

中药现代化技术

沙棘叶提取物的体外抗氧化及乙酰胆碱酯酶抑制能力

黄瑜¹, 张锡宇¹, 赵海桃¹, 石统帅¹, 邱隽蒙¹, 符群^{1,2*}

(1. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH·) 清除能力、总还原力为指标, 评估了沙棘叶提取物的体外抗氧化活性, 考察其对乙酰胆碱酯酶的抑制能力。结果表明: 5 种不同乙醇体积分数的 (40%、50%、60%、70%、80%) 沙棘叶提取物均有较好的抗氧化活性及乙酰胆碱酯酶抑制能力。以体积分数为 60% 乙醇水溶液提取的沙棘叶提取物的 DPPH·清除率、总还原力及乙酰胆碱酯酶抑制能力最强, 分别为 85.80%±1.39%, 2.45±0.18, 97.14%±0.81%, 可作为抗氧化剂与乙酰胆碱酯酶抑制剂。该沙棘叶提取物对乙酰胆碱酯酶有较强的抑制能力, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 (1.086±0.144) g/L, 对乙酰胆碱酯酶的抑制类型是竞争性大于非竞争性的混合可逆抑制。Auto Dock 分子对接及剂效相关性分析表明, 沙棘叶活性成分与乙酰胆碱酯酶具有一定的对接亲和力, 沙棘叶提取物的抗氧化、酶抑制活性与功能成分之间均存在良好的正相关性 ($P<0.05$), 沙棘叶提取物中起主要抗氧化与酶抑制作用的成分为多酚类化合物。

关键词: 沙棘叶; 活性成分; 乙酰胆碱酯酶; 体外抗氧化; 分子对接; 中药现代化技术

中图分类号: TQ460.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2024) 02-0391-07 开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



In vitro antioxidant activities and acetylcholinesterase inhibition ability of *Hippophae rhamnoides* L. leaves extract

HUANG Yu¹, ZHANG Xiyu¹, ZHAO Haitao¹, SHI Tongshuai¹, QIU Junmeng¹, FU Qun^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: *Hippophae rhamnoides* L. leaves extract was evaluated for its *in vitro* antioxidant activity using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH·) scavenging capacity and total reducing power as indicators, and further assessed for its acetylcholinesterase inhibition ability. The results showed that all *Hippophae rhamnoides* L. leaves extracts with ethanol volume fractions of 40%, 50%, 60%, 70%, and 80% showed good antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition ability, while extract with ethanol volume fractions of 60% exhibited the highest DPPH· scavenging rates, total reducing power, and acetylcholinesterase inhibition ability of 85.80%±1.39%, 2.45±0.18, and 97.14%±0.81% respectively, indicating its potential as antioxidant and acetylcholinesterase inhibitor. Moreover, this extract displayed a half acetylcholinesterase inhibitory concentration (IC₅₀) of (1.086±0.144) g/L and a mixed reversible inhibition mechanism against acetylcholinesterase based on the kinetic analysis of enzyme inhibition that was more competitive than non-competitive. Data from Auto Dock molecular docking and dose-effect correlation analysis indicated that the active ingredients of *Hippophae rhamnoides* L. leaves had a certain docking affinity with acetylcholinesterase. The antioxidant and enzyme inhibitory activities of the extract were positively correlated with the functional ingredients polyphenols ($P<0.05$).

Key words: *Hippophae rhamnoides* L. leaves; active ingredients; acetylcholinesterase; *in vitro* antioxidation; molecular docking; modernization technology of traditional Chinese medicines

收稿日期: 2023-04-25; 定用日期: 2023-07-07; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230349

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2016YFC0500307-07)

作者简介: 黄瑜 (1996—), 女, 硕士生, E-mail: 515487191@qq.com。联系人: 符群 (1974—), 女, 高级工程师, E-mail: nefufuqun@163.com。

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 是胡颓子科 (*Elaeagnaceae*) 的灌木或小乔木^[1]。自 1977 年中国卫生部首次将沙棘列入《中国药典》并认定为药食同源植物后, 2020 年版《中华人民共和国药典》也列出沙棘具有健脾、止咳、活血等功效^[2-3], 并且其富含类黄酮、酚酸、萜类等多种活性物质^[4]。目前, 国际上对于沙棘的叶片、浆果、种子及提取的衍生产品沙棘果汁和沙棘油都已有较多研究^[5]。而沙棘叶片虽易采摘保存且蕴藏丰富, 却往往在采摘过程被丢弃, 资源利用率极低^[6-7], 但实际上沙棘叶中的总黄酮与总酚含量都远高于沙棘果实^[8], 在国内外进行的体内外实验也已经证实了沙棘叶可以对人体发挥抗氧化、免疫调节、护肝和糖尿病等珍贵的药理作用^[9]。目前, 沙棘叶在食品领域的产业化应用, 主要集中在开发成为天然来源的食品添加剂, 以及沙棘茶叶、沙棘叶饮料类特色产品^[2]。

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 又称老年痴呆症, 是一种不可逆的、多因素的神经退行性疾病, 对人类健康构成严重威胁^[10]。目前, 世界上 AD 患病人数达 5000 万, 且其病程缓慢, 患者从开始出现症状到死亡一般持续 7~12 年, 多发于老年时期^[11]。乙酰胆碱 (ACh) 是一种在人体大脑中起重要作用的神经递质^[12], 其会在乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的作用下失活, 从而阻断神经信号的传递^[13]。因此, 乙酰胆碱酯酶抑制剂 (AChEI) 可通过抑制 AChE 活性以减少 ACh 的水解, 起到治疗或改善 AD 的作用^[14]。而天然植物在大自然中广泛存在, 易获取, 从中提取的 AChEI 相较于现在市面上主流的 AChE 抑制类药物如他克林、加兰他敏等, 具有价格低廉、无副作用的优点^[15]。此外, 也有研究表明, 体内自由基氧化效应也可能会诱发 AD^[16], 结合 AChEI 与抗氧化剂治疗 AD 是有效的防治方式^[17]。因此, 有必要不断地寻找到可提取制得 AChEI 与抗氧化剂的天然植物, 而关于沙棘叶的研究鲜见报道。

本研究以多种极性溶剂 (不同体积分数的乙醇水溶液) 沙棘叶提取物作为研究对象, 测定其体外抗氧化能力 [1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH·)、总还原力] 和活性物质 (总黄酮、总酚、总三萜) 含量, 测定其对 AChE 的抑制能力并结合抑制动力学分析对 AChE 的抑制类型, 利用分子对接技术虚拟筛选沙棘叶中具有 AChE 抑制能力的潜在活性成分, 从而为沙棘叶提取物用作天然抗氧化剂和植物源 AChEI 提供基础数据, 并通过对比多种极性溶剂提取物的活性差异, 以期在产业转化中, 通过提取工艺条件的微调, 获得不同应用目的的提取物, 从而实现最大程度的低成本设备投资, 为拓宽沙棘叶资源的深度开发, 与林产资源在功能食品、生物

医药、化工等领域的应用提供理论支持和科学依据。

1 实验部分

1.1 原料、试剂与仪器

沙棘叶, 2022 年黑龙江省农科院园艺分院提供, 经清洗、干燥、研磨过 80 目筛得到粉末, 置于阴凉干燥处备用; 苍蝇头部乙酰胆碱酯酶 (AChE)、碘化硫代乙酰胆碱 (ATCI)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)、加兰他敏、芦丁对照品 (质量分数 $\geq 98\%$)、三萜酸标准品 (齐墩果酸)、没食子酸标准品 (质量分数 $\geq 95\%$)、维生素 C (V_C)、DPPH·, 上海源叶生物科技有限公司; PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.2~7.4), 北京博奥拓达科技有限公司; 无水乙醇、铁氰化钾 {K₃[Fe(CN)₆] }、Al(NO₃)₃ 均为市售 AR, 天津市天力化学试剂有限公司。

