

[药材资源]

3 种竹叶抗氧化有效成分分析

郭 静¹, 王浩然², 沈周媛¹, 张 彤¹, 袁秀荣¹, 丁 越^{1*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 徐州市夏桥社区卫生服务中心, 江苏 徐州 221011)

摘要: **目的** 研究3种竹叶中有效成分含量与其提取物抗氧化活性差异的相关性及其抗氧化活性基础物质。**方法** 采用HPLC法分别测定了7批淡竹叶、10批苦竹叶、9批竹叶中7种成分的含有量; DPPH法、ABTS法及FRAP法测定其抗氧化活性。以清除DPPH自由基的能力评价3种竹叶提取物的抗氧化活性, 并利用多元相关与回归分析方法探讨各成分含有量与提取物活性的关系。**结果** 淡竹叶的抗氧化活性最弱, 且与苦竹叶、竹叶比较均具有显著性差异($P<0.05$)。芹菜素、异荭草苷、荭草苷含有量分别与淡竹叶、苦竹叶、竹叶抗氧化活性呈显著性正相关($P<0.05$)。回归分析结果与相关性分析结果基本一致。**结论** 芹菜素、异荭草苷、荭草苷分别是淡竹叶、苦竹叶、竹叶中的主要抗氧化有效成分。

关键词: 淡竹叶; 苦竹叶; 竹叶; 抗氧化活性; 相关性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)11-2688-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.11.026

Analysis of antioxidant effective components in three kinds of bamboo leaves

GUO Jing¹, WANG Hao-ran², SHEN Zhou-yuan¹, ZHANG Tong¹, YUAN Xiu-rong¹, DING Yue^{1*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Xiaqiao Community Health Service Center of Xuzhou, Xuzhou 221011, China)

ABSTRACT: AIM To study the functional antioxidant compounds in three kinds of bamboo leaves and the correlations between the content of effective components and antioxidant activities of the extracts. **METHODS** The contents of seven components in seven batches of *Lophatherum gracile* Brongn., ten batches of *Pleioblastus amarus* (Keng) Keng f. and nine batches of *Phyllostachys nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle leaves were determined by HPLC, and DPPH, ABTS, FRAP assay were used to evaluate their antioxidant capacity. The antioxidant activities of extracts were evaluated by the capability of scavenging DPPH free radical, and the relationships between the contents of compounds and the activities of extracts were explored by multiple correlation and regression analysis. **RESULTS** The antioxidant activities of *L. gracile* leaves were the weakest, and they were significantly different from *P. amarus* and *P. nigra* ($P<0.05$). The contents of apigenin, isoorientin, and orientin were significantly positively correlated with antioxidant activities of *L. gracile*, *P. Amarus* and *P. nigra* leaves ($P<0.05$), respectively. Stepwise regression analysis results were the same as bivariate correlation analysis results. **CONCLUSION** Apigenin, isoorientin, and orientin are the main effective components in *L. gracile*, *P. Amarus*, and *P. nigra* leaves, respectively.

KEY WORDS: *Lophatherum gracile* Brongn.; *Pleioblastus amarus* (Keng) keng f.; *Phyllostachys nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle; antioxidant activity; correlation

收稿日期: 2018-11-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81872781); 上海中医药大学杏林青年学者(2017); 上海优秀学术带头人计划(18XD1403700); 上海中医药大学大学生科创项目第十一期科创项目(2018140)

作者简介: 郭 静(1993—), 女, 硕士生, 从事中药新药研究。Tel: 15026979994

* 通信作者: 丁 越, 研究员, 硕士生导师, 主要从事中药制剂及中药新药开发。Tel: (021) 51322325, E-mail: dingyue-2001@hotmail.com

网络出版日期: 2019-07-15

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.r.20190711.1327.004.html>

我国竹类资源丰富, 是世界上最主要的产竹国, 目前已收录了原产及少数引进的竹亚科植物43属707种、52变种及98变型^[1], 其中《中国中药资源志要》上列出了30余种药用竹种, 包括常见的禾本科淡竹叶属植物淡竹叶 *Lophatherum gracile* Brongn.、大明竹属植物苦竹 *Pleioblastus amarus* (Keng) keng f.、刚竹属植物淡竹(又名毛金竹) *Phyllostachys nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle 等^[2-3], 其中淡竹叶的茎叶称淡竹叶, 苦竹的叶称苦竹叶, 而淡竹等的叶则被统称为竹叶, 在我国拥有极其悠久的药用和食用历史。淡竹叶主要分布于长江以南各省区, 有清热泻火、除烦利尿的功效, 经炮制干燥后使用, 主治热病烦渴、口疮尿赤、热淋涩痛等症。其小块根亦作药用。苦竹叶分布于江苏、安徽、浙江、江西、福建、湖北、湖南、四川等地, 具有清心解毒、利尿明目之功效, 以嫩叶入药, 常用于热病烦渴、失眠、小便短赤、口疮、目痛、失音、烫火伤。竹叶主要分布于山东、河南及长江流域以南各地, 具有清热除烦、生津利尿之功效, 随时采鲜品入药, 多用于治疗热病烦渴、小儿惊痫、咳逆吐衄、小便短赤、口糜舌疮。其笋可供食用, 中药之“竹茹”“竹沥”一般取自本种。

