

猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选分离及质谱分析

庄思远, 周旭, 李彦杰, 刘春明*, 李赛男*, 张语迟

(长春师范大学中心实验室, 吉林长春 130032)

摘要: 试验以猪苓为研究对象, 综合利用遗传算法-BP 神经网络数学模型、色谱和质谱等技术, 建立快速筛选猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂的新方法。首先, 利用遗传算法-BP 神经网络数学模型优化猪苓中麦角甾醇的提取工艺; 其次, 以黄嘌呤氧化酶为生物靶分子, 应用超滤质谱技术, 筛选猪苓中潜在的黄嘌呤氧化酶抑制剂, 同时, 应用分子对接技术验证超滤实验的准确性; 最后, 以活性筛选为导向, 利用高速逆流色谱技术分离猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂。结果显示: 猪苓中麦角甾醇的最佳提取工艺为乙醇体积分数 80%、液料比 16 mL/g、提取时间 1.4 h、提取次数 3 次, 在此条件下, 麦角甾醇得率为 2.31%; 从猪苓中筛选并分离出 4 个纯度均在 90% 以上的黄嘌呤氧化酶抑制剂, 其抑制效果强弱顺序为猪苓酮 A>猪苓酮 B>麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮>麦角甾-7,22-二烯-3-酮。该方法快速、灵敏, 为猪苓抗痛风药理作用的进一步研究提供了一定的理论基础。

关键词: 猪苓; 黄嘌呤氧化酶; BP 神经网络; 分子对接; 高速逆流色谱

文章编号: 1673-9078(2023)11-58-67

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1366

Screening, Isolation, and Mass Spectrometric Analysis for Xanthine Oxidase Inhibitors from *Polyporus umbellatus*

ZHUANG Siyuan, ZHOU Xu, LI Yanjie, LIU Chunming*, LI Sainan*, ZHANG Yuchi

(The Central Laboratory, Changchun Normal University, Changchun 130032, China)

Abstract: A new method was developed for the rapid screening of xanthine oxidase inhibitors in *Polyporus umbellatus*. The novel rapid and sensitive method uses an integrated approach combining a genetic algorithm-back propagation neural network mathematical model, chromatography, and mass spectrometry. Extraction of ergosterol from *P. umbellatus* was optimized using the genetic algorithm-back propagation neural network mathematical model. Secondly, using xanthine oxidase as the biological target molecule, ultrafiltration mass spectrometry was applied to screen for potential xanthine oxidase inhibitors in *P. umbellatus*. Molecular docking technology was used to validate the accuracy of the ultrafiltration experiment. Finally, with the guidance of the activity screening, high-speed counter-current chromatography was used to separate the xanthine oxidase inhibitors from *P. umbellatus*. The optimal extraction conditions for *P. umbellatus* ergosterol were 80% ethanol by volume, liquid-solid concentration of 16 mL/g, extraction time of 1.4 hours, and three extraction cycles. The optimized yield of ergosterol was 2.31%. Four xanthine oxidase inhibitors with purity >90% were identified and isolated from *P. umbellatus*. Their inhibitory activity ranked in order of polyporusterone A> polyporusterone B> ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one> ergosta-7,22-dien-3-one. The findings providing a theoretical basis for further studies on the anti-gout effects of *P. umbellatus*.

Key words: *Polyporus umbellatus*; xanthine oxidase; back propagation neural network; molecular docking; high-speed counter-current chromatography

引文格式:

庄思远,周旭,李彦杰,等.猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选分离及质谱分析[J].现代食品科技,2023,39(11):58-67

ZHUANG Siyuan, ZHOU Xu, LI Yanjie, et al. Screening, isolation, and mass spectrometric analysis for xanthine oxidase inhibitors from *Polyporus umbellatus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 58-67

收稿日期: 2022-10-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31870336); 吉林省自然科技基金项目 (YDZJ202201ZYTS514)

作者简介: 庄思远 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物分析化学, E-mail: 1725240100@qq.com

通讯作者: 刘春明 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物分析化学, E-mail: ccsf777@163.com; 共同通讯作者: 李赛男 (1985-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 天然药物分析化学, E-mail: sainan_85@163.com

猪苓 [*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries] 在不同地区又有猪苓多孔菌、猪灵芝、猪茯苓、地乌桃等名称, 外观呈不规则块状, 是多孔菌科、多孔菌属的药用真菌^[1]。其味甘、淡, 性平, 具有利水、渗湿功效^[2]。临床上常用于治疗急性肾炎、全身浮肿等疾病^[3], 现代研究表明, 猪苓在增强免疫力^[4]、抗肿瘤^[6]、保肝^[7]、抗氧化^[8]等方面具有一定的药理作用。猪苓中主要化学物质为甾体类化合物和多糖, 还包含少量的含氮类、酚类等化学成分, 其中甾体类化合物为主要的有效成分, 包括麦角甾醇、猪苓酮 A、猪苓酮 B 等^[9,10]。因此, 猪苓作为甾体类化合物含量丰富的植物, 开发利用价值较高。

常用的优化方法的是正交实验设计、因子设计、响应面 (Response Surface Methodology, RSM) 实验设计等, 传统的方法存在灵活性较差, 对试验点的选择要求高, 如果试验点的选择不当, 则得不到理想的优化结果等缺点。遗传算法是一种通过模拟自然界的生物进化过程来寻找最优解法的优化算法, 在非线性优化问题的处理上得到了广泛的应用^[11,12]。BP 神经网络是一种基于误差反向传播算法的多层前馈神经网络, 能够通过软件的学习和训练, 总结出实验数据中的规律, 它以实验数据为基础, 不需要提前给出公式的形式, 在优化提取工艺的过程中具有独到的优势, 因此利用遗传算法-BP 神经网络数学模型优化猪苓中麦角甾醇的提取工艺, 可以达到较好的预测和优化效果^[13,14]。