NP-PS-20AL 型数码超声波清洗机, 北角仪器科技数码公司; EPOCH12 型酶标仪, 美国 Bio Tek Instruments 公司; UV-5500PC 型紫外-可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 沙棘叶醇提物的制备

精确称取 4 g 干燥的沙棘叶粉末, 加入 80 mL 不同体积分数 (40%、50%、60%、70%、80%) 的乙醇水溶液, 料液比为 1 : 20 (g : mL), 随后在超声功率 80 W, 超声温度 50 °C 条件下超声辅助提取 60 min, 冷却后抽滤。将滤液旋转蒸发浓缩后, 用电热鼓风干燥箱 45 °C 恒温烘干 48 h, 制得沙棘叶醇提取物 (SBLE)^[18-19]。

1.2.2 沙棘叶醇提物的抗氧化活性实验

将 SBLE 溶解在体积分数为 60% 的乙醇水溶液中, 制成质量浓度为 10 g/L 的沙棘叶醇提液, 备用。

1.2.2.1 DPPH·清除率的测定

参考 CHEN 等^[20]的方法并略作改动。首先配制浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH·乙醇溶液, 并将沙棘叶醇提液按梯度稀释成质量浓度为 0.015、0.020、0.025、0.030、0.035、0.040、0.060、0.080、0.100、0.150、0.200、0.250 g/L, 避光下在 96 孔板中依次加入不同质量浓度梯度的样液与 DPPH·乙醇溶液各 100 μ L, 混匀后室温下避光反应 30 min 后迅速使用酶标仪于 517 nm 波长下测定其吸光度 (A_i)。用等体积无水乙醇代替 DPPH·乙醇溶液作为空白组, 测其吸光度 (A_j)。用等体积蒸馏水代替沙棘叶醇提液, 测其吸光度 (A_0)。同时, 用 V_C 作为阳性对照, 根据式 (1) 计算 DPPH·清除率:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}/\% = \left[1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

1.2.2.2 总还原力的测定

参考冉丽梅^[21]的方法进行测定。在试管中加入 1.0 mL 不同质量浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L) 的沙棘叶醇提液,然后依次加入 2.5 mL PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.2~7.4) 和 5.0 mL 质量分数为 1.0% 的铁氰化钾溶液,摇匀。于 50 °C 水浴条件下恒温反应 20 min,并通过加入 5.0 mL 质量分数为 10% 的三氯乙酸溶液终止反应。将反应液以 3000 r/min 离心处理 10 min,取 2.5 mL 上清液,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 质量分数为 10% 的 FeCl₃ 溶液并充分混合。用紫外-可见分光光度计测定反应液在 700 nm 处的吸光度 (OD₇₀₀),样品的还原力与被测溶液的吸光度存在正相关性,用样品溶液的吸光度来评价其还原力,同时用 V_C 作为阳性对照。

1.2.3 沙棘叶醇提物抑制乙酰胆碱酯酶能力及抑制类型的测定

用 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.2~7.4) 将已制好的质量浓度为 10 g/L 的沙棘叶醇提液,梯度稀释成质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 g/L。并用 PBS 缓冲液配制 AChE (0.8 U/mL)、DTNB (5 mol/L) 和 ATCI (10 mol/L) 溶液,备用。

1.2.3.1 抑制乙酰胆碱酯酶活性测定

采用改良的 ELLMAN 法^[12,22],具体步骤为:在 96 孔板中依次加入 140 μL PBS 缓冲液,10 μL AChE 溶液和 20 μL 样品溶液 (质量浓度为 10 g/L),然后将 96 孔板置于酶标仪中 37 °C 恒温振板 15 min;随后加入 20 μL DTNB 溶液与 10 μL ATCI 溶液,并立即再次置于酶标仪中 37 °C 振板充分反应 15 min 后,用酶标仪测定反应前后溶液在 412 nm 处的吸光度,同时用加兰他敏作为阳性对照组。根据式 (2) 及式 (3) 计算乙酰胆碱酯酶的酶促反应速率 (v , 单位为 OD/min) 和抑制率,以 PBS 缓冲液代替样品溶液作为空白,不加 AChE 为相对应本底值。

$$v = \frac{\Delta A_{15} - \Delta A_0}{15} \quad (2)$$

$$\text{乙酰胆碱酯酶抑制率} / \% = (1 - v_i / v_0) \times 100 \quad (3)$$

式中: ΔA_{15} 为反应 15 min 后对照组或实验组除去相应本底值后的吸光度; ΔA_0 为反应前对照组或实验组除去相应本底值后的吸光度; v_i 为实验组的酶促反应速率; v_0 为对照组酶促反应速率。

1.2.3.2 乙酰胆碱酯酶抑制类型判定

通过 1.2.3.1 节确定采用体积分数为 60% 的乙醇水溶液的沙棘叶醇提物对乙酰胆碱酯酶抑制能力最强。将 SBLE 溶解在体积分数为 60% 的乙醇水溶液中制得样品溶液用于判定乙酰胆碱酯酶抑制类型。按 1.2.3.1 节方法,固定底物 ATCI 的浓度 (5 mmol/L),

修改样品溶液质量浓度 (0、0.5、1.0、1.5 g/L) 和 AChE 活性浓度 (0、0.2、0.4、0.6、0.8 U/mL),测定不同质量浓度沙棘叶提取物作用下 AChE 的酶促反应速率,以横坐标为 AChE 活性浓度,纵坐标为酶促反应速率作图,判断样品溶液对 AChE 的抑制类型为可逆抑制/不可逆抑制。

根据 1.2.3.1 节方法,固定 AChE 活性浓度 (0.4 U/mL),修改沙棘叶样品溶液的质量浓度 (0、0.5、1.0、1.5 g/L) 和底物 ATCI 浓度 (0.625、1.25、2.50、5.00、10.00 mmol/L),测定酶促反应速率后并以底物 ATCI 浓度的倒数为横坐标,酶促反应速率的倒数为纵坐标绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线,确定沙棘叶提取物对 AChE 的抑制类型及抑制常数^[12]。

1.2.4 沙棘叶醇提物中主要活性成分含量测定

根据 1.2.2 节与 1.2.3 节的实验结果,比较乙醇各级分的 3 种能力剂效关系及抑制类型,从而筛选出最佳提取溶剂 (乙醇体积分数)。称取 2 g 干燥的沙棘叶粉末,加入 40 mL 选定体积分数的无水乙醇溶液参照 1.2.1 节方法进行超声辅助提取,抽滤合并滤液后用无水乙醇定容至 100 mL 容量瓶中,待用。

1.2.4.1 总黄酮含量测定

参照刘馨雨等^[23]的“硝酸铝”法进行测定。用紫外-可见分光光度计测定反应液在 510 nm 处的吸光度。以芦丁为标准品,得到标准曲线方程为 $y = 17.393x - 0.0074$ (y 为吸光度; x 为芦丁标准溶液的质量浓度, g/L), $R^2 = 0.9993$ 。通过测定样品提取液在 510 nm 处的吸光度得到样品提取液中芦丁质量浓度,再根据式 (4) 计算得到 SBLE 中的总黄酮含量,结果以每克沙棘叶干的芦丁当量表示 (mg/g)。

$$P = \frac{\rho V D}{M} \quad (4)$$

式中: P 为总黄酮 (或总酚) 含量,以每克沙棘叶干样品的芦丁 (或没食子酸) 当量表示, mg/g; ρ 为沙棘叶中总黄酮 (或没食子酸) 的质量浓度, g/L; V 为样品提取液体积, mL; D 为样品提取液稀释倍数; M 为沙棘叶样品干粉质量, g。

