食品工业科技 半月刊
SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY
权威 · 核心 · 领先 · 实用 · 全面
美国《化学文摘》CA
日本科学技术振兴机构数据库JST
北大核心期刊
中国生物医学文献系统SinoMed收录期刊
中国精品科技期刊
英国《食品科技文摘》FSTA
中国科技核心期刊CSTPCD
RCCSE中国核心学术期刊
中国农林核心期刊A

油茶叶提取物的5α-还原酶抑制活性及化学成分分析

崔心禹，夏　琛，金　蒙，苏　远，吴晓琴，沈建福

The Inhibitory Activity of *Camellia oleifera* Leaves Extract against 5α-Reductase and Chemical Components Analysis

CUI Xinyu, XIA Chen, JIN Meng, SU Yuan, WU Xiaoqin, and SHEN Jianfu

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030006

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法快速测定畜禽产品中抗组胺类药物残留

Determination of Antihistamine Residues in Livestock and Poultry Products by Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry

食品工业科技. 2021, 42(5): 250-256,264

利用高效液相色谱-飞行时间质谱和高效液相色谱-三重四级杆质谱检测南美白对虾的过敏原

Determination of Allergens of *Litopenaeus vannamei* by HPLC-QTOF and Triple Quadrupole Mass Spectrometer

食品工业科技. 2019, 40(4): 232-237,244

超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法同时测定槟榔籽中四种生物碱含量

Simultaneous Determination of Four Alkaloids in Betel Nut Seeds by Ultra Performance Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry

食品工业科技. 2021, 42(14): 257-263

不同品种甘薯叶提取物抗氧化及对α-葡萄糖苷酶抑制活性的研究

Antioxidant Activity and α-glucosidase Inhibitory Activity of Sweet Potato(*Ipomoea batatas* L.)Leaf Extracts from Different Varieties

食品工业科技. 2019, 40(23): 283-289

超高效液相色谱-三重四极杆质谱法快速测定煎炸过程用油中的苯并[a]芘

Rapid Determination of Benzo[a]Pyrene in Deep Frying Oil by Ultra Performance Liquid Chromatography-triple Quadrupole Mass Spectrometry

食品工业科技. 2018, 39(19): 248-251,257

体外模拟胃肠消化过程中四种茶叶活性成分及抗氧化性变化规律

Changes of Active Constituents and Antioxidant Properties of Four Kinds of Tea during Gastrointestinal Digestion *in Vitro*

食品工业科技. 2020, 41(1): 301-306

关注微信公众号，获得更多资讯信息

崔心禹, 夏琛, 金蒙, 等. 油茶叶提取物的 5α-还原酶抑制活性及化学成分分析 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 97−105. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030006

CUI Xinyu, XIA Chen, JIN Meng, et al. The Inhibitory Activity of *Camellia oleifera* Leaves Extract against 5α-Reductase and Chemical Components Analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 97−105. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030006

油茶叶提取物的 5α-还原酶抑制活性及化学成分分析

崔心禹, 夏　琛, 金　蒙, 苏　远, 吴晓琴, 沈建福*

（浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058）

摘　要: 目的：研究油茶叶提取物（COLE）的 5α-还原酶（5α-Reductase, 5α-R）抑制活性，分析具有高 5α-R 抑制活性的油茶叶提取物的物质基础。方法：首先建立 5α-R 酶促反应体系，通过高效相色谱法测定 5α-R 活性；制备不同极性溶剂油茶叶提取物，测定比较其 5α-R 抑活性，并以度他雄安作为阳性药物；以 5α-R 抑制率为指标选择油茶叶最佳提取剂；采用 Folin-Ciocalteu 法和亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法测定各提取物总酚、总黄酮含量，分析各提取物 5α-R 抑制率与多酚黄酮含量的相关性；采用超高效液相色谱串联三重四极杆飞行时间质谱分析（UPLC-TRIPLE TOF-MS/MS）5α-R 抑制活性最高的油茶叶提取物的化学组分。结果：确定酶促反应体系如下：磷酸盐缓冲液 300 μL，0.76 mg/mL 的粗酶提取物 500 μL，2.0 mmol/L 的睾酮 50 μL，样品 50 μL，2.0 mmol/L 的还原型辅酶 II 100 μL，于 37 ℃ 条件下反应 30 min。不同油茶叶提取物具有不同程度的 5α-R 抑制活性，其中油茶叶 50% 乙醇提取物的抑制率最高，达 49.77%±4.43%，以 5α-R 抑制效果为指标，选择 50% 乙醇为最佳提取溶剂；经过 Pearson 相关性分析发现各油茶叶提取物 5α-R 抑制率与其中总酚、总黄酮含量高度相关（r>0.6，r>0.8）；采用 UPLC-TRIPLE TOF-MS/MS 分析了油茶叶提取物中 22 个酚类化合物，其中有 5 种物质已经在文献中报道具有高 5α-R 抑制活性。结论：油茶叶提取物具有 5α-R 抑制活性，是潜在的 5α-R 抑制剂，其抑制活性与多酚、黄酮含量具有相关性。在油茶叶 50% 乙醇提取物中发现槲皮素、芦丁、儿茶素、3-O-没食子酰基-4, 6, -[(S)-六羟基联苯二酰基]-α/β-D-吡喃葡萄糖（Gemin D）、3, 4, 6-三-O-没食子酰基-α/β-D-吡喃葡萄糖可能是 COLE 发挥 5α-R 抑制活性的物质基础。

关键词: 油茶叶提取物, 5α-还原酶, 超高效液相色谱串联三重四极杆飞行时间质谱, 多酚, 黄酮

中图分类号: TS252.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2021)19−0097−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030006

本文网刊:

The Inhibitory Activity of *Camellia oleifera* Leaves Extract against 5α-Reductase and Chemical Components Analysis

CUI Xinyu, XIA Chen, JIN Meng, SU Yuan, WU Xiaoqin, SHEN Jianfu*

（College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China）

Abstract: Objective: To study the 5α-Reductase (5α-R) inhibitory activity of *Camellia oleifera* (COLE) leaves extract, and to analyze the material basis of its extract with high 5α-R inhibitory activity. Method: Firstly, a 5α-R enzymatic reaction system was established, and the 5α-R activity was measured by high performance phase chromatography(HPLC). The extracts of *Camellia oleifera* leaves with different solvents were prepared, and the 5α-R inhibitory activity was measured and compared, with Dutasteride as the positive drug; 5α-R inhibition rate was used to select the best solvent of *Camellia oleifera* leaves extract; Folin-Ciocalteu method and sodium nitrite-aluminum nitrate-sodium hydroxide color method was used to determine the total phenol and total flavonoid content of each extract, and correlation between the 5α-R inhibition rate of each extract and the content of polyphenol and flavonoids was analyzed; ultra-high performance liquid chromatography tandem triple quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TRIPLE TOF-MS/MS) was used to

