

# 高速逆流色谱分离蓝靛果花色苷及其 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性研究

刘育颖<sup>1</sup>, 张源生<sup>2</sup>

(1. 吉安职业技术学院 现代农林工程学院, 吉安 343000;

2. 井冈山应用科技学院, 吉安 343200)

**摘要:** 以蓝靛果为原料, 利用高速逆流色谱法 (high-speed counter-current chromatography, HSCCC) 分离纯化蓝靛果花色苷 (anthocyanins from *Lonicera edulis*, ALE), 并结合紫外、高效液相色谱、液质联用和核磁等分析技术鉴定花色苷组分。结果表明分离 ALE 的 HSCCC 溶剂体系为 1-BU-MTBE-ACN-水-TFA, 2:2:1:5:0.01, V/V。利用该体系成功地从蓝靛果中分离得到矢车菊-3-O-芸香糖苷 (cyanidin-3-O-rutinoside, C3R), 其纯度和相对含量分别为 91.75% 和 98.13%。通过酶抑制和荧光光谱法研究 C3R 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用和荧光猝灭类型。结果发现 C3R 和阿卡波糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的  $IC_{50}$  分别为 30.85  $\mu$ mol/L 和 36.18  $\mu$ mol/L, 同时 C3R 能引起  $\alpha$ -葡萄糖苷酶发生内部荧光猝灭, 猝灭类型属于静态猝灭。因此本研究揭示了蓝靛果为开发  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂提供天然资源。

**关键词:** 高速逆流色谱; 蓝靛果; 结构鉴定; 矢车菊-3-O-芸香糖苷;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶

中图分类号: TS202.3/TS264.4 文献标识码: A 文章编号: 1006-2513 (2022) 07-0075-08

doi: 10.19804/j.issn1006-2513.2022.07.010

## Separation of anthocyanins from *Lonicera edulis* by high-speed counter-current chromatography and its inhibitory activity on $\alpha$ -glucosidase

LIU Yuying<sup>1</sup>, ZHANG Yuansheng<sup>2</sup>

(1. Modern Agriculture and Forestry Engineering College, Ji'an Vocational and

Technical College, Ji'an 343000; 2. Jinggang Mountains School of

Applied Science and technology, Ji'an 343200)

**Abstract:** Anthocyanins from *Lonicera edulis* were separated and purified by high-speed counter current chromatography (HSCCC), and was identified by UV, HPLC, HPLC-MS and NMR. HSCCC separation of anthocyanins from *Lonicera edulis* condition was: 1-BU-MTBE-ACN-water-TFA, 2:2:1:5:0.01,

收稿日期: 2021-10-01

基金项目: 江西省教育厅科技项目 (CJJ191442)。

作者简介: 刘育颖 (1974-), 女, 本科, 教授, 研究方向: 食品加工与保藏。

V/V. Using this system, cyanidin-3-O-rutinoside (C3R) was successfully isolated from anthocyanins of *Lonicera edulis*. The purity and relative content were 91.75% and 98.13%, respectively. Enzyme inhibition test and fluorescence spectroscopy was employed to study the inhibitory effect of C3R on  $\alpha$ -glucosidase and the type of fluorescence quenching. The research results indicated that  $IC_{50}$  of C3R and acarbose on the inhibition rate of glucosidase were 30.85 and 36.18, respectively. Meanwhile, C3R could lead to internal fluorescence quenching of glucosidase, which was a static quenching. Therefore, this study revealed that *Lonicera edulis* is a natural resource for the development of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors.

**Key words:** high-speed counter-current chromatography; *Lonicera edulis*; structure identification; cyanidin-3-O-rutinoside;  $\alpha$ -glucosidase

蓝靛果 (*Lonicera caerulea* L.) 是属于忍冬科、富含多酚、黄酮、维生素、花青素等营养物质的浆果<sup>[1]</sup>, 在我国的东北、华北和新疆等地区被广泛种植。花色苷是蓝靛果中最主要的活性组分之一, 大量研究数据表明蓝靛果花色苷 (anthocyanins from *Lonicera edulis*, ALE) 具有众多营养功效, 如抗氧化<sup>[2]</sup>、抗炎症<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>和降血糖<sup>[5]</sup>等, 一直受到食品及医药领域的密切关注。

