

· 化学与分析 ·

新疆3种植物不同提取部位的抗氧化活性 及其对PTP1B的抑制作用

李转红, 郭寒, 徐文斌, 何大俊*

(石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832000)

[摘要] 目的:考察新疆树莓、黑果悬钩子和天山茶藨不同萃取部位的抗氧化活性及其对蛋白酪氨酸磷酸酶1B(PTP1B)的抑制作用,筛选具有抗氧化及降血糖活性的有效部位。方法:采用甲醇提取、分步萃取的方法分别制备了不同的极性部位。测定了3种植物不同部位的总黄酮含量,果实提取物经AB-8型大孔树脂纯化后制备了果实花青素部位;利用2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐法,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼法及PTP1B抑制活性实验比较了不同部位的相关活性,并分析了黄酮含量和活性的相关性。结果:经AB-8型大孔树脂纯化后,树莓果实花青素含量由 $(12.72 \pm 0.14) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 提高到 $(238.13 \pm 1.18) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,天山茶藨果实的花青素含量由 $(35.36 \pm 0.45) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 提高到 $(548.05 \pm 1.11) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,随着花青素含量的升高,其抗氧化活性和PTP1B抑制活性也显著升高。黑果悬钩子茎乙酸乙酯部位总黄酮含量最高,为 $(658.65 \pm 11.43) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;黑果悬钩子茎水部位抗氧化活性最高,ABTS和DPPH自由基清除能力分别为 (4.53 ± 0.07) , $(2.82 \pm 0.09) \text{ mmol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ 当量;黑果悬钩子茎水部位对PTP1B的抑制率最高,半数抑制浓度为 $(0.08 \pm 0.01) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:这3种植物不同萃取部位均具有良好的抗氧化活性和PTP1B抑制作用,黑果悬钩子茎水部位为主要的抗氧化活性和PTP1B抑制活性的有效部位,树莓和天山茶藨果实中花青素是主要的活性成分,天山茶藨茎叶中黄酮是主要的抗氧化活性成分。

[关键词] 树莓;黑果悬钩子;天山茶藨;蛋白酪氨酸磷酸酶1B;抗氧化

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0028-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190028

Antioxidant Activities and PTP1B Inhibitory Effect of Different Extracts from Three Xinjiang Plants

LI Zhuan-hong, GUO Han, XU Wen-bin, HE Da-jun* (College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate antioxidant activities and inhibitory effect on protein tyrosine phosphatase1B (PTP1B) of different fractions of *Rubus idaeus*, *R. caesius* and *Ribes meyeri* in Xinjiang, in order to screen out active ingredients with antioxidant activity and hypoglycemic action. **Method:** The different polar fractions were extracted by methanol and fractional extraction method. Then the total flavonoids content of different polar fractions were determined. The anthocyanin fractions of fruits were purified by AB-8 macroporous resin. ABTS method, DPPH method and PTP1B inhibitory activity experiment were adopted to compare relevant activities of different fractions and analyze the correlation of flavonoid content and activity. **Result:** After AB-8 macroporous resin purification, anthocyanin contents of *R. idaeus* and *R. meyeri* fruit extract increased from $(12.7 \pm 0.14) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ to $(238.1 \pm 1.18) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, and $(35.3 \pm 0.45) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ to $(548.0 \pm 1.11) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. With the increase of anthocyanin content, antioxidant activity and PTP1B inhibitory activity were also significantly increased. The ethyl acetate fraction of *R. caesius* stem had the highest total flavonoids content, which was $(658.65 \pm 11.43) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The water fraction of *R. caesius* stem had the highest antioxidant activity and PTP1B inhibitory activity, which was $\text{IC}_{50} (0.08 \pm 0.01) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and their ABTS and DPPH radical scavenging

[收稿日期] 20141020(016)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(31200259);石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZX2011011)

[第一作者] 李转红,在读硕士,从事植物化学研究,Tel:0993-2058500,E-mail:1935532358@qq.com

[通讯作者] *何大俊,博士,副教授,硕士生导师,从事植物化学研究,Tel:0993-2058500,E-mail:hedajunww@163.com

capacity were (4.53 ± 0.07) and (2.82 ± 0.09) mmol Trolox $\cdot g^{-1}$ equivalent, respectively. **Conclusion:** The different fractions of three plants have high flavonoid contents and good antioxidant activity and PTP1B inhibitory effect. The water fraction of *R. caesius* stem was the main active fraction. Anthocyanin of *R. idaeus* and *R. meyeri* fruits was the main active ingredient, and flavonoids from stem and leave of *R. meyeri* was the main antioxidant ingredient.

