

· 综述 ·

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

杨丽, 赵伯原, 李春龙, 王可心, 张婷, 王尚, 刘荣华*, 何军伟*
(江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 药学院,
江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新中心, 南昌 330004)

[摘要] 药用植物历史悠久, 为人类的防病和治病发挥了重要作用, 但其生物活性成分与特定的生物靶点之间的相互作用仍然不清楚。传统的化学成分分离结合活性评价模式费时费力, 且不能够真实体现活性物质天然构象和受体之间的相互作用, 已不能满足现代药物研发的迫切需要。亲和超滤-液质联用技术可以弥补传统活性物质发现的诸多缺点, 是一种新的快速药物筛选分析方法, 可用于天然产物中活性小分子化合物的靶向筛选; 然而, 该技术在筛选天然活性成分时也存在一定的缺陷。笔者拟对亲和超滤-液质联用技术在药用植物活性成分筛选中的原理、特点及应用进行系统的文献综述和分析, 并对其开发前景进行了展望, 为快速靶向筛选药用植物中活性成分提供一定的科学依据。

[关键词] 亲和超滤; 液质联用技术; 药用植物; 活性成分; 靶向; 中药

[中图分类号] R22; G353.11; R28; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0196-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202348

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200909.1429.001.html>

[网络出版日期] 2020-9-10 14:19

Research Progress on Screening Active Components from Medicinal Plants Based on Affinity Ultrafiltration Coupled with LC-MS Technology

YANG Li, ZHAO Bo-yuan, LI Chun-long, WANG Ke-xin, ZHANG Ting,
WANG Shang, LIU Rong-hua*, HE Jun-wei*

(*Jiangxi Synergistic Innovation Center of Modern Technology and Industrial Development of Traditional Ethnic Medicines, School of Pharmacy, Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China*)

[Abstract] Medicinal plants have a long history and play an important role in the prevention and treatment of human diseases. However, the interaction between bioactive components and specific biological targets in many medicinal plants is still unclear. Conventional separation and activity evaluation model of chemical constituents from natural products was time-consuming and laborious, and cannot truly reflect the interaction between the natural conformation of compounds and receptors, so these methods could not meet the urgent needs of modern drug development. Affinity ultrafiltration coupled with liquid chromatography-mass spectrometry (AUF-LC/MS) is a rapid, efficient and precise method focused on identification of bio-

[收稿日期] 20200731(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760705); 江西省自然科学基金项目(20204BCJL23047, 20192BBHL80008); 2020年大学生创新创业训练计划项目(s202010412063, s202010412068, 202010412047, 202010412052)

[第一作者] 杨丽, 在读博士, 讲师, 从事中药化学与质量评价研究, Tel: 0791-87118658, E-mail: yangli07971@163.com

[通信作者] * 何军伟, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 0791-87118873, E-mail: jxtcm_hjw@163.com;

* 刘荣华, 博士, 教授, 从事中药质量评价和中药药效物质基础研究, Tel: 0791-87118658, E-mail: rhliu@163.com

components from natural products, it can make up for many shortcomings found in conventional discovery of bio-constituents. However, AUF-LC/MS technology also has some drawbacks in experiments. In this paper, the principle, characteristics and application of AUF-LC/MS in the screening of active ingredients from medicinal plants are systematically reviewed, and its development prospect is prospected, so as to provide scientific basis for rapid and targeted screening of active components from medicinal plants.

[Key words] affinity ultrafiltration; liquid chromatography-mass spectrometry; medicinal plants; active components; targeted; traditional Chinese medicine (TCM)

药用植物是人类数千年来筛选出来的用于防病、治病的植物,其蕴含了大量结构复杂且生物活性多样的化学成分。此外,药用植物的自然资源生物多样性丰富、分布广泛、药用历史悠久,已成为药物发现和开发的重要来源^[1-3]。如地高辛、吗啡等许多古老的药物至今仍在世界范围内使用,并继续在为人类健康发挥重要作用^[4]。据统计,从1981年1月到2019年9月,在全球获批上市的1 881种药物中,约46%直接或间接来源于天然药用植物^[5-6]。然而,由于药用植物中的化学成分复杂、组分含量差异大,在生物活性成分的筛选中一直存在着一些棘手的问题,如非特异性吸附不明显、假阳性结果干扰明显、微量活性组分不易检测等^[7-9]。此外,常规的化学成分分离结合活性评价或者活性追踪分离单体化合物的方法,费时费力且不能够真实体现活性物质天然构象和受体的相互结合作用。因此,这些障碍对药用植物中活性成分的和进一步揭示其可能的作用机制提出了严峻挑战。

健康的生命过程与许多固有的生物分子之间复杂而巧妙的相互作用密切相关。一方面,生物大分子通过调节机体的信号转导和维持正常的代谢,在正常生命活动中发挥着至关重要的作用。另一方面,大多数药物只能通过与相应的大分子(如酶和受体)特定的结合方式才能发挥药效。利用这些靶点,可从天然产物尤其是传统药用植物中快速、高效地筛选出针对这些酶或受体的生物活性成分,这不仅可为新药发现提供新的思路和方法,还可以有助于揭示生物活性的作用机制^[10]。药物分子与靶点结合的技术在高通量筛选实验室获得广泛应用,加快了从传统药用植物中发现活性成分的进程^[11]。

亲和超滤-液质联用法(AUF-LC/MS)是1997年发明的一种新的快速药物筛选的分析方法,可用于组合化学库及天然产物中生物活性小分子化合物的快速发现。该技术将亲和捕获与超滤及高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)相结合,同时实现了复

杂混合物中生物活性成分的高通量筛选和快速鉴定^[12]。简而言之,亲和超滤法首先将配体-酶复合物从游离组分中分离出来,然后通过HPLC-MS对复合物中释放的配体进行定性和定量分析。相较于传统的从药用植物中筛选活性成分的方法,AUF-LC/MS操作简单,极大地减少了筛选所需的时间、样品和昂贵试剂的消耗,更重要的是该技术实现了多种检测仪器的在线联用,且能够真实体现活性物质天然构象和受体的相互结合作用。1981年,超滤法首次用于测定血清蛋白结合率^[13]。1997年,亲和超滤和HPLC-MS相结合并被引入靶向药物发现领域^[14]。该技术以其灵敏度高、选择性强的特点,在小分子药物的发现中有着独特的应用,引起了药学界的广泛关注。因此,采用AUF-LC/MS靶向筛选药用植物中的活性小分子化合物是一种快速、简便、高效的方法,使追踪目标更为明确,克服了传统化学-活性筛选模式的诸多缺点。本文综述了AUF-LC/MS的基本原理、特点和面临的挑战,并对其在药用植物生物活性组分筛选中的应用和前景进行了展望,以期快速靶向筛选药用植物中的活性成分提供一定的科学依据。

1 概述

具有生物活性的天然产物快速筛选是新药研发的关键步骤。然而常规的化学成分分离结合活性评价或者活性追踪分离单体化合物的方法已不能满足现代药物研究的迫切需要^[15]。AUF-LC-MS可弥补传统活性物质发现的诸多缺点,是一种新的快速药物筛选分析方法,可用于药用植物中活性小分子化合物的快速、靶向筛选。

1.1 基本原理 根据配体与蛋白质受体的结合亲和性,亲和超滤主要分为离心超滤和脉冲超滤2种。在超滤筛选过程中,首先将来源药用植物中的提取物或部位与目标受体进行充分的结合,并采用适当孔径的超滤膜截留蛋白质-配体复合物进行过滤以去除未结合组分,其次使用特定的洗脱液将配体与受体进行分离,最后采用LC-MS进行化学结构的鉴