蓝靛果作为提取花色苷的重要原料, 在提取过程中, 一些杂质也被提取出来, 在一定程度上会影响花色苷的活性<sup>[6]</sup>。为深入探究高纯度花色苷的生理生化作用, 对花色苷粗提物进行分离纯化是必不可少的。目前针对花色苷纯化主要采用传统的柱色谱分离技术, 该技术操作便捷, 但得到的花色苷单体达不到要求的高纯度<sup>[7]</sup>。高速逆流色谱 (high-speed counter-current chromatography, HSCCC) 技术是一种新兴的液-液分离技术, 它无需使用固定相作为载体, 能够避免由于化合物不可逆吸附而导致的损失, 在工业化大规模分离纯化天然产物时广泛应用<sup>[8]</sup>。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶可水解低聚糖产生  $\alpha$ -D-葡萄糖, 被吸收后入血, 进而导致餐后血糖水平升高<sup>[9]</sup>。通过抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性可以从源头上阻碍葡萄糖的产生, 能够有效降低餐后血糖水平, 是治疗 II 型糖尿病的一种主要途径。临床上采用阿卡波糖、米格列醇和二甲双胍等抑制剂来降低餐后血糖水平来治疗或预防 II 型糖尿病, 长期服用这些抑制剂会造成耐药性增加, 同时产生明显的毒副作用。近年来研究表明天然来源的

黄酮类化合物能有效抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性, 无毒副作用<sup>[10-11]</sup>。吴莹<sup>[12]</sup>研究发现不同来源的花色苷提取物能显著抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性, 推测与花色苷单体种类和含量有关。但目前关于采用 HSCCC 分离 ALE 单体及其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的研究鲜见报道。鉴于此, 本研究采用 HSCCC 分离 ALE 单体, 并通过紫外、高效液相色谱、液质联用和核磁鉴定花色苷结构; 在此基础上, 通过采用酶抑制和荧光光谱法探究单体花色苷对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蓝靛果: 在 2020 年 8 月购于东北长白山地区, 将新鲜蓝靛果洗净后置于料理机中破壁粉碎, 将处理后的果浆放在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷藏 12h, 然后用真空冷冻干燥机将预冷后的果浆冻干, 最后将干燥后的蓝靛果果粉密封置于  $-18^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

甲基叔丁基醚 (Methyl tert-butyl ether, MTBE): 上海柏卡化学技术有限公司; 乙腈 (Acetonitrile, ACN): 上海安谱实验科技股份有限公司; 正丁醇 (1-butane, 1-BU): 上海脉铂医药科技有限公司; 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA): 南京草本源生物科技有限公司; 对硝基苯酚: 北京迈瑞达科技有限公司; 对硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷: 南京都莱生物技术有限公司;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (50U/mg, 68.5kDa, 酿酒酵母): 重庆昊曠科技有限责任公司; 甲酸、甲醇和乙醇 (分析纯): 重庆跃翔化工有限公司。

### 1.2 仪器与设备

Scientz-5T 超声提取仪：宁波新芝超声设备；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；LC-8000 高效液相色谱仪：上海天普分析仪器；KH23A 台式高速离心机：湖南凯达科学仪器；TBE-300C 高速逆流色谱仪：上海同田生物；Advance 400MHz 核磁共振谱仪：德国布鲁克公司；SHB-B95 循环水式多功能真空泵：南通普瑞科技仪器；SARTORIUS 电子天平：北京赛多利斯仪器；Q-6 双光束紫外可见分光光度计，上海元析仪器。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 ALE 粗提物制备

在预实验的基础之上，以浓度为 60% (v/v) 乙醇作为提取剂，准确量取质量为 100g 干燥后的蓝靛果粉末，按照固液比 1:25 加入提取剂使其充分溶解，将溶解后的混合物置于超声提取仪中，设定相关参数为超声功率 300W、时间 30min 和温度 45℃，进行提取实验。提取完成后，将过滤后获得滤液装在干净容器中，剩余的残渣再利用相同的流程提取 3 次，合并集中每次过滤后的滤液。将滤液在温度 40℃ 旋转蒸发仪进行浓缩，在浓缩液加入等体积的乙酸乙酯萃取 3 次，收集下层水相，在温度 40℃ 条件下，将水相进行浓缩，然后在冷冻干燥机中冻干，即获得 ALE 粗提物。