[Key words] *Rubus idaeus*; *Rubus caesius*; *Ribes meyeri*; protein tyrosine phosphatase 1B; antioxidation

蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 是蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatases, PTPs) 家族中的一个经典的非受体型酪氨酸磷酸酶, 通过使激活的胰岛素受体及胰岛素受体底物 (IRs-1) 等去磷酸化失活而阻止胰岛素信号转导, 在胰岛素信号通路中起着重要的负调控作用^[1-2], 是目前公认的一个新颖的糖尿病治疗靶点。寻找 PTP1B 的高活性抑制剂对糖尿病治疗有着重要的应用前景。

天山茶藨浆果紫黑色; 黑果悬钩子果实蓝黑色; 树莓又称托盘、覆盆子, 果实红色^[3]。这 3 种植物是广泛分布在新疆天山、阿尔泰山的药食两用植物。据报道, 树莓果实和叶有较好的抗氧化活性^[4-6], 与天山茶藨同属的黑果茶藨 (黑加仑) 果实和叶具有较好的抗氧化活性^[7], 其活性主要与果实中丰富的花青素和叶中的黄酮类成分有关。树莓果实提取液^[8]和树莓叶水提物^[9]具有一定的降血糖活性, 但是以 PTP1B 为靶点的降血糖活性研究未见报道。黑果悬钩子和天山茶藨为新疆特有的小浆果植物, 对这两种植物化学成分和生物活性的研究未见报道。

本研究以 3 种新疆特有的药食两用植物为对象, 制备它们的茎、叶、果实的不同极性部位, 筛选不同部位的抗氧化活性和 PTP1B 抑制活性, 并比较它们的活性与黄酮含量、花青素含量的关系, 为从中发现高活性、低毒性的天然抗氧化剂和 PTP1B 抑制剂提供依据。

1 材料

树莓为蔷薇科植物 (*Rubus idaeus*), 树莓果实、叶于 2013 年 7 月采集于石河子大学种苗中心, 黑果悬钩子 (*R. caesius*), 茎、叶于 2013 年 8 月采集于新疆额敏兵团第九师 165 团, 天山茶藨 (*Ribes meyeri*) 为虎耳草科灌木, 果实、茎、叶于 2013 年 8 月采集于新疆玛纳斯林场, 3 种植物由石河子大学生命科学学院植物学教研室徐文斌老师鉴定。3 种植物的茎、叶阴干备用, 果实采集后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

SpectraMax M5 型酶标仪 (美国分子仪器公司), 5415R 小型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), UV-2550 型分光光度计 (日本岛津公司), 1/1 万天平 (德国 Sartorius 公司)。

对-硝基苯基磷酸二钠 (*p*-NPP), 二硫苏糖醇 (DTT), 牛血清白蛋白 (BSA), 6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸 (Trolox), 二苯代苦味酰基 (DPPH), 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 均购自 Sigma 公司, 芦丁 (纯度 $\geq 98\%$, 国药集团化学试剂有限公司), 飞燕草素 3-*O*-芸香糖苷 (成都普菲德生物技术公司), 二甲基亚砜 (DMSO) 和甲醇、乙酸乙酯等均为国产分析纯。PTP1B 由中国科学院新疆理化所植物资源化学重点实验室提供。

