

超滤-质谱技术在中药活性成分筛选中的应用进展

张 慧, 徐 聪, 吴媛媛, 田清华, 张 亚, 颜继忠*

浙江工业大学, 浙江 杭州 310014

摘 要: 超滤-质谱技术作为一种新兴的药物活性成分筛选方法, 具有操作简单、分析速度快、特异性强、高通量等特点, 在天然活性成分筛选中发挥着重要作用。以不同疾病相关的靶标为切入点, 综述了近年来超滤-质谱技术在中药提取物中快速筛选天然活性成分的应用进展。对超滤-质谱技术存在的一些不足和未来的发展进行总结和展望, 以期为相关研究提供一定的借鉴。

关键词: 超滤-质谱技术; 中药; 高通量; 天然活性成分; 靶标

中图分类号: R286.0 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)23-5712-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.033

Application of ultrafiltration-mass spectrometry in screening of active components in Chinese materia medica

ZHANG Hui, XU Cong, WU Yuan-yuan, TIAN Qing-hua, ZHANG Ya, YAN Ji-zhong

Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: As an emerging method for active ingredients screening, ultrafiltration-mass spectrometry (UF-MS) has the characteristics of simple operation, fast analysis, strong specificity, and high throughput. It plays an important role in the screening of natural active ingredients. In this paper, using the different disease-related targets as key point, the application of UF-MS in the rapid screening of natural active ingredients in Chinese materia medica extracts were reviewed. Combining the practice of the research group for many years, the deficiencies and the development of the UF-MS technology were prospected to provide a reference for related research.

Key words: ultrafiltration-mass spectrometry; Chinese materia medica; high throughput; natural active ingredients; targets

中药历史悠久, 是我国医药体系中独具特色的重要组成部分。作为一个巨大宝库, 中药防治疾病的物质载体是其所含有的化学成分群, 然而, 中药具有成分复杂、结构多样、分离困难等问题。如何快速筛选中药宝库中的活性成分, 发现潜在的天然候选化合物, 是中药新药开发的关键, 也是阐明中药药效物质基础及质量控制的关键。超滤-质谱技术 (ultrafiltration-mass spectrometry, UF-MS) 不仅能够快速筛选出中药中可以与配体相结合的活性成分, 而且能够测定不同靶标与天然活性成分间的相互作用, 适合在中药复杂体系中发现并筛选天然活性成分的研究。

本文以不同疾病的相关靶点为切入点, 结合本

课题组近年的研究, 对 UF-MS 技术在快速筛选中药活性成分中的应用进展进行综述。重点介绍了 2 型糖尿病的靶点 α -葡萄糖苷酶和醛糖还原酶 (aldose reductase, AR), 氧化应激的靶点黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD), 类风湿关节炎的靶点环氧化酶 (cyclooxygenase, COX)、5-脂氧合酶 (5-lipoxygenase, 5-LOX) 和基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 等。

1 UF-MS 技术原理简介

UF-MS 是一种基于质谱的亲筛方法, 利用超滤装置和质谱技术的串联, 能够有效地从中药体系中快速筛选出天然活性成分 (图 1)。UF-MS 是利用亲和原理, 使化合物混合溶液中加入的受体与

收稿日期: 2018-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603249); 中国博士后科学基金面上资助 (2018M632507)

作者简介: 张 慧, 博士, 讲师, 研究方向为中药活性成分筛选及中药质量评价。E-mail: zh889@zjut.edu.cn

*通信作者 颜继忠, 教授, 主要从事中药分离工程与中药质量控制方向的研究。Tel: (0571)88320984 E-mail: yjz@zjut.edu.cn

