

正交试验法优化生脉散中有效成分组方亲和介质的制备工艺

吕燕妮, 翟科峰, 寇俊萍, 余伯阳*

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198)

[摘要] **目的:**制备以生脉散中有效成分人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、麦冬皂苷 DT-13 及五味子醇甲为配基的亲合介质。**方法:**采用 4 个有效成分与环氧活化琼脂糖凝胶 6B(EAS 6B)偶联,制备亲和介质。建立 HPLC-DAD 对 4 个有效成分同时在线分离与检测,以偶联率为指标,通过 L₉(3⁴)正交试验考察反应温度,反应时间和投料比对偶联反应的影响,优化制备工艺条件。**结果:**4 个成分均可与 EAS 6B 发生偶联,最佳制备工艺为反应温度 25 ℃,反应时间 24 h,添加 10 倍量生脉散有效成分组方。人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、麦冬皂苷 DT-13 及五味子醇甲亲和介质的偶联率分别为 27.4%, 22.3%, 50.0%, 24.5%。**结论:**成功制备了以生脉有效成分组为配基的亲合介质,为进一步识别该方的作用靶点提供技术手段,同时也为制备类似结构中中药复方的亲和介质提供实验依据。

[关键词] 亲和介质; 生脉散有效成分组方; 环氧活化琼脂糖凝胶 6B; 正交设计; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0006-04

[doi] 10.11653/syfy2013140006

Optimization of Preparation Technology for Affinity Medium with Four Active Ingredients From Shengmai Powder as Ligands by Orthogonal Test

LV Yan-ni, ZHAI Ke-feng, KOU Jun-ping, YU Bo-yang*

(State Key Laboratory of Natural Medicines, Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare affinity medium with four effective ingredients of ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, ophiopogonin DT-13 and schisandrin from Shengmai powder as ligands. **Method:** Affinity medium was prepared by coupling with four effective ingredients and epoxy-activated-sepharose™ 6B (EAS 6B). A HPLC-DAD method for simultaneous separation and determination of four ingredients was established, with coupling rate as index, effect of feeding rate, reaction time and temperature on coupling reaction was investigated by orthogonal test, then optimized preparation technology. **Result:** Optimum preparation technology was as following: reaction time 24 h, reaction temperature 25 ℃, added 10 times the amount of active ingredients ligands. Four ingredients could coupling with EAS 6B, coupling rate with four ingredients and affinity medium was ginsenoside Rg₁ of 27.40%, ginsenoside Rb₁ of 22.30%, ophiopogonin DT-13 of 50%, schisandrin of 24.50%. **Conclusion:** We successfully prepared affinity medium with four effective compounds deprived from Shengmai powder as ligands. It provided technical means to further identify target of this compound and some references for preparing affinity medium of other multiple natural compounds with similar active groups.

[收稿日期] 20130107(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274004); 十一五科技支撑计划(2008BAI51B03); 天然药物活性组分与药效国家重点实验室自主科研重点项目(JKGZ201107); 江苏省研究生创新计划项目(CXZZ11_0795)

[第一作者] 吕燕妮, 博士, 从事中药作用机制研究, Tel: 15850681647, E-mail: lvyanni@126.com

[通讯作者] * 余伯阳, 博士生导师, 从事中药复方药效物质基础与作用机制研究, Tel: 025-86185158, E-mail: boyangyu59@163.com

[Key words] affinity medium; active ingredients prescription from Shengmai powder; epoxy-activated-sepharose™6B; orthogonal design; HPLC

生脉散出自《医学启源》,具有广泛的药理活性,尤其对心脑血管疾病的防治效确切^[1-3]。课题组前期筛选发现,由人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、麦冬皂苷 DT-13 及五味子醇甲 4 个有效成分组成的新组方,抗心脑血管缺血缺氧活性与生脉注射液相当,已获专利授权^[4],但其作用靶点机制尚不十分明确。亲和色谱技术是利用偶联亲和配基的亲亲和吸附介质为固定相,吸附目标产物,从而得以分离纯化,已被广泛应用于发现药物靶点^[5-8]。前期研究已成功制备了以鲁斯可皂苷元和人参皂苷 Rg₁ 为配基的亲亲和色谱介质,并应用于作用靶点发现^[9-12]。本实验尝试制备生脉散有效成分组方的亲和介质,并优化偶联条件,为进一步识别其作用靶点及阐释其作用机制奠定基础,同时为制备类似结构的含多成分中药复方的亲和介质提供实验依据。