#### 1.3.2 HSCCC 系统选择

参考并改进文献<sup>[13]</sup>的方法，HSCCC 溶剂体系由 1-BU-MTBE-ACN-水-TFA 组成，将上述溶剂按照不同的体积比进行配制，充分震荡使其上下分层，设定上相和下相分别为固定相和流动相。依据化合物在两相溶剂中的分配系数不同，筛选出最合适的 HSCCC 溶剂体系。准确称取 10mg 干燥后的 ALE 粗提物粉末，在 10mL 上相和 10mL 下相中分别溶解，充分摇匀使体系静置产生分层，将上、下两相进行分离，分别从中各取出 1mL，用微孔滤膜（孔径 0.45μm）进行过滤。过滤后的滤液用 HPLC 进行检测，根据 (1) 式计算溶剂分配系数。

$$K = \frac{A_{\text{上相化合物峰面积}}}{A_{\text{下相化合物峰面积}}} \quad (1)$$

#### 1.3.3 HSCCC 分离

分离 ALE 的 HSCCC 溶剂体系是基于 1.3.2

筛选出来的最佳溶剂配比，溶剂体系静置过夜两相分离，然后超声脱气 30 min。其余操作步骤参考文献 [14]，检测波长为 254 nm，依据 HSCCC 分离结果，将分离之后的 ALE 粗提物组分以 F1、F2、F3 和 F4 进行命名，统一收集后冻干，获得各组分的干燥粉末，在 -18℃ 温度下保存备用。

#### 1.3.4 分离物鉴定

**1.3.4.1 紫外光谱扫描** 准确称取 1.0mg 的 F1、F2、F3 和 F4 样品粉末，再将粉末分别配制成 0.1mg/mL (w/v) 溶液，量取 1.0mL 样品溶液置于样品池中，于波长 200 ~ 700nm 的范围内利用紫外可见分光光度计进行紫外光谱扫描，记录并分析 F1、F2、F3 和 F4 各样品的紫外光谱特征。

**1.3.4.2 HPLC 分析** 样品前处理：准确称取 1.0mg 样品 F3（目标物）于试管中，缓慢加入 1mL 事先混合均匀的 HCl-甲醇溶液，配制成质量浓度 0.1mg/mL 样品溶液，然后用微孔滤膜（孔径 0.45μm）进行过滤，再将滤液进行 HPLC 分析。

色谱条件：C18 柱（6.0mm × 150mm，5.0μm）；设定流动相 A 为体积分数 20% 甲酸，流动相 B 为体积分数 60% 乙腈。洗脱程序如下：5% ~ 20%，5min；20% ~ 25%，10min；25% ~ 30%，5min；30% ~ 33%，15min；33% ~ 5%，10min。其它参数设定参考文献 [13]，依据式 (2) 计算 F3（目标物）的纯度。

$$p(\%) = \frac{\lambda_{\text{校正因子}} A_{\text{峰面积}}}{\sum \lambda_{\text{校正因子}} A_{\text{峰面积}}} \quad (2)$$

**1.3.4.3 HPLC-MS 分析** 质谱条件：利用正离子扫描方式对 F3 进行质谱扫描，设定质谱扫描范围为 100 ~ 1000m/z，依据文献 [14] 设定其它相关参数。

**1.3.4.4 NMR 鉴定** 样品前处理：以氘代甲醇作为溶剂使质量为 5.0mg 的 F3 样品粉末充分溶解，用微孔滤膜（孔径 0.45μm）进行过滤，将滤液通过 400MHz 核磁共振谱仪对 F3 的 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 谱图进行分析。

#### 1.3.5 α-葡萄糖苷酶抑制活性实验

采用 α-葡萄糖苷酶水解对硝基苯-α-D-吡喃葡萄糖苷可产生对硝基苯酚，对硝基苯酚在

405nm 波长条件下具有最大的吸收峰。按照文献 [14] 中提供的方法, 分别量取 1mL 活性单位为 0.2U/mL 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶于试管中, 然后加入 1mL 浓度为 10、20、30、40 和 50 $\mu$ mol/L 的 F3 (矢车菊素-3-O-芸香糖苷, cyanidin-3-O-rutinoside, C3R) 溶液和阿卡波糖样品溶液, 并将二者混匀, 其余操作均按文献 [14] 的方法进行。依据 (3) 式计算样品对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率。

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (3)$$

### 1.3.6 荧光光谱测定

按照 Zeng L 等 [15] 提出的方法, 分别将 1mL 浓度为 10、20、30、40 和 50 $\mu$ mol/L 的 F3 溶液与 4mL 活性单位为 0.2U/mL 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶液混合均匀, 在 25 $^{\circ}$ C 温度下充分反应 10min, 利用荧光光谱仪在波长 320 ~ 380nm 范围内进行扫描, 同时将激发波长设定为 295nm, 发射和激发的狭缝宽度设定为 10nm。

