

孙嘉莉, 江峻峰, 牟晓娟, 等. 沙棘果皮渣总黄酮的纯化、成分分析及对胰脂肪酶的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(19): 206-215. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110077

SUN Jiali, JIANG Junfeng, MOU Xiaojuan, et al. Purification and Component Analysis of Total Flavonoids from Sea Buckthorn Peel Residue and Its Anti-Pancreatic Lipase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(19): 206-215. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110077

· 工艺技术 ·

# 沙棘果皮渣总黄酮的纯化、成分分析及对胰脂肪酶的抑制作用

孙嘉莉<sup>1</sup>, 江峻峰<sup>1</sup>, 牟晓娟<sup>1</sup>, 宗泽慧<sup>1</sup>, 闫思语<sup>1</sup>, 加拉力丁·热木扎<sup>2</sup>, 包晓玮<sup>1,\*</sup>

(1.新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052;

2.新疆工业经济学校粮油食品工程系, 新疆乌鲁木齐 830013)

**摘要:**为了明确沙棘果皮渣中总黄酮纯化物(TFSE)对胰脂肪酶的抑制作用, 本文通过静态及动态吸附解析实验, 优化了 AB-8 大孔树脂纯化沙棘果皮渣总黄酮粗提物(TFCE)的条件; 采用超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术(UPLC-Q-MS)分析 TFSE 组成成分; 对硝基苯基丁酸酯法结合酶反应动力学探究 TFSE 对胰脂肪酶抑制效果及抑制类型。结果表明, AB-8 大孔树脂最佳纯化条件为上样液浓度 2.2 mg/mL、上样液 pH 5.0、上样体积 140 mL, 上样流速 1.0 mL/min; 洗脱液乙醇体积分数 75%、洗脱剂用量 120 mL、洗脱流速 1.5 mL/min, 在此条件下分离纯化, TFSE 纯度由 9.786% 提高到 50.204%; 从 TFSE 中鉴定出 39 种酚类化合物, 以芦丁、儿茶素、槲皮素-3-O-葡萄糖苷等黄酮类化合物为主; TFSE 对胰脂肪酶有较好的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 值为 12.46 mg/mL, 并通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法测出其抑制类型为非竞争性抑制, 抑制常数 K<sub>i</sub>=10.21 mg/mL。TFSE 具有良好的胰脂肪酶抑制活性, 对于提高沙棘果皮渣产品的附加值具有重要意义。

**关键词:**沙棘果皮渣, 总黄酮, 超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术, 纯化, 胰脂肪酶, 抑制作用

中图分类号: TS201.4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)19-0206-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110077



本文网刊:

## Purification and Component Analysis of Total Flavonoids from Sea Buckthorn Peel Residue and Its Anti-Pancreatic Lipase

SUN Jiali<sup>1</sup>, JIANG Junfeng<sup>1</sup>, MOU Xiaojuan<sup>1</sup>, ZONG Zehui<sup>1</sup>, YAN Siyu<sup>1</sup>,

JIALALIDING·Remuzha<sup>2</sup>, BAO Xiaowei<sup>1,\*</sup>

(1.School of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2.Department of Grain, Oil and Food Engineering, Xinjiang Institute of Technology and Economics,

Urumqi 830013, China)

**Abstract:** In order to clarify the inhibition of total flavonoids purified extract (TFSE) of sea buckthorn peel residue on pancreatic lipase, this research optimized the purification condition of total flavonoids crude extract (TFCE) of sea buckthorn peel residue using AB-8 macroporous resin by means of static and dynamic adsorption and desorption experiment. Ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-MS) was used to analyze the component of TFSE. In addition, the inhibitory effect and types of TFSE on pancreatic lipase were explored through the method of nitrophenyl butyrate combined with enzymatic reaction kinetics. The results showed that the optimal purification conditions for AB-8 macroporous resin were a sample concentration of 2.2 mg/mL, a sample pH of 5.0, a sample volume of 140 mL, and a sample flow rate of 1.0 mL/min. The volume fraction of ethanol was 75% with the eluent being 120 mL and the elution flow rate being 1.5 mL/min. After separation and purification under these conditions, the

收稿日期: 2023-11-09

基金项目: 自治区重点研发计划项目(2022B02005-4)。

作者简介: 孙嘉莉(1998-),女,硕士研究生,研究方向:食品营养与安全,E-mail: 1527087054@qq.com。

\* 通信作者: 包晓玮(1969-),女,博士,教授,研究方向:食品营养与安全,E-mail: 408531623@qq.com。

purity of TFSE increased from 9.786% to 50.204%. The total of 39 phenolic compounds were identified from TFSE with flavonoids like rutin, catechins, and quercetin-3-O-glucoside being the main compounds. TFSE had a strong inhibition on pancreatic lipase with the  $IC_{50}$  being 12.46 mg/mL. In addition, the inhibition type was determined to be non-competitive inhibition by using double reciprocal plot method of Lineweaver-Burk with an inhibition constant  $K_i$  being 10.21 mg/mL. TFSE has better inhibitory activity on pancreatic lipase, which is of great significance for improving the added value of sea buckthorn peel residue products.

**Key words:** sea buckthorn peel residue; total flavonoids; ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry; purification; pancreatic lipase; inhibition

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.) 隶属胡颓子科沙棘属, 是一种具有重要生态和经济价值的多年生落叶灌木或小乔木, 具有药食同源性。沙棘中的天然活性成分因其天然来源、结构多样、副作用小、高效等其他优点对高脂血症、心血管疾病和动脉粥样硬化等疾病有良好的治疗作用, 受到人们的广泛青睐<sup>[1]</sup>。目前, 沙棘加工主要以果实精深加工为主, 而作为副产物的沙棘果皮渣被当作饲料或丢弃, 不仅造成资源浪费, 对环境还产生一定污染<sup>[2]</sup>。这些果皮渣富含黄酮、多酚、膳食纤维等多种生物活性物质, 其中的黄酮类化合物作为果皮渣中的主要活性成分, 具有降血脂、抗氧化和保护肝脏等多种生物活性, 可提取开发多种高附加值的产品, 从而加强沙棘综合利用, 提高沙棘产业经济效益<sup>[3]</sup>。目前已有的分离纯化黄酮技术主要有超临界萃取法、膜过滤法、柱层析法等<sup>[4]</sup>。在多种纯化方法中大孔树脂具有操作简便、理化性质稳定、环保、能较好保持化合物原本活性等优点<sup>[5]</sup>, 故选择大孔树脂法对沙棘果皮渣黄酮进行初步分离纯化, 对解决沙棘果皮渣的资源浪费问题具有重要意义。

已知人体过量摄入脂肪会造成脂质代谢紊乱, 由此引发高脂血症等一系列心脑血管疾病。胰脂肪酶是甘油三酯在胃肠道水解的关键酶, 抑制其活性可减少食物中摄入脂肪的水解和吸收, 有效地改善肥胖等各种慢性病<sup>[6]</sup>。奥利司他作为一种特异性的胃肠道脂肪酶抑制剂, 主要是通过抑制甘油三酯的吸收来治疗肥胖, 但会引起一系列胃肠道不适的副作用<sup>[7]</sup>。目前, 研究人员的重点是寻找脂肪酶活性的天然抑制剂<sup>[8]</sup>。研究发现天然胰脂肪酶抑制剂通常来源于药用植物、蔬菜、水果中含有的天然活性化合物以及微生物代谢产物、真菌等<sup>[9-10]</sup>。在不同的植物代谢产物中, 黄酮类化合物对胰脂肪酶的抑制作用更为突出。如 HONG 等<sup>[11]</sup> 发现大豆叶中香叶木素和黄豆黄素这两种黄酮类化合物是胰脂肪酶的竞争抑制剂。HUANG 等<sup>[12]</sup> 对不同柑橘皮中的黄酮类化合物进行研究, 发现黄酮类化合物主要是通过影响胰脂肪酶的原始构象和活性位点, 有效地抑制胰脂肪酶的体外活性。而沙棘果皮渣中总黄酮纯化物(TFSE)作为天然植物活性成分, 关于其对胰脂肪酶的抑制作用尚未见报道, 因此研究 TFSE 对胰脂肪酶活性的影响, 可为开发具有调节脂代谢紊乱的功能因子提供新的思路,