定,也可以采用对照品进行化学结构的确证。

根据相对分子质量的不同,上述2种方法均可用于生物大分子和小分子化合物的筛选及分离。目前,离心超滤是利用超滤膜的超低结合性和各向异性,采用超滤离心管进行离心洗脱,具有用量少、操作简单、时间短、重复性好等优点。而脉冲超滤由流动室、磁力搅拌器和超滤膜组成^[16],将供试品和靶蛋白加入流动腔后,施加一定的压力,从而将配体-受体复合物与非活性组分进行分离。虽然这2种技术都可以用于配体的亲和性选择和富集,但二者应用取决于器件本身。其中,脉冲超滤易于实现自动化,适合于高通量筛选,在描述配体-受体结合特性、药物代谢和产物测定方面更为有效^[17];而离心超滤通常用于活性小分子的筛选,操作简单、简便经济,已广泛应用于小分子活性成分的快速筛选。

质谱具有高灵敏度、高准确度和高分辨率的特点,现已成为生命科学、医学和化学领域最重要的分析工具之一。特别是软电离质谱的出现,如电喷雾电离质谱法(ESI-MS)和基质辅助激光解析电离质谱法(MALDI-MS),不仅增强了该方法的敏感性和特异性,而且能检测到药用植物中微量甚至痕量成分,已在药物发现、小分子组分与生物靶点蛋白相互作用等领域取得了显著的进展。近年来,越来越多的质谱仪从多个角度满足了在非常复杂的矩阵中进行某些成分分析和鉴定,如电喷雾离子源高分辨串联飞行时间质谱仪(ESI-Q/TOF-MS)^[18-19],基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)^[20],静电场轨道阱质谱仪(Orbitrap MS)^[21],傅立叶变换离子回旋共振质谱仪(FT-ICR-MS)^[22]等。

AUF-LC/MS结合了亲和超滤的优良筛选功能和MS的优良分析能力,可以同时筛选和鉴定与受体结合的小分子配体。其原理是在亲和靶标(相对分子质量>10 kDa的受体、酶等)与多组分的混合物混合孵育的过程中,与靶标具有一定亲和力的小分子化合物与其活性位点结合形成复合物,通过超滤的方法将复合物与未结合的小分子化合物分离,然后利用适当的方法(加入有机溶剂,改变pH等)将蛋白变性,从而使配体从复合物上解离下来,再利用HPLC-MS初步鉴定配体的化学结构,见图1。

1.2 特点和优势 目前,除AUF-LC/MS外,已有多种组合技术从复杂体系中筛选活性成分,但AUF-LC/MS不仅具有快速、高通量、高特异性等重要特

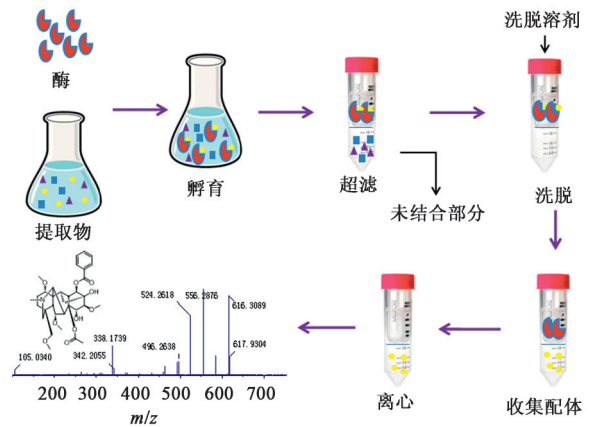


图1 亲和超滤-液质联用技术的工作原理示意

Fig. 1 Schematic diagram of working principle of affinity ultrafiltration coupled with liquid chromatography-mass spectrometry

性,同时样品用量少,并可以提供大量的谱学信息。因此,这些特点使其在药物小分子与生物靶点相互作用的研究中具有独特性,从而证明了其与其他分析方法相比具有一些不可比拟的优势。

首先,质谱具有高灵敏度和高选择性,非常适合于分析少量复杂的混合物,如组合化合物库和药用植物的提取物或部位。当亲和超滤技术与HPLC-MSⁿ联用时,质谱的高灵敏度可以弥补HPLC在检测样品含量极低的微小组分方面的局限性^[23]。此外,该方法中的蛋白质靶点即受体可以重复使用,这在特定靶点价格昂贵或不易获得时尤为重要^[24]。因此,AUF-LC/MS也可用于评估生物活性小分子与生物靶点之间的相互作用。

其次,传统的基于光学或放射性物质的色谱鉴别方法易受基体干扰,给天然产物中复杂组分的鉴别和分析带来了诸多困难。而AUF-LC/MS的筛选过程不受配体基质的影响。因此,这种独特的优势使得其特别适合于从复杂体系中筛选活性成分,尤其是传统药用植物^[25]。

再次,在AUF-LC/MS分析中,研究了药物小分子与生物靶点在溶液状态下的相互作用。因此,这种分析过程一方面可以保持蛋白质靶点的自然构象,从而最大限度地真实反映蛋白质靶点与药物小分子相互作用的真实条件。另一方面,也可以直接利用超滤膜的截留作用,在不进行预处理的情况下,实现与目标物结合的活性组分的选择,如固定化酶在线质谱、细胞膜色谱-质谱等^[26-27],AUF-LC/MS法能快速测定生物靶点与药物小分子的结合常数,同时获得药物小分子的活性信息。

最后,在AUF-LC/MS组合方法中,亲和超滤对复杂混合物中的小配体具有良好的特异性和筛选性能,且LC-MS在高效分离和结构鉴定方面具有强大的功能并能最大限度地减少基质的干扰。因此,AUF-LC/MS不仅可以用于快速筛选和鉴定与生物靶点结合的小分子药物,而且能够比较不同类型配体和受体之间的结合能力,进一步确定配体和受体结合常数的差异。近年来,该技术得到了快速的发展,成为新药研究领域非常重要和有效的筛选方法之一,并已广泛应用于天然产物尤其是传统药用植物中活性成分的快速靶向筛选。

1.3 主要影响因素 利用AUF-LC/MS技术从复杂基质中筛选活性成分时,为了获得理想的结果,在实验过程中需要考虑很多因素,如受体与配体的浓度、超滤膜的材质和大小、解离溶剂的种类和浓度。

1.3.1 受体和配体的浓度 受体和配体的浓度是一个非常重要的影响因素。在亲和超滤过程中,由于配体与靶蛋白的结合具有相对竞争性,如果配体的浓度远高于靶蛋白,可能会使某些活性成分难以融入靶蛋白,进而导致一定程度的假阴性结果;反之,可能会增加非特异性吸附,会增加假阳性的概率。平衡解离常数(KD)是用来评估配体和靶蛋白之间的相互作用,不同的组分有其各自的KD值。通常,受体浓度应近似等于最弱配体的KD值,而在超载配体的情况下,只有结合能力强的配体才能更好的通过竞争性结合位点与靶蛋白结合^[1]。因此,在实际试验过程中配体的浓度应等于或小于受体的浓度。