猪苓具有广泛的生物活性, 成为了发掘新药先导化合物的重要源泉, 但成分复杂, 治疗作用是通过抑制酶的活性来实现的。超滤质谱技术 (Ultrafiltration-MS) 利用亲和原理筛选酶抑制剂, 是近年来常用于从天然药物中筛选黄嘌呤氧化酶 (Xanthine Oxidase, XOD) 抑制剂的方法^[15], 它具有操作简单、分析速度快、高通量等特点。分子对接是一种理论模拟方法, 研究配体和受体之间的相互作用, 并预测其结合方式。在天然药物研究领域, 分子对接技术近年来已成为一项重要技术^[16]。

从天然药物中分离黄嘌呤氧化酶抑制剂的方法有硅胶柱色谱、硅藻土、AB-8 大孔吸附树脂, 这些常规方法存在耗时长、死吸附大的缺点, 易造成样品的损失, 为了解决这些问题, 本研究建立了高速逆流色谱分离纯化猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂的方法。高速逆流色谱 (High Speed Counter Current Chromatography, HSCCC) 是一种液-液分配色谱技术, 区别于传统的固-液色谱, 它无需任何固体载体作为固定相, 而是由两种互不相溶的液体作为固定相和流动相, 具有固定相成本低、易回收、分离过程灵活、效率高等优点^[17,18],

在天然药物的分离制备领域, 被广泛应用。

实验以猪苓为研究对象, 综合利用遗传算法-BP 神经网络数学模型、质谱和色谱等技术, 建立了快速筛选猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂的方法。首先, 利用响应面结合遗传算法-BP 神经网络, 优化了猪苓中麦角甾醇的提取工艺; 其次, 以黄嘌呤氧化酶为生物靶分子, 应用超滤质谱技术, 快速筛选猪苓中潜在的酶抑制剂, 同时, 应用分子对接技术验证超滤实验的准确性; 最后, 以活性筛选为导向, 利用高速逆流色谱技术分离猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂。该方法快速、灵敏, 为猪苓抗痛风等药理作用的进一步研究提供了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

供试仪器: 超高效液相色谱-轨道阱高分辨质谱仪 UPLC-Q Exactive MS, 美国 Thermo Scientific 公司; Waters 2695 高效液相色谱仪; DK-98-II 型恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司; D-37520 型离心机, 美国 Sigma 公司; TBE300A 高速逆流色谱仪, 中国上海同田生物技术有限公司。

供试试剂: 黄嘌呤氧化酶 (1001918117) 购自 Fluka; 对照品麦角甾醇、猪苓酮 B、猪苓酮 A、麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮、麦角甾-7,22-二烯-3-酮均购自成都埃法生物科技有限公司; 超滤离心管 (30 kD) 购自 PALL; Tris-HCl 缓冲溶液购自 Bueke; 乙腈 (色谱纯)、甲醇 (色谱纯) 购自 Thermo Fisher 公司; 其它试剂为分析纯购自北京化工厂; 猪苓购自长春市北京同仁堂药店。

1.2 方法

1.2.1 响应面试验设计

称取干燥猪苓粉 1.0 g, 分别考察麦角甾醇得率受乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数的影响。参数考察区间分别为: 乙醇体积分数 60%、70%、80%、90%、100%; 液料比 5、10、15、20、25 (mL/g); 提取时间 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h; 提取次数 1、2、3、4 次。除说明考察因素条件不同外, 其他影响因素均设置为乙醇体积分数为 90%、液料比为 1:20 (g/mL)、提取时间为 1 h、提取次数为 1 次。

设计响应面试验, 以单因素为基础, 将响应值设定为猪苓中麦角甾醇得率, 以单因素考察的 4 个因素为变量, 进一步优化猪苓中麦角甾醇的提取工艺。

1.2.2 BP神经网络模型构建

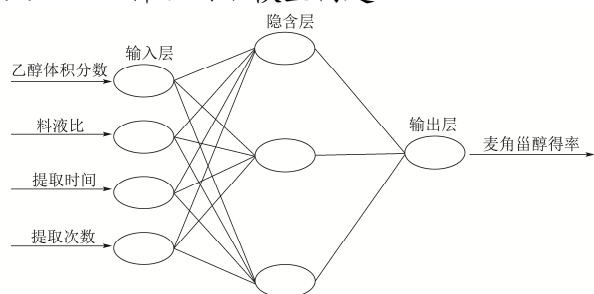


图1 BP神经网络模型流程结构图

Fig.1 Flow chart of BP neural network model

3层BP神经网络模型是在响应面试验的基础上创建的,该模型的4个输入变量选择乙醇体积分数,料液比,提取时间,提取次数,输出变量为麦角甾醇得率。隐含层数为1,内含隐含层节点数为15,其他参数为软件默认值,训练数据使用响应面试验的29组数据,根据图1创建的BP神经网络的流程结构,利用Matlab软件编写程序。

1.2.3 遗传算法寻优

基于1.2.2创建的BP神经网络模型与遗传算法结合对猪苓中麦角甾醇的提取工艺进一步寻优,设定试验参数:种群大小为50,最大进化代数为200,利用Matlab软件程序,得到每代种群平均适应度及变化结果。

1.2.4 高效液相色谱条件

C_{18} 色谱柱(SunFireTM, 250 nm×4.6 nm, Waters),以乙腈(A)和超纯水(B)作为流动相,梯度程序为:0~5 min, 2% A; 5~15 min, 2%~5% A, 15~17 min, 5% A, 17~50 min, 5%~15% A, 50~80 min, 15%~93% A, 80~90 min, 93%~100% A, 90~100 min, 100% A, 流速:0.4 mL/min, 进样体积:5 μ L; 检测波长:254 nm。

1.2.5 超滤条件

参考文献^[19], 30 μ L猪苓样品溶液(100 mg/mL)分别与90 μ L不同活度的黄嘌呤氧化酶(0.2、0.5、1.0 U/mL)混合,分别加入100 μ L Tris-HCl缓冲溶液,在37 $^{\circ}$ C水浴锅中孵育30 min,通过30 ku超滤膜将未结合的小分子与结合的大分子进行分离。用100 μ L 50%甲醇水冲洗超滤膜上大分子,离心(11 000×g)10 min,若膜上还残留有结合的大分子则重复冲洗离心。空白组加入90 μ L的Tris-HCl缓冲溶液代替酶,其他条件保持不变,之后在1.2.4条件下进行检测。样品与酶的结合强度按下式计算:

$$S = \frac{A_1 - A_2}{A_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

S——样品与酶的结合强度, %;

