

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2023.81047

超声波辅助双水相法提取枸杞叶黄酮 及其胰脂肪酶抑制活性

贾晓凤^{1,2} 高 蝶^{1,2} 刘金旺^{1,2} 徐钰莹^{1,2} 范艳丽^{1,2}

(1. 宁夏大学食品科学与工程学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学枸杞现代产业学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: [目的] 开发一种安全、无毒且高效的枸杞叶黄酮类化合物提取方法。[方法] 采用超声波辅助双水相法实现高得率、绿色的枸杞叶黄酮类化合物提取, 并评价产物活性。通过单因素和 Plackett-Burman (PB) 试验考察各因素对黄酮提取效果的影响, 选取聚乙二醇 (PEG400) 使用量、硫酸铵使用量、料液比 3 个因素通过响应面中心组合试验设计优化提取条件; 通过胰脂肪酶活性抑制试验评价提取物活性。[结果] 超声波辅助双水相法提取枸杞叶黄酮最佳工艺条件为: 聚乙二醇 PEG 相对分子质量 400, PEG 质量分数 28%、硫酸铵质量分数 16%、超声功率 250 W, 超声处理时间 40 min、超声处理温度 40 °C、料液比 1:30 (g/g), 该条件下所提取的枸杞叶黄酮提取物的总黄酮含量为 (486.30 ± 3.29) mg/g, 其对胰脂肪酶活性具有显著抑制作用, 半数抑制质量浓度 (IC_{50}) 为 1.06 mg/mL。[结论] 最优提取条件下, 超声波辅助双水相法所提取的枸杞叶黄酮得率高、溶剂残留低, 该方法所得枸杞叶黄酮对胰脂肪酶具有良好的抑制作用。

关键词: 枸杞叶; 黄酮; 超声波; 双水相法; 胰脂肪酶

Extraction of flavonoids from Goji (*Lycium barbarum* L.) leaves by ultrasonic-assisted two-phase aqueous method and the inhibitory activity of the extract on pancreatic lipase

JIA Xiaofeng^{1,2} GAO Die^{1,2} LIU Jinwang^{1,2} XU Yuying^{1,2} FAN Yanli^{1,2}

(1. School of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2. Ningxia University Institute of Goji Berry Modern Industry, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to achieve high yield and green extraction of flavonoids from Goji (*Lycium barbarum* L.) leaves using ultrasonic assisted aqueous two-phase method, and to evaluate the activity of extract. [Methods] Single factor and PB (Plackett-Burman) experiments were conducted to investigate the influence of various factors on the extraction efficiency of flavonoids. Three parameters were chosen to optimize the extraction conditions using a Central Composite Design (CCD) of the response surface experiment: the amount of polyethylene glycol (PEG400), the amount of ammonium sulfate, and the solid-liquid ratio. The extract's activity was assessed using an activity inhibition test of pancreatic lipase. [Results] The optimal process conditions for ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of flavonoids from Goji berry leaves were: 28% polyethylene glycol 400, 16% ammonium sulfate, ultrasonic power of 250 W, ultrasonic treatment time of 40 minutes, ultrasonic treatment temperature of 40 °C, and solid-solid ratio of 1:30 (g/g). Under these conditions, the total flavonoid content of the extract was (486.30 ± 3.29) mg/g, which had a significant inhibitory effect on pancreatic lipase activity, and the half inhibition concentration (IC_{50}) was 1.06 mg/mL. [Conclusion] Under the optimal extraction conditions, the flavonoids extracted from *L. barbarum* leaves by ultrasonic-assisted aqueous phase method had high yield and low solvent residue, and the flavonoids from *L. barbarum* leaves obtained by this method had a good inhibitory effect on pancreatic lipase.

Keywords: Goji (*Lycium barbarum* L.) leaves; flavonoids; ultrasonic wave; two aqueous phase method; pancreatic lipase

基金项目: 国家级大学生创新创业计划项目 (编号: 202210749027)

通信作者: 范艳丽 (1980—), 女, 宁夏大学教授, 博士。E-mail: fanyanli_fyl@163.com

收稿日期: 2023-10-19 改回日期: 2024-05-02

枸杞叶是茄科植物枸杞(*Lycium barbarum* L.)的嫩叶,在中国食用历史悠久。研究^[1-3]发现,枸杞叶含有枸杞果中同样丰富的营养活性物质,如多糖、蛋白质、黄酮类、酚酸类、生物碱以及甾类等。其中,黄酮类化合物是枸杞叶中最具代表性活性物质,其在枸杞叶中的含量远高于枸杞果^[4]。枸杞叶黄酮类化合物具有抗氧化、抗衰老、提高免疫力等生理活性,可预防和改善糖尿病、肥胖、高脂血症等慢性疾病^[5],可以作为降血糖和降血脂的绿色功能性食品原料或配料。

目前植物黄酮类化合物的提取方法主要有热水提取法、乙醇热回流提取和酶法提取^[6-8]等,其中热水提取法由于提取溶剂水的极性较低,黄酮产物得率较低;而酶法提取虽然较为清洁,但酶活性极易受温度和pH等因素影响而降低甚至丧失,导致黄酮产物不稳定,整个过程需考虑的影响因素较多。乙醇热回流法虽然获得较高得率的枸杞叶黄酮提取物,但提取温度高,易造成部分枸杞叶黄酮成分被破坏,并且需要使用石油醚等有机溶剂脱除叶绿素,造成产物中有机溶剂和杂质残留风险较高^[9]。

