

红江橙果皮黄酮提取物对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用

林海生¹, 饶梦微¹, 秦小明¹, 吴清孝¹, 章超桦¹, 余国师^{2*}, 张海龙¹

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东省亚热带果蔬加工科技创新中心, 广东湛江 524088)

(2. 湛江科技学院建筑工程学院, 广东湛江 524003)

摘要: 为进一步高值化利用红江橙 (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Hongjiang) 果皮, 该研究以黄酮提取量作为评价指标, 采用超声辅助溶剂提取法和正交试验设计优化黄酮的提取工艺, 并探讨黄酮提取物对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用。结果显示, 红江橙果皮黄酮类化合物的最佳提取工艺条件: 提取温度为 70 °C、提取料液比为 1:5、提取时间为 50 min, 该条件下黄酮提取量为 82.57 mg/g, 高于传统乙醇浸提法 (23.56 mg/g)。红江橙果皮黄酮提取物 (Citrus Sinensis Peel Flavonoids Extract, CSFE) 对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的半抑制浓度 IC_{50} 值分别为 2.95 mg/mL 和 28.54 mg/mL; 在 10~50 mg/mL 质量浓度范围内, CSFE 对胰脂肪酶的抑制活性均呈现明显的质量浓度依赖性; 其作用类型均为混合型抑制。研究表明, 红江橙果皮黄酮类提取物具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性和胰脂肪酶抑制活性, 可为其在降血糖和减肥功能活性的深入研究提供依据。

关键词: 红江橙; 黄酮提取物; α -葡萄糖苷酶; 脂肪酶

文章编号: 1673-9078(2023)10-89-96

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1337

Inhibitory Effects of Total Flavonoids Extracted from the Peel of *Citrus sinensis* Osbeck 'Hongjiang' on α -Glucosidase and Pancreatic Lipase Activities

LIN Haisheng¹, RAO Mengwei¹, QIN Xiaoming¹, WU Qingxiao¹, ZHANG Chaohua¹, YU Guoshi^{2*}, ZHANG Hailong¹

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Modern Agricultural Science and Technology Innovation Center for Subtropical Fruit and Vegetable Processing, Zhanjiang 524088, China)

(2. Architectural Engineering College, Zhanjiang University of Science and Technology, Zhanjiang 524003, China)

Abstract: To enhance the utilization of the peel of *Citrus sinensis* Osbeck 'Hongjiang', an optimal extraction process for flavonoids was developed. To this end, an orthogonal experimental design was adopted, and ultrasonic-assisted extraction was performed; the flavonoid yield served as the evaluation index. Subsequently, the inhibitory effects of the extract on α -glucosidase and pancreatic lipase were investigated. The results demonstrated that the optimal conditions included an ultrasonic temperature of 70 °C, solid-liquid ratio of 1:5, and extraction time of 50 min. The resulting total flavonoid yield was 82.57 mg/g, considerably higher than that achieved by traditional ethanol extraction (23.56 mg/g). The IC_{50} values of the flavonoid extract from the peel of *C. sinensis* 'Hongjiang' (CSFE) for α -glucosidase and pancreatic lipase were 2.95 mg/mL and 28.54 mg/mL, respectively. The inhibitory effects of CSFE on pancreatic lipase were concentration-dependent between 10 and 50 mg/mL.

引文格式:

林海生, 饶梦微, 秦小明, 等. 红江橙果皮黄酮提取物对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(10): 89-96

LIN Haisheng, RAO Mengwei, QIN Xiaoming, et al. Inhibitory effects of total flavonoids extracted from the peel of *Citrus sinensis* Osbeck 'Hongjiang' on α -glucosidase and pancreatic lipase activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 89-96

收稿日期: 2022-10-20

基金项目: 广东省教育厅创新强校工程项目 (2013050214); 广东省教育厅高等学校科技创新团队项目 (2021KCXTD021)

作者简介: 林海生 (1985-), 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 农产品加工与高值化利用, E-mail: haishenglin@163.com

通讯作者: 余国师 (1983-), 男, 硕士研究生, 讲师, 研究方向: 思想政治教育和农业产业经济管理, E-mail: 597682450@qq.com

Moreover, mixed-type inhibition was observed for α -glucosidase and pancreatic lipase. These findings indicate that CSFE exhibited good inhibitory effects against α -glucosidase and pancreatic lipase, providing a theoretical foundation for future research on its hypoglycemic and weight reducing functions.