同时为指导沙棘果皮渣的精深加工利用提供新的途径。

本实验采用 AB-8 大孔树脂对沙棘果皮渣的纯化工艺参数进行优化, 研究静态吸附和动态吸附过程中影响沙棘果皮渣总黄酮吸附效果的因素, 借助 UPLC-Q-MS 联用技术对 TFSE 的结构进行鉴定, 并研究其对胰脂肪酶的抑制作用, 以期为提高新疆沙棘果皮渣产品的附加值与促进天然的降血脂保健食品的开发提供必要的理论基础和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

沙棘果皮渣 新疆阿勒泰地区慧华生物科技有限公司; 芦丁标准品(HPLC $\geq$ 98%)、三羟甲基氨基甲烷 上海蓝季生物科技有限公司; 猪胰脂肪酶(Type II,  $\geq$ 125 U/mg)、奥利司他( $\geq$ 98%)、4-硝基苯丁酸酯( $\geq$ 98%)、对硝基苯酚 美国 Sigma-Aldrich 公司;  $\alpha$ -萘酚 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; AB-8 大孔树脂 天津市光复精细化工研究所; 甲醇、乙腈、乙酸 色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

UV-2700 紫外分光光度计 日本岛津公司; Y0062 电子天平 赛多利斯科学仪器北京有限公司; STGL-18M 离心机 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; ALPHA2-4 LSCplus 冷冻干燥机 德国 Martin Christ 公司; Bio-rad xMark 酶标仪 美国伯乐公司; 16 $\times$ 200 mm 层析柱 瑞达恒辉; FE20 pH 计 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; BT100N 蠕动泵 保定申辰泵业有限公司; BSZ-100 自动部分收集器 上海嘉鹏科技有限公司; Q Exactive 超高效液相色谱、Vanquis 超高压液相色谱仪 美国赛默飞世尔科技公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 沙棘果皮渣总黄酮粗提物(TFCE)的制备 根据本实验室前期对提取条件的优化, 得到 TFCE 的制备方法。将沙棘果皮渣过 40 目筛, 精确称量 2.0 g 后加入体积分数 59% 的乙醇, 在液料比 40 mL/g, 超声温度 59  $^{\circ}$ C, 超声时间 39 min 条件下结合超声波辅助提取, 合并两次提取液减压浓缩后蒸至浸膏状, 得到 TFCE, 在 4  $^{\circ}$ C 冷藏备用。

1.2.2 沙棘果皮渣总黄酮含量的测定 参照陈燕玲<sup>[13]</sup> 的比色法, 绘制芦丁标准曲线。配制浓度

0.2 mg/mL 的芦丁标准溶液, 所得的标准曲线为:  $y=12.04x+0.0028$ ,  $R^2=0.9996$ 。在 0~0.048 mg/mL 范围内线性关系良好。取“1.2.1”的提取物按上述方法于 510 nm 测定吸光值。总黄酮含量计算公式计算如下:

$$\text{沙棘果皮渣总黄酮含量(mg/g)} = \frac{\text{测得质量浓度(mg/mL)} \times \text{稀释倍数} \times \text{提取液体积(mL)}}{\text{沙棘果皮渣质量(g)}}$$

### 1.2.3 AB-8 大孔树脂纯化 TFCE

1.2.3.1 大孔树脂预处理 参考文献 [14], 选择 AB-8 大孔树脂进行精制 TFCE 的研究, 其预处理方法参照文献 [15]。

1.2.3.2 静态吸附与解析附动力学曲线 准确称取 1 g 湿树脂, 加入 50 mL 质量浓度为 1.65 mg/mL 的样液, 避光密封, 并置恒温振荡器中, 在 30 °C 条件下, 以 120 r/min 振荡 12 h, 根据公式计算吸附率。将吸附饱和的树脂洗至洗出液无色为止, 加入 50 mL 95% 乙醇振荡 9 h, 根据公式计算解析率。

1.2.3.3 AB-8 大孔树脂对沙棘果皮渣总黄酮的静态吸附与解析性能的影响 按照“1.2.3.2”所述方法, 研究总黄酮质量浓度 (0.66、1.1、1.65、2.2、2.75、3.3 mg/mL)、pH(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0) 对 AB-8 大孔树脂吸附效果的影响, 根据公式计算吸附率、吸附量; 按照优选的吸附条件进行吸附, 吸附饱和经水洗后加入 50 mL 洗脱液, 置于恒温培养箱中振荡 4 h, 研究洗脱液乙醇体积分数 (35%、45%、55%、65%、75%、85%、95%) 对洗脱效果的影响。收集流出液, 前 10 mL 弃去, 测定总黄酮浓度, 根据公式计算总黄酮解析率、解析量。

$$\text{吸附量(mg/g)} = \frac{(P_1 - P_2)V_1}{M}$$

$$\text{吸附率(\%)} = \left( \frac{P_1 - P_2}{P_1} \right) \times 100$$

$$\text{解析量(mg/g)} = \frac{P_3 V_2}{M}$$

$$\text{解析率(\%)} = \left( \frac{P_3 V_2}{(P_1 - P_2)V_1} \right) \times 100$$

式中:  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$  分别表示原料液、流出液和洗脱液的总黄酮质量浓度 (mg/mL);  $V_1$ 、 $V_2$  表示原料液和洗脱液的体积 (mL);  $M$  为大孔树脂质量 (g)。

1.2.3.4 动态吸附泄漏曲线制备 准确称取 10 g 湿树脂进行湿法装柱, 待层析柱吸附平衡后, 根据“1.2.3.3”节中最佳工艺优化所得条件以 1.0 mL/min 流速进行上样, 每 10 mL 收集 1 管, 分段收集流出液, 测定总黄酮含量。以总黄酮质量浓度 (mg/mL) 为纵坐标, 洗脱管数为横坐标绘制动态吸附泄漏曲线<sup>[16]</sup>。

1.2.3.5 AB-8 大孔树脂对沙棘果皮渣总黄酮的动态吸附与解析性能的影响 按照“1.2.3.4”所述方法, 分

别以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min 的流速通过, 确定最佳上样流速。按照优选的吸附条件进行吸附, 吸附饱和后以 1.0 mL/min 的速度经去离子水洗脱, 直至洗脱液不发生 Molish 反应, 确定最佳水洗体积。水洗后用 75% 乙醇溶液进行洗脱, 分别将洗脱流速调为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min, 确定最佳洗脱流速, 绘制动态上样和洗脱曲线。

1.2.3.6 验证实验 将收集的洗脱液合并后旋转浓缩至无醇味, 于真空冷冻干燥机上冻干, 根据公式计算纯化前后黄酮类物质纯度差异。

$$\text{纯度(\%)} = \frac{\text{黄酮类化合物浓度(mg/mL)} \times \text{溶液体积(mL)}}{\text{干燥后样品质量(mg)}} \times 100$$

