

林宝妹, 邱珊莲, 郑开斌, 等. 嘉宝果叶片总多酚提取工艺优化及其体外降糖活性 [J]. 福建农业学报, 2019, 34 (5): 587—594.
LIN B M, QIU S L, ZHENG K B, et al. Process Optimization and *in vitro* Hypoglycemic Effect of Polyphenols Extracted from Jaboticaba Leaves [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 34 (5): 587—594.

嘉宝果叶片总多酚提取工艺优化及其体外降糖活性

林宝妹, 邱珊莲*, 郑开斌, 张 帅, 洪佳敏, 张少平

(福建省农业科学院亚热带农业研究所, 福建 漳州 363005)

摘 要:【目的】优化嘉宝果叶片总多酚的提取工艺, 检测优化提取后的嘉宝果叶片提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。【方法】利用超声波辅助与乙醇提取相结合的方法, 以总多酚提取量为考察指标, 采用单因素及正交试验, 研究功率、时间、乙醇体积分数、料液比和温度对嘉宝果叶片总多酚提取量的影响, 并采用酶动力学及紫外可见吸收光谱法探讨叶片提取物体外抑制 α -葡萄糖苷酶的活性。【结果】嘉宝果叶片总多酚的最佳提取工艺为: 功率 120 W, 时间 10 min, 乙醇体积分数 40%, 料液比 1:160 (g:mL), 温度 40℃, 在此条件下, 嘉宝果叶片总多酚质量分数可达 33.84%。优化提取后的嘉宝果叶片提取物对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制作用, 半数抑制浓度 IC_{50} 为 $0.0031 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的半数抑制浓度 IC_{50} 为 $8.1108 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; Lineweaver-Burk 双倒数作图显示嘉宝果叶片多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型为反竞争性抑制。【结论】正交实验法优化嘉宝果叶片总多酚提取具有可行性, 嘉宝果叶片总多酚对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制作用, 可作为降血糖功能因子进行开发利用。

关键词: 嘉宝果; 多酚; α -葡萄糖苷酶; 正交试验

中图分类号: Q 946.8

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2019) 05—587—08

Process Optimization and *in vitro* Hypoglycemic Effect of Polyphenols Extracted from Jaboticaba Leaves

LIN Bao-mei, QIU Shan-lian*, ZHENG Kai-bin, ZHANG Shuai, HONG Jia-min, ZHANG Shao-ping

(Institute of Subtropical Agriculture, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005, China)

Abstract: 【Objective】To optimize the polyphenol extraction from leaves of jaboticaba and determine the α -glucosidase inhibition by the extract. 【Method】The ethanol extraction with ultrasound application was optimized by an orthogonal experiment. Effects of the power and time of ultrasonic application as well as the ethanol volume fraction, material-solvent ratio, and processing temperature on the total polyphenols extracted from the leaves were analyzed. The inhibition on α -glucosidase activity by the extract was determined *in vitro* by an enzyme kinetic study and uv-vis absorption spectrometry. 【Result】The optimal extraction conditions included the use of 120 W ultrasonic wave for 10 min, 40% ethanol volume fraction, 1:160 (g:mL) material-solvent ratio, and 40℃ processing temperature to achieve a polyphenol extraction rate of 33.84%. The α -glucosidase activity was significantly inhibited by the extract with a low IC_{50} of $0.0031 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, as compared to IC_{50} of $8.1108 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ on acarbose. The kinetic study by the Lineweaver-Burk plot showed that the polyphenol extract was an anti-competitive inhibitor of α -glucosidase. 【Conclusion】The polyphenol extract from jaboticaba leaves significantly inhibited α -glucosidase and could be explored for use as a hypoglycemic agent.

Key words: Jaboticaba; polyphenol; α -glucosidase; orthogonal test

0 引言

【研究意义】糖尿病是一类高发病率的内分泌

紊乱性疾病, 以高血糖、糖尿和负氮平衡为特征, 包括 I 型糖尿病和 II 型糖尿病。II 型糖尿病在糖尿病中占 95% 左右, 其治疗策略一直是世界范围内

收稿日期: 2018—12—25 初稿; 2019—03—12 修改稿

作者简介: 林宝妹 (1988—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 天然产物化学 (E-mail: yogobm@qq.com)

* 通讯作者: 邱珊莲 (1979—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然产物化学 (E-mail: slqiu79@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2018R1024-6); 福建省农业科学院科技创新项目 (PC2018-9); 福建省农业科学院青年英才计划项目 (YC2015-19); 福建省农业科学院青年创新团队项目 (STIT2017-3-4); 福建省农业科学院生产性工程化实验室中试项目 (AG2017-5)