1 材料

AL204 型电子分析天平(上海 Mettler Toledo 公司),SX-IV 型手提式吸引器(兴市卫星医疗设备制造有限公司),Waters 600 型高效液相色谱仪(上海沃特世科技有限公司),Venusil MP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、五味子醇甲对照品(南京泽朗医药科技有限,批号分别为 ZL20120217YY, ZL20111115YY, ZL20120309YY),短葶山麦冬皂苷 DT-13 对照品(自制,经 HPLC 检测纯度 > 98%),环氧活化琼糖凝胶 6B (Epoxy-activated-sepharose™6B, EAS 6B, 瑞典 GE Healthcare 公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 生脉散有效成分组方亲和介质的制备

EAS 6B 连接臂末端的含氧三元环可与有效成分的羟基发生偶联反应。精密称取 EAS 6B 0.1 g,于双蒸水中溶胀 30 min,并用双蒸水抽洗 30 min,待用(1 g 的 EAS 6B 在双蒸水中溶胀后体积约 3 mL, EAS 6B 溶液中含有的活性基团数约 40 mmol·L⁻¹)。各组分别称取一定量生脉散有效成分组方加至 1 mL 的二甲基亚砜(DMSO)中溶解,向溶液中加入上述 EAS 6B,于对应温度下,水浴振荡反应不同时间,转速 110 r·min⁻¹,即得。

2.2 有效成分组方的偶联率测定

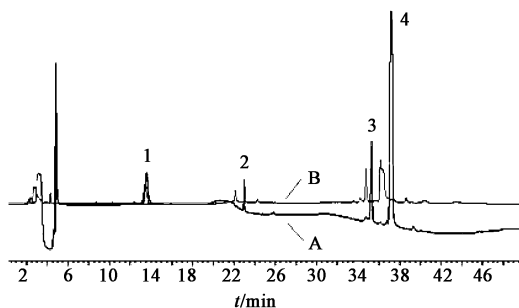
2.2.1 对照品溶液及供试品的制备

取各对照品

适量,精密称定,加甲醇定容至 50 mL,得相应对照品储备液。偶联反应后过滤亲和介质,收集各组反应溶液,用 DMSO 溶液轻柔洗脱各组填料上未偶联的生脉散有效成分组方,收集反应溶液和洗脱液,吹干,用甲醇溶解并过滤,加甲醇定容于 50 mL 量瓶中,经 0.45 μm 微孔滤过,即得供试品溶液。

2.2.2 色谱条件的建立^[13-14]

在预试验基础上,确定色谱条件为流动相乙腈(A)-0.1% 乙酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 12 min, 25% A; 12 ~ 15 min, 25% ~ 40% A; 15 ~ 23 min, 40% A; 23 ~ 33 min, 40% ~ 70% A; 33 ~ 38 min, 70% A),检测波长 203 nm(人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 及麦冬皂苷 DT-13), 250 nm(五味子醇甲),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温室温,进样量 20 μL,见图 2。



A. 对照品; B. 与亲和介质未偶联的成分; 1. 人参皂苷 Rg₁; 2. 人参皂苷 Rb₁; 3. 麦冬皂苷 DT-13; 4. 五味子醇甲

图 2 生脉散有效成分组方的 HPLC

2.2.3 方法学考察

精密称取人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、麦冬皂苷 DT-13 及五味子醇甲对照品适量,配制系列质量浓度的对照品溶液,人参皂苷 Rg₁ 分别为 16.14, 32.29, 64.57, 129.14, 258.28, 516.56 mg·L⁻¹; 人参皂苷 Rb₁ 分别为 10.76, 21.52, 43.05, 86.09, 172.19, 344.38 mg·L⁻¹; 麦冬皂苷 DT-13 分别为 7.17, 14.35, 28.70, 57.40, 114.80, 229.58 mg·L⁻¹; 五味子醇甲分别为 8.97, 17.94, 35.87, 71.74, 143.49, 286.98 mg·L⁻¹。按上述色谱条件进样,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程依次为 $Y = 3.71 \times 10^4 X + 1.90 \times 10^4$ ($r = 0.9995$), $Y = 1.45 \times 10^4 X + 1.17 \times 10^4$ ($r = 0.9995$), $Y = 1 \times 10^6 X + 3 \times 10^6$ ($r = 0.9992$), $Y = 2 \times 10^6 X + 8 \times 10^5$ ($r = 0.9994$)。精密度试验中人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、麦冬皂苷 DT-13 及五味子醇甲峰面积的 RSD 分

别为 1.1%, 1.2%, 1.5%, 1.4%; 重复性试验中峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 1.4%, 1.7%, 1.5%; 平均加样回收率分别为 98.7% (RSD 1.6%), 99.2% (RSD 1.7%), 101.9% (RSD 2.5%), 100.8% (RSD 1.8%)。

