

• 药剂与工艺 •

纳米磁珠辅助红细胞膜垂钓技术及其在当归活性成分筛选中的应用

何嘉辉¹, 茆睿智², 唐 钺², 徐 亮^{2,3*}, 肖学风^{1*}

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

2. 天津医科大学药学院 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

3. 天津医学高等专科学校, 天津 300222

摘要: 目的 为提高天然产物中活性成分的筛选效率, 利用活性成分与细胞膜(CMs)受体间具有特异性亲和的性质, 建立一种新型、高效的纳米磁珠(MNPs)辅助CMs垂钓的方法。方法 将MNPs与兔红细胞CMs结合形成纳米磁珠-细胞膜复合物(MN-CMs), 利用MN-CMs垂钓当归水提取液中的活性成分, 通过GC-MS对垂钓结果进行分析。结果 自制MNPs平均粒径为 (250.6 ± 3.3) nm ($n=3$), 且粒径分散均匀, 多分散指数(PDI)为 0.010 ± 0.003 ($n=3$), 具有较强的磁性和良好的超顺磁性, 饱和磁化强度值为83.4 emu/g。MNPs能与CMs稳定结合, 10 mg MNPs的最大吸附量为1.02 mg CMs, 同时可以有效保持一定的CMs酶活性。GC-MS结果表明, MN-CMs从当归水提取液中垂钓出的潜在活性成分为藁本内酯, 出峰时间为20 min, 同时该新型垂钓方法能够有效避免非活性成分的干扰。结论 建立的MNPs辅助CMs垂钓方法能够特异性垂钓出当归中活性成分藁本内酯, 弥补了传统药物筛选方法的缺点, 也为其他天然产物的活性成分筛选提供一种新方法。

关键词: 天然产物; 当归; 活性成分; 细胞膜; 纳米磁珠; 垂钓; 纳米磁珠-细胞膜复合物; 磁性; 藁本内酯

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)05-1041-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.008

Application of magnetic nanoparticle-assisted erythrocyte membrane fishing assay on active compounds screening from *Angelica sinensis*HE Jia-hui¹, MAO Rui-zhi², TANG Cheng², XU Liang^{2,3}, XIAO Xue-feng¹

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3. Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China

Abstract: Objective To improve the screening efficiency of the active ingredients in natural products by building up a kind of novel and efficient magnetic nanoparticle-assisted cell membranes (MN-CMs) fishing assay employing specific affinity interactions between active ingredients and receptors on cell membranes (CMs). **Methods** The magnetic nanoparticles (MNPs) were combined with erythrocyte membrane of rabbits to fish active ingredients from water extracts of *Angelica sinensis*, and the fishing results were analyzed by GC-MS. **Results** The particle size of the self-made magnetic beads was about (250.6 ± 3.3) nm ($n=3$) with PDI index at 0.010 ± 0.003 ($n=3$), and the beads were monodisperse, strongly magnetic and superparamagnetic, the saturation magnetization was 83.4 emu/g. The combination of MNPs and CMs was stable, the maximum combined amount was 1.02 mg CMs/10 mg MNPs, and the combination was able to keep better enzyme activity of CMs in the fishing assay. GC-MS results showed that ligustilide was fished out as the active compound from water extracts of *A. sinensis* by MN-CMs assay with the retention time at 20 min, and the new established

收稿日期: 2017-09-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81402889); 天津市自然科学基金资助项目(2014JCYBJC24300)

作者简介: 何嘉辉(1992—), 男, 在读硕士, 主要研究方向为细胞膜色谱的应用及磁性微球的制备研究。

Tel: 18658921213 E-mail: 1049482655@qq.com

*通信作者 肖学风(1966—), 女, 教授, 主要从事药理学研究。Tel: 13820066504 E-mail: kail219@163.com

徐 亮(1982—), 男, 副教授, 主要从事生物色谱及体外诊断试剂研究。Tel: 13602106627 E-mail: xuliang@tmu.edu.cn

fishing assay could effectively avoid the interference of inactive components. **Conclusion** Ligustilide, one of the active ingredients in *A. sinensis*, can be screened out by the established fishing assay of MN-CMs. The developed fishing method in this work makes up for some deficiencies of traditional screening method and provides a novel and efficient way to screen ingredients from natural products.

