

• 制剂工艺 •

体外细胞膜的制备及其对补阳还五汤中 黄芪甲苷及阿魏酸吸附性的研究

刘 伟¹, 贺福元^{1,3*}, 刘文龙¹, 伍 勇¹, 王竹鑫²

(1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学附二医院, 湖南 长沙 410007;
3. 中南大学临床药理研究所, 湖南 长沙 410078)

[摘要] 目的: 研究体外细胞膜的制备工艺及其对中药复方补阳还五汤中黄芪甲苷及阿魏酸的吸附性。方法: 采用蔗糖溶液分步离心法制备体外细胞膜, 并按常规的柱层析分离补阳还五汤中的黄芪甲苷及阿魏酸, 再用高效液相色谱法测定其含量变化。结果: 用该法制得的细胞膜中蛋白质的含量约为 $8.0\% \pm 0.45\%$, 黄芪甲苷的流出达峰时间为 1 h, 浓度为 $123.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 转移率为 94.46%; 阿魏酸的流出达峰时间为 9 h, 浓度为 $8.769 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 转移率为 86.78%。结论: 体外细胞膜对黄芪甲苷和阿魏酸的吸附选择性有显著性差异, 可用于中药复方成分的分离。

[关键词] 体外细胞膜; 高效液相色谱法; 黄芪甲苷; 阿魏酸; 细胞膜层析; 靶向提取

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)02-0021-05

The Preparation of Active *in vitro* Membrane and Its Adsorption of Astragaloside IV and Ferulic Acid in Buyang Huanwu Decoction

LIU Wei¹, HE Fu-yuan^{1,3*}, LIU Wen-long¹, WU Yong¹, WANG Zhu-xin²

(1. Department of Pharmacy, Hunan University of TCM, Changsha 410208, China;

2. The Secondary Affiliated Hospital, in the Hunan University of TCM, Changsha 410007, China;

3. Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Changsha 410078, China)

[Abstract] **Objective:** To study the isolation of the active *in vitro* cell membranes of pig intestines and adsorption of astragaloside IV and ferulic acid in Buyang Huanwu Decoction (BYHWD). **Methods:** The sucrose density gradient ultracentrifugation at different speeds was used to isolate pig intestinal membranes and determine its total protein content. Normal column chromatography was used to isolate the astragaloside IV and ferulic acid, the content of which was determined by HPLC analysis. **Results:** The content of total protein in the cell membrane is $8.0\% \pm 0.45\%$, The peak time for astragaloside IV is 1 h, while the concentration is $123.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the transferring ratio is 94.46%; The peak time for ferulic acid is 9 h, while the concentration is $8.769 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the transferring ratio is 86.78%. **Conclusions:** There are significant difference in adsorbability and transporting capability between astragaloside IV and ferulic acid under cell membrane chromatography. The cell membrane could be used to separate the ingredients of the compound formulate of traditional Chinese medicine.

[Key words] cell membrane *in vitro*; HPLC; astragaloside IV; ferulic acid; cell membrane chromatography; target extraction

[收稿日期] 2007-04-02

[基金项目] 湖南省科技厅科技资助项目(013SSYZ2008-24)

[通讯作者] * 贺福元, Tel: (0731) 5381372; E-mail: phamsharking@tom.com

目前中药复方制备工艺主要有水醇法、醇水法、水蒸汽蒸馏法、超滤法^[1]、甲壳素吸附法^[2],但由于上述诸工艺受到中药材中“唯成分论”的影响,多根据药物的理化性质进行分离精制,不能反映消化道对原处方成分取舍的要求。这就要求中药提取工艺应由“化学型”工艺向“仿生型”工艺转变。为此张兆旺^[3]等提出了“半仿生提取法”;模仿人体消化吸收过程,经酸碱作用研究中药提取工艺。这对运用生物技术研制中药复方提取工艺有重要启迪意义。但内容主要涉及到不同酸碱条件下对中药复方的水解工艺的研究,不能完全体现人体消化吸收过程,因此可在其基础上提出“全仿生消化工艺”:模拟人体消化系统功能,中药复方先在体外经酸、碱、及相关酶条件下作用,然后经小肠细胞膜吸附及转运取舍成分,最终获得体内所需有效成分。该工艺中核心技术为肠细胞膜对中药复方成分的吸附转运问题。因此本文作者根据细胞膜在体内吸收转运的机理,展开活体猪细胞膜在分割后对补阳还五汤成分吸附的选择研究;欲探索体外细胞膜与体内消化吸收过程对复方成分的吸附转运机理的异同,为最终建立能根据人体的生理功能的需要而分离出“有用”和“无用”的物质,以体外膜为核心分离技术的“全仿生消化工艺”奠定理论及试验基础。

