

运用液质联用与分子对接技术筛选黄精中抑制血管紧张素转化酶活性成分

程端端, 李春楠, 吕经纬, 张凯月, 张楠茜, 申嘉明, 王跃龙, 张辉*, 孙佳明*
(长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林长春 130117)

摘要: 采用液质联用 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 和分子对接技术筛选黄精中抑制血管紧张素转化酶 (ACE) 的活性成分。以血管紧张素转化酶 (ACE) 为靶标, 确定黄精中 ACE 抑制部位, 应用超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱技术 (UPLC-Q-Exactive MS) 鉴定潜在抑制 ACE 活性成分, 应用分子对接技术进一步对潜在抑制 ACE 活性成分进行验证。结果发现黄精乙酸酯部位体外 ACE 抑制率最高, ACE 抑制率的 IC_{50} 为 1.174 mg/mL, 通过对黄精乙酸酯部位进行液质分析, 共鉴定出 30 个化合物, 包括正离子模式下的 Tianshic Acid、Cimicifugic Acid E、Brucine、Polygonatine B、Kingianoside B 等 15 个化合物, 负离子模式下的 N-Trans-Pcoumaroyloctopamine、Pseudolaric Acid、Isomer of 25R,22S-Hydroxylwattinoside C、Skullcapflavone I、3,3',7-Trimethy-4',5-Dihydroxyflavone 等 15 个化合物, 将这些化合物与 ACE 进行分子对接, 均为负结合能, 可以自发结合, 其中 80% 的化合物结合能低于 -5 kcal/mol, 将结合能最低的化合物通过可视化分析, 发现黄精中抑制 ACE 活性成分主要通过 3~4 个氢键与 ACE 活性中心相互作用。研究结果为黄精抑制 ACE 活性成分的筛选提供了参考依据。

关键词: 液相色谱-质谱联用; 分子对接; 血管紧张素转化酶; 黄精

文章编号: 1673-9078(2023)05-109-118

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0647

Rapid Screening of Active Ingredients that Inhibit Angiotensin-converting Enzyme in Polygonati Rhizoma using LC-MS/MS and Molecular Docking Technology

CHENG Duanduan, LI Chunnan, LYU Jingwei, ZHANG Kaiyue, ZHANG Nanxi, SHEN Jiaming, WANG Yuelong, ZHANG Hui*, SUN Jiaming*

(Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine Jilin, Changchun 130117, China)

Abstract: The active components inhibiting angiotensin-converting enzyme (ACE) in polygonati rhizoma were screened using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and molecular docking technology. ACE was used as the target to identify the ACE-inhibitory site in polygonati rhizoma and ultra-performance liquid chromatography-electrostatic field orbital trap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive MS) was used to identify the potential ACE-inhibiting active components. Molecular docking technology was used to further verify the potential ACE-inhibiting active components. The results showed that the ethyl acetate component of polygonati rhizoma had the highest ACE inhibition rate *in vitro*, and the IC_{50} of ACE inhibition rate was 1.174 mg/mL. Through LC-MS analysis of the ethyl acetate

引文格式:

程端端, 李春楠, 吕经纬, 等. 运用液质联用与分子对接技术筛选黄精中抑制血管紧张素转化酶活性成分 [J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 109-118.

CHENG Duanduan, LI Chunnan, LYU Jingwei, et al. Rapid screening of active ingredients that inhibit angiotensin-converting enzyme in polygonati rhizoma using LC-MS/MS and molecular docking technology [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 109-118.

收稿日期: 2022-05-22

基金项目: 吉林省中医药科技资助项目 (2022011); 橘井杯学术科研创新项目 (YK202115)

作者简介: 程端端 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药与复方药效物质基础和质量标准, E-mail: chengduanduan123@163.com

通讯作者: 张辉 (1958-), 男, 学士, 教授, 研究方向: 中药与复方药效物质基础和标准, E-mail: zhanghui_8080@163.com; 共同通讯作者: 孙佳明 (1976-),

男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药与复方药效物质基础和标准, E-mail: sun_jiaming2000@163.com

component of polygonati rhizoma, a total of 30 compounds were identified, including tianshich acid, cimicifugic acid E, brucine, polygonatine B, and kingianoside B among the 15 compounds in the positive ion mode; N-trans-p-coumaroyloctopamine, pseudo-dolaric acid, isomer of 25R, 22S-hydroxylwattinide C, skullcapflavone I, and 3,3',7-trimethyl-4',5-dihydroxyflavone among the 15 compounds in the negative ion mode. Molecular docking revealed that these compounds had negative binding energy and could spontaneously bind to ACE; 80% of the compounds showed binding energy lower than -5 kcal/mol. Visual analysis of the compounds with the lowest binding energy revealed that the ACE-inhibiting active ingredient in xanthine mainly interacts with the ACE active center through three to four hydrogen bonds and inhibits its activity. These results provide a reference for future studies aimed at screening the ACE-inhibiting active components in polygonati rhizoma.

