

射干中乳酸脱氢酶抑制剂的筛选分离与质谱分析

李森林, 刘春明*, 李赛男, 唐英, 张语迟

长春师范大学中心实验室, 长春 130032

摘要: 本研究采用高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术(HPLC-ESI-MS)对射干提取物中异黄酮类化学成分进行分析鉴定,以乳酸脱氢酶作为生物靶分子,运用超滤质谱技术筛选出6种酶抑制剂,分别为鸢尾苷(tectoridin)、鸢尾新苷A(Iristectorin A)、野鸢尾苷(iridin)、鸢尾苷元(tectorigenin)、野鸢尾黄素(irigenin)和次野鸢尾黄素(irisflorentin),并采用半制备型高效液相色谱技术(Semi-prep·HPLC)分离纯化射干提取物中的活性成分。所得单体分离收集液经分析型高效液相色谱法检测,纯度均大于90%。结果证明利用液相色谱-超滤-质谱-半制备型高效液相色谱联用技术可以快速筛选、鉴定、分离射干中的活性物质。此方法对于筛选酶抑制剂有快速和灵敏等优势,具有广泛的应用前景。

关键词: 射干;超滤;液质联用;半制备型高效液相色谱;乳酸脱氢酶

中图分类号: O657.63; O657.7+2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.011

Screening and Identification of Lactate Dehydrogenase Inhibitors from *Belamcanda chinensis* Extract Using HPLC-ESI-MS

LI Sen-lin, LIU Chun-ming*, LI Sai-nan, TANG Ying, ZHANG Yu-chi

Central laboratory, Changchun Normal University, Changchun 130032, China

Abstract: In this study, high performance liquid chromatography coupled with photo-diode array detector and electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) was used to screen and identify isoflavonoids with lactate dehydrogenase inhibitory activity from *Belamcanda chinensis* extracts. Lactate dehydrogenase was used as biotargeting molecule, six major compounds in *B. chinensis* was identified as lactate dehydrogenase inhibitors using ultrafiltration methods, namely tectoridin, iristectorin A, iridin, tectorigenin, irigenin, and irisflorentin. Following this, semi-preparative high performance liquid chromatography (semi-prep·HPLC) was applied to separate and isolate the active constituents. These compounds were then isolated by semi-prep HPLC with purity higher than 90%. Our results demonstrated that systematic isolation of bioactive components from *B. chinensis* guided by ultrafiltration HPLC-ESI-MS was a feasible and efficient technique. It can be extended for the identification and isolation of other enzyme inhibitors.

Key words: *Belamcanda chinensis*; ultrafiltration; liquid chromatography/mass spectrometry; semi-preparative high performance liquid chromatography; lactate dehydrogenase

射干(*Belamcanda chinensis*)为鸢尾科植物*Belamcanda chinensis* (L.) DC. 射干的干燥根茎,味苦,寒,有毒,入肺、肝经。具有解毒利咽,清热化痰,散结消痞的药效作用。主治喉痹咽痛,咳逆上气,痰涎壅盛,瘰疬结核,疔母,妇女经闭,痈疮疔毒^[1]。射干药材中主要有效成分为异黄酮类成分,现代研究表明,此类成分具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒、清除自由基及抗癌等重要的药理与药效作用^[2]。基

于其显著的药理活性,对射干异黄酮类活性成分探究具有重要的研究价值。射干中最常见物质是具有不同取代基的异黄酮类化合物,其中鸢尾苷(tectoridin)、鸢尾新苷B(iristectorin B)、鸢尾新苷A(iristectorin A)、野鸢尾苷(iridin)、鸢尾苷元(tectorigenin)、野鸢尾黄素(irigenin)和次野鸢尾黄素(irisflorentin),在射干中分布最为广泛^[3]。

