

活性引导结合高速逆流色谱分离蓝莓活性成分 及其与 α -葡萄糖苷酶的相互作用

杨兆艳¹, 田艳花¹, 王玲丽², 谭佳琪^{3*}

(¹山西药科职业学院食品工程系 太原 030031

²运城学院生命科学系 山西运城 044000

³北京大学前沿交叉研究院 北京 100091)

摘要 基于活性引导结合高速逆流色谱(HSCCC)技术,分离蓝莓中具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的组分。首先,经不同溶剂提取后,活性成分在水中得到富集;其次,通过 HSCCC 分离水提取物,得到 6 种组分,其中 F4 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率显著高于其它几种;再次将 F4 采用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶纯化,得到高纯的组分 I;最后通过紫外光谱、傅里叶红外光谱、高效液相色谱-质谱联用及核磁技术鉴定组分 I 为矢车菊-3-O-葡萄糖苷(C3G),纯度为 95.06%。此外,采用多光谱扫描和分子对接技术对 C3G 与 α -葡萄糖苷酶的相互作用进行表征。研究发现 C3G 与 α -葡萄糖苷酶通过氢键自发结合形成复合物。与 C3G 复合后, α -葡萄糖苷酶的二级结构发生不同程度的变化,其中 α -螺旋和 β -转角降低, β -折叠和不规则卷曲增加。分子对接模拟发现 C3G 与残基 Leu 313、Ser 157、Tyr 158、Phe 314、Arg 315 和 Asp 307 以氢键结合,并与周围 4 个疏水残基存在疏水作用,共同维持复合物结构。本研究结果对开发 2 型糖尿病功能性食品具有重要意义。

关键词 蓝莓; 活性引导; 高速逆流色谱; 矢车菊-3-O-葡萄糖苷; α -葡萄糖苷酶; 相互作用

文章编号 1009-7848(2023)01-0041-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.01.005

天然产物的化学成分非常复杂,传统的分离方法存在操作复杂、耗时长和效率低等问题。因此,提出一种潜在的以活性为导向的分离方法,以提高活性化合物的分离效率^[1]。通过活性引导结合色谱技术对活性化合物进行富集和分离,最终得到高纯度活性化合物,该技术已被成功应用于抗菌香豆素^[2]、抗肿瘤药物^[3]和水溶性抗氧化剂^[4]分离。柱色谱是活性引导中最重要的色谱技术,常用于从天然植物资源中分离各种活性化合物,然而,该技术在分离化合物的过程中,不可逆吸附会造成微量活性化合物丢失^[5]。该现象可以通过液-液萃取来避免,液-液萃取通常被用于粗提物的初步纯化。传统的液-液萃取分离效率低,导致萃取物的组成仍非常复杂,因此需改进以获得目标活性成分。高速逆流色谱(High-speed counter-current chromatography, HSCCC)作为一种不需要任何固体相作为载体的连续液-液萃取方法,被广泛用于从粗提取物中制备活性化合物^[6-7]。HSCCC 可以避免

样品在固相上的不可逆吸附。与传统色谱法相比, HSCCC 可以提高样品的载样能力,便于活性物质的大规模制备。采用 HSCCC 分离后,目标组分中的杂质大幅减少,有效成分的分离成功率显著提高。

蓝莓(*Vaccinium* spp.)属杜鹃花科越橘属,广泛种植于世界各地,尤其在在我国东北地区种植面积较广。蓝莓中富含花色苷、酚酸、超氧化物歧化酶和各种维生素等活性成分^[8]。大量研究表明蓝莓中活性化合物具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎和抗衰老等功效^[9]。此外,蓝莓中的一些化合物可以改善血糖和血压水平^[10]。 α -葡萄糖苷酶作为一种水解酶,具有水解和转糖苷的双重功能。它被广泛应用于乙醇发酵、低聚糖生产、淀粉水解、食品成分分析和代谢机理研究等方面^[11]。 α -葡萄糖苷酶通过加水切割寡糖/多糖中的 α -1,4-糖苷键,产生游离的 α -D-葡萄糖,易被肠细胞从血液中吸收,导致餐后血糖水平升高^[12]。而控制餐后血糖水平是治疗或预防 2 型糖尿病的关键。目前 α -葡萄糖苷酶被用作治疗 2 型糖尿病的靶点酶,临床药物一般通过抑制其活性来治疗 2 型糖尿病^[13]。虽然这些药物在临床上有效,但是长期使用耐药性增强,同时

收稿日期: 2022-01-29

基金项目: 山西省高等学校科技创新项目(2019L1012)

第一作者: 杨兆艳,女,硕士,副教授

通信作者: 谭佳琪 E-mail: tanjq0909@163.com

会产生不良反应。天然活性化合物被作为潜在的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,可以避免上述问题。目前,有研究表明,酚酸和黄酮类化合物对 α -葡萄糖苷酶具有较好的抑制作用^[14-15],而蓝莓中具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的成分及与酶的相互作用尚未阐明。

鉴于此,本研究建立活性引导结合 HSCCC 分离蓝莓中具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的组分,并通过紫外光谱、傅立叶红外光谱、高效液相色谱-质谱联用及核磁技术鉴定其结构;采用荧光光谱、圆二色谱和分子对接技术研究活性组分与 α -葡萄糖苷酶的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜矮丛蓝莓购于小兴安岭地区,经除杂清洗后,自然晾干。利用九阳破壁机将其打浆,果浆首先置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冷 12 h,预冷结束后将其置于真空冷冻干燥机中,连续干燥 72 h,然后采用植物粉碎机将其粉碎,过 40 目筛,制得蓝莓果粉,将其避光保存在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

α -葡萄糖苷酶(50 U/mg, 68.5 ku, 酿酒酵母),上海联硕生物科技有限公司;对硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside, PNPG),上海吉至生化科技有限公司;对硝基苯酚(*P*-nitrophenol, PNP),泰州苏泽化工材料有限公司;甲基叔丁基醚(Methyl tert-butyl ether, MTBE),上海金锦乐实业有限公司;正丁烷(1-butane, 1-BU),上海脉铂医药科技有限公司;乙腈(Acetonitrile, ACN),上海升德医药科技有限公司;三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA),南京草本源生物科技有限公司;Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶,北京绿百草科技发展有限公司;甲醇、乙醇和甲酸(分析纯级),湖北惠择普医药科技有限公司。

1.2 仪器与设备

LC-40 高效液相色谱,广东晟泽科技有限公司;LCMS-8080 日本岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪,日本岛津公司;HSCCC-TBE1000A 高速逆流色谱,深圳同田生化技术有限公司;LANY-I-650CT 超声波提取仪,上海兰仪实业有限公司;3-18KS 高速离心机,北京博迈星仪器有限公司;

SHZ-D 台式循环水多用真空泵,河南金博仪器制造有限公司;Advance 400MHz 核磁共振谱仪,德国布鲁克公司;752N 紫外可见分光光度计,济南好来宝医疗器材有限公司;PHSJ-3F 高精度台式数显 pH 酸度计,上海力辰仪器科技有限公司;RGF-6300 原子荧光分光光度计,杭州俊升科学器材有限公司;DSM 20 CD 圆二色光谱仪,韶赫国际贸易(上海)有限公司;DJ10R-K6 九阳豆浆机,山东九阳股份有限公司;124-1CN 分析天平,爱来宝(济南)医疗科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品提取物制备 在预试验的基础上,采用超声辅助提取蓝莓中具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的成分,利用 60%乙醇作为提取溶剂。称取 1 000 g 蓝莓粉末,按照料液比 1:3 g/mL 加入 60%乙醇,将其充分混合后,置于超声提取设备中,设定超声功率 350 W,提取温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,提取时间 25 min,待提取结束后,将提取液通过高速离心机离心(7 000 r/min, 15 min),过滤收集滤液。残渣采用同样的方式提取 3 次,合并滤液。滤液先通过 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发仪除去大部分溶剂,后置于真空冷冻干燥机中将其冻干,得到蓝莓粗提物样品(43.18 g)。蓝莓粗提物样品经水复溶后,再依次通过 500 mL 石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,将每种溶剂得到的提取液进行浓缩干燥后,分别得到 0.69 g 石油醚提取物(样品 1)、2.84 g 乙酸乙酯提取物(样品 2)、7.03 g 正丁醇提取物(样品 3)和 18.47 g 水提取物(样品 4)。

