

王秦军, 王翠萍, 刘建欣, 等. 箭叶淫羊藿提取物活性成分、抗氧化及酶抑制活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(12): 354-360.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100171

WANG Qinjun, WANG Cuiping, LIU Jianxin, et al. Analysis of Active Constituents, Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of *Epimedium sagittatum* Extract[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(12): 354-360. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100171

· 营养与保健 ·

箭叶淫羊藿提取物活性成分、抗氧化及酶抑制活性分析

王秦军¹, 王翠萍², 刘建欣², 陈琛^{1*}

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院/陕西省资源生物重点实验室/陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心/秦巴生物资源与生态环境省部共建国家重点实验室(培育), 陕西汉中 723000;
2. 汉中天然谷生物科技有限公司, 陕西汉中 723000)

摘要:目的: 研究评价箭叶淫羊藿提取物的活性成分、含量及体外生物活性。方法: 通过分光光度法测定箭叶淫羊藿提取物总多酚、总黄酮、总多糖及原花青素含量; 利用高效液相色谱 (HPLC) 法测定提取物 5 种黄酮类化合物含量; 通过清除 DPPH、OH、ABTS⁺ 自由基法评价了箭叶淫羊藿提取物的抗氧化活性, 并测定了对胰脂肪酶、酪氨酸酶、乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶的抑制作用。结果: 箭叶淫羊藿提取物中总多酚、总黄酮、总多糖及原花青素含量分别为 105.60±0.92、70.09±0.75、18.45±1.27、8.79±0.13 mg/g; HPLC 测定 5 种黄酮类成分中淫羊藿苷含量最高、朝藿定 C 次之, 分别为 266.16±4.22 和 43.35±0.67 mg/g, 宝藿苷 I 含量最少, 为 2.54±0.07 mg/g; 箭叶淫羊藿提取物对 DPPH、·OH、ABTS⁺ 半数清除浓度 (IC₅₀) 分别为 4.43±0.40、2.83±0.09、2.04±0.08 mg/mL, 清除能力呈一定的浓度依赖性; 同时, 箭叶淫羊藿提取物对脂肪酶、酪氨酸酶、乙酰/丁酰胆碱酯酶的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 5.97±0.04、2.27±0.23、9.27±0.07、7.41±0.26 mg/mL。结论: 箭叶淫羊藿提取物活性物质丰富, 对 DPPH、OH、ABTS⁺ 自由基具有较好的清除作用, 对胰脂肪酶、酪氨酸酶、乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶有一定的抑制作用。

关键词: 淫羊藿, 活性成分, 含量, 自由基清除, 酶抑制

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)12-0354-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100171



本文网刊:

Analysis of Active Constituents, Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of *Epimedium sagittatum* Extract

WANG Qinjun¹, WANG Cuiping², LIU Jianxin², CHEN Chen^{1*}

(1. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology/Shaanxi Key Laboratory of Resource Biology/Collaborative Innovation Center for Comprehensive Development of Biological Resources in Qinba Mountain area of Southern Shaanxi/Key Laboratory of Qinba Biological Resources and Ecological Environment of Shaanxi Province (Cultivation), Hanzhong 723000, China;
2. Hanzhong Natural Valley Biotechnology Co., Ltd., Hanzhong 723000, China)

Abstract: Objective: To study and evaluate the active components, contents and *in vitro* biological activities of *Epimedium sagittatum* extract. Methods: Contents of total polyphenols, total flavonoids, total polysaccharides and proanthocyanidins in the extract of *Epimedium sagittatum* were determined by spectrophotometry, the contents of five flavonoids in the extract were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), the antioxidant activity of *Epimedium sagittatum* extract was evaluated by scavenging DPPH, OH, ABTS⁺ free radical method, and the inhibitory effects on pancreatic lipase,

收稿日期: 2021-10-18

基金项目: 国家高端外国专家项目 (GDT20186100426); 陕西省重点研发项目 (2020NY-139)。

作者简介: 王秦军 (1997-), 男, 硕士, 研究方向: 天然产物研究与开发, E-mail: w13060457912@163.com。

* 通信作者: 陈琛 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物研究与开发, E-mail: cchen2008@yahoo.com。

tyrosinase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase were determined. Results: The contents of total polyphenols, total flavonoids, total polysaccharides and proanthocyanidins in the extract of *Epimedium sagittatum* were 105.60 ± 0.92 , 70.09 ± 0.75 , 18.45 ± 1.27 , 8.79 ± 0.13 mg/g, respectively. HPLC detected five kinds of flavonoids in the extract. Among them, Icariin and epimedin C contained the highest content, which were 266.16 ± 4.22 and 43.35 ± 0.67 mg/g, respectively. Baohuoside I contained the least, which was 2.54 ± 0.07 mg/g. *Epimedium sagittatum* extracts had certain free radical scavenging ability. The half-clearing concentrations (IC_{50}) of *Epimedium sagittatum* extracts on DPPH \cdot , \cdot OH, and ABTS $^{+}$ were 4.43 ± 0.40 , 2.83 ± 0.09 and 2.04 ± 0.08 mg/mL, respectively. The scavenging ability was concentration-dependent. Meanwhile, The IC_{50} of *Epimedium sagittatum* extract on lipase, tyrosinase and acetyl/butyrylcholinesterase were 5.97 ± 0.04 , 2.27 ± 0.23 , 9.27 ± 0.07 and 7.41 ± 0.26 mg/mL, respectively. Conclusion: *Epimedium sagittatum* extracts was rich in active substances, had a good scavenging effect on DPPH, OH, ABTS $^{+}$ free radicals, and had certain inhibition on pancreatic lipase, tyrosinase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase effect.

