

葛花异黄酮精制及体外降脂活性研究

Refining isoflavones from *Puerariae flos* and its *in vitro* lipid-lowering activity

吴威 李群 宋笛 孙明哲

WU Wei LI Qun SONG Di SUN Ming-zhe

(长春职业技术学院食品与生物技术分院, 吉林 长春 130033)

(Food and Biological Technology College, Changchun Vocational Institute of Technology, Changchun, Jilin 130033, China)

摘要:目的:利用 HPD-100 型大孔树脂优化葛花异黄酮精制工艺,并评价其体外降脂活性。方法:通过大孔树脂柱层析法优化葛花异黄酮精制工艺,通过体外胰脂肪酶活性、胆固醇酯酶活性和胆固醇胶束溶解度法评价葛花异黄酮的降脂活性。结果:花异黄酮精制工艺如下,吸附参数:葛花异黄酮质量浓度 100 mg/mL, pH 6.0, 上样体积 20 mL, 解吸参数:洗脱液为 pH 5.0 体积分数 70% 的乙醇溶液, 洗脱流速 2.0 mL/min, 精制后葛花异黄酮纯度可达 81.47%;精制葛花异黄酮对胰脂肪酶、胆固醇酯酶和胆固醇胶束溶解度的抑制率可达 40.73%, 52.32%, 46.17%, 较未精制分别提高了 26.65%, 47.46%, 37.53%, 并存在一定的剂量效应关系。结论:葛花异黄酮可通过抑制胰脂肪酶和胆固醇酯酶的活性,降低胆固醇胶束溶解度发挥降脂作用。

关键词: 葛花; 异黄酮; 精制; 降脂活性

Abstract: Objective: The refining parameters of isoflavones from *Puerariae flos* were optimized by using HPD-100 macroporous adsorption resin, and its *in vitro* lipid-lowering effects were evaluated. **Methods:** The optimized refine parameters of isoflavones from *Puerariae flos* were studied by macroporous adsorption resin, and the lipid-lowering effects of isoflavones from *Puerariae flos* were evaluated by pancreatic lipase enzyme activity, pancreatic cholesterol esterase enzyme activity and micellar cholesterol solubility. **Results:** Adsorption parameters: *Puerariae flos* isoflavones were adsorbed with concentration of 100 mg/mL, pH 6.0 and upper column volume of 20 mL. Desorption parameters:

the adsorption resins were washed by 70% ethanol with pH 5.0 at flow rate of 2.0 mL/min. The purity of refined *Puerariae flos* isoflavones were 81.47%. The inhibition ratio on pancreatic lipase enzyme, pancreatic cholesterol esterase enzyme and micellar cholesterol solubility were 40.73%, 52.32% and 46.17%, respectively, and these were increased by 26.65%, 47.46% and 37.53% respectively, compared with not refining.

Conclusion: *Puerariae flos* isoflavones showed lipid-lowering effects by inhibiting pancreatic lipase enzyme activity, pancreatic cholesterol esterase enzyme activity and micellar cholesterol solubility.

Keywords: *Puerariae flos*; isoflavones; refine; lipid-lowering activity

葛花(*Puerariae flos*)又名葛条花,具有解酒、降血脂、抗肿瘤、抗氧化等多种生物活性^[1-3]。葛花异黄酮是葛花的主要生物活性成分之一^[4],近年来葛花异黄酮的提取、纯化和结构鉴定方面也取得一些研究成果^[5-7],但分离纯化技术落后、产品纯度不高限制了葛花异黄酮在食品、化妆品和医药健康领域的应用。

肥胖已成为世界性的健康问题,脂类过量摄入是导致超重的重要因素之一。抑制膳食脂肪吸收进入人体消化系统是减肥的重要途径之一^[8]。在脂肪消化吸收过程中胰脂肪酶和胆固醇酯酶发挥了关键作用,抑制胰脂肪酶和胆固醇酯酶活性,可控制脂肪吸收进入人体,因此,胰脂肪酶抑制率、胆固醇酯酶抑制率和胆固醇胶束溶解度成为体外降脂减肥评价的通用方法^[9-11]。异黄酮类化合物具有一定的降脂活性^[12],但关于葛花异黄酮降脂活性的研究未见报道。研究拟优化葛花异黄酮精制工艺,并以胰脂肪酶、胆固醇酯酶和胆固醇胶束溶解度抑制率为指标,评价精制前后葛花异黄酮的体外降脂减肥活性,以期葛花资源在食品领域中的应用提供重要的理论依据。