近年来, 由于竹叶保健作用明显、安全性高, 常被开发成色、香、味俱佳的保健产品, 如竹叶酒、竹叶茶等, 具有提高机体免疫力、抑菌杀菌、清除氧自由基等功效^[4]。竹叶中含有大量的黄酮、酚酸、多糖、氨基酸及微量元素等, 其中以黄酮和酚酸居多, 是竹叶的主要活性物质^[5-7]。竹叶中黄酮类多属于黄酮碳苷和黄酮氧苷, 主要有苜蓿素、日当药黄素、木犀草素、木犀草苷、异荭草苷、荭草苷等; 酚酸类主要包括香豆酸、香草酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸等^[8-13]。现代药理研究证明, 竹叶具有抗氧化、抑菌、抗炎、抗肿瘤、降血脂等作用^[14-21], 其中黄酮、酚酸类表现出较强的药理活性, 具有显著的抗氧化活性。目前以竹叶黄酮、内酯和酚酸类为主的竹叶抗氧化剂(AOB)已列入国标 GB-2760, 被卫生部批准作为天然食品抗氧化剂使用, 在北美和亚洲等地区已安全应用于食品、保健品、医药、化妆品的开发^[22-24], 具有广阔发展前景。

竹叶具有显著的抗氧化活性, 市场应用极为广泛。但是, 由于竹叶品种繁多、性状相近、功效相似、成分复杂, 目前尚无系统有效的鉴别方法, 即

便是纳入《中国药典》的淡竹叶也缺少成分含有量测定的质量控制标准^[25-26], 更缺乏对其抗氧化活性的物质基础研究。本研究采用 DPPH 法、ABTS 法及 FRAP 法对其活性成分进行抗氧化活性研究, 根据其适用性、稳定性与可重复性优选出 DPPH 法用于3种竹叶提取物的抗氧化活性评价, 再通过指标成分含有量与提取物抗氧化活性的相关与回归分析, 初步探讨3种竹叶中的抗氧化活性物质基础, 以期对竹叶资源的合理利用和健康产品的有效开发奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1260 series 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); JA31002 电子分析天平(上海精天电子仪器有限公司); DHG-9053A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); XS105DU 电子天平(梅特勒-托利多中国); JP-300B 高速多功能粉碎机(浙江永康市久品工贸有限公司); SB5200D 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 微孔板分光光度计(美国 Bio Tek 公司)。

1.2 药物和试剂 1, 1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)(美国 Sigma 公司); L-抗坏血酸(国药集团化学试剂有限公司); 维生素 E 类似物(上海碧云天生物技术有限公司); 绿原酸、异荭草苷、荭草苷、异牡荆素、木犀草苷、木犀草素、芹菜素对照品(上海源叶生物科技有限公司)。FRAP 法总抗氧化能力检测试剂盒、ABTS 快速法总抗氧化能力检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。乙腈、甲醇(色谱纯, 安徽时联特种溶剂股份有限公司)。

实验中所用3种竹叶经上海中医药大学宋龙博士鉴定为禾本科植物淡竹叶 *Lophatherum gracile* Brongn. 的干燥叶及根茎、禾本科植物苦竹 *Pleioblastus amarus* (Keng) keng f. 的干燥叶、禾本科植物淡竹 *Phyllostachys nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle 等的干燥叶。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 分别取绿原酸、木犀草苷、木犀草素、芹菜素对照品约5 mg, 精密称定, 甲醇溶解并定容至10 mL量瓶中, 得到约0.5 g/L的对照品溶液, 同法配制约1 g/L的异荭草苷、荭草苷、异牡荆素对照品溶液。分别精密量取绿原酸1 mL、异荭草苷2.5 mL、荭草苷2 mL、异牡荆素

2 mL、木犀草苷 0.2 mL、木犀草素 0.2 mL、芹菜素 0.1 mL，混合后加 50% 甲醇定容至 10 mL，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.1.2 HPLC 待测样品 取各竹叶粉末（过 65 目筛）约 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别加入甲醇 25 mL，室温超声提取 30 min，冷却至室温，10 000 r/min 离心 10 min，取上清液，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.1.3 抗氧化活性待测样品 待测提取液的前处理方法同 HPLC 待测样品的制备，所得提取液还需经适当浓缩或稀释配制系列质量浓度待测液。另取绿原酸、异荭草苷、荭草苷、异牡荆素、木犀草苷、木犀草素、芹菜素对照品及 L-抗坏血酸、维生素 E 类似物阳性抗氧化物各约 1 mg，精密称定，分别加适量 DMSO 溶解，配制成 20 mmol/L 的对照品溶液，再分别加 50% 甲醇稀释成系列浓度的成分待测液。