1.3.2 HSCCC 分离 参考薛宏坤等^[16]的方法,选择 1-BU-MTBE-ACN-水-TFA (2:2:1:5:0.01, V/V)作为 HSCCC 溶剂体系,设定上相作为固定相,下相作为流动相。依据 α -葡萄糖苷酶抑制活性试验发现,样品 4 对 α -葡萄糖苷酶抑制效果明显优于其它样品。因此,选择样品 4 进一步分析。分别称取 0.20 g 样品 4,溶于 20 mL 上相和 20 mL 下相,待两相平衡后,将上、下相分离,并利用超声脱气 30 min。样品在分离前,设定温度和固定相流速分别为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 15 mL/min,直到固定相充满整个螺线管后,打开主机,设定转速 850 r/min,待转速恒定后,将流动相以 2 mL/min 流速泵入进行分离,在波长 254 nm 处检测,根据 HPLC 对应的出

峰时间进行分步收集组分,并对其浓缩干燥,然后避光保存于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.3.3 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶分离 采用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶进一步纯化,经 HSCCC 分离获得具有最高 α -葡萄糖苷酶抑制活性组分(F4)。称取 20 g Sephadex LH-20 凝胶,加 200 mL 蒸馏水充分饱和,转移至洗脱柱(30 cm \times 2.5 cm)中,并用体积分数 45%丙酮洗脱。称取 1.0 mg F4,用蒸馏水溶解,采用 0.22 μm 微孔膜对样品溶液过滤,然后将其转移至凝胶床上,待组分完全渗透到凝胶床后,采用体积分数 50%甲醇溶液洗脱色谱柱,收集洗脱液,并将其浓缩干燥后,即可获得高纯度的 α -葡萄糖苷酶抑制活性组分(组分 I)。

1.3.4 组分 I 鉴定

1.3.4.1 紫外扫描 将组分 I 配制成 0.1 mg/mL 样品溶液,然后在波长 200~700 nm 范围内扫描,分析组分 I 的紫外光谱特征。

1.3.4.2 傅里叶红外光谱扫描 称取 2.0 mg 组分 I,按照 1:100(g/g)加入 KBr 粉末,共同研磨压片,然后对其在波长 400~4 000 cm^{-1} 范围内进行光谱扫描,分析组分 I 的红外光谱特征。

1.3.4.3 HPLC 分析 样品处理:分别称取 1.0 mg 样品 4、F4 和组分 I 于试管中,加入 0.1% HCl -甲醇溶液,配制成 0.1 mg/mL 溶液,利用 0.45 μm 滤膜对溶液进行过滤,用于 HPLC 分析。

色谱条件:岛津-228 C_{18} 柱(6.0 mm \times 150 mm,5.0 μm);选择体积分数 20%甲酸作为流动相 A,体积分数 60%乙腈作为流动相 B。洗脱程序:5%~20%B,10 min;20%~25%B,5 min;25%~30%B,10 min;30%~33%B,5 min;33%~5%B,15 min。柱温、进样量和检测波长分别设为 25 $^{\circ}\text{C}$,20 μL ,520 nm。依据公式(1)计算样品组分的纯度。

$$p_i(\%) = \frac{\lambda_i A_i}{\sum \lambda_i A_i} \times 100 \quad (1)$$

式中, P_i ——待测样品(i)峰面积百分数; λ_i ——校正因子; A_i ——待测样品(i)峰面积。

1.3.4.4 HPLC-MS 分析 质谱条件:质谱采用正离子扫描方式对样品进行扫描,扫描范围 100~1 000 m/z ,同时分别设定雾化器压力、干燥气温度

和毛细管电压分别为 138 kPa,335 $^{\circ}\text{C}$,4.5 kV。

1.3.4.5 NMR 鉴定 样品处理:称取 5.0 mg 组分 I,加入氘代甲醇将其溶解,配制成 0.1 mg/mL 的溶液,利用 0.45 μm 滤膜对其过滤,用于 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 分析。

1.3.5 α -葡萄糖苷酶抑制试验 α -葡萄糖苷酶能水解 PNPG 生成黄色的 PNP,PNP 在波长 405 nm 处有最大吸收峰。参考文献[17]的方法,分别取 1 mL α -葡萄糖苷酶(0.2 $\mu\text{mol/L}$)置于试管中,分别加入 1 mL 质量浓度为 10,20,40,80,160 $\mu\text{g/mL}$ 样品溶液(样品 1~4 和 HSCCC 分离获得的组分)和 1 mL 组分 I(矢车菊-3- O -葡萄糖苷,Cyanidin-3- O -glucoside,C3G)(10,20,40,80,160 $\mu\text{mol/L}$),并将其充分混合,其余操作参考文献[17]的方法。依据式(2)计算样品对 α -葡萄糖苷酶抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.6 荧光光谱测定 参照 Zeng 等^[18]的方法,将 1 mL 不同浓度 C3G(10,20,40,80,160 $\mu\text{mol/L}$)分别与 4 mL α -葡萄糖苷酶液(0.2 U/mL)均匀混合,分别在 25,30,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 10 min,然后对其进行荧光光谱扫描,设定扫描波长范围为 320~380 nm,激发波长为 295 nm,发射和激发的狭缝宽度均为 10 nm。

1.3.7 圆二色谱 采用圆二色谱仪测定 C3G 对 α -葡萄糖苷酶二级结构的影响。样品分别为 α -葡萄糖苷酶(20 $\mu\text{mol/L}$)和 α -葡萄糖苷酶(20 $\mu\text{mol/L}$)+C3G(40 $\mu\text{mol/L}$)。圆二色谱设置条件为:扫描速率 60 nm/min,光谱分辨率 1 nm,响应 1 s,带宽 1 nm。测定样品在 200~250 nm 下的远紫外吸收,计算 α -葡萄糖苷酶二级结构中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲的变化。

1.3.8 分子对接模拟 采用 AutoDock4.2 软件进行分子对接模拟。C3G(CID:132989527)的分子结构来自 PubChem 分子库,用于配体对接。晶体结构 α -葡萄糖苷酶(PDB ID:3A47)可在 RSCB 蛋白质数据库中获得(<https://www.rcsb.org/>)在对接过程中被用作受体。利用 Lamarck 遗传算法计算配体和大分子可能的构象。根据计算结果中以结合能最小为原则,得到最优对接结果,并进一步分析。

2 结果与分析

2.1 α -葡萄糖苷酶抑制效果

本研究以 α -葡萄糖苷酶抑制活性为导向,进行提取分离,筛选出具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的蓝莓组分。蓝莓粗提物样品对 α -葡萄糖苷酶抑制效果如图1a所示。由图1a可知,当蓝莓粗提物样品质量浓度在10~160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, α -葡萄糖苷酶抑制率随蓝莓粗提物样品质量浓度增加而显著增加($P<0.05$),且呈浓度依赖性。当蓝莓粗提物样品质量浓度为160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, α -葡萄糖苷酶抑制率高达 $72.82\%\pm 1.64\%$ 。结果表明,蓝莓粗提物样品中含有具有 α -葡萄糖苷酶抑制作用的活性成分。为使活性成分被分段和富集,本研究将蓝莓粗提物样品依次通过石油醚、乙酸乙酯和正丁醇

