

# 雪胆多酚抗氧化作用及对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用研究

赵 艳<sup>1,2</sup>, 刘丽娟<sup>1</sup>, 王白娟<sup>3</sup>, 陈 庚<sup>1,2</sup>, 高青青<sup>1,2</sup>, 张广辉<sup>1</sup>, 杨生超<sup>1\*</sup>

(1. 云南农业大学云南省药用植物生物学重点实验室/西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 3. 云南农业大学机关党委, 云南 昆明 650201)

**摘 要:**【目的】探讨雪胆多酚与氨基酸的联合抗氧化作用及对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用。【方法】采用 Folin-Ciocalteu 法测定多酚含量。利用 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基、超氧阴离子清除活性和铁还原能力法, 评价雪胆多酚与组氨酸、缬氨酸、甘氨酸之间的联合抗氧化活性。并通过体外法测定雪胆多酚对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用。【结果】雪胆多酚、组氨酸、缬氨酸、甘氨酸、组氨酸与雪胆多酚联合、缬氨酸与雪胆多酚联合、甘氨酸与雪胆多酚联合均具有清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基、超氧阴离子清除活性的能力, 并具有一定的还原能力。抑制性实验结果表明, 雪胆多酚对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶有抑制作用, 属于可逆性抑制中的反竞争性抑制类型。【结论】利用体外抗氧化评价方法, 明确了雪胆多酚与氨基酸之间具有协同抗氧化能力, 以及雪胆多酚对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶具有抑制作用, 为雪胆多酚的进一步开发利用提供理论依据。

**关键词:** 雪胆; 多酚; 抗氧化活性;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶

**中图分类号:** R284 **文献标识码:** A

## Antioxidation and $\alpha$ -glucosidase Inhibition of *Hemsleya chinensis* Polyphenols

ZHAO Yan<sup>1,2</sup>, LIU Li-juan<sup>1</sup>, WANG Bai-juan<sup>3</sup>, CHEN Geng<sup>1,2</sup>, GAO Qing-qing<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Guang-hui<sup>1</sup>, YANG Sheng-chao<sup>1\*</sup>

(1. The Key Laboratory of Medicinal Plant Biology of Yunnan Province/National & Local Joint Engineering Research Center on Germplasm Innovation & Utilization of Chinese Medicinal Materials in Southwest China, Yunnan Agricultural University, Yunnan Kunming 650201, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Yunnan Kunming 650201, China; 3. Party Committee of Organ, Yunnan Agricultural University, Yunnan Kunming 650201, China)

**Abstract** 【Objective】The present research aimed to investigate the synergistic antioxidant of polyphenol from *Hemsleya chinensis* with amino acids, and the inhibition to  $\alpha$ -glucosidase. 【Method】The polyphenol content from *H. chinensis* was determined by Folin-Ciocalteu method. The antioxidation activity of polyphenol from *H. chinensis*, histidine, valine and glycine were determined by DPPH, ABTS, hydroxyl radical, superoxide anion scavenging activity and reducing power, respectively. The inhibition effect of polyphenol from *H. chinensis* on  $\alpha$ -glucosidase was determined in vitro. 【Result】The results indicated that the synergistic antioxidant of polyphenol from *H. chinensis*, histidine, valine, glycine, histidine, and polyphenol from *H. chinensis*, valine and polyphenol from *H. chinensis*, glycine and polyphenol from *H. chinensis* had DPPH radical-scavenging activity, ABTS radical-scavenging activity, hydroxyl radicals-scavenging activity, superoxide anion radical-scavenging activity, and similar results had been shown in reducing power assay. 【Conclusion】The antioxidant evaluation method in vitro was used to clarify the synergistic antioxidant capacity of polyphenol from *H. chinensis* and amino acids, and the inhibition effect of polyphenol from *H. chinensis* on  $\alpha$ -glucosidase was demonstrated, which provided a theory for future development and utilization in *H. chinensis*.

**Key words:** *Hemsleya chinensis*; Polyphenols; Antioxidant;  $\alpha$ -glucosidase

【研究意义】雪胆 (*Hemsleya chinensis*) 为葫芦科雪胆属植物, 主要分布于中国西南地区<sup>[1]</sup>。雪胆具有清热解毒、消炎抗菌等功效, 被收载于《云南中草

药》、《全国中草药汇编》, 为民间习用药材, 常用于治疗胃肠炎及急性扁桃体炎等疾病<sup>[2]</sup>。植物多酚是在植物体内广泛存在的次级代谢产物, 具有较好的抑菌性和抗氧化活性<sup>[3-6]</sup>。有报道称在自然界中氨基酸也具有一定的抗氧化能力<sup>[7]</sup>。【前人研究进展】陈冠群等<sup>[8]</sup>测定氨基酸抗氧化活性的结果表明, 蛋氨酸、赖氨酸和酪氨酸等 6 种氨基酸的抗氧化活性较高。天然抗氧化剂间存在相互增效协同的作

收稿日期: 2019-11-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81960691); 云南省重大科技专项 (2018ZF011; 2019ZF011)

作者简介: 赵 艳 (1982-), 女, 云南宾川人, 博士, 副教授, 主要研究方向为药用植物研究, E-mail: zhaoyankm@126.com; \* 为通讯作者, 杨生超, E-mail: shengchaoyang@163.com。

用, Hwang 等<sup>[9]</sup>研究发现高温不影响协同增效作用, 生育酚和氨基酸具有联合抗氧化作用。但是对雪胆多酚与氨基酸之间的协同作用以及雪胆多酚对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的研究尚未见报道。【本研究切入点】通过 Folin-Ciocalte 法测定多酚含量, 结合 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基、超氧阴离子清除活性和铁还原能力法, 探讨雪胆多酚与组氨酸、缬氨酸、甘氨酸之间的联合抗氧化活性, 并采用体外法分析雪胆多酚对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用。【拟解决的关键问题】明确雪胆多酚与氨基酸的协同增效作用和对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用, 为雪胆的开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试验材料: 雪胆 (*Hemsleya chinensis*) 采自云南柯兆生物科技有限公司雪胆种植基地, 由杨生超教授鉴定为葫芦科雪胆属雪胆 (*Hemsleya chinensis*), 经粉碎过 100 目筛, 密封于干燥器中备用。

