

三七中与牛血清白蛋白结合的活性成分研究^Δ

罗朵生^{1*}, 曾翠香¹, 胡因铭¹, 郭 姣^{2#}(1. 国家中医药管理局高脂血症“调肝降脂”重点研究室/国家中医药管理局“脂代谢”三级实验室/广东药学院中医药研究院, 广州 510006; 2. 广东省代谢性疾病中医药防治重点实验室, 广州 510006)

中图分类号 R285;R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4043-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.04

摘要 目的: 研究三七中与牛血清白蛋白(BSA)有结合作用的潜在活性成分。方法: 采用平衡透析与高效液相色谱联用技术筛选三七中与BSA有结合作用的成分; 考察BSA浓度、缓冲液pH值对三七皂苷与BSA结合作用的影响; 比较三七中主要皂苷单体与BSA单独作用和三七总皂苷与BSA作用的区别。结果: 三七中有3个化学成分与BSA结合作用明显, 分别为人参皂苷Rg₁、人参皂苷Re、人参皂苷Rb₁; 各皂苷单独结合作用强于联合结合作用, 各皂苷在与BSA结合过程中存在竞争作用。结论: 蛋白结合-平衡透析-高效液相色谱法联用可有效、快速地预测三七中多种成分在体内的吸收情况, 筛选其潜在活性成分, 且能体现中药整体作用的特点。

关键词 三七; 皂苷; 牛血清白蛋白; 平衡透析-高效液相色谱法; 活性成分

Study on Active Ingredients in *Panax notoginseng* Combined with Bovine Serum Albumin

LUO Duo-sheng¹, ZENG Cui-xiang¹, HU Ying-min¹, GUO Jiao²(1. Key Unit of Modulating Liver to Treat Hyperlipemia SATCM/Three-level Lab of Lipid Metabolism SATCM/Institute of Chinese Medical Science of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong TCM Key Lab for Metabolic Disease, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study potential active ingredients in *Panax notoginseng* combined with bovine serum albumin (BSA). METHODS: The synergistic action components in *P. notoginseng* combined with BSA was studied by equilibrium dialysis coupled with HPLC. The effects of the concentration of BSA and pH value on their bindings were also investigated; the binding between sanchinoside monomers of *P. notoginseng* and BSA was compared with that between total saponins of *P. notoginseng* and BSA. RESULTS: Result showed that 3 components of *P. notoginseng* had combined with BSA, including ginsenosides Rg₁, ginsenoside Re and ginsenoside Rb₁. The binding degrees of sanchinoside monomers were better than those of total saponins; the sanchinoside monomers acted competitively each other in binding BSA process. CONCLUSIONS: Protein binding-equilibrium dialysis-HPLC is rapid and effective to predict the absorption of various components of *P. notoginseng*, screen potential active ingredients and present the characteristics of TCM.

KEY WORDS *Panax notoginseng*; Saponin; Bovine serum albumin; Equilibrium dialysis-HPLC; Active ingredients

jury in rats: therapeutic time window and its mechanism [J]. *Thromb Res*, 2009, 123(5):727.

[6] Abe T, Kunz A, Shimamura M, et al. Anrather, and C. Iadecola, The neuroprotective effect of prostaglandin E₂ EP₁ receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(1): 66.

[7] Ley JJ, Belayev L, Saul I, et al. Neuroprotective effect

of STAZN, a novel azulenyl nitron antioxidant, in focal cerebral ischemia in rats: dose-response and therapeutic window[J]. *Brain Res*, 2007, 1180:101.

[8] Hua, YT, Schallert, RF, Keep J, et al. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat[J]. *Stroke*, 2002, 33(10):2 478.

[9] Zhang L, Schallert T, Zhang ZG, et al. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosci Methods*, 2002, 117(2):207.

[10] Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, et al. Functional assessments in mice and rats after focal stroke[J]. *Neuropharmacology*, 2000, 39(5):806.

(收稿日期:2013-07-31 修回日期:2013-09-02)

Δ 基金项目:广东省自然科学基金团队项目(No.10351022401000000); 广东省教育部产学研结合项目(No.2009B090300349);广州市科技支撑资助项目(No.2009Z1-E361)