的研究热点。 α -葡萄糖苷酶是 II 型糖尿病治疗的靶点之一, α -葡萄糖苷酶抑制剂作为一种有效的糖尿病治疗药物已上市多年, 如阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇等, 但长期摄入化学合成的 α -葡萄糖苷酶抑制剂具有明显的胃肠道不良反应^[1]。因此, 研发高效、低毒或无毒的 α -葡萄糖苷酶抑制剂成为糖尿病治疗药物研发的重要方向之一。【前人研究进展】植物多酚是一类活性较强的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 但酚类化合物种类繁多, 不同的酚类提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性及抑制作用方式存在显著差异^[2-4], 因此, 在开发利用酚类 α -葡萄糖苷酶抑制剂时有必要先探讨其与 α -葡萄糖苷酶的构效关系。嘉宝果 *Myrciaria cauliflora* 又名树葡萄、珍宝果, 为桃金娘科拟爱神木属热带亚热带常绿灌木, 一年四季均可开花、结果。嘉宝果枝繁叶茂, 四季常绿, 叶对生, 深绿有光泽, 新叶淡红色。本课题组前期通过浸提的方法获取多酚, 发现嘉宝果植株各部位(根、茎、叶、果皮等)中以嘉宝果叶片醇提取物的总多酚含量最高、清除自由基能力和体外降糖效果最强, 且叶片总多酚含量与 α -葡萄糖苷酶抑制活性存在显著正相关性, 提高提取物中总多酚含量可增强对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性^[5-6]。【本研究切入点】关于嘉宝果叶片总多酚提取工艺优化及其对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的相关机制研究目前尚未见报道。【拟解决的关键问题】为高效获取嘉宝果叶片多酚, 本文采用正交试验设计, 通过超声波辅助与乙醇提取相结合的方法对嘉宝果叶片总多酚的提取工艺进行优化, 并测定其体外抑制 α -葡萄糖苷酶活性及抑制作用方式, 为嘉宝果叶片多酚类化合物的开发利用提供参考。

1 材料与方 法

试验于 2018 年 6~12 月在福建省农业科学院亚热带农业研究所生理生化实验室内进行。

1.1 试验材料

1.1.1 材料与试剂 嘉宝果叶片: 采自福建龙海市惠昌树葡萄专业合作社, 供试嘉宝果品种为‘沙巴’。随机选取 9 株树龄为 15 a 的健康植株剪取嫩叶。嫩叶位于枝条顶部, 质地柔嫩且叶脉不清晰, 颜色嫩绿或淡红。

标准品没食子酸、阿卡波糖、4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG): 纯度>98%, 日本东京化成工业株式会社; Folin-Ciocalteu 试剂: 分析纯, 美国 Sigma 公司; α -葡萄糖苷酶: G0660-750UN, 美国 Sigma 公司; 无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、

氢氧化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、碳酸钠: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备 紫外可见分光光度计: L5S 型, 上海仪电分析仪器有限公司; 酶标仪: iMARK, 美国伯乐; 超纯水机: UPW-20N 型, 北京历元电子仪器有限公司; 分析天平: BS110S 型, 德国 Sartorius 集团; 水浴锅: HH·S21-8-S 型, 上海新苗医疗器械制造有限公司; 粉碎机: WBL2521H 型, 佛山美的集团; 数控超声波清洗仪: KQ-300DE, 昆山市超声仪器有限公司; 冷冻高速离心机: MIKRO-22R, 德国 Hettich。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理 将采集的嘉宝果嫩叶烘干至恒质量后用粉碎机粉碎 40 s ($28\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 再过 40 目筛, 称取适量粉末按照 1.2.3 单因素试验设计和 1.2.4 正交试验设计方案进行提取, 提取液采用冷冻高速离心机离心 15 min ($6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液, 待测。

1.2.2 总多酚含量的测定 总多酚含量的测定采用福林酚法^[5], 并稍作修改, 具体如下: 以没食子酸为标准品, 精确称取没食子酸标准品 0.2000 g, 超纯水定容至 100 mL。加水稀释得质量浓度为 0.010、0.100、0.200、0.300、0.400、0.500、0.600、0.700 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标液, 取 0.1 mL 标液, 加入 0.1 mL $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Folin-Ciocalteu 试剂和 2.8 mL 水, 摇匀, 静置 8 min 后加入 2 mL $75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液, 摇匀, 室温下密封避光 2 h, 于 765 nm 处测其吸光度值, 平行测定 3 次。以吸光度值为纵坐标 y ($A_{765\text{nm}}$), 没食子酸标液质量浓度为横坐标 x , 绘制标准曲线。绘制标准曲线得回归方程为: $y = 1.7577x + 0.0578$ ($R^2 = 0.9933$)。取各提取液按照如上方法测定, 不同提取液中总多酚含量用每克干燥叶片中所含没食子酸(GAE)的质量分数进行计算, 单位为%。

1.2.3 单因素试验设计 采用不同的功率、时间、乙醇体积分数、料液比和温度进行单因素试验。按照 1.2.2 测定总多酚含量的方法, 计算嘉宝果叶片中总多酚的提取量。

(1) 功率: 固定乙醇体积分数 40%、时间 10 min、料液比 1:50 ($\text{g}:\text{mL}$)、温度 30℃, 考察功率(120、150、180、210、240、270 W)对总多酚提取量的影响。

(2) 时间: 固定功率 120W、乙醇体积分数 40%、料液比 1:50 ($\text{g}:\text{mL}$)、温度 30℃, 考察时间(10、20、30、40、50、60 min)对总多酚提

取量的影响。

(3) 乙醇体积分数：固定功率 120 W、时间 10 min、料液比 1 : 50 (g : mL)、温度 30℃，考察乙醇体积分数 (0、20、40、60、80、100%) 对总多酚提取量的影响。