试验仪器: 无水乙醇、苯酚、葡萄糖购自天津市风船化学试剂科技有限公司; 氯仿、正丁醇、浓硫酸购自重庆川东化工有限公司; 冰醋酸、氢氧化钠、硫酸亚铁、水杨酸钠、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁粉购自西陇化工股份有限公司; 福林-酚试剂、甘氨酸、组氨酸、缬氨酸购自国药集团化学试剂有限公司; 对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷、二苯基苦味酰基苯肼 (DPPH) 购自上海金穗生物科技有限公司; 对硝基苯酚购自西陇化工有限公司;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶购自 Sigma 公司; ABTS 购自化工生物工程(上海)股份有限公司, 以上试剂均为国产分析纯。DPPH 购自 Sigma 公司。722S 型可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司)、DRHH-型数显恒温水浴锅(上海双捷实验设备有限公司)、DC-600 高速多功能粉碎机(江武义鼎藏日用金属制品厂)、电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 雪胆多酚的提取 雪胆块茎→粉碎机粉碎(100 目)→提取→过滤→雪胆多酚提取液<sup>[10]</sup>。

1.2.2 没食子酸标准曲线的制作 准备没食子酸标品, 根据 Folin-Ciocalte 法在 765 nm 处测定提取液的吸光值, 平行测定 3 次。以没食子酸浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 绘制没食子酸的标准工作曲线。

1.2.3 雪胆多酚提取率的计算 将 1.2.2 中没食子酸标准溶液用 10 mL 雪胆多酚提取液替代, 按 1.2.2 步骤测定吸光值, 通过没食子酸标准工作曲线

的线性方程, 得到多酚浓度后通过式(1), 计算雪胆多酚提取率。

$$\text{多酚提取率}(\text{mg/g}) = \frac{C \times V_a \times V_b}{M \times V} \quad (1)$$

式中,  $C$ : 多酚浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ );  $V_a$ : 容量瓶量程 ( $\text{mL}$ );  $V_b$ : 提取液总体积 ( $\text{mL}$ );  $M$ : 样品质量 ( $\text{g}$ );  $V$ : 取液量 ( $\text{mL}$ )。

#### 1.2.4 雪胆多酚与氨基酸的体外联合抗氧化能力

取 4 g 雪胆粉末进行多酚提取, 并计算雪胆多酚的含量, 将雪胆多酚提取液按 0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度梯度进行稀释。分别按照前述浓度梯度配制抗坏血酸 (Vc)、甘氨酸、组氨酸和缬氨酸溶液。

(1) DPPH 清除率的测定。雪胆多酚提取液、组氨酸、缬氨酸、甘氨酸、Vc(分别取 2 mL 于试管中)→DPPH 无水乙醇溶液(2 mL)→室温反应(0.5 h)→测定吸光值  $A_1$ (517 nm)→以水代替待测溶液测定吸光值  $A_0$ , 以乙醇溶液代替 DPPH 溶液测定吸光值  $A_2$ , 以同等梯度浓度抗坏血酸溶液作对照→计算 DPPH 清除率<sup>[11]</sup>。

联合抗氧化测定中, 氨基酸与雪胆多酚提取液各 1 mL, 用等浓度乙醇置换作对照组和空白组。

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = \left[ 1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

(2) ABTS 清除率的测定。配制 ABTS 溶液。雪胆多酚提取液、组氨酸、缬氨酸、甘氨酸、Vc(分别取 2 mL 于试管中)→ABTS 溶液(1.8 mL)→避光反应(0.5 h)→测定吸光值  $A_1$ (734 nm)→以水代替待测溶液测定吸光值  $A_0$ , 以乙醇溶液代替 ABTS 溶液测定吸光值  $A_2$ , 以同等梯度浓度抗坏血酸溶液作对照→计算 ABTS 清除率<sup>[12]</sup>。

联合抗氧化测定中, 氨基酸与雪胆多酚提取液各 1 mL, 将 ABTS 和雪胆多酚溶液、氨基酸、氨基酸与雪胆多酚混合液用等量蒸馏水置换作对照组和空白组。

$$\text{ABTS 清除率}(\%) = \left[ 1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100 \quad (3)$$

(3) 羟基自由基清除率的测定。雪胆多酚提取液、组氨酸、缬氨酸、甘氨酸、Vc(分别取 2 mL 于试管中)→硫酸亚铁(2 mL)→过氧化氢(2 mL)→室温反应(2 min)→水杨酸钠溶液(2 mL)→室温反应(20 min)→测定吸光值  $A_1$ (510 nm)→以水代替待测溶液测定吸光值  $A_0$ , 以水代替过氧化氢溶液测定吸光值  $A_2$ , 以同等梯度浓度抗坏血酸溶液作对照→计算羟基自由基清除率<sup>[13]</sup>。

联合抗氧化测定中, 氨基酸与雪胆多酚提取液

各 1 mL,用等量蒸馏水代替水杨酸钠溶液和雪胆多酚溶液、氨基酸、氨基酸与雪胆多酚混合液作对照组和空白组。

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = [1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0}] \times 100 \quad (4)$$

(4) 超氧阴离子清除率的测定。雪胆多酚提取液、组氨酸、缬氨酸、甘氨酸、Vc(分别取 2 mL 于试管中)→邻苯三酚溶液(1 mL)→Tris-HCl 溶液(4.5 mL)→25℃水浴(10 min)→HCl 溶液(1.5 mL)→测定吸光值  $A_2$ (360 nm)→以水代替待测溶液测定吸光值  $A_1$ ,以同等梯度浓度抗坏血酸溶液作对照→计算超氧阴离子清除率<sup>[14]</sup>。

联合抗氧化测定中,氨基酸与雪胆多酚提取液各 1 mL 将邻苯三酚溶液和雪胆多酚溶液、氨基酸、氨基酸与雪胆多酚混合液用等量蒸馏水置换作对照组和空白组。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{清除率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (5)$$

(5) 还原能力的测定。雪胆多酚提取液、组氨酸、缬氨酸、甘氨酸、Vc(分别取 2 mL 于离心管中)→磷酸缓冲溶液(2.5 mL)→K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]溶液(2.5 mL)→室温反应(20 min)→三氯乙酸溶液(2.5 mL)→离心取上清液(5 mL)→三氯化铁(0.5 mL)→蒸馏水(5 mL)→室温反应(20 min)→测定吸光值(700 nm)<sup>[15]</sup>。