1.2.4.2 总酚含量测定

参照傅钰等^[24]的“福林酚”法进行测定。用紫外-可见分光光度计测定反应液在 765 nm 处的吸光度。以没食子酸为标准品,得到没食子酸标准曲线方程为 $y = 84.886x - 0.0014$ (y 为吸光度; x 为没食子酸标准溶液的质量浓度, g/L), $R^2 = 0.9991$ 。通过测定样品提取液在 765 nm 处的吸光度得到样品提取液中没食子酸质量浓度,再根据式 (4) 计算总酚含量,结果以每克干样品中所含的没食子酸当量表示 (mg/g)。

1.2.4.3 总三萜含量测定

参照付亚玲等^[25]的“香草醛-冰乙酸”法进行测

定。用紫外-可见分光光度计测定反应液在 547 nm 处的吸光度。以齐墩果酸为标准品, 得到齐墩果酸标准曲线方程为 $y=9.1926x+0.0223$ (y 为吸光度; x 为齐墩果酸质量, mg), $R^2=0.9996$ 。结果以每克干样品中所含的齐墩果酸当量表示 (mg/g), 计算公式类似于式 (4)。

1.2.5 沙棘叶醇提物成分与抗氧化、酶抑制相关性分析

所有实验均进行 3 次平行实验, 数据结果表示为平均值±标准差。使用 Excel 2019 软件与 SPSS 25.0 进行数据分析, 并使用 Origin Pro 2022 软件进行绘图; 采用 SPSS 25.0 软件, 利用 Pearson 法对沙棘叶中高活性成分含量与抗氧化、酶抑制能力进行相关性分析 ($P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著)。

1.2.6 分子对接

分子对接模拟为活性蛋白酶与化合物的相互作用方式给予一定的解释, 为进一步研究小分子药物奠定理论基础。通过查阅文献^[26-28]并整合筛选, 结合 1.2.5 节中相关性分析结果, 可预测出沙棘叶醇提物中的 11 个潜在活性成分, 再加上阳性对照加兰他敏, 如表 1 所示。

表 1 沙棘叶提取物的潜在活性成分

Table 1 Potential active ingredients of *Hippophae rhamnoides* L. leaves extract

编号	化合物	有机小分子生物活性数据库中化合物对应编码	分子简式
1	加兰他敏	9651	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃
2	儿茶素	9064	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
3	丁香酸	10742	C ₉ H ₁₀ O ₅
4	异鼠李素	5281654	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
5	山奈酚	5280863	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
6	槲皮素	5280343	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
7	杨梅素	5281672	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
8	没食子酸	370	C ₇ H ₆ O ₅
9	鞣花酸	5281855	C ₁₄ H ₆ O ₈
10	熊果酸	64945	C ₃₀ H ₄₈ O ₃
11	科罗素酸	6918774	C ₃₀ H ₄₈ O ₄
12	齐墩果酸	10494	C ₃₀ H ₄₈ O ₃

借助有机小分子生物活性 (PubChem) 数据库中下载配体 (11 种潜在活性成分和标准品) 的 3D 结构, 并结合 Open Babel 工具转换为 PDB 格式; AchE (PDB 代码: 1C2O) 的 3D 结构从 RCSB 蛋白数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载, 使用 PyMOL 软件删除配体、除水, 用 Auto Dock Tools 进行加氢和加 Gasteiger 电荷修饰, 保存为受体结构的 pdbqt 格式; 通过 Auto Dock 软件预测各活性成分与受体 AchE 蛋白的结合, 对

接参数均采用默认设置, 借助 Auto Grid 工具进行格点能量的计算, 利用拉马克遗传算法 (LGA) 半柔性对接寻找到最佳位点, 选择每组中对接结合能小于 -5 kcal/mol、均方根偏差 (RMSD) < 0.2 nm 的小分子配体与受体蛋白进一步分析其结合位点^[29], 使用 PyMOL 软件对对接结果进行可视化分析。

2 结果与讨论

2.1 不同乙醇级分沙棘叶提取物的抗氧化活性评价

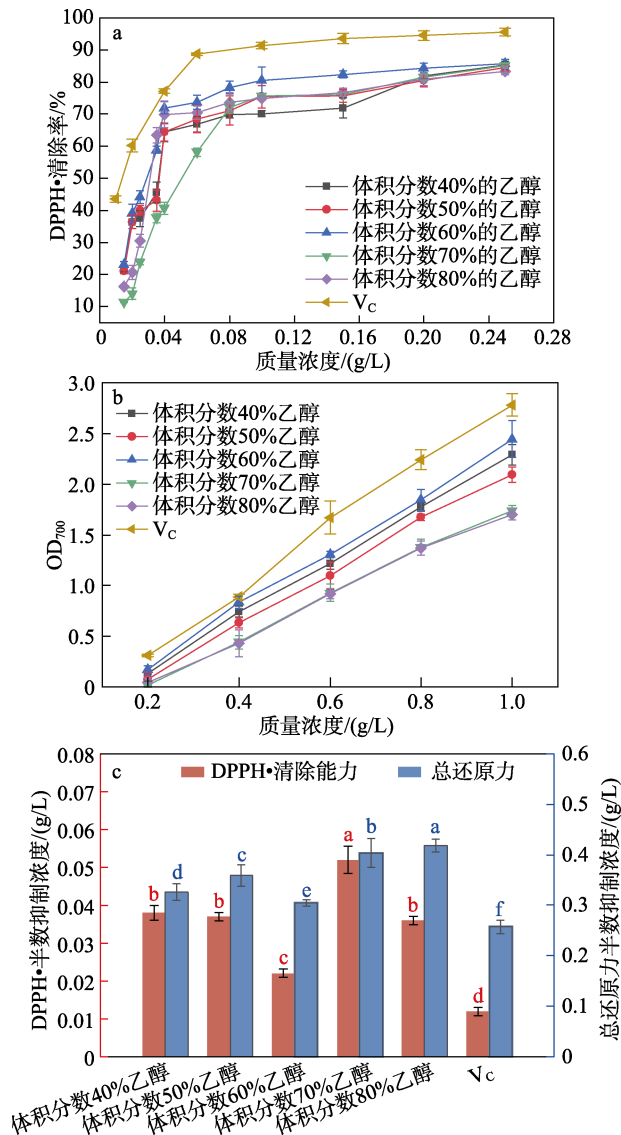
2.1.1 对 DPPH·清除率的影响

DPPH·是一种以氮为中心的稳定自由基, 常被用来反映样品抗氧化能力强弱^[30]。使用不同体积分数乙醇提取的 SBLE 对 DPPH·的清除能力进行测定, 结果如图 1a 所示。从图 1a 可以看出, 5 种不同乙醇级分提取的 SBLE 对 DPPH·均具有显著的清除能力, 但整体上弱于阳性对照 V_C 对 DPPH·的清除能力。当提取物质量浓度为 0.015~0.25 g/L 时, SBLE 对 DPPH·清除率随着提取物质量浓度的升高逐渐增大, 表现出显著的剂量依赖性; 当提取物质量浓度高于 0.06 g/L 后, DPPH·清除率趋于平稳。比较发现, 体积分数为 60% 的乙醇水溶液提取的 SBLE, 其 DPPH·清除率最高, 当其质量浓度为 0.25 g/L 时, DPPH·清除率最大, 为 85.80%±1.39%, 与 V_C 的 DPPH·清除率无显著差异, 此时, 其他 4 种 SBLE 的 DPPH·清除率均可达到 83% 以上。结合图 1c, 采用体积分数为 60% 的乙醇水溶液提取的 SBLE 对 DPPH·清除率的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 (0.022±0.001) g/L, 说明其对 DPPH·清除能力显著强于其他乙醇级分的醇提物 ($P < 0.05$), 这与图 1a 的结果相符。此结果与周浩楠等^[31]的研究一致, 表明 SBLE 具有较强的抗氧化活性。