基金项目: 长春职业技术学院应用技术与开发项目(编号:YY-2019C05)

作者简介: 吴威,女,长春职业技术学院副教授,硕士。

通信作者: 孙明哲(1983—),女,长春职业技术学院副教授,硕士。

E-mail: 13843008299@163.com

收稿日期: 2021-08-28

1 材料与amp;方法

1.1 材料

葛花:吉林大药房,经干燥、粉碎、过 80 目筛备用。

1.2 仪器与试剂

酶标仪:F50 型,瑞士帝肯 TECAN 集团公司;

紫外可见分光光度计:UV-1700 型,日本岛津公司;

真空冷冻干燥机:FD-1A-50 型,上海豫明仪器有限公司;

气流式超微粉碎机:RT-25 型,北京锟捷玉诚机械设备有限公司;

超声波萃取仪:KS-600N 型,上海柯祁仪器设备有限公司;

旋转蒸发仪:RE-52C 型,巩义市予华仪器有限责任公司;

葛根素标准品:中国食品药品检定研究院;

AB-8、NKA-9、HPD-100、D101、LSA-10 型大孔树脂:天津允开树脂科技有限公司;

猪胰脂肪酶(100 U/mg)、猪胰胆固醇酯酶(100 U/mg)、对硝基苯基月桂酸酯、对硝基苯基丁酸酯:美国 Sigma 公司;

奥利司他胶囊(Orlistat):重庆华森制药有限公司;

总胆固醇检测试剂盒:南京建成生物工程研究所有限公司。

1.3 葛花异黄酮提取方法

参照孙明哲^[13]的方法,以葛花为原料,粉碎过 80 目,固液比($m_{\text{葛花}}:V_{\text{乙醇溶液}}$)1:16 (g/mL),乙醇体积分数 74%,超声功率 260 W,超声时间 40 min,超声温度 76℃,提取 2 次,浓缩、冻干(-55℃,0~5 Pa)备用。

1.4 葛花异黄酮的精制工艺

1.4.1 葛花异黄酮吸附率和解吸率 吸附率按式(1)计算,解吸率按式(2)计算。

$$A = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

$$D = \frac{A_2}{A_0 - A_1} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

A——吸附率,%;

D——解吸率,%;

A_0 ——原液葛花异黄酮的吸光度值(250 nm);

A_1 ——吸附后溶液的吸光度值(250 nm);

A_2 ——洗脱溶液的吸光度值(250 nm)。

1.4.2 树脂优选 分别取 5 g AB-8、NKA-9、D101、HPD-100 和 LSA-10 型大孔吸附树脂,预处理后置于三角瓶中,分别加入 50 mg/mL 的葛花异黄酮粗提液 20 mL,室

温震荡 2 h,过滤,于 250 nm 处测定滤液的吸光度值,计算吸附率;取吸附饱和的树脂,分别向其中加入体积分数 70%的乙醇水溶液 20 mL,室温条件下振荡 2 h,过滤,测定 250 nm 处吸光度值,计算解吸率,葛花异黄酮的精制树脂选择吸附率和解吸率中的最大值。

1.4.3 葛花异黄酮质量浓度对吸附率的影响 取质量浓度 12.5、25、50、100、200、400、800 mg/mL 的葛花异黄酮溶液各 50 mL,与 20 g 预处理的 HPD-100 型大孔树脂混合,室温振荡 2 h,过滤,测定滤液的吸光度值(250 nm),计算吸附率。

1.4.4 pH 值对葛花异黄酮吸附率的影响 三角瓶中分别配制 50 mL 质量浓度为 50.0 mg/mL 的葛花异黄酮,pH 值分别调整为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,分别加入预处理的 HPD-100 型大孔树脂 20 g,室温振荡 2 h,过滤,测定滤液的吸光度值(250 nm),计算吸附率。

1.4.5 洗脱液体积分数对葛花异黄酮解吸率的影响 分别配制 50 mL 体积分数为 30%、40%、50%、60%、70%、80%的乙醇溶液,加入吸附饱和的 HPD-100 型大孔树脂 20 g,室温振荡 2 h,过滤,测定滤液的吸光度值(250 nm),计算解吸率。

