

# 基于微量筛选模型的 48 种中草药提取物 乙酰胆碱酯酶抑制活性筛选及评价

周思多<sup>1,2</sup>, 王 晓<sup>2</sup>, 冯金红<sup>2</sup>, 耿岩玲<sup>2</sup>, 赵恒强<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>山东农业大学食品科学与工程学院, 泰安 271018; <sup>2</sup>山东省科学院中药过程控制研究中心  
山东省大型精密分析仪器应用技术重点实验室 山东省分析测试中心, 济南 250014

**摘要:** 采用微量筛选模型考察 48 种中药提取物的乙酰胆碱酯酶抑制活性。采用不同极性溶剂对中药材进行提取, 采用微量筛选模型对不同浓度提取物的乙酰胆碱酯酶抑制活性进行考察, 并采用 Origin8.0 计算其 IC<sub>50</sub> 值。结果表明, 几种中药材的不同极性溶剂(水、80% 乙醇、乙酸乙酯、石油醚)提取物有不同程度的乙酰胆碱酯酶抑制活性。其中黄柏、元胡的 80% 乙醇提取物, 丹参的乙酸乙酯提取物的抑制率较高。当上述提取物在实验体系中的终浓度为 76.92 mg/L 时, 抑制率分别为 66.72 ± 0.02%、52.67 ± 0.04%、46.84 ± 0.03%, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 295.12、229.09、1202.26 mg/L。本研究结果为从中草药中快速筛选乙酰胆碱酯酶抑制剂提供了方法和数据支持。

**关键词:** 中药; 乙酰胆碱酯酶; 微量筛选模型

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.02.026

## Screening and Evaluation of Acetylcholinesterase Inhibitory Activity Based on Microscale Screening Model of 48 Traditional Chinese Medicines

ZHOU Si-duo<sup>1,2</sup>, WANG Xiao<sup>2</sup>, FENG Jin-hong<sup>2</sup>, GENG Yan-ling<sup>2</sup>, ZHAO Heng-qiang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Shandong Academy of Sciences, Tai' an 271018, China; <sup>2</sup>Process Control Research Center of Traditional Chinese Medicine of Shandong Academy of Sciences, Shandong Analysis and Test Center, Key Laboratory for Applied Technology of Sophisticated Analytical Instruments of Shandong Province, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

**Abstract:** In this paper, the acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activities of 48 traditional Chinese medicine extracts were investigated by microscale screening model. Different polar solvents such as distilled water, 80% ethanol (v/v), ethyl acetate and petroleum ether, were used as extraction solvents, the AChE inhibitory activities of these extracts were investigated by microscale screening model, and the IC<sub>50</sub> values were evaluated by Origin 8.0. The results showed that some of the extracts derived from the 48 traditional Chinese medicines had AChE inhibitory activities, in which the inhibitory rates of the 80% ethanol extracts of Cortex Phellodendri, Rhizoma Corydalis, and ethyl acetate extract of *Salvia miltiorrhiza* were the highest. When the final concentration of the extracts in the experimental system were 76.92 mg/L, the inhibitory rates of the 3 extracts were 66.72 ± 0.02%, 52.67 ± 0.04% and 46.84 ± 0.03%, respectively. The IC<sub>50</sub> values were 295.12, 229.09 mg/L and 1202.26 mg/L, respectively. This study provided method and data support for rapid screening of AChE inhibitors from traditional Chinese medicines.