1.3.2 超滤膜 AUF-LC/MS利用超滤膜对配体-受体复合物和未结合组分进行分离,并对亲和配体与蛋白质靶点进行分离。因此,超滤膜的选择对试验结果有很大的影响。一般来说,超滤膜的选择主要涉及孔径和材质2个方面^[10]。通常,截留相对分子质量应小于目标蛋白相对分子质量的三分之一,如果滤膜孔径过大,容易造成漏筛;而滤膜直径过小,容易堵塞滤膜,降低超滤效率。例如,靶标相对分子质量为100 kDa,则可选择相对分子质量30 kDa的超滤管。为减少非特异性结合带来的干扰,应将不易与受体和潜在配体结合的材料作为首选。其中,聚乳酸等材料易产生蛋白质吸附,而聚氯乙烯、聚砜、聚醚酮、甲基纤维素等材料的非特异性结合较小,故常作为超滤膜材料。

1.3.3 解离溶剂 由于天然产物(包括传统药用植物)成分复杂,如何在尽可能少的非特异性结合的

情况下顺利分离出结合配体是影响筛选结果的另一重要因素。目前,目标酶的变性方法主要有2种,一种是在解离溶剂中加入酸,另一种是加入有机溶剂使酶变性^[7]。大多数情况下,可使用含酸有机溶剂代替纯有机溶剂,以减少配体与超滤膜的非特异性结合。例如,ZHOU等^[28]以pH 3.3的50%甲醇为分离溶剂,从玉竹中筛选 α -糖苷酶抑制剂。通过比较实验组和对照组的超滤色谱图,发现活性组分的峰面积存在显著差异,且非特异性吸附信号很低。当然,仅含有有机溶剂的解离液也被用于筛选。例如,JIAO等^[29]以90%甲醇为分离溶剂,从穿心莲中筛选环氧合酶-2(COX-2)抑制剂。因此,为了获得最佳的解离条件,必须对特定解离溶剂的选择进行优化。

1.3.4 其他 除上述干扰因素外,孵育时间和温度、离心速度和时间、缓冲液的pH等都会影响活性成分筛选的结果。此外,为了减少假阴性或假阳性结果,提高准确性,还需要设计适当的阴性或阳性对照实验。

2 AUF-LC/MS的应用

2.1 药用植物活性成分的高通量筛选 药用植物尤其是传统中药作为宝贵的自然资源,几千年来一直被广泛用于治疗各种疾病。近年来,随着“回归自然”热潮的兴起,利用药用植物的生物活性成分进行天然产物的研究已成为世界范围内的研究热点。药用植物中的化学成分具有含量低、结构复杂、多靶点等特点,其活性成分和作用机制很难阐释。AUF-LC/MS则能完全适应复杂天然产物中活性成分的筛选。

郭明全课题组利用AUF-LC/MS技术对药用植物中化学成分与生物靶蛋白的相互作用进行了系列研究^[30-33];首次利用AUF-LC/MS联合拓扑异构酶I(Toxo I),II和COX-2,研究重楼抗癌和抗炎的作用机制^[34]。其中,Toxo I和II属于核酶,能催化双链DNA的拓扑转化,在肿瘤细胞中高表达,是重要的抗癌靶点之一;而COX-2是一种引起炎症和疼痛的酶,也能抑制血管内皮生长因子(VEGF)的表达,从而抑制肿瘤血管生成,进而发挥抗肿瘤作用。结果表明重楼皂苷I不仅对上述3种酶具有较高的亲和力,而且还具有较强的抑制活性。因此,重楼皂苷I可作为重楼抗癌、抗炎作用的主要活性成分,COX-2和Toxo I可作为重楼的抗癌和抗炎靶点。说明利用AUF-LC/MS技术高效、多靶点、多组分的特点,可有效阐明重楼的潜在活性成分和可能

作用机制,为该药材的质量控制提供有效依据。此外,郭明全课题组还利用 AUF-LC/MS 建立了一种快速、高通量的方法,从莲子心提取物中发现了潜在的 COX-2 配体^[35]。筛选出 12 个与 COX-2 特异性结合的组分,进一步的构-效关系表明,黄酮类 O-糖苷与 COX-2 的结合亲和力与黄酮类 C-糖苷相当。此外,8 个具有较高富集因子(EF)的化合物具有较强的抗炎作用,进一步证实了 AUF-LC/MS 的可靠性。该研究首次采用基于 COX-2 的 AUF-LC/MS 对

莲子心的抗炎机制进行了系统研究,实现了快速发现莲子心中具有抗炎活性的黄酮类化合物。

迄今为止,多项研究采用 AUF-LC/MS 从药用植物提取物中筛选酶抑制剂,各种药用植物提取物中的多种潜在活性成分已通过该方法被筛选出来,笔者总结了 2005 年以来采用 AUF-LC/MS 从药用植物提取物中筛选酶抑制剂的成功研究实例,包括酪氨酸酶、黄嘌呤氧化酶和 α -葡萄糖苷酶等,具体情况见表 1。

表 1 AUF-LC/MS 从药用植物中筛选活性成分的研究汇总

Table 1 Summary of studies on screening active components from medicinal plants by AUF-LC/MS

靶蛋白	分析材料	潜在活性成分	分析方法	参考文献
α -葡萄糖苷酶	竹节参	三七皂苷 R ₁ , 人参皂苷 Rb ₁ , Rd 和千里光皂苷 IV a, IV 和 V	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS	[36]
	银杏	11 个黄酮类化合物	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[9]
	山竹	α -倒捻子素, 3-异倒捻子素, 8-desoxygartanin, mangostanol	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS	[37]
	锐刺山楂	牡荆素, 牡荆素-2"-O-葡萄糖苷, 牡荆素-2"-O-鼠李糖苷, 槲皮素-3-O-rha-(1-4)-glc-rha	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS	[38]
	虎杖	12 个化学成分	HPLC-ESI-ion trap MS	[39]
	大黄	7 个化学成分	HPLC-ESI-ion trap MS	[39]
	刺五加	5 个黄酮苷和 3 个二咖啡酰奎宁酸类化合物	RP-HPLC-DAD-ESI MS ⁿ	[40]
	降香	18 个化学成分	HPLC-DAD-ESI MS ⁿ	[41]
	银杏	槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS	[42]
	黄芪	毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷, 毛蕊异黄酮-7-O- β -D-6"-O-丙二酸, 芒柄花素-7-O- β -D-葡萄糖苷-6"-O-丙二酸, 鹰嘴豆芽素 A, 芒柄花苷, 芒柄花素	HPLC-DAD-ESI MS ⁿ	[43]
	黄芩	11 个化学成分	HPLC-PDA-ESI-MS ⁿ	[44]
	玉竹	4 个同异黄酮, 5 个苯乙基肉桂酸酯化合物	HPLC-DAD-Q-TOF MS	[45]
	黄连	黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱和巴马汀	HPLC-DAD-ESI MS ⁿ	[46]
	人参	人参皂苷 Rb ₃ , Rd, Rf, Rg ₃ , F ₂	HPLC-DAD-ESI MS ⁿ	[47]
	匙羹藤	9 个化学成分	HPLC-ESI-MS ⁿ	[32]
红车轴草	大豆苷元、染料木素、芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS	[48]	
毛茛菪	黄芩苷、乳酸菌素	HPLC-ESI-MS	[49]	
番石榴叶茶	11 个化学成分	HPLC-ESI-TOF MS	[50]	
黄嘌呤氧化酶	脉络宁注射液	3,4-二咖啡酸甲酯和 3,5-二咖啡酸甲酯	HPLC-ESI-Q-TOF-MS	[51]
	二妙丸	9 个生物碱	HPLC-ESI-Q-TOF-MS	[52]
	山竹	α -倒捻子素, 3-异倒捻子素, gartanin, 8-desoxygartanin, mangostanol	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS	[37]
	葛根花	鸢尾苷、大豆苷、芒柄花苷、鹰嘴豆芽素 A	HPLC-ESI-MS ⁿ	[53]
	卷柏	穗花杉双黄酮、罗波斯塔双黄酮	HPLC-PDA-ESI-MS	[54]
	菊花	木犀草素、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素、芹菜素-7-O-葡萄糖苷	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[55]
	丹参	11 个亲脂二萜奎宁	UPLC-DAD-ESI MS ⁿ	[56]
	红车轴草	大豆苷、芒柄花苷、大豆苷元、芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS	[48]
	银杏叶	槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素	HPLC-ESI-MS	[57]
	COX-2	川乌和制川乌	12 个化学成分	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS
生姜		10 种姜辣素相关成分	HPLC-ESI-QqQ-MS	[59]

