

超滤亲和-液质联用和分子对接技术筛选毛菊苣根中 α -葡萄糖苷酶抑制剂

陈海君¹, 马尚智¹, 江敏¹, 王秋平¹, 藏洁^{1,2}, 秦惠玉¹, 陈文¹, 韩博^{1*}

1. 石河子大学药学院, 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002

2. 石河子大学化学化工学院, 新疆 石河子 832002

摘要: 目的 采用超滤亲和-液质联用(Ultra-filtration affinity-liquid chromatography-mass spectrometry, UF-LC-MS)和分子对接技术筛选毛菊苣 *Cichorium glandulosum* 根中 α -葡萄糖苷酶抑制剂。方法 通过超滤亲和-液质联用技术筛选并鉴定毛菊苣根中的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 发现有 4 个组分对 α -葡萄糖苷酶的活性具有抑制作用, 进一步采用分子对接技术对这 4 个化合物进行验证。结果 发现 2 个化合物对 α -葡萄糖苷酶具有较高的抑制作用, 其中黄芩苷、山莴苣苦素在 0.1~2.0 mg/mL 呈良好的量效关系。结论 为利用 UF-LC-MS 和分子对接技术筛选天然产物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂提供了参考, 也为后续研究毛菊苣降糖功效提供了基础。

关键词: 毛菊苣; 超滤亲和-液质联用; 分子对接; α -葡萄糖苷酶抑制剂; 黄芩苷; 山莴苣苦素

中图分类号: R945, 284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)02-0344-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.012

Screening of α -glucosidase inhibitors from roots of *Cichorium glandulosum* by UF-LC-MS and molecular docking

CHEN Hai-jun¹, MA Shang-zhi¹, JIANG Min¹, WANG Qiu-ping¹, ZANG Jie^{1,2}, QIN Hui-yu¹, CHEN Wen¹, HAN Bo¹

1. Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832002, China

Abstract: Objective To screen α -glucosidase inhibitors from root extract of *Cichorium glandulosum* (CGR) by UF-LC-MS and molecular docking. **Methods** The inhibitory activity of CGR extract was evaluated by establishing enzyme inhibitor model. Meanwhile, four active compounds from CGR extract were screened by UF-LC-MS and identified as α -glucosidase inhibitors, which were verified by using Autodock Software. **Results** The results showed that two compounds that combined with α -glucosidase well were screened out, including baicalin and lactupicrin, which showed significant α -glucosidase inhibitory activity in the concentration range of 0.1—2 mg/mL in a dose-dependent manner. **Conclusion** Our work provide theoretical basis for screening natural and high affinity enzyme inhibitors from CGR by using UF-LC-MS and molecular docking and further study of the hypoglycemic effect of *C. glandulosum*.

Key words: *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet; ultrafiltration affinity-liquid chromatography-mass spectrometry; molecular docking; α -glucosidase inhibitors; baicalin; lactupicrin

毛菊苣 *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet 为菊科菊苣属草本植物, 是维吾尔族民间习用药材。维吾尔医认为毛菊苣可调节异常胆液质, 降低肝火, 清胃之热, 具有清热、利尿、消炎等功效, 临床上主要用于肝炎、肝纤维化和糖尿病的治疗^[1-4]。同时药理研究表明, 毛菊苣具有降血糖、调血脂等药理

作用^[5-6], 本研究旨在寻找毛菊苣中具有降糖作用的天然活性成分。由于毛菊苣的化学成分组成复杂且含量参差不齐, 部分成分含量较低且存在多种成分协同作用、多靶点治疗的现象^[7-8]。因此, 本研究选择特异性的生物靶标筛选毛菊苣中的活性成分。

α -葡萄糖苷酶是治疗 2 型糖尿病 (T2DM) 的靶点

收稿日期: 2018-07-17

作者简介: 陈海君 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药剂学。E-mail: 501546165@qq.com

*通信作者 韩博 E-mail: 534683221@qq.com

之一。此类酶能从碳水化合物分子链非还原性末端依次切开 α -1,4糖苷键,并能缓慢水解 α -1,6糖苷键,最终将碳水化合物水解为单糖葡萄糖,是碳水化合物水解的关键酶^[9-12]。而 α -葡萄糖苷酶抑制剂则通过可逆占据 α -葡萄糖苷酶与糖结合位点,抑制 α -葡萄糖苷酶活性,从而降低多糖降解,延缓肠道对碳水化合物的吸收,达到改善高血糖的效果。临床广泛使用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂有阿卡波糖(拜糖平)、伏格列波糖(倍欣)等^[13-14]。然而合成 α -葡萄糖苷酶抑制剂会造成较严重的肝功能损伤、胃肠道不适、胀气、腹泻等不良反应^[15-16]。因此,从天然产物中筛选获得更安全、高效的抑制剂,是T2DM治疗的研究热点。