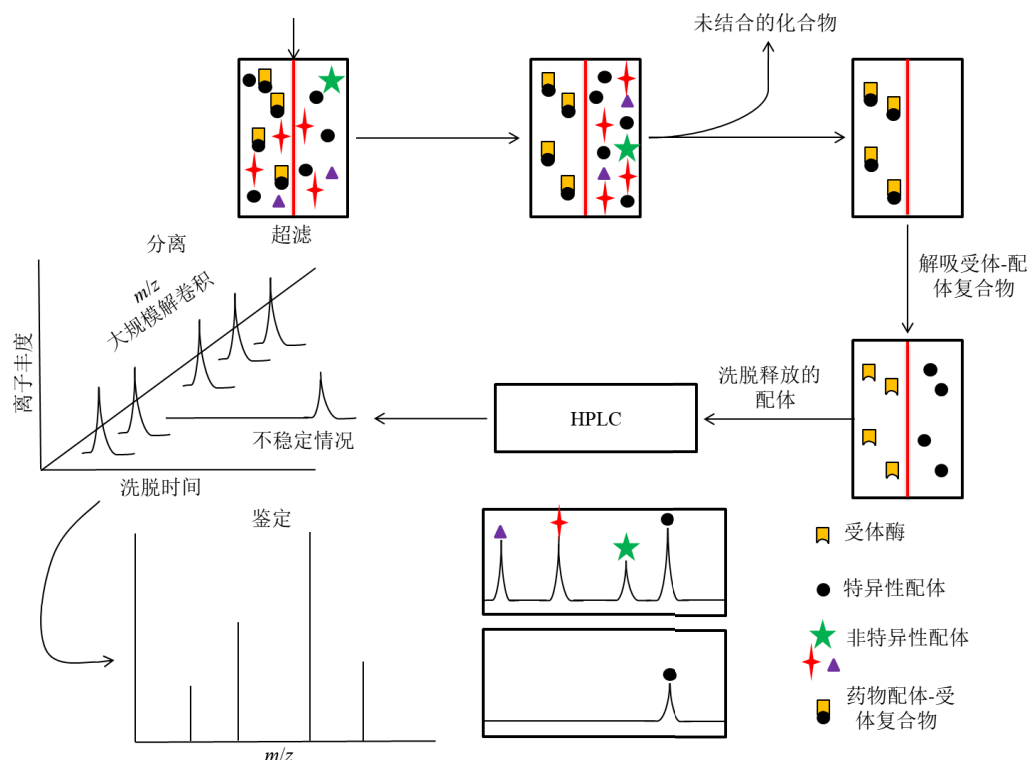


图 1 UF-MS 法的筛选原理示意图

Fig. 1 Screening principle of UF-MS

天然活性成分结合形成药物配体-受体复合物，复合物被超滤薄膜挡住，而未与受体结合的其他化合物通过超滤薄膜被除去。用有机溶剂处理复合物，将配体释放，通过液相-质谱（LC-MS）联用技术分析配体，从而实现复杂中药体系中天然活性成分的快速筛选。UF-MS 法应用于不同疾病相关靶点的活性成分筛选思维导图见图 2。

大部分实验室所使用的超滤技术为离心超滤，将超滤管中的样品进行离线处理后，再进行质谱分析。由于离心超滤的重复性较差，研究人员对该技术进行改进，发展了脉冲超滤-质谱（pulsed ultrafiltration-mass spectrometry, PUF-MS）技术，该技术是一种在线的亲亲和质谱筛选方法，最早由 van Breemen 等^[1]提出，并利用该方法成功地从 20 种腺苷类似物的组合化学库中筛选出了腺苷脱氨酶抑制剂。

2 UF-MS 在筛选 2 型糖尿病相关靶点活性成分中的应用

糖尿病属于中医“消渴病”的范畴，是以高血糖为特征的代谢疾病，其中 2 型糖尿病占本病群体的 95%，相关靶点主要有 α -葡萄糖苷酶、AR 和蛋

白酪氨酸磷酸酶 1B（PTP1B）等。

2.1 α -葡萄糖苷酶

α -葡萄糖苷酶是水解碳水化合物的关键酶，其能从低聚糖类底物的非还原端切开 α -1,4 糖苷键，释放出葡萄糖，升高血糖水平。而 α -葡萄糖苷酶抑制剂可以抑制 α -葡萄糖苷酶的活性，从而减少葡萄糖和 α -葡萄糖苷酶的特异性结合。