2.2 7 种成分含有量测定 按 2015 年版《中国药典》中药质量标准研究制定要求，结合预试验中成分含有量、分离度、专属性等考察结果，最终确定以绿原酸、异荭草苷、荭草苷、异牡荆素、木犀草苷、木犀草素、芹菜素作为竹叶测定指标，并建立了一种可用于 3 种竹叶中 7 种成分含有量测定方法。色谱条件，Diamonsil Plus C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；柱温 30 ℃；流动相 0.1% 甲酸（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~2 min，10% B；2~30 min，10%~30% B；30~45 min，30%~70% B；45~55 min，70% B；55~60 min，70%~10% B）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 350 nm；进样量 10 μL。每个样品平行测定 3 次。

2.3 抗氧化活性测定

2.3.1 各成分对 DPPH 自由基的清除活性 新鲜配制 6.5×10⁻⁵ mol/L 的 DPPH 甲醇溶液，在 96 孔板中分别加入 DPPH 甲醇溶液 100 μL，再取不同浓度的成分待测液 10 μL 加入，摇匀后加入甲醇 140 μL，于室温避光反应 1 h，在 517 nm 处测定吸光度为 A_{样品}；未加待测液的空白 DPPH 溶液（10 μL 甲醇）的吸光度为 A_{空白}。每份样品各平行测定 3 次，取平均值。样品对 DPPH 的清除率可表示为

$$\text{清除率} = [1 - (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$$

采用 SPSS v21.0 软件，以成分浓度和相应的清除率计算其 IC₅₀，单位 mmol/L。

2.3.2 各成分对 ABTS 自由基的清除活性 根据

ABTS 试剂盒说明书配制 ABTS 工作液，稀释过氧化氢和过氧化物酶溶液，以维生素 E 类似物为标准品配制系列浓度溶液，构建标准曲线。96 孔板中先加入 20 μL 过氧化物酶工作液，再加入 10 μL 各成分待测液和 ABTS 工作液 170 μL 轻轻混匀，室温孵育 6 min 后测定 414 nm 处吸光度，根据标准曲线计算待测成分的抗氧化值。

2.3.3 各成分对铁离子的还原能力 按照 FRAP 试剂盒说明书配制适量的 FRAP 工作液，并以 FeSO₄·7H₂O 为标准品配制系列浓度溶液，构建标准曲线。96 孔板中先加入 180 μL FRAP 工作液，再加入 5 μL 各成分待测液混匀，37 ℃ 孵育 3~5 min 后测定 593 nm 处吸光度，根据标准曲线计算其抗氧化值。

2.3.4 各竹叶提取物对 DPPH 自由基的清除活性 新鲜配制浓度为 6.5×10⁻⁵ mol/L 的 DPPH 甲醇溶液，在 96 孔板中分别加入 DPPH 甲醇溶液 100 μL，再取不同浓度的待测提取液 10 μL 加入，摇匀后加入甲醇 140 μL 于室温避光反应 1 h，在 517 nm 处测定吸光度并按上述公式计算待测提取液对 DPPH 自由基的清除率，并采用 SPSS 21.0 软件计算其 IC₅₀，单位 mg/mL。

3 结果

3.1 不同竹叶中 7 种成分的含有量测定及抗氧化活性测定

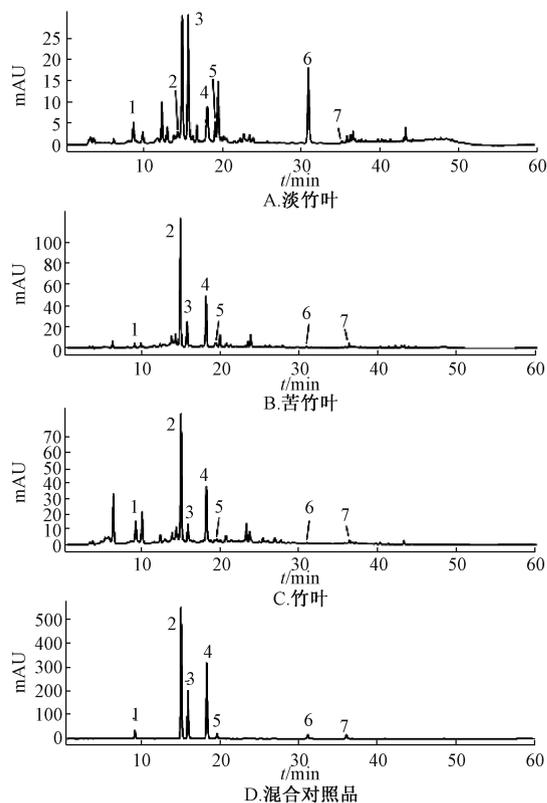
3.1.1 线性关系考察 取“2.1.1”项下混合对照品溶液加 50% 甲醇逐次稀释 2 倍，注入 HPLC 测定，以色谱峰峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）进行回归。结果见表 1。7 种成分及其在不同竹叶样品中的高效液相色谱图见图 1。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various components