Key words: *Epimedium*; active ingredients; content; free radical scavenging; enzyme inhibition

淫羊藿(*Epimedium brevicornu* Maxim.)是我国名贵滋补中药材之一,是保健食品原料之一,民间常用其根叶制作保健酒、保健茶及药膳等保健品^[1]。淫羊藿始载于《神农本草经》,味辛、甘、温,主补肾阳、祛风湿。临床常用其治疗阳痿遗精、风湿及痉挛等病状^[2-3]。临床上,淫羊藿在骨质疏松症、乳腺疾病及生殖系统疾病治疗方面有良好的疗效^[4]。黄酮类化合物是淫羊藿主要的药理成分,主要有淫羊藿苷、淫羊藿素、朝藿定、淫羊藿次苷等^[5]。化学研究表明,淫羊藿中分离出黄酮、多糖、精油、植物甾醇、酚酸和生物碱等 260 多种成分^[6]。淫羊藿的多种成分,易受到产地、加工方式等多重因素影响,影响临床药效。药典记录的淫羊藿品种有朝鲜淫羊藿、心叶淫羊藿、巫山淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿。箭叶淫羊藿为淫羊藿属分布最广的品种,其最早被药典收录且被历版药典收载^[7-9]。

现代生活方式的改变及人口老龄化使肥胖、糖尿病、高血压及阿尔茨海默症等发病率急速增加,中草药提取物能够预防或治疗以上疾病。脂肪酶抑制剂可以降低膳食脂肪的水解,降低人体吸收脂肪效率,以此缓解肥胖及高血脂症等症状。胆碱酯酶抑制剂可以抑制胆碱酯酶与乙/丁酰胆碱结合,从而调节老年痴呆患者的中枢神经胆碱功能;酪氨酸酶是已知唯一与黑色素合成相关的酶,与人类的色素障碍性疾病、黑色素瘤、白化病和老年痴呆等疾病的发生与治疗有直接关联^[10-12]。淫羊藿的多种药理活性使其成为热点研究对象。谭莉等^[13]和席晓志等^[14]分别优化了淫羊藿叶多糖及淫羊藿的提取工艺,并对其抗氧化活性进行了评价;张运辉等^[15]研究了淫羊藿治疗阿尔兹海默症的作用靶点及通路,明确了其作用机制;Wang 等^[16]的研究结果显示淫羊藿苷可作为治疗黑色素瘤辅助治疗剂;同时,Wang 等^[17]研究了去甲基淫羊藿苷对脂肪生成的影响及其体外潜在机制。前人对于淫羊藿的研究报道较多,但主要集中于对其提取物及黄酮类成分进行定量分析、体外抗氧化能力评价及体内作用机理探究,有关于淫羊藿对脂肪酶、酪氨酸酶、乙酰/丁酰胆碱酯酶体外抑制未见相关报道。高通量体外评价具有简便、快速、高效的特

点,广泛应用于天然产物活性成分的初步筛选,评价效果可作为开发膳食补充剂和功能性食品的参考^[18]。通过研究并建立体外淫羊藿对脂肪酶、酪氨酸酶、胆碱酯酶抑制活性和抗氧化活性,为扩大淫羊藿的应用范围和综合开发利用提供基础数据。

因此,本实验测定了淫羊藿提取物中总多酚、总黄酮、总多糖、原花青素及淫羊藿苷、朝藿定 A-C 及宝藿苷 I 等含量;并通过对 DPPH \cdot 、 \cdot OH、ABTS $^{+}$ 清除率评价了淫羊藿体外抗氧化活性;利用脂肪酶、酪氨酸酶及两种胆碱酯酶对淫羊藿体外酶抑制活性进行分析评价,为其综合开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

箭叶淫羊藿 产地四川广元,阴干,干品由汉中市天然谷生物科技股份有限公司提供;芦丁($\geq 95\%$)、原花青素($\geq 97\%$)、胰脂肪酶(400 U)、奥利司他($\geq 95\%$)、石杉碱甲(98%) 索莱宝公司;4-甲基伞形酮油酸酯 Sigma 公司;左旋多巴(99%)、ACHE(500 U)、BCHE(500 U) 上海源叶生物有限公司;酪氨酸酶(2.5 kU)、曲酸(99%)、碘化乙酰胆碱(ATCI)、硫代丁酰碘化胆碱(BTCI) 阿拉丁公司;其他试剂均为分析级。

I-Series LC-2030 高效液相色谱仪 株式会社岛津制作所;酶标仪 美国 BioTek 公司;ME104E 电子天平 上海博特勒-托科多仪器有限公司;723 型可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 淫羊藿提取物制备 称取淫羊藿粉末,加入 70% 乙醇(料液比=1:7)回流提取 3 次,提取液过滤,HPD-100 大孔树脂用 95% 乙醇浸泡 24 h,用蒸馏水清洗至无醇味装柱,将提取液上样(上样量:树脂量=1:2),30 °C 下用 70% 乙醇以 3 BV/h 洗脱 2 h,收集洗脱液^[19]。真空干燥得到干燥的淫羊藿提取物,备用。取 1000 mg 冻干粉末,用蒸馏水定容至 50 mL 容量瓶中,超声 30 min,10000 r/min 离心 5 min,收集上清液。

