



王苗苗,韩飞,严欢,等.薰衣草提取物对乙酰胆碱酯酶的抑制作用[J].黑龙江农业科学,2019(8):124-127.

薰衣草提取物对乙酰胆碱酯酶的抑制作用

王苗苗,韩 飞,严 欢,张 倩,李慕春

(新疆维吾尔自治区分析测试研究院,新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要:为从薰衣草提取物中寻找潜在的治疗阿尔茨海默病的乙酰胆碱酯酶抑制剂。采用经乙醇提取,聚酰胺柱、HP20 树脂柱及制备液相分离纯化后,得到 30 个薰衣草提取物,测定其多酚含量,并以石杉碱甲为阳性对照,采用酶标仪测定 405 nm 处吸光度值以筛选其乙酰胆碱酯酶抑制活性并计算抑制率,分析二者相关性。结果表明:薰衣草提取物对乙酰胆碱酯酶表现出了不同的抑制作用(抑制率 3.00%~82.78%),其中 7 个提取物作用较为显著,抑制率均大于 50%;有 4 个提取物表现出了微弱的抑制作用(抑制率小于 10%);另外,近一半的薰衣草提取物多酚含量大于 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。薰衣草提取物具有乙酰胆碱酯酶抑制活性,表明其含有抑制乙酰胆碱酯酶的成分,经过相关性分析,多酚可能不是起主要作用的活性物质,为进一步跟踪分离活性成分奠定基础。

关键词:薰衣草提取物;乙酰胆碱酯酶;抑制剂;阿尔茨海默病;酶标仪

阿尔茨海默病(*Alzheimer's disease*, AD)俗称早发性痴呆症,是发生于老年和老年前期以进行性神经退化为特征的中枢神经系统变性性疾病,是大脑退行性病变,其主要临床表现为认知功能减退并伴有行为障碍和情绪异常等,严重者甚至失去生活自理能力^[1-2]。随着我国人口老龄化进程的加快,AD 发病率呈不断上升的趋势,严重威胁老年人的生命健康。AD 的发病机制十分复杂,目前多方面研究表明,AD 患者大脑内神经递质-乙酰胆碱的缺失是导致 AD 疾病的关键原因,AD 的病理与患者神经间隙中乙酰胆碱酯酶(Acetylcholin esterase, AChE)活性过高具有重要关系^[3-4]。因此乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI)药物是目前研究最多、使用最为广泛的抗早发性痴呆症药物^[5-6]。而天然植物药用成分具有疗效好、副作用小、作用面广、适宜长期服用等优点^[7]。因而,从药用植物中寻找具有抗早发性痴呆症的乙酰胆碱酯酶抑制剂,已成为当今医药研究方面的热点课题。

新疆伊犁是亚洲最大的薰衣草生产基地,薰衣草具有丰富的活性,但目前尚未被充分利用^[8]。有研究发现薰衣草对氯化铝所致阿尔茨海默(AD)斑马鱼的运动及反应恢复具有一定的作

用,但发生作用的物质基础尚不明确。为此,本研究以新疆薰衣草提取物为研究对象,通过乙酰胆碱酯酶(AChE)体外模型对分离到薰衣草提取物进行筛选,以期筛选到高效的 AChE 抑制剂,为治疗 AD 药物的开发提供新方向,为薰衣草资源的综合利用及芳香产业的发展奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试试剂 乙酰胆碱酯酶(AChE, Sigma 公司),碘化乙酰硫代胆碱(ATCI, Aladdin 公司),5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB, Aladdin 公司),石杉碱甲(huperzine A, Aladdin 公司),二甲基亚砷(DMSO, GR,天津市北联精细化学品开发有限公司),磷酸二氢钠(AR,天津市致远化学试剂有限公司),磷酸氢二钠(AR,天津市致远化学试剂有限公司),没食子酸(AR,成都市新都区木兰镇工业开发区),无水碳酸钠(AR,上海试剂四赫维化工有限公司),福林酚试剂(AR,天津市光复精细化工研究所);其余化学试剂均为国产分析纯,实验用水为去离子水;薰衣草(由伊犁紫苏丽人有限责任公司提供,经新疆分析测试研究院阿依古丽副研究员鉴定确认)。

1.1.2 仪器设备 酶标仪 I3X(MD 公司),制备液相色谱仪(日本岛津公司),碎样机(北京开创同和科技发展有限公司),电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),电热恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司),冷却水循环机(莱博科泰公司),实验室冷冻干燥机(德国 CHRIST),分析天平(梅特勒-托利多),联用型平行蒸发仪(BUCHI),紫外