### 1.2.4 UPLC-Q-MS 分析 TFSE 成分

1.2.4.1 供试品溶液的配制 精密称取 50.5 mg TFSE 至离心管中, 加入 0.5 mL 80% 甲醇水溶液 (含 0.2% 维生素 C), 涡旋混匀, 室温超声提取 30 min, 以 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 重复提取两次, 将两次上清液合并混匀, 稀释 5 倍后经 0.22 μm 滤膜过滤作为供试品溶液, 待上机检测。

1.2.4.2 系列混合标准品溶液的配制 分别精密称取实验所需标准品, 加入甲醇配成 10 mg/mL 单标母液, 取适量单标母液混合配制成 1、10 或 20 μg/mL 的混合标准品溶液保存备用。根据下列浓度范围将混合标准品溶液配制成为系列混合标准品使用溶液待上机检测: 没食子酸、4-羟基苯甲酸、儿茶素、香草酸、表儿茶素、二氢杨梅素、香草醛、芦丁、水杨酸、牡荆素、反式阿魏酸、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、二氢槲皮素、苯甲酸、山奈酚-3-O-葡萄糖苷、二氢山奈酚、木犀草素、槲皮素、氯化肉桂酸、反式肉桂酸、柚皮苷查尔酮、柚皮素、芹菜素、山奈酚、异鼠李素浓度范围为 0.001~0.5 μg/mL; 原儿茶酸、原儿茶醛、邻苯二甲酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、丁香醛、芥子酸、木犀草苷、4',5,7-三羟异黄酮-7-糖苷、白藜芦醇、大豆甙元、根皮素、异甘草素浓度范围为 0.01~5 μg/mL, 棉酚浓度范围为 0.02~10 μg/mL。

1.2.4.3 色谱条件 参考文献 [17-18], 对 UPLC-Q-MS 分析 TFSE 成分的程序略作修改, 色谱柱: Waters HSS T3 (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A 相超纯水 (含 0.1% 甲酸), B 相乙腈 (含 0.1% 甲酸); 洗脱梯度: 0~2 min, A: 90%; 2~6 min, A: 90%~40%; 6~9 min, A: 40%; 9~9.1 min, A: 40%~90%; 9.1~12 min, A: 90%; 进样量 2 μL; 流速 0.3 mL/min; 柱温 40 °C。

1.2.4.4 质谱条件 扫描模式为单离子检测 (SIM) 模式; 扫描方式为负离子。一级扫描范围 (m/z): 100~900, 离子喷雾电压为 -2800 V; 鞘气 40 arb; 辅助气 10 arb; 温度 350 °C; 离子传输管温度 320 °C。

### 1.2.5 TFSE 对胰脂肪酶的抑制作用

1.2.5.1 PNP (对硝基苯酚) 标准曲线绘制 称取 0.07 g PNP 用 Tirs-HCl 缓冲液 (0.1 mol/L, 5 mmol/L

CaCl<sub>2</sub>, pH7.0, 下同)配制成浓度为 5 mmol/L 的母液, 将其稀释成不同浓度, 各取 200 μL 至 96 孔板中, 于 405 nm 波长处测定吸光度, 以 PNP 浓度为横坐标, 对应吸光度为纵坐标绘制标曲, 得到回归方程为  $y=6.471x+0.0202$ ,  $R^2=0.9999$ 。

1.2.5.2 纯化组分对胰脂肪酶活性抑制率的测定参考晏幸等<sup>[19]</sup>的方法稍作修改。将胰脂肪酶溶于 Tri-HCl 缓冲液中得到 0.05 mg/mL 酶液。取 18 μL 4-硝基苯丁酸酯(p-NPB)溶于二甲基亚砜中, 制得浓度为 10 mmol/L 的 p-NPB 溶液。TFSE 溶于 Tris-HCl 缓冲液中以制备各黄酮组分溶液。取 20 μL 浓度分别为 2、4、6、8、10、14、18 mg/mL 的黄酮组分溶液和 50 μL 胰脂肪酶溶液与 100 μL 缓冲溶液混合均匀, 于 37 °C 下孵育 15 min, 立即加入 30 μL p-NPB 溶液, 在 37 °C 下反应 20 min, 测定各反应体系在 405 nm 波长处的吸光度。奥利司他用少量二甲亚砜溶解作为阳性对照。计算公式如下所示:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{B-b}{A-a}\right) \times 100$$

式中: A: 对照实验组的吸光度值(酶和底物); a: 对照空白组的吸光度值(底物); B: 样品实验组的吸光度值(酶、抑制剂和底物); b: 样品空白组的吸光度值(抑制剂和底物)。

1.2.5.3 纯化组分抑制胰脂肪酶的酶动力学特征酶促反应动力学分析参考文献 [20-21] 所述方法。固定 p-NPB 溶液质量浓度为 10 mmol/L, 分别测定不同浓度(0、10、14、18 mg/mL)的样品对不同酶液浓度(0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 和 0.06 mg/mL)的酶促反应初速度, 反应条件和体系与“1.2.5.2”节相同, 以横坐标为酶液浓度, 将反应后的体系吸光度除以反应时间为反应速率(V), 以反应速率为纵坐标, 绘制酶促反应动力学曲线。按照上述的操作步骤, 固定酶液质量浓度为 0.04 mg/mL, 分别测定不同浓度的样品在不同底物 p-NPB 浓度(0.5、1、2、4、6、8、10 mmol/L)下的反应初速度。每个实验重复三次, 以反应速率的倒数(1/[V])对 p-NPB 底物质量浓度的倒数(1/[S])作图, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线。

### 1.3 数据处理

以上实验重复 3 次, 所有数据的显著性采用 SPSS 19.0 进行处理, 实验结果以“平均值±标准差”表示; 采用 OriginPro 2019b 软件进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 AB-8 大孔树脂静态吸附与解析实验结果分析

2.1.1 静态吸附动力学曲线 图 1 为 AB-8 大孔吸附树脂的静态吸附动力学曲线, 从曲线中可看出, 在吸附初始阶段吸附速率呈现快速上升的趋势, 当吸附时间为 8 h 时, 吸附率逐渐达到平衡, 此时吸附率为 71.39%±0.26%, 当吸附时间达到 10 h, 吸附率没有明

显增加, 说明 AB-8 大孔树脂达到饱和状态, 此时吸附率为 73.11%±0.63%。考虑到节约时间与物力成本, 选择 8 h 为静态吸附饱和时间。

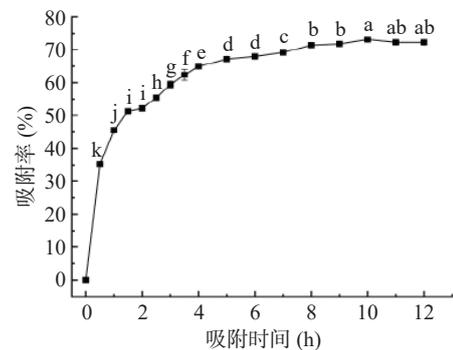


图 1 AB-8 大孔树脂静态吸附动力学曲线  
Fig.1 Static adsorption kinetics curve of AB-8 macroporous resin

注: 不同小写字母表示显著性差异,  $P<0.05$ , 图 2~图 5、图 8、图 10 同。

2.1.2 静态解析附动力学曲线 图 2 为 AB-8 大孔树脂静态解析动力学曲线, 在前 4 h 之内, AB-8 树脂能快速解析沙棘果皮渣里的黄酮, 解析率随着解析时间的延长而上升, 当达到 4 h 时, 解析率为 90.43%±0.28%, 之后由于解析浓度增大, 会再次发生复吸, 直到解析率逐渐平稳后达到饱和状态。这一现象与王竞珮<sup>[22]</sup>对甜樱桃果多酚经大孔树脂纯化的研究结论相似。分析可能的原因是: AB-8 大孔树脂吸附极性较弱的黄酮类化合物, 而乙醇体积分数过高会呈现一定的弱极性, 与树脂接触后会减少黄酮类化合物与大孔树脂之间的吸附力, 黄酮类化合物易被解析下来; 随着解析液与树脂接触时间增加, 一些与黄酮极性相似的杂质也会竞争脱附, 同时解析液中高浓度的黄酮再次与弱极性的大孔树脂结合, 出现了复吸的情况, 从而影响解析率。故选择解析时间为 4 h。