### 1.3.7 C3R 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶荧光猝灭类型判断

参照文献 [16] 的方法, 考察不同温度 (25、30 和 37 $^{\circ}$ C) 条件下, 不同质量浓度 C3R 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶内部荧光强度的影响, 采用 Stern-Volmer 方程进行分析。

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (4)$$

式中,  $F_0$  和  $F$  分别为在无猝灭剂和有猝灭剂下反应体系的荧光强度, au;  $K_q$  和  $K_{sv}$  分别为  $\alpha$ -葡萄糖苷酶猝灭速率和 Stern-Volmer 猝灭常数;  $\tau_0$  为荧光分子寿命, s。

## 2 结果与分析

### 2.1 HSCCC 溶剂体系的确定

合适的 HSCCC 溶剂体系和配比是成功分离化合物最重要的因素之一, 参考文献 [13], 选取 1-BU-MTBE-ACN-水-TFA 为 HSCCC 溶剂体系, 依据 K 值确定最佳的溶剂体系配比, 不同溶剂配比的 K 值结果如表 1 所示。

表 1 不同溶剂体系配比的 K 值  
Table 1 K values in different solvent systems

编号	1-BU-MTBE-ACN-水-TFA	K 值			
		F1	F2	F3	F4
1	2 : 2 : 1 : 5 : 0.01	0.57 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	1.94 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.12 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	1.63 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
2	3 : 2 : 1 : 5 : 0.01	0.80 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.86 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.79 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
3	3 : 1 : 1 : 5 : 0.01	1.06 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.99 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
4	5 : 2 : 1 : 5 : 0.01	0.97 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
5	5 : 3 : 1 : 5 : 0.01	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.87 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.94 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>

注: 含有相同小写字母的各组分没有显著差异 ( $P > 0.05$ ), 含有完全不同小写字母的各组分有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

由表 1 可知, 溶剂体系 2 和 3 所得的 K 值无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 说明利用溶剂体系 2 和 4 无法满足花色苷组分的分离, 故溶剂体系 2 和 4 不符合 HSCCC 溶剂体系配比。溶剂体系 3 的 K 值均在 0.5 ~ 2.0 范围内, 符合 HSCCC 溶剂体系配比, 但在该体系下, 所得的 F1、F2 和 F3 的 K 值无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 说明 F1、F2 和 F3 无法分开, 故体系 3 不合作花色苷组分的 HSCCC 溶剂体系。溶剂体系 5 中 F1 和 F3 的 K 值均低于 0.5, 分离效果较差。溶剂体系 1 中 F1、F2、F3 和 F4 的 K 值均在 0.5 ~ 2.0 范围内,

且 4 个组分的 K 值存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 说明在该溶剂体系下, 各组分得到较好的分离。因此, 本研究选择溶剂体系 1 (1-BU-MTBE-ACN-水-TFA, 2 : 2 : 1 : 5 : 0.01, V/V) 作为分离 ALE 的 HSCCC 溶剂体系。该研究结果与 Chen L [17] 等利用 HSCCC 法从蓝果忍冬中快速分离花色苷所用 HSCCC 溶剂体系一致。

### 2.2 HSCCC 分离纯化结果

依据 2.1 的实验结果, 选取 1-BU-MTBE-ACN-水-TFA (2 : 2 : 1 : 5 : 0.01, V/V) 为最佳的溶剂体系, 图 1 所示为分离结果, 经

HSCCC 分离后得到 4 种组分 (为 F1、F2、F3 和 F4), 且分离效果较好, 此时固定相保留率为

63.85%。该结果显示 HSCCC 溶剂体系选择合理, 利用该条件进行花色苷分离的效果较佳。

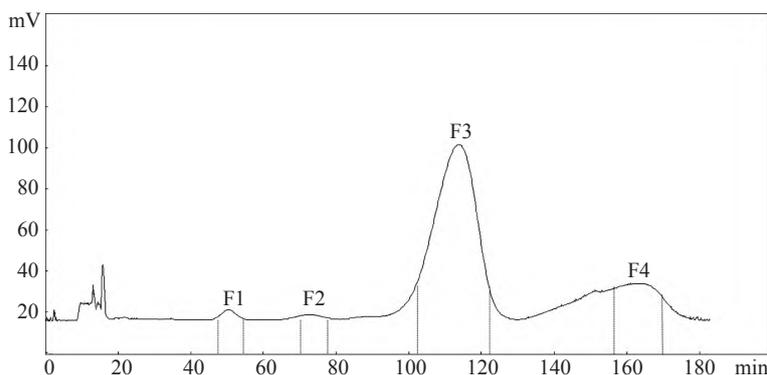


图 1 HSCCC 分离 ALE 提取物的色谱图

Figure 1 Chromatogram of anthocyanin extracts from *Ionicera edulis* separated by HSCCC

