺玫果提取物中 4 种黄酮成分 HPLC 谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of four flavonoids in FRDP extracts

表 2 线性关系考察结果

Table 2 The results of linear relationship investigation

标准品	拟合方程	拟合度 R ²	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
金丝桃苷	y=51.547x+25.327	0.995 3	2.10~21.0
芦丁	y=43.086x+78.228	0.995 3	2.05~20.5
槲皮素	y=90.719x+33.264	0.999 9	2.05~20.5
木犀草素	y=68.102x+34.585	1.000 0	2.05~20.5

表 2 显示,金丝桃苷在 2.10~21.0 μg/mL,芦丁、槲皮素及木犀草素在 2.05~20.5 μg/mL 浓度范围内与峰面积线性关系良好。

2.1.3 方法学考察 仪器精密性,方法重复性及供试品溶液 48 h 内稳定性的 RSD 值均在 3% 以内,表明仪器精密性,方法重复性以及供试品溶液 48 h 内稳定性良好,试验结果见表 3。

表 3 方法学考察试验数据

Table 3 Methodological experimental data (n=6) %

对照品	精密性 RSD		重复性 RSD	稳定性 RSD
	混合对照品	供试品		
金丝桃苷	0.50	1.28	2.44	1.92
芦丁	1.51	1.74	2.11	2.61
槲皮素	0.89	2.94	1.97	1.41
木犀草素	1.49	2.17	0.90	2.41

2.1.4 加样回收率及含量测定 4 种黄酮类单体成分金丝桃苷、芦丁、槲皮素及木犀草素的平均加样回收率分别为 98.02%,98.45%,99.15%,98.46%,RSD 值分别为 0.80%,1.92%,2.12%,2.89%。具体试验结果见表 4。含量测定结果显示刺玫果提取物中金丝桃苷、芦丁、槲皮素及木犀草素的含量分别为 607.98,450.63,187.32,12.68 μg/g,结果见表 5。

2.2 体外活性测试

2.2.1 DPPH 自由基清除试验 从图 2 可以看出,刺玫果提取物、4 种黄酮类成分及复方配伍(金丝桃苷、芦丁、槲皮素及木犀草素按质量比为 47.9:35.5:14.8:1.0 进行混合得到 4 种黄酮类成分单体复方配伍)均具有一定的清除 DPPH 自由基活性。其中刺玫果提取物、芦丁、木犀草素及复方配伍的活性弱于 V_C,槲皮素及金丝桃苷活性强于 V_C。刺玫果提取物清除 DPPH 自由基的活性较阳性对照 V_C 虽然较弱,但是 IC₅₀ 较为接近,与孟永梅等对刺玫果提取物清除 DPPH 自由基活性的研究结果相当^[22],但弱于黄刺玫乙酸乙酯层萃取物^[23]。

2.2.2 ABTS 自由基阳离子清除试验 从图 3 可以看出,各样品均具有较强的清除 ABTS⁺ 的活性。其中槲皮素的清除能力最强,IC₅₀ 值为 29.5 μg/mL;复方配伍的清除能力最弱,对应 IC₅₀ 值为 196.2 μg/mL。槲皮素为五羟黄酮,其 2,3 位有双键,3,7 位有两个羟基,可通过单电子转移直接清除自由基^[24],所以具有极强的抗氧化活性。但由于刺玫果提取物中所含有的槲皮素较少,所以刺玫果提取物的抗氧化能力弱于槲皮素。

2.2.3 抗脂质过氧化试验 从图 4 可以看出,槲皮素具有较强的抗脂质过氧化作用,其活性强于 V_C,其 IC₅₀ 值为 0.058 2 mg/mL。其他成分抗脂质过氧化作用由强到

表4 加样回收率结果

Table 4 Result of recovery tests

目标成分	样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
金丝桃苷	306.5	305.2	605.3	97.90	98.02	0.80
	305.4	304.8	604.6	98.17		
	306.0	304.3	606.2	98.65		
	305.4	305.3	607.5	98.94		
	307.2	304.4	604.7	97.74		
	305.1	305.1	600.1	96.70		
芦丁	227.2	224.6	450.1	99.27	98.45	1.92
	226.4	225.3	444.5	96.82		
	226.8	224.4	450.6	99.71		
	226.4	225.6	442.8	95.93		
	227.7	225.3	455.2	100.98		
	226.1	224.9	453.2	98.00		
槲皮素	94.4	94.6	190.2	101.22	99.15	2.12
	94.1	95.1	188.9	99.73		
	94.3	96.2	187.4	96.78		
	94.1	93.8	184.4	96.23		
	94.6	93.4	188.5	100.47		
	94.0	94.6	189.0	100.46		
木犀草素	6.4	6.5	13.0	101.39	98.46	2.89
	6.4	6.4	12.7	98.46		
	6.4	5.8	12.0	96.99		
	6.4	6.6	13.1	102.37		
	6.4	6.2	12.4	96.01		
	6.4	6.3	12.4	95.52		