(4) 料液比：固定功率 120 W、时间 10 min、乙醇体积分数 40%、温度 30℃，考察料液比 1 : 40、1 : 80、1 : 120、1 : 160、1 : 200、1 : 240 (g : mL) 对总多酚提取量的影响。

(5) 温度：固定功率 120 W、时间 10 min、料液比 1 : 160 (g : mL)、乙醇体积分数 40%，考察温度 (20、30、40、50、60℃) 对总多酚提取量的影响。

1.2.4 正交试验设计 在单因素试验的基础上，固定功率 120 W、时间 10 min，选择乙醇体积分数、料液比、温度等对总多酚提取影响较大的 3 个因素，以 $L_9(3^4)$ 正交试验确定嘉宝果叶片总多酚提取的最佳工艺条件。正交试验因素水平见表 1。提取后采用 1.2.2 方法测定总多酚含量。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	乙醇体积分数 Ethanol volume fraction/%	料液比 Material-solvent ratio/(g : mL)	温度 Temperature /℃
1	20	1 : 120	20
2	40	1 : 160	30
3	60	1 : 200	40

1.2.5 嘉宝果叶片总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 参照 Jirapast Sichaem 等^[7] 的方法并稍作修改，具体如下：采用 0.05 mmol · L⁻¹ pH 6.8 的 PBS 缓冲液配置 0.4 U · mL⁻¹ 的 α -葡萄糖苷酶，0.2 mmol · L⁻¹ pH 6.8 的 PBS 缓冲液配置 3.0 mmol · L⁻¹ PNPG。在 96 孔板中先加 10 μ L 样品和 10 μ L α -葡萄糖苷酶，混匀后，于 37℃ 温箱中孵育 10 min，然后加入 50 μ L PNPG 继续孵育 20 min，最后加入 100 μ L 0.2 mol · L⁻¹ Na₂CO₃ 终止反应，在酶标仪上测定其在 405 nm 波长处的吸光度，平行测定 3 次。IC₅₀ 为酶活性被抑制 50% 时的抑制剂浓度。按照公式 (1) 计算 α -葡萄糖苷酶活性抑制率：

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶活性抑制率}/\% = \left[\frac{A_0 - (A_1 - A_3)}{A_0 - A_2} \right] \times 100\% \quad (1)$$

式中 A_1 和 A_0 分别为加或不加抑制剂时的吸光

度值， A_2 为溶剂本底吸光度值， A_3 为抑制剂溶液本底吸光度值。

1.2.6 嘉宝果叶片总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用类型 酶抑制剂对酶的抑制作用分为可逆抑制和不可逆抑制，在 4-硝基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG) 浓度不变的情况下，选用不同浓度 (0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 U · mL⁻¹) 的 α -葡萄糖苷酶，嘉宝果叶片多酚提取物质量浓度分别为 0、0.003、0.006 mg · mL⁻¹ 的条件下，测定 α -葡萄糖苷酶酶促反应速率 (V)，平行测定 3 次，对酶促反应速率和酶浓度进行线性拟合。若得到一组相交于原点的直线，则该抑制作用为可逆抑制；若直线未相交于原点，则该抑制作用为不可逆抑制^[8-9]。

1.2.7 酶促动力学研究 酶抑制剂对酶的可逆抑制作用包括竞争性抑制、非竞争性抑制和反竞争性抑制，在 α -葡萄糖苷酶浓度不变的情况下，选用不同浓度 (0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 mmol · L⁻¹) 的 PNPG 为底物 [S]，嘉宝果叶片多酚提取物质量浓度分别为 0、0.003、0.006 mg · mL⁻¹ 的条件下，测定 α -葡萄糖苷酶酶促反应速率 (V)，平行测定 3 次，通过 Lineweaver-Burk 双倒数法，1/V - 1/[S] 作图，对二者进行线性拟合，并按米氏双倒数方程 (2) 计算最大酶促反应速率 V_{\max} 和米氏常数 K_m 。若得到一组相交于 Y 轴的直线， V_{\max} 不变， K_m 增大，则为竞争性抑制；若得到一组相交于 X 轴的直线， V_{\max} 减小， K_m 不变，则为非竞争性抑制；若得到一组平行的直线， V_{\max} 和 K_m 均减小，则为反竞争性抑制^[10]。

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

1.3 数据分析

利用 Excel 软件统计各参数的平均值和标准误差并作图，采用 DPS 软件进行统计检验分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 功率对总多酚提取量的影响 由图 1 可知，功率在 120~270 W，总多酚的提取量随功率的增加未有明显变化。当功率增加至 270 W 时，总多酚提取量反而有所下降。因此，考虑能耗问题，固定提取功率为 120 W。

