

## 沙棘叶多酚提取物抗氧化及体外降血糖活性研究

柳梅<sup>1</sup>, 任璇<sup>1</sup>, 姚玉军<sup>2</sup>, 王捷<sup>2</sup>, 董久霞<sup>2</sup>, 吕兆林<sup>3\*</sup><sup>1</sup>北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; <sup>2</sup>内蒙古宇航人高技术产业有限责任公司, 内蒙古 011517;<sup>3</sup>北京林业大学公共分析测试中心, 北京 100083

**摘要:** 本实验以沙棘叶为原料, 通过溶剂提取制得提取物 A, 将提取物 A 经大孔树脂纯化制得沙棘叶多酚提取物 B, 在研究提取物 A 及提取物 B 的抗氧化能力和自由基清除能力的基础上, 探究了沙棘叶多酚提取物 B 对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶的抑制类型, 并通过 DNS 法来评价提取物 B 的体外降糖能力。实验结果表明: 提取物 A、提取物 B 多酚含量分别为 18.59% 和 30.25%; 以 VC 当量计, 总抗氧化能力分别为 6.15 mgVC/g 提取物 A、9.79 mgVC/g 提取物 B, 对应的 DPPH 自由基清除率  $IC_{50}$  值分别为 20.19  $\mu$ g 提取物 A/mL、8.6  $\mu$ g 提取物 B/mL; 当猪胰  $\alpha$ -淀粉酶浓度为 0.5 mg/mL 以下, 反应时间在 1 min 以内时, 酶反应体系具有良好的线性趋势, 在此条件下, 沙棘叶多酚提取物 B 对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶具有一定的抑制作用, 其半抑制浓度为 0.25 mg/mL, 属于可逆反竞争抑制。本研究可为沙棘叶的开发和利用提供数据支撑。

**关键词:** 沙棘叶; 多酚; 抗氧化; 降糖活性

中图分类号: TS255.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.6.019

## Antioxidant and *in vitro* Hypoglycemic Activities of Polyphenol in Sea Buckthorn Leaves

LIU Mei<sup>1</sup>, REN Xuan<sup>1</sup>, YAO Yu-jun<sup>2</sup>, WANG Jie<sup>2</sup>, DONG Jiu-xia<sup>2</sup>, LV Zhao-lin<sup>3\*</sup><sup>1</sup>College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China,<sup>2</sup>Inner Mongolia Yuhangren High-Tech Industry Limited Liability Company, Huhehaote 011517, China, <sup>3</sup>The Analysis Center, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract:** In this study, the content of polyphenol in the extract A from seabuckthorn leaf was extracted by solvent extraction, and the extract B was prepared by macroporous resin. On the basis of the research in antioxidant capacity and radical scavenging ability of the extract, porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase and 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) methods were used to evaluate the *in vitro* hypoglycemic activity of extracts. The results showed that polyphenol content from extract A and B were 18.59% and 30.25%, respectively; With VC equivalent, total antioxidant capacity of per gram were 6.15 mg and 9.79 mg, respectively; corresponding to  $IC_{50}$  of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical clearance were 20.19  $\mu$ g/mL and 8.6  $\mu$ g/mL; When the concentration of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase was below 0.5 mg/mL and the reaction time was less than 1 min, the enzymatic reaction system had a good linear trend. Under these conditions, the content of polyphenol in the extract B had a certain inhibitory effect on porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase, the semi-inhibitory concentration of 0.25 mg/mL, were reversible anti-competitive inhibition. This study can provide data support for the development and utilization of seabuckthorn leaves.

**Key words:** seabuckthorn leaves; polyphenol; antioxidant; hypoglycemic activity

沙棘 (*SeaBuckthorn*) 为胡颓子科 (Elaeagnaceae) 沙棘属 (*Hippophae* Linn) 落叶灌木或小乔木<sup>[1]</sup>。根据《中华人民共和国药典》规定, 沙棘被列为中药材<sup>[2]</sup>。与果实相比, 作为废弃物的沙棘叶具有产量

大、易收集、生产加工工艺简单等方面的优势<sup>[3]</sup>, 沙棘叶中主要含有黄酮类、多酚类、三萜、甾体类等植物次生代谢物, 因此在降低心肌耗氧量、抗癌变、延缓衰老、抑菌等方面有突出的功效<sup>[4-6]</sup>。

据报道, 目前已有数百种植物源可以用做降糖治疗剂<sup>[7]</sup>, 降糖活性物质包括多糖、生物碱、肽类、萜类、黄酮类、酚类等<sup>[8]</sup>, 沙棘叶中多酚含量较高, 推测其有降糖活性, 但未见沙棘叶多酚提取物体外

