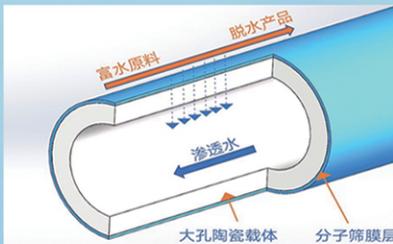
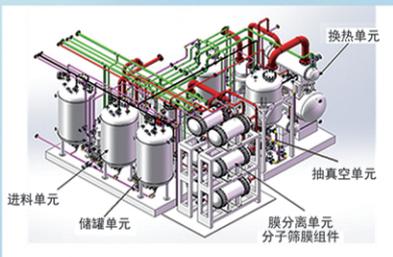




浙江汇甬新材料有限公司

微波合成第二代脱水膜



收率高、能耗低、连续脱水、无需再生

在如下领域的有机物脱水精制已有工业化应用

锂电池电解液溶剂及NMP生产、回收
BDO产业链、煤化工、石油化工精细化学品
制药行业、溶媒回收、燃料乙醇、超纯溶剂

广泛适用于醇类、醚类、酯类、酮类、苯系物、卤代烃的脱水精制



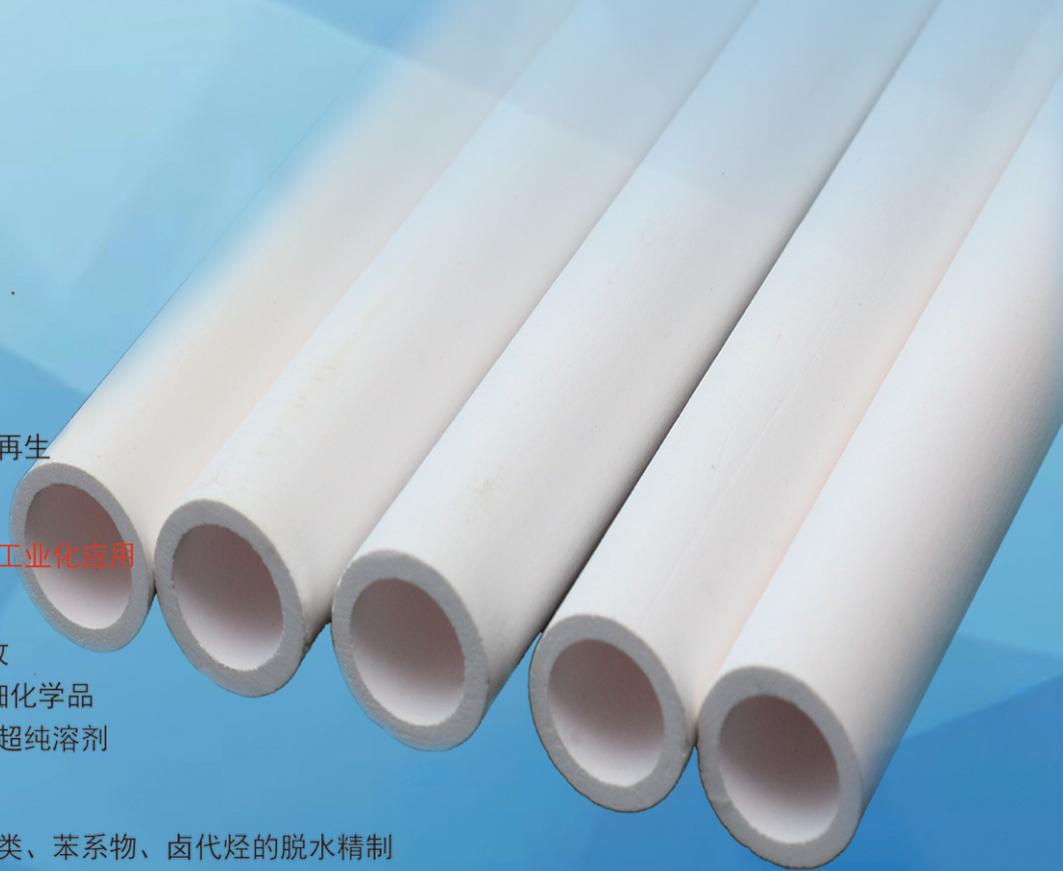
网址: www.hymater.com

固定电话: 0574-87648996

电话: 13396592011

地址: 浙江省宁波市江北高新园区庆丰路联东U谷国际港56号楼

国家自然科学基金二等奖 成果转化
IChemE全球 创新产品冠军
微波分子筛膜 脱水性能遥遥领先
共沸体系、热敏体系、含水有机物脱水精制换代技术



云南小粒咖啡果皮多酚生物活性评价及成分鉴定

董仕豪¹, 徐柠檬¹, 资璐熙¹, 杨晶晶³, 秦粉¹, 郭磊^{1,2*}

(1. 西南林业大学 生物与食品工程学院, 云南 昆明 650224; 2. 云南省高校大健康类森林资源开发利用工程研究中心, 云南 昆明 650224; 3. 广西南亚热带农业科学研究所, 广西 崇左 532415)

摘要: 通过溶剂提取和大孔树脂纯化得到了云南小粒咖啡果皮多酚 (PYCAP), 并测定了其生物活性。通过 Lineweaver-Burk 方程和 Dixon 方程探究了 PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶的抑制机理, 分析了其对胰脂肪酶和黄嘌呤氧化酶的抑制作用。采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪对 PYCAP 的化学成分进行了鉴定。结果表明, PYCAP 具有较强的降血糖、降血脂和降尿酸能力; PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用显著, 其半数抑制质量浓度 (IC_{50}) 分别为 (0.073 ± 0.002) 和 (0.056 ± 0.005) g/L, 且抑制类型均为竞争性-非竞争性混合抑制; PYCAP 对胰脂肪酶、黄嘌呤氧化酶均有一定的抑制作用, 其 IC_{50} 分别为 (0.034 ± 0.003) 和 (0.251 ± 0.011) g/L。PYCAP 中共鉴定出 27 种多酚类化合物, 主要为黄酮类 10 种、吡喃类 7 种和酚酸类 10 种。

关键词: 云南小粒咖啡果皮; 多酚; 降血糖能力; 降血脂; 成分鉴定; 食品化学品

中图分类号: TS209 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 02-0370-08

Biological activity evaluation and component identification of polyphenols from Yunnan *Coffea arabica* pericarp