2.1.2 时间对总多酚提取量的影响 由图 2 可知，超声提取时间在 10~60 min，总多酚的提取量随时间的变化较小，最低提取量为总多酚质量分数

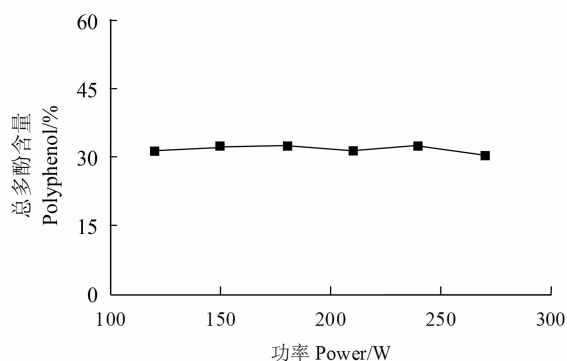


图 1 功率对总多酚提取量的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic wave power on polyphenol extraction

30.60%，最高提取量为总多酚质量分数 31.71%，二者相差较小。因此，考虑到能耗及效率问题，选择固定超声时间 10 min。

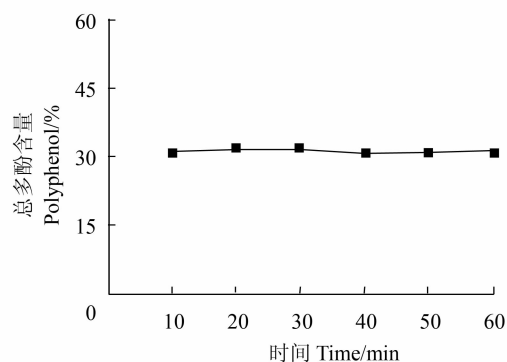


图 2 时间对总多酚提取量的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic wave application duration on polyphenol extraction

2.1.3 乙醇体积分数对总多酚提取量的影响 由图 3 可知，乙醇体积分数在 0~40%，总多酚的提取量随乙醇体积分数的增加而升高。当乙醇体积分数为 40% 时，总多酚提取量达到 29.64%，继续增加乙醇体积分数，提取量反而持续下降。因此，选择 40% 为最佳乙醇体积分数。

2.1.4 料液比对总多酚提取量的影响 结果如图 4 所示，在料液比为 (1:40) ~ (1:160) (g:mL) 时，嘉宝果叶片总多酚提取量随提取溶剂量的增加而增加；当料液比小于 1:160 (g:mL) 时，继续增加提取溶剂量，出现嘉宝果叶片总多酚提取量下降的趋势。因此，选择 1:160 (g:mL) 为最佳料液比。

2.1.5 温度对总多酚提取量的影响 由图 5 可知，在温度 20~30℃，总多酚提取量随温度的升高而升高，提取温度为 30℃ 时，总多酚提取量达最高

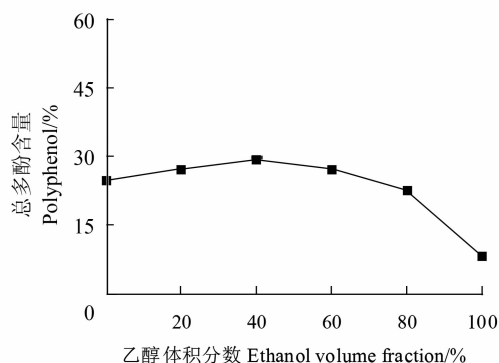


图 3 乙醇体积分数对总多酚提取量的影响

Fig. 3 Effect of ethanol volume fraction on polyphenol extraction

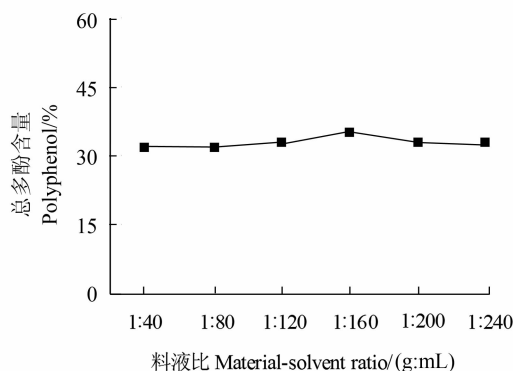


图 4 料液比对总多酚提取量的影响

Fig. 4 Effect of material-solvent ratio on polyphenol extraction

值；当提取温度超过 30℃ 时，总多酚的提取量开始下降；在提取温度 40~50℃，总多酚的提取量变化较小，超过 50℃ 后，提取量又明显降低。因此，选择 30℃ 为最佳超声温度。

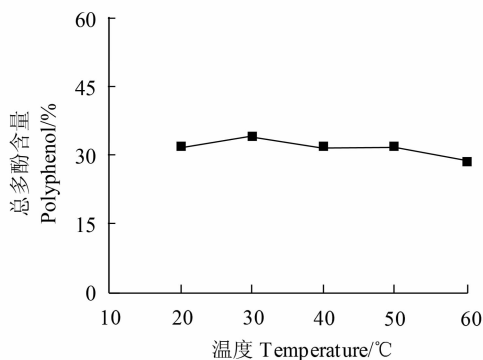


图 5 温度对总多酚提取量的影响

Fig. 5 Effect of processing temperature on polyphenol extraction

2.2 正交试验

从表 2 可知，通过极差分析得出影响嘉宝果叶片总多酚提取量的 3 个因素的主次关系表现为：乙醇体积分数>料液比>温度。为了进一步确定各因素对嘉宝果叶片总多酚提取量的影响，对表 2 结果进行方差分析和显著性检验，结果见表 3。*F* 检验结果表明，正交试验所设 3 个因素中乙醇体积分数和料液比为嘉宝果叶片总多酚提取的显著影响因素。