收稿日期: 2016-12-19 接受日期: 2017-03-30

基金项目: 呼和浩特市科技计划 (2015-高新-3); 国家科技支撑计划 (2015BAD16B01)

\* 通信作者 Tel: 86-10-62338171; E-mail: zhaolinlv@bjfu.edu.cn

降糖活性的研究报道。

本研究以沙棘叶为原料,以沙棘叶多酚提取物为研究目标物,在评价沙棘叶多酚提取物 A、提取物 B 抗氧化活性的基础上<sup>[9]</sup>,采用猪胰  $\alpha$ -淀粉酶来评价沙棘叶多酚提取物 B 对其的抑制类型,并通过 DNS 法来评估降糖能力,此研究可以提高人们对沙棘叶多酚活性的认知度,并对沙棘叶资源的开发利用奠定理论基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验材料

沙棘叶,采自内蒙古呼和浩特市,经风干后,用万能粉碎机粉碎成 20 目的沙棘叶粉,密封保存,室温放置,备用。

所用试剂均为分析纯,无水乙醇、无水碳酸钠、盐酸、氢氧化钠、磷酸钠、钼酸铵、二水合磷酸二氢钠、四水酒石酸钾钠、麦芽糖、3,5-二硝基水杨酸(DNS)均购自北京化工厂;硫酸、福林酚标准液、没食子酸标准品、二苯基苦味酰基苯肼(DPPH)、猪胰  $\alpha$ -淀粉酶(250 U/mg)均购自北京科百奥科技有限公司;D101 大孔树脂(非极性)购自北京慧德易科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计(UV1800):岛津制作所日本京都;离心机(1-14):德国 Sigma 公司;IKA 控制型摇床(KS130):德国 IKA 集团;Lab Tech 旋转蒸发器(EV311):美国莱伯泰科有限公司;BILON 真空冷冻干燥机(LGJ-18A):上海比朗仪器制造有限公司。

## 2 实验方法

### 2.1 沙棘叶多酚提取物制备

称取一定质量的过 20 目筛的沙棘叶粉,置于带盖磨口锥形瓶,加入料液比 1:8 的乙醇溶液,60~70℃ 超声提取 30 min,得沙棘叶多酚粗提物,将提取物于旋转浓缩仪上浓缩,除去大量溶剂,后置于冻干机上冷冻干燥,得提取物 A,低温避光存放<sup>[10]</sup>。

### 2.2 沙棘叶多酚提取物除杂

树脂的活化:用乙醇浸泡并反复清洗至无残渣后反复用蒸馏水清洗,除去乙醇。

树脂强化再生:加入高于树脂层 10~20 cm 体积分数 3%~5% 盐酸溶液浸泡 2~4 h 后,用同样浓度 5~7 倍树脂体积量盐酸溶液淋洗,再用蒸馏水充分淋洗至 pH 值呈中性,然后以 5% NaOH 溶液按上

述方法浸泡 2~4 h,淋洗 5~7 倍体积量氢氧化钠溶液,再用蒸馏水充分淋洗至 pH 值呈中性。

装柱:直径 40 mm,长 80 cm 玻璃层析柱,装入约 300 g 的已经活化的 D101 树脂,用蒸馏水洗至柱中无乙醇,保证柱内无气泡,在上端加脱脂棉。

洗脱分离:取提取物 A,用一定量的温水溶解,慢慢倒入层析柱内,保证流速 1.5 mL/min。用蒸馏水洗脱,再依次使用 50% 到 90% 的乙醇冲洗,收集洗脱液,于旋转蒸发器上脱去大部分乙醇,后置于冷冻机上冷冻干燥,得沙棘叶多酚提取物除杂后的物质 B,低温避光存放<sup>[11]</sup>。

### 2.3 提取物多酚含量测定

#### 2.3.1 标准曲线的绘制

称取 0.1000 g 没食子酸标准品,于 100 mL 容量瓶中定容,即浓度为 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,使用没食子酸标准储备液配制浓度为 10、20、40、60、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的没食子酸工作液。取 0.5 mL 样品溶液(对照组为蒸馏水),加入 2.5 mL 10% (v/v) 的福林酚试剂,摇匀。反应 3 min 至 8 min 内,加入 2.0 mL 7.5% (m/m) 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液,摇匀。室温下避光放置 60 min,使用紫外分光光度计在 765 nm 波长条件下测量吸光度 A,每组重复三次,绘制吸光度与溶液浓度标准曲线。