从天然植物中筛选降糖活性成分的方法有分子印迹技术、细胞膜色谱法、磁珠吸附筛选等。相较于这些方法,超滤亲和-液质联用(UF-LC-MS)技术具有操作简便、检测灵敏、结果特异等优势^[13,17-20]。自Van Breemen等^[21]将亲和超滤与液质技术结合,以血清白蛋白和腺苷脱氨酶为靶点,成功地应用于组合化合物库的筛选,使得更多的研究者将这一技术运用于复杂体系中发现活性成分。如Wang等^[22]采用光电二极管阵列检测和电喷雾串联质谱(UF-LC-PDA-ESIMS)联用技术从罗望子中筛选出XOD抑制剂;Fang等^[23]运用UF-LC-MS方法从红曲霉发酵大米中发现了胰脂肪酶抑制成分。

本课题组前期已完成毛菊苣种子体外活性成分的筛选,筛选出4个 α -葡萄糖苷酶抑制剂,分别为绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、秦皮乙素。由于毛菊苣具有良好的降糖疗效,根与种子中活性成分虽不尽相同,但可相互辅佐、配伍用药,协同发挥作用^[24-25]。因此本实验对毛菊苣中的活性成分进行筛选鉴定,为开发毛菊苣降糖成分提供理论依据。具体研究步骤包括以下4步:(1)测定毛菊苣的 α -葡萄糖苷酶抑制活性;(2)以 α -葡萄糖苷酶作为生物靶点,采用UF-LC-MS/MS技术快速筛选毛菊苣中的有效成分;(3)以筛选出的有效成分与 α -葡萄糖苷酶进行分子对接,通过计算机辅助虚拟筛选出高效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。(4)评价筛选所得化合物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

毛菊苣购自新疆维吾尔自治区和田县,经石河子大学药学院韩博副教授鉴定为菊科菊苣属植物毛

菊苣*Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet的地下根部分,存放于新疆特种植物药重点实验室药剂学研究室。

4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG,批号N1377a-1G)、阿卡波糖(批号Y0000-427)、 α -葡萄糖苷酶(50 000~120 000,批号G3651-50U)均购于Sigma-Aldrich公司;秦皮甲素(质量分数 $\geq 98\%$,批号Z110740)、东莨菪内酯(质量分数 $\geq 98\%$,批号D1054)、山莨菪苦素(质量分数 $\geq 95\%$,批号ES-3813)、黄芩苷(质量分数 $\geq 98\%$,批号EB07435)对照品均购于上海源叶生物有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,购于美国Thermo Fisher公司;其余试剂为分析纯,实验用水为Milli-Q超纯水。

2545 高效液相色谱仪、2489 紫外检测器、Xevo TQD 质谱联用仪(美国Waters公司);Varioscans Flash 多功能酶标仪(美国热电公司);Mili-Q Advantage A10 超纯水系统、Microcon 超滤离心管YM-10(10 000,美国Millipore公司);Centrifuge 5424R 高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);QL-861 涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 样品处理

取毛菊苣根,粉碎,过筛,精密称定30 g,75%乙醇回流提取3次,每次2.5 h,合并提取液,稀释至4 mg/mL的溶液。

将 α -葡萄糖苷酶冻干粉溶于10 mmol/L的磷酸盐缓冲溶液(pH 6.86)中,配制为2 U/mL的酶溶液,用于活性分析。

1.3 HPLC-MS/MS 分析条件

1.3.1 HPLC 条件 Symmetry C₁₈ 分析柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);柱温25 $^{\circ}$ C;流动相为0.2%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~5 min, 12% B;5~15 min, 12%~15% B;15~25 min, 15%~20% B;20~40 min, 20%~27% B;45~60 min, 27%~40% B,体积流量1.0 mL/min;检测波长254 nm;进样量20 μ L。

1.3.2 电喷雾质谱(ESI-MS)条件 正、负离子电离模式,扫描范围 m/z 100~2 000,实验前质量数均经过校正,毛细管电压2 V。采用ESI电喷雾离子源,离子源温度200 $^{\circ}$ C,锥孔气为氮气,碰撞气为氦气。锥孔电压35~60 kV,碰撞电压15~35 V。

1.4 毛菊苣根提取物的 α -葡萄糖苷酶活性实验

以PNPG为底物,阿卡波糖为阳性对照,测定毛菊苣提取物的酶抑制活性。实验分为空白组、阳

性对照组, 样品组和背景组 ($n=3$)。空白组不加样品, 背景组不加 α -葡萄糖苷酶液。其余组依次加入 PBS 缓冲液、样品和 α -葡萄糖苷酶液, 于 37 °C 培养箱中反应 15 min, 加入底物 PNPg 溶液, 孵育 20 min, 加入 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应, 立刻测定 405 nm 处吸光度 (A) 值^[26-29]。按照公式计算其 α -葡萄糖苷酶抑制率 (I), 考察 0.1~2.0 mg/mL 5 个不同质量浓度下毛茛苣根提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。