* 助理研究员, 硕士。研究方向:中药药效物质基础。电话:020-39352609。E-mail:lds0901@163.com

通信作者:教授, 博士研究生导师。研究方向:中医药防治代谢紊乱性疾病。电话:020-39359898。E-mail:gyguoyz@163.com

药物发挥作用的关键步骤之一是进入全身血液循环,与血液中的血浆蛋白发生可逆性结合,随血液循环到达全身各个部位的靶器官、组织,最终发挥药理作用。可见,与血浆蛋白结合是药物发挥作用的前提条件之一。因此,以血清白蛋白为生物捕集体系,筛选中药复杂体系中的活性成分是直接、有效的手段之一,克服了以往中药物质基础研究中药西化,难以说明其整体性和复杂性,且分析操作烦琐、周期长等缺点^[1-2]。笔者前期采用蛋白结合-透析-色谱联用技术筛选了黄连中潜在的活性成分,并经后续药理实验证实所筛选得到的结合能力最强的化合物小檗碱降脂活性也最强。据此,笔者继续采用该法筛选三七中潜在的活性成分,既可预测三七的药效物质基础,也为推广该法在其他含皂苷中药药效物质基础的筛选提供参考。

1 材料

1.1 仪器

DIONEX Ultimate 3000型高效液相色谱仪,包括四元梯度泵、柱温箱、自动进样器、DAD二极管阵列检测器、Chromeleon 6.8色谱工作站(美国戴安公司);KQ-500VDE型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);0.22 μm溶剂过滤器(北京津腾仪器厂);BT-224S型万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);UNIPREP 24型三维旋振样品处理器(德国Uniequip公司);ULTRA-GE-MK2型纯水仪(英国Elga公司);透析袋(相对截留分子量8 000~12 000 Da,广州瑞舒生物科技有限公司)。

1.2 药材

三七(产地:云南,批号:20110907)购自广州至信药业有限公司,经广东药学院何伟教授鉴定为真品。

1.3 试剂

三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re对照品(中国食品药品鉴定研究院,批号分别为:100745-200617、110703-200726、100704-201118、110754-201123);牛血清白蛋白(BSA,广州瑞舒生物科技有限公司);DMSO(美国Sigma公司);甲醇、乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法

2.1 样品的处理

取三七药材,粉碎成颗粒,加入5倍量70%乙醇水溶液回流提取3次,每次1 h。滤过,合并滤液,减压回收乙醇。浸膏减压干燥,得到三七提取物粉末。取该粉末适量,精密称定,以含2% DMSO的PBS缓冲液(1/1)溶解(pH分别为7.0、5.4、7.4)制成质量浓度为0.1 g/ml的溶液,以离心半径为8 cm、50 000 r/min离心10 min,取上清液作为三七供试品溶液。称取三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re对照品适量,用70%甲醇水溶液分别制备成质量浓度为0.130、0.610、0.061、0.600 mg/ml的对照品溶液,用于化合物对照确认及与BSA结合试验。

2.2 三七与BSA的结合作用

取长约8 cm的透析袋,一端用细线扎紧,加入0.6 mmol/L BSA溶液(pH7.0)和三七供试品溶液(pH7.0)各2 ml,另一端也用细线扎紧。将透析袋放入盛有16 ml缓冲液(pH7.0)的离心管中;另取1个透析袋,加入2 ml缓冲液(pH7.0)代替BSA溶液作空白对照。25 ℃透析24 h,使透析袋内外药物浓度达到平衡,37 ℃水浴孵育10 min。取透析袋外侧(离心管内)的溶液,即得透析液样品。改用pH分别为5.4、7.4的缓冲液同法操作,则得到不同pH条件下的透析液样品;改用浓度分别为0.3、0.9 mmol/L的BSA溶液同法操作,则得到不同BSA浓度条件下的透析液样品。样品用0.22 μm微孔滤膜过滤,取滤液20 μl进样分析。

2.3 三七中各单体皂苷与BSA的结合作用

分别取三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re对照品溶液(pH7.0)各2 ml,按“2.2”项下方法操作,得到各单体皂苷与BSA结合作用后的透析液样品。样品用0.22 μm的微孔滤膜过滤,取滤液20 μl进样分析。

2.4 三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re含量的测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Agilent HC-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水[梯度洗脱,参考2010年版《中国药典》(一部)三七项含量测定方法]。柱温:30 ℃;流速:1 ml/min;检测波长:203 nm;进样量:20 μl。

2.4.2 混合对照品溶液的制备:精密称取三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re对照品适量,置于25 ml量瓶中,用70%甲醇水溶液分别制备成质量浓度为0.13、0.61、0.06、0.60 mg/ml的对照品溶液,用于化合物对照确认及与BSA结合试验。