#### 2.3.2 供试品测定

取 0.04 g 提取物,定容至 10 mL,配制成供试品原液,取原液稀释 n 倍后,取稀释液 0.5 mL(对照组为蒸馏水),按照 2.3.1 的方法进行测定,得样品溶液的吸光度 A,将 A 值带入标准曲线中计算样品溶液浓度 C<sup>[12]</sup>。

$$\text{提取物多酚含量}(\%) = (m_{\text{酚}}/m_{\text{物}}) \times 100 \quad (2-1)$$

式中,  $m_{\text{酚}}$ —物料中多酚质量(g) =  $[C(\mu\text{g}/\text{mL}) \times 5 \text{ mL} / 0.5 \text{ mL} \times n \times 10 \text{ mL}] \times 10^{-6}$ ;  $m_{\text{物}}$ —物料质量(g)。

### 2.4 抗氧化能力测定

#### 2.4.1 总抗氧化能力

采用钼酸铵还原法,0.30 mL 一定质量浓度的沙棘叶提取物乙醇溶液加入到 3.00 mL 反应容积中(0.60 M 硫酸,28.00 mM 磷酸钠,4.00 mM 钼酸铵),95℃ 水浴 90 min。反应物冷却到室温后,于 695 nm 测定 OD 值。不加样品的空白试剂调零。被测物总抗氧化能力以相当于多少质量的 VC(抗坏血酸)来表示。

### 2.4.2 DPPH 自由基清除能力

将 DPPH 用无水乙醇配成 2 mmol/L 的溶液。将提取物配制成不同浓度梯度,各取 3 mL 加入到 1 mL DPPH 溶液中,室温、避光反应 30 min 后,在 517 nm 处测定吸光度  $A_i$ ,每个试样做 3 个平行,取平均值。其中以等体积无水乙醇代替 DPPH 溶液的为空白值  $A_j$ ,等体积蒸馏水代替样品溶液的为对照值  $A_0$ ,等体积蒸馏水无水乙醇混合液作为仪器的空白调零试剂。清除率可按下式计算。绘制对数曲线,横坐标为被测物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ),纵坐标为清除 DPPH 自由基的清除率(%),并利用曲线计算  $IC_{50}$ 。清除率  $I(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$  (2-2)

式中: $A_i$ ——样品吸光度; $A_j$ ——空白试样吸光度; $A_0$ ——对照组吸光度。

## 2.5 沙棘叶多酚提取物 B 体外降糖能力研究

### 2.5.1 溶液配制

0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液:取 45 mL 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液和 55 mL 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  互溶,于 1000 mL 容量瓶中定容,再加入 5.844 g NaCl 溶解,得到 pH6.9 的磷酸盐缓冲液。

表 1 麦芽糖标准曲配制表

Table 1 Preparation of maltose standard

试剂 Reagent (mL)	管号 Tube number					
	1	2	3	4	5	6
麦芽糖标准溶液 Maltose solution	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 Distilled water	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
DNS 溶液 DNS solution	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

### 2.5.3 DNS 法测定猪胰 $\alpha$ -淀粉酶酶活

该法原理是淀粉酶催化淀粉产生的还原糖可以使 3,5-二硝基水杨酸(DNS)还原生成棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸,淀粉酶活力的大小与产生的还原糖的量成正比<sup>[13]</sup>。

取 0.5 mL 一定浓度的猪胰  $\alpha$ -淀粉酶溶液,于 37 °C 水浴 5 min,加入 0.5 mL 37 °C 的淀粉底物溶液,该温度下反应一定时间后,再加入 1 mL DNS 显色溶液,混匀,置于沸水浴中 8 min,室温放置 20 min,冷却,加蒸馏水稀释至 10 mL,540 nm 分光光度测吸光值。以 0.5 mL 磷酸盐缓冲溶液代替猪胰  $\alpha$ -淀粉酶溶液作为空白对照,每组做三个平行。

### 2.5.4 猪胰 $\alpha$ -淀粉酶浓度及反应时间的选取

分别取 0.1、0.2、0.3、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0 mg/mL 不同浓度的猪胰  $\alpha$ -淀粉酶溶液,按照方法 2.

DNS 溶液:称取 3,5-二硝基水杨酸 5.0 g,NaOH 固体 5.0 g,分别溶于一定量的 40 °C 蒸馏水中,将 3,5-二硝基水杨酸溶液于 40 °C 缓缓加入到 NaOH 水溶液中,再加入四水酒石酸钠 150.0 g、苯酚 2.0 g、无水硫酸钠 2.0 g 搅拌至完全溶解,定容至 500 mL,黑暗密封放置 7 d 后使用。

1% 淀粉底物溶液:称取 2.5 g 可溶性淀粉,加入 50 mL 磷酸盐缓冲液搅拌均匀,缓缓倾入 200 mL 80 °C 的磷酸盐缓冲液中,煮沸并不停搅拌,配置成 0.01 g/mL 淀粉底物溶液。