研究采用超声波辅助双水相法提取枸杞叶黄酮类化合物,并通过胰脂肪酶活性抑制试验评价枸杞叶黄酮提取物生物活性,以期开发一种安全、无毒且高效的枸杞叶黄酮类化合物提取方法,解决现有提取工艺缺陷,实现枸杞叶的绿色高值化利用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

枸杞叶茶:宁夏童子茶科技有限公司;

芦丁:色谱级(纯度 $\geq 98\%$),上海源叶生物科技有限公司;

无水乙醇、硫酸铵、氢氧化钠、硝酸铝、氯化钠:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

亚硝酸钠:分析纯,上海广诺化学科技有限公司;

聚乙二醇(PEG400):相对分子质量380~430,北京索莱宝科技有限公司;

猪胰脂肪酶(Type II):3万U/g,上海源叶生物公司;

三羟甲基氨基甲烷(Tris):优级纯,美国SIGMA公司;

棕榈酸对硝基苯酯(p-nitrophenylpalmitate, p-NPP):分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;

盐酸、氯化钙:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

高速粉碎机:SE-750型,永康市圣象电器有限公司;

电子天平:ME203E/02型、AL104型,梅特勒-托利多公司;

紫外-可见分光光度计:V-5100型,上海元析仪器有限公司;

超声波清洗器:KQ-250DE型,昆山市超声仪器有限公司;

低速台式大容量离心机:TDL-5-A型,上海安亭科学仪器厂;

微孔板恒温振荡器:ST70-2型,杭州米欧仪器公司;

全波长酶标仪:Multiskan Mk3型,赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 超声波辅助双水相法提取枸杞叶黄酮基本方法

用高速粉碎机将枸杞叶粉碎后过60目筛,备用。向离心管中加入质量分数28%的PEG400、16%的硫酸铵和56%的蒸馏水,构建双水相体系。准确称量1.000 g枸杞叶粉末于配制好的双水相体系中,摇匀,置于超声波清洗器中在30℃、250 W下超声提取30 min。离心(4 000 r/min)10 min,取上层溶液。

1.2.2 枸杞叶黄酮提取液的总黄酮含量测定 以芦丁为标准品,采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法,在510 nm下测定并计算枸杞叶黄酮提取液的总黄酮含量^[10]。

1.2.3 双水相体系的构建及其相图的绘制

(1) 双水相体系构建:分别配制5种不同的双水相体系:以质量分数计,35.50%的乙醇/16.00%的硫酸铵;28.00%的PEG400/18.00%的硫酸铵;21.00%的正丙醇/18.00%的硫酸铵;19.00%的PEG600/20.00%的硫酸铵;41.80%的乙醇/22.00%的磷酸氢二钾。采用1.2.2方法测定提取液的总黄酮含量,确定最佳双水相体系。

(2) 相图绘制:采用浊点滴定法^[11]绘制已确定的最佳双水相体系相图。向比色管中加入聚乙二醇溶液和适量蒸馏水后,逐滴加入硫酸铵溶液使体系出现浑浊,记录硫酸铵的质量;再滴加适量蒸馏水至体系完全澄清,记录所加水的质量。重复上述步骤直至双水相体系不再出现浑浊,计算各个浊点时聚乙二醇和硫酸铵的质量浓度,绘制双水相体系相图。

1.2.4 单因素试验 按照1.2.1方法,以1.0 g枸杞叶粉末为基准,在聚乙二醇PEG400质量分数28%,硫酸铵18%,料液比1:30(g/g),超声温度40℃,超声时间40 min的基础上,以总黄酮含量为评价指标,考察聚乙二醇PEG400质量分数(16%,20%,24%,28%,32%)、硫酸铵质量分数(14%,16%,18%,20%,22%)、料液比[1:10,1:20,1:30,1:40,1:50(g/g)];超声温度(20,30,40,50,60℃)、超声时间(20,30,40,50,60 min)对总黄酮含量的影响。

1.2.5 Plackett-Burman(PB)和响应面试验 根据单因素试验结果,用Design-Expert 8.0.6软件进行PB试验设计并开展试验,根据试验结果判断各单因素的显著性。选取影响总黄酮含量最显著的3个因素作为自变量,以枸杞叶黄酮提取液的总黄酮含量(Y)为响应值,设计三因素三水平响应面试验,考察重要因素及其交互作用对响应值的影响,确定枸杞叶黄酮的最佳提取工艺条件。

1.2.6 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶活性的影响 取 40 μL Tris-HCl 缓冲液、30 μL 枸杞叶黄酮溶液和 60 μL 10 mg/mL 的胰脂肪酶溶液加入 96 孔板中混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min 后, 加入 80 μL p-NPP 底物启动反应, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 酶标仪 405 nm 处测定吸光值。以奥利司他为阳性对照, 研究枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用。用缓冲液替代对照组酶液, 每组试验重复 3 次。胰脂肪酶活性抑制率计算见式(1)。半抑制质量浓度(IC_{50})通过绘制抑制曲线图的线性回归拟合求得。

$$I = \left(1 - \frac{B-b}{A-a}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

I ——抑制率, %;

A ——对照试验组吸光值;

B ——样品试验组吸光值;

a ——对照空白组吸光值;

b ——样品空白组吸光值。

判断抑制类型: 底物浓度值固定, 分别测定添加 1.0 mg/mL 和不添加酶抑制剂时, 不同酶浓度下的反应初速度, 以初速度对酶质量浓度作图分析。添加抑制剂得到一条通过原点且斜率降低的直线, 即为可逆抑制作用类型。