2.1.2 对总还原力的影响

总还原力的大小与其抗氧化能力有关, 且和显色反应吸光度值成正相关性, 常被用来评价抗氧化剂的抗氧化能力^[32], 所以测定的吸光度值越高, SBLE 的还原力越强。不同体积分数乙醇提取的 SBLE 在 700 nm 处的吸光度 (OD₇₀₀) 测定结果如图 1b 所示。从图 1b 可以看出, 5 种不同乙醇级分提取的 SBLE 溶液质量浓度为 0.2~1.0 g/L 范围内, 总还原力随着溶液质量浓度的增加而显著增大, 样品溶液质量浓度与其吸光度呈正相关性, 说明二者之间有显著的剂量依赖性。当提取物质量浓度为 1.0 g/L 时, 采用体积分数为 60% 乙醇水溶液作为提取剂时 SBLE 的吸光度值最大, 为 2.45±0.18, 且显著高于其他 4 种 SBLE ($P < 0.05$), 但低于阳性对照 V_C。结合图 1c 可见, 采用体积分数 60% 乙醇水溶液的 SBLE 总还原力的半数抑制浓度 (C_{0.5}, 即 OD₇₀₀ 为

0.5 时的质量浓度) 为(0.304±0.006) g/L, 说明该提取物的总还原力显著强于其他乙醇级分制得的 SBLE ($P < 0.05$), 阳性对照 V_C 的 C_{0.5} 为(0.257±0.013) g/L, 总还原力强于 SBLE, 这与图 1b 的结果相符。



图中不同的小写字母代表显著性差异 ($P < 0.05$), 下同
 图 1 不同乙醇级分沙棘叶提取物的 DPPH·清除能力 (a)、总还原力 (b) 与半数抑制浓度 (c)
 Fig. 1 DPPH· scavenging ability (a), total reducing power (b) and half-inhibitory concentration (c) of *Hippophae rhamnoides* L. leaves extracts at different ethanolic levels

2.2 不同乙醇级分沙棘叶提取物对乙酰胆碱酯酶抑制活性评价

2.2.1 对乙酰胆碱酯酶抑制活性的影响

阿尔茨海默症 (AD) 患者大脑中神经递质乙酰胆碱 (ACh) 的缺失是该疾病的致病主要原因, 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 催化 ACh 的分裂和水解, 导致 ACh 的缺失以及神经元信息传递受损, 因此, 抑制 AChE 的活性是临床上治疗 AD 的重要手段^[33]。

探究不同乙醇级分的 SBLE 对 AChE 活性的抑制作用, 结果如图 2a 所示。从图 2a 可以看出, 在提取物溶液质量浓度为 0.5~8.0 g/L 范围内, 随着 SBLE 质量浓度的升高, 其对 AChE 的抑制作用显著增强 ($P < 0.05$), 表现出显著的剂量依赖性。虽然阳性对照加兰他敏表现出极强的 AChE 抑制能力, 但比较 5 种沙棘叶醇提取物对 AChE 的抑制能力, 当提取物质量浓度为 8.0 g/L 时, 体积分数为 60% 的乙醇水溶液沙棘叶醇提取物的抑制能力最大, 为 97.14%±0.81%, 此时其他 4 种沙棘叶醇提取物的抑制能力均可达 81% 以上, 说明不同乙醇级分的 SBLE 对 AChE 均有较好的抑制能力。结合图 2b, 使用软件 SPSS 25.0 计算得出采用体积分数为 60% 乙醇水溶液的沙棘叶醇提取物对 AChE 抑制能力的 IC₅₀ 为 (1.086±0.144) g/L, 显著强于其他乙醇级分的醇提取物 ($P < 0.05$), 这与图 2a 的结果相符。此实验结果远高于丁林玲等^[30]研究的三叶木通果肉提取物对 AChE 的抑制能力, 说明 SBLE 有成为较好的 AChEI 的开发潜力。

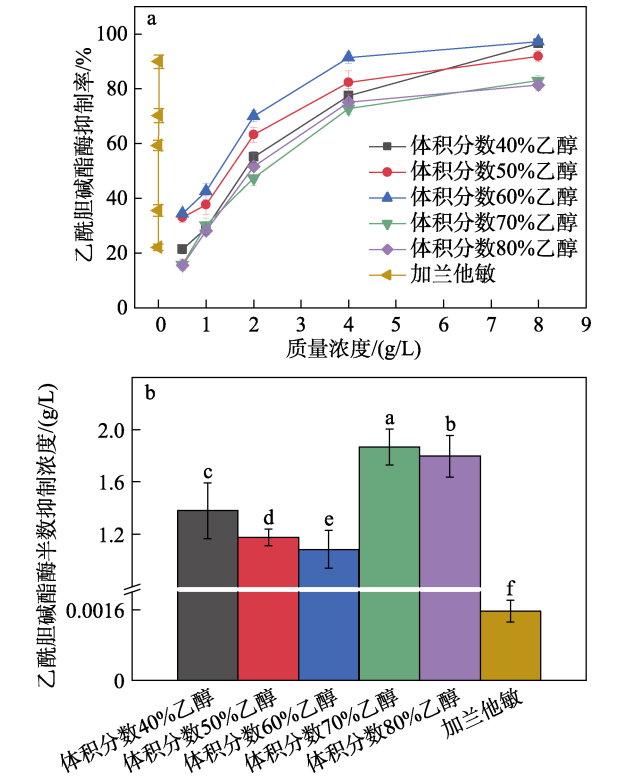


图 2 不同乙醇级分沙棘叶提取物对乙酰胆碱酯酶抑制能力 (a) 与乙酰胆碱酯酶半数抑制浓度 (b)
 Fig. 2 Inhibitory ability (a) and half-inhibitory concentration (b) of acetylcholinesterase by *Hippophae rhamnoides* L. leaves extracts at different ethanolic levels

2.2.2 对乙酰胆碱酯酶抑制类型的分析

图 3a 为不同质量浓度 SBLE 作用下 AChE 的酶促反应速率。从图 3a 可以看出, 未加 SBLE 和加入 SBLE 均得到一条通过原点的直线, 且拟合直线斜

率随着 SBLE 质量浓度的增加而减小,表明 SBLE 对 AChE 的抑制类型属于可逆抑制^[34], SBLE 与 AChE 分子以非共价键的形式结合而造成酶活性降低或丧失,但未引起酶蛋白变性,AChE 酶活力可通过物理手段恢复^[35]。

为进一步明确 SBLE 对 AChE 的可逆抑制类型,通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,进一步确定抑制类型和抑制常数,结果见图 3b。从图 3b 可以看出,不加 SBLE 和加入 SBLE 后,得到的双倒数曲线相交于一点且交点位于第三象限,横轴截距为 $-1/K_m$,纵轴截距为 $1/V_{max}$,说明随着 SBLE 质量浓度增大,米氏常数 K_m 增大,最大酶解速率 V_{max} 减小。随着底物 ATCI 浓度的增加,酶促反应速率也在增加,并逐渐接近 V_{max} 。拟合直线斜率为 K_m 和 V_{max} 的比值,随着 SBLE 质量浓度的增加,直线斜率也随之增加,这一结果表明, K_m 随着抑制剂浓度的增加而增大。综上所述,SBLE 能够竞争底物 ATCI,并优先与酶相结合形成复合物,从而使酶失活^[36-37]。

