

不同产地桃金娘果中5种酚类成分的测定及其抗氧化作用研究

肖婷^{1,2}, 崔炯谟¹, 郭正红^{2,3}, 赵余庆^{2,3*}

1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133000

2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

3. 沈阳药科大学教育部基于靶点药物设计与研究重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 采用 HPLC 测定 6 种不同产地的桃金娘果中 5 种酚类成分, 并通过考察 5 种酚类成分和不同产地桃金娘果提取物清除自由基能力。 **方法** Inertsil ODS-SP 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈-1%磷酸水, 梯度洗脱, 检测波长为 280 nm, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μL; 采用 DPPH 法测定没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、白藜芦醇及 6 个不同产地桃金娘果提取物清除自由基的能力。 **结果** 5 种酚类成分线性关系良好, 精密度、稳定性、重复性、加样回收率均符合要求; 5 种酚类成分和不同产地桃金娘果提取物清除自由基能力较好, 广东新丰县、广东翁源县、广西南宁、云南、广西桂林、贵州产地桃金娘果提取物的 IC₅₀ 值分别为 58.82、61.57、17.73、7.91、14.77、8.11 μg/mL, 没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、白藜芦醇的 IC₅₀ 值分别为 0.02、0.04、0.03、0.05、5.7 μg/mL, 阳性对照 VC 的 IC₅₀ 值为 6.31 μg/mL。 **结论** 初步明确了桃金娘果清除自由基、抗氧化活性的物质基础, 为桃金娘资源的综合利用和开发研究提供科学依据。

关键词: 桃金娘; 酚类成分; DPPH 法; 清除自由基; HPLC

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)18-2703-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.024

Determination of five phenolic compounds from fruits of *Rhodomyrtus tomentosa* in different regions and its antioxidant effect

XIAO Ting^{1,2}, CUI Jiong-mo¹, GUO Zheng-hong^{2,3}, ZHAO Yu-qing^{2,3}

1. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China

2. College of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

3. Key Laboratory of Structure-based Drug Design and Discovery of Ministry of Education, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective Five phenolic compounds in fruits of *Rhodomyrtus tomentosa* from six different regions were measured by HPLC, and the ability of scavenging free radicals of five kinds of phenolics and myrtle fruits extracts in different regions was investigated. **Methods** The determination was performed on Inertsil ODS-SP column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% phosphate aqueous solution with gradient elution program, flow rate was 1 mL/min with 10 μL of sample quantity at 280 nm, and the antiradical efficiency of five phenolic compounds and extracts were evaluated by DPPH radical scavenging assay. **Results** Five kinds of phenolic components showed a good linear relationship, and the precision, stability, repeatability, and sample recovery rate all met the requirements. Five phenolic compounds and extracts had good antiradical efficiency. The IC₅₀ values of the myrtle fruits extracts from Xinfeng, Wengyuan counties in Guangdong province, Nanning, Guilin in Guangxi province, Yunnan province, and Guizhou province were 58.82, 61.57, 17.73, 7.91, 14.77, and 8.11 μg/mL, and the IC₅₀ values of gallic acid, protocatechuic acid, catechin, ellagic acid, and resveratrol were 0.02, 0.04, 0.03, 0.05, and 5.70 μg/mL, respectively. The IC₅₀ of positive control VC was 6.31 μg/mL. **Conclusion** Material basis of antiradical efficiency of fruits is preliminary identified and it provides a scientific basis for the comprehensive utilization of the resources of *R. tomentosa*.

Key words: *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk; phenolics; DPPH method; scavenging free radical; HPLC

桃金娘为 *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk 桃 Reich 植物, 别名哆尼、岗惹、山惹、多莲、当梨
金娘科 (Mytaceae) 桃金娘属 *Rhodomyrtus* (DC.) 根、稔子树、豆稔、仲尼、乌肚子、桃舅娘、当泥,

收稿日期: 2014-04-16

基金项目: 中药标准提取物工业化色谱制备技术子平台 (2010ZX09401-304-105-002)

作者简介: 肖婷, 在读硕士研究生。Tel: 15840268187 E-mail: tingjinxiao@163.com

*通信作者 赵余庆, 教授, 主要从事天然活性成份的发现与构效关系研究。Tel/Fax: (024)23986521 E-mail: zyuq4885@126.com