固定酶液的质量浓度, 枸杞叶黄酮溶液质量浓度为 0.5, 1.0 mg/mL, 分别测定 p-NPP 浓度为 8, 4, 2, 1 mmol/L 时的酶促反应初速度, 以 1 min 内吸光度值(A)变化 0.01 为 1 个酶活单位(U), 以反应速率的倒数($1/v$)对底物浓度的倒数($1/[S]$)作图, 得到 Lineweaver-Burk 双倒数曲线。

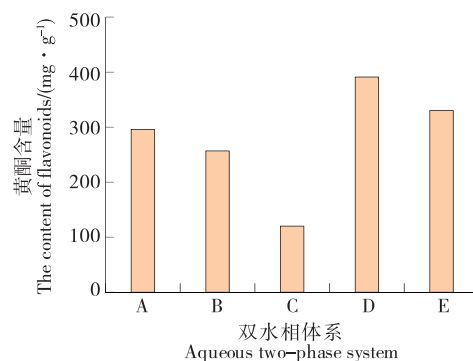
枸杞叶黄酮提取液对胰脂肪酶活性的抑制率、半抑制质量浓度(IC_{50})及其抑制类型的测定方法, 详见参考文献[12]。

1.2.7 数据处理 使用 Origin 2021、Excel 2019、Graphpad Prism 9.5 版软件进行数据分析与作图; 用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 PB 试验和响应面试验设计与分析; 每组试验 3 次重复, 结果采用平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 双水相体系的确定

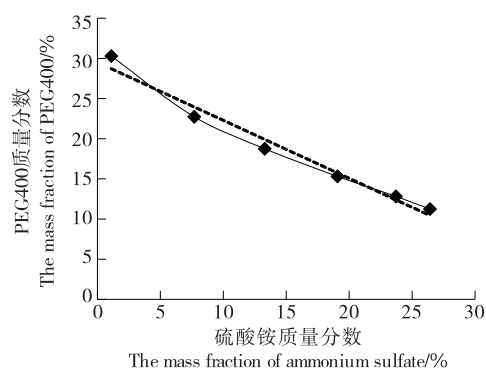
2.1.1 双水相体系选择 探究 5 种不同双水相体系对枸杞叶黄酮提取液总黄酮含量的影响, 结果见图 1。由图 1 可知, B、C 体系提取所得总黄酮含量低, 且不能通过绿色方法有效去除叶绿素, 上层提取液呈墨绿色; A、D、E 3 个体系所得提取液呈橙黄色, A 体系呈较暗橙黄色, 可能残留较少叶绿素成分, 比较之下, D、E 体系均采用聚乙二醇—硫酸铵体系, 有效去除叶绿素干扰, 提取体系稳定, PEG400-硫酸铵体系提取得到的提取液中总黄酮含量达到 391.04 mg/g 显著高于 PEG600-硫酸铵体系, 故选取 PEG400-硫酸铵为提取枸杞叶黄酮的双水相体系。



A. 32.5% 的乙醇+16% 的硫酸铵 B. 41.8% 的乙醇+22% 的磷酸氢二钾 C. 21% 的正丙醇+18% 的硫酸铵 D. 28% 的 PEG400+18% 的硫酸铵 E. 19% 的 PEG600+20% 的硫酸铵

图 1 双水相体系对枸杞叶黄酮提取液总黄酮含量的影响
Figure 1 Effects of different aqueous two-phase systems on the total flavonoid content of Goji leaf flavonoid extract

2.1.2 PEG400-硫酸铵双水相体系相图 通过浊点滴定法确定 PEG400-硫酸铵双水相体系相图见图 2, 图中曲线将体系划分为两个区域, 曲线以下为均相区, 曲线以上为两相区。若 PEG400 质量分数和硫酸铵质量分数趋于极大或极小的情况时, 不分相或两者难以与水分子相溶, 呈现浑浊现象或硫酸铵颗粒析出。所以, 当 PEG400 质量分数为 11.24%~30.30%, 硫酸铵质量分数为 1.10%~26.42% 时易形成两相, 即双水相体系。



虚线表示系统线, 系统线长度越长, 两相间的性质差异越大, 反之则相反

图 2 双水相体系浊点图

Figure 2 Cloud point diagram of aqueous two-phase system

2.2 单因素试验

如图 3 所示, 当 PEG400 质量分数达到 28%、硫酸铵达到 16% 时, 提取液的总黄酮含量最大。双水相体系中的上相富集液提取溶剂为 PEG400, 随着其质量分数增加, 上相溶液对于水的亲和力增加, 对黄酮的亲和力增加。但当 PEG400 质量分数 $> 28\%$ 时, PEG400 的黏度增

加阻碍了分子在双水相中的移动,从而降低了黄酮在上相中的富集能力,导致所提取的总黄酮含量降低。硫酸铵能够抢夺双水相体系中的水分子,当硫酸铵质量分数 $>16\%$ 时,随着硫酸铵增加黄酮类化合物在聚乙二醇相中的富集较少,导致所提取的总黄酮含量降低。此外,当料液比达到 $1:30$ (g/g)时,枸杞叶中的总黄酮含量达到峰