结合酶的可逆抑制动力学特征进行分析,SBLE 对 AChE 的可逆抑制类型为混合型,SBLE 不仅可以和游离酶结合,还可以与酶-底物复合物在非活性中心结合,导致酶活力降低,且根据双倒数曲线图的特点,交点 K_m 位于第三象限说明 SBLE 对 AChE 的混合型抑制具体为非竞争性抑制与反竞争性抑制的混合。SBLE 对 AChE 的抑制类型为混合型抑制,可能是因为本实验制得的 SBLE 为粗提物,因此,所含的活性成分复杂从而对 AChE 的抑制类型不同。而根据混合型抑制的动力学特征,在可逆抑制剂存在的情况下,表观米氏常数、最大反应速率与抑制常数遵循以下关系^[12,38]:

$$K'_m = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_m}{1 + \frac{[I]}{K'_i}} \quad (5)$$

$$V'_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K'_i} \times 2a} \quad (6)$$

式中: K_m 、 V_{max} 分别为无抑制剂存在时的米氏常数 (mol/L) 与最大酶解速率 (OD/min); K'_m 、 V'_{max} 分别为有抑制剂存在下的表观米氏常数 (mol/L) 及最大酶解速率 (OD/min); $[I]$ 为抑制剂质量浓度 (g/L); K_i 为对游离酶的抑制常数,即竞争性常数 (g/L); K'_i 为对酶-底物复合物的抑制常数,即非竞争性常数 (g/L)。

根据 Lineweaver-Burk 图和公式(5)和公式(6),SBLE 对 AChE 的混合抑制常数 K_i 为 1.264 g/L, K'_i 为 0.823 g/L,抑制常数越大,竞争能力越弱。通过比较表明 $K'_i < K_i$,说明 SBLE 对酶-底物复合物的抑

制作用强于对游离酶的抑制作用,也说明 SBLE 对 AChE 是竞争性大于非竞争性的混合可逆抑制类型。

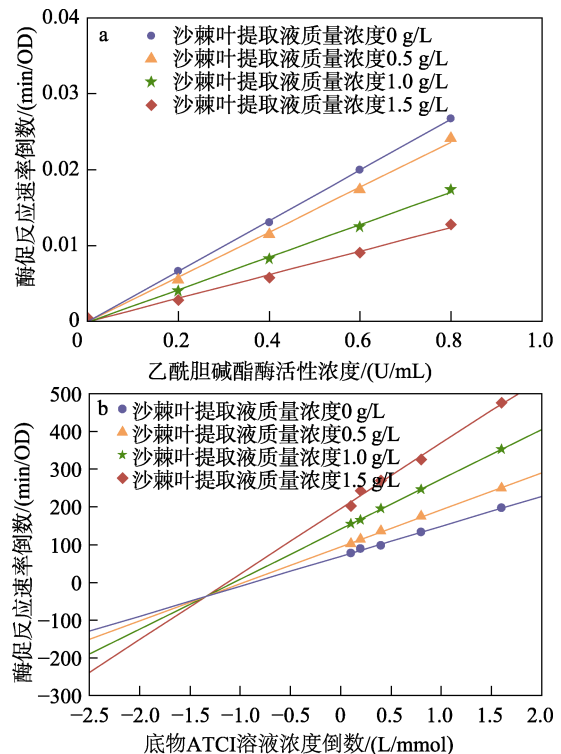


图 3 不同质量浓度沙棘叶提取物作用下乙酰胆碱酯酶的酶促反应速率 (a) 与乙酰胆碱酯酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 模型拟合线 (b)

Fig. 3 Enzymatic reaction rate of acetylcholinesterase under the action of *Hippophae rhamnoides* L. leaves extract with different mass concentrations (a) and Lineweaver-Burk curves of acetylcholinesterase inhibition with *Hippophae rhamnoides* L. leaves extract (b)

2.3 沙棘叶醇提物成分与抗氧化、AChE 抑制能力相关性分析

根据 2.1 与 2.2 节实验结果,发现体积分数为 60%的乙醇水溶液提取的沙棘叶醇提物,对 DPPH·的清除能力、总还原力与 AChE 抑制能力均强于其他 4 种乙醇级分,说明该沙棘叶醇提物具有较好的抗氧化能力与 AChE 抑制能力。因此,选定体积分数为 60%的乙醇水溶液提取的沙棘叶醇提物,进一步考察该提取物中多酚、黄酮和总三萜主要活性成分的含量,并分析 3 种主要活性成分和抗氧化能力、AChE 抑制活性的相关性。

2.3.1 高活性成分的含量

天然植物来源的黄酮类化合物具有较好的生物活性,已被发现在人体中具有抗氧化、抗癌和保护血管等作用^[39],并因其生物特性作为 AD 治疗的潜在候选药物获得关注^[40]。根据芦丁标准曲线计算出沙棘叶醇提物的总黄酮含量为(30.63±2.04) mg/g,高于辛燕花等^[19]使用不同溶剂提取的沙棘叶总黄酮含量(19.84±

0.10) mg/g, 与刘馨雨等^[23]使用超声波微波协同提取法提取的沙棘叶黄酮含量 42.09 mg/g 结果相似。

多酚类物质因具有潜在的促进健康作用的生理活性, 被称为“第七营养素”^[41], 而且天然植物来源的酚类化合物在治疗防治 AD 方面已取得了相关研究进展, 吴良文等^[42]通过实验均已验证。根据没食子酸标准曲线计算出沙棘叶醇提物的总酚含量为(100.41±2.37) mg/g, 与研究者已有的研究结果类似^[8]。

沙棘叶中富含三萜类和甾醇类化合物, 目前科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸是沙棘中研究比较热门且具有代表性的五环三萜酸物质。根据齐墩果酸标

准曲线计算出沙棘叶醇提物的总三萜含量为(23.43±0.97) mg/g, 高于刘伟等^[3]通过 HPLC 检测测定的沙棘叶总三萜含量 2.332 mg/g。

2.3.2 高活性成分与抗氧化、酶抑制能力相关性分析

使用 SPSS 25.0 对 SBLE 含量与抗氧化、酶抑制能力测定结果进行 Pearson 相关性分析。在本研究中, 高活性成分含量和抗氧化、酶抑制数据均为连续变量且成对出现, 服从正态分布, 高活性成分含量与 DPPH·清除能力、总还原力、AChE 抑制能力基本呈线性关系, 符合数据分析的条件^[43], 相关性分析结果如表 2 所示。

表 2 沙棘叶醇提物的主要活性成分与抗氧化、AChE 抑制能力的相关性

Table 2 Correlations of main ingredients of *Hippophae rhamnoides* L. leaves extract with antioxidant and AChE inhibitory activity

项目	总黄酮	总多酚	总三萜	AChE 抑制能力	DPPH·清除能力	总还原力
总黄酮	1.000					
总多酚	0.975**	1.000				
总三萜	0.967**	0.989**	1.000			
AChE 抑制能力	0.965**	0.989**	0.978**	1.000		
DPPH·清除能力	0.850*	0.930**	0.921**	0.957**	1.000	
总还原力	0.875*	0.941**	0.931**	0.937**	0.951**	1.000