续表 1

靶蛋白	分析材料	潜在活性成分	分析方法	参考文献
	羌活、丹参、当归等 11味中药	4种乳香脂酸和桉桉酸,洋川芎内酯O,隐丹参酮,桦木酸,苯乙基 反式阿魏酸脂,异甘草素	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[60]
	莲子心	12个化学成分	HPLC-ESI-MS/MS	[35]
	穿心莲	穿心莲内酯,14-脱氧-11,12-二氢穿心莲苷,穿心莲碱E,穿心莲内 酯D和去氧穿心莲内酯	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[29]
	重楼	重楼皂苷 I, II, VII	HPLC-ESI-MS	[34]
	滋肾丸	8个化学成分	HPLC-FT-ICR MS	[61]
	鼠李	11个化学成分	HPLC-ESI-MS/MS	[62]
人血清白蛋白	大豆	大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[63]
	甘草	甘草素、甘草酸、甘草苷、甘草呋喃酮、甘草利酮	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[64]
	川乌	9个乌头生物碱	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[65]
	葛根花	葛根素,芒柄花苷,鸢尾黄素,鹰嘴豆芽素A,染料木素,尼泊尔鸢 尾异黄酮,3'-甲氧基大豆苷,大豆苷,3'-甲氧基大豆素	HPLC-ESI-MS	[66]
	丹红注射液	原儿茶醛,对香豆酸,丹酚酸B,丹酚酸D,迷迭香酸,丹酚酸E,紫 草酚酸	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[67]
神经氨酸酶	黄芩	黄芩苷,黄芩素,汉黄芩素,汉黄芩苷,木蝴蝶素A,木蝴蝶素A-7- O-葡萄糖酸	HPLC-DAD-ESI-ion trap MS	[68]
	板蓝根	精氨酸、告依春、腺苷	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[69]
	紫草	乙酰阿卡宁、紫草素、异丁酰阿卡宁、异戊酰基紫草素及 β,β -二甲 基丙烯酰阿卡宁	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[70]
	复方板蓝根颗粒	黄芩素、染料木素、黄芩苷、木犀草素、异鼠李素、芹菜素	HPLC-PDA-ESI-ion trap MS	[71]
	女贞子	13个化学成分	HPLC-ESI-MS ⁿ	[72]
酪氨酸酶	葛根	葛根素,染料木苷,大豆苷,葛根素-6"-O-木糖苷,3'-羟基葛根素, 6"-O-乙酰黄豆苷	HPLC-ESI-MS-ion trap MS	[73]
	桑椹	12个化学成分	UPLC-ESI-ion trap MS	[74]
	苍耳	原儿茶酸,3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸,1,5-二-O-咖啡酰奎宁酸和绿原酸	HPLC-DAD	[75]
	木蝴蝶	7个化学成分	HPLC-ESI-MS	[76]
Topo I	石蒜	11个化学成分	HPLC-ESI-MS ⁿ	[31]
	重楼	重楼皂苷 I, II 和 VII	HPLC-ESI-MS	[34]
	鼠李	8个化学成分	HPLC-ESI-MS ⁿ	[33]
	鼠李	12个化学成分	HPLC-ESI-MS/MS	[62]
α -淀粉酶	南五味子	槲皮素-3-O-鼠李糖苷、原儿茶酸	HPLC-ESI-MS ⁿ	[77]
	山楂	槲皮素-3-O-鼠李糖基-(1 \rightarrow 4)-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)-鼠李糖苷,牡 荆素-2"- β -D-葡萄糖苷和牡荆苷-2"- β -D-鼠李糖苷	HPLC-ion trap MS	[78]
	荷叶	芹菜素,山柰酚和异鼠李素	HPLC	[79]
磷酸二酯酶	杜仲	7个化学成分	UPLC-ESI-ion trap MS	[80]
	毛冬青	11个化学成分	HPLC-ESI-ITTOF-MS	[81]
脂肪酶	五苓散、泽泻汤、小 陷胸汤、小柴胡汤	16个化学成分	HPLC-DAD-ESI-LCQ	[2]
	铁皮石斛	11个化学成分	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[82]
乙醇脱氢酶	广东金钱草	芒柄花素、香橙素	HPLC-DAD-ESI-MS	[83]
	甘草	甘草苷、异甘草苷、甘草素	HPLC-NMR	[84]
乳酸脱氢酶	射干	射干苷,鸢尾甲苷A,野鸢尾苷,鸢尾黄素,野鸢尾黄素,次野鸢尾 黄素	HPLC-PDA-ESI-MS	[85]
	红车轴草	芒柄花苷、染料木素、芒柄花素、鹰嘴豆芽素A	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS	[48]

续表 1

靶蛋白	分析材料	潜在活性成分	分析方法	参考文献
5-脂氧合酶	防风、土茯苓、葛根和红花	16个化学成分	UPLC-DAD-ESI MS	[86]
	滋肾丸	知母皂苷 I, 知母皂苷 A I, niasol, 去甲基小檗碱	HPLC-FT-ICR MS	[87]
Topo II	重楼	重楼皂苷 I, II, VII	HPLC-ESI-MS	[34]
COX-1	羌活、丹参、当归等 11味中药	4种乳香酸和苯乙基反式阿魏酸脂、桉叶酸、桉木酸	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[60]
芳香化酶	延胡索	6个生物碱	HPLC-DAD-ESI MS ^a	[88]
蛋白酪氨酸磷酸酶 1B	红曲	红曲红胺素	UPLC-ESI-Q-TOF MS	[89]
线粒体 DNA	虎杖和黄芩	19个化学成分	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS	[90]
	红车轴草	德鸢尾素-4'-O-β-D-葡萄糖苷、德鸢尾素、黄豆黄葡萄糖苷、红车轴草素、鹰嘴豆牙素 A	HPLC-ESI-MS-ion trap MS	[91]
过氧化物酶体增殖剂激活受体 α	艾叶	异泽兰黄素	HPLC-ESI-Q-TOF MS	[92]
苯醌还原酶-2	啤酒花	黄腐酚, 黄腐酚 D	HPLC-ESI-MS-ion trap MS	[93]
恶性疟原虫硫氧还蛋白还原酶	AnalytiCon Discovery library 的 133 种天然成分	11-羟基冠狗牙花定碱, 育亨宾, hispolone, 长春碱, 老刺木碱, 奎尼丁 N-氧化物, hernagine, gnetifolin E, hispolone methyl ether	RRLC-ESI-Q/TOF MS	[94]
基质金属蛋白酶-2	土茯苓、菝葜和防风	落新妇苷, 黄杞苷, 白藜芦醇, 升麻素苷, 5-O-甲基维斯阿米醇苷, 升麻素, 亥茅酚苷	HPLC-ESI-MS	[95]
脂氧化酶	防风	升麻素苷, 5-O-甲基维斯阿米醇, 亥茅酚苷, 亥茅酚	UPLC-Q-Extractive-MS	[96]
过氧化物酶	丹参	丹参醇, 原儿茶醛, 丹酚酸 D, 迷迭香酸, 紫草酸, 丹酚酸 B	HPLC-ESI-QqQ-MS	[97]
乙酰胆碱酯酶	人参茎叶皂苷	11个化学成分	RRLC-DAD-ESI-MS ²	[98]