Key words: *Citrus sinensis* Osbeck ‘Hongjiang’; flavonoid extract; α -glycosidase; pancreatic lipase

糖尿病 (Diabetes Mellitus, DM) 是由胰岛素分泌缺陷或胰岛素作用障碍引起的高血糖为特征的代谢性疾病, 是危害人类健康的三大慢性疾病之一^[1]。相关数据显示, 2017 年全球糖尿病患者约为 4.2 亿, 预测 2045 年将超 6.9 亿^[2], 而我国糖尿病患者将达到 1.47 亿, 居世界首位^[3]。II 型糖尿病是糖尿病的主要类型, 人数约占总患者的 90%, 针对早期糖尿病进行血糖干预和治疗, 可以将其发病危险减低^[4]。 α -葡萄糖苷酶是影响餐后血糖浓度的关键酶, 临床上常用 α -葡萄糖苷酶抑制剂 (α -Glucosidase Inhibitors, AGI) 作为一种降糖药, 如阿卡波糖、伏格列波糖等, 其价格高且对胃肠道系统和肾脏具有副作用^[5,6]。因而, 天然辅助降血糖物质的开发和应用具有重要意义。

肥胖容易导致许多慢性疾病 (如心血管疾病、糖尿病以及癌症等) 发生的几率。胰脂肪酶是水解脂肪的关键酶, 在人体脂肪消化中发挥着重要作用, 其主要负责肠腔内 50%~70% 脂肪的水解和吸收^[7]。因此, 通过抑制胰脂肪酶能够有效减少膳食中脂肪的消化和吸收, 从而起到减肥降脂和预防肥胖相关疾病的发生。目前, 市面上主要减肥药 (如奥利司他) 存在较大的胃肠道副作用。因而, 从植物中筛选安全、高效的天然胰脂肪酶抑制剂备受关注^[8]。

目前, 已报道具有 AGI 功能的天然物质主要有: 黄酮类化合物 (Flavonoids)、萜类化合物、皂苷类化合物、多糖类化合物、膳食纤维和生物活性肽等^[9,10]。而黄酮、皂苷和萜类物质均是抑制胰脂肪酶的活性成分。其中, 黄酮类化合物作为植物次生代谢产物, 具有来源广、种类多、生物活性多样化等特点^[11,12]。研究发现, 黄酮类化合物对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制效果, 能通过改善小鼠糖耐量和降低餐后血糖浓度, 从而发挥其降血糖等功能, 且生物毒性较低。大多数黄酮类化合物 (茶叶、枸杞叶、银杏叶、木瓜皮、苦瓜、橙皮等) 均抑制胰脂肪酶活性^[7,8,13]。因此, 植物来源黄酮类化合物研究成为筛选高效 α -葡萄糖苷酶抑制剂和胰脂肪酶抑制剂的研究方向之一^[14,15]。

红江橙 (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Hongjiang) 是广东湛江地区主栽的橙类品种, 其具有产量大、多汁、风味独特等特点, 具有国宴佳果的美称。2020 年, 红江橙的种植面积达 5 507 hm², 产量达到 7 万 t, 且产量逐年增长^[16]。目前, 红江橙的研究主要集中在栽培

和疾病防治^[17], 而果实的加工利用研究较少^[18,19]。红江橙鲜食或加工成罐头、果汁等果肉产品过程, 产生的大量的果皮副产物, 大部分作为废弃物丢弃, 资源未得到很好的利用。研究表明, 柑橘果皮中富含黄酮类、多酚、香精油、多糖、类胡萝卜素、香豆素和类柠檬苦素等生物活性物质, 具有抗氧化、抗炎、抗菌、增强免疫和辅助减肥等功效^[20]。黄酮类化合物在果皮中主要以糖苷形式存在, 具有极高药用和食疗价值^[21]。然而, 对于红江橙黄酮类化合物的研究鲜有报道。

为了进一步挖掘红江橙果皮潜在的降血糖和减肥等功能, 本研究选用红江橙果皮为原料, 以黄酮提取量为主要评价指标, 采用正交试验法优化提取工艺, 并探讨黄酮提取物对 α -葡萄糖苷酶和脂肪酶的抑制作用, 为红江橙资源高值化利用提供新思路, 同时也为其在降血糖和减肥功能的深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红江橙购于廉江市广东岭南红橙有限公司 (广东省现代农业廉江红橙产业园)。

芦丁标准品 ($\geq 98\%$)、 α -葡萄糖苷酶、对硝基苯基 - α -D- 吡喃葡萄糖苷 (*p*-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranoside, *p*NPG)、4-硝基苯丁酸酯 (*p*-Nitrophenyl Butyrate, *p*NPB) 上海源叶生物科技有限公司; 胰脂肪酶美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

KQ-500DB 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; N-1100V-W 旋转蒸发器, 上海爱朗仪器有限公司; VOS-210C 真空定温干燥器, 上海爱朗仪器有限公司; UNIVERSAL 320R 台式高速冷冻离心机, 德国 Hettich 科学仪器公司; VARIOSKAN FLASH 全波长扫描式多功能酶标仪, 赛默飞世尔科技公司。

1.3 方法

1.3.1 红江橙果皮前处理

成熟的红江橙果实洗净、晾干, 剥离果皮于 65 °C 烘箱中干燥至含水量小于 5%, 样品粉碎并经过 80 目

筛子,密封贮藏干燥器中,备用。

1.3.2 单因素试验

选用 90%乙醇为提取溶剂,超声波辅助提取(功率为 240 W),考察提取时间(10、20、30、40、50 min;料液比 m/V 为 1:20,提取温度 70 ℃)、料液比(m/V) (1:5、1:10、1:15、1:20、1:25;提取温度 70 ℃,时间 30 min)和提取温度(40、50、60、70、80 ℃;料液比 m/V 为 1:20,提取时间 30 min)对黄酮提取量的影响,每组单因素试验做 3 次平行。