萃取,分别得到不同提取物,提取物在最大质量浓度(160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)条件下对 α -葡萄糖苷酶抑制效果如图1b所示。由图1b可知,样品1~4对 α -葡萄糖苷酶抑制效果存在显著差异($P<0.05$)。样品1和样品2能促进 α -葡萄糖苷酶发挥作用。其原因可能是由于石油醚提取物和乙酸乙酯提取物中的活性成分促进 α -葡萄糖苷酶活性位点的释放,有利于酶发挥作用。样品3和样品4均能有效抑制 α -葡萄糖苷酶活性,而样品4对 α -葡萄糖苷酶抑制效果明显优于样品3($P<0.05$)。因此,选择样品4作为下一步的研究对象,利用活性引导结合HSCCC分离纯化样品4中具有 α -葡萄糖苷酶抑制效果的活性成分。

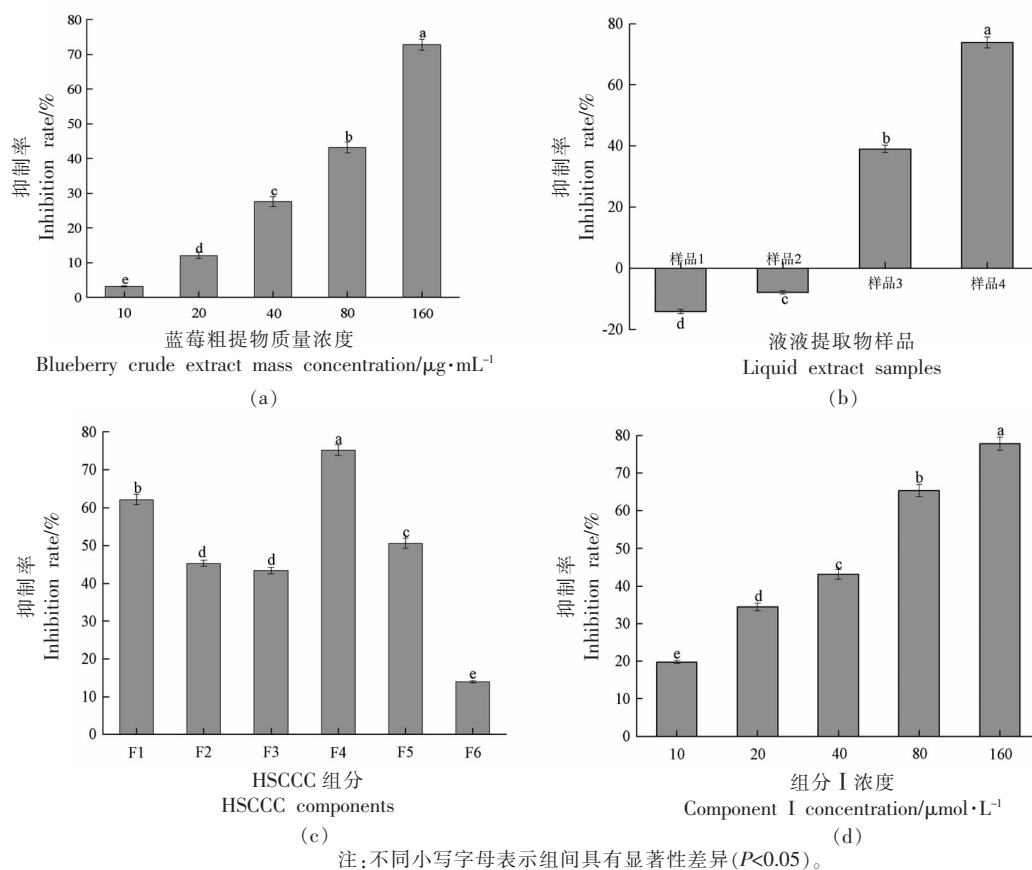


图1 蓝莓粗提取物(a)、液-液提取物(b)、HSCCC组分(c)和组分I(d)对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.1 Effect of blueberry crude extract (a), liquid-liquid extract (b), HSCCC component (c) and component I (d) on the inhibition rate of α -glucosidase

2.2 HSCCC组分及其对 α -葡萄糖苷酶抑制效果

选取1-BU:MTBE:ACN:水:TFA=2:2:1:5:

0.01(V/V)作为HSCCC溶剂体系,用于分离样品4,其结果如图2所示。由图2可知,样品4经

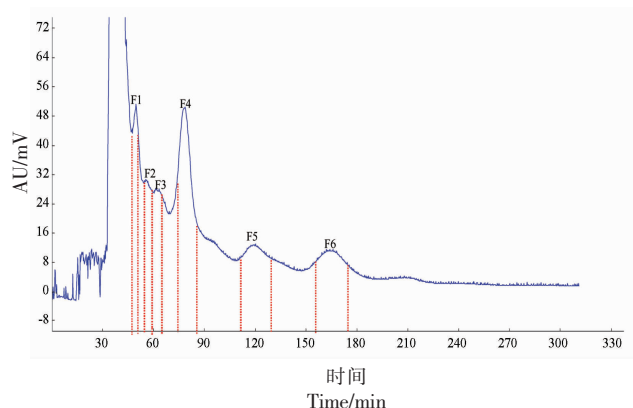


图 2 HSCCC 分离样品 4 活性成分的色谱图

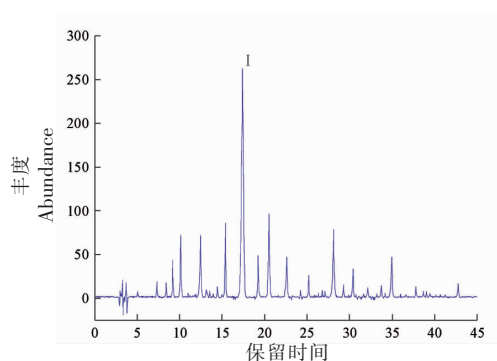
Fig.2 Chromatogram of active components in sample 4 separated by HSCCC

HSCCC 分离后得到 6 种组分,分别命名为 F1、F2、F3、F4、F5 和 F6,此时固定相保留率为 68.52%。固定 F1、F2、F3、F4、F5 和 F6 质量浓度为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$,测定其对 α -葡萄糖苷酶的抑制率,结果如图 1C 所示。由图 1c 可知,F4 对 α -葡萄糖苷酶抑制率显著高于其它组分 ($P < 0.05$)。因此,选择 F4 进一步分析其组成。

2.3 组分结构鉴定

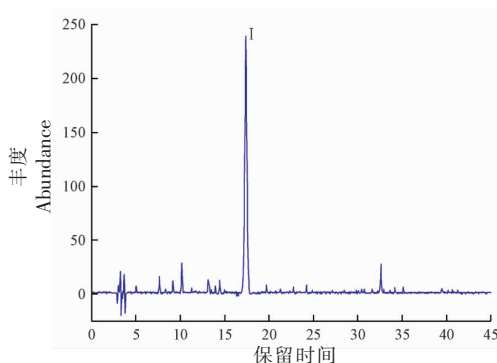
2.3.1 HPLC 分析 采用 HPLC 对样品 4 和 F4 进一步采用 HPLC 分析,其结果如图 3 所示。由图 3a~3b 可知,样品 4 和 F4 均有多个峰。说明样品 4 和 F4 是混合物,含有多种组分,含量最高的组分被记为组分 I。采用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶进一步纯化 F4,获得高纯度的组分 I。组分 I 的 HPLC 图见图 3c,由图 3c 可知,组分 I 仅有 1 个单峰。结果表明,组分 I 为单一高纯度化合物,依据式(1)计算组分 I 的纯度为 95.06%。