目前,在中药活性成分筛选研究方面,主要评价中药提取物对酶的抑制情况。超滤技术就是以生物靶分子为研究目标,研究中药小分子与生物靶分子之间的结合能力,从分子水平阐明其作用机理,建立快速和灵敏的天然药物活性成分筛选方法,并对现

收稿日期: 2016-10-17 接受日期: 2017-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(31370374 和 31670358); 吉林省科技
发展计划(20160101336JC)

* 通讯作者 Tel: 86-431-86168777; E-mail: ccsf777@163.com

代天然药物的研究与开发提供了基础数据^[4,5]。超滤质谱是“超滤”技术和“质谱”技术相结合而发展起来的一种新的研究方法。

本实验采用液相色谱-超滤-质谱-半制备型高效液相色谱联用技术,首先选取乳酸脱氢酶作为与脑卒中病相关的生物靶分子,将受体酶和药物小分子配体混合在体外进行孵化,形成配体-受体复合物及未结合的配体,通过超滤膜将未结合配体滤出后,加入有机溶剂使配体-受体复合物变性,释放出结合配体,然后对结合配体进行质谱分析。最后利用半制备型高效液相色谱,对筛选出来的结合配体进行分离提纯,并采用标准品比对法对其结构进行鉴定。研究结果表明,超滤质谱技术适用于从传统中药中筛选乳酸脱氢酶抑制剂,该方法快速、灵敏、具有高通量的特点,为天然抗脑卒中药物的筛选与开发提供了科学有效的技术支持^[6,7]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

乳酸脱氢酶(生产批号:1001918117;瑞士 Fluka 公司);对照品鸢尾苷(PA0826RA13)、鸢尾新苷 B(PA1121RA13)、鸢尾新苷 A(PA1018RA13)、野鸢尾苷(PA0914RA13)、鸢尾苷元(PA1024RA13)、野鸢尾黄素(PA1125RA13)和次野鸢尾黄素(PA0815RA13)购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均大于 98%;射干购自陕西锦泰生物工程有限公司,经长春师范大学中心实验室刘春明教授鉴定确认为鸢尾科植物射干[*Belamcanda chinensis* (L.) DC.]的干燥根。

1.2 仪器与试剂

LCQ FLEET 离子阱型串联液质联用仪(美国 Thermo Scientific 公司);Waters 2695(Waters 2998 DAD 检测器)分析型高效液相色谱仪;Waters 2545 半制备型高效液相色谱仪(四元梯度泵,Waters 2489 UV/Vis 检测器,馏分收集器Ⅲ);半制备型色谱柱:SunFire™C₁₈ 色谱柱(100 mm × 19 mm, I. D. 5 μm, 美国 Waters 公司);分析型色谱柱:SunFire™C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, I. D. 5 μm, 美国 Waters 公司);恒温水浴锅(北京泰克仪器公司);HPLC 流动相所用甲醇为色谱纯(美国 Thermo Fisher 公司);实验用水为超纯水(美国 Millipore 公司);其它试剂均为分析纯(北京化工厂);离心机(美国 Sigma 公司);超滤离心管(德国 Merck 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品溶液的制备

精密称取射干 250 g,粉碎,用 10 倍量的 70% 乙醇溶液作为提取溶液,回流提取 3 次,合并滤液,减压浓缩至至干,取 20 mg 提取物粉末,用色谱甲醇定容至 10 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,制得供试样品溶液。

1.3.2 分析型高效液相色谱条件

分析型色谱柱:SunFire™C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, I. D. 5 μm),以 0.05% 醋酸水(A)和乙腈(B)作为液相色谱流动相,进行梯度洗脱,流动相梯度程序:0 ~ 20 min, 1% ~ 8% B, 20 ~ 40 min, 8% ~ 18% B, 40 ~ 60 min, 18% ~ 21% B, 60 ~ 70 min, 21% ~ 35% B, 70 ~ 100 min, 35% ~ 50% B;流速 1 mL/min;波长 266 nm,进样量 10 μL,柱温:30 ℃。