**Key words:** traditional Chinese medicine; acetylcholinesterase; microscale screening model

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's Disease, AD), 又称早老性痴呆症, 是发生于老年和老年前期以进行性神经退化为特征的大脑退行性病变<sup>[1]</sup>。随着世

界老龄人口的不断增加, AD 病发病率在国内外呈不断上升的趋势, 成为威胁老年人生命健康的主要疾病之一。目前, 多方面的研究表明, AD 的病理与患者神经间隙中乙酰胆碱酯酶活性过高具有重要关系<sup>[2,3]</sup>。因此, 乙酰胆碱酯酶抑制剂 (Acetylcholinesterase Inhibitor, AChEI) 药物是目前研究最多、最为活跃的抗老年性痴呆症药物。

收稿日期: 2014-07-28 接受日期: 2014-12-11

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2013HL029); 山东省大型分析仪器升级改造项目 (2012SJGZ01); 山东省科学院科技发展基金 (2012015)

\* 通讯作者 Tel: 86-531-82605319; E-mail: hqzhao2007@163.com

我国中药材资源极其丰富,中药治疗老年痴呆历史悠久,有丰富的理论基础和实践经验。从中药千层塔中发现的石杉碱甲<sup>[4]</sup>和黄皮酰胺<sup>[5]</sup>,经药理研究表明对AD患者有显著的治疗作用。从中草药中寻找抗老年痴呆成分,为研制新型抗老年痴呆创新药物及开发中草药资源均具有重要意义。目前,已公开的AChE抑制剂的主流筛选方法均由Ellman法改进而来。这些方法以大鼠脑组织匀浆为酶源,且没有微量化<sup>[6-8]</sup>。孙黔云等<sup>[9]</sup>发展了乙酰胆碱酯酶抑制剂微量筛选模型,该方法具有高效、快速等优点,可以大大加快中药活性成分地发现进程。

本研究采用微量化AChE抑制剂筛选模型,对48种中草药的乙酰胆碱酯酶抑制活性进行大规模的系统筛选,为寻找来自中草药的乙酰胆碱酯酶抑制剂提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

电鳗AChE购自Sigma公司;碘化硫代乙酰胆碱(Acetylthiocholine iodide, AChI)购自Fluka公司;5,5-二硫双硝基苯甲酸(Dithiobisnitrobenzoic acid, DTNB)购自Sigma公司;毒扁豆碱(Eserine)购自Sigma公司;其它试剂均为进口或国产分析纯;实验用水为Milli-Q超纯水(18.2 M $\Omega$ )。本实验所用的中草药样品购于济南市建联大药店,由山东省分析测试中心王晓研究员鉴定。

### 1.2 仪器与设备

Tecan Infinite M200型多功能酶标仪(瑞士TECAN集团公司);MICROTEST™ 96孔酶标板(美国BD公司);KQ-400KDE型高功率数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司);R201型旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);FA1104型电子天平(上海精天电子仪器厂);Milli-Q(18.2 M $\Omega$ )超纯水处理系统(美国Millipore公司)。

### 1.3 样品溶液的制备

准确称取样品1.0 g,置于100 mL具塞三角烧瓶中,加入50 mL(水、80%乙醇、乙酸乙酯、石油醚)提取溶剂,于超声提取器中提取30 min,重复提取一次过滤,滤液合并,转入100 mL旋蒸瓶中旋转蒸发至干,称重。使用时依次用50%乙醇溶解并分别稀释至50 mg/L和1000 mg/L,备用。

### 1.4 溶液的配制

乙酰胆碱酯酶(AChE):准确称取一定量电鳗

AChE(2.32 mg,500 U),用50 mmol/L,pH = 7.4磷酸盐缓冲液稀释至1.0 U/mL。

磷酸盐缓冲液(PBS)(50 mmol/L,pH = 7.4):用100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,按照体积比V<sub>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></sub>:V<sub>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></sub> = 77.4 :22.6配制。

显色剂(2.5 mmol/L,DTNB溶液):准确称取一定量DTNB,用50 mmol/L,pH = 7.4磷酸盐缓冲液稀释到一定浓度。

底物(10 mmol/L,AChI溶液):准确称取一定量AChI,用50 mmol/L,pH = 7.4磷酸盐缓冲液稀释至一定浓度。

终止剂(1% 十二烷基硫酸钠(SDS)):准确称取一定量SDS,用磷酸盐缓冲液稀释至一定浓度。

阳性对照品:毒扁豆碱(Eserine)(7.69 × 10<sup>-2</sup> mg/L,3.85 mg/L),用50 mmol/L,pH = 7.4磷酸盐缓冲液配制。