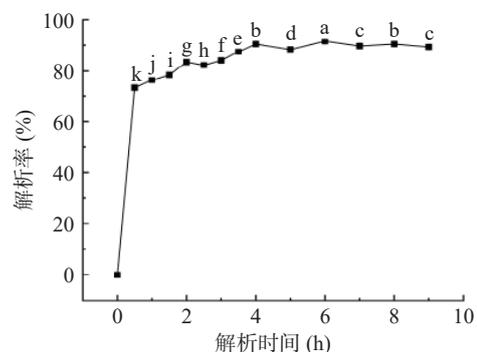


图 2 AB-8 大孔树脂静态解析动力学曲线  
Fig.2 Static desorption kinetics curve of AB-8 macroporous resin

2.1.3 样液 pH 对静态吸附的影响 图 3 反映了样液 pH 对 AB-8 大孔树脂静态吸附的影响, 在不同 pH 下, 吸附率和吸附量变化差异显著( $P<0.05$ )。随着上样液 pH 的增大, AB-8 大孔树脂对沙棘果皮渣黄酮类化合物的吸附率和吸附量先增加后减小。当

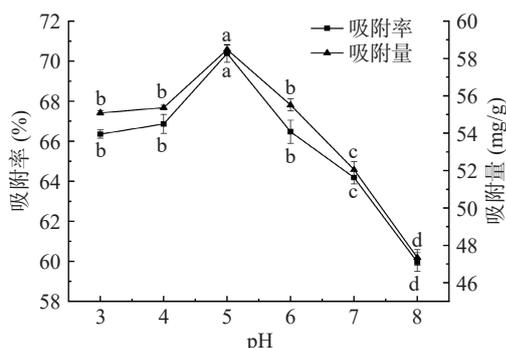


图3 样液 pH 对静态吸附效果的影响

Fig.3 Effect of sample pH on static adsorption

pH5 时,树脂的吸附效果最佳,吸附率和吸附量分别为  $70.38\% \pm 0.45\%$ 、 $58.48 \pm 0.23$  mg/g,分析原因可能是:黄酮类物质因含有酚羟基而呈现出一定的酸性,因此在酸性条件下性质稳定,更容易与大孔树脂产生氢键作用而被吸附。但是过酸过碱都会影响黄酮的存在形式,强酸条件下,黄酮类化合物形成烺盐,影响吸附效果;当溶液为碱性环境时,黄酮类化合物结构改变,易分解产生沉淀,使得树脂无法吸附,从而降低吸附率和吸附量<sup>[23-24]</sup>。因此 pH5 比较适宜大孔树脂的吸附,故选择 pH5 为最适的样液 pH。

2.1.4 样液浓度对静态吸附的影响 图4反映了样液浓度对 AB-8 大孔树脂静态吸附的影响,在不同样液浓度下,吸附率和吸附量呈现显著差异( $P < 0.05$ ),随着样液浓度的增加,大孔树脂的吸附量逐渐升高,但吸附率逐渐降低。当样液浓度为 0.66 mg/mL 时,吸附率为  $77.47\% \pm 0.25\%$ ,吸附量为  $25.61 \pm 0.12$  mg/g,此时吸附量过低使得大孔树脂未能被充分利用,造成树脂的浪费;当样液浓度为 3.30 mg/mL 时,吸附率为  $49.23\% \pm 0.23\%$ ,吸附量为  $81.26 \pm 0.32$  mg/g,此时吸附率过低,可能是由于杂质过多,与黄酮类化合物竞争树脂的位点,使得黄酮类物质未能被充分吸附<sup>[25]</sup>。当样液浓度为 2.20 mg/mL 时,大孔树脂的吸附率为  $64.34\% \pm 0.29\%$ ,吸附量为  $71.01 \pm 0.36$  mg/g,此时大孔树脂吸附率和吸附量都较为合适,这与张冀凡<sup>[15]</sup>对红花玉兰黄酮研究结果相似,从节约成本和增加纯化效率方面来看,为了确保可以提取更多的黄酮,并考虑到实际应用情况,优先考虑吸附量,故选

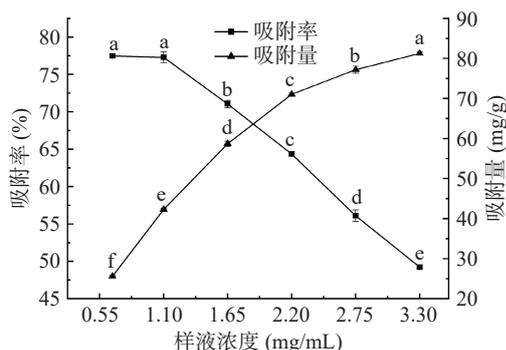


图4 样液浓度对静态吸附效果的影响

Fig.4 Effect of sample concentration on static adsorption

择 2.20 mg/mL 作为最适的上样浓度。

2.1.5 乙醇体积分数对静态解析的影响 图5反映了在不同乙醇体积分数对 AB-8 大孔树脂静态解析率的影响,可以看出其变化差异显著( $P < 0.05$ )。当乙醇体积分数为 75% 时,解析率与解析量达到最大值,分别为  $90.88\% \pm 0.45\%$  与  $64.83 \pm 0.36$  mg/g,这是因为具有糖苷键与酚羟基结构的黄酮化合物水溶液呈弱极性,而中等极性的洗脱剂与黄酮结构相似,易于和 AB-8 大孔树脂形成氢键,将吸附在树脂上的黄酮类物质置换洗脱下来,从而提高其解析效果。洗脱剂极性过高或过低均难以和大孔树脂结合,过高不仅会造成试剂的浪费,还会将与黄酮结构相似的化合物提取出来<sup>[26]</sup>。综合考虑,选择体积分数为 75% 的乙醇作为洗脱剂。

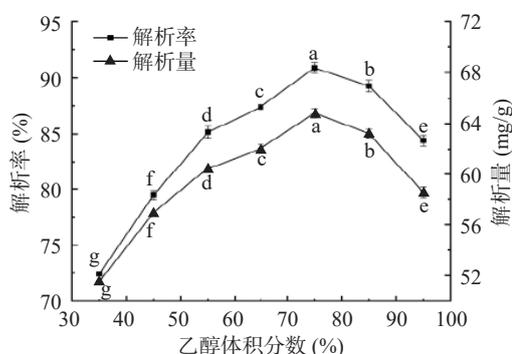


图5 乙醇体积分数对静态解析效果的影响

Fig.5 Effect of ethanol volume fraction on static desorption

## 2.2 AB-8 大孔树脂动态吸附与解析实验结果分析

2.2.1 泄露曲线 泄露点是指流出液中黄酮浓度达到上样液浓度的 10% 时的上样体积,此时可停止上样。当达到上样液浓度的 100% 时,称为饱和点<sup>[27]</sup>。如图6所示,流出液黄酮类物质浓度随上样液体积的增加逐渐上升。当上样体积达到 14 管时,流出液中黄酮类物质的浓度为  $0.22 \pm 0.029$  mg/mL,达到上样液黄酮浓度(2.20 mg/mL)的十分之一,为树脂的泄露点,故选择 14 管(140 mL)为最佳上样体积。随着样液不断泄露,达到 36 管时,流出液黄酮类物质浓度为  $2.20 \pm 0.0048$  mg/mL,流出液中黄酮浓度基本

