

## 枸杞叶多糖结构表征及体外抗氧化与酶活抑制活性评价

张涛, 马麦迈, 卢顺, 杨雪, 范艳丽\*

(宁夏大学食品科学与工程学院 银川 750021)

**摘要** 采用碱提醇沉法提取枸杞叶多糖(LBLP),通过离子色谱法和高效凝胶渗透色谱法检测 LBLP 的单糖组成及分子量分布。采用紫外光谱、红外光谱及 X 射线衍射等方法进行 LBLP 结构表征,并通过体外自由基清除试验和酶活抑制试验评价其抗氧化和糖脂代谢调控活性。结果表明,LBLP 的总糖含量为(65.78±0.85)%,蛋白含量为(12.25±0.25)%,糖醛酸含量为(19.26±0.14)%,为蛋白复合酸性多糖。LBLP 由 8 种单糖组成,物质的量比为: $n_{\text{阿拉伯糖}}:n_{\text{半乳糖}}:n_{\text{鼠李糖}}:n_{\text{葡萄糖}}:n_{\text{木糖}}:n_{\text{古罗糖醛酸}}:n_{\text{半乳糖醛酸}}:n_{\text{盐酸氨基葡萄糖}}=427:293:86:73:42:40:31:8$ ,其中阿拉伯糖含量最高。LBLP 主要含有 2 种不同分子量分布的多糖组分,其中含量最多的组分其重均分子量( $M_w$ )为(67 380±288)ku。紫外光谱显示枸杞叶提取物含有蛋白吸收峰,表明其是一种蛋白复合多糖,与蛋白质含量测定结果一致。由红外光谱图可知,LBLP 具有多糖特征吸收峰,且含有吡喃糖苷。在抗氧化试验中,LBLP 对 2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑-6-磺酸阳离子 (ABTS<sup>+</sup>)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼阳离子 (DPPH<sup>+</sup>)、超氧阴离子和羟自由基均具有较好的清除效果,当 LBLP 质量浓度为 5 mg/mL 时,对 DPPH<sup>+</sup>和超氧阴离子的清除率均达 90%。酶活性抑制试验中,LBLP 对  $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、胰蛋白酶和胰脂肪酶的活性均有较好的抑制能力并具有量效关系,半抑制质量浓度(IC<sub>50</sub>)分别为(23.80±0.17),(9.53±0.39),(23.36±0.81)mg/mL 和(16.03±0.59)mg/mL。本研究可为枸杞叶多糖在抗氧化、降血糖和降血脂相关功能食品的开发提供理论依据。

**关键词** 枸杞叶; 多糖; 结构表征; 抗氧化; 酶抑制动力学

文章编号 1009-7848(2024)11-0059-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.11.007

枸杞叶(*Lycium barbarum* leaves)是茄科枸杞属植物枸杞的嫩叶。正如《本草纲目》所述,枸杞叶性味苦、甘、涩,药理作用复杂多样,具有抗炎镇痛、补肾益精、清热明目以及延缓衰老等功效,对健康有益处,是很好的食品补充剂<sup>[1]</sup>。枸杞嫩叶被称为生物功能蔬菜,在许多亚洲国家被用于煮汤、炒菜和煮鸡蛋<sup>[2]</sup>。枸杞叶的植物化学特征通常与枸杞果相似,甚至某些成分比后者更丰富<sup>[3]</sup>。枸杞叶主要功能成分包括多糖、酚类、黄酮、生物碱、蛋白质、脂肪、氨基酸和萜类化合物等<sup>[4]</sup>,其中多糖的含量较高。

多糖是天然大分子物质,是功能性保健食品中重要的标志性功效成分,药理研究表明多糖具有降血糖、免疫调节和降血脂等多种作用<sup>[5]</sup>。近年来,枸杞多糖因多样且显著的生物活性而备受关注<sup>[6]</sup>。研究人员已经发现,枸杞多糖在增强神经保护、提升抗疲劳/耐力、促进代谢、改善糖尿病患者

的血糖水平、增强抗氧化性和抗肿瘤活性以及提供细胞保护等方面均表现出积极作用<sup>[7]</sup>。枸杞叶多糖(LBLP)是一种水溶性多糖,由酸性杂多糖和蛋白质的肽键结合而成的糖蛋白和糖肽<sup>[8]</sup>。目前人们对 LBLP 的结构特征和生物活性的研究较少,这阻碍了枸杞经济的进一步研究和开发<sup>[9]</sup>。本研究从枸杞叶中提取 LBLP,进行结构表征,探究其理化性质和功能特性。通过体外抗氧化和体外酶活性抑制试验来考察 LBLP 的生物活性,为枸杞叶的进一步开发和提高资源利用率奠定理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

枸杞叶,采自宁夏童子茶科技有限公司叶用枸杞种植基地。

葡萄糖醛酸、磷酸、四硼酸钠、牛血清蛋白、铁氰化钾,天津市大茂化学试剂厂;胰脂肪酶、考马斯亮蓝 G-250、1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),上海麦克林生化科技有限公司; $\alpha$ -淀粉酶,索莱宝科技有限公司;胰蛋白酶,西亚化学科技有限公司;ABTS,上海瑞永生物科技有限公司;阿卡波

收稿日期: 2023-11-14

基金项目: 宁夏重点研发计划项目(2022BBF03016)

第一作者: 张涛,女,硕士生

通信作者: 范艳丽 E-mail: fanyanli\_fyl@163.com

糖、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶,阿拉丁试剂有限公司;三氟乙酸,国药集团化学试剂有限公司;奥利司他,上海源叶生物科技有限公司。所有化学试剂均为分析纯级。

## 1.2 仪器

ICS5000 离子色谱仪,Thermo Fisher 公司;UV-1800 紫外光谱仪器,日本岛津公司;Spectrum Two 傅里叶变换-红外光谱仪,美国 PerkinElmer 公司;LC-10A 高效凝胶渗透色谱仪器,Shimadzu 公司;JSM-7500F 扫描电镜,日本电子株式会社;Multiskan Mk3 酶标仪,赛默飞世尔仪器公司;D8 ADVANCE A25X 射线衍射仪器,德国布鲁克 AXS 有限公司;Pyris 1TGA 热重分析仪,美国 Perkin Elmer 公司。

## 1.3 方法

1.3.1 原料的预处理 挑选新鲜品质好的枸杞叶,在 60 °C 真空冷冻干燥箱中干燥 12 h 后,经粉碎机粉碎后过 40 目筛备用<sup>[10]</sup>。

1.3.2 LBLP 的制备 参照张召等<sup>[11]</sup>的方法稍加修改,称取 20 g 枸杞叶粉,按照料液比 1:30 加入 1% 的碱液,在 45 °C 下搅拌制备 LBLP。在 4 000 r/min 下将提取液离心 15 min,调上清液 pH 值为 3.0 使蛋白沉淀出,后调 pH 值为中性并在 60 °C 下旋转蒸发浓缩至 1/3,加入无水乙醇( $V_{\text{浓缩液}}:V_{\text{无水乙醇}}=1:4$ )醇沉过夜后,4 000 r/min 离心 15 min,留下沉淀并冷冻干燥得 LBLP。