1.2.2 总多酚含量测定 参考 Aktumsek 等^[20]的方

法,反应体系稍作修改。取 150 μL 没食子酸溶液(0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别加入 450 μL 蒸馏水和 550 μL 福林酚试剂,避光 3 min,加入 2.5 mL Na_2CO_3 溶液,40 $^\circ\text{C}$ 水浴 15 min,于 760 nm 处测定吸光度。以没食子酸浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标曲,其标准方程为 $Y=0.0039X+0.0586$, $R^2=0.9994$ 。

1.2.3 总黄酮含量测定 参考 Xi 等^[21]的方法,并略作修改。取 100 μL 芦丁溶液(0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),加入 50 μL 5% NaNO_2 反应 6 min,加入 50 μL 10% 硝酸铝反应 6 min,再加入 1 mol/L 氢氧化钠 500 μL ,避光 10 min,于 510 nm 处测定其吸光度值,以芦丁浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,其线性回归方程为 $Y=0.0010X+0.0402$, $R^2=0.9997$ 。

1.2.4 多糖含量测定 参考陈琛等^[22]的方法,并略作修改。取 1 mL 葡萄糖溶液(0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),加入 1 mL 6% 苯酚和 5 mL 浓硫酸,混匀,静置 10 min,30 $^\circ\text{C}$ 水浴 10 min。于 490 nm 处测定吸光度。以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,其线性回归方程为 $Y=0.0031X+0.0905$, $R^2=0.9995$ 。

1.2.5 原花青素含量测定 参考石磊等^[23]的方法,并稍作修改。取 150 μL 原花青素溶液(1~5 mg/mL),加入 500 μL 5% 香草醛溶液及 10% 盐酸混合液,30 $^\circ\text{C}$ 水浴 15 min,于 500 nm 处测定吸光值,以原花青素浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标曲,其回归方程为 $Y=0.0456X+0.0413$, $R^2=0.9991$ 。

1.2.6 黄酮类成分含量测定 采用 LC-2030 高效液相色谱仪进行含量测定,色谱条件^[24]:分析柱为 Weich Xtimate® C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相 A:乙腈,流动相 B:水。检测波长分别为 270 nm,进样 10 μL ,流速 0.7 mL/min,检测温度 30 $^\circ\text{C}$ 。梯度洗脱条件:0~3 min,80% D;3~9 min,80%~70% D;9~25 min,70% D。每个样品平行三次。

1.2.7 抗氧化活性评价

1.2.7.1 清除 DPPH·能力 参考 Chen 等^[25]的方法,反应体系稍作修改。取 50 μL 不同浓度样液,加入 150 μL DPPH(0.14 mg/mL)溶液,避光 30 min。在 517 nm 处测定其吸光度。 V_C 为阳性对照。根据以下等式计算自由基清除率(%):

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_{10}}{A_j}\right) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: A_1 为样液组 OD 值; A_{10} 以等体积水代替 DPPH 溶液,测定所得吸光度为样液背景吸光度 OD 值; A_j 用等体积水代替样品溶液测定吸光度所得 OD 值。

1.2.7.2 清除·OH 能力 参照 Zhao 等^[26]的方法,反应体系略作修改。取 50 μL 不同浓度样液,加入 50 μL FeSO_4 (9 mmol/mL)及 50 μL 水杨酸-乙醇溶液(9 mmol/mL),再加入 50 μL H_2O_2 溶液(1.5 mg/mL),避光 30 min,于 510 nm 处测定吸光度。以 V_C 为阳

性对照,清除率计算公式为:

$$\cdot\text{OH清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_{10}}{A_j}\right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_1 为样液组 OD 值; A_{10} 用蒸馏水代替 H_2O_2 溶液,测定所得吸光度为样液背景吸光度 OD 值; A_j 为空白组 OD 值,即用等体积水代替样品溶液测定的吸光度值。

1.2.7.3 清除 ABTS^+ ·能力 参考 Rozi 等^[27]的方法,并稍作修改。取 1.5 mL ABTS 溶液(6 mmol/mL)与 50 μL 不同浓度样液混合,25 $^\circ\text{C}$ 下水浴 40 min,在 734 nm 下测定吸光度。以 V_C 为阳性对照。清除率计算公式如下:

$$\text{ABTS}^+\cdot\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_{10}}{A_j}\right) \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: A_1 为样液组 OD 值; A_{10} 以等体积水代替 ABTS 溶液,测定所得吸光度为样液背景吸光度 OD 值; A_j 用等体积水代替样品溶液测定吸光度作为空白组 OD 值。

1.2.8 酶抑制活性评价

1.2.8.1 脂肪酶抑制活性 参考本实验室前期建立的方法^[28],反应体系略作修改。50 μL 样液与 50 μL 脂肪酶液(1 U/mL)于 96 孔板中混合,然后加入 100 μL 4-甲基伞形酮油酸

酯底物(0.75 mg/mL),37 $^\circ\text{C}$ 下水浴 15 min。激发波长 360 nm,检测波长 465 nm 下检测淫羊藿提取物溶液的荧光值,检测时间 30 min。以 Tris-HCl 溶液替代样液检测荧光值作为空白组;Tris-HCl 溶液代替酶液检测荧光值作为样液背景组,阳性对照为奥利司他。脂肪酶抑制率(%)计算公式如下:

$$\text{胰脂肪酶抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_{10}}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: A_1 为样液组吸光度; A_{10} 为样液背景吸光度,用 Tris-HCl 代替酶液测定吸光度; A_j 以 Tris-HCl 代替样液作为空白对照吸光度。