Key words: liquid chromatography-mass spectrometry; molecular docking; angiotensin-converting enzyme; polygonati rhizoma

高血压 (Hypertension) 是一种由多种遗传和环境危险因素相互作用引起的全身性疾病^[1], 血管紧张素转化酶抑制剂 (Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor, ACEI) 属于治疗高血压临床一线用药^[2], 其代表药物为卡托普利^[3], 主要是通过抑制血管紧张素转换酶 I (Angiotensin- I Converting Enzyme, ACE) 转化为血管紧张素 II (Ang II) 来发挥降血压作用。但长期服用会引起剧烈的干咳和血管神经性水肿, 因此从药食同源的植物中筛选天然的抑制 ACE 的活性成分, 在高血压预防、控制及减少并发症方面都具有独特的优势。

黄精^[4] (*Polygonati rhizoma*) 作为“药食同源”植物, 为百合科植物滇黄精 (*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl)、黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red) 或多花黄精 (*Polygonatum cyrtonema* Hua) 的干燥根茎, 具有滋阴润肺、养脾益气的作用, 能够治疗阴虚燥咳、脾胃虚弱、肾精亏损、髌膝酸软等证。陈思思等^[5] 在研究黄精和铁皮石斛叶降血压活性时, 发现单用及配伍均对自发性高血压大鼠具有降压作用。目前, 对黄精的现代药理作用的研究多集中于降血糖和抗肿瘤方面, 对降血压药理活性报道较少, 其具体降压成分及作用机制尚不清楚。

为了在黄精复杂的成分中筛选抑制 ACE 的活性成分, 本研究以 ACE 为靶标, 筛选黄精 ACE 抑制部位, 通过 UPLC-Q-Exactive MS 和分子对接联用技术分析黄精活性部位中抑制 ACE 的活性成分, 并预测它们与 ACE 的对接模式。与传统对药食同源植物提取分离后进行活性测定的方法相比, 液质联用与分子对接技术相结合不仅可以满足高通量筛选的要求, 提高了筛选的成功率, 而且为其作用机制的推测和阐述提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

黄精药材购于云南曲靖, 置于阴凉干燥处贮藏, 经长春中医药大学张辉教授鉴定为百合科植物滇黄精

(*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl) 的干燥根茎。

UltiMate 3000 series 高效液相色谱仪、Q-Exactive 静电场轨道阱高分辨质谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; BP211D 型十万分之一电子天平, 北京赛多利斯天平有限公司; KQ3200BE 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

血管紧张素转化酶 (O10GS162604)、马尿酸标准品 (H0ZN8P47277) 和马尿酸组胺酰亮氨酸 (M10GS141275), 美国 Sigma 公司; 卡托普利 (ZO1015YE13) 和硼酸盐缓冲液 (0521A21, 浓度为 0.1 mol/L 且含有 0.3 mol/L NaCl), 上海源叶生物科技有限公司; 甲醇 (分析纯, 20220309), 国药集团化学试剂有限公司; 盐酸, 北京鼎国生物公司; 乙腈、甲酸 (色谱纯), 赛默飞世尔科技 (中国)。

1.2 样品制备

取 10 g 黄精饮片, 用超纯水 (质量比 1:10) 回流提取, 每次 30 min, 共 3 次, 将合并的滤液倒入分液漏斗中, 根据极性顺序, 依次用等体积的二氯甲烷, 乙酸乙酯, 正丁醇各萃取 3 次, 每次萃取 30 min。最后将各萃取部位挥干, 即得 4 类样品干膏。

1.3 血管紧张素转化酶抑制活性的测定

采用改良 Cushman 法^[6-8] 测定样品的 ACE 抑制活性。首先用硼酸盐缓冲液将 Hip-His-Leu 配成 5 mmol/L 的溶液和 0.1 U/mL ACE 溶液。样品组中加入 80 μ L 的 Hip-His-Leu 溶液和 20 μ L 样品, 阴性组中加入 80 μ L 的 Hip-His-Leu 溶液和 20 μ L 缓冲盐溶液, 阳性组加入 80 μ L 的 Hip-His-Leu 溶液和 20 μ L 卡托普利溶液, 于 37 $^{\circ}$ C 摇床中孵育 5 min, 加入 20 μ L 浓度为 0.1 U/mL ACE 溶液, 振荡后再次孵育 30 min, 最后加入 200 μ L 的 1.0 mol/L 盐酸溶液终止反应。

采用高效液相色谱法测定 ACE 的抑制率, 色谱条件: 色谱柱 Agilent Eclipse Plus-C18 (250 mm \times 4.6 mm), 流动相为乙腈和甲酸水, 流动梯度见表 1, 检测波长 228 nm, 流速 0.3 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。

表1 高效液相流动相梯度表

Table 1 High performance liquid phase mobile phase gradient

table		
时间/min	乙腈/%	1%甲酸水溶液/%
0	30	70
25	30	70
26	100	0
30	100	0
31	30	70
40	30	70

将卡托普利以质量浓度梯度为 0.001、0.01、0.1、1、10、20、40、60、80 $\mu\text{g/mL}$ 进行 ACE 抑制活性的测定, 确定方法的可行性; 接着对黄精水部位, 黄精正丁醇部位, 黄精乙酸乙酯部位和黄精二氯甲烷部位各部位样品以 3 mg/mL 浓度进行血管紧张素转化酶抑制活性的测定; 最后将活性最好的黄精乙酸乙酯部位以浓度梯度为 0.001、0.01、0.1、1、10 mg/mL 进行血管紧张素转化酶抑制活性的测定, 血管紧张素转化酶活性抑制率计算公式如下。

$$R = \left(1 - \frac{S_0}{S_1}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R —ACE 抑制率, %;

S_0 —含样品和 ACE 的峰面积;

S_1 —含 ACE 但不含样品的峰面积。

1.4 黄精乙酸乙酯部位提取物的液质分析

黄精乙酸乙酯部位提取物采用 UPLC-Q-Exactive MS 进行鉴定, 样品使用甲醇溶解为浓度 1 mg/mL , 设置相应参数, 采用自动进样进行检测。

色谱条件: 采用 Unitary C18 色谱柱 (4.6 $\text{mm} \times 150 \text{ mm}$, 2.8 μm 100 \AA); 流动相为乙腈和 1% 的甲酸水溶液, 通过二元线性梯度洗脱, 流动相梯度: 0~45 min (5~100 \AA), 流速 0.3 mL/min ; 进样量 10 μL ; 柱温 30 $^\circ\text{C}$; 检测波长 254 nm 。