1.4.6 pH 值对葛花异黄酮解吸率的影响 取吸附饱和的 HPD-100 型大孔树脂 20 g 于三角瓶中,将 50 mL 体积分数 70%的乙醇溶液分别加入其中,调整溶液的 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,置于摇床中振荡 2 h,过滤取滤液,测定 250 nm 处吸光度值,计算解吸率。

1.4.7 洗脱流速对葛花异黄酮解吸率的影响 层析柱中(35 mm×500 mm)填入 HPD-100 型大孔树脂(经预处理),经 12 h 平衡后,上样,即加入 20 mL 葛花异黄酮溶液(100 mg/mL);洗脱,即利用 70%(pH 5.0)乙醇溶液进行洗脱,洗脱流量分别调整为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL/min,收集洗脱液,测定滤液的吸光度值(250 nm),计算解吸率。

1.5 葛花异黄酮对胰脂肪酶活性的影响

胰脂肪酶活性测定参照 Gondoin 等^[14]的方法并做适当修改。酶液(10 mg/mL):1 g 胰脂肪酶溶解于 10 mL 去离子水中,涡旋 2 min,离心(8 000 r/min,10 min)取上清液备用;缓冲溶液:100 mmol/L pH 8.2 的三羟甲基氨基甲烷溶液(Tris);底物(对硝基苯基月桂酸酯 0.08%):以 5 mmol/L pH 5.0 的磷酸盐缓冲溶液(内含 1% 曲拉通,Triton X-100)配制。分别取缓冲溶液 350 μL,酶液 150 μL,不同质量分数葛花异黄酮样品 50 μL 于离心管中,再加入 450 μL 底物开始反应,37℃ 孵育 2 h,离心(8 000 r/min,1 min),测上清液吸光度值(400 nm),对照组以去离子水替代葛花异黄酮,胰脂肪酶抑制率按式(3)计算。

$$H_p = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

H_p ——胰脂肪酶抑制率, %;

A_c ——对照组吸光度值;

A_s ——样品吸光度值。

1.6 葛花异黄酮对胆固醇酯酶活性的影响

胆固醇酯酶活性测定参照 Garzón 等^[15]的方法并适当修改。酶液(25 μg/mL):0.25 mg 猪胰胆固醇酯酶溶解于 10 mL 去离子水中,离心(8 000 r/min,10 min)取上清液备用;底物缓冲液:配制 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.04)(内含 0.1 mol/L NaCl,0.02 mol/L 对硝基苯基丁酸酯,6 mmol/L 牛磺胆酸钠),分别取底物缓冲液 925 μL,酶液 50 μL 和 25 μL 不同质量分数葛花异黄酮样品于离心管中,25 ℃ 孵育 5 min,测吸光度值(405 nm),对照组加入 25 μL 去离子水,胆固醇酯酶抑制率按式(3)计算。

1.7 葛花异黄酮对胆固醇胶束溶解度的影响

胆固醇胶束的制备参照 Prados 等^[16]的方法并适当修改。胆固醇胶束制备:以 15 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)配制,内含牛磺胆酸钠(10 mmol/L)、胆固醇(2 mmol/L)、油酸(5 mmol/L)、NaCl(132 mmol/L),超声波(400 Hz)处理 1 h,37 ℃ 孵育 24 h,取 1 mL 不同质量分数葛花异黄酮样品与 5 mL 胆固醇胶束混合,37 ℃ 孵育 2 h,离心(8 000 r/min,10 min),用总胆固醇试剂盒测定上清液胆固醇含量,对照组加 1 mL 去离子水,抑制率按式(4)计算。

$$H_c = \frac{C_s - C_c}{C_s} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

H_c ——胆固醇胶束溶解度抑制率, %;

C_c ——对照组胆固醇含量,mmol/L;