注: 表中数据均为相关系数; “*”代表相关性显著 ($P < 0.05$); “**”代表相关性极显著 ($P < 0.01$)。

由表 2 可见, 沙棘叶醇提物的抗氧化、酶抑制活性与功能成分之间存在良好的相关性。AChE 抑制能力与总黄酮、总多酚、总三萜含量均呈极显著正相关性 ($P < 0.01$), 相关系数 (r) 分别为 0.965、0.989、0.978; DPPH·清除能力与总黄酮呈显著正相关 ($P < 0.05$), r 为 0.850; DPPH·清除能力与总多酚、总三萜含量均呈极显著正相关性 ($P < 0.01$), r 分别为 0.930、0.921; 总还原力与总黄酮呈显著正相关性 ($P < 0.05$), r 为 0.875; 总还原力与总多酚、总三萜含量均呈极显著正相关性 ($P < 0.01$), r 分别为 0.941、0.931。抗氧化指标间存在极好的相关性, 总还原力与 AChE 抑制能力、DPPH·清除能力之间均呈极显著正相关性 ($P < 0.01$), r 分别为 0.937、0.951。其活性成分之间也存在极好的相关性, 总三萜与总黄酮、总多酚含量均呈极显著正相关性 ($P < 0.01$), r 分别为 0.967、0.989。此相关性分析结果进一步证明了 SBLE 中 3 种高活性成分含量与酶抑制、抗氧化作用密切相关, SBLE 中起主要抗氧化与酶抑制作用的是多酚类物质, 总黄酮含量与抗氧化能力之间相关性稍弱, 但与酶抑制能力的相关性仍极好。

2.4 基于分子对接技术的沙棘叶醇提物体外 AChE 抑制能力的分析

采用 Auto Dock 将现有研究发现 SBLE 中的黄酮类、酚酸类以及三萜类物质共计 11 种和 AD 治疗药物加兰他敏与 AChE 进行分子模拟对接, 对接结果见表

3。配体物质的对接结合能越低, 对接物构象越稳定, 与蛋白质受体的亲和力越强, 对蛋白质受体可能具有抑制活性, 一般认为最低对接结合能 < -5 kcal/mol, 说明配体能稳定对接受体蛋白^[44]; RMSD < 0.2 nm 时, 说明配体与受体蛋白结合模式较好^[45]。

表 3 沙棘叶醇提物中主要成分与 AChE 对接构象的对接结合能与 RMSD

Table 3 Docking binding energy and RMSD between main ingredients of *Hippophae rhamnoides* L. leaves extract and AChE

序号	化合物	对接结合能/(kcal/mol)	RMSD/Å
1	加兰他敏	-7.92	0
2	儿茶素	-7.36	0.042
3	丁香酸	-5.57	1.308
4	异鼠李素	-6.59	0.001
5	山奈酚	-6.55	0.001
6	槲皮素	-7.00	0.001
7	杨梅素	-5.74	0.065
8	没食子酸	-5.26	0
9	鞣花酸	-7.71	0.001
10	熊果酸	-9.59	0
11	科罗索酸	-9.27	0.001
12	齐墩果酸	-9.51	0.001

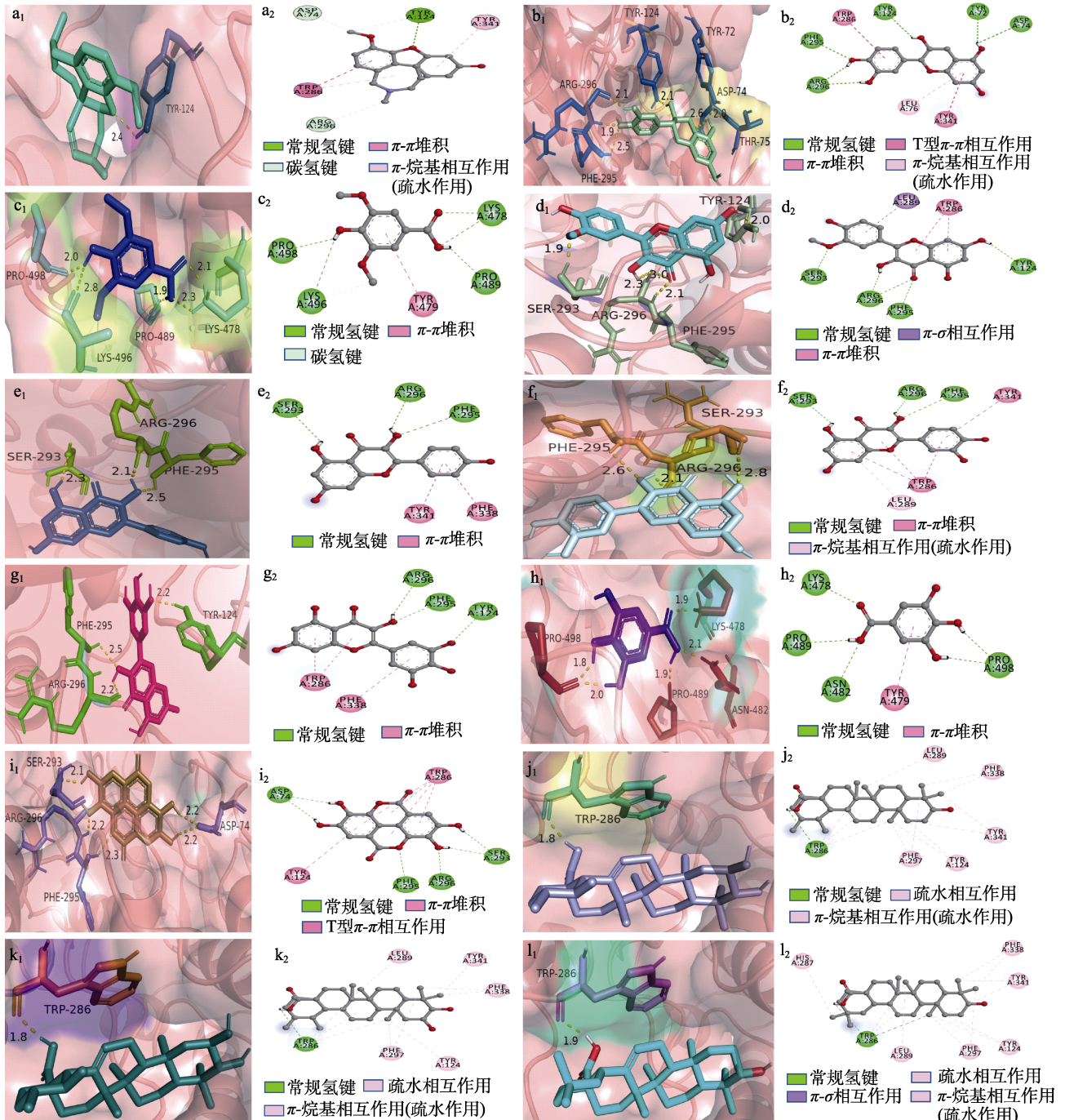
注: 1 Å=0.1 nm。

由表 3 可知, SBLE 中的相关活性物质与 AChE

均有较好的结合模式，主要活性物质结合能在 $-9.59 \sim -5.26$ kcal/mol，并与加兰他敏作对比，说明具有较好的对接稳定性。

进一步将沙棘叶醇提物中主要成分与 AChE 的分子对接最优构象进行可视化分析，结果如图 4 所

示（因为在分子对接过程中，蛋白质受体结构均采用 A 链进行对接，删除了其他侧链结构）。从图 4 可以看出，12 种化合物与 AChE 的结合位点都位于其活性口袋内，被受体的氨基酸残基所包围。



a~l 分别为加兰他敏 (a)、儿茶素 (b)、丁香酸 (c)、异鼠李素 (d)、山奈酚 (e)、槲皮素 (f)、杨梅素 (g)、没食子酸 (h)、鞣花酸 (i)、熊果酸 (j)、科罗素酸 (k)、齐墩果酸 (l) 与 AChE 分子对接；下标 1 为对接位点在活性口袋内的小分子与受体结合的 3D 图（图中键长单位为 Å 且 1 Å=0.1 nm）；下标 2 为配体/受体结合处相互作用的 2D 图