质谱条件: 采用电喷雾电离源 (ESI), 样品分别采用正、负离子模式扫描。喷雾电压 2.5 kV , 毛细管温度 320 $^\circ\text{C}$, 透镜电压 50 eV , 鞘气压力 $2.76 \times 10^5 \text{ Pa}$, 辅助气压力 $6.89 \times 10^4 \text{ Pa}$, 辅助气温度 300 $^\circ\text{C}$, 分辨率 70 000, 质量扫描范围 m/z 100~1 500。

1.5 分子对接

检索 Pubchem 数据库 (<https://www.pubchem.org/>) 下载并结合文献使用 ChemDraw 20.0 绘制黄精抗高血压活性部位中化合物的 sdf 2D 结构的分子式, 通过

Chem 3D 软件能量最小化, 转换为柔性结构的 pdb 格式, 使用 OpenBabel 2.4.1 确认可旋转的键并保存为 pdbqt 格式, 以备后续对接使用。

通过 RSCB PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载 ACE 的晶体结构, 编号为 C-结构域: 1O8A 的 pdb 格式文件, 经 Pymol 对其进行去水、加氢等操作, 使用 Autodock 保存为 pdbqt 格式。通过查询文献确定 ACE 的结合位点坐标 ACE (1O8A、33.307、22.167、68.039) 及尺寸 (26 $\text{\AA} \times 26 \text{ \AA} \times 26 \text{ \AA}$), 并按照相关格式保存为 txt 格式, 黄精乙酸乙酯部位的化合物所有可旋转键均设为柔性, ACE 设置为刚性, 搜寻精度 Exhaustiveness 设为 64, 格点间距 1 \AA , 其他参数默认, 运行 Autodock Vina, 采用拉马克遗传算法对接运算 100 次。将结果用 Ligplus 和 Pymol 程序对对接构象进行可视化分析。

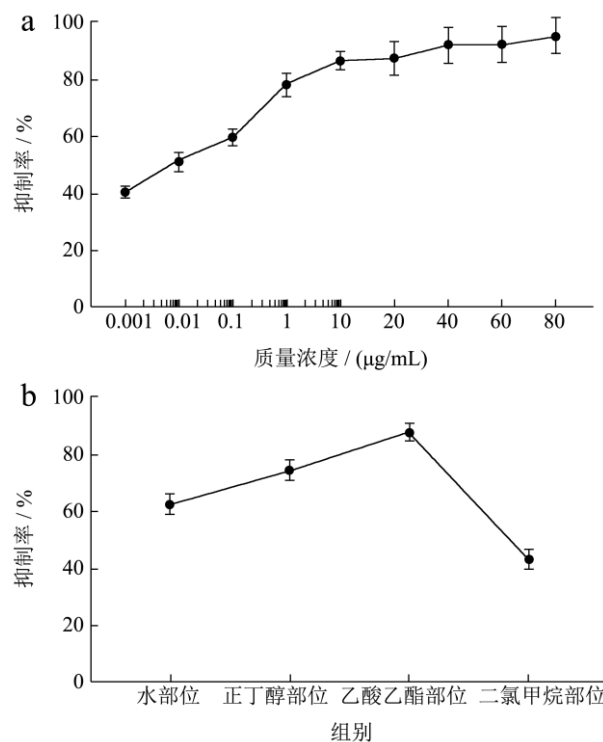
1.6 统计分析

所有的样品均进行三次平行测定, 实验数据以 Excel 2020 进行数据初步整理, 采用 Prism 8.0.1 软件进行数据统计分析。

2 结果与讨论

2.1 血管紧张素转化酶抑制活性的测定

以卡托普利为阳性对照, 应用改良 Cushman 法对黄精的提取物进行血管紧张素转化酶抑制活性的测定, 结果见图 1。



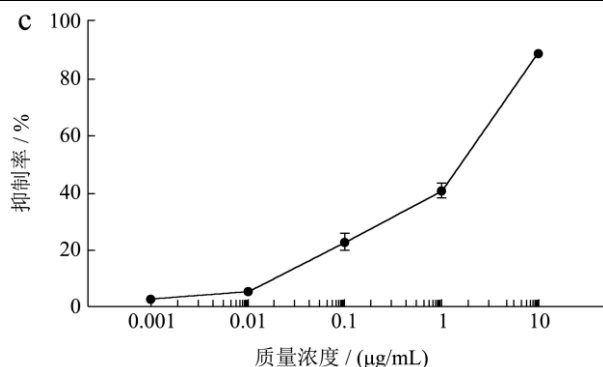


图1 各样品不同质量浓度抑制率

Fig.1 Different concentration inhibition rate of each sample

注: a 为 captopril 不同浓度抑制率; b 为 3 mg/mL 黄精不同萃取部位的抑制率; c 为黄精乙酸乙酯部位不同浓度抑制率。

如图 1a, 通过对不同浓度的卡托普利标准液进行血管紧张素转化酶抑制活性实验, 在 0.001~10 µg/mL 范围内, 卡托普利标准液的 ACE 抑制率随着卡托普利浓度的提高而逐渐增加, 经 ACE 抑制率公式计算, 可得出卡托普利的 IC₅₀ 值为 4 ng/mL, 约等于 17.8×10⁻¹⁰ mol/L。符合文献^[9]中报道的卡托普利 IC₅₀ 值范围值, 说明本方法具有可行性。如图 1b, 通过对浓度为 3 mg/mL 的黄精水部位, 黄精正丁醇部位, 黄精乙酸乙酯部位和黄精二氯甲烷部位样品的检测, 其活性大小排序为黄精二氯甲烷部位<黄精水部位<黄精正丁醇部位<黄精乙酸乙酯部位, 可见黄精乙酸乙酯部位对 ACE 抑制率最高, 为黄精的降血压活性部位。图 1c, 通过对不同浓度的黄精乙酸乙酯部位样品进行体外活性抑制试验, 在 0.001~10 mg/mL 范围内, 黄精乙酸乙酯部位样品对 ACE 的抑制率随着黄精乙酸乙酯部位样品浓度的提高而不断增加, 经计算, 黄精乙酸乙酯部位样品对 ACE 抑制率的 IC₅₀ 值为 1.17 mg/mL。

