



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109613233 A

(43)申请公布日 2019.04.12

(21)申请号 201811257051.7

(22)申请日 2018.10.26

(71)申请人 杭州市红十字会医院

地址 310003 浙江省杭州市环城东路208号

(72)发明人 叶丽红 刘喜德 刘芳

(74)专利代理机构 上海脱颖律师事务所 31259

代理人 解文霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

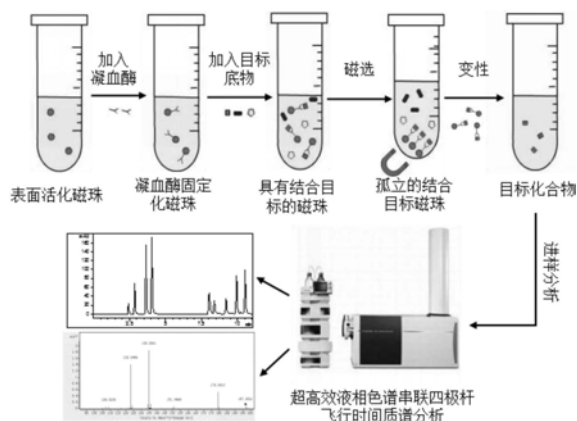
权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54)发明名称

一种中药制剂的活性成分的筛选方法

(57)摘要

本发明公开了一种中药制剂的活性成分的筛选方法,通过开环反应直接将凝血酶固定在磁珠上,制备得到凝血酶固定化磁珠,用于从复杂的丹参制剂中筛选出潜在的凝血酶抑制剂。本发明与其他方法相比,可以同时分离和富集键合的化合物,使其能够更敏感和快速的对化合物进行筛选,并提供了一种高选择性分离亲和化合物而避免繁琐的凝血酶固定化磁珠与目标分析物的制备方法。此外,原儿茶醛的凝血酶抑制活性为首次报道。方便的酶联技术表明,凝血酶固定化磁珠是一种用于从复杂的丹参制剂中鉴定生物活性化合物的新颖和可行的工具。



1. 一种凝血酶固定化磁珠的制备方法,包括如下步骤:
 - 1) 取适量空白磁珠于离心管中,用缓冲液清洗;
 - 2) 在离心管中加入凝血酶溶液,混合均匀;然后加入硫酸铵溶液,旋转孵育;
 - 3) 孵育完成后,移除离心管中的上清液,然后清洗磁珠,最后把键合后的凝血酶固定化磁珠重新分散在缓冲液中保存。
2. 如权利要求1凝血酶固定化磁珠的制备方法,其特征在于:所述的磁珠用量为1-2.5mg/30 μ g凝血酶。
3. 如权利要求2凝血酶固定化磁珠的制备方法,其特征在于:所述的磁珠用量为1.5mg/30 μ g凝血酶。
4. 如权利要求1凝血酶固定化磁珠的制备方法,其特征在于:步骤1)中所述的缓冲液为0.1M磷酸钠缓冲液。
5. 如权利要求1凝血酶固定化磁珠的制备方法,其特征在于:步骤1)在清洗空白磁珠后加入适量磷酸钠溶液。
6. 如权利要求1凝血酶固定化磁珠的制备方法,其特征在于:步骤2)所述的凝血酶溶液为凝血酶0.9%NaCl溶液。
7. 如权利要求1凝血酶固定化磁珠的制备方法,其特征在于:步骤2)在孵化期间不让磁珠沉淀,采用倾斜旋转的方式。
8. 如权利要求1凝血酶固定化磁珠的制备方法,其特征在于:步骤3)在移除上清液前把离心管放在磁铁上1-3min,用0.8%吐温20清洗磁珠,分散后的凝血酶固定化磁珠适宜保存温度1-10 $^{\circ}$ C。
9. 一种中药制剂活性成分的筛选方法,包括如下步骤:
 - (1) 将权利要求1-8任一所述的凝血酶固定化磁珠的制备方法制备得到的凝血酶固定化磁珠与待测中药制剂混合,置于恒温箱中孵育,设定合适的孵育时间和孵育温度;
 - (2) 孵育结束后,转移上清液,清洗磁珠分离未键合的分子;
 - (3) 使用洗脱试剂洗脱,使磁珠上键合的化合物解离出来,用酶抑制剂测定方法评估键合凝血酶的化合物对凝血酶的抑制活性;
 - (4) 通过步骤(3)筛选出有抑制活性的化合物,然后通过液相色谱串联四极杆飞行时间质谱分析键合的化合物种类和结构。
10. 如权利要求9所述的中药制剂活性成分的筛选方法,其特征在于:步骤(1)中恒温箱中孵育时间为10-50min,孵育温度20-50 $^{\circ}$ C。
11. 如权利要求9所述的中药制剂活性成分的筛选方法,其特征在于:步骤(3)所述的洗脱试剂包括0.1M柠檬酸溶液、30%的乙腈-水溶液(v/v)、10%的甲醇-水溶液(v/v)、30%的甲醇-水溶液(v/v)及30%的丙酮-水溶液(v/v)。
12. 如权利要求9所述的中药制剂活性成分的筛选方法,其特征在于:步骤(1)的中药制剂为丹参制剂。
13. 如权利要求12所述的中药制剂活性成分的筛选方法,其特征在于:步骤(1)的孵育时间为30min,孵育温度23 $^{\circ}$ C。
14. 如权利要求12所述的中药制剂活性成分的筛选方法,其特征在于:步骤(3)所述的洗脱试剂为30%的乙腈-水溶液(v/v)。

一种中药制剂的活性成分的筛选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种中药制剂的活性成分的筛选方法技术领域。

背景技术

[0002] 在过去的几十年中,各种亲和筛选方法,包括表型细胞筛选法、细胞荧光素酶报告系统法和基于酶的筛选方法,被广泛地开发和应用用于评价复杂药用植物提取物的生物活性。其中,酶键合磁珠法由于具有操作稳定性高、低特异性结合、耦合抗体定位性好、共轭效率高和完好保留酶的结构和活性的优点在生物催化剂、化合物库和酶抑制剂筛选的应用方面受到了极大的关注。常见的酶固定化方法有共价键合、物理吸附和亲和固定。虽然基于亲和选择方法固定的磁珠可以从药用植物中筛选出一些特定的抑制剂,但是不可避免酶共轭技术的固有缺点。更重要的是,磁珠的适宜反应试剂必须通过化学改性研发,这可能是一个昂贵和费时的过程。目前,几乎未报道有在酶固定化方法中利用直接共价键合方法固定化酶的文章。因此,迫切需要开发一种简单的固定化酶的方法,适用于从复杂样品基质中检测活性物质。

[0003] 凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶,可以选择性的裂解纤维蛋白原的精氨酸-谷氨酸键形成纤维蛋白凝块和释放血纤维蛋白肽链。众所周知,凝血酶在血栓症、炎症、凝血、肿瘤的生长和转移等生理和病理过程中起着重要的作用,通常作为诊断某些疾病的生物标志物,如凝血异常、滑膜炎症和肺转移等。因此,抑制凝血酶的活性或防止其产生是最新的抗血栓形成的治疗策略。其目的在于治疗干预血栓性疾病,并且几种方法已经成功应用于有效的凝血酶抑制剂的开发,例如基于配体/受体相互作用的概念的筛选方法。然而,这些方法具有诸如重复性、稳定性和复杂的分离程序等缺点,导致一些活性化合物的缺失。因此,开发一种简单、快速和有效的方法用于凝血酶抑制剂的筛选是十分有意义的。

