

doi:10.12301/j.issn.2095-6002.2021.05.012

文章编号:2095-6002(2021)05-0101-07

引用格式:苏晨玉,胡娜,董琦,等.沙棘果渣三萜酸富集、表征及其体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J].食品科学技术学报,2021,39(5):101-107.



SU Chenyu, HU Na, DONG Qi, et al. Study on enrichment and characterization of triterpene acid and its α -glycosidase inhibitory activity *in vitro* from *Hippophae rhamnoides* fruit pomace[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(5):101-107.

沙棘果渣三萜酸富集、表征及其体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

苏晨玉^{1,2,3}, 胡娜^{1,2}, 董琦^{1,2}, 王洪伦^{1,2,*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所/藏药研究重点实验室, 青海西宁 810008;

2. 青海省藏药研究重点实验室, 青海西宁 810008; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:为提高沙棘果渣的综合利用价值,采用十八烷基硅烷键合硅胶(ODS)填料减压洗脱法对沙棘果渣中的三萜酸进行富集制备,并通过高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(HPLC-Q-TOF-MS/MS)对其中含有的三萜酸类化合物进行了表征,同时对其 α -葡萄糖苷酶的抑制活性进行了评价。结果表明,富集后总三萜酸质量分数从10.20%提高到了75.01%。HPLC-Q-TOF-MS/MS结果显示,富集后三萜酸含量最高的组分中含有麦珠子酸、山楂酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸及其衍生物在内的11种五环三萜类化合物。 α -葡萄糖苷酶抑制实验结果表明:三萜酸含量最高的组分半抑制浓度 IC_{50} 为 (0.040 ± 0.160) mg/mL,活性显著高于阳性对照阿卡波糖,说明沙棘果渣中的三萜酸成分具有降低糖尿病患者餐后血糖的潜在能力。ODS减压洗脱法富集三萜酸,极大地提高了三萜酸的含量,并具有较高的回收率,研究以期对沙棘果渣三萜酸的综合利用提供一定的理论基础和数据支持。

关键词:沙棘果渣;三萜酸;富集制备;高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱; α -葡萄糖苷酶
中图分类号:TS201.2;R932 **文献标志码:**A

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)为胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属(*Hippophae*)植物,具有耐干旱、耐盐碱、耐贫瘠性等特征^[1-2],并具有较高的营养价值和药用价值。沙棘含有黄酮类、三萜类、多糖和氨基酸等活性成分^[3-4],是一种药食同源植物,在《晶珠本草》《藏药志》等典籍中均有药用记载。同时沙棘作为原料生产的副食品在市场上深受消费者青睐,目前有沙棘酸奶、沙棘果醋、沙棘冰酒和沙棘咀嚼片等产品。现阶段对沙棘的研究主要集中于沙棘果和沙棘叶等方面^[5-8],对沙棘果加工过程中产生的大量沙棘果渣研究和利用较少,造成了资源的

浪费^[9]。据文献报道^[10-12],沙棘果渣中也含有丰富的生物活性成分,因此具有极高的研究价值。

通过高效液相色谱法可测定沙棘中含有的三萜酸类化合物类型^[13]。三萜酸类化合物中,五环三萜酸以游离或苷类形式广泛存在于自然界,是沙棘中含量最丰富的一种次级代谢产物,分为乌苏烷型、齐墩果烷型、羽扇豆烷型和木栓烷型4种结构类型,代表化合物有熊果酸、科罗索酸、山楂酸、齐墩果酸和桦木酸^[14]。五环三萜酸类化合物有广泛的药理和生物活性作用^[15-17],具有降血糖、护肝、抗肿瘤、抗炎及免疫调节等功效。枇杷叶和夏枯草等植物中所

收稿日期:2021-01-19

基金项目:青海省科技厅2017年重大专项(2017-SF-A8);青海省基础研究计划项目(2019-ZJ-7023);青海省创新平台建设专项(2021-ZJ-T05)。

第一作者:苏晨玉,女,硕士研究生,研究方向为天然药物化学。

*通信作者:王洪伦,男,研究员,博士,主要从事天然药物化学方面的研究。

含的熊果酸、科罗索酸和齐墩果酸通过对糖原磷酸化酶的抑制作用来降低血糖水平并对 α -葡萄糖苷酶表现出抑制活性^[18-21]。沙棘果渣中三萜酸类化合物含量丰富,总三萜酸含量可达 11.605 mg/g ^[22],并且动物实验结果显示,沙棘果渣提取物对糖尿病大鼠表现出较好的疗效^[23]。