### 1.3.3 LBLP 提取物特征分析

1.3.3.1 LBLP 中总糖含量的测定 采用国家标准《枸杞》(GB/T 18672-2014)中的方法进行测定。

1.3.3.2 LBLP 中蛋白含量的测定 参照刘恒等<sup>[12]</sup>测定蛋白质的方法稍加修改,以蒸馏水作为空白,测定样品吸光度值并计算 LBLP 中蛋白的含量。

1.3.3.3 LBLP 中糖醛酸含量的测定 参照陈巧巧等<sup>[13]</sup>的方法稍加修改,以蒸馏水作空白对照,测定样品吸光度值并计算出 LBLP 中糖醛酸的含量。

1.3.3.4 LBLP 单糖组成的测定 参照 Yang 等<sup>[14]</sup>的方法稍加修改,采用离子色谱法(IC)测定 LBLP 单糖组成。

1.3.3.5 LBLP 分子质量的测定 参照 Liu 等<sup>[15]</sup>的方法稍加修改,采用凝胶色谱(HPGPC)法测定

LBLP 分子质量。

### 1.3.4 LBLP 的结构表征

1.3.4.1 LBLP 紫外光谱的测定 称取 0.01 g LBLP,加入超纯水,配成质量浓度为 0.1 mg/mL 的溶液,在室温下置于紫外光谱仪中扫描,扫描范围为 190~400 nm<sup>[16]</sup>。

1.3.4.2 LBLP 红外光谱的测定 制备溴化钾(KBr)片时以质量比 1:100 的比例将多糖提取物样品与 KBr 粉末充分混合,将不添加多糖提取物样品的 KBr 片为参考,扫描空白 KBr 后,将制备好的 KBr 片通过傅里叶变换红外光谱仪扫描,并绘制样品的红外光谱图<sup>[17]</sup>。

1.3.4.3 LBLP X 射线衍射分析 在 40 kV 管压、40 mA 电流下,扫描的衍射角范围为 5~50°和步长为 0.01°的条件下进行晶体结构测定<sup>[18]</sup>。

1.3.4.4 LBLP 热稳定性测定 参照 Tu 等<sup>[19]</sup>的方法稍加修改,采用热重分析仪对 LBLP 热稳定性进行分析。

1.3.4.5 LBLP 扫描电镜观察 取适量的枸杞叶多糖提取物(真空冷冻干燥后)于样品座上,用洗耳球吹去浮样,喷金后,置于扫描电镜的样品室中扫描、观察并分析<sup>[20]</sup>。

### 1.3.5 LBLP 的自由基清除试验

1.3.5.1 对 ABTS<sup>+</sup>的清除活性测定 将 3.9 mL ABTS(7 mmol/L)溶液与 0.1 mL 不同质量浓度的样品溶液混匀,以蒸馏水代替样品作为空白对照,同时在室温下放置 6 min,以维生素 C(VC)作阳性对照,清除率由公式(1)计算<sup>[21]</sup>。

$$\text{清除率}(\%)=(A_0-A_1)/A_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: $A_0$  为空白管的吸光度值; $A_1$  为样品的吸光度值。

1.3.5.2 对 DPPH<sup>+</sup>的清除活性测定 参照 Zhu 等<sup>[22]</sup>的方法稍加修改,以 VC 作阳性对照,DPPH<sup>+</sup>的清除率由公式(2)计算。

$$\text{清除率}(\%)=[A_0-(A_1-A_2)]/A_0 \times 100 \quad (2)$$

式中: $A_0$  为空白管的吸光度值; $A_1$  为样品的吸光度值; $A_2$  为背景对照组的吸光度值。

1.3.5.3 对超氧阴离子的清除活性测定 参照 Chen 等<sup>[23]</sup>测定超氧阴离子清除能力的方法,以 VC 作阳性对照,清除率计算同公式(2)。

1.3.5.4 对羟自由基的清除活性测定 参照范艳

丽等<sup>[24]</sup>测定羟自由基清除能力的方法,以 VC 作阳性对照,根据公式(3)进行计算。

$$\text{清除率}(\%) = [(A_5 - A_6) - (A_3 - A_4)] / A_5 \times 100 \quad (3)$$

式中: $A_5$ 为损伤组的吸光度值; $A_6$ 为空白参照组的吸光度值; $A_3$ 为样品组的吸光度值; $A_4$ 为样品参照组的吸光度值。

### 1.3.6 LBLP 体外酶活性抑制试验

1.3.6.1 对  $\alpha$ -淀粉酶活性抑制活性测定 参照 Yin 等<sup>[25]</sup>的方法,按表 1 反应体系进行试验。取 0.5 mL 质量浓度分别为 5, 10, 15, 20, 25 mg/mL 样品溶液、0.5 mL  $\alpha$ -淀粉酶 (0.5 mg/mL)、0.5 mL 磷

酸盐缓冲溶液 (0.1 mol/L pH=7.0) 混匀,于 37 °C 水浴 10 min,然后加入 0.5 mL 可溶性淀粉溶液 (1%) 继续水浴 10 min,最后加 0.5 mL 3,5-二硝基水杨酸显色剂在沸水浴中加热 10 min,于波长 540 nm 处测定吸光度值。以阿卡波糖为阳性对照, $\alpha$ -淀粉酶抑制率由公式(4)计算。

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率}(\%) = [1 - (A_7 - A_8) / (A_9 - A_{10})] \times 100 \quad (4)$$

式中: $A_7$ 为试验组吸光度; $A_8$ 为试验空白组吸光度; $A_9$ 为对照组吸光度; $A_{10}$ 为背景组吸光度。

表 1  $\alpha$ -淀粉酶活性反应体系

Table 1  $\alpha$ -Amylase activity reaction system

项目	缓冲液添加量/mL	酶液添加量/mL	抑制剂添加量/mL	底物添加量/mL	3,5-二硝基水杨酸添加量/mL
抑制剂组	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
背景对照组	0.5	-	0.5	0.5	0.5
空白组	0.5	0.5	-	0.5	0.5
空白对照组	0.5	-	-	0.5	0.5

注:“-”表示不加试剂,下同。

1.3.6.2 对  $\alpha$ -淀粉酶抑制类型分析 固定酶质量浓度为 0.5 mg/mL,分别设置质量浓度为 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 mg/mL 的可溶性淀粉底物溶液和质量浓度为 0.067, 0.08, 0.1, 0.13, 0.2 mg/mL 的样品溶液,按照表 1 反应体系进行试验,测定反应体系的吸光度值。

1.3.6.3 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定 参照 He 等<sup>[26]</sup>的方法,按表 2 反应体系进行试验。取 20

$\mu$ L  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液 (0.4 U/mL)、150  $\mu$ L 磷酸盐缓冲溶液 (0.1 mol/L pH 6.8)、50  $\mu$ L 质量浓度分别为 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL 样品溶液混匀,37 °C 下水浴 10 min,加入 50  $\mu$ L 对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (5 mmol/L) 继续水浴 10 min,最后加 50  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.2 mol/L) 终止反应,于波长 405 nm 处测定吸光度。以阿卡波糖作阳性对照, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率计算同公式(4)。

表 2  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性反应体系

Table 2  $\alpha$ -Glucosidase activity reaction system

项目	缓冲液添加量/ $\mu$ L	酶液添加量/ $\mu$ L	抑制剂添加量/ $\mu$ L	底物添加量/ $\mu$ L	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ 添加量/ $\mu$ L
抑制剂组	150	20	50	50	50
背景对照组	150	-	50	50	50
空白组	150	20	-	50	50
空白对照组	150	-	-	50	50