收稿日期:2019-02-16

基金项目:新疆地产中药民族药新药研发培育项目(2017-02-07)。

第一作者简介:王苗苗(1988-),女,硕士,实验师,从事天然产物研究。E-mail:1445625495@qq.com。

通讯作者:李慕春(1978-),男,硕士,副研究员,从事天然产物研究。E-mail:164228718@qq.com。

分光光度计 UV-2700(日本岛津公司),超纯水系统(美国密理特公司),酶标板(Costar 公司)。

1.2 方法

1.2.1 薰衣草提取物的制备 取薰衣草干花适量,用碎样机粉碎,过筛,保存备用。称取粉碎后样品于锥形瓶,加入 70%的乙醇(料液比 1:10),80℃回流提取 1 h,过滤,重复提取 2 次,合并 2 次滤液,减压浓缩至无醇味,过聚酰胺柱,减压浓缩后冻干,称重;将冻干的过完聚酰胺柱的组分溶解后过 HP20 树脂柱,收集洗脱液,减压浓缩后冻干,称重,取该提取物加甲醇超声溶解,进制备液相,按时间收集,得 30 个组分,减压浓缩后冻干,称重;配置 1 mg·mL⁻¹ 溶液,放于 4℃冰箱保存备用,作为进行乙酰胆碱酯酶活性测定的样品溶液。

1.2.2 薰衣草提取物多酚含量的测定 标准曲线制备:各取不同浓度的没食子酸标准液 0.5 mL 于 10 mL 比色管中,加入 5 mL 10%的福林酚试剂,加入 3 mL 10%碳酸钠溶液,充分混匀,室温避光反应 90 min;在 765 nm 处测定吸光度值,以吸光度值(A)为纵坐标,以浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线。

样品测定:取待测样品溶液 0.5 mL,加入 5 mL 10%的福林酚试剂,加入 3 mL 10%碳酸钠溶液,混匀,室温避光反应 90 min;在 765 nm 处测定吸光度值。

1.2.3 薰衣草提取物对乙酰胆碱酯酶的抑制活性研究 参考文献^[9-11]方法,在 96 孔板中加人

160 μL 0.1 mol·L⁻¹ PB 缓冲液(pH7.4),10 μL 1 U·mL⁻¹ AChE 和 10 μL 待测样品溶液(1 mg·mL⁻¹),混匀,4℃放置 20 min。加入 10 μL 10 mmol·L⁻¹ DTNB 和 10 μL 10 mmol·L⁻¹ ATCI,37℃反应 20 min,用酶标仪测定 405 nm 处吸光度值。同时设立背景对照组和空白对照组。按下式计算酶活性抑制率。

抑制率(%)=[(A_{空白组} - A_{完全抑制组}) - (A_{样品} - A_{样品本底})]/(A_{空白组} - A_{完全抑制组}) × 100

其中,空白组用 10 μL PB 缓冲液(pH7.4)代替 10 μL 样品液,完全抑制组用 10 μL 石杉碱甲(1 mg·mL⁻¹)代替 10 μL 样品液,样品本底组用 10 μL PB 缓冲液(pH7.4)代替 10 μL AChE。

1.2.4 数据分析 试验数据采用 Microsoft Excel 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 薰衣草提取物多酚含量的测定

以没食子酸作为标准物测定标准曲线。以吸光度值(A)为纵坐标,以浓度(C)为横坐标,得曲线 A=0.095 7C-0.005 8,R²=0.999 5,如图 1。

对 30 个薰衣草提取物样品测定多酚含量,结果如表 1。其中 13、14、15、16 号样品多酚含量较高,分别为 63.20,51.72,46.79,81.82 μg·mL⁻¹;5~18 号样品多酚含量均大于 20 μg·mL⁻¹;其余样品多酚含量较低,均小于 12 μg·mL⁻¹。

表 1 薰衣草提取物多酚含量测定结果
Table 1 Test results of total polyphenols content

样品编号 Sample No.	样品浓度 Sample concentration/ (mg·mL ⁻¹)	多酚含量 Polyphenol content/ (μg·mL ⁻¹)	样品编号 Sample No.	样品浓度 Sample concentration/ (mg·mL ⁻¹)	多酚含量 Polyphenol content/ (μg·mL ⁻¹)
1	1.25	6.92	16	1.10	81.82
2	1.07	9.53	17	1.00	27.96
3	1.03	4.10	18	1.15	22.49
4	1.06	9.40	19	1.05	10.41
5	1.06	39.56	20	1.25	12.37
6	1.40	28.13	21	1.00	8.48
7	1.15	28.51	22	1.00	8.71
8	1.03	31.18	23	1.00	9.07
9	1.15	32.31	24	1.30	8.99
10	1.35	40.98	25	1.40	7.71
11	1.10	16.03	26	1.85	2.15
12	1.25	41.36	27	1.10	11.43
13	1.10	63.20	28	1.00	8.65
14	1.00	51.72	29	1.03	6.21
15	1.15	46.79	30	1.08	11.39