1.2.8.2 酪氨酸酶抑制活性 参考袁晓擎等^[29]的测定方法反应体系稍加修改。取 80 μL 样液与 80 μL 酪氨酸酶溶液(5 U/mL),加入 100 μL PBS(pH=6.8)溶液混合,避光 5 min,加入 80 μL 左旋多巴溶液(2.5 mg/mL),室温静置 20 min。于 475 nm 波长处测定样品组吸光度值(A_1),以 PBS 缓冲液替代酶检测吸光度值(A_{10})用作样液背景组;以 PBS 缓冲液替代样液检测吸光度值(A_0)用作空白组,曲酸溶液为阳性对照,酪氨酸酶抑制率计算公式如下:

$$\text{酪氨酸酶抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_{10}}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中: A_1 为样液组吸光度; A_{10} 用 PBS 代替酶液测定吸光度,作为样液背景吸光度;用 PBS 代替样品测定吸光度作为空白对照吸光度。

1.2.8.3 胆碱酯酶抑制活性 参考 Orhan 等^[30]的方法,体系稍作修改。将 50 μL 样液与 125 μL 1.5 mmol/L DTNB 溶液混合,加入 50 μL 酶液(0.25 U/mL)和 75 μL PBS 缓冲液(pH=8.0),室温避光 10 min。于 412 nm 处测定样品组吸光度值(A_i),PBS 缓冲液替代酶液检测吸光度值(A_{i0})用作样液背景组;以 PBS 缓冲液替代样液吸光度值(A_0)用作空白组,以石杉碱甲溶液为阳性对照,胆碱酯酶抑制率计算同式(2)。

$$\text{胆碱酯酶抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{A_i - A_{i0}}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(6)}$$

式中: A_i 为样液组吸光度; A_{i0} 用 PBS 代替酶液测定吸光度,作为样液背景吸光度;用 PBS 代替样品测定吸光度作为空白对照吸光度。

1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次以上,采用 SPSS 22.0、Excel 2019、GraphPad Prism 9.00 等软件分析和作图。

2 结果与分析

2.1 淫羊藿提取物的化学成分

4 种标准曲线方程及淫羊藿提取物植物化学成分含量如表 1 所示,提取物中总多酚的含量最高,为 105.60 \pm 0.92 mg/g;总黄酮次之,含量为 70.09 \pm 0.75 mg/g;原花青素含量较少,仅有 8.79 mg/g;而总多糖含量达到 18.45 \pm 1.27 mg/g。廖莉玲等^[31]的研究报道淫羊藿中的总多酚及总黄酮含量分别为 29.75 及 46.00 mg/g,均低于本实验中测定的总多酚与总黄酮含量;李倩等^[32]测定的淫羊藿总黄酮含量 58.2 mg/g,也低于本研究测得的总黄酮含量。付亮等^[33]测定的淫羊藿总多糖高于本研究测定的总多糖含量,可能是因为淫羊藿产地、品种及提取方式等因素不同所导致。

表 1 淫羊藿提取物植物化学成分分析

Table 1 Analysis of phytochemical constituents in the extracts of *Epimedium*

| 成分 | 回归方程 | R^2 | 含量(mg/g 提取物) |
|------|--------------------|--------|-------------------|
| 总多酚 | $Y=0.0039X+0.0586$ | 0.9994 | 105.60 \pm 0.92 |
| 总黄酮 | $Y=0.0010X+0.0402$ | 0.9997 | 70.09 \pm 0.75 |
| 总多糖 | $Y=0.0031X+0.0905$ | 0.9995 | 18.45 \pm 1.27 |
| 原花青素 | $Y=0.0456X+0.0413$ | 0.9991 | 8.79 \pm 0.13 |

2.2 黄酮类化合物含量

由表 2 可得,测定结果显示淫羊藿提取物中淫羊藿苷的含量最高,为 266.16 \pm 4.22 mg/g;其次为朝藿定 C,含量为 43.35 \pm 0.67 mg/g;朝藿定 A 与朝藿定 B 含量相当;宝藿苷 I 含量最低,达到 2.54 \pm 0.07 mg/g。淫羊藿 5 种黄酮类化合物含量 HPLC 结果见图 1,可以看出,5 种化合物在 18 min 时已得到完全分离,4 号峰(淫羊藿苷)响应值及表面积远高于测定其他黄酮类化合物,表明淫羊藿中淫羊藿苷含量最大,与表 2 测定结果一致。党亚峰等^[34]研究发现,朝藿定 C 在巫山淫羊藿中含量最高,为 2.68 mg/g;淫羊藿苷含量次之,为 0.10 mg/g,均低于本实验中二者的含

量;同时,相较于张翔等^[35]测定的超高压提取法淫羊藿苷含量最高,含量为 137.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$,低于本实验测定的淫羊藿苷含量,同时其测定的朝藿定 C 含量为 49.33 $\mu\text{g}/\text{mg}$,与本实验测定的接近;在于雪娥等^[36]报告中,10 批次淫羊藿总黄酮胶囊中淫羊藿苷的含量在 82.48~89.39 mg/g 范围之内,相对于本实验所测含量较低。

