

文章编号:1671-6833(2009)03-0106-00

## ESI MS 研究黄酮含磷衍生物与溶菌酶的竞争作用

陈晓岚<sup>1</sup>, 李 慧<sup>2</sup>, 袁金伟<sup>1</sup>, 屈凌波<sup>1,3</sup>, 刘向前<sup>1</sup>, 赵玉芬<sup>1</sup>

(1. 郑州大学 化学系 河南省化学生物与有机化学重点实验室, 河南 郑州 450001; 2. 中原工学院 河南 郑州 450007; 3. 河南工业大学 化学化工学院, 河南 郑州 450002)

**摘 要:** 采用电喷雾质谱(ESI MS)技术,研究了黄酮-7-磷酸化丙氨酸酯(a)、黄酮-7-磷酸化缬氨酸酯(b)、黄酮-7-磷酸化亮氨酸酯(c)、黄酮-7-磷酸化异亮氨酸酯(d)分别与黄酮-7-二异丙基磷酸酯(e)、溶菌酶形成的三体系混合溶液小分子与蛋白大分子的弱相互作用。实验结果表明,在这个三体系的混合溶液中,黄酮-7-磷酸化氨基酸酯 a、b、c、d 与黄酮-7-二异丙基磷酸酯 e 相比,与溶菌酶具有更强的弱相互作用能力或亲和力。

**关键词:** ESI 质谱; 黄酮-7-磷酸化氨基酸酯; 黄酮-7-二异丙基磷酸酯; 溶菌酶; 竞争作用

**中图分类号:** O 657. 63

**文献标识码:** A

### 0 引言

黄酮化合物是一类具有广泛生物活性的天然产物,具有抗病毒、抗氧化、抗心血管疾病和抗肿瘤抗癌等活性<sup>[1]</sup>。由于黄酮的水溶性较差,生物利用度低,因此人们对它进行了硝化、烷基化、卤化、氮甲基化<sup>[2]</sup>等方面的结构改造。磷酸酯类化合物在生物多样性和具有生物活性的化合物领域都扮演着非常重要的角色,一个磷酸基的引入能从本质上改变母体分子的化学性质和物理性质,使分子的极性和分子间力发生变化。在现代制药工业中,磷酸酯常被用作前药来增加药物的水溶性进而提高药物的生物利用度<sup>[3]</sup>。为了改善黄酮的溶解性,解决临床应用中存在的生物利用度低、吸收差、显效慢等缺点,本实验室通过磷酸化改造合成一系列黄酮含磷衍生物<sup>[4]</sup>,部分化合物体外活性试验表明对肿瘤细胞有明显的抑制作用<sup>[5]</sup>。

ESI 质谱是近年来发展起来的一种软电离质谱技术,广泛应用于小分子与蛋白大分子的弱相互作用、非共价复合物的研究和检测<sup>[6]</sup>。对于大多数研究对象,从电喷雾质谱得到的结论与溶液中用荧光光谱等方法得到的结果相符<sup>[7]</sup>。说明通过电喷雾质谱研究可以了解细胞中蛋白质与其它生物分子是怎样相互作用的。本实验室采用 ESI

MS 方法研究了磷酸化黄酮与溶菌酶等蛋白的两体系溶液中的相互作用,但是,对于三体系溶液中的竞争作用情况,未见文献报道,因此本实验选取 4 个黄酮-7-磷酸化氨基酸酯和 1 个黄酮-7-二异丙基磷酸酯作为研究对象,利用 ESI MS 研究了相同浓度下不同种类的 2 个黄酮含磷衍生物与溶菌酶形成复合物的竞争作用。黄酮含磷衍生物与蛋白形成的复合物的强弱与化合物的活性有重要的关系,这些研究结果对小分子化合物活性筛选具有重要的指导意义。化合物的生物活性正在进一步的测试中。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

溶菌酶由华美生物制品有限公司提供,甲醇为色谱纯,水为美国 Labconco 公司纯水机生产的超纯水。黄酮-7-磷酸化氨基酸酯(a、b、c、d)和黄酮-7-二异丙基磷酸酯(e)(如图 1)由本实验室合成。

