

不同成熟度油橄榄果实多酚提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性及抗氧化活性对比分析

冯惠泽, 向海心, 项敏, 向燕, 李芳, 何强, 黄伦杰, 董怡*

(四川大学轻工科学与工程学院, 四川成都 610065)

摘要: α -葡萄糖苷酶抑制剂可延缓碳水化合物吸收, 控制餐后血糖。油橄榄果实富含多酚, 但其成熟度对多酚提取物生物活性的影响缺乏系统性的研究。为比较不同成熟度油橄榄果实游离多酚提取物及其主要单体成分的 α -葡萄糖苷酶抑制机制和体外抗氧化能力, 本研究提取油橄榄果实的游离多酚, 测定样品对 α -葡萄糖苷酶抑制的 IC_{50} 值, 结合酶动力学与分子对接探究抑制类型及结合位点, 通过 DPPH、ORAC 和 Fe^{2+} 螯合实验评价抗氧化活性。结果表明: GFP (IC_{50} 值为 0.39 mg mL^{-1}) 的抑制能力显著优于 MFP (IC_{50} 值为 0.59 mg mL^{-1}); 单体中木犀草素的抑制活性最强 (IC_{50} 值为 $26.70 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。酶动力学结果显示, GFP、MFP、芦丁和绿原酸为混合型抑制, 木犀草素为非竞争性抑制; 分子对接表明木犀草素主要结合 GLN-350、ASP-349 等非活性中心位点; 此外, 样品的体外抗氧化活性显著, 木犀草素的综合活性最佳, GFP 的 Fe^{2+} 螯合能力最强。综上所述, 油橄榄多酚在抑制 α -葡萄糖苷酶活性和抗氧化方面展现了潜力, 本研究为其在天然降糖剂和功能性食品中的应用提供了理论依据。

关键词: 油橄榄多酚; α -葡萄糖苷酶; 酶动力学; 分子对接; 抗氧化能力

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.4.0947

Comparative Analysis of α -Glucosidase Inhibitory and Antioxidant Activities of Polyphenol Extracts from Olive Fruits at Different Maturity Stages

FENG Huize, XIANG Haixin, XIANG Min, XIANG Yan, LI Fang, HE Qiang, HUANG Lunjie, DONG Yi*

(College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: α -Glucosidase inhibitors are known to delay carbohydrate absorption and control postprandial blood glucose. Olive fruits are rich in polyphenols, yet systematic studies on the influence of fruit maturity on the biological activities of these polyphenol extracts remain scarce. This study aimed to compare the α -glucosidase inhibitory mechanisms and in vitro antioxidant capacities of free polyphenol extracts from olive fruits at different maturity stages, as well as their major individual phenolic constituents. Free polyphenols were extracted using organic solvents, and their IC_{50} values against α -glucosidase were determined. Furthermore, inhibition types and binding sites were investigated through enzyme kinetics and molecular docking, while antioxidant activities were evaluated via DPPH, ORAC, and Fe^{2+} chelating assays. The results showed that GFP ($IC_{50}=0.39 \text{ mg mL}^{-1}$) exhibited significantly higher inhibitory activity than MFP ($IC_{50}=0.59 \text{ mg mL}^{-1}$). Among the tested phenolic monomers, luteolin exhibited the strongest inhibitory activity, with an IC_{50} value of $26.70 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Enzyme kinetic analysis revealed that GFP, MFP, rutin, and chlorogenic acid acted as mixed-type inhibitors, whereas luteolin exhibited non-competitive inhibition. Molecular docking indicated that luteolin primarily bound to non-active-site residues such as GLN-350 and ASP-349. In addition, all samples exhibited potent in vitro antioxidant activities; luteolin showed the best overall activity, while GFP demonstrated the strongest Fe^{2+} chelating capacity. Overall, olive polyphenols possess promising functionality as both α -glucosidase inhibitors and antioxidants, supporting their potential application in natural hypoglycemic agents and functional foods.

Key words: olive polyphenols; α -glucosidase; enzyme kinetics; molecular docking; antioxidant capacity

收稿日期: 2026-06-24; 修回日期: 2026-07-27; 接受日期: 2026-07-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (32102039); 四川省科技计划项目-省国际合作项目 (2021YFH0043)

作者简介: 冯惠泽 (2005-), 男, 本科, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 2679493380@qq.com

通讯作者: 董怡 (1986-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: waydongyi2501779@163.com

II型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) 是一种高发的慢性代谢疾病。全球糖尿病患者已超过 5 亿, 其中 90% 以上为 T2DM 患者^[1,2]。持续的餐后高血糖被证实是 T2DM 发生和发展的重要因素, 并与肾损伤、心血管损伤等并发症密切相关^[3,4]。碳水化合物的消化主要依赖 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶。 α -淀粉酶催化淀粉等多糖内部 α -1,4 糖苷键水解, 生成寡糖^[5]。位于小肠刷状缘的 α -葡萄糖苷酶最终水解二糖、寡糖为葡萄糖, 其活性直接影响餐后葡萄糖的吸收速率^[3,6]。因此, 抑制 α -葡萄糖苷酶的活性是控制餐后血糖水平的重要策略之一。目前, 临床广泛应用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 如阿卡波糖, 具有良好的降糖效果, 但伴随肠胃不适、腹泻等副作用, 限制其长期使用^[7]。因此, 开发一款安全、高效的天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂是目前天然产物和功能性食品领域的热点。

研究表明, 氧化应激与 T2DM 的发生与发展密切相关^[8]。长期高血糖状态会促使活性氧过量生成, 导致胰岛 β 细胞功能障碍和胰岛素抵抗^[9,10]。此外, 胰岛 β 细胞的抗氧化酶表达水平较低, 极易受到氧化损伤^[11]。近年来, 天然抗氧化剂被发现能通过抑制氧化链式反应、清除自由基等方式, 延缓 T2DM 的发生与发展^[12]。由此可见, 兼具降糖活性和抗氧化能力的天然活性成分具有更高的开发价值。

地中海饮食具有显著的健康效益, 因此得到广泛关注。现有研究指出, 坚持该饮食模式能显著降低 T2DM、心血管疾病的发生风险^[13-15]。传统观点认为, 橄榄油中以油酸为核心的丰富的单不饱和脂肪酸, 是其发挥健康效益的主要物质基础^[16,17]。但近年研究发现, 橄榄油中所富含的酚类化合物同样发挥重要作用, 其优异的抗氧化活性和降糖能力都有助于地中海饮食发挥健康功效^[17]。