DONG Shihao¹, XU Ningmeng¹, ZI Luxi¹, YANG Jingjing³, QIN Fen¹, GUO Lei^{1,2*}

(1. College of Biological Sciences and Food Engineering, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Forest Resources Exploitation and Utilization Engineering Research Center for Grand Health of Yunnan Provincial Universities, Kunming 650224, Yunnan, China; 3. Guangxi South Subtropical Agricultural Science Research Institute, Chongzuo 532415, Guangxi, China)

Abstract: Polyphenols from Yunnan *Coffea arabica* pericarp (PYCAP) was obtained by solvent extraction and macroporous resin purification, and evaluated for their bioactivity. The inhibitory mechanisms of PYCAP on α -glucosidase, α -amylase were analyzed by Lineweaver-Burk equation and Dixon equation, respectively, while the inhibitory effect of PYCAP on pancreatic lipase and xanthine oxidase were evaluated. The chemical composition was further identified by the ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry. The results showed that PYCAP exhibited strong antihyperglycemic, hypolipidemic and uric-acid-lowering performance, and significantly inhibited α -glucosidase and α -amylase, with the corresponding half inhibition mass concentration (IC_{50}) of (0.073 ± 0.002) and (0.056 ± 0.005) g/L, and the inhibition types of both competitive-noncompetitive mixed inhibition. In addition, PYCAP inhibited pancreatic lipase and xanthine oxidase to some extent, with the corresponding IC_{50} of (0.034 ± 0.003) and (0.251 ± 0.011) g/L, respectively. A total of 27 chemical components were identified in PYCAP, including 10 flavonoids, 7 pyrans, and 10 phenolic acids.

Key words: Yunnan *Coffea arabica* pericarp; polyphenols; antihyperglycemic capability; hypolipidemic capability; component identification; food chemicals

收稿日期: 2024-02-04; 定用日期: 2024-03-18; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240125

基金项目: 云南省科技厅基础研究计划项目 (202101AT070042); 云南省科技厅农业联合专项 (202101BD070001-054); 云南省大学生创新训练项目 (202210677046)

作者简介: 董仕豪 (2000—), 男, 硕士生, E-mail: dongshihao@swfu.edu.cn. 联系人: 郭磊 (1981—), 男, 副教授, E-mail: guoleigift.student@sina.com.

多酚是植物次生代谢产生的酚羟基化合物,其种类繁多、结构复杂、来源广泛。多酚作为一种常见的天然活性物质,具有多种生理活性,如抗氧化、抗炎、降血脂、降血糖等功能,在不同食品中含量及种类差异较大,且多酚的功能与其结构密切相关^[1-3]。杨成峻等^[4]研究发现,花椒果皮多酚中的绿原酸含量与 α -葡萄糖苷酶活性抑制率具有极显著相关性;谢星等^[5]研究发现,海蒿子多酚具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,且抑制类型为混合型抑制。TAN等^[6]通过小鼠实验验证,龙眼果皮中的多酚可以降低血脂,抑制高脂饮食诱导的肝脂积累。

咖啡为茜草科咖啡属,全球主要有阿拉比卡(*Coffea arabica* L.)、罗布斯塔(*Coffea robusta* L.)以及利比里卡(*Coffea liberica* L.)三大原种,在中国分别称之为小粒、中粒和大粒咖啡^[7]。其中,阿拉比卡咖啡占全球咖啡产量的75%以上,为最常见的商业化种植品种^[8]。中国云南省为小粒咖啡主要栽种区,种植面积和产量达全国的98%以上,因昼夜温差大、低纬度、高海拔等气候地理条件的独特性,小粒咖啡具有香气浓郁、口感醇厚、气味清新、浓而不烈等特点^[9]。目前,对咖啡多酚的研究主要集中于咖啡豆和咖啡渣,而咖啡果皮经常作为咖啡加工过程中的废弃物,造成严重的资源浪费及环境污染^[10-11]。已有研究表明,咖啡果皮中含有大量的多酚类物质,其多酚质量分数达到1.8%~8.6%,主要包括咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、羟基苯甲酸及其衍生物等^[12-13]。天然植物多酚因来源广泛、安全性高、生物活性好而备受关注,但是云南小粒咖啡果皮多酚的化学组成、生物活性,特别是降血糖、降血脂作用鲜见报道,因此,咖啡果皮多酚的进一步研究对咖啡深度开发利用具有重要的指导意义。

在前期对云南小粒咖啡果皮多酚(PYCAP)进行提取纯化的基础上,本文拟测定纯化后果皮多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶、胰脂肪酶及黄嘌呤氧化酶的抑制作用,分析其在降血糖、降血脂和降尿酸方面的生物活性,并结合Lineweaver-Burk方程和Dixon方程探讨其抑制机理;利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪(UPLC-Q-TOF-MS/MS)分析云南小粒咖啡果皮多酚成分组成,以期对咖啡果皮废弃物的开发利用以及推动新型功能性食品和保健品的研发提供一定理论依据。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

云南小粒咖啡果,2023年1月采自云南保山龙江江坝,经西南林业大学阚欢教授鉴定为云南小粒咖啡,

样本现保存于西南林业大学食品科学与工程教研室。

α -葡萄糖苷酶(7×10^5 U/mL),上海吉至生化科技有限公司;阿卡波糖、对硝基苯- α -D-葡萄糖苷(PNPG),上海毕得医药科技股份有限公司;XDA-7大孔树脂、纤维素酶(400 U/mg)、黄嘌呤氧化酶(9.5 U/mg)、胰脂肪酶(3×10^4 U/g)、 α -淀粉酶(4000 U/g),上海源叶生物技术有限公司;黄嘌呤氧化酶、聚乙烯醇,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;别嘌呤醇,合肥博美生物科技有限责任公司;盐酸,云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司;3,5-二硝基水杨酸(DNS)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,上海阿达玛斯试剂有限公司;可溶性淀粉、氢氧化钠、无水碳酸钠、四水酒石酸钠、苯酚、无水硫酸钠、无水乙醇、酚酞,天津市风船化学试剂科技有限公司,以上试剂均为分析纯。乙腈、甲醇、氨水、甲酸,色谱纯,飞世尔科技(重庆)有限公司。

UV-Vis 300型紫外-可见分光光度计(UV-Vis)、Q Exactive Plus型高分辨质谱仪(HRMS),美国Thermo Fisher Scientific公司;HH-2型数显电子恒温水浴锅,金坛市丹瑞电器厂;TGL-1850型高速冷冻离心机,四川蜀科仪器有限公司;ReadMax 500F型光吸收酶标仪,上海闪谱生物科技有限公司;YTLG-12A型真空冷冻干燥机,上海叶拓科技有限公司;Nexera X2 LC-30AD型超高压液相色谱仪(HPLC),日本Shimadzu公司;Agilent 1290 UPLC-6550 Q-TOF-MS/MS,美国Agilent Technologies公司。