### 2.3 紫外光谱分析

花色苷在波长 280nm 和 520nm 左右具有紫外吸收峰, 基于这一特性可以判断所分离得到的组分是否属于花色苷类物质<sup>[18]</sup>。在波长 200 ~ 700nm 范围内进行紫外光谱扫描, 得到的图谱如图 2 所示, F1、F2 和 F4 在波长 280nm 和 520nm

左右无紫外吸收峰, 表明 F1、F2 和 F4 这三种组分不属于花色苷类物质。图 2C 显示, F3 在波长 278nm 和 524nm 处有紫外吸收峰, 这间接表明 F3 为花色苷类物质。后续进一步利用 HPLC、HPLC-MS 和 NMR 鉴定 F3 结构。

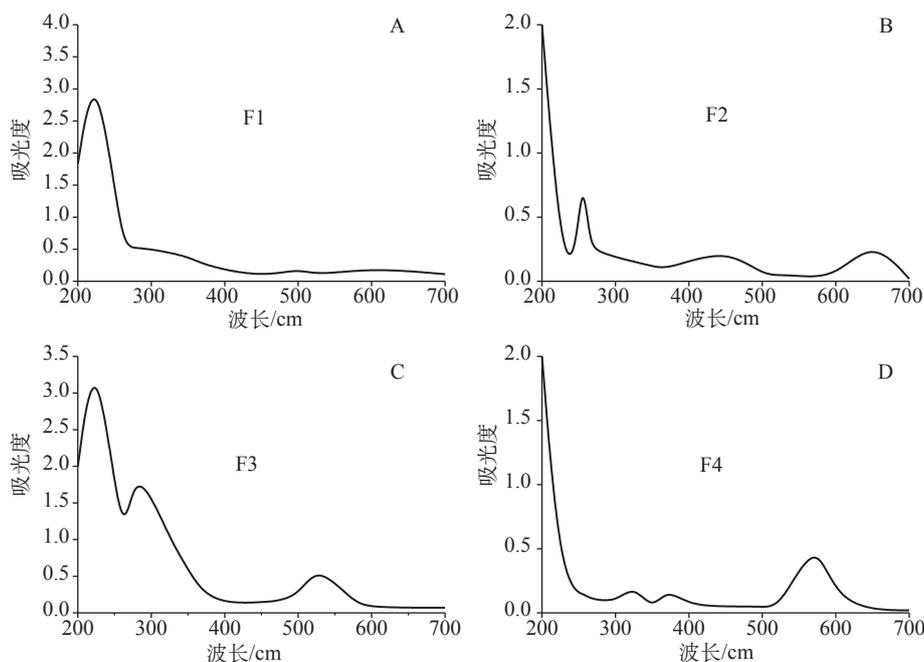


图 2 F1、F2、F3 和 F4 的紫外吸收光谱图

Figure 2 UV absorption spectra of F1, F2, F3 and F4

### 2.4 HPLC 分析

为了对 F3 组分的结构进行鉴定, 首先采用

HPLC 分析, 结果如图 3 所示, F3 含有一个主峰, 且出峰时间为 20.15min。依据式 (2) 计算 F3 的

纯度为 91.75%，其相对含量为 98.13%。在此基础上，进一步利用 HPLC-MS 和 NMR 鉴定其结构。

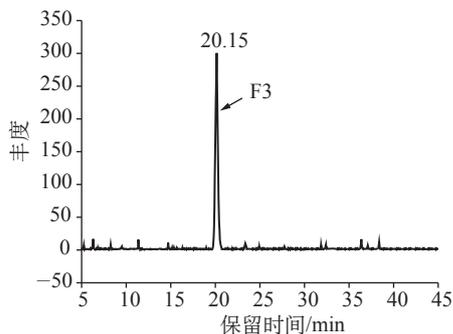
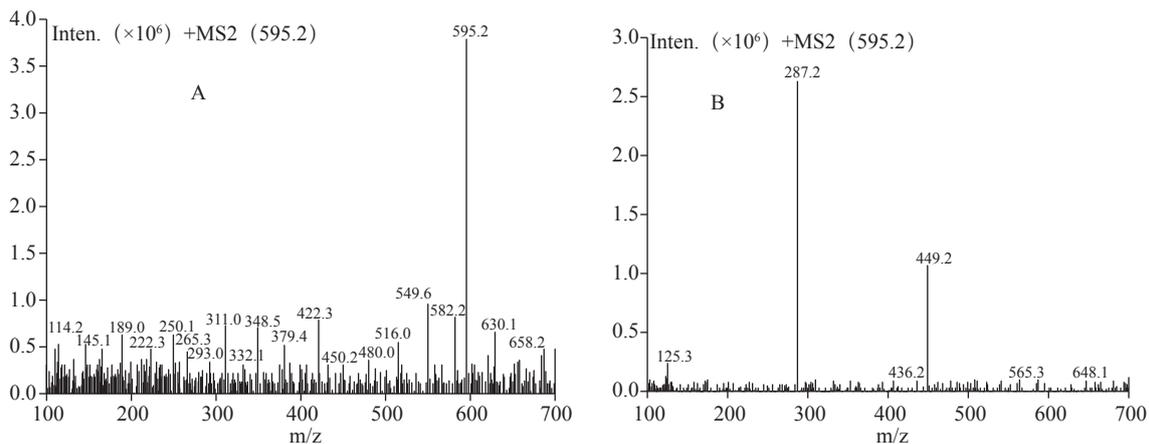


图 3 F3 的 HPLC 色谱图  
Figure 3 HPLC chromatogram of F3



注：(A)：F3 一级质谱；(B)：F3 二级质谱

图 4 F3 的质谱图和核磁图

Figure 4 Mass spectra and nuclear magnetic spectra of F3

表 2 F3 的  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据  
Table 2  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR results of F3

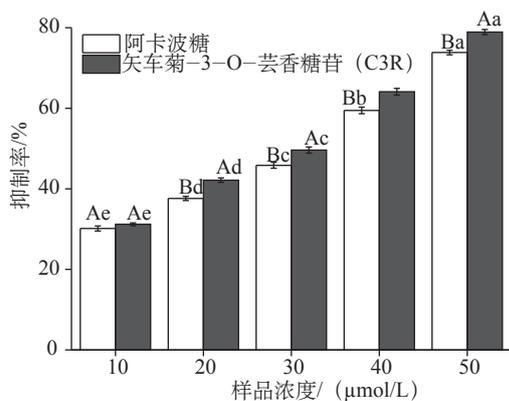
位置	F3	
	$^1\text{H}$ NMR (400 MHz)	$^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz)