[0004] 酚酸是一类含有酚环的有机酸,具体包括单羟基苯甲酸,二羟基苯甲酸和三羟基苯甲酸。据报道,药用植物中的酚酸具有多种生物活性,如抗氧化、抗菌、抗炎、抗缺氧、抗动脉硬化和抗癌。酚酸存在于许多植物中。丹参,为唇形科植物丹参的干燥根茎。它通常单独使用或与其它草药组合用于预防和治疗高血压,高脂血症等多种疾病。丹参注射剂是一种最常用的中药制剂,由丹参提取物制成。其主要活性化合物是各种水溶性酚酸,如丹参素,原儿茶酸,原儿茶醛,咖啡酸和迷迭香酸。药理研究表明,丹参中的酚酸可以抑制血小板凝固、清除氧自由基、保护心脏微血管内皮细胞、抑制血栓形成、调节致突变活性、保护心肌免受局部缺血。因此,从丹参制剂中筛选活性血液循环成分,对临床应用和新药研发具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的就在于提供一种新的中药制剂活性成分的筛选方法及其采用的凝血酶固定化磁珠。该方法重复性好、稳定性高,能从复杂的中药制剂中鉴定和筛选出生物活性化合物。

[0006] 一种凝血酶固定化磁珠的制备方法,包括如下步骤:

[0007] 1) 取适量空白磁珠于离心管中,用缓冲液清洗;

[0008] 2) 在离心管中加入凝血酶溶液,混合均匀;然后加入硫酸铵溶液,旋转孵育;

[0009] 3) 孵育结束后,移除离心管中的上清液,然后清洗磁珠,最后把键合后的凝血酶固定化磁珠重新分散在缓冲液中保存。

[0010] 所述的磁珠用量,优选为1-2.5mg/30μg凝血酶,最优选为1.5mg/30μg凝血酶,此时凝血酶的键合率达到理想化的数值。

[0011] 步骤1)中所述的缓冲液优选为0.1M磷酸钠缓冲液。进一步,在清洗空白磁珠后加入适量磷酸钠溶液。

[0012] 步骤2)所述的凝血酶溶液为凝血酶0.9%NaCl溶液,所述的旋转孵育旨在孵化期间不让磁珠沉淀,优选采用倾斜旋转的方式,不己沉淀。孵育时间根据凝血酶与磁珠的结合是否达到最大稳定值来决定。凝血酶-磁珠键合率用于评价磁珠和酶之间的相互作用,本专利中,凝血酶的结合率(%) = $(T_t - T_u) / T_t \times 100\%$, T_t 为总的凝血酶的量, T_u 为四次清洗上清液中凝血酶的含量。未固定化凝血酶的含量根据Bradford蛋白测定方法计算。

[0013] 步骤3)在移除上清液前把离心管放在磁铁上1-3min(最优选2min),用0.8%吐温(Tween) 20清洗磁珠,分散后的凝血酶固定化磁珠适宜保存温度在1-10℃(最优选4℃)。

[0014] 一种中药制剂活性成分的筛选方法,包括如下步骤:

[0015] (1) 将本专利方法制备得到的凝血酶固定化磁珠与待测中药制剂混合,置于恒温箱中孵育,设定合适的孵育时间和孵育温度;

[0016] (2) 孵育结束后,转移上清液,清洗磁珠分离未键合的分子;

[0017] (3) 使用洗脱试剂洗脱,使磁珠上键合的化合物解离出来,用酶抑制剂测定方法评估键合凝血酶的化合物对凝血酶的抑制活性;

[0018] (4) 通过步骤(3)筛选出有抑制活性的化合物,然后通过液相色谱串联四极杆飞行时间质谱分析键合的化合物种类和结构。

[0019] 步骤(1)中恒温箱中孵育设定的时间一般选择10-50min,优选为30min。孵育温度一般选择20-50℃,优选为23℃。

[0020] 步骤(3)所述的洗脱试剂包括0.1M柠檬酸溶液、30%的乙腈-水溶液(v/v)、10%的甲醇-水溶液(v/v)、30%的甲醇-水溶液(v/v)及30%的丙酮-水溶液(v/v),优选为30%的乙腈-水溶液(v/v)。所述的酶抑制剂测定方法,采用现有技术中公开的相关酶抑制剂测定方法来评估键合凝血酶的化合物对凝血酶的抑制活性即可。

[0021] 步骤(4)优选Agilent 1290超高效液相色谱和Agilent 6530四级杆飞行时间质谱。

[0022] 本专利提供的中药制剂活性成分的筛选方法,经过对丹参制剂及其对照混合物的应用结果来看,成功的从复杂的丹参制剂中筛选出潜在的凝血酶抑制剂。

[0023] 本发明的有益效果:

[0024] 本发明通过开环反应直接将凝血酶键合固定在磁珠上,制备得到凝血酶固定化磁珠,操作简单。通过实验测试,利用本发明方法得到的凝血酶固定化磁珠可以从复杂样品(中药制剂中)基质中检测筛选出活性成分。

[0025] 与基于配体/受体相互作用的概念的筛选一类的方法相比,本发明提供的从酶固

定化磁珠的方法重复性好,稳定性高,分离程序简单、快速、有效。

[0026] 以丹参中药制剂为例,该方法可以同时分离和富集键合的活性成分,并且可以高选择性的从丹参制剂中筛选出潜在的凝血酶抑制剂的活性成分,可见是一种从复杂的中药制剂中鉴定出生物活性化合物的有效方法。

[0027] 本发明的中药制剂活性成分的筛选方法具有操作稳定性高、特异性结合低、耦合抗体定位性好、共轭效率高并能完好保留酶的结构和活性的优点,在生物催化剂、化合物库和酶抑制剂筛选的应用方面将会得到更多的应用。

附图说明

[0028] 图1为丹参制剂中抑制剂筛选的工作流程图。

[0029] 图2A和2B分别为空白磁珠和凝血酶固定化磁珠的透射电镜图;图2C和2D分别为空白磁珠和凝血酶固定化磁珠的扫描电镜图;图2E、2F和2G分别是凝血酶、磁珠和凝血酶固定化磁珠的红外光谱图。

[0030] 图3为标准对照品和丹参注射剂中的主要成分的四级杆飞行时间质谱图及其裂解途径示意图。图中字母A、B、C、D、E、F、G、H、I分别代表丹参注射剂中不同的有效成分,分别为(A)丹酚素钠;(B)原儿茶酸;(C)原儿茶醛;(D)咖啡酸;(E)迷迭香酸;(F)紫草酸;(G)丹酚酸B;(H)丹酚酸A;(I)丹酚酸C。