$$I = [A_b - (A_s - A_0)] / A_b$$

A_b 为空白组 A 值; A_s 为样品组 A 值; A_0 为背景组 A 值

1.5 超滤筛选活性分子

移取毛茛苣根提取物溶液 (4 mg/mL, 100 μL) 和 α -葡萄糖苷酶溶液 (2 U/mL, 400 μL), 加至磷酸盐溶液 (10 mmol/L, pH 6.86) 中, 置于 37 °C 培养箱中反应 30 min, 移至超滤管中, 于 10 000 $\times g$ 高速离心 15 min, 向滤膜中加入 100 μL 磷酸盐溶液 (10 mmol/L, pH 6.86), 离心清洗 3 次, 洗去未结合成分。再向滤膜中加入 100 μL 甲醇-水 (1:1, pH 3.30) 溶液, 于 10 000 $\times g$ 高速离心 10 min 释放结合配体, 重复 3 次, 收集洗脱液, 冷冻干燥后加 40 μL 甲醇-水溶液溶解, 用于 HPLC-MS 分析^[30-32], 为了考察酶与底物的相互作用强度, 设置了变性酶 (α -葡萄糖苷酶经 100 °C 高温灭活的对照实验), 同法处理进行实验, 求出结合率 (BD)。

$$\text{BD} = (A_b - A_c) / A_a$$

A_a 为超滤筛选前毛茛苣根提取物溶液各化合物色谱峰面积;

A_b 为亲和作用后活性酶结合的各化合物的色谱峰面积; A_c 为变性酶结合的各化合物的色谱峰面积

1.6 分子对接

1.6.1 配体分子准备 以超滤亲和实验为基础, 获得的化学活性成分, 使用 ChemBio 3D Ultra 14.0 绘制化合物三维结构^[8], 对小分子化合物进行 MM2 Minimize Energy 力场优化, 将转化好的分子保存为 PDB 格式备用。

1.6.2 分子对接准备 选取 α -葡萄糖苷酶晶体 (PDB ID: 2QMJ), 在上述构建好的 α -葡萄糖苷酶的三维结构基础上, 利用 Autodock tools (Scripps 研究所的 Olson 实验室) 剥离蛋白质三维结构中的溶剂水分子和调节原子, Ligand 子程序包可对小分子化合物进行处理, 计算配体可旋转键个数, 保存为 pdbqt 格式。使用 Auto Grid (Scripps 研究所的 Olson 实验室) 进行能量格点计算, 格点盒子

(gridbox) 设置为 6 nm $\times$ 6 nm $\times$ 6 nm, 格点间距 0.037 5 nm, 格点中心坐标为默认受体活性中心。然后根据配体结构特性找到结合部位, 将存储的文件中的化合物与蛋白质分子进行柔性对接, 在每一个对接后, 移动小分子的位置使之最匹配。排除结合程度较低、位置不佳的化合物, 记录配体与受体对接位置及计算评分。以上所用参数除特别指明外, 均为默认参数。最后使用 PYMOL 1.2 (DeLano Scientific LLC 公司) 软件做图。

1.7 活性化合物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性验证

参照“1.4”项下方法, 对毛茛苣根中经 UF-LC-MS 和分子对接筛选出的化合物进行体外酶活性抑制实验的验证。

2 结果与分析

2.1 毛茛苣根提取物的 α -葡萄糖苷酶活性实验结果

α -葡萄糖苷酶的抑制活性测定结果见表 1。毛茛苣根提取物质量浓度为 1.6 mg/mL 时, 抑制率可达到 74.5%。相同浓度下, 阳性对照阿卡波糖的抑制率为 87.4%, 显示毛茛苣根提取物具有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性且呈现剂量依赖性。推测毛茛苣根中可能存在部分有效成分通过占据 α -葡萄糖苷酶与糖的络合位点形成受体-配体复合物, 从而抑制了 α -葡萄糖苷酶的活性。