1.3.3 正交试验设计

基于单因素实验结果,采用三水平三因素 $L_9(3^3)$ 进行正交试验设计,优化黄酮类化合物的提取工艺,因素和水平如表 1 所示。

表 1 正交实验设计表

Table 1 Orthogonal experiment design table

水平	因素		
	A 提取温度/℃	B 提取料液比	C 提取时间/min
1	60	1:5	30
2	70	1:10	40
3	80	1:15	50

1.3.4 红江橙果皮黄酮提取物的制备

按照最佳提取条件,得到的黄酮提取液经真空浓缩和真空干燥(50 ℃)制得红江橙果皮黄酮提取物(*Citrus sinensis* Peel Flavonoids Extract, CSFE)。

1.3.5 黄酮提取量的测定方法

采用芦丁标准曲线法测定黄酮类化合物含量^[22]。以芦丁质量浓度 X ,对吸光值 Y 进行线性回归方程计算得: $y=178.6x-9.830$, $R^2=0.996\ 3$ 。样品稀释后,按照相同步骤测定 OD 值,根据回归方程计算黄酮含量,按照式(1)计算黄酮提取量。

$$E = \frac{C \times N \times V}{1000 \times m} \quad (1)$$

式中:

E ——黄酮提取量, mg/g;

C ——试样测定质量浓度, $\mu\text{g/mL}$;

N ——稀释倍数;

V ——滤液体积, mL;

m ——样品质量, g。

1.3.6 α -葡萄糖苷酶抑制率的测定

参考 Zhang 等^[15]方法稍作修改。取 110 μL 磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline, PBS, 0.1 mol/L, pH 值 6.8)于 96 孔板的微孔中,分别加入 20 μL 的样品和 α -葡萄糖苷酶溶液(2.5 U/mL),混匀后于 37 ℃ 孵育 10 min,加入 20 μL 1.25 mmol/L 的 pNPG 溶液,37 ℃ 反应 20 min 后,加入 80 μL 碳酸钠(0.10 mol/L)

终止反应。405 nm 处测定吸光值,即为样品组吸光度值。试验还分别设定样品空白组、对照组和空白组,并按式(2)计算抑制率。

$$S_1 = \left(1 - \frac{A_4 - A_3}{A_2 - A_1}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

S_1 —— α -葡萄糖苷酶抑制率, %;

A_4 ——样品组吸光度值, 样品+酶+pNPG;

A_3 ——样品空白组吸光度值, 样品+PBS+pNPG;

A_2 ——对照组吸光度值, PBS+酶+pNPG;

A_1 ——空白组吸光度值, PBS+PBS+pNPG。

1.3.7 胰脂肪酶抑制率的测定

参考王雪等^[23]方法稍加改进,分别取 50 μL 样品溶液和脂肪酶溶液(25 U/mL, 13 mmol/L tris-HCl 缓冲液配制)于 96 孔板中混匀后,于 37 ℃ 保温 10 min,再加入 50 μL 1 mg/mL pNPB 溶液,混匀后继续孵育 20 min 后,室温条件下在 405 nm 处测定其吸光度值,即为样品组吸光度值。试验还设置样品空白组、对照组和空白组,根据式(3)计算抑制率。

$$S_2 = \left(1 - \frac{A_8 - A_7}{A_6 - A_5}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

S_2 ——脂肪酶抑制率, %;

A_8 ——样品组吸光度值, 样品+酶+pNPB;

A_7 ——样品空白组吸光度值, 样品+蒸馏水+pNPB;

A_6 ——对照组吸光度值, 蒸馏水+酶+pNPB;

A_5 ——空白组吸光度值, 蒸馏水+pNPB。

1.3.8 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的半抑制浓度测定

以 CSFE 质量浓度为横坐标(1.00~40.00 mg/mL),分别以 α -葡萄糖苷酶抑制率和胰脂肪酶抑制率为纵坐标,绘制抑制率曲线,并利用回归方程计算半抑制剂浓度(Half Inhibitory Concentration, IC_{50})。分别以阿卡波糖和奥利司他作为阳性对照物。

1.3.9 α -葡萄糖苷酶抑制动力学

在 CSFE 质量浓度为 40 mg/mL 和 0 mg/mL 的条件下,分别与不同质量浓度的 α -葡萄糖苷酶溶液(0.00、20.00、40.00、60.00、80.00、100.00 mg/mL)反应,按照 1.3.6 的方法测定 405 nm 的吸光值,计算反应速率。按照 Dixon 作图法,以 α -葡萄糖苷酶浓度为横坐标,反应速率为纵坐标,确定 CSFE 对 α -葡萄糖苷酶抑制的类型。

在 CSFE 质量浓度为 40 mg/mL 和 0 mg/mL 的条件下,加入 2.50 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶溶液,反应后分别加入不同浓度 PNPB 溶液(0.25、0.50、0.75、1.00、