针对沙棘果渣利用率较低现状,本研究通过对沙棘果渣三萜酸进行富集,提高各组分中三萜酸的含量,对富集组分中三萜酸成分进行表征和含量测定,同时对其 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行评价,以期对沙棘果渣的进一步深度开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沙棘果渣,青海康普生物科技股份有限公司;甲醇(色谱纯),德国Merck公司;制备分离用球形十八烷基键合硅胶填料(ODS-A-HG),粒径 $50\ \mu\text{m}$ 、孔径 $12\ \text{nm}$,日本YMC公司;阿卡波糖,上海源叶科技有限公司; α -葡萄糖苷酶(酵母来源),美国Sigma公司;对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷($p\text{NPG}$),上海阿拉丁试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

AcquityTM ultra型高效液相色谱仪,美国Waters公司;Triple TOF5600⁺型飞行时间质谱(配有电喷雾离子源,ESI),美国AB SCIEX公司;Eppendorf minispan型离心机,德国Eppendorf公司;EPOCH2型酶标仪,美国BioTek公司。

1.3 实验方法

1.3.1 沙棘果渣三萜酸的提取

将干燥的沙棘果渣粉碎后,按料液比(kg/L) $1:10$ 加入体积分数 95% 乙醇,加热回流提取3次,提取温度 $70\ ^\circ\text{C}$,每次 $1.5\ \text{h}$,过滤后合并滤液。将滤液减压浓缩,即得沙棘果渣乙醇浸膏, $-20\ ^\circ\text{C}$ 冷冻保存。

1.3.2 沙棘果渣三萜酸的富集

称取沙棘浸膏 $1.0\ \text{kg}$,加入 $2\ \text{L}$ 蒸馏水, $60\ ^\circ\text{C}$ 水浴加热溶解,静置沉淀后过滤,滤渣干燥后即得三萜酸粗提物。取干燥后的粗提物 $6.20\ \text{g}$,加入甲醇溶解后过滤,与ODS按照质量比 $1.0:1.5$ 拌样并干燥。装入减压玻璃柱,依次使用 $3\sim 5$ 倍柱体积的体积分数 20% 、 60% 、 80% 、 100% 甲醇和氯仿-甲醇溶液(体积比 $90:10$)按照流动相极性由大到小进行梯度洗脱。收集各部分馏分,并浓缩,干燥后即得不同极性富集物。

1.3.3 沙棘果渣三萜酸含量的测定

使用香草醛冰乙酸法测定三萜酸含量,以齐墩果酸为标准品在紫外波长 $547\ \text{nm}$ 下测定吸光度,绘制标准曲线,并计算各富集组分的三萜酸含量^[24]。

分别称取干燥后的浸膏、粗提物、不同极性组分 $10.0\ \text{mg}$,加入少量甲醇溶解后,再加入无水乙醇定容至 $50\ \text{mL}$ 。每组进行3次平行实验,取 $0.5\ \text{mL}$ 样品溶液于具塞试管中,每种样品取6份,3份为实验组,3份为对照组,置于沸水浴挥发溶剂后,实验组与对照组均加入 $1.6\ \text{mL}$ 高氯酸,而后实验组加入质量分数 5% 的香草醛-冰乙酸溶液 $0.4\ \text{mL}$,实验组和对照组均在 $70\ ^\circ\text{C}$ 下反应 $15\ \text{min}$,最后实验组、对照组分别加入 $8.0\ \text{mL}$ 和 $8.4\ \text{mL}$ 冰乙酸终止反应,于 $547\ \text{nm}$ 处测定吸光度,根据回归方程计算三萜酸含量。

1.3.4 HPLC-Q-TOF-MS/MS 实验条件设定

1.3.4.1 液相条件

称取三萜酸含量最高的组分 $7.5\ \text{mg}$, $1\ \text{mL}$ 甲醇-水溶液(体积比 $80:20$)溶解后,过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜用于测试。色谱柱:Agilent SB C18($250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$),流动相为甲醇-水溶液(体积比 $85:15$),等度洗脱,流速为 $0.8\ \text{mL/min}$,检测波长为 $210\ \text{nm}$,柱温为 $30\ ^\circ\text{C}$ 。