A_1 ——化合物与黄嘌呤氧化酶结合后的峰面积;

A_2 ——化合物未与黄嘌呤氧化酶结合的峰面积。

1.2.6 液质条件

以超纯水(A)和乙腈(B)作为流动相,梯度程序:0~2 min, 5% B, 2~15 min, 5%~15% B, 15~60 min, 15~100% B; 流速:0.2 mL/min; 样品进样量为5.0 μ L; 检测波长:254 nm。质谱离子源:电喷雾离子源; 扫描范围 m/z : 100~1 000; 在正离子分析模式; 离子源喷雾电压4.0 kV, 辅助气为10 psi, 离子阱压力 3.1×10^7 Pa; 毛细管温度320 $^{\circ}$ C。

1.2.7 分子对接模拟条件

为了进一步明确猪苓治疗痛风的化合物和靶点的可靠性,对猪苓治疗痛风的化合物进行分子对接,以评估其之间的结合情况。在数据库中下载复合物。随后,使用Autodock vina软件对4个有效成分与黄嘌呤氧化酶进行分子对接。

1.2.8 高速逆流色谱条件

按 $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=5:2:4$ 配制溶剂系统,在分液漏斗中充分混合后,分出上下两相,上相作为固定相,下相作为流动相。分别取4 mL的固定相和流动相,将400 mg的猪苓粗提物溶于两相中。

在使用固定相和流动相之前,将两相进行超声脱气,将超声脱气后的固定相(上相)泵入高速逆流色谱仪的螺旋管中,设转速为800 r/min,当固定相(上相)充满螺旋管后,以1.2 mL/min的流速泵入流动相(下相),当流动相从出口处流出时,两相达到平衡,从进样圈中注入猪苓样品溶液,在254 nm的波长下,收集馏分。

1.2.9 数据分析

统计分析在Office Excel 2010软件上进行,响应面试验结果分析在Design Expert 11.0软件上进行;分子对接在Autodock vina软件上进行可视化分析。

2 结果与分析

2.1 猪苓中麦角甾醇提取工艺的优化

2.1.1 响应面试验结果与数据分析

在单因素试验的基础上,利用软件设计四因素三水平试验,对猪苓中麦角甾醇的工艺条件进行优化,试验设计结果如表1所示。

采用Design-Expert 8.0.6软件对表1的数据进行分析,得到以麦角甾醇得率的多元二次回归方程为:

$$Y = 2.26 + 0.049A + 0.035B + 0.026C + 0.069D - 6.875 \times 10^{-3}AB - 1.875 \times 10^{-3}AC + 5.625 \times 10^{-3}AD - 0.011BC + 0.014BD - 0.023CD - 0.32A^2 - 0.066B^2 - 0.018C^2 - 0.14D^2$$
。对多项式模型进行方差分析结果表明,模型的 F 值为71.55,

$P<0.0001$ ，失拟项的 F 值为 4.74， P 为 0.073 5，说明该模型拟合较好，有统计学意义。对各因素进行分析，得出 4 个因素对麦角甾醇得率的影响最大为提取

次数（D），其次为乙醇体积分数（A），液料比（B），提取时间（C）是影响猪苓中麦角甾醇得率最小的因素。

表 1 试验设计与结果

Table 1 Design scheme and test results

编号	A 乙醇体积分数/%	B 液料比 (mL/g)	C 提取时间/h	D 提取次数/次	得率/%		
					实测值	RSM 预测值	GA-BP 预测值
1	70	10	2.0	4	1.62	1.62	1.62
2	90	15	1.5	3	1.92	1.97	1.97
3	90	20	1.0	4	1.80	1.76	1.80
4	90	10	1.0	2	1.53	1.54	1.54
5	80	15	1.0	3	2.07	2.08	2.07
6	80	15	1.5	3	2.30	2.26	2.29
7	70	20	2.0	2	1.62	1.61	1.62
8	90	10	2.0	4	1.68	1.69	1.68
9	80	20	1.5	3	2.19	2.25	2.20
10	80	15	2.0	3	2.15	2.18	2.15
11	70	20	1.0	2	1.54	1.52	1.55
12	90	20	2.0	2	1.64	1.65	1.64
13	80	15	1.5	3	2.30	2.26	2.29
14	90	10	1.0	4	1.64	1.66	1.65
15	80	10	1.5	3	2.14	2.16	2.14
16	90	20	2.0	4	1.79	1.78	1.80
17	80	15	1.5	2	2.07	2.11	2.06
18	70	20	2.0	4	1.73	1.71	1.72
19	80	15	1.5	4	2.13	2.19	2.13
20	80	15	1.5	3	2.35	2.26	2.29
21	70	15	1.5	3	1.86	1.88	1.86
22	70	10	1.0	4	1.55	1.52	1.54
23	90	10	2.0	2	1.65	1.60	1.66
24	70	10	2.0	2	1.51	1.54	1.51
25	80	15	1.5	3	2.28	2.26	2.29
26	70	10	1.0	2	1.42	1.42	1.42
27	90	20	1.0	2	1.63	1.63	1.64
28	80	15	1.5	3	2.31	2.26	2.29
29	70	20	1.0	4	1.60	1.64	1.61

2.1.2 各因素间的交互作用分析

响应面的 3D 图能够较为直观的体现出各因素的交互作用对麦角甾醇得率的影响。曲面越陡峭，表明其对应的对响应值（麦角甾醇得率）的影响越显著，得率也越大^[20]。根据回归方程绘制响应曲面图。

由图 2 所示，乙醇体积分数与提取时间之间的曲线最陡，表明对应因素之间的交互作用最显著，乙醇体积分数与液料比的等高线图最圆，表明对应因素之间的交互作用对响应值（麦角甾醇得率）的影响最不