### 2.5.2 还原糖含量标准曲线

还原糖可以使 3,5-二硝基水杨酸(DNS)还原并生成棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸,利用还原糖浓度与颜色之间的关系制作标准曲线。将 1 mg/mL 麦芽糖标准溶液、蒸馏水及 DNS 溶液按照表 1 的加入量配制,置于沸水浴中 8 min,室温放置 20 min,冷却,加蒸馏水稀释至 10 mL,540 nm 分光光度测吸光值。每组做三个平行,以 1 号管为空白对照。以麦芽糖含量(mg)为横坐标,吸光度(Abs)为纵坐标,绘制还原糖含量标准曲线。

5.3,分别在 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3min 内进行反应测定。

### 2.5.5 猪胰 $\alpha$ -淀粉酶反应动力学方程

最佳酶浓度和最佳的反应时间通过 2.5.4 确定后,按照方法 2.5.3 进行操作,准确计时,测定猪胰  $\alpha$ -淀粉酶反应的初速率,每种浓度做三个平行,通过双倒数法求出  $K_m$  和  $V_{max}$  值。

### 2.5.6 沙棘叶多酚对猪胰 $\alpha$ -淀粉酶半抑制浓度

取 0.25 mL 上述最佳浓度的酶溶液于试管,分别加入 0.25 mL 不同浓度的沙棘多酚提取物 B 溶液,混匀,37 °C 水浴 5 min,按照 2.5.3,即加 0.5 mL 37 °C 的 1% 淀粉底物溶液,最佳反应时间后,立刻加入 1 mL DNS 显色溶液,混合液沸水浴后,室温放置,加蒸馏水稀释,540 nm 分光光度测吸光值。每个浓度做三个平行。通过多元线性拟合求出半抑制浓度。

$$\text{抑制率 \%} = \frac{T_1 - T_2}{T_1} \times 100 \quad (2-3)$$

式中,  $T_1$ —无抑制剂时的酶活;  $T_2$ —有抑制剂时的酶活。

### 2.5.7 沙棘叶多酚对猪胰 $\alpha$ -淀粉酶抑制类型

#### 2.5.7.1 抑制可逆与否的判断

取 0.5 mg 提取物 B/mL 的沙棘叶多酚提取物溶液 0.25 mL (空白为磷酸缓冲液), 分别加入不同浓度 (0.1、0.3、0.5、0.7 mg/mL) 的酶溶液 0.25 mL, 混匀, 37 °C 水浴 5 min, 按照 2.5.3, 即加 0.5 mL 37 °C 的 1% 淀粉底物溶液, 最佳反应时间后, 立刻加入 1 mL DNS 显色溶液, 混合液沸水浴后, 室温放置, 加蒸馏水稀释, 540 nm 分光光度测吸光值。

#### 2.5.7.2 抑制竞争类型的判断

取 0.3 mg/mL 酶溶液 0.25 mL, 加入 0.5 mg 提

取物 B/mL 沙棘叶多酚提取物溶液 0.25 mL 混匀, 分别加到不同浓度 (0.6%、1%、1.4%、1.8%) 的 37 °C 的淀粉底物溶液中, 按照 2.5.3, 最佳反应时间后, 立刻加入 1 mL DNS 显色溶液, 混合液沸水浴后, 室温放置, 加蒸馏水稀释, 540 nm 分光光度测吸光值。

## 3 结果与分析

### 3.1 沙棘叶多酚提取物总抗氧化能力

按照 2.3.1, 得到计算多酚含量的没食子酸标准曲线,  $y = 0.10262x + 0.0323$ ,  $R^2$  为 0.9985, 线性关系良好。按照 2.4.1, 得到 VC 与总抗氧化能力对应的标准曲线,  $y = 8.307x + 0.01$ , 其中  $R^2 = 0.999$ , 线性良好。

表 2 沙棘叶多酚提取物抗氧化能力

Table 2 Antioxidant capacity of seabuckthorn leaves polyphenols

提取物 Extract	多酚含量 Polyphenols content	总抗氧化能力 (VC 当量) Total antioxidant capacity (VC equivalent)	
		mgVC/g 被测物	mgVC/g 被测物总多酚
提取物 A Extract A	18.59	6.09	32.77
提取物 B Extract B	30.25	9.78	32.30

从表 2 可以看出, 提取物 B 中多酚类物质的含量由 18.59% 提升至 30.25%, 含量提高了近一倍; 每克提取物 B 相当于 VC 的质量数高于提取物 A, 约是提取物 A 的 1.5 倍, 从数据可以看出, 经过纯化后的多酚提取物 B 总抗氧化能力明显优于提取物 A; 将提取物 A、B 的总抗氧化能力折算成总多酚

