

亲和超滤质谱技术在 中药活性成分筛选中的研究进展

周 慧¹, 王义民¹, 郑 重², 刘 舒², 刘志强²

(1. 吉林大学珠海学院, 广东 珠海 519041;
2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022)

摘要:亲和超滤质谱技术是20世纪90年代中期发展起来的一种快速、简单、有效的药物小分子发现模式。该技术利用配体与受体之间特异性结合,通过超滤装置快速筛选活性小分子化合物,再结合液相色谱-质谱联用技术(LC-MS),鉴定活性成分结构。亲和超滤质谱技术集药物活性成分筛选、结构鉴定于一体,尤其适用于从复杂体系中筛选潜在的活性小分子化合物。近年来,针对中药发挥药理作用具有多组分、多靶点的重要特点,亲和超滤质谱技术已被广泛用于从中药提取物中筛选与特定蛋白靶点相结合的小分子活性物质,对阐明中药药效的物质基础和以活性成分作为先导化合物的新药开发具有重要意义,是对传统药物发现方法的有利补充。本工作综述了该技术在中药活性成分筛选中的原理、特点、应用进展,以及对未来的展望。

关键词:亲和超滤质谱(AUF-MS);中药;靶蛋白;活性成分筛选;高通量

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2018)06-0641-12

doi: 10.7538/zpxb.2018.0033

Recent Advances of Affinity Ultrafiltration Mass Spectrometry in Screening Active Components of Traditional Chinese Medicine

ZHOU Hui¹, WANG Yi-min¹, ZHENG Zhong², LIU Shu², LIU Zhi-qiang²

(1. *Department of Chemistry and Pharmacy, Zhuhai College of Jilin University, Zhuhai 519041, China;*
2. *Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry,*
Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract: Affinity ultrafiltration mass spectrometry (AUF-MS) technology is a rapid, simple and effective method for the discovery and development of small active molecule in traditional Chinese medicine (TCM). This technology was initially developed in the middle of 1990s, which was introduced to target-oriented drug discovery. Through the ligand-receptor specific binding characteristics, the affinity ultrafiltration device can facilitate the rapid screening of small-molecule ligands from the complex extracts, and

收稿日期: 2018-03-27; **修回日期:** 2018-05-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(81403077); 吉林省科技发展计划国际科技合作项目(20170414008GH); 广东省自然科学基金博士启动项目(2014A030310494)资助

作者简介: 周 慧(1982—), 女(汉族), 吉林长春人, 副教授, 从事质谱分析研究。E-mail: zhouhuimslab@163.com

网络出版时间: 2018-09-12; **网络出版地址:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20180911.1025.004.html>

high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) assists in the structural identification of potentially active small drug molecules. Thus, AUF-MS has become a powerful tool for identifying bioactive molecules from complex chemical matrices. The general workflow of AUF-MS is not complicated; depending on the molecular weight cut-off of the semi-permeable membrane, the ligand-bound protein complexes are retained by the membrane under centrifugal force to separate the bound and unbound components of the analyte. Bound ligands are eluted from the ultrafiltration membrane by destabilizing the target-ligand complex with an organic solvent or pH change, and then the ligands are consequently subjected to analysis by LC-MS to identify and characterize the low molecular weight compounds that interact with target molecules. The classic strategies of screening active ingredients from natural product, such as the high-throughput screening methods based on ultraviolet fluorimetric or radioactive detection, the traditional phytochemical screening procedure (i. e. isolation, structure elucidation and bioactivity test), are not able to meet the urgent need of contemporary pharmacology research due to its time consumption and a high rate of false positive or negative results. In comparison with those methods, AUF-MS is easier to be operated without unnecessary isolation or purification of inactive compounds and directly screen bioactive ingredients from the Chinese herb. Also, only modest amounts of target proteins are required, which are no labeling or immobilization. AUF-LC-MS was employed to identify inhibitors of enzymes such as α -glucosidase, xanthine oxidase, neuraminidase from Chinese herb medicine. The results showed that AUF-MS performed better reproducibility and more tolerance of interferences than classic strategies for certain targets. In this review, Firstly, a brief introduction was exhibited about the general procedures of AUF-MS, and the key factors affecting the result of AUF-MS, including the selection of ultrafiltration membrane and dissociation, the dose of receptors. Secondly, the recent applications of AUF-MS to screen potential bioactivity small molecules from the natural product in the past ten years were summarized. These results based on AUF-MS to screen active compounds were expected to be valuable for discovering drug molecules candidates from TCM and efficiently designing drugs for prevention and the treatment of diseases. Finally, the future prospects of AUF-MS were also presented. AUF-MS technology is expected to provide new research ideas for the screening of active components from TCM.