1.2 PYCAP的提取与纯化

将新鲜的云南小粒咖啡果浸于水中进行湿法去皮后,将果皮置于60℃烘箱干燥24 h后,粉碎、过60目筛,备用。称取3 g云南小粒咖啡果皮粉末于锥形瓶中,加入体积分数42%的乙醇水溶液按照料液比(g:mL)1:40混匀后,使用浓度为0.2 mol/L的HCl溶液调节pH=5,加入质量分数1%的纤维素酶(以云南小粒咖啡果皮粉质量为基准,下同)后,置于65℃水浴锅中浸提70 min,然后在10000 r/min下离心10 min,将上清液旋蒸脱醇、冻干(冷阱温度-65.5℃、真空度为2 Pa,下同),得到粗多酚粉末。将粗多酚粉末以水溶解后,通过XDA-7型大孔树脂纯化(洗脱剂为体积分数为60%的乙醇水溶液),收集洗脱液旋蒸脱醇、冻干(-70℃,48 h),得到淡黄色粉末,即PYCAP。

1.3 生物活性测试

α -淀粉酶与 α -葡萄糖苷酶抑制剂能够通过阻止糖原、淀粉等成分转化为葡萄糖,进而有效地降低餐后的血糖水平^[14]。阿卡波糖被认为是 α -淀粉酶和 α -葡萄糖的代表性抑制剂,故选择阿卡波糖作为阳性对照。

1.3.1 α -葡萄糖苷酶活性抑制率测定

参照王旭等^[15]的方法进行测定, 具体步骤为: 用蒸馏水配制不同质量浓度的 PYCAP 样液后依次取 30、25 μL 的 α -葡萄糖苷酶 (2 U/mL) 和 120 μL 的磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.1 mol/L、pH = 6.8) 于试管中, 混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 15 min, 取出加入 25 μL 的 PNPG 溶液 (2.5 mmol/L), 再于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 25 min。最后加入 100 μL 的 Na_2CO_3 溶液 (浓度 0.2 mol/L) 终止反应, 用光吸收酶标仪测定其在 405 nm 处的吸光度 (A_1)。以 PBS 代替酶溶液为空白组, 测定其在 405 nm 处的吸光度 (A_2); 以 PBS 代替 PYCAP 样液为对照组, 测定其在 405 nm 处的吸光度 (A_0), 根据公式 (1) 计算 PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 α -葡萄糖苷酶活性抑制动力学实验

参照潘玥等^[16]的方法进行动力学实验。设置 PYCAP 样液 (用蒸馏水配制) 质量浓度范围 0.1~0.5 g/L, PNPG 质量浓度范围 0.5~2.5 g/L, 按照 1.3.1 节方法进行实验, 测定反应体系的吸光度, 用每分钟吸光度的变化量表示酶促反应速率。以 PNPG 溶液质量浓度的倒数 $[1/[S]]$ 为横坐标, 以酶促反应速率的倒数 ($1/v$) 为纵坐标作图, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 并采用纵截距和斜率作图, 确定 PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max} [S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (2)$$

式中: v 为酶促反应速率, $\Delta A/\text{min}$; v_{\max} 为最大反应速率, $\Delta A/\text{min}$; $[S]$ 为底物质量浓度, g/L; K_m 为米氏常数, g/L。

混合型抑制类型 Dixon 方程 (3) 可进一步验证抑制类型并确定相关抑制常数。

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{IS}} \right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)} \sqrt{2} \quad (3)$$

式中: $[I]$ 为抑制剂质量浓度, g/L; K_I 为抑制剂对酶的抑制常数, g/L; K_{IS} 为抑制剂对酶-底物复合物的抑制常数, g/L。

1.3.3 α -淀粉酶活性抑制率测定

参照梁宗瑶等^[17]的方法进行测定, 具体步骤为: 取 50 μL 不同质量浓度 PYCAP 样液 (用蒸馏水配制) 和 50 μL 的 α -淀粉酶溶液 (12 U/mL) 混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 再加入 50 μL 质量分数 1% 可溶性淀粉后, 再于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 最后加入 50 μL 的 DNS 终止反应, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 冷却至室温, 用光吸收酶标仪测定其在 540 nm 处的吸光度 (A_1)。以 PBS 代替酶溶液为空白组, 测定其在 540 nm 处的吸光度 (A_2), 以 PBS 代替 PYCAP 样液为对照组,

测定其在 540 nm 处的吸光度 (A_0), 按公式 (1) 计算 PYCAP 对 α -淀粉酶的抑制率。

1.3.4 α -淀粉酶活性抑制动力学实验

参照刘承毅等^[18]的方法进行动力学实验。设置 PYCAP 样液 (以蒸馏水配制) 质量浓度范围 0.1~0.5 g/L, 可溶性淀粉溶液质量浓度范围 2~10 g/L, 按照 1.3.3 节方法进行实验, 测定反应体系的吸光度, 以每分钟吸光度的变化量表示酶促反应速率。以可溶性淀粉溶液质量浓度的倒数 $[1/[S]]$ 为横坐标, 以酶促反应速率的倒数 ($1/v'$) 为纵坐标绘制反应体系的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 并进行纵截距和斜率作图, 确定 PYCAP 对 α -淀粉酶的抑制类型。

1.3.5 胰脂肪酶活性抑制率测定

胰脂肪酶是分解脂肪的核心酶。胰脂肪酶具有将食物中的油脂转化为小分子甘油和脂肪酸的能力。通过抑制小肠中胰脂肪酶的活性, 能导致胰脂肪酶失去部分分解功能, 从根本上阻止脂肪进入血液, 有助于减少脂肪的消化和吸收, 达到降低血脂的效果^[19-20]。

参照曹叶霞等^[21]的方法进行测定, 具体步骤为: 在锥形瓶中加入 5 mL 的 PBS (0.025 mol/L、pH=7.4) 和 4 mL 聚乙烯醇为乳化剂、橄榄油为油相底物的乳化液 (0.3 g/mL), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 10 min, 加入 1 mL 不同质量浓度 PYCAP 样液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min, 然后加入 1 mL 胰脂肪酶溶液 (质量浓度 2 g/L), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中反应 15 min, 反应结束后, 立即向其中加入 15 mL 体积分数 95% 乙醇终止酶反应。加 3 滴酚酞指示剂, 用 0.025 mol/L 的 NaOH 溶液滴至体系呈微红色。同时作空白对照实验, 先不加胰脂肪酶溶液, 保温 15 min 后立即加入 15 mL 体积分数 95% 乙醇水溶液, 最后加入 1 mL 胰脂肪酶溶液。以奥司利他为阳性对照, 按公式 (4) 计算胰脂肪酶活力 (IU)。

$$\text{酶活力} = \frac{(V_1 - V_2) \times c}{t \times m} \quad (4)$$

式中: V_1 为样品消耗 NaOH 标准溶液的体积, L; V_2 为空白对照消耗 NaOH 标准溶液的体积, L; c 为 NaOH 标准溶液的浓度, 0.025 mol/L; t 为加酶后反应时间, min; m 为胰脂肪酶添加量, g。

