

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2020.01.022

微透析/液相色谱-质谱联用筛选黄芩中 α -葡萄糖苷酶抑制剂

庞博^{1,2}, 王倩倩³, 刘舒¹, 刘志强¹, 宋凤瑞^{1,2*}

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心 & 吉林省中药化学与质谱重点实验室, 吉林 长春 130022;
2. 中国科学技术大学 应用化学与工程学院, 安徽 合肥 230026; 3. 南开大学 药物化学
生物学国家重点实验室, 天津 300457)

摘要: 应用微透析/液相色谱-质谱联用法筛选黄芩中 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 并对筛选出的具有酶抑制活性的化合物进行结构鉴定。实验采用迪马 C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 以 0.5% 醋酸水-乙腈溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 以正离子电喷雾质谱模式采集数据, 从黄芩中筛选出 10 种潜在的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 10 种化合物与 α -葡萄糖苷酶的结合率为 36.18% ~ 52.71%。该方法可快速、有效地筛选黄芩中的 α -葡萄糖苷酶的抑制剂, 同时可为从其他中药中筛选酶抑制剂提供方法学借鉴。

关键词: 黄芩; α -葡萄糖苷酶; 微透析; HPLC-MSⁿ; 抑制剂

中图分类号: O657.6; O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2020)01-0157-05

Screening of α -Glucosidase Inhibitors in *Scutellaria Baicalensis* by Liquid Chromatography - Mass Spectrometry with Microdialysis

PANG Bo^{1,2}, WANG Qian-qian³, LIU Shu¹, LIU Zhi-qiang¹, SONG Feng-rui^{1,2*}

(1. National Center of Mass Spectrometry in Changchun, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Chemistry and Mass Spectrometry Jilin Province, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China; 2. School of Applied Chemistry and Engineering, University of Science and Technology for China, Hefei 230026, China; 3. State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300457, China)

Abstract: A liquid chromatography - mass spectrometry with microdialysis was used to screen potential α -glucosidase inhibitors in the extracts of *Scutellaria baicalensis* and identify the structures of those bioactive components screened. The chromatographic separation was carried out on a Dikma C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m) by gradient elution with 0.5% acetic acid solution - acetonitrile as mobile phases at a flow rate of 0.5 mL/min and a column temperature of 30 $^{\circ}$ C. Mass spectrometry analysis and data acquisition were conducted in the positive ion mode. In this work, ten potential α -glucosidase inhibitors in *Scutellaria baicalensis* were found and identified simultaneously. The binding degrees of 10 compounds with α -glucosidase ranged from 36.18% to 52.71%. With the advantages of rapidness, high throughput and effectiveness, this method could screen α -glucosidase inhibitors in *Scutellaria baicalensis* and provide valuable information for screening α -glucosidase inhibitors from other traditional Chinese medicines.

Key words: *Scutellaria baicalensis*; α -glucosidase; microdialysis; HPLC-MSⁿ; inhibitor

黄芩为我国著名传统中药, 始载于《神农本草经》, 为唇形科多年生草本植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。中医认为黄芩性寒味苦, 具有清热解毒、止血、安胎等功效, 对湿热痞满、黄疸、痈肿疮毒、肺热咳嗽、高热烦渴等有良好疗效^[1]。黄芩中含有多种活性成分, 黄酮类化合物作为其中的主要成分, 包括黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 等。随着对黄芩药理作用研究的不断深入, 发现黄芩具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤和保护心血管等作用^[2-4]。此外, 近期研究也发现黄芩具有较好的降血糖及治疗糖尿病并发症的作用^[5-6]。 α -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.20,

收稿日期: 2019-09-30; 修回日期: 2019-11-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21673219, 81373952)