2.3.2 紫外和傅里叶红外光谱分析 为了鉴定组分 I 的结构,首先利用紫外光谱对组分 I 进行扫描,其结果如图 4a 所示。由图 4a 可知,组分 I 在 278 nm 和 519 nm 波长处具有特征吸收峰,说明组分 I 属于花色苷类物质。随后进一步对组分 I 采用傅里叶红外光谱扫描,其结果如图 4b 所示。由图 4b 可知,3 372 cm^{-1} 和 2 927 cm^{-1} 波长处对应的吸收峰分别是由 O-H 和 C-H 伸缩振动引起^[19]。1 631 cm^{-1} 波长处对应的吸收峰可能与 C=C 剪切振动有关。此外,1 497 cm^{-1} 和 1 116 cm^{-1} 之间的红外波段作为“指纹”区域,该区域是由 C-O、C-C、



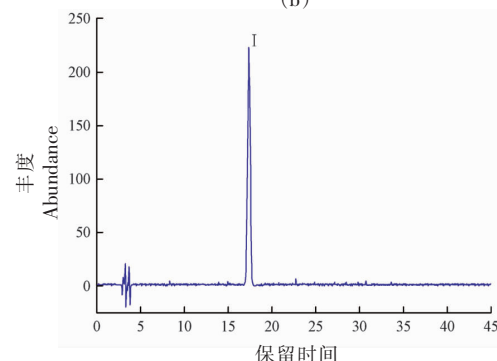
Retention time/min

(a)



Retention time/min

(b)



Retention time/min

(c)

图 3 样品 4(a)、F4(b)和组分 I (c)的 HPLC 色谱图
Fig.3 HPLC chromatogram of sample 4 (a), F4 (b) and component I (c)

C-H 伸缩振动引起,为有机化合物提供大量信息^[20]。Molaeafard 等^[21]和 Ma 等^[22]同样利用傅里叶红外光谱分析樱桃和黑米中花色苷的官能团。**2.3.3 HPLC-MS 和 NMR 分析** 为进一步鉴定组分 I 的结构,利用 HPLC-MS、NMR 和参考文献共同确定组分 I 的结构。组分 I 的一级质谱和二级质谱分别如图 5a~5b 所示。组分 I 分子离子峰 $[M]^+$ 为 m/z 449.2,在质谱中,检测到碎片离子为 m/z 287.1。 m/z 287 属于矢车菊素的特征离子,丢失的

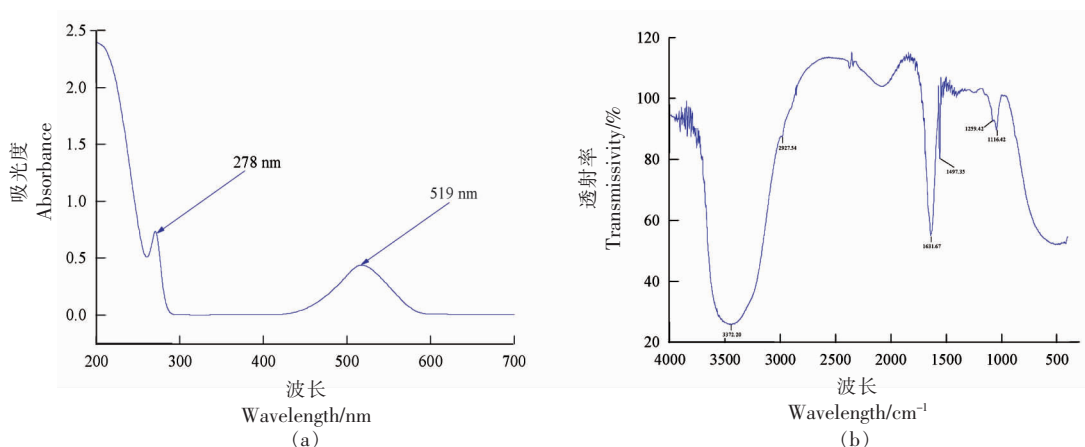


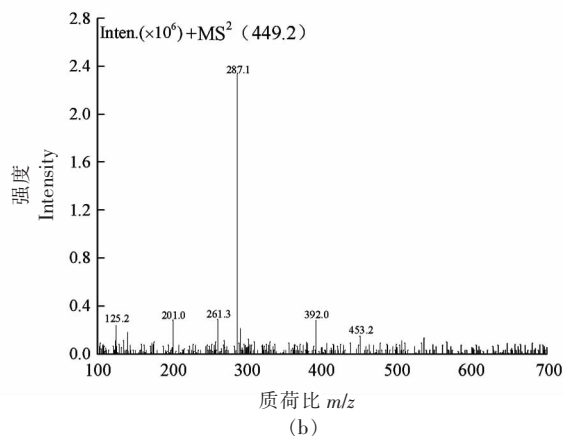
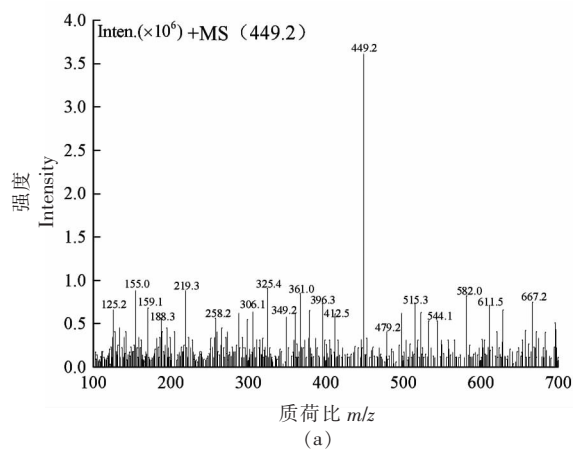
图4 组分 I 的紫外 (a) 和傅里叶红外光谱 (b)

Fig.4 UV (a) and FTIR spectra (b) of component I

碎片 m/z 162, 可能是失去半乳糖和葡萄糖, 同时检测到组分 I 最大吸收波长为 516 nm, 参考相关文献报道^[16], 初步判断组分 I 为矢车菊-3-O-葡萄糖苷。随后对组分 I 进行 NMR 检测, 数据如下: ^1H NMR ($\text{CF}_3\text{COOD}-\text{CD}_3\text{OD}$): δ 6.64 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-6), δ 6.86 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-8), 8.22 (1H, dd, $J=8.8, 2.2$ Hz, H-6O), 8.02 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 7.04 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5'), 8.98 (1H, s, H-4); 5.31 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1 glc), 3.69 (1H, m, H-2 glc), 3.56 (2H, m, H-3, 5 glc), 3.46 (1H, m, H-4 glc), 3.73 (1H, dd, $J=12.2, 5.6$ Hz, H-6b glc), 3.96 (1H, dd, $J=12.2, 2.2$ Hz, H-6a glc); ^{13}C NMR ($\text{CF}_3\text{COOD}-\text{CD}_3\text{OD}$): δ 164.5 (C-2), 145.8 (C-3), 137.2 (C-4), 159.6 (C-5), 103.7 (C-6), 170.8 (C-7), 95.4 (C-8), 157.9 (C-9), 113.6 (C-10), 121.5 (C-1'),