2.4.3 标准曲线的制备:精密吸取混合对照品溶液1、2、5、10、15、20、25、30 μl,注入液相色谱仪,按上述条件测定三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁和人参皂苷Re色谱峰面积。以三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁和人参皂苷Re进样量(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归。得三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re回归方程分别为 $y=2.8077x+0.2146$ ($r=0.9998$)、 $y=6.2387x+0.2229$ ($r=0.9999$)、 $y=2.3507x+0.2590$ ($r=0.9999$)、 $y=5.2926x+0.5664$ ($r=0.9998$)。结果表明,三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re进样量分别在0.13~3.90 μg、0.61~18.30 μg、0.06~1.80 μg、0.60~18.00 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 检测指标

以峰面积的减少比率表示各成分与BSA的结合系数(Binding degree, BD),结合系数按以下公式计算^[9]:

$$BD(\%) = (Aa - Ab) / Aa \times 100\%$$

式中,Aa和Ab分别为各成分与BSA作用前后的色谱峰面积。试验重复2次,取平均值,各成分的BD值越大,说明该成分与BSA的结合作用越强。

3 结果

3.1 三七中可与BSA发生结合的成分

三七供试品溶液与BSA溶液透析孵育后,有1个成分的色谱峰面积几乎不变,有3个成分的色谱峰面积有不同程度的下降,推测是与BSA发生结合作用的成分,是三七中潜在的活性成分。不同成分的峰面积减少程度不同,说明其与BSA发生结合作用的强弱不同。三七皂苷R₁在此试验条件与BSA几乎没有作用,而人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re与BSA有一定的相互作用,且它们分别单独与BSA结合时,其结合系数大于三七供试品溶液与BSA的结合系数,说明其在与BSA结合过程中存在竞争作用。三七供试品溶液与BSA作用前、后的色谱见图1(pH7.0);三七中各皂苷单体与BSA单独作用后的色谱见图2;三七中各化合物与BSA的结合系数见表1。

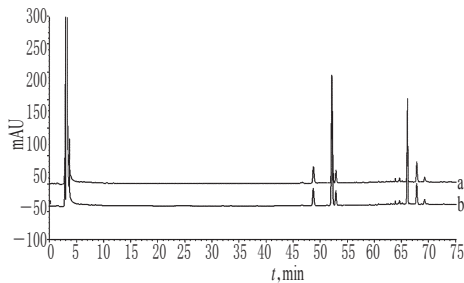


图1 三七供试品溶液与BSA作用前后的色谱图(pH7)
a.三七供试品溶液与BSA作用后的透析液样品;b.空白对照

Fig 1 Representative chromatograms of *P. notoginseng* before and after combined with BSA (pH7)
a. after interacted with BSA; b. blank control

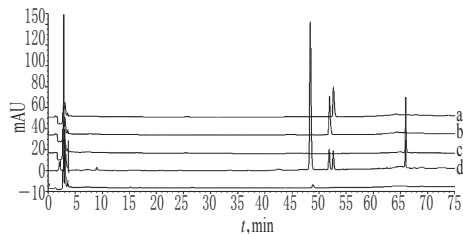


图2 三七中皂苷单体与BSA单独作用后的色谱图
a.人参皂苷Re;b.人参皂苷Rb₁;c.人参皂苷Rg₁;d.人参皂苷R₁

Fig 2 Representative chromatograms of sanchinoside monomers after interacted with BSA

a. ginsenoside Re; b. ginsenoside Rb₁; c. ginsenoside Rg₁; d. ginsenoside R₁

表1 三七中各化合物与BSA的结合系数(n=2)

Tab 1 Binding degrees of *P. notoginseng* saponins with BSA (n=2)

化合物	结合系数	
	各皂苷单体	三七供试品溶液
三七皂苷R ₁	0	0
人参皂苷Rg ₁	25.54	19.36
人参皂苷Rb ₁	27.40	10.54
人参皂苷Re	51.18	26.58

3.2 pH和BSA质量浓度对三七皂苷与BSA结合作用的影响

三七皂苷R₁在不同pH缓冲液或BSA浓度下,均与BSA没有相互作用;人参皂苷Re与BSA结合作用随着pH的增加而增大;人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁在pH为7.0时有较强相互

作用。随着BSA浓度的增加,人参皂苷Re、人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁与BSA的结合作用逐渐增强。不同pH(5.4、7.0、7.4)的PBS缓冲体系下,三七皂苷与BSA(0.6 mmol/L)的结合系数见表2;不同BSA浓度(0.3、0.6、0.9 mmol/L)条件下,三七皂苷与BSA(pH7.0)的结合系数见表2。

表2 三七皂苷在不同条件下与BSA的结合系数(n=2)

Tab 2 Binding degrees of *P. notoginseng* saponins with BSA under different conditions (n=2)