值。随着料液比的增加,溶剂的添加量也在增加,枸杞叶中的非黄酮物质被提取出来阻碍了黄酮的提取,导致提取液的总黄酮含量降低。当超声时间为 40 min 、超声温度达到 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,枸杞叶中的总黄酮含量达到峰值,推测随着超声时间的增加、温度的上升,一些黄酮类化合物对热不稳定、开始分解,导致所提取的黄酮含量下降。

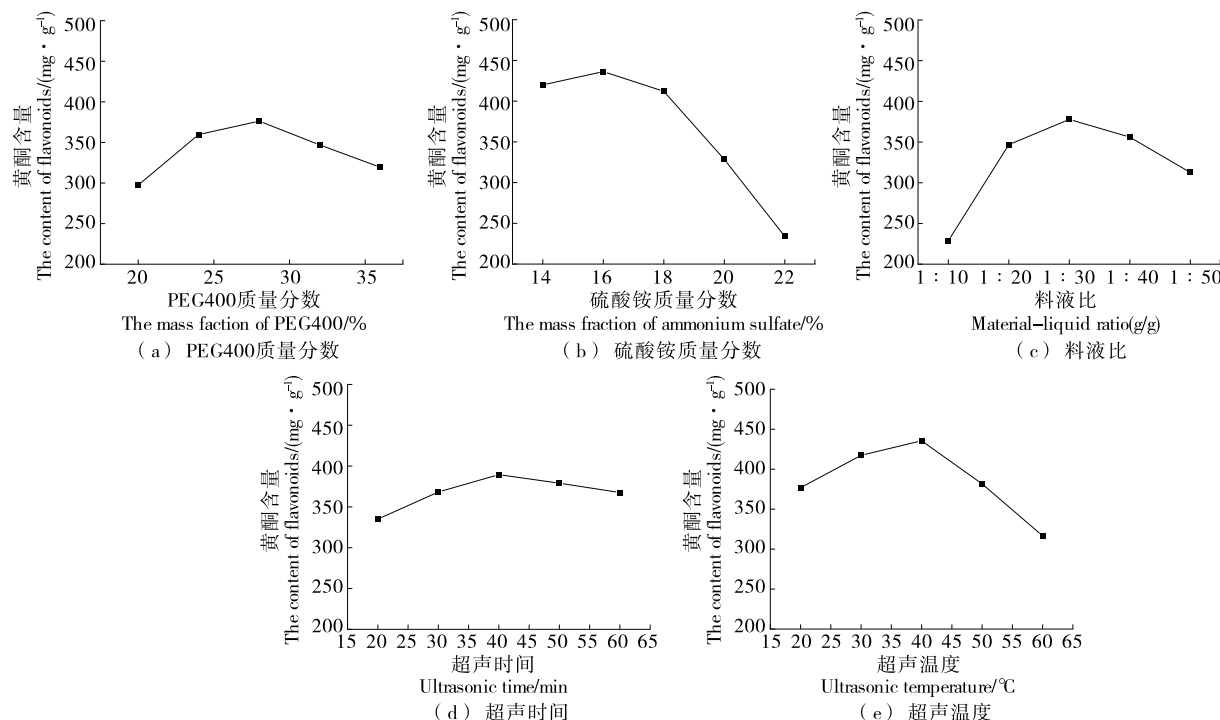


图3 各单因素对枸杞叶黄酮提取液总黄酮含量的影响

Figure 3 Effects of different single factors on the total flavonoid content of Goji leaf flavonoid extract

2.3 枸杞叶黄酮的最佳提取条件与验证实验

在单因素试验的基础上,设计12组PB试验对PEG400质量分数、硫酸铵的质量分数、料液比、超声时

间、超声温度5个影响枸杞叶中总黄酮含量的显著性因素进行考察,每个因素设计3个水平。PB试验因素水平及结果分别见表1和表2。

表1 PB试验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of PB experiments

水平	A PEG400质量分数/%	B 硫酸铵质量分数/%	C 料液比(g/g)	D 超声时间/min	E 超声温度/ $^{\circ}\text{C}$
-1	24	14	1:20	30	30
0	28	16	1:30	40	40
1	32	18	1:40	50	50

由表3可知,模型具有极显著性($P<0.01$),即此PB模型可用于枸杞叶中总黄酮含量的显著性因素优化分析,其中Adj R-Square $Y=0.9570$ 、R-Square $Y=0.9220$ 较相似,表明此试验模型拟合度结果较好。从 P 值可以看出,PEG400、硫酸铵对枸杞叶总黄酮含量的影响极显著($P<0.01$)、料液比对枸杞叶中黄酮含量的影响显著($P<0.05$),故将PEG400质量分数、硫酸铵质量分数、料液比

3个单因素作为响应面的试验因素。

基于单因素试验和PB试验结果,固定超声时间为 40 min 、超声温度为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,分别设置不同的PEG400质量分数、硫酸铵质量分数、料液比进行试验。响应面试验设计因素水平结果分别见表4和表5。

使用Design-Expert 8.0.6软件对试验数据进行多元回归分析,并将每个自变量及其相关响应拟合为二阶多

表 2 PB 试验设计方案及结果

Table 2 The design plan and results of PB experiments						
序列号	A	B	C	D	E	黄酮含量/ (mg•g ⁻¹)
1	-1	-1	-1	1	-1	436.70±4.55
2	1	-1	1	1	1	493.13±6.31
3	-1	-1	1	-1	1	485.52±5.55
4	1	-1	-1	-1	1	495.24±6.14
5	1	1	1	-1	-1	470.24±3.53
6	-1	1	1	-1	1	443.14±3.52
7	1	1	-1	-1	-1	450.14±1.97
8	-1	1	-1	1	1	423.88±8.38
9	1	-1	1	1	-1	496.57±1.10
10	-1	1	1	1	-1	442.99±4.15
11	-1	-1	-1	-1	-1	475.27±1.81
12	1	1	-1	1	1	450.16±2.56