图 4 沙棘叶醇提物中主要成分与 AChE 的分子对接可视化效果图

Fig. 4 Visualization of molecular docking of main ingredients of *Hippophae rhamnoides* L. leaves extract with AChE

以加兰他敏与 AChE 对接结果 (图 4a) 为例进行分析,配体与氨基酸 TYR-124 之间存在一条氢键,

键长为 0.24 nm, 与氨基酸 TRP-286 之间通过 π - π 堆积相互作用, 与氨基酸 TYR-341 之间存在疏水性

相互作用。上述的 11 个化合物均与 AchE 形成了较稳定的复合物, 说明这些沙棘叶醇提物相关活性成分对 AchE 可能具有较好的抑制活性, 这与 2.2 节研究结果中对 AchE 体外抑制活性的测定结果相符。

3 结论

通过测定 5 种不同乙醇级分 SBLE 的 DPPH·、总还原力与 AchE 抑制能力, 说明不同级分醇提 SBLE 均有较好的抗氧化能力与 AchE 抑制能力, 其中以体积分数为 60%乙醇水溶液提取的 SBLE 的 DPPH·清除率、总还原力及 AchE 抑制能力最强, 分别为 85.80%±1.39%, 2.45±0.18, 97.14%±0.81%。结合酶抑制动力学分析, 探究确定了 SBLE 对 AchE 的抑制类型是竞争性大于非竞争性的混合可逆抑制类型。不同乙醇级分提取物的活性存在差异, 证明溶剂极性不同, 提取物构成不同, 从而造成协同后的活性亦不同。

通过对 SBLE 中总多酚、总黄酮和总三萜 3 种活性成分与 DPPH·、总还原力与 AchE 抑制能力作相关性研究, 结果表明, SBLE 中起主要抗氧化与酶抑制作用的是多酚类物质。结合分子对接技术对 SBLE 中的 11 种潜在活性成分与 AchE 进行模拟分子对接, 对接结果表明, SBLE 中的主要物质均表现出了对 AchE 的抑制能力, 进一步理论验证了 SBLE 开发为 AchEI 的潜力。

综上所述, SBLE 具有很强的体外抗氧化能力与 AchE 抑制能力, 这与沙棘叶内含有丰富的酚类物质、黄酮类物质和三萜类物质密不可分, 为沙棘叶开发成天然植物源自由基清除剂和 AchEI 提供基础研究数据, 进一步开发成为有抗氧化、增强记忆力的功能食品、膳食补充剂提供了理论参考。但是本研究仅对 SBLE 对 AchE 的抑制能力进行了初步测定, 还需要通过开展体外模拟消化实验、细胞毒性实验、细胞水平有效性评价实验等进一步探究 SBLE 发挥抗氧化与 AchE 抑制的作用效果。本文为沙棘叶在功能食品、生物医药等领域的应用提供了理论支持和科学依据。

参考文献:

- [1] LIU Y (刘勇), LIAN Y S (廉永善), WANG Y L (王颖莉), *et al.* Review of research and development and significant effect of *Hippophae rhamnoides*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2014, 39(9): 1547-1552.
- [2] YAN C Y (闫昌誉), YU G Y (余桂媛), HE X J (贺晓静), *et al.* Research progress and industrialization application of sea buckthorn leaves[J]. Pharmacy Today (今日药学), 2021, 31(7): 481-492.
- [3] LIU W (刘伟), ZHOU L F (周龙飞), LI H (李会), *et al.* Extraction and determination of triterpene acids in *Hippophae rhamnoides*[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering (生物加工过程), 2023, 21(1): 50-56.
- [4] CIESAROVÁ Z, MURKOVIC M, CEJPEK K, *et al.* Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review[J]. Food Research International, 2020, 133: 109170.
- [5] PUNDIR S, GARG P, DVIWEDI A, *et al.* Ethnomedicinal uses, phytochemistry and dermatological effects of *Hippophae rhamnoides* L.: A review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 266: 113434.
- [6] CAO Q (曹倩), WANG Q L (王齐蕾), WANG X (王泉), *et al.* Preparation and characterization of nanofibers loaded with sea buckthorn oil by electrospinning method[J]. Food Science (食品科学), 2022, 43(9): 48-54.
- [7] YAN C Y (闫昌誉), DING Z J (丁肇俊), LI X M (李晓敏), *et al.* The chemical constituents and hypoglycemic activity of alcoholic extract of sea buckthorn leaves[J]. Acta Pharmaceutica Sinica (药学报), 2023, 58(2): 396-404.
- [8] IRENA S, JANA O, LUKÁŠ S, *et al.* Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times[J]. Food Chemistry, 2020, 310(C): 125784.
- [9] NING Z X (宁志雪), NIU G C (牛广财), ZHU L B (朱立斌), *et al.* Research progress on the active components of sea buckthorn and their physiological functions and utilization[J]. Food & Machinery (食品与机械), 2021, 37(11): 221-227.
- [10] YU Z, DONG W, WU S, *et al.* Identification of ovalbumin-derived peptides as multi-target inhibitors of AchE, BChE, and BAC-E1[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(6): 2648-2655.
- [11] WANG W L (王威丽), SONG C S (宋沧桑). Recent advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease and clinical medication[J]. Chinese Journal of Drug Evaluation (中国药物评价), 2019, 36(3): 204-209.
- [12] WANG W (王微). Study on the improvement effect of *Nymphaea hybrid* extract on learning and memory ability of Alzheimer's disease[D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2019.
- [13] YAN M Z (闫明哲), WANG P (王萍). Inhibition of angiotensin converting enzyme and acetylcholinesterase of fermented red beetroot juice with *Lactobacillus acidophilus*[J]. Modern Food Science and Technology (现代食品科技), 2022, 38(11): 98-110.
- [14] SHARMA P, SRIVASTAVA P, SETH A, *et al.* Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies[J]. Progress in Neurobiology, 2019, 174: 53-89.
- [15] ZHANG T (张涛), CHEN Y H (陈艳红), CHANG G P (常高萍), *et al.* Understanding the mechanism of action of echinenone on Alzheimer's disease from the perspective of acetylcholinesterase and oxidative stress[J]. Food Science (食品科学), 2022, 43(11): 105-112.
- [16] LIN Z L (林紫兰), SHA X M (沙小梅), ZHANG Z B (张志斌), *et al.* *In vitro* antioxidant activities and inhibitory activities of α -glucosidase and acetylcholinesterase in *Rubus parvifolius* L. root extract[J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2021, 47(12): 83-89.
- [17] ZHANG X C (张雪春), LIU J (刘江), WU X (吴鑫), *et al.* Microwave-assisted extraction, *in vitro* antioxidant activity, α -glucosidase inhibition and acetylcholinesterase inhibition of *Duchesnea indica* polyphenols[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences (西南农业学报), 2018, 31(6): 1171-1179.
- [18] LIU Y C (刘英翠). Effect of different extraction methods on total flavonoids content in *Hippophae rhamnoides* L. leaves[J]. Shanxi Forestry Science and Technology (山西林业科技), 2018, 47(3): 21-23.
- [19] XIN Y H (辛燕花), ZHAO S H (赵三虎), WANG Y (王瑜), *et al.* Study on the active substances and antioxidant activity of different solvent extracts of seabuckthorn leaves[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2021, 42(17): 44-49.
- [20] CHEN W, ZHU X, LU Q, *et al.* C-ring cleavage metabolites of catechin and epicatechin enhanced antioxidant activities through intestinal microbiota[J]. Food Research International, 2020, 135: 109271.