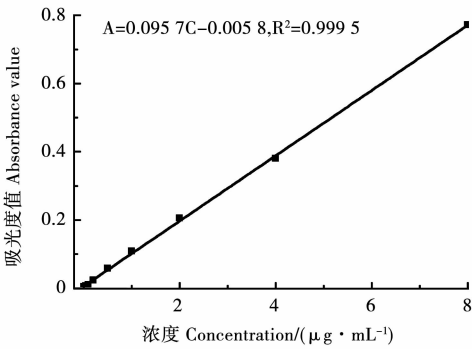


图1 没食子酸标准曲线
Fig.1 The standard curve of gallic acid

2.2 薰衣草提取物对乙酰胆碱酯酶的抑制活性研究

由表2可知,薰衣草提取物(除6号样品外)均对乙酰胆碱酯酶表现出了不同的抑制作用(抑制率3.00%~82.78%),其中10、17、19、20、22、27、28号提物作用较为明显,抑制率均大于50%,分别为59.14%、61.58%、82.78%、63.43%、62.67%、71.59%和53.41%;而3、12、14、24号表现出了微弱的抑制作用(抑制率分别为7.42%、8.28%、3.00%和3.14%)。

2.3 多酚含量与抑制酶活的相关性分析

将30个薰衣草样品的多酚含量及酶活性数值进行比较,做相关性分析,如图2。可知多酚含量的高低与乙酰胆碱酯酶抑制活性高低可能不存在相关性。如图中16号样品多酚含量最高,但其乙酰胆碱酯酶抑制活性不是最高或最低,此外,6号样品乙酰胆碱酯酶抑制活性最低,但其多酚含量为28.13 μg·mL⁻¹。由此可见,多酚不是薰衣草提取物中抑制乙酰胆碱酯酶的主要活性物质。

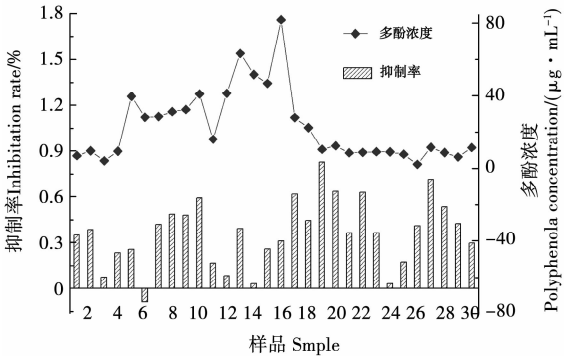


图2 薰衣草提取物多酚含量及抑酶活性比较
Fig.2 Comparison of polyphenol content and inhibitory activity of lavender extracts

表2 薰衣草提取物对乙酰胆碱酯酶活性的抑制率

Table 2 Inhibition ratio of *Lavandula angustifolia* Mill extract against AChE

样品编号 Sample No. 1	样品浓度 Sample concentration/ (mg·mL ⁻¹)	抑制率 Inhibition ratio/%	样品编号 Sample No.	样品浓度 Sample concentration/ (mg·mL ⁻¹)	抑制率 Inhibition ratio/%
1	1.25	34.88	16	1.10	30.96
2	1.07	38.57	17	1.00	61.58
3	1.03	7.42	18	1.15	44.54
4	1.06	23.14	19	1.05	82.78
5	1.06	25.39	20	1.25	63.43
6	1.40	-8.95	21	1.00	36.51
7	1.15	41.94	22	1.00	62.67
8	1.03	48.52	23	1.00	36.51
9	1.15	47.86	24	1.30	3.14
10	1.35	59.14	25	1.40	17.32
11	1.10	16.60	26	1.85	40.95
12	1.25	8.28	27	1.10	71.59
13	1.10	39.14	28	1.00	53.41
14	1.00	3.00	29	1.03	42.38
15	1.15	25.83	30	1.08	29.68