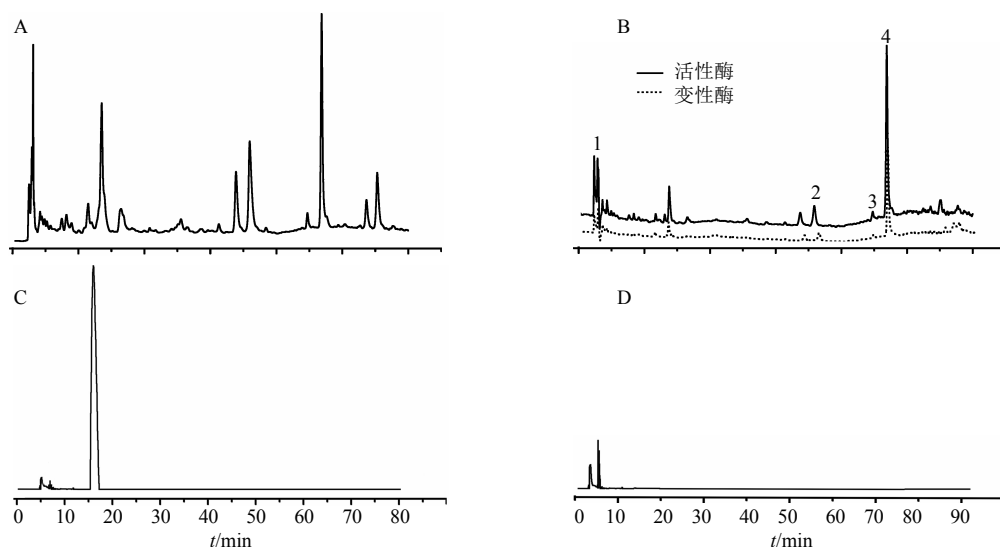
2.2 超滤筛选活性分子

与毛茛苣根提取物的色谱图 (图 1-A) 相比, 发现在超滤筛选实验条件下, 毛茛苣根提取物中只有部分化合物能够与 α -葡萄糖苷酶结合 (图 1-B);

表 1 毛茛苣根提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Inhibitory activity of CGR extract against α -glucosidase at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	抑制率/%
毛茛苣根提取物	0.1	59.5 $\pm$ 1.1
	0.4	68.1 $\pm$ 1.6
	0.8	69.7 $\pm$ 2.3
	1.2	72.1 $\pm$ 1.7
	1.6	74.5 $\pm$ 1.1
	2.0	77.1 $\pm$ 1.1
阿卡波糖	0.1	74.5 $\pm$ 0.5
	0.4	78.8 $\pm$ 0.8
	0.8	79.3 $\pm$ 0.5
	1.2	87.2 $\pm$ 0.5
	1.6	87.4 $\pm$ 1.3
	2.0	93.2 $\pm$ 0.8



A-毛茛苣根提取物原色谱图 B-毛茛苣根提取物与活性和灭活 α -葡萄糖苷酶相互作用 C-阿卡波糖与 α -葡萄糖苷酶相互作用体系 D-未加 α -葡萄糖苷酶的空白对照
A-CGR extract stock solution B-ultrafiltration HPLC screening of CGR extract for binding to active and denatured α -glucosidase C-ultrafiltration HPLC screening of acarbose for binding to α -glucosidase D-control assay of CGR extract without α -glucosidase

图 1 不同靶向亲和和作用体系的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of different targeted affinity systems

毛茛苣根提取物与活性 α -葡萄糖苷酶发生结合后的色谱峰面积部分高于灭活酶组。当活性成分与 α -葡萄糖苷酶发生特异性结合后，活性酶组捕获的配体所对应的峰强度和峰面积均应大于灭活酶组，因此可根据峰面积的变化情况来反映化合物与 α -葡萄糖苷酶的结合率。通过比较各峰高和计算峰面积下降比，筛选出 4 个峰（图 1-B），各峰与 α -葡萄糖苷酶的结合率均大于 21.7%。而图 1-B 中未标注序号的峰的峰高和峰面积无显著性差异，这可能由于浓度较大的化合物占据 α -葡萄糖苷酶活性位点的概率比浓度小的化合物大所致。以阳性对照阿卡波糖进行了超滤实验（图 2-C），证明本实验方法准确性较好。与空白对照的色谱图（图 2-D）相比，本方法可有效避免小分子化合物吸附到超滤膜而造成的假阳性结果。

2.3 MS/MS 分析和结构鉴定

结合特异性筛选结果，从毛茛苣根提取物中检测到 4 个化合物与 α -葡萄糖苷酶发生结合，结果如表 2 所示，通过分析一级全扫描质谱与二级质谱碎片，初步预测毛茛苣根中 α -葡萄糖苷酶抑制剂为香豆素类、黄酮类、倍半萜类，通过质谱对碎片进行分析，结构见图 2。

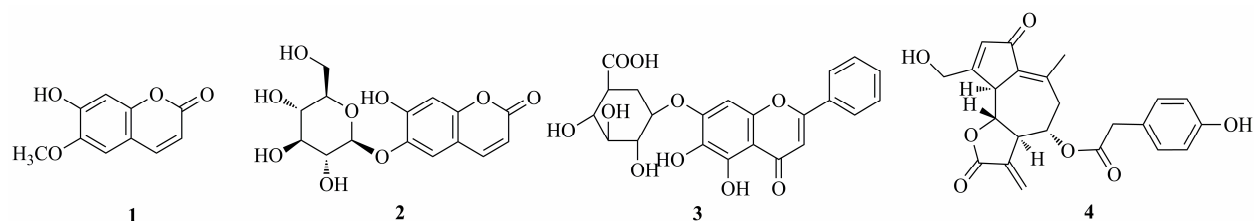
化合物 1 在一级全扫描质谱中准分子离子峰为 191，在二级质谱分析中丢失 1 个分子 CO 和 OCH₃ 产生碎片离子 165.452 3、133.003 2，结合保留时间和文献报道^[33]，鉴定化合物 1 为东莨菪内酯。