联合抗氧化测定中,氨基酸与雪胆多酚提取液各 1 mL。

1.2.5  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制实验 (1) pNP 标准曲线的制作。配制 pNP 标准溶液,在 405 nm 处测定吸光值,以 pNP 浓度和吸光值为横纵坐标,绘制 pNP 标准曲线<sup>[16-17]</sup>。

(2) 适宜酶量的确定。pNPG 溶液(1 mL)→ $\alpha$ -葡萄糖苷酶液(同浓度不同量)→磷酸缓冲溶液(补充至同体积)→37℃水浴→每隔 10 min Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液终止反应(2 mL)→测定吸光值(405 nm)<sup>[18-19]</sup>。

(3) 酶反应动力学方程的建立。pNPG 溶液(同量不同浓度)→ $\alpha$ -葡萄糖苷酶液(0.4 mL)→磷酸缓冲溶液(补充至同体积)→37℃水浴(0.5 h)→Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液终止反应(2 mL)→测定吸光值(405 nm)<sup>[18-19]</sup>。对照组用磷酸缓冲溶液置换  $\alpha$ -葡萄糖苷酶液。

(4) 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的动力学实验。10 支试管(分为两组)→ $\alpha$ -葡萄糖苷酶液(同量不同浓度)→雪胆多酚提取液(1 mL)→磷酸缓冲溶液(补充至同体积)→37℃水浴(预反应 30 min)→pNPG 溶液(1 mL)→37℃水浴(30 min)→Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

溶液终止反应(2 mL)→测定吸光值(405 nm)。

(5) 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制类型的确定。8 支试管(分为两组)→ $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液(0.4 mL)→磷酸缓冲溶液(1 组为 1、0.8、0.6、0.4 mL 2 组为 2、1.8、1.6、1.4 mL)→37℃水浴(预反应 30 min)→pNPG 溶液(1 mL)→37℃水浴(30 min)→Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液终止反应(2 mL)→测定吸光值(405 nm)。用磷酸缓冲溶液代替  $\alpha$ -葡萄糖苷酶液做对照组。

### 1.3 数据分析与作图

采用 Microsoft Excel 2013 整理数据作图,以 SPSS 20.0 中的 LSD 法进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 没食子酸标准曲线的建立

以没食子酸浓度与吸光值为横纵坐标绘制标准曲线。得到没食子酸标准曲线的回归方程:  $Y = 67.23X + 0.0046$ ,  $R^2 = 0.9997$ 。由图 1 表明在 0 ~ 0.009 mg · mL<sup>-1</sup> 没食子酸浓度与吸光值线性关系良好。

### 2.2 雪胆多酚与氨基酸的联合体外抗氧化实验

2.2.1 清除 DPPH 自由基能力分析 由图 2 可知,随着雪胆多酚提取液、组氨酸、组氨酸与雪胆多酚混合液、缬氨酸、缬氨酸与雪胆多酚混合液、甘氨酸、甘氨酸与雪胆多酚混合液浓度的不断提高,DPPH 自由基清除率也呈现增加的趋势。结果表明其 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.0018、0.0068、0.0056、0.0036、0.0094、0.0076、0.0066、0.0005 mg · mL<sup>-1</sup>。通过 IC<sub>50</sub> 数值的大小,可以发现抗氧化能力的差异,总体趋势为 IC<sub>50</sub> 数值越小,对应物质的抗氧化能力越强。结果表明,雪胆多酚、3 种氨基酸、3 种氨基酸和雪胆多酚联合使用对 DPPH 有一定的清除能力,但清除能力略弱于 Vc。

