

桃仁中苦杏仁苷高效提取及其体外生物活性研究

黄欣莉^{1,2}, 吴伟杰^{2,3*}, 陈杭君², 房祥军², 韩延超², 穆宏磊²,
牛犇², 孙培龙¹, 郜海燕^{2*}

(¹浙江工业大学食品科学与工程学院 杭州 310014

²浙江省农业科学院食品科学研究所 农业部果品采后处理重点实验室 浙江省果蔬保鲜与加工技术研究重点实验室
中国轻工业果蔬保鲜与加工重点实验室 杭州 310021

³省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室 杭州 310021)

摘要 为优化超声辅助法提取白桃加工副产物——桃仁中苦杏仁苷的工艺,研究其体外生物活性。在不同干燥方式下进行单因素提取试验,在选定微波干燥的基础上,应用响应面法优化提取工艺,对苦杏仁苷的体外抗凝血、降血糖、降血脂活性进行研究,并通过分子对接技术探究苦杏仁苷与酶的相互作用。结果表明,苦杏仁苷最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 81.43%,提取温度 68.91 °C,提取时间 20.00 min。桃仁苦杏仁苷可以延长活化部分凝血酶时间和凝血酶时间,降低纤维蛋白原含量,抑制 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶以及胰脂肪酶催化活性,同时,能结合牛磺酸胆酸盐和甘氨酸胆酸盐。分子对接研究结果表明:桃仁苦杏仁苷与 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶分子的亲水性氨基酸形成氢键结合,通过改变酶分子构象,与底物形成竞争性抑制,从而起到抑制酶催化活性的作用。桃仁中苦杏仁苷具有体外抗凝血、降血糖和降血脂的作用,研究结果为桃仁中苦杏仁苷的高效提取和桃仁的进一步开发应用提供参考。

关键词 桃仁;苦杏仁苷;超声提取;生物活性;分子对接

文章编号 1009-7848(2023)04-0146-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.015

桃果易受机械损伤,储运性差,市场上常以加工食品出售,例如:桃汁、桃子罐头、果酒、果脯^[1]。桃加工食品在生产过程中会产生大量的桃仁副产物,若能高效开发利用,将其变废为宝,不仅保护环境,而且可以减少生物质资源的浪费。桃仁(*Semen persicae*)含脂肪油类、蛋白质和氨基酸、苷类、矿物质、纤维素等药用和营养成分^[2],常与红花(*Carthami flos*)配伍作为活血化瘀常用药,具有悠久的临床应用历史^[3-4]。

苦杏仁苷是桃仁的主要药用成分^[5],广泛存在于桃子等核果的种子中,含量高达 6%^[6-7]。多年来,苦杏仁苷除了具有中医学所说的止咳平喘的功效外,还具有抗纤维化^[8],辅助抗癌^[9],抗动脉粥样硬化^[10-11],抗心肌肥厚^[12],降血脂^[13]、降血糖^[14]和抗凝血^[15]作用等生理功效。将桃仁中的苦杏仁苷进行分离提纯,对其抗凝血、降血脂、降血糖等生理功

能进行探究,明确其构效关系,并开发相应功能产品,将具有较好的应用前景。

本文采用冷冻干燥、热风干燥、微波干燥分别对‘北京 14 号’白桃桃仁进行干燥处理,以乙醇体积分数、超声温度、超声时间为单因素参数,研究桃仁苦杏仁苷提取工艺,并做响应面法设计试验,明确桃仁中苦杏仁苷的最佳提取工艺参数。同时对其抗凝血、降血脂和降血糖活性进行体外研究,为桃仁的综合开发利用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

‘北京 14 号’白桃新鲜桃仁,浙江丰岛食品股份有限公司;苦杏仁苷标准品, Sigma;乙醇、石油醚(沸程 60~90 °C),上海凌峰化学试剂有限公司;色谱级甲醇, TEDIA; α -淀粉酶, 麦克林; α -葡萄糖苷酶、牛磺酸胆酸盐、甘氨酸胆酸盐, 上海源叶; 胰脂肪酶、对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(pNPG)、月桂酸 4-硝基苯酯, 阿拉丁。

1.2 仪器与设备

DGG-9070A 立式电热恒温鼓风干燥箱, 上海

收稿日期: 2022-04-10

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2020C02037)

第一作者: 黄欣莉, 女, 硕士生

通信作者: 吴伟杰 E-mail: wuweijie87@163.com

郜海燕 E-mail: spsghy@163.com

森信公司;Free Zone 冻干机,美国 Labconco 公司;Waters e2695 分析型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;KQ-5200DE 超声清洗器,昆曲市超声仪器有限公司;UV-9000 紫外分光光度计,上海元析仪器;Spark 10M 多功能酶标仪,瑞士 TECAN 公司;全自动凝血分析仪 UP1500,上海太阳生物技术技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 绘制苦杏仁苷标准曲线 准确称取苦杏仁苷标准品用甲醇配制成不同质量浓度标准溶液,通过高效液相色谱法测定不同质量浓度标准溶液的相应峰面积绘制标准曲线^[16]。色谱柱:Eclipse XDB-C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:以甲醇:水(2:8),等度洗脱 30 min;检测波长:217 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量 20 μL。苦杏仁苷标准曲线: $Y = 9206.9X + 75703$ ($R^2 = 0.9998$),式中, X ——苦杏仁苷标准品的质量浓度(μg/mL); Y ——峰面积。

