

山楂叶总黄酮中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的超滤质谱筛选研究

李惠琳^{1,2}, 宋凤瑞¹, 邢俊鹏¹, 刘志强¹, 刘淑莹¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 吉林 长春 130022; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

Screening and Structures Characterization of α -Glucosidase Inhibitors from Hawthorn Leaves Flavonoids Extract by Ultrafiltration LC-MSⁿ

LI Hui-lin^{1,2}, SONG Feng-rui¹, XING Jun-peng¹, LIU Zhi-qiang¹, LIU Shu-ying¹

(1. Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: In vitro α -glucosidase inhibition assays and Ultrafiltration LC-DAD-ESI-MSⁿ were combined to screening α -glucosidase inhibitors from hawthorn leaves flavonoids extract. As a result, hawthorn leaves flavonoids extract showed strong α -glucosidase inhibitory activity, four compounds presented α -glucosidase inhibitory effects were observed and identified by LC-DAD-MSⁿ, and further confirmed by high resolution SORI-CID FT ICR MS data.

Key words: Ultrafiltration LC-DAD-ESI-MSⁿ; hawthorn leaves flavonoids; FT ICR MS

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2008) 增刊-84-02

α -葡萄糖苷酶抑制剂是 II 型糖尿病的首选药和 I 型糖尿病的胰岛素治疗的辅助药物, 黄酮类化学成分作为水果、蔬菜、中药中广泛存在天然多酚类物质已被报道, 可以通过抗氧化、抑制 α -葡萄糖苷酶、类胰岛素等多种机制治疗糖尿病及其并发症^[1]。山楂叶中富含多种黄酮类成分, 具有调节血脂、抗氧化及降低血糖等作用^[2]。本工作介绍体外酶活性实验超滤质谱技术 (Ultrafiltration LC-UV-ESI-MSⁿ) 及高分辨质谱 (SORI CID-FT ICR MS) 筛选, 鉴定山楂叶总黄酮中的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。

1 实验部分

1.1 材料

山楂叶总黄酮提取物: 购自西安天一生物技术有限公司; 4-硝基酚-D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG): 购自Biochem公司; α -葡萄糖苷酶 (E.C. 3.2.1.20): 购自Fluka公司; YM-10超滤膜: 购自Millipore公司; Acarbose: 购自拜耳公司。

1.2 样品制备及测定方法

1.2.1 α -葡萄糖苷酶活性测定: 参照 Li 等^[3]酶活性测定方法; 超滤筛选: 参照 Liu 等^[4]方法。

1.2.2 LC-MSⁿ Waters2690 液相色谱与 Finnigan LCQ 离子阱质谱联用。迪马 C₁₈ 分析柱(150 mm × 4.6 mm × 5 μ m), 柱温 25 $^{\circ}$ C, 流速 0.5 mL·min⁻¹。液相条件: 流动相 A 为乙腈, B 为 0.5% 醋酸, 梯度洗脱。 $t=0$ min, 20% A (80% B); $t=0\sim 10$ min, 20% A (80% B); $t=10\sim 15$ min, 20%~30% A (80%~70% B), 15~20min, 30% A (70% B)。质谱条件: 电喷雾负离子模式, 喷雾电压 5.0 kV, 金属

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20675079, 20873137)、吉林省科技发展计划项目(批准号: 20080736)和长春市科技发展计划项目(批准号: 2007GH27)资助

作者简介: 李惠琳 (1978~), 女, 助理研究员, 从事天然药物化学和有机质谱研究。E-mail: mslab29@ciac.jl.cn

通信作者: 刘志强 (1962~), 男 (汉族), 吉林人, 研究员, 博士生导师, 从事天然药物化学和有机质谱研究。E-mail: liuzq@ciac.jl.cn

毛细管电压 4.5 V, 源温度 250 °C, 鞘气流速 50 arb, 质量扫描范围 m/z 100~1 500。

1.2.3 SORI CID FT MS IonSpec 7.0 T FT-ICR MS, 毛细管电压 -3.5 kV, 扫描范围 m/z 108~1 500, 源温度 100 °C, 探针温度 80 °C, SORI CID 串联模式, 碰撞气为 N_2 。