1.3.4.2 质谱条件

负离子扫描模式,离子源温度 $550\sim 600\ ^\circ\text{C}$;离子源电压为 $4\ 500\sim 5\ 500\ \text{V}$;扫描范围 $m/z\ 100\sim 1\ 500$ 。

1.3.5 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

参照文献^[25]的方法并改良,实验分为空白组、对照组、样品组和样品空白组,各反应物按表1中的剂量加入96孔板,每组进行3次平行实验,将待测试剂、磷酸缓冲液和酶溶液混合均匀,在恒温振荡器中 $37\ ^\circ\text{C}$ 保温 $10\ \text{min}$,加入 $50\ \mu\text{L}$ $0.5\ \text{mmol/L}$ $p\text{NPG}$ 溶液,充分混匀,于 $37\ ^\circ\text{C}$ 反应 $10\ \text{min}$,最后加入 $50\ \mu\text{L}$ $0.1\ \text{mol/L}$ 的 Na_2CO_3 溶液终止反应,在 $405\ \text{nm}$ 波长下测定吸光度,根据式(1)计算各组 α -葡萄糖苷酶的抑制率及 IC_{50} 。

$$\text{抑制率} = \frac{(A_C - A_B) - (A_S - A_{SB})}{A_C - A_B} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, A_C 为空白组吸光度, A_B 为对照组吸光度, A_S 为样品组吸光度, A_{SB} 为样品空白组吸光度。

1.4 数据处理

所有实验均重复3次,结果表示为平均值 \pm 标准差。差异显著性分析采用Graph Pad 8.0软件进行,绘图采用Origin 9.0软件。

表1 酶活性抑制实验设计

V(添加)/ μL	空白组	对照组	样品组	样品空白组
二甲基亚砜	20	20	0	0
抑制剂	0	0	20	20
磷酸缓冲液	80	130	80	130
酶溶液	50	0	50	0
pNPG	50	50	50	50
碳酸钠溶液	50	50	50	50

2 结果与分析

2.1 沙棘果渣三萜酸的富集与含量测定结果

通过 ODS 减压富集共得 6 个不同的极性组分, 分别命名为 F1 ~ F6。其中, 20% 甲醇洗脱为 F1 组

分; 60% 甲醇洗脱为 F2 组分; 80% 甲醇洗脱为 F3 组分; 纯甲醇洗脱时, 明显分为 2 个不同颜色的色带, 其中首先被洗脱下来的色带为 F4 组分, 最后被洗脱下来的色带为 F5 组分; 氯仿-甲醇洗脱得到的组分为 F6。

以标准品质量浓度 (mg/mL) 为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程为 $y = 2.8358x - 0.019$, $R^2 = 0.9988$, 由此计算沙棘果渣各极性组分总三萜酸的含量, 如表 2。经过富集共得三萜酸粗提物 179.12 g, 取 6.20 g 粗提物进行减压富集后, 共得三萜酸含量较高的 F3 组分 0.51 g, F4 组分 1.75 g, 其三萜酸的质量分数分别为 63.24% 和 75.01%, 说明沙棘果渣中的三萜酸主要集中在低极性组分中, ODS 减压富集可快速高效地将化合物按照不同极性进行富集, 且具有较高的回收率, F4 组分三萜酸回收率为 51.30%。

表2 富集组分中三萜酸含量

Tab.2 Triterpene acid contents in enriched components

浸膏	粗提物	F1	F2	F3	F4	F5	F6	%
10.20 \pm 0.17	41.27 \pm 0.09	4.34 \pm 0.13	13.50 \pm 0.07	63.24 \pm 0.10	75.01 \pm 0.06	10.18 \pm 0.09	27.46 \pm 0.15	

2.2 沙棘果渣富集组分 F4 的特征分析

由于 F4 组分三萜酸含量最高, 故利用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 对富集后的组分 F4 进行了分析,