3 结论与讨论

AD在我国患病率在65岁以上的老年人口中约占5%,75岁以上的老年人口中上升为

20%,85岁以上超过45%,到2040年若仍找不到有效的防治办法,我国AD病人将会达到900万,寻找安全、高效、专一的治疗AD的天然药物刻不

容缓。目前市面上销售的用于治疗 AD 的药物包括利斯的明、多奈哌齐等,对身体具有不同程度的伤害^[12]。因此寻找高效、副作用小的天然乙酰胆碱酯酶抑制活性产物对 AD 患者具有重要意义。石杉碱甲是从中草药蛇足石杉中分离到的一种强乙酰胆碱酯酶抑制剂,本研究以石杉碱甲为阳性对照对薰衣草提取物进行乙酰胆碱酯酶抑制活性研究,发现部分薰衣草提取物对乙酰胆碱酯酶的抑制作用十分显著,抑制率高达 50%~80%,而对于多酚含量的比较之后,可以发现,多酚不是薰衣草提取物中抑制乙酰胆碱酯酶的主要活性物质,二者之间不存在相关性,这为 AD 药物的研发提供了理论基础和试验依据^[13]。

参考文献:

- [1] Aisen P S, Davis K L. The search for disease-modifying treatment for *Alzheimer's disease* [J]. *Neurology*, 1997, 48(5 Suppl 6):S35.
- [2] Jann M W. Preclinical pharmacology of metrifonate[J]. *Pharmacotherapy the Journal of Human Pharmacology & Drug Therapy*, 1998, 18(2P2):55-67.
- [3] 付剑亮,邵福源.阿尔茨海默病发病机制研究进展[J]. *世界临床药物*, 2010, 31(7):390-394.
- [4] 陶纪宁.胆碱酯酶抑制剂治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. *药理学进展*, 2001, 25(4):202-206.
- [5] 杨中铎,赖东海,张东博,等.具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的总生物碱提取物的筛选[J]. *中医药学报*, 2011, 39(3):71-74.
- [6] 殷帅文,刘丽萍,王安萍,等.15 种植物不同溶剂萃取物乙酰胆碱酯酶抑制活性的初步研究[J]. *井冈山大学学报(自然科学版)*, 2012, 33(4):1429-1436.
- [7] 丁运华,郭少敏,刘燕,等.10 种南药植物提取物乙酰胆碱酯酶抑制活性的筛选模型研究[J]. *热带作物学报*, 2017(8):1451-1455.
- [8] 李慕春,韩飞,曹雪琴,等.薰衣草活性提取物在制备治疗老年痴呆药物中的应用:CN 105326900 A[P]. 2016-02-17.
- [9] 孙黔云,杨付梅.乙酰胆碱酯酶抑制剂微量筛选模型的比较研究[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(10):1387-1392.
- [10] Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives[J]. *Pharmacological Research*, 2004, 50(4):433-440.
- [11] Oh M H, Houghton P J, Whang W K, et al. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity[J]. *Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*, 2004, 11(6):544-548.
- [12] 陈莲珍,王育琴,陈宁,等.老年痴呆症的药物治疗与进展[J]. *中国组织工程研究*, 2002, 6(21):3269-3269.
- [13] 初大丰.用于治疗老年痴呆症的石杉碱甲长效缓释微球剂研究[D]. 长春:吉林大学,2007.

Inhibitory Effect of *Lavandula angustifolia* Mill. Extract on Acetylcholin Esterase

WANG Miao-miao, HAN Fei, YAN Huan, ZHANG Qian, LI Mu-chun

(Xinjiang Academy of Analysis and Testing, Urumqi 830011, China)

Abstract: In order to find potential inhibitors from *Lavandula angustifolia* Mill. extract for acetylcholin esterase that can be used in the treatment of *Alzheimer's disease*. *Lavandula angustifolia* Mill. was extracted by ethanol and purified by polyamide column, HP20 resin column and preparative liquid chromatography. The Folin-phenol reagent method was used for the determination of total phenolics *Lavandula angustifolia* Mill. Extract Totally 30 extracts from *Lavandula angustifolia* Mill. were served as inhibitors, Huperzine A was used as the positive control to detect the absorbance value at 405 nm *in vitro* enzymatic reaction system by enzyme-labeling instrument. The inhibitory activity on the extracts was calculated. The results showed that *Lavandula angustifolia* Mill. extract showed a certain inhibitory activity on acetylcholin esterase (inhibition rate was 3.00%~82.78%). 7 *Lavandula angustifolia* Mill. extracts showed significant inhibition on acetylcholin esterase (inhibition rate was higher than 50%), while 4 *Lavandula angustifolia* Mill. extracts showed faint inhibition on acetylcholin esterase (inhibition rate was less than 10%). Half of *Lavandula angustifolia* Mill. extract showed the content of polyphenols was higher than 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The most of extract showed a certain inhibitory activity on acetylcholin esterase. Through the correlation analysis, polyphenols may not be the main active substance.

Keywords: *Lavandula angustifolia* Mill. extract; acetylcholin esterase; inhibitor; *Alzheimer's disease*; enzyme-labeling instrument