2.3 正交试验优化^[15] 在预试验基础上, 选择影响偶联率的 3 个主要因素反应温度、反应时间、反应物投料比(生脉散有效成分组方与亲和介质活性基团倍数比), 每个因素选择 3 个水平进行正交试验设计, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差

分析见表 3。

表 1 生脉散中有效成分组方的亲和介质制备工艺优选正交试验因素水平

水平	A 反应温度/℃	B 反应时间/h	C 反应投料比
1	25	16	5:1
2	33	20	7:1
3	40	24	10:1

注: 1 倍的反应溶液为人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、麦冬皂苷 DT-13 及五味子醇甲 10.33, 6.88, 4.59, 5.74 mg·L⁻¹。

表 2 生脉散中有效成分组方的亲和介质制备工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	结合率/%				
					人参皂苷 R _{g1}	人参皂苷 R _{b1}	麦冬皂苷 DT-13	五味子醇甲	平均值
1	1	1	1	1	6.80	46.30	42.50	10.00	26.40
2	1	2	2	2	24.00	31.60	33.54	11.50	25.16
3	1	3	3	3	27.40	22.30	50.00	24.50	31.05
4	2	1	2	3	10.70	1.10	38.80	4.32	13.73
5	2	2	3	1	3.30	17.70	14.30	11.10	11.60
6	2	3	1	2	26.30	1.30	1.20	14.30	10.78
7	3	1	3	2	2.10	8.80	10.90	7.00	7.20
8	3	2	1	3	1.70	2.00	1.20	1.30	1.55
9	3	3	2	1	23.20	1.20	1.50	1.40	6.83
K ₁	27.54	15.78	12.91	14.94					
K ₂	12.04	12.77	15.24	14.38					
K ₃	5.19	16.22	16.62	15.44					
R	22.34	3.45	3.71	1.06					

表 3 平均结合率方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	786.31	2	463.08	<0.01
B	21.14	2	12.45	>0.05
C	21.06	2	12.41	>0.05
D(误差)	1.70	2		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$ 。

由直观分析可知, 各因素影响亲和介质制备的主次顺序为 $A > C > B$ 。方差分析表明, 因素 A 具有显著性影响, 因素 B, C 无显著性影响。结合实际情况, 确定最佳制备条件为 $A_1B_3C_3$, 即反应温度 25℃, 反应时间 24 h, 反应物投料比 10:1。反应物(图 2A)与亲和介质反应后, 通过测定未偶联的反应物部分(图 2B), B 中各项色谱峰面积相较于 A 均有不同程度减小, 说明组方中有效成分已不同程度地与亲和介质发生偶联。

2.4 验证试验 称取各味药材, 按 2.2.1 项下方法

制备供试品溶液, 按优选的制备工艺进行 3 次验证试验, 结果制备的生脉散有效成分组方的平均偶联率 31.76%, RSD 1.64%, 说明优选的制备条件稳定可行。

3 讨论

中药复方防治疾病的协同整合作用机制, 可通过所含活性成分与体内功能蛋白的特异性结合, 影响和调节相关信号分子网络加以阐释^[16]。目前利用亲和色谱技术识别单一成分的作用靶点已广泛应用^[5], 是否能用于多成分靶标识别值得关注。制备含中药复方多成分的亲和介质, 继而发现其在相应疾病模型中特异性靶点, 探讨相关的信号网络, 将为研究和阐释中药复方的作用机制提供一定借鉴。在前期研究基础上, 针对生脉散有效成分组方中 4 个有效成分含有多个羟基这一结构特点, 选择了能与羟基等基团反应的 EAS 6B 为基质进行偶联, 制备以其为配基的亲和介质, 将为寻找其作用靶点提供技术手段。

目前制备以多成分为配基的亲介方法尚未见报道,考虑到配基和介质的偶联反应效率常受温度、反应时间、反应物比例等因素的影响,继而影响亲和介质应用时的蛋白吸附量。之前多采取反应物与亲和介质的摩尔数与体积比例为反应物比例进行考察,由于反应物所含活性基团数不同,并不能达到亲和介质最佳反应所需条件,即反应物的活性基团数应为亲和介质的活性基团数5~10倍。按照活性基团数比例进行投料,能达到合理反应条件,且用量经济合理,特别当投料比较大时,其用量经济的优势更为明显,故对反应投料比进行改进。