Zhou 等^[2]采用超滤-液相-质谱法（UF-LC-MS）从刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms 中鉴定出 8 种活性成分，并利用体外活性实验检测化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性，确定其中 7 种活性成分为 α -葡萄糖苷酶抑制剂。Yang 等^[3]采用离线 UF-MS 与液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱（LC-Q/TOF-MS/MS）联用技术，从黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 提取物中筛选出 5 种黄酮类化合物，且通过体外检测，确定这 5 种黄酮为 α -葡萄糖苷酶抑制剂。Zhao 等^[4]采用超滤-液相色谱-二极管阵列检测器串联质谱（UF-HPLC-DAD-MSⁿ）快速筛选黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 提取物中的 α -葡萄糖苷酶抑制剂，鉴定出 13 个异黄酮类化合物和 1 个单羟基化代谢异

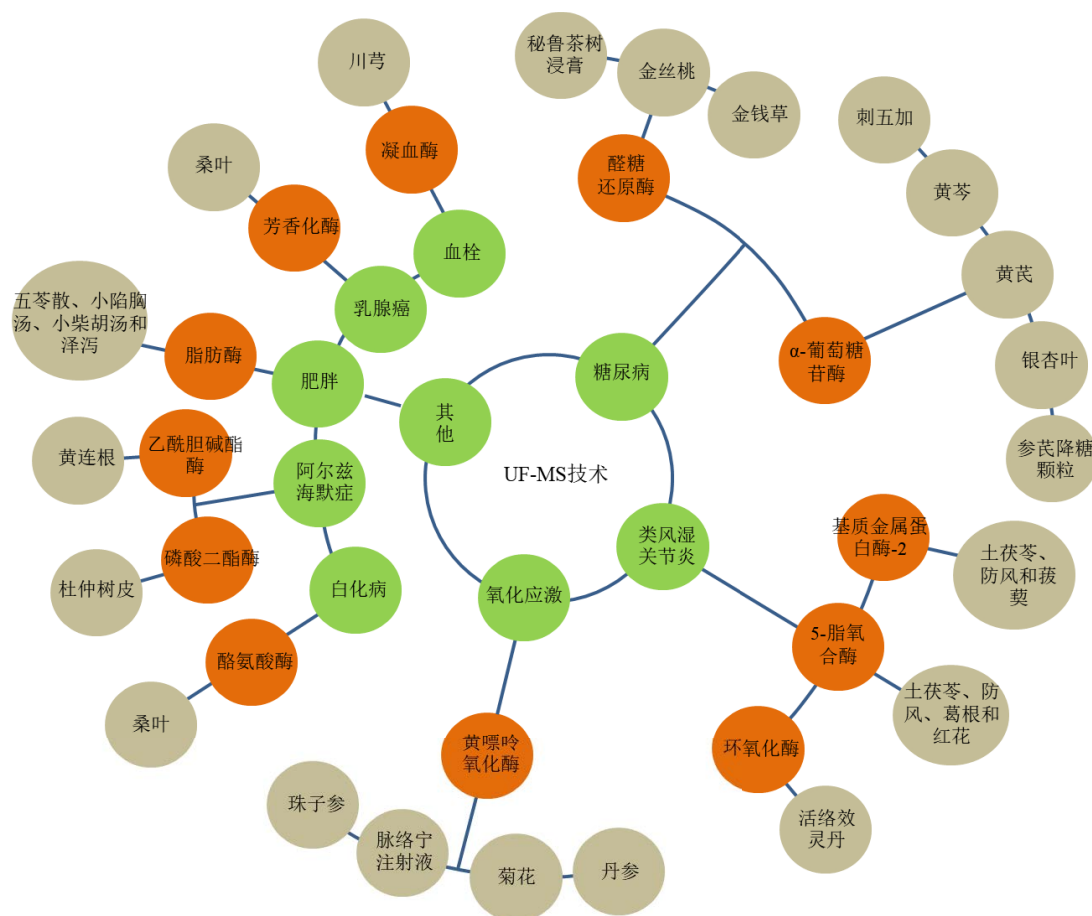


图 2 基于 UF-MS 法筛选不同疾病靶点活性成分的思维导图

Fig. 2 Mind map of screening active ingredients from different diseases targets based on UF-MS

黄酮类化合物,通过体外酶促反应证实 14 个化合物均有 α -葡萄糖苷酶抑制活性。Wu 等^[5]采用四极杆飞行时间质谱联用超滤液相色谱 (UF-LC-Q/TOF-MS) 法,以 α -葡萄糖苷酶为靶标,对银杏 *Ginkgo biloba* L. 叶中的活性成分进行筛选和鉴定,得到 11 种黄酮类化合物,并通过与阳性对照阿卡波糖对比,显示这 11 种化合物均为 α -葡萄糖苷酶抑制剂。