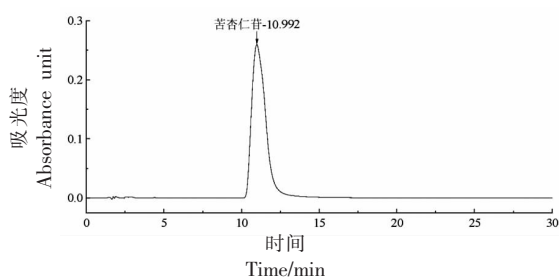


图 1 苦杏仁苷高效液相图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of amygdalin

1.3.2 桃仁干燥及苦杏仁苷提取工艺 将白桃桃仁洗净后,立即采用以下 3 种干燥方式将桃仁进行干燥。

1) 冷冻干燥 将桃仁置于干燥托盘,于-80 ℃预冻后,放入冻干机中,0.01 kPa,-80 ℃干燥 48 h。

2) 热风干燥 将桃仁置于 50 ℃热风干燥箱,烘至完全干燥。

3) 微波干燥 将桃仁置于微波炉中,间歇干燥 10 min 至完全干燥。

将干燥后的桃仁研磨成粉末过筛,样品与石油醚料液比(g/mL)为 1:5,重复 2 次石油醚脱脂,

真空过滤,滤渣于通风橱中将石油醚挥干,固定桃仁与乙醇液料比(g/mL)为 1:14,之后进行超声提取,真空抽滤,滤液即苦杏仁苷提取液。

苦杏仁苷提取率计算公式:

苦杏仁苷提取率=

$$\frac{\text{苦杏仁苷浓度} \times \text{稀释倍数} \times \text{提取液体积}}{\text{桃仁质量}} \times 100\% \quad (1)$$

将滤液通过旋转蒸发仪浓缩,将浓缩液进行冷冻干燥得到苦杏仁苷粉末,纯度为 51%。干燥器保存,使用时用生理盐水溶解,配制成所需浓度溶液。

1.3.3 单因素实验 超声提取采用设置不同乙醇体积分数(60%,70%,80%,90%,100%)、提取温度(50,60,70,80,90 ℃)、提取时间(10,20,30,40,50,60 min),通过改变工艺参数,考察乙醇体积分数、提取温度、提取时间对苦杏仁苷得率的影响。

1.3.4 Box-Behnken 试验设计 选定一种干燥方式,在单因素实验的基础上建立 3 因素模型,以苦杏仁苷提取率为响应值,基于 Box-Behnken 试验设计原理,设计响应面优化试验,试验后对响应面结果进行分析^[17]。

1.3.5 体外抗凝血 参照王辰龙等^[18]的方法,取小鼠血浆 1.80 mL,加入 200 μL 白桃桃仁苦杏仁苷溶液,以生理盐水作为空白对照。37 ℃温育 2 min 后,加入促凝血酶原,温育 2 min 后加入 20 mmol/L CaCl₂ 0.1 mL 混匀,使用全自动凝血分析仪测定活化部分凝血酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)和纤维蛋白原(FIB)含量。

1.3.6 体外降血脂

1.3.6.1 胰脂肪酶抑制率 胰脂肪酶用缓冲液溶解配制成 0.25 mg/mL 胰脂肪酶溶液,称取月桂酸 4-硝基苯酯溶解于乙醇,用缓冲液稀释得到 10 mmol/mL 的底物溶液。参照王远等^[19]的反应体系,37 ℃温育 20 min 后,用酶标仪在 405 nm 波长下测定吸光度。胰脂肪酶的抑制率按公式(2)计算:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{B-b}{A-a}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中, A ——对照试验组的吸光值; a ——对照空白组的吸光值; B ——样品试验组的吸光值; b ——样品空白组的吸光值。

1.3.6.2 胆酸盐结合率 参照芦宇等^[20]的方法,分别移取 3 mL 苦杏仁苷溶液 2 份于 100 mL 三角瓶中,模拟胃消化 1 h,用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 6.3,模拟肠道消化 1 h。取其中 1 份样品于三角瓶中加入 4 mL 0.3 mmol/L 甘氨酸胆酸钠(牛磺酸胆酸盐)。在 37 °C 下继续振荡 1 h,离心取上清液,用比色法测定 387 nm 波长处吸光度。按公式(3)计算:

$$\text{胆酸盐结合率} = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中, A_0 ——空白对照试验组的吸光值; A_1 ——样品试验组的吸光值。

1.3.7 体外降血糖活性分析

1.3.7.1 α -淀粉酶抑制活性 根据严尚隆等^[21]的方法测定。移取不同浓度的苦杏仁苷溶液 250 μ L 至试管,加入 0.25 μ L 1% α -淀粉酶溶液。37 °C 水浴 10 min 后,加入 0.5 mL 1%淀粉溶液。继续水浴 20 min,再加入 1 mL DNS 溶液煮沸 5 min 后,定容至 10 mL。冷却至室温,在 540 nm 波长处测定吸光值,抑制活性按公式(4)计算:

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中, A_1 —— α -淀粉酶溶液+样品+淀粉溶液+DNS 溶液的吸光值; A_2 ——水+样品+淀粉溶液+DNS 溶液; A_3 —— α -淀粉酶溶液+生理盐水+淀粉溶液+DNS 溶液的吸光值; A_4 ——水+水+淀粉溶液+DNS 溶液的吸光值。

1.3.7.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性 参考蔡思学等^[22]的方法测定。200 μ L 苦杏仁苷溶液中加入 200 μ L α -葡萄糖苷酶溶液。37 °C 水浴 15 min,再加入 200 μ L pNPG 溶液。继续 37 °C 水浴 25 min,加入 5 mL Na_2CO_3 溶液终止反应。冷却至室温,在 405 nm 波长处测得吸光值 A_1 。将酶液替换为水,测得 A_2 。样品溶液换成水,作空白对照 A_0 。抑制活性按公式(5)计算:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (5)$$

1.3.8 生物信息学分析 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的晶体结构来自 PDB 数据库(PDB ID: 3VM7、3W38、1GPF)。在 PubChem 上下载小分子苦杏仁苷的结构(PubChem CID: 656516)。参照齐燕娇等^[23]的方法进行分子对接,选取能量最小的构象结果做进一步分析。