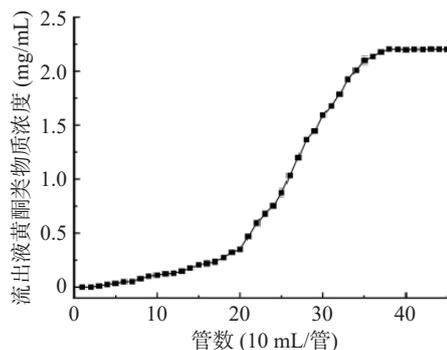


图6 AB-8 大孔树脂动态吸附泄露曲线

Fig.6 Dynamic adsorption leakage curve of AB-8 macroporous resin

与上样液浓度接近, 认为此时流出液体积达到饱和点。

**2.2.2 上样流速与洗脱流速** 由图 7A 可知, 随着上样体积的增加, 流出液中黄酮的浓度也在增加。当上样流速从 0.5 mL/min 增加至 2.5 mL/min 时, 达到树脂吸附泄露点的上样体积分别为 160、140、120、100、80 mL。这是因为在较低流速的情况下, 黄酮类物质可以与大孔树脂进行充分接触, 树脂能够被完全吸附, 所以泄露点出现较晚, 但纯化循环周期长; 当流速过快时, 黄酮类物质在大孔树脂中停留时间较短, 吸附不完全, 使得吸附率与吸附量较低<sup>[28]</sup>。综合考虑实际应用, 最终确定最佳上样流速为 1.0 mL/min。由图 7B 可知, 当洗脱流速小于 1.5 mL/min 时, 洗脱曲线尖锐且对称性较好, 拖尾也不明显, 解析效果好; 当洗脱液流速大于 1.5 mL/min 逐渐增加时, 洗脱曲线逐渐变宽, 拖尾现象较为明显。如果单从解析率与拖尾是否明显的角度考虑, 应该选择 1.0 mL/min 作为最佳洗脱流速, 但是如果流速过慢, 会延长分离周期增加工作时长。考虑到节约时间成本与有机溶剂用量, 故选择洗脱流速 1.5 mL/min。

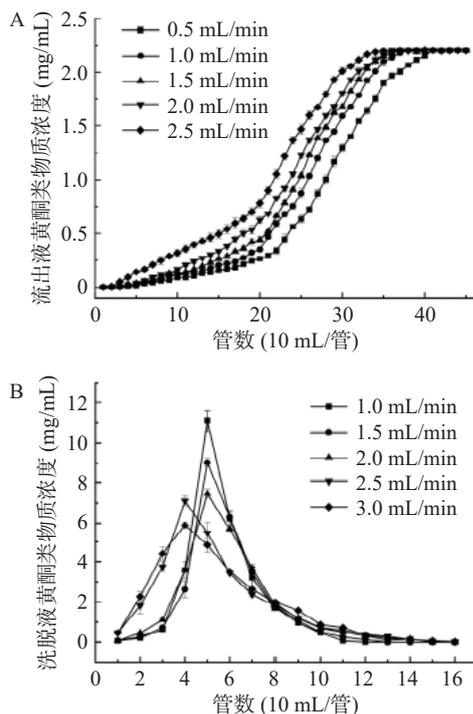


图 7 不同上样流速(A)和洗脱流速(B)对吸附与解析效果的影响

Fig.7 Effect of different loading sample flow rate and elution flow rate on absorption and desorption

**2.2.3 洗脱曲线** 根据上述所得结果, 选用 75% 乙醇以 1.5 mL/min 的洗脱流速进行洗脱。由图 8 可看出, 随着洗脱液流出体积的增加, 黄酮类物质浓度呈现先上升后下降的趋势。当洗脱液流出体积达到 50 mL 时, 洗脱液中黄酮类物质的浓度达到最高; 当洗脱液流出体积继续增加, 洗脱液中黄酮浓度显著下降 ( $P < 0.05$ ); 当洗脱液体积为 120 mL 时, 黄酮浓度

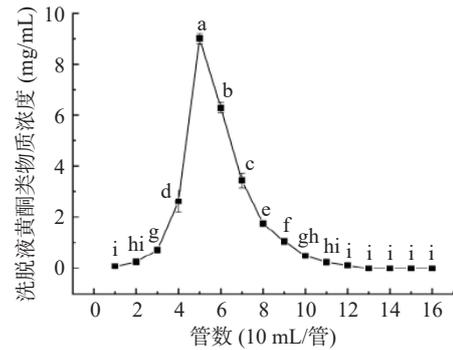


图 8 AB-8 大孔树脂动态洗脱曲线

Fig.8 Dynamic elution curve of AB-8 macroporous resin

趋于平稳 ( $P > 0.05$ ), 几乎为 0, 说明该洗脱条件下能够使黄酮全部洗脱下来, 因此选择 120 mL 为最佳洗脱体积。

### 2.3 最佳纯化工艺验证

按 AB-8 大孔树脂的初步分离纯化 TFCE 工艺, 进行 3 次重复实验。经计算总黄酮纯度分别为 50.138%、50.277%、50.197%, 其平均值为 50.204%, 相较纯化前(9.786%)提高了 5.13 倍。杨果等<sup>[29]</sup>采用 AB-8 大孔树脂纯化西番莲果皮黄酮, 产物的黄酮含量比纯化前提高约为 2.63 倍; HOU 等<sup>[30]</sup>采用 AB-8 大孔树脂纯化山楂黄酮, 产物的黄酮含量比纯化前提高约 4.76 倍。可见 AB-8 大孔树脂对黄酮类物质有较好的分离纯化效果, 并且纯化工艺提高了黄酮类化合物的纯度。

### 2.4 UPLC-Q-MS 成分分析

采用 UPLC-Q-MS 法对 TFSE 中的成分进行定

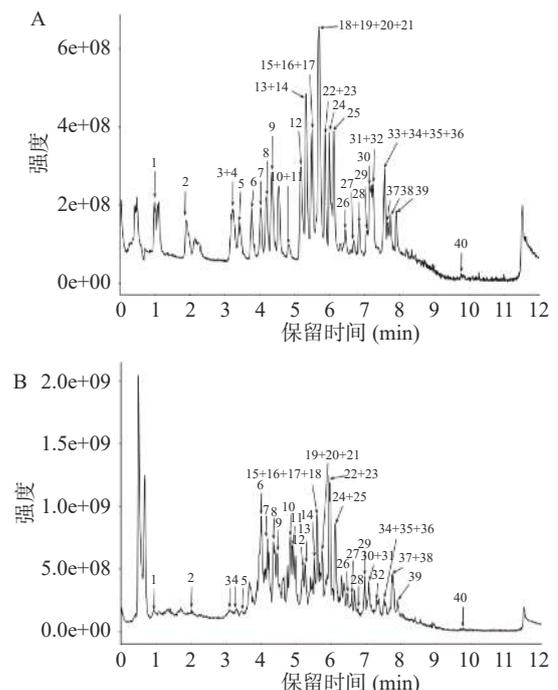


图 9 UPLC-Q-MS 在负离子模式(A)混标和(B)TFSE 的总离子流图(TIC)

Fig.9 UPLC-Q-MS in negative ion mode (A) mixed standard and (B) TFSE trace particle flow diagram (TIC)

量分析,并通过负离子模式对其进行识别,通过对比混标和样品的总离子流色谱图(见图9A和9B),并结合质谱数据和参考文献可初步分析出纯化成分,有利于进一步阐明其药效物质基础,为沙棘果皮渣后期的体外研究开发提供理论依据。