的 VC 当量, 二者的 VC 当量数值接近, 尽管多酚提取物中含有除多酚外的其他化合物 (如蛋白质、色素、矿物质、脂肪等), 从数据上可以推测, 沙棘叶多酚提取物的总抗氧化能力基本源于多酚化合物的贡献。

### 3.2 沙棘叶多酚提取物 DPPH 清除能力

表 3 沙棘叶多酚提取物 DPPH 清除能力

Table 3 DPPH scavenging capacity of polyphenols from seabuckthorn leaves

提取物 Extract	样品浓度 Sample concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	对数曲线 Logarithmic curve ( $x$ 为浓度, $y$ 为清除率)	相关系数 Correlation coefficient ( $R^2$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g}$ 总多酚/mL)
提取物 A Extract A	2 ~ 40	$Y = 15.85\ln(x) + 2.37$	0.969	20.19	3.75
提取物 B Extract B	1 ~ 20	$Y = 15.93\ln(x) + 15.73$	0.946	8.60	2.60
对照物 VC Control	0.4 ~ 10	$Y = 12.49\ln(x) + 37.40$	0.942	2.74	2.74

由表 3 可知: 经过柱纯化后的  $IC_{50}$  值降至提取物 A 的 43%, 其清除 DPPH 的能力提高了 2 倍多。为了证明 DPPH 清除能力是沙棘多酚的作用结果, 测定了对照物 VC 的  $IC_{50}$  值, 同时折合成总多酚的含量计算  $IC_{50}$  值, 可以看出提取物 A、提取物 B 对应

总多酚的  $IC_{50}$  值与对照物 VC 的  $IC_{50}$  值很接近, 说明提取物 A、提取物 B 中多酚清除 DPPH 的能力与 VC 能力相当, 进而推测沙棘叶多酚提取物的 DPPH 自由基清除能力基本源于多酚化合物的贡献。

### 3.3 体外降血糖活性研究

### 3.3.1 麦芽糖含量标准曲线

麦芽糖含量标准曲线  $y = 1.3448x - 0.01046$ ,  $R^2$  为 0.9981, 吸光度与麦芽糖含量之间存在着良好的线性关系。

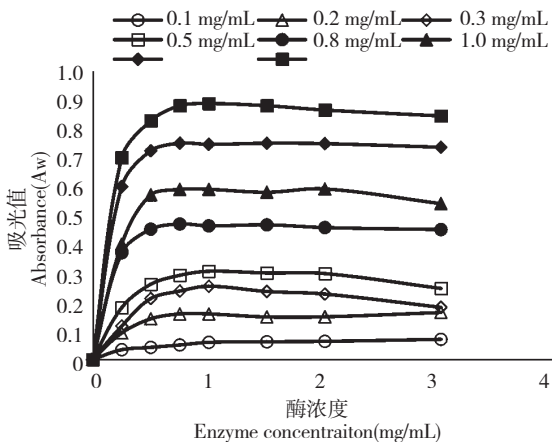


图1 不同浓度的猪胰  $\alpha$ -淀粉酶的反应进程曲线

Fig.1 Reaction process curves with different concentrations of  $\alpha$ -amylase

### 3.3.2 最适宜酶浓度和最佳时间的选取

如图1所示,为不同浓度猪胰  $\alpha$ -淀粉酶的反应进程曲线。曲线测定了 0 ~ 3 min 之间酶反应进程,在 0.1 mg/mL 到 2 mg/mL 选取了不同的酶浓度。根据文献,线性反应速率每分钟的吸光值变化在 0.03 ~ 0.25 之间利于酶反应动力方程的建立<sup>[14]</sup>。从图1中可以看出,随着酶浓度的增大,酶的线性反应时间逐渐减小,在 0.5 mg/mL 以下时,1 min 内反应曲线较为线性。所以,选取最佳酶浓度为 0.3 mg/mL,最佳反应时间为 1 min 进行酶反应动力学测定。

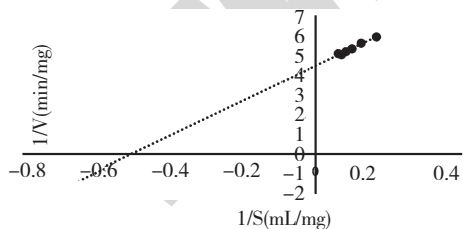


图2 猪胰  $\alpha$ -淀粉酶米氏方程曲线

Fig.2 Michaelis-Menten equation of  $\alpha$ -amylase

### 3.3.3 酶反应动力学方程

米氏方程是酶促反应的起始速度与底物浓度关系的速度方程。米氏方程可改写为  $1/V = K_m/V_{max} \times 1/[S] + 1/V_{max}$ , 其中  $1/V$  为纵坐标,  $1/[S]$  为横坐标, 采用双倒数作图法作图。由图2可以得出,  $V_{max} = 0.226 \text{ mg/min}$ ,  $K_m = 1.99 \text{ mg/mL}$ ,  $R^2 =$