根据公式 (5) 计算胰脂肪酶的抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (5)$$

式中: A 、 B 分别为抑制前、后胰脂肪酶活力。

1.3.6 黄嘌呤氧化酶活性抑制率测定

黄嘌呤氧化酶 (XO) 在尿酸生物合成途径中发挥着重要作用, 它促进次黄嘌呤向黄嘌呤转化, 并将其进一步氧化产生尿酸。尿酸含量的持续升高可能会诱发高尿酸血症, 并有可能引发痛风、关节炎、肾脏功能衰竭等健康问题^[22-23]。因此, 抑制黄嘌呤氧化酶活性以降低尿酸的生成, 已成为治疗高尿酸

血症及其相关并发症的重要临床策略。

参照李雨鸿等^[24]的方法进行测定,具体步骤为:取 0.6 mL 的 PBS 缓冲液 (0.10 mol/L、pH=8.5), 0.2 mL 黄嘌呤溶液 (2.0 mmol/L) 和 0.1 mL 不同质量浓度 PYCAP 样液于试管中混匀, 加入 0.2 mL 黄嘌呤氧化酶溶液 (0.1 U/mL) 后于 25 °C 水浴 30 min, 取出加入 0.2 mL 盐酸 (1.0 mol/L) 终止反应。以别嘌呤醇为阳性对照, 用紫外-可见分光光度计测定其在 290 nm 处的吸光度。按公式 (6) 计算黄嘌呤氧化酶的抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{(a-b)-(c-d)}{a-b} \times 100 \quad (6)$$

式中: a 为加酶不加样品的吸光度; b 为不加酶不加样品的吸光度; c 为加酶且加样品的吸光度; d 为不加酶加样品的吸光度。

1.4 PYCAP 成分鉴定

PYCAP 样品液制备: 称取 125 mg 的 PYCAP 样品于离心管中, 加 1 mL 预冷 (4 °C, 1 h) 的甲醇溶液涡旋混匀, 于 12000 r/min 离心 20 min, 取上清液过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 得到 PYCAP 样品液。

色谱条件: ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm×1.8 μm) 色谱柱。流动相 A 为质量分数 0.1% 的甲酸水溶液, 流动相 B 为体积分数 100% 乙腈, 进样量为 4 μL。柱温 40 °C, 流速 0.3 mL/min。梯度洗脱程序: 0~2 min, 流动相 B 维持在 0; 2~6 min, 流动相 B 从 0 线性变化至 48%; 6~10 min, 流动相 B 从 48% 线性变化至 100%; 10~12 min, 流动相 B 维持在 100%; 12.0~12.1 min, 流动相 B 从 100% 线性变化至 0; 12.1~15.0 min, 流动相 B 维持在 0 (以上均为体积分数)。

质谱条件: 采用电喷雾电离 (ESI) 进行正离子和负离子模式检测。使用 HESI 源进行离子化, 其离子化条件如下: 喷雾电压 3.8 kV(+) 和 3.2 kV(-); 毛细管温度 350 °C; 鞘气流速 40 arb; 辅助气流速 5 arb; 汽化温度 350 °C; 镜头电压 50 V。

HPLC-MS 分析: 结合 mzCloud (<https://www.mzcloud.org>)、mzVault 和 ChemSpide (<https://www.chemspide.com>) 等数据库并参考霍俊伟等^[25]的方法进行分析。

1.5 数据处理

采用 SPSS 20 软件对数据进行统计分析, Origin 2022 进行绘图, 每组实验均平行测定 3 次, 实验结果以“算数平均值±标准差”表示。

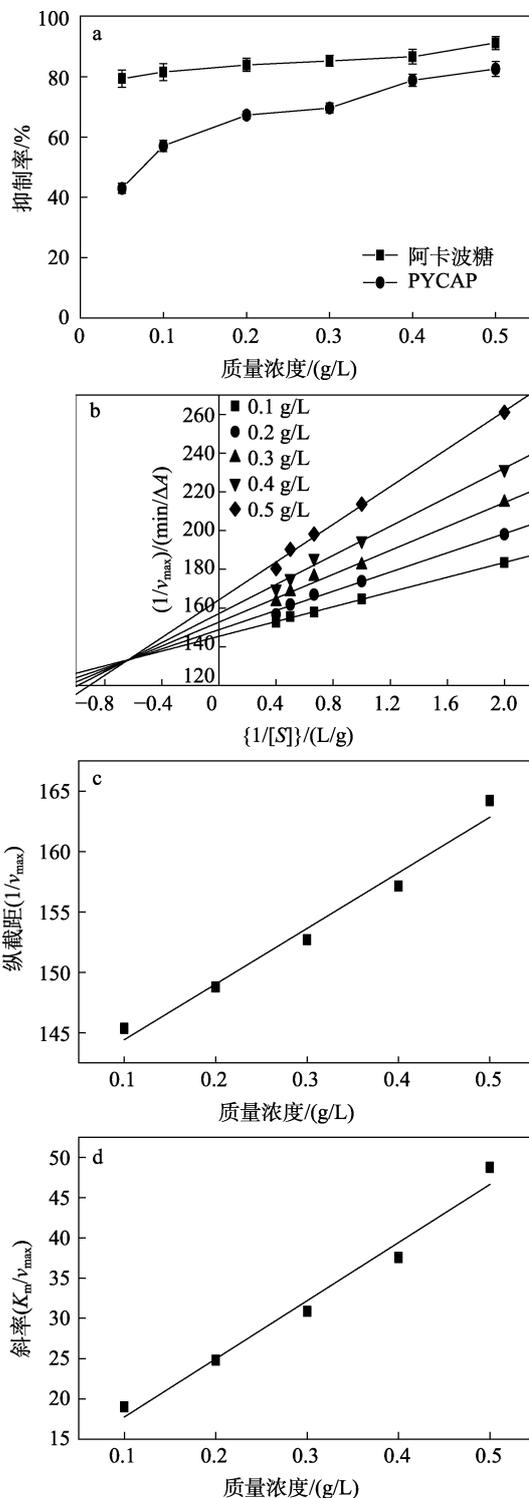
2 结果与讨论

2.1 PYCAP 生物活性测试结果分析

2.1.1 对 α-葡萄糖苷酶的活性抑制

α-葡萄糖苷酶抑制剂是一种口服降糖药物, 这

类药物能够抑制小肠内的各种 α-葡萄糖苷酶, 减缓淀粉分解为葡萄糖的速度和肠道对葡萄糖的吸收, 降低血糖水平^[26-27]。图 1 为 PYCAP 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用。



a—质量浓度对抑制率的影响; b—Lineweaver-Burk 图; c—纵截距作图; d—斜率作图

图 1 PYCAP 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effect of PYCAP on α-glucosidase

