

鸡屎藤抑制丁酰胆碱酯酶活性及活性部位的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

王冬梅¹, 刘艾琳², 黄林芳^{1*}, 陈士林^{1**}

(¹中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

²中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要 应用高通量药物筛选技术, 筛选发现具有丁酰胆碱酯酶(BuChE)抑制活性的中药提取物, 同时采用超高效液相色谱与串联四极杆飞行时间质谱仪联用技术(UPLC-Q-TOF-MS)对其活性部位进行分析和鉴别。药材经石油醚渗滤、乙醇提取、乙酸乙酯萃取和水煎煮后, 得到4个提取部位。采用5,5'-二硫双硝基苯甲酸(DTNB)法检测BuChE活性, 于412 nm波长处检测吸收度, 计算提取物对BuChE的抑制率。采用ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱, 以水-甲醇为流动相梯度洗脱, 200~400 nm扫描, 使用ESI离子源, 在正离子模式下采集数据。结果显示, 57种中药提取物中, 鸡屎藤的乙酸乙酯部位显示较强的BuChE抑制活性, 并从其活性部位中分析鉴定出9个化合物, 主要成分为环烯醚萜苷类化合物, 分别是鸡屎藤苷、鸡屎藤苷酸、甲基鸡屎藤苷、咖啡酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖-鸡屎藤苷B和4个未知的环烯醚萜苷类, 以及1个黄酮类成分蒙花苷。表明鸡屎藤乙酸乙酯提取部位具有较强的BuChE抑制活性, IC₅₀为12.415 μg/mL, Q-TOF-MS测定的相对分子质量及正离子信息鉴定鸡屎藤乙酸乙酯提取物中主要为环烯醚萜类成分, 说明其含有的环烯醚萜苷类为抑制BuChE活性的主要成分, 为进一步研究鸡屎藤活性成分奠定基础。

关键词 鸡屎藤; 丁酰胆碱酯酶抑制剂; 高通量筛选; 提取物; 有效成分; UPLC-Q-TOF-MS

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)01-0044-05

Analysis of chemical constituents of the effective part of anti-butyrylcholinesterase of *Paederia scandens* (Lour.) Merr. by UPLC-Q-TOF-MS

WANG Dongmei¹, LIU Ailin², HUANG Linfang^{1*}, CHEN Shilin^{1**}

¹Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193; ²Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Abstract High-throughput drug screening was applied to study the butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitory activity of Chinese herb extracts and to analyze the active ingredients were carried out. The constituents in *Paederia scandens* (Lour.) Merr. were determined by UPLC-Q-TOF-MS. Herbs were percolated with petroleum ether, ethanol extract, ethyl acetate extraction and boiling water, to obtain the four corresponding parts of extraction. BuChE inhibitory activity of the candidate compounds was assayed based on thionitrobenzoic anion (DTNB) method. The chromatographic separation was performed on a C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) with a gradient elution of methanol-water. The mass spectrometer equipped with electron spray ionization source was used as detector and the data was collected under the positive ion modes. 57 Chinese herb extracts showed BuChE inhibitory activity, with the ethyl acetate extraction part of *Paederia scandens* (Lour.) Merr. showing a strong activity. Nine constituents were analyzed and identified, including paederoside, paederosidic acid, methylpaederoside, caffeic acid-4-O-β-D-glucopyranoside paederoside B as the main active components, and linarin as a flavonoid composition, and

* 收稿日期 2012-11-13 通信作者 * Tel: 010-57833197 E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

** Tel: 010-57833197 E-mail: slchen@implad.ac.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81274013, No. 81130069); 留学人员科技活动项目择优资助项目; 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2011ZX09307-002-01)

4 unknown substances. Parts of *Paederia scandens* (lour.) Merr. extracted with ethyl acetate has significant BuChE inhibitory activity, and IC_{50} was 12.415 $\mu\text{g/mL}$. Iridoids were identified through the information of positive ion and relative molecular mass which were determined by Q-TOF-MS. The results indicate that *Paederia scandens* (lour.) Merr. contains iridoids ingredients as inhibitors of BuChE, which lays the foundation for further tracking separation of active ingredients.