C_s ——样品胆固醇含量,mmol/L。

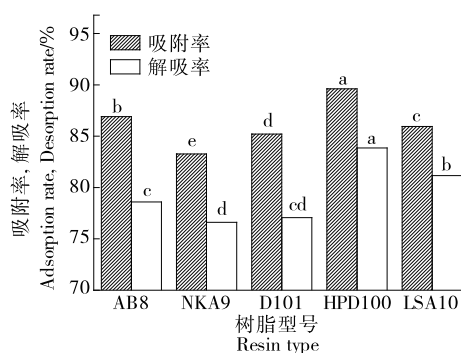
1.8 数据处理

以 $\bar{X} \pm s$ 统计试验数据,通过 SPSS 19.0 软件进行数据差异显著性分析,利用 Origin 8.5 软件绘制图形。

2 结果与分析

2.1 葛花异黄酮精制工艺的确定

2.1.1 树脂优化 大孔吸附树脂是广泛选用的精制异黄酮类化合物的柱填料,因其极性和粒径大小的不同,对不同异黄酮类化合物的吸附和解离的难易程度存在差异^[17]。由图 1 可知,HPD-100 型大孔树脂对葛花异黄酮表现出较好的吸附和解离性能,吸附率最高为 89.61%,解吸率最高为 83.86%,优于其他类型的大孔树脂,HPD-100 型大孔树脂的极性和粒径适合分离葛花异黄酮,可以用于后续精制过程。



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 1 树脂筛选

Figure 1 Optimization of macroporous adsorption resin

2.1.2 葛花异黄酮质量浓度对吸附率的影响 由图 2 可知,随着葛花异黄酮质量浓度的增大,吸附率呈先增加后减小的趋势,当葛花异黄酮质量浓度达到 100 mg/mL 时,吸附率出现最大值 88.41%,此后吸附率逐渐减小。可能是高浓度的葛花异黄酮堵塞树脂孔洞,导致吸附率下降,因此葛花异黄酮吸附液质量浓度定为 100 mg/mL。

2.1.3 pH 值对葛花异黄酮吸附率的影响 由图 3 可知,

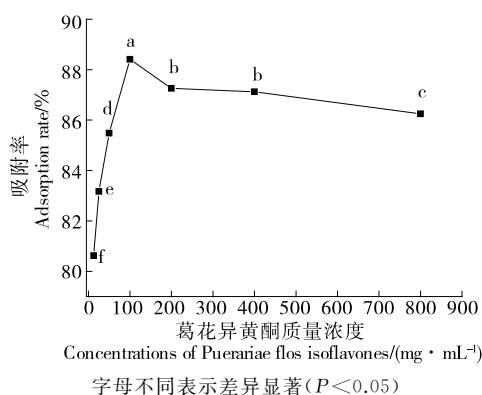
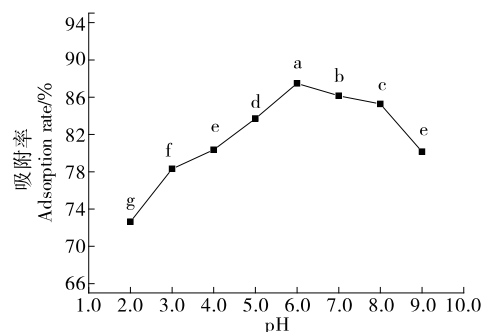


图 2 葛花异黄酮质量浓度对吸附率的影响

Figure 2 The effect of concentrations of *Puerariae flos* isoflavones on adsorption rate



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 pH 值对葛花异黄酮吸附率的影响

Figure 3 The effect of pH on adsorption rate of *Puerariae flos* isoflavones

随吸附溶液 pH 的增加,吸附率呈先增大后减小的趋势,当吸附液 pH 为 6.0 时,吸附率最高为 87.49%。葛花异黄酮的弱酸性质使其在 pH 6.0 时出现最高的吸附率,与闵玉涛等^[18]纯化葛根异黄酮的吸附溶液 pH(5.0~6.0)相似。因此,调整吸附溶液 pH 为 6.0。

2.1.4 洗脱液体积分数对葛花异黄酮解吸率的影响 由图 4 可知,随洗脱液浓度的增加,解吸率呈先增大后减小的趋势,当洗脱液体积分数为 70% 时,解吸率达到最大值 82.35%,70% 的乙醇溶液,其极性适合从树脂上解离葛花异黄酮类物质。因此,洗脱溶液定为体积分数 70% 的乙醇溶液。