2 方法

2.1 3 种植物茎、叶不同部位的制备 取阴干的树莓叶, 黑果悬钩子茎、叶, 天山茶藨茎、叶 500 g, 粉碎, 分别用甲醇在室温超声提取 1 h, 提取 4 次, 合并提取液, 浓缩, 回收溶剂得到提取物。提取物用蒸馏水 1 L 充分溶解成悬浮液, 该悬浮液用等体积石油醚萃取 6 次、乙酸乙酯萃取 4 次、正丁醇萃取 4 次, 分别浓缩后得到树莓叶乙酸乙酯部位 4.3 g, 正丁醇部位 1.5 g, 水部位 6.8 g, 黑果悬钩子叶乙酸乙酯部位 8.2 g, 正丁醇部位 4.6 g, 水部位 5.1 g, 黑果悬钩子茎乙酸乙酯部位 15.2 g, 正丁醇部位 4.5 g, 水部位 3.2 g, 天山茶藨叶乙酸乙酯部位 2.8 g, 正丁醇部位 12.5 g, 水部位 6.0 g, 天山茶藨茎乙酸乙酯部位 2.0 g, 正丁醇部位 1.3 g, 水部位 18.0 g。

2.2 树莓、天山茶藨果实提取物和花青素部位的制备^[10] 将冷冻保存的树莓果实和天山茶藨果实 500 g 分别用组织匀浆机打成匀浆, 在其中加入甲醇 (含 0.1% 盐酸) 1 L 室温下超声提取 30 min, 反复提取 3 次, 分别合并提取液, 减压浓缩除去甲醇后, 分别得到树莓和天山茶藨果实提取物 (浸膏) 21.4 g, 34.3 g。

果实提取物中含有糖、有机酸等杂质, 果实提取

物进一步用 AB-8 型大孔树脂纯化,以提高其中花青素的含量。称取上述树莓和天山茶藨果实提取物 20 g 和 30 g,用蒸馏水 200 mL 溶解后,分别上 AB-8 大孔树脂柱(100 cm × 5 cm),先用蒸馏水 500 mL 洗,以除去糖类杂质,流速 5.0 mL·min⁻¹,再用含 0.1% 盐酸的甲醇溶液 100 mL 洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,收集洗脱液,减压浓缩后分别得树莓和天山茶藨果实的花青素部位 2.5 g,4.6 g。

2.3 花青素含量的测定^[11]

2.3.1 标准曲线的绘制 称取飞燕草素 3-*O*-芸香糖苷(D3R)5.0 mg,用 pH 1.1 的氯化钾-盐酸缓冲液溶解,并定容至 50 mL,摇匀,作为对照品溶液(0.1 g·L⁻¹)。分别精确吸取 D3R 溶液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,置于 10 mL 棕色量瓶中,用 pH 1.1 的氯化钾-盐酸缓冲液稀释至刻度,摇匀,放置 30 min,同时以氯化钾-盐酸缓冲液为空白。在 300~900 nm 波长光谱扫描,确定 520 nm 为最大吸收波长。以吸光度为纵坐标,质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线。以飞燕草素 3-*O*-芸香糖苷质量浓度对吸光度做标准曲线,得到回归方程为 $Y=0.022X+0.013$, ($R^2=0.999$)。结果表明,花青素质量浓度在 0~50.0 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.3.2 两种植物果实花青素含量的测定 分别称取树莓果实、天山茶藨果实提取物各 10 mg 和相应的大孔树脂纯化的花青素部位,用 pH 1.1 的氯化钾-盐酸缓冲液溶解并定容至 10 mL,以氯化钾-盐酸缓冲液为空白,测定 520 nm 处的吸光度 A ,代入回归方程,按飞燕草素-3-*O*-芸香糖苷计算出花青素含量。

2.4 黄酮含量的测定^[12-13]

2.4.1 标准曲线的绘制 分别量取芦丁标准液(质量浓度 0.4 g·L⁻¹)0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mL 于试管中,分别用 30% 乙醇稀释至 5 mL,加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL,振荡后放置 5 min,加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀后放置 6 min,加入 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL,再加入 30% 乙醇 5 mL,同时设置空白对照。在 510 nm 波长下,测定吸光度 A 。以 A 为纵坐标,质量(M ,mg)为横坐标,绘制标准曲线。