1.25 mmol/L), 按照 1.3.6 的方法测定 405 nm 处的吸光值并计算反应速率。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法, 以底物浓度的倒数 ($1/[S]$) 为横坐标, 反应速率的倒数 ($1/V$) 为纵坐标, 绘制双倒数曲线, 分别求出米氏亲和常数 (K_m)、最大反应速率 (V_{max}) 和解离常数 (K_i), 确定 CSFE 对 α -葡萄糖苷酶可逆抑制的类型。

1.3.10 胰脂肪酶抑制动力学

在 CSFE 质量浓度为 40 mg/mL 和 0 mg/mL 的条件下, 加入不同质量浓度胰脂肪酶溶液 (0.00、25、50、75、100、125 mg/mL), 按照 1.3.7 的方法测定 405 nm 的吸光值, 计算反应速率。按照 Dixon 作图法, 以胰脂肪酶浓度为横坐标, 反应速率为纵坐标, 确定 CSFE 对胰脂肪酶抑制的类型。

在 CSFE 质量浓度为 40 mg/mL 和 0 mg/mL 的条件下, 加入 0.25 mg/mL 的胰脂肪酶溶液, 反应后分别加入不同质量浓度的 pNPB 溶液 (0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/mL), 按照 1.3.7 的方法测定 405 nm 的吸光值。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法, 以底物浓度的倒数 ($1/[S]$) 为横坐标, 反应速率的倒数 ($1/V$) 为纵坐标, 绘制双倒数曲线, 分别求出米氏亲和常数 (K_m)、最大反应速率 (V_{max}) 和解离常数 (K_i), 确定 CSFE 对胰脂肪酶可逆抑制的类型。

1.3.11 数据分析

所有实验均重复三次, 实验数据采用 Excel 软件进行统计分析, 采用 Origin 2017 作图。定量数据采用“平均值 $\pm$ 标准差”表示。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

由图 1 可知, 随着提取时间的延长, 黄酮提取量明显增加; 相比于传统乙醇浸提法, 超声辅助提取 30、40 和 50 min, 能明显提高黄酮的提取量, 分别提高 10.59%、22.86% 和 29.90%。当提取时间超过 40 min 后, 黄酮提取量无明显提高。超声辅助溶剂提取技术能够利用超声波产生的空化效应、机械振动、热效应等多级效应作用, 加剧细胞的破碎程度, 有利于黄酮类物质的溶出, 从而提高黄酮类物质的提取量^[11,24,25]。因而, 选择超声辅助提取法进行进一步实验, 考虑时间和成本, 选 30 min 作其他因素考察条件。

由图 2 可知, 红江橙果皮黄酮提取量含量随着提取温度的升高而不断增加, 当温度超过 70 °C (提取量达到 19.03 mg/g), 黄酮提取量无上升趋势。黄酮类化合物在乙醇中的溶解度随着温度的升高而增加,

同时, 温度提高导致提取溶剂的扩散系数增大, 促使提取速度加快。但温度过高, 容易导致部分黄酮类物质被氧化^[11]。因此, 考虑到实际生产情况, 选择提取温度为 60~80 °C 间作为工艺优化范围。

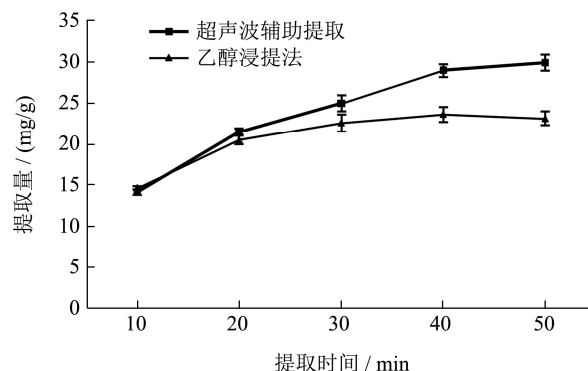


图 1 时间和提取方式对黄酮提取量的影响

Fig.1 Effect of extraction time and extraction method on the total flavonoids extraction yield