Key words: natural products; *Angelica sinensis* (OLiv.) Diels; active ingredients; cell membrane; magnetic nanoparticle; fishing; magnetic nanoparticle-assisted cell membranes; magnetic; ligustilide

天然产物是指在自然界的生物进化过程中逐渐形成的次生代谢产物, 是新药发现的主要途径之一^[1-5], 天然产物中有效成分提取分离的相关研究日益受到人们的重视, 但是天然产物的成分十分复杂, 而具有生物活性的成分含量往往较低, 传统色谱方法会被大量的无效成分所干扰, 影响对其活性成分的高效准确定位。因此发展一种用于天然产物中活性成分筛选的新型方法具有重大意义, 高效的筛选方法将会促进其他研究者对天然产物的研究, 促进新药的发现发展, 促进中药的现代化。

生物色谱法 (biochromatography) 是由色谱技术与生命科学交叉形成的新兴色谱技术^[6], 原理是利用药物与受体间具有特异性亲和的性质, 其固定相多采用各种具有生物活性的材料, 如酶、载体蛋白、细胞膜 (cellular membranes, CMs) 等。贺浪冲等^[7]利用细胞膜色谱 (cell membrane chromatography, CMC) 筛选川芎、白芷、五味子等发现的川芎内酯、丁烯呋内酯、欧前胡素、五味子甲素和五味子酯甲等成分具有良好的舒张血管和抗高血压的活性^[8-9]。Dong 等^[10]利用药物与膜受体间的特异性亲和作用进行配体垂钓, 直接用人血红细胞膜垂钓当归提取液中的特异性结合成分。然而操作过程中需要高速离心来分离 CMs, 这一过程不仅费时, 而且操作过程中 CMs 容易破碎和损失, CMs 和药物无法完全分离, 影响后续分析的准确性。

Fe₃O₄ 磁性纳米材料具有良好的生物相容性, 可经量子点、金属或染料分子修饰而起到核磁共振成像的作用^[11], 经亲水性生物高分子包覆修饰可以作为药物载体^[12], 还可以用于蛋白质和核酸的分离、提纯^[13], 去除血液中高相对分子质量的致病物质 (病原体、细菌等)^[14]以及肿瘤热疗^[15]等方面。但报道中多限于单个蛋白或酶的固定, 用 CMs 来修饰 Fe₃O₄ 磁性纳米材料却还未见报道。

本实验主要将磁性纳米材料引入到 CMs 垂钓过程中, 将 CMs 与 Fe₃O₄ 纳米磁珠 (magnetic nanoparticles, MNPs) 结合, 形成纳米磁珠-细胞膜复合物 (magnetic nanoparticle-assisted cellular membranes, MN-CMs), 方便 CMs 分离, 同时起到

稳定 CMs 的作用, 使其不易破碎, 减少不可控的膜损失。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 7890A/5975C 气相色谱质谱联用仪购自安捷伦科技公司; Malvern Zetasizer Nano ZS90 纳米粒径电位分析仪购自马尔文仪器有限公司; ALPHA1-4LDplus 冷冻干燥机购自德国 Christ 公司; Nicolet 380 傅里叶变换红外光谱仪与 Thermo Scientific Multiskan GO 全波长酶标仪均购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; SB-5200DT 超声波清洗器购自宁波新芝生物科技有限公司; Model-155 型振动样品磁强计 (VSM) 购自阿美特克商贸 (上海) 有限公司; R203B SENCO 旋转蒸发器购自上海申生科技有限公司; Teflon-lined 不锈钢反应釜购自济南恒化科技有限公司。