表5 样品测定结果

Table 5 Results of samples determination

目标成分	1	2	3	平均峰面积	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$
金丝桃苷	704.6	695.7	678.4	692.9	607.98
芦丁	449.4	453.9	448.2	450.5	450.63
槲皮素	405.1	391.1	388.8	395.0	187.32
木犀草素	52.9	53.3	52.6	52.9	12.68

弱的顺序为金丝桃苷、木犀草素、刺玫果提取物、芦丁及复方配伍。复方配伍组活性相较于刺玫果提取物明显降低,说明刺玫果提取物中应该含有其他具有较高体外活性的成分,由于天然产物结构中的酚羟基易被氧化成醌,从而具有较高体外抗氧化的活性,综合分析认为刺玫果提取物中应该含有一定量的多酚类成分。

2.2.4 清除亚硝酸盐及阻断亚硝酸胺合成活性试验 在体外模拟胃液条件下,分别考察了刺玫果提取物、4种黄酮类单体及复方配伍的清除亚硝酸盐活性和阻断亚硝酸胺合

成活性,试验结果分别见表6、7。

从试验结果可以看出,刺玫果提取物、4种黄酮类成分单体及复方配伍,均具有一定的清除亚硝酸盐及阻断亚硝酸胺合成活性。其中木犀草素清除亚硝酸盐的活性最强,强于 V_c 的清除活性;复方配伍阻断亚硝酸胺合成活性为样品中最好的,但弱于 V_c 。刺玫果提取物能有效阻断亚硝酸胺合成,其活性略低于复方配伍,而复方配伍的活性强于各单体本身,说明配伍后可能存在协同增效作用。

2.2.5 α -糖苷酶抑制活性试验 从表5中可以看出,刺

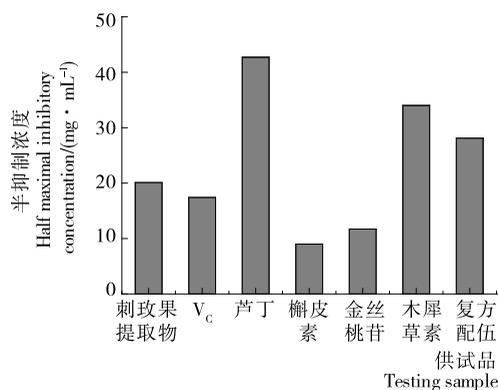


图 2 样品对 DPPH· 清除能力半抑制浓度比较

Figure 2 IC_{50} comparisons among clearance rate of DPPH· for the tested sample

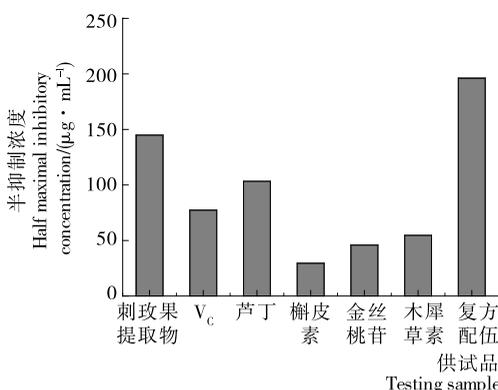


图 3 样品对 ABTS⁺· 清除能力半抑制浓度比较

Figure 3 IC_{50} comparisons among clearance rate of ABTS⁺· for the tested sample

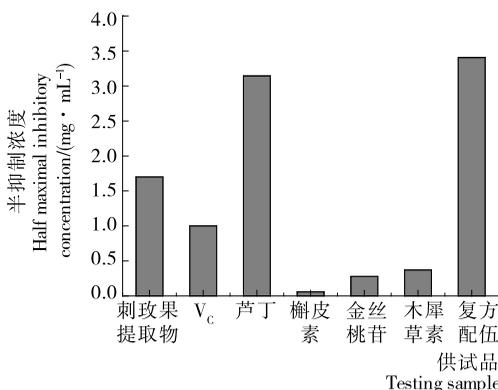


图 4 各成分抗脂质过氧化作用半抑制浓度比较

Figure 4 IC_{50} comparisons among clearance rate of anti-liposome peroxidation effect for the tested sample