118.7 (C-2'), 147.6 (C-3'), 156.0 (C-4'), 117.7 (C-5'), 128.4 (C-6'), 104.1 (C-1 glc), 75.0 (C-2 glc), 78.3 (C-3 glc), 71.3 (C-4 glc), 79.0 (C-5 glc), 62.6 (C-6 glc)。组分 I ^1H 和 ^{13}C 谱图如图 5c~5d 所示。该研究结果与 Lee 等^[23] 鉴定鹅掌楸果实中矢车菊-3-O-葡萄糖苷的 NMR 信息一致。故最终确定组分 I 为矢车菊-3-O-葡萄糖苷 (Cyanidin-3-O-glucoside, C3G)。

组分 I (C3G) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率结果如图 1d 所示。由图 1d 可知, 随组分 I 浓度增加 α -葡萄糖苷酶抑制率显著增加 ($P<0.05$), 呈浓度依赖性。对上述数据进行非线性拟合可得组分 I 对 α -葡萄糖苷酶抑制率的 IC_{50} 值为 (47.52 ± 0.85) $\mu\text{mol/L}$ 。因此, 选取组分 I (C3G) 进一步探究其与 α -葡萄糖苷酶的相互作用。



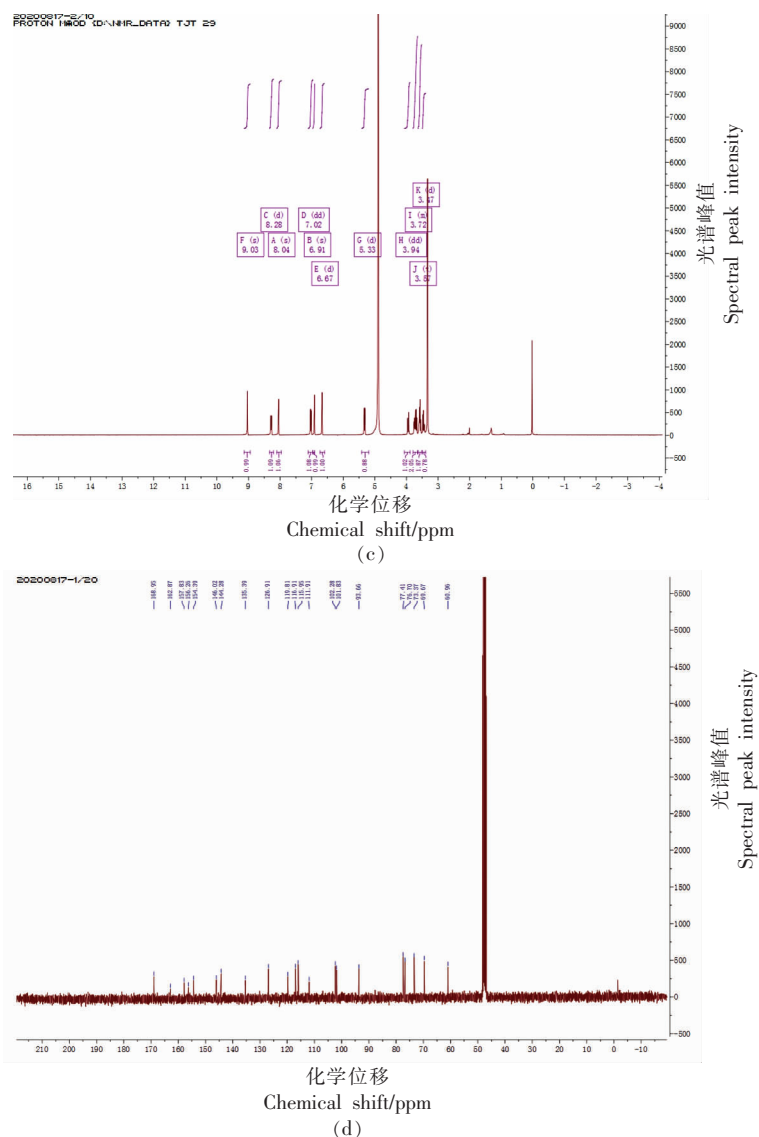


图 5 组分 I 一级质谱(a)、二级质谱(b)、¹H(c)和 ¹³C(d)谱图

Fig.5 primary mass spectrometry (a), secondary mass spectrometry (b), ¹H (c) and ¹³C spectra (d) of component I

2.4 荧光光谱分析

不同浓度 C3G (0~160 $\mu\text{mol/L}$) 对 α -葡萄糖苷酶荧光光谱影响结果如图 6a~6c 所示。由图 6a~6c 可知, 在 3 个温度 (25, 30, 37 $^{\circ}\text{C}$) 下, α -葡萄糖苷酶的荧光强度随 C3G 浓度增加而逐渐减弱。温度和 C3G 浓度越高, α -葡萄糖苷酶的荧光强度减弱越显著。结果表明, α -葡萄糖苷酶的荧光强度受 C3G 浓度和温度依赖性猝灭的影响^[18]。此外, 在 C3G 作用下, α -葡萄糖苷酶的最大吸收峰 (339 nm) 没有发生移动。表明 C3G 可能与 α -葡萄糖苷酶形成复合物, 改变了 α -葡萄糖苷酶中色氨酸的微环境, 猝灭 α -葡萄糖苷酶内荧光^[12]。戴涛涛^[24]研

究发现多酚类物质 (原花青素 B2 和茶多酚) 能与 α -葡萄糖苷酶结合猝灭 α -葡萄糖苷酶内荧光。

2.4.1 荧光猝灭机制及结合常数 荧光光谱法是探究小分子物质与酶相互作用中最常用的一种方法, 其原理是基于小分子活性成分与酶发生相互作用进而引起酶内源性荧光发生变化, 并通过数据分析获得小分子活性成分与酶的结合常数和结合位点数等参数信息^[17]。采用 Stern-Volmer 方程分析不同温度下 (25, 30, 37 $^{\circ}\text{C}$) 荧光数据, 得到相关的参数, 如表 1 所示。