2.2.2 清除 ABTS 自由基能力分析 由图 3 可知,随着各溶液浓度的增加,ABTS 自由基的清除率也

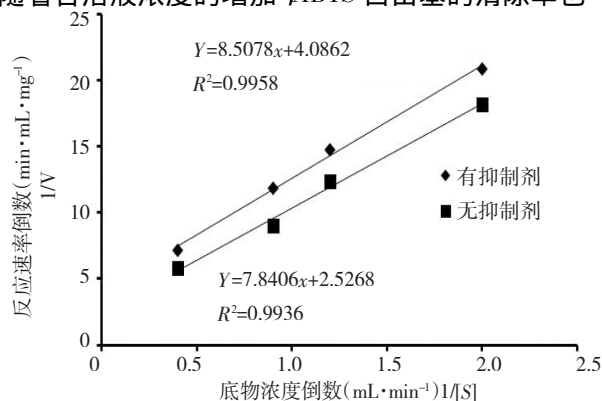


图 1 没食子酸标准曲线

Fig. 1 Gallic acid standard curve

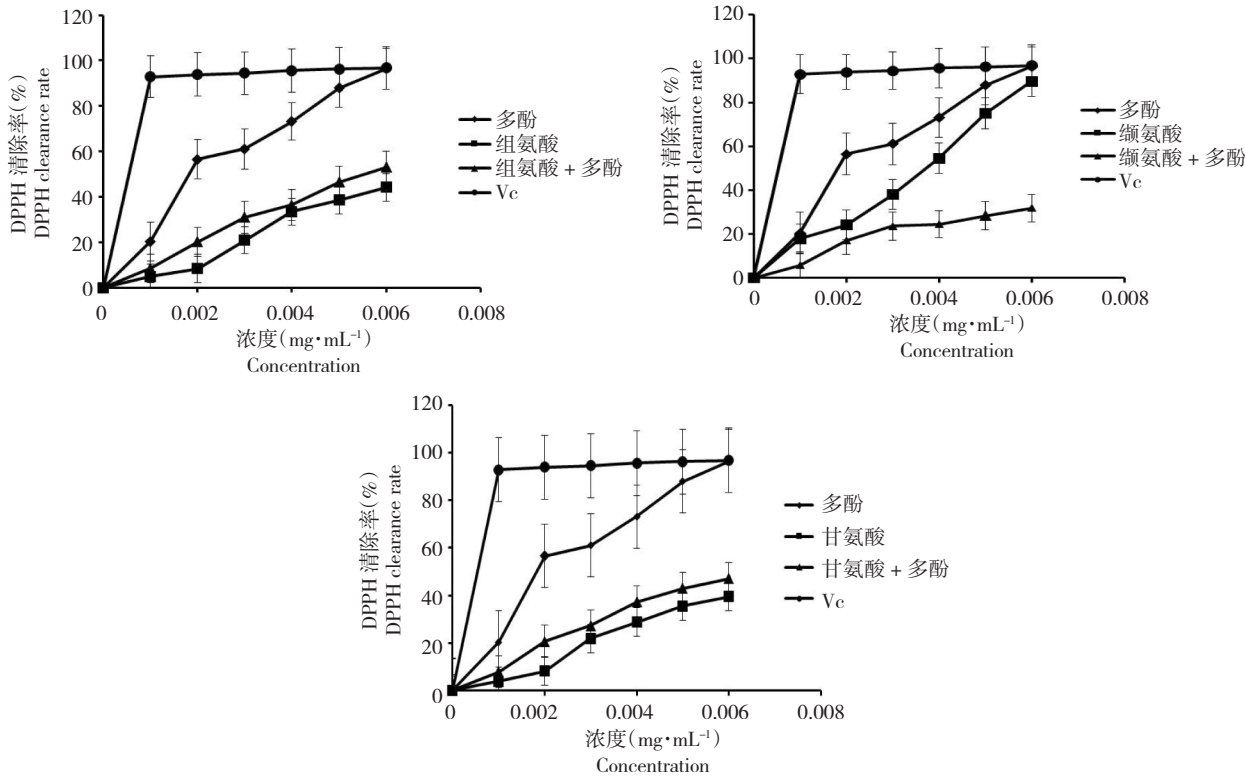


图 2 DPPH 自由基清除率

Fig. 2 DPPH free radical scavenging ability

在逐渐增大。研究结果表明,各溶液  $\text{IC}_{50}$  的数值分别为雪胆多酚提取液  $0.0058 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、组氨酸  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、组氨酸与多酚混合液  $0.0016$

$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、缬氨酸  $0.0082 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、缬氨酸与多酚混合液  $0.0017 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘氨酸  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘氨酸与多酚混合液  $0.0017 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、Vc 溶液