收稿日期: 2021−03−02

基金项目: 国家自然科学基金（31270722）。

作者简介: 崔心禹（1995−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物与人类健康, E-mail: 595331659@qq.com。

*** 通信作者:** 沈建福（1964−）, 男, 硕士, 教授, 研究方向: 食品安全与标准化、食品工艺, E-mail: shenjf107@zju.edu.cn。

analyze the chemical components of extract with the highest 5α-R inhibitory activity. Results: The enzymatic reaction system was determined as follows: 300 μL of phosphate buffer, 500 μL of 0.76 mg/mL enzyme extract, 50 μL of 2.0 mmol/L testosterone, 50 μL of sample, 2.0 mmol/L of NADPH 100 μL, reacted at 37 ℃ for 30 min. Different *Camellia oleifera* extracts had different levels of 5α-R inhibitory activity. The 50% ethanol extract of *Camellia oleifera* had the highest inhibition rate, reaching 49.77%±4.43%. Taking 5α-R inhibitory effect as an indicator, 50% ethanolwas the best extraction solvent. Pearson correlation analysis showed that the 5α-R inhibition rate of each *Camellia oleifera* extract was highly correlated with the content of total phenols and total flavonoids (r>0.6, r>0.8); UPLC-TRIPLE TOF-MS/MS analysis 22 kinds substances, five of which were reported that had the 5α-R inhibitory activity. Conclusion: The extract of *Camellia oleifera* leaves had 5α-R inhibitory activity and was a potential 5α-R inhibitor. Its inhibitory activity was related to the content of polyphenols and flavonoids. Quercetin, rutin, catechin, 3-O-galloyl-4, 6, -[(S)-hexahydroxybiphth-aloyl]-α/β-D-glucopyranose (Gemin D), 3, 4, 6-tri-O-galloyl-α/β-D-glucopyranose (GAG), might be the material basis for COLE to exert 5α-R inhibitory activity.

Key words: *Camellia oleifera* leaves extract; 5α-reductase(5α-R); utra performance liquid chromatography tandem triple quadrupole time-of-flight mass spectrometry(UPLC-TRIPLE TOF-MS/MS); phenols; flavonoids

5α-还原酶(5α-Reductase, 5α-R)是重要的雄性激素代谢酶, 睾酮(Testosterone, T)在 5α-还原酶(5α-R)的作用下不可逆地转化双氢睾酮(Dihydrotestosterone, DHT), 过程中还要依赖还原性辅酶 II(NADPH)[1−2], 如图 1 所示。DHT 是最强的活性雄性激素, 因为它与雄性激素受体(Androgen receptor, AR)的亲和性比 T 高 2~5 倍, 诱导 AR 信号传导的效力比 T 高 10 倍[3−4] 可引发雄性激素依赖性疾病比如痤疮、雄激素源性脱发、女性多毛症、前列腺癌、前列腺增生、假两性畸形等[5−6]。

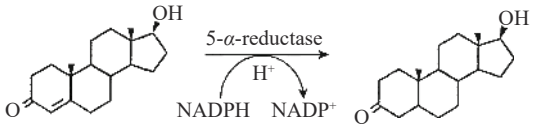

图 1 5α-R 的作用机理

Fig.1 Catalytic reaction process of 5α-R

5α-R 是皮肤中最重要的雄性激素代谢酶, 它具有三种同工酶, 其中 I 型和 II 型酶的特征比较清楚, 二者的主要区别为 5α-RI 主要存在于肝脏及非生殖器官皮肤, 其发挥生理作用的最适 pH 为范围较宽为 6~9, 而 5α-RII 主要存在前列腺、睾丸、附睾、精囊、头皮毛囊等, 其最适 pH 为 5.5[7−11]。

目前已开发的 5α-R 抑制剂包括甾体类和非甾体类, 最常见药物如非那雄胺、度他雄胺、爱普列特等。但这些药物存在不良反应, 如代表性药物非那雄胺可能对男性造成抑郁、焦虑、认知障碍、勃起障碍、性欲减退、男性乳房女子化、肌肉生长受损等副作用[12−13], 统称为非那雄胺后综合征(Post-finasteride syndrome, PFS)[14]。这些副作用是这类药物本身固有的, 难以通过改造结构来消除, 因此从天然植物中寻找安全、有效且来源广泛的 5α-R 抑制剂替代这些化学合成的抑制剂已成为国内外研究的热点。Niederprüm 等[15] 通过体外实验证实了锯叶棕果实提取物具有 5α-R 抑制活性以及治疗前列腺增生的效果。Weisser 等[16] 发现锯叶棕提取物 IDS 89 对人前列腺上皮和间质中的 5α-R 具有抑制作用, 且属于非竞争性抑制, 有效成分是可皂化亚组分中的月桂酸, 它对上皮和基质的最大抑制率分别为 52% 和 45%。邓桂球等[17] 从雌性大鼠肝脏、雄性大鼠附睾组织中分别提取 I 型、Ⅱ型 5α-R, 采用 HPLC 法测定出红花提取物对 I 型、Ⅱ型 5α-R 活性均有抑制效果, 抑制率分别达到 88.12% 和 61.65%。另外也有研究报道大黄[18] 非洲臀果木[19]、大蓖麻[20]、薰衣草[21]、莲子心[22−23] 等植物的提取物具有良好的 5α-R 抑制活性, 是天然来源的 5α-R 抑制剂。

油茶叶是山茶科植物油茶 *Camellia oleifera* 的叶, 《中华本草》中提到其味微苦, 性平, 有治疗鼻衄, 皮肤溃烂瘙痒, 疮疽的功效。罗晓伟等[24] 已经证明油茶蒲具有 5α-R 抑制活性, 油茶叶与油茶蒲同为油茶的重要组成部分, 推测油茶叶与油茶蒲可能具有类似的生物活性。本文以 5α-R 为研究靶点, 旨在探究油茶叶提取物对 5α-R 活性的影响, 探讨其成为潜在的 5α-R 抑制剂的可能性, 并分析其化学成分, 为其在治疗雄性激素依赖型疾病如痤疮、前列腺癌等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜采摘的油茶叶 浙江省江山市江山之间生物科技有限公司提供; SPF 级别雄性大鼠 4 只, 体重(200±20)g 由浙江省医学科学院提供, 许可证编号 SCXK(浙)2019-0002; 还原型辅酶 II、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司; 度他雄胺、睾酮、没食子酸、芦丁分析对照品 上海阿拉丁试剂有限公司; 色谱级甲醇等有机试剂 均来自国药集团化学试剂有限公司。