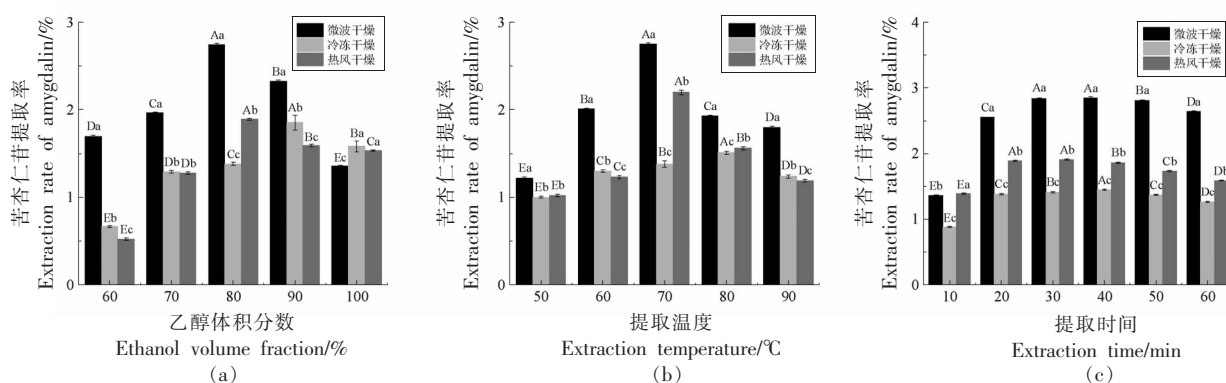
1.4 数据处理

使用 Origin 2018 软件作图,所有数据用 SPSS 24 软件进行统计处理,并采用 ANAVO 检验进行显著性分析($P < 0.05$ 表示差异显著),多重比较采用 LSD- t 检验。

2 结果与分析

2.1 单因素优化苦杏仁苷提取工艺

由图 2a 可知,苦杏仁苷提取率随乙醇体积分数的增加呈先上升后下降的趋势,乙醇体积分数大于 70% 后,对苦杏仁苷提取率影响不大,微波干



注:不同小写字母表示同一提取工艺不同干燥方式不同组别差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示同一干燥方式不同提取工艺相同组别差异显著($P < 0.05$)。

图 2 不同因素对桃仁苦杏仁苷提取率的影响

Fig.2 Effects of different factors on the extraction rate of amygdalin from peach kernel

燥和热风干燥的桃仁在 80%乙醇下提取,苦杏仁苷得率最高,而冷冻干燥的苦杏仁苷提取率在 90%乙醇提取下最高。由图 2b 可知,提取温度对苦杏仁苷提取率的影响与不同乙醇体积分数提取相类似,呈先上升后下降的趋势,70~80 °C 为最佳提取温度范围。由图 2c 可知,超声时间大于 30 min 后,提取率无明显变化,20~40 min 的超声处理已经基本将苦杏仁苷提取完全。综合单因素实验结果,微波干燥后的桃仁苦杏仁苷提取率明显优于热风干燥和冷冻干燥。

2.2 响应面优化苦杏仁苷提取工艺

结合单因素试验结果选定微波干燥方式干燥桃仁,并采用响应面法对桃仁中苦杏仁苷的提取工艺进行优化,得出桃仁苦杏仁苷提取响应面试验结果。利用 Design Expert 软件进行分析,得到苦杏仁苷提取率(Y)对乙醇体积分数(A)、提取温度(B)、提取时间(C)的二次多项回归方程为: $Y = 3.672 + 0.055A - 0.18375B - 0.06375C + 0.0125AB - 0.1875AC - 0.105BC - 1.6735A^2 - 0.711B^2 - 0.011C^2$,试验所选用模型 $P < 0.0001$,决定系数 $R^2 = 0.9987 >$

0.8,失拟不显著($P = 0.768003 > 0.05$),说明方程的拟合情况较好。由表 2 可知, A 和 C 的一次项系数的 P 值小于 0.05, B 的 P 值小于 0.001,说明 A 和 C 对响应值影响显著, B 极显著。各因素与响应值之间不是简单的线性关系,且各因素存在交互作用。

根据回归方程获得的响应面和等高线图,能直观反映各因素之间交互作用的强弱^[24]。如图 3 所示,因素 A 和 C ,因素 B 和 C 之间的响应面图的曲面较陡,等高线图趋于椭圆,交互作用明显。因素 A 和 B 的响应面图曲面较平,等高线图趋于圆形,交互作用较小。乙醇体积分数对应的曲面较陡,说明其对苦杏仁苷提取率的影响最为显著。采用响应面优化获得的工艺条件(乙醇体积分数 81.43%,提取温度 68.91 °C,提取时间 20.00 min)提取白桃桃仁中的苦杏仁苷,进行验证性试验,重复 3 次,得到实际苦杏仁苷提取率为 $(3.61 \pm 0.05)\%$,与预测提取率 3.74% 无显著性差异,证明该方程具有准确性和实用性^[25]。

表 1 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 1 Results of Box-Behnken design tests

序号	A(乙醇体积分数)/%	B(提取温度)/°C	C(提取时间)/min	苦杏仁苷提取率/%	序号	A(乙醇体积分数)/%	B(提取温度)/°C	C(提取时间)/min	苦杏仁苷提取率/%
1	80	70	40	3.75	10	80	90	60	2.58
2	60	70	60	2.09	11	80	90	20	2.95
3	60	70	20	1.81	12	100	70	60	1.79
4	100	70	20	2.26	13	80	70	40	3.63
5	80	70	40	3.59	14	80	50	60	3.16
6	80	70	40	3.7	15	100	90	40	1.19
7	60	90	40	1.02	16	80	50	20	3.11
8	80	70	40	3.69	17	100	50	40	1.53
9	60	50	40	1.41					

表 2 回归方差分析结果

Table 2 Analysis of variance for the fitted regression model

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	15.08737	9	1.676374	579.3444	<0.0001	**
A	0.0242	1	0.0242	8.363367	0.023251	*
B	0.270113	1	0.270113	93.34917	<0.0001	**
C	0.032512	1	0.032512	11.23611	0.012217	*
AB	0.000625	1	0.000625	0.215996	0.656218	

(续表 2)