表 2 样品中 5 种黄酮类成分含量
Table 2 Content results of five flavonoids

| 成分 | 回归方程 | R^2 | 含量(mg/g) |
|-------|--------------------|--------|-------------------|
| 淫羊藿苷 | $Y=0.4127X-0.2316$ | 0.9995 | 266.16 \pm 4.22 |
| 朝藿定 A | $Y=0.5422X-0.1370$ | 0.9995 | 4.57 \pm 0.12 |
| 朝藿定 B | $Y=0.8849X-0.0432$ | 0.9990 | 5.61 \pm 0.02 |
| 朝藿定 C | $Y=0.4681X-0.7092$ | 0.9993 | 43.35 \pm 0.67 |
| 宝藿苷 I | $Y=0.1008X-0.5401$ | 0.9997 | 2.54 \pm 0.07 |

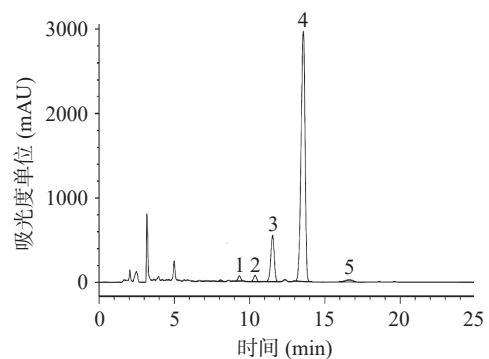


图 1 HPLC 测定 5 种黄酮成分

Fig.1 Five flavonoids were determined by HPLC

注: 1.朝藿定 A; 2.朝藿定 B; 3.朝藿定 C; 4.淫羊藿苷; 5.宝藿苷 I。

2.3 抗氧化活性

本实验从清除 DPPH·、OH·、ABTS⁺自由基的三个方面评价淫羊藿苷的抗氧化活性,结果如图 2 所示。

淫羊藿苷具有自由基清除、抑制过氧化的能力^[37-38]。由图 2 可知,淫羊藿提取物浓度升高,其对自由基清除能力也升高。由表 3 可知 DPPH·清除能力的 IC₅₀=4.43 \pm 0.40 mg/mL,同时由图 2a 可知,当淫羊藿提取物浓度达到 10 mg/mL 时,其对 DPPH·自由基清除率达到 82%,略低于 V_C 的清除效率,表明淫羊藿提取物对 DPPH·具有一定的清除能力;由图 2b 可知,淫羊藿提取物在浓度为 2 mg/mL 时,其对·OH 清除率已超过 40%,在 4~12 mg/mL 时,对·OH 清除率趋近于一致,说明淫羊藿提取物在浓度达到 4 mg/mL 后对·OH 清除能力较小,由表 3 得知,淫羊藿清除·OH 的 IC₅₀=2.83 \pm 0.09 mg/mL,高于 V_C 的 IC₅₀ 值,说明淫羊藿对于 OH 自由基有一定清除能力;由图 2c 可知,样品浓度对于 ABTS⁺清除能力影响较大,样品浓度在 1 mg/mL 时,其清除率为 15%,而样液浓度达到 4 mg/mL 时,淫羊藿提取物对 ABTS⁺的清除率达到 97%,接近于 V_C,其 IC₅₀=2.04 mg/mL。综上,淫羊藿提取物有一定的抗氧化能力。

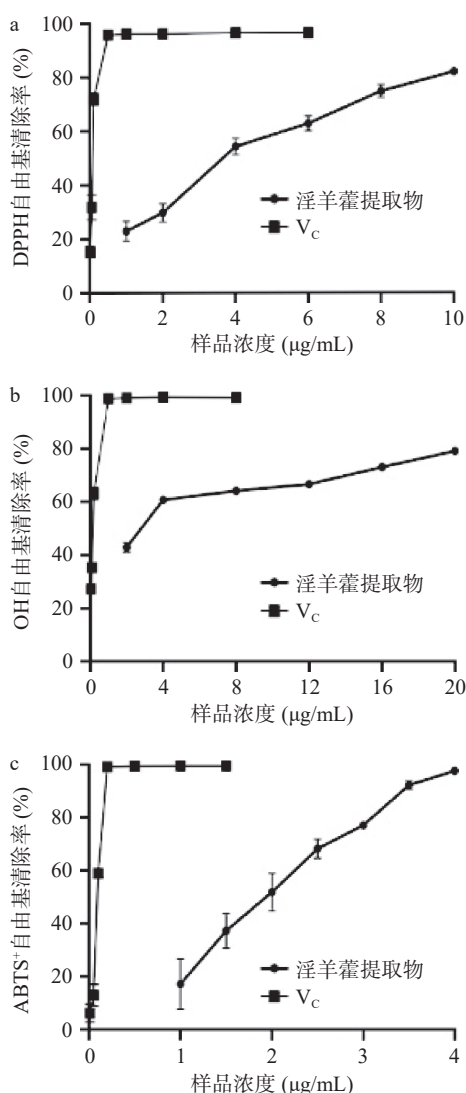


图2 淫羊藿对DPPH、OH、ABTS⁺自由基的清除率

Fig.2 Scavenging rates of *Epimedium* on DPPH, OH and ABTS⁺ free radicals

表3 淫羊藿提取物清除DPPH、OH、ABTS⁺自由基的IC₅₀值

Table 3 IC₅₀ value of *Epimedium* extract in scavenging DPPH, OH and ABTS⁺ free radicals

| 自由基种类 | 淫羊藿提取物(mg/mL) | V _c (mg/mL) |
|-------------------|---------------|------------------------|
| DPPH· | 4.43±0.40 | 0.07±0.00 |
| ·OH | 2.83±0.09 | 0.14±0.00 |
| ABTS ⁺ | 2.04±0.08 | 0.08±0.00 |