玫果提取物、槲皮素及木犀草素的抑制活性优于阿卡波糖,且槲皮素的抑制活性最强;芦丁、金丝桃苷及复方配伍活性低于阿卡波糖,但也具有一定的抑制活性。虽然刺玫果提取物具有较强的体外降血糖活性,且活性强于

表 6 清除亚硝酸盐试验结果

Table 6 Results of sodium nitrite removal test

供试品	拟合方程	R^2	$IC_{50}/$ ($mg \cdot mL^{-1}$)
刺玫果提取物	$y=0.094 4x+33.402$	0.956 4	0.18
V _c	$y=1.372 4x+1.224$	0.984 5	0.36
芦丁	$y=0.005 4x+45.891$	0.990 3	0.76
金丝桃苷	$y=0.020 4x+29.070$	0.970 0	1.03
槲皮素	$y=0.060 7x+26.758$	0.982 3	0.38
木犀草素	$y=0.081 6x+26.731$	0.942 7	0.29
复方配伍	$y=0.019 3x+32.296$	0.980 7	0.92

表 7 阻断亚硝胺试验结果

Table 7 Test results of blocking nitrosamine

供试品	拟合方程	R^2	$IC_{50}/$ ($mg \cdot mL^{-1}$)
刺玫果提取物	$y=29.118x+10.590$	0.934 7	1.35
V _c	$y=33.553x+33.372$	0.945 2	0.50
芦丁	$y=20.631x+19.104$	0.987 2	1.50
金丝桃苷	$y=27.593x+5.824$	0.945 1	1.60
槲皮素	$y=30.896x+11.873$	0.978 1	1.23
木犀草素	$y=25.114x+2.502$	0.970 6	1.89
复方配伍	$y=19.914x+25.636$	0.931 3	1.22

表 8 抑制 α-葡萄糖苷酶试验结果

Table 8 Results of inhibiting enzyme activity of α-glucosidase

供试品	拟合方程	R^2	$IC_{50}/$ ($μg \cdot mL^{-1}$)
刺玫果提取物	$y=0.375 1x+30.539$	0.944 6	51.88
阿卡波糖	$y=0.234 5x+16.013$	0.969 0	144.93
芦丁	$y=0.092 7x+22.508$	0.955 2	296.57
金丝桃苷	$y=0.069 8x+37.485$	0.982 1	179.30
槲皮素	$y=0.564 8x+30.206$	0.935 8	35.05
木犀草素	$y=0.255 8x+34.329$	0.918 5	61.26
复方配伍	$y=0.185 7x+10.355$	0.971 6	213.49

桑叶总黄酮^[25]。槲皮素对 α-糖苷酶抑制活性,但刺玫果提取物中槲皮素的含量较低,所以刺玫果提取物中的降糖活性成分及机理还有待进一步研究。

3 结论

研究建立了 HPLC 同时测定刺玫果提取物中 4 种黄酮类成分单体含量的方法,采用该方法测定的刺玫果提取物中金丝桃苷、芦丁、槲皮素及木犀草素的含量分别为 607.98,450.63,187.32,12.68 μg/g,研究结果表明建立的