Key words: affinity ultrafiltration mass spectrometry (AUF-MS); Chinese herbal medicine; target protein; active components screening; high throughput

中药活性成分筛选研究是中药现代化的重要组成部分,也是实现中药“走出去”的必经之路。较之传统的人工合成药物设计模式,中药化学成分的多样性使其在新药研发方面体现出较大优势。从中药成分中筛选得到的活性物质往往结构新颖、疗效高、不良反应少,既可以直接开发为新药,也可以作为先导化合物进行结构修饰与优化后成为一代新药^[1],现已成为制

药工业中新药研究的来源之一。根据文献^[2]报道,在过去 30 多年时间里,超过 50% 已批准上市的药物直接或间接来源于天然产物。因此,以中药为来源的药物活性成分筛选受到新药研发工作者的推崇。

传统的中药活性成分筛选模式主要以多次提取、分离为基础,其基本思路是利用体外药效评估对提取分离的每一阶段组分进行活性评

价,追踪其活性组分,然后继续追踪活性显著组分,直至获得活性单体成分。但这种研究策略往往实验周期长、工作量大,无法实现大规模、高通量筛选,而且该筛选模式忽略了中药多成分、多靶点、协同作用的特点,导致筛选出的一些药物药用效果较差^[3]。因此,基于疾病靶点的、以活性为导向的高通量筛选研究十分必要。

近年来,随着“精准医疗”计划的提出,传统的药物研究模式已经转向了“精准”靶向药物分子设计策略^[4-5]。以靶标-配体精确相互作用为理论基础,通过药物活性成分与疾病相关的特定生物靶点相互作用,发现对靶蛋白具有亲和力、特异性强的小分子配体。亲和超滤质谱(affinity ultrafiltration mass spectrometry, AUF-MS)筛选技术符合精准医疗时代下靶向药物研究的需求,其利用小分子药物配体和靶标之间特异性结合的特性,将具有潜在活性的小分子化合物的混合物与靶蛋白混合,得到靶标-配体复合物和未结合的小分子,通过超滤装置将未结合的小分子滤除后,将靶标-配体复合物解离,释放出与靶蛋白结合的活性成分,再利用液相色谱-质谱(HPLC-MS)技术分析活性化合物^[6]。该技术可针对特定的疾病靶标进行全面、客观的筛选,获得的天然配体具有药理活性显著、靶向清晰、机制明确等特点,可作为新药研发中具有临床开发价值的候选化合物。由于利用该方法进行筛选时,可洗掉大量无活性的化合物,加快了活性化合物的解析速度^[7-8]。

特别是随着 HPLC-MS 技术在分子质量检测范围、灵敏度等方面性能的提高,使得亲和超滤质谱技术从复杂中药体系中筛选和鉴定活性成分的优势更加明显。

本工作将从亲和超滤质谱技术在中药活性成分筛选中的原理、特点、应用进展等方面进行综述。

1 亲和超滤质谱概述

1.1 基本原理和分类

亲和超滤是利用已知靶蛋白(受体)与未知体系小分子(配体)特异性地结合,通过超滤膜对不同大小物质选择性的差异实现活性物质的快速分离和筛选。具体操作为:首先,将待筛选体系与选定的靶蛋白进行孵育,使得有亲和活性的小分子与靶蛋白活性位点特异性结合形成受体-配体复合物,没有亲和活性的化合物则游离出来^[9]。然后,利用超滤膜的选择透过性,用缓冲液将未与靶蛋白结合的化合物洗脱下来,将超滤膜截留下来的复合物用一定比例的有机溶剂处理,或者改变体系的 pH 值使受体蛋白变性,释放出小分子配体。最后,利用 HPLC-MS 技术快速分析和鉴定小分子活性物质,其原理示于图 1。

亲和超滤技术分为脉冲超滤和离心超滤^[11]。两者筛选小分子活性物质的基本原理相同,均是通过半透膜的选择特异性达到富集配体的目的^[12-13]。脉冲超滤的操作单元由超滤

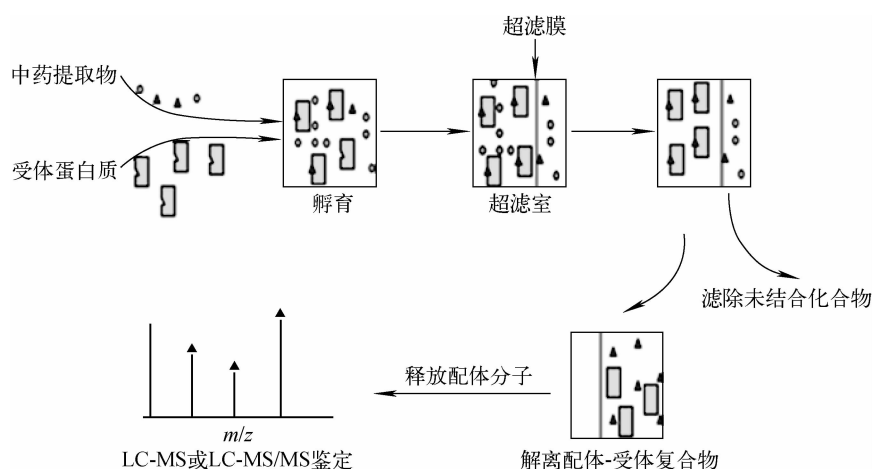


图 1 超滤质谱技术工作原理示意图^[10]

Fig. 1 Scheme of ultrafiltration mass spectrometry^[10]

室(分为上室和下室)、磁力搅拌器和超滤膜组成^[14],脉冲超滤室的两室之间被超滤膜隔开。脉冲超滤的基本筛选过程为:将受体-配体的混合物置于超滤膜上,通过施加一定的压力,选择与受体有一定亲和能力的配体,再通过HPLC-MS法对选择得到的配体进行结构鉴定。在脉冲超滤中,可以根据受体-配体混合液体积选择超滤室的大小,还可对超滤室进行控温,以优化受体-配体反应温度^[15]。离心超滤则采用商品化的超滤离心管,通过离心筛选化合物,不需复杂的操作程序,且实验的重现性良好。但是,较之脉冲超滤,离心超滤过程中往往存在浓差极化现象,导致超滤膜的过滤速度降低,严重的会导致蛋白在膜表面吸附和沉积,从而影响游离药物的转运。离心超滤与脉冲超滤的差异决定了它们的应用范围不同。离心超滤不能与质谱在线联用,主要用于小分子化合物的筛选,应用范围小;脉冲超滤可以实现与质谱在线连接,适用于从组合化学库和天然产物库中筛选小分子物质,尤其在计算靶标和配体的结合常数及药物代谢研究方面优势明显^[15-16]。