补阳还五汤系清代王清任《医林改错》首载。该方由黄芪、当归、川芎、桃仁、红花、地龙、赤芍组成。具有补气通络的功能,在抗血栓、抗衰老、降血脂及免疫功能方面都有广泛的作用^[4]。本室已从多方面进行了立项研究,因此以补阳还五汤为实验药物更有利于揭示该方的物质基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 DS-1 型高速组织捣碎机(上海标本模型厂),SK3300H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市英子华仪器厂),MA-110 型电子天平(上海天平仪器厂),LD4-2 型低速离心机(北京医用离心机厂),SCR-20BC 高速冷冻离心机(日本日立),UV-9200 紫外可见光光度计(北京瑞利分析仪器公司),BCD-287DVC 型海尔冰箱,Waters 1525 Binary HPLC Pump, Breeze 工作站,Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector。

1.2 试剂 黄芪甲苷对照品(批号:110737-200424)阿魏酸对照品(批号:0773-9910)购于中国药品生物制品检定所,牛血清白蛋白(上海化学试剂

厂),甲醇、乙氰为色谱纯(湖南化工院精细化工研究所),蒸馏水为二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材来源 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 干燥根。当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子。红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。地龙为环节动物门钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. perrier) 的干燥体。处方:黄芪 60g,当归 9g,川芎 6g,赤芍 9g,桃仁 9g,红花 9g,地龙 9g。

1.4 动物来源 猪, *Sus Scrofa*。

2 方法与结果

2.1 体外细胞膜的制备及总蛋白质的含测

2.1.1 试液的配制 PBS 液:称取 Na_2HPO_4 1.2 g, KH_2PO_4 0.20 g, NaCl 0.01 g, KCl 0.20 g, NaN_3 2 g, 用双蒸馏水将其溶解到 1 000 mL 即得,于 5 °C 以下保存。均浆缓冲液:称取蔗糖 85.5 g, EDTA-Na 1.86 g, dl-组氨酸 0.81 g, 脱氧胆酸钠 1.0 g, 二硫苏糖醇 0.001 5 g, 用 1 000 mL 双蒸馏水将其溶解,并调节 pH=7.0, 密封并于 -20 °C 以下冷藏。台氏液:称取 NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, CaCl_2 0.2 g, NaHCO_3 1.0 g, NaH_2PO_4 0.05 g, MgCl_2 0.1 g, 葡萄糖 1.0 g, 溶于 1 000 mL 重蒸馏水中即得,密封冷藏。Tris-HCl 缓冲液:称取 0.6 g Tris 碱于 500 mL 容量瓶中,加 50 mL 双蒸馏水,再加入 42 mL 0.1 mol·L⁻¹ 的 HCl 混合,然后加双蒸馏水至刻度。Bradford 试剂:精称 100.0 mg 考马斯亮蓝 G-250,精密加入 95% 的乙醇 50.0 mL 及 85% 的磷酸 100 mL,再加入双蒸馏水定容至 200.0 mL 过滤后置 4 °C 以下,即为贮备液,取上述贮备液用双蒸馏水作 10 倍稀释即得试剂应用液。

2.1.2 体外细胞膜的制备工艺 取猪的新鲜胃肠器官,分离出黏膜。将器官余血洗净,再用冰冷的 PBS 洗(2~3)次后,称重,尽可能地剪成碎块,用蔗糖密度梯度离心法分离细胞膜^[5],加(10~20)倍体积的均浆缓冲液至高速组织捣碎机中以 3 000 r·min⁻¹ 的转速研磨成浆,然后将匀浆液通过四层纱布过滤,将滤液于 4 °C,离心力为 1 000 × g 的条件下离心 10 min(300 r·min⁻¹),弃去沉淀,取上清液于高速

冷冻离心机中,在 4 °C,离心力为 $35\,500 \times g$ ($10\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 的条件下离心 80 min,弃上清液,取沉淀悬浮于(10~15)倍体积的冰冷的 Tris-HCl 缓冲液(pH = 7.0)中,置玻璃匀浆器中上下轻轻研磨(6~10)次后在离心力为 $35\,000 \times g$,4 °C 的条件下再次离心 30 min,弃上清液,取沉淀,即粗质膜,加相当于原组织湿重 2 倍体积的冰冷的 Tris-HCl 缓冲液(pH = 7.0)于匀浆器中上下研磨 4 次,即得粗的质膜溶液,冷冻干燥得细胞膜,在 -30 °C 的条件下贮存备用。