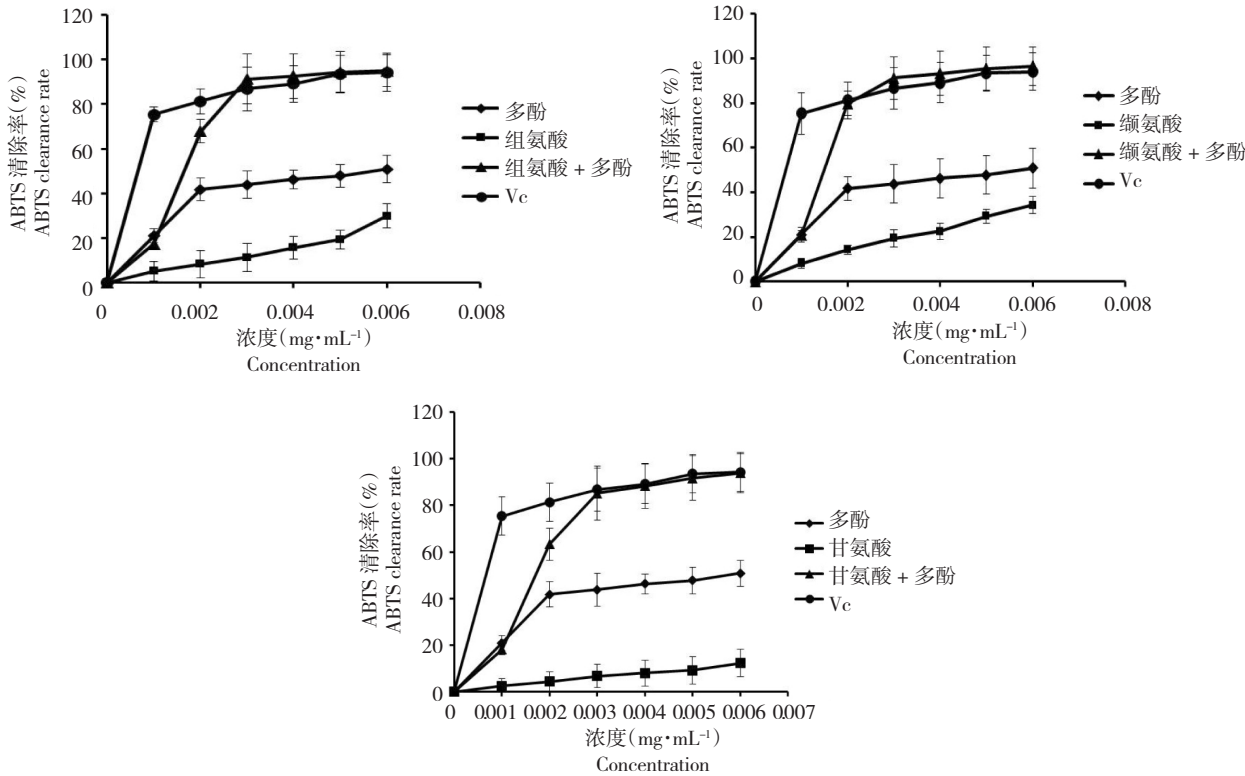


图 3 ABTS 自由基清除率

Fig. 3 ABTS free radical scavenging ability

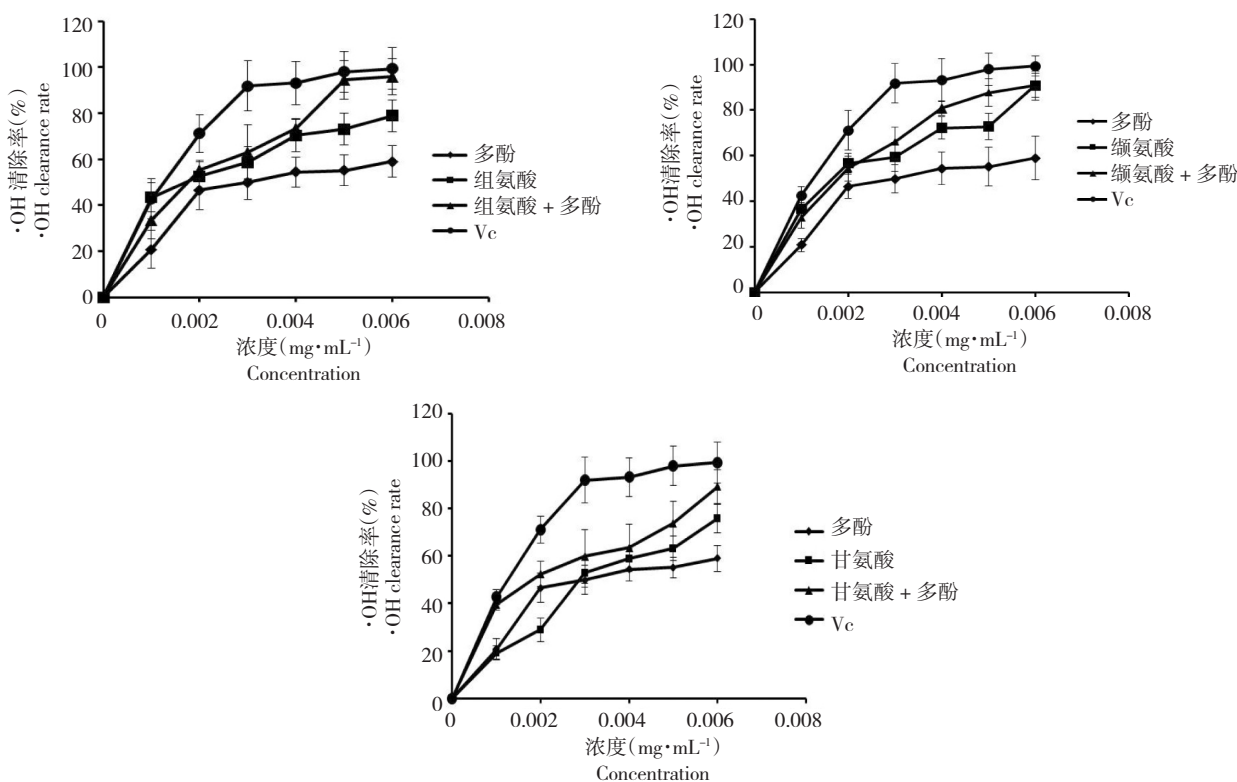


图4 羟基自由基清除率

Fig. 4 Hydroxyl radicals free radical scavenging ability

0.0007  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果表明,雪胆多酚、3种氨基酸、3种氨基酸和雪胆多酚联合使用对ABTS自由基有一定的清除能力,但清除能力略弱于Vc。

**2.2.3 清除羟基自由基能力分析** 雪胆多酚、3种氨基酸、3种氨基酸和雪胆多酚联合使用对羟基自由基均具有清除能力,但清除能力弱于Vc(图4)。随着各个溶液浓度增加,羟基自由基的清除率增强,结果表明 $\text{IC}_{50}$ 的数值分别为雪胆多酚提取液0.0032  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、组氨酸0.0017  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、组氨酸与多酚混合液0.0018  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、缬氨酸0.0017  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、缬氨酸与多酚混合液0.0018  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘氨酸0.0028  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘氨酸与多酚混合液0.0018  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和Vc 0.0012  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.2.4 清除超氧阴离子能力分析** 由图5可知,与Vc清除超氧阴离子能力比较,雪胆多酚、3种氨基酸、3种氨基酸与雪胆多酚联合使用对超氧阴离子均具有一定的清除能力。结果表明, $\text{IC}_{50}$ 的数值分别为雪胆多酚提取液0.0075  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、组氨酸0.011  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、组氨酸与多酚混合液0.0044  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、缬氨酸0.016  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、缬氨酸与多酚混合液0.0027  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘氨酸0.017  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘氨酸与多酚混合液0.008  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和Vc 0.0018  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.2.5 还原能力分析** 由图6可知,雪胆多酚、氨基酸均具有一定的还原能力,随着雪胆多酚提取液、

组氨酸、组氨酸与多酚混合液、缬氨酸、缬氨酸与多酚混合液、甘氨酸、甘氨酸与多酚混合液和Vc浓度的增加,还原能力也逐渐增大,但还原能力较Vc稍弱。

### 2.3 雪胆多酚对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制实验

**2.3.1 建立pNP标准曲线** 以pNP浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制pNP标准曲线。 $Y = 64.179X + 0.0001$ 为线性回归方程( $R^2 = 0.9997$ )。从图7可知,pNP浓度在0~0.004  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内pNP浓度与吸光值线性关系良好。

**2.3.2  $\alpha$ -葡萄糖苷酶反应动力学中最适酶量的测定** 由图8可知 $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液用量越大,线性反应期的时间缩短。根据初始反应速率的数值,确定酶的用量为0.4 mL,选取0.5 h作为反应时间,进行酶反应动力学测定。

**2.3.3 酶反应动力学方程的确定** 由图9可知,直线的X轴截距为-0.18,Y轴的截距为3.08。因为X轴的截距 $= -1/K_m$ ,Y轴截距 $= 1/V_{\max}$ 。

$$\text{米氏常数 } K_m = 5.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\text{最大反应速率 } V_{\max} = 0.32 \text{ nM} \cdot \text{min}^{-1}$$

将米氏常数与最大反应速率代入酶反应动力学方程,可得到米氏方程。

$$V = V_{\max} [S] / ([S] + K_m) = 0.32 \text{ nmol/L} \cdot \text{min}^{-1} [S] / ([S] + 5.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1})$$



