

萝卜叶不同萃取物对乙酰胆碱酯酶抑制活性研究

王乐, 黄明远, 高品一, 刘学贵* (沈阳化工大学制药与生物工程学院, 辽宁沈阳 110142)

摘要 [目的]研究萝卜叶不同萃取组分对乙酰胆碱酯酶的抑制活性。[方法]通过对萝卜叶水提原液、水提不同萃取组分及萃取后的水相进行乙酰胆碱酯酶抑制活性测试,对萝卜叶抑制乙酰胆碱酯酶能力进行评价。[结果]以石杉碱甲为对照,萝卜叶不同萃取物对乙酰胆碱酯酶的抑制能力从大到小依次为石杉碱甲、二氯甲烷组分、乙酸乙酯组分、石油醚组分、正丁醇组分、水相、萝卜叶水提原液。[结论]萝卜叶具有较好的乙酰胆碱酯酶抑制活性,并呈现一定的浓度依赖性。

关键词 不同萃取组分;乙酰胆碱酯酶;抑制活性;萝卜叶水提原液;水相

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)01-0120-02

Study of Inhibitory Activity of Different Extracts from Radish Leaves to Acetylcholinesterase

WANG Le, HUANG Ming-yuan, GAO Pin-yi, LIU Xue-gui* (College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang, Liaoning 110142)

Abstract [Objective] To study inhibitory activity of different extraction fractions from radish leaves to acetylcholinesterase. [Method] The inhibitory activities of different polarities of water extracts from radish leaves to acetylcholinesterase were determined and the ability of radish leaves inhibiting acetylcholinesterase was evaluated. [Result] Using huperzine as the control, the order of inhibiting ability from strong to weak is huperzine, dichloromethane layer, ethyl acetate layer, petroleum ether layer, butanol layer, water-phase, radish leaf extract. [Conclusion] Radish leaves have a good inhibitory activity to acetylcholinesterase and present a concentration-dependent manner.

Key words Different extraction fractions; Acetylcholinesterase; Inhibitory activity; Radish leaf extract; Water-phase

萝卜(*Raphanus sativus* L.)古汉语中又称莱菔、雹突、菜头等,始载于《唐本草》,是生活中常见的蔬菜,为十字花科萝卜属1~2年生草本植物^[1]。萝卜根部为主要的食用部位;萝卜叶又名莱菔叶、萝卜缨,其缨叶性味甘苦平,主要功能消食理气^[2]。化学分析证明,萝卜叶的主要成分是精油和多种维生素,还含微量元素和抗病毒成分^[1-2]。

在生物体内,乙酰胆碱酯酶(AChE)是以一种蛋白质为结构的生物催化剂,在神经传导过程中起关键作用,能降解乙酰胆碱,使得神经递质在突触后膜上失去活性,从而保证信号的正常传导。AChE在体内一般有6种不同的分子形式,包括3种球形与3种胶原样亚基连接形成的不对称形式,其主要在肝脏中合成,AChE在人体的红细胞、内皮细胞、胸腺细胞、肝细胞甚至在骨细胞中广泛表达^[3]。乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI)一般是从天然产物中提取出来的,主要为生物碱类、萜类、酚类等^[4]。在天然产物中分离提取AChEI目前已经成为医药研究的重点^[3-6]。笔者通过对萝卜叶水提原液、水提不同萃取成分及萃取后的水相进行乙酰胆碱酯酶抑制活性研究,旨在为发现天然乙酰胆碱酯酶抑制剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。白萝卜叶产于辽宁省沈阳市,经鉴定为萝卜的叶子。

1.1.2 主要仪器。电子天平TD5102(余姚市金诺天平仪器有限公司),ZF-20D暗箱式紫外分析仪(巩义市予华仪器有限责任公司),Biotek Synergy2多功能酶标仪(基因有限公

司),薄层色谱展开缸(上海信宜仪器厂制造),HZC超声波清洗器(福州志科学仪器公司),UV-3200PC紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),RE-5205旋转蒸发器(上海亚荣有限公司)。

1.1.3 主要试剂。二甲基亚砜(DMSO,博迪化工股份有限公司),乙酰胆碱酯酶(AChE,北京索莱宝科技公司),PBS粉末(北京索莱宝科技公司),石杉碱甲对照品(北京索莱宝科技公司),二硫二硝基苯甲酸(DTNB,北京索莱宝科技公司),碘代硫代乙酰胆碱(ATCI,北京索莱宝科技公司),其他化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 萝卜叶不同萃取组分的制备。将4 kg干燥的萝卜叶放在恒温水浴锅中,设置温度为20℃,加8 L蒸馏水,浸泡水解18 h;提取3次,减压浓缩,得到浓缩液4 000 mL。取1 000 mL浓缩液,分别用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇1 000 mL萃取3次,萃取完毕,旋蒸,挥干,制得4个不同极性萃取组分的浸膏,待用^[5]。