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (3)$$

式中, F_0 和 F ——分别为在没有猝灭剂和有

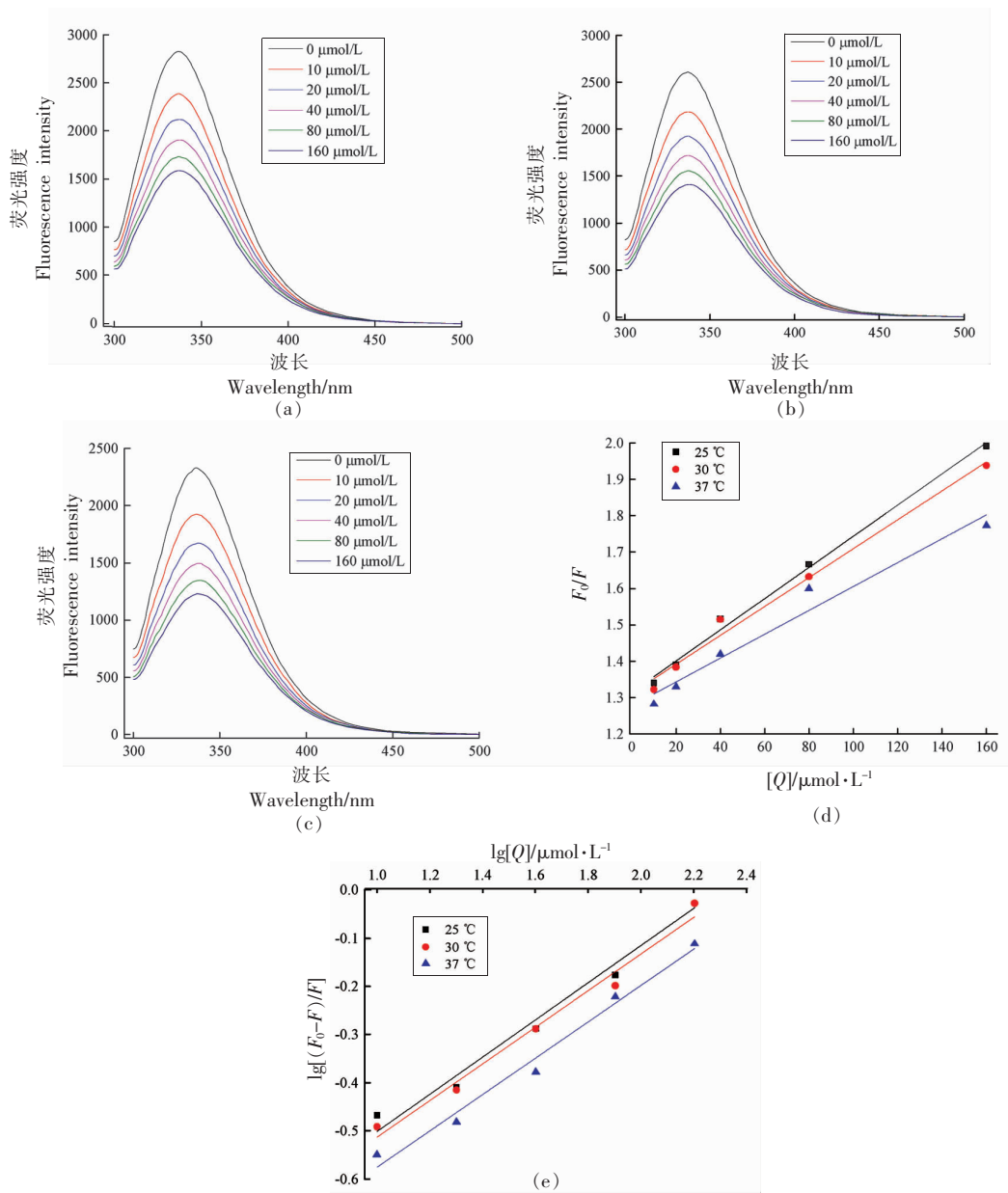


图6 C3G在25 °C(a)、30 °C(b)和37 °C(c)时对 α -葡萄糖苷酶荧光光谱的影响;C3G对 α -葡萄糖苷酶荧光猝灭的Stern-Volmer曲线(d); C3G对 α -葡萄糖苷酶荧光猝灭修正的Stern-Volmer图(e)

Fig.6 The effect of C3G on the fluorescence spectrum of α -glucosidase at 25 °C (a), 30 °C (b) and 37 °C (c); Stern-Volmer curve of fluorescence quenching of α -glucosidase by C3G(d); Modified Stern-Volmer diagram of C3G on the fluorescence quenching of α -glucosidase (e)

猝灭剂下反应体系荧光强度 (au); K_q 和 K_{sv} 分别为 α -葡萄糖苷酶猝灭速率和 Stern-Volmer 猝灭常数; τ_0 在没有猝灭剂下荧光分子寿命 (s)。

由图 6d 可知, 在 3 个温度下 (25, 30, 37 °C), Stern-Volmer 方程线性拟合较好, 拟合 R^2 均在 0.95 以上。结果表明, α -葡萄糖苷酶荧光猝灭为动

态猝灭或静态猝灭, 相关的拟合参数如表 1 所示。由表 1 可知, 在温度为 25, 30, 37 °C 下, K_{sv} 分别为 $(4.26 \pm 0.04) \times 10^3$, $(3.95 \pm 0.02) \times 10^3$, $(3.27 \pm 0.03) \times 10^3$ L/mol。随温度升高 K_{sv} 降低, 表明 α -葡萄糖苷酶荧光猝灭过程为静态猝灭。此外, α -葡萄糖苷酶最小荧光猝灭速率为 $(3.27 \pm 0.03) \times 10^{11}$ L/(mol·s),

表 1 不同温度下 C3G 与 α -葡萄糖苷酶的猝灭和结合常数Table 1 The values of quenching and binding parameters for C3G binding with α -glucosidase at different temperatures

温度/°C	$K_s/10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$K_q/10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$K_d/10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$	n	R^2
25	4.26 ± 0.04	4.26 ± 0.04	1.30 ± 0.01	0.89	0.9965
30	3.95 ± 0.02	3.95 ± 0.02	1.27 ± 0.03	0.92	0.9871
37	3.27 ± 0.03	3.27 ± 0.03	1.11 ± 0.02	0.95	0.9558

该值远大于最大动态荧光猝灭常数 $2 \times 10^{10} \text{ L} / (\text{mol} \cdot \text{s})$ 。进一步表明 α -葡萄糖苷酶荧光猝灭过程属于静态猝灭。在静态猝灭过程中,采用双对数方程计算 C3G 与 α -葡萄糖苷酶之间的结合常数 (K_a)和结合位点数 (n)。

$$\lg[(F_0-F)/F]=\lg K_a+n\lg[Q] \quad (4)$$

由图 6e 可知,在 3 个温度下 (25, 30, 37 °C), 双对数方程线性拟合较好, 拟合 R^2 均在 0.95 以上, 回归计算所得结合常数 (K_a)和结合位点数 (n) 可信度较高, 相关数据如表 1 所示。由表 1 可知, 在温度为 25, 30, 37 °C 下, K_a 分别为 $(1.30 \pm 0.01) \times 10^5$, $(1.27 \pm 0.03) \times 10^5$, $(1.11 \pm 0.02) \times 10^5 \text{ L/mol}$ 。随温度升高 K_a 降低, 说明 C3G 与 α -葡萄糖苷酶复合物的形成是个温和的过程。在温度为 25, 30, 37 °C 下, 结合位点数 (n) 在 1 附近, 表示 C3G 与 α -葡萄糖苷酶有一个活性部位结合。

2.4.2 热力学参数 采用荧光数据计算热力学参数被用于确定 C3G 与 α -葡萄糖苷酶之间的相互作用。小分子与蛋白相互作用力主要有氢键、疏水相互作用、静电相互作用和范德华力等作用力。相关研究已经证实^[25]: ①当 $\Delta S < 0$ 、 $\Delta H < 0$, 小分子和蛋白主要相互作用力为氢键; ②当 $\Delta S > 0$ 、 $\Delta H > 0$, 小分子和蛋白主要相互作用力为疏水相互作用; ③当 $\Delta S > 0$ 、 $\Delta H < 0$, 小分子和蛋白主要相互作用力为静电相互作用。采用 Van't Hoff 方程计算 C3G 与 α -葡萄糖苷酶结合过程中的 ΔS 、 ΔH 和 ΔG , 其结果如表 2 所示。

$$\ln K_a = \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

式中, ΔS ——熵变 ($\text{kJ/mol} \cdot \text{K}$); ΔH ——焓变 (kJ/mol); ΔG ——吉布斯自由能变 (kJ/mol); R ——理想气体状态常数 ($\text{J/mol} \cdot \text{K}$)。

由表 2 可知, ΔS ($\text{kJ/mol} \cdot \text{K}$) 和 ΔH (kJ/mol) 分

表 2 不同温度下 C3G 与 α -葡萄糖苷酶的热力学常数Table 2 Thermodynamic constants of C3G and α -glucosidase at different temperatures

温度/°C	$\Delta H/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	$\Delta G/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
25			-3.42 ± 0.03
30	-32.61 ± 0.58	-0.096 ± 0.004	-2.47 ± 0.04
37			-1.45 ± 0.02