2 结果与讨论

超滤质谱技术是一种亲和质谱筛选方法, 受体-配体复合物经超滤后仍然保留在超滤膜的溶液中, 而不与受体结合的化合物则会被洗脱掉。然后, 通过改变溶液极性来破坏复合物, 从而使得结合的配体释放出来, 可以通过 LC-UV-MSⁿ 得到鉴定^[4-5]。与阳性对照药阿卡波糖 (抑制率 63.90%, $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 相比, 山楂叶总黄酮提取物 (抑制率 89.86%, $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 具有强 α -葡萄糖苷酶抑制活性。超滤 LC-UV-MSⁿ 结果显示, 提取物中有 4 种化合物 (1~4) 具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 在电喷雾负离子模式下, 其质荷比分别为 755 (1)、593 (2)、577 (3)、431 (4), 其中化合物 1 的最大紫外吸收在 254 和 353 nm, 而化合物 2~4 的最大紫外吸收均在 267、335nm, 说明化合物 2~4 具有相同母核结构。

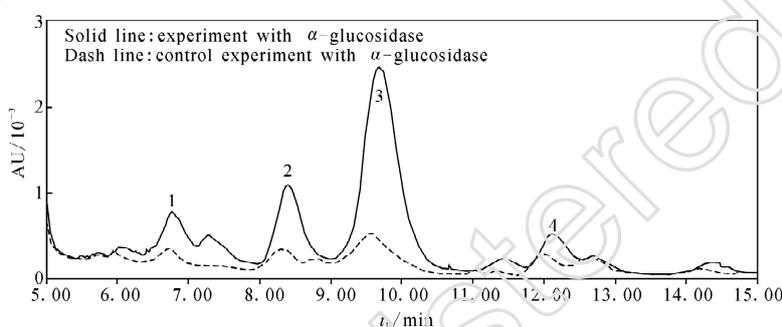


Fig.1 Analysis of hawthorn leaves flavonoids extract with ultrafiltration LC-MS to screen for ligands of α -glucosidase

化合物 1 的多级串联结果显示, 其具有槲皮素母核结构 (m/z 300、 m/z 301), 糖基化位点为 C-3 位, 并且连有鼠李糖基 (m/z 755 \rightarrow m/z 609、 m/z 591)、葡萄糖基 (m/z 755 \rightarrow m/z 489) 以及另外一个鼠李糖 (m/z 489 \rightarrow m/z 343、 m/z 325)。同时结合高分辨数据, 化合物 1 被确定为槲皮素-3-O-鼠李糖-(1-4)-葡萄糖-鼠李糖苷。化合物 4 确定为牡荆素, 其主要通过葡萄糖的跨环裂解给出 $^{0,2}X_0^-$ 离子 (m/z 311) 以及葡萄糖基的中性丢失给出 $^{0,3}X_0^-$ 离子 (m/z 341)。化合物 2~3 具有与化合物 4 相同的母核结构, 分别被确定为牡荆素-2''-O-葡萄糖苷和牡荆素-2''-鼠李糖苷。

3 结论

本文结合体外酶活性实验及脉冲超滤质谱技术成功地从山楂叶总黄酮中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 并且通过 LC-UV-ESI-MSⁿ 和 SORI CID-FT ICR MS 数据对其进行了快速鉴定。说明该方法灵敏、快速, 适用于从复杂的天然产物提取物或组合化学库中筛选药物。

参考文献:

- [1] 冯长根, 陈 凌, 刘 霞. 以中草药为来源的 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选研究进展[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(6): 669-672.
- [2] 郭琦丽, 吕武清. 山楂叶的研究进展[J]. 中国药学, 2007, 16(22): 60-62.
- [3] LI T, ZHANG X D, SONG Y W, et al. A microplate-based screening method for alpha-glucosidase inhibitors[J]. 2005, 10(10): 1 128-1 134.
- [4] LIU J H, BURDETTE J E, XU H Y, et al. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2001, 49: 2 472-2 479.
- [5] GEOGHEGAN K F, KELLY M A. Biochemical applications of mass spectrometry in pharmaceutical drug discovery[J]. Mass Spectrometry Review, 2005, 24: 347-366.