显著。增大乙醇体积分数可以促使细胞溶胀，有利于提取剂向细胞内部的渗透，从而提高了麦角甾醇得率。但乙醇体积分数过高，导致溶液体系的极性下降，使细胞中的醇溶性与脂溶性杂质竞争溶剂，导致得率呈现出下降的趋势。不同交互因素之间均存在稳定的极值，且 3D 图均为开口向下的凸曲面，表明响应值 Y （麦角甾醇得率）有最大值，对麦角甾醇得率的回归方程求极值，得到最佳提取工艺为：乙醇体积分数为 80.66%、液料比为 16.78 mL/g、提取时间为 1.56 h、

提取次数为 3.21 次。在此条件下, 麦角甾醇得率通过响应面预测为 2.28%。工艺条件根据实际操作修正为乙醇体积分数 81%, 液料比 17 mL/g, 提取时间 1.60 h, 提取次数 3 次, 猪苓中麦角甾醇在此条件下提取, 实测值 2.31%, 相对误差 1.32%。

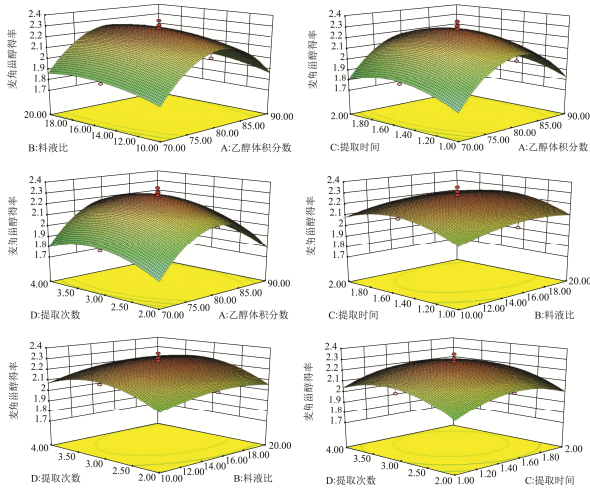


图 2 各因素交互效应的响应曲面图

Fig.2 Response surface diagram of interaction effects of various factors

2.1.3 遗传算法-BP 神经网络的构建和训练

在响应面分析的基础上, 采用 BP 人工神经网络对麦角甾醇的提取工艺进行进一步优化, 采用 29 组试验数据进行训练, 经 BP 神经网络进行训练, 其训练集、验证集、测试集和全部集结果如图 3 所示。

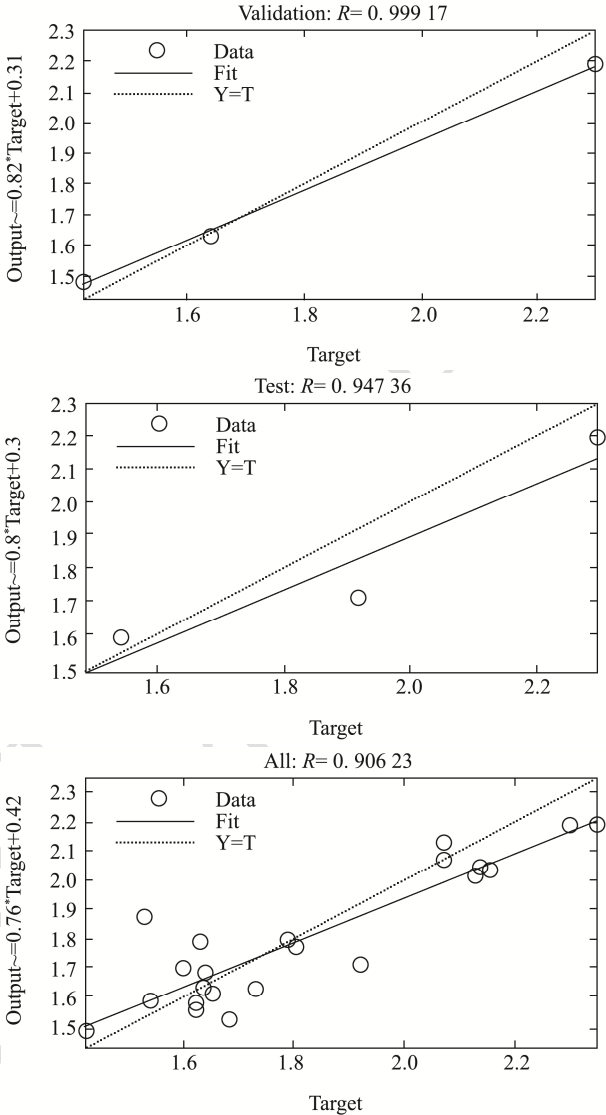
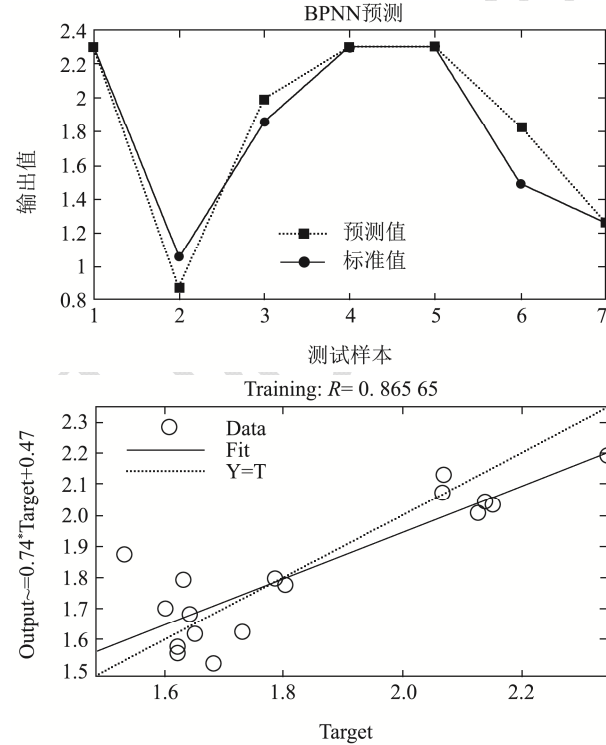