表 3 PB 试验结果显著性分析[†]

Table 3 Significance analysis of PB test results						
误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著值
模型	6 571.34	5	1 314.27	14.18	0.002 8	**
A	1 825.07	1	1 825.07	19.70	0.004 4	**
B	3 396.14	1	3 396.14	36.65	0.000 9	**
C	836.72	1	836.72	9.03	0.023 5	*
D	482.79	1	482.79	5.21	0.062 6	
E	30.63	1	30.63	0.33	0.586 2	

[†] *表示模型具有显著性($P<0.05$);**表示模型具有极显著性($P<0.01$)。

表 4 响应面试验设计因素水平表

Table 4 Factors of response surface test design			
水平	A PEG400 质量 分数/%	B 硫酸铵质量 分/%	C 料液比 (g/g)
-1	24	14	1:20
0	28	16	1:30
1	32	18	1:40

项式函数,所得模型:

$$Y=485.32+15.09A+10.30B+4.36C+8.82AB-0.63AC+9.99BC-29.59A^2-38.09B^2-36.96C^2。$$
 (2)

通过方差分析(ANOVA)响应面二次多项式模型的显著性, F 值为 244.15, $P<0.01$ 极显著,表明回归模型可用于枸杞叶中黄酮类化合物的提取。相关系数(R^2)、调整相关系数(Adj- R^2)和预测相关系数(Pred- R^2)分别为 0.996 8、0.992 7 和 0.965 0,均 >0.900 0,变异系数为 0.63%,Adeq Precision(精确度)为 38.112,远大于 4,说明该模型拟合良好,且回归模型的真实值和测量值之间相

表 5 响应面试验设计及结果

Table 5 The design and results of response surface experiments					
试验号	A	B	C	黄酮含量/(mg•g ⁻¹)	
1	1	0	-1	428.88±6.54	
2	-1	1	0	409.63±2.05	
3	0	1	-1	406.30±2.19	
4	-1	-1	0	409.91±5.97	
5	0	0	0	485.62±2.89	
6	0	0	0	482.59±9.95	
7	-1	0	1	405.92±9.57	
8	0	0	0	484.41±8.19	
9	1	-1	0	440.00±3.01	
10	0	1	1	438.07±3.97	
11	0	-1	1	403.66±11.72	
12	0	0	0	485.47±9.75	
13	-1	0	-1	415.02±4.93	
14	0	-1	-1	422.45±9.74	
15	1	0	1	450.27±6.76	
16	1	1	0	443.02±1.75	
17	0	0	0	488.50±1.04	

关性较高,对试验有较高显著性。由表 6 可知,模型中的 A、B、C 对枸杞叶提取液总黄酮含量的影响差异显著($P<0.05$),回归模型极显著($P<0.01$),失拟项 $P=0.195\ 7>0.05$,不显著。以上结果均表明,试验中研究的 3 个因素具有合理性和显著性,该模型可用于分析和预测

表 6 响应面试验结果显著性分析

Table 6 Significance analysis of the response surface experiment results						
误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著值
模型	16 859.43	9	1 873.27	244.15	$<0.000\ 1$	**
A	1 851.12	1	1 851.12	241.27	$<0.000\ 1$	**
B	57.26	1	57.26	7.46	0.029 3	*
C	77.28	1	77.28	10.07	0.015 6	*
AB	2.72	1	2.72	0.35	0.570 5	
AC	232.49	1	232.49	30.30	0.000 9	**
BC	649.03	1	649.03	84.59	$<0.000\ 1$	**
A ²	2 865.40	1	2 865.40	373.46	$<0.000\ 1$	**
B ²	4 750.19	1	4 750.19	619.12	$<0.000\ 1$	**
C ²	4 927.17	1	4 927.17	642.18	$<0.000\ 1$	**
失拟项	35.17	3	11.72	2.53	0.195 7	不显著
残差	53.71	7	7.67			
纯误差	18.53	4	4.63			
总和	16 913.14	16				

枸杞叶黄酮的提取工艺,且影响枸杞叶黄酮提取液总黄酮含量的因素由高到低为PEG400质量分数>料液比>硫酸铵质量分数。

3D响应面反映了两个单因素之间的交互影响作用程

度,曲面弯曲程度越高,证明影响程度越显著^[13]。如图4所示,所有的响应面图均呈降落伞形状,其中BC、AC之间即PEG400质量分数与料液比、硫酸铵质量分数与料液比的相互作用对提取液的总黄酮含量具有极显著影响。