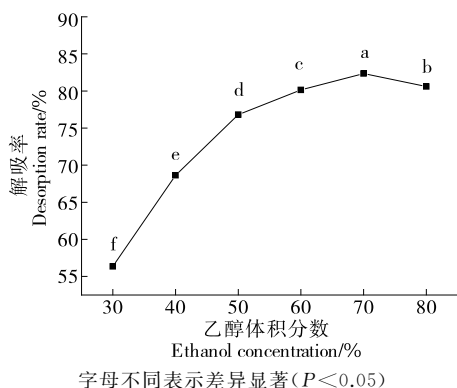


图 4 洗脱液体积分数对葛花异黄酮解吸率的影响

Figure 4 The effect of eluent concentration on desorption rate of *Puerariae flos* isoflavones

2.1.5 pH 值对葛花异黄酮解吸率的影响 由图 5 可知,随洗脱溶液 pH 值的增大,解吸率先增大后减小,在 pH 值为 5.0 处,解吸率出现最大值 81.52%,因此,洗脱液 pH 值调整为 5.0。

2.1.6 洗脱流速对葛花异黄酮解吸率的影响 由图 6 可知,随洗脱流速的增加,葛花异黄酮解吸率呈先增大后减小的趋势,当 2.0 mL/min 速度进行洗脱时,解吸率出现最大值 82.35%,洗脱流速过高,葛花异黄酮洗脱不够完

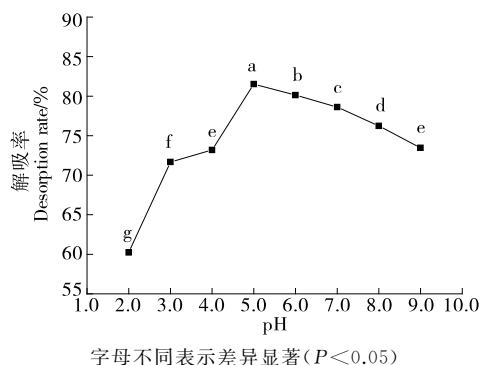
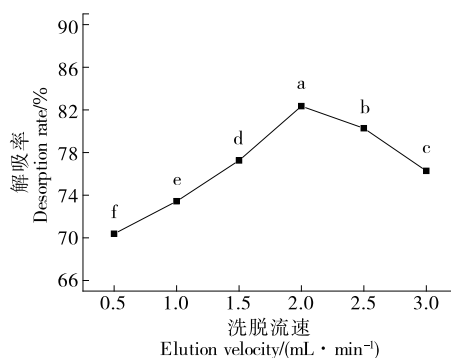


图 5 pH 对葛花异黄酮解吸率的影响

Figure 5 The effect of eluent pH on desorption rate of *Puerariae flos* isoflavones



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 6 洗脱流速对葛花异黄酮解吸率的影响

Figure 6 The effect of washing velocity on desorption rate of *Puerariae flos* isoflavones

全,导致解吸率减小,洗脱流速参数与刘莹等^[19]的结论相同。因此,洗脱流速调整为 2.0 mL/min。

2.1.7 葛花异黄酮精制工艺参数 层析柱中(35 mm×500 mm)装入预处理的 HPD-100 型大孔树脂,以去离子水平衡 12 h,吸附条件:葛花异黄酮质量浓度 100 mg/mL,pH 6.0,体积 20 mL;解吸条件:70%乙醇溶液(pH 5.0),流速 2.0 mL/min。如图 7 所示,经 HPD-100 型大孔树脂精制后,洗脱曲线中出现单一组分峰,收集管编号(22~30),真空浓缩,冷冻干燥后获得葛花异黄酮精制组分 A₁(纯度 81.47%)。

2.2 葛花异黄酮对胰脂肪酶活性的影响

由图 8 可知,随葛花异黄酮浓度的增加,胰脂肪酶抑制率呈线性增加的趋势,当质量浓度超过 0.2 mg/mL 后,趋于平缓,在 1.0 mg/mL 处抑制率出现最大值 40.73%,略低于奥利司他(44.36%),但高于未精制葛花异黄酮 26.65%,高于相同质量浓度的陈年乌龙茶^[20]。胰脂肪酶是膳食脂肪分解的关键酶,抑制其活性可减少脂肪吸收,降低脂肪利用率^[21]。葛花异黄酮可抑制胰脂肪酶活性,通过减少脂肪消化发挥降脂减肥作用。