在亲和介质制备的反应中,有时会加入氢氧化钠等强碱溶液使反应环境成强碱性,从而促使环氧三元环开环,继而与药物成分反应。但在实际应用中,强碱往往会使溶液中成分的性质发生改变。本实验所用的成分在强碱性环境中本身结构会发生改变,不仅影响亲和反应的结合效率,而且对后期蛋白的识别造成成分不明的干扰,故采取较温和的DMSO溶剂作为溶解药物的溶剂与反应溶液^[10]。预试验发现,4个成分在DMSO溶液中保持稳定,考虑到将来应用于成分更为复杂的中药复方体系,而中药复方中成分复杂往往在强碱中不稳定,所以采用DMSO溶剂作为反应溶剂将利于成分的稳定与反应的可靠性。

偶联率是评价亲和介质是否制备成功的关键指标之一,本文建立HPLC-DAD在线同时分离并测定4种有效成分的偶联率,方法学考察表明,该分析方法分离度、重复性和精密度均符合要求。制备的含多类型结构成分为配基的亲介偶联率22.3%~50.0%,近似或高于文献报道的EAS 6B与其他药物成分的偶联率3.7%~27.6%^[15]。值得注意的是,含多成分的药物组方偶联时,因实际偶联率的不同,偶联后组方的比例可能会发生改变,这也是多成分亲和介质制备的复杂性和难点之一。本研究所采用的有效成分配伍组方,是按照其专利中最佳比例范围配伍而成,与亲和介质偶联后,其比例范围尽管有所改变,但仍属于其处方比例范围内。由于反应的偶联率较高,对靶点的亲和力较强,比例的微小改变对靶点的种类识别影响较小。另外,亲和介质的制备为体外识别靶点提供一定载体,靶点的功能验证,仍需进一步应用原比例组方进行研究。

[参考文献]

[1] Giridharan V V, Thandavarayan R A, Konishi T. Effect of

Shengmai-san on cognitive performance and cerebral oxidative damage in BALB/c Mice[J]. J Med Food, 2011, 14(6):601.

- [2] 严永清,陈可冀,余伯阳,等.著名古方生脉散的基础研究[J].中国中西医结合杂志,2006,26(1):94.
- [3] 任钧国,马晓斌,林成仁,等.加味生脉散对急性心肌梗死再灌注损伤大鼠的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(2):78.
- [4] 余伯阳,寇俊萍,张建宏,等.一种防治心脑血管疾病的中药有效成分组合物及其用途[P].中国:ZL 200710132029.5,2009-12-09.
- [5] Leslie B J, Hergenrother P J. Identification of the cellular targets of bioactive small organic molecules using affinity reagents[J]. Chem Soc Rev, 2008, 37(7):1347.
- [6] Mizushima Y, Ishidoh T, Kamisuki S, et al. Flavonoid glycoside: a new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase and a new carrier for inhibitor affinity chromatography[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(12):480.
- [7] Terstappen G C, Schlüpen C, Raggiaschi R, et al. Target deconvolution strategies in drug discovery[J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(11):891.
- [8] Hisabori T, Hara S, Fujii T, et al. Thioredoxin affinity chromatography: a useful method for further understanding the thioredoxin network[J]. J Exp Bot, 2005, 56(416):1463.
- [9] Yamamoto K, Yamazaki A, Takeuchi M, et al. A versatile method of identifying specific binding proteins on affinity resins[J]. Anal Biochem, 2006, 352(1):15.
- [10] 梁明,刘楠,刘吉华,等.以鲁斯可皂苷元为配基的亲介层析柱的制备及其在纯化抗体中的应用[J].中国天然药物,2006,4(5):363.
- [11] 刘倩,寇俊萍,黄娅琳,等.以人参皂苷Rg₁为配基的亲介色谱介质的制备与初步应用[J].中国药科大学学报,2010,41(5):451.
- [12] 余伯阳,寇俊萍,黄娅琳,等.一种防治炎症相关心脑血管疾病的药物靶标及其抑制剂[P].中国:ZL 200710024810.0,2011-05-04.
- [13] 魏宏伟,刘沛,刘翠哲. HPLC同时测定复方生脉颗粒中有效成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011, 17(20):95.
- [14] 秦建平,吴建雄,毕宇安,等. HPLC同时测定益心舒片中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮A的含量[J].中国实验方剂学杂志, 2012,18(2):77.
- [15] Pedersen A K, Branner S, Mortensen S B, et al. Affinity purification of recombinant protein tyrosine phosphatase 1B using a highly selective inhibitor[J]. J Chromatogr B, 2004, 799(1):1.
- [16] ZHAO J, JIANG P, ZHANG W D. Molecular networks for the study of TCM pharmacology[J]. Brief Bioinform, 2009, 11(4):417.

[责任编辑 全燕]