是在我国有天然分布的唯一一种,在我国东南部、南部至西南部,南亚、东南亚以及日本等地均有广泛分布,是一种优良的野生植物资源^[1],为广东常用地产药材^[2]。桃金娘是中国南方地区民间传统中草药,其性味甘涩平,以根、叶、花和果入药^[3],具有养血、止血、涩肠、固精、暖腹脏、益肌肉之功效^[4]。现代临床多用于脘腹疼痛,急、慢性肠胃炎,胃痛,消化不良,肝炎等疾病的治疗。植物酚类是一种植物体内的多元酚类次生代谢产物,广泛存在于植物的皮、根、叶和果实中^[5],具有抗氧化、清除自由基、抗肿瘤、保护心血管系统、预防肥胖和糖尿病、保护脑及神经系统、预防微生物所致疾病、抗炎等药理活性^[6-7]。桃金娘含有丰富的酚类物质,其叶和根中含有长梗马兜铃素、木麻黄鞣质、山稔甲素和栗木鞣花素^[8],果实中含有没食子酸、白藜芦醇、鞣花酸、白皮杉醇己糖苷、飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷、矮牵牛素-3-己糖苷等多酚类物质^[9]。没食子酸能够清除体外自由基、抑制脂质过氧化^[10];原儿茶酸通过抑制 JNK 激活 Nr2 诱导产生抗氧化活性^[11],同时具有提高脑组织内源性抗氧化酶活力,减少体内自由基的产生,进而减轻了脑组织的病理损伤^[12];儿茶素具有抗氧化、防辐射、护肤美容、减缓香烟毒害等多种功效^[13];鞣花酸具有抗氧化、抗炎、抗癌等药理活性^[14];白藜芦醇具有很强的清除自由基和抑制自由基引起的氧化损伤的能力^[15]。本实验采用 HPLC 法首次对 6 种不同产地桃金娘中没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、白藜芦醇进行了检识和分析,采用 DPPH 法对桃金娘果提取物和 5 种酚类成分进行体外抗氧化活性评价。

1 材料与试剂

1.1 材料

样品分别购于广西南宁、广西桂林、广东新丰县、广东翁源县、云南和贵州,经沈阳药科大学路金才教授鉴定为桃金娘属 *Rhodomyrtus* (DC.) Reich 桃金娘 *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hass 的干燥果实。取不同产地桃金娘干果各 150 g,加入 3 倍量的 75%乙醇超声提取 3 次,每次提取 1 h,提取液滤过、合并、减压浓缩后,取适量,经 0.45 μm 滤膜滤过,待用。

1.2 试剂与仪器

高效液相色谱仪 (L-2200 Hitachi: 日本); BT125D 电子天平: 德国; Inertsil ODS-SP 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); RPL-D2000 柱温箱(大

连日普利科技仪器有限公司); HH-S2 恒温水浴锅 (郑州长城科工贸有限公司)。

没食子酸、原儿茶酸、鞣花酸对照品 (质量分数均为 98%) 均由天津市科曼斯特医药科技发展有限公司提供。儿茶素、白藜芦醇 (质量分数为 98%) 由天津市尖峰天然产物研究开发有限公司提供。乙腈 (天津市康科德科技有限公司, 色谱纯, 批号 130527); 水为双重蒸馏水; 磷酸 (沈阳市试剂五厂, 分析纯, 批号 0712031)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸 1.99 mg、原儿茶酸 2.05 mg、儿茶素 2.00 mg、鞣花酸 1.99 mg、白藜芦醇 2.01 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取不同产地桃金娘果提取物样品各 10.00 mg, 精密称定, 精密加入甲醇 1 mL 溶解, 摇匀, 滤过, 即得。

2.3 色谱条件

流动相采用色谱纯乙腈 (A) - 含 1% 磷酸水溶液 (B) 梯度洗脱, 0~20 min, 5% A; 22~25 min, 8% A; 42~70 min, 11% A; 72 min, 14% A; 74 min, 17% A; 76~90 min, 22.5% A; 92 min, 100% A; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长为 280 nm; 进样量 10 μL。