成分	线性方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
绿原酸	Y = 13.39X + 8.37	0.999 9	1.15~73.80
异荭草苷	Y = 29.14X + 23.96	0.999 9	1.85~118.40
荭草苷	Y = 17.18X + 5.86	0.999 9	0.85~54.20
异牡荆素	Y = 26.87X + 22.16	0.999 9	1.74~111.40
木犀草苷	Y = 28.32X + 2.35	1.000 0	0.32~20.24
木犀草素	Y = 39.79X - 43.71	0.999 8	1.54~24.72
芹菜素	Y = 47.77X - 16.63	0.999 6	1.28~10.22

3.1.2 不同竹叶中 7 种成分的含有量及其抗氧化活性 分别测定了 7 批淡竹叶、10 批苦竹叶和 9 批竹叶提取物及 7 种成分的抗氧化活性，结果见表



1. 绿原酸 2. 异荭草苷 3. 荭草苷 4. 异牡荆素 5. 木犀草苷 6. 木犀草素 7. 芹菜素
1. chlorogenic acid 2. isoorientin 3. orientin 4. isovitexin
5. cynaroside 6. luteolin 7. apigenin

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various components

表2 各成分的抗氧化活性及相关性分析结果

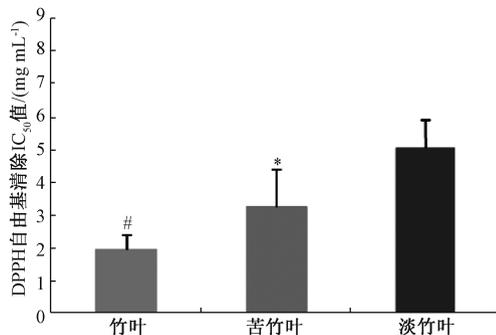
Tab. 2 Results of antioxidant activities of various components and correlation analysis

序号	成分	3种方法抗氧化活性测定结果			r		
		ABTS	FRAP	DPPH/(IC ₅₀ , mmol·L ⁻¹)	竹叶	苦竹叶	淡竹叶
1	绿原酸	1.37±0.02	2.20±0.00	1.04±0.04	-0.023	-0.508**	-0.169
2	异荭草苷	1.05±0.02	2.78±0.01	0.81±0.01	-0.171	-0.643**	-0.181
3	荭草苷	0.51±0.02	1.68±0.00	0.84±0.02	-0.501**	-0.120	-0.133
4	异牡荆素	-	0.14±0.00	14.50±0.04	-0.193	-0.227	-0.293
5	木犀草苷	0.87±0.02	2.77±0.01	0.43±0.00	-0.164	-0.228	0.169
6	木犀草素	0.97±0.01	2.32±0.00	0.42±0.01	0.021	0.431*	0.139
7	芹菜素	-	0.10±0.00	-	-0.026	-0.274	-0.491*
8	维生素E类似物	1.00±0.00	1.78±0.01	0.97±0.04	-	-	-
9	L-抗坏血酸	-	1.92±0.01	0.93±0.02	-	-	-

注：-表示未检测出。* P<0.05 表示两两比较相关性显著；** P<0.01 表示两两比较相关性极显著；IC₅₀表示清除50% DPPH 自由基时对应的成分浓度

淡竹叶提取物抗氧化活性呈显著正相关 (P<0.05)，绿原酸、异荭草苷含有量与苦竹叶提取物抗氧化活性呈极显著正相关 (P<0.01)；荭草苷含有量与竹叶提取物抗氧化活性呈极显著正相关 (P<0.01)，即绿原酸、异荭草苷、荭草苷和芹菜素含有量与3种竹叶提取物抗氧化活性具有显著的

2~3，结果均表示为 ($\bar{x}\pm s$)。不同竹叶提取物清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 均值比较结果如图 2。其结果表明竹叶提取物的抗氧化活性最强，苦竹叶次之，淡竹叶最弱，竹叶和苦竹叶清除 DPPH 自由基的能力约为淡竹叶的 2~3 倍，且淡竹叶的抗氧化活性与竹叶、苦竹叶比较均具有显著的统计学差异 (P<0.05)。



注：与淡竹叶比较，# P<0.05，与淡竹叶比较，* P<0.05

图2 3种竹叶提取物清除 DPPH 自由基的能力

Fig. 2 DPPH free radical scavenging activities of the extracts from three kinds of bamboo leaves