油橄榄 (*Olea europaea* L.) 的果实中富含多种生物活性酚类, 包括木犀草素、芦丁和绿原酸等^[18,19]。这些酚类化合物具有较强的体外抗氧化能力, 可调控单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMP-Activated Protein Kinase, AMPK) 等信号通路, 产生抗氧化及抗炎效应^[20-22]。同时, 酚类物质具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的能力, 可以降低餐后血糖, 发挥降糖效果^[23]。然而, 目前对于油橄榄果实多酚中关键活性成分的具体贡献, 以及不同成熟度果实的降糖和抗氧化能力的变化规律, 尚缺乏系统研究^[24]。

基于此, 本研究以不同成熟度油橄榄果实为原料, 提取游离多酚, 系统评价其对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力, 筛选多酚提取物中的关键生物活性单体, 并通过酶促动力学分析和分子对接技术, 阐释多酚混合物与单体的作用机理。同时, 通过 DPPH、ORAC 和 Fe^{2+} 螯合实验, 系统评价其体外抗氧化能力。旨在发掘油橄榄多酚的降糖与抗氧化功能, 为其在天然降糖剂和功能性食品领域提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

油橄榄鲜果实, 由四川橄榄枝农业科技有限责任公司提供。

1.1.2 主要试剂

α -葡萄糖苷酶、阿卡波糖、Trolox、芦丁、绿原酸、抗坏血酸 (Ascorbic Acid, VC)、二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、1,1-二苯基-2-苦基肼 (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl, DPPH)、偶氮二异丁脒盐酸盐 (2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH)、荧光素钠、 FeCl_2 、菲啰嗪、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (4-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranoside, pNPG), 购于上海源叶生物科技有限公司; 木犀草素, 购于上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

KQ3200DE 超声细胞破碎仪, 昆山市超声仪器有限公司; DF-101T 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; 1736R 高速冷冻离心机, LaboGene 公司; SCIENTZ-10N 真空干燥冷冻机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Synergy H1 多功能微孔板检测仪, 美国伯腾仪器有限公司; SQP 分析天平, 德国赛多利斯科学仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 油橄榄多酚提取物的制备与分析

1.3.1.1 原料预处理

将鲜油橄榄果清洗去除杂质,依据其外观特征(如硬度和果皮颜色)将其分为未成熟果(Green, G)和熟果(Mature, M)分别分离出果肉后冷冻干燥。在冻干后的样品中按 1:10 (m/V) 的料液比加入石油醚,于室温避光搅拌提取 24 h,抽滤,去除石油醚,重复三次。脱脂后的果肉于 40 °C 烘箱中干燥,得到两种成熟度的脱水脱脂的果肉样品。

1.3.1.2 游离多酚的提取

未成熟果游离多酚(Green Free Polyphenols, GFP):精确称取 30.00 g 脱水脱脂的未成熟果果肉粉末,加入 450 mL 80% (体积分数)乙醇溶液,280 W 超声提取 20 min,4 000 ×g 低温离心 15 min,收集上清液。重复提取 3 次,合并、减压浓缩上清液后,定容至 100 mL。准确吸取 1 mL 提取原液,稀释至 1 mg mL⁻¹ 备用。

成熟果游离多酚(Mature Free Polyphenols, MFP):选用成熟果果肉粉末,方法同 GFP 的提取。

1.3.1.3 生物活性单体的筛选

参考实验室前期对油橄榄多酚的研究,筛选出三种样品中含量较高且抗氧化性能较强的生物活性单体:木犀草素、芦丁、绿原酸^[19]。

1.3.2 油橄榄多酚提取物及单体对 α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用

用 100 mmol L⁻¹, pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution, PBS)配制浓度为 5 mmol L⁻¹ 的底物(pNPG)溶液和 1 U mL⁻¹ 的 α-葡萄糖苷酶溶液,用 DMSO 配制单体样品母液,再用 PBS 将多酚提取物和单体母液稀释至一定质量浓度梯度。分别取 50 μL 样品和 α-葡萄糖苷酶溶液混合后于 37 °C 下孵育 10 min,再加入 150 μL pNPG 溶液启动反应,用酶标仪在 405 nm 处持续测吸光度 15 min,时间间隔 2 s。以阿卡波糖作为阳性对照。每个样品重复测量三次,根据公式(1)计算抑制率(I):

$$I = (1 - \frac{k_1}{k_0}) \times 100 \quad (1)$$

式中:

I——抑制率, %;

k₁——样品组吸光度-时间曲线斜率;

k₀——空白组吸光度-时间曲线斜率。

1.3.3 α-葡萄糖苷酶活性抑制动力学

参考王闪^[25]的方法,并做适当修改,判断不同成熟度油橄榄多酚提取物及单体对 α-葡萄糖苷酶的抑制类型。

取 50 μL 浓度为 1 U mL⁻¹ 的 α-葡萄糖苷酶溶液,加入 50 μL 不同质量浓度样品,37 °C 静置 10 min,随后分别加入 150 μL 浓度为 1.0、2.5、5.0、10 mmol L⁻¹ 的 pNPG 溶液,测定并计算 405 nm 处的吸光度变化。绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线,横坐标为 pNPG 浓度的倒数 (mmol L⁻¹),纵坐标为反应速率的倒数,以吸光度变化率 (min ΔA⁻¹) 表示。据此计算动力学参数,确定样品对 α-葡萄糖苷酶的抑制类型。

1.3.4 分子对接

酵母的 α-葡萄糖苷酶结构不可用,其同工酶异麦芽糖酶的结构具有高序列同源性^[26,27]。因此本研究在 Protein Data Bank(RCSB PDB: Homepage)中下载异麦芽糖酶的晶体结构(PDB ID: 3A4A)作为受体模型。利用 ChemDraw 软件构建木犀草素、芦丁和绿原酸的三维分子结构,并进行能量最小化。使用 Autodock Vina 软件对小分子和蛋白质进行去除水分子、加氢及分子对接处理,将结合能力最强的对接结构导入 Pymol 软件,进行可视化处理。