2.4 酶抑制活性

淫羊藿提取物对于4种酶的抑制活性水平结果如图3所示,4种酶的抑制率都随着淫羊藿提取物浓度的升高而增大。在脂肪酶评价中,提取物浓度达到10 mg/mL时,其抑制率达到91%,与奥利司他的抑制率接近,且由表4可知,提取物对脂肪酶抑制的IC₅₀=5.97±0.04 mg/mL,表明淫羊藿提取物具有降脂的潜力;酪氨酸酶抑制的IC₅₀=2.27±0.23 mg/mL,且当提取物浓度为1 mg/mL时,其抑制率已经达到43%,当提取物浓度为10 mg/mL时,其抑制率为88%,略低于曲酸的酶抑制率;在两种胆碱酯酶抑

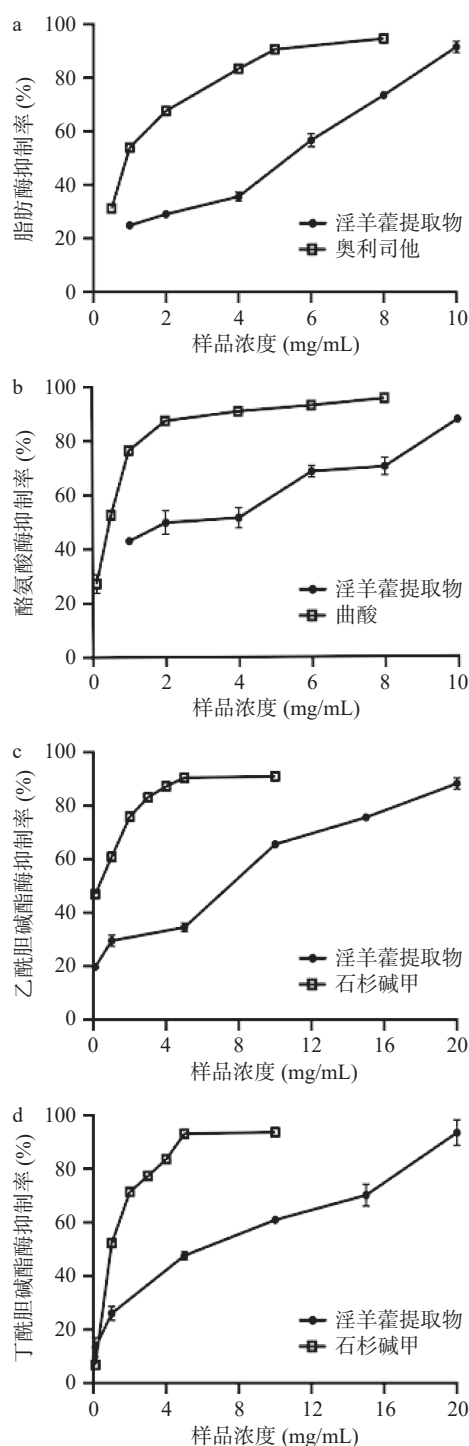


图3 淫羊藿提取物对脂肪酶、酪氨酸酶、乙酰/丁酰胆碱酯酶抑制率

Fig.3 Inhibitory rate of *Epimedium* extract on lipase, tyrosinase and acetyl/butyrylcholinesterase

制评价中,提取物浓度为0.1 mg/mL时,ACHE的抑制率为20%,BCHE的酶抑制率仅有13%,当提取物浓度达到20 mg/mL时,ACHE抑制率为88%,BCHE的抑制率达到95%,与石杉碱甲相当。同时,通过表4可知,BCHE的IC₅₀=7.41±0.26 mg/mL,ACHE的IC₅₀=9.27±0.07 mg/mL,故提取物对于两种胆碱酯酶均有一定的抑制作用。

3 结论

本文研究了淫羊藿提取物化学成分含量,并对

表 4 淫羊藿提取物抑制脂肪酶、酪氨酸酶、乙酰/丁酰胆碱酯的 IC₅₀ 值

Table 4 IC₅₀ values of *Epimedium* extract inhibiting lipase, tyrosinase and acetyl / butyrylcholine ester

| 酶抑制类型 | 样品 | | 阳性对照 | |
|---------|-------------------|-----------------|---------------|-----------------|
| | 淫羊藿提取物 (mg/mL) | 奥利司他 (mg/mL) | 曲酸 (mg/mL) | 石杉碱甲 (mg/mL) |
| 抑制脂肪酶 | 5.97±0.04 | 0.86±0.03 | | |
| 抑制酪氨酸酶 | 2.27±0.23 | | 0.36±0.04 | |
| 抑制ACHE酶 | 9.27±0.07 | | | 0.21±0.01 |
| 抑制BCHE酶 | 7.41±0.26 | | | 0.79±0.01 |

淫羊藿苷、朝藿定 A-C 及宝藿苷 I 的含量进行了测定,在此基础上研究评价了淫羊藿体外清除自由基能力及对脂肪酶、酪氨酸酶及胆碱酯酶 4 种酶的酶抑制能力。结果发现,淫羊藿提取物中富含多酚及黄酮类化合物且淫羊藿苷含量丰富;提取物对于 DPPH· 及 ABTS⁺ 的清除率与阳性对照 V_C 相当,这说明提取物具有较强的体外自由基清除能力;同时,对胰脂肪酶、酪氨酸酶、乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶 4 种酶抑制结果中,淫羊藿提取物的酶抑制率接近甚至超过了阳性对照,表明了提取物在体外也具有一定的酶抑制能力。综上表明,本研究为淫羊藿提取物体外生物活性研究提供了一些参考性数据,同时说明淫羊藿提取物可作为一种天然的抗氧化剂,亦可作为抗阿尔兹海默症、抗皮肤病及抗肥胖症的潜在资源,为淫羊藿的综合利用提供了依据。