化合物	缓冲液pH			BSA浓度, mmol/L		
	5.4	7.0	7.4	0.3	0.6	0.9
三七皂苷R ₁	0	0	0	0	0	0
人参皂苷Rg ₁	18.61	19.36	8.71	12.36	19.36	22.12
人参皂苷Rb ₁	8.62	10.54	4.23	6.34	10.54	16.58
人参皂苷Re	25.70	26.58	51.54	17.12	26.58	34.82

3.3 平衡透析温度、透析时间对三七皂苷与BSA结合的影响

笔者考察了平衡透析温度、透析时间对三七皂苷与BSA结合的影响,结果显示以25℃、透析24h为较优条件。

4 讨论

BD是重要的药动学参数之一。BD的测定方法有平衡透析、超滤、凝胶过滤、超速离心和蛋白微球测定法等。平衡透析法原理简单,操作方便,不需要特殊、贵重的仪器,是一种较为经典的方法,但也易受一些因素的影响。本研究中透析液的离子强度和pH值都被严格控制;透析内、外液的液面保持在同一水平以避免体积迁移的干扰,并要防止透析袋贴壁以免影响药物透析;透析过程在密封环境中进行以减少由于液体蒸发体积减少带来的透析液浓度的改变;透析至平衡后,检查透析袋外液有无蛋白质漏出,一旦发生泄漏,作废处理。

人体内的环境是一个pH相对稳定的缓冲体系,血液与组织液的正常pH约为7.4,细胞内液pH约为7.0,人体主要吸收器官小肠肠道内的pH约为5.4。因此,为了更好地模拟体内三七皂苷与血浆蛋白的结合作用,本研究分别考察pH为5.4、7.0、7.4的PBS缓冲体系条件下三七皂苷与BSA的相互作用。

通过比较三七皂苷与BSA结合前、后色谱峰面积的变化,发现三七中的三七皂苷R₁与BSA几乎没有结合作用,而人参皂苷Re、人参皂苷Rg₁及人参皂苷Rb₁均与BSA有结合作用,其中人参皂苷Re结合作用最强,其次为人参皂苷Rb₁。总体趋势表现为随着皂苷极性的减小,与BSA结合作用逐渐增强。

为了比较三七中人参皂苷Re、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁分别与BSA结合作用及三七供试品溶液与BSA结合作用,控制研究中各单体质量浓度与在三七供试品中的质量浓度一致,结果显示,在相同条件下,各单体与BSA结合作用强于三七皂苷R₁与BSA结合作用,可能是因为各皂苷结构相似,在与BSA的结合过程中存在竞争作用。

文献报道有采用离心超滤、微透析等方法研究金银花等与血浆蛋白的结合作用^[1-10],笔者前期采用蛋白结合-透析-色谱联用技术筛选了黄连中潜在的活性成分^[11-13],均取得较好的结果。该技术是以中药提取物不经分离直接与BSA结合,将活性检测与成分分析集成,能够较好地阐明中药多成分、多靶

点协同作用的特点。本研究又利用该技术筛选三七中潜在的活性成分,为该技术拓展到含皂苷类中药的药效物质筛选提供了试验依据。

参考文献

- [1] 齐炼文,周建良,郝海平,等.基于中医药特点的中药体内外药效物质组生物/化学集成表征新方法[J].中国药科大学学报,2010,41(3):195.
- [2] Qian ZM, Qin SJ, Yi L, *et al.* Binding study of Flos Lonicerae Japonicae with bovine serum using centrifugal ultrafiltration and liquid chromatography[J]. *Biomed Chromatogr*,2008,22:202.
- [3] 任非,吴宗耀,段坤峰,等.HPLC法测定戟叶马鞭草苷在不同血浆中的蛋白结合率[J].中国药房,2012,23(35):3271.
- [4] Qian ZM, Wen XD, Li HJ, *et al.* Analysis of interaction property of bioactive components in Flos Lonicerae Japonicae with protein by microdialysis coupled with HPLC-DAD-MS[J]. *Biol Pharm Bull*,2008,31(1):126.
- [5] Sheng LH, Li SL, Kong L, *et al.* Separation of compounds interacting with liposome membrane in combined prescription of traditional Chinese medicines with immobilized liposome chromatography[J]. *J Pharmaceut Biomed*,2005,38(2):216.
- [6] 吴茜,毕志明,李萍,等.基于整体观的中药药效物质基础的生物活性筛选/化学在线分析研究新进展[J].中国药科大学学报,2007,38(4):289.