* 通讯作者: 宋凤瑞, 研究员, 研究方向: 药物分析及中药代谢、代谢组学研究, E-mail: songfr@ciac.ac.cn

α -Glucosidase) 在生物体内分布广泛, 在机体的多种生理过程中起着关键作用, 包括消化、糖蛋白合成、多糖及糖复合物的合成与分解等^[7]。有文献报道, α -葡萄糖苷酶与许多因代谢紊乱失调而引发的疾病(如糖尿病、肥胖症、癌症以及病毒感染等^[8])密切相关。 α -葡萄糖苷酶抑制剂则对该酶有很强的抑制作用, 通过在小肠局部发挥作用, 可有效延缓饮食中碳水化合物的吸收, 使餐后血糖峰值低平, 趋于稳定, 从而降低血浆中的糖化血红蛋白水平, 发挥治疗糖尿病的作用^[9]。目前, 已有 α -葡萄糖苷酶抑制剂类化学药物在临床上用于治疗糖尿病, 而中药资源丰富、高效低毒, 具备筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的天然优势^[10-11]。本研究以 α -葡萄糖苷酶为生物靶点, 利用微透析/液相色谱-质谱联用技术, 通过比较与生物靶分子结合前后溶液中处于游离状态药物浓度的变化来推断药物与靶分子之间的结合强度。同时, 透析液可以无需任何前处理步骤直接进行液相色谱-质谱联用分析。利用该方法从黄芩提取物中筛选出 10 种 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 并对其结构进行了鉴定, 为进一步研究黄芩治疗糖尿病的作用机制、新药研发, 以及从其他中药中筛选酶抑制剂提供科学依据。

1 实验部分

1.1 样品、试剂与仪器

α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20, Sigma, USA); 醋酸铵购于 Sigma Chemical 公司(St. Louis, MO, USA); 实验用水为 Milli-Q 超纯水; 乙腈、乙酸(色谱级)购自美国 Fisher 公司; 中药材黄芩购自北京同仁堂长春药店并经长春中医药大学王淑敏教授鉴定。黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品购于中国食品药品检定研究院, 千层纸素 A 对照品购于上海融禾医药科技发展有限公司。

HX-200A 型高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂); 微透析系统: 灌注器推进泵(CMA 402 Syringe Pump)、灌注器(CMA 1.0 mL, MS-GAN100)、MAB85 样品自动收集器、取样探针 MAB 7.8.10(截留分子量 15 kD, 膜长 10 mm)购自 Microbiotech/se AB 公司; Waters H-class 液相色谱仪(美国 Waters 公司); LTQ XL 线性离子阱液相色谱-质谱联用仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 黄芩水提物的制备 黄芩粉碎后称取药材粉末 25 g, 加入 10 倍体积水浸泡 20 min, 加热回流提取 45 min, 过滤, 残渣在相同条件下提取 30 min, 合并 2 次提取液, 旋转蒸发浓缩至 0.5 g/mL 后冷冻干燥。所得黄芩提取物冻干粉末用甲醇溶解后制得生药质量浓度为 100 mg/mL 的储备液, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 备用。

1.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 适量, 用甲醇溶解并定容配成 1.0 mg/mL 对照品储备液, 再用甲醇稀释各对照品储备液制得质量浓度均为 50 μ g/mL 的混合对照品溶液, 备用。

1.2.3 微透析筛选方法 在 EP 管中添加适量 α -葡萄糖苷酶液、黄芩提取物溶液和 10 mmol/L NH_4AC 缓冲溶液(pH 6.8), 总反应体系为 1.5 mL, 黄芩提取物终浓度约为 5 mg/mL, 酶浓度约为 10 U/mL, 混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 30 min。然后将反应体系取出, 插入探针, 在 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速下, 以反应体系缓冲液(含 10% 甲醇)灌流, 平衡 90 min 后采集样品, 每 40 min 采集一次, 平行采集 4 个样品后直接用于 LC-MSⁿ 分析。以相同体积的 10 mmol/L NH_4AC 缓冲液代替酶液作为空白对照组, 空白对照组中其他溶液的加入量及处理、透析方法与上述相同。另外制备与空白对照组完全相同的样品用于提取物中成分的回收率测定, 该样品不经过透析, 直接进行 LC-MSⁿ 分析。