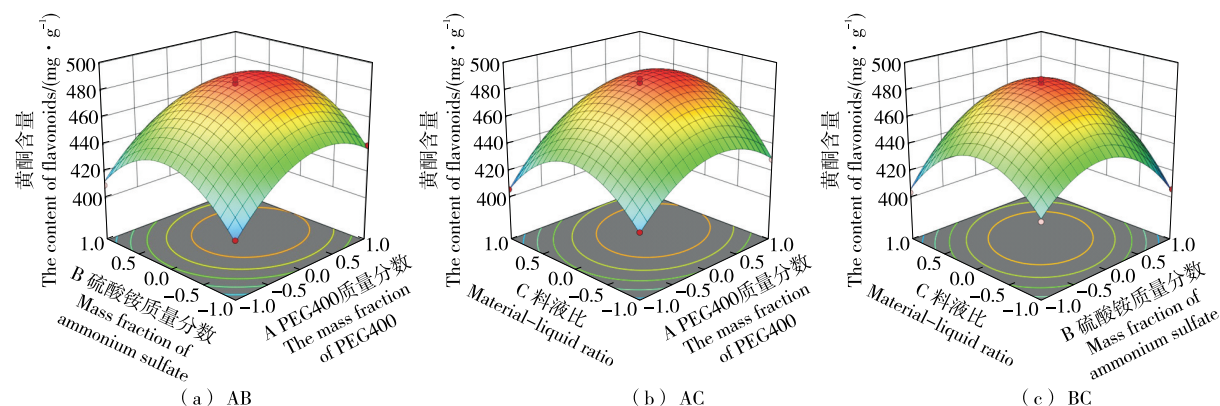


图4 各因素的交互作用对枸杞叶总黄酮含量的影响

Figure 4 Effects of interaction of various factors on the content of total flavonoids in *L. barbarum* leaves

根据响应面试验结果,得到枸杞叶黄酮的最佳提取条件为:PEG400质量分数28%、硫酸铵质量分数16%、料液比1:30(g/g)、超声温度40℃、超声时间40min。在此条件下,枸杞叶黄酮提取液的总黄酮含量预测值为485.3 mg/g,而3次验证实验的总黄酮含量为(486.3±3.29) mg/g,验证结果接近模型预测值,表明优化得到的工艺条件适用于超声波辅助双水相法提取枸杞叶黄酮。与热乙醇提取法^[7]相比,该工艺确定的提取工艺得到了总黄酮含量更高的枸杞叶黄酮提取物。

2.4 枸杞叶黄酮提取物对胰脂肪酶抑制作用类型的判断

由图5可知,随着枸杞叶黄酮质量浓度的增大,枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制率也逐渐增大。在枸杞叶黄酮提取物质量浓度0~1.2 mg/mL的范围内,得到多元回归拟合方程 $Y = -21.897x^2 + 76.853x - 1.8734$,枸杞叶黄酮提取物对胰脂肪酶的 IC_{50} 为1.06 mg/mL。奥利司他质量浓度在0~1.2 mg/mL范围内,其 IC_{50} 为0.625 mg/mL(见图6)。高畅等^[14]报道,桑叶黄酮粗提取物对胰脂肪酶的 IC_{50} 为1.94 mg/mL,抑制作用类型属于非竞争性抑制;费子璇等^[15]报道,刺玫果总黄酮对胰脂肪酶的 IC_{50} 值为0.659 mg/mL,属于非竞争性抑制;王远等^[16]报道,纯化后的辣木叶黄酮对胰脂肪酶的 IC_{50} 为0.94 mg/mL,测定其属于非竞争性抑制;范金波等^[17]报道,沙棘叶黄酮抗胰脂肪酶的 IC_{50} 值为(1.01±0.08) mg/mL,山楂叶黄酮的 IC_{50} 为(1.14±0.05) mg/mL。对比可知,枸杞叶黄酮抑制胰脂肪酶的效果虽比不上奥利司他,但优于大多数已报道的植物叶、果的黄酮提取物。且奥利司他对于胰脂肪酶活性抑制效果很好,但对人体胃肠部位有较大刺激性副作用,不适用于高血脂群体长期服用。枸杞叶黄酮作为

天然活性产物,其总黄酮经进一步提取纯化后,具有开发为新型功能性食品和医药品的潜力。

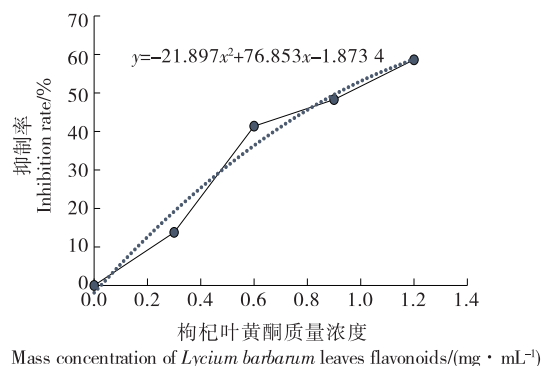


图5 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用

Figure 5 Inhibitory effects of *L. barbarum* leaf flavonoids on pancreatic lipase

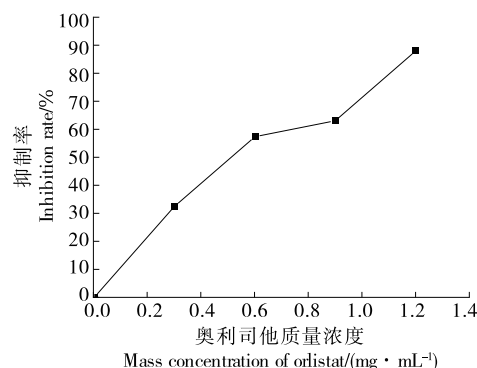


图6 奥利司他对胰脂肪酶的抑制作用

Figure 6 Inhibitory effects of orlistat on pancreatic lipase

如图 7 所示,有抑制剂组和无抑制剂组拟合得到的反应速率曲线基本都通过原点,当枸杞叶黄酮类化合物与酶蛋白的活性部位结合时,对酶蛋白的抑制类型为竞争性抑制;与其非活性部位结合,抑制类型为非竞争性抑制^[18]。在反应体系中有抑制剂(枸杞叶黄酮质量浓度为 1 mg/mL)存在时,曲线斜率明显降低,其速率直线通过原点,因此推断枸杞叶黄酮作为抑制剂对胰脂肪酶的抑制作用类型为可逆性抑制,即枸杞叶黄酮与胰脂肪酶的作用形式为可逆性结合,可导致胰脂肪酶的作用效果降低,酶丧失活性或活力降低,最终影响胰脂肪酶的催化效果。