参考文献

- [1] 张华峰, 杨晓华. 淫羊藿在食品工业中的应用现状与展望[J]. 食品工业科技, 2010, 31(5): 390-393. [ZHANG H F, YANG X H. Application of herba *Epimedium* in food industry: Current status and prospect[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(5): 390-393.]
- [2] 殷涛, 李云峰, 徐宁, 等. 淫羊藿人工种植现状及思考[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(6): 1468-1471. [YIN T, LI Y F, XU N, et al. Current situation and thinking of artificial cultivation of *Epimedium*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2020, 31(6): 1468-1471.]
- [3] 孟宁, 孔凯, 李师翁. 淫羊藿属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 西北植物学报, 2010, 30(5): 1063-1073. [MENG N, SUN K, LI S W, et al. Advances in studies on chemical constituents and pharmaceutical activities in species of *Epimedium*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(5): 1063-1073.]
- [4] 欧阳慧子, 何俊. 淫羊藿化学成分分析及其药代动力学研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(3): 219-227. [OUYANG H Z, HE J. Research progress on the quantitative analysis of chemical constituents in *Epimedium* herb and its pharmacokinetics[J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 38(3): 219-227.]
- [5] ZHANG H, WANG H, WEI J, et al. Comparison of the active compositions between raw and processed *Epimedium* from different species[J]. Molecules, 2018, 23(7): 1656.
- [6] 袁航, 曹树萍, 陈抒云, 等. 淫羊藿的化学成分及质量控制研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(24): 3630-3640. [YUAN H, CAO

S P, CHEN S Y, et al. Research progress on chemical constituents and quality control of *Epimedium folium*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(24): 3630-3640.]

- [7] 付亮, 袁璟亚, 杨瑞武, 等. 正交试验优化淫羊藿总黄酮和多糖的分步提取工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(24): 56-60. [FU L, YUAN J Y, YANG R W, et al. Orthogonal array design for the optimization of successive extraction of total flavonoids and polysaccharides from *Epimedium brevicornu* Maxim[J]. Food Science, 2012, 33(24): 56-60.]
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 340. [National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part one[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 340.]
- [9] 徐艳琴, 李仁清, 张华雁, 等. 箭叶淫羊藿的资源分布及质量特征研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(23): 6119-6132. [XU Y Q, LI R Q, ZHANG Y H, et al. Distribution of *Epimedium sagittatum* and its research progress on quality characteristics[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(23): 6119-6132.]
- [10] 侯旭东, 胡情, 马丽娟, 等. 源于中药的胰脂肪酶抑制剂研究进展[J]. 药学学报, 2020, 55(7): 1478-1493. [HOU X D, HU Q, MA L J, et al. Recent advances on pancreatic lipase inhibitors from Chinese herbs[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2020, 55(7): 1478-1493.]
- [11] 马正月, 张仕国, 张元功, 等. 硫色满-4-酮类乙酰胆碱酯酶抑制剂的设计、合成及活性评价[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(20): 1774-1778. [MA Z Y, ZHANG S G, ZHANG Y G, et al. Design, synthesis and evaluation of thiochroman-4-ones as acetylcholinesterase inhibitors[J]. Chinese Pharmaceutica Journal, 2013, 48(20): 1774-1778.]
- [12] 毕云枫, 宋凤瑞, 刘志强. 天然酪氨酸酶抑制剂的种类及其对酪氨酸酶抑制作用的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2014, 40(2): 454-459. [BI Y F, SONG F R, LIU Z Q, et al. Research progress on types of natural tyrosinase inhibitors and their inhibitory effects on tyrosinase[J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2014, 40(2): 454-459.]
- [13] 谭莉, 陈瑞战, 常清泉, 等. 淫羊藿叶多糖工艺优化及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 255-263. [TAN L, CHEN R Z, CHANG Q Q, et al. Optimization of extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Epimedium* leaves[J]. Food Science, 2017, 38(2): 255-263.]
- [14] 席晓志, 崔晓伟, 郭弘, 等. 响应面分析法优化后淫羊藿提取物抗氧化活性研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(4): 63-67. [XI X Z, CUI X W, GUO H, et al. Research of response surface methodology for optimization on extraction conditions of antioxidant activity from *Epimedium brevicornu* Maxim[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 20(4): 63-67.]
- [15] 张运辉, 周小青, 伍大华, 等. 基于网络药理学的淫羊藿治疗阿尔茨海默病作用机制研究[J]. 中国现代应用药理学, 2021, 38(16): 1945-1951. [ZHANG Y H, ZHOU X Q, WU D H, et al. Study on the mechanism of *Epimedium folium* in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2021, 38(16): 1945-1951.]
- [16] WANG D, XU W, CHEN X, et al. Icarin induces cell differentiation and cell cycle arrest in mouse melanoma B16 cells via