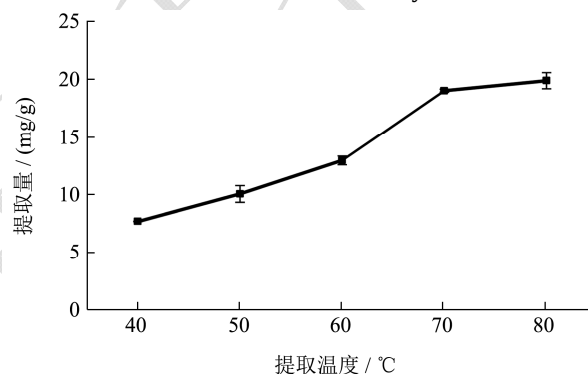


图 2 温度对红江橙果皮黄酮提取量的影响

Fig.2 Effect of temperature on the total flavonoids extraction yield

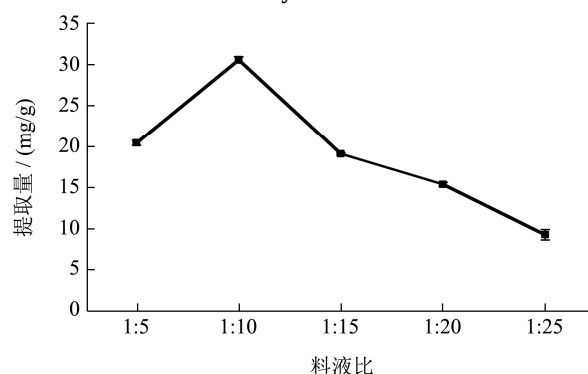


图 3 料液比对黄酮提取量的影响

Fig.3 Effect of solid-liquid ratio on the total flavonoids extraction yield

从图 3 可以看出, 红江橙果皮黄酮提取量含量随着提取料液比的增加出现先上升后下降, 当提取料液比在 1:10 时, 红江橙果皮黄酮提取量含量达到最高值 30.58 mg/g, 随着料液比的提高, 提取量不断下降, 该结果与王苡琄等^[26]研究金花葵中总黄酮提

取因素的结果相似。合适的料液比，能够使果皮粉颗粒与溶剂充分接触，使细胞更容易受到超声波产生的“空化”效应撞击，更好地溶出黄酮类化合物。但随着料液比进一步增大，更多的多糖杂质也溶出，多糖等杂质容易对黄酮产生吸附沉淀作用，从而引起黄酮提取率降低^[27]。

2.2 正交实验结果

在单因素试验的基础上，以提取温度（A）、提取料液比（B）、提取时间（C）为黄酮化合物提取工艺的影响因子，以黄酮化合物提取量作为参考的指标，采用3因素3水平的分析方法来进行优化，从中得到提取最佳工艺的提取条件。正交试验的实验设计见表1，正交实验结果见表2。

由表2中可知，影响红江橙果皮黄酮提取量因素的主次顺序为：B（提取料液比）>A（提取温度）>C（提取时间）。黄酮提取的最佳提取条件是A₂B₁C₃，即提取温度为70℃、料液比为1:5、提取时间为50 min。该条件下验证试验结果显示，红江橙的黄酮提取量为82.57 mg/g，与正交实验结果相符合。本研究工艺得到的红江橙果皮提取量远远高于传统乙醇浸提法（23.56 mg/g）（图1）。相关文献报道，柑橘类果皮的总黄酮提取量在29.87~69.13 mg/g之间^[22,28,29]。由此可见，红江橙果皮比其他柑橘类果皮提取的总黄酮含量更高，更具有研究和现实利用价值。综上，超声波辅助能够显著提高红江橙果皮黄酮提取量，正交试验优化后的黄酮提取效果最佳。

表2 红江橙果皮黄酮提取正交实验结果

Table 2 Extraction of flavonoids from peel of *Citrus sinensis* cv. Hongjiang by orthogonal experiment

试验号	A 提取温度	B 提取料液比	C 提取时间	提取量 (mg/g)
1	1	1	1	64.25
2	1	2	2	53.76
3	1	3	3	49.20
4	2	1	2	69.48
5	2	2	3	62.81
6	2	3	1	49.64
7	3	1	3	60.88
8	3	2	1	55.94
9	3	3	2	30.84
k1	55.73	64.87	56.61	
k2	60.64	57.50	51.36	
k3	49.22	43.23	57.63	
极差 R	11.42	21.64	6.27	