化合物 2 在一级全扫描质谱中准分子离子峰为 339，化合物 2 在二级质谱分析中产生了碎片离子 223.104 7、149.133 2、114.100 7，结合保留时间和文献报道^[34]，鉴定化合物 2 为秦皮甲素。

表 2 预测化合物 HPLC-MS/MS 分析结果

Table 2 Analytical results of prediction compounds by HPLC-MS/MS

峰号	t_R/min	分子式	误差 ($\times 10^{-6}$)	模式	m/z	MS/MS	预测化合物
1	3.07	C ₁₀ H ₈ O ₄	-3.2	[M+H] ⁺	191.364 7	193.364 7, 165.452 3, 133.003 2	东莨菪内酯
2	36.01	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	1.6	[M+H] ⁺	339.000 9	339.000 9, 223.104 7, 149.133 2, 114.100 7	秦皮甲素
3	46.80	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	2.7	[M+H] ⁺	445.078 2	447.078 2, 268.154 6, 251.616 1, 223.482 4, 195.169 5	黄芩苷
4	48.95	C ₂₃ H ₂₂ O ₇	-1.8	[M-H] ⁻	409.234 8	409.234 8, 257.191 3, 213.275 1, 150.707 8, 107.232 8	山莨菪苦素

图 2 毛茛苳根中 α -葡萄糖苷酶抑制成分的化学结构Fig. 2 Chemical structures of α -glucosidase inhibitor in roots of *C. glundulosum*

化合物 **3** 在一级全扫描质谱中准分子离子峰为 445, 在二级质谱分析中丢失 1 个葡萄糖基产生碎片离子 268.154 6, 继而丢失 1 分子 H_2O 、1 分子 CO 、1 分子 CHO 产生碎片离子 251.616 1、223.482 4、195.169 5, 结合保留时间和文献报^[35], 鉴定化合物 **3** 为黄芩苷。

化合物 **4** 在一级全扫描质谱中准分子离子峰为 409, 在二级质谱分析中丢失 1 个 4'-hydroxyphenyl acetoxy, 产生碎片离子 257.191 3, 随后丢失 2 个中性分子 CO_2 产生碎片离子 213.275 1、150.707 8, 与对照品对比并结合文献报道和保留时间^[36], 鉴定化

合物 **4** 为山茛苳苦素。

2.4 分子对接结果

采用分子对接方法, 评价各化合物与 α -葡萄糖苷酶对接评分和空间结合模式, 结果见图 3。对接评分大小次序为: 山茛苳苦素 > 黄芩苷 > 东茛苳内酯 > 秦皮甲素。从空腔位置分析, 秦皮甲素、东茛苳内酯可与 α -葡萄糖苷酶结合, 但结合能力较低, 空腔位置占据较小, 缺乏氢键支持。山茛苳苦素、黄芩苷空腔占据位置较大, 氢键数多, 相对结合能力较强。因此推测山茛苳苦素、黄芩苷可作为高效 α -葡萄糖抑制劑。

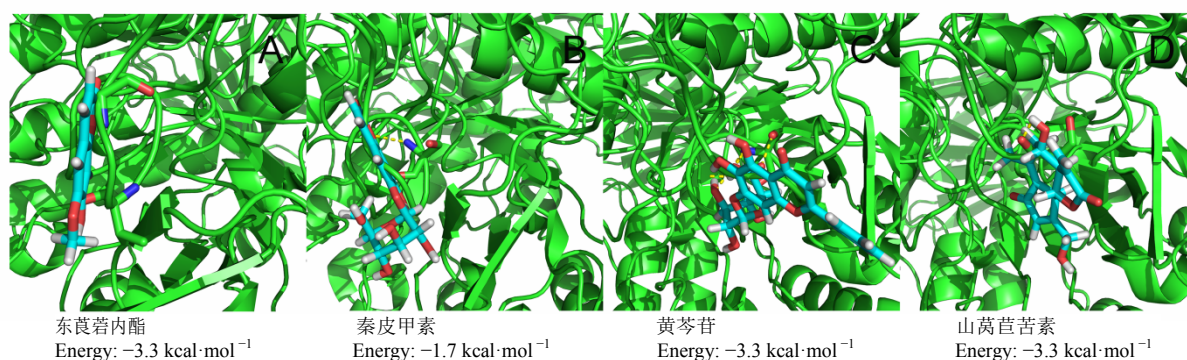


图 3 东茛苳内酯 (A)、秦皮甲素 (B)、黄芩苷 (C) 和山茛苳苦素 (D) 的分子对接结果

Fig. 3 Results of scopoletin (A), esculin (B), baicalin (C) and lactupicrin (D) by molecular docking