以明确其特征成分, 其液相色谱和总离子流图分别如图 1 和图 2。组分 F4 经过分析发现主要含有 11 种五环三萜类化合物, 结果见表 3。

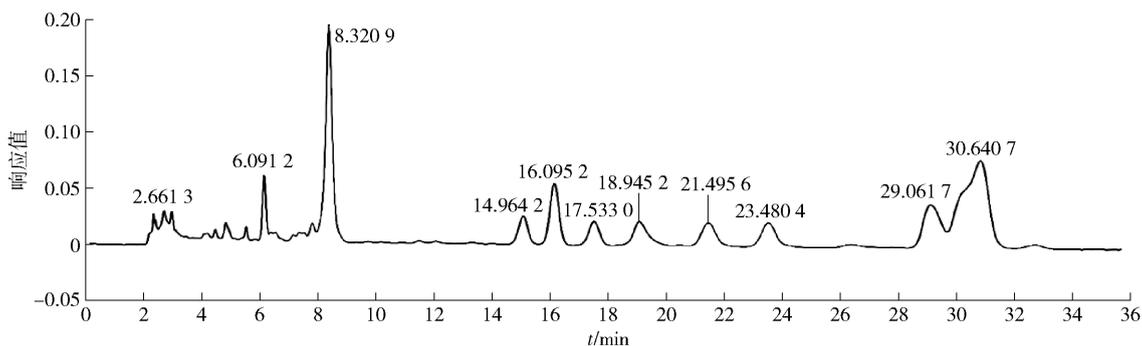


图1 组分 F4 的 HPLC 分析

Fig.1 HPLC analysis of component F4

根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 结合分子离子峰和二级质谱碎片离子峰, 推测出化合物类型。化合物 1 的 m/z 487 (M-H) - m/z 469 (M-H₂O) 丰度值较高, 对比结果为化合物 2 α , 3 β , 24-三羟基-12-烯-28-乌苏酸。对比文献[26], 化合物 10 和 11 为差向异构体齐墩果酸和熊果酸, 齐墩果酸由于相邻 2 个甲基空间结构的影响, 造成 m/z 439 (M²-H₂O) - m/z 421 (M³-H₂O) 丰度值较高; 而熊果酸和化合物

5 中 m/z 411 (M³-HCOOH) - m/z 393 (M⁴-H₂O) 和 m/z 455 (M³-HCOOH) - m/z 409 (M⁴-H₂O) 丰度值较为突出。化合物 4 与 10、5 与 11 间相对分子质量相差 16, 且具有相同的裂解规律, 因此, 推测化合物 4 为山楂酸, 化合物 5 为科罗索酸。化合物 6 ~ 9 比山楂酸相对分子质量增加了 146, 结合文献[27-30]和碎片峰信息可推测为香豆酰三萜酸, 即化合物 6 ~ 9 分别为山楂酸和科罗索酸的衍生物。