2.2 黄精乙酸乙酯部位的液质分析

用甲醇溶液配制质量浓度为 1 mg/mL 的黄精乙酸乙酯部位样品溶液, 过 0.22 µm 膜, 经 UPLC-Q-Exactive MS 分析, 得到正、负离子模式下的总离子流图(图 2)。结合各色谱峰的分子离子峰及主要碎片峰的解析、与文献^[10-33]对比, 指认了其中 30 个化合物, 结果见表 2。

图 2a 为黄精乙酸乙酯化合物的正谱总离子流图, 指认出 15 个化合物, 其中 2,3,4,6-tetrahydro-1H-β-carboline-3-carboxylic acid、Tianshic acid、cimicifugic acid E 属于有机酸类, brucine、polygonatine B 属于生物碱类, 3-hydroxyl-2,8-dimethoxy xanthone、kingianside

B 属于皂苷类, rhamnetin、peonidin、wogonin 属于黄酮类, 8-hydroxychromogen、Cyclic (L-leuco-L-isoleucine) dipeptide、cordycepin、5-Hydroxymethylfurfural、coumaroyloctopamine 属于其他类别。

图 2b 为黄精乙酸乙酯化合物的负谱总离子流图, 指认出 15 个化合物, 其中 N-cis-pcoumaroyloctopamine、N-trans-pcoumaroyloctopamine、3-(4-hydroxy)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl]-2-propenamide 属于生物碱类, 5,7-dihydroxy-8-methyl-3-(2'-hydroxy-4'-methoxybenzyl)chroman-4-one、5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-hydroxybenzyl)chroman-4-one、isomer of 25R,22S-hydroxylwattinoside C、25S,22-hydroxylwattinoside C、25R,22-hydroxylwattinoside C、isomer of (25R)-kingianside G 属于皂苷类, Skullcapflavone I、3,3',7-trimethoxy-4',5-dihydroxyflavone、5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-methoxybenzyl)-chroman-4-one、7-Hydroxy-6-methoxy-8-[2S,4R,5S-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxochromen-2-one 属于黄酮类, pseudolaric acid 属于有机酸类和 disporopsin 属于其他类别。

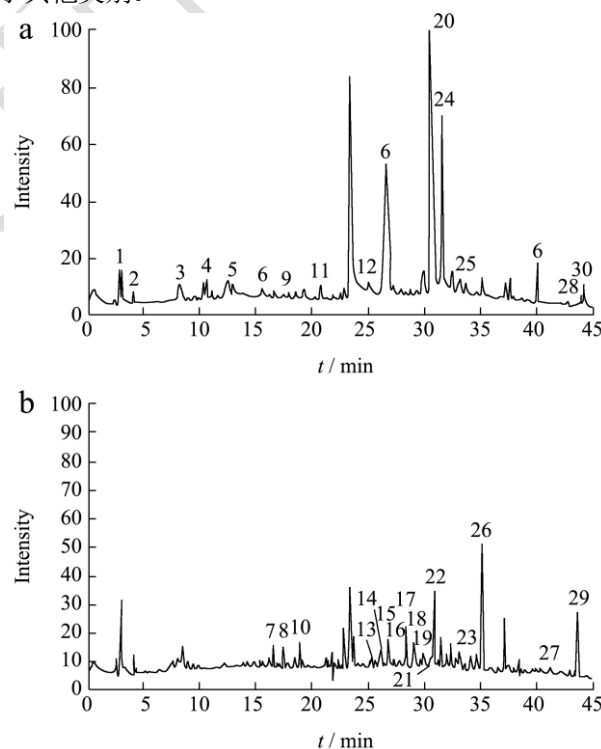


图2 黄精乙酸乙酯化合物的正离子模式(a)和负离子模式(b)下的总离子流图

Fig.2 Total ion chromatograms of the ethyl acetate chemical composition of polygonati rhizoma in positive ion mode (a) and negative ion mode (b)

表2 黄精乙酸酯部位中化合物的UHPLC-Q-Exact ive 高分辨质谱技术分析结果

Table 2 Results of UHPLC-Q-Exact ive high resolution mass spectrometry of compounds in ethyl acetate fraction of *Polygonati rhizoma*.