1.2.2 样品溶液的配制。将萝卜叶中不同萃取组分加入不同剂量的0.1% PBS-DMSO溶液分别配制成浓度为2、100、400、800 μg/mL的样品储备液,待用。

1.2.3 其他溶液的配制。

1.2.3.1 PBS缓冲液的配制。将PBS粉末通过定容配制成pH 7.4、0.1 mol/L的PBS缓冲液。

1.2.3.2 P-D溶液的配制。量取10 μL二甲基亚砜至15 mL的EP管中,加入9.99 mL PBS缓冲液,配制成P-D溶液。

1.2.3.3 DTNB的配制。称取40 mg DTNB加入无水乙醇将其配制成10 mmol/L的溶液,将溶液保存在4℃环境中。

1.2.3.4 底物ATCI的配制。准确称取43 mg ATCI加入无水乙醇将其配制成15 mmol/L的ATCI溶液。

作者简介 王乐(1991—),男,安徽阜阳人,硕士研究生,研究方向:药理学。*通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事天然产物活性成分的提取及合成工艺研究。

收稿日期 2016-10-12

1.2.4 活性测试试验。

1.2.4.1 原理。由于碘代硫代乙酰胆碱在 AChE 的作用下能够分解生成碘代硫代胆碱,碘代硫代胆碱与显色剂(DT-

NB)反应生成 5-巯基-2-硝基苯甲酸,而生成的 5-巯基-2-硝基苯甲酸能够在 405 nm 下具有紫外光吸收的黄色物质^[5],反应原理方程式见图 1。

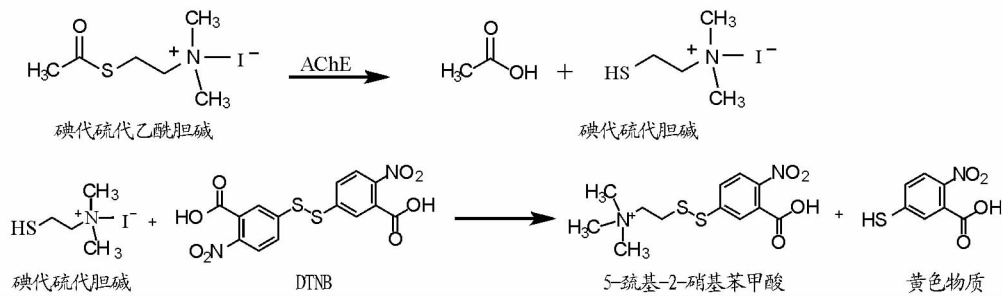


图 1 乙酰胆碱酯酶活性反应原理方程式

Fig.1 Principle equation of acetylcholinesterase activity

1.2.4.2 步骤。主要采用改良的酶标仪法(Ellman 法^[6])对萝卜叶不同萃取组分进行测试,步骤主要在于样品组、样品本底组以及对照组之间通过检测其吸光度值来观察乙酰胆碱酯酶抑制活性。

样品组:在 96 孔酶标板上中依次加入 140 μL 0.1 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液、20 μL 样品溶液、15 μL 0.4 U/mL AChE,在 4 ℃ 条件下反应 20 min。加入 10 μL 15 mmol/L 底物 ATCI,再加入 20 μL 10 mmol/L DTNB,在 37 ℃ 条件下反应 30 min,用酶标仪在 405 nm 处测定其吸光度值,每组试验做 3 次平行试验。样品本底组:用 15 μL PBS 缓冲液代替 15 μL AChE 溶液,其他条件不变。空白对照组:用 20 μL PBS 缓冲液代替 20 μL 样品溶液,其他条件不变。完全抑制对照组:用 20 μL PBS 缓冲液配制石杉碱甲溶液(0.1 mg/mL)。

抑制率=[(空白组-完全抑制组)-(样品组-样品本底组)]/(空白组-完全抑制组)×100%,各组值均为吸光度值。

2 结果与分析

萝卜叶经过水提取以及石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取,得到石油醚组分、二氯甲烷组分、乙酸乙酯组分、正丁醇组分、萝卜叶水提原液、水相和石杉碱甲 7 个样品溶液。对这 7 个样品分别进行乙酰胆碱酯酶抑制活性检测^[7]。