1.2 材料

当归 *Angelica Sinensis* 药材购自兰州佛慈制药股份有限公司 (批号 160811), 原产地甘肃, 为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (OLiv.) Diels 的干燥根, 经天津医科大学药学院唐铖副教授鉴定为正品, 符合《中国药典》2015 年版规定。FeCl₃·6H₂O、乙二醇、无水乙醇购自天津市化学试剂供销公司; 对照品藁本内酯, 批号 150420, 质量分数 ≥ 98%, 购自上海融禾医药科技有限公司; 无水乙酸钠、乙二醇四乙酸钠 (EDTA-Na₂)、BCA 试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司; Na₂HPO₄·12 H₂O、氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司; Na⁺, K⁺-ATP 酶活性比色法定量检测试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司; 本实验用水均为 Milli-Q 超纯水。

2 方法与结果

2.1 Fe₃O₄ MNPs 的制备与表征

Fe₃O₄ MNPs 的制备方法主要有沉淀法、水解法、水热法等, 不同方法各有其优缺点, 如沉淀法成本低且产率高, 但制备过程复杂, 产物易团聚、氧化^[16]; 水解法反应条件温和, 工艺简单, 但制备过程中影响粒径和磁学性能的因素较多, 需要严格

控制工艺参数^[17]；水热法由于反应温度较高，产物磁性强，还具有原料易得、粒子纯度高、分散性好、晶形好等优点^[18]。因此，本实验采用水热法制备 Fe_3O_4 MNPs^[19]，过程如下：将 0.81 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与 2.16 g 无水乙酸钠分别溶于 15 mL 乙二醇中，超声溶解 30 min。将 2 部分溶液混合，超声 30 min 得到棕黄色不透明液体，转入到 50 mL Teflon-lined 不锈钢反应釜中，于 200 °C 条件下反应 16 h。所得材料用无水乙醇和去离子水反复洗涤干净。最后 60 °C 真空干燥 12 h 后仔细研磨，即得 MNPs，备用。

制备的 MNPs 粒径及粒径分布如图 1 所示，平均粒径为 (250.6 ± 3.3) nm，多分散指数 (PDI) 为 0.010 ± 0.003 ($n=3$)，表明 MNPs 粒径分散均匀，无团聚现象。

采用振动样品磁强计 (VSM) 对 Fe_3O_4 MNPs 进行磁学性质表征，在 300 K 下记录干燥后的 MNPs 的磁滞回线并得到其磁化强度，施加磁场强度为 $-20 \sim 20$ kOe ($1 \text{ Oe} = 1\,000/4\pi \text{ A/m}$)。图 2 结果显示制备的 MNPs 具有较强的磁性，饱和磁化强度值为 83.4 emu/g ，且表现出良好的超顺磁性，满足后续垂

钓过程中磁分离的磁性要求。MNPs 的粒径和磁学性能与原文献基本一致^[19]。

2.2 当归提取液及兔红细胞 CMs 的制备

2.2.1 当归水提取液的制备 本实验采取超声波提取法^[20]制备当归水提取液，用 80 mL 去离子水超声提取 (40 kHz, 300 W, 80 °C) 10 g 当归粉末 30 min，相同条件下重复提取 1 次，合并 2 次提取液后减压蒸馏浓缩至黏稠状，用生理盐水复溶至 10 mL，用 $0.22 \mu\text{m}$ 膜滤过，即得当归水提取液，将水提取液置于 4 °C 保存。

2.2.2 兔血红细胞 CMs 的制备 用离心机将细胞悬液低速 (4 °C, $1\,500 \times g$) 离心 15 min 除去上层血清；加生理盐水悬浮，中速 (4 °C, $6\,000 \times g$) 离心 5 min，弃上清并除去白色绒毛状沉淀，重复 2~3 次；细胞沉淀按 1:30 的比例分散于低渗破膜液 (0.1 mmol/L EDTA- Na_2 , 5 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 8.0) 剧烈振荡摇晃使细胞完全破裂；高速 (4 °C, $15\,000 \times g$) 离心 40 min 得到 CMs 沉淀，除去上清液后用生理盐水重新悬浮 CMs，重复 3~4 次。得到的 CMs 用适量生理盐水稀释至质量浓度为 1.0 mg/mL ，4 °C 保存。