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
AC	0.140625	1	0.140625	48.59911	0.000217	**
BC	0.0441	1	0.0441	15.24068	0.005869	*
A ²	11.79201	1	11.79201	4075.244	<0.0001	**
B ²	2.128509	1	2.128509	735.5994	<0.0001	**
C ²	0.000509	1	0.000509	0.176071	0.68735	
残差	0.020255	7	0.002894			
失拟	0.004575	3	0.001525	0.389031	0.768003	
纯误差	0.01568	4	0.00392			
总和	15.10762	16				

注:*. 差异显著($P < 0.05$);**. 差异极显著($P < 0.01$)。回归系数 $R^2 = 0.9987, R^2_{Adj} = 0.9969$ 。

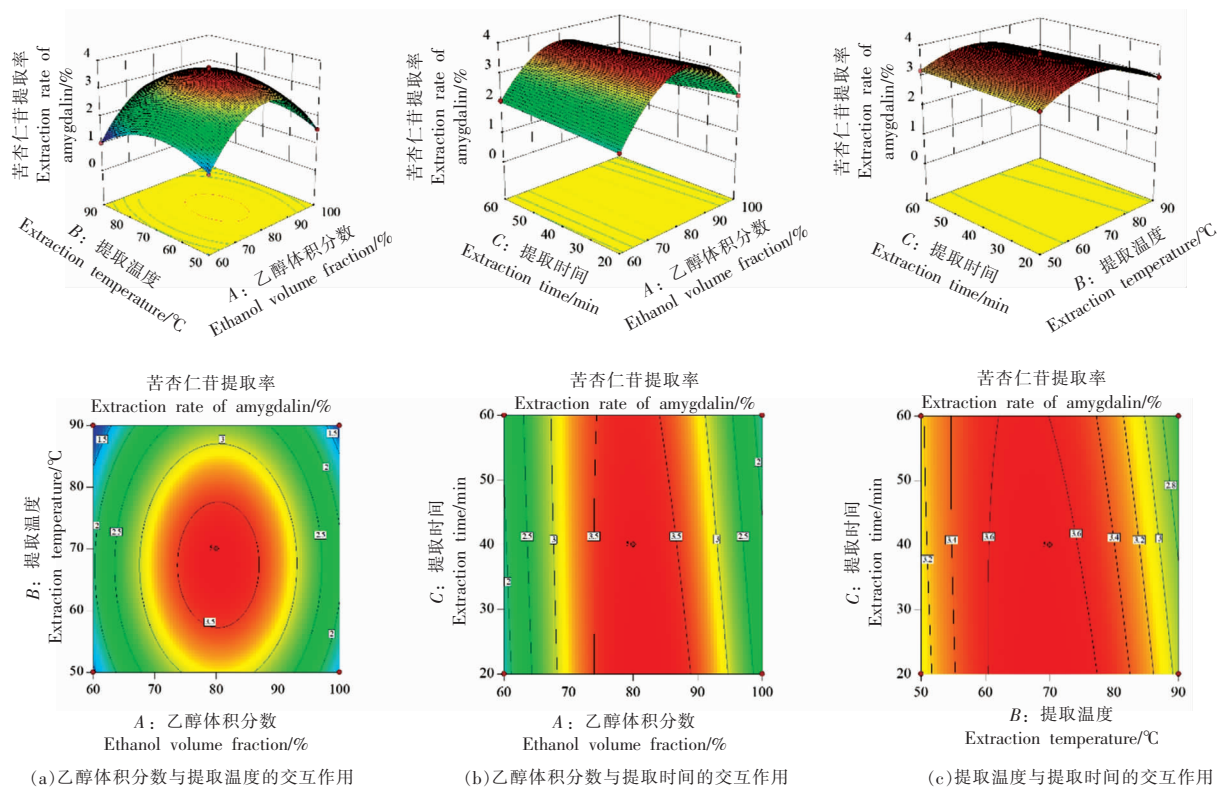


图 3 各两因素交互作用对苦杏仁苷提取率的影响

Fig.3 Effect of two interactions on the extraction rate of amygdalin

2.3 桃仁苦杏仁苷体外抗凝血活性

药物主要通过对凝血途径的激活和抑制来影响机体的凝血系统,凝血 4 项的变化可以反应机体凝血系统的病理变化^[26],即活化部分凝血酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)和纤维蛋白原含量(FIB)。由表 3 可知,苦杏仁苷对 APTT、PT、TT 和 FIB 的影响与其浓度存在一定关系。与空白对照相比,苦杏仁苷质量浓度在 15~

100 mg/mL 时,可显著延长 APTT。除 50 mg/mL 外,苦杏仁苷可延长 TT。苦杏仁苷可降低 PT,且随质量浓度变化呈先上升后下降的趋势。在质量浓度低于 25 mg/mL 和大于 100 mg/mL 时,可降低小鼠血浆的 FIB 的含量。Liu 等^[27]发现苦杏仁苷可显著延长 APTT,降低 FIB 含量,具有一定程度的活血化瘀作用。苦杏仁可能通过延长 APTT 和 TT 使内源性凝血途径和共同凝血途径被激活。FIB 含量

表 3 苦杏仁苷对外凝血功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 3 Effects of amygdalin on blood coagulation *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	活化部分凝血酶 时间 (APTT)/s	凝血酶时间 (TT)/s	凝血酶原时间 (PT)/s	纤维蛋白原含量 (FIB)/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照	0	34.37 ± 0.49	8.97 ± 0.95	1.77 ± 0.09	3.37 ± 0.09
苦杏仁苷处理组	5	33.00 ± 0.64	11.60 ± 1.15	$1.17 \pm 0.15^*$	3.17 ± 0.26
	15	$36.73 \pm 0.92^*$	$12.67 \pm 1.07^*$	$1.00 \pm 0.17^{**}$	2.87 ± 0.09
	25	$38.53 \pm 1.33^{**}$	10.40 ± 1.04	$1.27 \pm 0.20^*$	3.27 ± 0.26
	50	$41.40 \pm 0.75^{**}$	6.00 ± 0.23	$0.87 \pm 0.23^{**}$	3.70 ± 0.29
	100	$37.37 \pm 0.95^*$	9.77 ± 0.65	$0.40 \pm 0.17^{**}$	$4.60 \pm 0.25^{**}$
	200	33.17 ± 0.43	11.50 ± 1.39	$0.50 \pm 0.17^{**}$	3.10 ± 0.12