1.3.6.4 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制类型分析 固定酶浓度为 0.4 U/mL,分别设置浓度为 0.25, 0.5, 1, 3, 5 mmol/L 的对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷底物溶液和质量浓度为 0.2, 0.3, 1, 2, 4 mg/mL 的样品溶液,按照表 2 的反应体系进行,测定反应体系的

吸光度值。

1.3.6.5 对胰蛋白酶抑制活性测定 按表 3 反应体系进行试验,参照 Li 等<sup>[27]</sup>的方法,取 0.4 mL 质量浓度为 5, 10, 15, 20, 25 mg/mL 样品溶液、0.4 mL 胰蛋白酶 (0.5 mg/mL)、0.4 mL 磷酸盐缓冲溶

液 (0.1 mol/L pH 8.0)、2 mL NA-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰胺盐酸盐 (0.5 mg/mL) 混合均匀, 37 °C 水浴 5 min, 再加入 5 mL 醋酸溶液 (3%) 终止

反应, 于波长 420 nm 处测定相应吸光度值, 胰蛋白酶抑制率计算同公式 (4)。

表 3 胰蛋白酶活性反应体系

Table 3 Trypsin activity reaction system

项目	缓冲液添加量/mL	酶液添加量/mL	抑制剂添加量/mL	底物添加量/mL	醋酸添加量/mL
抑制剂组	0.4	0.4	0.4	2	5
背景对照组	0.4	-	0.4	2	5
空白组	0.4	0.4	-	2	5
空白对照组	0.8	-	-	2	5

1.3.6.6 对胰蛋白酶抑制类型分析 固定酶质量浓度为 0.5 mg/mL, 分别设置质量浓度为 0.25, 0.35, 0.45, 0.55, 0.65 mg/mL 的月桂酸 4-硝基苯酯底物溶液和质量浓度为 1.5, 1.8, 2.2, 2.8, 4 mg/mL 的样品溶液, 按照表 3 反应体系进行, 测定反应体系的吸光度值。

1.3.6.7 对胰脂肪酶抑制活性测定 按表 4 反应体系进行试验, 参照 Zhao 等<sup>[28]</sup>的方法, 取 50 μL 磷酸盐缓冲溶液 (50 mmol/L, pH 8.0)、50 μL 胰脂肪酶 (10 mg/mL)、50 μL 质量浓度为 5, 10, 15, 20, 25 mg/mL 样品溶液, 混匀于 37 °C 水浴, 10 min 后加入 50 μL 底物月桂酸 4-硝基苯酯溶液 (0.5 mmol/L), 37 °C 水浴 30 min, 在波长 405 nm 处测定吸光度值, 以奥利司他作阳性对照, 胰脂肪酶抑制率计算同公式 (4)。

1.3.6.8 对胰脂肪酶抑制类型分析 固定酶质量浓度为 10 mg/mL, 选浓度为 1, 2, 3, 4, 5 mmol/L 月桂酸 4-硝基苯酯底物溶液和质量浓度为 0.2, 0.25, 0.3, 0.5, 1 mg/mL 的样品溶液根据抑制率的测定结果确定几种样品的半抑制浓度并选择出各样品的样品浓度梯度, 在 37 °C 反应 10 min, 按照表 4 反应体系进行, 测定反应体系的吸光度值。

1.3.7 数据处理与统计 所有试验均采用单独样品, 并进行 3 次独立重复检测。所有试验所得数据采用 IBM SPSS Statistics 25.0 版本分析显著性水平,  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著; 采用 Origin 2022.0 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 LBLP 的总糖和蛋白含量

根据苯酚-硫酸法测定 LBLP 中总糖的含量<sup>[29]</sup>,

通过考马斯亮蓝法测定 LBLP 中蛋白的含量, 采用咔唑-硫酸法测定 LBLP 中糖醛酸含量。结果如表 5 所示, 总糖的含量为 (65.78±0.85)%, 蛋白含量为 (12.25±0.25)%, 糖醛酸的含量为 (19.26±0.14)%。

表 4 胰脂肪酶活性反应体系

Table 4 Pancreatic lipase activity reaction system

项目	缓冲液添加量/μL	酶液添加量/μL	抑制剂添加量/μL	底物添加量/μL
抑制剂组	50	50	50	50
背景对照组	50	-	50	50
空白组	50	50	-	50
空白对照组	50	-	-	50

表 5 LBLP 的组成含量分析

Table 5 Analysis of the characteristics of LBLP

指标	含量/%
总糖	65.78 ± 0.85
蛋白质	12.25 ± 0.25
糖醛酸	19.26 ± 0.14

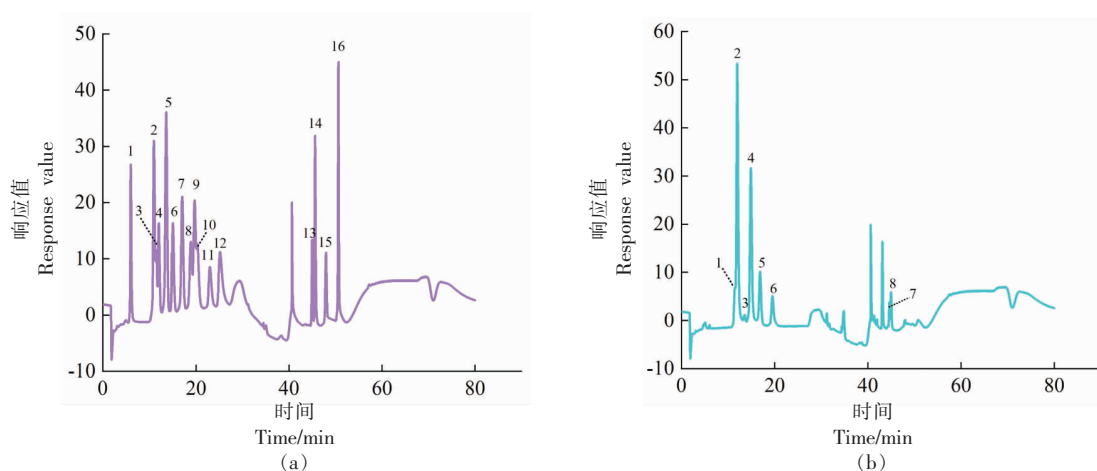
### 2.2 LBLP 单糖组成

LBLP 单糖组成结果见表 6 和图 1。由图和表可知: 8 种单糖可以有效的分离, 其单糖组成物质的量比为:  $n$  阿拉伯糖 :  $n$  半乳糖 :  $n$  鼠李糖 :  $n$  葡萄糖 :  $n$  木糖 :  $n$  古罗糖醛酸 :  $n$  半乳糖醛酸 :  $n$  盐酸氨基葡萄糖 = 427 : 293 : 86 : 73 : 42 : 40 : 31 : 8, 结果显示 LBLP 中阿拉伯糖含量最高。

表 6 LBLP 单糖组成分析

Table 6 Analysis of monosaccharide composition of LBLP

单糖组成	峰面积	物质的量/mol	含量/( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
鼠李糖	$2.78 \pm 0.019$	$0.086 \pm 0.0010$	$32.88 \pm 0.23$
阿拉伯糖	$24.95 \pm 0.085$	$0.427 \pm 0.0015$	$148.90 \pm 0.51$
盐酸氨基葡萄糖	$1.35 \pm 0.013$	$0.008 \pm 0.0005$	$3.91 \pm 0.33$
半乳糖	$17.99 \pm 0.098$	$0.293 \pm 0.0005$	$122.52 \pm 0.67$
葡萄糖	$6.53 \pm 0.061$	$0.073 \pm 0.0001$	$30.40 \pm 0.29$
木糖	$3.34 \pm 0.048$	$0.042 \pm 0.0005$	$14.70 \pm 0.21$
半乳糖醛酸	$1.07 \pm 0.085$	$0.031 \pm 0.0001$	$13.97 \pm 0.11$
古罗糖醛酸	$1.83 \pm 0.025$	$0.040 \pm 0.0025$	$20.14 \pm 1.35$