#### 1.2 质谱条件

采用 ESI 离子源,正离子检测模式,检测范围  $m/z$  小于 6 000。雾化气( $N_2$ )压力 16 Pa,干燥气( $N_2$ )流速 9.00 L/min,ESI 离子源温度 250 ℃,锥孔电压 120 V,导入离子源速率 4  $\mu$ L/min。

收稿日期:2009-01-17;修订日期:2009-04-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20472076);河南省杰出青年基金资助项目(0512001400)。

作者简介:陈晓岚(1964-),女,郑州大学教授,博士,主要从事化学生物学、有机磷化学和天然产物化学研究, E-mail:chenxl@zzu.edu.cn

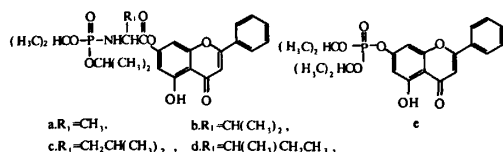


图1 黄酮-7-磷酸化氨基酸酯(a、b、c、d)和  
黄酮-7-二异丙基磷酸酯(e)的结构

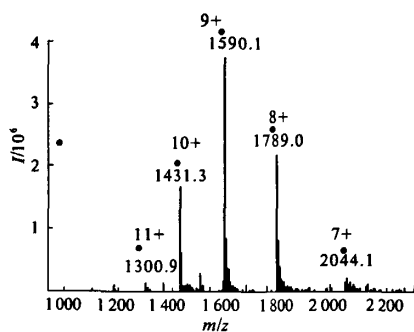
Fig.1 Structures of chrysin-7-phosphated amino acid esters and chrysin-7-diisopropyl phosphate

## 2 结果与讨论

ESI 质谱作为一种软电离方法,实验条件在蛋白非共价键复合物的研究中非常重要,实验条件不合适可能会导致无法成功地检测到蛋白的非共价键复合物,更无法判定弱相互作用的强弱.本实验通过优化仪器参数和条件,选择合适的锥孔电压和毛细管温度保持不变的条件下,在近中性环境中分别检测了两种不同的小分子与溶菌酶形成复合物的竞争作用.实验中测试溶液分别为0.2 mmol/L的化合物 a (b,c,d)的甲醇溶液、0.2 mmol/L的化合物 e 的甲醇溶液与等体积的0.05 mmol/L溶菌酶水溶液混合配置,溶液的 pH 值为 6.9.

### 2.1 溶菌酶的 ESI 质谱分析

溶菌酶溶液的 ESI 质谱图如图 2 所示,0.05 mmol/L 的溶菌酶水溶液与等体积甲醇混合后注射入质谱仪中,溶菌酶(HEWL,hen egg white lysozyme)从  $(HEWL + 7H)^{7+}$  到  $(HEWL + 11H)^{11+}$  的电荷分布状态,并且以  $(HEWL + 9H)^{9+}$  的丰度最高.根据质谱图计算的平均相对分子质量为 14 302.



● 为溶菌酶所带多电荷峰.

图2 溶菌酶溶液的 ESI 质谱图

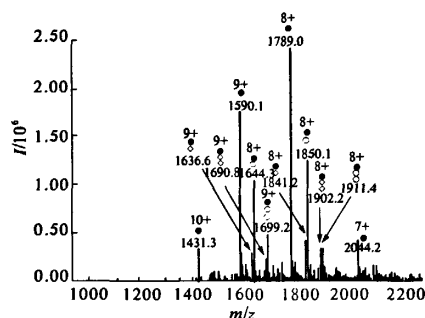
Fig.2 ESI mass spectra of HEWL.