从图 1a 可以看出, 随着 PYCAP 质量浓度的增加, 其对 α-葡萄糖苷酶的抑制率呈逐渐上升的趋势,

相同质量浓度下, 阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率高于 PYCAP, 但随着 PYCAP 质量浓度的上升, 二者差距逐渐减小。阿卡波糖和 PYCAP 的半数抑制质量浓度 (IC_{50}) 分别为 (0.033 ± 0.002) 和 (0.073 ± 0.002) g/L, 表明阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力优于 PYCAP; 但当 PYCAP 质量浓度为 0.5 g/L 时, 阿卡波糖和 PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为 $91.13\% \pm 2.13\%$ 和 $82.53\% \pm 2.46\%$, 两者差异不显著。

从 PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制 Lineweaver-Burk 图 (图 1b) 可以看出, 随着 PYCAP 质量浓度的升高, 对应的直线斜率也逐渐增大, 各直线在 x 轴的截距逐渐减小, 表明 K_m 值与 PYCAP 质量浓度成正相关, 而 v_{max} 值则与之呈现为负相关, 各质量浓度下拟合直线交于第二象限, 呈现出竞争性-非竞争性混合抑制的特点。由此推测, PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用类型为竞争性-非竞争性混合抑制^[28]。

表 1 为 PYCAP 抑制 α -葡萄糖苷酶的 Michaelis-Menten 方程; 以纵截距 ($1/v_{max}$) 和斜率 (K_m/v_{max}) 对抑制剂质量浓度二次作图, 得到图 1c、d, 并计算得到相关抑制常数。经计算, PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制常数 K_I 为 1.1679 g/L, 对酶-底物复合物 (ES) 的抑制常数 K_{IS} 为 3.0368 g/L, 该抑制体系中 $K_I < K_{IS}$, 说明 PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用强于对酶-底物复合物的抑制。通过与酶紧密结合减少酶促反应的发生, 可以起到有效降糖的作用。

表 1 PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的 Michaelis-Menten 方程

Table 1 Michaelis-Menten equation for inhibition effect of α -glucosidase by PYCAP

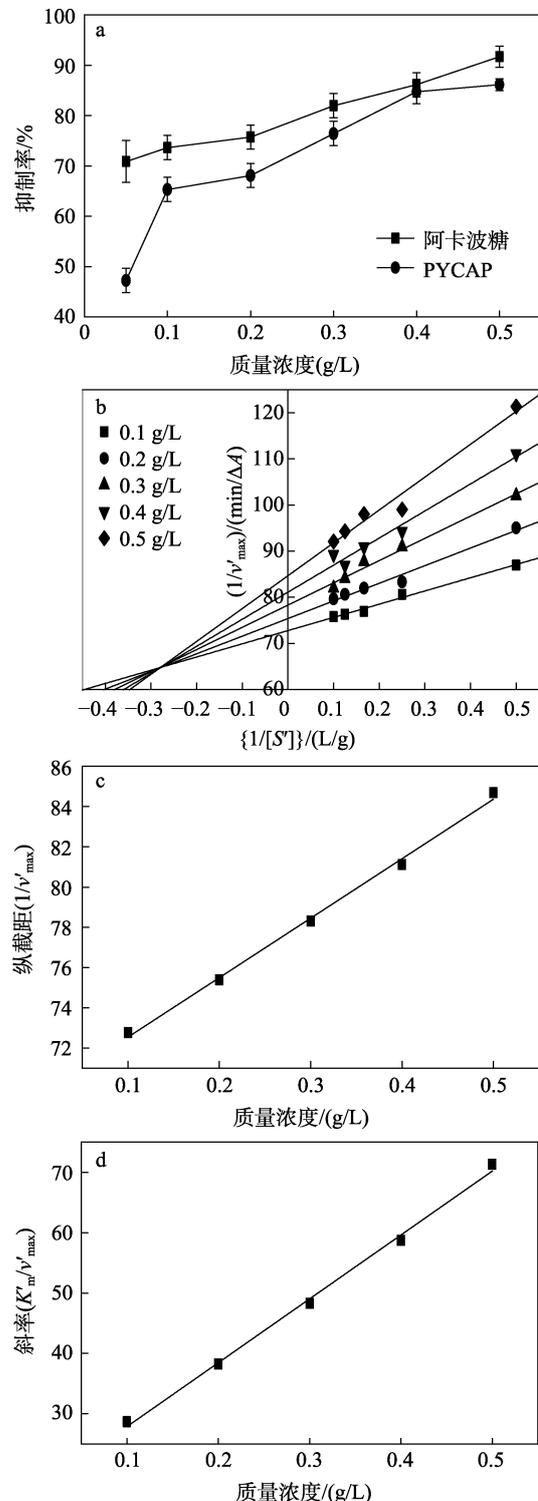
PYCAP 质量浓度/(g/L)	Michaelis-Menten 方程	R^2
0.1	$\frac{1}{v} = \frac{19.0073}{[S]} + 145.3661$	0.9986
0.2	$\frac{1}{v} = \frac{24.8140}{[S]} + 148.7831$	0.9914
0.3	$\frac{1}{v} = \frac{30.8751}{[S]} + 152.6890$	0.9885
0.4	$\frac{1}{v} = \frac{37.5543}{[S]} + 157.1300$	0.9894
0.5	$\frac{1}{v} = \frac{48.7334}{[S]} + 164.2142$	0.9943

2.1.2 对 α -淀粉酶的活性抑制

抑制 α -淀粉酶可以使食物中的淀粉在肠道的消化被延缓, 抑制餐后血糖水平的升高, 对 II 型糖尿病的饮食治疗有所帮助^[29]。图 2 为 PYCAP 对 α -淀粉酶的抑制作用。

从图 2a 可以看出, PYCAP 对 α -淀粉酶的抑制效果与 PYCAP 的质量浓度呈一定正相关。在质量浓度 0.1~0.5 g/L 范围内, 阿卡波糖对 α -淀粉酶的抑