图 3 BP 神经网络训练模型适配

Fig.3 BP neural network training model adaptation

由图 3 结果显示, 经过训练的 BP 神经网络, 预测值与试验值拟合较好, 表明建立的 BP 神经网络模型性能可靠。图中有一条实线和一条虚线, 实线为标准值, 虚线为预测值, 预测输出曲线基本与测试样本曲线趋势一致。训练集、验证集、测试集和全部集的 R^2 在 0.8~1 范围内, 具有统计学意义。将经过训练的 BP 神经网络作为遗传算法的适应度函数, 通过选择、交叉和变异 3 个步骤, 寻找优秀个体, 当个体的适应度趋于稳定, 达到最优状态。

由图 4 可知, 经过 30 代后达到最佳适应度, 此后适应度曲线趋于稳定, 表明麦角甾醇得率达到最大。经遗传算法-BP 神经网络对猪苓中麦角甾醇的提取工艺进行优化, 得猪苓中麦角甾醇的最佳提取工艺: 乙醇体积分数为 80.23%、液料比为 15.84 mL/g、提取时

间为 1.43 h、提取次数为 3.06 次,在此条件下,麦角甾醇得率通过遗传算法-BP 神经网络数学模型预测为 2.30%。工艺条件根据实际操作修正为乙醇体积分数为 80%、液料比为 16 mL/g、提取时间 1.4 h、提取次数 3 次,在此条件下,对猪苓中麦角甾醇进行提取,其得率实测值为 2.31%,相对误差为 0.43%。通过遗传算法-BP 神经网络获得的最佳工艺优化条件参数与响应面得到的最优参数相近,且预测含量要高于响应面优化中得到的最佳含量,具有一定的准确性。并且,遗传算法-BP 神经网络的拟合度和预测精度都优于传统的响应面方法。证实了该理论模型的可行性,模型预测性能良好,由此得到的麦角甾醇提取条件具有实际应用价值。

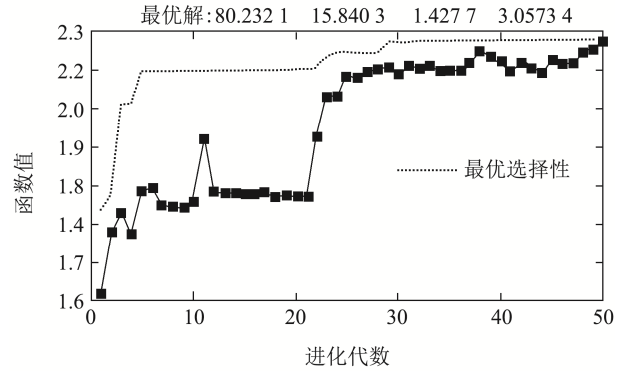


图 4 遗传算法的适应度曲线
Fig.4 Fitness curve of genetic algorithm

2.2 猪苓中的有效成分化学成分与黄嘌呤氧化酶生物亲和作用

30 μL 猪苓样品溶液 (100 mg/mL) 与黄嘌呤氧化酶未结合的对照组以及分别与 90 μL 不同活度黄嘌呤氧化酶 (0.2、0.5、1.0 U/mL) 结合的实验组的液相色谱图如图 5 所示。

由图 5 可知,猪苓中化合物 1、2、3 和 4 与具有生物亲和能力,其对应的峰面积均大于空白组的峰面积,这表明,这 4 个化合物能够抑制黄嘌呤氧化酶,具有潜在的抗痛风的活性。猪苓化合物与不同活度黄嘌呤氧化酶的结合强度如表 2 所示。

结果表明,化合物猪苓酮 B (1)、猪苓酮 A (2) 与黄嘌呤氧化酶的结合强度明显高于化合物麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮 (3)、麦角甾-7,22-二烯-3-酮 (4),其对黄嘌呤氧化酶有较强的抑制作用,化合物麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮 (3)、麦角甾-7,22-二烯-3-酮 (4) 对黄嘌呤氧化酶的抑制效果不明显,其中 4 个化合物对 1.0 U/mL 黄嘌呤氧化酶的抑制效果最强,对 0.2 U/mL 黄嘌呤氧化酶的抑制效果最弱。

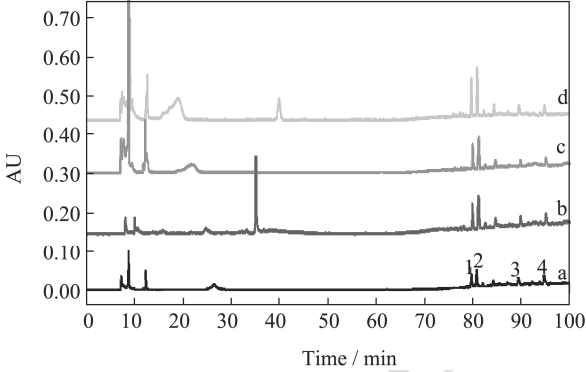


图 5 猪苓提取物与黄嘌呤氧化酶结合的液相色谱图
Fig.5 Liquid chromatogram of the combination of *Polyporus umbellatus* extract and xanthine oxidase

注: a 为空白组; b 为 0.2 U/mL; c 为 0.5 U/mL; d 为 1.0 U/mL; 1 为猪苓酮 B; 2 为猪苓酮 A; 3 为麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮; 4 为麦角甾-7,22-二烯-3-酮。

表 2 猪苓提取物与黄嘌呤氧化酶结合强度表
Table 2 Binding strength of *Polyporus umbellatus* extract and xanthine oxidase

编号	结合强度/%		
	0.2 U/mL	0.5 U/mL	1.0 U/mL
1	33.68	38.69	40.77
2	54.74	57.99	59.22
3	14.01	16.11	17.53
4	9.28	11.76	15.17

综上,从猪苓提取物中筛选得到 4 个黄嘌呤氧化酶抑制剂,均具有生物亲和能力,具有潜在的抗痛风活性。各化合物与黄嘌呤氧化酶的结合强度分别为 40.77%、59.22%、17.53%、15.17%,因此抑制效果强弱顺序为猪苓酮 A (2) > 猪苓酮 B (1) > 麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮 (3) > 麦角甾-7,22-二烯-3-酮 (4)。