高效液相色谱含量测定方法具有良好的精密度,线性关系良好,结果准确可靠,可用于刺玫果提取物中黄酮类成分的含量测定。

大量研究^[26-27]证实刺玫果提取物具有较好的体外活性,但均未对提取物与其中的黄酮单体及单体复方配伍的体外活性进行对比研究。体外试验结果表明刺玫果提取物具有较好的体外抗氧化和降糖活性,在天然抗氧化剂、降血糖以及保健食品的开发与应用方面具有广阔的发展前景。刺玫果提取物能有效地清除亚硝酸盐,具有较好的阻断亚硝酸盐合成活性,可有效预防致癌、致畸及智力迟钝的发生^[28]。刺玫果提取物中含有较多的活性成分,试验只对其中的4种黄酮类化合物进行了定量分析,尚未对其做进一步的化学成分分离,其主要活性成分有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 王领弟,李艳荣,张雪峰,等.刺玫果的研究近况[J].承德医学院学报,2011,28(4):416-417.
- [2] 郝龙平,晏嘉泽,靳艳,等.刺玫果多糖的制备及其抗氧化活性[J].中成药,2016,38(12):2692-2696.
- [3] 怀雪,孟永海,吴丽红,等.刺玫果不同提取方式对小鼠抗疲劳抗衰老的实验研究[J].中医药信息,2018,35(4):17-20.
- [4] 王光函,姜鸿,张振秋,等.刺玫果药材中黄酮类成分测定[J].中成药,2011,33(4):710-712.
- [5] 杨莹莹,王晓燕,冯夏珍,等.主成分分析和聚类分析法研究刺玫果黄酮类成分 HPLC 指纹图谱[J].食品工业科技,2017,38(24):231-237.
- [6] 崔凤侠,王领弟,杜义龙,等.刺玫果提取物指纹图谱构建及4种成分含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(7):93-96.
- [7] 雷永平,钟方丽,王晓林,等.离子液体辅助提取刺玫果中木犀草素与金丝桃苷的工艺研究[J].经济林研究,2018(3):142-150.
- [8] 郭海欢,王晓林,钟方丽,等.高效液相色谱法同时测定刺玫果提取物中黄酮苷元槲皮素、山奈酚的含量[J].河南工业大学学报:自然科学版,2016,37(3):55-60.
- [9] 袁园,张潇,陈碧琼,等.草果总黄酮的提取及 DPPH 自由基清除活性研究[J].食品研究与开发,2017,38(15):63-68.
- [10] 李培源,霍丽妮,苏炜,等.总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS)法测定江南星蕨的抗氧化活性[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):162-164.
- [11] 李鸿飞,卿德刚,张娟,等.甘草渣中总黄酮清除 OH 自由基能力的研究[J].新疆医科大学学报,2015,38(2):182-183,186.
- [12] 夏光辉,李新华,王晓雅.不同加工处理对玉竹黄酮抗氧化活性的影响研究[J].食品科技,2018,43(3):181-185.
- [13] 刘可心,兰永强,杨娜,等.木蝴蝶总黄酮的提取及体外清除亚硝酸盐及阻断亚硝酸胺合成的研究[J].西北药学杂志,2015,30(6):669-674.
- [14] 薛璇玑,张新新,罗俊,等.柿叶与柿皮中黄酮含量及 α -糖苷酶抑制活性比较研究[J].中华中医药学刊,2017,35(3):599-601.
- [15] 杨扬,胡雪媛,王晓林,等.大孔吸附树脂纯化山刺玫果总黄酮的工艺研究[J].湖北农业科学,2015,54(2):412-415.
- [16] 李丽丽,孙泽宇,刘雄民,等.柠檬桉树脂总黄酮的提取纯化及抗氧化活性[J/OL].精细化工.[2019-03-22].
<https://doi.org/10.13550/j.jxhg.20180706>.
- [17] 陈飞,何先元,周卯勤,等.超声辅助提取四齿四棱草中总黄酮及其抗氧化活性[J].天然产物研究与开发,2016,28(1):96-101,70.
- [18] 李颖畅,孙建华,孟宪军.蓝莓叶总黄酮提取物的定性分析和抗油脂氧化[J].食品科学,2010,31(13):96-99.
- [19] 陶银华,石娜娜,高清山.海棠果提取液对亚硝酸盐清除作用的体外试验研究[J].现代农业科技,2018(2):253-254.
- [20] 盛玮,高翔,薛建平,等.黑糯米色素清除亚硝酸盐及阻断亚硝酸胺合成的研究[J].食品科学,2013,34(17):92-95.
- [21] 赖小燕,姜泽东,倪辉,等.茶花粉黄酮对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J].食品工业科技,2016,37(5):353-357.
- [22] 孟永海,怀雪,翟春梅,等.刺玫果提取物总黄酮含量以及体外抗氧化活性的测定[J].化学工程师,2018,32(11):26-28.
- [23] 任婧,杨官娥,柴秋彦,等.黄刺玫果提取物体外抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2017,38(18):11-15.
- [24] 马纳,李亚静,范吉平.槲皮素药理作用研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(8):221-224.
- [25] 薛长勇,刘英华,张荣欣,等.桑叶黄酮对 α -糖苷酶活性的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007(21):419-424.
- [26] 洪淳赞,金长炼,全成旭,等.体外刺玫果汁清除亚硝酸钠及阻断二甲基亚硝酸胺合成的效果[J].延边医学院学报,1992(2):94-97.
- [27] 高阳,姜会敏,霍雅玉,等.刺玫果的体外抗氧化活性研究[J].西北药学杂志,2014,29(3):226-230.
- [28] 贾长虹,常丽新,李月,等.月季叶黄酮对自由基和亚硝酸盐的清除作用研究[J].食品工业科技,2010,31(9):104-106.