### 1.5 筛选模型

#### 1.5.1 实验原理

碘化硫代乙酰胆碱(AChI)在乙酰胆碱酯酶(AChE)作用下分解,生成硫代胆碱(Thiocholine),硫代胆碱与显色剂DTNB迅速作用,生成在405 nm处有光吸收的黄色物质。

#### 1.5.2 实验方法

实验采用改良的Ellman方法进行<sup>[10]</sup>。首先,取溶于50%乙醇的样品溶液20  $\mu$ L,依次加入80  $\mu$ L PBS、40  $\mu$ L 2.5 mmol/L的DTNB、20  $\mu$ L酶液(1.0 U/mL),振荡混匀,37  $^{\circ}$ C预孵10 min,然后加入40  $\mu$ L 10 mmol/L的底物,37  $^{\circ}$ C反应10 min,加入60  $\mu$ L 1%的SDS终止反应,用酶标仪测定405 nm吸收值,记为A<sub>样品</sub>。

### 1.6 中草药活性成分的筛选

方法如1.5.2所述:取20  $\mu$ L溶于50%乙醇的样品溶液,依次加入各种反应试剂,测其A<sub>405</sub>,记为A<sub>样品</sub>;同时每批样品都做溶剂对照,即用50%乙醇代替样品的乙醇溶液,其吸光度记为A<sub>对照</sub>;再做空白对照,即用40  $\mu$ L PBS代替底物AChI,记为A<sub>空白</sub>。在405 nm下测量吸光值并根据下式计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = [A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})] / A_{\text{对照}} \times 100$$

式中,A<sub>对照</sub>为用50%乙醇溶液代替样品溶液时的吸光值;A<sub>样品</sub>为添加样品溶液时的吸光值;A<sub>空白</sub>为添加样品溶液但没有添加底物AChI(用40  $\mu$ L PBS代替底物AChI)时的吸光值。所有实验重复三次并计算平均值和标准偏差,阳性对照为毒扁豆碱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 中药提取物的 AChE 抑制活性

按照 1.3 样品溶液的制备方法提取制备中草药样品,采用改良的基于 Ellman 法的微量筛选模型,按照 1.5 中草药粗提物的乙酰胆碱酯酶抑制活性评

价实验所述条件进行。根据测得各对照品、样品、样品空白的吸光度,按照 1.6 所述抑制率计算公式进行计算,得到 48 种中草药不同极性溶剂提取物在实验体系中高、低两种终浓度(76.92, 3.85 mg/L)的乙酰胆碱酯酶抑制活性,结果见表 1。

表 1 中药提取物的 AChE 抑制活性

Table 1 AChE inhibitory activity of different traditional Chinese medicine extracts