2.3 猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂的液-质分析结果

采用“1.2.4”项高效液相色谱条件分离猪苓粗提物,能够较好的分离猪苓提取物中的化合物,液相色谱图如图 8a 所示,采用“1.2.6”项液质条件对猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂的质谱数据进行了分析,并与标准品进行比对,结果如表 3 所示。

化合物 1 的液相保留时间为 79.14 min,一级质谱出现准分子离子峰 $[M+H]^+$ (m/z 476.32),经裂解产生的碎片离子 m/z 363, m/z 345,其中 m/z 363 是母离子失去一个 $C_7H_{13}O$ 产生的, m/z 345 是母离子失去一个 $C_7H_{13}O$ 和一个 H_2O 产生的,这些碎片结果与文献报道猪苓酮 B 的主要质谱碎片一致,其保留时间与猪苓

酮 B 标品一致,故推测为猪苓酮 B^[21]。利用上述相同的方法,推测化合物 2、3 和 4 分别为猪苓酮 A、麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮和麦角甾-7,22-二烯-3-酮^[22-24]。

表 3 猪苓粗提取物中有效成分的液质联用分析数据

Table 3 Analytical data of effective components in crude extract of *Polyporus umbellatus* by LC-MS

峰号	时间/min	分子式	质荷比	二级质荷比	化合物
1	79.14	C ₂₈ H ₄₄ O ₆	476.32	363, 345	猪苓酮 B
2	81.12	C ₂₈ H ₄₆ O ₆	478.33	461, 443, 407, 345	猪苓酮 A
3	84.85	C ₂₈ H ₄₀ O	392.61	335, 268, 253	麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮
4	95.33	C ₂₈ H ₄₄ O	396.65	381, 274, 256	麦角甾-7,22-二烯-3-酮

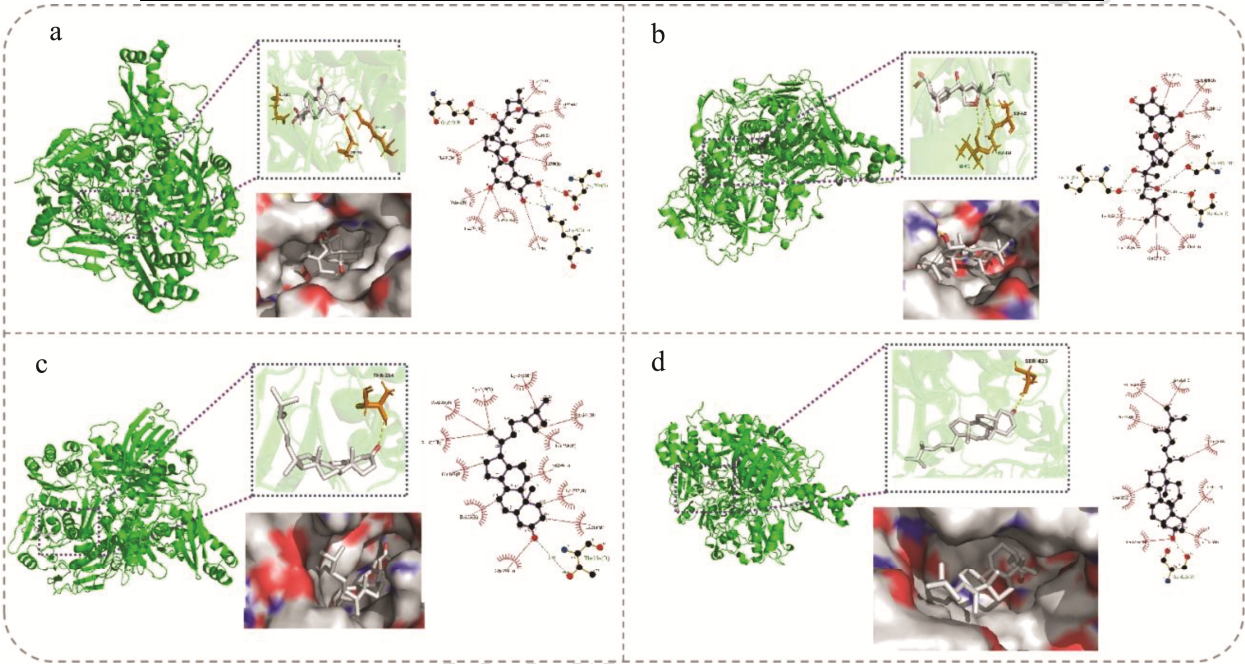


图 6 不同化合物与黄嘌呤氧化酶结合的分子对接图

Fig.6 Molecular docking diagram of different compounds binding to xanthine oxidase

注: 1 为猪苓酮 B; 2 为猪苓酮 A; 3 为麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮; 4 为麦角甾-7,22-二烯-3-酮。

2.4 猪苓中有效成分与黄嘌呤氧化酶的分子对接结果分析

采用 Autodock vina 将 4 个有效成分与黄嘌呤氧化酶进行分子对接,并预测其结合能 (Binding Energy, kJ/mol)。结合能越低,对接物构象越稳定,活性成分与蛋白结合越牢固,亲和力越好^[25]。最佳结合模式如图 6 所示。

图 6 表明,猪苓酮 B 与 Glu263(B)形成一条氢键,键长 2.91 nm、与 Asp360(B)形成一条氢键,键长 2.70 nm、与 Lys422(B)形成两条氢键,键长 2.95 和 2.98 nm;猪苓酮 A 与 Ser425(B)形成一条氢键,键长 2.84 nm、与 Ala424(B)形成一条氢键,键长 3.14 nm、与 Ile431(B)形成两条氢键,键长 2.90 和 3.05 nm;麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮与 Ser425(B)形成一条氢

键,键长 2.94 nm;麦角甾-7,22-二烯-3-酮与 Thr345(B)形成一条氢键,键长 2.81 nm。此外,在周围观察到了疏水作用,多个力可以增加形成的复合物的稳定性。4 个化合物在黄嘌呤氧化酶的活性位点均表现出良好的结合,因此具有潜在的抗痛风应用。4 个化合物与黄嘌呤氧化酶的对接结合能分别为-8.6、-8.7、-8.1、-7.8 kcal/mol,结果与超滤实验结果一致。