0.9804, 说明该酶催化反应与米氏方程相吻合, 可运用该方程对催化反应机理进行分析。

### 3.3.4 沙棘叶多酚对猪胰 $\alpha$ -淀粉酶半抑制浓度

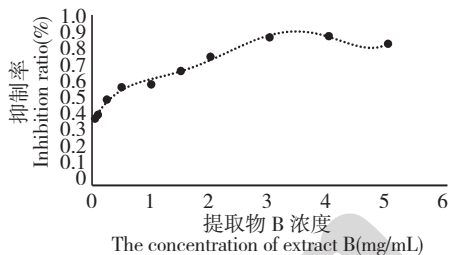


图3 沙棘叶多酚对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶的抑制曲线

Fig.3 The inhibition curve of seabuckthorn leaves polyphenols to  $\alpha$ -amylase

如图3所示,通过不同浓度沙棘叶多酚对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶的不同抑制率,可拟合出多元线性方程  $y = 0.00569x^5 - 0.0723x^4 + 0.32126x^3 - 0.61528x^2 + 0.61635x + 0.36725$ , 其中  $R^2 = 0.9926$ , 线性良好。由此方程可以求得沙棘叶多酚提取物 B 对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶的半抑制浓度为 0.25 mg 提取物 B/mL, 其提取物 B 相对应的多酚的半抑制浓度为 0.075 mg 沙棘叶多酚提取物 B/mL, 具有一定的抑制性<sup>[15]</sup>。秦昱等人研究了没食子酸对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用, 其中没食子酸的半抑制浓度为 3.01 mg/mL, 阳性对照拜平糖的半抑制浓度为 0.236 mg/mL<sup>[16]</sup>, 陈睿等探究灰栒子提取物对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制, 发现半抑制浓度为 0.5 mg/mL<sup>[17]</sup>, 本研究制备的沙棘叶多酚提取物 B 降糖活性与阳性对照药物拜平糖活性相当, 高于没食子酸及栒子提取物的降糖活性。

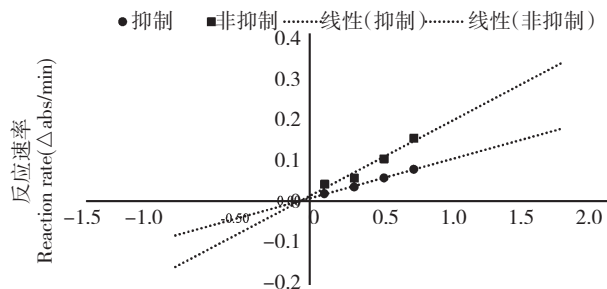


图4 沙棘叶多酚对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶抑制动力学曲线

Fig.4 Kinetic curve of inhibition on  $\alpha$ -amylase

### 3.3.5 判断沙棘叶多酚对猪胰 $\alpha$ -淀粉酶抑制是否可逆

抑制可分为可逆和不可逆两类, 可通过酶反应动力学进行分析。以酶浓度为横坐标, 初速率为纵

坐标绘制曲线,当体系中不存在抑制剂时,理论上应通过原点;当有不可逆抑制剂存在时,直线从原点水平向右平移<sup>[18]</sup>;当有可逆抑制剂时,其速率直线通过原点,反之则不通过原点<sup>[19]</sup>。如图4,加入沙棘叶多酚的体系直线未平行向右平移,而是与未加沙棘叶多酚的直线基本交于原点,因此推测沙棘叶多酚对猪胰 $\alpha$ -淀粉酶的抑制类型为可逆抑制。

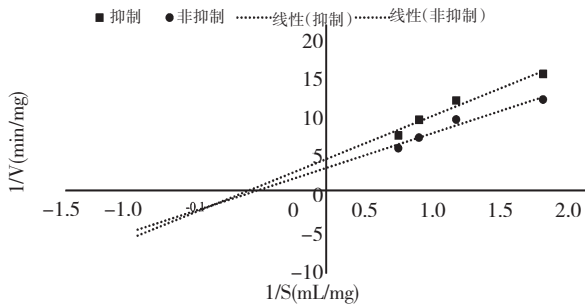


图5 沙棘叶多酚对 $\alpha$ -淀粉酶抑制动力学曲线

Fig. 5 Line weaver-Burk plot for inhibition of seabuckthorn leaves polyphenols on  $\alpha$ -amylase