1.3.5 DPPH 自由基清除能力

参考 Sepehri 等^[28]的方法,并做适当修改。以无水乙醇作为反应体系溶剂。分别配制浓度分别为 0.08、0.06、0.04、0.02、0.01 μmol L⁻¹ 的 Trolox 溶液,浓度为 0.25 mmol L⁻¹ 的 DPPH 溶液。取 80 μL Trolox 溶液与 80 μL 乙醇加入 96 孔板,再加入 40 μL DPPH 溶液,混匀,室温避光静置 20 min,测定 517 nm 处吸光度(A₁)。将 80 μL Trolox 溶液和 120 μL 乙醇加入 96 孔细胞板中,混合反应后,测定 517 nm 处吸光度(A₂);再将 160 μL 乙醇溶液和 40 μL DPPH 溶液加入 96 孔板,混合反应后,测定 517 nm 处吸光度(A₀)。根据公式(2)计算 DPPH 清除率(S):

$$S = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中:

S——DPPH 清除率, %;

A_0 ——DPPH 工作液的吸光度;

A_1 ——加入 DPPH 工作液后样品的吸光度;

A_2 ——不加 DPPH 工作液时样品的吸光度。

以 Trolox 浓度为横坐标, DPPH 清除率为纵坐标建立标准曲线。

配制一定质量浓度的 GFP、MFP、木犀草素、芦丁、绿原酸溶液, 测定 DPPH 清除率, 计算 DPPH 值, 以 Trolox 当量 (Trolox Equivalent, TE) 表示, 单位为 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ 。TE 定义为样品与 Trolox 标准品达到相同 DPPH 清除率时所对应的 Trolox 浓度。

1.3.6 ORAC

以 pH 值为 7.4、浓度为 75 mmol L^{-1} 的 PBS 为溶剂, 分别配制 $38.25 \text{ mmol L}^{-1}$ 的 AAPH 磷酸盐溶液; $0.16 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的荧光素钠的磷酸盐溶液; 浓度分别为 0、0.005、0.01、0.02、0.04、0.08 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的 Trolox 溶液。在 96 孔细胞板中加入 $25 \mu\text{L}$ Trolox 溶液、 $75 \mu\text{L}$ 荧光素钠溶液, 37°C 温浴 10 min 后加入 $100 \mu\text{L}$ AAPH 溶液, 设置激发波长为 485 nm, 发射波长为 530 nm, 每 90 s 检测一次, 进行 2 h 动力学检测, 依次记录各时间点荧光强度为 F_0 、 F_1 、 F_2 …… F_{80} 。以各时间点的绝对荧光强度 F_n 与初始的绝对荧光强度 F_0 之比计算相对荧光强度, 记作 f_0 、 f_1 、 f_2 …… f_{80} 。采用近似积分法计算相对荧光强度的荧光衰退曲线下面积 (AUC):

$$AUC = 0.5 \times [2 \times (f_0 + f_1 + \dots + f_{n-1} + f_n) - f_0 - f_n] \times \Delta t \quad (3)$$

式中:

Δt ——相邻时间点间的时间间隔, min;

f_n ——第 n 个时间点的相对荧光强度。

保护面积 AUC_{Net} 的计算公式为:

$$AUC_{Net} = AUC_1 - AUC_0 \quad (4)$$

式中:

AUC_1 ——样品在荧光曲线下的面积;

AUC_0 ——不加荧光素钠的空白组在荧光曲线下的面积。

以 Trolox 浓度为横坐标, 保护面积 AUC_{Net} 为纵坐标建立标准曲线。

配制一定质量浓度的 GFP、MFP、木犀草素、芦丁、绿原酸溶液, 测定样品的保护面积 AUC_{Net} 。样品的 ORAC 值以 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ 样品表示。

1.3.7 Fe^{2+} 螯合能力

参考刘芳等^[29]的方法, 并做适当修改。用超纯水配制 2 mmol L^{-1} 的 FeCl_2 和 5 mmol L^{-1} 的菲啰啉溶液。分别用 DMSO 配制木犀草素、芦丁、绿原酸、VC 的高浓度母液, 用超纯水稀释样品。在 48 孔板中依次加入 $300 \mu\text{L}$ 样品、 $405 \mu\text{L}$ 超纯水、 $15 \mu\text{L}$ FeCl_2 和 $30 \mu\text{L}$ 菲啰啉溶液, 混匀, 室温反应 10 min, 在 562 nm 处测定吸光度 (A_s)。将 $300 \mu\text{L}$ 样品、 $405 \mu\text{L}$ 超纯水、 $15 \mu\text{L}$ FeCl_2 和 $30 \mu\text{L}$ 超纯水加入 48 孔板, 混匀后室温下反应 10 min, 在 562 nm 处测定吸光度 (A_{s0})。再将 $300 \mu\text{L}$ 超纯水、 $405 \mu\text{L}$ 超纯水、 $15 \mu\text{L}$ FeCl_2 和 $30 \mu\text{L}$ 菲啰啉溶液加入 48 孔板, 室温下混合反应 10 min, 在 562 nm 处测定吸光度 (A_0)。以 VC 作为阳性对照。根据公式 (5) 计算 Fe^{2+} 螯合率 (C):

$$C = (1 - \frac{A_s - A_{s0}}{A_0}) \quad (5)$$

式中:

C—— Fe^{2+} 螯合率, %;

A_0 ——空白组的吸光度;

A_s ——样品组的吸光度;

A_{s0} ——不加菲啰啉水溶液时样品的吸光度。

1.3.8 数据分析

所有数据测定均进行三次重复实验, 所得数据以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示。使用 IBM SPSS Statistics 27 对实验结果进行单因素 ANOVA 检验和 Tukey 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。使用 OriginPro 2024 作图。

2 结果与讨论

2.1 油橄榄多酚提取物及单体对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用

如图 1 所示, 在 $0.05\sim 2.50\text{ mg mL}^{-1}$ 的质量浓度范围内, GFP 和 MFP 均对 α -葡萄糖苷酶表现出强烈的抑制活性, GFP 的 IC_{50} 值为 0.39 mg mL^{-1} , 其抑制能力显著高于 MFP (IC_{50} 值为 0.59 mg mL^{-1})。不同成熟度油橄榄果实多酚提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性存在显著差异, 可能与其成熟过程中游离多酚组成和含量的动态变化密切相关。