2.3 CSFE对α-葡萄糖苷酶和胰脂肪酶抑制活性

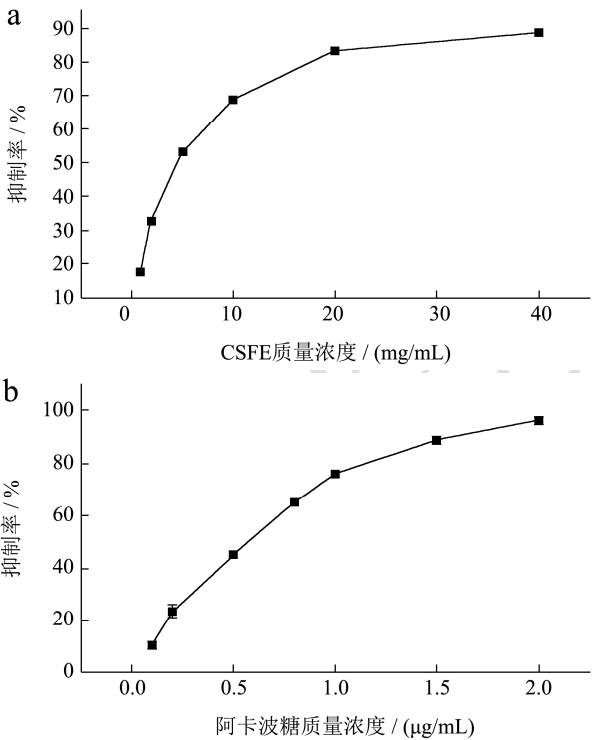


图4 CSFE及阿卡波糖对α-葡萄糖苷酶的抑制活性

Fig.4 Inhibitory effect of CSFE and acarbose on the activity of α-glucosidase

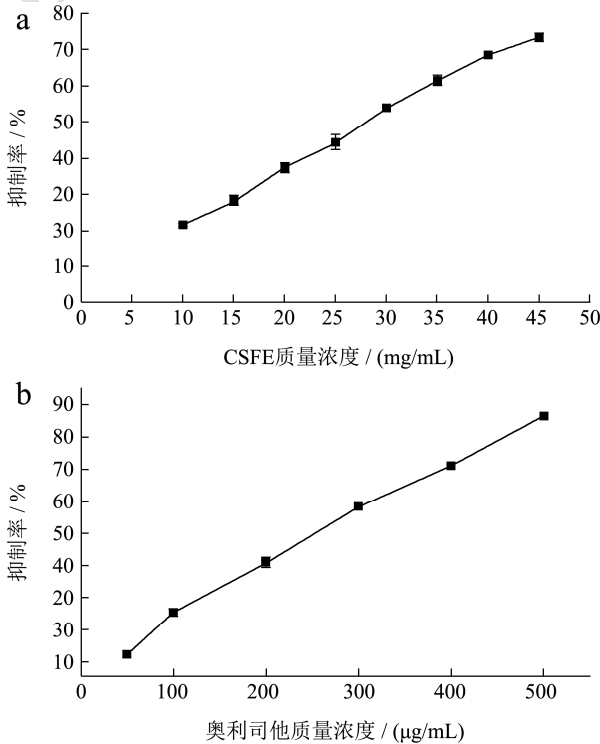


图5 CSFE及奥利司他对胰脂肪酶的抑制活性

Fig.5 Inhibitory effect of CSFE and orlistat on the activity of pancreatic lipase

如图4所示，最优工艺条件下制得的红江橙果皮黄

酮提取物 CSFE 对 α -葡萄糖苷酶具有明显的抑制作用。在 10~20 mg/mL 质量浓度范围内, α -葡萄糖苷酶抑制率随 CSFE 质量浓度增加不断升高, 呈现出较好的量效依赖性。当质量浓度达到大于 20 mg/mL 时, 抑制率逐渐趋于平缓。经非线性拟合, 得到回归方程为: $y=16.75x+0.618$ ($R^2=0.996$), CSFE 对 α -葡萄糖苷酶的半抑制质量浓度 IC_{50} 值为 2.95 mg/mL, 高于已报道的桑黄醇提取物 (IC_{50} 为 0.43 mg/mL)^[30], 而低于百香果果皮提取物 (IC_{50} 为 6.23 mg/mL)^[31]。由于 CSFE 为粗提取, 其 IC_{50} 值远远高于阳性对照阿卡波糖 (IC_{50} 为 0.60 μ g/mL), CSFE 中的黄酮成分仍需要进行进一步纯化。

由图 5a 可知, CSFE 对胰脂肪酶具有一定的抑制作用。随着 CSFE 质量浓度的增加, 对胰脂肪酶抑制率升高, 具有较好的量效关系。经拟合得到回归方程: $y=1.544x+5.913$ ($R^2=0.996$)。CSFE 对胰脂肪酶的 IC_{50} 为 28.54 mg/mL, 大于已报道的刺玫果总黄酮 (IC_{50} 为 0.659 mg/mL)^[32]和阳性对照组 (奥利司他, IC_{50} 为 0.266 9 μ g/mL) (图 5b), 表明 CSFE 对胰脂肪酶的抑制活性相对较弱。

2.4 CSFE 对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶抑制动力学

抑制剂与酶的作用方式有可逆抑制和不可逆抑制两种类型。由图 6 可知, 当反应体系中有抑制剂 (CSFE 质量浓度为 40 mg/mL) 存在时, 其速率直线通过原点, 由此可推断 CSFE 作为抑制剂对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制类型为可逆性抑制。黄酮类化合物通过氢键、疏水作用等作用力与酶结合影响酶的活性, 当黄酮化合物与酶的活性中心部位结合时, 抑制类型为竞争性抑制; 与酶的非活性部位结合时, 抑制类型为非竞争性抑制^[33]。图 7 为 CSFE 分别抑制 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的双倒数 Lineweaver-Burk, 由此可见, 不同质量浓度的 CSFE (40 mg/mL 和 0 mg/mL) 分别抑制 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的双倒数曲线图交于第三象限, 为非竞争性抑制和反竞争性抑制的混合型抑制^[34-36]。上述结果表明, CSFE 可通过氢键、疏水作用等作用力与 α -葡萄糖苷酶或胰脂肪酶的活性中心结合, 也可与 α -葡萄糖苷酶与底物复合物或胰脂肪酶与底物的复合物结合, 从而起到抑制酶的活性。

综上, 红江橙果皮黄酮提取物 CSFE 对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶具有良好的抑制活性, 具有开发 α -葡萄糖苷酶抑制剂和胰脂肪酶抑制剂的潜力。为进一步探讨其降糖和降脂活性, 还需要对 CSFE 进行分离纯化, 并建立高脂饲料诱导食源性肥胖大鼠模型和高血糖小鼠模