2.4.2 不同部位黄酮含量测定 称取 3 种植物茎、叶的不同极性部位 10.0 mg,用甲醇溶解,定容至 25 mL,取样品溶液 1 mL,用 30% 乙醇稀释至 5 mL 后,按照制作标准曲线的方法,测定其在 510 nm 处 A ,代入回归方程,计算出各极性部位黄酮含量。

2.5 抗氧化活性测定

2.5.1 DPPH 法^[14-15] 称取 DPPH 7.9 mg 用甲醇溶解,用甲醇定容于 100 mL 量瓶(浓度 2.0×10^{-4} mol·L⁻¹)。分别称取 3 种植物的不同极性部位 10.0 mg,用甲醇溶解,并定容至 25 mL,取样品溶液 40 μL,加入甲醇补足到 2 mL,再加入 2.0×10^{-4} mol·L⁻¹ DPPH 溶液 2 mL 混匀,30 min 后在 517 nm 处测定 A ,控制样本用甲醇代替提取液,以纯甲醇为空白样本。对 DPPH 自由基的清除率按下式计算:

$$\text{清除率 } S = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

A_1 为控制样本的吸光度, A_2 为测试样本的吸光度。

另以不同浓度(0,400,800,1 200,1 600,2 000 μmol·L⁻¹)的 Trolox 清除 DPPH 自由基的能力做标准曲线,计算不同部位的 Trolox 当量抗氧化能力 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity)。得回归方程 $Y=0.047X$ ($R^2=0.998$),其中 Y 为清除率, X 为 Trolox 浓度(μmol·L⁻¹)。

2.5.2 ABTS 法 参照 Mustafa Ozgen 等人的方法[16-17]制备 ABTS 储备液。称取 ABTS 0.41 g,用 20 mmol·L⁻¹ 乙酸盐缓冲液(pH 4.5)溶解并定容至 100 mL,配制成 7.4 mmol·L⁻¹ ABTS 储备液。称取过硫酸钾 0.070 3 g,加水溶解定容至 100 mL,配制成 2.6 mmol·L⁻¹ 过硫酸钾储备液。将配置好的 ABTS 储备液与过硫酸钾储备液等体积混合,在室温黑暗条件下放置 12 h,再用 20 mmol·L⁻¹ 乙酸盐缓冲液(pH 4.5)稀释 45~55 倍,以 20 mmol·L⁻¹ 乙酸盐缓冲液(pH 4.5)为空白对照,使 ABTS 工作液在 734 nm 下的 $A 0.7 \pm 0.02$ 。

分别称取 3 种植物的不同极性部位 10.0 mg,用甲醇溶解,并定容至 25 mL,各取 40 μL 样品溶液,再加入无水乙醇 960 μL,然后加入 ABTS 工作液 4 mL 震荡 10 s 以充分混匀,静置 6 min,用乙酸盐缓冲液做为空白对照,测定 734 nm 处的吸光度 A_4 。用无水乙醇代替样液加入 ABTS 工作液 4 mL,在 734 nm 下测得吸光度 A_3 。对 ABTS 自由基的清除率按下式计算:

$$\text{清除率 } S = \frac{A_3 - A_4}{A_3} \times 100\%$$

A_3 为控制样本的吸光度, A_4 为测试样本的吸光度。

另以不同浓度(0,400,800,1 200,1 600,2 000 μmol·L⁻¹)的 Trolox 清除 ABTS 自由基的能力做标准曲线,计算不同部位的 Trolox 当量抗氧化能力