制率高于 PYCAP, 两者 IC_{50} 分别为 (0.020 ± 0.001) 和 (0.056 ± 0.005) g/L。当质量浓度为 0.5 g/L 时, 两者对 α -淀粉酶的抑制率差异不显著, 分别为 $91.67\% \pm 2.08\%$ 和 $86.11\% \pm 1.20\%$, 表明 PYCAP 对 α -淀粉酶具有较好的抑制作用, 可以作为潜在的 α -淀粉酶抑制剂。



a—质量浓度对抑制率的影响; b—Lineweaver-Burk 图; c—纵截距作图; d—斜率作图

图 2 PYCAP 对 α -淀粉酶的抑制作用

Fig. 2 Inhibition effect of PYCAP on α -amylase

从 PYCAP 对 α -淀粉酶的抑制 Lineweaver-Burk 图 (图 2b) 可以看出, 各直线交于第二象限, 随着 PYCAP 质量浓度的增加, v_{max} 值减小, K_m 值增大, 为竞争性-非竞争性混合抑制的典型特征^[30]。据此推测, PYCAP 对 α -淀粉酶的抑制类型为竞争性-非竞争性混合抑制。

表 2 为 PYCAP 抑制 α -淀粉酶的 Michaelis-Menten 方程。根据 Lineweaver-Burk 方程, 以直线的纵截距 ($1/v'_{max}$) 和斜率 (K'_m/v'_{max}) 对 PYCAP 质量浓度二次作图, 得到图 2c、d。结合公式 (3) 可计算得到 PYCAP 对 ES 的抑制常数 K_{IS} 值及对 α -淀粉酶的抑制常数 K_I 值, 分别为 2.357 和 0.164 g/L。研究表明, 抑制常数越小, 复合物的结合越紧密^[31], PYCAP 抑制常数 $K_I < K_{IS}$, 说明 PYCAP 对 α -淀粉酶的亲和力强于对 ES 的亲和力, 能够通过与 α -淀粉酶紧密结合, 减少酶促反应发生, 阻止淀粉分解为葡萄糖, 从而产生降血糖效果^[32]。

表 2 PYCAP 对 α -淀粉酶抑制作用的 Michaelis-Menten 方程

Table 2 Michaelis-Menten equation for inhibition effect of α -amylase by PYCAP

PYCAP 质量浓度/(g/L)	Michaelis-Menten 方程	R^2
0.1	$\frac{1}{v} = \frac{28.6693}{[S]} + 72.7775$	0.9859
0.2	$\frac{1}{v} = \frac{38.2408}{[S]} + 75.3925$	0.9717
0.3	$\frac{1}{v} = \frac{48.2677}{[S]} + 78.3129$	0.9798
0.4	$\frac{1}{v} = \frac{58.7263}{[S]} + 81.1113$	0.9641
0.5	$\frac{1}{v} = \frac{71.3084}{[S]} + 84.6837$	0.9611

2.1.3 对胰脂肪酶的活性抑制

图 3 为 PYCAP 对胰脂肪酶的抑制作用。

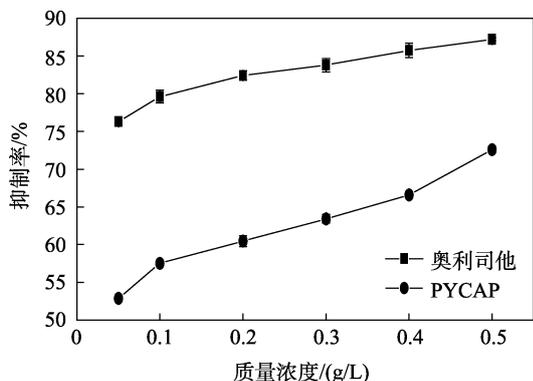


图 3 不同质量浓度 PYCAP 对胰脂肪酶的抑制作用
Fig. 3 Inhibitory effect of PYCAP with different mass concentrations on pancreatic lipase

从图 3 可以看出, 随着 PYCAP 质量浓度的升高, 胰脂肪酶抑制率呈逐渐上升趋势, 说明 PYCAP 对胰脂肪酶的抑制呈现质量浓度依赖性, 奥利司他对胰脂肪酶的抑制率始终高于 PYCAP, 两者对胰脂肪酶 IC_{50} 分别为(0.017±0.001)和(0.034±0.003) g/L, 说明 PYCAP 对胰脂肪酶有一定抑制作用。

2.1.4 对黄嘌呤氧化酶的活性抑制

图 4 为 PYCAP 对黄嘌呤氧化酶的抑制作用。从图 4 可以看出, 随着 PYCAP 质量浓度的增大, 其对黄嘌呤氧化酶的抑制率也不断增大, 当质量浓度在 0.05~0.50 g/L 范围内时, 别嘌呤醇对黄嘌呤氧化酶的抑制率始终高于 PYCAP, 两者对黄嘌呤氧化酶 IC_{50} 分别为(0.106±0.004)和(0.251±0.011) g/L。当质量浓度 0.50 g/L 时, 两者对黄嘌呤氧化酶的抑制率差异较小, 分别为 79.37%±1.92%和 96.62%±1.79%, 因此, PYCAP 具有较好抑制黄嘌呤氧化酶的能力, 可以作为潜在的黄嘌呤氧化酶抑制剂。

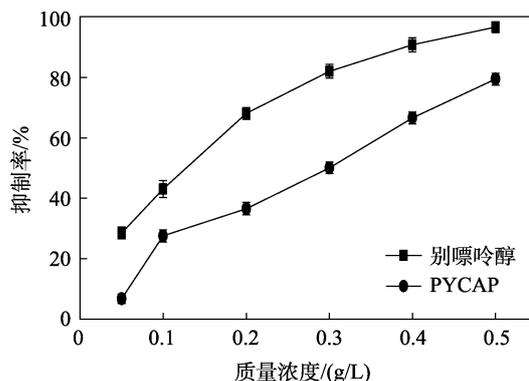


图 4 不同质量浓度 PYCAP 对黄嘌呤氧化酶的抑制作用
Fig. 4 Inhibition effect of PYCAP with different mass concentrations on xanthine oxidase