1.3.3 HPLC-ESI-MS 条件

高效液相色谱选择二元线性梯度洗脱:流动相 A 为 0.05% 醋酸水溶液,流动相 B 为乙腈,流动相梯度程序:0 ~ 23 min, 20% ~ 30% B, 23 ~ 25 min, 30% ~ 35% B, 25 ~ 45 min, 35% ~ 50% B, 45 ~ 60 min, 50% B;流速 0.5 mL/min;样品进样量为 10 μL;检测波长:266 nm;柱温:30 ℃。液相色谱二极管阵列检测器(DAD)通过三通阀与质谱连接,质谱离子源:电喷雾离子源(ESI);分析模式:正离子;扫描范围 m/z :100 ~ 1000;离子阱条件:离子源喷雾电压 4.5 kV,鞘气辅助气为氮气,流速为 20 L/min,离子阱压力 3.1×10^7 Pa;金属毛细管温度 250 ℃,金属毛细管电压 20 V。ESI-MSⁿ 分辨率为 1.0 Da, CID 碰撞能量为 20% ~ 30%。

1.3.4 超滤实验筛选乳酸脱氢酶抑制剂

10 μL 射干提取物分别和 20 μL 10 U/mL 乳酸脱氢酶分别在 70 μL PBS 缓冲溶液(pH 值 7.2 ~ 7.4)水浴锅 37 ℃ 时孵化 30 min。孵化后,混合物是通过超滤膜过滤(YM-30 30000 Da),然后在室温下离心(12000 × g) 10 min。超滤管加入 100 μL PBS 缓冲溶液(pH 值 7.2 ~ 7.4),离心 3 次,去除未结合的化合物。结合的化合物加入 100 μL 甲醇-水(50 : 50, v : v, pH 值 3.30),通过离心机(12000 × g)离心 10 min,重复三次,最后收集洗脱液,利用液相色谱分析,不加乳酸脱氢酶的对照组实验同法处理。

样品对酶的增强因子(%)按下式计算:增强因子(%) = $(A_1/A_2) \times 100$, 式中 A_1 为与乳酸脱氢酶结合的化合物的量, A_2 为在提取液中该化合物初

始的量,增强因子反映了异黄酮类物质与乳酸脱氢酶的结合能力的大小^[8]。

1.3.5 半制备型高效液相色谱条件

半制备型 SunFire™ C₁₈ 色谱柱(100 mm × 19 mm, I. D. 5 μm, 美国 Waters 公司),以 0.05% 醋酸水(A)和乙腈(B)作为液相色谱流动相,进行梯度洗脱,流动相梯度程序:0 ~ 3 min, 10% ~ 20% B, 3 ~ 6 min, 20% ~ 23% B, 6 ~ 9 min, 23% ~ 30% B, 9 ~ 15 min, 30% ~ 50% B, 15 ~ 20 min, 50% B;流速 10 mL/min;波长 266 nm,进样量 1 mL。

2 结果与讨论

2.1 应用 HPLC-ESI-MS 分析射干提取物中化学成分

采用“1.3.3”项高效液相色谱分离条件,射干提取物中的化合物得到较好的分离。射干提取物的液相色谱图如图 1 所示。采用液相色谱与质谱联用技术和标准品比对的方法,对液相色谱主要化合物

色谱峰相对应的质谱数据进行了分析,结果如表 1 所示。

化合物 1 的保留时间为 17.59 min,在一级质谱中母离子为 $[M + H]^+ m/z$ 463;其二级质谱离子主要碎片 m/z 301 和 m/z 286;碎片 m/z 301 是母离子失去一个葡萄糖 162 Da 产生的,即苷元离子;碎片 m/z 286 是苷元离子进一步失去一个 CH₃ 后产生的碎片离子峰。与文献报道鸢尾苷的主要碎片一致,此外,化合物 1 的保留时间与鸢尾苷标品一致,故推测为鸢尾苷^[9]。