1.2.4 色谱-质谱条件 液相色谱条件: 迪马 C₁₈ 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流速 0.5 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为乙腈(A)-0.5% 醋酸水溶液(B), 梯度洗脱程序: 0~10 min, 27%~35% A; 10~20 min, 35%~50% A; 20~25 min, 50%~60% A; 25~30 min, 60%~80% A; 30~35 min, 80%~100% A; 进样量 10 μL 。

质谱条件: 电喷雾离子源, 正离子检测模式, 扫描范围为 m/z 100~1 000, 喷雾电压 5.0 kV, 毛细管温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气流速(N_2) 45 L/h, 辅助气流速 90 L/h, 金属毛细管电压 32 V。

2 结果与讨论

2.1 黄芩与 α -葡萄糖苷酶的相互作用

图1为黄芩提取物与 α -葡萄糖苷酶相互作用以及不加酶的空白对照的液相色谱图。由图1可以看出在微透析筛选实验条件下,黄芩提取物中仅部分化合物能够与 α -葡萄糖苷酶结合,通过比较峰面积的变化情况筛选出10种成分可以与 α -葡萄糖苷酶产生相互作用(表1)。

2.2 黄芩中与 α -葡萄糖苷酶结合的化合物结构鉴定

通过LC-MSⁿ分析对黄芩提取物中10种潜在的 α -葡萄糖苷酶抑制剂成分进行结构鉴定,其保留时间、色谱峰归属以及ESI-MSⁿ数据见表1。

表1 黄芩提取物中与 α -葡萄糖苷酶结合化合物的鉴定

Table 1 Identification of compounds binding to α -glucosidase in *Scutellaria baicalensis* extract

| Peak No. | t_R (min) | $[M + H]^+$ | MS ⁿ (m/z) | Compounds |
|----------|-------------|-------------|---|---|
| 1 | 3.91 | 549 | MS ² [549]: 531, 513, 495, 465, 441 | Chrysin-6-C-arabinosyl-8-C-glucoside (白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷) |
| 2 | 4.36 | 549 | MS ² [549]: 531, 513, 483, 465, 441 | Chrysin-6-C-glucosyl-8-C-arabinoside (白杨素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷) |
| 3 | 8.52 | 447 | MS ² [447]: 271, 253, 225, 169; MS ³ [271]: 253, 225, 169 | Baicalin(黄芩苷) |
| 4 | 10.76 | 447 | MS ² [447]: 271, 253, 225, 169; MS ³ [271]: 253, 225, 169 | Wogonin-5-O-glucoside (汉黄芩素-5-O-葡萄糖苷) |
| 5 | 11.31 | 461 | MS ² [461]: 285, 270; MS ³ [285]: 270, 168 | Oroxylin A-7-O-glucuronide (木蝴蝶素-7-O-葡萄糖醛酸苷) |
| 6 | 13.00 | 461 | MS ² [461]: 285, 270; MS ³ [285]: 270, 131 | Wogonoside(汉黄芩苷) |
| 7 | 19.14 | 271 | MS ² [271]: 253, 243, 225 | Baicalein(黄芩素) |
| 8 | 25.26 | 285 | MS ² [285]: 270; MS ³ [270]: 242 | Wogonin(汉黄芩素) |
| 9 | 25.81 | 375 | MS ² [375]: 360, 345, 342 | Skullcapflavon II(黄芩黄酮II) |
| 10 | 26.71 | 285 | MS ² [285]: 270, 241, 242; MS ³ [270]: 242, 224, 185, 168 | Oroxylin A(千层纸素A) |

由表1可见,1号峰和2号峰的保留时间分别为3.91 min和4.36 min,两者的一级全扫描质谱图中均产生 m/z 549的准分子离子峰 $[M + H]^+$ (图2),其分子量均为548,推测二者为一对同分异构体。再经二级及三级串联质谱信息发现,二者均能产生 m/z 531、513、483、465等系列失水得到的碎片离子,但离子强度有所差异,结合文献报道^[12],推测1号峰为白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷,2号峰为白杨素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷,其结构见表2。