表 2 正交试验设计与结果
Table 2 Orthogonal design, results and range analysis

试验号 Numbers	因素				总多酚提取量 Total polyphenol /%
	A/%	B/(g : mL)	C/℃	D	
1	1(20)	1(1 : 120)	1(20)	1	30.13
2	1	2(1 : 160)	2(30)	2	31.91
3	1	3(1 : 200)	3(40)	3	31.59
4	2(40)	1	2	3	32.67
5	2	2	3	1	34.52
6	2	3	1	2	34.06
7	3(60)	1	3	2	32.22
8	3	2	1	3	33.14
9	3	3	2	1	33.20
k1	93.63	95.02	97.33	97.85	
k2	101.25	99.57	97.78	98.19	
k3	98.56	98.85	98.33	97.40	
R	7.62	4.55	1.00	0.79	

注：表中因素 A 为乙醇体积分数，B 为液料比，C 为温度，D 为空白。表 3 同。
Note: A. Ethanol volume fraction, B. Material-solvent ratio, C. Temperature, D. Vacant column. The same as table 3.

表 3 正交试验结果方差分析

Table 3 Analysis of variance on results of orthogonal experiment

变异来源 Variations	偏差平方和 Sum of square	自由度 Freedom	F 值 F value	F 临界值 F critical value	P 值 P value
A	9.956	2	94.819	19.000	<0.05
B	3.988	2	37.981	19.000	<0.05
C	0.167	2	1.590	19.000	>0.05
D	0.105	2	1.000	19.000	>0.05
误差 Errors	0.105	2			

从表 2 可见，9 组正交试验中，嘉宝果叶片总多酚提取量最高的提取组合为 A₂B₂C₃D₁，即乙醇体积分数 40%，料液比 1 : 160 (g : mL)，温度 40℃，总多酚提取量为 34.52%，通过极差分析得到的嘉宝果叶片总多酚提取量最佳提取组合为 A₂

B₂C₃D₂，即乙醇体积分数 40%，料液比 1 : 160 (g : mL)，温度 40℃，与正交试验的最高提取组合一致。为验证最佳组合 A₂B₂C₃D₁ 的稳定性，经过 3 次平行试验，总多酚提取量为 (33.84 ± 0.28)%。该提取工艺重复性好，稳定可靠。

2.3 嘉宝果叶片总多酚提取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

由图 6 可知，在试验所设质量浓度范围内，阿卡波糖和嘉宝果叶片总多酚提取物对 α-葡萄糖苷酶均具有一定的抑制作用，且其抑制效果与质量浓度间呈现良好的剂量效应关系，其 IC₅₀ 值分别为 8.110 8、0.003 1 mg · mL⁻¹，嘉宝果叶片多酚提取物对 α-葡萄糖苷酶抑制的 IC₅₀ 值远小于阿卡波糖，说明嘉宝果叶片多酚提取物对 α-葡萄糖苷酶有很强的抑制效果。

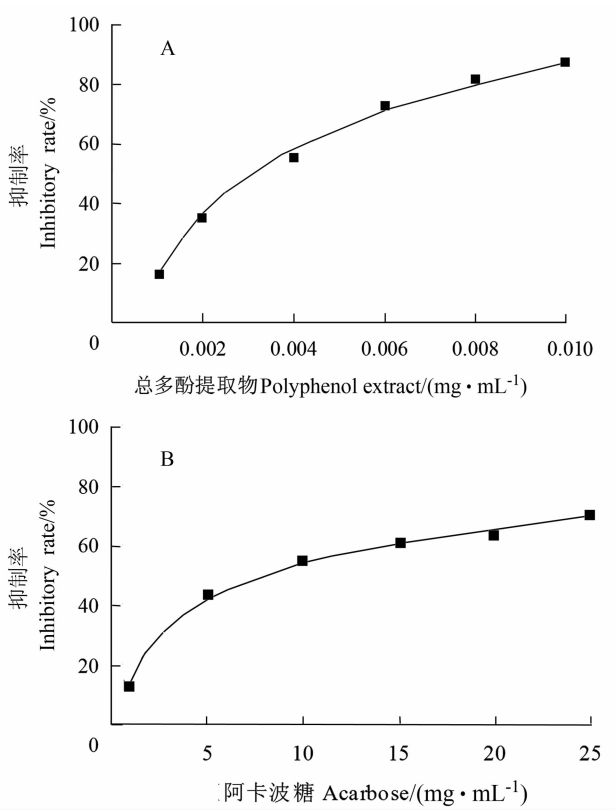


图 6 嘉宝果叶片总多酚提取物 (A) 及阿卡波糖 (B) 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

Fig. 6 Effects of polyphenol extract (A) and acarbose (B) on α-glucosidase

2.4 嘉宝果叶片总多酚提取物对 α-葡萄糖苷酶抑制作用类型

以不同酶浓度与酶促反应速率进行线性拟合，随着嘉宝果叶片总多酚提取物质量浓度的增大，可得到几条不同的直线。如图 7 所示，随着酶浓度的

增加, 酶促反应速率增大, 在试验条件下, 酶浓度与酶促反应速率呈良好的线性关系 ($0.9791 \leq R^2 \leq 0.9939$), 且所有回归方程近似经过原点, 可见嘉宝果叶片总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用类型属于可逆抑制类型。