[0031] 图4为凝血酶固定化磁珠的反应机理图。

[0032] 图5A为考察不同磁珠用量对凝血酶键合率的影响折线图。

[0033] 图5B为考察不同种类的洗脱溶剂对键合后的化合物的洗脱效果的柱状图,图中通过原儿茶醛和丹酚酸C的峰面积进行分析比较。

[0034] 图5C为考察不同孵育温度对凝血酶键合后的化合物的影响柱状图,图中通过原儿茶醛和丹酚酸C的峰面积进行分析比较。

[0035] 图5D为考察不同孵育时间对凝血酶键合后的化合物的影响柱状图,图中通过原儿茶醛和丹酚酸C的峰面积进行分析比较。

[0036] 图5E为考察游离凝血酶和固定化凝血酶的活性研究柱状图。

[0037] 图6A为对照品混合溶液的液相色谱图。图中,1,2,3,4,5,6,7,8,9分别代表不同的有效成分,化合物1为丹参素钠,化合物2为原儿茶酸,化合物3为原儿茶醛,化合物4为咖啡酸,化合物5为迷迭香酸,化合物6为紫草酸,化合物7为丹酚酸B,化合物8为丹酚酸A,化合物9为丹酚酸C。

[0038] 图6B和6D为原儿茶醛和丹酚酸C键合凝血酶的液相色谱图。

[0039] 图6C为丹参注射制剂的液相色谱图。图中,1,2,3,4,5,6,7,8,9分别代表丹参注射剂中不同的有效成分,化合物1为丹参素钠,化合物2为原儿茶酸,化合物3为原儿茶醛,化合物4为咖啡酸,化合物5为迷迭香酸,化合物6为紫草酸,化合物7为丹酚酸B,化合物8为丹酚酸A,化合物9为丹酚酸C。

具体实施方式

[0040] 由于其应用范围广,下面将以示例的方式对本发明的内容作举例说明。如果没有特别说明,所采用的试剂盒仪器均为本领域常规或市售产品。

[0041] (1) 本发明实施例中凝血酶固定化磁珠按以下方法制得:准确称取1.5mg的空白磁珠于2mL离心管中,用0.1M磷酸钠缓冲液清洗2次。在清洗后的磁珠中加入100μL的0.1M磷酸钠溶液(PBS)和100μL凝血酶溶液(30μg凝血酶溶于100μL的0.9%NaCl溶液中),混合均匀,加入100μL的3M硫酸铵溶液,在37℃下缓慢倾斜旋转孵育24h(在孵化期间不要让磁珠沉淀下来)。孵育后,把离心管放在磁铁上2min,移除上清液,用1mL缓冲液PBS清洗磁珠3次,再用1mL 0.8%Tween 20清洗磁珠10min。最后,把键合后的凝血酶固定化磁珠重新分散在900μL缓冲液PBS中,4℃保存。

[0042] 本发明实施例中对照品混合溶液的制备方法为:分别称取丹参素钠,原儿茶酸,原儿茶醛,咖啡酸,迷迭香酸,紫草酸,丹酚酸B,丹酚酸A,丹酚酸C的对照品适量,精密称定,分别置于棕色量瓶中,各自加入甲醇制成每1mL含1000μg的对照品溶液。分别移取100μL的对照品溶液置于同一棕色量瓶中,再加入100μL甲醇制成100μg/mL的对照品混合溶液。

[0043] (2) 将900μL的凝血酶固定化磁珠和100μL的100μg/mL的丹参注射剂(或对照品混合溶液)配制成1mL的反应液,置于恒温箱中用不同的时间和不同的温度孵育。转移上清液,并清洗磁珠。随后,用不同的100μL洗脱溶剂洗脱,并在室温下倾斜旋转10min。上清液离心后,进行分析检测。

[0044] 不同的洗脱溶剂包括:0.1M柠檬酸溶液,30%的乙腈-水溶液(v/v),10%的甲醇-水溶液(v/v),30%的甲醇-水溶液(v/v)及30%的丙酮-水溶液(v/v),优选为30%的乙腈-水溶液(v/v)。

[0045] 分析检测通过Agilent 1290超高效液相色谱和Agilent 6530四级杆飞行时间质谱测定丹参注射剂(或对照品混合液)中有效成分的含量来表征该方法。

[0046] (3) 将100μL 0.3mg/mL的凝血酶溶液分别与不同用量的磁珠键合(1,1.5,2和2.5mg)。加入100μL的0.1M磷酸钠溶液(PBS)和100μL 3M硫酸铵溶液,在37℃下缓慢倾斜旋转孵育24h。未固定化酶的含量根据Bradford蛋白测定方法计算。在本实验中, T_u 为四次清洗上清液中凝血酶的含量, T_t 为总的凝血酶的量,凝血酶的结合率(%) = $(T_t - T_u) / T_t \times 100\%$ 。凝血酶-磁珠结合率用于评价磁珠和酶之间的相互作用。

[0047] 凝血酶溶液用30μg凝血酶溶于100μL的0.9%NaCl溶液中。

[0048] Bradford蛋白测定方法:6支试管中分别加入100μL不同含量的凝血酶溶液(0,6,12,18,24和30μg)。然后,在各个试管中分别加入2mL Total Protein Kit试剂。反应2min后,用比色皿,在分光光度计上测定各样品在595nm处的光吸收值A₅₉₅。用凝血酶质量(μg)为横坐标,用吸光度值A₅₉₅为纵坐标,作图,即得到一条标准曲线。

[0049] (4) 测定凝血酶的抑制活性,具体方法包括以下步骤:50μL的0.3mg/mL的凝血酶溶液和200μL目标化合物(0,0.5,1.5,10,50,100和500μg/mL)混合后,加入50μL 25mg/mL的T3068(β-丙氨酸-甘氨酸-精氨酸-对硝基苯胺二乙酸酯,购于Sigma公司),溶于PBS溶液中,开始酶反应。在23℃条件下孵育20min后,加入100μL 0.1M柠檬酸溶液(pH 3.1)终止反应。使用Hitachi UH5300分光光度计在405nm的波长下测量由凝血酶释放的对硝基苯胺的量,其可间接评估样品中靶凝血酶的浓度。

[0050] 酶活性抑制率由百分比来表示。酶活性抑制率计算方法如下:抑制率(%) = (不加样品反应的吸光度 - 加入样品反应的吸光度) / 不加样品反应的吸光度 × 100%。原儿茶醛和丹酚酸C的半抑制浓度(IC₅₀)是由酶抑制率比上样品浓度对数绘制的最小二乘回归线所

得。本发明中,阿加曲班作为凝血酶抑制剂的阳性对照。

[0051] 实施例1

[0052] Bradford蛋白测定方法:于6支试管中分别加入100 μ L不同含量的凝血酶溶液(0, 6, 12, 18, 24和30 μ g)。然后,在各个试管中分别加入2mL Total Protein Kit试剂。反应2min后,用比色皿,在分光光度计上测定各样品在595nm处的光吸收值A₅₉₅。用凝血酶质量(μ g)为横座标,用吸光度值A₅₉₅为纵座标,作图,即得到一条标准曲线。

[0053] 为了测定凝血酶-磁珠结合率,100 μ L 0.3mg/ml的凝血酶溶液分别与不同用量的磁珠键合(1, 1.5, 2和2.5mg)。加入100 μ L的0.1M磷酸钠溶液(PBS)和100 μ L 3M硫酸铵溶液,在37 $^{\circ}$ C下缓慢倾斜旋转孵育24h。未固定化酶的含量根据Bradford蛋白测定实验计算。在本实验中, T_u 为四次清洗上清液中凝血酶的含量, T_t 为总凝血酶的量,凝血酶的结合率(%) = $(T_t - T_u) / T_t \times 100\%$ 。