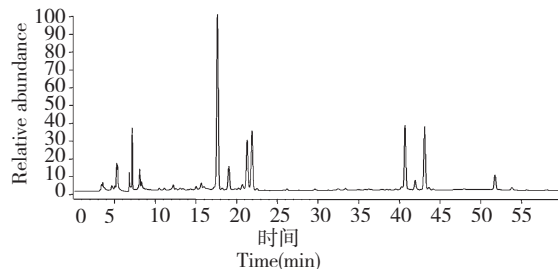


图 1 射干提取物的液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of *B. chinensis* extract

表 1 射干有效成分的液质联用分析数据

Table 1 Compounds detected in *B. chinensis* by HPLC-MS/MS

峰号 Peak No.	保留时间 t_R (min)	分子式 Formula	质荷比 MS, m/z	二级质荷比 MS/MS, m/z	化合物 Compounds
1	17.59	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463, $[M + H]^+$	343, 301, 286, 168	鸢尾苷
2	18.98	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	493, $[M + H]^+$	331, 145	鸢尾新苷 B
3	21.24	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	493, $[M + H]^+$	331, 316, 301, 273, 168	鸢尾新苷 A
4	21.83	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	523, $[M + H]^+$	361, 346, 232, 145	野鸢尾苷
5	40.66	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301, $[M + H]^+$	286, 257, 212, 168, 140	鸢尾苷元
6	43.06	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	361, $[M + H]^+$	346, 328, 301, 258, 232	野鸢尾黄素
7	51.72	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	387, $[M + H]^+$	372, 357, 342, 329, 314	次野鸢尾黄素

化合物 2 的保留时间为 18.98 min 质谱中母离子为 $[M + H]^+ m/z$ 493;其二级质谱离子主要碎片 m/z 331 和 m/z 145;碎片 m/z 331 是母离子失去一个葡萄糖 162 Da 产生的,即苷元离子;碎片 m/z 145 是苷元离子进一步失去 HCHO 等离子后产生的碎片离子峰。与文献报道一致,故推测为鸢尾新苷 B^[10],由于鸢尾新苷 B 和鸢尾新苷 A(化合物 3)互为同分异构体,因此,利用鸢尾新苷 B 对照品的液相色谱和质谱数据对该化合物进行系统的对比,证明化合物 2 为鸢尾新苷 B。

化合物 3 的保留时间为 21.24 min,与化合物 2

有着相同的串联质谱裂解规律,推测他们为同分异构体。质谱中母离子为 $[M + H]^+ m/z$ 493;其二级质谱离子主要碎片 m/z 331 和 m/z 316;碎片 m/z 331 是母离子失去一个葡萄糖 162 Da 产生的,即苷元离子;碎片 m/z 316 是苷元离子进一步失去一个 CH₃ 后产生的碎片离子峰。与文献报道的鸢尾新苷 A 碎裂方式一致^[11]。此外,化合物 3 的保留时间与鸢尾新苷 A 标品一致,故推测其为鸢尾新苷 A。

化合物 4 的保留时间为 21.83 min,在一级质谱中母离子为 $[M + H]^+ m/z$ 523;其二级质谱主要碎片 m/z 361 和 m/z 346;碎片 m/z 361 是母离子失去

一个葡萄糖 162 Da 产生的,即苷元离子;碎片 m/z 346 是苷元离子进一步失去一个 CH_3 后产生的碎片离子峰。与文献报道野鸢尾苷的主要碎片一致^[12],此外,化合物 **4** 的保留时间与野鸢尾苷样品一致,故推测为野鸢尾苷。

化合物 **5** 的保留时间为 40.66 min,在一级质谱中母离子为 $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 301;其二级质谱离子主要碎片 m/z 286 和 m/z 257; m/z 286 是母离子失去一个 CH_3 后产生的碎片离子峰, m/z 257 是进一步失去 4 位上的羰基产生的碎片离子峰。上述数据与文献报道鸢尾苷元的主要碎片一致^[13],此外,化合物 **5** 的保留时间与鸢尾苷元样品一致,故推测为鸢尾苷元。