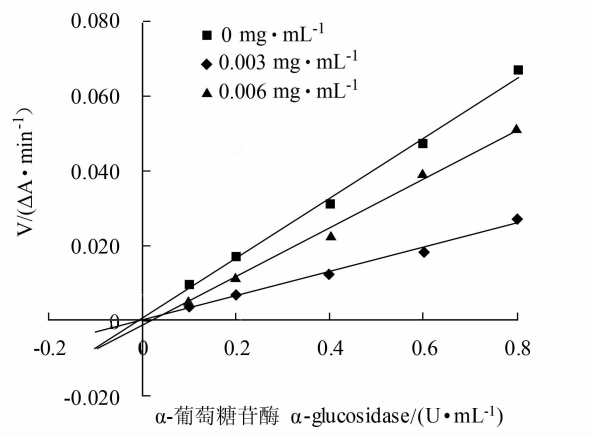


图 7 嘉宝果叶片总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用类型

Fig. 7 Inhibition type of polyphenol extract on α -glucosidase

2.5 嘉宝果叶片总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的动力学分析

固定 α -葡萄糖苷酶浓度, 测定了不同底物浓度 $[S]$ 下酶促反应速率 V , 以 $1/V-1/[S]$ 作图,

得到 α -葡萄糖苷酶在添加或不添加嘉宝果叶片总多酚提取物时的 Lineweaver-Burk 双倒数图, 如图 8 所示, 得到一组近似平行的直线。按照公式 (2) 可计算出不同质量浓度的总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制的米氏常数 K_m 及最大酶促反应速率 V_m , 如表 4 所示, 随着嘉宝果总多酚提取物质量浓度增加, 酶促反应 K_m 、 V_m 值均减小, 可见嘉宝果叶片总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用类型为反竞争性抑制。

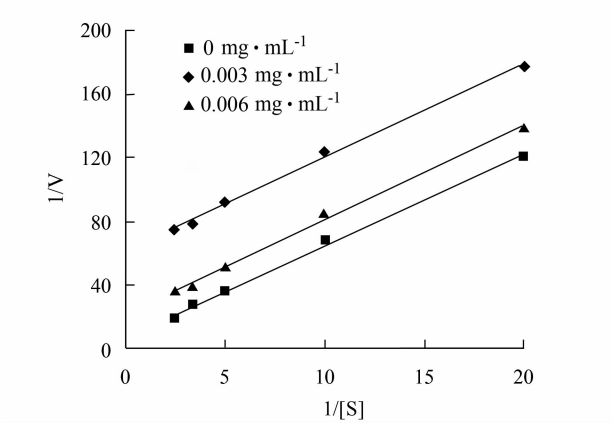


图 8 嘉宝果叶片总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 8 Lineweaver-Burk plot on inhibition of polyphenol extract on α -glucosidase

表 4 嘉宝果总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线方程
Table 4 Lineweaver-Burk plot equation for inhibition of polyphenol extract on α -glucosidase

项目 Items	质量浓度 Mass concentration /(mg · mL ⁻¹)	线性回归方程 Linear regression equation		R ²	V _{max} / (OD · min ⁻¹)	K _m / (mmol · L ⁻¹)
		斜率 Slope	截距 Intercept			
对照组 Contrast	0	5.7203	8.0232	0.9976	0.1246	0.7130
嘉宝果总多酚 Total polyphenol	0.003	5.8844	22.6842	0.9974	0.0441	0.2594
	0.006	5.8105	61.6144	0.9976	0.0162	0.0943

3 讨论与结论

本研究采用超声波辅助、乙醇提取相结合的方法, 探讨了功率、时间、乙醇体积分数、料液比和温度对嘉宝果叶片总多酚提取量的影响。多酚类化合物是植物体内重要的次级代谢产物, 提取植物细胞中的总多酚首先需要破坏细胞结构, 乙醇具有较强的细胞破壁作用, 故选用乙醇作为提取溶剂。结果表明, 乙醇体积分数的变化显著影响总多酚的提取量, 最佳提取工艺中乙醇体积分数为 40%, 提取溶剂含有一定体积的水有利于提取溶剂润湿提取

物, 提高提取溶剂极性、水溶性, 白兰叶 *Michelia alba*、雪莲果叶 *Smallanthus sonchifolius* 和蓝莓叶 *Ericaceae Vaccinium. spp* 等多酚类化合物提取采用的提取溶剂为体积分数 30%~70% 的乙醇水溶液, 都获得最佳提取率^[11-13]。在料液比单因素试验中, 随着提取溶剂量增加, 总多酚不断溶出, 总多酚提取量升高, 继续增加溶剂量, 总多酚提取量反而下降, 这可能是因为提取溶剂量增加可加大细胞内外酚类物质浓度差, 有利于酚类物质由叶片向提取液中扩散, 继续增加提取液用量可能由于提取溶剂量过大, 酚类物质反渗透, 导致提取