1.2 亲和超滤质谱的特点和优势

传统的中药成分活性物质筛选研究模式通常是对中药化学成分进行提取、分离、结构鉴定,然后进行生物活性测定,确定有效成分。该分离筛选过程操作繁琐、耗时长、对环境不友好,而且容易造成一些微量潜在活性物质的丢失和大量假阳性结果的干扰^[17]。相比之下,亲和超滤质谱技术在筛选活性物质时具有操作简单、效率高、成本低等特点。

首先,亲和超滤所使用的靶分子用量少,且不需要经过固定化处理,经过有机溶剂处理和多次离心即可完成分离工作。这不仅简化了实验步骤,而且避免了蛋白受体经固定化处理带来的变性与失活。其次,由于蛋白受体和小分子配体是在天然溶液状态下进行反应的,不需要进行标记,因此能够保持蛋白的天然构象;同时,能够控制受体和配体的孵育温度,使其在接近生理条件下客观地反映药物小分子和生物大分子的相互作用。另外,超滤实验所需要的靶标用量少,尤其对于价格昂贵的蛋白靶分子,实验后经处理可重复使用,节约了实验成本。最

后,通过超滤装置与具有分离能力的色谱和具有结构鉴定能力的质谱联用,使活性化合物的筛选、分离、鉴定(定性与定量)成为一个连续的过程,实现了高通量、高效率筛选。随着更多类型质谱仪的出现,超滤质谱将会更大程度地满足不同药物活性成分结构鉴定的需要^[18]。

1.3 影响亲和超滤质谱分析的关键因素

在超滤筛选实验过程中,为了减少假阳性或假阴性结果的干扰,获得理想的实验数据,实验设计时必须考虑以下因素:超滤膜的选择、受体的使用剂量、解离液的选择等。

1.3.1 超滤膜的选择 在亲和超滤过程中,超滤膜的选择决定着筛选结果的准确与否。选择超滤膜一般需要遵循2个原则:1)在选择滤膜材质时应尽可能减少靶蛋白和配体与膜的非特异性吸附,目前应用较多的材质主要有再生纤维素、甲基纤维素、聚砜类、PEEK等。2)根据分子截留量的大小选择合适孔径的超滤膜,膜的孔径过小,容易造成膜的堵塞而产生高压,影响膜的过滤效率;膜的孔径过大,容易造成漏筛,同时降低了分子间的结构强度,易导致膜的破裂^[14,17]。根据以往的实验经验,超滤膜的截留分子质量应该小于靶蛋白分子质量的1/3,例如当靶分子分子质量为25 ku时,可以选择截留量为8 ku的超滤膜^[17]。

1.3.2 受体的使用剂量 实验中受体的使用剂量会在一定程度上影响筛选结果。在反应体系中,如果受体的浓度远大于配体,则所有潜在的配体都会与受体结合,从而产生假阳性结果;如果配体浓度远大于受体,则只有结合能力强的配体才能与受体结合,从而导致结合力弱的潜在活性物质被过滤掉,产生假阴性结果。通常来说,确定受体的使用剂量时,应尽量保证靶标与配体的浓度适中,且受体的浓度与结合能力最弱配体的 K_d 值近似相等^[15]。

1.3.3 解离液的选择 在配体和受体完成特异性结合后,影响筛选结果的关键是如何成功地将配体从复合物中解离出来,并尽可能减少非特异性吸附。目前,配体的解离方法主要包括向溶液中加入一定比例的有机溶剂或者加入酸碱溶液以改变体系pH值,使蛋白变性失活,释放出配体分子。

单一使用有机溶剂解离液可能会增加非特

异性吸附,造成假阳性结果,而使用含酸的有机溶剂则能够减少配体与超滤膜的非特异性结合。Nikolic 等^[19]考察了 80% 甲醇和 10% 甲醇+2% 醋酸分别作为洗脱液时,乙嘧啶、甲氧苄氨嘧啶、双嘧达莫这 3 种存在非特异性结合的物质被洗脱下来的响应信号强度,结果表明,使用 10% 甲醇+2% 醋酸解离液比 80% 甲醇解离液获得的假阳性信号明显降低。本课题组 Xu 等^[20]利用超滤技术从中药复方二妙丸中筛选黄嘌呤氧化酶抑制剂时发现,当选择含酸的甲醇-水洗脱液时(50:50, V/V, pH3.3),对比实验组和空白组的色谱图,非特异性结合物质的响应信号较低。因此,在进行超滤筛选时,为了在一定程度上减少非特异性结合,最好选择含酸的有机溶剂作为解离液。