编号	保留时间/min	准分子离子峰(m/z)	结构式	模式	化合物鉴定	二级离子(m/z)	
1	4.17	216.0826	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	2,3,4,6-tetrahydro-1H-β-carboline-3-carboxylic acid	142.9958	10
2	4.20	316.0649	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+Na] ⁺	Isorhamnetin	301.1396	11
3	8.19	126.0395	C ₆ H ₆ O ₃	[M+H] ⁺	5-Hydroxymethylfurfural	109.0297	12
4	10.53	272.0577	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M+Na] ⁺	3-hydroxyl-2,8-dimethoxy xanthone	255.1325	13
5	10.62	226.31	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ N ₂	[M+H] ⁺	Cyclic (L-leuco-L-isoleucine) dipeptide	114.0914	14
6	14.09	251.0912	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	[M+Na] ⁺	cordycepin	226.9505	15
7	15.30	299.1044	C ₁₈ H ₁₈ NO ₄	[M-H] ⁻	N-cis-pcoumaroyloctopamine	280.0968, 145.0279, 119.0467	16
8	15.81	299.1078	C ₁₇ H ₁₇ NO ₄	[M-H] ⁻	N-trans-pcoumaroyloctopamine	280.0995, 145.0288, 119.0468	16
9	17.94	193.1030	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	[M+H] ⁺	polygonatine B	148.0269	17
10	19.20	313.1223	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	[M-H] ⁻	4-(4-hydroxy)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl]-2-propenamidine	190.0465	18
11	21.24	736.4107	C ₃₉ H ₆₀ O ₁₃	[M+H] ⁺	kingianoside B	719.3905, 411.2882	19
12	25.56	299.123	C ₁₇ H ₁₇ NO ₄	[M+H] ⁺	coumaroyloctopamine	282.2782	20
13	27.21	330.0956	C ₁₇ H ₁₇ O ₄	[M-H] ⁻	5,7-dihydroxy- 8-methyl-3-(2'-hydroxy-4'methoxybenzyl)chroman-4-one	254.0246	21
14	28.15	302.0741	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	disporopsin	191.9519	21
15	28.41	314.1066	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	[M-H] ⁻	5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-hydroxybenzyl)chroman-4-one	207.0678	21
16	29.12	314.0687	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	Skullcapflavone I	221.1201, 207.0678	22
17	29.29	934.4711	C ₄₅ H ₇₄ O ₂₀	[M-H] ⁻	isomer of 25R,22-hydroxylwattinoside C	771.6353	23
18	29.36	934.4765	C ₄₅ H ₇₄ O ₂₀	[M-H] ⁻	25R,22-hydroxylwattinoside C	771.6448	23
19	29.45	934.4731	C ₄₅ H ₇₄ O ₂₀	[M-H] ⁻	25R,22-hydroxylwattinoside C	771.6423	24
20	29.58	301.0596	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	[M+Na] ⁺	peonidin	270.3141	25
21	29.65	344.0787	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	[M-H] ⁻	3,3',7-trimethyl-4',5-dihydroxyflavone	313.2408	23
22	30.91	432.1848	C ₂₂ H ₂₈ O ₆	[M-H] ⁻	pseudolaric acid	385.1813, 355.1701	26
23	31.02	330.2334	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	[M+H] ⁺	Tianshic acid	183.4437	27
24	31.56	409.1128	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+Na] ⁺	cimicifugic acid E	415.2102, 397.2016	28
25	31.67	164.16	C ₉ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	8-hydroxychromogen	147.0648, 123.0402	29
26	34.79	930.4653	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₉	[M-H] ⁻	isomer of (25R)-kingianoside G	799.6700	30
27	43.02	370.3081	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	7-Hydroxy-6-methoxy-8-[(2S,4R,5S)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-one	179.1091, 193.1248	23
28	43.71	284.0584	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+Na] ⁺	wogonin	270.314	31
29	45.30	328.1384	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	[M-H] ⁻	5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-methoxybenzyl)-chroman-4-one	313.2405, 297.1555, 206.0599	32
30	45.55	394.1964	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	[M+Na] ⁺	brucine	355.2799	33

表 3 化合物与 ACE 的结合情况

Table 3 Binding of compounds to ACE

序号	化合物	结合能	氢键	距离 Å
阳性药	captopril	-3.90	GLu342(A), Leu341(A)	2.89 Å, 3.01 Å
1	2,3,4,6-tetrahydro-1H- β -carboline-3-carboxylic acid	-5.60*	Lys339(A), Trp67(A), Thr-71(A)	3.03 Å, 2.87 Å, 3.14 Å, 3.34 Å
2	Isorhamnetin	-6.60*	Asn377(A), Thr345(A)	2.94 Å, 2.97 Å, 3.13 Å, 3.20 Å,
3	5-Hydroxymethylfurfural	-3.60	-	-
4	3-hydroxyl-2,8-dimethoxy xanthone	-5.70*	Trp67(A), THR71(A)	2.87 Å, 2.89 Å
5	Cyclic (L-leuco-L-isoleucine) dipeptide	-4.70	-	-
6	cordycepin	-5.60*	Asn337(A), Asp346(A), Glu342(A), Lys338(A), Thr345(A)	3.27 Å, 2.96 Å, 3.00 Å, 3.19 Å, 2.96 Å, 3.03 Å, 3.05 Å
7	N-cis-pcoumaroyloctopamine	-5.00	Asn68(A), Asn337(A), Ser339(A), Thr71(A)	2.98 Å, 3.16 Å, 2.98 Å, 3.29 Å
8	N-trans-pcoumaroyloctopamine	-4.20	-	-
9	polygonatine B	-4.80	-	-
10	3-(4-hydroxy)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl]-2-propenamide	-7.0*	Thr67(A), Thr71(A)	2.98 Å, 2.90 Å
11	kingianoside B	-6.00*	Asn72(A), Arg348(A), Glu342(A), Lys338(A), Leu341(A), Ser339(A), Trp67(A), Thr71(A)	3.17 Å, 3.03 Å, 3.02 Å, 3.29 Å, 3.32 Å, 2.75 Å, 3.23 Å, 2.73 Å, 3.16 Å, 3.10 Å, 3.29 Å
12	coumaroyloctopamine	-6.40*	Asp346(A), Thr71(A), Thr345(A)	3.20 Å, 2.88 Å, 2.98 Å, 2.98 Å
13	5,7-dihydroxy-8-methyl-3-(2'-hydroxy-4'-methoxybenzyl)chroman-4-one	-6.50*	Glu342(A), Thr71(A)	3.03 Å, 2.99 Å, 3.11 Å
14	disporopsin	-6.20*	Arg348(A), Glu342(A), Thr71(A), Trp67(A), Thr345(A)	3.33 Å, 2.99 Å, 3.24 Å, 3.17 Å, 2.80 Å, 3.04 Å, 3.10 Å,
15	5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-hydroxybenzyl)chroman-4-one	-5.90*	Trp67(A), Thr345(A)	2.85 Å, 2.84 Å, 2.92 Å
16	Skullcapflavone I	-7.50*	Trp67(A), Ser339(A)	2.89 Å, 2.81 Å
17	isomer of 25R,22S-hydroxylwattinoside C	-7.60*	Asn72(A), Glu349(A), Glu342(A), Lys339(A), Ile73(A), Ser339(A)	3.09 Å, 3.14 Å, 3.22 Å, 3.00 Å, 2.99 Å, 3.01 Å, 2.99 Å, 3.14 Å, 2.83 Å
18	25S,22-hydroxylwattinoside C	-7.70*	Arg348(A), Asn72(A), Glu342(A), Ile73(A), Leu341(A), Lys338(A), Glu349(A), Ser339(A)	3.20 Å, 3.20 Å, 3.05 Å, 2.81 Å, 2.82 Å, 2.96 Å, 2.88 Å, 3.22 Å, 3.01 Å
19	25R,22-hydroxylwattinoside C	-6.50*	Glu342(A), Glu349(A), Gly347(A), Ile73(A), Lys338(A), Ser339(A)	2.97 Å, 2.80 Å, 2.90 Å, 3.14 Å, 3.09 Å, 3.18 Å, 3.29 Å, 2.83 Å, 2.90 Å, 3.17 Å,