Zhou 等^[6]采用超滤-高效液相色谱-质谱 (UF-HPLC-ESI-MS) 结合高速逆流色谱 (HSCCC) 技术从玉竹 *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce 中分离和鉴定出 9 种具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的化合物,其中 5 种为苯乙基肉桂酰胺类化合物,4 种为高异黄酮类化合物。本课题组采用 UF-LC-Q/TOF-MS 法,以 α -葡萄糖苷酶为参照,快速筛选出参芪降糖颗粒中的生物活性成分^[7]。结果鉴定出 18 种具有潜在 α -葡萄糖苷酶抑制活性的化合物,其中戈米辛 J 和戈米辛 D 显示出比其他活性化合物更强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,基于 α -葡萄糖苷酶靶标活性成分

的筛选见表 1。

2.2 AR

AR 是多元醇代谢途径的限速酶,与糖尿病慢性并发症有着密切的联系。而 AR 抑制剂可以在聚醇通路中阻止葡萄糖转化为山梨醇,使多元醇的量恢复正常,从而达到改善糖尿病并发症的目的。

Wang 等^[8]基于超滤-高效液相色谱-快速原子轰击电离质谱法 (UF-HPLC-FAB-MS),从金钱草 *Lysimachia christinae* Hance 中分离出 1 种新的 AR 抑制剂 1,5-二羟基-1,5-二-[(E)-3-(4-羟基苯基)-2-丙烯酸]-3-戊酮酯 (DHDP)。Wang 等^[9]研究了 24 种秘鲁茶树浸膏提取物的抗氧化性和 AR 抑制活性,采用超滤-高效液相色谱技术 (UF-HPLC) 从秘鲁茶树中鉴定出 3 种 AR 抑制剂。Quispe 等^[10]研究了 30 种秘鲁草药提取物中与糖尿病相关的体外靶标并成功运用超滤-离线高效液相色谱技术 (UF-offline HPLC) 从秘鲁金丝桃 *Hypericum laricifolium* Juss. 提取物中分离出 6 种活性成分,其中槲皮素在

表 1 不同疾病中各靶标的活性成分筛选

Table 1 Screening of active ingredients from various targets in different diseases