化合物 **6** 的保留时间为 43.06 min,在一级质谱中母离子 $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 361;其二级质谱离子主要碎片 m/z 346 和 m/z 328; m/z 346 是母离子失去一个 CH_3 后产生的碎片离子峰, m/z 328 是 $[\text{M}-\text{CH}_3 + \text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 碎片离子峰。与文献报道野鸢尾黄素的主要碎片一致^[14],此外,化合物 **6** 的保留时间与野鸢尾黄素样品一致,故推测为野鸢尾黄素。

化合物 **7** 的保留时间为 51.72 min,在一级质谱中母离子 $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 387;其二级质谱离子主要碎片 m/z 372 和 m/z 357; m/z 372 是母离子失去一个 CH_3 后产生的碎片离子峰, m/z 357 是进一步失去一个 CH_3 后产生的碎片离子峰。上述数据与文献报道次野鸢尾黄素的主要碎片一致^[15],此外,化合物 **7** 的保留时间与次野鸢尾黄素样品一致,故推测为次野鸢尾黄素。

2.2 射干化学成分与乳酸脱氢酶生物亲和作用研究

取 10 μL 射干提取物(100 mg/mL)分别与 20 μL 乳酸脱氢酶及相同量失活的乳酸脱氢酶作用后

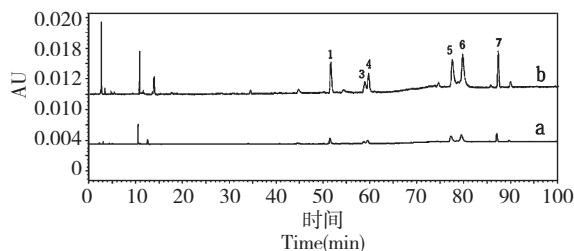


图2 射干提取物未与乳酸脱氢酶结合(a)及与 20 μL 乳酸脱氢酶结合(b)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of *B. chinensis* sample with de-natured LDH(a) and with 20 μL LDH(b)

的高效液相色谱图如图 2 所示。当射干提取物中化学成分与乳酸脱氢酶发生特异性结合后,乳酸脱氢酶捕获的配体所对应的峰面积均大于其空白对照。图 2 表明,射干提取物中有 6 个化合物可与乳酸脱氢酶结合。

通过分别比对图 2a 和图 2b 中的液相色谱峰面积,考察化合物与乳酸脱氢酶的生物亲和能力,可以比较得出化合物 **1**、**3**、**4**、**5**、**6** 和 **7** 具有明显的乳酸脱氢酶抑制作用,而化合物 **2** 在图中几乎看不到峰,不具有乳酸脱氢酶抑制作用。通过计算得出 **1**、**3**、**4**、**5**、**6** 和 **7** 化合物的增强因子数值依次为 7.17、5.86、8.03、25.99、23.02 和 49.82。各化合物对乳酸脱氢酶抑制效果强弱顺序为次野鸢尾黄素(**7**) > 鸢尾苷元(**5**) > 野鸢尾黄素(**6**) > 野鸢尾苷(**4**) > 鸢尾苷(**1**) > 鸢尾新苷 A(**3**)。因此得出结论:射干提取物中 **1**、**3**、**4**、**5**、**6** 和 **7** 化合物与乳酸脱氢酶具有生物亲和能力,对乳酸脱氢酶有一定的抑制作用,具有潜在的抗脑卒中病活性。