2		162.8
3		144.2
4	8.97 (1H, s)	134.7
5		157.6
6	6.70 (1H, d, J=1.8 Hz)	102.0
7		168.9
8	6.92 (1H, d, J=1.8 Hz)	93.7
9		156.2
10		115.9

位置	F3	
	$^1\text{H}$ NMR (400 MHz)	$^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz)
1'		119.8
2'	8.05 (1H, d, J=1.9 Hz)	116.9
3'		146.0
4'		154.4
5'	7.05 (1H, dd, J=8.7, 1.9 Hz)	111.8
6'	8.31 (1H, d, J=8.7, 1.9 Hz)	127.0
1''	5.31 (1H, d, J=7.7 Hz)	101.9
2''		73.2
3''		76.5
4''	3.93 ~ 3.37 (8H, m)	69.7
5''		75.9
6''	4.67 (2H, s,)	66.3

位置	F3	
	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz)	<sup>13</sup> C NMR (100 MHz)
1'''	4.08 (1H, d, J=11.1 Hz)	100.7
2'''		70.4
3'''		70.9
4'''		72.4
5'''		68.3
6'''	1.18 (3H, d, J=1.5 Hz)	16.4

## 2.6 α-葡萄糖苷酶抑制效果

阿卡波糖一般作为抑制α-葡萄糖苷酶的阳性药物,本研究将阿卡波糖作为对照,探究不同浓度C3R对α-葡萄糖苷酶抑制效果,用以评价C3R对α-葡萄糖苷酶的抑制效果。研究结果如图5所示,在10~60μmol/L的浓度范围内,α-葡萄糖苷酶抑制率随着C3R和阿卡波糖浓度的增加也在显著增加( $P < 0.05$ )。当浓度达到60μmol/L时,C3R和阿卡波糖对α-葡萄糖苷酶的抑制率分别为 $78.92 \pm 0.62\%$ 和 $73.84 \pm 0.57\%$ 。对上述实验数据进行非线性拟合并计算得到C3R和阿卡波糖对α-葡萄糖苷酶的 $IC_{50}$ (半抑制浓度,50% Inhibiting Concentration)分别为30.85、36.18μmol/L。由此对比可知,C3R对α-葡萄糖苷酶抑制效果显著高于阿卡波糖,因此后续选择C3R进一步探究与α-葡萄糖苷酶的相互作用。