疾病	靶标	中药/复方	筛选方法	活性验证	活性成分	文献
2 型糖尿病	α -葡萄糖苷酶	刺五加	UF-LC-MS	体外酶活性检测	槲皮素、槲皮苷、金丝桃苷、1,5-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸	2
		黄芩	UF-LC-Q/TOF-MS/MS	体外酶活性检测	黄芩素-7- <i>O</i> -葡萄糖酸、5,6,7-三羟基黄酮、汉黄芩素、白杨素和千层纸素 A	3
		黄芪	UF-HPLC-DAD-MS ^a	体外酶活性检测	毛蕊异黄酮苷、红车轴草素-7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷、芳香膜菊素-7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、(6aR,11aR)-10-羟基-3,9-二甲氧基-紫檀素、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷-6''-醋酸酯、(3R)-2'-羟基 7,3',4'-三甲氧基异黄烷、3',6-二甲氧基-4'-羟基异黄酮-7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花黄素、(6aR,11aR)-3-羟基-9,10-二甲氧基-紫檀素、芳香膜菊素、isomucronulaton	4
		银杏叶	UF-LC-Q/TOF-MS	体外酶活性检测	杨梅素、槲皮素、芹菜素、山柰酚、丁香亭、异鼠李亭、阿曼托黄素、7-去甲基银杏双黄酮、银杏素、异银杏黄素、紫杉双黄酮	5
	玉竹		UF-HPLC-ESI-MS	体外酶活性检测	<i>N</i> -顺式阿魏酰真蛸胺、 <i>N</i> -反式-对-香豆酰基去甲辛弗林、 <i>N</i> -反式-阿魏酰真蛸胺、 <i>N</i> -反式-对-香豆酰酯胺、 <i>N</i> -反式-阿魏酰酯胺、(3R)-5,7-二羟基-3-(2',4'-二羟基苄基)-苯并二氢吡喃-4-酮、(3R)-5,7-二羟基-6-甲基-3-(4'-羟基苄基)-苯并二氢吡喃-4-酮、(3R)-5,7-二羟基-6-甲基-8-甲氧基-3-(4'-羟基苄基)-苯并二氢吡喃-4-酮、(3R)-5,7-二羟基-6,8-二甲基-3-(4'-羟基苄基)-苯并二氢吡喃-4-酮	6
		参芪降糖颗粒	UF-LC-Q/TOF-MS	体外酶活性检测	人参皂苷 F ₅ 、人参皂苷 Rc、芒柄花素、人参皂苷 Rb ₃ 、人参皂苷 Rh ₁ 、人参皂苷 Rd、三七皂苷 Fc、西洋参皂苷 L ₁₀ 、异五味子醇甲、人参皂苷 F ₂ 、前戈米辛、五味子酚、米辛 D、戈米辛 J、五味子醇甲和 3 种未知化合物	7
	AR	金钱草	UF-HPLC-FAB-MS	细胞内山梨醇检测	1,5-二羟基-1,5-二-[(<i>E</i>)-3-(4-羟基苄基)-2-丙烯酸]-3-戊酮酯	8
		秘鲁茶树浸膏	UF-HPLC	巨噬细胞中 NO 的生成和细胞活力测定	绿原酸、3,5-二- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸、1,3,5-三- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸	9
		秘鲁金丝桃	UF-offline HPLC	细胞活力测定	原儿茶酸、绿原酸、山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷、槲皮素、山柰酚、咖啡酸	10
氧化应激	XOD	珠子参提取物	UF-LC-MS	体外酶活性实验	24(R)-珠子参苷 R ₁ 、齐墩果酸-28- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷、竹节参皂苷 IVa、三七皂苷 Fe、人参皂苷 Rb ₂ 、人参皂苷 Rd	11
		丹参提取物	UF-LC-MS	—	丹参酮 II _B 、丹参二醇 B、丹参二醇 A、15,16-二氢丹参酮 I、1,2-二氢丹参酮 I、丹参新醌 B、隐丹参酮、丹参酮 I、3-羟基次甲丹参醌、亚甲基丹参醌、丹参酮 II _A	12
		菊花提取物	UF-LC-MS	微板法	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷、芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	13
		脉络宁注射液	UF-LC-MS	体外酶活性检测	异绿原酸 B、3,5-二反式咖啡酰奎尼酸	14