2.3 MN-CMs 的制备与表征

采用“减压振荡法”将 MNPs 与 CMs 结合^[21]，称取 MNPs 10 mg 于具支试管中，在减压振荡条件下，用注射器吸取 2 mL CMs 悬液 (1 mg/mL)，插入到密封的橡皮塞中，试管内的负压自动将注射器内的 CMs 悬液吸入试管内，振荡 2 min，置于 4 °C 条件下静置 12 h。用强力磁铁将磁性复合物吸引到一边，达到类似离心的效果，弃去液体，移除磁铁后用生理盐水溶液重新悬浮，重复洗涤 3 次，除去未结合的 CMs，去离子水悬浮备用。

为表征 MN-CMs，本实验将 MNPs、CMs 及 MN-CMs 用去离子水反复洗涤，干燥后进行红外检测，红外结果见图 3。图 3-A 为 CMs 的红外谱图，图 3-B 为 MNPs 的红外谱图，图 3-C 为 MN-CMs 的红外谱图。其中图 3-B 和 3-C 都在 571 cm^{-1} 处有吸收，该峰为 Fe_3O_4 的特征峰，证明图 3-B 和 3-C 中都有磁珠，与事实符合；图 3-A 和 3-C 于 $2\,924$ 、 $2\,852$ 、 $1\,651$ 、 $1\,540$ 、 $1\,065 \text{ cm}^{-1}$ 处都有共同的吸收峰，其中 $2\,924 \text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,852 \text{ cm}^{-1}$ 分别为亚甲基的碳氢键和碳碳单键的伸缩振动吸收峰， $1\,651 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,540 \text{ cm}^{-1}$ 分别为酰胺基中羰基和氮氢键的特征峰， $1\,065 \text{ cm}^{-1}$ 为磷酸中磷氧碳组合键峰，可以发