序号 No.	药材名称 Name	抑制率 Inhibitory rate (%)							
		水(mg/L)		80% 乙醇(mg/L)		乙酸乙酯(mg/L)		石油醚(mg/L)	
		76.92	3.85	76.92	3.85	76.92	3.85	76.92	3.85
1	柴胡	4.36 ± 0.30	3.61 ± 0.18	3.72 ± 0.28	2.97 ± 0.32	13.86 ± 0.11	2.70 ± 0.19	2.59 ± 0.67	3.35 ± 0.34
2	泽兰	4.34 ± 0.38	2.75 ± 0.52	3.76 ± 0.47	2.47 ± 0.28	3.81 ± 0.29	1.93 ± 0.38	4.93 ± 0.20	4.74 ± 0.06
3	远志	3.78 ± 0.39	3.14 ± 0.23	3.14 ± 0.40	2.32 ± 0.57	3.33 ± 0.41	1.68 ± 0.48	3.39 ± 0.56	3.27 ± 0.43
4	三七	4.36 ± 0.51	3.76 ± 0.31	6.66 ± 0.17	4.65 ± 0.53	3.60 ± 0.49	2.50 ± 0.73	3.92 ± 0.37	3.51 ± 0.46
5	石菖蒲	2.30 ± 0.74	1.93 ± 0.65	2.54 ± 0.69	1.95 ± 0.34	3.28 ± 0.31	1.52 ± 0.51	4.10 ± 0.20	4.14 ± 0.09
6	黄芩	5.21 ± 0.23	9.81 ± 0.37	4.47 ± 0.26	2.25 ± 0.49	6.35 ± 0.21	1.90 ± 0.29	3.80 ± 0.45	2.85 ± 0.50
7	淫羊藿	2.07 ± 0.90	1.83 ± 0.79	3.72 ± 0.41	1.66 ± 0.42	4.60 ± 0.25	1.24 ± 0.58	5.50 ± 0.12	3.76 ± 0.10
8	当归	4.52 ± 0.23	4.36 ± 0.05	3.74 ± 0.22	3.19 ± 0.55	4.12 ± 0.40	1.88 ± 0.30	4.94 ± 0.46	3.96 ± 0.31
9	白芍	3.72 ± 0.59	3.01 ± 0.26	4.08 ± 0.50	4.69 ± 0.19	5.42 ± 0.23	2.61 ± 0.24	6.46 ± 0.14	5.50 ± 0.04
10	丹参	4.84 ± 0.29	4.25 ± 0.06	13.37 ± 0.09	3.28 ± 0.26	46.84 ± 0.03	4.51 ± 0.45	46.28 ± 0.06	5.23 ± 0.38
11	川芎	3.83 ± 0.49	2.93 ± 0.45	3.06 ± 0.70	2.45 ± 0.47	4.34 ± 0.32	1.84 ± 0.41	6.38 ± 0.10	5.02 ± 0.04
12	钩藤	4.58 ± 0.24	3.00 ± 0.34	5.26 ± 0.26	2.98 ± 0.50	6.67 ± 0.15	2.30 ± 0.39	6.89 ± 0.13	5.15 ± 0.04
13	人参	4.64 ± 0.33	4.03 ± 0.07	3.40 ± 0.42	3.43 ± 0.31	4.79 ± 0.35	3.13 ± 0.28	4.06 ± 0.37	3.90 ± 0.33
14	天麻	3.37 ± 0.37	3.40 ± 0.31	3.10 ± 0.45	3.12 ± 0.35	4.28 ± 0.28	2.78 ± 0.32	5.28 ± 0.17	5.52 ± 0.04
15	黄柏	42.08 ± 0.02	3.08 ± 0.13	66.72 ± 0.02	5.01 ± 0.29	3.01 ± 0.45	1.74 ± 0.31	2.88 ± 0.67	2.52 ± 0.84