TEAC。得回归方程 $Y = 0.046X (R^2 = 0.999)$ ，其中 Y 为清除率， X 为 Trolox 浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.6 PTP1B 抑制活性测定^[18] 以对-硝基苯基磷酸二钠 ($p\text{-NPP}$) 作为底物，以钒酸钠为阳性对照，利用酶标仪进行 PTP1B 酶抑制剂的筛选，根据 PTP1B 水解 $p\text{-NPP}$ 的磷酸基团而产生颜色反应来测定 PTP1B 的活性。在 96 孔板中加入 PTP1B 蛋白溶液 $1\ \mu\text{L}$ ($0.115\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)，测试样品 $1\ \mu\text{L}$ (用 DMSO 溶解，质量浓度梯度为 $0.16, 0.31, 0.62, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 或阳性对照钒酸钠 $1\ \mu\text{L}$ (用 DMSO 溶解，摩尔浓度梯度为 $0.03, 0.06, 0.13, 0.25, 0.50, 1.00\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 或 DMSO $1\ \mu\text{L}$ ，缓冲液 ($50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, pH 7.3, $100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.1% BSA, $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT) $96\ \mu\text{L}$ 混匀，10 min 后加入 $p\text{-PNP}$ $2\ \mu\text{L}$ ，使其终浓度为 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。30 °C 孵育 30 min 后，用 3 mol NaOH 终止反应。以不含酶溶液的系统为空白，利用 SpectraMax MD5 酶标仪测定 405 nm 处 A 。

按下式计算不同浓度的抑制率。应用 Origin 软件计算半抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

2.7 统计分析 每个结果重复处理 3 次，所测数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，实验数据采用 SPSS 18.0 软件处理，其中 $P < 0.05$ 表示存在显著性差异。

3 结果与分析

3.1 树莓和天山茶藨果实花青素含量及其抗氧化、PTP1B 抑制活性 树莓果实和天山茶藨果实提取物是深红色浸膏，其中除了花青素之外含有糖类、有机酸等成分，对这两种提取物用 AB-8 型大孔树脂纯化后，得到紫黑色固体，即花青素部位，其中花青素含量分别提高了 18.72 倍和 15.50 倍，见表 1。利用 AB-8 型大孔树脂纯化花青素，通过水洗和甲醇洗脱两步洗脱的方法，就可除去糖等杂质，提高花青素的含量，说明 AB-8 型大孔树脂是一种简单、快速、高效的花青素纯化方法。

树莓果实和天山茶藨果实提取物和花青素部位对 ABTS 和 DPPH 自由基均有一定的清除能力，其抗氧化活性随着花青素含量的升高而升高，见表 1。提示花青素可能是其中主要的抗氧化活性成分。

表 1 两种植物果实花青素含量、抗氧化及 PTP1B 抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Two kinds of plant fruit anthocyanin content, antioxidant and PTP1B inhibitory activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

植物部位	萃取部位	花青素 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	ABTS 清除能力 / $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$	DPPH 清除能力 / $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$	PTP1B 抑制率 $\text{IC}_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
树莓果实	果实提取物	12.72 ± 0.14	1.47 ± 0.13	1.03 ± 0.05	3.22 ± 0.71
	花青素部位	238.13 ± 1.18	2.70 ± 0.24	2.45 ± 0.01	0.22 ± 0.04
天山茶藨果实	果实提取物	35.36 ± 0.45	1.57 ± 0.03	0.99 ± 0.04	1.33 ± 0.20
	花青素部位	548.05 ± 1.11	3.03 ± 0.06	2.55 ± 0.01	0.27 ± 0.04

天山茶藨果实对 PTP1B 的抑制活性，其提取物和花青素部位的 IC_{50} 分别为 (1.33 ± 0.20)、(0.27 ± 0.04) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，二者的 IC_{50} 均低于阳性对照药物钒酸钠的 IC_{50} $1.46\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，且它们对 PTP1B 的抑制活性随着花青素含量的升高而升高；树莓果实对 PTP1B 的抑制活性，其提取物和花青素部位的 IC_{50} 分别为 (3.22 ± 1.71)、(0.22 ± 0.04) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，它们对 PTP1B 的抑制活性也是随着花青素含量的升高而升高。