注: glc. 葡萄糖; rha. 鼠李糖。

2.2 中药复方制剂中活性成分的筛选 中药复方制剂是在中医药理论指导下组成的处方,其化学成分十分复杂,常规的分析方法很难快速筛选和鉴定其有效成分。戴荣华课题组利用 AUF-LC/MS 技术对中药复方制剂——滋肾丸的提取物与生物靶蛋白的相互作用进行了系列研究。COX-2 是催化花生四烯酸(AA)转化为前列腺素(PG)的关键酶,在细胞内被特异性地诱导表达炎症、退行性病变和肿瘤过程。该课题组采用 AUF-LC/MS 技术对滋肾丸提取物与 COX-2 的相互作用进行了研究^[61]。结果发现 20 个化合物与 COX-2 有特异性结合,其中 8 个化合物为潜在的 COX-2 抑制剂,并利用傅立叶变换-离子回旋共振质谱法(FT-ICR MS)对其结构进行了鉴定,同时利用分子对接进行了构-效关系分析。

此外,该课题组还进一步研究了滋肾丸与 5-脂氧合酶(5-LOX)抑制剂的相互作用^[87]。5-LOX 是炎症机制中的重要蛋白靶点,是 AA 代谢到白三烯 A₄(LTA₄)的关键酶。筛选结果表明有 6 个化合物为

潜在的 5-LOX 抑制剂,其中知母皂苷 I, 去甲基小檗碱,知母皂苷 A I, niasol 具有显著的酶抑制活性。进一步的构-效关系表明,羟基是配体与 5-LOX 蛋白结合的最关键基团;其次是芳香环,其可以与 5-LOX 蛋白中的氨基酸残基发生 π-π 相互作用。该实验为 5-LOX 抑制剂的开发提供了科学依据。

2.3 中药有效成分的指纹图谱分析 中药化学指纹图谱是指某些中药或其制剂经适当处理后,用其特有的化学成分进行标记的色谱图或光谱图。其是在对中药化学成分进行系统研究的基础上,主要用于评价中药及其衍生产品的真实性、优良性和稳定性,对提高中药质量、促进中药现代化具有重要意义。但事实上,传统的化学指纹图谱仅通过所含化学成分来评价中药的质量,这在一定程度上有其局限性,因为所选化学成分与发挥临床功效的成分并不完全吻合^[7]。因此,如果首先使用高通量筛选技术(如 AUF-LC/MS)从对应的中药中识别这些活性成分,则可以根据蛋白质靶点与这些活性成分之间的关系获得其生物指纹图谱,这不仅弥补了化学

指纹图谱的局限性,而且为评价中药有效性提供了新的思路,为中药质量控制提供了更重要的科学依据。

为此,CHEN等^[62]建立了鼠李的抗炎和抗增殖生物活性指纹图谱,分离并鉴定了32个化合物,其中23个为黄酮类化合物。利用UF-UPLC/MS筛选并鉴定了12个化合物为拓扑异构酶配体,11个化合物为COX-2配体。另外,体外抗炎和抗增殖活性进一步证明了UF-UPLC/MS的可行性。在另一项研究中,ZHAO等^[41]用UF-LC/MS从降香黄檀心材中鉴定出18个潜在的 α -葡萄糖苷酶配体,同时检测出5个具有明显 α -葡萄糖苷酶抑制活性的主要组分的含量,可用于降香黄檀的质量控制。

2.4 小分子药物的代谢产物分析 AUF-LC/MS在药物代谢研究中也得到了广泛的应用。HUANG等^[96]采用该方法从防风根提取物中筛选了脂氧化酶(LOX)抑制剂,采用半制备HPLC分离得到4个活性化合物,并对这些化合物进行了细胞色素P450的体外代谢研究,最后推断了3种可能代谢途径。VAN BREEMEN等^[99]应用在线UF-LC/MS技术对肝细胞色素P450代谢的药物分子进行了确证,该方法可用于检测肝细胞色素P450代谢药物的程度和初步药物代谢产物的鉴定。此外,还建立了一些用于超滤管连接的装置,大大提高了分析速度。SHIN等^[100]利用脉冲UF-LC-MS/MS技术考察药物在代谢过程中的稳定性,该实验采用肝细胞色素P450作为亲和性靶标,对未产生代谢的8种 β -阻断剂进行定量检测,结果表明该技术不仅可以体外考察药物代谢的稳定性,还可实现多种化合物的同时定量检测。

3 结论与展望

药用植物用于治疗疾病时具有多成分、多靶点等特性。为了进一步阐明药用植物的作用机制,首先要鉴定其活性成分。然而,常规的方法难以完成此项工作。因此,有必要开发一种快速、简便、有效的技术进行活性成分的靶向筛选,使其化学成分与某些药理活性迅速关联。AUF-LC/MS是亲和超滤和质谱联用的一种有效方法,能快速筛选和鉴定与靶蛋白结合的药物小分子,可用于筛选组合文库中的先导化合物,已广泛用于天然产物中活性小分子化合物的靶向筛选,尤其是特定靶酶的精准发现。总之,采用AUF-LC/MS技术靶向筛选传统药用植物中的活性小分子化合物是一种快速、简便、高效的方法,其使追踪目标更为明确,克服了传统“化学-

活性”筛选模式的诸多缺点。

从过去的应用来看,AUF-LC/MS也面临着许多挑战:①如何减少药物小分子与超滤膜的非特异性结合,从而减少假阳性结果,是今后亟待解决的问题之一。②传统药用植物成分复杂、有效成分含量极低、化学成分与酶之间的结合方式受到诸多外界因素的干扰,因此在试验中会出现一定的假阴性结果。③该技术目前主要用于特定靶酶的快速筛选,在实际应用中仍受到一定的限制。④该技术只能针对1个或2个蛋白质靶点的活性小分子筛选,难以全面表征成分复杂的传统药用植物的化学生物信息。目前,关于多靶点筛选的报道很少,不能满足日益增长的药用植物提取物多靶点筛选的需要。然而,具有多个蛋白质靶点的高通量亲和超滤-液质联用筛选也有望在不久的将来实现。此外,随着生物医学研究在人类各种疾病的病因和潜在机制方面的逐步了解,目前尚不清楚的与疾病相关的蛋白质靶点会得到更多探索。综上所述,随着超滤技术和液相色谱-质谱联用技术的发展,相信AUF-LC/MS将在研究活性小分子与生物蛋白靶点之间相互作用方面发挥更大的作用,特别是实现高通量和多靶点的药用植物活性成分筛选,为药用植物资源的开发和合理利用提供依据。

[参考文献]

- [1] QIN S S, REN Y R, FU X, et al. Multiple ligand detection and affinity measurement by ultrafiltration and mass spectrometry analysis applied to fragment mixture screening [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 886: 98-106.
- [2] XIAO S, YU R R, AI N, et al. Rapid screening natural-origin lipase inhibitors from hypolipidemic decoctions by ultrafiltration combined with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 104: 67-74.
- [3] YAO C X, NA N, HUANG L Y, et al. High-throughput detection of drugs binding to proteins using desorption electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 794: 60-66.
- [4] BERDIGALIYEV N, ALJOFAN M. An overview of drug discovery and development [J]. *Future Med Chem*, 2020, 12(10): 939-947.
- [5] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(3): 770-803.