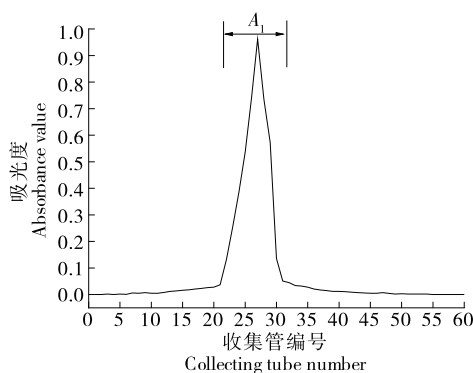


图 7 葛花异黄酮洗脱曲线

Figure 7 The elution graph of *Puerariae flos* isoflavones

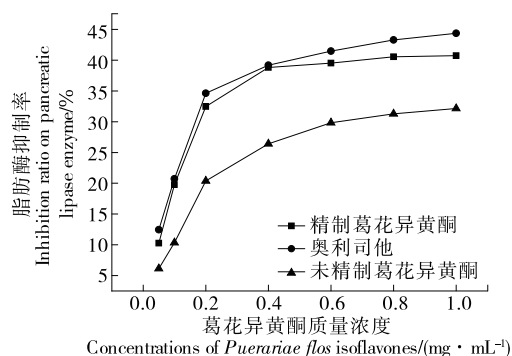


图 8 葛花异黄酮对胰脂肪酶活性的影响

Figure 8 The effect of *Puerariae flos* isoflavones on pancreatic lipase enzyme activity

2.3 葛花异黄酮对胆固醇酯酶活性的影响

由图 9 可知,随葛花异黄酮质量浓度的增大,胆固醇酯酶活性表现出一定的抑制作用,抑制率呈线性增加趋势,当质量浓度高于 0.6 mg/mL 时,增长趋势趋于平缓,当质量浓度为 1.0 mg/mL 时,抑制率最高为 52.32%,略低于奥利司他(54.28%),但高于未精制葛花异黄酮(47.46%)。抑制胆固醇酯酶活性,可减少膳食中的胆固醇酯分解成胆固醇,进而抑制胆固醇的吸收,发挥降脂减肥的作用^[22]。葛花异黄酮可抑制膳食胆固醇酯分解成游离胆固醇进入消化系统,具有一定的降脂减肥活性。

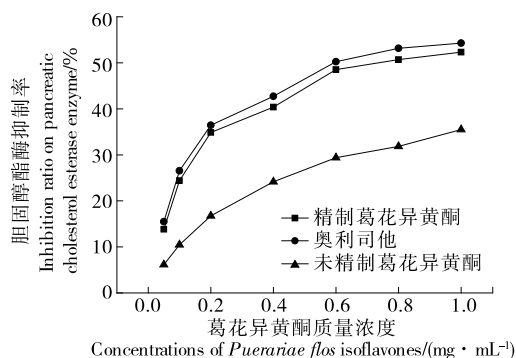


图 9 葛花异黄酮对胆固醇酯酶活性的影响

Figure 9 The effect of *Puerariae flos* isoflavones on pancreatic cholesterol esterase enzyme activity

2.4 葛花异黄酮对胆固醇胶束溶解度的影响

由图 10 可知,随葛花异黄酮质量浓度的增加,胆固醇胶束溶解度抑制率呈线性增加的趋势,在质量浓度 1.0 mg/mL 处,抑制率出现最大值 46.17%,略低于奥利司他(48.41%),但高于未精制葛花异黄酮(37.53%),胆固醇胶束溶解度抑制率高于亚麻籽肽^[23]。胆固醇需借助胆固醇胶束完成转运到消化系统的过程,溶解度越高,吸收利用率就越高^[24]。葛花异黄酮可降低胆固醇胶束溶解度,降低胆固醇的生物利用率,发挥降脂减肥作用。

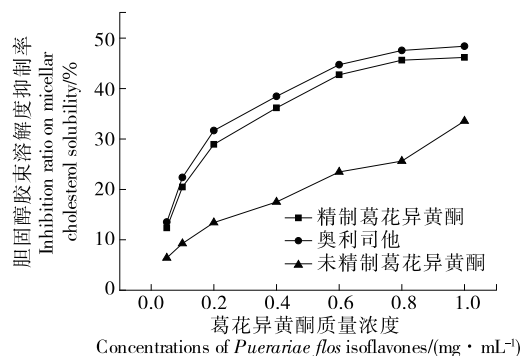


图 10 葛花异黄酮对胆固醇胶束溶解度的影响

Figure 10 The effect of *Puerariae flos* isoflavones on micellar cholesterol solubility