2.2 PYCAP 成分鉴定结果分析

图 5 为利用 UPLC-QTOF-MS/MS 技术测定的 PYCAP 总离子流图; 表 3 为 PYCAP 成分分析。

从 PYCAP 中共鉴别出 27 个多酚类化学成分, 主要以黄酮类、吡喃类和酚酸类化合物为主。其中, 黄酮类化合物 10 种 (表 3), 如芒柄花黄素、甘草西定、芒果苷、7-羟基黄酮等。其中, 已有研究表明, 芒柄花黄素不仅具有抗氧化、抗炎、抗癌和防止肝脂肪变性等作用, 还可降低糖尿病小鼠的血糖水平, 减缓心肌纤维化现象及炎症反应, 改善心肌损伤^[33]。另外, 在吴思毅等^[34]的研究中还发现, 芒柄花黄素可通过抑制 P2X7R/NLRP3 通路缓解高糖诱导的心肌细胞的炎症反应与细胞焦亡现象, 减少细胞损伤。吡喃类化合物 7 种 (表 3), 如秦皮素、瑞香素、东莨菪素、7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素等。秦皮素对低密度脂蛋白 (LDL) 氧化起到保护作用, 可通过激活血管平滑肌细胞 (VSMC) 中的抗氧化

酶来减轻动脉粥样硬化 (AS)^[35]。瑞香素是从中草药中提取的一种天然香豆素衍生物, 具有消炎、抗肿瘤、保护神经等多种药理作用, 已运用在多种炎症相关疾病和肿瘤治疗方面^[36]。酚酸类化合物 10 种 (表 3), 如龙脑阿魏酸酯、咖啡酸甲酯、阿魏酸、咖啡酸等。阿魏酸是一种天然抗氧化剂, 对心血管

具有良好的保护作用, 还可通过抑制炎症、上调抗氧化蛋白、改善能量代谢等途径, 减轻心肌细胞所受的损伤^[37]。咖啡酸在保健中发挥着重要的作用, 研究表明, 咖啡酸具有抗氧化、抗病毒、抗癌细胞、降血糖等各种生理作用, 在临床医学上常用于治疗血小板降低以及白细胞减少症状。

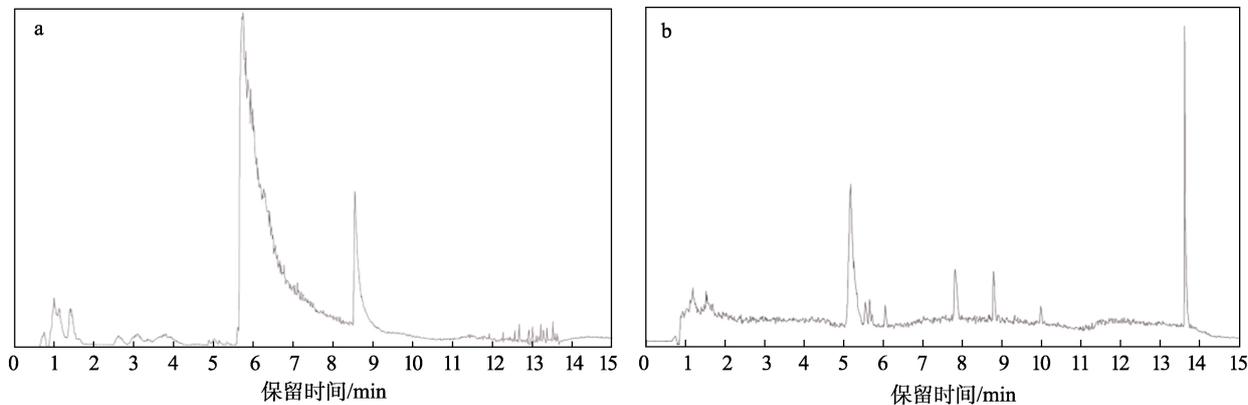


图 5 正离子模式 (a) 和负离子模式 (b) 下的 PYCAP 总离子流图

Fig. 5 Total ion flow diagrams of PYCAP in positive ion mode (a) and in negative ion mode (b)

表 3 PYCAP 中多酚成分分析
Table 3 Analysis of polyphenols in PYCAP

序号	化合物名称	离子模式	保留时间/min	分子式	m/Z	碎片离子, m/Z
黄酮类						
1	芒柄花黄素	[M-H] ⁻	0.97	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.06631	252.64615, 180.20535, 177.03105, 129.01233, 117.01344
2	甘草西定	[M-H] ⁻	6.95	C ₂₆ H ₃₂ O ₅	423.21771	379.11716, 363.79565, 335.16577, 317.12402, 293.06781, 272.01389
3	芒果苷	[M-H] ⁻	5.65	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	421.07761	403.02356, 355.02646, 331.00296, 270.99994, 150.99707
4	7-羟基黄酮	[M-H] ⁻	1.36	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	237.05573	177.03105, 147.02083, 116.02922, 87.00227
5	7-羟基-5-甲基黄酮	[M-H] ⁻	1.54	C ₁₆ H ₁₂ O ₃	251.07132	250.3687, 225.69318, 147.78467, 101.01896, 96.21561
6	3',4-二羟基-β-萘黄酮	[M-H] ⁻	4.91	C ₁₉ H ₁₂ O ₄	303.06631	285.04211, 241.05502, 201.02956, 123.04281, 99.00414
7	3,5-二羟基-2-(4-羟基苯基)-7-[3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)杂环英-2-基]氧基-2,3-二氢苯并吡喃-4-酮	[M-H] ⁻	5.79	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.10892	342.03152, 269.00931, 191.05188, 125.02416, 87.84575
8	宝藿苷 I	[M+H] ⁺	8.83	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	515.19116	497.33649, 411.11407, 315.06476, 194.57266, 105.06885, 95.0847, 64.00392
9	杨梅素	[M+H] ⁺	1.29	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	319.04489	291.09003, 274.12384, 175.03946, 150.0844, 138.05151, 107.05177
10	次苷酸查尔酮	[M-H] ⁻	5.79	C ₂₅ H ₂₆ O ₄	389.17581	329.13736, 215.11681, 137.02101, 123.43859, 73.02591
吡喃类						
1	秦皮素	[M+H] ⁺	5.63	C ₁₀ H ₈ O ₅	209.04448	194.00237, 124.08238, 96.04887, 59.04852
2	瑞香素	[M-H] ⁻	5.83	C ₉ H ₆ O ₄	177.01932	162.0237, 149.01411, 133.01875, 129.01799, 121.02263, 107.00855
3	东莨菪素	[M-H] ⁻	6.54	C ₁₀ H ₈ O ₄	191.03502	176.00116, 161.03647, 149.0519, 78.19785
4	异嗪皮啉	[M+Na] ⁺	1.18	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	245.04202	223.06046, 209.02434, 167.01418, 83.0005
5	6-甲基香豆素	[M+H] ⁺	5.81	C ₁₀ H ₈ O ₂	161.05968	146.03481, 132.07825, 79.05232, 55.01722
6	7-烯丙氧基香豆素	[M-H] ⁻	8.22	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	201.05573	186.02321, 171.0923, 165.08272, 141.1209, 125.09273
7	7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素	[M+Na] ⁺	8.34	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	267.09912	223.09857, 181.05756, 126.58844, 79.05363