Waters e2695 高效液相色谱、Acquity TM Ultra 型超高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; Luna C_{18}(2)色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 美国 Phenomenex 公司; Ultimate UHPLC LP- C_{18} 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) 上海月旭科技股份有

限公司；Sciex Triple TOF 5600+四极杆飞行时间质谱仪　美国 AB Sciex 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　粗酶提取物的制备以及 5α-R 含量的测定　参考张蓓[25]的方法并稍作修改，取雄性大鼠 4 只，禁食不禁水过夜后脱臼处死。迅速取肝脏，剥离脂肪组织，称重，剪碎，置于烧杯，加入预冷的提酶缓冲液（提酶缓冲液[26]：0.32 mol/L 蔗糖；0.1 mmol/L DTT；1 mmol/L EDTA；20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.4）按照 1∶4（w/v）的比例在冰水浴中用匀浆器匀浆，制成匀浆液，然后将其分装至离心管，在 4 ℃、10000×g 条件下离心 20 min，除去漂浮的脂肪，取上层液体，同样条件下再离心 1 h，上清液即为微粒体粗提取物。采用 Bradford 法[11]对粗酶提取物定量，以其总蛋白质含量表示 5α-R 的含量。

1.2.2　5α-R 酶促反应体系的建立与 5α-R 活性测定

1.2.2.1　T 标准曲线的制备　配制系列浓度 T 溶液：5~2000 μmol/L，将不同浓度 T 溶液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤至液相瓶，进入高效液相色谱仪检测，以峰面积 A（AU*min）为纵坐标，以 T 浓度 C（μmol/L）为横坐标，绘制标准曲线。

液相色谱条件：色谱柱：LunaC_{18}（2）柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）不锈钢柱；柱温：30 ℃；流动相：甲醇/水 70/30（V/V）；流速：1.0 mL/min；检测波长：242 nm；进样体积：20 μL。

1.2.2.2　5α-R 酶促反应体系的建立　在 1000 μL 测活体系中[27]，将 300 μL PBS 缓冲液（pH7.4）、500 μL 粗酶提取物稀释液、50 μL T、50 μL 50% 乙醇、100 μL NADPH 按顺序添依次加至离心管，于旋涡混合仪快速混合均匀 3 s，37 ℃ 恒温水浴锅反应 30 min，在 t_0 时刻与 t_{30} 时刻快速分别取样 400 μL，快速加入 800 μL 甲醇（甲醇起到失活蛋白酶的作用），涡旋 5 s 终止反应[17]。上述反应液在 12000 r/min 离心 15 min，除蛋白，取上清液，0.22 μm 有机相滤膜过滤至液相瓶，待检测。

1.2.2.3　5α-R 活性测定　HPLC 检测比较反应前 t_0 时刻与反应后 t_{30} 时刻 T 峰面积的变化，液相色谱条件同 1.2.2.1。将 T 峰面积带入 T 标准曲线，计算出相应浓度，以及 T 浓度的变化量，从而实现测定 5α-R 的活性。设置不同的反应管包括：空白对照管（酶提取物用甲醇失活）、酶正常反应管、阳性对照管（50% 乙醇换成度他雄胺溶液）。

计算公式如下：

$$\Delta T(\mu mol/L)=C_{t0}-Ct_{30} \qquad 式（1）$$

式中，C_{t0} 表示 0 min 时 T 浓度，Ct_{30} 表示 30 min 时 T 浓度，ΔT 表示反应前后 T 浓度的差值。

$$5\alpha\text{-R活性}(\mu mol\ T/(g\ prot\cdot 30\ min))=\frac{C_{t0}-Ct_{30}}{C_{5\alpha-R}} \qquad 式（2）$$

式中，定义 5α-R 活性（μmol T/（g prot·30 min））为每克酶提取物每 30 min 转化 T 的量，$C_{5\alpha-R}$（g/L）表示 5α-R 粗提取物的浓度，即 5α-R 粗提取物蛋白质的浓度。

1.2.3　5α-R 酶促反应体系的优化

1.2.3.1　反应体系中 NADPH、T、粗酶提取物适宜添加浓度的确定　将 NADPH 用 PBS 配制成一系列梯度：0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L，采用 1.2.2 中提到的 5α-R 活性测定方法，在固定 5α-R 提取物浓度为 0.76 mg/mL、T 浓度为 1 mmol/L 的条件下，以 5α-R 活性为指标，考察 NADPH 的适宜添加浓度。

将 T 配制成一系列梯度：0.1、0.4、1.0、1.5、2.0 mmol/L，采用 1.2.2 中提到的 5α-R 活性测定方法，在固定 5α-R 提取物浓度为 0.76 mg/mL，NADPH 浓度为 2 mmol/L 的条件下，以 5α-R 活性为指标，考察 T 的适宜添加浓度。

以蛋白质浓度表示粗酶提取物的浓度，将其用 PBS（pH7.4）缓冲液稀释成系列梯度：0.38、0.76、1.52、3.08、6.16 mg/mL，采用 1.2.2 中提到的 5α-R 活性测定方法，在固定 T 浓度为 2 mmol/L，NADPH 浓度为 2 mmol/L 的条件下，以 5α-R 活性为指标，考察粗酶提取物的适宜添加浓度。

1.2.3.2　反应体系稳定性的考察　确定最终反应体系各个组分浓度条件：0.76 mg/mL 粗酶提取物 500 μL，2 mmol/L T 50 μL，样品 50 μL，2 mmol/L NADPH 100 μL，分别测定四次空白对照管和酶正常反应管的 T 浓度变化，考察反应体系的重复性和稳定性，计算相对偏差 RSD。

1.2.3.3　度他雄胺 5α-R 抑制活性的测定　度他雄胺是Ⅰ型 5α-R 抑制剂，将其为阳性药物并稀释成系列梯度：2、4、6、8、12、16 nmol/L，采用 1.2.2 中提到的 5α-R 活性测定方法，在适宜的 NADPH 浓度、T 浓度、粗酶提取物浓度条件下，把 50% 乙醇溶液替换成系列浓度的度他雄胺溶液，考察不同浓度度他雄胺对 5α-R 活性的抑制率，绘制抑制曲线，计算出度他雄胺对 5α-R 活性的半抑制浓度（IC_{50}），公式如下：

$$\text{度他雄胺}5\alpha\text{-R抑制率}(\%)=\frac{(\text{正常反应管}\Delta T-\text{度他雄胺管}\Delta T)}{(\text{正常反应管}\Delta T-\text{空白对照}\Delta T)}\times 100 \qquad 式（3）$$