量下降。这种变化趋势也存在于龙利叶 *Sauropus rostratus* Miq.、番石榴叶 *Psidium guajava* Linn. 等植物多酚的提取中^[14-15]。嘉宝果总多酚的提取量随温度的升高呈先上升后降低趋势, 并且总多酚最高提取量所对应的提取温度较低, 为 30℃, 笔者推测嘉宝果叶片多酚耐热性较差, 适合在较低温度进行提取, 与圣罗勒叶片 *Ocimum sanctum*、孟加拉榕树叶 *Ficus benghalensis*、黑莓树叶 *Syzigium cumini* 等植物多酚提取相似, 均需在较低温度下进行提取^[16]。功率和时间的变化对嘉宝果嫩叶总多酚提取影响较小。采用优化后的工艺提取嘉宝果叶片总多酚含量可达 33.84%, 比已报道的采用简单浸提方法提取的嘉宝果叶片总多酚含量 273.70 mg·g⁻¹ 高 23.63%^[17]。

α -葡萄糖苷酶抑制剂如阿卡波糖、伏格列波糖等可通过抑制位于消化道的 α -葡萄糖苷酶, 延缓肠道内双糖或多糖分解产生葡萄糖的速度, 改善餐后高血糖。本文通过测定优化提取工艺后的嘉宝果叶片总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及抑制类型评价其体外降糖活性。结果表明, 嘉宝果叶片总多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制活性, 抑制 1U 的 α -葡萄糖苷酶需要嘉宝果干燥叶片 0.016 mg。已报道的采用简单浸提方法, 抑制 1U 的 α -葡萄糖苷酶需要嘉宝果干燥叶片 0.040 mg^[5]。说明与采用简单浸提相比, 采用优化后的工艺提取的嘉宝果叶片提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用更强。酶促反应动力学研究表明, 嘉宝果叶片总多酚对 α -葡萄糖苷酶抑制作用为反竞争性抑制, 即嘉宝果叶片总多酚提取物可与酶-底物复合物结合, 而不与游离酶结合。该结果与石榴皮多酚提取物的纯化物 P-2 及莲子红衣多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用方式一致^[18-19]。而吕欢等^[20]研究发现, 阿卡波糖对酵母源 α -葡萄糖苷酶的抑制作用方式为非竞争性抑制, 说明嘉宝果叶片多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶的作用靶点、酶的修饰作用与阿卡波糖不同。笔者推测嘉宝果总多酚提取物中能够发挥 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用的成分较单一或者是结构相似的一类, 可进一步从结构上进行分析。

本研究以‘沙巴’品种嘉宝果嫩叶为原料, 通过单因素和正交试验, 采用超声波辅助与乙醇提取相结合的方法提取嘉宝果叶片总多酚, 获得嘉宝果叶片多酚的最佳提取工艺为: 功率 120 W, 时间 10 min, 乙醇体积分数 40%, 料液比 1:160 (g:mL), 温度 40℃, 在此条件下, 叶片总多酚的提

取量达到 33.84%。各因素对叶片总多酚提取量的影响作用大小表现为: 乙醇体积分数>料液比>温度, 功率与时间对提取的影响较小。此外, 嘉宝果叶片总多酚提取液具有较强的 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用, 并且其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用方式与阿卡波糖不同, 为反竞争性抑制, 具有辅助降血糖药开发价值。

致谢: 特别感谢福建龙海市惠昌树葡萄专业合作社, 在采样过程中承担了主要的采集工作。

参考文献:

- [1] FA V D L, LUCASSEN P L, AKKERMANS R P, et al. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus: A systematic review [J]. *Chinese Journal of Evidence-Based Medicine*, 2006, 20 (2): 335-350.
- [2] 王占一, 张立华, 王玉海, 等. 超声波辅助纤维素酶提取石榴幼果多酚及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性 [J]. *食品科学*, 2017 (18): 221-228.
WANG Z Y, ZHANG L H, WANG Y H, et al. Optimization of ultrasonic-assisted cellulase-based extraction and anti- α -glucosidase activity of polyphenols from pomegranate fruitlets [J]. *Food Science*, 2017 (18): 221-228. (in Chinese)
- [3] KALITA D, HOLM D G, LABARBERA D V, et al. Inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds [J]. *Plos One*, 2018, 13 (1): 1-21.
- [4] 柳余莉, 杨文康, 刘合生, 等. 杨梅多酚粗提物对 α -葡萄糖苷酶体外抑制作用的研究 [J]. *果树学报*, 2016 (1): 59-65.
LIU Y L, YANG W K, LIU H S, et al. Inhibitory effects of the polyphenol extracts from Chinese bayberry on α -glucosidase in vitro [J]. *Journal of Fruit Science*, 2016 (1): 59-65. (in Chinese)
- [5] 邱珊莲, 林宝妹, 郑开斌, 等. 不同品种树葡萄叶片醇提物抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究 [J]. *果树学报*, 2017, 34 (11): 1450-1457.
QIU S L, LIN B M, ZHENG K B, et al. Antioxidative activity and α -glucosidase inhibitory activity of ethanol extracts of leaves of different cultivars of jaboticaba [J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34 (11): 1450-1457. (in Chinese)
- [6] 邱珊莲, 林宝妹, 洪佳敏, 等. 树葡萄植株不同部位醇提物抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶活性的比较研究 [J]. *果树学报*, 2018, 35 (3): 311-318.
QIU S L, LIN B M, HONG J M, et al. Comparative study of the antioxidant activity and the α -glucosidase inhibitory activity of the ethanol extracts from different parts of jaboticaba plant [J]. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35 (3): 311-318. (in Chinese)
- [7] SICHAE M J, AREE T, LUGSANANGARM K, et al. Identification of highly potent α -glucosidase inhibitory and antioxidant constituents from *Zizyphus rugosa* bark: enzyme kinetic and molecular docking studies with active metabolites