### 3.3.6 沙棘叶多酚对猪胰 $\alpha$ -淀粉酶抑制竞争类型的判断

可逆抑制一般可分为竞争性抑制、非竞争抑制、反竞争抑制和混合抑制,一般通过抑制作用的双倒数图判定,观察米氏常 $K_m$ 和最大反应速度 $V_{max}$ 的变化<sup>[20]</sup>。非竞争抑制 $K_m$ 不变,但 $V_{max}$ 减小;竞争性抑制 $V_{max}$ 不变,但 $K_m$ 减小;反竞争抑制 $K_m$ 减小, $V_{max}$ 也减小。如图5所示,两直线大概相交于横轴,加入抑制剂后, $K_m$ 值从19.22减小为17.04, $V_{max}$ 从0.3739 mg/min减小为0.2673 mg/min,初步判断沙棘叶多酚对猪胰 $\alpha$ -淀粉酶的抑制为反竞争抑制类型。这表明沙棘叶多酚提取物不能与游离酶结合,但可与酶和底物的复合物结合并阻止产物生成,使酶的催化活性降低。

## 4 结论

为了提高沙棘叶资源的开发利用,本实验从天然产物化学角度出发对沙棘叶多酚提取物的体外降糖能力进行了系统研究,研究结果表明:沙棘叶多酚提取物的总抗氧化能力及DPPH清除能力源于沙棘叶多酚提取物的贡献。同时,沙棘叶多酚提取物B对猪胰 $\alpha$ -淀粉酶具有一定的抑制作用,对猪胰 $\alpha$ -淀粉酶的半抑制浓度为0.25 mg提取物B/mL,属于可逆反竞争抑制类型。相关研究表明:天然的抗氧化剂不仅能够防止食品中油脂体系的氧化,而且可

以防止人体内自由基的危害,多酚还原性强,使得其在抗氧化性研究领域受到很大关注<sup>[21]</sup>,心脑血管病、衰老、癌症、帕金森症等疾病发生均与自由基有关<sup>[22]</sup>,但摄入抗氧化物质可有效抵消自由基氧化对人体造成损伤;同时,多酚化合物的多项生理活性与多酚具有较强的清除自由基能力和抗氧化性密切相关<sup>[23]</sup>;因此,在研究多酚其它生理活性时,研究其抗氧化活性为基础。上述结果对今后研究沙棘叶多酚提取物降糖作用提供有效的数据,为沙棘叶多酚提取物开发成天然的抗氧化剂、降糖的食品或药物奠定基础,对充分合理利用丰富的沙棘叶资源提供一定的理论指导。

## 参考文献

- Jin Y (金怡), Yao M (姚敏). Review of *SeaBuckthorn* research. *Infor Tradit Chin Med* (中医药信息), 2003, 20(3): 21-22.
- Liu Y (刘勇), Lian YS (廉永善), Wang YL (王颖莉), et al. Review and significance on research and development of *SeaBuckthorn*. *Tradit Chin Med Magazine China* (中国中药杂志), 2014, 9:1547-1552.
- Teng XP (滕晓萍), Wen ZP (温中平), Wang HH (王宏昊), et al. Review on research progress of *SeaBuckthorn Leaves*. *Res DevInt SeaBuckthorn Leaves* (国际沙棘研究与开发), 2010, 3:17-20.
- Ding XL (丁小林), Qin LP (秦利平). Advances innutritional components and bioactive substances in *SeaBuckthorn*. *Chin J Food Nutr* (中国食物与营养), 2008, 9:57-59.
- Saggu S, Divekar HM, Gupta V, et al. Adaptogenic and safety evaluation of *SeaBuckthorn*. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45: 609-617.
- Geetha S, Ram MS, Mongia SS, et al. Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of *SeaBuckthorn* (*Hippophaerhamnoides* L.) on chromium(VI) induced oxidative stress in albino rats. *J Ethnopharmacol*, 2003, 87:247-251.
- Guo J (郭君), Yin JL (银金兰), Kang GY (康桂英). The hypoglycemic activity in herbal medicine. *Inner Mongolia Med J* (内蒙古医学杂志), 2004, 36:362-363.
- Zhang LN (张丽娜). *In vitro* inhibitory effects from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) merr. et perry on pancreatic lipase and  $\alpha$ -amylase. Shanghai: East China University of Science and Technology (华东理工大学), MSc. 2012.
- Malgorzata EZ, Anna MW. Antioxidant potential and polyphenol content of *Selected Food*. *Int J Food Properties*, 2011, 14: 300-308.