1.2.4　油茶提取物的制备及 5α-R 抑制活性的测定

1.2.4.1　不同溶剂油茶叶提取物的制备及得率的计算　油茶叶经过挑选去除病变叶后，45 ℃ 烘箱干燥，粉碎过 60 目筛，称取 8 份 20 g 油茶叶粉末按 1∶40（w∶v）料液比分别加入水、50% 乙醇溶液、甲醇、乙醇、正丁醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、石油醚，先搅拌浸泡 3 h 再于 50 ℃ 下超声振荡提取两次（2 h/次），4000 r/min 离心 10 min 使得固液分离，上清液旋转蒸发减压浓缩除去有机试剂，然后真空冷冻干燥，得

到不同极性溶剂的油茶粗提取物分别记为 A1~A8，观察其颜色及性状，并计算得率，计算公式如下：

$$得率(\%)=\frac{m}{M}\times 100 \qquad 式（4）$$

式中，m 为提取物的质量(g)，M 为原料干基质量(g)。

1.2.4.2 油茶叶提取物 5α-R 抑制活性的测定 分别取 A1~A8 冻干粉末，用 50% 乙醇均配制成 200 μg/mL 的稀释液，按照 1.2.2 测定 A1~A8 稀释液对 5α-R 的抑制率，以 5α-R 抑制率为指标，确定最佳制备溶剂，并测定、计算最佳溶剂提取物对 5α-R 活性的半抑制浓度(IC_{50})，相关计算公式同公式(3)。

1.2.5 油茶提取物总酚和总黄酮含量的测定 用 50% 乙醇溶液将 A1~A8 配制成 1 mg/mL 的稀释液，采用 Folin-Ciocalteu 法，以没食子酸计，测定不同油茶叶提取物中的总酚含量。标准曲线的制备：配制梯度浓度的芦丁溶液 0~50 μg/mL。在 1 mL 体系中依次加入 100 μL 没食子酸溶液，250 μL 的福林酚试剂，250 μL 的 15% 的碳酸钠溶液，再补足 400 μL 水至 1 mL 终体积。充分混合之后 80 ℃ 水浴放置 30 min，静置冷却 10 min，4000 r/min 离心 5 min，取上清液于 778 nm 测定吸光值 $A_{778\ nm}$。依据没食子酸标准溶液的浓度和相应的吸光值绘制标准曲线。样品的测定：操作同上，将样品吸光值带入标准曲线，以没食子酸计，算得样品总酚含量[28]。

采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法，以芦丁计，测定不同溶剂植物提取物中总黄酮的含量。标准曲线的制备：精密配制梯度浓度的芦丁溶液 0~50 μg/mL。吸取 200 μL 待测芦丁溶液，置于 5 mL 试管中，加入 300 μL 60% 乙醇溶液，再加入 100 μL 亚硝酸钠溶液，摇匀，放置 6 min，加入 150 μL 硝酸铝溶液，摇匀，放置 6 min，加入 400 μL 氢氧化钠溶液，最后加入 1.35 mL 60% 乙醇溶液至终体系为 2.5 mL，摇匀，放置 15 min，于 510 nm 测定吸光值 $A_{510\ nm}$。依据芦丁标准溶液的浓度和相应的吸光值绘制标准曲线。样品的测定：操作同上，将样品吸光值带入标准曲线，以芦丁计，算得样品总黄酮含量[29]。

1.2.6 油茶叶提取物化学组分的分析鉴定 参考王微[30] 的方法取得 8 mg 油茶叶 50% 乙醇提取物，加入 2 mL 甲醇，配制成 4 mg/mL 的提取物待测液，超声 5 min 后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤至液相瓶中，待测。

色谱柱：C_{18} 柱(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm)；流动相：0.1% 甲酸-水溶液(流动相 A)和乙腈(流动相 B)；梯度洗脱条件：0~10 min, 5%~13% B; 10~20 min, 13% B; 20~40 min, 13%~20% B; 40~60 min, 20%~45% B; 60~70 min, 45%~100% B；进样量：10 μL；流速：1 mL/min；柱温：35 ℃；检测波长：280 nm。

UPLC-Triple TOF 5600+飞行时间液质联用仪：负离子扫描模式；扫描范围：m/z 100~2000；雾化气(GS1)：55 psi；雾化气(GS2)：55 psi；气帘气(CUR)：35 psi；离子源温度(TEM)：550 ℃(负)；离子源电压(IS)：−4500 V(负)；一级扫描：去簇电压(DP)：100 V；聚焦电压(CE)：10 V；二级扫描：使用 TOFMS-ProductIon-IDA 模式采集质谱数据，CID 能量为 20、40 和 60 V，进样前，用 CDS 泵做质量轴校正，使质量轴误差小于 2 ppm。

1.3 数据处理

采用 Excel 软件进行数据分析(各组数据均用 $\bar{x}\pm s$ 来表示)；用 Graphpad Prism 6.0 绘制线图、柱状图；相关性分析采用 SPSS 中 Pearson 相关性分析统计检验(*表示 $P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 5α-R 粗酶提取物蛋白含量的测定

粗酶提取物呈现粉红色，采用 Bradford 法对 5α-R 粗酶提取物定量，以蛋白质含量表示。测得蛋白质含量的标准曲线为 y=0.5753x+0.5269(y 为吸光值，x 为标准蛋白浓度，R^2=0.9977)，计算得出蛋白质浓度为 12.12 mg/mL。

2.2 T 的标准曲线

如图 2 所示，T 在 5~2000 μmol/L 范围内呈现良好的线性关系，回归方程为 y=18110x+116886(R^2=0.9998)。

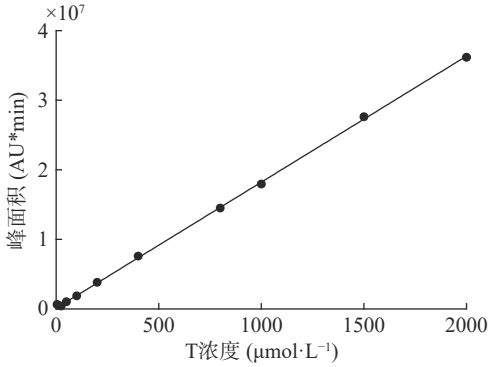

图 2 T 的标准曲线

Fig.2 The standard curve of T

2.3 酶促反应体系的确定

如图 3 所示，在 0.5~2.5 mmol/L 范围内，随着 NADPH 浓度的增加，酶活性不断上升，当 NADPH 浓度为 2 mmol/L 时再增加时对酶活性的影响不大，而且考虑到 NADPH 价格昂贵，故最终选择 2 mmol/L 作为 NADPH 在 5α-R 酶促反应体系中的适宜添加浓度。如图 4 所示，在 0.1~2 mmol/L 范围内，随着 T 浓度的增加，酶活性不断上升，选择酶活性最高时对应的 2 mmol/L 作为 T 在 5α-R 酶促反应体系中的适宜添加浓度。如图 5 所示，5α-R 提取物浓度在 0.38~0.76 mg/mL 范围时，随着提取物浓度增加，酶活力逐渐上升，在浓度为 0.76 mg/mL 时达到最高值，之后随着提取物浓度的增大酶活力反而降低，因此确定 0.76 mg/mL 为粗酶提取物浓度在 5α-R 酶促