前期实验结果表明 GFP 中芦丁含量最高(0.69 mg g^{-1}), 其次为木犀草素(0.21 mg g^{-1})和绿原酸(0.17 mg g^{-1}); MFP 中芦丁含量最高(1.93 mg g^{-1}), 其次为木犀草素(0.37 mg g^{-1})和绿原酸(0.06 mg g^{-1})。三种单体在一定质量浓度范围内, 对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率均随浓度的升高而增大(图 2)。其中, 提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用从大到小依次为: 木犀草素($26.70\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$)>芦丁(0.50 mg mL^{-1})>绿原酸(2.25 mg mL^{-1})。黄酮类化合物(木犀草素、芦丁)主要的活性结构修饰集中在 C 环的 2、3 位, 木犀草素 C-2、C-3 位的双键可稳定 A、B 两环的平面型空间结构, 有利于其与酶分子的结合^[30]。袁海华等^[31]通过比较木犀草素与圣草酚(二者结构差异仅在于 C 环 C-2、C-3 双键的有无)对 β -酮酰基-ACP 还原酶的抑制活性发现, C-2、C-3 位双键可显著增强木犀草素的酶抑制活性。而芦丁 C-3 位连接的芸香糖苷会产生空间位阻, 导致其结合亲和力降低, 从而降低其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制效果。绿原酸分子结构中的羟基、羧基是形成氢键的关键供体和受体, 它们能够与酶分子形成大量的氢键, 实现与酶分子的稳定结合, 并产生抑制作用^[32]。结合各单体含量和抑制活性(IC_{50} 值)计算其对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的贡献。木犀草素在 GFP 和 MFP 中的贡献度分别为 84.35%和 78.23%, 远高于芦丁(14.87%、21.61%)和绿原酸(0.78%、0.16%)。综上, 油橄榄多酚提取物中木犀草素含量较高且对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用贡献度最大, 因此木犀草素可能是油橄榄多酚发挥降糖作用的关键活性成分之一^[19]。

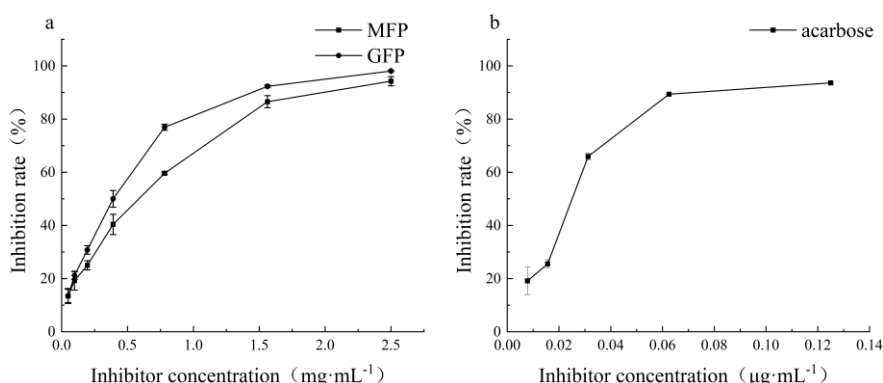


图 1 油橄榄多酚提取物 (GFP、MFP)、阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶活性抑制

Fig.1 α -Glucosidase inhibitory activity of olive polyphenol extracts (GFP and MFP) and acarbose

注: a, 油橄榄多酚提取物; b, 阿卡波糖。

2.2 α -葡萄糖苷酶活性抑制动力学

为进一步明确油橄榄多酚及其主要活性单体对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型, 利用 Lineweaver-Burk 双倒数曲线对油橄榄多酚提取物及三种单体的酶抑制动力学进行分析, 结果如图 3 所示。

动力学拟合结果表明, MFP、GFP、绿原酸和芦丁的 Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线均相交于第三象限。随着抑制物浓度增大, 拟合曲线的斜率 (K_m/V_{max}) 与截距 ($1/V_{max}$) 均增大, 对应体系的最大反应速度 (V_{max}) 和米氏常数 (K_m) 均降低。该动力学现象表现为混合性抑制^[33], 并呈现向反竞争性抑制偏移的特征, 表明 MFP、GFP、绿原酸和芦丁不仅可以和游离酶 (E) 结合, 还可以和酶-底物复合物 (ES) 结合, 通过双重结合方式影响酶与底物之间的亲和能力, 进而抑制 α -葡萄糖苷酶的催化活性^[25,34]。

木犀草素的 Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线相交于 x 轴负半轴。这一动力学特征表明, 随着木犀草素浓度增大, 拟合曲线斜率 (K_m/V_{max}) 增大但截距 ($1/V_{max}$) 不变, 说明酶促反应的最大反应速度 (V_{max}) 降低, 但米氏

常数 (K_m) 并未发生改变。因此, 木犀草素对 α -葡萄糖苷酶的抑制属于非竞争性抑制。结果表明, 木犀草素不与底物竞争酶的活性中心, 而是与非活性中心的位点结合, 不影响酶与底物的结合能力, 因此 K_m 基本保持不变^[35]。而 V_{max} 的降低是因为抑制剂降低了体系中有效酶浓度, 使酶促反应的效率下降。木犀草素对 α -葡萄糖苷酶的非竞争性抑制机制已在酶抑制动力学、荧光猝灭和分子对接实验中得到证实^[35]。