注: 1. 岩藻糖; 2. 盐酸氨基半乳糖; 3. 鼠李糖; 4. 阿拉伯糖; 5. 盐酸氨基葡萄糖; 6. 半乳糖; 7. 葡萄糖; 8. *N*-乙酰-*D* 氨基葡萄糖; 9. 木糖; 10. 甘露糖; 11. 果糖; 12. 核糖; 13. 半乳糖醛酸; 14. 古罗糖醛酸; 15. 葡萄糖醛; 16. 甘露糖醛酸。

图 1 LBLP 标准品(a)和样品(b)的单糖组成

Fig.1 Monosaccharide composition of LBLP standard (a) and sample (b)

### 2.3 LBLP 分子质量

分子质量回归方程为  $\lg(M_w) = -0.1914RT + 12.069$  ( $R^2 = 0.9944$ ),  $\lg(M_n) = -0.1774RT + 11.357$  ( $R^2 = 0.9921$ ), 式中  $M_w$  为重均分子质量(ku),  $M_n$  为数均分子质量(ku),  $RT$  为保留时间(min)。当  $RT$  为 31.639 min,  $M_w$  为  $(1\ 031\ 087 \pm 2\ 493)$ ku,  $M_n$  为  $(554\ 934 \pm 1\ 244)$ ku; 当  $RT$  为 37.829 min,  $M_w$  为

$(67\ 380 \pm 288)$ ku,  $M_n$  为  $(44\ 273 \pm 236)$ ku。根据表 7 和图 2 可知 LBLP 分子质量是由 2 个峰组成且峰形不对称, 第 2 个峰形呈现较宽的状态, 说明此多糖是一个杂多糖<sup>[30]</sup>。从表中可以看出 LBLP 的分散系数较小, 这说明 LBLP 在水溶液中分布较均匀, 不会形成较大的聚合物。

表 7 LBLP 分子质量及分散系数的测定

Table 7 Determination of molecular weight and dispersion coefficient of LBLP

样品名称	RT/min	$M_w/\text{ku}$	$M_n/\text{ku}$	峰面积比/%	分散系数
枸杞叶多糖提取物	31.639	$1\ 031\ 087 \pm 2\ 493$	$554\ 934 \pm 1\ 244$	$10.756 \pm 1.013$	$1.8580 \pm 0.4980$
	37.829	$67\ 380 \pm 288$	$44\ 273 \pm 236$	$89.244 \pm 1.013$	$1.5219 \pm 0.3190$

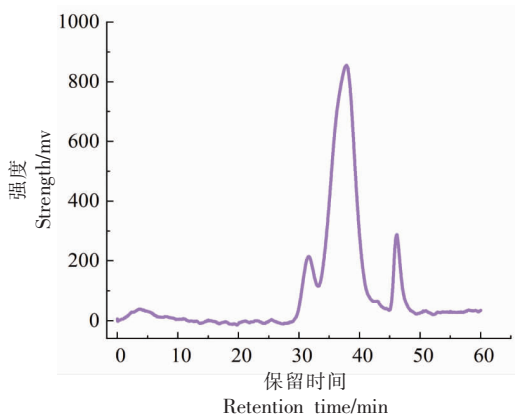


图2 LBLP的HPGPC色谱

Fig.2 HPGPC chromatography of LBLP

## 2.4 LBLP的结构表征

2.4.1 LBLP的紫外光谱分析 图3a为LBLP的紫外光谱图,扫描波长为200~400 nm。结果显示:

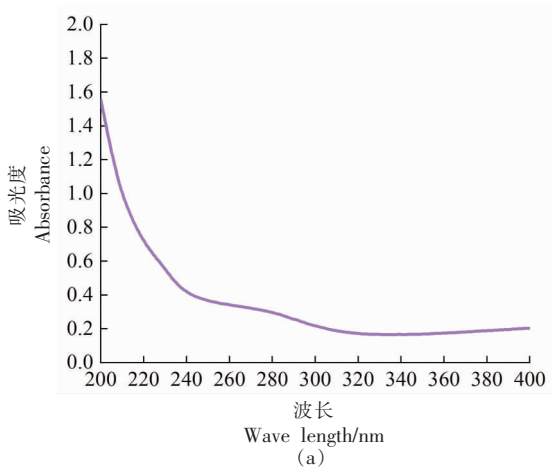


图3 LBLP的紫外光谱(a)和红外光谱(b)

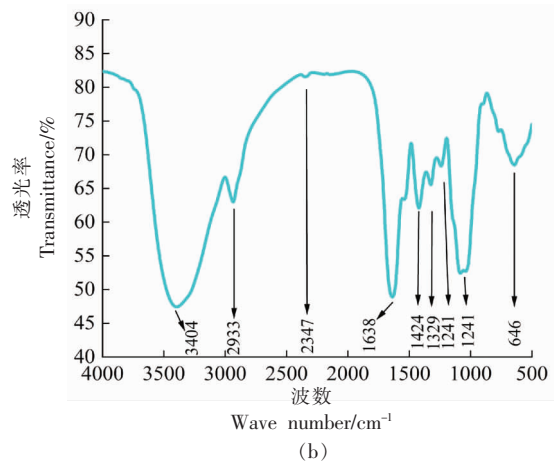
Fig.3 Ultraviolet spectra (a) and infrared spectra (b) of LBLP

2.4.3 LBLP X射线衍射分析 X射线衍射图谱可以分析LBLP的结构有无定形。对LBLP样品进行X射线衍射分析,结果如图4所示:在 $2\theta$ 为 $0^\circ\sim 20^\circ$ 之间出现了一个较宽的特征峰,说明存在无定形结构;在 $2\theta$ 为 $20^\circ\sim 40^\circ$ 区间范围内,只有少量峰值较小的峰出现,并无明显吸收峰产生,说明LBLP在该条件下无法形成多糖类单体或以单体形式存在,而是以一种不稳定晶体形态存在。

2.4.4 LBLP热稳定性分析 由图5可知,LBLP的热分解分为3部分。第1部分( $30\sim 140^\circ\text{C}$ )LBLP的质量损失较小,损失小于10.0%,其质量减少主

多糖组分在260 nm处无明显的吸收峰,表示LBLP中核酸含量较低;在280 nm处有相对微弱的吸收峰,表示LBLP中含有蛋白质,这与蛋白含量测定结果相一致,表明提取的LBLP是酸性蛋白复合多糖。

2.4.2 LBLP的红外光谱分析 图3b为LBLP红外光谱图,图中表现出多糖明显的特征峰:在 $3404\text{ cm}^{-1}$ 附近的特征峰是由于O-H键伸缩振动引起的;在 $2933, 2347, 1424\text{ cm}^{-1}$ 附近出现的微弱特征吸收峰是由甲基或者次甲基的C-H伸缩振动引起的; $1638\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰窄而尖,说明此处的吸收峰较强烈且此峰可能是由C=O和C-O键的伸缩振动引起的; $1329\sim 1241\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰是由于O-H键变角振动引起的,表明有吡喃糖苷的存在。综上可推出,LBLP具有多糖的特征官能团。