续表 1

疾病	靶标	中药/复方	筛选方法	活性验证	活性成分	文献
类风湿关节炎	COX	活络效灵丹	PUF-LC-MS	体外酶活性检测	洋川芎内酯 O、隐丹参酮、乙酰基-11-酮- β -乳香酸、 β -乳香酸、乙酰基-11-酮- α -乳香酸、乙酰基- β -乳香酸、桦木酸、苯乙基-反式-阿魏酸、栝楼酸	15
	5-LOX	防风、土茯苓、葛根和红花	UF-LC-ESI-MS ⁿ	体外酶活性测定	白藜芦醇、大豆黄素、脱水红花黄色素 B、亥茅酚苷	16
	MMP-2	土茯苓、防风和菝葜	UF-LC-ESI-MS ⁿ	体外酶活性检测	落新妇苷、黄杞苷、升麻苷、白藜芦醇、4'-O- β -D-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷	17
肥胖	脂肪酶	五苓散、小陷胸汤、小柴胡汤、泽泻	UF-HPLC-MS	脂肪酶功能测定	4-[O- α -呋喃芹菜糖基-(1" $\rightarrow$ 2')- β -D-吡喃葡萄糖] 苯甲醛、桔梗糖苷 F、2-羟基-十七烷-1,2,3-三羧酸、(2E,9Z)-N-(2-羟基-2-甲基丙基)-2,9-十五碳二烯-12,14-二炔酰胺、七里香苷甲、醋戊曲酯、垂盆草苷、刺罂粟碱、黄芩苷、5,7,2'-三羟基-8-甲氧基黄酮-7-O-D-葡萄糖醛吡喃糖苷、汉黄芩苷、5,7'-二羟基-8,2'-二甲氧基黄酮-7-O-D-葡萄糖醛吡喃糖苷和 2 种未知成分	18
阿尔茨海默病	AchE	黄连 <i>Coptidis Rhizoma</i> 根	UF-HPLC-ESI-Q-TOF/MS	体外 AchE 抑制测定法	非洲防己碱、药根碱、黄连碱、巴马汀和黄连素	19
	磷酸二酯酶	杜仲 <i>Eucommiae Cortex</i> 树皮	UF-HPLC-D AD-MS	放射性同位素程序	(+)-松脂醇-4,4'-二-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、(+)-松脂醇-4-O- β -D-吡喃葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷、(+)-桉皮树脂醇-4,4'-二-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、(+)-丁香脂素-4,4'-二-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、(-)-橄榄树脂素-4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、(-)-橄榄树脂素-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、(+)-松脂醇-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	20
白化病	TYR	桑叶 <i>Mori Folium</i>	UF-HPLC-DAD-MS	白藜芦醇和 EEM 对 TYR 的竞争性结合实验	新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-O-(6-O-丙二酰)- β -D-吡喃葡萄糖苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、紫云英苷、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、山奈酚-3-O-(6-O-丙二酰)- β -D-吡喃葡萄糖苷	21
血栓	THR	川芎 <i>Chuanxiong Rhizoma</i>	UF-LC-ESI-MS ⁿ	体外酶活性测定	新绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 J、洋川芎内酯 N	22
乳腺癌	芳香化酶	桑叶	UF-HPLC-ESI-MS	测量荧光素的荧光强度	芦丁、3,5,7,3',4'-五羟基-3-葡萄糖苷、紫云英苷、蒙古霉素 F、亚麻酸和 2 种未知化合物	23

所有酶分析中表现出最强的抗氧化活性，并确定为 AR 抑制剂。基于 AR 靶标活性成分的筛选见表 1。

3 UF-MS 在筛选氧化应激相关靶点活性成分中的应用

XOD 是生物体内嘌呤代谢过程的限速酶。在哺乳动物中，XOD 的功能异常所造成的高尿酸血症是痛风的主要原因，而 XOD 缺少会导致黄嘌呤尿症。

Sainan 等^[11]采用 UF-LC-MS 联合 HSCCC 从珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 提取物中快速筛选和分离出