[0054] 在本实施例中,选取1.0、1.5、2.0、2.5mg的磁珠对磁珠用量进行考察,实验过程中凝血酶用量保持恒定(100 μ L, 0.3mg/mL)。如图5A所示,考察不同磁珠用量对凝血酶键合率的影响折线图。当磁珠的量从1.0mg增加至1.5mg时,凝血酶的键合百分比从55逐渐升高至70。然而,当磁珠的量增加至2.5mg时,凝血酶-磁珠的键合率回落到65%,表明当磁珠的用量为1.5mg时凝血酶的键合率达到最大。因此,选择1.5mg的磁珠用量来键合凝血酶。

[0055] 实施例2

[0056] 将900 μ L的凝血酶固定化磁珠和100 μ L的100 μ g/mL的对照品混合溶液配制成1mL的反应液,共配制5份相同的反应液,置于相同孵育温度的恒温箱中,孵育相同的时间。待孵育结束后,转移上清液,并清洗磁珠。配制5份不同的100 μ L洗脱溶剂,分别为0.1M柠檬酸溶液,30%的乙腈-水溶液(v/v),10%的甲醇-水溶液(v/v),30%的甲醇-水溶液(v/v)及30%的丙酮-水溶液(v/v)。随后,用5份不同的100 μ L洗脱溶剂分别洗脱5份反应液,并在室温下倾斜旋转10min。上清液离心后,进行液相色谱串联四极杆飞行时间质谱分析检测。

[0057] 液相色谱分析条件为:

[0058] 本实验采用的仪器为安捷伦超高效液相色谱(圣克拉拉,美国),配备真空抽气泵,自动进样器,恒温柱温箱,紫外检测器。Agilent SB-C18色谱柱(1.8 μ m, 4.6 $\times$ 50mm i.d.),柱温30 $^{\circ}$ C,检测波长286nm,流动相A为0.1% (v/v) 甲酸水;B为乙腈。梯度:0-2min, 7%-17%B; 2-3min, 17%-21%B; 3-6min, 21%-21%B; 6-8min, 21%-28%B; 8-9min, 28%-35%B; 9-10min, 35%-80%B; 10-12min, 80%-80%B; 12-13min, 80%-7%B。流速为0.5mL/min,进样体积为2 μ L。

[0059] 四级杆飞行时间质谱分析条件为:

[0060] 本实验采用的仪器为安捷伦四级杆飞行时间质谱(圣克拉拉,美国),双电喷雾离子化(Dual ESI)。负离子模式运行,质量范围设定为m/z 100-1000。毛细管电压,3500V;雾化器气压,45psig;干燥气流速,12L/min;干燥气温度,350 $^{\circ}$ C;skimmer电压,65V;碰撞能,175V;八级杆RF,750V。

[0061] 在本实施例中,当孵育温度和孵育时间均保持一致时,测试了一系列不同种类的洗脱溶剂。如图5B所示,考察不同种类的洗脱溶剂对键合后的化合物的洗脱效果的柱状图,图中通过原儿茶醛和丹酚酸C的峰面积来研究具有两种比例(10和30%, v/v)的两相溶剂体系(甲醇-水和乙腈-水)。此外,推荐的磁珠变性溶剂0.1M柠檬酸盐溶液也用来洗脱目标分

析物。用液相色谱串联四极杆飞行时间质谱来分析洗脱后的溶剂,因其可以进一步的鉴别出游离的化合物。而且,将吸附后的酶键合的磁珠溶解在水中可以检测到目标分析物。通过比较分析,可以确定键合的化合物是否都已被解吸出来。如图5B所示,用30%乙腈洗脱的两种化合物的峰面积大于使用其它标准化方法洗脱溶剂的峰面积。当使用30%甲醇洗脱时,原儿茶醛和丹酚酸C的峰面积为第二大。因此,选择30%乙腈的洗脱溶剂作为最优条件。

[0062] 实施例3

[0063] 将900 μ L的凝血酶固定化磁珠和100 μ L的100 μ g/mL的对照品混合溶液配制成1mL的反应液,共配制4份相同的反应液,置于4个温度不同的恒温箱中,孵育相同的时间30min,4个恒温箱的温度分别设定为23 $^{\circ}$ C,30 $^{\circ}$ C,37 $^{\circ}$ C和44 $^{\circ}$ C。待孵育结束后,转移上清液,并清洗磁珠。随后,用相同的100 μ L洗脱溶剂洗脱,并在室温下倾斜旋转10min。上清液离心后,进行液相色谱串联四极杆飞行时间质谱分析检测。

[0064] 液相色谱串联四极杆飞行时间质谱分析条件同实施例2。

[0065] 在本实施例中,当孵育时间保持在30min时,测试了一系列从23 $^{\circ}$ C至44 $^{\circ}$ C的孵育温度。如图5C所示,考察不同孵育温度对凝血酶键合后的化合物的影响柱状图,图中通过原儿茶醛和丹酚酸C的峰面积进行分析比较。可以看出,随着孵育温度从23 $^{\circ}$ C升温至37 $^{\circ}$ C,原儿茶醛和丹酚酸C的键合率略有下降。然而,当孵育温度达到44 $^{\circ}$ C时,固定化酶显示出较弱的活性稳定性,伴随着分析物峰面积的急剧下降。因此,基于高的键合率和简便的操作条件,选择23 $^{\circ}$ C的孵育温度作为最优条件。

[0066] 实施例4

[0067] 将900 μ L的凝血酶固定化磁珠和100 μ L的100 μ g/mL的对照品混合溶液配制成1mL的反应液,共配制5份相同的反应液,置于相同温度的恒温箱中,分别孵育10min,20min,30min,40min和50min。待孵育结束后,转移上清液,并清洗磁珠。随后,用相同的100 μ L洗脱溶剂洗脱,并在室温下倾斜旋转10min。上清液离心后,进行液相色谱串联四极杆飞行时间质谱分析检测。

[0068] 液相色谱串联四极杆飞行时间质谱分析条件同实施例2。

[0069] 在本实施例中,当孵育温度保持一致时,测试了一系列从10min至50min的孵育时间。如图5D所示,考察不同孵育时间对凝血酶键合后的化合物的影响柱状图,图中通过原儿茶醛和丹酚酸C的峰面积进行分析比较。在孵育30min后原儿茶醛和丹酚酸C的峰面积达到最大。但是,当孵育时间从30延长至50min时,两个目标分析物的峰面积出现了轻微的减小。因此,选择30min的孵育时间作为最优条件。

[0070] 实施例5

[0071] 在本实施例中,在最优的实验条件下(显色底物T3068 25mg/mL,凝血酶0.3mg/mL,检测波长405nm),对游离凝血酶和固定化凝血酶的活性进行了研究。图5E表明固定化酶的活性略低于游离凝血酶87.2%的活性。当凝血酶与磁珠表面共价结合时,由于固定化凝血酶的特异性和稳定性更高,从而导致固定化酶更适合与底物分子作用。