要是多糖水分的蒸发;第2部分( $140\sim 460^\circ\text{C}$ )LBLP出现明显的质量损失,大概损失60%,此部分质量明显降低可能是多糖的糖链发生了热分解从而引起了碳化;第3部分( $460\sim 600^\circ\text{C}$ )LBLP的质量损失相对减缓,损失8%,其原因可能是碱性溶液提取多糖含量较高。总体而言,LBLP的质量损失了70%,因此LBLP具有一定的热稳定性。

2.4.5 LBLP物扫描电镜观察 多糖的空间结构会影响多糖的构效关系,扫描电子显微镜可以作为定型鉴定多糖表面形态的一个特征。LBLP扫描电镜如图6所示,LBLP表面疏松并结合在一起,

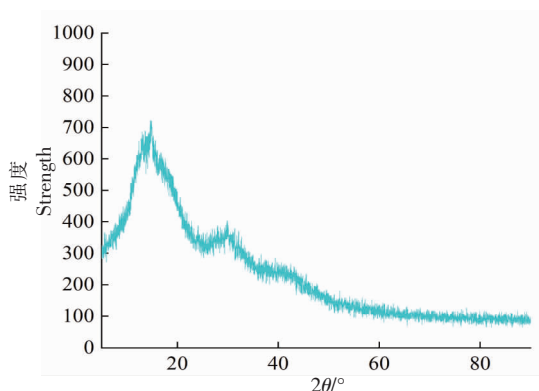


图 4 LBLP 的 X 射线衍射

Fig.4 X-ray diffraction of LBLP

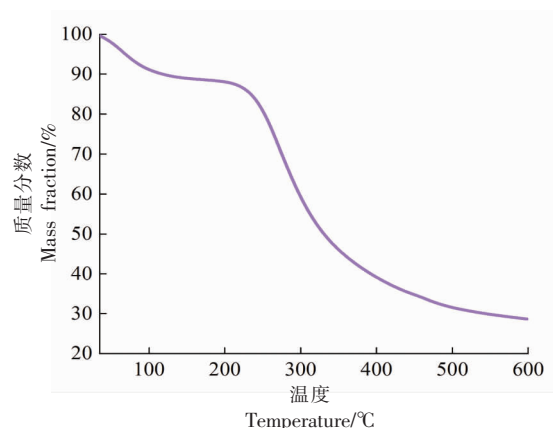
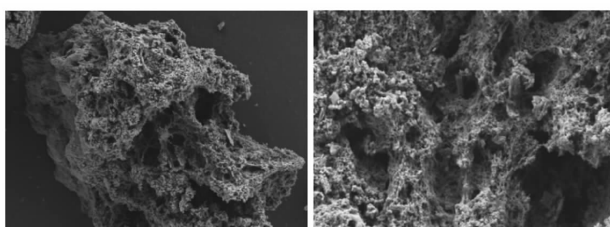


图 5 LBLP 热稳定性

Fig.5 Thermal stability of LBLP



(a) 2 000×

(b) 5 000×

图 6 LBLP 微观结构的观察

Fig.6 Observation on the microstructure of LBLP

放大后呈现纤维状并有不规则的孔状结构，说明糖链由于分子质量大而紧密聚集。

## 2.5 LBLP 自由基清除能力

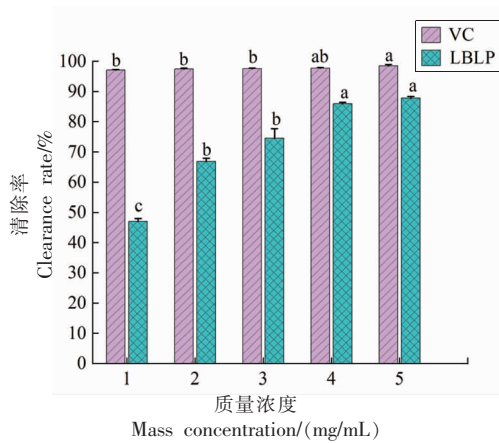
2.5.1 对 ABTS<sup>+</sup> 的清除能力 如图 7a 所示，当 LBLP 的质量浓度为 5 mg/mL 时清除率达到 80%。

2.5.2 对 DPPH<sup>+</sup> 的清除能力 如图 7b 所示，随着

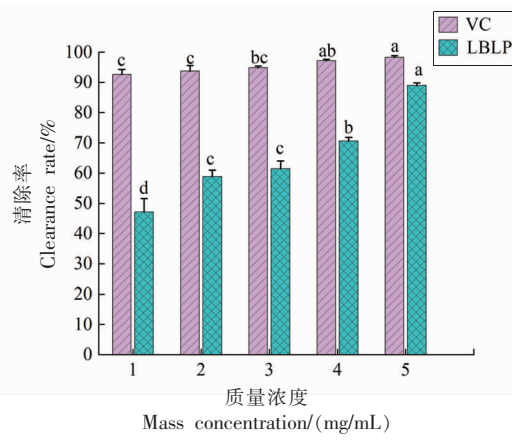
LBLP 质量浓度的增加，抗氧化能力也在上升，并且趋势较明显，在质量浓度范围为 1~5 mg/mL 时，LBLP 的抗氧化性呈质量浓度依赖性，当质量浓度为 5 mg/mL 时，最大清除率为 90%。

2.5.3 对超氧阴离子的清除能力 超氧阴离子与羟基结合后会使得脂质过氧化，造成细胞损伤和线粒体的作用改变，破坏人体机能，对人造成危害<sup>[31]</sup>。如图 7c 所示，当 LBLP 的质量浓度为 5 mg/mL 时的清除率达到 90%。

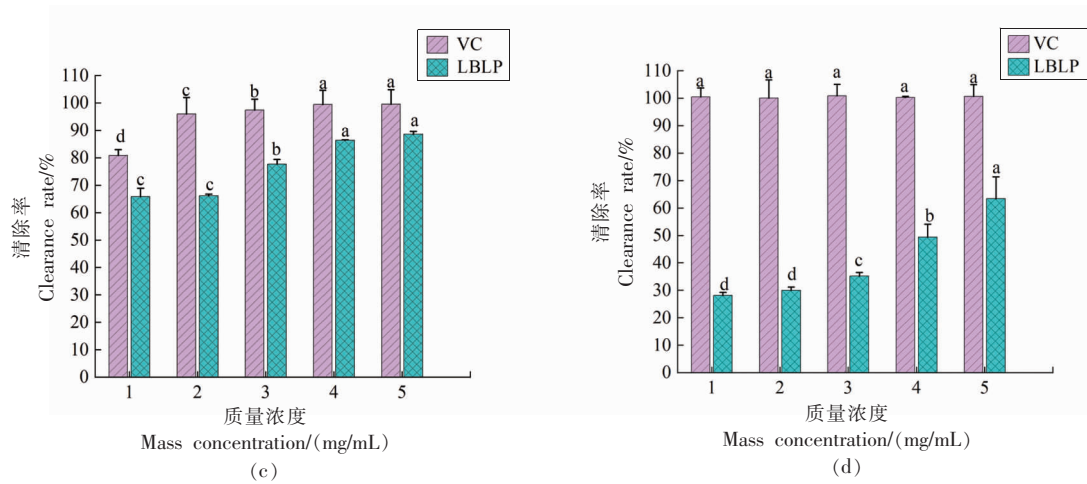
2.5.4 对羟基自由基的清除能力 羟基自由基是活性氧的一种，能够杀死红细胞并降解 DNA、脂质及蛋白质等化合物，使机体产生氧化损伤<sup>[32]</sup>。由图 7d 可知，LBLP 对羟基自由基的清除能力具有量效关系，当 LBLP 质量浓度为 5 mg/mL 时，清除率为 65%。