2.2 黄酮-7-磷酸化氨基酸酯(a, b, c, d)和  
黄酮-7-二异丙基磷酸酯(e)混合物与溶菌酶  
的弱相互作用的 ESI 质谱分析

#### 2.2.1 化合物 a 和 e 的混合物与溶菌酶的弱相

#### 互作用的 ESI 质谱分析

化合物 a(Ca)和 e(Ce)与溶菌酶(HEWL)混合液的 ESI 质谱图如图 3 所示,除了图 2 中所能观察到的离子峰以外,图 3 中又出现了一些新的离子峰; $m/z$  为 1 644.3,1 699.2,1 850.1,1 911.4 分别对应于  $(HEWL + Ca + 9H)^{9+}$ ,  $(HEWL + 2Ca + 9H)^{9+}$ ,  $(HEWL + Ca + 8H)^{8+}$ ,  $(HEWL + 2Ca + 8H)^{8+}$ ;  $m/z$  为 1 636.6,1 690.8,1 841.2,1 902.2 分别对应于  $(HEWL + Ce + 9H)^{9+}$ ,  $(HEWL + 2Ce + 9H)^{9+}$ ,  $(HEWL + Ce + 8H)^{8+}$ ,  $(HEWL + 2Ce + 8H)^{8+}$ . 测试结果显示,化合物 a 和 e 均能与溶菌酶(HEWL)在  $9^+$  和  $8^+$  的电荷处形成复合物,检测到化学计量数分别为 1:1 和 1:2;虽然 Ca 和 Ce 结构类似,均含有黄酮母体和二异丙基磷酸基,但是溶菌酶-Ca 形成复合物的质子峰强度明显比溶菌酶-Ce 复合物要强,说明 Ca 与溶菌酶亲和力更强,形成的复合物更稳定.



●—溶菌酶的多电荷峰;○—化合物 a(Ca);  
◇—化合物 e(Ce).

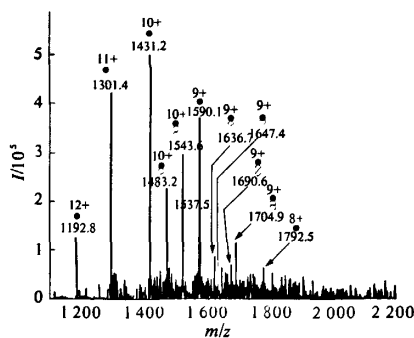
图3 化合物 a 和化合物 e 与溶菌酶溶液的 ESI 质谱图

Fig.3 ESI mass spectrum of lysozyme with compound a and e

#### 2.2.2 化合物 b 和 e 的混合物与溶菌酶的弱相互作用的 ESI 质谱分析

化合物 b(Cb)和 e(Ce)与溶菌酶(HEWL)混合液的 ESI 质谱图如图 4 所示,与图 2 相比在图中出现的新离子峰; $m/z$  为 1 483.2,1 543.6,1 647.4,1704.9 分别对应于  $(HEWL + Cb + 10H)^{10+}$ ,  $(HEWL + 2Cb + 10H)^{10+}$ ,  $(HEWL + Cb + 9H)^{9+}$ ,  $(HEWL + 2Cb + 9H)^{9+}$ ;  $m/z$  为 1 636.7,1 690.6 分别对应于  $(HEWL + Ce + 9H)^{9+}$ ,  $(HEWL + 2Ce + 9H)^{9+}$ . 测试结果同时显示,化合物 b 与溶菌酶(HEWL)在  $10^+$  和  $9^+$  的电荷处形成复合物,检测到化学计量数分别为 1:1 和 1:2;化合物 e 与溶菌酶(HEWL)在  $9^+$  的  $m/z$  形成复合物,检测到化学计量数为 1:1 和 1:2;在

质谱图上,溶菌酶-Cb 形成复合物的质子峰比较多,并且强度明显比溶菌酶-Ce 复合物要强,说明 Cb 与溶菌酶亲和力更强。



●—溶菌酶的多电荷峰; 一代表化合物 b(Cb);  
—代表化合物 e(Ce)。

图 4 化合物 b 和化合物 e 与溶菌酶溶液的 ESI 质谱图

Fig. 4 ESI mass spectrum of lysozyme with compound b and e

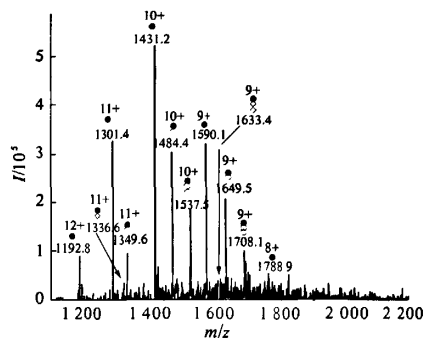
### 2.2.3 化合物 c 和 e 的混合物与溶菌酶的弱相互作用的 ESI 质谱分析