2.1.3 细胞膜中蛋白质含量的测定 照 Bradford 法^[6]测蛋白的方法测定质膜中蛋白的含量。

标准牛血清白蛋白溶液的配制:精称牛血清白蛋白 10.0 mg 于 50 mL 的容量瓶中,用 $0.015 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 溶解,定容至刻度(浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

细胞膜样品溶液的配制:取粗质膜溶液 20.0 mL,于 100 mL 容量瓶中,加 PBS 定容至刻度,得浓度为 C_1 ,在其中取 25.0 mL 与 50 mL 容量瓶中,用 PBS 稀释至刻度,得浓度为 C_2 。

标准曲线的绘制:取洁净试管 7 支标号,1 号为试剂空白,(2~7)号管分别加牛血清白蛋白标准液 10,20,40,60,80,100 μL ,各管均以 PBS 调整液量至 100 μL ,加入 Bradford 试剂应用液 5 mL,置室温下反应 5 min 后,在可见光 595 nm 处测吸光度 A,得标准曲线方程 $Y = -0.002\,73X + 0.004\,94$, $r = 0.999\,8$,说明在(20~200) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内线形关系良好。

样品测定:分别取两种浓度的粗质膜 10,20 μL 于 4 支试管中,用 PBS 调样本量至 100 μL ,加入 Bradford 试剂应用液 5 mL,测定方法同上,重复 3 次,得制得的细胞膜中蛋白质的含量约为 $8.0\% \pm 0.45\%$ 。

2.2 对补阳还五汤中黄芪甲苷及阿魏酸的吸附性研究

2.2.1 样品溶液的制备 按处方量称取黄芪、当归、川芎、红花、桃仁、地龙、赤芍,第一次加水 8 倍量,煎煮 2 h,第二次加水 5 倍量,煎煮 1.5 h,合并水煎液,在旋转蒸发器中浓缩至比重约(1.08~1.10) $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,按计算量加入乙醇使其浓度达 85% 以上,静置,抽滤,将滤液回收乙醇并浓缩至稠膏状,得体积约 50 mL,取稠浸膏 5.0 mL,用台氏液稀释到 10.0 mL,即得。

2.2.2 细胞膜的装柱及对药液的转运 在柱温度

37 °C,相对湿度 75% 的条件下,按药液:质膜蛋白质 = 1:10 的量,取 2.2.1 中药液 2.0 mL 及台氏液 20 mL,浸泡稍许,以 $1 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度收集台氏洗脱液,每 1 mL 为一管,依次收集,编号 1~15。

2.2.3 黄芪甲苷的含量测定 色谱条件及供试液制备: C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), UV 检测器,以 203 nm 为检测波长,流动相为乙腈-水(33:67),流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 45 °C。对照品液的制备:精密称取已干燥至恒重的黄芪甲苷标准品 8.0 mg,用甲醇定容至 10.0 mL,制得每毫升含黄芪甲苷 0.8 mg 的对照品溶液。供试品液的制备:将 2.2.2 中收集的洗脱液,每管取 0.1 mL,加 0.3 mL 乙腈,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过即得。同供试品液制备方法,不加药液,用台氏液洗脱,收集约 1 mL 的洗脱液,按供试品液方法制得空白样品。

样品中黄芪甲苷的含量测定 精密吸取黄芪甲苷对照品液、供试品溶液、阴性对照品液各 10 μL ,注入高效液相色谱仪,测得黄芪甲苷的含量变化,标准品、样品溶液、阴性空白色谱图如图 1,经过细胞膜转运后不同时间黄芪甲苷的含量变化如图 2。图 1 中黄芪甲苷色谱峰在 25 min 左右,阴性无干扰,可建立其含量测定方法。黄芪甲苷的主要转运参数列于表 1。