(a)



(b)



注:图中不同小写字母表示同一组别不同质量浓度的数据间有显著性差异( $P < 0.05$ ),下同。

图7 LBLP对ABTS<sup>+</sup>(a)、DPPH<sup>+</sup>(b)、超氧阴离子(c)和羟自由基的清除能力(d)

Fig.7 Scavenging ability of LBLP on ABTS<sup>+</sup> (a), DPPH<sup>+</sup> (b), superoxide anion (c) and hydroxyl radical (d)

2.6 LBLP体外酶活性抑制分析

2.6.1 LBLP对 $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、胰蛋白酶和胰脂肪酶活性抑制能力分析 抑制 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,可控制餐后高血糖<sup>[33]</sup>;抑制胰蛋白酶活性,可有效控制蛋白质消化吸收;抑制胰脂肪酶活性,可减少机体对脂肪的吸收<sup>[34]</sup>。以阿卡波糖为阳性对照探究 LBLP对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用;以未加 LBLP为空白对照探究 LBLP对胰蛋白酶活性的抑制作

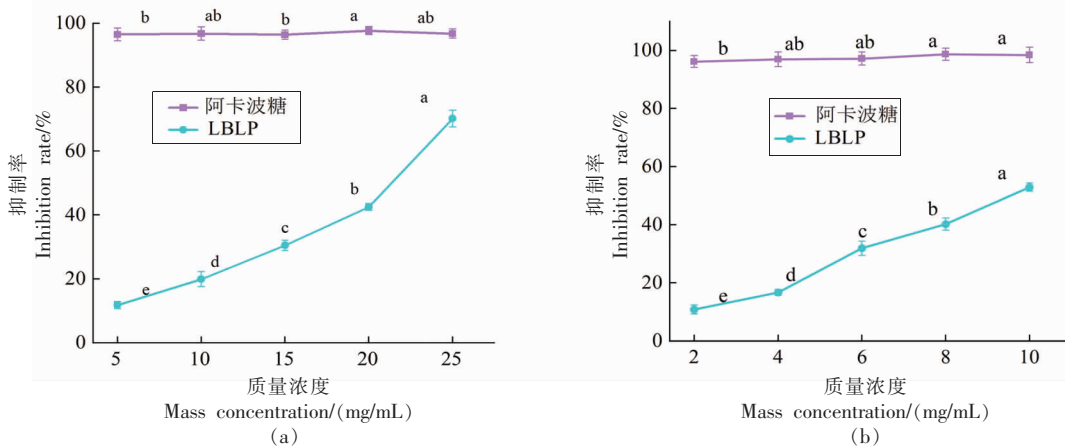
用;以奥利司他为阳性对照,探究 LBLP对胰脂肪酶的抑制作用。由图8可知,LBLP对 $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、胰蛋白酶和胰脂肪酶活性均具有一定的抑制作用且具有量效关系,半抑制质量浓度(IC<sub>50</sub>)分别为(23.80±0.17), (9.53±0.39), (23.36±0.81)mg/mL和(16.03±0.59)mg/mL。结果表明在一定的质量浓度下,LBLP具有降血糖、降血脂作用。

表8 LBLP对4种酶抑制率的量效关系拟合方程及IC<sub>50</sub>

Table 8 The dose-effect relationship fitting equation and IC<sub>50</sub> of the inhibitory rates of LBLP on four enzymes

样品	酶	拟合方程	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> /(mg/mL)
LBLP	$\alpha$ -淀粉酶	$Y = 0.022x^2 + 0.986x + 14.219$	0.9899	23.80 ± 0.17
	$\alpha$ -葡萄糖苷酶	$Y = 0.022x^2 + 0.986x + 14.219$	0.9886	9.53 ± 0.39
	胰蛋白酶	$Y = -0.027x^2 + 2.387x + 8.633$	0.9902	23.36 ± 0.81
	胰脂肪酶	$Y = -0.0847x^2 + 4.534x + 4.078$	0.9770	16.03 ± 0.59

注:表中x为LBLP的质量浓度(mg/mL),Y为LBLP对酶的抑制率。





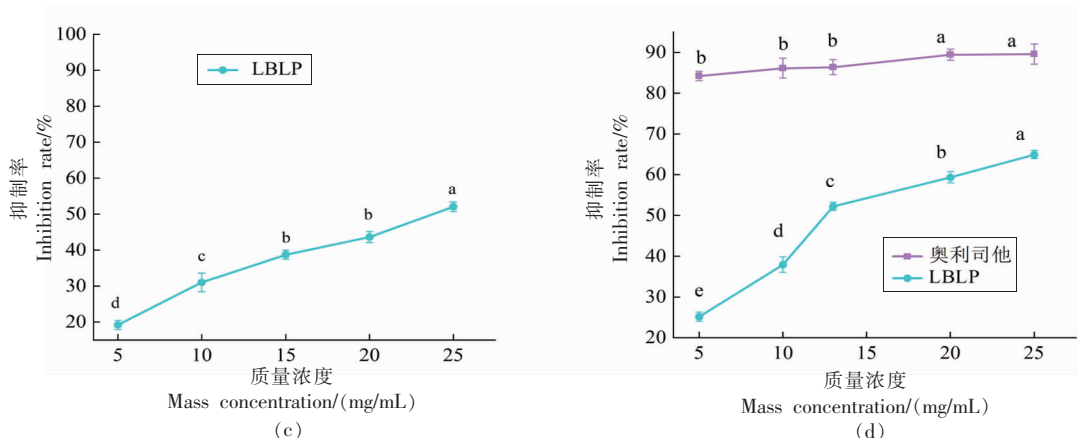


图 8 LBLP 对  $\alpha$ -淀粉酶(a)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(b)、胰蛋白酶(c)和胰脂肪酶(d)活性抑制能力

Fig.8 Inhibitory activity of LBLP on  $\alpha$ -amylase (a),  $\alpha$ -glucosidase (b), trypsin (c) and pancreatic lipase (d)

2.6.2 LBLP 对  $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、胰蛋白酶和胰脂肪酶的抑制类型分析 固定样品质量浓度及酶质量浓度，通过改变反应体系中的底物浓度进行酶促反应，采用 Lineweaver-Burk 双倒数方程作图法，以反应初速度的倒数  $1/v$  对底物浓度的倒数  $1/S$  绘制点图并线性拟合。当对照组的曲

线和 LBLP 组的曲线相交于纵轴，则为竞争性抑制，当二者相交于横轴，则为非竞争性抑制。由图 9 可知，4 种酶的对照组与 LBLP 组的直线均相交于横坐标，所以 LBLP 对  $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、胰蛋白酶和胰脂肪酶的催化作用均为非竞争性抑制。