续表 3

序号	化合物	结合能	氢键	距离 Å
20	peonidin	-6.40*	Glu342(A), Lys338(A), Leu341(A), Thr345(A)	3.84 Å, 3.11 Å, 3.11 Å, 2.86 Å
21	3,3',7-trimethy-4',5-dihydroxyflavone	-6.10*	Arg348(A), Lys338(A), Trp67(A), Thr345(A)	3.28 Å, 2.96 Å, 3.04 Å, 3.14 Å, 3.17 Å
22	pseudolaric acid	-4.80	-	-
23	Tianshic acid	-5.90*	Asn337(A), Asp346(A), Glu342(A), Leu341(A), Lys338(A), Ser339(A), Thr345(A)	3.08 Å, 3.07 Å, 2.94 Å, 2.94 Å, 2.92 Å, 3.29 Å, 2.99 Å, 2.70 Å
24	cimicifugic acid E	-4.2	-	-
25	8-hydroxychromogen	-6.80*	Ser339(A)	3.02 Å
26	isomer of (25R)-kingianoside G	-5.40*	Asn68(A), Asn72(A), Asp346(A), Lys338(A)	2.96 Å, 2.94 Å, 3.13 Å, 3.09 Å, 3.06 Å
27	7-Hydroxy-6-methoxy-8-[(2S,4R,5S)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-one	-5.90*	Asn337(A), Thr71(A), Ser339(A)	2.89 Å, 2.90 Å, 3.23 Å, 2.89 Å, 2.97 Å
28	wogonin	-6.00*	Asn337(A), Trp67(A)	2.93 Å, 2.89 Å
29	5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-methoxybenzyl)-chroman-4-one	-6.20*	Arg348(A), Thr348(A)	3.26 Å, 3.30 Å
30	brucine	-5.20*	-	-

注: *结合能小于-5 kcal/mol 的化合物。

2.3 分子对接结果

将高效液相色谱-电喷雾串联质谱指认的 30 个化合物与 ACE (1O8A) 通过 Vina 软件进行分子对接, 结果显示, 所有的化合物均可以与 ACE (1O8A) 结合, 具有很好的对接活性, 结果见表 3, 选择卡托普利和结合能最低化合物 25S,22-hydroxylwattinoside C 的对接构象通过 Pymol 和 Ligplus 程序进行可视化分析, 见图 3。

To 等^[34]和 Rashmi 等^[35]在探究受体结合模式时发现形成最佳结合构象的最低的结合能最低。由表 3 可知, 黄精中 30 个化合物均与 ACE 靶标具有负结合能, 理论上说明这 30 个化合物可以与 ACE 自发结合, 其中 24 个化合物的结合能小于 -5 kcal/mol, 也表明了黄精 ACE 抑制活性部位中多数化合物具有潜在的 ACE 抑制活性, 有待于进一步活性验证。其中部分化合物已有 ACE 抑制活性报道, 如朱福等^[36]在研究醋柳总黄酮时, 发现 isorhametin 对 ACE 具有极好地抑制作用; Liu^[37]比较不同豆类发酵前后含量和 ACE 抑制率,

发现 cordycepin 的 ACE 抑制活性普遍较高; Pires 等^[38]探究婴儿奶粉随时间变化时发现 5-Hydroxymethylfurfural 的 ACE 抑制作用会随温度变化而变化; Fidelis 等^[39]在研究大豆乳饮品时发现 wogonin 具有较好的 ACE 抑制活性。Lee 等^[40]从枸杞中发现 peonidin 有明显的 ACE 体内活性抑制率, 相关报道结果说明本研究从药食同源植物的复杂的成分中筛选抑制 ACE 活性成分的方法具有一定的可行性, 推测黄精活性部位对血管紧张素转化酶的抑制效果可能是通过其含有的多种化合物共同作用的结果。

为了便于直观分析, 图 3 给出了结合能最低的化合物 25S,22-hydroxylwattinoside C 与 ACE 活性位点的结合方式和卡托普利与 ACE 活性位点的结合方式十分相似。其中 25S,22-hydroxylwattinoside C 和卡托普利均与 ACE 的 Leu341 和 Glu342 残基之间形成氢键, 另外 25S,22-hydroxylwattinoside C 还与 ACE 的 Glu349、Asn72、Arg348 和 Ser339 残基形成了四个氢键, 理论上说明了 25S,22-hydroxylwattinoside C 相较于卡托普利与 ACE 之间具有更低的结合能。