1.3.4 其他影响因素 对于离心超滤,除了以上 3 个重要因素外,靶蛋白与被筛选物质的孵育时间、温度、漂洗次数、离心转速与次数等都会影响筛选结果。如果蛋白与被筛选样品的孵育时间过短,相互作用不充分,容易造成漏筛;若孵育时间过长,两者可能发生反应,活性位点结构发生改变,影响结果准确性;孵育温度的选取会影响蛋白酶的活性;离心转速与次数的选取会影响蛋白与配体间的相互作用。亲和超滤方法不能完全消除假阳性实验结果,即不能完全避免配体与靶蛋白的非特异性结合。因此,在进行超滤实验时,除了增加阴性对照组以减少假阳性结果外,还可在复合物解离前用缓冲液进行多次漂洗,以最大程度减少非特异性吸附。

2 亲和超滤质谱技术在中药活性成分筛选中的应用

中药作为大自然的分子宝库,为药物研发提供了丰富的化合物来源。目前,对于中药活性物质的研究主要以大规模提取分离为基础。首先,通过多步分离、纯化,获得单体化合物;然后,通过核磁、质谱等技术手段对其进行结构确认;最后,使用经典的动物、细胞模型进行生物学活性评价。这种研究策略往往实验周期长、工作量大,无法实现大规模、高通量筛选,而且难以分离和提纯具有潜在活性的微量成分。亲和超滤质谱技术不但简化了活性成分的分离、

纯化步骤,可使中药活性成分的筛选与结构鉴定一步完成,而且能够有效避免微量活性物质的漏筛和杂质干扰,可提高筛选结果的准确率,现已广泛用于中药活性成分研究。

本课题组运用亲和超滤质谱技术,从中药复杂体系中成功筛选出多种 α -葡萄糖苷酶抑制剂、黄嘌呤氧化酶抑制剂和神经氨酸酶抑制剂,并考察了中药提取物与生物大分子 DNA、人血清白蛋白的相互作用。Zhou 等^[21]利用离心超滤质谱技术成功地从刺五加叶中鉴定出 7 种具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的物质,包括 4 种黄酮类化合物、3 种酚酸类化合物。然后,利用体外酶活性测定方法进一步比较了刺五加叶提取物中各相关化合物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。结果表明,黄酮醇类糖苷与 α -葡萄糖苷酶的作用强度与糖配基的类型有关;咖啡酰奎宁酸类化合物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性不仅与咖啡酰基的数目有关,而且与咖啡酰基和奎宁酸基团连接的位点有关。Liu 等^[22]运用超滤筛选结合超高效液相色谱-电喷雾多级串联质谱(UPLC-DAD-ESI-MSⁿ)和傅里叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR-MS)技术成功地从丹参提取物中筛选出 12 种具有黄嘌呤氧化酶抑制作用的物质,并运用 Nikolic 等^[19]评价 COX-2 抑制剂抑制能力的计算公式,得到这 12 种配体的富集因子。研究表明,1,2-萘醌基团是抑制剂发挥抑制作用的重要结构,脂环上的咪喃和羟基取代可以不同程度增强抑制剂的抑制能力,这一结果可为研发治疗痛风的药物提供借鉴。

超滤质谱技术以快速、灵敏、高通量的特点被广泛应用于筛选中药提取物中的活性成分。但是,目前超滤质谱技术还存在一些不足,例如,化合物与目标靶蛋白的非特异性结合会导致假阳性结果,从而使筛选出的化合物表现出活性很弱或者完全没有活性。为减少假阳性结果,在超滤筛选时可以引入变性酶作为对照组。Yang 等^[23]分别以活性酪氨酸酶和变性酪氨酸酶为靶标进行了 2 个平行实验,采用 UPLC-DAD-MSⁿ 技术对实验组和对照组的滤液进行分析,从桑椹叶提取物中成功筛选鉴定出 12 种具有酪氨酸酶结合活性的物质,再通过体外酶活性实验进行验证,最后发现了槲皮素 D-吡喃葡萄糖苷和山奈酚 D-吡喃葡萄糖苷 2 种新的

酪氨酸酶抑制剂。

引入变性酶作为对照组虽然在一定程度上可以减少假阳性结果,但是,一些靶蛋白变性后溶解度会下降,影响筛选结果。为解决这一问题,Song等^[24]引入了靶蛋白酶活性位点阻断剂,从菊花中筛选并鉴定出4种黄嘌呤氧化酶抑制剂。非布索坦是黄嘌呤氧化酶的强效抑制剂,当其在复杂体系中与潜在的抑制酶共存时,能够与潜在配体在黄嘌呤氧化酶活性位点上产生竞争性结合,从而间接减少化合物和靶分子的过度结合。利用这一特性,通过比较添加了竞争性配体(非布索坦)的实验组和未添加非布索坦的对照组解离液的色谱图,发现具有潜在抑制活性的物质在实验组的色谱图中的峰高要明显低于对照组,实验过程示于图2。此实验结果表明,加入酶活性位点阻断剂可以有效减少非特异结合引起的假阳性结果,从而提高亲和超滤的准确性。在此基础上,该课题组将亲和超滤与分子芯片对接技术相结合,研究小分子与酶的相互作用,筛选潜在的天然酶抑制剂^[25]。具体筛选过程为:首先,利用亲和超滤质谱技术从提取物中筛选出小分子活性物质;其次,对筛选出的小分子活性物质进行结构改造,得到一系列新的化合物;最后,利用分子芯片对接技术模拟结构改造后的新化合物与靶分子之间的相互作用,预测它们的活性,并结合体外酶活性实验进行验证。该课题组将超滤与分子芯片对接技术应用于筛选中药复方制剂脉络宁注射剂中的黄嘌呤氧化酶(XOD)抑制剂成分,成功筛选并鉴定出3种能够与XOD特异性结合的活性成分。通过对筛选得到的3种成分进行结构优化,得到14种化合物,利用分子对接技术模