型, 研究 CSFE 的抗肥胖作用及辅助降血糖功能活性。

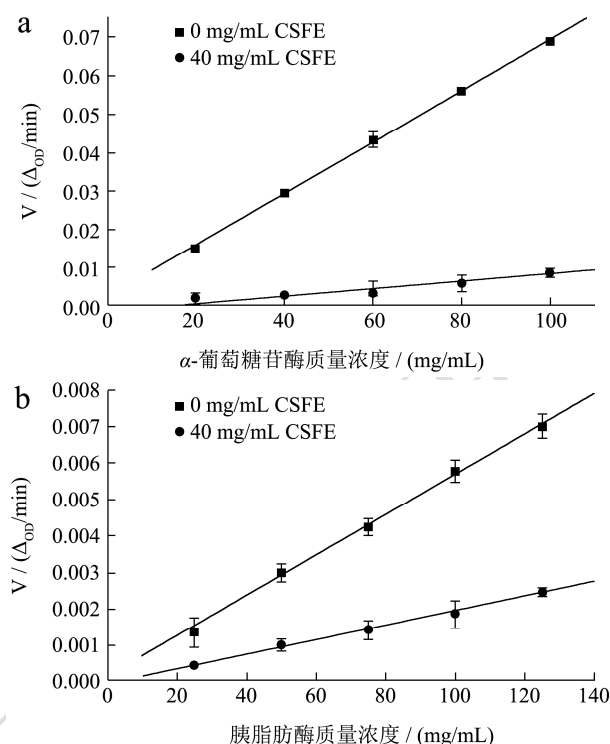


图 6 CSFE 对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制动力学曲线

Fig.6 Kinetic curves of inhibition of α -glucosidase and pancreatic lipase by CSFE

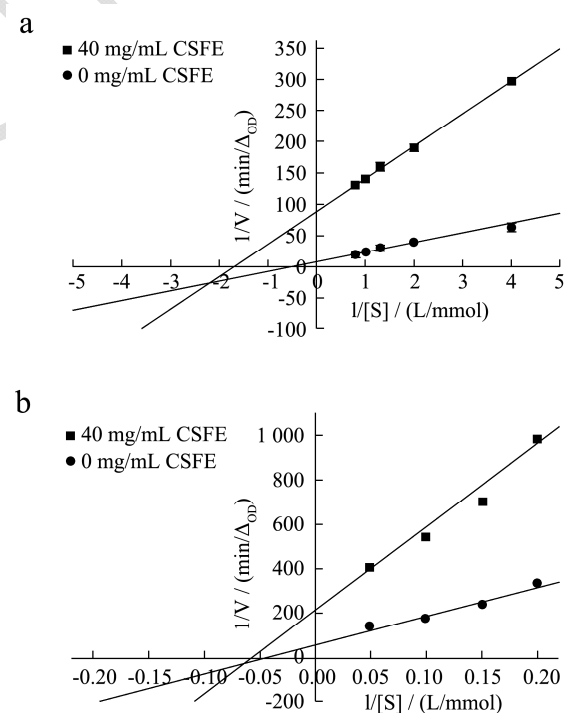


图 7 CSFE 对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶作用的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.7 Lineweaver-Burk plots of CSFE against α -glucosidase and pancreatic lipase

注: a: α -葡萄糖苷酶; b: 胰脂肪酶。

3 结论

采用超声辅助溶剂提取红江橙果皮中的黄酮化合物,通过正交实验设计优化提取工艺,其最优条件为提取温度为 70 ℃、提取料液比为 1:5、提取时间为 50 min,提取料液比为影响提取效率的最主要因素。最佳条件下,黄酮提取率为 82.60 mg/g。红江橙果皮黄酮提取物 CSFE 对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的 IC₅₀ 值分别为 2.95 mg/mL 和 28.54 mg/mL;在一定质量浓度范围内,抑制活性均呈现明显的质量浓度依赖性;抑制类型均为混合型抑制。研究结果表明,CSFE 具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性和脂肪酶抑制活性。本研究为红江橙资源综合利用及高值化加工提供新思路,也红江橙果皮黄酮化合物在降血糖和减肥功能的深入研究提供依据。