2.3 利用半制备型高效液相色谱分离射干中化合物

2.3.1 流动相的组成及比例

考虑到流动相的极性、黏度、分离效果等因素,实验中选择水、乙腈、甲醇,并以不同的比例将之混合。各实验组的具体流动相的组成及比例如表 2 所示。

实验结果表明:第 1 组采用水(0.5% 乙酸):乙腈 = 6:4 为流动相分离样品时,样品只分离出 2 个峰,且分离度较小,当增大进样量时,2 个峰重叠为 1 个峰。这可能由于异黄酮是一种复杂的混合物,且各种物质之间极性差别很大,等梯度洗脱程序很难将其很好地分离。

第 2~4 组依次按照如下梯度洗脱程序分离油茶果皮多酚:0~5 min,10%~25% B;5~8 min,25%~74% B;8~10 min,74%~70% B;10~13 min,70%~55% B;13~16 min,55%~50% B;16~20 min,50%~40% B。按此梯度洗脱程序分离,流动相的比例虽然改变了,但是样品各组分的分离度仍然太小,较难实现各组分的分离与收集,且收集到的物质其纯度较低,基线漂移严重。

第 5 组按照如下流动相梯度洗脱条件分离射干提取物:0~3 min,10%~20% B;3~6 min,20%~23% B;6~9 min,23%~30% B;9~15 min,30%~50% B;15~20 min,50% B。这组的分离效果明显

表 2 各实验组流动相的组成及比例

Table 2 The composition and proportion of the mobile phases of all group

组别 Group	流动相 A Mobile phases A	流动相 B Mobile phases B
1	0.5% 乙酸:乙腈 = 6:4 0.5% acetic acid: acetonitrile = 6:4	-
2	水:乙酸 = 100:0.5 water: acetic acid = 100:0.5	甲醇:乙腈 = 75:25 methanol: acetonitrile = 75:25
3	水:乙酸 = 100:0.5 water: acetic acid = 100:0.5	甲醇:乙腈 = 45:55 methanol: acetonitrile = 45:55
4	水:乙酸 = 100:0.5 water: acetic acid = 100:0.5	甲醇:乙腈 = 15:85 methanol: acetonitrile = 15:85
5	水:乙酸 = 100:0.5 water: acetic acid = 100:0.5	乙腈 acetonitrile

优于第 1~4 组,能使物质很好地分离,也可达到较好的分离度,可以同时分离出 6 种活性物质,且分离度较高,便于组分的收集,提高物质的制备率,且能够减少消耗更经济。因此,文中采用的流动相 A 为水:乙酸 = 100:0.5,流动相 B 为乙腈,按如下梯度洗脱程序分离射干提取物:0~3 min,10%~20% B;3~6 min,20%~23% B;6~9 min,23%~30% B;9~15 min,30%~50% B;15~20 min,50% B。

2.3.2 流速的选择

实验中对比观察了不同流速(3.0、6.0、10.0、13.0 mL/min)下物质的出峰情况。结果表明,流速的增加可以缩短物质的保留时间,但是,随着流速的增加,分离效果却下降,而且会使柱压增加,缩短柱子的使用寿命,同时增加流动相试剂的用量,使得收集液被稀释,后续处理的能耗增多,制备成本增加。但是,当流速小于 10 mL/min 时,物质出峰的保留时间大大延长,增加了制备时间和流动相用量。所以,文中采用的流速为 10 mL/min。

2.3.3 进样量的选择

实验中依次考察了进样体积分别为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 时样品的分离情况。结果表明,随着进样量的增加,物质产率便增加,单次制备量也增加,这样就可减少制备的次数,既节约了实验时间,又减少了流动相试剂的用量,提高了实验效率。但是,当进样量为 1.0 mL 时,色谱峰扩展现象严重,峰形不对称,而且进样量过大,柱压增加,物质的分离度下降。所以,综合考虑物质的分离度及所制备物质的产量,选择的进样量为 1.0 mL。

综合分析后最终确定的半制备液相色谱条件为:流速 10.0 mL/min,进样量 1.0 mL。梯度洗脱条件为:流动相 A 为水:乙酸 = 100:0.5,流动相 B 为