拟了此14种化合物与XOD的结合情况,通过预测这些物质的活性并结合体外酶活性实验,最终发现3,4-二咖啡酰奎宁酸甲酯和3,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯为XOD的强效抑制剂,且测得此二者的 IC_{50} 值低于已上市的抗痛风药别嘌醇。由此可见,利用超滤质谱技术不仅可以从中药提取物中直接筛选活性物质,还可以结合计算机模拟技术对已鉴定的活性物质进行结构改造形成组合化学库,从而进行二次筛选,可为高活性中药先导化合物的发现提供信息和思路。

线粒体不仅是细胞内能量合成的重要场所,还与氧自由基的产生、细胞死亡进程调控有关。早期研究表明^[26],帕金森病、阿尔茨海默氏症、糖尿病、肿瘤等疾病和衰老均与线粒体功能异常有关,因此,以线粒体为药理学靶点的药物筛选意义重大。不同于常见的以单一靶蛋白为靶标从复杂基质中筛选活性物质,Yang等^[27]通过离心超滤与液相色谱-质谱联用技术建立了以线粒体为靶向的生物活性筛选平台,并使用阳性对照组对该方法的适用性进行评价,优化了靶细胞器、样品浓度和孵育时间,成功地检测到19种生物活性化合物,并通过体外药理学实验证实其中9种物质能够与靶线粒体活性位点结合。杨兴鑫等^[28]应用基于线粒体的离心超滤-液相色谱-质谱法,从中药葛根和川芎中筛选得到了23种可与线粒体结合的活性化合物,并鉴定了其中17种化合物。在此基础上,采用体外药理学实验证实了7种化合物具有调节线粒体功能的作用。此外,研究人员还发现,洋川芎内A和3'-羟基葛根素可抑制HepG2细胞增殖,提高缺氧/复氧所致损伤的心肌细胞存活率。该研究结果可为深入阐释

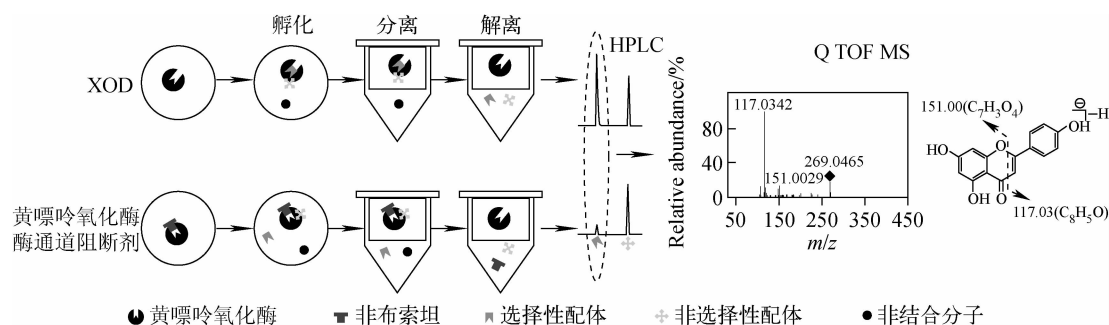


图2 加入非布索坦阻断剂的亲和超滤筛选示意图^[24]

Fig. 2 General workflow for AUF-MS screening method combined with febuxostat^[24]

中药治疗线粒体相关疾病的机理及开发线粒体靶向新药提供重要的科学依据。

有研究者将亲和超滤和代谢组学技术相结合进行了药物机制研究。Fu等^[29]应用基于高分辨质谱的代谢组学分析技术从甘草粗提物中发现了30种和22种分别能与埃博拉病毒核蛋白和马尔堡病毒核蛋白结合的配体,经混合物单体分离、单体活性测定法结合生物化学分析方法,最终确定18- β 甘草次酸和甘草查儿酮A能够显著降低病毒核蛋白的热稳定性并诱导形

成核蛋白寡聚体,且应用生化实验证实18- β 甘草次酸能有效阻止病毒RNA片段与埃博拉病毒核蛋白的结合。该研究结果揭示了中药甘草在抗病毒方面的作用机制,为抗病毒药物的开发提供了借鉴,并且为中药甘草相关的复方研究提供了实验数据。

近年来,亲和超滤质谱与细胞和生化实验相结合,已广泛应用于中药提取物活性物质筛选研究中。近6年来,亲和超滤质谱技术在中药有效成分筛选中的研究实例列于表1。

表1 亲和超滤质谱技术在中药活性成分筛选中的应用^[9,17]

Table 1 Application of AUF-MS to target-oriented drug discovery in screening active components of TCMs^[9,17]