别为 $(-0.096 \pm 0.004) \text{ kJ/mol} \cdot \text{K}$ 和 $(-32.61 \pm 0.58) \text{ kJ/mol}$, ΔS 和 ΔH 均为负值。表明 C3G 与 α -葡萄糖苷酶主要相互作用力为氢键。在 25, 30, 37 °C 下, ΔG 分别为 (-3.42 ± 0.03) , (-2.47 ± 0.04) , $(-1.45 \pm 0.02) \text{ kJ/mol}$ 。不同温度下 ΔG 为负值。说明 C3G 与 α -葡萄糖苷酶的结合是自发进行的。

2.5 圆二色谱分析

采用圆二色谱仪测定 C3G 对 α -葡萄糖苷酶二级结构 (α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲) 的变化影响, 其结果如图 7 和表 3 所示。

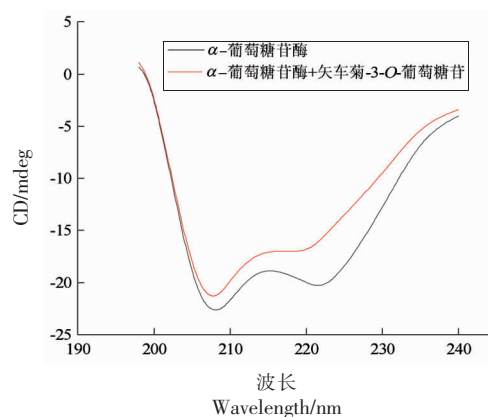


图 7 C3G 对 α -葡萄糖苷酶二级结构及含量的变化
Fig.7 Changes of secondary structure and content of α -glucosidase by C3G

由图7可知,当 α -葡萄糖苷酶与C3G作用后, α -葡萄糖苷酶负的椭圆峰上升,结果表明C3G的确影响了 α -葡萄糖苷酶的二级结构。图7显示 α -葡萄糖苷酶在209 nm和221 nm波长处出现2个负的椭圆峰,这个椭圆峰是 α -螺旋结构特征。由表3可知, α -葡萄糖苷酶二级结构中的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲分别为22.6% \pm 0.3%,23.4% \pm 0.1%,24.2% \pm 0.4%,32.3% \pm 0.3%,当加入C3G后,此时 α -葡萄糖苷酶二级结构中的

α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲分别为19.5% \pm 0.3%,26.2% \pm 0.3%,20.5% \pm 0.5%,35.0% \pm 0.4%。结果表明加入C3G后, α -葡萄糖苷酶二级结构中 α -螺旋和 β -转角显著降低($P<0.05$), β -折叠和无规则卷曲显著增加($P<0.05$)。该现象可能是由于C3G与 α -葡萄糖苷酶的结合促进了蛋白质多肽链的去折叠,破坏了 α -葡萄糖苷酶的氢键网络结构,进而导致 α -葡萄糖苷酶构象发生改变^[26]。

表3 C3G对 α -葡萄糖苷酶二级结构及含量的影响

Table 3 Effect of C3G on the secondary structure and content of α -glucosidase

样品	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
α -葡萄糖苷酶	22.6 \pm 0.3 ^a	23.4 \pm 0.1 ^a	24.2 \pm 0.4 ^a	32.3 \pm 0.3 ^b
α -葡萄糖苷酶-C3G	19.5 \pm 0.2 ^b	26.2 \pm 0.3 ^b	20.5 \pm 0.5 ^b	35.0 \pm 0.4 ^a

注:不同小写字母表示组间具有显著差异($P<0.05$)。

2.6 分子动力学模拟分析

采用AutoDock软件对C3G与 α -葡萄糖苷酶进行分子对接,通过分子对接结果验证上述试验

的结果。经过100次对接操作,从AutoDock对接结果中选择能量最低、组合数最多的一次作为最终分析结果,其对接结果如图8所示。

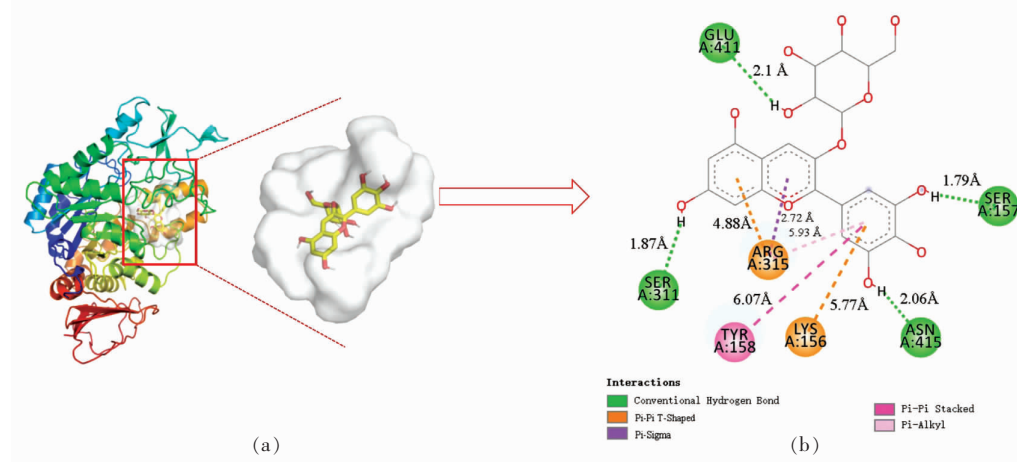


图8 α -葡萄糖苷酶与C3G的3D对接图(a)和二维平面对接图(b)

Fig.8 3D docking diagram (a) and 2D planar docking diagram (b) of α -glucosidase and C3G

C3G与 α -葡萄糖苷酶形成复合物的捆绑结合能为-11.71 kcal/mol,该结果与估算的结合能一致,说明分子对接结果是准确可行的。结合3D对接模式和2维示意图,可以清楚地显示C3G插入到 α -葡萄糖苷酶活性腔中。图8b展示C3G与氨基酸残基发生相互作用,其中发生相互作用的氨基酸残基包括Ser 157、Tyr 158、Phe 314、Arg 315、Asp 307、His 280、Val 232和Leu 313,它们

是C3G与 α -葡萄糖苷酶之间可能的相互作用位点。C3G和氨基酸残基(Leu 313、Ser 157、Tyr 158、Phe 314、Arg 315和2个Asp 307)之间形成7个氢键。C3G和氨基酸残基(Val 232、Leu 313、Arg 315和His 280)之间形成4种疏水相互作用(1个Pi-Pi T-Shaped,1个Pi-Cation和2个Pi-Alkyl)。Tyr和Phe具有固有的荧光吸收特性。C3G和 α -葡萄糖苷酶的氨基酸残基(Tyr和Phe)通过

氢键形成复合物。这一结果较好地解释了 C3G 与 α -葡萄糖苷酶相互作用降低 α -葡萄糖苷酶荧光强度。图 8b 分别显示了 7 个氢键的距离(2.12, 3.47, 2.01, 2.60, 2.58, 2.13, 2.18Å)和 4 个疏水力的距离(6.18, 5.81, 4.71, 4.52Å)。C3G 与 α -葡萄糖苷酶相互作用的综合比较,证实氢键是 C3G 与 α -葡萄糖苷酶相互作用的主要驱动力。

3 结论

采用活性引导结合 HSCCC 技术成功从蓝莓中分离获得纯度为 95.06% 的 C3G, C3G 并对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制作用。此外,利用光谱分析和分子对接的方法阐明 C3G 与 α -葡萄糖苷酶相互作用的主要驱动力为氢键。 α -葡萄糖苷酶与 C3G 结合后,其二级结构发生了不同程度的变化。其中 α -螺旋和 β -转角含量降低, β -折叠含量和不规则的螺旋结构增加。研究结果可为 C3G 抑制 α -葡萄糖苷酶的机制提供新的认识。