3 结论

试验优化了葛花异黄酮的精制工艺条件,同时评价其体外降脂减肥活性。葛花异黄酮精制的最佳树脂选择 HPD-100 型大孔吸附树脂,精制工艺条件如下,吸附条件:上样 100 mg/mL 葛花异黄酮溶液(pH 6.0) 20 mL;解吸条件:利用 70%乙醇溶液(pH 5.0)以 2.0 mL/min 的流速进行洗脱,葛花异黄酮经精制后纯度可达 81.47%。精制后的葛花异黄酮在体外对胰脂肪酶、胆固醇酯酶和胆固醇胶束溶解度都表现出较好的抑制作用,并呈一定的剂量效应关系,但抑制率略低于奥利司他,高于未精制葛花异黄酮。葛花异黄酮可以通过抑制胰脂肪酶,抑制胆固醇酯酶的活性,降低胆固醇胶束溶解度,阻止食物中脂肪消化吸收而发挥降脂减肥作用,但能否在动物体内经消化后也表现出相同的降脂减肥活性,以及其作用机制将在后续研究中进行探讨。

参考文献

- [1] 王兰, 蓝璟, 龚频, 等. 葛根异黄酮降血糖活性及作用机制的研究[J]. 食品科技, 2017, 42(3): 223-226.
WANG Lan, LAN Jing, GONG Pin, et al. Hypoglycemic effects and mechanisms of Radix Puerariae isoflavone[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(3): 223-226.
- [2] 王金凤, 薄华本, 孟祥颖, 等. 葛花异黄酮对急性心肌梗死小鼠心肌的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(1): 59-62.
WANG Jin-feng, PU Hua-ben, MENG Xiang-ying, et al. The protection of isoflavones on myocardium in myocardial infarction mouse[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2010, 26(1): 59-62.
- [3] YAO H, WU B, CHENG Y, et al. High throughput chemiluminescence platform for evaluating antioxidative activity of total flavonoid glycosides from plant extracts[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 380-386.
- [4] KAMIYA T, SAMESHIMA-KAMIYA M, NAGAMINE R, et al. The crude extract from Puerariae flower exerts antiobesity and antifatty liver effects in high-fat diet-induced obese mice[J]. Evidence-Based