靶标 Targets	分析物 Analytes	分析方法 Analytical methods	文献 References	
酪氨酸酶	桑叶	UPLC-DAD-MS ^a	23	
	甘草根	HPLC-DAD-ESI-ion trap MS	30	
	苍耳果实提取物	HPLC-DAD	31	
	α -葡萄糖苷酶	降香黄檀	HPLC-DAD-ESI-MS ^a	32
		黄连提取物	HPLC-DAD-ESI-MS ^a	33
		人参茎叶总皂苷	HPLC-DAD-ESI-MS ^a	34
		玉竹	HPLC-DAD, HPLC-Q/TOF MS	35
		黄芩	HPLC-DAD-ESI-MS	36
		竹节参	UHPLC-DAD-ESI-ion trap MS	37
		山竹果	HPLC-ESI-ion trap MS	38
		黄芩根提取物	HPLC-ESI-Q/TOF MS	39
银杏叶提取物		HPLC-DAD-ESI-ion trap MS	40	
番石榴叶茶	HPLC-ESI-TOF MS	41		
黄嘌呤氧化酶	丹参	UPLC-DAD-ESI-MS ^a , FT-ICR-MS	22	
	卷柏	HPLC-PDA-ESI-MS, UPLC-QqQ-MS	42	
	脉络宁注射液	HPLC-ESI-Q/TOF MS	25	
	菊花	HPLC-ESI-Q/TOF MS	24	
	珠子参	UHPLC-DAD-ESI-ion trap MS	43	
脂肪酶	五苓散、泽泻、小陷胸汤、小柴胡汤	HPLC-ESI-ion trap MS	44	
	铁皮石斛	HPLC-ESI-Q/TOF MS	45	
神经氨酸酶	复方板蓝根颗粒	HPLC-PDA-ESI-ion trap MS	46	
	黄芩	HPLC-DAD-ESI-ion trap MS	47	
	女贞子	UPLC-PDA-ESI-ion trap MS	48	
环氧合酶-2	生姜	HPLC-ESI-QqQ-MS	49	
	羌活、丹参、当归、独活等11种草药	HPLC-ESI-Q/TOF MS, HPLC-APPI-QqQ-MS	50	
	川乌	UPLC-DAD-ESI-ion trap MS	51	
人血清白蛋白	甘草	HPLC-ESI-Q/TOF MS	52	
	丹红注射液	HPLC-ESI-Q-TOF-HRMS	53	
环氧合酶-1	羌活、丹参、当归、独活等11种草药	HPLC-ESI-Q/TOF MS	50	
DNA	红车轴草	HPLC-ESI-ion trap MS	54	
乙醇脱氢酶	甘草	HPLC	55	

续表 1

靶标 Targets	分析物 Analytes	分析方法 Analytical methods	文献 References
芳香化酶	延胡索	HPLC-DAD-ESI-MS ^a	56
线粒体	虎杖、黄芩	HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS ^a	27
α -淀粉酶	山楂叶	HPLC-ion trap MS	57
过氧化物酶体增殖剂激活受体	艾叶	HPLC-ESI-QqQ-MS	58
蛋白酪氨酸磷酸酶 1B	中国红曲米	UPLC-ESI-Q-TOF-MS	59
乙酰胆碱酯酶	黄连根	HPLC-ESI-Q/TOF MS	60
5-脂氧合酶	防风、土茯苓、葛根和红花	HPLC-ESI-MS ^a	61
基质金属蛋白酶-2	土茯苓、菝葜和防风	HPLC-ESI-MS ^a	62
磷酸二酯酶	杜仲	HPLC-HSCCC-ESI-MS	63
马尔堡病毒	甘草	UPLC-ESI-Q/TOF MS	64
恶性疟原虫硫氧还蛋白和 谷胱甘肽还原酶	姜黄素类化合物	RRLC-ESI-Q/TOF MS	65
拓扑异构酶 I	臭李子	HPLC-ESI-MS/MS	66

3 结论与展望

中药发挥药理作用具有多成分、多靶点、协同作用的特点。因此,如何快速、一体化地实现中药多种活性成分筛选及鉴定是艰巨却意义重大的工作。基于靶标,以生物活性为导向的亲亲和超滤质谱技术的出现,提高了从复杂中药成分体系中识别目标成分的特异性和灵敏性,且能够实现大规模、高通量筛选,已被研究者广泛应用到特定靶标的活性物质筛选中。在未来的研究中,可考虑以超滤技术为核心,设计在线超滤池,通过将多个超滤池并联后与液相色谱串联,进一步实现样品的高通量超滤筛选。这样,超滤技术不但可用于研究 1 种药物与单一作用靶点或多个靶点的相互作用,还可研究多种药物与单一作用靶点或多个靶点的相互作用,符合中药治疗疾病的整体作用理论。此外,超滤技术也可用于研究中药小分子作用机制。随着超滤膜分离和高分辨质谱技术的发展,亲和超滤质谱技术将在中药活性成分研究,特别是高通量筛选方面发挥更大的作用。

参考文献:

- [1] 朱大元. 中药活性成分研究是中药现代化的重要组成部分[J]. 化学进展, 2009, 21(1): 24-29. ZHU Dayuan. Studies on active ingredients of TCM-The essential part of TCM's modernization [J]. Progress in Chemistry, 2009, 21(1): 24-29 (in Chinese).
- [2] 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): 1 582-1 614.
- [3] 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.
- [4] 展鹏, 王学顺, 刘新泳. “精准医疗”背景下的分子靶向药物研究-精准药物设计策略浅析[J]. 化学进展, 2016, 28(9): 1 363-1 386. ZHAN Peng, WANG Xueshun, LIU Xinyong. Contemporary molecular targeted drug in the context of “Precision medicine”: an attempting discussion of “Precision drug design” [J]. Progress in Chemistry, 2016, 28(9): 1 363-1 386 (in Chinese).
- [5] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. J Nat Prod, 2016, 79(3): 629-661.
- [6] 周慧, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 超滤质谱技术在药物小分子与生物靶分子相互作用研究中的应用进展[J]. 化学进展, 2010, 22(11): 2 207-2 214. ZHOU Hui, SONG Fengrui, LIU Zhiqiang, et al. Applications of ultrafiltration mass spectrometry in the studies on interaction between small drug molecule and biological target [J]. Progress in Chemistry, 2010, 22(11): 2 207-2 214 (in Chinese).