- Erk1/2-p38-JNK-dependent pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59): 99504-99513.
- [17] WANG X L, WANG N, ZHENG L Z, et al. Phytoestrogenic molecule desmethylaritin suppressed adipogenesis via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2013, 714(1-3): 254-260.
- [18] BAHADORI M B, VALIZADEH H, ASGHARI B, et al. Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L.[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 727-736.
- [19] 王平, 李雪松, 任晓峰, 等. 一种从淫羊藿属植物制备高含量(98%)淫羊藿甙的技术: 中国, 102807595A [P]. 2012-12-05. [WANG P, LI X S, REN X F, et al. A method for preparing high content *Epimedium* from *Epimedium* plants Technology of icariin (98%): China, 102807595a [P]. 2012-12-05.]
- [20] AKTUMSEK A, ZENGING, GULER G O, et al. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 55: 290-296.
- [21] XI W P, LU J F, QUN J P, et al. Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 54(5): 1108-1118.
- [22] 陈琛, 李鑫鑫, 徐尤美, 等. 天麻多糖的分离纯化与抗氧化活性研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(18): 2203-2206. [CHEN C, LI X X, XU Y M, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Gastrodia elata* B1[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, 34(18): 2203-2206.]
- [23] 石磊, 高哲, 刘丽南, 等. 四种原花青素含量测定方法比较[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(15): 242-247, 253. [SHI L, GAO Z, LIU L N, et al. Comparison of four methods for quantitation of proanthocyanidin[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(15): 242-247, 253.]
- [24] 王燕萍, 贾旭森, 王艳, 等. 不同干燥方式对淫羊藿黄酮类成分含量及抗氧化活性影响[J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4193-4200. [WANG Y P, JIA X S, WANG Y, et al. Effects of different drying methods on flavonoids content and antioxidant activity of *Epimedium folium*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(14): 4193-4200.]
- [25] CHEN X W, QI Y J, ZHU C H, et al. Effect of ultrasound on the properties and antioxidant activity of hawthorn pectin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 273-281.
- [26] ZHAO Y, DU S K, WANG H X, et al. *In vitro* antioxidant activity of extracts from common legumes[J]. *Food Chemistry*, 2014, 152: 462-466.
- [27] ROZI P, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, et al. Sequential extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 97-106.
- [28] 李鑫鑫, 王一棠, 陈琛, 等. 12种植物粗多糖的体外抗肥胖及抗氧化活性研究[J]. *食品科技*, 2018, 43(2): 222-227. [LI X X, WANG Y T, CHEN C, et al. The anti-obesity and anti-oxidant activities of 12 crude polysaccharide[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(2): 222-227.]
- [29] 袁晓擘, 李世刚, 张宏岐, 等. 五峰绿茶的体外抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(3): 51-55. [YUAN X B, LI S G, ZHANG H Q, et al. Study on antioxidative activity of total extracted from Wu-feng green tea *in vitro*[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(3): 51-55.]
- [30] ORHAN I E, SENOL F S, OZTURK N, et al. Phytochemical contents and enzyme inhibitory and antioxidant properties of *Anethum graveolens* L. (Dill) samples cultivated under organic and conventional agricultural conditions[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 59: 96-103.
- [31] 廖莉玲, 刘程程, 韦万丽, 等. 7种黔产补益类中草药抗氧化成分的测定[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(10): 2498-2500. [LIAO L L, LIU C C, WEI W L, et al. Determination of the contents of main antioxidant compositions in seven Chinese tonic herbs collected in Guizhou province[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2012, 23(10): 2498-2500.]
- [32] 李倩, 李晓, 魏悦, 等. 淫羊藿总黄酮的碱提工艺研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(7): 1141-1144. [LI Q, LI X, WEI Y, et al. Extraction of total flavonoid from herba *Epimedium maximusing* alkali solution[J]. *Natural Product Research and Development*, 2014, 26(7): 1141-1144.]
- [33] 付亮, 袁璟亚, 丁春邦, 等. 淫羊藿药渣中多糖的提取及其体外抗氧化活性评价[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(1): 116-120. [FU L, YUAN J Y, DING C B, et al. Polysaccharides extraction from residue of *Epimedium* and its antioxidant activity evaluation[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(1): 116-120.]
- [34] 党亚锋, 袁洪超, 张圣文, 等. 巫山淫羊藿不同药用部位有效成分分析研究[J]. *山东化工*, 2021, 50(14): 107-108. [DANG Y F, YUAN H C, ZHANG S W, et al. Analysis and study on the effective components of different parts of *Epimedium Wushan*[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2021, 50(14): 107-108.]
- [35] 张翔, 张华峰. 淫羊藿黄酮的超高压提取工艺研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(4): 250-254. [ZHANG X, ZHANG H F. Optimization of flavonoids extraction from *Epimedium sagittatum* by ultra high pressure extraction[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(4): 250-254.]
- [36] 于雪娥, 秦建平, 李家春, 等. 一测多评法同时测定淫羊藿总黄酮胶囊中7种黄酮类成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(7): 79-85. [YU X E, QIN J P, LI J C, et al. Simultaneous determination of 7 flavonoid compounds Yinyanghuo zonghuangtong capsule by quantitative analysis of multi-components with a single-marker[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2017, 23(7): 79-85.]
- [37] 杨娟, 张华峰, 牛丽丽, 等. 不同地区商品淫羊藿中朝藿定、淫羊藿苷、总黄酮含量变异及抗氧化活性分析[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(16): 96-100. [YANG J, ZHANG H F, NIU L L, et al. Variation of epimedins, icariin and total flavonoids and evaluation of antioxidant activities of *Epimedium folium* in different areas of China[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(16): 96-100.]
- [38] ZHAO Y, CHEN S, WANG Y, et al. Effect of drying processes on prenylflavonoid content and antioxidant activity of *Epimedium koreanum* Nakai[J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2): 796-806.