参 考 文 献

- [1] HAN C, WANG S, LI Z, et al. Bioactivity-guided cut countercurrent chromatography for isolation of lysine-specific demethylase 1 inhibitors from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1016: 59-68.
- [2] WALASEK M, GRZEGORCZYK A, MALM A, et al. Bioactivity-guided isolation of antimicrobial coumarins from *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (*Apiaceae*) fruits by high-performance counter-current chromatography [J]. *Food Chemistry*, 2015, 186(1): 133-138.
- [3] SUN J, CHEN Y, WU Y, et al. Bioassay-guided separation and identification of a new anti-lung cancer compound from *Cordyceps militaris* by means of off-line two-dimensional preparative chromatography, real-time cell analysis, and X-ray single-crystal diffraction [J]. *Chromatographia*, 2015, 78(7): 495-506.
- [4] LI L, YANG Y, HOU X, et al. Bioassay-guided separation and purification of water-soluble antioxidants from *Carthamus tinctorius* L. by combination of chromatographic techniques [J]. *Separation & Purification Technology*, 2013, 104(2): 200-207.
- [5] ENGLERT M, KAISER C, SCHWACK W, et al. Isolation of (Five) steviol glycosides from a stevia rebaudiana formulation by gradient elution counter current chromatography [J]. *Chromatographia*, 2016, 79(5): 275-284.
- [6] YANG J, GU D, JI Z, et al. Comprehensive separation of major compositions from *Sophora japonica* var. *violacea* by counter-current chromatography using a liquid-liquid extraction strategy [J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 124: 363-368.
- [7] YANG F, MA Y, ITO Y. Separation and purification of isoflavones from a crude soybean extract by high-speed counter-current chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 928(2): 163-170.
- [8] BARNES J S, NGUYEN H P, SHEN S, et al. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(23): 4728-4735.
- [9] BAENAS N, RUALES J, MORENO D A, et al. Characterization of an dean blueberry in bioactive compounds, evaluation of biological properties and *in vitro* bioaccessibility [J]. *Foods*, 2020, 9(10): 1483.
- [10] MILLER K, FEUCHT W, SCHMID M. Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: A brief overview [J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1510.
- [11] TRINH B T D, STAERK D, JAGER A K. Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 186(20): 189-195.
- [12] ZHANG J, SUN L, DONG Y, et al. Chemical compositions and α -glucosidase inhibitory effects of anthocyanidins from blueberry, blackcurrant and blue honeysuckle fruits [J]. *Food Chemistry*, 2019, 299: 125102.
- [13] IMRAN S, TAHA M, ISMAIL N H, et al. Synthesis of novel flavone hydrazones: *In-vitro* evaluation of α -glucosidase inhibition, QSAR analysis and docking studies [J]. *European Journal of Medicinal*

- Chemistry, 2015, 105: 156–170.
- [14] FIGUEROA –ESPINOZA M C, ZAFIMAHOVA A, ALVARADO P, et al. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties Dedicated to the memory of Gérard Mazerolles[J]. Food Chemistry, 2015, 178: 38–44.
- [15] LI Q, WEI Q, YUAN E, et al. Interaction between four flavonoids and trypsin: Effect on the characteristics of trypsin and antioxidant activity of flavonoids [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2014, 49(4): 1063–1069.
- [16] 薛宏坤, 李鹏程, 钟雪, 等. 高速逆流色谱分离纯化桑葚花色苷及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2020, 41(15): 96–104.
- XUE H K, LI P C, ZHONG X, et al. Separation and purification of mulberry anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and their antioxidant activity[J]. Food Science, 2020, 41(15): 96–104.
- [17] 韩芬霞, 范新景, 耿升, 等. 异甘草素抑制 α -葡萄糖苷酶的分子机制[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 37–42.
- HAN F X, FAN X J, GENG S, et al. Molecular mechanism of isoglycyrrhizin inhibiting α -glucosidase [J]. Food Science, 2019, 40(15): 37–42.
- [18] ZENG L, ZHANG G, LIAO Y, et al. Inhibitory mechanism of morin on α -glucosidase and its anti-glycation properties[J]. Food & Function, 2016, 7(9): 3953–3996.
- [19] ESPINOSA –ACOSTA G, RAMOS –JACQUES A, MOLINA G, et al. Stability analysis of anthocyanins using alcoholic extracts from black carrot (*Daucus carota* ssp. *Sativus* Var. *Atrorubens adef.*) [J]. Molecules, 2018, 23(11): 2744.
- [20] AGATONOVIC–KUSTRIN S, MORTON D W, YU-SOF A P M. The use of Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy and artificial neural networks (ANNs) to assess wine quality[J]. Modern Chemistry & Applications, 2013, 1(4): 1–8.
- [21] MOLAEAFARD S, JAMEI R, MARJANI A P. Co-pigmentation of anthocyanins extracted from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) with some organic acids: Color intensity, thermal stability, and thermodynamic parameters[J]. Food Chemistry, 2021, 339: 128070.
- [22] MA Z, JING P. Stabilization of black rice anthocyanins by self-assembled silk fibroin nanofibrils: Morphology, spectroscopy and thermal protection[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 146: 1030–1039.
- [23] LEE J H, CHOUNG M G. Identification and characterisation of anthocyanins in the antioxidant activity-containing fraction of *Liriope platyphylla* fruits[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1686–1693.
- [24] 戴涛涛. 蛋白-多酚复合物相互作用及其对蛋白性质的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- DAI T T. Protein-polyphenol complex interaction and its effect on protein properties[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.
- [25] NANDA R K, SARKAR N, BANERJEE R. Probing the interaction of ellagic acid with human serum albumin: A fluorescence spectroscopic study[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A, 2018, 192(2): 152–158
- [26] LI Y, ZHOU F, GAO F, et al. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009, 57: 11463–11468.

Activity Guided-Assisted High-Speed Counter-Current Chromatography Separation of Active Compound from Blueberry and the Interaction between the Active Compound and α -Glucosidase

Yang Zhaoyan¹, Tian Yanhua¹, Wang Lingli², Tan Jiaqi^{3*}

¹Department of Food Engineering, Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan 030031

²Department of Life Sciences, Yuncheng College, Yuncheng 044000, Shanxi

³Peking University Frontier Cross Research Institute, Beijing 100091)

Abstract Activity guided-assisted high-speed counter-current chromatography (HSCCC) was used to separate α -glucosidase inhibitory components from blueberry in this study. Firstly, the active components were enriched in water after being

extracted by different solvents. Secondly, the water extract was separated by HSCCC and six components were obtained. The inhibition rate of F4 on α -glucosidase was significantly higher than other components. Then F4 was purified by Sephadex LH-20 dextran gel to obtain high purity component I. Finally, component I was identified as cyanidin-3-*O*-glucoside (C3G) by UV, FTIR, HPLC-MS and NMR, and its purity was 95.06%. In addition, the interaction between C3G and α -glucosidase was characterized by multispectral scanning and molecular docking. It was found that C3G could spontaneously combine with α -glucosidase through hydrogen bond to form complex. After compounding with C3G, the secondary structure of α -glucosidase changed in varying degrees, in which the α -helix and β -angle decreased, while the β -folding and irregular helix increased. Molecular docking simulation showed that C3G was hydrogen bonded with Leu 313, Ser 157, Tyr 158, Phe 314, Arg 315 and Asp 307, and had hydrophobic interaction with four hydrophobic residues, which maintained the complex structure. The results of this study have important guiding significance for the development of functional foods for treating type 2 diabetes.

Keywords blueberry; activity guided; high speed counter-current chromatography; cyanidin-3-*O*-glucoside; α -glucosidase; interaction