化合物 c(Cc)和 e(Ce)与溶菌酶(HEWL)混合液的 ESI 质谱图如图 5 所示,与图 2 相比在图中出现的新离子峰; $m/z$  为 1 349.6,1 484.4,1 537.5,1649.5,1708.1 分别对应于(HEWL + Cc + 11H) $^{11+}$ , (HEWL + Cc + 10H) $^{10+}$ , (HEWL + 2Cc + 10H) $^{10+}$ , (HEWL + Cc + 9H) $^{9+}$ , (HEWL + 2Cc + 9H) $^{9+}$ ;  $m/z$  为 1 336.6,1 633.4 分别对应于(HEWL + Ce + 11H) $^{11+}$ , (HEWL + Ce + 9H) $^{9+}$ 。测试结果同时显示,化合物 c 与溶菌酶(HEWL)在 11+ 到 9+ 的电荷范围形成复合物,检测到化学计量数分别为 1:1 和 1:2;化合物 e 与溶菌酶(HEWL)在 11+ 和 9+ 的电荷处形成复合物,检测到化学计量数为 1:1 和 1:2;在质谱图上,溶菌酶-Cc 形成复合物的质子峰比较多,并且强度明显比溶菌酶-Ce 复合物要强,说明 Cc 与溶菌酶亲和力更强。

### 2.2.4 化合物 d 和 e 的混合物与溶菌酶的弱相互作用的 ESI 质谱分析

化合物 d(Cd)和 e(Ce)与溶菌酶(HEWL)混合液的 ESI 质谱图如图 6 所示,与图 2 相比在图中出现的新离子峰; $m/z$  为 1 484.4,1 537.5,1 649.5,1 708.1 分别对应于(HEWL + Cd + 10H) $^{10+}$ , (HEWL + 2Cd + 10H) $^{10+}$ , (HEWL + Cd + 9H) $^{9+}$ , (HEWL + 2Cd + 9H) $^{9+}$ 。测试结果同时显示,化合物 d 与溶菌酶(HEWL)在 10+ 和 9+ 的电荷处形成复合物,检测到化学计量数分别为

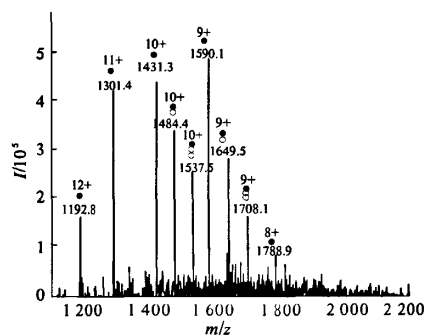
1:1 和 1:2;化合物 e 与溶菌酶(HEWL)在 12+ 和 8+ 的电荷范围内未检测到复合物的存在,溶菌酶-Cd 形成复合物的质子峰强度比较强,说明 Cd 与溶菌酶的亲和力更强,形成的复合物更稳定。



●—溶菌酶的多电荷峰; 一代表化合物 c(Cc);  
—代表化合物 e(Ce)。

图 5 化合物 c 和化合物 e 与溶菌酶溶液的 ESI 质谱图

Fig. 5 ESI mass spectrum of lysozyme with compound c and e



●—溶菌酶的多电荷峰; 一代表化合物 d(Cd)。

图 6 化合物 d 和化合物 e 与溶菌酶溶液的 ESI 质谱图

Fig. 6 ESI mass spectrum of lysozyme with compound d and e

### 2.3 讨论分析

在相同的 ESI 质谱条件下(相同的锥孔电压和毛细管温度),检测具有相同的浓度的两种不同的黄酮含磷衍生物小分子与溶菌酶形成复合物的竞争作用表明:化合物 a、b、c、d 都能与溶菌酶发生弱相互作用,并且作用强度较大;化合物 e 分别和化合物 a、b、c 与溶菌酶形成的混合物中,能与溶菌酶发生弱相互作用,但是强度较弱,而在化合物 e、d 与溶菌酶形成的混合物中,未检测到化合物 e-溶菌酶复合物的存在,即化合物 d 比 e 与溶菌酶更具有亲和力。从图 2~6 可以看出,化合物 a、b、c、d、e 的加入基本没有改变溶菌酶的电荷峰的正态分布,说明化合物与溶菌酶发生弱相