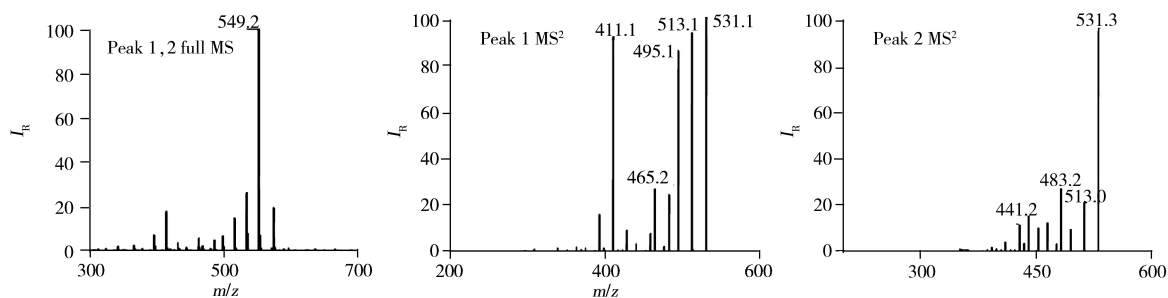


图2 化合物1和2在正离子模式下的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of compound 1 and 2 in positive ion mode

3号峰和4号峰的保留时间分别为8.52 min和10.76 min,其一级全扫描质谱图中的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 均为 m/z 447,推测二者为一对同分异构体。MS²质谱信息显示, $[M + H]^+$ 丢失分子量为176 Da的中性碎片,产生 m/z 271的碎片离子,推测176 Da的中性碎片可能为葡萄糖醛酸残基;MS³

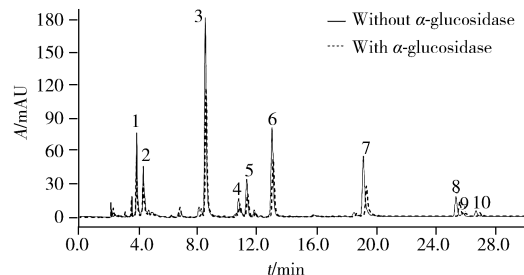


图1 黄芩提取物与 α -葡萄糖苷酶相互作用色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of *Scutellaria baicalensis* extract with/without α -glucosidase
the peak 1-20 were the same as those in Table 1

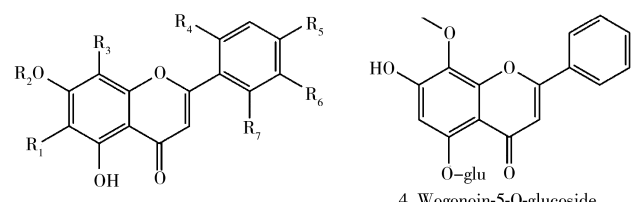
质谱条件下进一步碎裂产生 m/z 253、225、169 的碎片离子。根据与黄芩苷标准对照品的串联质谱信息比对,并结合色谱保留时间,推定 3 号峰为黄芩苷,4 号峰为汉黄芩素-5-O-葡萄糖苷,其结构见表 2。

5 号峰和 6 号峰的保留时间分别为 11.31 min 和 13.00 min,在其一级全扫描质谱图中 $[M+H]^+$ 均为 m/z 461,推测二者也为一对同分异构体。在 MS^2 质谱信息中,二者的 MS^2 均产生 $[M+H-176]^+$ 即 m/z 285 的特征离子碎片,与丢失葡萄糖醛酸残基相吻合;进一步进行 MS^3 碎裂,发现二者均能产生丢失葡萄糖醛酸残基和 CH_3 基团的碎片离子 m/z 270,由此证明其结构中均含有甲氧基。结合保留时间、串联质谱信息以及对比文献报道^[13-14],推定 5 号峰为木蝴蝶素-7-O-葡萄糖醛酸苷,6 号峰为汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷(汉黄芩苷)。7 号峰对应的保留时间为 19.14 min,一级全扫描质谱信息中 $[M+H]^+$ 为 m/z 271,其二级串联质谱图中 m/z 253、243、225 的碎片离子分别为丢失一个 H_2O ,一个 CO,以及同时丢失一个 H_2O 和一个 CO 产生的。这些碎片信息与黄芩素对照品的串联质谱信息一致,因此推定 7 号峰为黄芩素。化合物 5、6、7 的结构见表 2。