16	栀子	5.42 ± 0.24	3.39 ± 0.18	7.05 ± 0.20	2.28 ± 0.45	3.95 ± 0.30	1.65 ± 0.28	3.25 ± 0.53	3.24 ± 0.38
17	山药	2.73 ± 0.61	2.32 ± 0.58	3.22 ± 0.52	2.46 ± 0.15	4.93 ± 0.28	1.51 ± 0.00	5.19 ± 0.14	4.05 ± 0.09
18	白术	4.24 ± 0.37	3.65 ± 0.18	3.08 ± 0.56	2.75 ± 0.42	3.70 ± 0.48	2.59 ± 0.67	3.68 ± 0.51	3.52 ± 0.33
19	泽泻	2.99 ± 0.51	2.67 ± 0.41	2.82 ± 0.46	2.57 ± 0.56	3.97 ± 0.33	2.20 ± 0.40	5.24 ± 0.19	5.32 ± 0.08
20	白术	4.24 ± 0.37	3.65 ± 0.18	3.08 ± 0.56	2.75 ± 0.42	3.70 ± 0.48	2.59 ± 0.27	3.68 ± 0.51	3.52 ± 0.33
21	泽泻	2.99 ± 0.51	2.67 ± 0.41	2.82 ± 0.46	2.57 ± 0.56	3.97 ± 0.33	2.20 ± 0.40	5.24 ± 0.19	5.32 ± 0.08
22	西洋参	3.92 ± 0.34	3.42 ± 0.19	3.46 ± 0.16	2.85 ± 0.42	3.08 ± 0.29	1.35 ± 0.43	5.10 ± 0.16	3.45 ± 0.40
23	水蛭	6.40 ± 0.21	2.29 ± 0.84	3.36 ± 0.54	2.67 ± 0.31	4.10 ± 0.32	1.86 ± 0.29	5.00 ± 0.16	4.55 ± 0.11
24	红景天	4.03 ± 0.42	3.47 ± 0.13	21.94 ± 0.23	2.86 ± 0.32	3.68 ± 0.47	3.12 ± 0.13	4.07 ± 0.54	3.73 ± 0.34
25	酸枣仁	3.31 ± 0.26	3.91 ± 0.37	3.43 ± 0.43	2.81 ± 0.62	7.21 ± 0.33	2.84 ± 0.29	5.47 ± 0.17	4.67 ± 0.08
26	赤芍	4.06 ± 0.42	3.80 ± 0.26	6.25 ± 0.16	3.76 ± 0.67	4.69 ± 0.15	4.21 ± 0.30	5.43 ± 0.18	4.86 ± 0.14
27	女贞子	4.55 ± 0.15	4.18 ± 0.21	4.85 ± 0.21	5.07 ± 0.42	9.91 ± 0.45	8.45 ± 0.09	5.26 ± 0.14	5.24 ± 0.05
28	蛇床子	5.02 ± 0.25	4.08 ± 0.30	4.13 ± 0.31	2.80 ± 0.39	4.60 ± 0.24	2.14 ± 0.28	5.83 ± 0.27	4.29 ± 0.32
29	黄芪	3.92 ± 0.29	3.42 ± 0.43	3.27 ± 0.51	4.73 ± 0.28	4.64 ± 0.20	2.69 ± 0.25	5.90 ± 0.10	7.00 ± 0.34
30	灵芝	4.57 ± 0.28	3.80 ± 0.17	4.51 ± 0.25	3.39 ± 0.33	2.98 ± 0.38	2.28 ± 0.26	3.25 ± 0.31	3.97 ± 0.29
31	茯苓	2.78 ± 0.47	3.60 ± 0.52	3.00 ± 0.50	3.15 ± 0.22	5.73 ± 0.11	2.46 ± 0.24	5.63 ± 0.08	4.87 ± 0.00