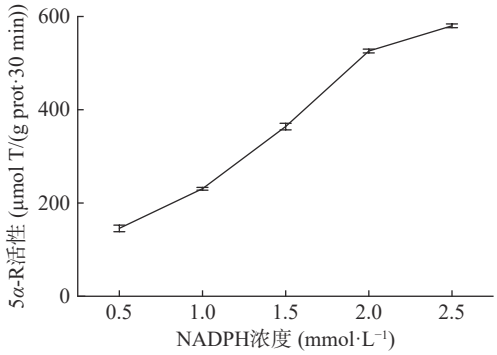

图 3　NADPH 浓度对 5α-R 活性的影响

Fig.3　Effect of concentrations of NADPH on 5α-R activity

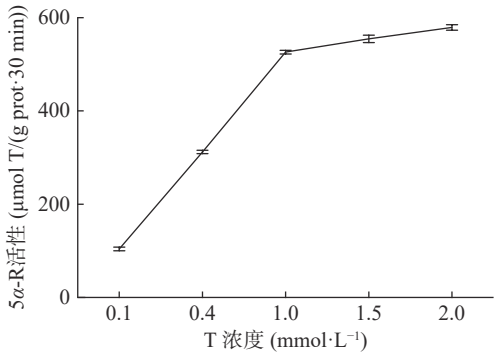

图 4　T 浓度对 5α-R 活性的影响

Fig.4　The effect of concentrations of testosterone on 5α-R activity

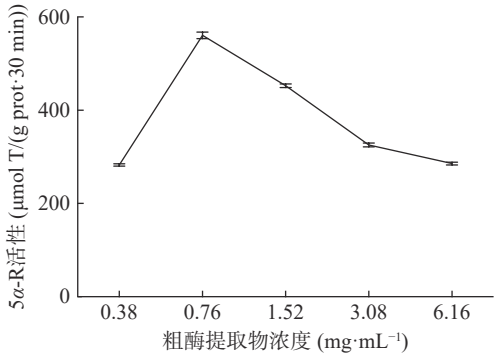

图 5　粗酶提取物浓度对 5α-R 活性的影响

Fig.5　Effect of concentrations of enzyme extract on 5α-R activity

反应体系中的适宜添加浓度。

最终确定的反应条件如下：pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液 300 μL，添加浓度为 0.76 mg/mL 的粗酶提取物 500 μL，添加浓度为 2 mmol/L 的 T 50 μL，样品 50 μL，添加浓度为 2 mmol/L 的 NADPH 100 μL，反应温度为 37 ℃，反应时间为 30 min。

2.4　酶促反应体系的稳定性

根据 2.3 确定的反应条件，分别测定四份空白对照管和酶正常反应管（同一批次）酶活性分别为 (6.11±0.16)、(565.53±9.24) μmol T/(g prot·30 min)，相对偏差均小于 2%，说明该法可重复，此 5α-R 酶促反应体系稳定强。

2.5　度他雄胺的 5α-R 抑制活性

如图 6 所示，当度他雄胺浓度范围为 2～16 nmol/L 时，阳性药物度他雄胺对 5α-R 的抑制作用具有量效关系，曲线拟合度良好，根据拟合曲线算得度他雄胺对 5α-R 的半抑制浓度（IC_{50}）为 6.24 nmol/L，有文献报道[25,31] 度他雄胺对 I 型 5α-R 的 IC_{50} 等于 6 nmol/L，与本测定值相近，进一步说明 5α-R 酶促反应体系可靠有效。

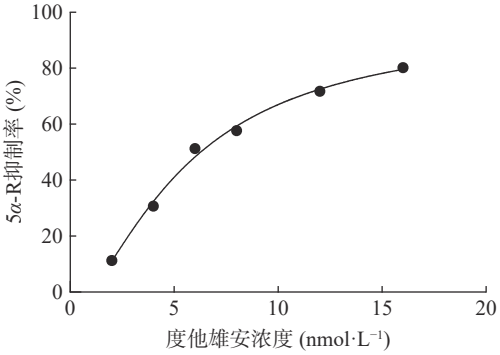

图 6　度他雄胺对 5α-R 的抑制曲线

Fig.6　Inhibition curve of dutasteride on 5α-R

2.6　不同油茶叶提取物得率

不同极性溶剂的油茶叶提取物的得率如表 1 所示，50% 乙醇、甲醇、乙醇、正丁醇油茶叶提取物的得率高均超过 20%，其中油茶叶 50% 乙醇提取物的得率最高达 29.02%。这是因为该溶剂的溶解范围广，可以富集大多数的活性成分。

表 1　不同极性溶剂对油茶叶提取物得率的影响

Table 1　Effect of different polar solvents on the yield of *Camellia oleifera* leaves extracts

编号	提取剂	得率(%)
A1	水	14.31
A2	50%乙醇	29.02
A3	甲醇	23.70
A4	乙醇	24.29
A5	正丁醇	21.96
A6	乙酸乙酯	8.81
A7	二氯甲烷	1.85
A8	石油醚	1.94

2.7　油茶叶不同溶剂提取物的 5α-R 抑制率

根据图 7 可知，200 μg/mL 的油茶叶提取物对 5α-R 的抑制活性有影响，油茶叶石油醚提取物对其有促进作用，而其他油茶叶提取物呈现不同程度的抑制作用，其中油茶叶 50% 乙醇提取物对 5α-R 抑制效果最明显，高达 49.77%±4.43%，其次，二氯甲烷提取物和甲醇提取物对 5α-R 的抑制活性也较高，分别为41.26%±0.02%、36.66%±0.71%。由于油茶叶50% 乙醇提取物 5α-R 抑制率最高，因此最佳制备溶剂为 50% 乙醇，并将其提取物命名为 COLE（*Camellia oleifera* Leaves Extract, COLE），测得其 IC_{50} 为 259.56 μg/mL。已知临床上使用度他雄胺的治疗剂