[0072] 实施例6

[0073] 50 μ L的0.3mg/mL的凝血酶溶液和200 μ L目标化合物(0,0.5,1.5,10,50,100和500 μ g/mL)混合后,加入50 μ L 25mg/mL的T3068(溶于PBS溶液中)开始酶反应。在23 $^{\circ}$ C条件下孵育20min后,加入100 μ L 0.1M柠檬酸溶液(pH 3.1)终止反应。使用Hitachi UH5300分光光度计

在405nm的波长下测量由凝血酶释放的对硝基苯胺的量,其可间接评估样品中靶凝血酶的浓度。

[0074] 酶活性抑制率由百分比表示。抑制率计算如下:抑制率(%)=(不加样品反应的吸光度-加入样品反应的吸光度)/不加样品反应的吸光度 $\times$ 100%。原儿茶醛和丹酚酸C的半抑制浓度(IC₅₀)是由酶抑制率比上样品浓度对数绘制的最小二乘回归线所得。在这项研究中,阿加曲班作为凝血酶抑制剂的阳性对照。

[0075] 在本实施例中,使用传统的酶抑制剂测定方法评估了两种可以键合凝血酶的化合物(原儿茶醛和丹酚酸C)对凝血酶的抑制活性。原儿茶醛和丹酚酸C的半抑制浓度的计算结果如表1所示,分别为286.11和66.09 μ g/mL。

[0076] 日内精密度

[0077] 分别称取原儿茶醛,丹酚酸C的对照品适量,精密称定,分别置于棕色量瓶中,各自加入甲醇制成每1mL含1000 μ g的对照品溶液。分别移取50 μ L的对照品溶液置于同一棕色量瓶中,再加入900 μ L甲醇制成50 μ g/mL的对照品混合溶液,即可用作液相色谱串联四极杆飞行时间质谱对其进行分析检测。在同一天内对同一对照品混合溶液连续进样6次,获得日内精密度,其结果如表1所示。原儿茶醛保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)为0.02%和0.22%。丹酚酸C保留时间和峰面积的RSD为0.02%和1.28%。

[0078] 日间精密度

[0079] 分别称取原儿茶醛,丹酚酸C的对照品适量,精密称定,分别置于棕色量瓶中,各自加入甲醇制成每1mL含1000 μ g的对照品溶液。分别移取50 μ L的对照品溶液置于同一棕色量瓶中,再加入900 μ L甲醇制成50 μ g/mL的对照品混合溶液,即可用作液相色谱串联四极杆飞行时间质谱对其进行分析检测。对于同一混合标准品连续进样3天,每天进样2次,获得日间精密度,其结果如表1所示。原儿茶醛保留时间和峰面积的日RSD为0.34%和1.07%。丹酚酸C的保留时间和峰面积的RSD为0.05%和3.91%。

[0080] 重复性

[0081] 分别称取原儿茶醛,丹酚酸C的对照品适量,精密称定,分别置于棕色量瓶中,各自加入甲醇制成每1mL含1000 μ g的对照品溶液。分别移取50 μ L的对照品溶液置于同一棕色量瓶中,再加入900 μ L甲醇制成50 μ g/mL的对照品混合溶液,即可用作液相色谱串联四极杆飞行时间质谱对其进行分析检测。参照上述实验步骤,平行做三组,进行考察,其结果如表1所示。原儿茶醛保留时间和峰面积的RSD为0.37%和7.31%。丹酚酸C的保留时间和峰面积的RSD为0.03%和6.72%。

[0082] 定量限和检测限

[0083] 在最优条件下,根据标准溶液的浓度及其测量的峰面积绘制校准曲线,求出直线回归方程式。所有标准曲线都具有良好的线性,且相关系数 r^2 均高于0.99。以3倍和10倍的信噪声(S/N)来确定每个分析物的检测限和定量限。其结果如表1所示,原儿茶醛的LOD和LOQ分别为0.01 μ g/mL和0.04 μ g/mL。丹酚酸C的LOD和LOQ分别为0.04 μ g/mL和0.14 μ g/mL。

[0084] 表1 方法的线性回归数据、精密度、重现性、检测限、定量限和半抑制浓度

[0085]

分析物	标准曲线	线 性 范 围 (μg/mL)	r ²	精密度 (RSD%)				重 复 性(RSD%, n=3)		LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)
				日内		日间						
				(n=6)		(n=3)		保 留 时 间	峰 面 积			
				保 留 时 间	峰 面 积	保 留 时 间	峰 面 积					
原儿茶醛	y = 16.455x - 8.3837	0.05-250	0.9999	0.02	0.22	0.34	1.07	0.37	7.31	0.01	0.04	286.11
丹酚酸 C	y = 5.5825x + 3.1862	0.05-250	0.9989	0.02	1.28	0.05	3.91	0.03	6.72	0.04	0.14	66.09

[0086] 加样回收率

[0087] 表2中所列的实际样品中原儿茶醛和丹酚酸C的浓度分别为74.94和11.68μg/mL。通过在丹参样品中加入低和高浓度的两种标准溶液,对目标分析物的回收率进行了测试。并通过筛选方法对样品进行分析。在本实验中,样品的加标回收率达到89.11%-107.88%,其结果如表2所示。

[0088] 表2 样品中原儿茶醛和丹酚酸C的含量及其加标回收率

分析物	丹参注射液(μg/mL)	加标浓度 (μg/mL)		回收率 (%)
		10	100	
[0089] 原儿茶醛	74.94	10	92.64	
		100	92.11	
	11.68	5	96.02	
		50	107.88	