32	刺五加	7.52 ± 0.27	5.89 ± 0.35	5.26 ± 0.16	4.07 ± 0.16	6.01 ± 0.29	3.35 ± 0.17	6.91 ± 0.64	6.57 ± 0.73
33	绞股蓝	6.99 ± 0.17	6.09 ± 0.45	13.31 ± 0.10	5.16 ± 0.50	7.26 ± 0.15	3.03 ± 0.37	6.67 ± 0.39	6.57 ± 0.28
34	元胡	16.88 ± 0.15	4.76 ± 0.06	52.67 ± 0.04	15.25 ± 0.04	7.26 ± 0.11	2.33 ± 0.27	3.27 ± 0.48	3.65 ± 0.37
35	首乌	4.10 ± 0.33	3.58 ± 0.20	4.94 ± 0.33	3.88 ± 0.24	5.20 ± 0.22	3.08 ± 0.22	5.62 ± 0.06	6.32 ± 0.22
36	葛根	4.63 ± 0.34	3.77 ± 0.23	3.67 ± 0.35	3.41 ± 0.42	5.01 ± 0.28	3.42 ± 0.43	4.94 ± 0.27	4.32 ± 0.36
37	麦门冬	3.96 ± 0.29	3.21 ± 0.20	3.27 ± 0.42	3.41 ± 0.72	5.00 ± 0.18	3.56 ± 0.60	5.13 ± 0.18	5.43 ± 0.03
38	鹿茸	4.33 ± 0.38	3.69 ± 0.21	3.99 ± 0.32	2.88 ± 0.35	4.14 ± 0.37	2.49 ± 0.19	3.42 ± 0.75	4.05 ± 0.23
39	肉苁蓉	3.94 ± 0.39	2.65 ± 0.28	5.10 ± 0.24	3.41 ± 0.21	3.98 ± 0.35	2.13 ± 0.16	4.94 ± 0.18	5.17 ± 0.07
40	黄精	5.29 ± 0.19	3.72 ± 0.15	3.92 ± 0.30	2.96 ± 0.32	3.40 ± 0.37	2.32 ± 0.33	26.62 ± 0.28	3.46 ± 0.33
41	柏子仁	-6.48 ± -0.22	-5.69 ± -0.20	-4.07 ± -0.80	-7.62 ± -0.16	-6.58 ± -0.46	-8.63 ± -0.10	-6.69 ± -0.61	-6.22 ± -0.38
42	五味子	-0.81 ± -6.95	-7.48 ± -0.11	-3.01 ± -1.71	-7.92 ± -0.20	-2.51 ± -1.24	1.46 ± 12.08	3.26 ± 0.43	25.45 ± 1.96
43	知母	5.37 ± 0.24	3.97 ± 0.16	6.22 ± 0.18	3.29 ± 0.30	4.09 ± 0.31	2.75 ± 0.18	3.40 ± 0.57	4.07 ± 0.28
44	红枣	4.02 ± 0.23	3.17 ± 0.40	3.96 ± 0.47	3.57 ± 0.22	4.87 ± 0.34	3.33 ± 0.21	6.06 ± 0.18	5.04 ± 0.06
45	枸杞	3.09 ± 0.51	2.71 ± 0.13	1.82 ± 0.82	1.71 ± 0.63	3.70 ± 0.40	1.68 ± 0.56	3.78 ± 0.37	2.88 ± 0.42
46	熟地	4.62 ± 0.11	2.39 ± 0.33	3.48 ± 0.22	1.79 ± 0.56	5.11 ± 0.22	1.73 ± 0.46	6.46 ± 0.06	6.26 ± 0.04
47	党参	4.67 ± 0.31	4.11 ± 0.12	3.84 ± 0.29	3.22 ± 0.31	3.91 ± 0.36	3.05 ± 0.08	4.53 ± 0.25	4.19 ± 0.18
48	土鳖虫	4.51 ± 0.37	4.80 ± 0.11	3.95 ± 0.46	3.69 ± 0.26	6.03 ± 0.06	3.36 ± 0.25	13.96 ± 0.04	6.63 ± 0.09