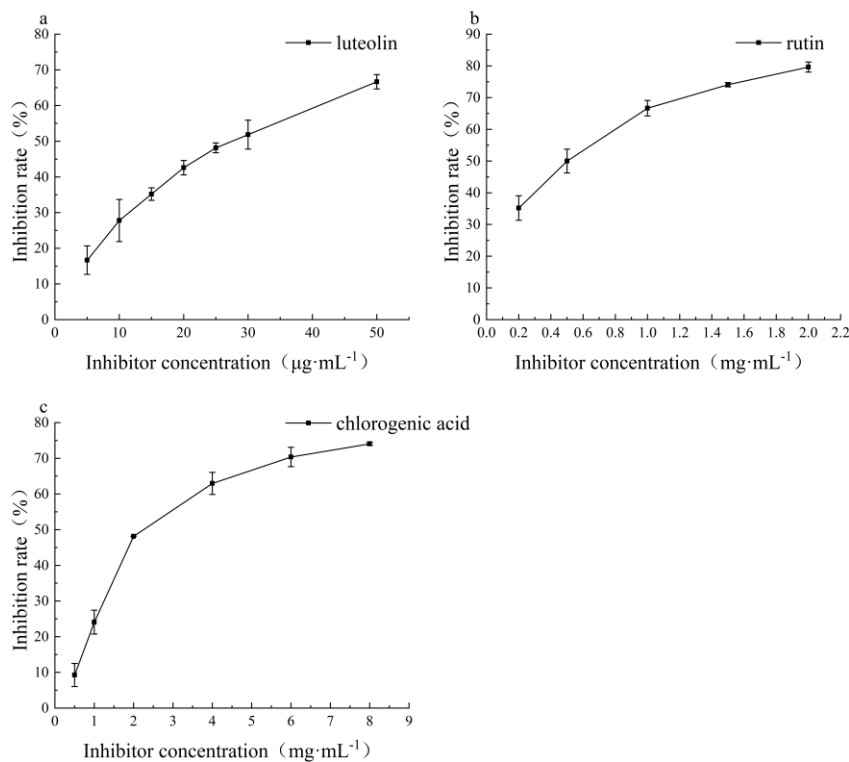
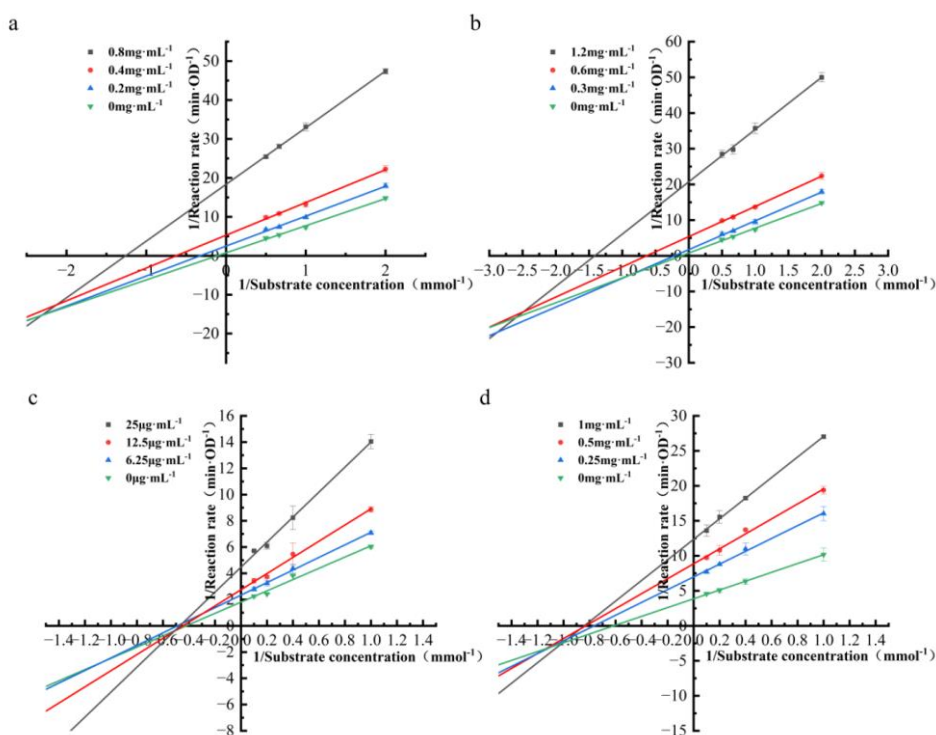


图2 单体对 α -葡萄糖苷酶活性抑制

Fig.2 Inhibitory effects of individual phenolic compounds on α -glucosidase activity

注: a, 木犀草素; b, 芦丁; c, 绿原酸。



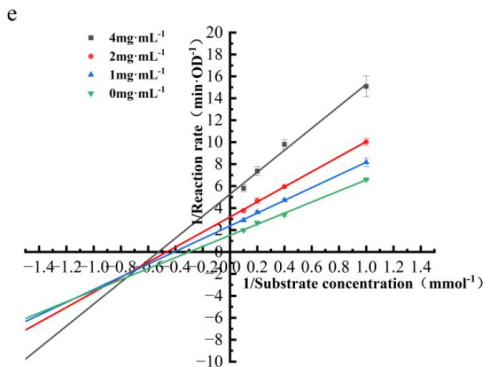


图 3 油橄榄多酚提取物及单体对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制动力学

Fig.3 Inhibitory kinetics of olive polyphenol extracts and individual phenolic compounds against α -glucosidase

注：a，GFP；b，MFP；c，木犀草素；d，芦丁；e，绿原酸。

2.3 分子对接

分子对接技术被应用于探究单体与酶分子的相互作用机制。分子对接结果表明（图 4），三种单体分子均成功嵌入酶蛋白分子内部。单体的多羟基结构使其与异麦芽糖酶分子中的关键氨基酸残基形成紧密的氢键网络，调控酶分子的空间构象与催化能力，从而影响酶促反应。其中，木犀草素主要与 GLN-350、ASP-349 等位点结合，其并未与异麦芽糖酶活性中心的 GLU-277、HIS-351 和 ASP-352 等关键氨基酸残基发生相互作用，这进一步佐证了其非竞争性抑制机制^[35]。