[0090] 结果显示本发明方法的重复性良好,回收率高,检测准确性好。

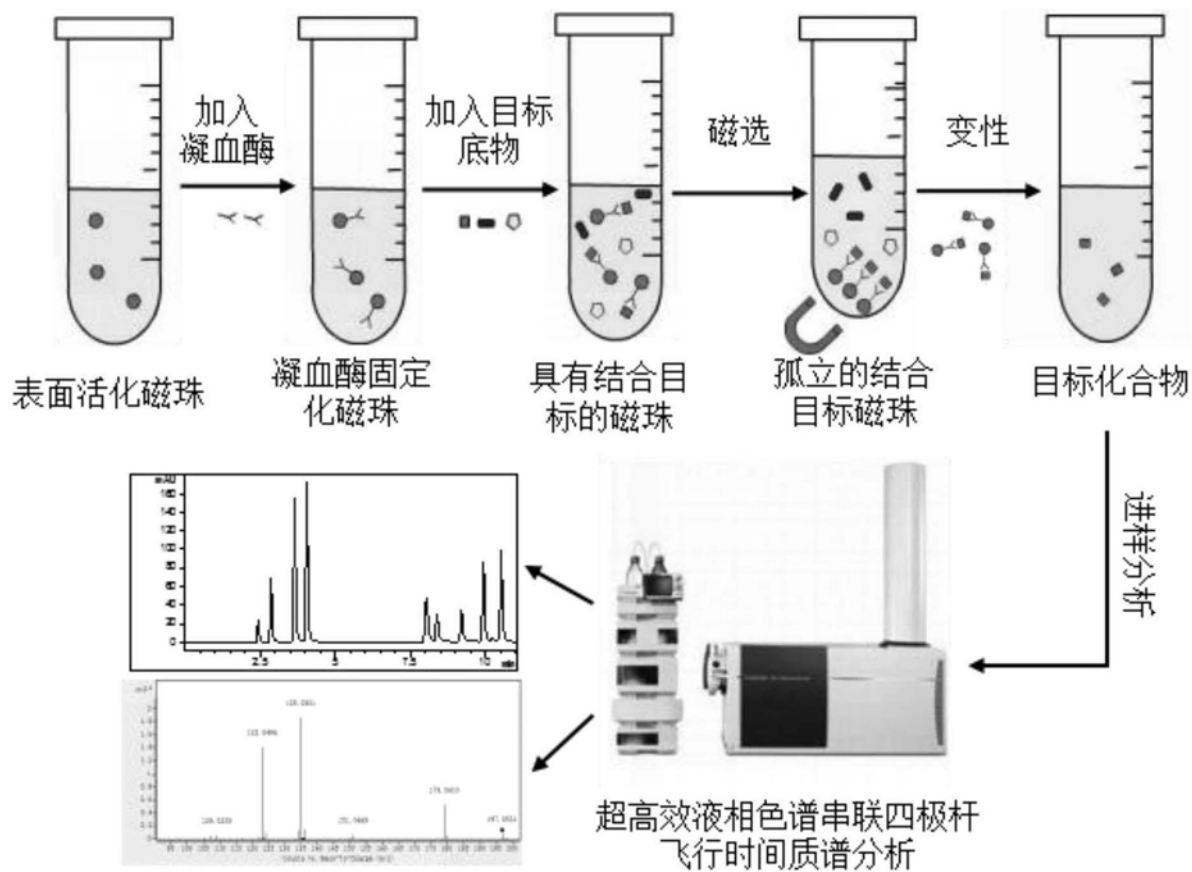


图1

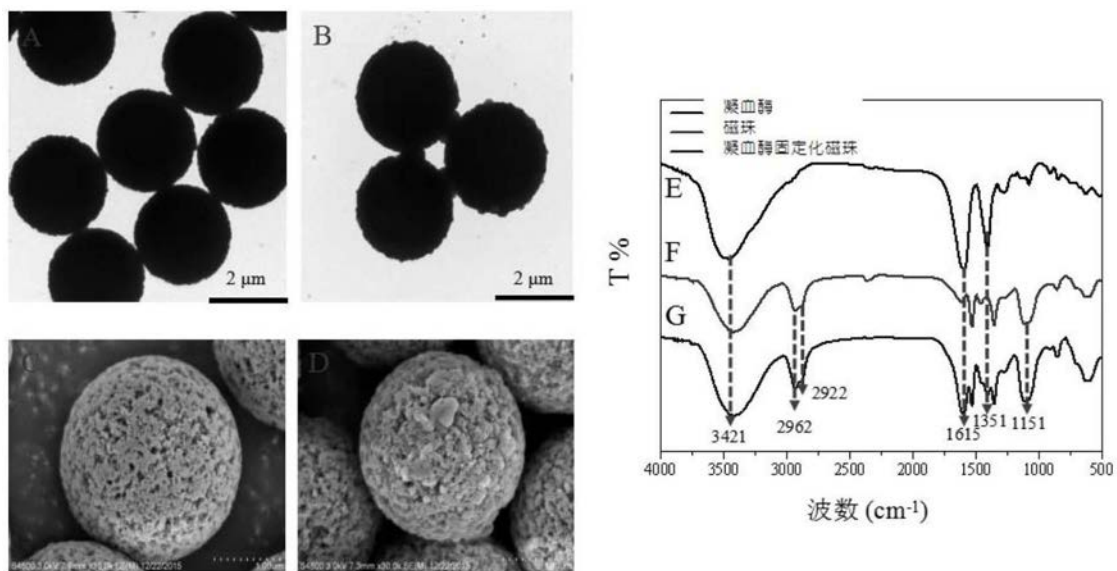


图2

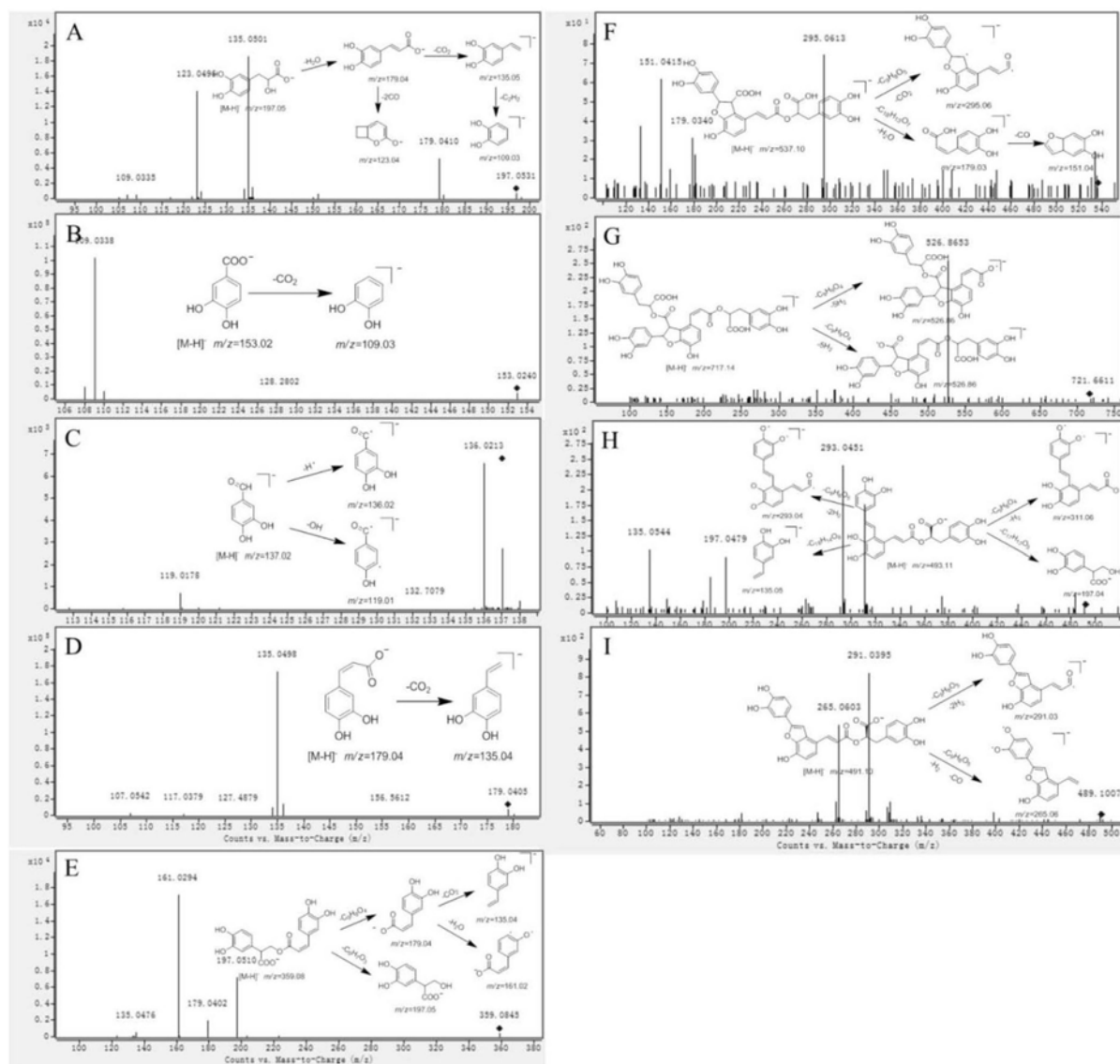