注:毒扁豆碱在实验体系中终浓度为  $7.69 \times 10^{-2}$  mg/L、3.85 mg/L 时的抑制率分别为  $57.22 \pm 0.04\%$ 、 $88.85 \pm 0.01\%$ 。

Note: when the final concentrations of eserine in the experimental system were  $7.69 \times 10^{-2}$  mg/L and 3.85 mg/L, the inhibitory rates were  $57.22 \pm 0.04\%$  and  $88.85 \pm 0.01\%$ , respectively.

从表 1 中可以看出,当提取物在实验体系中终浓度为 76.92 mg/L 时,黄柏 80% 乙醇提取物、元胡 80% 乙醇提取物、丹参乙酸乙酯提取物 AChE 抑制率较高,其值均在 45% 以上。其中,黄柏 80% 乙醇提取物抑制率最高,其值为  $66.72 \pm 0.02\%$ 。而且,这三种中药提取物的抑制率与终浓度为  $7.69 \times 10^{-2}$  mg/L 毒扁豆碱的乙酰胆碱酯酶抑制率 ( $57.22 \pm 0.04\%$ ) 较为接近。另外,部分药材不同极性溶剂提取物对 AChE 抑制率为负值。如:当提取物在实验体系中终浓度为 76.92 mg/L 时,柏子仁乙酸乙酯提取物的 AChE 抑制率为  $-8.63 \pm -0.10\%$ 、五味子 80% 乙醇提取物的 AChE 抑制率为  $-7.92 \pm -0.20\%$ 。这在蕨类植物和海藻提取物的乙酰胆碱酯酶抑制活性研究中有类似现象<sup>[11,12]</sup>。

## 2.2 提取溶剂的影响

本研究选择 4 种不同极性提取溶剂(水、80% 乙醇、乙酸乙酯、石油醚)提取制备中草药样品。根据表 1 数据,对比提取溶剂与提取物抑制率的关系,可以看出有以下规律特征:

首先,少数中药材不同极性溶剂提取物具有一定的 AChE 抑制活性。如:黄柏水提取物的抑制率为  $42.08 \pm 0.02\%$  (76.92 mg/L)、80% 乙醇提取物的抑制率为  $66.72 \pm 0.02\%$  (76.92 mg/L);丹参乙

酸乙酯提取物的抑制率为  $46.84 \pm 0.03\%$  (76.92 mg/L)、石油醚提取物的抑制率为  $46.28 \pm 0.06\%$  (76.92 mg/L)。

其次,同一药材的不同极性溶剂提取物的 AChE 抑制活性可能相差较大。如:当提取物在实验体系中终浓度为 76.92 mg/L 时,元胡 80% 乙醇提取物抑制率为  $52.67 \pm 0.04\%$ ,而同浓度下其石油醚提取物抑制率仅为  $3.27 \pm 0.48\%$ 。这可能与不同极性提取溶剂所提取的化合物种类及含量均有不同有关。

第三,几种不同品种中药材的同一极性溶剂提取物均具有较好的 AChE 抑制活性。这可能是因这几类中药材的同一极性溶剂提取物所含化学成分结构类型相似所致。如:当提取物在实验体系中终浓度为 76.92 mg/L 时,黄柏、元胡 80% 乙醇提取物均有较强的 AChE 抑制活性,其所含化学成分主要是生物碱类化合物<sup>[13,14]</sup>。

参考相关文献可知,已发现的具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的化合物种类较多、极性差异大<sup>[13,14]</sup>。这与本研究的结果一致,说明中草药中不同极性和结构类型的化合物均有可能具有乙酰胆碱酯酶抑制活性,选择适当极性的提取溶剂对中草药样品进行有效提取,是准确快速的发现 AChEI 的前提和保障。

### 2.3 提取物浓度的影响

中草药提取物浓度对酶的抑制活性也有一定影响。提取物浓度太高,基质对酶活性的影响会增强;提取物浓度太低,其中所含活性成分含量相应减少,又会造成对酶的抑制效果不明显,产生假阴性结果。本研究选取中草药粗提物在实验体系中高、低两种终浓度(76.92 mg/L 和 3.85 mg/L)用于 AChE 抑制活性研究。

从表 1 可以看出,当中药提取物在实验体系中终浓度为 3.85 mg/L 时,多数中药提取物的 AChE 抑制率较低,其值一般在 10% 以下。

当提取物在实验体系中终浓度为 76.92 mg/L 时,具有乙酰胆碱酯酶抑制性的中药提取物其大多数 AChE 抑制率较高,如:黄柏水提取物的 AChE 抑制率从  $3.08 \pm 0.13\%$  (3.85 mg/L) 变为  $42.08 \pm$

$0.02\%$  (76.92 mg/L);少数中药提取物对 AChE 抑制活性表现出减弱趋势,如:五味子石油醚提取物 AChE 抑制率从终浓度 3.85 mg/L 时的  $25.45 \pm 1.96\%$  变为终浓度 76.92 mg/L 时的  $3.26 \pm 0.43\%$ 。