乙腈。按此条件制备的射干提取物中活性成分的制备图谱如图 3 所示,分别收集这 6 个峰,进一步采用 HPLC 对其纯度进行检测,结果如图 4 所示。

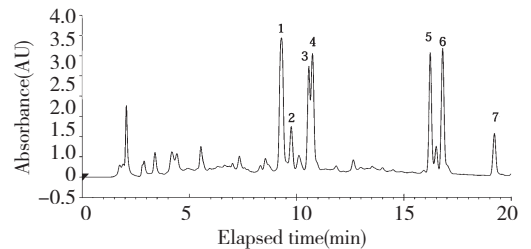


图 3 射干粗提物的半制备高效液相色谱图

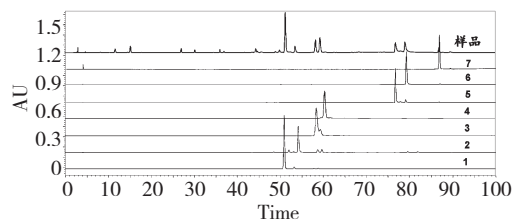
Fig. 3 Semi-prep · HPLC chromatogram of *B. chinensis* sample

图 4 半制备高效液相色谱分离收集成分的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of LDH inhibitors isolated by Semi-prep · HPLC

运用标准品比对法,根据液相色谱保留时间,确定分离出的化合物 1、2、3、4、5、6 和 7,分别为鸢尾苷(tectoridin)、鸢尾新苷 B(Iristectorin B)、鸢尾新苷 A(Iristectorin A)、野鸢尾苷(iridin)、鸢尾苷元(tectorigenin)、野鸢尾黄素(irigenin)和次野鸢尾黄素(irisfloreutin)(对应于 HPLC 图的峰 1,峰 2,峰 3,峰 4,峰 5,峰 6 和峰 7)。根据面积归一化法,其纯度依次为 96.29%、91.41%、92.33%、98.15%、97.26%、98.97% 和 92.17%,其中有六种为乳酸脱氢酶抑制剂。此结果表明,利用半制备型高效液相

色谱对射干活性成分进行大量制备分离的方法切实可行^[16]。

3 结论

以 HPLC-ESI/MS 作为研究方法,根据正离子模式下的质谱数据对射干粗提取物的化学成分进行了结构解析研究,结果表明,射干中化学成分主要为异黄酮类化合物成分。根据各色谱峰在质谱中的分子量、质谱碎片结构信息和色谱保留时间,成功鉴定了射干提取物中 6 个活性化合物。分别为鸢尾苷(tectoridin)、鸢尾新苷 A(Iristectorin A)、野鸢尾苷(iridin)、鸢尾苷元(tectorigenin)、野鸢尾黄素(irigenin)和次野鸢尾黄素(irisflorentin)。

通过利用超滤质谱法研究山射干与乳酸脱氢酶的抑制作用,验证了超滤质谱法是一种研究配体与酶的相互作用快速灵敏有效的分析方法。此 6 种异黄酮类化合物与乳酸脱氢酶均具有生物亲和能力,可以抑制乳酸脱氢酶生物活性。利用半制备液相色谱分离纯化筛选出的活性物质,条件为:流速 10.0 mL/min,进样量 1.0 mL。梯度洗脱:流动相 A 为水:乙酸=100:0.5,流动相 B 为乙腈,分离出的单体纯度均大于 92%。结果表明,以乳酸脱氢酶作为靶点,利用超滤质谱结合半制备高效液相色谱对天然产物进行筛选和分离具有简单快速、操作性强等优势,为开发具抗脑卒中病治疗药物提供了实验数据。