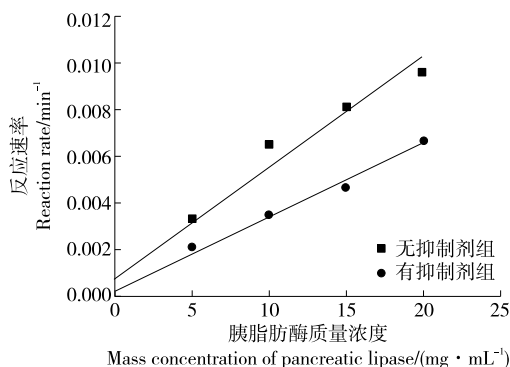


图 7 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用类型

Figure 7 Types of inhibitory effects of *L. barbarum* leaf flavonoids on pancreatic lipase

枸杞叶黄酮提取物的抑制胰脂肪酶的双倒数 Lineweaver-Burk 曲线如图 8 所示。当枸杞叶黄酮质量浓度为 0.5~1.0 mg/mL 时,抑制胰脂肪酶的双倒数曲线图交于第三象限,表明枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用为典型的非竞争性抑制和反竞争性抑制的混合型抑制,枸杞叶黄酮提取物可通过氢键、疏水作用等作用力与胰脂肪酶的活性中心结合,也可与胰脂肪酶与底物的复合物结合,从而抑制酶的活性。

3 结论

研究优化了超声波辅助双水相法提取枸杞叶黄酮类化合物的工艺条件,其最佳提取工艺为聚乙二醇质量分数 28%、硫酸铵质量分数 16%、料液比 1:30 (g/g)、超声时间 40 min、超声温度 40 ℃、超声功率 250 W。该条件下提取的枸杞叶黄酮提取物的总黄酮含量达到(486.30±3.29) mg/g。通过枸杞叶总黄酮对胰脂肪酶抑制作用及类型的研究发现:所得产物对胰脂肪酶具有显著的抑制活性,半数抑制质量浓度为 1.06 mg/mL,其抑制类型为非竞争性抑制和反竞争性抑制的混合型抑制,枸杞叶黄酮有望作为潜在的降血糖和降血脂的绿色功能性食品原料或配料加以应用。今后研究中可通过体外细胞模型或体

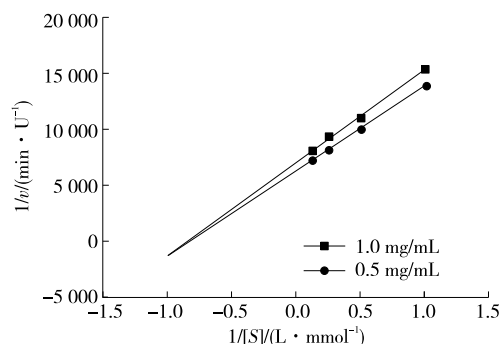


图 8 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的可逆抑制 Lineweaver-Burk 曲线

Figure 8 Lineweaver-Burk curve of reversible inhibition of *L. barbarum* leaves flavonoids on pancreatic lipase

内动物模型进一步解析枸杞叶黄酮提取物的血糖和血脂调控作用及其深入机理,为枸杞叶的营养物质挖掘与深加工利用提供研究参考。

参考文献

- [1] 李佳佳,任钢,徐志标,等.不同品种枸杞叶片营养成分的区域化差异[J].食品与发酵工业,2021,47(18):59-64.
LI J J, REN G, XU Z B, et al. Regional variation on leaves nutrient composition of different *Lycium barbarum* varieties[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 59-64.
- [2] ZHAO X Q. Analysis of phenolic acids and flavonoids in leaves of *Lycium barbarum* from different habitats by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry[J]. Biomedical Chromatography: BMC, 2019, 33(8): 654-700.
- [3] 刘赛,杨孟可,李叶林,等.不同产地枸杞叶片多糖、总黄酮和总酚含量差异比较分析[J].中国中药杂志,2019,44(9):1774-1780.
LIU S, YANG M K, LI Y L, et al. Variance analysis on polysaccharide, total flavonoids and total phenols of *Lycium barbarum* leaves from different production areas[J]. China Journal of Chinese Material Medica, 2019, 44(9): 1774-1780.
- [4] 曾祥林,何颂华,黄晓东,等.HPLC-MS/MS检测中药制剂及保健食品中添加6种减肥药物的研究[J].中国药理学杂志,2009,44(17):1339-1342.
ZENG X L, HE S H, HUANG X D, et al. Identification of six anti-obesity chemical drugs added into traditional Chinese medicines and health foods by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry method[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2009, 44(17): 1339-1342.
- [5] NIU Y H, LIAO J L, ZHOU H T, et al. Flavonoids from *Lycium barbarum* leaves exhibit anti-aging effects through the redox-modulation[J]. Molecules, 2022, 27: 4952.