- [6] ATANASOV A G, WALTENBERGER B, PFERSCHY-WENZIG E M, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review[J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(8): 1582-1614.
- [7] CHEN G L, HUANG B X, GUO M Q. Current advances in screening for bioactive components from medicinal plants by affinity ultrafiltration mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 2018, 29 (4) : 375-386.
- [8] POTTERAT O, HAMBURGER M. Concepts and technologies for tracking bioactive compounds in natural product extracts: generation of libraries, and hyphenation of analytical processes with bioassays[J]. *Nat Prod Rep*, 2013, 30(4): 546-564.
- [9] WU B, SONG H P, ZHOU X, et al. Screening of minor bioactive compounds from herbal medicines by in silico docking and the trace peak exposure methods [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1436: 91-99.
- [10] 邹思琪, 杨华, 李萍. 亲和超滤结合液质技术在中药有效成分发现中的应用[J]. *药学报*, 2016, 51(7): 1060-1067.
- [11] 周慧, 王义民, 郑重, 等. 亲和超滤质谱技术在中药活性成分筛选中的研究进展[J]. *质谱学报*, 2018, 39(6): 641-652.
- [12] WEI H, ZHANG X J, TIAN X, et al. Pharmaceutical applications of affinity-ultrafiltration mass spectrometry: Recent advances and future prospects [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 131: 444-453.
- [13] WHITLAM J B, BROWN K F. Ultrafiltration in serum protein binding determinations[J]. *J Pharm Sci*, 1981, 70(2): 146-150.
- [14] VAN BREEMEN R B, HUANG C R, NIKOLIC D, et al. Pulsed ultrafiltration mass spectrometry: a new method for screening combinatorial libraries[J]. *Anal Chem*, 1997, 69(11): 2159-2164.
- [15] MOUNTAIN V. Astex, structural genomics, and syrrx. I can see clearly now: structural biology and drug discovery[J]. *Chem Biol*, 2003, 10(2): 95-98.
- [16] 赵宏艳, 张勇忠, 肖春玲. 亲和超滤 HPLC-MS 法的研究进展[J]. *药学报*, 2009, 44(10): 1084-1088.
- [17] JOHNSON B M, NIKOLIC D, VAN BREEMEN R B. Applications of pulsed ultrafiltration-mass spectrometry [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2002, 21(2): 76-86.
- [18] SHAO S Y, TING Y, WANG J, et al. Characterization and identification of the major flavonoids in *phyllostachys edulis* leaf extract by UPLC-QTOF-MS/MS[J]. *Acta Chromatogr*, 2020, 32(4): 228-237.
- [19] YANG L, LIU R H, HE J W. Rapid analysis of the chemical compositions in *Semiliquidambar cathayensis* roots by ultra high-performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2019, 24 (22) : 4098.
- [20] LI K X, PEI Y Q, WU Y, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in diagnosis of ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 6.
- [21] ZHONG J Y, CHEN N, HUANG S C, et al. Chemical profiling and discrimination of green tea and Pu-erh raw tea based on UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS and chemometrics[J]. *Food Chem*, 2020, 326: 126760.
- [22] ZHAO Y H, WANG M, SUN L, et al. Rapid characterization of the chemical constituents of Sanhua decoction by UHPLC coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(44): 26109-26119.
- [23] WIEBOLDT R, ZWEIGENBAUM J, HENION J. Immunoaffinity ultrafiltration with ion spray HPLC/MS for screening small-molecule libraries [J]. *Anal Chem*, 1997, 69(9): 1683-1691.
- [24] ZHAO H Y, ZHANG Y Z, XIAO C L. Advances in the study of affinity selection-ultrafiltration/HPLC-MS[J]. *Acta Pharm Sin*, 2009, 44(10): 1084-1088.
- [25] MULABAGAL V, CALDERÓN A I. Development of an ultrafiltration-liquid chromatography/mass spectrometry (UF-LC/MS) based ligand-binding assay and an LC/MS based functional assay for *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(9): 3616-3621.
- [26] LOHMANN W, KARST U. Generation and identification of reactive metabolites by electrochemistry and immobilized enzymes coupled on-line to liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(17): 6831-6839.
- [27] WANG S, SUN M, ZHANG Y M, et al. A new A431/cell membrane chromatography and online high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening epidermal growth factor receptor antagonists from *Radix Sophorae Flavescentis* [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(32): 5246-5252.
- [28] ZHOU X L, LIANG J S, ZHANG Y, et al. Separation and purification of α -glucosidase inhibitors from *Polygonatum odoratum* by step wise high-speed counter-current chromatography combined with