3.2 双变量相关性分析

3.2.1 双变量相关性分析 采用双变量相关性分析分别对3个品种竹叶中7种成分的含有量与对应品种提取物的抗氧化活性的相关性进行了分析，分析结果见表2所示。其结果表明，芹菜素含有量与

相关性 (P<0.05)。但由于提取物活性通常是各成分总体作用的结果，仅通过相关性不能直观的根据各成分的含有量预测样品的抗氧化活性，还需进一步回归分析。

3.2.2 逐步回归分析 利用 SPSS v21.0 统计软件对成分含有量数据及提取物清除 DPPH 自由基的

表3 各成分含有量测定结果及其抗氧化活性 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab. 3 Results of content determination of various components and their antioxidant activities ($\bar{x}\pm s, n=3$)

成分	来源	含有量/(mg·g ⁻¹)							IC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)
		绿原酸	异荜草苷	荜草苷	异牡荆素	木犀草苷	木犀草素	芹菜素	
淡竹叶	安徽	0.016 9±0.000 9	0.001 4±0.000 0	-	0.002 2±0.000 0	-	0.013 0±0.000 1	0.010 8±0.000 0	4.09±0.84
	四川	0.007 5±0.000 2	0.007 1±0.000 1	0.326 0±0.003 8	0.003 9±0.000 0	0.092 6±0.000 4	0.003 3±0.000 0	0.011 4±0.000 2	6.69±0.21
	浙江	0.008 1±0.000 3	0.003 7±0.000 1	0.214 1±0.005 0	0.000 3±0.000 0	0.021 8±0.001 5	0.000 6±0.000 0	0.006 5±0.000 1	4.51±0.03
	广东	0.061 5±0.000 6	0.007 6±0.000 2	0.242 2±0.006 8	0.004 6±0.000 2	0.020 3±0.001 2	0.000 4±0.000 0	0.007 1±0.000 1	2.10±0.06
	浙江	0.026 3±0.001 0	0.022 4±0.000 7	0.002 6±0.000 0	0.005 6±0.000 1	0.017 7±0.000 8	0.054 1±0.000 3	-	10.17±0.10
	浙江	0.175 5±0.003 4	0.083 3±0.007 3	0.006 0±0.000 2	0.004 2±0.000 1	0.048 1±0.002 9	0.060 5±0.000 3	0.023 1±0.000 0	4.89±0.58
	河北	0.035 6±0.000 7	0.103 1±0.010 1	0.001 5±0.000 1	0.051 3±0.003 7	0.038 5±0.002 6	0.087 7±0.001 6	0.023 6±0.000 0	3.06±0.07
	河北	0.175 9±0.016 4	1.923 0±0.032 1	0.579 6±0.010 6	0.897 1±0.014 8	0.062 6±0.001 1	0.021 6±0.000 2	0.013 3±0.000 1	1.25±0.12
苦竹叶	浙江	-	0.061 9±0.002 0	0.017 4±0.000 4	-	-	0.017 8±0.000 2	0.006 6±0.000 6	2.11±0.06
	广东	0.195 1±0.002 9	0.440 3±0.017 3	0.168 4±0.003 4	0.098 9±0.003 4	0.013 2±0.000 4	0.016 7±0.000 2	0.007 5±0.000 3	2.18±0.01
	四川	-	0.052 5±0.001 1	0.326 5±0.002 8	0.000 4±0.000 0	0.017 0±0.000 4	0.049 0±0.000 0	-	3.09±0.18
	四川	-	0.340 7±0.008 0	0.107 3±0.000 6	0.026 7±0.000 6	0.101 7±0.002 4	0.049 5±0.000 1	0.030 0±0.000 1	3.25±0.56
	江苏	0.012 2±0.001 5	0.310 6±0.012 0	-	0.046 3±0.001 2	0.008 6±0.000 5	0.018 6±0.000 2	-	3.46±0.39
	四川	-	0.078 8±0.003 1	0.473 7±0.057 1	0.016 0±0.000 5	0.016 4±0.000 8	0.053 0±0.000 2	-	3.67±0.25
	四川	0.030 4±0.000 1	0.102 8±0.001 7	0.571 4±0.012 1	0.001 4±0.000 1	0.018 8±0.000 3	0.053 8±0.000 2	-	3.89±0.07
	江西	0.104 2±0.002 8	0.307 8±0.008 6	0.136 8±0.004 9	0.838 0±0.017 6	0.021 2±0.000 2	0.013 5±0.000 1	0.011 8±0.000 1	4.48±0.08
	四川	-	0.035 2±0.001 8	0.226 7±0.007 5	0.002 5±0.000 0	0.011 3±0.000 3	0.049 0±0.000 0	-	5.07±0.58
	竹叶	安徽	0.339 6±0.011 7	0.488 6±0.002 5	0.180 0±0.003 0	0.390 8±0.003 3	0.000 5±0.000 0	0.015 3±0.000 0	0.018 4±0.000 1
江西		0.442 1±0.008 5	0.304 0±0.007 2	0.119 1±0.004 6	0.404 2±0.005 8	0.005 1±0.000 5	0.015 5±0.000 0	0.014 1±0.000 3	2.02±0.08
安徽		0.449 0±0.041 4	0.185 1±0.006 1	0.049 5±0.003 9	0.347 2±0.019 9	0.015 3±0.001 4	0.014 3±0.000 6	0.012 9±0.000 3	1.80±0.02
浙江		0.195 0±0.001 4	0.607 3±0.006 4	0.288 3±0.004 4	0.317 5±0.002 3	0.009 4±0.000 4	0.049 2±0.000 1	0.026 4±0.000 0	1.59±0.09
浙江		0.116 7±0.005 1	0.863 3±0.037 6	0.224 1±0.009 7	0.386 1±0.008 1	0.012 1±0.000 5	0.050 8±0.000 1	0.032 0±0.000 4	1.65±0.08
浙江		0.122 6±0.003 8	1.065 4±0.050 1	0.377 5±0.007 9	0.480 8±0.014 7	0.011 7±0.000 1	0.049 8±0.000 1	0.033 6±0.000 9	1.85±0.03
四川		0.032 0±0.000 2	0.269 2±0.026 2	0.015 2±0.001 4	0.033 2±0.002 9	0.005 7±0.000 1	0.052 0±0.000 2	0.025 5±0.000 1	2.63±0.07
浙江		0.255 7±0.002 4	0.414 3±0.013 1	0.269 3±0.008 4	0.301 6±0.010 6	0.065 6±0.001 0	0.051 6±0.000 1	0.028 0±0.000 2	1.90±0.14
浙江		0.134 7±0.003 2	0.012 5±0.000 2	0.202 3±0.009 3	0.012 4±0.000 2	0.002 5±0.000 2	0.000 4±0.000 0	0.007 6±0.000 1	1.65±0.03