2.5 活性化合物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性验证

根据计算抑制率大小对比发现, 山茛苳苦素 > 黄芩苷 > 东茛苳内酯 > 秦皮甲素。如图 4 所示, 随着质量浓度的提高, 各化合物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率随之提高, 说明其对酶的抑制活性在一定质量浓度范围内呈现出明显的剂量效应关系, 通过对比 IC_{50} 值发现, 山茛苳苦素 IC_{50} 值为 5.5 $\mu\text{mol/mL}$, 黄芩苷的 IC_{50} 值为 10.6 $\mu\text{mol/mL}$, 与阳性对照阿卡波糖较为相近, 表明二者对 α -葡萄糖苷酶抑制作用较强, 抑制率与浓度呈正比, 存在明显的酶抑制活性。这与分子对接预测结果相吻合, 如表 3 所示。山茛苳苦素作为倍半萜类化合物具有降血糖、抗菌、调血脂、镇痛镇静的药理作用, 但降

血糖机制尚不明确。而黄芩苷作为黄酮苷类化合物, 广泛存在于毛茛苳的根中, 由于结构的特殊性, 可能通过糖原合成, 增强糖异生, 降低肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 而发挥作用, 且可能通过 AMPK 通路实现抗氧化作用^[35,37-39]。东茛苳内酯与秦皮甲素均属于苯丙素类化合物, 其作用机制与氧化应激有关, 具体表现为明显降低血浆和肝脏匀浆的 MDA、 NO_2 含量, 增加血清中胆固醇和磷脂的水平^[40]。而山茛苳苦素的作用机制未见明确报道。本实验首次探究了上述化合物可通过抑制 α -葡萄糖苷酶活性从而发挥降血糖作用。

3 讨论

本研究通过建立酶-抑制剂模型, 结果毛茛苳根

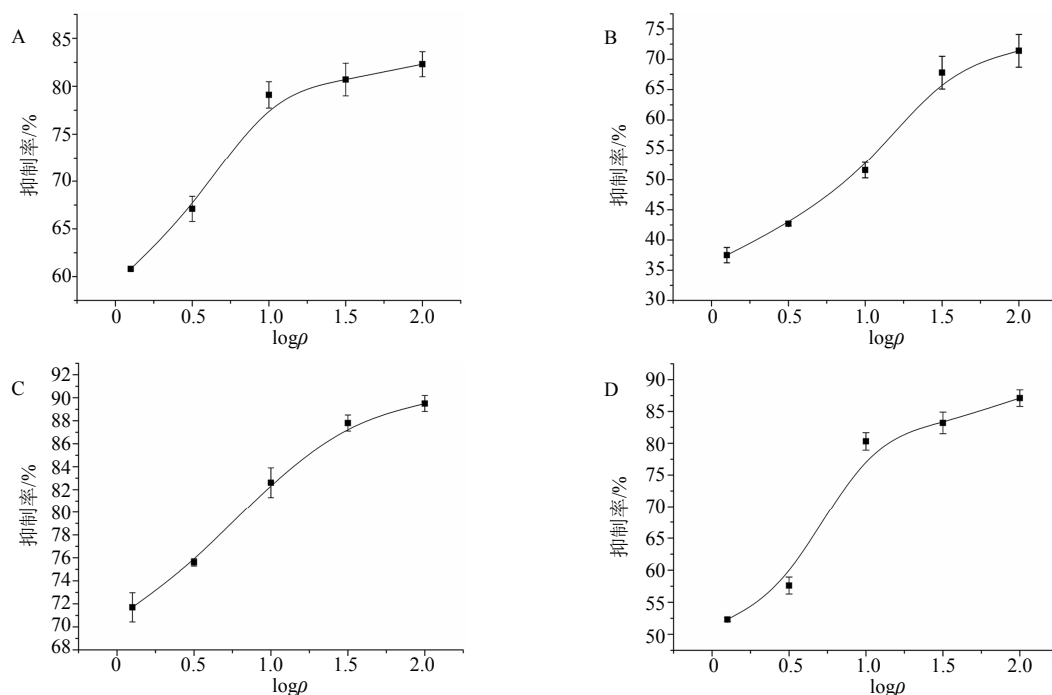


图 4 东莨菪内酯 (A)、秦皮甲素 (B)、山莨菪苦素 (C)、黄芩苷 (D) 的剂量反应曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Dose-respose curves of scopolin (A), esculin (B), lactucin (C), and baicalin (D) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 3 各 α -葡萄糖苷酶抑制成分的抑制率及 IC_{50} 值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Inhibition activity and IC_{50} value of compounds against α -glucosidase and its pharmacological action ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

成分	抑制率/%		$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1})$
	$0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	$0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	
东莨菪内酯	60.8 ± 1.6	82.3 ± 1.6	17.76 ± 0.21
秦皮甲素	37.5 ± 1.4	71.4 ± 1.4	30.74 ± 0.08
山莨菪苦素	71.7 ± 0.7	89.5 ± 0.7	5.51 ± 0.03
黄芩苷	52.3 ± 1.1	86.7 ± 1.1	10.62 ± 0.13