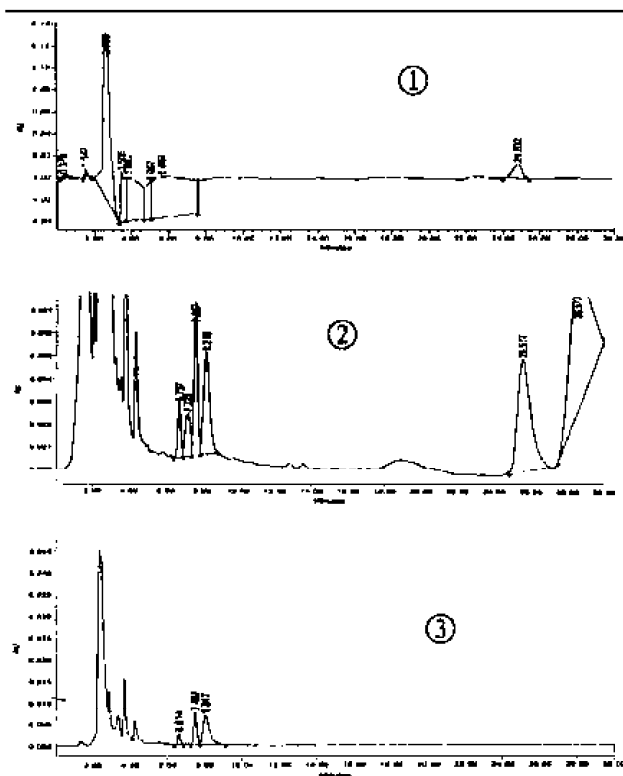


图 1 黄芪甲苷色谱图

①黄芪甲苷(对照品) ②供试品液 ③阴性对照品液

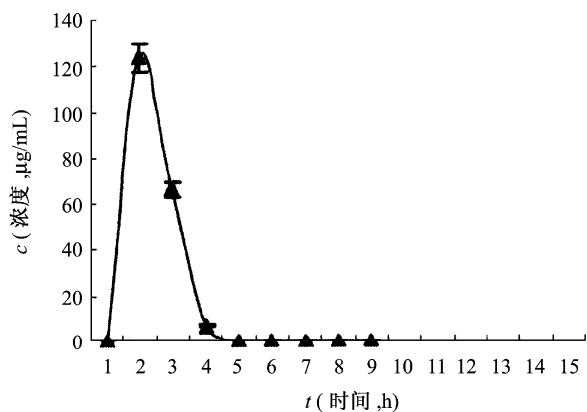


图 2 黄芪甲苷经活性细胞膜转运后的含量变化

表 1 细胞膜对补阳还五汤中黄芪甲苷和阿魏酸转运参数

参数名称	最低检出浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	达峰时间 (h)	达峰浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	曲线下面积 (μg)	转移率 (%)
黄芪甲苷	12	1	123.6	198.4	94.46
阿魏酸	0.002	9	8.769	33.24	86.78

2.2.4 阿魏酸的含量测定 色谱条件及供试品液制备: C_{18} 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), UV 检测器, 以 320 nm 为检测波长, 流动相为甲醇-水-冰醋酸(33: 67: 0.5), 流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温: 室温。阿魏酸对照品溶液的制备: 精密称取已干燥至恒重的阿魏酸标准品 5.0 mg, 用甲醇定容至 50 mL, 再在其中精密吸取 2.0 mL 到 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制得每毫升含阿魏酸 20 μg 的对照品溶液。供试品溶液及阴性空白对照品溶液的制备同黄芪甲苷供试品及阴性空白对照品液的制备。

样品中阿魏酸的含量测定 精密吸取上述阿魏酸对照品溶液及供试液各 10 μL 注入高效液相色谱仪测得其含量变化, 标准品、样品溶液、阴性空白对照液色谱图如图 3, 经过细胞膜转运后阿魏酸的含量变化如图 4。比较图 3 图谱可知阿魏酸在 19 min 左右与它峰分离完全, 阴性无干扰, 可建立含量测定。阿魏酸的分离参数列于表 1。

3 结论

根据人体在消化、吸收、转运、代谢过程与中药材成分存在的相容性, 展开人体消化吸收转运作用机理研究, 有助于揭示中药复方成分的吸收转运机理, 有助于血清药理学深入研究, 有利于中药复方物质基础研究, 这也为中药复方成分的靶向提取、中药注射剂制备工艺研究提供新的思路, 可谓之中药复方成靶向分离纯化的新方向。