2.5 利用高速逆流色谱分离猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂

在高速逆流色谱中,分离的关键是选择合适的溶剂系统,最适合的 *K* 值范围是 0.5~2.0^[26]。根据化合物的特性,本研究考察了猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂在表 4 所列溶剂系统的分配系数。

表 4 猪苓中有效成分在不同溶剂系统中的分配系数 (K)

Table 4 Partition coefficient of effective components in *Polyporus umbellatus* in different solvent systems

项目	溶剂系统	V/V/V/V	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
1	正己烷-甲醇-水	5:1:5	1.52	4.23	5.12	12.30
2	正己烷-甲醇-水	5:2:5	1.23	3.12	3.55	10.12
3	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	5:1:1:5	1.30	1.50	2.58	5.98
4	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	5:1:2:5	1.09	1.43	2.34	4.73
5	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	5:2:1:5	0.97	1.23	1.30	3.95
6	乙酸乙酯-甲醇-水	5:1:5	1.05	1.15	2.21	3.45
7	乙酸乙酯-甲醇-水	5:2:4	0.51	0.78	1.23	2.31
8	乙酸乙酯-乙醇-水	5:1:5	0.06	1.37	1.61	6.95
9	乙酸乙酯-乙醇-水	5:2:4	0.02	1.61	1.83	5.98
10	石油醚-乙腈-水	5:1:5	-	1.14	1.34	4.73
11	石油醚-乙腈-水	3:2:5	-	2.09	1.39	6.95

从表 4 中可以看出,在正己烷-甲醇-水及正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水中,化合物 3 和化合物 4 的 K 值均大于 2,采用这两个溶剂系统会导致分离时间过长、分离效率低。在石油醚-乙腈-水中,化合物 1 的 K 值不存在,难以达到很好的分离效果。当溶剂系统为乙酸乙酯-甲醇-水 (5:2:4, $V/V/V$) 时,4 个化合物的 K 值分别为 0.51、0.78、1.23、2.31,可以在短时间内实现对猪苓粗提物的分离纯化,并且一次就可以得到 4 个化合物。实验中还考察了流动相的流速对分离效果的影响。若流速太慢,则浪费时间;若流速太快,则分离效果不好。最终选择流量为 1.2 mL/min。

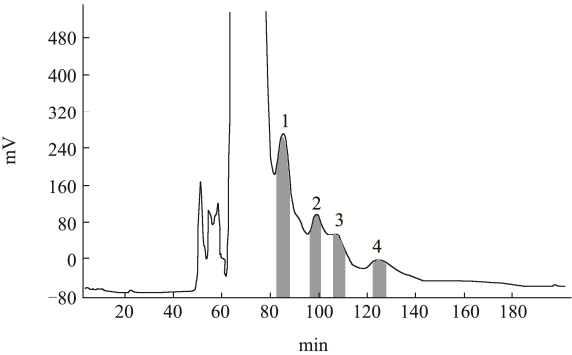


图 7 猪苓高速逆流色谱分离图

Fig.7 High speed countercurrent chromatographic separation diagram of *Polyporus umbellatus*

注: 1 为猪苓酮 B; 2 为猪苓酮 A; 3 为麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮; 4 为麦角甾-7,22-二烯-3-酮。

在溶剂系统为乙酸乙酯 - 甲醇 - 水 (5:2:4, $V/V/V$),流速为 1.2 mL/min,波长为 254 nm,进样体积为 5 mL (样品质量浓度为 50 mg/mL) 的条件下,分离猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂,结果如图 7 所示。体系固定相保留率为 63%,60 min 左右出溶剂峰,色

谱分离出 4 个峰,分离时间 200 min。分别收集这 4 个组分,蒸干后,用甲醇溶解,在 1.2.4 条件下采用 HPLC 对其纯度进行检测。

2.6 猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂分离纯化结果

采用“1.2.8”项高速逆流色谱条件,采用 HPLC 对经 HSCCC 分离得到的 4 个组分进行液相色谱检测分析,其结果如图 8 所示。

由图 8 可知,高速逆流色谱对猪苓粗提物中黄嘌呤氧化酶抑制剂有较好分离效果,与标准品进行比对,根据 4 个化合物在液相色谱中的保留时间,确定分离得到 4 个单体化合物分别为猪苓酮 B、猪苓酮 A、麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮和麦角甾-7,22-二烯-3-酮,根据面积归一化法计算 4 个化合物的纯度,分别为 94.6%、95.2%、98.3%和 96.2%。结果表明,高速逆流色谱能够大量分离制备猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂。

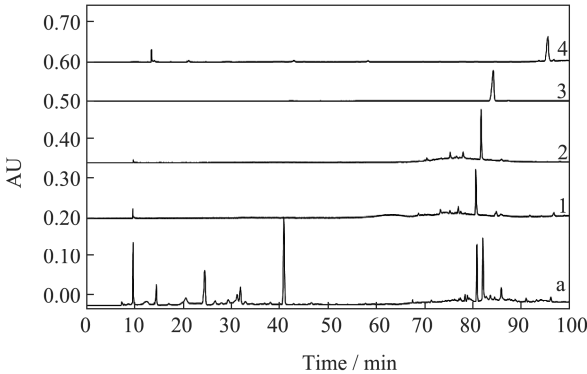


图 8 高速逆流色谱分离得到化合物的液相色谱图

Fig.8 Liquid chromatograms of compounds obtained by high speed countercurrent chromatography

注: a 为猪苓样品; 1 为猪苓酮 B; 2 为猪苓酮 A; 3 为麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮; 4 为麦角甾-7,22-二烯-3-酮。

3 结论

在响应面分析的基础上,经遗传算法-BP 神经网络数学模型对猪苓中麦角甾醇的提取工艺进行优化,得到最佳提取工艺为:乙醇体积分数 80%、液料比 16 mL/g、提取时间 1.4 h、提取次数 3 次,在此条件下,麦角甾醇得率为 2.31%。建立的遗传算法-BP 神经网络数学模型性能良好,可以更好的预测猪苓中麦角甾醇得率。