- [7] Qi LW, Li P, Li SL, *et al.* Screening and identification of permeable components in a combined prescription of Danggui buxue decoction using a liposome equilibrium dialysis system followed by HPLC and LC-MS[J]. *J Sep Sci*,2006,29(14):2211.
- [8] 齐炼文,李萍,盛亮洪,等.透析-高效液相色谱法在当归补血汤药效物质基础研究中的应用[J].分析化学,2006,34(2):196.
- [9] Wen XD, Qi LW, Chen J, *et al.* Analysis of interaction property of bioactive components in Danggui buxue decoction with protein by microdialysis coupled with HPLC-DAD-MS[J]. *J Chromatogr B*,2007,852(1/2):598.
- [10] Wan H, Rehngrén M. High-throughput screening of protein binding by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography and mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*,2006,1102(1/2):125.
- [11] 罗朵生,黄利华,陈媛媛,等.透析高效液相色谱法筛选黄连药效物质的研究[J].中药新药与临床药理,2012,23(1):45.
- [12] 胡旭光,贝伟剑,郭姣,等.复方贞术调脂方调节HMG-CoA还原酶活性成分的快速筛选[J].中药新药与临床药理,2010,21(5):468.
- [13] 郭姣,贝伟剑,唐春萍,等.复方贞术调脂方对饮食性高脂血症大鼠肝酯酶的作用[J].中药材,2009,32(4):582.

(收稿日期:2013-01-10 修回日期:2013-03-18)

纪念李时珍逝世420周年及中国药学会药学史分会成立30周年暨第十七届全国药史本草学术研讨会在湖北蕪春召开

2013年10月24~26日,纪念李时珍逝世420周年及中国药学会药学史分会成立30周年暨第十七届全国药史本草学术研讨会在李时珍故乡湖北蕪春隆重召开。会议由中国药学会主办,中国药学会药学史专业委员会、中国中医科学院中药资源中心、湖北蕪春县人民政府联合承办。

10月25日的会议开幕式由中国药学会药学史专业委员会副主任委员梅全喜主持,中国药学会药学史专业委员会主任委员郝近大致开幕词,蕪春县人民政府县长赵少莲和中国药学会副秘书长陈兵讲话,蕪春县人大副主任王剑宣读李时珍逝世420周年纪念文。开幕式上,还试映了由健康卫视摄制的《本草纲目》大型文献纪录片——从艾开始;并举行了由梅全喜教授主编、中国中医药出版社出版的《艾叶的研究与应用》新书首发式暨赠书仪式,梅全喜教授向蕪春县李时珍中医药图书馆、蕪春县李时珍纪念馆及参会代表赠书。出席大会的还有中国药学会副理事长黄璐琦教授、药学史专业委员会副主任委员万芳、曹晖教授,香港浸会大学中医药学院副院长赵中振教授,安徽中医药大学副校长彭代银教授,台湾中医药大学谢云忠教授,湖南中医药大学李钟文教授等以及来自大陆、香港、台湾的专家学者共140多人。会议共收到论文86篇,并出版会议论文集。

开幕式后,上午的学术报告会由药学史专业委员会副主任委员曹晖教授主持。中国中医科学院副院长黄璐琦教授、香港浸会大学赵中振教授、广州中医药大学附属中山医院梅

全喜教授作大会学术报告。下午的学术报告会由药学史专业委员会副主任委员万芳教授主持。中国中医科学院医史文献研究所肖永芝研究员、中国医学科学院药用植物研究所谭晓蕾博士、中国中医科学院中药资源中心彭华胜博士、浙江中医药大学药学院张水利教授、国家中药现代工程技术研究中心曹晖教授、南京中医药大学陈仁寿教授、安徽中医药大学王德群教授、中国中医科学院医史文献研究所万芳研究员及台湾中医药大学附设医院谢云忠教授等作了精彩的学术报告,最后由万芳研究员致闭幕词。

当天晚上8点半,与会代表近60人还参加了由赵中振教授主持的第十一次本草读书会。中国中医科学院中药资源中心郝近大和李时珍纪念馆原副馆长宋光锐分别作了“读本草讲故事——谈木通用品种的变化”和“《本草纲目》中的文化内涵”两个精彩的报告。

26日上午,全体代表参加了第二十三届李时珍中药材交易会开幕式,并参观了李时珍医药集团、李时珍纪念馆及李时珍陵园,在李时珍墓前敬献花篮,共同三鞠躬缅怀“医圣”李时珍,追思“医圣”的丰功伟绩,继承“医圣”的遗志。至此,纪念李时珍逝世420周年及中国药学会药学史分会成立30周年暨第十七届全国药史本草学术研讨会在浓厚的学术及愉悦和谐的气氛中圆满结束。

戴卫波