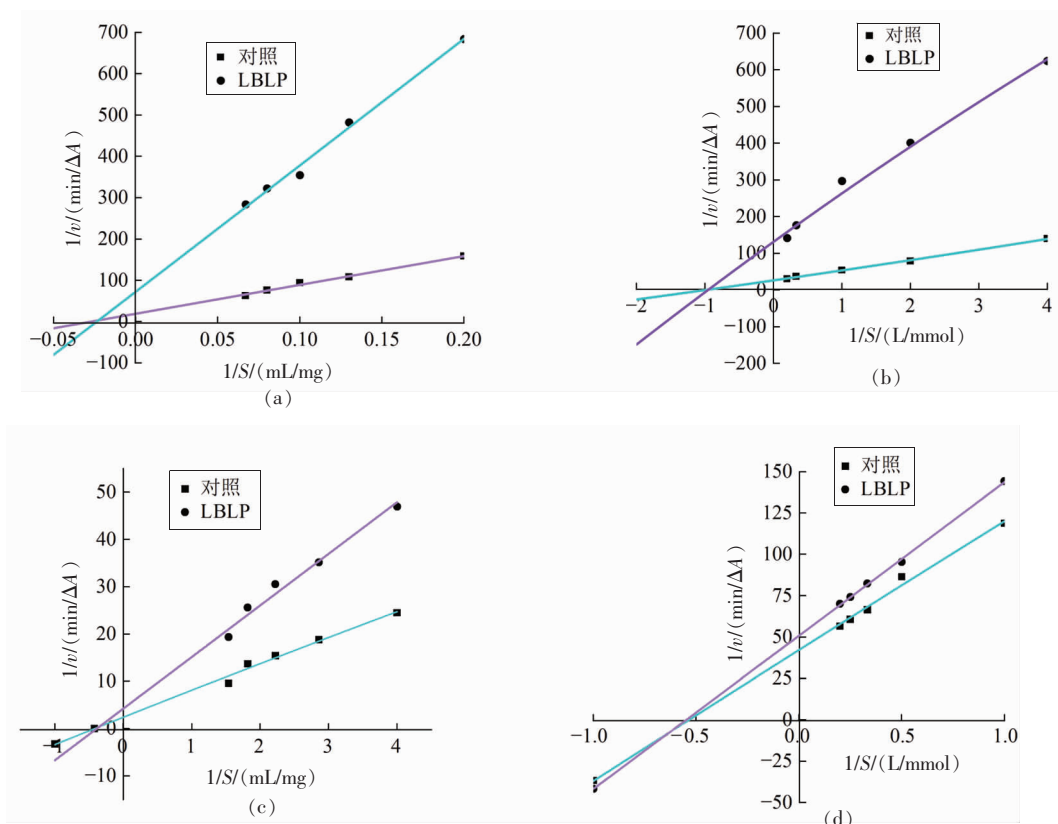


图 9 LBLP 对  $\alpha$ -淀粉酶(a)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(b)、胰蛋白酶(c)和胰脂肪酶(d)的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig.9 Lineweaver-Burk double reciprocal diagram of LBLP on  $\alpha$ -amylase (a),  $\alpha$ -glucosidase (b), trypsin (c) and pancreatic lipase (d)

### 3 结论

本研究以枸杞叶为原料,通过碱提醇沉的方法制备 LBLP,出糖率为(65.78±0.85)%,LBLP 中蛋白和糖醛酸的含量分别为(12.25±0.25)%和(19.26±0.14)%。利用离子色谱法测得 LBLP 由 8 种单糖组成,其中阿拉伯糖含量最高,物质的量为(0.427±0.0015)mol。由高效凝胶色谱法测定 LBLP 的分子质量,得出枸杞叶多糖提取物是一个杂多糖,且枸杞叶多糖提取物的分散系数较小。由紫外光谱法测得 LBLP 组分在 280 nm 处有相对微弱的吸收峰,表示 LBLP 中含有蛋白质,这与蛋白含量测定结果相一致,表明 LBLP 是复合的糖蛋白。采用红外光谱法测出具有多糖的特征官 LBLP 能团。对 LBLP 进行 X 射线衍射分析,结果显示 LBLP 无定形结构。对 LBLP 的热稳定性进行分析,得出 LBLP 具有一定的热稳定性。扫描电镜结果显示 LBLP 的糖链由于分子质量大而紧密聚集。LBLP 为 5 mg/mL 时对 ABTS<sup>+</sup>、DPPH<sup>+</sup>、超氧阴离子和羟自由基的清除率分别为 80%,90%,90%,65%,表明 LBLP 具有较好的抗氧化能力且呈量效关系。LBLP 对  $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、胰蛋白酶和胰脂肪酶的活性均具有较好的抑制能力,且抑制类型均为非竞争性抑制。综上,LBLP 具有潜在抗氧化、降血糖和降血脂的作用,可用作功能性食品或营养食品的配料,这将有利于枸杞叶的深度开发及综合利用。

### 参 考 文 献

- [1] CONIDI C, DRIOLI E, CASSANO A. Biologically active compounds from Goji (*Lycium Barbarum* L.) leaves aqueous extracts: Purification and concentration by membrane processes[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 935.
- [2] DENG Y, XIE J, LUO Z, et al. Synergistic immunomodulatory effect of complex polysaccharides from seven herbs and their major active fractions[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165: 530–541.
- [3] YU C X, HU X X, AHMADI S, et al. Structure and *in vitro* fermentation characteristics of polysaccharides sequentially extracted from Goji berry (*Lycium barbarum*) leaves [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(24): 7535–7546.
- [4] GONG G P, FAN J B, SUN Y J, et al. Isolation, structural characterization, and antioxidativity of polysaccharide LBLP5 -A from *Lycium barbarum* leaves[J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(2): 314–324.
- [5] QIAO Y B, YE Y, CAI T X, et al. Anti-fatigue activity of the polysaccharides isolated from *Ribes stenocarpum* Maxim[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 89: 104947.
- [6] MASCI A, SCARRADORI I, CASADEI M A, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides: Extraction, purification, structural characterisation and evidence about hypoglycaemic and hypolipidaemic effects: A review[J]. *Food Chemistry*, 2018, 254: 377–389.
- [7] ANDREI M, GÖKHAN Z, MARIO S, et al. Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: Phytochemical characterization, biological profile, and computational studies[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2017, 32(1): 153–168.
- [8] LEI Z L, CHEN X N, CAO F L, et al. Phytochemicals and bioactivities of Goji (*Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill.) leaves and their potential applications in the food industry: A review [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2021, 57(3): 1451–1461.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 何若男, 刘思师, 吴婷, 等. 响应面法优化微波-超声波协同提取黑枸杞叶多酚及抗氧化性研究[J]. *特产研究*, 2022, 44(4): 19–26, 38.
- [12] HE R N, LIU S S, WU T, et al. Study on microwave-ultrasonic synergistic extraction of polyphenols and antioxidant activity of *Lycium barbarum* leaves by response surface method[J]. *Specialty Research*, 2022, 44(4): 19–26, 38.
- [13] 张召, 易阳, 彭凯迪, 等. 莲藕多糖的碱法提取工艺优化与抗氧化活性评价[J]. *食品安全质量检测学*