通过超滤质谱法研究猪苓对黄嘌呤氧化酶的抑制作用,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。从猪苓粗提物中筛选出 4 个黄嘌呤氧化酶抑制剂。以液-质作为研究方法,根据正离子模式下的质谱数据对其进行结构解析,成功鉴定出 4 个化学成分,4 个化合物对黄嘌呤氧化酶抑制效果大小顺序为猪苓酮 A (2) > 猪苓酮 B (1) > 麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮 (3) > 麦角甾-7,22-二烯-3-酮 (4)。分子对接结果表明,4 个化合物与黄嘌呤氧化酶的主要结合作用力为氢键,对接结合能分别为-8.6、-8.7、-8.1、-7.8 kcal/mol,与超滤实验结果一致,进一步验证了超滤实验的准确性。

高速逆流色谱法分离纯化猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂具有制备量大、纯化效果好、操作高效、快速的特点。选用乙酸乙酯-甲醇-水 (5:2:4, V/V/V) 为溶剂系统,在流速为 1.2 mL/min,波长为 254 nm,进样体积为 5 mL 的分离条件,固定相保留率为 63%,成功从猪苓粗提物中分离纯化猪苓酮 B、猪苓酮 A、麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮、麦角甾-7,22-二烯-3-酮 (纯度依次为 94.6%、95.2%、98.3%和 96.2%),纯度均达到 90.0%以上。结果显示溶剂体系选择合理,利用该条件对猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂进行分离的效果较佳。

结果表明,利用遗传算法-BP 神经网络数学模型、质谱和色谱等技术,能够快速筛选猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂,该方法快速、灵敏,为猪苓抗痛风等药理作用的进一步研究提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 刘瑞娟,张叶,田伟,等.猪苓的利尿渗湿作用及其药理活性研究[J].中国食用菌,2019,38(1):68-71.
- [3] 苏克雷,郭立中.猪苓汤治疗慢性肾脏病临床及实验研究进展[J].中医学报,2010,25(3):589-592.
- [4] 李娟.猪苓多糖对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能调节的研究[D].太原:山西医科大学,2010.
- [5] Liu C P, Li X, Lai G N, et al. Mechanisms of macrophage immunomodulatory activity induced by a new polysaccharide isolated from *Polyporus umbellatus* [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 581.
- [6] Tan X L, Guo L, Wang G H. *Polyporus umbellatus* inhibited tumor cell proliferation and promoted tumor cell apoptosis by down-regulating AKT in breast cancer [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 83: 526-535.
- [7] 洪东风.猪苓中有效成分的提取分离及其类似甾体的衍生和活性筛选[D].咸阳:西北农林科技大学,2020.
- [8] He P F, Zhang A Q, Zhang F M, et al. Structure and bioactivity of a polysaccharide containing uronic acid from *Polyporus umbellatus* sclerotia [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 152: 222-230.
- [9] 王天媛,张飞飞,任跃英,等.猪苓化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2017,51(4):109-112.
- [10] 赵英永.中药猪苓的化学成分及其药理学研究[D].西安:西北大学,2010.
- [11] 吴霞.基于遗传算法的橘皮黄色素提取工艺优化[J].中国调味品,2021,46(10):169-172.
- [12] 樊志国,陈长锴,赵凤祥,等.胡椒叶精油的提取工艺优化及其 GC-MS 分析[J].现代食品科技,2020,36(6):226-234.
- [13] 程索婷,孙新宇,王紫彤,等.基于指纹图谱的 Box-Behnken 响应面法结合 BP 神经网络多指标优化黑胡椒提取工艺[J].天然产物研究与开发,2022,34(9):1481-1492.
- [14] 陈斌辉,吕圭源,金伟锋,等.基于正交设计和 BP 神经网络-遗传算法多指标综合优化茶叶提取工艺[J].中国现代应用药学,2019,36(10):1223-1228.
- [15] 杨丽,赵伯原,李春龙,等.亲和超滤-液质联用技术在药用植物活性成分筛选中的应用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(8):196-208.
- [16] 廖鑫,蔡媛,孙瑜,等.分子对接结合体外筛选挖掘来自中药的黄嘌呤氧化酶抑制剂[J].中国新药杂志,2022,31(16):1616-1622.
- [17] 刘育颖,张源生.高速逆流色谱分离蓝靛果花色苷及其对 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J].中国食品添加剂,2022,33(7):75-82.
- [18] 宋道光,陈志.高速逆流色谱法从小叶金钱草中分离四种黄酮苷类化合物[J].食品工业科技,2022,24:93-101.
- [19] 夏建丽,侯万超,李赛男,等.葛根中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选分离及质谱分析[J].时珍国医国药,2019,30(12):2849-2852.
- [20] 杨聪颖,骆亚丽,郭时印,等.响应面优化金柑多酚的提取工艺[J].现代食品科技,2018,34(5):174-181.
- [21] Zhou W W, Lin W H, Guo S X. Two new polyporosterones

- isolated from the sclerotia of *Polyporus umbellatus* [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 55(8): 1148-1150.
- [22] Jia W J, Chen S Z, Sun J H, et al. Quality evaluation of *Polyporus umbellatus* based on HPLC specific chromatogram and fingerprint analysis [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2020, 29(12): 896-907.
- [23] Zhu Z Y, Yao Q, Liu Y, et al. Highly efficient synthesis and antitumor activity of monosaccharide saponins mimicking components of Chinese folk medicine *Cordyceps sinensis* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2012, 14(5): 429-435.
- [24] Shen M Y, Xie M Y, Nie S P, et al. Separation and identification of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one from *Ganoderma atrum* by high-speed counter-current chromatography and spectroscopic methods [J]. Chromatographia, 2008, 67(11-12): 999-1001.
- [25] 黄意婷.基于数据挖掘的土茯苓总黄酮类活性成分在痛风性肾病中的作用及其机制研究[D].南宁:广西中医药大学, 2021.
- [26] 刘雪辉,王振,吴琪,等.高速逆流色谱法分离玫瑰茄中的花色苷[J].现代食品科技,2014,30(1):190-194,169.