注:含有相同字母的各组间没有显著差异( $P > 0.05$ ),含有完全不同字母的各组间有显著差异( $P < 0.05$ )。

图5 C3R和阿卡波糖对α-葡萄糖苷酶抑制率的影响  
Figure 5 Effect of C3R and acarbose on inhibition rate of α-glucosidase

## 2.7 荧光光谱分析

图6所示为0~60μmol/L浓度范围内C3R

对α-葡萄糖苷酶内部荧光强度的影响结果,图中荧光强度随C3R浓度的增加而降低,在最大波长为339nm时,荧光强度未发生移动。该结果表明C3R与α-葡萄糖苷酶之间的相互作用使得α-葡萄糖苷酶内部荧光发生了猝灭,这与戴涛涛<sup>[2]</sup>的研究结果类似。

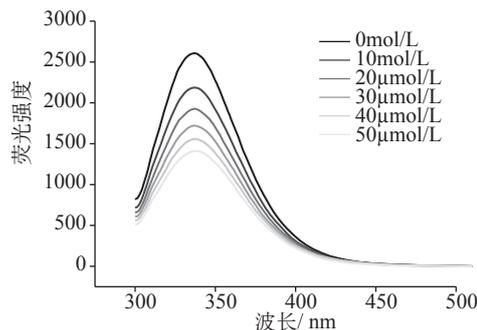


图6 在25°C条件下,C3R对α-葡萄糖苷酶荧光强度的影响

Figure 6 Effect of C3R on fluorescence intensity of α-glucosidase at 25°C

## 2.8 C3R与α-葡萄糖苷酶的猝灭类型分析

在温度为25、30和37°C条件下,C3R对α-葡萄糖苷酶的荧光猝灭Stern-Volmer曲线如图7所示。由图7可知,不同温度下,Stern-Volmer方程线性拟合较好, $R^2$ 均在0.97以上,同时曲线斜率随温度的升高而降低。分析对应的数据其结果如表3所示。由表3可知,在25、30和37°C条件下, $K_{sv}$ 分别为 $(6.85 \pm 0.03) \times 10^3$ 、 $(5.25 \pm 0.04) \times 10^3$ 和 $(4.27 \pm 0.02) \times 10^3$  L/mol。 $K_{sv}$ 随

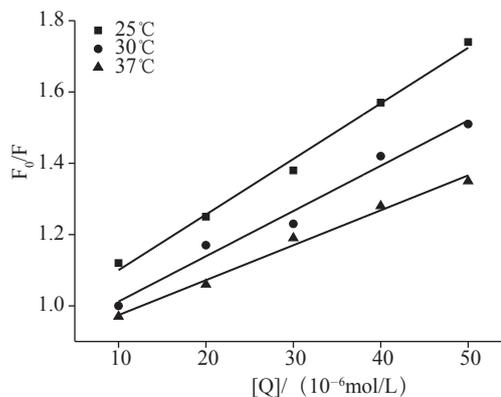


图7 C3R对α-葡萄糖苷酶荧光猝灭的Stern-Volmer曲线

Figure 7 Stern-Volmer curve of fluorescence quenching of α-glucosidase by C3R

温度升高而降低。说明 C3R 引起  $\alpha$ -葡萄糖苷酶发生静态猝灭。此外,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶最小的  $K_q$  为  $(4.27 \pm 0.02) \times 10^{11} \text{ L/mol} \cdot \text{S}^{-1}$ , 最小的  $K_q$  远大于最大动态  $K_q$  ( $2 \times 10^{10} \text{ L/mol} \cdot \text{S}^{-1}$ )。实验结果进一步说明 C3R 可使  $\alpha$ -葡萄糖苷酶发生静态荧光猝灭。

表 3 不同温度下 C3R 与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的猝灭和结合常数

Table 3 Quenching and binding parameters of C3R on  $\alpha$ -glucosidase at different temperatures

样品	温度 / ℃	$K_{sv}$ ( $10^3 \text{ L/mol}$ )	$K_q$ ( $10^{11} \text{ L/mol} \cdot \text{S}^{-1}$ )	$R^2$
$\alpha$ -葡萄糖苷酶	25	$6.85 \pm 0.03$	$6.85 \pm 0.03$	0.9896
	30	$5.25 \pm 0.04$	$5.25 \pm 0.04$	0.9713
	37	$4.27 \pm 0.02$	$4.27 \pm 0.02$	0.9824