树莓果实为红色的聚核果，天山茶藨果实为紫黑色浆果，天山茶藨果实花青素的含量要高于树莓果实。花青素是树莓和天山茶藨果实中的特征性成分，它们的抗氧化活性和 PTP1B 抑制活性可能主要来源于花青素的作用，两种植物果实的抗氧化活性和 PTP1B 抑制活性不同可能主要是因为其中花青

素含量和组成的差异。

3.2 黄酮的标准曲线 以芦丁为对照品，以芦丁质量对吸光度制作黄酮的标准曲线，得到回归方程 $Y = 1.01X + 0.006 (R^2 = 0.995)$ 。结果表明，在 $0 \sim 1.0\ \text{mg}$ 吸光度与芦丁质量线性关系良好。

3.3 3 种植物茎、叶不同部位的黄酮含量及其抗氧化、PTP1B 抑制活性 3 种植物茎叶的不同萃取部位包括石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水部位，其中石油醚部位主要是茎、叶中的叶绿素，未测定其相关活性，分别测定了其他 3 个部位的活性。3 种植物茎、叶总黄酮含量次序为乙酸乙酯部位 > 正丁醇部位 > 水部位，各样品间存在显著性差异 ($P < 0.05$)，见表 2。其中，黑果悬钩子茎乙酸乙酯部位的黄酮含量最高，为 (658.65 ± 11.43) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，树莓叶水部位的黄酮含量最低，为 (39.60 ± 2.82) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。各萃取部

位的抗氧化能力不同,对 ABTS 自由基清除能力最强的是黑果悬钩子茎水部位,为 (4.53 ± 0.07) mmol Trolox $\cdot g^{-1}$ 当量,天山茶藨叶水部位的活性最低,为 (0.77 ± 0.05) mmol Trolox $\cdot g^{-1}$ 当量;对 DPPH 自由基清除能力最强的是黑果悬钩子茎水部位,为 (2.82 ± 0.09) mmol Trolox $\cdot g^{-1}$ 当量,天山

茶藨茎水部位的活性最低,为 (0.48 ± 0.01) mmol Trolox $\cdot g^{-1}$ 当量。各萃取部位对 PTP1B 均具有一定的抑制活性,活性最高的是黑果悬钩子茎水部位,其 IC_{50} (0.08 ± 0.01) mg $\cdot L^{-1}$, 小于阳性对照药物钒酸钠的 IC_{50} 1.46 mg $\cdot L^{-1}$, 活性最低的是树莓叶水部位,其 IC_{50} (3.41 ± 0.01) mg $\cdot L^{-1}$ 。

表 2 3 种植物茎、叶不同部位的黄酮含量、抗氧化活性及 PTP1B 抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Three kinds of plants from different parts of stem and leaf flavonoid content, antioxidant activity and PTP1B inhibitory activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