互作用时,相对于原来的蛋白,溶菌酶此时的构象基本没有明显的变化。

黄酮-7-二异丙基磷酸酯与溶菌酶的弱相互作用是通过磷酸基上氧与蛋白溶菌酶碱性氨基酸残基通过氢键发生作用,从而增强了与蛋白的结合能力<sup>[8]</sup>。化合物 a、b、c、d、e 的结构中均含有二异丙基磷酸基,但是在化合物与溶菌酶的竞争作用中,化合物 a、b、c、d 分别与溶菌酶形成复合物的质子峰强度明显比溶菌酶-Ce 复合物要强 2-3 倍。其中的原因,我们推断是因为化合物 a、b、c、d 中除了有 P=O 上的 O 与溶菌酶蛋白上的碱性氨基酸残基形成氢键外,还有氨基酸 C=O 上的 O 也可以与碱性氨基酸残基形成氢键,从而具有更强的与溶菌酶的弱相互作用能力。ESI MS 作为分子水平上筛选新药化合物的理想辅助工具,这些研究结果对小分子化合物初步的活性筛选具有重要的指导意义。

### 3 结论

ESI MS 对相同浓度下不同种类的 2 个黄酮含磷衍生物与溶菌酶的混合溶液形成复合物的竞争作用表明,黄酮-7-磷酸化氨基酸酯与黄酮-7-二异丙基磷酸酯相比,与溶菌酶具有更强的弱相互作用或亲和力。

### 参考文献:

- [1] ZHENG X, MENG W D, XU Y Y, et al. Synthesis and anticancer effect of chrysin derivatives[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13(5): 881-884.
- [2] HARI B T, RAMA S R V, TIWARI A K, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 8-aminomethylated oroxylin A analogues as 8-glucosidase inhibitors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(5): 1659-1662.
- [3] SIMON J, STEVEN M. An improved method for lewis acid catalyzed phosphoryl transfer with Ti(t-BuO)<sub>4</sub> [J]. J Org Chem, 2003, 68(13): 5211-5216.
- [4] CHEN X L, QU L B, LI W F, et al. Synthesis of phosphoryl amino acids chrysin ester[J]. Phosphorus, Sulfur Silicon Relat Elem, 2008, 183(2-3): 527-537.
- [5] ZHANG T, CHEN X L, QU L B, et al. Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in Hela cells[J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12(23): 6097-6105.
- [6] PRAMANIK B N, BARMER P L, MIRZA U A, et al. Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: an emerging technology [J]. J Mass Spectrometry, 1998, 33(10): 911-920.
- [7] 陈晓岚,于斐,屈凌波,等,荧光及 ESI 质谱法研究溶菌酶与磷酸化黄酮的相互作用[J]. 化学学报, 2004, 62(2): 188-193.
- [8] CHEN X L, QU L B, ZHANG T, et al. The nature of phosphorylated chrysin-protein interactions involved in noncovalent complex formation by ESI MS [J]. Anal Chem, 2004, 76(1): 211-217.

## Study on Competitive Interaction of Lysozyme and Chrysin Phosphorylated Derivatives by ESI Mass Spectrometry

CHEN Xiao-lan<sup>1</sup>, LI Hui<sup>2</sup>, YUAN Jin-wei<sup>1</sup>, QU Ling-bo<sup>1,3</sup>, LIU Xiang-qian<sup>1</sup>, ZHAO Yu-fen<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry, Zhengzhou University, Key Laboratory of Chemistry Biology and Organic Chemistry, Zhengzhou 450001, China; 2. Zhongyuan University of Technology, Zhengzhou 450007, China; 3. School of Chemistry & Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450002, China.)

**Abstract:** In the competition experiment, the non-covalent complexes was studied by electrospray ionization mass spectrometry between the same protein lysozyme and two different kinds of chrysin phosphorylated derivatives, such as Ca and Ce, Cb and Ce, Cc and Ce, Cd and Ce. It was found that, in spite of all of compounds containing phosphoryl group, there were differences among them. The interaction lysozyme and chrysin-7-phosphated amino acid esters (a, b, c, d) was stronger than that of chrysin-7-diisopropyl phosphate (e).

**Key words:** electrospray ionization mass spectrometry; chrysin-7-phosphated amino acid esters; chrysin-7-diisopropyl phosphate; lysozyme; competitive interaction