### 3 结论

本研究确定了分离 ALE 提取物的 HSCCC 溶剂体系为 1-BU-MTBE-ACN-水-TFA, 2:2:1:5:0.01, V/V, 利用该体系成功地从 ALE 提取物中分离得到矢车菊-3-O-芸香糖苷 (C3R), 其纯度和相对含量分别为 91.75% 和 98.13%。对比发现 C3R 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率显著高于阳性药阿卡波糖, 同时 C3R 能引起  $\alpha$ -葡萄糖苷酶发生内部荧光猝灭, 猝灭类型属于静态猝灭。研究结果为蓝靛果开发功能性食品和保健品提供重要的参考价值。

#### 参考文献:

[1] 唐敬思, 王红梅, 佟猛, 等. 蓝靛果忍冬花色苷的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41 (16): 220-224.  
[2] 李凤凤. 蓝靛果花色苷提取、抗氧化性研究及饮料研制 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.  
[3] 张聪, 张彦龙, 白龙林, 等. 响应面优化超声波辅助提取蓝靛果花色苷及抗炎活性研究 [J]. 生物技术, 2020, 30 (5): 473-480, 443.  
[4] 刘奕琳, 王振宇. 蓝靛果花色苷乙醇洗脱物抗癌活性的研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33 (19): 159-161, 352.  
[5] 焦岩, 王振宇. 蓝靛果花色苷对高脂膳食诱导肥胖大鼠脂代谢和抗氧化能力的影响 [J]. 食品科学, 2010, 31 (3): 230-234.  
[6] 刘静波, 陈晶晶, 王二雷, 等. 蓝莓果实中花色苷单体的色谱分离纯化 [J]. 食品科学, 2017, 38 (2): 206-213.  
[7] Englert M, Kaiser C, Schwack W, et al. Isolation of (five)

steviol glycosides from a *Stevia rebaudiana* formulation by gradient elution countercurrent chromatography [J]. Chromatographia, 2016, 79 (5-6): 275-284.  
[8] Yang J, Gu D Y, Ji Z N, 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.  
[9] Chen H, Ouyang K H, Jiang Y, et al. Constituent analysis of the ethanol extracts of *Chimonanthus nitens* Oliv. leaves and their inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 98: 829-836.  
[10] Chen J, Wu Y C, Zou J W, et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and the flavonoid derivatives [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2016, 24 (7): 1488-1494.  
[11] Yang B, Liu H L, Yang J L, et al. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 79: 116-124.  
[12] 吴莹. 不同来源花色苷提取物的结构差异谱及其降糖降脂作用评价 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.  
[13] Xue H K, Tan J Q, Zhu X H, et al. Counter-current fractionation-assisted and bioassay-guided separation of active compounds from cranberry and their interaction with  $\alpha$ -glucosidase [J]. LWT, 2021, 145: 111374.  
[14] 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.  
[15] Zeng L, Zhang G W, Liao Y J, et al. Inhibitory mechanism of morin on  $\alpha$ -glucosidase and its anti-glycation properties [J]. Food & Function, 2016, 7 (9): 3953-3963.  
[16] 屠洁, 刘冠卉, 朱淑云, 等. 5-二十烷基间苯二酚抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的分子机制 [J]. 食品科学, 2017, 38 (19): 116-121.  
[17] Chen L, Xin X L, Lan R, et al. Isolation of cyanidin 3-glucoside from blue honeysuckle fruits by high-speed counter-current chromatography [J]. Food Chemistry, 2014, 152: 386-390.  
[18] 王卫东, 李超, 许时婴. 高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定黑莓花色苷 [J]. 食品科学, 2009, 30 (14): 230-234.  
[19] Choi S J, Choi J, Lee C U, et al. Rapid separation of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside from crude mulberry extract using high-performance countercurrent chromatography and establishment of a volumetric scale-up process [J]. Journal of Separation Science, 2015, 38 (11): 1828-1836.  
[20] Choi S J, Choi J, Jeon H, et al. Application of high-performance countercurrent chromatography for the isolation of steroidal saponins from *Liriope platyphylla* [J]. Journal of Separation Science, 2015, 38 (1): 18-24.  
[21] Xue H K, Tan J Q, Li Q, et al. Optimization ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of anthocyanins from raspberry using response surface methodology coupled with genetic algorithm [J]. Foods: Basel, Switzerland, 2020, 9 (10): 1409.  
[22] 戴涛涛. 蛋白-多酚复合物相互作用及其对蛋白质性质的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2020.