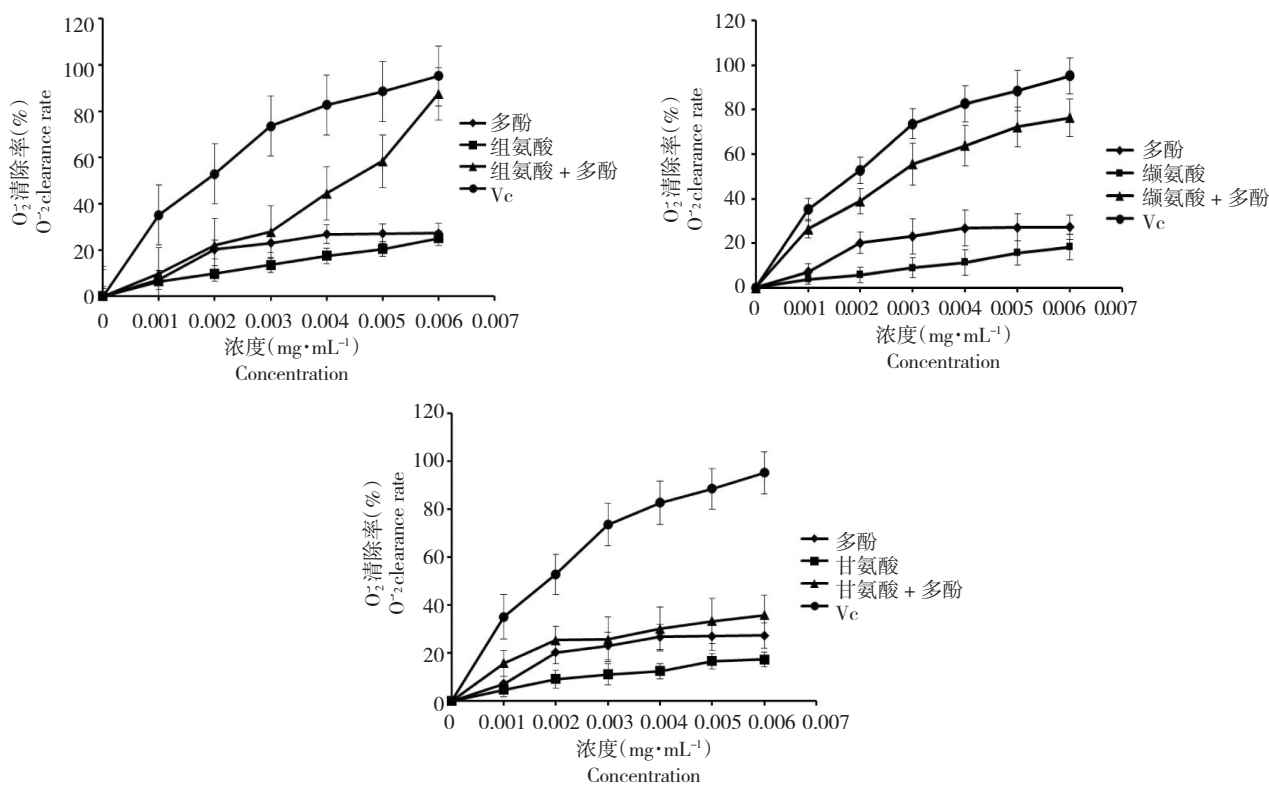


图5 超氧阴离子清除率

Fig. 5 Superoxide anion scavenging ability

2.3.4 雪胆多酚对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制类型 有无抑制剂的体系速率直线均经过原点,从动力学曲线可以看出,当有抑制剂时,速率直线的斜率较小,从图 10 可以判断雪胆多酚提取液对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶

的抑制作用属于可逆性抑制类型。

竞争性抑制、非竞争性抑制和反竞争性抑制属于可逆性抑制中的 3 种类型。当最大反应速率不变、米氏常数增大时为竞争性抑制类型;当最大反应

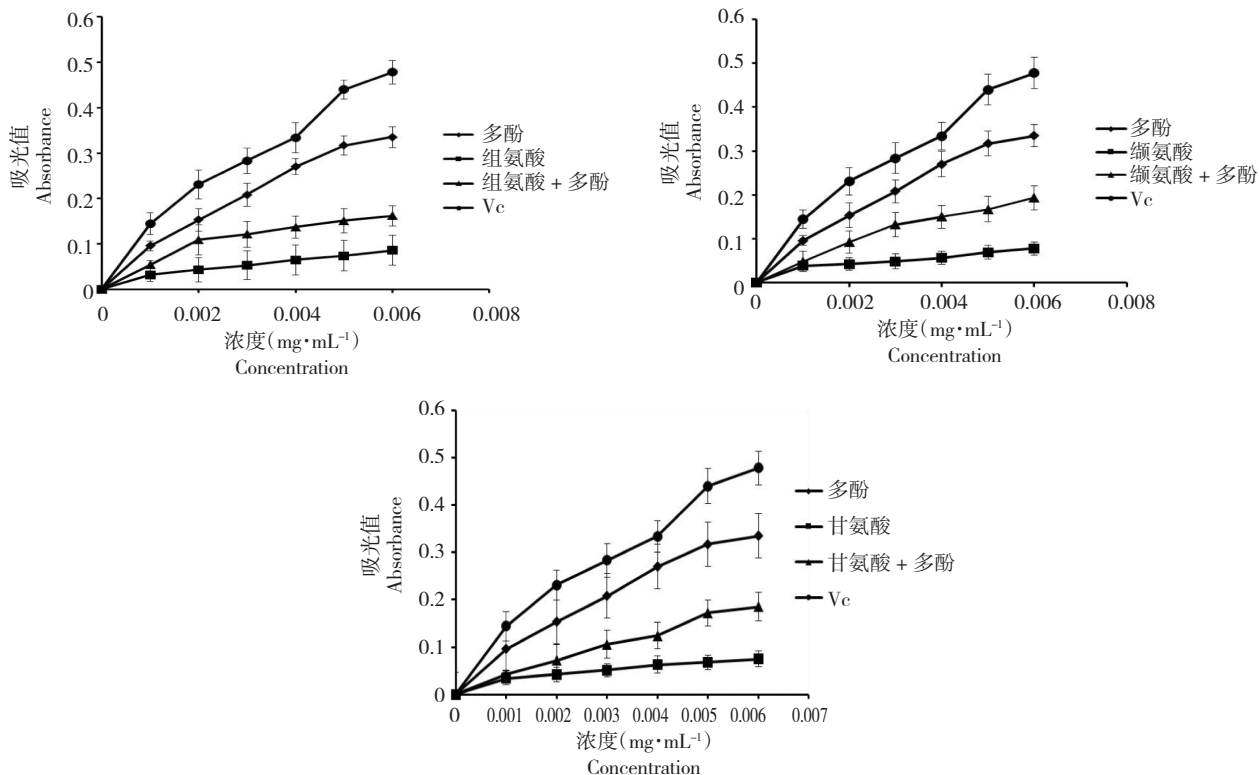


图6 还原能力

Fig. 6 Reduction power

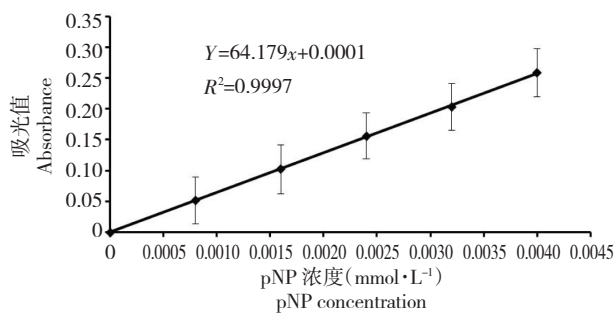


图7 pNP 标准曲线

Fig. 7 pNP standard curve

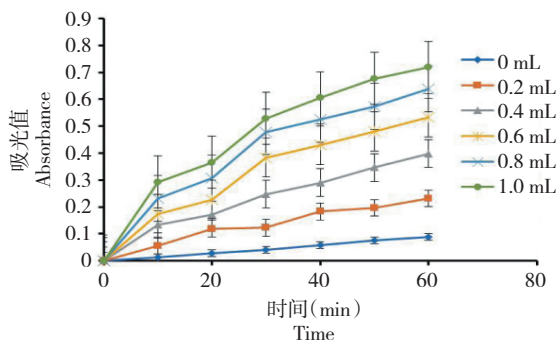


图8 α-葡萄糖苷酶不同酶量的反应进程曲线

Fig. 8 Enzymatic reaction curve in adding different amounts of α-glucosidase

速率减小、米氏常数不变时为非竞争性抑制类型;当最大反应速率和米氏常数的数值都减小时属于反竞争性抑制类型。由图 11 可知,添加抑制剂后,体系的最大反应速率和米氏常数均呈现减小的趋势,由此可知雪胆多酚对 α-葡萄糖苷酶是可逆性抑制中的反竞争性抑制类型。

### 3 讨论

酚类抗氧化剂一般含有一个或多个酚羟基,羟基能提供氢质子与自由基反应,起到清除自由基的作用<sup>[20]</sup>。雪胆多酚提取液清除 DPPH 的能力较强,其  $IC_{50}$  为  $0.0018 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;并有一定的羟基自由基、ABTS、超氧阴离子清除作用。组氨酸、缬氨酸与甘氨酸清除羟基自由基的能力较强,其  $IC_{50}$  分别为

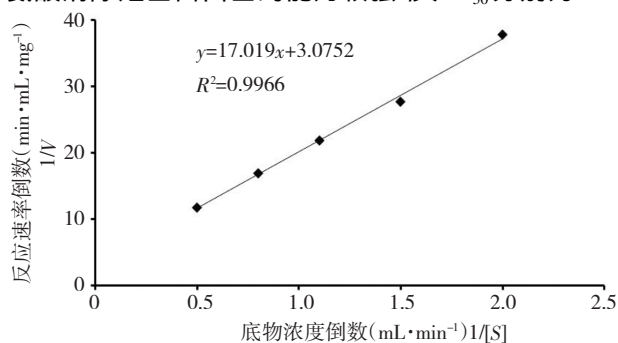


图9 α-葡萄糖苷酶的米氏方程曲线图

Fig. 9 Mie equation curve of α-glucosidase

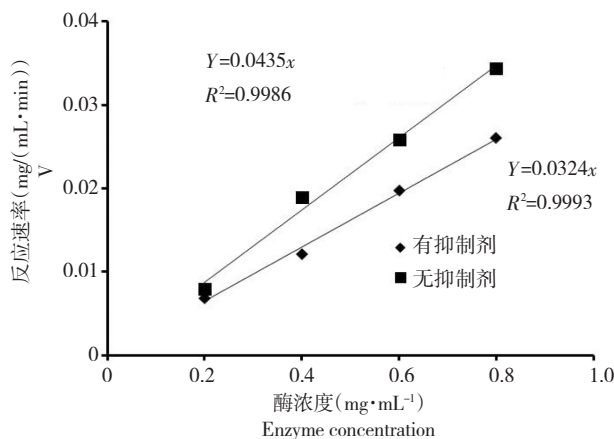


图10 雪胆多酚对 α-葡萄糖苷酶的抑制类型动力学曲线

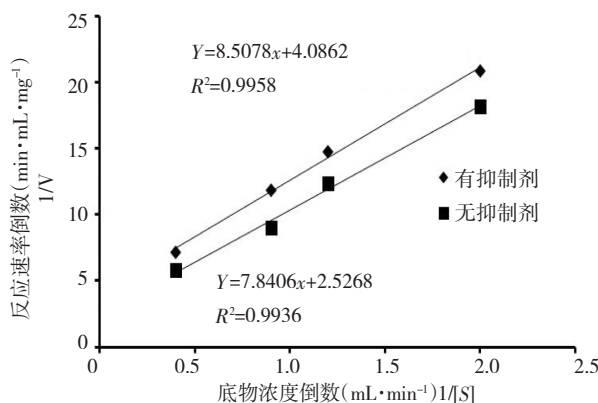
Fig. 10 Kinetic curve of polyphenols from *Hemsleya chinensis* inhibition on α-glucosidase

图11 α-葡萄糖苷酶反竞争性抑制曲线

Fig. 11 The α-glucosidase anticompetitive curve

$0.0017$ 、 $0.0017$ 、 $0.0028 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;并具有一定的 DPPH、ABTS、超氧阴离子清除作用。雪胆多酚提取液分别与组氨酸、缬氨酸、甘氨酸联合使用清除 ABTS 的能力较强,其  $IC_{50}$  分别为  $0.0016$ 、 $0.0017$ 、 $0.0017 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;并具有一定的 DPPH、羟基自由基、超氧阴离子清除作用。

天然抗氧化剂间可能存在协同作用,常将两种以上的天然抗氧化剂联合使用。氨基酸具有一定的抗氧化活性,但与酚类、黄酮类、维生素类强氧化剂相比,氨基酸的抗氧化活性相对较小,而氨基酸能发挥其抗氧化活性的作用的机制之一,是与其他抗氧化剂发挥协同抗氧化的作用<sup>[21]</sup>。李新<sup>[22]</sup>研究了 20 种氨基酸与 9 种酚类及维生素抗氧化剂的联合作用效果,发现组氨酸等氨基酸与 9 种酚类及维生素抗氧化剂之间存在较为明显的 ABTS 自由基清除活性的协同作用。