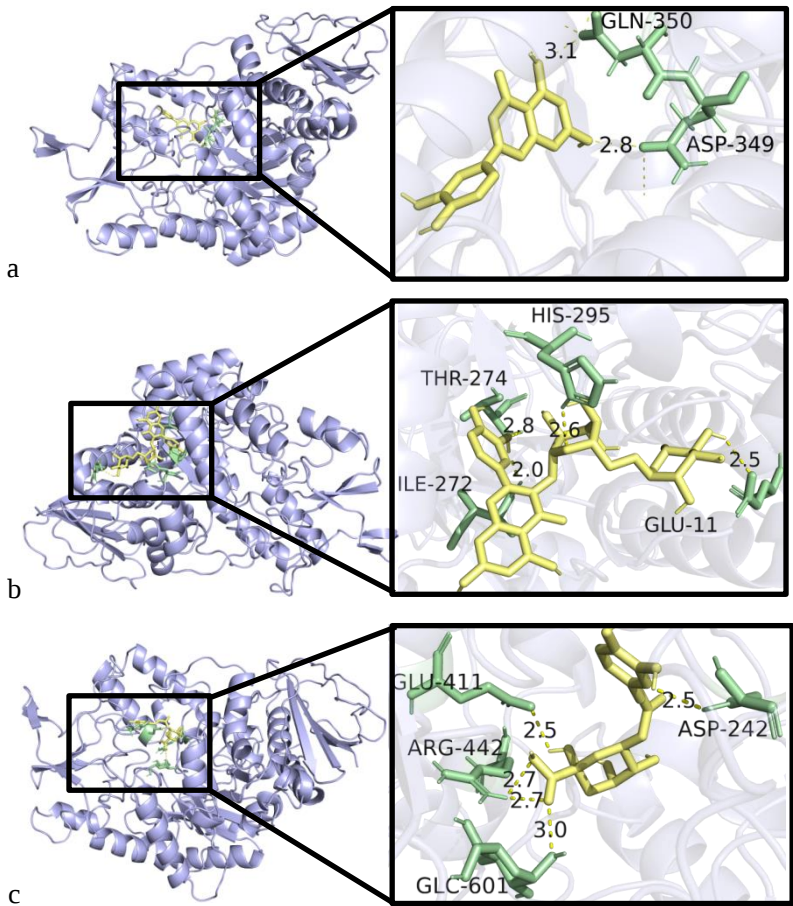


图 4 单体分子对接

Fig.4 Molecular docking of individual phenolic compounds

注：a，木犀草素；b，芦丁；c，绿原酸。

2.4 抗氧化能力

除酶抑制活性外,多酚化合物的抗氧化能力也是评估其功能潜力的重要指标。机体的氧化应激与 T2DM 的发病机制有显著的相关性,一方面,过量活性氧的生成会直接或间接激活细胞内一系列应激信号通路,从而诱发胰岛素抵抗;另一方面,胰岛 β 细胞对氧化损伤高度敏感,活性氧过量积累可诱导其凋亡,加剧胰岛素分泌不足^[36,37]。此外,活性氧还可以启动脂质过氧化链式反应,导致相关并发症(如动脉粥样硬化)的发生,进一步加剧氧化损伤,并通过 Fenton 反应生成羟基自由基,损伤胰岛 β 细胞^[38]。因此,通过抗氧化剂清除自由基、终止过氧化链式反应及螯合金属离子,已成为抑制 T2DM 发生的重要策略之一。

DPPH、ORAC 和 Fe^{2+} 螯合实验是评价化合物体外抗氧化活性的经典方法。DPPH 自由基可被抗氧化剂通过电子转移方式清除,从而引起吸光度降低,因此, DPPH 实验用于评价样品的自由基清除能力^[39]; ORAC 法的原理是抗氧化剂通过氢原子转移的方式终止自由基链式反应^[40]。如图 5 所示,三种单体中木犀草素的抗氧化性能最优(DPPH: $6491.19 \mu\text{mol TE g}^{-1}$; ORAC: $22\ 044.40 \mu\text{mol TE g}^{-1}$)。Romero 等^[41]在植物生物活性成分的研究中,发现木犀草素具有突出的抗氧化能力。而多酚提取物中, GFP 的抗氧化能力远高于 MFP。 Fe^{2+} 通过 Fenton 反应产生活性氧,加速氧化损伤,抗氧化剂可以与 Fe^{2+} 螯合,从而抑制其氧化能力^[42]。 Fe^{2+} 螯合能力结果(图 5)表明, GFP 和 MFP 的 Fe^{2+} 螯合率均超过 60%,显著高于阳性对照(VC),具有较强的抗氧化活性;单体组分中,芦丁表现出最强的 Fe^{2+} 螯合能力(约 50%)。

研究表明,类黄酮化合物的抗氧化活性主要由其结构特征决定, C-2、C-3 共轭双键及邻二酚结构是类黄酮抗氧化能力的决定性因素^[43]。木犀草素 B 环上的邻二酚结构以及 C-2、C-3 双键与 4-羰基形成的共轭体系,可有效促进电子离域并稳定酚氧自由基,显著增强其抗氧化能力。芦丁的糖苷化修饰及其糖基引入所产生的空间位阻,共同导致了其抗氧化活性的下降。绿原酸是一种酚酸类化合物,其 B 环上的邻二酚结构能够增加羟基电子云密度、形成分子内氢键,降低 O-H 键能,从而使酚羟基上更易发生夺氢反应,因此绿原酸具有优异的抗氧化能力^[44]。

根据各单体含量和抗氧化能力,计算其贡献度(含量 $\times$ 单位抗氧化活性)。再以三种贡献度之和为 100%进行归一化处理,计算相对贡献度。分析表明,芦丁对 DPPH、ORAC 及 Fe^{2+} 螯合三种抗氧化指标的相对贡献度均最高(相对贡献度分别为 43.80%~60.05%、62.60%~78.86%、52.44%~72.31%)。木犀草素虽然具有最强的抗氧化能力,但其在提取物中含量有限,相对贡献度低于芦丁,约为 30%。绿原酸的相对贡献度最低。此外三种单体的总贡献度不足 10%,表明提取物中尚存大量未鉴定的抗氧化成分。

因此,橄榄油多酚提取物通过自由基清除、阻断脂质过氧化链式反应及螯合 Fe^{2+} 等多重机制,协同发挥抗氧化作用,有效延缓 T2DM 及其相关并发症的发生与发展进程。Harun 等^[45]的研究中,长期摄入富含橄榄油多酚(主要为橄榄苦苷和羟基酪醇)的膳食,被证实可显著降低小鼠空腹血糖,改善胰岛素敏感性,从而发挥抗糖尿病效果。因此,橄榄油多酚不仅具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制能力,还可通过缓解氧化应激水平,降低 T2DM 及其并发症的发生风险,从而为其作为功能性食品原料的开发与应用提供理论依据。

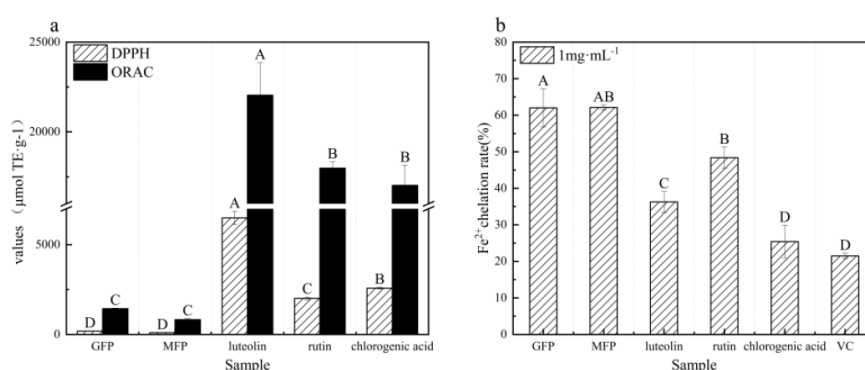


图 5 橄榄油多酚提取物、单体的抗氧化能力

Fig.5 Antioxidant capacity of olive polyphenol extracts and their monomeric constituents