2.4 标准曲线的绘制

精密量取 5 种多酚类成分适量, 用甲醇分别配成含没食子酸 0.002 0、0.012 0、0.024 0、0.072 0、0.144 0、0.199 0 mg/mL 对照品溶液; 含原儿茶酸 0.002 0、0.005 0、0.050 0、0.125 0、0.205 0 mg/mL 对照品溶液; 含儿茶素 0.002 0、0.005 0、0.015 0、0.003 0、0.090 0 mg/mL 对照品溶液; 含鞣花酸 0.006 0、0.012 0、0.030 0、0.060 0、0.150 0 mg/mL 对照品溶液; 含白藜芦醇 0.005 0、0.010 0、0.025 0、0.050 0、0.125 0 mg/mL 对照品溶液。按“2.3”项色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横纵坐标, 绘制标准曲线, 得到没食子酸标回归方程 $Y=2.8 \times 10^7 X+18\ 130$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 0.002 0~0.199 0 mg/mL; 原儿茶酸回归方程 $Y=2.0 \times 10^7 X+27\ 954$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 0.002 0~0.205 0 mg/mL; 儿茶素回归方程 $Y=7.3 \times 10^5 X+118.21$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.002 0~0.090 0 mg/mL; 鞣花酸回归方程 $Y=2.6 \times 10^7 X-8\ 778.5$,

$r=0.999\ 8$, 线性范围 $0.006\ 0\sim 0.150\ 0\ \text{mg/mL}$; 白藜芦醇回归方程 $Y=9.0\times 10^6 X+10\ 594$, $r=0.999\ 6$, 线性范围 $0.005\ 0\sim 0.125\ 0\ \text{mg/mL}$ 。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取供试品溶液 $10\ \mu\text{L}$, 连续进样 6 次, 测定色谱峰面积。结果显示没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、白藜芦醇的平均 RSD 分别为 1.54%、1.51%、1.65%、1.67% 和 1.32%。

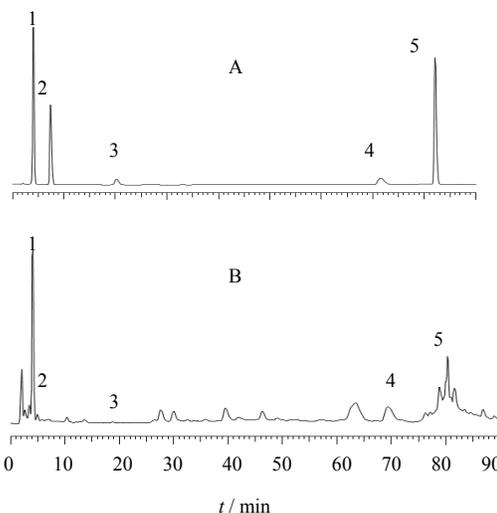
2.5.2 重复性试验 精密称取云南产地桃金娘果提取物 $9.63\ \text{mg}$, 共 6 份, 用 $1\ \text{mL}$ 甲醇溶解, 进样 $10\ \mu\text{L}$, 测定色谱峰面积。结果显示没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、白藜芦醇的平均 RSD 分别为 1.25%、1.32%、1.41%、1.02% 和 1.08%。

2.5.3 稳定性试验 分别在 0、4、8、10、12、24 h 精密吸取上述云南产地桃金娘果提取物溶液, $10\ \mu\text{L}$ 进样, 测定色谱峰面积。结果显示没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、白藜芦醇的平均 RSD 分别为 1.96%、1.62%、1.33%、1.29% 和 1.21%。

2.5.4 加样回收率试验 精取云南产地桃金娘果提取物 $4.82\ \text{mg}$, 共 6 份, 分别加入一定量的没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、白藜芦醇对照品, 按照供试品溶液制备方法制备, 精密吸取 $10\ \mu\text{L}$ 进样, 测定, 5 种酚类成分平均回收率分别为 100.72%、99.63%、100.97%、100.78% 和 100.11%, RSD 分别为 1.62%、1.08%、0.83%、1.02% 和 1.22%。