表1列出了TFSE的主要组分,共鉴定出39种酚类化合物,主要是以黄酮类化合物为主,其中20种化合物属于黄酮类化合物,2种化合物属于多酚类化合物,17种化合物属于酚酸类化合物。由图9和表1可知,对比混标,除柚皮苷查尔酮未检出外,其他物质均检出,其中芦丁是TFSE中含量最多的

化合物,含量达到 $1348.811\pm 0.179$  ng/mg,儿茶素含量为 $994.812\pm 0.845$  ng/mg、槲皮素-3-O-葡萄糖苷含量为 $558.638\pm 0.391$  ng/mg、山奈酚-3-O-葡萄糖苷含量为 $102.69\pm 0.427$  ng/mg、异鼠李素含量为 $182.445\pm 0.62$  ng/mg、槲皮素含量为 $111.289\pm 0.254$  ng/mg。郭建峰等<sup>[31]</sup>采用HPLC-Q-MS技术对沙棘叶中的化学成分进行分析,检测出15种类黄酮成分,发现其中有14种黄酮与本研究相同,与其相比本研究的TFSE中检测出其未含有的木犀草苷、4',5,7-三羟异黄酮-7-糖苷、山奈酚-3-O-葡萄糖苷、大豆甙元、根皮素、异甘草素。因此,本研究认为通过AB-8大孔

表1 TFSE结构分析鉴定结果

Table 1 Identification and analysis of flavonoids from TFSE

峰号	保留时间(min)	中文名称	英文名称	分子式	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	含量(ng/mg)	分类
1	0.99	没食子酸	Gallic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	169.014	3.007±0.446	酚酸类
2	1.91	原儿茶酸	3,4-Dihydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153.019	2.548±0.578	酚酸类
3	3.19	原儿茶醛	Protocatechualdehyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137.024	18.988±0.384	酚酸类
4	3.3	邻苯二甲酸	Phthalic acid	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	165.019	0.601±0.173	酚酸类
5	3.4	4-羟基苯甲酸	4-Hydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137.024	1.33±0.155	酚酸类
6	3.98	儿茶素	Catechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289.072	994.812±0.845	黄酮类
7	4.19	香草酸	Vanillic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	167.035	21.603±0.628	酚酸类
8	4.34	咖啡酸	Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	179.035	0.726±0.048	酚酸类
9	4.55	丁香酸	Syringic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	197.046	7.284±0.162	酚酸类
10	4.81	表儿茶素	Epicatechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289.072	82.49±0.135	黄酮类
11	4.85	二氢杨梅素	Dihydromyricetin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	319.046	22.136±0.422	黄酮类
12	5.17	香草醛	Vanillin	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	151.04	12.488±0.151	酚酸类
13	5.32	对香豆酸	p-Hydroxycinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163.04	34.16±0.485	酚酸类
14	5.49	丁香醛	Syringaldehyde	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	181.051	5.63±0.648	酚酸类
15	5.6	芦丁	Rutin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609.146	1348.811±0.179	黄酮类
16	5.6	水杨酸	Salicylic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137.024	7.591±0.466	酚酸类
17	5.64	牡荆素	Vitexin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.098	0.05±0.043	黄酮类
18	5.68	反式阿魏酸	Trans-Ferulic acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193.051	12.291±0.686	酚酸类
19	5.71	芥子酸	Sinapic acid	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	223.061	22.333±0.56	酚酸类
20	5.75	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	Quercetin 3-β-D-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463.088	558.638±0.391	黄酮类
21	5.78	木犀草苷	Luteoloside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.093	0.132±0.006	黄酮类
22	5.85	二氢槲皮素	(+)-Dihydroquercetin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	303.051	30.906±0.347	黄酮类
23	5.88	4',5,7-三羟异黄酮-7-糖苷	Genistin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.098	0.364±0.048	黄酮类
24	6.05	苯甲酸	Benzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	121.03	43.597±0.731	酚酸类
25	6.05	山奈酚-3-O-葡萄糖苷	Kaempferol-3-O-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.093	102.69±0.427	黄酮类
26	6.44	二氢山奈酚	(+)-Dihydrokaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	287.056	2.903±0.029	黄酮类
27	6.69	白藜芦醇	Resveratrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	227.071	0.608±0.011	多酚类
28	6.81	大豆甙元	Daidzein	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	253.051	0.008±0.004	黄酮类
29	7.05	木犀草素	Luteolin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285.04	0.87±0.016	黄酮类
30	7.09	槲皮素	Quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301.035	111.289±0.254	黄酮类
31	7.14	氢化肉桂酸	Hydrocinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	149.061	2.921±0.39	酚酸类
32	7.24	反式肉桂酸	Trans-Cinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	147.045	4.106±0.44	酚酸类
33	-	柚皮苷查尔酮	Naringenin chalcone	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-	-	黄酮类
34	7.55	根皮素	Phloretin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	273.077	0.089±0.011	黄酮类
35	7.58	柚皮素	Naringenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	271.061	3.32±0.439	黄酮类
36	7.58	芹菜素	Apigenin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	269.046	0.269±0.014	黄酮类
37	7.67	山奈酚	Kaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285.04	21.144±0.286	黄酮类
38	7.73	异鼠李素	Isorhamnetin	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	315.051	182.445±0.62	黄酮类
39	7.93	异甘草素	Isoliquiritigenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	255.066	0.007±0.001	黄酮类
40	9.76	棉酚	Gossypol	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	517.187	0.344±0.024	多酚类

树脂纯化的方式可以较好地提取出黄酮及酚酸类物质, 对于沙棘果皮渣黄酮类化合物的检出及今后开发沙棘副产品将起到积极的推动作用。

## 2.5 TFSE 对胰脂肪酶的抑制作用强度

由图 10 可知, 在样品浓度 2~18 mg/mL 范围内, 随着浓度的增加, TFSE 对胰脂肪酶抑制作用显著增加( $P < 0.05$ ), 这是因为黄酮类化合物可以通过疏水缔合或与极性基团形成氢键与酶相互作用, 从而改变酶的结构并影响其活性。通过线性拟合计算其半抑制浓度  $IC_{50}$  值为 12.46 mg/mL, 阳性对照奥利司他  $IC_{50}$  值为 0.89  $\mu$ g/mL。相比于其他天然产物中提取到的胰脂肪酶抑制剂, 例如, 林海生等<sup>[32]</sup>用超声波辅助提取法获得的红江橙果皮黄酮( $IC_{50}$  值为 28.54 mg/mL)、安欢等<sup>[33]</sup>研究的苦瓜多糖( $IC_{50}$  值为 29.86 mg/mL), TFSE 表现出较好的胰脂肪酶抑制作用, 有望作为一种潜在的胰脂肪酶抑制剂。

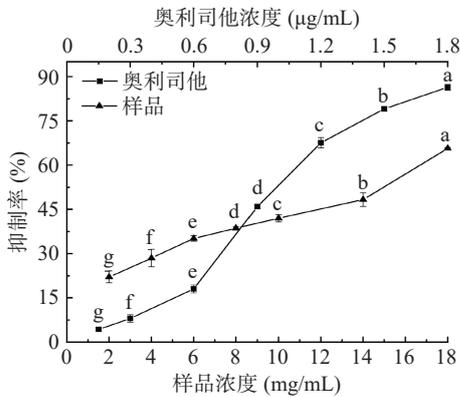


图 10 TFSE 和奥利司他对胰脂肪酶的抑制作用

Fig.10 Inhibition of TFSE and orlistat on pancreatic lipase

## 2.6 纯化组分对胰脂肪酶的抑制作用类型

为了研究 TFSE 对胰脂肪酶的抑制类型, 固定底物浓度不变, 在不同浓度抑制剂存在下, 绘制了不同胰脂肪酶浓度下反应速率的线性回归曲线。如图 11 所示, 图中的四条回归曲线给出了一组以不同斜率穿过原点的直线, 且随着抑制剂浓度的增加, 其斜率逐渐降低, 这些结果表明 TFSE 是通过非共价键的形式与酶可逆结合, 进而引起胰脂肪酶活力的降低或丧失而导致催化效率降低, 而不是通过降低有效酶量导致