- 报, 2023, 14(2): 256-263.
- ZHANG Z, YI Y, PENG K D, et al. Optimization of alkaline extraction process and evaluation of antioxidant activity of lotus root polysaccharide [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2023, 14(2): 256-263.
- [12] 刘恒, 张秀玲, 李坤, 等. 蕨菜多糖的提取、纯化、结构表征与抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 51-58.
- LIU H, ZHANG X L, LI K, et al. Extraction, purification, structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from bracken[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 51-58.
- [13] 陈巧巧, 万琴, 王振中, 等. 人参多糖中糖醛酸含量测定方法的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 121-124.
- CHEN Q Q, WAN Q, WANG Z Z, et al. Establishment of a method for determination of uronic acid in ginseng polysaccharide[J]. Chinese Journal of Experimental Formulae, 2012, 18(8): 121-124.
- [14] YANG X, JI H Y, FENG Y Y, et al. Structural characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Kaempferia galanga* L. [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 2018: 9579262.
- [15] LIU A J, YU J, JI H Y, et al. Extraction of a novel cold-water-soluble polysaccharide from astragalus membranaceus and its antitumor and immunological activities[J]. Molecules, 2017, 23(1): 62.
- [16] REHEBATI N, PAIHEERDING M, AYTURSUN A, et al. Effects of different chemical modifications on the structure and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(6): 2434-2444.
- [17] RONG A, ZHANG M L, LU Y, et al. The structural studies of a polysaccharide purified from oat Lao - Chao[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(12): 3563-3573.
- [18] 赵辉, 张艳荣, 杨岩, 等. 滑子菇多糖对玉米淀粉理化特性的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(2): 100-110.
- ZHAO H, ZHANG Y R, YANG Y, et al. Effects of lentinan on physicochemical properties of corn starch[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(2): 100-110.
- [19] TU J Q, LIU H P, WEN Y H, et al. A novel polysaccharide from *Hericiium erinaceus*: Preparation, structural characteristics, thermal stabilities, and antioxidant activities *in vitro*[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(9): e13871.
- [20] 杨许花, 张竞文, 刘红海, 等. 藏柳茶多糖的提取、结构解析及抗氧化活性分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(12): 318-328.
- YANG X H, ZHANG J W, LIU H H, et al. Extraction, structure analysis and antioxidant activity analysis of polysaccharides from Tibetan willow tea [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 318-328.
- [21] ZHOU C C, HUANG Y Z, CHEN J L, et al. Effects of high-pressure homogenization extraction on the physicochemical properties and antioxidant activity of large-leaf yellow tea polysaccharide conjugates [J]. Process Biochemistry, 2022, 122(P2): 87-94.
- [22] ZHU Z P, CHEN J, CHEN Y, et al. Extraction, structural characterization and antioxidant activity of turmeric polysaccharides [J]. LWT, 2022, 154: 112805.
- [23] CHEN F, LIANG H G, YANG Z Y, et al. Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 673-680.
- [24] 范艳丽, 韩丽娜, 付丽霞, 等. 枸杞叶黄酮类化合物体外清除自由基作用研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(12): 32-37.
- FAN Y L, HAN L N, FU L X, et al. Study on free radical scavenging effects of flavonoids from *Lycium barbarum* leaves *in vitro*[J]. Chinese Flavoring, 2017, 42(12): 32-37.
- [25] YIN L, FU S S, WU R J, et al. A neutral polysaccharide from green tea: Structure, effect on  $\alpha$ -amylase activity and hydrolysis property [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2020, 687: 108369.
- [26] HE C Y, LIU X L, SUN J L. Inhibitory mechanism of baicalein against  $\alpha$ -glucosidase[J]. Natural Product Communications, 2019, 14(6): 1934578X 19855825.
- [27] LI C, LI W J, ZHANG Y, et al. Comparison of physicochemical properties of recombinant buckwheat trypsin inhibitor (rBTI) and soybean trypsin inhibitor (SBTI) [J]. Protein Expression and Purification,

- 2020, 171: 105614.
- [28] ZHAO M M, BAI J W, BU X Y, et al. Characterization of selenized polysaccharides from *Ribes nigrum* L. and its inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 259: 117729.
- [29] CHENG H, HUANG G L. The antioxidant activities of carboxymethylated garlic polysaccharide and its derivatives [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 1054–1064.
- [30] LONG X S, HU X, XIANG H, et al. Structural characterization and hypolipidemic activity of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide and its degradation products[J]. Food Chemistry: X, 2022, 14: 100314–100314.
- [31] JIE Z S, LIU J, SHU M C, et al. Detection strategies for superoxide anion: A review[J]. Talanta, 2022, 236: 122892–122892.
- [32] GUNATHILAKE P P D K, RANAWEERA S D K K, RUPASINGHE V P H. Analysis of rutin,  $\beta$ -carotene, and lutein content and evaluation of antioxidant activities of six edible leaves on free radicals and reactive oxygen species[J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(5): e12579.
- [33] SHIMADA H, KUMA C, ISERI T, et al. Inhibitory effect of ocimum gratissimum leaf extract on postprandial increase of blood glucose[J]. Natural Product Communications, 2019, 14(10): 1934578X19883728.
- [34] CHEN J H, WU X H, ZHOU Y, et al. *Camellia nitidissima* Chi leaf as pancreatic lipase inhibitors: Inhibition potentials and mechanism[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(9): e13837.

## Structural Characterization and Evaluation of Antioxidant and Enzyme Activity of *Lycium barbarum* Leaves Polysaccharide *in Vitro*

Zhang Tao, Ma Maimai, Lu Shun, Yang Xue, Fan Yanli\*

(School of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021)

**Abstract** In this study, *Lycium barbarum* leaves polysaccharide (LBLP) was extracted by alkali extraction and ethanol precipitation. The monosaccharide composition and molecular weight distribution of LBLP were detected by ion chromatography and high performance gel permeation chromatography. The structure of LBLP was characterized by UV spectrum, infrared spectrum and X-ray diffraction. Its antioxidant and lipid metabolism regulation activities were evaluated by free radical scavenging test and enzyme activity inhibition test *in vitro*. The results showed that the total sugar content of LBLP was (65.78±0.85)%, the protein content was (12.25±0.25)%, and the uronic acid content was (19.26±0.14)%, indicating a protein complex acidic polysaccharide. LBLP was composed of 8 monosaccharides, the molar ratio of which was:  $n_{\text{arabinose}}:n_{\text{galactose}}:n_{\text{thamnose}}:n_{\text{glucose}}:n_{\text{xylose}}:n_{\text{glucuronic acid}}:n_{\text{galacturonic acid}}:n_{\text{glucosamine hydrochloride}}=427:293:86:73:42:40:31:8$  of which arabinose had the highest content. LBLP mainly contained two polysaccharide components with different molecular weight distributions, among which the component with the highest content had a weight average molecular weight (Mw) of (67 380±288) ku. The UV spectrum showed that the *Lycium barbarum* leaves extract contains protein absorption peaks, indicating that it was a protein complex polysaccharide, consistent with the protein content determination results. It could be seen from the infrared spectrum that LBLP has the characteristic absorption peak of polysaccharide and contains pyranoside. In antioxidant experiments, LBLP showed good scavenging effects on 2,2-diazo-bis-3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid cations (ABTS<sup>+</sup>), 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine cations (DPPH<sup>+</sup>), superoxide anions, and hydroxyl radicals. When the LBLP mass concentration was 5 mg/mL, the scavenging rates of DPPH<sup>+</sup> and superoxide anions reached 90%. In the enzyme activity inhibition experiment, LBLP had good inhibitory ability on the activities of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, trypsin, and pancreatic lipase, and had a dose effect relationship. The IC<sub>50</sub> was (23.80±0.17), (9.53±0.39), (23.36±0.81) mg/mL and (16.03±0.59) mg/mL, respectively. This study could provide theoretical basis for the development of functional foods related to antioxidant, hypoglycemic, and lipid-lowering effects of *Lycium barbarum* leaves polysaccharides.

**Keywords** *Lycium barbarum* leaves; polysaccharide; structural characterization; oxidation resistance; enzyme inhibition kinetics