参考文献

- [1] 孙晶,魏静,杨洋,等.茄皮提取物对糖尿病小鼠的降血糖作用[J].现代食品科技,2022,38(9):10-17.
- [2] Mejía E V, Batista K A, Fernández J J A, et al. Antihyperglycemic and hypoglycemic activity of naturally occurring peptides and protein hydrolysates from easy-to-cook and hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Food Research International, 2019, 121: 238-246.
- [3] 李文娟,吴伟,万敏,等.木姜叶柯降血糖作用研究进展[J].现代食品科技,2022,38(4):292-297,281.
- [4] 杨玉洁,刘静宣,谭艳,等.多糖降血糖活性构效关系及作用机制研究进展[J].食品科学,2021,42(23):355-363.
- [5] Zaman A G, Aleem Q, Ahmed R. Reducing cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Medicine, 2019, 47(2): 72-76.
- [6] 邹丽超,张琳依,梁馨元,等.天然活性成分对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(6):2276-2282.
- [7] 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.
- [8] 裴文清,吕沛楠,王靖宇,等.木瓜皮多酚和黄酮提取工艺优化及酪氨酸酶与胰脂肪酶抑制活性研究[J].食品工业科技,2022,43(1):188-195.
- [9] 金斐,朱丽云,高永生,等.植物源活性成分降血糖作用及其机理研究进展[J].食品科学,2021,42(21):322-330.
- [10] 林海生,廖津,秦小明,等.华贵栉孔扇贝闭壳肌酶解物的辅助降血糖功能活性评价[J].上海海洋大学学报,2023,32(4): 865-873
- [11] 赵云韵,杨心怡,王申萌,等.超声波协同高剪切法高效提取树莓果渣黄酮及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J].现代食品科技,2019,35(5):220-227.
- [12] 黄睿,沈淑好,陈虹霖,等.柑橘类黄酮的生物学活性及提高生物利用度技术研究进展[J].食品科学,2019,40(1):319-326.
- [13] 郭子雨,姚雨含,刘涛,等.植物来源的胰脂肪酶抑制剂研究进展[J].食品研究与开发,2021,42(8):212-217.
- [14] Yang J C, Wang X L, Zhang C Y, et al. Comparative study of inhibition mechanisms of structurally different flavonoid compounds on alpha-glucosidase and synergistic effect with acarbose [J]. Food Chemistry, 2021, 347(15): 129056.
- [15] Zhang H L, Wu Q X, Qin X M et al. *Camellia nitidissima* Chi flower extracts inhibit α -amylase and α -glucosidase: In vitro by analysis of optimization of addition methods, inhibitory kinetics and mechanisms [J]. Process Biochemistry, 2019, 86: 177-185.
- [16] 宋时艳,刘俊显.廉江红橙产业发展模式探讨[J].南方农业, 2021,15(25):103-106.
- [17] 赵丽宏,刘建荣,张曼其,等.湛江农垦红江橙主产区 2 个果园黄龙病的巢式 PCR 检测分析[J].热带农业科学,2020,40(1):67-71.
- [18] Li K, Xia Y, Li F, et al. Comparative analysis of volatile compounds in five *Citrus cultivars* with HS-SPME-GC-MS [J]. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 2020, 57(4): 1203-1209
- [19] 高倩. β -葡萄糖苷酶的提取纯化及其改善廉江红橙果汁风味的研究[D].湛江:广东海洋大学,2017.
- [20] 韩丹丹.柑橘果皮中多甲氧基黄酮的提取、分离及抗氧化活性研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2016.
- [21] Folake L O, Seun F A, Iyabo F O. A comparative study on the estimated glycemic index (eGI), phenolic constituents, antioxidative and potential antihyperglycemic effects of different parts of ripe *Citrus paradisi* fruit [J]. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 2019, 19(1): 81-89.
- [22] 黄运红,高兴强,黎伟伟,等.超声波提取脐橙皮黄酮类化合物的工艺研究[J].食品科学,2009,30(16):102-105.
- [23] 王雪,南敏伦,白雪,等.刺囊酸衍生物的合成及其对脂肪酶的抑制作用[J].中国实验方剂学杂志,2015,25(20):125-130.
- [24] 张冬冬,徐迪,洪伟.超声提取柑橘皮中总黄酮的研究[J].农产品加工,2017,32(10):1-3.
- [25] 张会香,杨世军,蓝华生,等.超声波辅助法提取百香果壳中黄酮的工艺及其抗氧化性研究[J].食品研究与开发,2020, 41(1):123-129.
- [26] 王苡瑄,殷萌,韩颖妍,等.响应曲面法优化金花葵中总黄酮超声提取工艺研究[J].黑龙江科学,2020,11(20):14-17.
- [27] 刘细祥,史兵方.正交优化超声提取红豆中总黄酮工艺研究

- [J].粮食与油脂,2013,26(12):43-47.
- [28] 范晓伟,冉露,郭箐,等.离子液体结合超声辅助和双水相萃取提取分离柑橘果皮中黄酮类化合物[J].食品科学,2020,41(10):265-271.
- [29] 李煜,韩春然,黄赫雁,等.红豆越橘中总黄酮的提取及抑菌性质研究[J].食品研究与开发,2017,38(13):69-74.
- [30] 李雨鸿,殷朝敏,范秀芝,等.桑黄提取物的体外抗氧化、降血糖及降尿酸活性[J].现代食品科技,2022,38(5):71-80.
- [31] 种俸亨,黄子珍,滕建文,等.百香果皮体外抑制葡萄糖吸收、抗氧化及调节高血糖大鼠肠道菌群结构的作用[J].食品科学,2021,42(5):193-200.
- [32] 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):64-70,76.
- [33] 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.
- [34] 朱娟娟,尹忠平,陈继光,等.微量 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型及抑制类型的判断方法[J].现代食品科技,2016,32(12):164-170,157.
- [35] 肖会芝.天然多酚对胰蛋白酶和 α -葡萄糖苷酶抑制机制的研究[D].重庆:重庆大学,2016.
- [36] 魏爱红,李晓虹,曾煌,等.枇杷抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性部位的筛选及其酶动力学分析[J].食品与发酵工业,2023,49(5):53-59.