注: -表示未检测出。IC₅₀表示清除 50% DPPH 自由基时所对应的提取物浓度

抗氧化活性进行逐步回归分析 (“Entry” = “0.15”, “Removal” = “0.20”)^[27-28], 结果显示, 淡竹叶中荜草苷、芹菜素含有量与其提取物清除 DPPH 自由基的能力呈极显著正相关 ($P < 0.01$); 苦竹叶中异荜草苷含有量与其提取物清除 DPPH 自由基的能力呈极显著正相关 ($P < 0.01$); 竹叶中荜草苷含有量与其提取物清除 DPPH 自由基的能力呈极显著正相关 ($P < 0.01$)。综合前述回归分析与相关性分析结果, 初步确定淡竹叶、苦竹叶、竹叶提取物中的主要抗氧化活性成分, 其中淡竹叶抗氧化活性主要与芹菜素相关; 苦竹叶抗氧化活性主要与异荜草苷相关; 而竹叶抗氧化活性主要

与荜草苷相关。此外, 本研究还对各指标成分含有量、含有量之和共 8 个自变量与因变量提取物抗氧化值 (IC₅₀) 进行了回归分析, 初步得到了不同品种竹叶抗氧化活性与各成分含有量的回归方程, 见表 4, 其中 A 表示提取物清除 DPPH 自由基活性, C_n 表示相应成分的含有量。将各成分含有量数据代入表中的回归方程进行抗氧化活性的预测和模拟, 见图 3。结果表明, 所观测的抗氧化活性值与实测的抗氧化活性值趋势基本一致, 均呈正相关, 且淡竹叶回归方程预测效果最好 ($R = 0.984$), 有望经过后续进一步的试验验证, 应用于淡竹叶抗氧化活性的快速推测。

表4 成分含有量与提取物抗氧化 IC₅₀ 值的逐步回归结果

Tab. 4 Results of stepwise regression analysis between content of components and antioxidant IC₅₀ values of extracts

样品	标准化回归系数								逐步回归方程
	绿原酸(1)	异荜草苷(2)	荜草苷(3)	异牡荆素(4)	木犀草苷(5)	木犀草素(6)	芹菜素(7)	含有量之和(8)	
淡竹叶	-0.038	0.124	-1.152 **	-0.101	1.182 **	0.197	-1.201 **	0.013	$A = 8.416 - 21.645C_3 - 14.814C_4 + 104.999C_5 - 366.902C_7$
苦竹叶	-0.316	-1.903 **	-0.229	0.327	0.063	0.027	-0.008	1.549 **	$A = 3.28 - 4.689C_1 - 3.867C_2 + 1.731C_8$
竹叶	-0.047	0.041	-0.686 **	-0.034	-0.100	-0.842	0.344	-0.043	$A = 2.066 - 2.291C_3 + 14.571C_7$