- Sephadex LH-20 chromatography target-guided by ultrafiltration-HPLC screening [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 985: 149-154.
- [29] JIAO J J, YANG Y Z, WU Z F, et al. Screening cyclooxygenase-2 inhibitors from *Andrographis paniculata* to treat inflammation based on bio-affinity ultrafiltration coupled with UPLC-QTOF-MS [J]. *Fitoterapia*, 2019, 137: 104259.
- [30] CHEN G L, TIAN Y Q, GUO M Q. Screening for inhibitors of topoisomerase I from *Lycoris radiata* by combining ultrafiltration with liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2016, 30(Suppl 1): 95-99.
- [31] CHEN G L, TIAN Y Q, WU J L, et al. Antiproliferative activities of Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata* targeting DNA topoisomerase I [J]. *Sci Rep-UK*, 2016, 6: 38284.
- [32] CHEN G L, GUO M Q. Rapid screening for α -glucosidase inhibitors from *Gymnema sylvestre* by affinity ultrafiltration-HPLC-MS [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 228.
- [33] CHEN G L, GUO M Q. Screening for natural inhibitors of topoisomerases I from *Rhamnus davurica* by affinity ultrafiltration and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1521.
- [34] CHEN G L, GUO M Q. Rapid re-evaluation of bioactive saponins from *Paris polyphylla* using affinity ultrafiltration-LC/MS with multiple drug targets [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2018, 434: 87-92.
- [35] CHEN G L, FAN M X, WU J L, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule [J]. *Food Chem*, 2019, 277: 706-712.
- [36] LI S N, TANG Y, LIU C M, et al. Development of a method to screen and isolate potential α -glucosidase inhibitors from *Panax japonicus* C. A. Meyer by ultrafiltration, liquid chromatography and counter-current chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(12): 2014-2023.
- [37] 唐英,刘春明,任浚萁,等. 山竹果中 α -葡萄糖苷酶和黄嘌呤氧化酶抑制剂的超滤质谱分析[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(10): 2322-2325.
- [38] LI H L, SONG F R, XING J P, et al. Screening and structural characterization of α -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MSⁿ and SORI-CID FTICR MS [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20(8): 1496-1503.
- [39] 杨冬,刘舒,宋凤瑞,等. 虎杖和大黄中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的超滤质谱研究[J]. *分析化学*, 2014, 42(4): 552-558.
- [40] ZHOU H, XING J P, LIU S, et al. Screening and determination for potential α -glucosidase inhibitors from leaves of *Acanthopanax senticosus* harms by using UF-LC/MS and ESI-MSⁿ [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23(4): 315-323.
- [41] ZHAO C F, LIU Y Q, CONG D L, et al. Screening and determination for potential α -glucosidase inhibitory constituents from *Dalbergia odorifera* T. Chen using ultrafiltration-LC/ESI-MSⁿ [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(12): 1621-1629.
- [42] 刘洋,周慧,刘舒,等. 银杏叶中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的超滤质谱筛选[J]. *高等学校化学学报*, 2013, 34(4): 813-818.
- [43] JIANG W Y, KAN H, LI P D, et al. Screening and structural characterization of potential α -glucosidase inhibitors from Radix *Astragali* flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-ESI-MSⁿ [J]. *Anal Methods-UK*, 2015, 7(1): 123-128.
- [44] WANG J, LIU S, LI S N, et al. Ultrafiltration LC-PDA-ESI/MS combined with reverse phase-medium pressure liquid chromatography for screening and isolation potential α -glucosidase inhibitors from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Anal Methods-UK*, 2014, 6(15): 5918-5924.
- [45] ZHOU X L, LIANG J S, ZHANG Y, et al. Separation and purification of α -glucosidase inhibitors from *Polygonatum odoratum* by stepwise high-speed counter-current chromatography combined with sephadex LH-20 chromatography target-guided by ultrafiltration-HPLC screening [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 985: 149-154.
- [46] ZHOU H, JIANG T, WANG Z Y, et al. Screening for potential α -glucosidase inhibitors in *Coptis chinensis* Franch. extract using ultrafiltration LC-ESI-MSⁿ [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(6 Suppl): 2007-2012.
- [47] 何忠梅,王晓慧,李国峰,等. 靶向亲和-液质联用技术对人参茎叶总皂苷中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的快速筛选[J]. *分析化学*, 2013, 41(11): 1694-1698.
- [48] 郝禹,刘春明,李赛男,等. 亲和超滤质谱技术筛选红车轴草中的生物活性配体[J]. *北方园艺*, 2019, 43(17): 102-107.
- [49] 陈海君,马尚智,江敏,等. 超滤亲和-液质联用和分子对接技术筛选毛菊苣根中 α -葡萄糖苷酶抑制剂[J]. *中草药*, 2019, 50(2): 344-351.
- [50] WANG L, LIU Y F, LUO Y, et al. Quickly screening for potential α -glucosidase inhibitors from guava

- leaves tea by bioaffinity ultrafiltration coupled with HPLC-ESI-TOF/MS method[J]. *J Agric Food Chem*, 2018,66(6):1576-1582.
- [51] SONG H P, CHEN J, HONG J Y, et al. A strategy for screening of high-quality enzyme inhibitors from herbal medicines based on ultrafiltration LC-MS and in silico molecular docking[J]. *Chem Commun(Camb)*, 2015,51(8):1494-1497.
- [52] 徐晨, 刘舒, 刘志强, 等. 离心超滤质谱法筛选中药复方二妙丸中黄嘌呤氧化酶抑制剂[J]. *高等学校化学学报*, 2014,35(8):1640-1645.
- [53] LIU L L, XIAO A P, MA L, et al. Analysis of xanthine oxidase inhibitors from *Puerariae Flos* using centrifugal ultrafiltration coupled with HPLC-MS[J]. *J Braz Chem Soc*, 2017,28(2):360-366.
- [54] WANG J, LIU S, MA B, et al. Rapid screening and detection of XOD inhibitors from *S. tamariscina* by ultrafiltration LC-PDA-ESI-MS combined with HPLC[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014,406(28):7379-7387.
- [55] SONG H P, ZHANG H, FU Y, et al. Screening for selective inhibitors of xanthine oxidase from *Flos Chrysanthemum* using ultrafiltration LC-MS combined with enzyme channel blocking[J]. *J Chromatogr B*, 2014,961:56-61.
- [56] LIU Y, LIU S, LIU Z Q. Screening and determination of potential xanthine oxidase inhibitors from *Radix Salviae Miltiorrhizae* using ultrafiltration liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2013,923/924:48-53.
- [57] WANG J, ZHANG Y, ZHOU M Q, et al. Rapid screening and evaluation of XOD inhibitors and $O_2^{\cdot -}$ scavenger from total flavonoids of *Ginkgo biloba* leaves by LC-MS and multimode microplate reader[J]. *Biomed Chromatogr*, 2020,34(8):e4852.
- [58] ZHU H B, LIU S, LI X, et al. Bioactivity fingerprint analysis of cyclooxygenase-2 ligands from *Radix Aconiti* by ultrafiltration-UPLC-MSⁿ[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013,405(23):7437-7445.
- [59] VAN BREEMEN R B, TAO Y, LI W K. Cyclooxygenase-2 inhibitors in ginger (*Zingiber officinale*)[J]. *Fitoterapia*, 2011,82(1):38-43.
- [60] CAO H M, YU R, CHOI Y S, et al. Discovery of cyclooxygenase inhibitors from medicinal plants used to treat inflammation[J]. *Pharmacol Res*, 2010,61(6):519-524.
- [61] HUAI J X, ZHAO X N, WANG S Q, et al. Characterization and screening of cyclooxygenase-2 inhibitors from *Zi-shen pill* by affinity ultrafiltration-ultra performance liquid chromatography mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 241: 111900.
- [62] CHEN G L, WU J L, LI N, et al. Screening for anti-proliferative and anti-inflammatory components from *Rhamnus davurica* Pall. using bio-affinity ultrafiltration with multiple drug targets [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018,410(15):3587-3595.
- [63] 杨睿, 喻花, 王献. 超滤质谱法筛选与人血清白蛋白作用的大豆异黄酮粉中异黄酮成分[J]. *绿色科技*, 2012(6):292-294.
- [64] 王献, 喻花, 潘子昂, 等. 超滤质谱法研究人血清白蛋白与甘草提取物的相互作用[J]. *中南民族大学学报:自然科学版*, 2015,34(3):25-28.
- [65] 朱洪彬, 刘舒, 王春艳. 离心超滤质谱筛选川乌中与人血清白蛋白相互作用的乌头类生物碱[J]. *高等学校化学学报*, 2013,34(7):1635-1639.
- [66] TANG P, SI S H, LIU L L. Analysis of bovine serum albumin ligands from *Puerariae Flos* using ultrafiltration combined with HPLC-MS[J]. *J Chem*, 2015,2015:1-6.
- [67] ZHU J F, YI X J, HUANG P, et al. Drug-protein binding of *Danhong injection* and the potential influence of drug combination with aspirin: Insight by ultrafiltration LC-MS and molecular modeling [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017,134:100-107.
- [68] 刘舒, 邢俊鹏, 闫峻, 等. 中药黄芩中神经氨酸酶抑制剂的超滤质谱筛选研究[J]. *化学学报*, 2011, 69(13):1570-1574.
- [69] 马丽娜, 章从恩, 鄢丹, 等. 超滤质谱技术筛选板蓝根中抗流感病毒的活性成分[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(5):812-816.
- [70] ZHANG M M, ZHAO H Q, ZHAO Z G, et al. Rapid screening, identification, and purification of neuraminidase inhibitors from *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. by ultrafiltration with HPLC-ESI-TOF-MS combined with semipreparative HPLC[J]. *J Sep Sci*, 2016,39(11):2097-2104.
- [71] LIU S, YAN J, XING J P, et al. Characterization of compounds and potential neuraminidase inhibitors from the n-butanol extract of Compound Indigowoad Root Granule using ultrafiltration and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012,59:96-101.
- [72] ZHANG Y C, HE Y, LIU C Y, et al. Screening and isolation of potential neuraminidase inhibitors from leaves of *Ligustrum lucidum* Ait. based on