由图 2 可见,萝卜叶不同萃取组分样品均表现出一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性,且其乙酰胆碱酯酶抑制活性与其样品浓度均表现出一定的浓度依赖关系。在样品浓度梯度较

低时,抑制率随着浓度增加近似为线性关系,而浓度较大时抑制率趋于稳定。其中二氯甲烷组分具有相对最强的 AChE 抑制活性,对其相关数据进行分析得其 IC₅₀ 为 344.02 μg/mL。乙酸乙酯及石油醚组分对 AChE 也表现出较好的抑制活性,且呈明显的线性相关,IC₅₀ 分别为 369.27、371.12 μg/mL。正丁醇组分的 AChE 活性相对较弱。萝卜叶水提取原液及水相的 AChE 抑制效果不佳。

根据 7 个样品的抑制曲线,确定各样品的 IC₅₀ 值(表 1)。结合图 2 和表 1 可以确定,7 个样品的抑制能力从大到小依次为石杉碱甲、二氯甲烷组分、乙酸乙酯组分、石油醚组分、正丁醇组分、水相、萝卜叶水提原液。但参考阳性对照石杉碱甲,发现萝卜叶水提取物各萃取组分的乙酰胆碱酯酶抑制活性相对偏低。

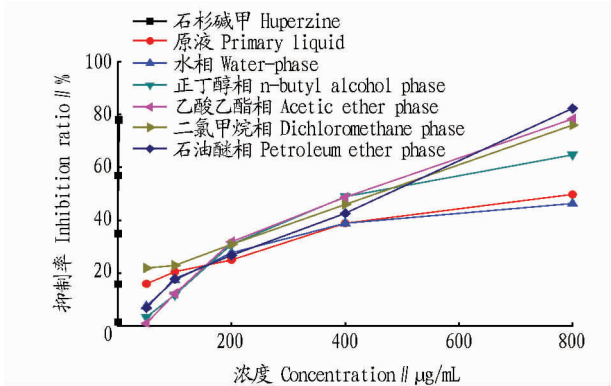


图 2 7 个样品对乙酰胆碱酯酶抑制曲线

Fig.2 Acetylcholinesterase inhibition curve of 7 samples

表 1 7 种样品对乙酰胆碱酯酶抑制活性及 IC₅₀ 值

Table 1 Acetylcholinesterase inhibition activity of 7 samples and IC₅₀ value

样品 Samples	抑制率 Inhibition ratio// %				IC ₅₀ μg/mL
	2 μg/mL	100 μg/mL	400 μg/mL	800 μg/mL	
石杉碱甲 Huperzine	78.12	—	—	—	0.31
石油醚相 Petroleum ether fraction	—	17.94	42.65	82.28	371.12
二氯甲烷相 Dichloromethane fraction	—	23.53	46.62	76.69	344.02
乙酸乙酯相 Acetic ether fraction	—	12.35	48.72	78.32	369.27
正丁醇相 n-butyl alcohol fraction	—	11.88	48.95	64.80	440.01
水相 Water-phase	—	17.48	38.93	46.38	813.59
原液 Primary liquid	—	20.59	38.93	49.80	872.94

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平 Level	A(超声温度 Ultrasonic temp- erature) //℃	B(超声时间 Ultrasonic time) // min	C(超声功率 Ultrasonic power) //kHz
1	30	60	80
2	40	90	90
3	50	120	100

2 结果与分析

由表 2 可见,各因素对凹叶厚朴内生真菌代谢产物厚朴酚提取量的影响程度从大到小依次为 C、A、B,即超声功率是影响厚朴酚提取量的主要因素。凹叶厚朴内生真菌发酵液的最佳超声提取工艺条件为 A₃B₂C₂,即超声温度为 50℃、超声时间为 90 min、超声功率为 90 kHz。然而由于因素 B 中各均值数值相差不大,且超声提取时间过长导致温度升高,影响厚朴酚含量;另外,超声波提取功率越高对细胞的破坏越彻底,内生真菌代谢产物提取量越多,综合分析考虑确定最佳超声提取功率为 100 kHz。最终确定最优提取工艺为超声温度 50℃、超声时间 60 min、超声功率 100 kHz。

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal test

试验号 Test No.	A	B	C	厚朴酚含量 The content of magnolol//mg/mL
1	1	1	1	0.002 845
2	1	2	2	0.004 818
3	1	3	3	0.002 412
4	2	1	2	0.003 551
5	2	2	3	0.003 920
6	2	3	1	0.003 363
7	3	1	3	0.005 007
8	3	2	1	0.002 959
9	3	3	2	0.004 405
k ₁	0.034	0.038	0.031	
k ₂	0.036	0.039	0.043	
k ₃	0.041	0.034	0.038	
R	0.007	0.050	0.012	