注:与空白对照组相比,* 差异显著 ($P < 0.05$), ** 差异极显著 ($P < 0.01$)。

的降低,说明苦杏仁苷可能通过抑制纤维蛋白原转化为纤维蛋白,发挥抗凝血的作用。

2.4 桃仁苦杏仁苷体外降血脂活性

胰脂肪酶可水解肠腔中 50%~70% 的脂肪,已报道的研究将胰脂肪酶抑制率作为降血脂的重要指标^[28]。肝脏中胆固醇可以转化为胆汁酸,与胆汁酸的结合可降低胆固醇量,有降血脂的效果^[29]。由图 4a 可知,在 0~50 mg/mL 质量浓度范围内,桃仁中苦杏仁苷对胰脂肪酶抑制率,随着质量浓度的增大而增加,表现出较好的线性关系,在低剂量时,苦杏仁苷表现出对胰脂肪酶活性较强的抑制作用,在质量浓度为 100 mg/mL 时,桃仁苦杏仁苷

对胰脂肪酶抑制率可达 $(87.67 \pm 2.89)\%$ 。由图 4b 可知,苦杏仁苷提取物对两种胆酸盐有一定的结合能力,在试验条件下,苦杏仁苷与牛磺酸胆酸盐、甘氨酸胆酸盐的结合量随质量浓度的增加而增加,且更易与甘氨酸胆酸钠结合。综合图 4 结果表明,苦杏仁苷具有一定的胰脂肪酶抑制能力,且能结合牛磺酸胆酸盐和甘氨酸胆酸盐,可能具有体外降血脂的潜力。张玲等^[13]的研究表明欧李仁中提取的苦杏仁苷对胰脂肪酶活性有较好的抑制作用,且其与牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠及脱氧胆酸钠均能结合,具有一定的体外降脂作用,与本文的研究结果相类似。

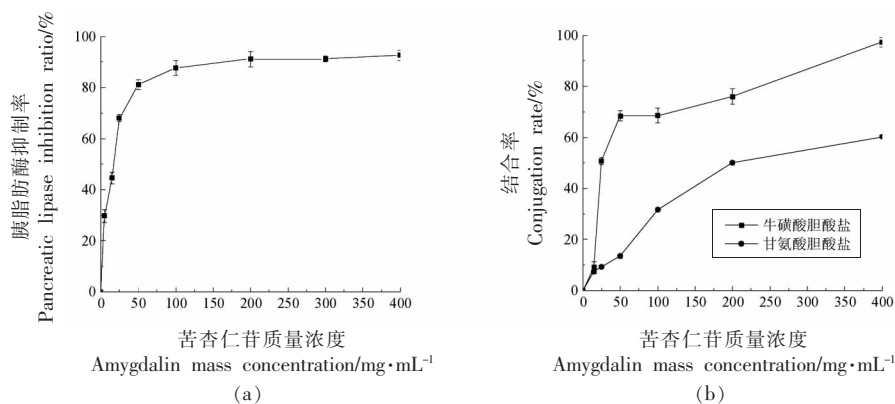


图 4 苦杏仁苷对胰脂肪酶和胆酸盐结合的影响

Fig.4 Effects of amygdalin on pancreatic lipase activity and cholate binding

2.5 体外降血糖

如图 5a 所示,桃仁中苦杏仁苷对 α -淀粉酶的抑制作用随剂量的上升而加强,在用量为 0~200 mg/mL 时,苦杏仁苷与 α -淀粉酶抑制率呈较

好的线性关系,在此质量浓度范围内,苦杏仁苷对 α -淀粉酶的抑制率最高达到 75.42%,当质量浓度大于 200 mg/mL 时,其对 α -淀粉酶的抑制作用没有明显增强。 α -葡萄糖苷酶对苦杏仁苷较为敏感,

当质量浓度为 0~25 mg/mL 时, 苦杏仁苷对 α -葡萄糖苷酶抑制活性快速上升, 当质量浓度大于 50 mg/mL, 苦杏仁苷对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用趋于稳定。以上结果表明, 桃仁中苦杏仁苷对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性均有较好的抑制作用, 表现出一定的体外降血糖作用。李瑞玲^[4]发现欧

李仁中提取的苦杏仁苷质量浓度为 100 mg/mL 时, 对 α -淀粉酶的抑制率达到最大, 为 87.4%, 表明其具有体外降血糖作用, 并通过动物实验发现, 苦杏仁苷提取物可以明显改善正常小鼠和糖尿病小鼠的糖耐量、体质量及脏器指数, 降低糖尿病小鼠的血糖值。

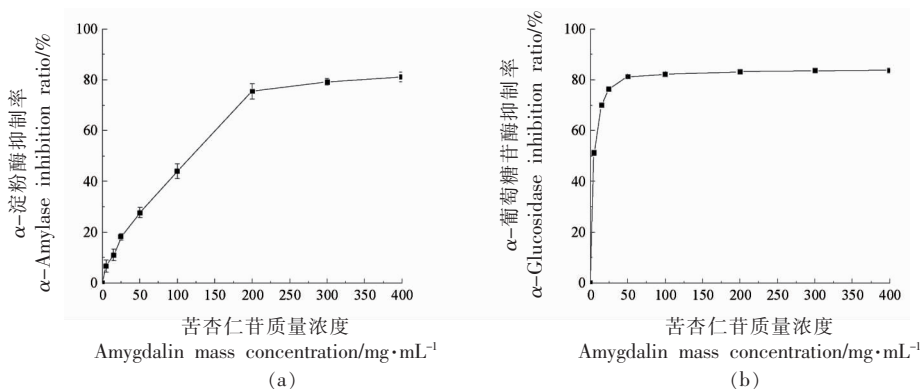


图5 苦杏仁苷对 α -淀粉酶(a)和 α -葡萄糖苷酶(b)的抑制率

Fig.5 Inhibitory rate of amygdalin on α -amylase (a) and α -glucosidase (b) activities