- Chinese).
- [7] 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]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 886: 98-106.
- [8] ZHANG G, GUO X H, WANG S S, et al. Screening and identification of natural ligands of tyrosinase from *Pueraria lobata Ohwi* by combination of ultrafiltration and LC-MS[J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(33): 4 858-4 862.
- [9] WEI H, ZHANG X, 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.
- [10] LIU D, GUO J, LUO Y, et al. Screening for ligands of human retinoid X receptor- α using ultrafiltration mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(24): 9 398-9 402.
- [11] CHEN C J, CHEN S, WOODBURY C P, et al. Pulsed ultrafiltration characterization of binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1998, 261(2): 164-182.
- [12] WHITLAN J B, BROWM K F. Ultrafiltration in serum protein binding determinations[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1981, 70(2): 146-150.
- [13] WIEBOLDT R, ZWEIGENBAUM J, HENION J. Immunoaffinity ultrafiltration with ion spray HPLC/MS for screening small-molecule libraries [J]. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(9): 1 683-1 691.
- [14] 赵宏艳,张勇忠,肖春玲. 亲和超滤 HPLC-MS 法的研究进展[J]. *药学学报*, 2009, 44(10): 1 084-1 088.
- ZHAO Hongyan, ZHANG Yongzhong, XIAO Chunling. Advance in the study of affinity selection ultrafiltration HPLC-MS[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2009, 44(10): 1 084-1 088 (in Chinese).
- [15] GEOGHEGAN K F, KELLY M A. Biochemical applications of mass spectrometry in pharmaceutical drug discovery[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2005, 24(3): 347-366.
- [16] GHOSH R, PAN S, WANG L J, et al. A pulsed tangential-flow ultrafiltration technique for studying protein-drug binding[J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102(8): 2 679-2 688.
- [17] 邬思琪,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]. *药学学报*, 2016, 51(7): 1 060-1 067.
- WU Siqi, YANG Hua, LI Ping. Application of the affinity ultrafiltration coupled with LC-MS technology in screening active components of traditional Chinese medicines[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2016, 51(7): 1 060-1 067 (in Chinese).
- [18] 王兆伏,宋凤瑞,刘志强,等. 质谱技术在中药小分子与生物大分子相互作用研究中的应用[J]. *质谱学报*, 2010, 31(3): 129-137.
- WANG Zhaofu, SONG Fengrui, LIU Zhiqiang, et al. Application of mass spectrometry in the study of binding interactions between small molecules in chinese medicinal herbs and biomacromolecules[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2010, 31(3): 129-137 (in Chinese).
- [19] NIKOLIC D, HABIBI-GOUDARZI S, CORLEY D G, et al. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors using pulsed ultrafiltration mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(16): 3 853-3 859.
- [20] 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): 1 640-1 645.
- XU Chen, LIU Shu, LIU Zhiqiang, et al. Screening of xanthine oxidase inhibitors in traditional Chinese herbal formulae ermiaowan using ultrafiltration UPLC-MSⁿ [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2014, 35(8): 1 640-1 645 (in Chinese).
- [21] ZHOU H, XING J P, LIU S, et al. Screening and determination for potential alpha-glucosidase inhibitors from leaves of *Acanthopanax senticosus* harms by using UF-LC/MS and ESI-MSⁿ [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23(4): 315-323.
- [22] 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 923-924(4): 48-53.
- [23] 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(6): 87-95.
- [24] 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]. *Journal Chromatography B*, 2014, 961: 56-61.
- [25] 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): 1 494-1 497.
- [26] MURPHY M P, SMITH R A. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, 41(2 000): 235-250.
- [27] 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, 1 413: 33-46.
- [28] 杨兴鑫,周瑜珍,徐凤,等. 基于线粒体的离心超滤/液相色谱/质谱法筛选中药线粒体靶向活性成分[EB/OL]. 北京:中国科技论文在线[2017-07-10]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201707-29>.
- [29] FU X, WANG Z H, Li L X, et al. Novel chemical ligands to ebola virus and marburg virus nucleoproteins identified by combining affinity mass spectrometry and metabolomics approaches[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 1-13.
- [30] LIU L L, SHI S Y, CHEN X Q, et al. Analysis of tyrosinase binders from *Glycyrrhiza uralensis* root: evaluation and comparison of tyrosinase immobilized magnetic fishing-HPLC and reverse ultrafiltration-HPLC[J]. *Journal of Chromatography B*, 2013, 932(Suppl C): 19-25.
- [31] 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]. *Journal of Chromatography B*, 2015, 1 002(Suppl C): 319-328.
- [32] ZHAO C F, LIU Y Q, CONG D I, et al. Screening and determination for potential alpha-glucosidase inhibitory constituents from *Dalbergia odorifera* T. Chen using ultrafiltration-LC/ESI-MSⁿ [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(12): 1 621-1 629.
- [33] 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*, 2014, 27(6): 2 007-2 012.
- [34] 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]. *分析化学研究报告*, 2013, 41(11):1 694-1 698.
- HE Zhongmei, WANG Xiaohui, LI Guofeng, et al. Screening and structures characterization of α -Glucosidase inhibitors from total saponins of ginseng stems and leaves by ultrafiltration LC-MSⁿ[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(11): 1 694-1 698(in Chinese).
- [35] ZHOU X I, 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]. *Journal of Chromatography B*, 2015, 985(Suppl C): 149-154.
- [36] ZHAO H D, ZHANG Y P, GUO Y, et al. Identification of major α -glucosidase inhibitors in Radix Astragali and its human microsomal metabolites using ultrafiltration HPLC-DAD-MSⁿ [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 104: 31-37.
- [37] 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): 2 014-2 023.
- [38] 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): 2 322-2 325.