2.5.5 测定结果 取 6 个不同产地桃金娘果提取物, 按照“2.2”项方法制备供试品溶液, 按上述色谱条

件, 采用外标法计算, 测定 6 个产地桃金娘中 5 种酚类成分的量。结果显示 6 个不同产地的桃金娘中没食子酸和鞣花酸的量较高, 其中云南产地桃金娘果中 5 种酚类成分的量整体较高, 没食子酸、鞣花酸、白藜芦醇的量为 6 个产地中最高, 5 种酚类物质质量具有显著的地域差异性。色谱图见图 1。样品中没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、白藜芦醇质量分数见表 1。



1-没食子酸 2-原儿茶酸 3-儿茶素 4-鞣花酸 5-白藜芦醇
1-gallic acid 2-protocatechuic acid 3-catechins 4-ellagic acid 5-resveratrol

图 1 对照品 (A) 和云南桃金娘果提取物 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of reference substances (A) and extract of myrtle fruits in Yunnan (B)

表 1 6 个不同产地桃金娘果中 5 种酚类成分的测定结果

Table 1 Contents of five phenol compounds of myrtle fruits from six different regions

产地	质量分数 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	没食子酸	原儿茶酸	儿茶素	鞣花酸	白藜芦醇
云南	18.492 6	0.761 2	1.388 0	10.140 4	7.637 1
广西南宁	5.667 2	3.565 6	1.268 3	5.637 8	2.060 0
广东新丰县	4.416 0	0.261 8	0.234 8	0.715 0	0.767 8
广东翁源县	10.145 8	0.401 0	0.328 7	0.863 4	0.862 1
广西桂林	14.796 4	0.138 5	1.758 4	4.986 3	4.418 1
贵州	18.400 8	0.176 4	4.353 2	7.541 5	6.866 3

2.6 DPPH 法测定 5 种酚类化合物和桃金娘果提取物的清除自由基能力

2.6.1 DPPH 溶液的配制 精密称取 $2.50\ \text{mg}$ DPPH, 甲醇溶解, 定容于 $100\ \text{mL}$ 量瓶中, DPPH 浓度为 $10.00\ \mu\text{mol/L}$ 。

2.6.2 阳性对照的配制 取市售维生素 C (VC) 配制成 200.00 、 60.00 、 20.00 、 6.00 、 $2.00\ \mu\text{mol/L}$ 的溶液, 避光保存。

2.6.3 样品溶液的配制 精密称取 6 个产地桃金娘果提取物 $2.00\ \text{mg}$ 及 5 种酚类成分对照品 $1.00\ \text{mg}$,

分别用甲醇溶解配成 200.00、60.00、20.00、6.00、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。

2.6.4 活性测试 取 100 μL 不同质量浓度的样品溶液, 加入 100 μL DPPH 溶液, 混合后在室温下避光反应 30 min, 在 517 nm 处测其吸光度值 (A_S); 同时测定 100 μL DPPH 溶液与 100 μL 甲醇混合后的吸光度值 (A_0) 作为空白对照。计算 DPPH 自由基清除率 (IR)。

$$\text{IR}=(A_0-A_S)/A_0$$

2.6.5 抗氧化能力的测定 结果得到广东新丰县、广东翁源县、广西南宁、云南、广西桂林、贵州产地桃金娘果提取物的 IC_{50} 值分别为 58.82、61.57、17.73、7.91、14.77、8.11 $\mu\text{g/mL}$ 和没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、白藜芦醇的 IC_{50} 值分别为 0.02、0.04、0.03、0.05、5.7 $\mu\text{g/mL}$, 阳性对照 VC 的 IC_{50} 值为 6.31 $\mu\text{g/mL}$ 。结果显示云贵地区桃金娘果显示出较强的抗氧化活性, 各产地抗氧化活性可能与地域差异也存在较大关系; 5 种酚类成分抗氧化作用均强于 VC 的活性, 且没食子酸的活性最强。