参考文献

- Li GX(李国信), Qin WY(秦文艳), Qi Y(齐越), et al. The anti-inflammatory and analgesia experiment research of the *Belamcanda chinensis* extract. *J Prac Trad Chinese Int Med* (实用中医内科杂志), 2008, 44(1): 3-4.
- Zhang L(张良), Zhang YK(张玉奎), Dai RJ(戴荣继), et al. The pharmacological effects of C-glycoside flavones in the leaves of *Belamcanda chinensis*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2010, 22: 728-730.
- Zhang L(张良), Zhang YK(张玉奎), Chen Y(陈艳), et al. Isoflavones in leaves of *Belamcanda chinensis*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23: 69-71.
- Li SN, Liu CM, Guo LP, et al. Ultrafiltration liquid chromatography combined with high-speed countercurrent chromatography for screening and isolating potential α -glucosidase and xanthine oxidase inhibitors from Cortex phellodendri. *J Sep Sci*, 2014, 37: 2504-2512.
- Tang Y, Li SN, Li SL, et al. Screening and isolation of potential lactate dehydrogenase inhibitors from five Chinese medicinal herbs: Soybean, Radix pueraria, Flos pueraria, Rhizoma belamcandae, and Radix astragali. *J Sep Sci*, 2016, 39: 2043-2049.
- Li L(李玲), Yang WM(杨为民), Wu WL(吴婉玲), et al. Neuroprotective effects of erigeon breviscapus flavonoids on transient cerebral ischemia-reperfusion injury in gerbils. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12: 55-59.
- Sena E, Worp H, Howells D, et al. How can we improve the pre-clinical development of drugs for stroke? *Trends Neurosci*, 2007, 30: 433-439.
- Li L, Li B, Zhang H, et al. Ultrafiltration LC-ESI-MSⁿ screening of MMP-2 inhibitors from selected chinese medicinal herbs *Smilax glabra*, *Smilax china*, *l.* and *Saposhnikovia divaricata*, (turcz.) *Schischk* as potential functional food ingredients. *J Funct Foods*, 2015, 15: 389-395.
- Min Y, Yang X, An J, et al. Comparative pharmacokinetic profiles of tectorigenin in rat plasma by UPLC-MS/MS after oral administration of Iris tectorum, Maxim extract and pure tectoridin. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 114: 34-41.
- Pan S, Hong JL, Gang W, et al. Analysis of flavonoids and phenolic acids in *Iris tectorum*, by HPLC-DAD-ESI-MS. *Chin J Natur Med*, 2010, 8: 202-207.
- Yu JC, Zhi TL, Yan Z, Guo, et al. Tissue-specific metabolites profiling and quantitative analyses of flavonoids in the rhizome of *Belamcanda chinensis*, by combining laser-microdissection with UHPLC-Q/TOF-MS and UHPLC-QqQ-MSⁿ. *Talanta*. 2014, 7: 585-597.
- Sulaiman CT, Balachandran I. LC/MS characterization of antioxidant flavonoids from *Tragia involucrata*, *L. Beni-Suef J Basic Appl Sci*, 2016, 5: 231-235.
- Zhang WD, Yang XL, Lei X, et al. Identification of key metabolites of tectorigenin in rat urine by HPLC-MS(n). *Biomol Chromatogr*, 2009, 23: 219-221.
- Zhang WD, Yang WJ, Wang XJ, et al. Simultaneous determination of tectorigenin, irigenin and irisflorentin in rat plasma and urine by UHPLC-MS/MS: Application to pharmacokinetics. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 3735-3741.
- Roger B, Jeannot V, Fernandez X, et al. Characterisation and quantification of flavonoids in *Iris germanica* L. and *Iris pallida* Lam. resinoids from Morocco. *Phytochem Anal*, 2012, 23: 450-455.
- Zhao QJ(赵清洁), Long QZ(龙奇志), Zhong HY(钟海雁), et al. Optimum condition of isolation and preparation of polyphenol in *Camellia pericarp* by semi-preparation HPLC. *Nonwood Forest Res* (经济林研究), 2012, 30(2): 73-77.