### 2.4 中药提取物 IC<sub>50</sub> 值的测定

选取对乙酰胆碱酯酶抑制活性明显的黄柏 80% 乙醇提取物,元胡 80% 乙醇提取物,丹参乙酸乙酯提取物,精密吸取上述提取物储备液,用 50% 乙醇稀释成八个浓度梯度(50 ~ 2000 mg/L),采用改良的 Ellman 法微量筛选模型,按照 1.5 中草药粗提物的乙酰胆碱酯酶抑制活性评价实验所述条件进行。根据测得各对照品、样品、样品空白的吸光度,按照 1.6 所述抑制率计算公式进行计算,得到上述中草药不同溶剂提取物的乙酰胆碱酯酶抑制活性,计算 IC<sub>50</sub> (mg/L) 值,结果见表 2。

表 2 三种中草药提取物的乙酰胆碱酯酶抑制作用 ( $n=3$ )

Table 2 Acetylcholinesterase inhibitory activities of 3 TCM extracts ( $n=3$ )

提取物 Extracts	标准曲线 Standard curve	IC <sub>50</sub> (mg/L)	相关系数 r <sup>2</sup> Correlation coefficient r <sup>2</sup>
黄柏 80% 乙醇提取物 80% Ethanol extract of Cortex Phellodendri	$y = 47.56x - 67.536$	295.12	0.9830
元胡 80% 乙醇提取物 80% Ethanol extract of Rhizoma Corydalis	$y = 36.749x - 38.974$	229.09	0.9948
丹参乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extract of <i>S. miltiorrhiza</i>	$y = 53.178x - 113.94$	1202.26	0.9913
毒扁豆碱 Eserine	$y = 58.388x + 89.335$	0.21	0.9996

由表 2 可知,黄柏 80% 乙醇提取物,元胡 80% 乙醇提取物,丹参乙酸乙酯提取物的 IC<sub>50</sub> 值分别为 295.12、229.09、1202.26 mg/L。其中,元胡 80% 乙醇提取物的 IC<sub>50</sub> 值最低,黄柏 80% 乙醇提取物的 IC<sub>50</sub> 值次之,丹参乙酸乙酯提取物的 IC<sub>50</sub> 值最大。三种中草药提取物对乙酰胆碱酯酶活性有一定抑制作用,但与阳性对照品毒扁豆碱 IC<sub>50</sub> 值有一定差距,这可能与提取物中具有 AChE 抑制活性的有效成分含量较低或者提取物的基质成分复杂有关。活性成分追踪筛选和分离纯化工作有待于进一步进行。

### 3 结论

采用基于酶标仪的微量筛选模型对 48 种中药不同极性溶剂提取物的乙酰胆碱酯酶抑制活性进行考察。结果表明,当提取物在实验体系中终浓度为 76.92 mg/L 时,黄柏 80% 乙醇提取物、元胡 80% 乙醇提取物和丹参乙酸乙酯提取物的 AChE 抑制活性

较高,其 IC<sub>50</sub> 值分别为 295.12、229.09、1202.26 mg/L。另外,提取物浓度对乙酰胆碱酯酶抑制活性有一定影响。本研究结果为从中草药中快速筛选潜在的乙酰胆碱酯酶抑制剂提供了方法和数据支持。

### 参考文献

- Zhao L (赵丽), Xu SP (徐淑萍), Li ZY (李宗阳), *et al.* Study on the antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of myricitrin and its structure-similar compounds. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2012, 01: 56-58, 62.
- Hu HF (胡海峰), Zhu BQ (朱宝泉), Gong BY (龚炳永). The research progress of acetylcholinesterase and its inhibitors. *World Notes on Antibiotics* (国外医药, 抗生素分册), 1999, 02: 81-87.
- Li Q (李前), Zhu ZX (朱振霞). The research progress for the relationship between acetylcholinesterase and senile dementia. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2002, 04: 325-326.