6 种 XOD 抑制剂，并通过紫外、质谱和核磁共振等方法鉴定出化合物的化学结构。Liu 等^[12]采用 UF-LC-MS 从丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 提取物中快速筛选并鉴定 11 种亲脂性二萜类奎宁为 XOD 抑制剂，并测定化合物的结构和活性之间的关系，表明化合物的 1,2-萜醌基团对于 XOD 抑制活性是必需的，并且 1,2-萜醌基团上的呋喃和羟基可以在不同的水平上提高化合物的活性。课题组前期应用 UF-LC-MS 和酶通道阻断 (ECB) 相结合的方法，以 XOD 为生物靶分子，对菊花 *Chrysanthemum*

morifolium Ramar 提取物中的相关活性成分进行筛选,得到4种XOD抑制剂,并应用微板法测定其酶抑制活性^[13]。另外,采用UF-LC-MS从脉络宁注射液中快速检测和筛选出2种天然活性成分,通过体外活性检测,最终确定这2种活性成分为XOD抑制剂^[14]。基于XOD靶标活性成分的筛选见表1。

4 UF-MS在筛选类风湿性关节炎相关靶点活性成分中的应用

类风湿性关节炎属于中医“痹”的范畴,是一种以炎症为主的周期免疫疾病,主要症状包括关节肿痛,关节功能受损以及关节病变等,其靶点包括COX、Janus 激酶、MMP-2、脾酪氨酸激酶和5-LOX等。

Cao等^[15]应用脉冲超滤-液相色谱-质谱联用技术(PUF-LC-MS),以COX为靶标,从丹参中快速筛选和鉴定得到11种COX抑制剂,并通过体外活性检测每一种配体的半数抑制浓度(IC₅₀)。Zhao等^[16]采用UF-LC-ESI-MSⁿ从防风 *Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk.、土茯苓 *Smilax glabra* Roxb.、葛根 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 和红花 *Carthamus tinctorius* L. 中筛选得到5种天然活性成分,并通过与Brooks等^[24]测定的IC₅₀比较,确定4种天然活性成分为抑制5-LOX活性的主要成分。基于COX和5-LOX靶标活性成分的筛选见表1。

Li等^[17]利用UF-LC-ESI-MSⁿ从土茯苓、防风和菝葜 *Smilax china* L. 提取物筛选出5种MMP-2抑制剂。其中白藜芦醇和5-O-甲基维斯阿米醇苷对MMP-2具有最高的结合亲和力,并分别是菝葜和防风提取物的MMP-2活性的主要贡献者。

5 其他

除了上述不同疾病的相关靶标,UF-MS还可应用于针对脂肪酶、乙酰胆碱酯酶(AchE)和酪氨酸酶(TYR)等多个靶标活性成分的筛选(表1)。脂肪酶是一种催化脂肪(脂质)水解的酶,脂肪酶抑制剂通过激活人类胰脂肪酶(一种参与体内三酰甘油水解的关键酶)的催化活性来产生调脂作用,有助于控制或治疗一些肥胖症疾病;AchE是生物神经传导中的一种关键性酶,该酶能降解乙酰胆碱,保证了神经信号的正常传递,AchE抑制剂是目前治疗阿尔茨海默病的最有效方法;TYR是一种控制黑色素生成的限速酶。白化病是一种遗传学疾病,是由人体内TYR基因的突变导致TYR生成受损而产生;凝血酶(THR)是丝氨酸蛋白酶,THR与血

栓调节蛋白相互作用^[25],在血栓栓塞性疾病中发挥重要作用,直接THR抑制剂是一类重要的临床抗凝药物;芳香化酶是一种催化雄激素向雌激素转化的细胞色素P450酶,是乳腺癌治疗的重要目标。桑叶的主要活性成分之一黄酮类化合物已被证明是通过抑制芳香化酶的活性而成为乳腺癌的潜在治疗剂。