Key words *Paederia scandens* (lour.) Merr.; butyrylcholinesterase inhibitor; high-throughput drug screening; extract; active ingredients; UPLC-Q-TOF-MS

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81274013, 81130069); the Technology Foundation for Selected Overseas Chinese Scholar; and China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2011ZX09307-002-01)

鸡屎藤是茜草科植物鸡屎藤 *Paederia scandens* (lour.) Merr. 的干燥全草或根,具有祛风活血,止痛解毒、消食导滞、除湿消肿之功效^[1],主要分布于我国的陕西、甘肃、山东、江苏、安徽、湖北、湖南、贵州等省。鸡屎藤全株作为民间常用草药已有数千年历史,历代本草均有记载,曾经收载于《中华人民共和国药典》(1977年版)及四川、上海、河南、贵州、广西等省、自治区的药典标准中^[2]。化学成分主要有环烯醚萜苷类、黄酮类、挥发油类、甾醇类、三萜类等。环烯醚萜苷类化合物主要是鸡屎藤苷(paederoside),鸡屎藤苷酸(paederosidic acid)等;黄酮类化合物主要为山奈酚(kaempferol)和槲皮素(quercetin)及其苷类;挥发油类化合物和少量的酚羧酸类化合物^[3]。

阿尔茨海默病(AD)是一种威胁老年人健康的进行性和致命性疾病^[4]。根据其公认的病理-胆碱能学说^[5],抑制乙酰胆碱酯酶(AchE)的活性已成为目前治疗AD的一个主要策略。临床上的胆碱酯酶抑制剂多是选择性AchE抑制剂,外周不良反应较大,长期治疗效果不理想。新近研究表明,给予大鼠大脑皮层内灌注选择性丁酰胆碱酯酶(BuChE)抑制剂可使细胞外乙酰胆碱浓度增加15倍,且未发现胆碱样不良反应。临床试验也表明,脑脊液中BuChE抑制与AD患者的认知功能具有相关性^[6-8]。近年来,对BuChE进行抑制已成为新的AD治疗手段^[9-11]。

本实验应用5,5'-二硫双硝基苯甲酸(DTNB)法^[12]建立了BuChE抑制剂高通量筛选方法,对57种中药提取物进行了BuChE抑制活性筛选,研究发现,鸡屎藤具有较强的BuChE抑制活性,并对其有效部位进行UPLC-Q-TOF-MS分析。本实验为其进一步跟踪分离获得活性先导化合物奠定基础,也

为临床治疗AD提供新的用药依据。

1 材料

1.1 试剂

氯化丁酰巯基胆碱(BuSCh)、四异丙基甲基焦磷酸胺(iso-OMPA)、DTNB(美国Sigma公司);人血浆(北京市红十字血液中心);甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);57个筛选样品为中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所提供的中药提取物;其他试剂均为市售国产分析纯。

1.2 仪器

PURELAB Classic-UVF 纯水机(英国ELGA公司);POLARstargalaxy 微板光学测定仪(德国BMG公司);Personal Pipettor PP-550MS 移液器(美国Apricot Designs公司);美国Waters AcquityTM UPLC-Q-TOF Premier;MassLynxV 4.1 工作站。

2 方法

2.1 待测样品的制备

药材样品粉碎成粗粉,取粗粉500g,先用石油醚浸泡1d后渗滤提取至提取液颜色浅(或5倍药材量),回收石油醚,得石油醚提取物;残渣挥去石油醚,用80%乙醇湿润后,再用3倍量80%乙醇回流提取2次,合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,用等体积乙酸乙酯萃取2次,合并乙酸乙酯萃取液,回收乙酸乙酯至干,得乙酸乙酯萃取物;母液浓缩至干,得乙醇提取物;残渣挥干乙醇,用3倍量水煮提2次,合并水提取液,浓缩至干,得水提取液。

2.2 活性测定

2.2.1 酶反应液、底物浓度、DTNB试液浓度的确定 人血浆可直接作为酶源。本实验以

0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释人血浆 80 倍的稀释液作为酶反应液;筛选体系中选用 3 mmol/L 作为底物的终浓度,以保证较快的反应速度,实现高通量;确定 DTNB 试液的浓度为 0.625 mmol/L,终浓度为 0.25 mmol/L^[13]。

2.2.2 BuChE 活性测定方法 采用改良的 DTNB 法^[12]测定酶活性。BuChE 水解丁酰胆碱生成胆碱及丁酸,胆碱可以与巯基显色剂 DTNB 反应生成 TNB 黄色化合物,根据颜色深浅进行比色定量,水解产物胆碱的数量可以反映胆碱酯酶的活力。