注: a, DPPH/ORAC; b, Fe^{2+} 螯合。不同大写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

2.5 α -葡萄糖苷酶抑制活性与抗氧化能力的相关性分析

为探究橄榄油多酚提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性与抗氧化能力之间的关联性,对各样品的 IC_{50} 值与 DPPH

值、ORAC 值及 Fe^{2+} 螯合率进行了 Pearson 相关性分析。

由图 6 可知, α -葡萄糖苷酶抑制活性与 DPPH 值呈弱负相关 ($r=-0.16$), 与 ORAC 值呈弱正相关 ($r=0.13$), 而与 Fe^{2+} 螯合率呈中等负相关 ($r=-0.581$)。总体而言, α -葡萄糖苷酶抑制活性与三种抗氧化指标之间的相关性均不强 ($|r|<0.6$), 表明油橄榄多酚的 α -葡萄糖苷酶抑制活性与抗氧化能力可能通过相对独立的途径发挥延缓 T2DM 发生与发展的作用。

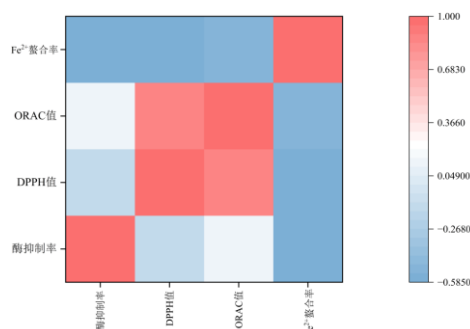


图 6 酶抑制率与各氧化性指标间的相关性热图

Fig.6 Correlation heatmap of α -glucosidase inhibition rate and antioxidant activities

3 结论

本研究对不同成熟度油橄榄果实游离多酚提取物及其主要活性单体的 α -葡萄糖苷酶抑制活性和体外抗氧化能力进行系统评价。结果表明, GFP、MFP 兼具良好的 α -葡萄糖苷酶抑制能力和抗氧化活性; 其中, GFP 的 α -葡萄糖苷酶抑制能力最优 (IC_{50} 值为 0.39 mg mL^{-1})。三种单体中, 木犀草素表现出最强的 α -葡萄糖苷酶抑制作用 (IC_{50} 值为 $26.70 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), 说明其可能是油橄榄多酚降糖作用的重要活性成分之一。酶动力学实验结果显示, MFP、GFP、绿原酸和芦丁是具有反竞争性抑制特征的混合性抑制类型; 而木犀草素表现为典型的非竞争性抑制类型。分子对接实验结果证实多酚化合物可以与酶分子通过氢键等相互作用力相结合, 进而影响酶活力。

另一方面, DPPH、ORAC 和 Fe^{2+} 螯合实验结果表明, GFP、MFP 及三种单体具有良好的抗氧化能力。鉴于氧化应激与 T2DM 的发生密切相关, 油橄榄多酚可通过清除自由基、阻断脂质过氧化链式反应、螯合 Fe^{2+} 等途径发挥抗氧化作用, 协同其 α -葡萄糖苷酶抑制能力, 从而延缓 T2DM 及其并发症的发生与发展。相关性分析结果显示, 油橄榄多酚的 α -葡萄糖苷酶抑制活性与抗氧化能力之间的相关性较弱, 二者可能通过相对独立的途径发挥作用。本研究阐明了 GFP、MFP 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性、机制和体外抗氧化能力, 为油橄榄多酚在天然降糖剂和功能性食品领域的开发提供科学依据。

参考文献

- [1] WANG J, LIU S, LI S, et al. Ultrafiltration LC-PDA-ESI/MS combined with reverse phase-medium pressure liquid chromatography for screening and isolation potential α -glucosidase inhibitors from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(15): 5918-5924.
- [2] DE TORRE M P, VIZMANOS J L, CAVERO R Y, et al. A novel in vivo method using *Caenorhabditis elegans* to evaluate α -glucosidase inhibition by natural products for type 2 diabetes treatment [J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(12): 1685.
- [3] KUMARI S, SAINI R, BHATNAGAR A, et al. Exploring plant-based alpha-glucosidase inhibitors: promising contenders for combatting type-2 diabetes [J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2024, 130(6): 694-709.
- [4] 郑晓丽, 阎利萍, 左吉卉, 等. 羊栖菜提取物的体外抗氧化活性及降低小鼠餐后血糖作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 33-39.
- [5] LI Z, MU Z, LI S, et al. Extraction optimization, purification, and structural characterization of Yacon polysaccharide: An inhibitor against α -glucosidase/ α -amylase [J]. *Food Chemistry*, 2026, 525: 150277.
- [6] FARIYA K, MOHSIN V K, AJAY K, et al. Recent Advances in the Development of Alpha-Glucosidase and Alpha-Amylase Inhibitors in Type 2 Diabetes Management: Insights from In silico to In vitro Studies [J]. *Current Drug Targets*, 2024, 25(12): 782-795.