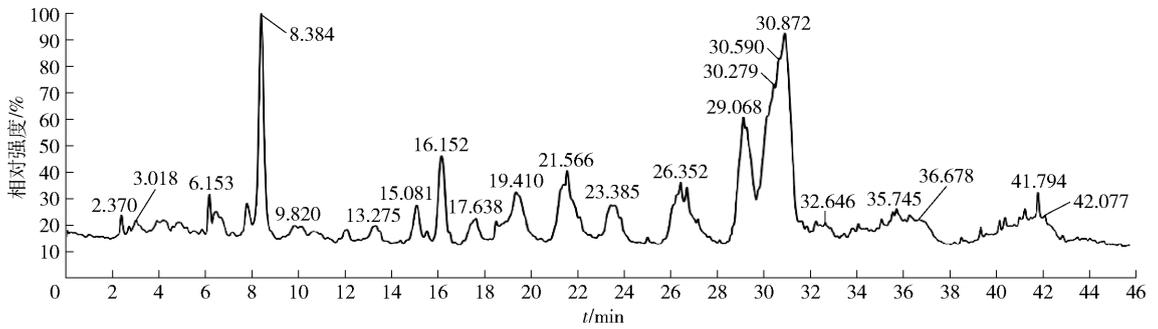


图2 组分F4的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of component F4

表3 HPLC-Q-TOF-MS/MS表征组分F4中的三萜酸

Tab. 3 Triterpene acids from component F4 characterized by HPLC-Q-TOF-MS/MS

编号	<i>t</i> (保留)/min	分子离子峰质荷比	化学式	MS/MS 碎片峰质荷比	化合物名称
1	6.09	487.342 2	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.345 0, 469.344 7, 467.319 5	2 α ,3 β ,24-三羟基-12-烯-28-乌苏酸
2	8.32	471.347 7	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.351 3, 453.340 3, 407.333 2	麦珠子酸
3	13.17	471.347 2	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.355 2, 469.858 4, 193.071 3	3,24-二羟基-齐墩果-12-烯-28-酸
4	14.96	471.347 2	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.355 2, 453.349 9, 423.328 9	山楂酸
5	16.09	471.347 2	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.355 2, 339.366 7, 255.262 7	科罗素酸
6	17.53	617.385 3	C ₃₉ H ₅₄ O ₆	617.391 6, 193.071 8, 145.029 0	山楂酸-2- <i>O</i> -反式-对-香豆酰酯
7	18.94	617.385 9	C ₃₉ H ₅₄ O ₆	617.391 6, 277.216 9, 145.029 7	科罗素酸-2- <i>O</i> -反式-对-香豆酰酯
8	21.49	617.385 9	C ₃₉ H ₅₄ O ₆	617.393 7, 253.217 3, 145.029 5	山楂酸-3- <i>O</i> -反式-对-香豆酰酯
9	23.48	617.385 9	C ₃₉ H ₅₄ O ₆	617.392 0, 253.216 9, 145.029 8	科罗素酸-3- <i>O</i> -反式-对-香豆酰酯
10	29.06	455.360 1	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.353 1, 281.234 1, 143.900 0, 83.026 6	齐墩果酸
11	30.64	455.360 1	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.353 1, 412.245 9, 394.228 2, 281.234 1	熊果酸

2.3 三萜酸提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性分析

不同极性组分对 α -葡萄糖苷酶的IC₅₀测定结果见表4。由表4可知,除组分F1抑制活性极显著低于阳性对照阿卡波糖外,沙棘果渣粗提物及组分F2~F6均对 α -葡萄糖苷酶具有较好的抑制活性,且都极显著高于阳性对照组阿卡波糖。组

分F4抑制活性最强,IC₅₀仅为0.040 mg/mL;其次为组分F3,IC₅₀为0.047 mg/mL。由于组分F1三萜酸含量远远低于其他组分,因此其抑制活性较差,IC₅₀大于2.000 mg/mL。结果表明,不同组分对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性与三萜酸含量呈正相关。

表4 不同组分对 α -葡萄糖苷酶活性的半抑制浓度

Tab. 4 Semi-inhibitory concentration of different components

F1	F2	F3	F4	F5	F6	粗提物	阿卡波糖
>2.000 ± 0.280 **	0.252 ± 0.260 **	0.047 ± 0.170 **	0.040 ± 0.160 **	0.316 ± 0.070 **	0.166 ± 0.100 **	0.147 ± 0.080 **	1.320 ± 0.008

**表示与阿卡波糖比较差异极显著($P < 0.001$)。

3 结论

目前对三萜酸类化合物的富集多采用大孔树脂乙醇洗脱法。在纯化过程中多采用水溶液进行上样吸附,由于提取液成分复杂,化合物极性较小等原因,样品溶解性较差,容易造成树脂的污染和堵塞,因此,上样前需进行预处理,且上样浓度不能过大,导致富集效率较低^[31-34]。本研究采用的ODS减压

洗脱法与固相萃取有类似之处,二者均为减压条件下进行梯度洗脱。蒋红红^[35]研究发现,固相萃取法对白头翁中的五环三萜皂苷类化合物的富集具有良好的回收率。ODS减压洗脱法采用拌样吸附进行干法上样,改善了样品溶解性较差的问题,并且增大了上样量,ODS法的上样量远远大于固相萃取法,再通过甲醇-水溶液进行梯度洗脱,实现了不同极性组分的分离与富集。同时,该方法具有良好的稳定性和重复利用性。结果表明:ODS减压洗脱法富

集后,F4组分三萜酸质量分数提高到了75.01%,且具有较高的回收率,达到51.30%。同时结合液-质联用色谱分析对F4组分所含三萜酸成分进行表征,结果显示:F4组分含有11种五环三萜类化合物,表明ODS减压洗脱法对极性较小的五环三萜类化合物具有良好的富集效果。