提取物显示出良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 为了探究其发挥抑制作用的具体物质基础, 利用 UF-LC-MS 技术从毛茛苳根提取物中筛选到 4 个潜在的抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分, 进行鉴定归属, 预测为秦皮甲素、东莨菪内酯、山莨菪苦素、黄芩苷。结果发现随着上述 4 个化合物质量浓度的升高, 其抑制作用逐渐增强, 且在一定质量浓度范围内呈量效抑制关系, 通过量效曲线, 发现这 4 个化合物具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性并与 α -葡萄糖苷酶形成竞争抑制效应。而通过分子对接技术, 发现以上 4 个化合物对接方式及位点并不相同, 其中山莨菪苦素、黄芩苷与 α -葡萄糖苷酶结合较为亲和,

对 α -葡萄糖苷酶抑制作用也较强。推测 4 个化合物发挥降糖疗效的作用机制存在一定差异。通过文献证实, 山莨菪苦素、东莨菪内酯、秦皮甲素、黄芩苷均具有降血糖的功效, 但作用机制尚未明确, 对其抑制 α -葡萄糖苷酶活性而发挥作用的研究也较为少见。因此本实验以 α -葡萄糖苷酶作为生物靶标, 提示这 4 个化合物可能通过抑制 α -葡萄糖苷酶活性从而发挥降血糖作用, 为上述化合物的降糖功效提供了新思路及物质基础。

综上所述, 毛茛苳可能通过抑制肠道中 α -葡萄糖苷酶活性, 降低餐后血糖, 但其降血糖作用是通过单一化合物还是多种化合物联合作用, 仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Wu H, Zhen S, Yi Y, *et al.* Isolation of three sesquiterpene lactones from the roots of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1176(1/2): 217-222.
- [2] 潘 兰, 贾新岳, 石明辉, 等. 维药毛茛苳化学成分研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2015, 45(9): 1088-1091.
- [3] 信学雷, 吴汉夔, 吕俏莹, 等. 维吾尔药毛茛苳提取物降糖活性的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(2): 234-238.

- [4] 张 尧, 信学雷, 阿吉艾克拜尔·艾萨, 等. 维药毛菊苣降糖有效部位的纯化工艺 [J]. 中成药, 2012, 34(12): 2322-2325.
- [5] Tong J, Ma B, Ge L, *et al.* Dicafeoylquinic acid-enriched fraction of *Cichorium glandulosum* seeds attenuates experimental type 1 diabetes via multipathway protection [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(50): 10791-10799.
- [6] 姚红锐, 龙子江, 赵 刚, 等. 毛菊苣有效部位降脂作用及初步机制探讨 [J]. 安徽医药, 2015, 19(10): 1857-1860.
- [7] Upur H, Amat N, BlažEkovic' B, *et al.* Protective effect of *Cichorium glandulosum* root extract on carbon tetrachloride-induced and galactosamine-induced hepatotoxicity in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(8): 2022-2030.
- [8] 何茂群, 高 峰, 鞠建刚. 毛菊苣根乙酸乙酯提取部位的化学成分 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 17(7): 70-71.
- [9] Chai T T, Kwek M T, Ong H C, *et al.* Water fraction of edible medicinal fern *Stenochlaena palustris* is a potent α -glucosidase inhibitor with concurrent antioxidant activity [J]. *Food Chem*, 2015, 186(2/3): 26-31.
- [10] Chen G, Guo M. Rapid screening for α -glucosidase inhibitors from *Gymnema sylvestre* by affinity ultrafiltration-HPLC-MS [J]. *Frontiers Pharmacol*, 2017, 30(S1): 95-99.
- [11] Yang J B, Tian J Y, Dai Z, *et al.* α -Glucosidase inhibitors extracted from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Fitoterapia*, 2016, 117(7): 65-67.
- [12] Nguyen V B, Nguyen Q V, Nguyen A D, *et al.* Screening and evaluation of α -glucosidase inhibitors from indigenous medicinal plants in Dak Lak Province, Vietnam [J]. *Res Chem Intermediates*, 2016, 43(6): 3599-3602.
- [13] Trinh B T, 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]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186(32): 189-195.
- [14] Yan H, Qiu C, Zhong K, *et al.* Inhibition of α -glucosidase activity by 3, 5-dicafeoylquinic acid from *Lonicera japonica* thunb flower buds [J]. *Modern Food Sci Tech*, 2015, 31(7): 44-49.
- [15] 范 莉, 王业玲, 唐 丽. 天然来源 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选方法的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 46(2): 313-321.
- [16] Kim J H, Ahn J H, Kim S K, *et al.* Combined use of basal insulin analog and acarbose reduces postprandial glucose in patients with uncontrolled type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Investigation*, 2015, 6(2): 219-226.
- [17] Yang D, Zhao J, Liu S, *et al.* The screening of potential α -glucosidase inhibitors from the *Polygonum multiflorum* extract using ultrafiltration combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2014, 6(10): 3353-3359.
- [18] Zhang A, Ye F, Lu J, *et al.* Screening α -glucosidase inhibitor from natural products by capillary electrophoresis with immobilised enzyme onto polymer monolith modified by gold nanoparticles [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 1854-1859.
- [19] 郭思琪, 杨 华, 李 萍. 亲和超滤结合液质技术在中药有效成分发现中的应用 [J]. 药科学报, 2016, 51(7): 1060-1067.
- [20] 张加余, 屠鹏飞. 天然产物液相色谱-质谱-数据库 (LC-MS-DS) 的建立与应用 [J]. 药科学报, 2012, 45(9): 1187-1192.
- [21] Breemen R B V, Huang C R, Nikolic D, *et al.* Pulsed ultrafiltration mass spectrometry: A new method for screening combinatorial libraries [J]. *Anal Chem*, 1997, 69(11): 2159-2164.
- [22] Wang J, Liu S, Ma B, *et al.* Rapid screening and detection of XOD inhibitors from *S. tamariscina* by ultrafiltration LC-PDA-ESI-MS combined with HPLC [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(28): 7379-7387.
- [23] Fang Y X, Song H P, Liang J X, *et al.* Rapid screening of pancreatic lipase inhibitors from *Monascus*-fermented rice by ultrafiltration liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2017, 23(9): 3422-3429.
- [24] Ding L, Liu J L, Hassan W, *et al.* Lipid modulatory activities of *Cichorium glandulosum* Boiss et Huet are mediated by multiple components within hepatocytes [J]. *Sci Reports*, 2014, 4(17): 4715-4717.
- [25] 杨 飞, 罗玉琴, 薛桂蓬, 等. 维药毛菊苣根-种子不同比例配伍的 90%乙醇提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(15): 1352-1356.
- [26] 唐 英, 刘春明, 李森林, 等. 黄连中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选分离及质谱分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(7): 1078-1083.
- [27] Hui C, Ouyang K, Yan J, *et al.* Constituent analysis of the ethanol extracts of *Chimonanthus nitens* Oliv. leaves and their inhibitory effect on α -glucosidase activity [J]. *Inter J Biol Macromol*, 2017, 98(9): 829-836.
- [28] Li H, Song F, Xing J, *et al.* Screening and structural characterization of α -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MS n and SORI-CID FTICR MS [J]. *J Am Soc*