注: * $P < 0.05$ 表示两两比较回归效果显著; ** $P < 0.01$ 表示两两比较回归效果极显著; A 表示提取物清除 DPPH 自由基活性, C_n 表示某成分的含有量

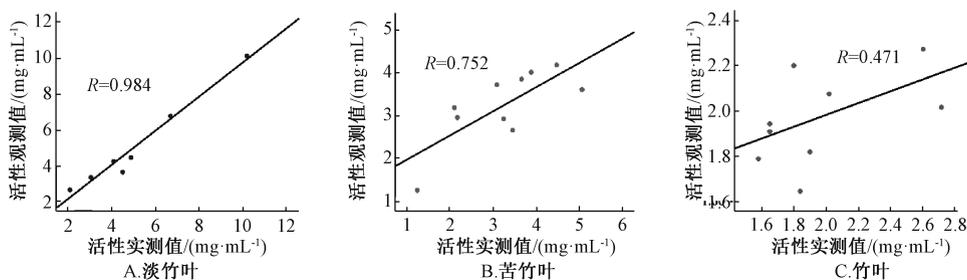


图3 回归方程模拟结果

Fig. 3 The simulation results of regression equations

4 讨论

研究中常用的抗氧化活性评价方法为 DPPH 自由基清除法, ABTS 自由基清除法, 铁离子还原能力 (FRAP) 法及羟自由基清除法等^[29-31]。本研究分别以 ABTS 法、DPPH 法和 FRAP 法考察了 3 种竹叶 7 种成分的抗氧化活性, 其中 ABTS 法测定结果表明绿原酸抗氧化能力最强, 而芹菜素最弱; DPPH 法结果表明异荜苳苳抗氧化活性最强而芹菜素最弱; FRAP 法结果表明木犀草素抗氧化活性最强而芹菜素最弱。3 种方法测定结果均表明 7 种成分中以芹菜素抗氧化活性最弱, 但对其中成分较强的化合物的抗氧化活性测定结果不尽相同, 可能与 3 种测定方法的工作机理、测试环境、待测物在测试溶剂中的溶化性等相关。经实验研究及结果分析发现, FRAP 法中以 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为对照品, 其反应体系主要为水, 而黄酮类难溶于水, 在水环境下会析出沉淀, 影响实验测定结果, 故 FRAP 法不适用于竹叶提取液中黄酮类的抗氧化活性测定; ABTS 法测定过程中需要使用过氧化物酶, 而过氧化物酶属蛋白质类, 易受到有机试剂的影响而失活。本研究在预试验中采用 ABTS 法测定提取物的抗氧化活性时, 结果较不稳定, 重复性差, 故 ABTS 法不适合作为本实验中提取物的抗氧化活性评价方法; 而 DPPH 法中的 DPPH 本身是种很稳定的氮中心的自由基, 易溶于甲醇、乙醇, 其体系弹性更大, 能更好的使竹叶中的主要成分充分发挥清除自由基的作用, 且 DPPH 法稳定性好, 可重复性强, 数据准确、可靠。因此, 本研究最终选用了 DPPH 法。

近年来, 学者们提出了中药谱效学的研究思路, 并在采用数据分析技术预测成分药效、阐明各成分对药效贡献率、寻找主要活性成分方面取得了一定的进展^[32]。本研究采用双变量相关分析与多元回归分析 2 种常用方法将样品中 7 种成分含有量

与 3 种竹叶提取物抗氧化活性相关联, 找出其中与活性密切相关的变量, 初步阐明了其药效物质基础, 并通过回归方程对样品的抗氧化活性进行了模拟, 基本与实测结果趋势保持一致, 有望通过该方程的进一步验证, 快速推测竹叶样品的抗氧化活性, 为 3 种竹叶原药材的快速筛选与健康产品的合理开发提供参考。

参考文献:

- [1] 易同培. 中国竹类图志[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [2] 王淑英, 汤 锋, 岳永德. 竹类植物的化学成分及药理活性研究进展[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(3): 149-156.
- [3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [4] 王 娟, 施 蕊, 杨宇明, 等. 一种竹叶饮料及其制作方法: 中国, CN106721778A[P]. 2017-05-31.
- [5] 张慧艳, 汤 锋, 王春梅, 等. 淡竹叶化学成分研究[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(4): 540-542.
- [6] 孙武兴, 李 铎, 李 宁, 等. 毛金竹叶提取物化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(1): 39-43.
- [7] 魏 琦. 苦竹属竹叶化学成分及其生物活性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.
- [8] 陈 烨. 淡竹叶化学成分与药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(13): 50-52.
- [9] 潘智然, 王腾华, 朱首伦, 等. 基于超高压液相色谱-高分辨多级质谱联用技术的中药淡竹叶化学成分分析[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(3): 300-306.
- [10] 杨 敏, 张 盛, 王玄源, 等. 竹叶黄酮中的抗炎有效成分及其对不同小鼠炎症模型的药效学研究[J]. 湖北中医杂志, 2017, 39(3): 1-5.
- [11] 张 盛. 竹叶黄酮的抗炎作用及物质基础研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [12] 邵 莹. 基于心肌缺血适应信号转导通路的淡竹叶药效物质基础研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [13] 王淑英. 杜竹属竹叶化学成分研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.
- [14] 钱俊青, 戴承恩, 李尚谦, 等. 竹叶黄酮降血脂活性研究