研究发现:植物中的三萜酸类成分对 α -葡萄糖苷酶具有较好的抑制活性,其中熊果酸对 α -葡萄糖苷酶有显著的抑制活性,其 IC_{50} 仅为0.76 $\mu\text{g/mL}$,科罗索酸和齐墩果酸的 IC_{50} 分别为1.14、1.27 $\mu\text{g/mL}$ ^[36-37],因此,推测F4组分中的熊果酸、科罗索酸和齐墩果酸这3种五环三萜对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制发挥了主要的作用。本研究通过一步步提高富集组分三萜酸含量,并进行不同组分对 α -葡萄糖苷酶的抑制实验,发现随着三萜酸含量的提高,富集组分对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用也随之增强,且显著高于药物对照组阿卡波糖,表明三萜酸类化合物具有降低糖尿病人餐后血糖的潜在活性。

参考文献:

[1] 李晓花,孔令学,刘洪章.沙棘有效成分研究进展[J].吉林农业大学学报,2007,29(2):162-167.
LI X H, KONG L X, LIU H Z. Advances on effective compositions of seabuckthorn[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2007, 29(2): 162-167.

[2] 王志伟.沙棘的营养价值及其利用[J].中国果菜,2017,37(11):23-24.
WANG Z W. Study on nutritive value and comprehensive utilization of seabuckthorn[J]. China Fruit and Vegetable, 2017, 37(11): 23-24.

[3] RAN B B, LI W D. Research progress on chemical constituents and their differences between sea buckthorn berries and leaves[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(9): 1767-1773.

[4] 张程慧,祁玉霞,程康蓉,等.沙棘的综合价值研究进展[J].食品工业科技,2017,38(22):331-335.
ZHANG C H, QI Y X, CHENG K R, et al. Advances on research and applications of *Hippophea rhamnoides*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(22): 331-335.

[5] GANSUKH E, MARIA J, MUTHURAMAN P, et al. Effects of seabuckthorn extracts on influenza viruses human cancer cells[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2017, 24: 1646-1656.

[6] WANG X, LIU J R, ZHANG X H, et al. Seabuckthorn berry polysaccharide extracts protect against acetamino-

phen induced hepatotoxicity in mice via activating the Nrf-2/HO-1-SOD-2 signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2018, 38: 90-97.

- [7] WEI E W, YANG R, ZHAO H P, et al. Microwave-assisted extraction releases the antioxidant polysaccharides from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123: 384-388.
- [8] MA X Y, YANG W, ALEXIS M V, et al. Analysis of flavour compounds and prediction of sensory properties in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2020, 55: 280-290.
- [9] 穆春堂,郝小燕,刁小高,等.沙棘果渣在动物饲料中应用的研究进展[J].动物营养学报,2019,31(7):2965-2970.
MU C T, HAO X Y, DIAO X G, et al. Research progress of application of sea buckthorn pomace in animal diets[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(7): 2965-2970.
- [10] CHEN J Y, TENG D, LI W. Protection and mechanism of total flavone of *Hippophae rhamnoides* on vascular endothelial cells[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2011, 31(3): 355-358.
- [11] KUKINT P, SHCHERBAKOV D N, GENSH K V, et al. Bioactive components of sea buckthorn *Hippophae rhamnoides* L. [J]. Foliage, 2017, 43(7): 747-751.
- [12] GUO R, CHANG X, GUO X, et al. Phenolic compounds, antioxidant activity, antiproliferative activity and bioaccessibility of sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries as affected by *in vitro* digestion[J]. Food & Function, 2017, 8(11): 4229-4240.
- [13] 滕晓萍,王宏昊,花圣卓,等.HPLC法测定沙棘叶、果实、枝条中齐墩果酸和熊果酸的含量[J].国际沙棘研究与开发,2013,11(4):1-3.
TENG X P, WANG H H, HUA S Z, et al. HPLC method in determining the content of oleanolic acid and ursolic acid in the organs of *Hippophae rhamnoides*[J]. The Global Seabuckthorn Research and Development, 2013, 11(4): 1-3.
- [14] NIEGE F, LAETITIA P, HELENE E, et al. Pentacyclic triterpene bioavailability: an overview of *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Molecules, 2017, 22(3): 400.
- [15] HILDA L R, SAMUEL E S, FRANCISCO J, et al. Oleanolic acid induces a dual agonist action on PPAR γ and GLUT4 translocation: a pentacyclic triterpene for dyslipidemia and type 2 diabetes[J]. European Journal of Pharmacology, 2020, 883: 173252.
- [16] FUKUSHIMA M, MATSUYAMA F, UEDA N, et al.