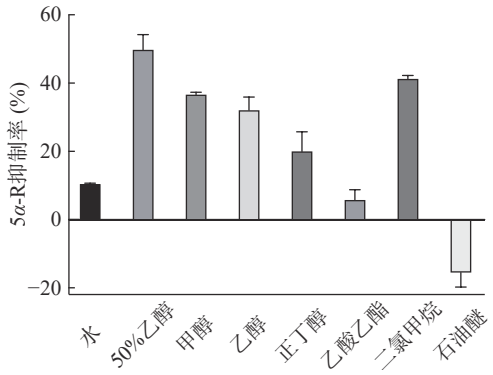

图 7 不同油茶叶提取物对 5α-R 的抑制率

Fig.7 5α-R inhibition rate of different *Camellia oleifera* leaves extracts

量为 0.5 mg/d[32], 经过等效换算, 若以 5α-R 抑制活性为指标, 39.35 mg/d COLE 与度他雄胺临床剂量治疗效果相当。

2.8 油茶叶提取物的总酚和总黄酮含量及与 5α-R 抑制率的相关性分析

A1~A8 的总酚、总黄酮含量见表 2。Pearson 相关性分析如表 3 所示, A1~A8 中总酚、总黄酮含量与 5α-R 抑制率相关系数分别为 0.609 和 0.808, 即 5α-R 抑制率与油茶叶提取物中总多酚含量在高度正相关(r>0.6), 5α-R 抑制率与总黄酮含量存在显著的强正相关(r>0.8, P<0.05), 这表明油茶叶提取物中的多酚与黄酮是抑制 5α-R 的重要物质。

表 2 不同油茶叶提取物(A1~A8)总酚和总黄酮含量

Table 2 Contents of total phenols and total flavonoids in different *Camellia oleifera* leaves extracts (A1~A8)

编号	提取物	总酚含量(%)	总黄酮含量(%)
A1	油茶叶水提取物	12.22±0.06	3.24±0.11
A2	油茶叶50%乙醇提取物	18.51±0.50	7.55±0.15
A3	油茶叶甲醇提取物	23.22±0.26	5.54±0.10
A4	油茶叶乙醇提取物	19.95±0.24	7.02±0.25
A5	油茶叶正丁醇提取物	19.61±0.30	3.92±0.20
A6	油茶叶乙酸乙酯提取物	7.44±0.18	3.56±0.11
A7	油茶叶二氯甲烷提取物	10.05±0.59	3.50±0.58
A8	油茶叶石油醚提取物	−0.58±0.03	0.97±0.05

表 3 油茶叶提取物的 5α-R 抑制率与其总黄酮、总酚含量与之间的相关性

Table 3 Correlation rate between 5α-R inhibition rate and total flavonoids, total phenolics in extracts of *Camellia oleifera* leaves

指标	5α-R抑制率	总黄酮	总酚
5α-R抑制率	1	0.808*	0.609
总黄酮含量	0.808*	1	0.815*
总酚含量	0.609	0.815*	1

注: *表示在0.05水平(双侧)上显著相关。

2.9 油茶叶提取物的化学成分分析

由上述结果可知油茶叶提取物中的多酚与黄酮可能是抑制 5α-R 的重要物质基础, 采用 UPLC-Triple TOF-MS /MS 对 COLE 中的酚类化合物进行定性分析, 结果在 COLE 中共发现 22 种酚类化合物。图 8 为负离子模式下的总离子图, 表 4 为 COLE 中酚类化合物鉴定结果。Richard 等[33] 研究证明芦丁(IC_{50}>100 μmol/L)、槲皮素(IC_{50}=23 μmol/L)具有 I 型 5α-R 抑制活性。另外还发现儿茶素等茶多酚类物质, 在无细胞状态下显示出有效的 5α-R 抑制作用, 但在 5α-R 的全细胞分析中抑制作用不明显。周琛媛等[34] 在具有高 5α-R 抑制活性的油茶蒲聚酰胺组 Fr8 中分离纯化(采用固相萃取的方式), 通过质谱和核磁共振的手段进行结构鉴定出 F1 为 3-O-没食子酰基-4,6,-[(S)-六羟基联苯二酰基]-α/β-D-吡喃葡萄糖(Gemin D), F4 为 3,4,6-三-O-没食子酰基-α/β-D-吡喃葡萄糖(GAG)。这些物质均在 COLE 中被发现, 它们是 COLE 发挥 5α-R 抑制活性的物质基础。

3 结论

本研究以 5α-R 为研究靶点建立酶促反应体系, 通过确定粗酶提取物、NADPH、T 的适宜添加浓度优化该体系, 确定反应体系如下: PBS 缓冲液(pH7.4) 300 μL, 0.76 mg/mL 的粗酶提取物 500 μL, 2 mmol/L 的 T 50 μL, 样品 50 μL, 2 mmol/L 的 NADPH 100 μL, 37 ℃ 下反应 30 min。按照该体系用 HPLC 法测量临床上使用的 I 型 5α-R 抑制剂度他雄胺的 5α-R 抑制活性, 结果测得其 IC_{50} 为 6.24 nmol/L, 证实该法

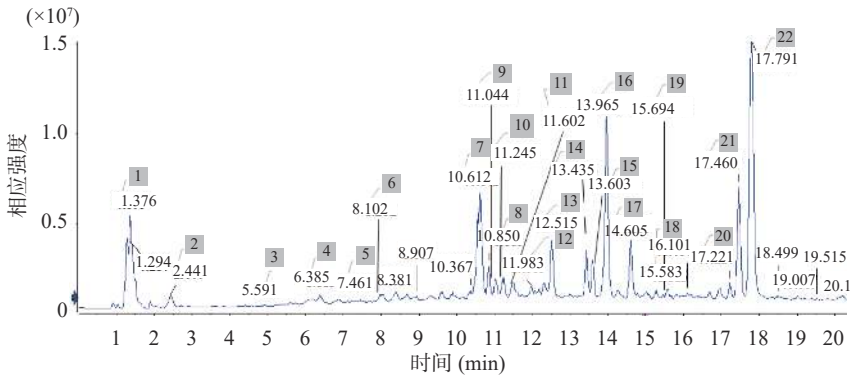

图 8 COLE 总离子流图(负离子模式)

Fig.8 Total ion chromatogram of COLE(Negative ion mode)