BuSCh 和 DTNB 均以 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液临用现配。化合物大规模筛选在 384 孔板中进行,用移液器转移液体,每孔中含有天然提取物(终浓度 50 $\mu\text{g/mL}$) 5 μL ,酶反应液 20 μL ,BuSCh 20 μL ,DTNB 20 μL ,反应总体积 55 μL 。用 0.05 mol/ μL 磷酸盐缓冲液来代替样品,作为标准孔,反映酶的最大活性;以 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液代替样品及底物作为空白对照;以 BuChE 的特异性抑制剂 *iso*-OMPA 作为阳性对照,以检验方法的可靠性。

由移液器依次加入样品、酶反应液、DTNB 试液,最后加入底物以启动反应,充分混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min 后,送入微板光学测定仪,读取 A_{412} ,计算抑制率。抑制率(%) = $(A_{\text{标准}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 100$ 。

2.2.3 样品筛选 初筛中药提取物 57 个,计算抑制率后对高活性样品进行复筛。复筛时每个样品依次稀释为 5 个浓度,实验重复 3 次,分别为 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 $\mu\text{g/mL}$ 。根据测定结果计算 IC_{50} 。

2.3 活性成分测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱 UPLCTM BEH C_{18} 柱(50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:A:水,B:甲醇;梯度洗脱:20% B(0 min) \rightarrow 35% B(5 min) \rightarrow 50% B(8 min) \rightarrow 60% B(9 min) \rightarrow 75% B(10 min) \rightarrow 90% B(12 min) \rightarrow 95% B(13 min) \rightarrow 100% B(15 min);流速:0.3 mL/min;进样量:4 μL ;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),采用正离子 V 模式检测;脱溶剂气流量为 800 L/h,脱溶

剂气温为 450 $^{\circ}\text{C}$,锥孔气流量为 50 L/h,离子源温度为 120 $^{\circ}\text{C}$,毛细管电压为 3 kV,锥孔电压为 40 V。0.1 s(间隔 0.02 s)采集一次谱图。

2.4 样品制备

取已制得的鸡屎藤乙酸乙酯提取物 20.01 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过备用。

3 结果

实验得到抑制率大于 50% 的中药提取物 57 个,进行复筛,阳性者 8 个,依次稀释成 5 种浓度,计算 IC_{50} 。从表 2 中可以看出:鸡屎藤 4 个部位具有不同程度的 BuChE 抑制活性。而其乙酸乙酯部位抑制活性最强,在终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,抑制率(%) 分别为 15.40, 40.04, 66.92, 11.45。鸡屎藤乙酸乙酯部位 IC_{50} 为 12.415 $\mu\text{g/mL}$,其他 3 个部位未检测到。

Table 1 Inhibition on butyrylcholinesterase (BuChE) activity and IC_{50} of different extract fractions of *Paederia scandens* (lour.) Merr. ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Extract	Inhibition/%	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g/mL})$
Petroleum ether	15.40	—
Ethanol	40.04	—
Ethyl acetate	66.92	12.145
H ₂ O	11.45	—
<i>iso</i> -OMPA	94.43	8.95

iso-OMPA: Tetraisopropylpyrophosphoramidate

按“2.3.1”项分析条件,绘制鸡屎藤乙酸乙酯溶液的 UPLC-Q-TOF-MS 离子流图,见图 1。

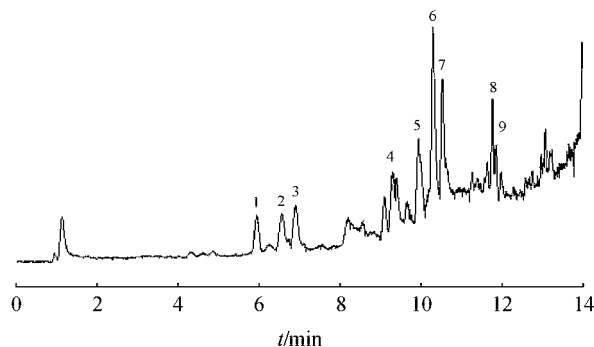


Figure 1 UPLC-Q-TOF-MS total ion current chromatograms of the extract of *Paederia scandens* (lour.) Merr. Peaks 1-9 refer to Table 2

数据采用 Micro mass Marker lynx 软件进行处理,根据正离子模式的一级质谱的分子离子峰得到化合物的准确相对分子质量,计算出其元素组

成,结果见表2。再由正离子的二级质谱中碎片信息,结合文献,对鸡屎藤用 UPLC 分离出的9个

主要峰进行分析,推断出其可能的成分,结果见表2。

Table 2 Compounds of the extract of *Paederia scandens* (Lour.) Merr. identified by UPLC-Q-TOF-MS