- [21] RAN L M (冉丽梅). Study on active components and its product of *Hippophae rhamnoides* L. leaves[D]. Jilin: Jilin Institute of Chemical Technology (吉林化工学院), 2021.
- [22] ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRES V, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7(2): 88-95.
- [23] LIU X Y (刘馨雨), ZHANG H S (张海生), XU M X (许铭芯), *et al.* Ultrasonic-microwave assisted extraction, composition and activity of flavonoids from *Hippophae rhamnoides* L. leaves[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences (核农学报)*, 2022, 36(7): 1381-1390.
- [24] FU Y (傅钰), SHI X (史璇), ZHANG D M (张道明), *et al.* Antioxidant activities in extracts from *Pinus massoniana* needles by deep eutectic solvents[J]. *Journal of Beijing Forestry University (北京林业大学学报)*, 2021, 43(7): 149-158.
- [25] FU Y L (付亚玲), YAO J X (姚俊修), ZHANG R T (张仁堂). Optimization of extraction and antioxidant activities of triterpenic acids from blacked jujube by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2021, 42(12): 176-183.
- [26] SUN Y (孙燕), FENG F (冯峰), HUANG T H (黄特辉), *et al.* Rapid analysis of functional components of *Hippophae rhamnoides* by UPLC-Q-exactive and OTCML database[J]. *Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发)*, 2019, 31(7): 1192-1202.
- [27] WANG N N (王宁宁), ZHENG W H (郑文惠), ZHANG K X (张凯雪), *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of seabuckthorn and prediction of its Q-markers[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志)*, 2021, 46(21): 5522-5532.
- [28] SKALSKI B, KONTEK B, OLAS B, *et al.* Phenolic fraction and nonpolar fraction from sea buckthorn leaves and twigs: Chemical profile and biological activity[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2018, 10(20): 2381-2394.
- [29] LIN X (林欣), LI Y (李杨), ZHAN M (詹森), *et al.* Metabolite composition and anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Camellia oleifera* seed[J]. *Food Science (食品科学)*, 2023, 44(2): 304-311.
- [30] DING L L (丁林玲), XIE Y X (谢颖欣), GAO W (高伟), *et al.* *In vitro* antioxidant activities, α -glucosidase and acetylcholinesterase inhibition ability of *Akebia trifoliata* pulp extracts[J]. *Journal of Southern Agriculture (南方农业学报)*, 2021, 52(4): 1058-1065.
- [31] ZHOU H N (周浩楠), HU N (胡娜), DONG Q (董琦), *et al.* Research progress on the chemical composition and pharmacological action of *Hippophae rhamnoides*[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences (华西药科学杂志)*, 2020, 35(2): 211-217.
- [32] FENG X Y (冯小雨), HAO Y J (郝艳娟), CAI Y (蔡瑜), *et al.* Antioxidant activity of total flavonoids from cucumber seed *in vitro*[J]. *Food Research and Development (食品研究与开发)*, 2018, 39(11): 27-30.
- [33] KNOPMAN D S, AMIEVA H, PETERSEN R C, *et al.* Alzheimer disease[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2021, 7(1): 33.
- [34] WU Y (吴颖), LIU Q (刘晴), TANG W (唐文), *et al.* Application of complexes of *Salvia miltiorrhiza* volatile oil and dandelion extract in cosmetics[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(3): 562-568.
- [35] HUANG X, CHEN Q, WANG Q, *et al.* Inhibition of the activity of mushroom tyrosinase by alkylbenzoic acids[J]. *Food Chemistry*, 2006, 94(1): 1-6.
- [36] CAMILA G K, RÚBIA C G C, DIEGO D S L, *et al.* Potential anti-diabetic properties of Merlot grape pomace extract: An *in vitro*, *in silico* and *in vivo* study of α -amylase and α -glucosidase inhibition[J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109462.
- [37] 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.
- [38] TUNG B T, HAI N T, THU D K. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities *in vitro* of different fraction of *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis extract and attenuation of scopolamine-induced cognitive impairment in mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 198: 24-32.
- [39] KOPUSTINSKIENE D M, JAKSTAS V, SAVICKAS A, *et al.* Flavonoids as anticancer agents[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 457.
- [40] AIROLDI C, LA FERLA B, D'ORAZIO G, *et al.* Flavonoids in the treatment of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2018, 25(27): 3228-3246.
- [41] WANG X (王泉). Extraction and encapsulation of phenolic compounds from sea buckthorn leaves and their application research[D]. Xi'an: Northwest University (西北大学), 2021.
- [42] WU L W (吴良文), ZHANG H (张虎), WU T (吴桐), *et al.* Research progress on the regulation of resveratrol in Alzheimer's disease[J]. *Food Science (食品科学)*, 2023, 44(3): 237-245.
- [43] WANG R F (王荣芳), ZHANG Z Y (张子言), LI D H (李德海). Effects of extraction methods on extraction components and antioxidant activity of *Quercus mongolica* shell[J]. *Journal of Beijing Forestry University (北京林业大学学报)*, 2022, 44(5): 150-160.
- [44] ZHONG H M (钟红梅), CAI K C (蔡开聪). Application of AutoDock software in teaching of biochemistry: Semi-flexible docking[J]. *Chinese Journal of Chemical Education (化学教育: 中英文)*, 2020, 41(6): 86-89.
- [45] WEI J (魏静), WANG Y (王宇), DONG Y (董英), *et al.* Chemical constituents and antioxidant activities of *Citrus reticulata* blanco superior plants fruit peel were analyzed by chromatography-mass spectrometry technology with network pharmacology and molecular docking[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报)*, 2023, 23(4): 305-323.

(上接第 314 页)

- [68] CARA C, SECCI F, LAI S R, *et al.* On the design of mesostructured acidic catalysts for the one-pot dimethyl ether production from CO₂[J]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2022, 62: 102066.
- [69] SALOMONE F, BONURA G, FRUSTERI F, *et al.* Physico-chemical modifications affecting the activity and stability of Cu-based hybrid catalysts during the direct hydrogenation of carbon dioxide into dimethyl-ether[J]. *Materials*, 2022, 15(21): 7774.
- [70] QIN Z Z, ZHOU X H, SU T M, *et al.* Hydrogenation of CO₂ to dimethyl ether on La-, Ce-modified Cu-Fe/HZSM-5 catalysts[J]. *Catalysis Communications*, 2016, 75(C): 78-82.
- [71] BAHRUJI H, RAZAK S A, MAHADI A H, *et al.* PdZn on ZSM-5 nanoparticles for CO₂ hydrogenation to dimethyl ether: Comparative *in situ* analysis with Pd/TiO₂ and PdZn/TiO₂[J]. *Reaction Kinetics Mechanisms and Catalysis*, 2022, 135(6): 2973-2991.
- [72] TAN K B, TIAN P, ZHANG X X, *et al.* Green synthesis of microspherical-confined nano-Pd/In₂O₃ integrated with H-ZSM-5 as bifunctional catalyst for CO₂ hydrogenation into dimethyl ether: A carbonized alginate templating strategy[J]. *Separation and Purification Technology*, 2022, 297: 121559.
- [73] YUE W Z, WAN Z, LI Y H, *et al.* Synthesis of Cu-ZnO-Pt@HZSM-5 catalytic membrane reactor for CO₂ hydrogenation to dimethyl ether[J]. *Journal of Membrane Science*, 2022, 660: 120845.