8 号峰和 10 号峰的保留时间分别为 25.26 min 和 26.71 min。一级全扫描质谱信息中的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 均为 m/z 285,推测二者也为一对同分异构体,在二级串联质谱图中,二者均产生 $[M+H-CH_3]^+$ 即 m/z 270 的特征离子碎片,说明二者含有甲氧基。 MS^3 碎裂发现二者所产生的碎片有明显差异,根据保留时间、串联质谱信息及文献报道^[15-16],同时与汉黄芩素和千层纸素 A 的标准对照品的串联质谱信息比对,推定 8 号峰为汉黄芩素,10 号峰为千层纸素 A,结构见表 2。

9 号峰的保留时间为 25.81 min,其一级全扫描质谱图中的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 375,在 MS^2 质谱信息中的 m/z 360 和 m/z 345 碎片离子分别为 $[M+H-CH_3]^+$ 和 $[M+H-2CH_3]^+$ 。通过与文献报道结果对比^[14],推定其为黄芩黄酮 II,结构见表 2。

表 2 黄芩提取物中与 α -葡萄糖苷酶结合化合物的结构
Table 2 Structures of compounds binding to α -glucosidase in *Scutellaria baicalensis* extract



4. Wogonoin-5-O-glucoside

| Peak No. | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | R ₇ | Compounds |
|----------|------------------|-----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|--------------------------------------|
| 1 | Ara | H | Glu | H | H | H | H | Chrysin-6-C-arabinosyl-8-C-glucoside |
| 2 | Glu | H | Ara | H | H | H | H | Chrysin-6-C-glucosyl-8-C-arabinoside |
| 3 | OH | Glu acid | H | H | H | H | H | Baicalin |
| 5 | OCH ₃ | Glu acid | H | H | H | H | H | Oroxylin A-7-O-glucuronide |
| 6 | H | Glu acid | OCH ₃ | H | H | H | H | Wogonoside |
| 7 | OH | H | H | H | H | H | H | Baicalein |
| 8 | H | H | OCH ₃ | H | H | H | H | Wogonin |
| 9 | OCH ₃ | CH ₃ | OCH ₃ | OH | H | H | OCH ₃ | Skullcapflavon II |
| 10 | OCH ₃ | H | H | H | H | H | H | Oroxylin A |

2.3 探针的回收率及黄芩提取物与 α -葡萄糖苷酶的结合率

在灌流液为含 10% 甲醇的醋酸铵溶液,灌流速度为 1.0 μ L/min 的微透析实验条件下,以黄芩提取物在微透析前后色谱图中各成分的峰面积之比计算其探针回收率。实际实验过程中,探针膜的种类和长度、灌流速度、实验温度以及探针的几何结构等因素均会对回收率产生影响。

由图 1 可知,黄芩提取物中有 10 种成分可与 α -葡萄糖苷酶产生相互作用。假设在不加入酶的对照组中药物色谱峰积分为 A,加入酶的实验组中药物色谱峰积分为 B,则药物与酶的结合强度可表示为: Binding Degree(%) = $(A - B) / A \times 100$,用此计算方法可对体系中的各组分与生物靶分子的相对结合强度进行比较,本研究计算的黄芩提取物中 10 种成分的探针回收率以及与 α -葡萄糖苷酶相互

作用的结合率见表3。结果显示, 黄芩提取物中筛选出的10种化合物与 α -葡萄糖苷酶的结合率均不低于36.18%, 表明黄芩提取物中的活性成分均与 α -葡萄糖苷酶有良好的特异性结合。