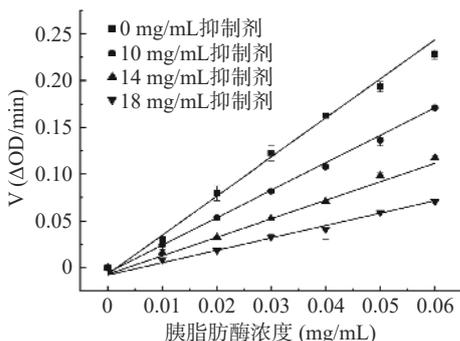


图 11 TFSE 对胰脂肪酶的抑制作用类型

Fig.11 Types of inhibition of TFSE on pancreatic lipase

反应速率降低, 因此对胰脂肪酶的作用方式属于可逆型抑制<sup>[34]</sup>。

TFSE 对胰脂肪酶作用得到的 Lineweaver-Burk 结果如图 12 所示, 当底物浓度为 0.5~10 mmol/L 时, 改变抑制剂的浓度, 直线相交在 X 轴, 并且截距不变, 斜率变大, 即米氏常数  $K_m$  不变,  $V_m$  值变小, 表明 TFSE 对胰脂肪酶的抑制作用类型是非竞争性抑制。此结果与枸杞叶黄酮<sup>[35]</sup>、长茎葡萄蕨藻提取物<sup>[36]</sup>对胰脂肪酶的抑制作用类型相似。非竞争性抑制的抑制程度仅仅受抑制剂的浓度影响, 即 TFSE 能够通过游离胰脂肪酶独立结合来抑制酶的催化作用, 与底物之间不存在竞争关系, 意味着其抑制作用不会受食物中脂肪的浓度影响, 这为有效地将 TFSE 开发为胰脂肪酶抑制剂提供了理论基础。

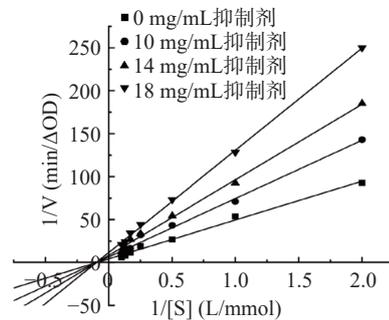


图 12 TFSE 对胰脂肪酶作用的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图

Fig.12 Lineweaver-Burk double reciprocal curve plots of TFSE against pancreatic lipase

$K_i$  值是解离常数, 反映了酶与抑制剂复合物之间的亲和力程度,  $K_i$  越小, 说明酶与抑制剂亲和力越强, 其抑制作用越强。黄雪薇等<sup>[37]</sup>发现板栗壳黄酮化合物对胰脂肪酶抑制类型为非竞争性抑制,  $K_i=53.19$  mg/mL; 通过不同浓度抑制剂的双倒数斜率对抑制剂浓度进行的二次作图, 线性拟合的曲线为  $y=3.8623x+39.437$ ,  $R^2=0.9088$ , 计算得抑制常数  $K_i=10.21$  mg/mL, TFSE 的抑制常数  $K_i$  小于黄雪薇等板栗壳黄酮对胰脂肪酶的  $K_i$  值, 表明 TFSE 和胰脂肪酶结合紧密, 因此抑制效果强。

## 3 结论

本实验采用大孔树脂对 TFSE 进行纯化。通过静态吸附、解析以及动力学特征分析, 优化纯化工工艺, 并确定最佳纯化条件为: 浓度 2.2 mg/mL, pH 5 的上样液以 1.0 mL/min 流速上样 140 mL; 采用 75% 乙醇作为洗脱剂, 在 1.5 mL/min 流速下洗脱 120 mL, 此条件下的总黄酮纯度由纯化前 9.786% 提高到 50.204%, 说明 AB-8 适合沙棘果皮渣总黄酮提取物的分离纯化。采用 UPLC-Q-MS 技术对 TFSE 的进行结构分析, 其中含量较高的为芦丁、儿茶素、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素等黄酮类化合物。并且初步研究 TFSE 对胰脂肪酶的抑制效果, 结果表明, TFSE 对胰脂肪酶具有较好的抑制作用, 其  $IC_{50}$  值

为 12.46 mg/mL, 通过 Lineweaver-Burk 法证明 TFSE 抑制类型为非竞争性抑制。该结果说明 TFSE 是一种天然安全的胰脂肪酶抑制剂, 并且为深入理解沙棘果皮渣加工副产品的降脂机制及进一步开发利用沙棘果皮渣提供了理论依据, 对于解决沙棘果皮渣的资源浪费问题具有重要意义。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 参考文献