- [7] DIRIR A M, DAOU M, YOUSEF A F, et al. A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2022, 21(4): 1049-1079.
- [8] ARAVINDHAN V, BOBHATE A, SATHISHKUMAR K, et al. Serum levels of novel anti-inflammatory cytokine Interleukin-38 in diabetes patients infected with latent tuberculosis (DM-LTB-3) [J]. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2022, 36(3): 108133.
- [9] CLEMENTE-SUÁREZ V J, MARTÍN-RODRÍGUEZ A, BELTRÁN-VELASCO A I, et al. Functional and therapeutic roles of plant-derived antioxidants in type 2 diabetes mellitus: mechanisms, challenges, and considerations for special populations [J]. *Antioxidants*, 2025, 14(6): 725.
- [10] KANETO H, KATAKAMI N, MATSUHISA M, et al. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis [J]. *Mediators of Inflammation*, 2010, 2010(1): 453892.
- [11] WANG X, HAI C X. ROS acts as a double-edged sword in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: is Nrf2 a potential target for the treatment? [J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2011, 11(12): 1082-1092.
- [12] DULI M, CIGANOVI P, VUJI L, et al. Antidiabetic and cosmeceutical potential of common barberry (*Berberis vulgaris* L.) root bark extracts obtained by optimization of 'green' ultrasound-assisted extraction [J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3613.
- [13] ROS E, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ M A, ESTRUCH R, et al. Mediterranean diet and cardiovascular health: teachings of the PREDIMED study [J]. *Advances in Nutrition*, 2014, 5(3): 330S-336S.
- [14] LAFFOND A, RIVERA-PICÓN C, OZ P M R, et al. Mediterranean diet for primary and secondary prevention of cardiovascular disease and mortality: an updated systematic review [J]. *Nutrients*, 2023, 15(15): 3356.
- [15] GUASCH-FERRÉ M, WILLETT W C. The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview [J]. *Journal of Internal Medicine*, 2021, 290(3): 549-566.
- [16] SCHWINGSHACKL L, HOFFMANN G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2014, 13(1): 154.
- [17] LU Y, ZHAO J, XIN Q, et al. Protective effects of oleic acid and polyphenols in extra virgin olive oil on cardiovascular diseases [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2024, 13(2): 529-540.
- [18] GHANBARI R, ANWAR F, ALKHARFY K M, et al. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—a review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(3): 3291-3340.
- [19] 池玉闽.油橄榄果膳食纤维与蛋白质及其复合物的理化特性研究[D].成都:四川大学,2023.
- [20] ZORIĆ N, KOPJAR N, RODRIGUEZ J V, et al. Protective effects of olive oil phenolics oleuropein and hydroxytyrosol against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes [J]. *Acta Pharmaceutica*, 2020, 71(1): 131-141.
- [21] ONG K W, HSU A, TAN B K H. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by AMPK activation [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2013, 85(9): 1341-1351.
- [22] 陈俊芳,王霞,姚霞,等.橄榄苦苷通过激活 AMPK 信号通路缓解小鼠妊娠糖尿病[J].世界科学技术-中医药现代化,2023,25(7):2621-2627.
- [23] PROENÇA C, FREITAS M, RIBEIRO D, et al. α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure-activity relationship study [J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2017, 32(1): 1216-1228.
- [24] BODOIRA R, TORRES M, PIERANTOZZI P, et al. Oil biogenesis and antioxidant compounds from "Arauco" olive (*Olea europaea* L.) cultivar during fruit development and ripening [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015, 117(3): 377-388.
- [25] 王闪.酶法合成绿原酸酰化衍生物及其抗氧化和 α -淀粉酶/葡萄糖苷酶抑制活性研究[D].无锡:江南大学,2021.
- [26] DONG Q, HU N, YUE H, et al. Inhibitory activity and mechanism investigation of hypericin as a novel α -glucosidase inhibitor [J]. *Molecules*, 2021, 26(15): 4566.
- [27] 韦思宇,韦玉璐,卢凤来,等.罗汉果根化学成分及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J].中成药,2025,47(4):1181-1188.
- [28] SEPEHRI S, MIRAN M, MANSOURI F, et al. Synthesis, biological evaluation, docking and molecular dynamics studies of Biginelli-type tetrahydropyrimidine analogues: Antimicrobial, cytotoxicity and antioxidant activity [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2025, 1322(1): 140228.
- [29] 刘芳,谢妍祎,吴苏喜,等.油茶花醇提物的体外抗氧化活性研究[J].粮食与油脂,2021,34(5):132-136.
- [30] SUN P, CHEN X, WANG Y, et al. Regulatory mechanisms of luteolin in inflammatory respiratory diseases [J]. *Frontiers in Pharmacology*,

- 2025, 27: 1720824.
- [31] 袁海华, 苟航, 曹先爽, 等. 黄酮类化合物抑制 β -酮酰基-ACP 还原酶的构效关系研究[J]. 林产化学与工业, 2024, 44(4): 18-28.
- [32] MOHAMED A I, OLOFINSAN K A, SALAU V F, et al. Ethiopian coffee (*Coffea arabica*) improves glucose uptake and modulates metabolic enzyme activities linked to hyperglycemia-induced infertility in isolated rats' testes [J]. Food Production, Processing and Nutrition, 2024, 6(1): 75.
- [33] PESARESI A. Mixed and non-competitive enzyme inhibition: underlying mechanisms and mechanistic irrelevance of the formal two-site model [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2023, 38(1): 2245168.
- [34] LI Y Q, ZHOU F C, GAO F, et al. Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of α -Glucosidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(24): 11463-11468.
- [35] 闫家凯. 木犀草素对黄嘌呤氧化酶、 α -葡萄糖苷酶抑制机理的探讨[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [36] 魏书瑶, 冯珊珊, 马菲菲, 等. 氧化应激在 2 型糖尿病发生发展中的作用机制[J]. 西北国防医学杂志, 2021, 42(6): 557-562.
- [37] 李爱琴, 陆环, 徐文静, 等. 氧化应激与 2 型糖尿病的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(12): 2371-2372, 2378.
- [38] DONG Y, TONG Y. Lipid Peroxidation in Diabetic Kidney Disease: Mechanism and Natural Solution [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(19): 9764.
- [39] HIDAYAH S N, HASTUTI A A M B. Comprehensive estimation of measurement uncertainty in determination of antioxidant activity in natural product by 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay[J]. Chemical Papers, 2023, 77(8): 4579-4587.
- [40] OU B, HUANG D, HAMPSCH-WOODILL M, et al. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(11): 3122-3128.
- [41] ROMERO A K, PORTILLO D J, BELTRÁN S B, et al. Enhanced two-step extraction from biomass of two *Cymbopogon* species cultivated in Santander, Colombia [J]. Molecules, 2023, 28(17): 6315.
- [42] GULCIN I, ALWASEL S H. Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method [J]. Processes, 2022, 10(1): 132.
- [43] UNG A T, ASMARA A P. Bioactive phytochemicals of *Acacia saligna* [J]. Molecules, 2023, 28(11): 4396.
- [44] 刘英, 王之盛, 周安国, 等. 橙皮苷和绿原酸的体内外抗氧化效应研究[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 196-199.
- [45] HARUN N, ADNYANA I K, DAMAYANTI S, et al. Administration of oleuropein or hydroxytyrosol improves diabetic markers in obese mice [J]. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, 2025, 13(2): 513-526.