- [J]. 浙江工业大学学报, 2014, 42(5): 496-498, 548.
- [15] 张 师. 竹叶黄酮对 CCl_4 所致小鼠肝损伤的保护作用及抗氧化机制研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- [16] 栾芳菲. 竹叶提取物和杜仲提取物体外抗癌活性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2016.
- [17] 潘 月, 雷美玲, 吕兆林, 等. 竹叶多糖分离纯化及抗氧化能力的研究[J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(3): 148-152.
- [18] Liu J, Zhu M, Feng C, *et al.* Bamboo leaf extract improves spatial learning ability in a rat model with senile dementia[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(7): 593-601.
- [19] Oh J, Jo H, Cho A R, *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas[J]. *Food Control*, 2013, 31(2): 403-409.
- [20] 杨 萍, 刘洪波, 潘佳佳, 等. 不同季节毛竹竹叶挥发油成分与抑菌效果比较研究[J]. 核农学报, 2015, 29(2): 313-320.
- [21] 邵 莹, 吴启南, 周 婧, 等. 淡竹叶黄酮对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 241-247.
- [22] 王正云, 唐劲松, 祁兴普. 竹叶抗氧化物结合气调包装对鱼丸品质的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(23): 319-322.
- [23] 张晓丽, 马海霞, 杨贤庆. 竹叶抗氧化物结合不同包装方式对鲜罗非鱼片保鲜效果的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(11): 256-261.
- [24] 王 楠. 具有美白和抑菌双重功效的竹叶黄酮纳米粒子[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [25] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 328.
- [26] 蔡慧卿, 詹志来, 郑丽香, 等. 中药淡竹叶质量标准研究概况[J]. 中医学报, 2017, 32(12): 2430-2434.
- [27] 皮子凤, 侯广月, 艾 军, 等. 化学计量学方法研究北五味子中木脂素含有量与抗氧化活性的相关性[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1133-1139.
- [28] 胡金伟, 尹文强, 赵延奎, 等. 慢性病患者优先使用基本药物的影响因素分析[J]. 中国全科医学, 2015, 18(19): 2269-2273.
- [29] 曾维才, 石 碧. 天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J]. 化工进展, 2013, 32(6): 1205-1213, 1247.
- [30] 张新国, 刘英娟, 曹心张, 等. 22种常见抗肿瘤中草药的抗氧化活性研究[J]. 中医学报, 2015, 43(5): 31-35.
- [31] 王雪梅, 吴汉平, 汪晓敏, 等. 16种中草药提取物的抗氧化活性研究[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2015, 39(2): 74-80.
- [32] 吕邵娃, 董书羽, 郭玉岩, 等. 数据分析技术在中药谱效关系中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 226-230.

HPLC 法同时测定不同品种红花中 4 种黄酮类

马梦雪, 吴士筠, 李 刚, 覃 瑞, 董 翔, 刘 虹*

(中南民族大学生命科学院, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北重点实验室, 湖北 武汉 430074)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定不同红花 *Carthamus tinctorius* L. (Safflower) 中羟基红花黄色素 A、芦丁、木犀草素、槲皮素的含量。方法 红花 60% 甲醇提取物的分析采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.5% 乙酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 300 nm。结果 羟基红花黄色素 A、芦丁、木犀草素、槲皮素分别在 17.36~282 ($R^2=0.9997$)、1.68~181.84 ($R^2=0.9995$)、0.52~8.71 ($R^2=0.9995$)、5.17~94.68 ($R^2=0.9994$) μg/mL 的范围内线性关系良好, 平均加样回收率 96.83%~98.39%, RSD 1.13%~2.36%。结论 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于红花的质量控制。

关键词: 红花; 羟基红花黄色素 A; 芦丁; 木犀草素; 槲皮素; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)11-2694-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.11.027

收稿日期: 2018-11-12

基金项目: 国家科学技术部科技基础性工作专项重点项目资助 (2014FY110100); 湖北省科技条件平台建设专项 (2017BEC014); 湖北重点实验室建设基金 (2018BFC360)

作者简介: 马梦雪 (1993—), 女, 硕士生, 从事植物细胞遗传研究。E-mail: mmengxue93@163.com

* 通信作者: 刘 虹 (1977—), 女, 副教授, 从事植物分类学研究。E-mail: 15102751466@163.com