- [6] 韩成云, 赵志刚, 邹磊. 响应面法优化徽州大菊总黄酮提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(13): 35-39.
HAN C Y, ZHAO Z G, ZOU L. Optimization of extraction for flavonoids from Huizhou chrysanthemum by response surface method[J]. Food Research and Development, 2016, 37(13): 35-39.
- [7] 王薇, 蔡健. 桂花总黄酮的提取工艺[J]. 广州食品工业科技, 2004(2): 53-54.
WANG W, CAI J. Extraction technology of total flavones from osmanthus flower[J]. Modern Food Science and Technology, 2004(2): 53-54.
- [8] 黄磊磊, 刘佳怡, 王天怡, 等. 纤维素酶辅助超声提取丁香叶黄酮工艺优化及抗氧化性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(4): 161-170.
HANG L L, LIU J Y, WANG T Y, et al. Optimization of cellulase-assisted ultrasound extraction and antioxidant analysis of flavonoids from syringa oblata leaves[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(4): 161-170.
- [9] 范艳丽, 韩丽娜, 孟雪梅, 等. 枸杞叶黄酮提取物的组成及初步结构表征[J]. 食品工业科技, 2017, 38(14): 46-50.
FAN Y L, HAN L N, MENG X M, et al. Composition analysis and preliminary structural characterization of the flavonoids from *Lycium barbarum* leaves[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(14): 46-50.
- [10] 段志航, 赵彩云, 代博, 等. 紫色姜总黄酮提取工艺优化及其抗氧化作用研究[J]. 食品工业, 2023, 44(10): 30-36.
DUAN Z H, ZHAO C Y, DAI B, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Zingiber montanum* and study on its antioxidant effect[J]. The Food Industry, 2023, 44(10): 30-36.
- [11] 谭志坚. 双水相萃取体系在分离纯化芦荟活性成分中的应用研究[D]. 长沙: 中南大学, 2013: 33-35.
TAN Z J. Separation and purification of the active ingredients in *Aloe Vera* L. using aqueous two-phase system[D]. Changsha: Central South University, 2013: 32-35.
- [12] 廖家乐, 方甜, 范艳丽. 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶活性的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(5): 43-53.
LIAO J L, FANG T, FAN Y L. Inhibitory effects of *Lycium barbarum* leaves flavonoids on pancreatic lipase activity[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(5): 43-53.
- [13] MARCO G V, RAJAURIA G, TIWARI B, et al. Extraction and yield optimisation of fucose, glucans and associated antioxidant activities from *Laminaria digitata* by applying response surface methodology to high intensity ultrasound-assisted extraction[J]. Marine Drugs, 2018, 16(8): 67-91.
- [14] 高畅, 胡利, 迟原龙, 等. 桑叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用[J]. 食品科技, 2017, 42(5): 194-198.
GAO C, HU L, CHI Y L, et al. Inhibitory effect of flavonoids from mulberry leaves on pancreatic lipase[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(5): 194-198.
- [15] 费子璇, 周慧宁, 张萌, 等. 刺玫果总黄酮提取工艺优化及抑制脂肪酶活性研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(7): 64-70.
FEI Z X, ZHOU H N, ZHANG M, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Rosa davurica* Pall. and its inhibition of lipase activity[J]. China Condiment, 2022, 47(7): 64-70.
- [16] 王远, 郑雯, 蔡珺珺, 等. 辣木叶黄酮结构分析及其对胰脂肪酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 31-37.
WANG Y, ZHENG W, CAI J J, et al. Structural analysis and anti-pancreatic lipase activity of flavonoids from *Moringa oleifera* Lam. leaves[J]. Food Science, 2018, 39(2): 31-37.
- [17] 范金波, 丁瑞文, 葛春辉, 等. 三种天然来源黄酮物质抗氧化活性和抑制胰脂肪酶活性的研究[J]. 包装与食品机械, 2017, 35(5): 15-20.
FAN J B, DING R W, GE C H, et al. Antioxidant activity and inhibition pancreatic lipase activity of three kinds of natural flavonoids[J]. Packaging and Food Machinery, 2017, 35(5): 15-20.
- [18] 关媛, 王雪盈, 孙媛媛, 等. 鸡血藤提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(7): 126-132.
GUAN Y, WANG X Y, SUN Y Y, et al. α -Amylase and α -glycosidase inhibitory activities of the extracts from *spatholobus suberectus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(7): 126-132.

(上接第 143 页)

- [27] ABD RAZAK D L, ABD RASHID N Y, JAMALUDDIN A, et al. Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015, 4(1): 33-38.
- [28] GE X, SALEHAS M, JING L, et al. Germination and drying induced changes in the composition and content of phenolic compounds in naked barley[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 95: 103594.
- [29] WANG H, CHEN G, FU X, et al. Effects of aging on the phytochemical profile and antioxidative activity of *Pericarpium Citri Reticulatae* 'Chachiensis'[J]. RSC Advances, 2016(107): 105272.
- [30] BEI Q, LIU Y, WANG L, et al. Improving free, conjugated, and bound phenolic fractions in fermented oats (*Avena sativa* L.) with *Monascus anka* and their antioxidant activity[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 185-194.
- [31] 徐艳平. 复合酶解法与固态发酵法研制新型牛蒡茶[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022: 35-43.
XU Y P. Development of a new type of burdock tea by combining enzymatic digestion and solid-state fermentation [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2022: 35-43.