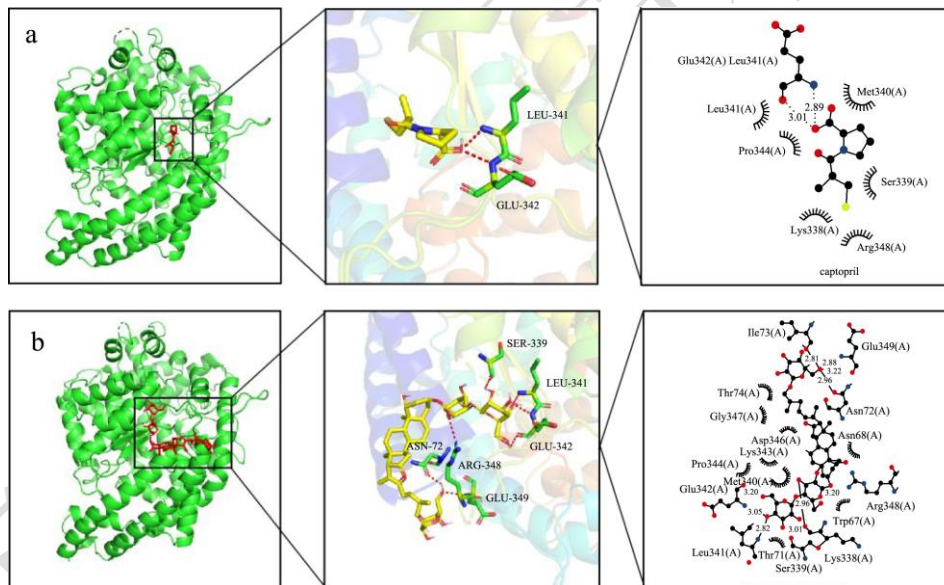


图 3 captopril 与 25S,22-hydroxylwattinoside C 的 2D、3D 分子对接模式

Fig.3 2D and 3D molecular docking mode of captopril with 25S,22-hydroxylwattinoside C

注: a、b 分别为 captopril 与 25S,22-hydroxylwattinoside C 与 ACE 的 2D、3D 分子对接模式。

3 结论

本研究主要是以 ACE 为靶标, 通过体外抑制实验确定黄精的 ACE 抑制活性部位为乙酸乙酯部位, 其 IC₅₀ 为 1.17 mg/mL, 同类报道中沙葱水提物 IC₅₀ 为 18.57 mg/mL, 说明黄精乙酸乙酯部位具有较好的 ACE 抑制活性。该部位经过 UPLC-Q-Exactive MS 和分子对接技术分析, 发现从黄精乙酸乙酯部位分析的 30 个化合物, 均能与 ACE 自发结合, 其中 80% 的化

合物结合能小于 -5 kcal/mol, 理论上说明他们都是潜在抑制 ACE 的活性成分, 有待于进一步实验验证, 尤其是其中 isorhametin、cordycepin、5-Hydroxymethylfurfural、wogonin 和 peonidin 已被报道具有 ACE 抑制活性, 说明黄精活性部位的 ACE 抑制活性可能是通过其含有多种化合物共同作用的结果。将结合能最低的 25S,22-hydroxylwattinoside C、卡托普利和其他化合物与 ACE 的对接构象进行可视化分析, 发现 25S,22-hydroxylwattinoside C 与 ACE 之间

主要是通过氢键与活性中心氨基酸残基相互作用。在受体结合口袋中 25S,22-hydroxylwattinoside C 等化合物与相应的氨基酸残基可以发生包括范德华力和氢键等在内的分子间作用力,配体与受体间能够较好地结合,为黄精 ACE 抑制活性部位中化合物的作用机制的推测和阐述提供了理论依据。本研究建立的应用 UPLC-Q-Exactive MS 筛选黄精 ACE 抑制活性成分,通过分子对接技术推测其特定作用机制的方法,为药食同源植物的相关研究提供了方法上的参考。