植物部位	萃取部位	黄酮 /mg $\cdot g^{-1}$	ABTS 清除能力 /mmol $\cdot g^{-1}$	DPPH 清除能力 /mmol $\cdot g^{-1}$	PTP1B 抑制率 IC_{50} /mg $\cdot L^{-1}$
黑果悬钩子茎	乙酸乙酯部位	658.65 \pm 11.43 ^a	3.47 \pm 0.13 ^b	2.54 \pm 0.06 ^b	0.23 \pm 0.03 ^a
	正丁醇部位	217.35 \pm 11.14 ^b	2.91 \pm 0.24 ^b	1.62 \pm 0.10 ^c	0.27 \pm 0.03 ^a
	水部位	228.67 \pm 7.82 ^b	4.53 \pm 0.07 ^a	2.82 \pm 0.09 ^a	0.08 \pm 0.01 ^b
黑果悬钩子叶	乙酸乙酯部位	198.96 \pm 7.08 ^a	1.74 \pm 0.09 ^b	1.33 \pm 0.10 ^a	0.16 \pm 0.06 ^b
	正丁醇部位	88.40 \pm 1.22 ^b	2.87 \pm 0.17 ^a	1.37 \pm 0.20 ^a	0.18 \pm 0.07 ^b
	水部位	63.41 \pm 2.27 ^c	0.86 \pm 0.04 ^c	0.77 \pm 0.01 ^b	1.93 \pm 0.80 ^a
树莓叶	乙酸乙酯部位	456.86 \pm 0.70 ^a	2.20 \pm 0.21 ^b	1.91 \pm 0.11 ^b	1.89 \pm 0.06 ^c
	正丁醇部位	255.78 \pm 3.63 ^b	3.35 \pm 0.08 ^a	2.55 \pm 0.06 ^a	1.33 \pm 0.04 ^b
	水部位	39.60 \pm 2.82 ^c	1.33 \pm 0.07 ^c	0.55 \pm 0.02 ^c	3.41 \pm 0.01 ^a
天山茶藨叶	乙酸乙酯部位	526.40 \pm 12.85 ^a	2.91 \pm 0.15 ^a	1.94 \pm 0.08 ^a	2.84 \pm 0.46 ^a
	正丁醇部位	337.28 \pm 10.36 ^b	1.20 \pm 0.12 ^b	1.38 \pm 0.04 ^b	1.34 \pm 0.22 ^b
	水部位	108.44 \pm 1.63 ^c	0.77 \pm 0.05 ^c	0.62 \pm 0.06 ^c	0.19 \pm 0.04 ^c
天山茶藨茎	乙酸乙酯部位	610.80 \pm 2.68 ^a	4.28 \pm 0.03 ^a	2.56 \pm 0.20 ^a	1.50 \pm 0.33 ^b
	正丁醇部位	168.32 \pm 10.20 ^b	2.75 \pm 0.04 ^b	1.00 \pm 0.03 ^b	3.33 \pm 1.01 ^a
	水部位	57.75 \pm 6.10 ^c	0.91 \pm 0.05 ^c	0.48 \pm 0.01 ^c	0.98 \pm 0.12 ^b

注:同一植物部位同列字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3.4 黄酮含量和抗氧化、PTP1B 抑制活性的相关性

不同植物不同萃取部位黄酮含量与抗氧化活性和 PTP1B 抑制活性具有不同的相关性。其中,天山茶藨茎、叶的黄酮含量与 ABTS 自由基清除能力的相关性在 $P < 0.01$ 水平上达到显著正相关,相关系数分别为 0.925, 0.888; 天山茶藨茎、叶的黄酮含量与 DPPH 自由基清除能力的相关性在 $P < 0.01$ 水平上达到显著正相关,相关系数分别为 0.993, 0.994, 天山茶藨茎、叶的抗氧化活性成分可能主要为黄酮类成分。树莓叶黄酮含量与 DPPH 自由基清除能力的相关性在 $P < 0.05$ 水平上达到显著正相关,相关系数 0.677。黑果悬钩子茎、叶黄酮含量与 ABTS, DPPH 自由基清除能力的相关性较低。黑果悬钩子叶、树莓叶黄酮含量与 PTP1B 抑制活性的相关性在 $P < 0.05$ 水平上达到显著负相关,相关系数分别为 -0.585 和 -0.720, 提示其中的黄酮类成分可能

是主要的活性成分。天山茶藨叶黄酮含量与 PTP1B 抑制活性的相关性在 $P < 0.01$ 水平上达到显著正相关,相关系数为 0.957, 即黄酮含量越低,其 PTP1B 抑制活性越好,提示其中可能存在黄酮类以外的 PTP1B 抑制剂。见表 3。

4 讨论

本研究中 3 种植物不同萃取部位均具有良好的抗氧化活性和 PTP1B 抑制作用。树莓果实和天山茶藨果实都是可食用的小浆果,具有长期的食用历史,其果实中花青素含量丰富,利用 AB-8 大孔树脂可以高效、快速地制备含量较高的花青素部位,这两种果实中花青素可能是主要的抗氧化和 PTP1B 抑制活性的有效成分。黑果悬钩子茎水部位为主要的抗氧化活性和 PTP1B 抑制活性的有效部位。天山茶藨茎、叶乙酸乙酯部位、树莓叶正丁醇部位也具有较高的抗氧化活性,天山茶藨茎、叶的黄酮含量和