Peak No.	t_R/min	$[M + Na]^+ (m/z)$	MS/MS(m/z)	Formula	Theoretical value(m/z)	Compound
1	6.599	469.089 8	452	$C_{18}H_{22}O_{11}SNa^+$	469.089 9	Paederoside
			307	$C_{12}H_{12}O_6SNa^+$	307.024 7	
2	6.933	487.099 5	469	$C_{18}H_{24}O_{11}SNa^+$	487.100 5	Paederosidic acid
			443	$C_{17}H_{24}O_{10}SNa^+$	433.098 2	
			399	$C_{16}H_{24}O_8SNa^+$	399.108 4	
			457	$C_{18}H_{26}O_{10}SNa^+$	457.113 9	
3	9.127	501.160 6	409	$C_{17}H_{22}O_{10}SNa^+$	409.110 5	Methylpaederoside
			339	$C_{13}H_{16}O_7SNa^+$	339.050 9	
			457	$C_{18}H_{26}O_{10}SNa^+$	457.113 9	
4	9.325	701.473 0	678	$C_{43}H_{66}O_6Na$	701.475 7	Unknown substance 1
5	9.678	386.992 6	457	$C_{24}H_3O_6$	386.993 0	Unknown substance 2
6	10.316	619.132 6		$C_{27}H_{49}O_5Na$	457.358 0	Unknown substance 3
7	10.593	593.181 7		$C_{35}H_{29}O_9$	593.181 2	Linarin
8	11.860	467.252 1	828	$C_{21}H_{39}O_{11}$	467.249 2	Unknown substance 4
9	13.976	915.176 5		$C_{36}H_{44}O_{22}S_2Na^+$	915.167 9	Caffeic acid 4-O- β -D-glucopyranoside Paederoside B

4 讨 论

结果表明,大多数中药提取物对 BuChE 没有抑制活性或仅有较弱的抑制作用,只有少数中药提取物对 BuChE 有相对较强的抑制活性和选择性。参照文献[12]方法,分别将底物和酶反应液换成 BuChE 的底物 BuSch 和 BuChE 含量充足的人血浆缓冲液。同时对底物和酶浓度,并采用 384 孔板实现了高通量筛选。BuChE 因其生理作用不明多年来未引起医学界的重视,随着近年来对其作用的新认识,逐渐成为一个新的研究热点,尤其成为 AD 的一个新的治疗靶点。

Q-TOF-MS 是高分辨串联质谱,一级质谱是四极杆,主要起选择离子的作用,二级质谱为飞行时间质谱,是该仪器的主要质量分析器,可以测得经 UPLC 快速分离之后得化合物准确相对分子质量。正离子流图上有和紫外色谱图对应的尖锐的峰出现,由一级质谱的分子离子峰得到的精确相对分子质量算出其元素组成,得到化合物的分子式。根据碎片的精确相对分子质量和参考文献[14-16]的信息,可得到5个峰对应化合物的信息。质谱结果分析表明在正离子模式下,几种环烯醚萜苷类化合物的质谱行为存在共性,产生的准分子离子峰多为 $[M + Na]^+$,这一点在确定未知化合物的种类和相对分子质量时有重要意义。

本实验通过简便、快速、稳定的 BuChE 抑制剂高通量筛选模型得到了活性较好的提取部位,今后将对这些活性提取物做进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Editorial Board of the Flora of China. *Flora of China* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1999: 18.
- [2] Lin RC. *Chinese Medicinal Materials Standard List* (中国药材标准名录) [M]. Beijing: Science Press, 2011: 254.
- [3] Xu JL, Liu L, Zhang QY, et al. Review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical practices of *Paederia scandens* (Lour.) Merr. [J]. *J Pharm Prac* (药学实践杂志), 2011, **29**(6): 401-404.
- [4] Wu HY, Zhou JY. Research progress of drugs for treatment of Alzheimer's disease [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2004, **13**(7): 583-586.
- [5] Zou L, Quan MH, Chen YQ, et al. Advances in the research of acetylcholinesterase inhibitors [J]. *Food Sci* (食品科学), 2005, **26**(Suppl): 105-108.
- [6] Greig NH, Utsuk IT, Ingram DK. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(47): 17 213-17 218.
- [7] Giacobini E. Selective inhibitors of butyrylcholinesterase: a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease [J]? *Drugs Aging*, 2001, **18**(12): 891-898.
- [8] Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives [J]. *Pharmacol Res*, 2004, **50**(4): 433-440.
- [9] Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K. Butyrylcholinesterase:

- an important new target in Alzheimer's disease therapy[J]. *Int Psychogeriatrics*, 2002, **14**(S1): 77-91.
- [10] Bullock R, Lane R. Executive dyscontrol in dementia, with emphasis on subcortical pathology and the role of butyrylcholinesterase[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2007, **4**(3): 277-293.
- [11] Kamal MA, Klein P, Yu QS, et al. Kinetics of human serum butyrylcholinesterase and its inhibition by a novel experimental Alzheimer therapeutic, bisnorcymserine [J]. *J Alzheimers Dis*, 2006, **10**(1): 43-51.
- [12] Ellman GL, Diane Courtney K, Valentino Andres Jr, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, **7**(1): 88-95.
- [13] Gao M, Liu AL, Du GH. High-throughput screening for butyrylcholinesterase inhibitors[J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2009, **18**(12): 1145-1148.
- [14] Fu YF, Liu YL, Shang TM, et al. Distribution of flavonoids, in the plant kingdom, therapeutic values and potential new drugs therefrom[J]. *J Integr Plant Biol* (植物学报), 1980, **22**(1): 87-89.
- [15] Zhou Y, Zou X, Liu X, et al. Multistage electrospray ionization mass spectrometric analyses of sulfur-containing iridoid glucosides in *Paederia scandens*[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, **21**(8): 1375-1385.
- [16] Chen YF. Study on active compounds and anti-nociceptive activity of *Paederia scandens*[D]. Shanghai: Second Mil Med Univ (第二军医大学), 2009: 23-33.

· 新 信 息 ·

2013 年有望上市的在研药物

全球新药研发在 2012 年成果丰硕,这种上升势头会在 2013 年持续保持。在 2013 年,肿瘤、糖尿病、心血管疾病、多发性硬化症及肝炎领域的在研药物将会成为未来的重磅炸弹级产品。罗氏、葛兰素史克、礼来、百健艾迪、吉利德科学公司以及诺和诺德均有重要的研发药物在 2013 年进入到一个关键时期。

今年最有望获得批准的为百健艾迪的多发性硬化症药物 BG-12。该产品将成为继诺华芬戈莫德和赛诺菲 Aubagio 之后第 3 个上市的口服多发性硬化症药物。投资者已将该药视为该类药物中最好的产品。

在糖尿病领域中,一种新型的通过肾脏起作用的药物潜力巨大。强生的 canagliflozin 近日获得了 FDA 专家顾问小组的认可,并建议批准该产品。

同时,诺和诺德也期望其超长效胰岛素 Tresiba 能继续保持在糖尿病治疗领域的领先地位。如果诺和诺德能证明其产品利拉鲁肽在减肥方面的安全性和有效性,那么该公司在减肥药市场也有很大的机遇。

在肿瘤药物研发领域,主要看好的产品集中在礼来的 ramucirumab。该产品可能申报用于胃癌的治疗,同时该产品在乳腺癌方面还有更大的商业潜能。虽然礼来公司年销售额大约在 50 亿美元抗抑郁药欣百达 2012 年 12 月专利到期,但礼来现有 13 个处于 III 期临床研究阶段的药物,是该公司有史以来在研产品最多的一次。

罗氏公司的乳腺癌治疗新药 T-DM1 有望在 2013 年获得批准。此外,该公司也可能在神经系统研发领域有所斩获,其试验药物 bitopertin 的关键临床研究数据将在 2013 年完成,该产品是一种精神分裂症药物,分析人士估计该产品上市后年销售额有望达到 30 多亿美元。

葛兰素史克公司 2013 年有 6 个品种要上报审批,包括肺病药物、肿瘤药物和艾滋病药物,同时在心血管疾病和肿瘤方面的两个高风险、高回报试验药物的 III 期临床研究将在 2013 年完成。其中, Darapladib 是一种通过不同于他汀类药物作用机制治疗动脉血管阻塞的试验药物,该产品可能成为年销售额 10 亿美元的产品。而 MAGE-A3 同样可能会成为治疗肺癌和黑素瘤具有开创性的产品。

(丁香园,本刊有删改)