- ultrafiltration, LC/MS, and online extraction-separation methods[J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1083: 102-109.
- [73] ZHANG G, GUO X, WANG S S, et al. Screening and identification of natural ligands of tyrosinase from *Pueraria lobata* Ohwi by a combination of ultrafiltration and LC-MS [J]. *Anal Methods-UK*, 2017, 9(33): 4858-4862.
- [74] YANG Z Z, ZHANG Y F, SUN L J, et al. An ultrafiltration high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterising tyrosinase inhibitors from mulberry leaves [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 719: 87-95.
- [75] WANG Z Q, HWANG S H, HUANG B, et al. Identification of tyrosinase specific inhibitors from *Xanthium strumarium* fruit extract using ultrafiltration-high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 1002: 319-328.
- [76] YIN X S, ZHANG X Q, YIN J T, et al. Screening and identification of potential tyrosinase inhibitors from Semen Oroxyli extract by ultrafiltration LC-MS and in silico molecular docking [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, 57(9): 838-846.
- [77] CEN Y, XIAO A P, CHEN X Q, et al. Isolation of α -amylase inhibitors from *Kadsura longipedunculata* using a high-speed counter-current chromatography target guided by centrifugal ultrafiltration with LC-MS [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1190.
- [78] 陶益, 陈锥, 张玉峰. 亲和超滤耦联液相色谱-质谱快速检测山楂叶中的 α -淀粉酶抑制剂[J]. *分析化学*, 2013, 41(2): 229-234.
- [79] LIAO L P, CHEN J, LIU L L, et al. Screening and binding analysis of flavonoids with alpha-amylase inhibitory activity from lotus leaf [J]. *J Braz Chem Soc*, 2018, 29(3): 587-593.
- [80] SHI S Y, PENG M J, ZHANG Y P, et al. Combination of preparative HPLC and HSCCC methods to separate phosphodiesterase inhibitors from *Eucommia ulmoides* bark guided by ultrafiltration-based ligand screening [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(12): 4213-4223.
- [81] LIU Z C, LIN Z T, CHEN S Z, et al. Rapid screening of potential phosphodiesterase inhibitors from the roots of *Ilex pubescens* Hook. et Arn. using a combination of ultrafiltration and LC-MS [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 2749643.
- [82] TAO Y, CAI H, LI W D, et al. Ultrafiltration coupled with high-performance liquid chromatography and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for screening lipase binders from different extracts of *Dendrobium officinale* [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(20): 6081-6093.
- [83] LIU L L, CHEN M, CHEN X Q. Analysis of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Desmodium styracifolium* using centrifugal ultrafiltration coupled with HPLC-MS [J]. *J Serb Chem Soc*, 2015, 80(8): 1051-1059.
- [84] CHEN M, LIU L L, CHEN X Q. Preparative isolation and analysis of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis* root using ultrafiltration combined with high-performance liquid chromatography and highspeed countercurrent chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(13): 1546-1551.
- [85] LI S L, LI S N, TANG Y, et al. Ultrafiltration-LC-MS combined with semi-preparative HPLC for the simultaneous screening and isolation of lactate dehydrogenase inhibitors from *Belamcanda chinensis* [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(23): 4533-4543.
- [86] ZHAO A Q, LI L, LI B, et al. Ultrafiltration LC-ESI-MSⁿ screening of 5-lipoxygenase inhibitors from selected Chinese medicinal herbs *Saposhnikovia divaricata*, *Smilax glabra*, *Pueraria lobata* and *Carthamus tinctorius* [J]. *J Funct Foods*, 2016, 24: 244-253.
- [87] WANG S Q, HUAI J X, SHANG Y, et al. Screening for natural inhibitors of 5-lipoxygenase from Zi-shen pill extract by affinity ultrafiltration coupled with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112733.
- [88] SHI J, ZHANG X Y, MA Z J, et al. Characterization of aromatase binding agents from the dichloromethane extract of *Corydalis yanhusuo* using ultrafiltration and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2010, 15(5): 3556-3566.
- [89] JIN Y, CHENG X H, JIANG F Q, et al. Application of the ultrafiltration-based LC-MS approach for screening PTP1B inhibitors from Chinese red yeast rice [J]. *Anal Methods-UK*, 2016, 8(2): 353-361.
- [90] YANG X X, XU F, WANG D, et al. Development of a mitochondria-based centrifugal ultrafiltration/liquid chromatography/mass spectrometry method for screening mitochondria-targeted bioactive constituents from complex matrixes: herbal medicines as a case study [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1413: 33-46.
- [91] 马蕾, 王兆伏, 陈丽娜, 等. 红车轴草总异黄酮成分DNA结合剂的超滤质谱筛选 [J]. *高等学校化学学*

- 报,2013,34(2):331-335.
- [92] CHOI Y S, JUNG Y J, KIM S N. Identification of eupatilin from *Artemisia argyi* as a selective PPAR α agonist using affinity selection ultrafiltration LC-MS [J]. *Molecules*,2015,20(8):13753-13763.
- [93] CHOI Y S, JERMIHOV K, NAM S J, et al. Screening natural products for inhibitors of quinone reductase-2 using ultrafiltration LC-MS [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(3):1048-1052.
- [94] MUNIGUNTI R, MULABAGAL V, CALDERÓN A I. Screening of natural compounds for ligands to PfTrxR by ultrafiltration and LC-MS based binding assay [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(2):265-271.
- [95] LI L, LI B, ZHANG H R, et al. Ultrafiltration LC-ESI-MSⁿ screening of MMP-2 inhibitors from selected Chinese medicinal herbs *Smilax glabra* Roxb., *Smilax china* L. and *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk as potential functional food ingredients [J]. *J Funct Foods*, 2015, 15:389-395.
- [96] HUANG Y, YU M, WU T, et al. Development of a method to screen and isolate lipoxidase inhibitors from *Radix Saposhnikovia* via ultrafiltration liquid chromatography combined with metabolism *in vitro* [J]. *Phytochem Anal*, 2020, doi: 10. 1002/pca. 2966.
- [97] WU S Q, SONG H P, LI B, et al. A fast and accurate method for the identification of peroxidase inhibitors from *Radix Salvia Miltiorrhizae* by on-flow biochemical assay coupled with LC/Q-TOF-MS: comparison with ultrafiltration-based affinity selection [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(18):4311-4322.
- [98] YANG Y P, LIANG X H, JIN P, et al. Screening and determination for potential acetylcholinesterase inhibitory constituents from ginseng stem-leaf saponins using ultrafiltration (UF)-LC-ESI-MS² [J]. *Phytochem Analysis*, 2019, 30(1):26-33.
- [99] VAN BREEMEN R B, NIKOLIC D, BOLTON J L. Metabolic screening using online ultrafiltration mass spectrometry [J]. *Drug Metab Dispos*, 1998, 26(2):85-90.
- [100] SHIN Y G, BOLTON J L, VAN BREEMEN R B. Screening drugs for metabolic stability using pulsed ultrafiltration mass spectrometry [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2002, 5(1):59-64.
- [责任编辑 刘德文]