- [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2017, 55 (1): 1436—1441.
- [8] XU Y R, NI J M, MENG Q G, et al. α -glucosidase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2006, 15 (1): 24—27.
- [9] 商文婷, 盛占武, 谷满屯, 等. 香蕉茎秆汁液抑制晚期糖基化终末产物活性评价 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37 (3): 49—53.
- SHANG W T, SHENG Z W, GU M T, et al. Inhibition to advanced glycation end-products and activity evaluation of sap of banana stem [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37 (3): 49—53. (in Chinese)
- [10] 杨荣武. 生物化学原理 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2012: 132—149.
- YANG R W. *Biochemical Theory* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2012: 132—149. (in Chinese)
- [11] 陈建福, 林洵, 许商荣, 等. 超声波辅助法提取白兰叶多酚的工艺研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2016 (7): 150—156.
- CHEN J F, LIN X, XU S R, et al. Ultrasonic-assisted extraction of polyphenols from *Michelia alba* leaves [J]. *China Food Additives*, 2016 (7): 150—156. (in Chinese)
- [12] 陈红惠, 吕静, 彭娜, 等. 雪莲果叶中多酚的提取工艺研究 [J]. *食品科学*, 2009, 30 (2): 88—91.
- CHEN H H, LV J, PENG L, et al. Study on extraction technology of polyphenols from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves [J]. *Food Science*, 2009, 30 (2): 88—91. (in Chinese)
- [13] 冯进, 曾晓雄, 李春阳. 响应面法优化蓝莓叶多酚提取工艺 [J]. *食品科学*, 2013, 34 (4): 59—64.
- FENG J, ZENG X X, LI C Y. Optimization of extraction process for polyphenols from blueberry leaves by response surface methodology [J]. *Food Science*, 2013, 34 (4): 59—64. (in Chinese)
- [14] 张素斌, 张欣, 李敏. 龙利叶多酚提取条件优化及其抗氧化活性研究 [J]. *河南农业科学*, 2017, 46 (2): 148—152.
- ZHANG S B, ZHANG X, LI M. Optimization of extraction conditions and antioxidant activities of polyphenols from *Sauropus rostratus* Miq. [J]. *Journal of Henan Agriculture Science*, 2017, 46 (2): 148—152. (in Chinese)
- [15] 陈智理, 杨昌鹏, 郭静婕, 等. 番石榴叶多酚提取工艺的优化 [J]. *南方农业学报*, 2014, 45 (10): 1856—1860.
- CHEN Z L, YANG C P, GUO J J, et al. Extraction process optimization of polyphenol from guava leaf [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45 (10): 1856—1860. (in Chinese)
- [16] DE B, BHANDARI K, SINGLA R K, et al. Chemometrics Optimized Extraction Procedures, Phytosynergistic Blending and in vitro Screening of Natural Enzyme Inhibitors Amongst Leaves of Tulsi, Banyan and Jamun [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2015, 11 (S4): S522—532.
- [17] 林宝妹, 邱珊莲, 张少平, 等. 不同品种嘉宝果叶片提取物的抗氧化活性 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2018, 46 (9): 121—130.
- LIN B M, QIU S L, ZHANG S P, et al. Antioxidant capacities of different leaf extracts of Jaboticaba cultivars [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2018, 46 (9): 121—130. (in Chinese)
- [18] 张海均, 贾冬英, 孙慧, 等. 石榴皮多酚提取物及纯化物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24 (9): 1253—1256.
- ZHANG H J, JIA D Y, SUN H, et al. Inhibitory Effect of polyphenol extract from pomegranate peel and its purified fractions on α -glucosidase activity [J]. *Natural Product Research and Development*, 2012, 24 (9): 1253—1256. (in Chinese)
- [19] 高航, 单雪玉, 高延芬, 等. 莲子红衣多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. *食品科学技术学报*, 2016, 34 (6): 36—40.
- GAO H, SHAN X Y, GAO Y F, et al. Inhibitory effect on α -glucosidase activity of polyphenol from red-skin of lotus seed [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2016, 34 (6): 36—40. (in Chinese)
- [20] 吕欢, 罗明琰, 方飞, 等. 桑叶提取物抑制 α -葡萄糖苷酶活性体系的优化及动力学研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23 (1): 42—44.
- LV H, LUO M L, FANG F, et al. Optimization of inhibitory reaction system of folium mori extracts on alpha-glucosidase activity and enzyme kinetics [J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2012, 23 (1): 42—44. (in Chinese)

(责任编辑: 林海清)