- Mass Spectr*, 2009, 20(8): 1496-1503.
- [29] Striegel L, Kang B, Pilkenton S J, *et al.* Apostolidis E. Effect of black tea and black tea pomace polyphenols on α -glucosidase and α -amylase inhibition, relevant to type 2 diabetes prevention [J]. *Frontiers Nutr*, 2015, 2(3): 3-6.
- [30] Deng S, Xia L, Xiao H. Screening of α -glucosidase inhibitors from green tea extracts using immobilized enzymes affinity capture combined with UHPLC-QTOF MS analysis [J]. *Chem Comm*, 2014, 50(20): 2582-2584.
- [31] Ji T, Li J, Su S L, *et al.* Identification and determination of the polyhydroxylated alkaloids compounds with α -glucosidase inhibitor activity in mulberry leaves of different origins [J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 206-208.
- [32] Luo L, Hao Y, Jia L, *et al.* Analysis of chlorogenic acid oxidation pathway in simulated enzymatic honeysuckle browning system by high performance liquid chromatography and mass spectrometry [J]. *Tropical J Pharm Res*, 2016, 15(2): 405-407.
- [33] Tóth G, Alberti Á, Sólyomváry A, *et al.* Phenolic profiling of various olive bark-types and leaves: HPLC-ESI/MS study [J]. *Industr Crops Prods*, 2015, 67(2): 432-438.
- [34] Gu Y X, Yu C H, Zhou Z L. Determination of baicalin in cosmetics and toothpaste by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. *Instrumentation Sci Technol*, 2016, 44(6): 593-602.
- [35] Wang Y, Min Z, Ou Y, *et al.* Metabolic profile of esculin in rats by ultra high performance liquid chromatography combined with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1020(23): 120-124.
- [36] Yi T, Zhu L, Tang Y N, *et al.* An integrated strategy based on UPLC-DAD-QTOF-MS for metabolism and pharmacokinetic studies of herbal medicines: Tibetan “Snow Lotus” herb (*Saussurea laniceps*), a case study [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 701-713.
- [37] 辛文好, 宋俊科, 何国荣, 等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(6): 647-653.
- [38] Sun M, Su M, Sun H. Spectroscopic investigation on the interaction characteristics and inhibitory activities between baicalin and acetylcholinesterase [J]. *Med Chem Res*, 2018, 27(6): 1589-1598.
- [39] Xi Y, Wu M, Li H, *et al.* Baicalin attenuates high fat diet-induced obesity and liver dysfunction: Dose-response and potential role of CaMKK β /AMPK/ACC pathway [J]. *Cell Physiol Biochem Inter J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*, 2015, 35(6): 2349-2359.
- [40] 李小华, 孙毅毅. 秦皮甲素对高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝的防治作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(9): 679-683.