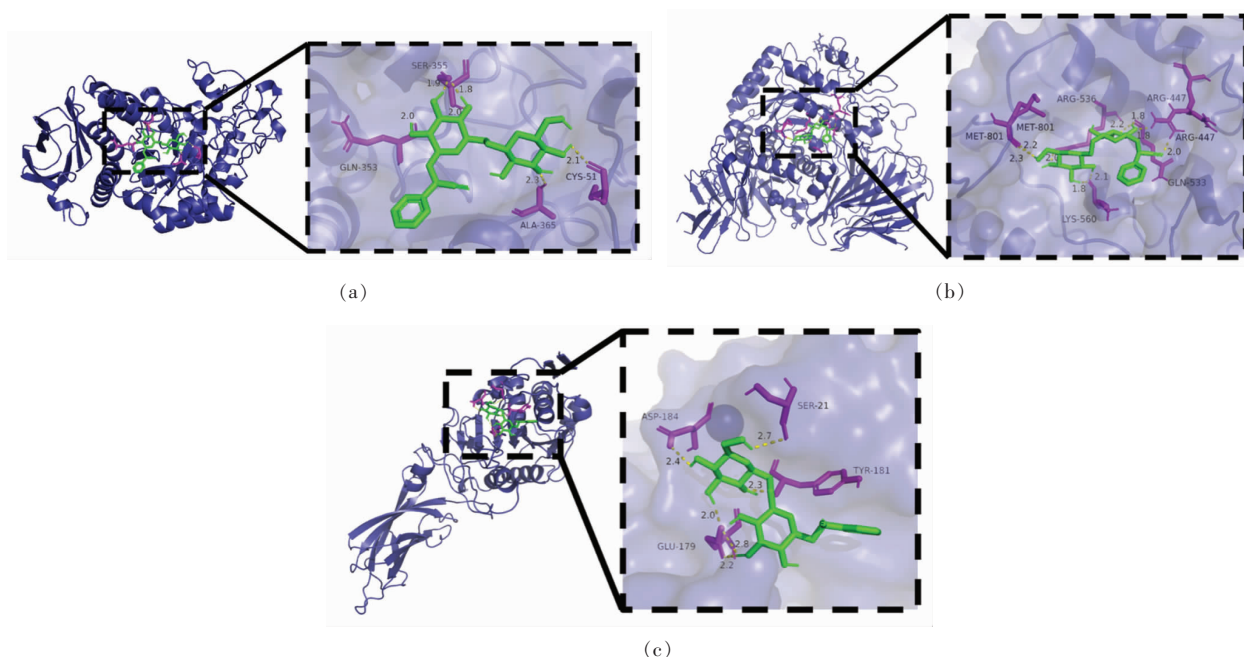
2.6 生物信息学分析

将桃仁苦杏仁苷与 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶进行分子对接分析, 进一步研究其相互作用结合位点。从图 6 可以看出, 苦杏仁苷与 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶结合位点处的氨基酸大多是极性氨基酸, 它们的相互作用主要以氢键为主, 图中以黄色虚线表示。图 6a 显示苦杏仁苷与 α -淀粉酶结合位点处的氨基酸是 CYS51、GLN353、SER355、ALA365, 氢键主要由谷氨酰胺 GLN353、丝氨酸 SER355 与苦杏仁苷组成。其它相关研究也表明谷氨酰胺 Glu 为 α -淀粉酶的关键活性位点^[30], 据此可推断 α -淀粉酶对苦杏仁苷具有较强的亲和力, 苦杏仁苷通过与谷氨酰胺 Glu 结合, 改变 α -淀粉酶催化口袋构象, 从而降低其催化活性。图 6b 显示苦杏仁苷与 α -葡萄糖苷酶结合位点处的氨基酸是 MET801、ARG447、ARG536、LYS560、GLN533, 氢键主要由谷氨酰胺 GLN533、精氨酸 ARG536、赖氨酸 LYS560 与苦杏仁苷作用形成。苦杏仁苷对 α -葡萄糖苷酶有抑制作用, 其原因可能是苦杏仁苷与葡萄糖结构较为相似, 作为底物竞争性抑制剂与 α -葡萄糖苷酶的活性中心结合, 使酶对葡萄糖的催化活性降低^[20]。图 6c 显示苦杏仁苷与胰脂肪酶

结合位点处的氨基酸是 ASP184、GLU179、SER21、TYR181, 氢键主要由谷氨酰胺 GLN179 与苦杏仁苷组成。苦杏仁苷与胰脂肪酶的结合处周围分布有多个 α 螺旋结构, 有序的二级结构数量与酶分子周围的高度氢键结构相关, 能增强酶分子的结构刚性。苦杏仁苷的结合可能会减少其 α 螺旋, 从而降低胰脂肪酶稳定性, 影响其催化能力^[31]。

3 结论

本研究通过分析不同干燥方式下乙醇体积分数、提取温度和超声时间对桃仁苦杏仁苷提取率的影响, 在选定微波干燥的基础上应用响应面法优化研究获得桃仁中苦杏仁苷的最佳提取工艺条件为: 乙醇体积分数 81.43%, 提取温度 68.91 $^{\circ}$ C, 提取时间 20.00 min, 在此条件下, 模型预测提取率可达 3.74%。桃仁苦杏仁苷的生物活性研究表明, 苦杏仁苷可以延长 ABTT 和 TT, 降低 FIB 含量, 抑制 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶以及胰脂肪酶的催化活性, 此外苦杏仁苷还能结合牛磺酸胆酸盐和甘氨酸胆酸盐, 结果表明苦杏仁苷具有一定的体外抗凝血、降血脂和降血糖作用。本研究为超声辅助法提取白桃中桃仁苦杏仁苷工艺提供了数据支撑, 并对其生物活性及相关机理进行了初步