表 3 3 种植物茎、叶不同部位黄酮含量与抗氧化活性、PTP1B 抑制活性之间的相关系数

Table 3 Three plants at different positions of stem and leaf flavonoid content and antioxidant activity, correlation coefficient between PTP1B inhibitory activities

项目	相关系数		
	ABTS 清除能力	DPPH 清除能力	PTP1B 抑制率
黑果悬钩子茎黄酮含量	-0.155	0.309	0.287
黑果悬钩子叶黄酮含量	0.106	0.571	-0.585 ¹⁾
树莓叶黄酮含量	0.443	0.677 ¹⁾	-0.720 ¹⁾
天山茶藨叶黄酮含量	0.888 ²⁾	0.994 ²⁾	0.957 ²⁾
天山茶藨茎黄酮含量	0.925 ²⁾	0.993 ²⁾	-0.109

注:与各组阳性对照相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

抗氧化活性具有显著正相关性,提示其中黄酮类成分是主要的抗氧化活性成分。这 3 种植物表现出不同的抗氧化活性和 PTP1B 活性,可能主要是其中黄酮含量和组成有所不同,此外,可能还具有黄酮类之外的有效成分。对这些有效部位的化学成分和作用机制进行深入研究,有望发现高活性、低毒性的抗氧化和降血糖有效成分。

[参考文献]

[1] 吴鸿. 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 对 β 细胞分泌胰岛素功能及其胰岛素信号传导通路的影响[D]. 上海:第二军医大学, 2009.

[2] Aftabul H, Jannik N A, Annette S, et al. Conformation-sensing antibodies stabilize the oxidized form of PTP1B and inhibit its phosphatase activity[J]. Cell, 2011, 147(1):185-198.

[3] 安争夕,周桂玲,杨昌友,等. 新疆植物志. 第二卷. 第二分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1994:262-266, 298-300.

[4] Liu M, Li X Q, Liu R H, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(10):2926-2930.

[5] Çekiç, Çetin, Mustafa Özgen. Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.) [J]. J Food Compos Anal, 2010, 23(6):540-544.

[6] Wang, S Y, Lin H S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies

with cultivar and developmental stage[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(2):140-146.

[7] Tabart Jessica, Thierry Franck, Claire Kevers, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ribes nigrum extracts [J]. Food Chem, 2012, 131(4):1116-1122.

[8] 王敏,侯慧先,时培海,等. 树莓液对糖尿病模型大鼠血糖、胰岛素水平影响的实验研究[J]. 中医药信息, 2002, 19(6):57.

[9] 韩泽梅. 树莓叶水提物降血糖活性成分的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2006.

[10] 刘琴,李敏,胡秋辉. 黑米麸皮与紫包菜花青素提取物的组成、抗氧化性与稳定性比较研究[J]. 食品科学, 2012, 33(19):113-118.

[11] 毛建霏,付成平,郭灵安,等. 可见分光光度法测定紫甘薯总花青素含量[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(2):101-104.

[12] 刘北林,董继生,霍红. 山楂黄酮最佳提取工艺探讨[J]. 食品科学, 2007, 28(6):167-170.

[13] 朱锦坤,张全伟,张奕丹,等. 大孔树脂富集纯化木棉花总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11):19-22.

[14] Liu L, Sun Y, Laura T, et al. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng[J]. Food Chem, 2009, 112(1):35-41.

[15] 陈永钧,龙晓英,安修,等. 5 种中药乙醇提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22):218-221.

[16] Mustafa Ozgen, R Neil Reese, Artemio Z Tulio, et al. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (abts) method to measure antioxidant capacity of Selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(4):1151-1157.

[17] 庞玉新,袁蕾,王中洋,等. 艾纳香不同部位提取物的抗氧化活性及其对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18):1-5.

[18] Liu D G, Gao Y, Voigt J H, et al. Acylsulfonamide-containing PTP1B inhibitors designed to mimic an enzyme-bound water of hydration[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 35(1):3005-3007.

[责任编辑 顾雪竹]