- 10 Chemat F, Zill EH, Khan MK. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2011, 18:813-835.
- 11 Xi L, Mu T, Sun H. Preparative purification of polyphenol from *Sweet Potato (Ipomoea batatas L.)* leaves by AB-8 macroporous resins. *Food Chem*, 2015, 172:166-174.
- 12 Chen LY, Cheng CW, Liang JY. Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *SAGE Publications*, 2007:181-210.
- 13 Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, 31:426-428.
- 14 Zhang YJ (张永军), Huang HH (黄惠华). Research on inhibition kinetics of  $\alpha$ -amylase by *Tea Polyphenols*. *Food Ind (食品工业)*, 2010, 01:7-9.
- 15 Ibrahim SRM, Mohamed GA, Abdel-Latif MMM, et al. Minutaside A, new  $\alpha$ -amylase inhibitor flavonol glucoside from *Tagetes minuta*: antidiabetic, antioxidant, and molecular modeling studies. *Starch-Starke*, 2015, 67(11-12):1-9.
- 16 Qin Y (秦昱), Shao YY (邵元元), Xiong S (熊硕), et al. Inhibitory effect of gallic acid on pancreatic  $\alpha$ -amylase and trypsin. *Food Sci (食品科学)*, 2015, 36(3):41-45.
- 17 Chen R (陈睿), Zeng Y (曾阳), Huang Y (黄元), et al. Pilot study of extraction of peking cotoneaster inhibit effect to  $\alpha$ -amylase. *Food Sci Technol (食品科技)*, 2009, 11:243-245.
- 18 Wang WM (王文蒙). Study on isolation and purification of  $\alpha$ -amylase inhibitor and its characteristics. Tianjin: Tianjin university of commerce (天津商业大学), MSc. 2010.
- 19 Liu R (刘睿), Pan SY (潘思轶), Liu L (刘亮). Research of inhibition kinetics for activity of  $\alpha$ -amylase by SPC. *Food Sci (食品科学)*, 2005, 26:189-192.
- 20 Li B (李波), Bao YH (包怡红), Gao F (高锋), et al. Inhibitory effect of polyphenols from Korean pine cone lamella on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Food Ind Technol (食品工业科技)*, 2015, 36(1):63-65.
- 21 Lian MN (廉美娜). Dynamics of total polyphenols and flavonoids concentration of alpine meadow plants and their antioxidant activity. Lanzhou: Lanzhou University (兰州大学), MSc. 2013.
- 22 Zheng JQ (郑晶泉). Advances in antioxidant experiments of antioxidants. *Foreign Med Hygiene Volume (国外医学卫生学分册)*, 2000, 27(1):37-40.
- 23 Song LJ (宋立江), Di Y (狄莹), Shi B (石碧). The significance and development of plant polyphenol on research and utilization. *Chem Progr (化学进展)*, 2000, 2:161-170.

(上接第 1005 页)

- 8 Zhang QM (张覃沐), Chen ZY (陈正玉), Zhao QZ (赵清治), et al. Another antitumor active ingredient from *Rabdosia rubescens-rubescens* B. *Chin Sci Bull*, 1980, 25:1051-1054.
- 9 Ma Z (马征). Study on immune regulation of *Rabdosia rubescens* and its safety assessment. Changsha: Central South University, MSc. 2010.
- 10 Wang YF (王一飞), Jiang JH (江金花), Wang QD (王庆端), et al. Antitumor and immunological activities of polysaccharides from *rabdosia rubescens*. *Chin J Pathophysiol*, 2002, 18:1341-1343.
- 11 Li XT, Lin C, Li PY. Characteristics of the cytostmic effects of oridonin *in vitro*. *Acta Pharm Sin*, 1986, 7:361-363.
- 12 Song FJ (宋发军), Wu SJ (吴士筠), Liang JJ (梁建军). Study on antibacterial activity about *Isodon Rubescens* from Badong. *J South Cent Univ National*, 2004, 23(4):9-11.
- 13 Jin Z (金珠), Zhou LL (周丽莉). Determination of oridonin and ponacidin in *Rabdosia rubescens* by HPLC. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 2004, 15:321-322.
- 14 Tremblay YDN, Lamarche D, Chever P, et al. Characterization of the ability of coagulase-negative *staphylococci* isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci*, 2013, 96:234-246.
- 15 O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, et al. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol*, 1999, 310(1):91-109.
- 16 Kong JL (孔晋亮), Liu XL (刘晓岚), Chen YQ (陈一强), et al. Observation the *Pseudomonas Aeruginosa* biofilm with siluer staining method. *J Jinning Med Coll*, 2007, 30(1):27-29.
- 17 Xu RR (徐蓉蓉). A comparative study of exopolysaccharides produced by planktonic and attached *Streptococcus mutans*. Chengdu: Sichuan University, MSc. 2004.
- 18 Lou FL (娄凡丽). Preliminary study on the effect of protamine intervention on *Staphylococcus aureus* biofilm. Wuhan: Huzhong Agricultural University, MSc. 2014.
- 19 Liu CJ (刘晨江), Zhao ZH (赵志鸿). Research progress of *Rabdosia rubescens*. *Chin Pharm J*, 1998, 33:577-579.