3 讨论

桃金娘果作为一种自然资源丰富、营养价值高、开发前景广阔的小浆果, 具有多种营养保健作用, 在欧美等国家普遍受到欢迎。随着中国未来医疗健康产业五大趋势的发展, 桃金娘的开发、利用给药物开发科技工作者提供了良好的机遇和挑战。从本研究的结果可以看出, 6 个不同产地的桃金娘中没食子酸和鞣花酸的量较高。鞣花酸具有抗氧化、抗癌等多种生物活性^[13], 有望将其开发为新型抗癌药物^[16]。其中云南产地桃金娘果中 5 种酚类成分的量整体较高, 没食子酸为 6 个产地中最高, 其果的提取物的抗氧化活性与 Vc 的相当, 且高于其他产地的, 这可能与含有较为丰富的没食子酸有关; 各产地桃金娘抗氧化活性可能与地域差异存在较大关系, 云贵地区显示出较强的抗氧化活性, 广西产地次之, 强于广东地区。在 5 种酚类成分的 DPPH 抗氧化活性测试中, 5 种酚类成分抗氧化作用除白藜芦醇外大大强于 VC 的活性, 其中没食子酸抗氧化能力强于其他 4 种成分, 且其在桃金娘果提取物中含量最高, 推测其可能为桃金娘果提取物抗氧化作用的主要物质基础。根据已知文献报道并进行对比发现, 桃金娘果提取物中白藜芦醇量普遍高于红酒中白藜芦醇量^[17], 没食子酸、原儿茶酸、鞣花酸、白藜芦醇量均高于国内蓝莓、红树莓、黑树莓^[18]。

《中国药典》1977 年版一部收载了“桃金娘根”副名(岗稔根), 以后历版药典及部颁标准均未收载此品种^[3]。因此, 进一步研究桃金娘中的酚类成分的组成和各种生物活性的差异, 建立其国家药品标准, 规范其药材的质量控制方法, 充分将其开发利用, 具有重要的经济和社会意义。

参考文献

- [1] 肖婷, 崔炯谟, 李倩, 等. 桃金娘的化学成分、药理作用和临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(5): 800-805.
- [2] 梅全喜. 广东地产药材研究 [M]. 广州: 广东科学技术出版社, 2011.
- [3] 广东中药材标准 [S]. 2004.
- [4] 李标. 桃金娘的开发利用探讨 [J]. 热带林业, 2009, 37(4): 26-27.
- [5] 陈亮, 李医明, 陈凯先, 等. 植物多酚类成分提取分离研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1501-1507.
- [6] 牛俊瑞, 吕瑞霞. 多酚类物质潜在药理活性及其研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(9): 128-129.
- [7] 张晓梦, 倪艳, 李先荣. 茶多酚的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(2): 157-160.
- [8] 刘延泽, 候爱君, 冀春茹. 桃金娘中可水解丹宁的分离与结构 [J]. 天然产物研究与开发, 1996, 10(1): 14-19.
- [9] Lai T, Herent M, Leclercq J, et al. Piceatannol, a potent bioactive stilbene, as major phenolic component in *Rhodomyrtus tomentosa* [J]. *Food Chem*, 2013, 138: 1421-1430.
- [10] Asnaashari A, Farhoosh R, Sharif A. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion [J]. *Food Chem*, 2014, 159: 439-444.
- [11] Vari R, D'Archivio M, Carotenuto S, et al. Protocatechuic acid induces antioxidant/detoxifying enzyme expression through JNK-mediated Nrf2 activation in murine macrophages [J]. *Sci Direct*, 2011, 22: 409-417.
- [12] 张秀丽, 李亚晨, 牛新华, 等. 原儿茶酸对帕金森模型鼠脑组织抗氧化能力的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(17): 3248-3251.
- [13] Ngoc T M. Lipoygenase inhibitory constituents from rhubarb [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(5): 598-605.
- [14] Kilic I, Yesiloglu Y, Bayrak Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid [J]. *Spectrochim Acta*, 2014, 130: 447-452.
- [15] 张泽生, 贺伟, 刘甜甜, 等. 白藜芦醇的体外抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2012, 33(11): 266-268.
- [16] 张奇志, 廖均元, 林丹琼. 桃金娘天然保健饮料开发研究 [J]. 饮料工程, 2008, 11(2): 32-34.
- [17] 王夏青, 於洪建, 赵余庆. 干红葡萄酒中儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇和原花青素的测定 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 745-747.
- [18] 孟实, 张晓书, 赵余庆. 树莓与蓝莓中多酚类成分的 HPLC 测定 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(3): 81-84.