- [1] 王宁宁, 郑文惠, 张凯雪, 等. 沙棘的化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5522-5532. [WANG N N, ZHENG W H, ZHANG K X, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of sea buckthorn and predictive analysis on Q-marker[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(21): 5522-5532.]
- [2] SYTAOVÁ I, ORSAVOVÁ J, SNOPEK L, et al. Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times[J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125784.
- [3] 张晓雪, 贾鸿震, 于长青, 等. 超声波-微波协同提取沙棘果皮渣中可溶性膳食纤维工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 200-206, 220. [ZHANG X X, JIA H Z, YU C Q, et al. Optimization of ultrasonic-microwave synergistic extraction of soluble dietary fiber from sea buckthorn peel residue[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 200-206, 220.]
- [4] XIE Y, GUO Q S, WANG G S. Preparative separation and purification of the total flavonoids in *Scorzonera austriaca* with macroporous resins[J]. Molecules, 2016, 21(6): 768.
- [5] TANG D, ZHU J X, NIE H, et al. Simple and efficient approach for enrichment of major isoflavonoids from *Astragalus membranaceus* with macroporous resins and their nephroprotective activities[J]. Industrial Crops & Products, 2018, 125: 276-283.
- [6] SILVIA R, T R A, MARISA F, et al. Methodologies for assessing pancreatic lipase catalytic activity: A review[J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2023, 6(19): 1-28.
- [7] PARK J Y, KIM C S, PARK K M, et al. Inhibitory characteristics of flavonol-3-O-glycosides from *Polygonum aviculare* L. (common knotgrass) against porcine pancreatic lipase[J]. Scientific Reports, 2019, 9(01): 18080.
- [8] DECHAKHAMPHU A, WONGCHUM N. Investigation of the kinetic properties of *Phyllanthus chamaepeuce* Ridl. extracts for the inhibition of pancreatic lipase activity[J]. Journal of Herbal Medicine, 2022, 32: 100508.
- [9] BIRARI R B, BHUTANI K K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: Unexplored potential[J]. Drug discovery Today, 2007, 12(19-20): 879-889.
- [10] BUCHHOLZ T, MELZIG M F. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors[J]. Planta Medica, 2015, 81(10): 771-783.
- [11] HONG J, CHOI Y, LEE J, et al. Inhibitory characteristics of flavonoids from soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) leaf against pancreatic lipase[J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103311.
- [12] HUANG R, ZHANG Y, SHEN S, et al. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory effects of flavonoids from different citrus peel extracts: An *in vitro* study[J]. Food Chemistry, 2020, 326: 126785.
- [13] 陈燕玲. 沙棘药用成分的研究及其活性初步探讨[D]. 无锡: 江南大学, 2017. [CHEN Y L. Medicinal ingredients in *Hippophaë rhamnoides* L. and the preliminary study of activity[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.]
- [14] 康莹. 中国沙棘叶黄酮提取精制工艺优化及其活性的初步评价[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019. [KANG Y. Optimization of extraction and refining process of flavonoids from sea buckthorn leaves and preliminary evaluation of their activities[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019.]
- [15] 张冀凡. 红花玉兰黄酮类物质的提取纯化及活性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2020. [ZHANG Y F. Study on extraction, purification and activity of flavonoids from *Magnolia wufengensis* L. Y. Ma et L. R. Wang[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020.]
- [16] 杨仁明, 何彦峰, 索有瑞, 等. 大孔树脂富集纯化胡芦巴种子总黄酮[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 224-228. [YANG R M, HE Y F, SUO Y R, et al. Enrichment and purification of total flavonoids from fenugreek seeds by macroporous resin[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(2): 224-228.]
- [17] ZHOU J, WU Y, LONG P, et al. LC-MS-based metabolomics reveals the chemical changes of polyphenols during high-temperature roasting of large-leaf yellow tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 67(19): 5405-5412.
- [18] ZHUANG J, DAI X, ZHU M, et al. Evaluation of astringent taste of green tea through mass spectrometry-based targeted metabolic profiling of polyphenols[J]. Food Chemistry, 2020, 305: 125507.
- [19] 晏幸, 戴宇琪, 欧丽明, 等. 瑄溪蜜柚柚皮黄酮提取工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 135-140. [YANG X, DAI Y Q, OU L M, et al. Optimization of flavonoids extraction from guanxi honey pomelo peel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(17): 135-140.]
- [20] 董玉婷, 蔡宏浩, 李志朋, 等. 乳杆菌发酵提高坛紫菜的抗氧化和抑制糖脂代谢关键酶活性[J]. 食品科学, 2022, 43(10): 162-171. [DONG Y T, CAI H H, LI Z P, et al. *Lactobacillus* fermentation improves the antioxidant activity of *Porphyra haitanensis* and its inhibitory activity on key enzymes of glycolipid metabolism[J]. Food Science, 2022, 43(10): 162-171.]
- [21] MORENO-CORDOVA E N, ARVIZU-FLORES A A, VALENZUELA-SOTO E M, et al. Gallotannins are uncompetitive inhibitors of pancreatic lipase activity[J]. Biophysical Chemistry: An International Journal Devoted to the Physical Chemistry of Biological Phenomena, 2020, 264: 106409.
- [22] 王竞琛. 甜樱桃果多酚的提取、纯化及其抗氧化、抗衰老活性研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2022. [WANG J P. Study on extraction, purification, antioxidant activity and anti-aging effects of polyphenols from sweet cherry[D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2022.]
- [23] 李侠, 臧学丽, 徐祎博, 等. AB-8 大孔树脂纯化绿豆皮黄酮工艺优化及纯化前后抗氧化能力比较[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 283-290. [LI X, ZANG X L, XU Y B, et al. Optimization of purification of flavonoids from mung bean coat by AB-8 macroporous resin and comparison of antioxidant capacity of crude and purified flavonoids[J]. Food Science, 2018, 39(10): 283-290.]
- [24] 杨誌, 万山, 张乔会, 等. 大孔树脂纯化山杏核壳总黄酮的工艺优化[J]. 食品科学, 2015, 36(10): 38-42. [YANG Z, WAN S,

- ZHANG Q H, et al. Purification of total flavonoids from shells of wild apricot with macroreticular resin[J]. Food Science, 2015, 36(10): 38-42. ]
- [ 25 ] 李金. 茶树花黄酮提取分离的参数优化与品种间的差异性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019. [ LI J. Research on optimization for extraction and isolation of tea flower flavones and variances of tea flower flavones among various cultivars[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019. ]
- [ 26 ] 胡华. 佩兰黄酮的纯化及其抗氧化与抗运动疲劳作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(15): 220-226. [ HU H. Purification of flavonoids from *Eupatorium fortunei* Turcz. and its antioxidant and resisting exercise fatigue effects[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(15): 220-226. ]
- [ 27 ] 孙开芬, 陈胤睿, 徐文芬, 等. 大孔吸附树脂分离纯化红禾麻总黄酮工艺的优化[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2619-2623. [ SUN K F, CHEN Y R, XU W F, et al. Optimization of separation and purification process of total flavonoids from *Corympium rufflorum* by porous adsorption resin[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(8): 2619-2623. ]
- [ 28 ] 耿杰, 梅子萍, 董功武. 大孔树脂分离纯化熟地黄黄酮及其对小鼠运动耐力的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 292-297. [ GENG J, MEI Z P, DONG G W. Purification of flavonoids extract from *Radix Rehmanniae Preparata* by macroporous resin and its effect on movement stamina of mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(24): 292-297. ]
- [ 29 ] 杨果, 李臣. 西番莲果皮黄酮纯化及其抗氧化与抗运动疲劳活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(4): 72-80. [ YANG G, LI C. Purification and activity of antioxidation and resisting exercise fatigue of flavonoids from peel of passion fruit[J]. China Food Additives, 2022, 33(4): 72-80. ]
- [ 30 ] HOU M, HU W, XIU Z, et al. Preparative purification of total flavonoids from *Sophora tonkinensis* Gagnep. by macroporous resin column chromatography and comparative analysis of flavonoid profiles by HPLC-PAD[J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3200. ]
- [ 31 ] 郭建峰, 邴浩然, 王芳, 等. 沙棘叶黄酮的提取纯化及组成分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 189-198. [ GUO J F, XI H R, WANG F, et al. Extraction, purification and composition analysis of flavonoids from sea buckthorn leaves[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 189-198. ]
- [ 32 ] 林海生, 饶梦微, 秦小明, 等. 红江橙果皮黄酮提取物对  $\alpha$ -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 H S, RAO M W, QIN X M, et al. Inhibitory effects of total flavonoids extracted from peel of *Citrus sinensis* Osbeckcv. Hongjiang on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 89-96. ]
- [ 33 ] 安欢, 叶云, 丁华杰, 等. 苦瓜多糖对胰脂肪酶抑制作用的研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(2): 27-31. [ AN H, YE Y, DING H J, et al. Study on the inhibitory effect of *Momordica charantia* polysaccharide on pancreatic lipase[J]. China Condiment, 2020, 45(2): 27-31. ]
- [ 34 ] XINYUE Z, DAN L, KEXIN W, et al. Hyperoside inhibits pancreatic lipase activity *in vitro* and reduces fat accumulation *in vivo*[J]. Food & Function, 2023, 14(10): 4763-4776. ]
- [ 35 ] 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 effect of flavonoids from *Lycium barbarum* leaves on pancreatic lipase activity[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(5): 43-53. ]
- [ 36 ] 肖晔, 卢芯仪, 任天宇, 等. 长茎葡萄蕨藻提取物对胰脂肪酶与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(3): 17-25. [ XIAO Y, LU X Y, REN T Y, et al. Inhibitory effects of *Caulerpa lentillifera* extracts on pancreatic lipase and  $\alpha$ -glucosidase[J]. Food Research and Development, 2023, 44(3): 17-25. ]
- [ 37 ] 黄雪薇, 雷嗣超, 涂芬, 等. 板栗壳黄酮结构分析及其对胰脂肪酶活力的抑制作用[J]. 食品科学, 2021, 42(21): 111-118. [ HUANG X W, LEI S C, TU F, et al. Structural analysis and anti-pancreatic lipase activity of flavonoids from chestnut shells[J]. Food Science, 2021, 42(21): 111-118. ]