注: 由于其它时间段有效物质很少, 故图中只截取 0~20 min 的总离子流图。

表 4　COLE 中酚类化合物的鉴定结果总表

Table 4　Identification results of phenolic compounds from COLE

峰号	保留时间（min）	分子式	负离子模式（m/z）	误差(ppm)	二级质谱碎片离子(m/z)	推断结果	
						中文名称	英文名称
1	1.376	$C_{27}H_{22}O_{18}$	634.461	1.3	300.9987 275.0184 249.0388 169.0128	Gemin D	3-O-galloyl-4,6-(S)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose
2	2.441	$C_7H_6O_5$	170.120	4.8	169.0103 125.0246 79.0201	没食子酸	Gallic acid
3	5.591	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578.520	0.9	559.1273 425.0888 407.0773 289.0709 245.0799 203.0717 125.0237	原花青素B2	Procyanidin B2
4	6.385	$C_{15}H_{14}O_6$	290.273	1.8	245.0813 203.0704 109.0300	儿茶素/表儿茶素	Catechin/Epicatechin
5	7.461	$C_{34}H_{26}O_{22}$	786.567	0.4	483.0793 300.9971 249.0380	四没食子酰基-葡萄糖	1,2-di-O-galloyl-4,6-(S)-hexahydroxydiphenoyl-β-D-glucose
6	8.102	$C_{27}H_{24}O_{18}$	636.469	0.9	465.0681 313.0557 169.0123 125.0249 94.9250	三没食子酰基-葡萄糖	3,4,6-Trigalloyl-glucose
7	10.612	$C_{20}H_{24}O_8$	391.139	0.80	229.0857 123.0451	3'-羟基-双苄基-3-β-D-吡喃葡萄糖苷	3'-hydroxy-bibenzyl-3-β-D-glucopyranoside
8	10.850	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.526	1.5	301.0356 300.0277 271.0246 178.9979 151.0034	芦丁	Rutin
9	11.044	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.376	0.9	301.0363 300.0278 271.0245 255.0294 243.0293 151.0028	金丝桃苷	Hiperoside
10	11.245	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.380	0.9	301.0603 300.0283 271.0248 255.0296 178.9982 151.0033	异槲皮苷	Isoquercetin
11	11.602	$C_{33}H_{40}O_{20}$	756.669	1.0	285.0396 255.0282	山奈酚-3-O-葡萄糖基-鼠李糖糖基-葡糖苷	Kaempferol-3-O-glucosyl-rhamnosyl-glucoside
12	11.983	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594.520	1.2	285.0408 255.300 227.0340	山奈酚-3-O-芸香糖苷	Kaempferol-3-rutinoside
13	12.215	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.094	0.8	301.0363 300.283 271.0248 255.0296 151.0033	槲皮苷	Quercitrin
14	13.435	$C_{21}H_{24}O_{10}$	436.137	0.4	273.0770 179.0338 167.0342 123.0449	–	Cudrabibenzyl A
15	13.603	$C_{26}H_{34}O_{12}$	537.198	0.7	293.0882 243.1020 149.0453 89.0241	化合物-1	–
16	13.965	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.099	0.8	285.0416 284.0329 255.0299 227.0345	山奈酚-7-O-鼠李糖苷	Kaempferol-7-rhamnoside
17	14.605	$C_{21}H_{26}O_8$	406.433	1.0	243.1020 123.0376	3'-羟基-5-甲氧基双苄基-3-β-D-吡喃葡萄糖苷	3'-hydroxy-5-methoxybibenzyl-3-β-D-glucopyranoside

续表 4

峰号	保留时间（min）	分子式	负离子模式（m/z）	误差(ppm)	二级质谱碎片离子(m/z)	推断结果	
						中文名称	英文名称
18	15.583	$C_{28}H_{30}O_{12}$	558.539	0.9	542.1474 327.0726 183.0297	化合物-2	–
19	15.694	$C_{15}H_{10}O_7$	302.240	0.7	301.0354 273.0511 255.2315 245.0433 229.0494 151.0040 121.0294	槲皮素	Quercetol
20	17.221	$C_{20}H_{18}O_6$	354.359	4.8	307.1044 289.0917 247.0819 205.0716 163.0599 125.0242 89.0254 59.0174	芝麻素	Sesamin
21	17.460	$C_{27}H_{36}O_{12}$	552.576	1.7	293.0877 257.1173 149.0448	化合物-3	–
22	17.791	$C_{28}H_{38}O_{12}$	566.603	0.6	307.1009 257.1186 163.0593 125.0242	化合物-4	–

可靠有效。通过重复性试验证实该反应体系具有稳定性。然后用该法进一步测定、比较不同油茶叶提取物 5α-R 抑制活性，其中 50% 乙醇油茶叶提取物的 5α-R 抑制活性最高(IC_{50}=259.56 μg/mL)，证明 50% 乙醇油茶叶提取物是潜在的植物来源的 5α-R 抑制剂。最后采用 UPLC-Triple TOF-MS/MS 对油茶叶提取物中的化学成分进行了分析鉴定，结果共发现 22 种酚类化合物，其中槲皮素、芦丁、儿茶素、3-O-没食子酰基-4,6,-[(S)-六羟基联苯二酰基]-α/β-D-吡喃葡萄糖(Gemin D)，3,4,6-三-O-没食子酰基-α/β-D-吡喃葡萄糖可能是 COLE 发挥 5α-R 抑制活性的物质基础。因此本研究证明了油茶叶提取物是天然的 5α-R 抑制剂，在治疗雄性激素依赖型疾病方面具有良好的应用前景。

参考文献

[1] 单雨婷, 路永红. 雄激素及雄激素受体在痤疮发病中的作用[J]. 皮肤病与性病, 2016, 38(2): 108−112. [Shan Y T, Lu Y H. Androgens and androgen receptors in the pathogenesis of acne[J]. Dermatology and Veneral Diseases, 2016, 38(2): 108−112.]

[2] 鞠强. 痤疮的临床与实验研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004: 88-91. [Ju Q. Clinical and experimental study on acne[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2004: 88-91.]

[3] Avila D M, Fuqua S A, George F W, et al. Identification of genes expressed in the rat prostate that are modulated differently by castration and finasteride treatment[J]. The Journal of Endocrinology, 1998, 159(3): 403.

[4] Nantermet Pascale V, Xu Jian, Yu Yuan jiang, et al. Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(2): 1310−1322.

[5] Scailteux L, Rioux-Leclercq N, Vincendeau S, et al. Use of 5α-reductase inhibitors for benign prostate hypertrophy and risk of high grade prostate cancer: A French population-based study[J]. BJU international, 2019, 123(2): 293−299.

[6] Occhiato E G, Guarna A, Danza G, et al. Selective non-steroidal inhibitors of 5α-reductase type 1[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 88(1): 1−16.

[7] Naphatsorn K, Wandee R, Nual-Anong N, et al. 5α-reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment[J]. Ethnopharmacol, 2012, 139: 765−771.

[8] Takami H, Kishibayashi N, Ishii A, et al. Indole and benzimidazole derivatives as steroid 5α-reductase inhibitors in the rat prostate[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1998, 6(12): 2441−2448.

[9] Nahata A, Dixit Vk. Evaluation of 5α-reductase inhibitory activity of certain herbs useful as antiandrogens[J]. Andrologia, 2014, 46(6): 592−601.

[10] Silva Ortiz, Aylin V, Bratoeff, et al. Synthesis of new derivatives of 21-imidazolyl-16-dehydropregnenolone as inhibitors of 5 alpha-reductase 2 and with cytotoxic activity in cancer cells[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2017, 25(5): 1600−1607.

[11] Iwai A, Yoshimura T, Wada K, et al. Spectrophotometric method for the assay of steroid 5α-reductase activity of rat liver and prostate microsomes[J]. Analytical Sciences, 2013, 29(4): 455−459.