6 结语与展望

本文介绍了UF-MS的亲筛选原理,按照疾病分类对多种靶点活性成分的筛选进行综述。UF-MS作为一种新兴高通量筛选技术,不仅能够从复杂的体系中筛选出天然活性成分,而且能够保留溶液中天然蛋白质-配体相互作用,为从中药中快速筛选和鉴定活性成分提供了好的方法。当然UF-MS也存在一定缺陷,如何减少药物小分子与超滤膜的非特异性结合所产生的假阳性是目前难以解决的一大难点,并且如何缩短分析时间和提高分析效率也是一个重点。相信随着该技术的发展,存在的问题能够得到解决,进而得到更广泛地应用。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Zhou H, Xing J, 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.
- [3] 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]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(3): 208-214.
- [4] Zhao H, Zhang Y, 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*, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2014.09.029.
- [5] 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, doi: 10.1016/j.chroma.2016.01.062.
- [6] 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, doi: 10.1016/j.jchromb.2015.01.030.
- [7] Zhang H, Zhang X, Jiang H J, *et al.* Screening and identification of α -glucosidase inhibitors from Shenqi Jiangtang Granule by ultrafiltration liquid chromatography and mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(3): 797-805.
- [8] Wang Z, Hwang S H, Lim S S. Characterization of DHDP, a novel aldose reductase inhibitor isolated from *Lysimachia christinae* [J]. *J Funct Foods*, 2017, doi: 10.1016/j.jff.2017.07.057.
- [9] Wang Z, Hwang S H, Guillen Quispe Y N, *et al.* Investigation of the antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of extracts from Peruvian tea plant infusions [J]. *Food Chem*, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.107.
- [10] Quispe Y, Hwang S H, Wang Z, *et al.* Screening *in vitro* targets related to diabetes in herbal extracts from Peru: Identification of active compounds in *Hypericum laricifolium* Juss. by offline high-performance liquid chromatography [J]. *Inter J Mol Sci*, 2017, doi: 10.3390/ijms18122512.
- [11] Sainan L, Ying T, Chunming L, *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, doi: 10.1016/j.talanta.2014.12.005.
- [12] Liu Y, Liu S, Liu Z. Screening and determination of potential xanthine oxidase inhibitors from *Radix Salviae Miltiorrhizae* using ultrafiltration liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatography B*, 2013, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.02.009.
- [13] 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, doi: 10.1016/j.jchromb.2014.05.001.
- [14] 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*, 2015, 51(8): 1494-1497.
- [15] Cao H, Yu R, Choi Y, *et al.* Discovery of cyclooxygenase inhibitors from medicinal plants used to treat inflammation [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61(6): 519-524.
- [16] Zhao A, 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, doi: 10.1016/j.jff.2016.04.011.
- [17] Li L, Li B, Zhang H, *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, doi: 10.1016/j.jff.2015.03.038.
- [18] Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(28): 16603-16608.
- [19] Xiao S, Yu R, Ai N, *et al.* Rapid screening natural-origin lipase inhibitors from hypolipidemic decoctions by ultrafiltration combined with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2014.11.022.
- [20] Zhao H, Zhou S, Zhang 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 Pharmaceut Biomed*, 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2015.12.025.
- [21] 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.
- [22] Yang Z, Zhang Y, Sun L, *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]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 719(6): 87-95.
- [23] Zhang Q, Yang Y X, Li S Y, *et al.* An ultrafiltration and high performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterizing thrombin inhibitors from *Rhizoma Chuanxiong* [J]. *J Chromatography B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1061-1062: 421-429.
- [24] Brooks H B, Geeganage S, Kahl S D, *et al.* Basics of Enzymatic Assays for HTS [A] // Assay Guidance Manual [C]. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2012.
- [25] Sun F, Shen L, Ma Z, *et al.* Screening for ligands of human aromatase from mulberry (*Mori alba* L.) leaf by using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2011, 126(3): 1337-1343.