参考文献

- [1] Berkin K E, Ball S G. Essential hypertension: the heart and hypertension [J]. *Heart*, 2001, 86(4): 467-475.
- [2] Park H J, Kim J Y, Kim H S, et al. Synergistic effect of fruit-seed mixed juice on inhibition of angiotensin I-converting enzyme and activation of NO production in EA.hy926 cells [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2018, 28(3): 881-893.
- [3] Adin D, Atkins C, Domenig O, et al. Renin-angiotensin aldosterone profile before and after angiotensin-converting enzyme-inhibitor administration in dogs with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism [J]. *Vet Intern Med*, 2020, 34(2): 600-606.
- [4] 陈宇,周芸涓,李丹,等.黄精的现代药理作用研究进展[J].*中药材*,2021,44(1):240-244.
- [5] 陈思思,吴悦,任泽明,等.铁皮石斛叶和黄精单用及配伍对自发性高血压大鼠降压作用的研究[J].*浙江中医杂志*,2019, 54(8):567-568.
- [6] 陈倩倩,佟立涛,钟葵,等.大米蛋白酶解物的 ACE 抑制活性研究[J].*现代食品科技*,2015,31(3):91-96.
- [7] Lu Y, Wang Y, Huang D, et al. Inhibitory mechanism of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from black tea [J]. *Zhejiang Univ Sci B*, 2021, 22(7): 575-589.
- [8] Yee C, Yee C, Ismail A, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of blue lupin (*Lupinus angustifolius*) proteins [J]. *Curr Dev Nutr*, 2020, 4(Suppl 2): 492.
- [9] 蒋菁莉,任发政,诸晓强.血管紧张素转化酶抑制剂体外活性检测方法的改进及应用[J].*中国乳品工业*,2006,7:9-12,33.
- [10] 王巧莲.黄精根茎化学成分及其抗炎活性研究[D].北京:北京化工大学,2016.
- [11] Żuchowski J, Pecio Ł, Marciniak B, et al. Unusualisovalerylated flavonoids from the fruit of sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides*) grown in Sokółka, Poland [J]. *Phytochemistry*, 2019, 163: 178-186.
- [12] Xie Y, Ge S, Jiang S, et al. Study on biomolecules in extractives of *Camellia oleifera* fruit shell by GC-MS [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(2): 234-236.
- [13] HUANG Zhuangzhuang, DU Xia, MA Cunde, et al. Identification of antitumor active constituents in polygonatum sibiricum flower by UPLC-Q-TOF-MSE and network pharmacology [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(46): 29755-29764
- [14] E H C, Tang H, Liu B S, et al. Cyclodipeptides from the actinomycete *Kytococcus* sp. associated with the sea cucumber *Apostichopus japonicas* [J]. *Chin J Mar Drugs*, 2013, 32(2): 31-36.
- [15] 项婷,夏琛,刘健华,等.蛹虫草中新化合物的分离纯化、结构鉴定及抗肿瘤活性[J].*食品科学*,2021,42(8):235-242.
- [16] 刘艳,荣晓惠,谭金燕,等.洋金花叶中黄酮类和生物碱类化学成分研究[J].*中草药*,2021,52(14):4141-4152.
- [17] Sun L R, Li X, Wang S X. Two new alkaloids from the rhizome of *Polygonatum sibiricum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(2): 127-130.
- [18] 南易.黄精属中药玉竹和黄精的质量分析研究[D].天津:天津中医药大学,2021.
- [19] Li X C, Yang C R, Ichikawa M, et al. Steroids saponins from *Polygonatum kingianum* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(10): 3559-3563.
- [20] Hu X, Zhao H D, Shi S Y, et al. Sensitive characterization of polyphenolic antioxidants in *Polygonatum odoratum* by selective solid phase extraction and high performance liquid chromatography-diode array detector-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2015, 112: 15-22.
- [21] 李丽红,任风芝,陈书红,等.玉竹中新的双氢高异黄酮[J].*药理学学报*,2009,44(7):764-767.
- [22] 黄嘉玲.穿心莲黄酮类成分研究[D].广州:广东药科大学, 2021.
- [23] 张苗.中药光慈姑中活性成分的研究[D].济南:济南大学, 2021.
- [24] ZHANG Jie, MA Baiping, KANG Liping, et al. Furostanol saponins from the fresh rhizomes of *Polygonatum kingianum* [J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 54(7): 931-935.
- [25] Qiu F, Luo J G, Yao S, et al. Preparative isolation and purification of anthocyanins from purple sweet potato by high-speed counter-current chromatography [J]. *Sep Sci*, 2009, 32(12): 2146-2151.
- [26] 杜洪芳,贾献慧,赵焕新,等.土荆皮化学成分及其抗黄嘌呤氧化酶活性研究[J].*食品与药品*,2019,21(6):444-450.
- [27] 高颖,戚楚露,张磊,等.黄精新鲜药材的化学成分[J].*药学与临床研究*,2015,23(4):365-367.

- [28] 秦汝兰,吕重宁,于洋,等.兴安升麻中酚酸类化学成分的分
离与鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(21):112-117.
- [29] Lynn D G, Jaffe K, Cormwell M, et al. Characterization of an
endogenous factor controlling the cell cycle of complex
tissues [J]. Am Chem Soc, 1987, 109(19): 5858-5859.
- [30] Yu H S, Zhang J, Kang L P, et al. Three new saponins from
the fresh rhizomes of *Polygonatum kingianum* [J]. Chem
Pharm Bull, 2009, 57(1): 1-4.
- [31] 庞溢媛,薛立英,郑艳红,等.基于 UHPLC-MS/MS 代谢组学
技术的不同采收期黄芩质量比较研究[J].药学学报,2017,
52(12):1903-1909.
- [32] Wang W X, Dabu X, He J, et al. Polygonatone H, anew
homoisoflavanone with cytotoxicity from *Polygonatum
cyrtoneuma* Hua [J]. Nat Prod Res, 2019, 33(12): 1727-1733.
- [33] 潘扬,张弦,刘亮镜,等.马钱子发酵品中生物碱化学成分研
究[J].中草药,2012,43(3):452-457.
- [34] To D C, Bui T Q, Nhung N T A, et al. On the inhibitability of
natural products isolated from *Tetradium ruticarpum* towards
tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and α -glucosidase (3W37):
An *in vitro* and *in silico* study [J]. Molecules, 2021, 26(12):
3691.
- [35] Rashmi Kumari, Rajendra Kumar, Open Source Drug
Discovery Consortium, et al. g_mmpbsa-A GROMACS tool
for high-throughput MM-PBSA calculations [J] Chem Inf
Model, 2014; 54(7):1951-1962.
- [36] 朱福,章茂顺,王家良,等.醋柳总黄酮对兔血管紧张素转换
酶的抑制作用[J].中国临床药理学杂志,2000,2:95-98.
- [37] Liu W W, Dun M Q, Liu X Y, et al. , Effects on total phenolic
and flavonoid content, antioxidant properties, and angiotensin
I-converting enzyme inhibitory activity of beans by
solid-state fermentation with *Cordyceps militaris* [J].
International Journal of Food Properties, 2022, 3(25):
477-491.
- [38] Pires R P S, Guimaraes J T, Barros, C P. et al. Efficient
catalytic Ohmic heating increases inactivation and
morphological changes of *Salmonella* sp. and the formation
of bioactive compounds in infant formula [J]. Food Microbiol,
2021, 4(97): 103737.
- [39] Fidelis Azi, Chuanhai Tu, Ling Meng, et al. Metabolite
dynamics and phytochemistry of a soy whey-based beverage
bio-transformed by water kefir consortium [J]. Food
Chemistry, 2021, 342: 128225.
- [40] Lee C, Han D, Kim B, et al. Antioxidant and
anti-hypertensive activity of anthocyanin-rich extracts from
hulless pigmented barley cultivars [J]. Journal of Food
Science and Technology, 2013, 5(48): 984-991.