[12] Irwig M S. Persistent sexual side effects of finasteride: Could they be permanent?[J]. Journal of Sexual Medicine, 2012, 9(11): 2927−2932.

[13] Cauci S, Chiriacò G, Cecchin E, et al. Androgen receptor (AR) gene (CAG)n and (GGN)n length polymorphisms and symptoms in young males with long-lasting adverse effects after

finasteride use against androgenic alopecia[J]. Sexual Medicine, 2017, 5(1): e61−71.
[14] Diviccaro S, Melcangi R C, Giatti S. Post-finasteride syndrome: An emerging clinical problem[J]. Neurobiology of Stress, 2020, 12: 100209.
[15] Niederprüm H J, Schweikert H U, Zänker K S. Testosterone 5α-reductase inhibition by free fatty acids from Sabal serrulata fruits[J]. Phytomedicine, 1994, 1(2): 127−133.
[16] Weisser H, Tunn S, Behnke B, et al. Effects of the sabal serrulata extract IDS 89 and its subfractions on 5 alpha-reductase activity in human benign prostatic hyperplasia.[J]. The Prostate, 1996, 28(5): 300−306.
[17] 邓桂球, 张蓓, 孔秀娟, 等. 红花提取物对Ⅰ型及Ⅱ型 5α-还原酶的抑制活性研究[J]. 中国药业, 2015, 24(14): 17−20. [Deng G Q, Zhang B, Kong X J, et al. Study on the inhibitory activity of safflower extract on 5α-reductase of type I and type II[J]. China Pharmaceutical Industry, 2015, 24(14): 17−20.]
[18] 姚新成, 顾承志, 王新兵, 等. 具有 5α-还原酶抑制作用的天然植物的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(5): 800−805. [Yao X C, Gu C Z, Wang X B, et al. Research progress of 5α-reductase inhibition in natural plants[J]. Natural Products Research and Development, 2014, 26(5): 800−805.]
[19] Aggarwal S, Verma A, Shukla R, et al. An overview of phytotherapeutic approaches for the treatment of benign prostatic hyperplasia[J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2014, 14(3): 257−270.
[20] Melo Ezer A, Bertero Eduardo B, Rios Luiz A S, et al. Evaluating the efficiency of a combination of *Pygeum africanum* and stinging nettle (*Urtica dioica)* extracts in treating benign prostatic hyperplasia (BPH): double-blind, randomized, placebo controlled trial.[J]. International Brazilian Journal of Urology, 2002, 28(5): 418−25.
[21] 王苗苗, 韩飞, 严欢, 等. 薰衣草提取物对Ⅰ型及Ⅱ型 5α-还原酶的抑制活性研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(18): 38−43. [Wang M M, Han F, Yan H, et al. Effects of lavender extract on the inhibitory activity of type I and type II 5α-reductase[J]. Journal of food research and development, 2018, 39(18): 38−43.]
[22] 巫传玲, 马松涛, 王富琴, 等. 莲子心提取物对 5α-还原酶的抑制作用研究[J]. 中国药业, 2012, 21(10): 17−18. [Wu C L, Ma S T, Wang F Q, et al. Inhibition of 5α -reductase from lotus seed heart extract[J]. China Pharmaceutical Industry, 2012, 21(10): 17−18.]
[23] 杨小青, 宋金春, 侯孝晨. 甲基莲心碱和异莲心碱对 5α-还原酶抑制作用的研究 [J]. 中国药师, 2016, 19(3): 495-498. [Yang X Q, Song J C, Hou X C. Effects of neferine methyl and isoneferine on the inhibition of 5 α -reductase[J]. Chinese journal of medicine, 2016, 19(3): 495-498.]
[24] 罗晓伟. 油茶蒲醇提取物抑制 5α-还原酶及对前列腺疾病的作用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011. [Luo Xiaowei. Inhibition of 5α-reductase and its effect on prostate diseases by ethanol extract of Camellia oleatum[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.]
[25] 张蓓. 用于脂溢性脱发的中药 5α-还原酶抑制剂的筛选及侧柏叶的生发药效评价研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015: 22-23. [Zhang Bei. Screening of traditional Chinese medicine 5α-reductase inhibitors for seborrheic alopecia and evaluation of the germinal efficacy of Platycladus orientalis[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015: 22-23.]
[26] 车璐. 香水莲花抗氧化及抑制 5α-还原酶的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 32. [CheLu. Study on antioxidant and inhibition of 5α -reductase in lotus flower[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013: 32.]
[27] Kazuya M, Kazuma N, Masato K, et al. Inhibitory activities of *Puerariae* Flos against testosterone 5α-reductase and its hair growth promotion activities[J]. Journal of Natural Medicines, 2012, 66(1): 158−165.
[28] 安徽省食品行业协会团体标准 T/AHFIA 005-2018 植物提取物及其制品中总多酚含量的测定 分光光度法 [S]. 安徽省: 食品行业协会, 2019. [Anhui Provincial Food Industry Association Group Standard T/AHFIA 005-2018 Determination of polyphenols in plant extracts and their products by spectrophotometry[S]. Anhui Province: Food Industry Association, 2019.]
[29] 湖南省地方标准 DB43/T 476-2009 植物源性总黄酮的测定 [S]. 湖南省: 技术质量监督局, 2009. [Hunan Provincial local standard DB43/T 476-2009 Determination of total flavonoids of plant origin[S]. Hunan Province: Technical quality Supervision Bureau, 2009.]
[30] 王微. 香水莲花提取物改善阿尔兹海默症学习记忆能力的作用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019. [Wang W. Study on the effect of perfume Lotus extract on learning and memory ability of Alzheimer's disease[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.]
[31] Saurabh Aggarwal, Suresh Thareja, Abhilasha Verma, et al. An overview on 5α-reductase inhibitors[J]. Steroids, 2010, 75(2): 109−153.
[32] 穆鑫, 薛蔚. 度他雄胺治疗良性前列腺增生症的临床研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(2): 97−100. [Cheng X, Xue W. Clinical progress of dutamide in the treatment of benign prostatic hyperplasia[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinic, 2013, 32(2): 97−100.]
[33] Hiipakka R A, Zhang H Z, Dai W, et al. Structure-activity relationships for inhibition of human 5α-reductases by polyphenols[J]. 2002, 63(6): 1165−1176.
[34] 周琛媛, 董柳青, 赵波, 等. 油茶蒲提取物抑制前列腺增生活性化合物的分离与鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(4): 553−558. [Zhou C Y, Dong L Q, Zhao B, et al. Isolation and identification of prostatic hyperplasia activity compounds from the extract of *Camellia camellia*[J]. Research and Development of Natural Products, 2017, 29(4): 553−558.]