注：图中黄色虚线表示氢键。

图 6 苦杏仁苷与 α -淀粉酶(a)、 α -葡萄糖苷酶(b)、胰脂肪酶(c)的分子对接

Fig.6 Molecular docking of amygdalin with α -amylase (a), α -glucosidase (b) and pancreatic lipase (c)

探索,将废弃生物质资源进行合理、多层次的利用,保护了生态环境,对提高桃产业附加值提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] 吕健, 毕金峰, 赵晓燕, 等. 国内外桃加工技术研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 268-271, 274.
LÜ J, BI J F, ZHAO X Y, et al. Research progress on peach processing technology[J]. Food & Machinery, 2012, 28(1): 268-271, 274.
- [2] JASWAL V, PALANIVELU J, DR R C. Effects of the gut microbiota on amygdalin and its use as an anti-cancer therapy: Substantial review on the key components involved in altering dose efficacy and toxicity [J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2018, 14(C): 125-132.
- [3] OYENIRAN O H, ADEMILUYI A O, OBOH G. African mistletoe (*Tapinanthus bangwensis* Lor.) infestation improves the phenolic constituents, antioxidative and antidiabetic effects of almond (*Terminalia catappa* Linn.) host leaf in sucrose-rich diet-induced diabetic-like phenotypes in fruit fly (*Drosophila melanogaster* Meigen)[J]. Food Frontiers, 2021, 2: 77-90.
- [4] 许筱凰, 李婷, 王一涛, 等. 桃仁的研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(17): 2649-2655.
XU X F, LI T, WANG Y T, et al. Research progress in *Persicae Semen* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(17): 2649-2655.
- [5] HE X Y, WU L J, WANG W X, et al. Amygdalin - A pharmacological and toxicological review [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 254: 112717.
- [6] BARCELOUX D G. Cyanogenic foods (Cassava, Fruit Kernels, and Cycad Seeds) [J]. Disease-a-Month, 2009, 55(6): 336-352.
- [7] KAJINO A, BAIB W, YOSHIMURAC N, TAKAYANAGI M. Identification of peach and apricot kernels for traditional Chinese medicines using near-infrared spectroscopy[J]. Vibrational Spectroscopy, 2021, 113: 103202.
- [8] ZHANG X Q, HU J G, ZHOU Y Z, et al. Amygdalin improves microcirculatory disturbance and attenuates pancreatic fibrosis by regulating the expression of endothelin-1 and calcitonin gene-related peptide in rats [J]. Journal of the Chinese

- Medical Association, 2018, 81(5): 437-443.
- [9] 吕建珍, 邓家刚. 苦杏仁苷的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 530-535.
LÜ J Z, DENG J G. Research progress in pharmacological effects of amygdalin[J]. Drugs & Clinic, 2012, 27(5): 530-535.
- [10] DENG J G, LI C Y, WANG H L, et al. Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice through the induction of regulatory T cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 411(3): 523-529.
- [11] DENG J G, WANG H L, LIU Y D, et al. Anti-atherosclerotic effects mediated by the combination of probucol and amygdalin in apolipoprotein e - knockout mice fed with a high fat diet[J]. Journal of Animal & Veterinary Advances, 2012, 11(1): 20-25.
- [12] 陈莹. 苦杏仁苷对异丙肾上腺素所致大鼠心肌肥厚的作用研究[D]. 吉林: 延边大学, 2014.
CHEN Y. Effect of amygdalin on the action of myocardial hypertrophy induced by isoproterenol in rats [D]. Jilin: Yanbian University, 2014.
- [13] 张玲, 丁卫英, 高芬, 等. 欧李仁苦杏仁苷与胆酸盐的结合及对胰脂肪酶的抑制作用[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(9): 136-138.
ZHANG L, DING W Y, GAO F, et al. Conjugation rate of amygdalin extract from *Cerasus humilis* combined with three cholates and inhibition effect of the amygdalin extract on pancrelipase[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2018, 46(9): 136-138.
- [14] 李瑞玲. 欧李仁苦杏仁苷的提取及生物活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.
LI R L. Extraction and biological activity of amygdalin from *Prunus humilis*[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2019.
- [15] 金松今, 张红英, 朴惠顺, 等. 桃仁乙醇提取物对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. 延边大学医学学报, 2010, 33(2): 98-99.
JIN S J, ZHANG H Y, PIAO H S, et al. Effects of ethanol extract of the *Semen persicae* for bleeding time and coagulation time in mice [J]. Journal of Medical Science Yanbian University, 2010, 33(2): 98-99.
- [16] 张鑫, 李瑞玲, 孙学茹, 等. 超声波辅助提取欧李仁中苦杏仁苷的工艺优化[J]. 食品与机械, 2018, 34(10): 163-168.
ZHANG X, LI R L, SUN X R, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of amygdalin from *Prunus humilis* seed[J]. Food & Machinery, 2018, 34(10): 163-168.
- [17] 钱浩杰, 郜海燕, 穆宏磊, 等. 水酶法提取山核桃油脂工艺研究[J]. 核农学报, 2017, 31(7): 1365-1373.
QIAN H J, GAO H Y, MU H L, et al. Study on the extraction technology of walnut oil by aqueous enzymatic method[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(7): 1365-1373.
- [18] 王辰龙, 张子奇, 王曼, 等. 黑木耳多糖的提取分离及体外抗凝血作用研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 238-241.
WANG C L, ZHANG Z Q, WANG M, et al. Study on extraction, isolation and *in vitro* anti-coagulation of polysaccharides from *Auricularia auricular*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(9): 238-241.
- [19] 王远, 郑雯, 蔡珺珺, 等. 辣木叶黄酮结构分析及其对胰脂肪酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 31-37.
WANG Y, ZHENG W, CAI J J, et al. Structural analysis and anti-pancreatic lipase activity of flavonoids from *Moringa oleifera* Lam. leaves[J]. Food Science, 2018, 39(2): 31-37.
- [20] 芦宇, 吕长鑫, 焦天慧, 等. 聚酰胺纯化红树莓籽黄酮及其结合胆酸盐能力评价[J]. 中国食品学报, 2019, 19(10): 172-178.
LU Y, LÜ C X, JIAO T H, et al. Ability of bile salt-binding of red raspberry seed flavonoids purification by polyamide[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(10): 172-178.
- [21] 严尚隆, 潘创, 杨贤庆, 等. 长松藻多糖降解、结构表征及降血糖活性测定[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 119-126.
YAN S L, PAN C, YANG X Q, et al. Degradation, structural characterization and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Codium cylindricum* [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 119-126.
- [22] 蔡思学, 户晶晶, 孙乐常, 等. 2种抗氧化剂对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2021,