3 结论与讨论

试验结果表明,超声波法提取凹叶厚朴内生真菌代谢产物最佳超声提取工艺为超声温度 50℃、超声时间 60 min、超声功率 100 kHz。在对菌丝体的提取时,采用了超声波萃取技术。超声功率是影响厚朴酚含量最大的因素,这是因为超声波在工作时,通过振动、空化效应加快相之间的传质速度,使有效成分和溶剂的交互作用增强,使有效成分更充分地溶入溶剂,提高有效成分的提取效果。

在对菌丝超声时,因实验室超声波清洗仪的规格原因,在仪器工作一段时间后,很明显出现温度上升的趋势,经过多次试验测量,结果表明在 60 min 之内,超声波清洗仪内水的温度均高出预设温度 5~7℃,因此,在试验过程中设置温度时均比正常的试验温度低 5~7℃,且使仪器每工作 20 min,间隔 10 min,更好地控制变量对试验结果的影响,控制试验结果的准确性。

在试验中,对菌液进行等量的乙酸乙酯萃取 3 次,使得菌液中含有的有效成分充分地融入乙酸乙酯相中。每次发酵液中菌丝体的量不是很多,相比菌液的量明显很少,且在提取菌丝体时,仅以等量的乙酸乙酯超声萃取 1 次。可见,原本就不多的菌丝体含量相比菌液显得微不足道。因此,前人在研究各种内生真菌的发酵液时,有的直接就舍弃了菌丝体的提取。该试验不但研究菌丝体,且研究用超声萃取技术提取菌丝体的最佳提取工艺。

参考文献

[1] 斯金平,童再康,曾燕如,等. 厚朴种质资源评价与利用研究[J]. 中药材,2002,25(2):79-81.
[2] 王兴红. 内生真菌与天然产物研究进展[J]. 中草药,2007,38(1):140-143.
[3] 马昭,唐承晨,张纯,等. 内生菌与宿主植物关系对中药材道地性研究的启示[J]. 上海中医药大学学报,2015,29(6):4-11.
[4] 杨海麟,吕霞付,杨胜利,等. 超声波在生物发酵工程中的应用[C]//中国生物工程学会. 中国生物工程学会第三次全国会员代表大会暨学术讨论会论文摘要集. 北京:中国生物工程学会,2001:1.
[5] 庞蕾,严铸云,郭晓恒,等. 厚朴内生真菌的研究(I):菌种分离及其鉴定[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):2013-2014.
[6] 全保慧,关铭. 厚朴内生真菌的分离鉴定及药理学活性的分析[J]. 湖南中医药大学学报,2009,29(7):36-40.

(上接第 121 页)

3 结论

对萝卜叶中不同萃取组分及其 AChE 抑制活性进行研究,以石杉碱甲为对照品,对萝卜叶中 6 个不同萃取组分的乙酰胆碱酯酶抑制活性进行试验。结果表明,6 个组分样品均表现出一定的 AChE 抑制活性,其 AChE 抑制活性与其样品浓度均表现出一定的浓度依赖关系。由 6 个不同萃取组分样品的 IC₅₀ 值可知,其抑制 AChE 的活性从大到小为二氯甲烷组分、乙酸乙酯组分、石油醚组分、正丁醇组分、水相、萝卜叶水提原液。由此可见,萝卜叶具有较好的 AChE 抑制活性,同时为萝卜叶中 AChE 抑制活性成分的跟踪分离提供试验依据。

参考文献

[1] 汪隆植,何启伟. 中国萝卜[M]. 北京:科学技术文献出版社,2005:1-6.
[2] 郑一美,周福富. 莱菔叶的药效应用及有效成分的提取分离研究[J]. 亚太传统医药,2008,4(11):49-50.
[3] 张明,李盾,陈仪本,等. 乙酰胆碱酯酶分子生物学研究进展[J]. 农药,2006,45(1):8-11.
[4] 杨建红,陶媛媛,张云梅,等. 药用植物中乙酰胆碱酯酶抑制剂研究进展[J]. 云南化工,2006,33(6):78-82.
[5] 张翼,冯妍,李晓明,等. 海藻组分抑制乙酰胆碱酯酶活性研究[J]. 海洋与湖沼,2005,36(5):459-464.
[6] ELLMAN G L,COURTNEY K D,ANDRES V,Jr,et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochem Pharmacol,1961,7(2):88-95.
[7] 殷帅文,刘丽萍,王安萍,等. 17 种植物不同溶剂萃取物乙酰胆碱酯酶抑制活性研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(10):293-296.