续表 1

序号	化合物名称	离子模式	保留时间/min	分子式	<i>m/z</i>	碎片离子, <i>m/z</i>
酚酸类						
1	儿茶酚	[M-H] ⁻	5.16	C ₆ H ₆ O ₂	109.02952	108.01414, 91.01363, 81.02986
2	对苯二酚	[M+H] ⁺	9.70	C ₆ H ₆ O ₂	111.04408	99.96479, 68.04939
3	龙脑阿魏酸酯	[M+NH ₄] ⁺	6.09	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	348.21692	302.17041, 223.13945, 181.09686, 104.90761, 62.30643
4	黄腐酸	[M-H] ⁻	5.15	C ₁₄ H ₁₂ O ₈	307.04593	289.15305, 263.04645, 203.1165, 187.05069, 147.0242, 109.02736
5	对香豆酸	[M-H] ⁻	6.66	C ₉ H ₈ O ₃	163.03952	161.03842, 131.02733, 120.04863, 101.0171, 89.01862
6	咖啡酸甲酯	[M-H] ⁻	6.99	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.05061	178.01376, 165.47775, 149.01578, 134.02554, 107.04427, 90.9379
7	阿魏酸	[M-H ₂ O+H] ⁺	5.60	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	177.054	149.05051, 134.03154, 105.0668
8	异阿魏酸	[M+H-H ₂ O] ⁺	5.96	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	177.054	161.09166, 134.03055, 62.01494, 107.04549
9	咖啡酸	[M+H-H ₂ O] ⁺	5.53	C ₉ H ₈ O ₄	163.039	158.05554, 136.04135, 135.03539, 133.02496, 117.02735
10	苯甲酸	[M-H] ⁻	5.05	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315.07211	225.03212, 195.75311, 151.04283, 131.05009, 107.42872, 87.00453, 53.13975

3 结论

本文测定了纯化后 PYCAP 的降血糖和降血脂等生物活性, 并通过 UPLC-QTOF-MS/MS 对其多酚成分进行了分析。

(1) PYCAP 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性抑制作用明显, 其抑制类型皆为竞争性-非竞争性混合抑制, IC₅₀ 分别为(0.073±0.002)和(0.056±0.005) g/L。

(2) PYCAP 具有一定的降血脂和降尿酸能力, 且降血脂和降尿酸能力与其质量浓度呈正相关, IC₅₀ 分别为(0.034±0.003)和(0.251±0.011) g/L。

(3) PYCAP 共鉴别出 27 个多酚类化学成分, 主要为黄酮类 10 种、吡喃类 7 种和酚酸类 10 种。

本文为云南小粒咖啡果皮资源在糖尿病和高血脂症的临床及日常应用方面提供了有益指导, 同时也为咖啡果皮多酚的进一步研发和应用奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] RANA A, SAMTIYA M, DHEWA T, *et al.* Health benefits of polyphenols: A concise review[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 46(10): e14264.
- [2] LICZBIŃSKI P, BUKOWSKA B. Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest *in vitro* investigations[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 175: 114265.
- [3] CASTALDO L, NARVÁEZ A, IZZO L, *et al.* *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of coffee silverskin polyphenolic extract and characterization of bioactive compounds using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. *Molecules*, 2020, 25(9): 2132.
- [4] YANG C J (杨成峻), CHEN M S (陈明舜), LIU C M (刘成梅), *et al.* Chemical composition and hypoglycemic activity of phenolic extract from *Zanthoxylum bungeanum* pericarps[J]. *Food Science (食品科学)*, 2023, 44(2): 271-278.
- [5] XIE X (谢星), WANG S Y (王思宇), WANG P X (王佩欣), *et al.* Chemical composition, antioxidant and hypoglycemic activities of phenolic fractions from *Sargassum pallidum*[J]. *Food Science (食品科学)*, 2023, 44(10): 281-290.

- [6] TAN S, KE Z L, ZHOU C B, *et al.* Polyphenol profile, antioxidant activity, and hypolipidemic effect of longan byproducts[J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2083.
- [7] ZHANG K (张坤), LIU X G (刘小刚), LI H Y (李慧永), *et al.* Effect of heating time and sugar content on the quality of coffee peel jam[J]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2022, 48(24): 97-104.
- [8] ZHU K (朱珂), DONG W J (董文江), CHENG J H (程金焕), *et al.* Comparison of the microstructure and functional properties of soluble dietary fiber from coffee peel and other five different sources[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops (热带作物学报)*, 2023, 44(2): 394-404.
- [9] MANASA V, PADMANABHAN A, APPAIAH K A A. Utilization of coffee pulp waste for rapid recovery of pectin and polyphenols for sustainable material recycle[J]. *Waste Management*, 2021, 120: 762-771.
- [10] FITRIA P D, AMIN M, LOKAPIRNASARI W P, *et al.* Supplementation of fermented coffee-peel flour to increase high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, docosahexaenoic acids (DHA) and eicosapentaenoic acids (EPA) deposition in tilapia fillet[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 24: 101502.
- [11] ANALIANASARI A, KENALI E W, BERLIANA D, *et al.* Liquid organic fertilizer development strategy based coffee leather and raw materials to increase revenue local coffee robusta farmers[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2022, 1012: 012047.
- [12] CHEN Y (陈誉), LUO L (罗磊), WANG S (王硕), *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory properties of polyphenols extracted from coffee cherry husks[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology (食品与生物技术学报)*, 2022, 41(8): 104-111.
- [13] HU G L, WANG X, ZHANG L, *et al.* The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee[J]. *Food & Function*, 2019, 10: 3113-3126.
- [14] ZHOU Y M (周一鸣), MA S J (马思佳), JIANG Q Y (蒋晴怡), *et al.* Inhibition of starch-digesting enzymes by rutin and quercetin in tartary buckwheat[J]. *Food Science (食品科学)*, 2022, 43(18): 30-37.
- [15] WANG X (王旭), KONG Z Q (孔志强), ZHAO Y H (赵玉红). Effect of solvent polarity on composition, *in vitro* hypoglycemic and hypolipidemic activities of extracts from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) residue[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(10): 2060-2068.
- [16] PAN Y (潘玥), LIU X L (刘小莉), WANG Y (王英), *et al.* Inhibitory effect of polyphenols from blueberry leaves on the activity of α -amylase and α -glucosidase *in vitro*[J]. *Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发)*, 2022, 34(4): 579-587.