- 21(4): 39–45.
- CAI S X, HU J J, SUN L C, et al. Inhibitory effect of two antioxidants on α -glucosidase[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 39–45.
- [23] 齐燕姣, 陆会宁, 金能智, 等. α -葡萄糖苷酶与米格列醇相互作用及其进化关系[J]. 生物信息学, 2015, 13(3): 141–149.
- QI Y J, LU H N, JIN N Z, et al. Interaction and evolutionary analysis of α -glucosidases and Miglitol[J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2015, 13(3): 141–149.
- [24] 柳萌, 郜海燕, 房祥军, 等. 不同成熟度杨梅酚酸的超声-微波协同优化提取及其抗氧化性对比[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 112–120.
- LIU M, GAO H Y, FANG X J, et al. Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction of phenolic acids from Chinese bayberries (*Morella rubra* Sieb. Et zucc) of different maturities and a comparative study of their antioxidant activities[J]. Food Science, 2021, 42(3): 112–120.
- [25] 尚凡贞, 刘瑞玲, 吴伟杰, 等. 无糖益生菌猕猴桃脯工艺优化及其营养风味分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 226–237.
- SHANG F Z, LIU R L, WU W J, et al. Process optimization of sugar-free probiotic preserved kiwifruit and analysis of nutritional flavor[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 226–237.
- [26] 宋艳丽, 郭继倩, 郭庆丰, 等. 可皆霉素的制备及抗凝血作用研究[J]. 西北药学杂志, 2020, 35(4): 481–484.
- SONG Y L, GUO J Q, GUO Q F, et al. Study on the preparation and anticoagulant effect of cochliodinol[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2020, 35(4): 481–484.
- [27] LIU L, DUAN J A, TANG Y P, et al. Taoren-Honghua herb pair and its main components promoting blood circulation through influencing on hemorheology, plasma coagulation, and platelet aggregation[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 139(2): 381–387.
- [28] TISS M, SOUIY Z, ABDELJELIL N B, et al. Fermented soy milk prepared using kefir grains prevents and ameliorates obesity, type 2 diabetes, hyperlipidemia and liver-kidney toxicities in HFFD-rats[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 67: 103869.
- [29] 杨青松, 陈小玲, 高路, 等. 水溶性红雪茶多糖体外结合胆酸盐能力的分析[J]. 中国食品添加剂, 2017, 9: 49–54.
- YANG Q S, CHEN X L, GAO L, et al. Analysis of bile salt-binding ability of water-soluble polysaccharide from *Lethariella* spp. *in vitro* [J]. Chinese Food Additives, 2017, 9: 49–54.
- [30] CAO J W, ZHANG Y, HAN L, et al. Number of galloyl moieties and molecular flexibility are both important in alpha-amylase inhibition by galloyl-based polyphenols[J]. Food & Function, 2020, 11(5): 3838–3850.
- [31] 王诗卉, 刘云. 茶叶儿茶素抑制剂对胰脂肪酶构效关系的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 104–107.
- WANG S H, LIU Y. Effect of (-)-Epigallocatechin-3-gallate as an inhibitor on the structure-activity relationship of pancreatic lipase[J]. Food Science, 2013, 34(9): 104–107.

High-Efficiency Extraction and *in Vitro* Bioactivity of Amygdalin from Peach Kernel

Huang Xinli^{1,2}, Wu Weijie^{2,3*}, Chen Hangjun², Fang Xiangjun², Han Yanchao², Mu Honglei², Niu Ben², Sun Peilong¹, Gao Haiyan^{2*}

¹School of Food Science and Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014

²Food Science Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Post-Harvest Handling of Fruits, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fruits and Vegetables Postharvest and Processing Technology Research of Zhejiang Province, Key Laboratory of Postharvest Preservation and Processing of Fruits and Vegetables, China National Light Industry, Hangzhou 310021

³State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Hangzhou 310021)

Abstract To extract amygdalin from the peach kernel, a by-product of white peach processing, and study its *in vitro* biological activities. A single-factor experiment was carried out under different drying methods. Based on microwave drying, the extraction process was optimized by response surface methodology. The study of anticoagulant, hypoglycemic and hypolipidemic activities of amygdalin were carried out by *in vitro* analysis, and the interaction between amygdalin and enzyme was studied by molecular docking. The optimal extraction conditions of amygdalin were as follows: ethanol volume fraction 81.43%, extraction temperature 68.91 °C and extraction time 20.00 min. Amygdalin prolonged the activated partial thromboplastin time and thrombin time, reduced the content of fibrinogen. Moreover, amygdalin inhibited the catalytic activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase. Meanwhile, it could combine with taurine cholate and glycine cholate. Molecular docking analysis showed that amygdalin from the peach kernel could form hydrogen bonds with hydrophilic amino acids of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase, which might change the molecular conformation of enzymes or form competitive inhibition with the substrate. Results indicated that amygdalin in the peach kernel showed effectively *in vitro* anticoagulant, hypoglycemic and hypolipidemic activities. The results of this study provide a reference for the efficient extraction of amygdalin in the peach kernel and the further utilization of peach kernel.

Keywords peach kernel; amygdalin; ultrasonic extraction; biological activity; molecular docking