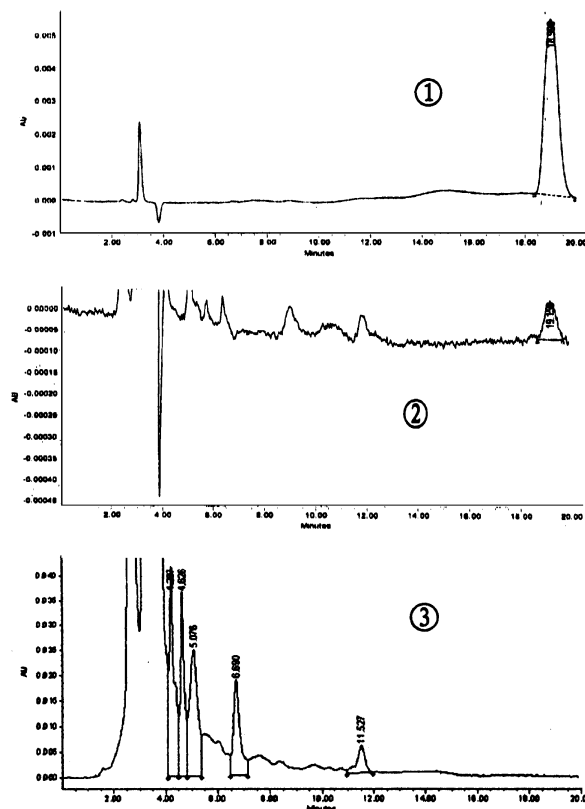


图 3 阿魏酸色谱图

①阿魏酸液(对照品) ②供试品液 ③阴性对照品液

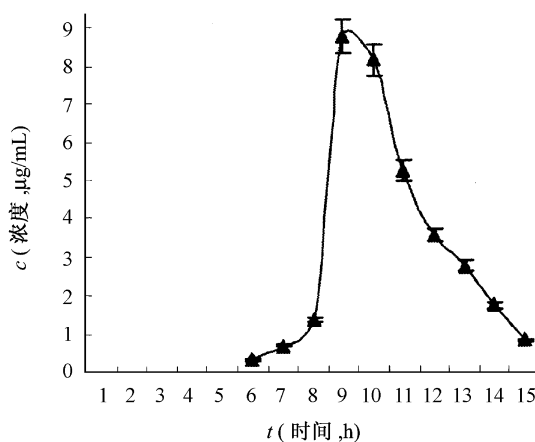


图 4 阿魏酸经活性细胞膜转运后的含量变化

中药复方的消化、吸收、转运在生物体内进行, 要进行大规模生产中中药复方成分必受制约, 为此必须展开离体细胞膜的转运机理研究, 其前期工作为离体细胞膜的研制及活性研究, 本文初步建立了体离细胞膜的制备并对其吸附转运性能进行初步研究。

用上述方法制得的细胞膜具有吸附分离黄芪甲苷及阿魏酸的能力, 由图 3 及图 4 可知药物化学性质的不同, 细胞膜对其吸附分离的过程有着显著性差异, 与细胞膜为蛋白质的磷脂双分子层(极性基团位于膜内外两侧, 非极性基团向内排列)结构有关,

药物的脂溶性很大程度上影响其吸收转运。黄芪甲苷为黄芪醇的配糖体,由于糖基的存在,则易通过磷脂双分子层两侧的极性基团,而不被膜所吸附。另外还可通过膜上的含水微孔及细胞旁路通道而吸收,故传质时间快,转移率高。阿魏酸则为苷元类成分,其极性较小,脂溶性较大,可能由于易被脂质双分子层中内部的疏水基团所吸附而慢慢释放,故传质时间慢,转运率低。通过以上实验的研究,说明细胞膜对中药复方成分的透过是具有选择性的,该法制得的细胞膜保留了磷脂双分子层的结构。但对于膜上药物受体、离子通道等性质的存活性尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] 王志超,潘灏白,刘卫红.超滤法和水醇法制备参麦注

射液的实验比较研究[J].中国药房,1994,5(1):11-12.

[2] 张立海,管涛.浅谈汤剂的研究与剂型改革[J].亚洲医院,1997,8(10):879-880.

[3] 张兆旺,孙秀梅.试论“半仿生提取法”制备中药口服制剂[J].中国中药杂志,1995,20(11):670-673.

[4] Yan Darmin, Yan Xiaopin. Summary of experimental studies on the BYHWT decoration in ten years [J]. Journal of Information for Chinese Tradition Medicine, 1999, 6(6): 16-17.

[5] 何涛,蒋灵芝.脑组织细胞膜的制备和鉴定[J].泸州医学院学报,1998,21(5):30-33.

[6] Simth JA. Quantitation of proteins. In Ausubel FM, *et al.* eds. In current protocols in molecular biology[J]. USA: John Wiley and Sons Lnc. 1994: 10. 1. 1-10. 1. 3.