α-葡萄糖苷酶可水解 α-1,4 糖苷键,把机体摄入的碳水化合物生成利于吸收的葡萄糖,在人体糖类化合物代谢中有着重要的作用,α-葡萄糖苷酶抑制剂可以竞争性抑制 α-葡萄糖苷酶,从而减弱及减缓葡萄糖在肠道中的吸收。通过雪胆多酚对 α-葡

葡萄糖苷酶的抑制动力学曲线类型研究,发现雪胆多酚对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶有一定的抑制作用,属于可逆性抑制中的反竞争性抑制类型。不同多酚化合物的抑制类型有所不同,伍城颖等<sup>[23]</sup>研究发现茨种皮多酚对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用为竞争性抑制。宋菲等<sup>[24]</sup>研究了槟榔提取物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用,结果表明槟榔壳及槟榔籽提取物对酶活性的抑制作用类型为竞争与非竞争的混合型抑制,而槟榔花提取物对酶活性的抑制作用类型为竞争与反竞争的混合型抑制。

## 4 结 论

利用体外抗氧化评价方法,分析了雪胆多酚与组氨酸、缬氨酸、甘氨酸单独抗氧化和组合抗氧化效应实验结果表明,雪胆多酚、组氨酸、缬氨酸、甘氨酸、组氨酸与雪胆多酚联合、缬氨酸与雪胆多酚联合、甘氨酸与雪胆多酚联合均具有清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基、超氧阴离子清除活性的能力,并具有一定的还原能力。通过动力学实验发现,雪胆多酚对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶有抑制作用,对酶活性的抑制作用类型为可逆性抑制中的反竞争性抑制类型。本研究结果表明,雪胆多酚提取物具有良好的开发潜力,为提高雪胆产品的附加值和雪胆资源的高效利用提供了理论依据。

### 参考文献:

- [1] Li H T, Yang J B, Li D Z, et al. A molecular phylogenetic study of *Hemsleya* (*Cucurbitaceae*) based on ITS, rpl16, trnH-psbA, and trnL DNA sequences [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2010, 285(1-2): 23-32.
- [2] 李 莹, 徐晓婷, 郑重飞, 等. 雪胆属植物的化学成分及生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(18): 2800-2808.
- [3] Chen M S, Zhao Z G, Meng H C, et al. The antibiotic activity and mechanisms of sugar beet (*Beta vulgaris*) molasses polyphenols against selected food borne pathogens [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 82: 354-360.
- [4] Chibane L B, Degraeve P, Ferhout H, et al. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(4): 1457-1474.
- [5] Mokhtar M, Ginestra G, Youcefi F, et al. Antimicrobial activity of selected polyphenols and capsaicinoids identified in pepper (*Capsicum annuum* L.) and their possible mode of interaction [J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(4): 1-8.
- [6] 林 波, 郑凤锦, 任 红, 等. 莲雾花多酚的超声波辅助提取工艺优化抗氧化活性分析 [J]. *西南农业学报*, 2019, 32(6): 1353-1359.
- [7] Rajapakse N, Mendis E, Jung W K, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties [J]. *Food Research International*, 2005, 38(2): 175-182.
- [8] 陈冠群. 机体总抗氧化力的氨基酸和基因基础以及氧化对抗体活性及其它实验室指标的影响 [D]. 大连: 大连医科大学, 2014.
- [9] Hwang H S, Winkler-Moser J K. Antioxidant activity of amino acids in soybean oil at frying temperature: Structural effects and synergism with tocopherols [J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1168-1177.
- [10] 周子舜, 段柯兆, 全瑞兰, 等. 响应面法优化雪胆多酚提取工艺 [J]. *湖北农业科学*, 2020, 59(17): 112-118.
- [11] Brito A, Areche C, Sepúlveda B, et al. Anthocyanin characterization, total phenolic quantification and antioxidant features of some Chilean edible berry extracts [J]. *Molecules*, 2014, 19: 10936-10955.
- [12] 郑善元, 陈填烽, 郑文杰, 等. 单丛茶水提取物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(9): 2417.
- [13] Nishimura K, Suzuki M, Saeki H. Glucose-conjugated chicken myofibrillar proteins derived from random-centroid optimization present potent hydroxyl radical scavenging activity [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2019, 83(12): 2307-2317.
- [14] Qu J Y, Ren D M. Chemical Modification and in vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Cordyceps militaris* [J]. *Food Science*, 2011, 32(15): 58-61.
- [15] Zhou L, Shao J H, Ren X M, et al. In vitro antioxidant properties of polysaccharides and its derivatives from *Dioscorea rhizoma* [J]. *Food Science and Technology*, 2014, 39(2): 188-191.
- [16] 谢玉锋, 韩雪梅, 路福平. 抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性乳酸菌筛选与鉴定 [J]. *西南农业学报*, 2019, 32(8): 1779-1783.
- [17] 张雪春, 刘 江, 吴 鑫, 等. 微波辅助提取蛇莓多酚及其体外抗氧化、抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶能力研究 [J]. *西南农业学报*, 2018, 31(6): 1171-1179.
- [18] 易 醒, 仲秋晨, 焦 爽, 等. 泽泻提取物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(5): 115-117.
- [19] 全吉淑, 尹学哲, 金 明, 等. 大豆皂苷对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的研究 [J]. *中药材*, 2003(9): 654-656.
- [20] 冉 玲, 黄 琰, 曾红棱, 等. 酚酸与谷胱甘肽的抗氧化活性及联合抗氧化作用 [J]. *现代食品科技*, 2020, 36(3): 48-55.
- [21] 盛雪飞, 彭 燕, 陈健初, 等. 天然抗氧化剂之间的协同作用研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2010(7): 414-417.
- [22] 李 新. 氨基酸和酚类化合物的联合抗氧化作用研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [23] 伍城颖, 吴启南, 王 红, 等. 茨种皮多酚提取物体外抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -淀粉酶活性研究 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(16): 91-94, 99.
- [24] 宋 菲, 张玉峰, 郭玉如, 等. 槟榔提取物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用研究 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(13): 78-83.

(责任编辑 赵丹丹)