图3

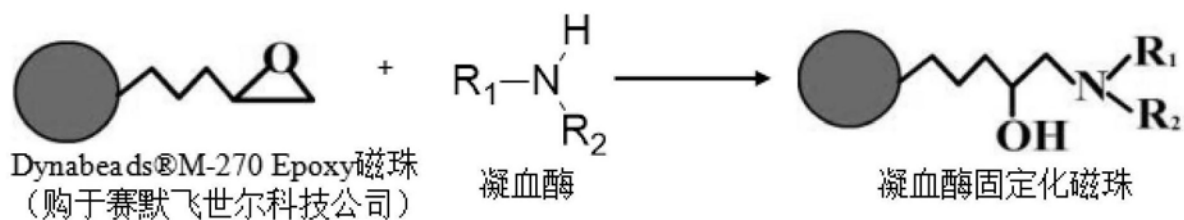
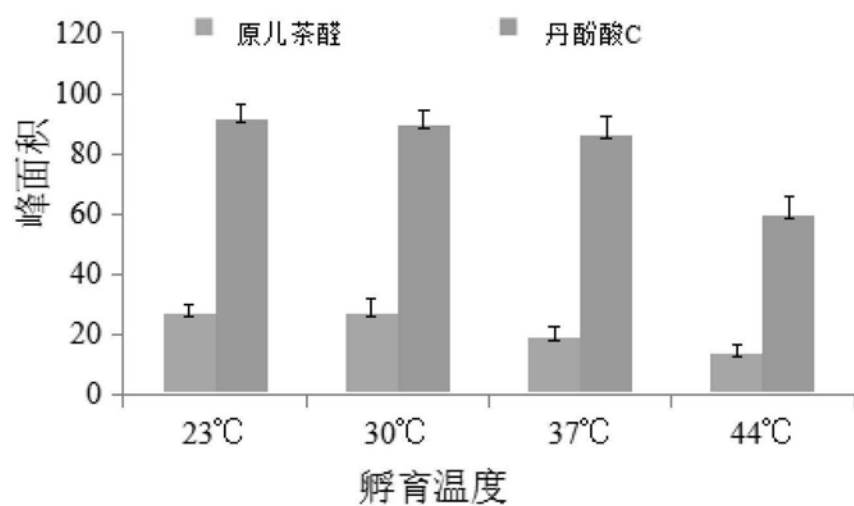
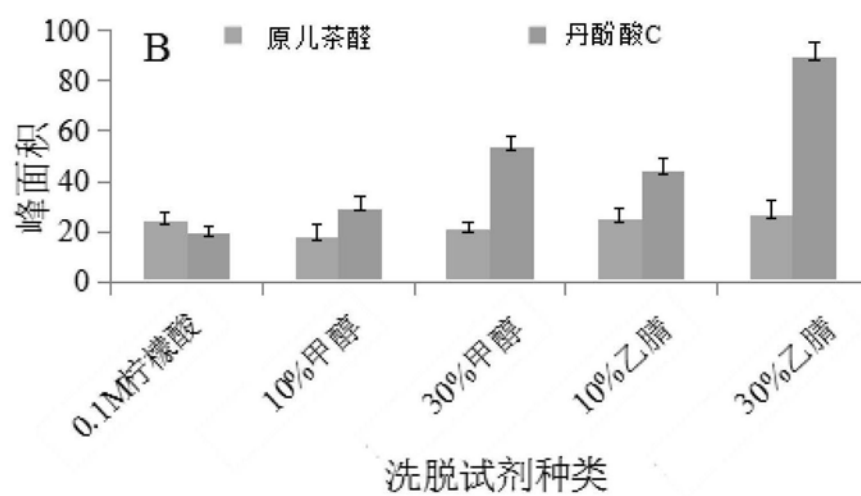
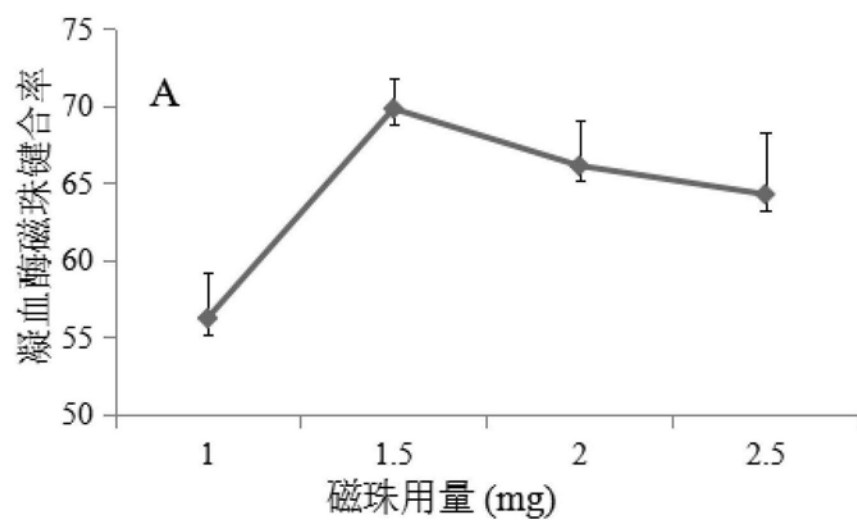