- TANG Ying, LIU Chunming, REN Junqi, et al. Screening of α -glucosidase and xanthine oxidase inhibitors from *Garcinia mangostana* extract using ultrafiltration HPLC-ESI-MS [J]. *LiShiZhen Medicine and Materia Medica Research*, 2015, 26(10): 2 322-2 325(in Chinese).
- [39] YANG J R, LUO J G, KONG L Y. Determination of α -glucosidase inhibitors from *Scutellaria baicalensis* using liquid chromatography with quadrupole time of flight tandem mass spectrometry coupled with centrifugal ultrafiltration [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2015, 13(3): 208-214.
- [40] 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.
- LIU Yang, ZHOU Hui, LIU Shu, et al. Screening of α -glucosidase inhibitors in *Ginkgo biloba* extract using ultrafiltration LC-ESI-MSⁿ [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2013, 34(4): 813-818(in Chinese).
- [41] 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): 1 576-1 582.
- [42] 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): 7 379-7 387.
- [43] LI S N, TANG Y, LIU C M, et al. Development of a method to screen and isolate potential xanthine oxidase inhibitors from *Panax japonicus* var *via* ultrafiltration liquid chromatography combined with counter-current chromatography [J]. *Talanta*, 2015, 134: 665-673.
- [44] 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]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 104(Suppl C): 67-74.
- [45] 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]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(20): 6 081-6 093.
- [46] 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(1): 96-101.
- [47] 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(11):1 570-1 574.
- LIU Shu, XING Junpeng, YAN Jun, et al. Screening and structures characterization of neuraminidase inhibitors from Radix *Scutellaria* extract by ultrafiltration LC-MSⁿ [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2011, 69(11): 1 570-1 574 (in Chinese).
- [48] 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]. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1 083: 102-109.
- [49] VAN BREEMEN R B, TAO Y, LI W K. Cyclooxygenase-2 inhibitors in ginger (*Zingiber officinale*) [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(1): 38-43.
- [50] CAO H M, YU R, CHOI Y S, et al. Discovery of cyclooxygenase inhibitors from medicinal plants used to treat inflammation [J]. *Pharmacological Research*, 2010, 61(6): 519-524.
- [51] ZHU H B, LIU S, LI X, et al. Bioactivity fingerprint analysis of cyclooxygenase-2 ligands from Radix *Aconiti* by ultrafiltration-UPLC-MSⁿ [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(23): 7 437-7 445.
- [52] 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*, 2015,34(3):25-28.
- WANG Xian, YU Hua, PAN Ziang, et al. Study on the interaction between human serum albumin and licorice extracts by ultrafiltration mass spectrometry [J]. *Journal of South-Central University for Nationalities*, 2015, 34(3): 25-28 (in Chinese).

- [53] 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]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 134: 100-107.
- [54] 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.
MA Lei, WANG Zhaofu, CHEN Lina, et al. Screening DNA binders from isoflavone extracts of red clover by centrifugal ultrafiltration-LC-MSⁿ[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2013, 34(2): 331-335(in Chinese).
- [55] 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 high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Separation Science, 2014, 37(13): 1 546-1 551.
- [56] 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): 3 556-3 566.
- [57] 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]. 分析化学研究报告, 2013, 41(2): 229-234.
TAO Yi, CHEN Zhui, ZHANG Yufeng. Characterization of α -Amylase binding agents from Hawthorn leaf using ultrafiltration and liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(2): 229-234(in Chinese).
- [58] 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): 13 753-13 763.
- [59] 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, 2016, 8(2): 353-361.
- [60] ZHAO H Q, ZHOU S D, ZHANG M M, et al. An in vitro AChE inhibition assay combined with UF-HPLC-ESI-Q-TOF/MS approach for screening and characterizing of AChE inhibitors from roots of *Coptis chinensis* Franch[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 120: 235-240.
- [61] 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]. Journal of Functional Foods, 2016, 24: 244-253.
- [62] 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]. Journal of Functional Foods, 2015, 15(1 117): 389-395.
- [63] 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]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(12): 4 213-4 223.
- [64] 付旭,李利新,汪志华,等. 利用亲和质谱技术从中药材提取物中筛选马尔堡病毒核蛋白的小分子配体[J]. 南开大学学报, 2016, 49(5): 1-7.
FU Xu, LI Lixin, WANG Zhihua, et al. Ligand screening from TCM extracts against marburg virus nucleoprotein using affinity mass spectrometry[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 2016, 49(5): 1-7 (in Chinese).
- [65] MULABAGAL V, CALDERON A I. Development of binding assays to screen ligands for plasmodium falciparum thioredoxin and glutathione reductases by ultrafiltration and liquid chromatography/mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(13/14): 987-993.
- [66] CHEN G L, GUO M Q. Screening for natural inhibitors of topoisomerases I from *Rhamnus davurica* by affinity ultrafiltration and high-performance liquid[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8(1 521): 1-11.