- Complementary and Alternative Medicine, 2012, 20(12): 1-6.
- [5] 戴雨霖, 于珊珊, 张颖, 等. 葛花中异黄酮类化学成分的 RRLC-Q-TOF MS/MS 研究[J]. 高等学校化学学报, 2014, 35(7): 1396-1402.
- DAI Yu-lin, YU Shan-shan, ZHANG Ying, et al. RRLC-Q-TOF MS/MS study on isoflavones from *Pueraria puerariae* [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2014, 35(7): 1396-1402.
- [6] 吴桐, 黄彧, 侯万超, 等. 葛花中异黄酮类活性成分的分离及鉴定[J]. 分析化学学报, 2020, 36(3): 353-358.
- WU Tong, HUANG Yu, HOU Wan-chao, et al. Isolation and identification of isoflavones from *Pueraria*[J]. Journal of Analytical Sciences, 2020, 36(3): 353-358.
- [7] WU T, LIU C, HUANG Y, et al. Simultaneous screening and isolation of activated constituents from *Puerariae Flos* by ultrafiltration with liquid chromatography and mass spectrometry combined with high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Separation Science, 2018, 41(24): 4458-4468.
- [8] MAROUNEK M, VOLEK Z, SKRIVANOVÁ E, et al. Comparative study of the hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of alginate and amidated alginate in rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105: 620-624.
- [9] SIRICHAIWETCHAKOON K, LOWE G M, THUMANU K, et al. The effect of *Pluchea indica* (L.) Less. tea on adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and lipase activity [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 2018(2): 1-13.
- [10] ADISAKWATTANA S, INTRAWANGSO J, HEMRID A, et al. Extracts of edible plants inhibit pancreatic lipase, cholesterol esterase and cholesterol micellization, and bind bile acids[J]. Food Technology & Biotechnology, 2012, 50(1): 11-16.
- [11] SIVASHANMUGAM T, MUTHUKRISHNAN S, UMAMAHESWARI M, et al. Cholesterol esterase inhibitory activity of flavonoids using in silico and in vitro studies [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2013, 3: 930-935.
- [12] 何桂香, 刘金宝. 鹰嘴豆异黄酮提取物对高脂血症小鼠的降脂作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(7): 80.
- HE Gui-xiang, LIU Jin-bao. Effect of extract of *Cicer arietium* L. isoflavones in decreasing blood lipid of mice with hyperlipidemia[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9(7): 80.
- [13] 孙明哲. 超声波辅助提取葛花总异黄酮及体外抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(3): 29-34.
- SUN Ming-zhe. Ultrasound-assisted extraction of total isoflavones from *Puerariae flos* and its antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2020, 41(3): 29-34.
- [14] GONDOIN A, GRUSSU D, STEWART D, et al. White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase in vitro[J]. Food Research International, 2010, 43(5): 1537-1544.
- [15] GARZÓN A G, CIAN R E, AQUINO M E, et al. Isolation and identification of cholesterol esterase and pancreatic lipase inhibitory peptides from brewer's spent grain by consecutive chromatography and mass spectrometry[J]. Food & Function, 2020, 11(6): 4994-5003.
- [16] PRADOS I M, LUISA MARINA M, CONCEPCIÓN G M. Isolation and identification by high resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry of novel peptides with multifunctional lipid-lowering capacity [J]. Food Research International, 2018, 111(9): 77-86.
- [17] 张星, 董欣, 刘振春, 等. 大孔树脂纯化黑豆异黄酮的工艺优化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(1): 136-145, 154.
- ZHANG Xing, DONG Xin, LIU Zhen-chun, et al. Optimization of purification process of black beans isoflavones with macroporous adsorption resin [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2018, 46(1): 136-145, 154.
- [18] 闵玉涛, 宋彦显, 陶敬, 等. AB-8 型大孔树脂分离纯化葛根异黄酮的工艺优化[J]. 食品工业, 2015, 36(7): 159-162.
- MIN Yu-tao, SONG Yan-xian, TAO Jing, et al. Optimized the extraction and partial purification of isoflavone in *pueraria lobata* tubers by Ab-8 macroporous resin[J]. The Food Industry, 2015, 36(7): 159-162.
- [19] 刘莹, 郁建平. 大孔树脂纯化葛花总异黄酮的工艺条件研究[J]. 山地农业生物学报, 2010, 29(1): 56-60.
- LIU Ying, YU Jian-ping. Separation and purification of the isoflavonoids from *flos puerariae* using macroporous resin[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2010, 29(1): 56-60.
- [20] 霍梦恩, 李冬利, 罗小燕, 等. 陈年乌龙茶的生化成分及其降脂降糖活性研究[J]. 茶叶通讯, 2019, 46(4): 472-478.
- HUO Meng-en, LI Dong-li, LUO Xiao-yan, et al. Study on the biochemical composition of aged oolong teas and its hyperglycemic and hypolipidemic activities in vitro[J]. Journal of Tea Communication, 2019, 46(4): 472-478.
- [21] LI B, ZHOU B, LU H, et al. Phosphaisocoumarins as a new class of potent inhibitors for pancreatic cholesterol esterase[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 45(5): 1955-1963.
- [22] 苏建辉, 马朝阳, 杨鹿, 等. 槲皮素、EGCG 对胆固醇酯酶活性和胆固醇胶束抑制作用研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(11): 346-349.
- SU Jian-hui, MA Chao-yang, YANG Lu, et al. Inhibition of pancreatic cholesterol esterase activities and cholesterol micelle of EGCG and quercetin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(11): 346-349.
- [23] 包小兰, 刘晓静, 郑睿, 等. 亚麻籽降胆固醇活性肽的酶解工艺优化及分级制备[J]. 中国油脂, 2020, 45(6): 37-42.
- BAO Xiao-lan, LIU Xiao-jing, ZHENG Rui, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis and fractionation preparation of flaxseed peptides with cholesterol-lowering activity[J]. China Oils and Fats, 2020, 45(6): 37-42.
- [24] ZHANG J, ZHANG W, MAMADOUBA B, et al. A comparative study on hypolipidemic activities of high and low molecular weight chitosan in rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(4): 504-508.