- Effect of corosolic acid on postchallenge plasma glucose levels [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2006, 73: 174–177.
- [17] ZHU Y S, LI X Q, CHEN J Q, et al. The pentacyclic triterpene lupeol switches M1 macrophages to M2 and ameliorates experimental inflammatory bowel disease [J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 30: 74–84.
- [18] DZOYEM J P, NGANTENG D N D, MELONG R, et al. Bioguided identification of pentacyclic triterpenoids as anti-inflammatory bioactive constituents of *Ocimum gratissimum* extract [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 268: 113637.
- [19] SUN Q, HE M, ZHANG M, et al. Ursolic acid: a systematic review of its pharmacology, toxicity and rethink on its pharmacokinetics based on PK-PD model [J]. *Fitoterapia*, 2020, 147: 104735.
- [20] CHEN J, LIU J, ZHANG L Y, et al. Pentacyclic triterpenes. Part 3: synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 11(16): 2915–2919.
- [21] MUHAMMAD A S, MUHAMMAD J, HUSSAN S S, et al. Inhibition of α -glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives [J]. *Phytochemistry*, 2002, 3(60): 295–299.
- [22] 周浩楠. 沙棘果渣中三萜酸类成分的分离分析及其体外护肝作用研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2020: 58–59.
- ZHOU H N. Isolation and analysis of triterpenes acid active ingredients from *Hippophae rhamnoides*. Fruit pomace and its hepatoprotective effect *in vitro* [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2020: 58–59.
- [23] 曹群华, 瞿伟菁, 邓云霞, 等. 沙棘籽渣和果渣中黄酮对小鼠糖代谢的影响 [J]. *中药材*, 2003(10): 735–737.
- CAO Q H, QU W J, DENG Y X, et al. Effect of flavonoids from the seed and fruit residue of *Hippophae rhamnoides* L. on glycometabolism in mice [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2003(10): 735–737.
- [24] 宋福江, 王玉乐, 闫寒, 等. 紫外分光光度法测定灵芝孢子油中总三萜含量 [J]. *中国医药导刊*, 2017, 19(9): 940–942.
- SONG F J, WANG Y L, YAN H, et al. Determination of total triterpenoids in *Ganoderma lucidum* spores oil by ultraviolet spectrophotometry [J]. *Chinese Journal of Medical Guide*, 2017, 19(9): 940–942.
- [25] 吴慧平, 张吉吉, 丁婷, 等. 夏枯草提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2009, 25(5): 361–363.
- WU H P, ZHANG J J, DING T, et al. Inhibiting effect of spica *Prunellae vulgaris* extract on α -glucosidase [J]. *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, 2009, 25(5): 361–363.
- [26] 郭晓敏, 程捷恺, 张明, 等. UHPLC/MSn 质谱树技术与 Q/TOF 联用在利舒康胶囊成份鉴定中的应用 [J]. *中草药*, 2017, 48(10): 1944–1956.
- GUO X M, CHENG J K, ZHANG M, et al. Application of UHPLC/MSn spectral tree combined with Q/TOF in chemical profiling of Lishukang capsules [J]. *Chinese Traditional Herbal Drug*, 2017, 48(10): 1944–1956.
- [27] HÄBERLEIN H, TSCHERSCH K P. Triterpenoids and flavonoids from *Leptospermum scoparium* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 35(3): 765–768.
- [28] XIA H, ZHANG X L, WANG G H, et al. Chemical constituents from *Barringtonia racemosa* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(13): 2460–2465.
- [29] CHANGON S, JI E L, JUNG A, et al. Acylated triterpenoids, flavonoids, and lignans isolated from the stems of *Tetracera loureiri* [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2019, 55(2): 386–389.
- [30] 许琼明, 唐丽华, 李夏, 等. 珍珠菜中五环三萜-3-O-对香豆酸酯类化学成分分离鉴定 [J]. *中国药学杂志*, 2010, 45(11): 825–828.
- XU Q M, TANG L H, LI X, et al. Isolation and identification of 3-O-p-coumaroyloxyl pentacyclic triterpenoids from *Lysimachia clethroides* Duby [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2010, 45(11): 825–828.
- [31] 绍长森, 韩真真, 张国青, 等. 大孔吸附树脂分离纯化翻白草中三萜类化合物及其降血糖作用的研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2018(3): 80–87.
- SHAO C S, HAN Z Z, ZHANG G Q, et al. Purification of triterpenoids from *Potentilla discolor* by microporous resin and the anti-diabetic effects [J]. *Chinese Food Additives*, 2018(3): 80–87.
- [32] 段晓颖, 范梨颖, 马秋莹, 等. 灵芝总三萜提取与精制工艺优选 [J]. *中医研究*, 2018, 31(11): 59–63.
- DUAN X Y, FAN L Y, MA Q Y, et al. Extraction process of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* [J]. *Traditional Chinese Medicinal Research*, 2018, 31(11): 59–63.
- [33] 吴梨, 赵伟, 杨瑞金. 从枇杷叶中分离提取熊果酸的研究进展 [J]. *北京工商大学学报(自然科学版)*, 2011, 29(6): 50–53.
- WU L, ZHAO W, YANG R J. Research progress in isolation and extraction of ursolic acid from loquat leaf