图4



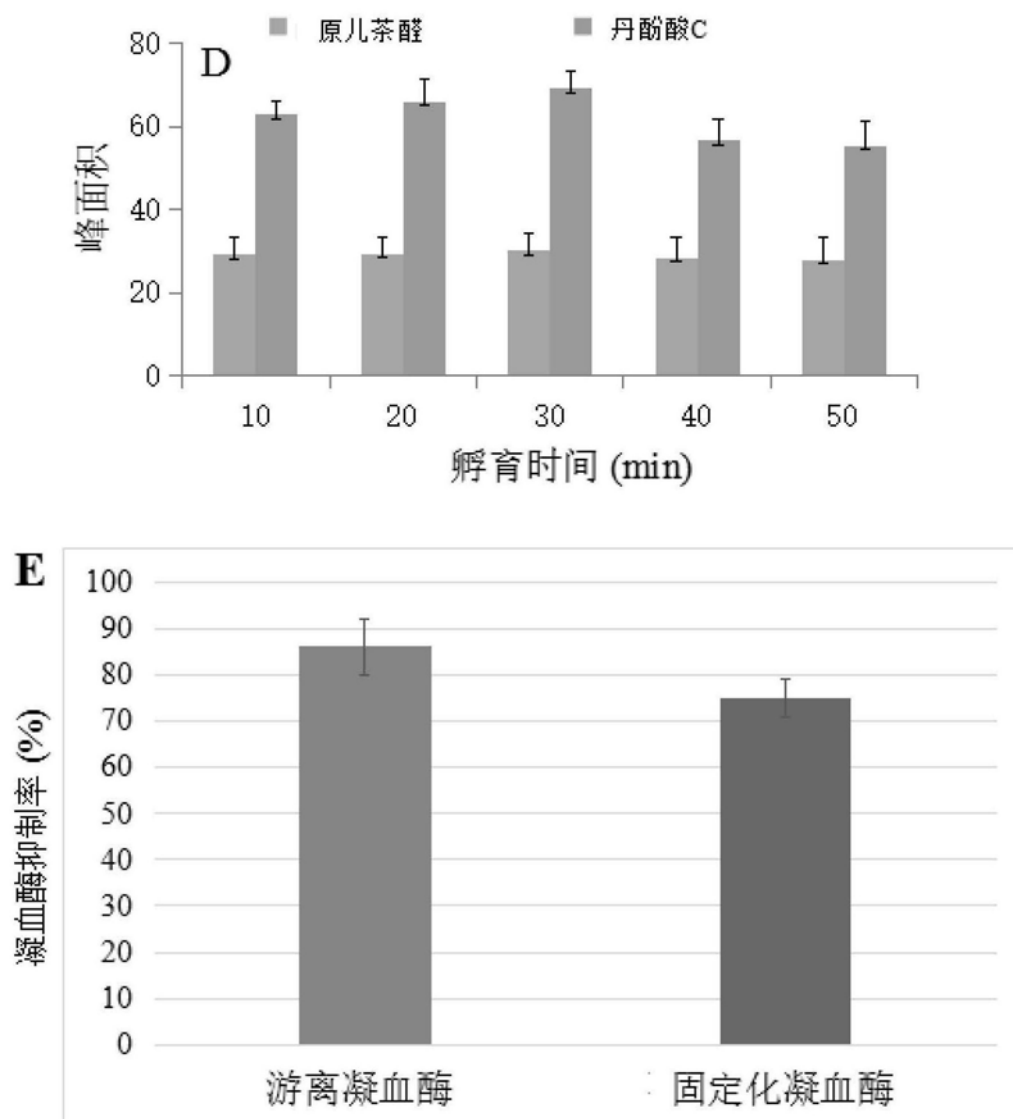


图5

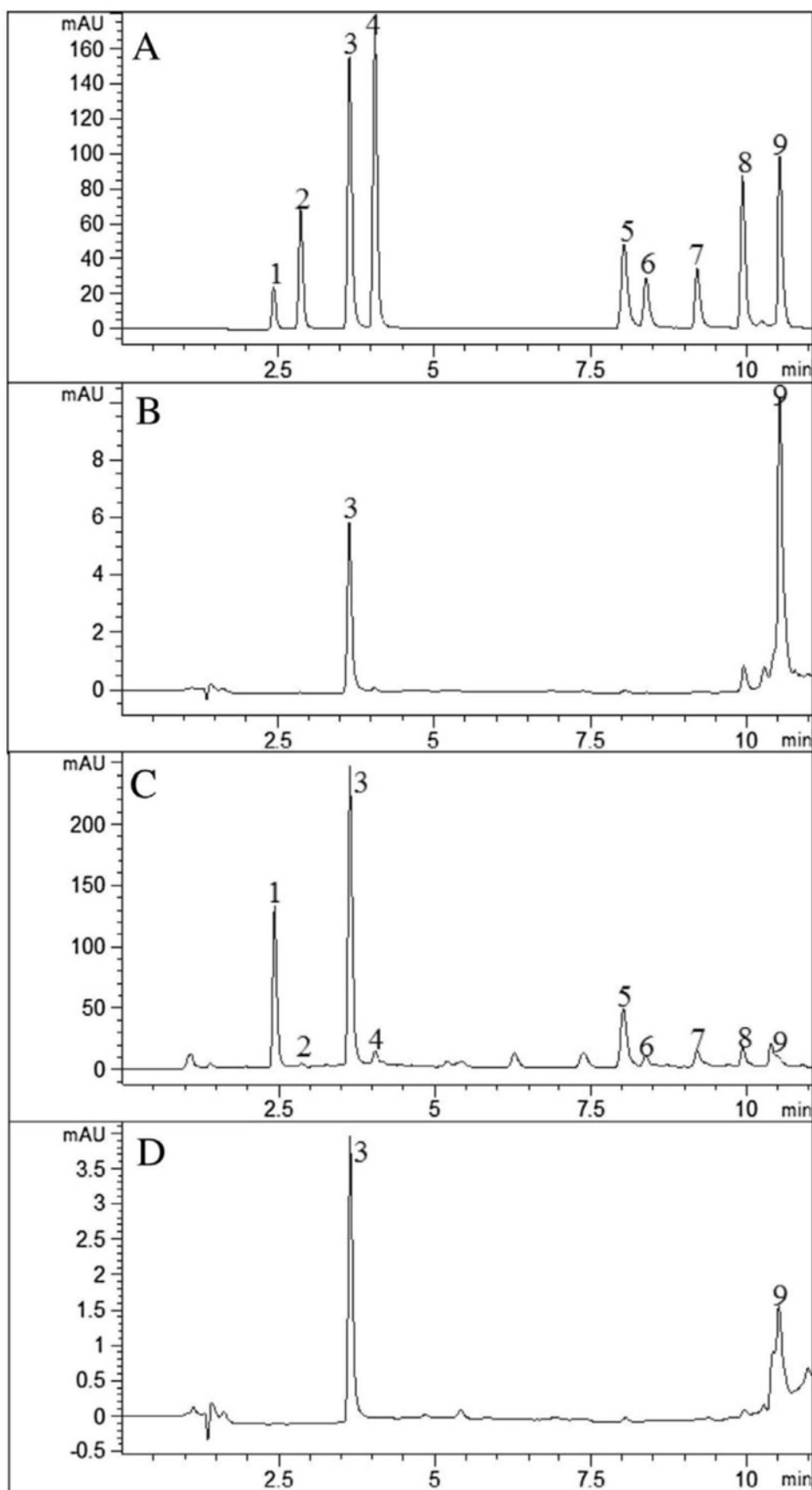


图6

专利名称(译)	一种中药制剂的活性成分的筛选方法		
公开(公告)号	CN109613233A	公开(公告)日	2019-04-12
申请号	CN201811257051.7	申请日	2018-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	杭州市红十字会医院		
申请(专利权)人(译)	杭州市红十字会医院		
当前申请(专利权)人(译)	杭州市红十字会医院		
[标]发明人	叶丽红 刘喜德 刘芳		
发明人	叶丽红 刘喜德 刘芳		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N30/02		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N30/02 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种中药制剂的活性成分的筛选方法，通过开环反应直接将凝血酶固定在磁珠上，制备得到凝血酶固定化磁珠，用于从复杂的丹参制剂中筛选出潜在的凝血酶抑制剂。本发明与其他方法相比，可以同时分离和富集键合的化合物，使其能够更敏感和快速的对化合物进行筛选，并提供了一种高选择性分离亲和化合物而避免繁琐的凝血酶固定化磁珠与目标分析物的制备方法。此外，原儿茶醛的凝血酶抑制活性为首次报道。方便的酶联技术表明，凝血酶固定化磁珠是一种用于从复杂的丹参制剂中鉴定生物活性化合物的新颖和可行的工具。