表3 黄芩提取物中与 α -葡萄糖苷酶结合化合物的探针回收率及结合率Table 3 Probe recoveries and binding degrees of compounds binding to α -glucosidase in *Scutellaria baicalensis* extract

| Peak No. | Compounds | Probe recovery(%) | Binding degree(%) |
|----------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | Chrysin-6-C-arabinosyl-8-C-glucoside | 36.46 | 42.34 |
| 2 | Chrysin-6-C-glucosyl-8-C-arabinoside | 37.57 | 44.76 |
| 3 | Baicalin | 31.09 | 42.23 |
| 4 | Wogonin-5-O-glucoside | 29.85 | 36.18 |
| 5 | Oroxylin A-7-O-glucuronide | 29.33 | 41.96 |
| 6 | Wogonoside | 30.10 | 45.82 |
| 7 | Baicalein | 12.79 | 52.71 |
| 8 | Wogonin | 10.07 | 44.29 |
| 9 | Skullcapflavon II | 9.27 | 41.38 |
| 10 | Oroxylin A | 6.34 | 50.40 |

3 结论

本文以 α -葡萄糖苷酶为生物靶点, 通过微透析/液相色谱-质谱联用技术从黄芩提取物中筛选出10种 α -葡萄糖苷酶抑制剂。该筛选方法能够保证药物与靶分子的作用体系始终处于溶液状态, 可真实反映药物与靶分子的相互作用, 且能够避免药物与膜间的非特异性作用干扰。利用串联质谱对筛选出的抑制剂进行结构鉴定, 计算了此10种化合物与 α -葡萄糖苷酶的结合率以及探针回收率。结果表明, 黄芩中的黄酮类化合物均具有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制作用, 可为进一步研究黄芩治疗糖尿病的药理作用以及筛选高效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂研究提供依据。

参考文献:

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Volumes I. 1st ed. Beijing: China Medical Science Press(国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部. 1版. 北京: 中国医药科技出版社), 2015: 301-302.
- [2] Huang Y, Hu J D, Zheng J, Li J, Wei T N, Zheng Z H, Chen Y Y. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2012, 31: 1-9.
- [3] Shi H F, Ren K, Lv B J, Zhang W, Zhao Y, Tan R X, Li E G. *Sci. Rep.*, 2016, 6: 35851.
- [4] Chen H M, Hsu J H, Liou S F, Chen T J, Chen L Y, Chiu C C, Yeh J L. *BMC Complement Altern. Med.*, 2014, 14: 233.
- [5] Na H Y, Lee B C. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20(3): 1-10.
- [6] Zhang X J, Liu S, Xing J P, Liu Z Q, Song F R. *Chin. J. Nat. Med.*, 2018, 16(6): 418-427.
- [7] Yu C Y, Gao Z L, Chen T Z, Wei T. *Sci. Technol. Food. Ind.* (于彩云, 高兆兰, 陈天姿, 魏涛. 食品工业科技), 2015, 36(22): 394-399.
- [8] Tundis R, Loizzo M R, Menichini F. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2010, 10(4): 315-331.
- [9] Kumar R V, Sinha V R. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2012, 9(4): 403-416.
- [10] Ghani U. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, 103: 133-162.
- [11] Yang D, Liu S, Song F R, Liu Z Q. *Chin. J. Anal. Chem.* (杨冬, 刘舒, 宋凤瑞, 刘志强. 分析化学), 2014, 42(4): 552-558.
- [12] Zhao S N, Li S Z. *J. Chengde Med. Coll.* (赵胜男, 李守拙. 承德医学院学报), 2012, 29(4): 345-346.
- [13] Liu G Z, Ma J Y, Chen Y Z, Tian Q Q, Shen Y, Wang X S, Chen B, Yao S Z. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216(23): 4809-4814.
- [14] Wang J, Liu S, Li S N, Song F R, Zhang Y C, Liu Z Q, Liu C M. *Anal. Methods*, 2014, 6(15): 5918-5924.
- [15] Wu W, Liu Z Q, Song F R, Liu S Y. *Anal. Sci.*, 2004, 20(7): 1103-1105.
- [16] Han J, Ye M, Xu M, Sun J H, Wang B R, Guo D A. *J. Chromatogr. B*, 2007, 848(2): 355-362.

(责任编辑: 周启动)