- [J]. Journal of Beijing Technology and Business University (National Science Edition), 2011, 29(6): 50-53.
- [34] 李柰, 王昌涛, 孙宝国. 沙棘叶中黄酮提取及大孔树脂分离纯化槲皮素[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(4): 56-63.
- LI N, WANG C T, SUN B G. Water extraction and macroporous resins for purification of flavonoids from seabuckthorn leaves [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 32(4): 56-63.
- [35] 蒋红红. 基于固相萃取技术对白头翁的质量控制及其肝损伤保护作用机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2020: 16-18.
- JIANG H H. Quality control of *Pulsatilla chinensis* based on solid-phase extraction and protective mechanism of *Pulsatilla chinensis* against liver injury [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2020: 16-18.
- [36] 陈剑, 吴月娟, 吕寒, 等. 枇杷叶中三萜酸类成分抗糖尿病及其并发症的体外活性研究[J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29(3): 78-80.
- CHEN J, WU Y X, LÜ H, et al. Study on *in vitro* activities of triterpene acids from leaf of *Eriobotrya japonica* against diabetes and its complications [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2020, 29(3): 78-80.
- [37] 曹新民, 张华华, 周健. 赤芝中羊毛脂烷型三萜类化合物及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J]. 中草药, 2017, 48(7): 1275-1281.
- CAO X M, ZHANG H H, ZHOU J. Chinese lanostane triterpenoids of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory effect on α -glucosidase [J]. Traditional Herbal Drug, 2017, 48(7): 1275-1281.

Study on Enrichment and Characterization of Triterpene Acid and Its α -Glucosidase Inhibitory Activity *in Vitro* from *Hippophae rhamnoides* Fruit Pomace

SU Chenyu^{1,2,3}, HU Na^{1,2}, DONG Qi^{1,2}, WANG Honglun^{1,2,*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology/Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Xining 810008, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to improve the comprehensive utilization of *Hippophae rhamnoides* fruit pomace, a method for enrichment of the triterpene acids from *Hippophae Rhamnoides* fruit pomace was established by the octadecylsilyl (ODS) decompression elution, and the type of the triterpene acids were identified by high performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS). Meanwhile, the α -glucosidase inhibitory affection of triterpene acids was evaluated *in vitro*. The results showed that the concentration of triterpene acids increased from 10.20% to 75.01%. The results of HPLC-Q-TOF-MS/MS showed that 11 kinds of pentacyclic triterpenoids in the component with the highest triterpenoid acid content were identified, including alphitolic acid, maslinic acid, crosolic acid, oleanolic acid, ursolic acid and their derivatives. The inhibitory experiment of α -glucosidase showed that the IC_{50} of the component with the highest triterpenoid acid content was (0.040 ± 0.160) mg/mL, and the activity was significantly higher than the positive control acarbose, indicating triterpene acid from *Hippophae Rhamnoide* fruit pomace had the potential to reduce the postprandial blood glucose levels of diabetic patients. This study confirmed that ODS decompression elution method was an efficient triterpene acid enrichment method, which could provide certain theoretical basis and data support for the comprehensive utilization of triterpene acids from *Hippophae Rhamnoide* fruit pomace.

Keywords: *Hippophae rhamnoide* fruit pomace; triterpene acid; enrichment and preparation; HPLC-Q-TOF-MS/MS; α -glucosidase