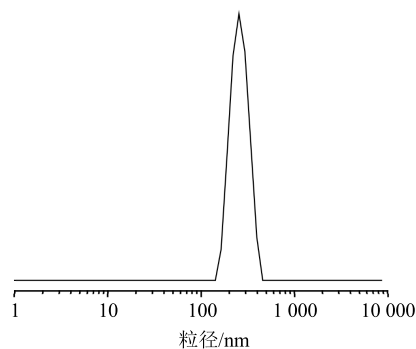


图 1 MNPs 的粒径及粒径分布

Fig. 1 Particle size and size distribution of MNPs

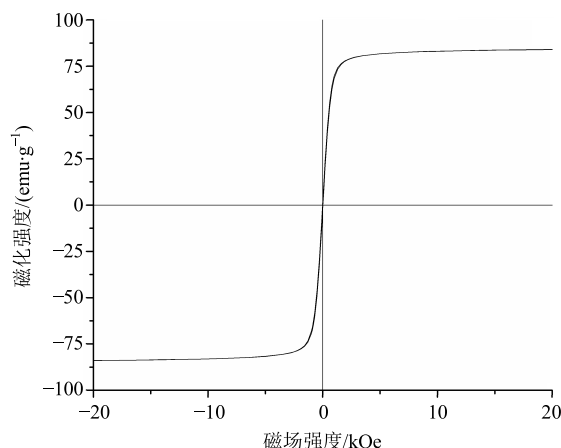


图 2 MNPs 的 VSM 图

Fig. 2 VSM results of MNPs

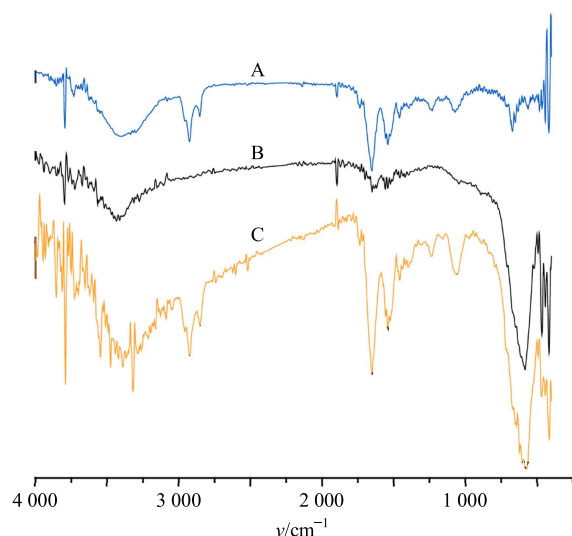


图 3 CMs (A)、MNPs (B) 及 MN-CMs (C) 的红外光谱图
Fig. 3 IR spectrogram of CMs (A), MNPs (B), and MN-CMs (C)

现图 3-C 同时拥有图 3-A 和 3-B 的全部特征峰，证明 CMs 已与 MNPs 稳定结合。

MNPs 结合的 CMs 量以及结合后的 CMs 活性可能会影响后续的垂钓过程，本实验用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度以考察 MNPs 对 CMs 的吸附能力（图 4），10 mg MNPs 的最大吸附量为 1.02 mg CMs，当加 CMs 量为 2 mg 时 MNPs 吸附饱和；通过 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性试剂盒测定结合前与结合后的 CMs 酶活性，考察 MNPs 是否会对 CMs 酶活性产生较大影响。游离 CMs 与 MN-CMs 的 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性 [试剂盒中规定每小时每毫克膜蛋白中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷为 1 个 ATP 酶活力单位， $\mu\text{mol P}/(\text{mg}\cdot\text{h})$] 分别为 (2.011 ± 0.377) 、 (1.297 ± 0.170) $\mu\text{mol P}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ，证明 CMs 与 MNPs

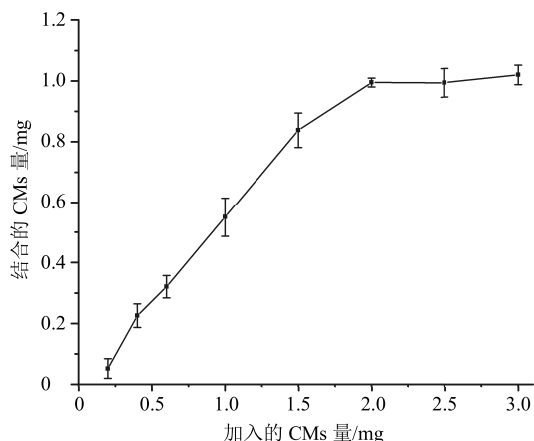


图 4 CMs 在 MNPs (10 mg) 上的等温吸附线
Fig. 4 Adsorption isotherm of CMs on MNPs (10 mg)

结合后仍保持一定酶活性。

2.4 MNPs 辅助 CMs 垂钓法的建立及应用

2.4.1 MNPs 辅助 CMs 垂钓过程 用 MNPs 进行配体垂钓已多有报道^[22-24]，展现出许多优良的特性，如易修饰固定、易分离、无残留等。本实验将 MNPs 与 CMs 结合形成 MN-CMs 进行配体垂钓，具体过程见图 5。将处理得到的兔红细胞 CMs 与 Fe_3O_4 MNPs 减压振荡，过夜静置使其稳定，形成 MN-CMs，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下与目标混合物摇床共同孵育 30 min，使之与活性成分特异性结合，磁分离，去离子水洗去 MN-CMs 表面非特异性吸附的非活性成分，20%乙酸溶液解离洗脱与 MN-CMs 特异性吸附的成分，洗脱液冻干，甲醇复溶，进行 GC-MS 分析。与 CMs 直接垂钓相比，新方法用磁分离替代费时费力的高速离心，加快了洗涤和洗脱过程，同时减少了 CMs 的损失。

2.4.2 气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 色谱条件 色谱柱为 Agilent HP-5MS 毛细管柱；载气为氦气，载气体积流量 1.0 mL/min；进样柱温为 50 $^{\circ}\text{C}$ ，然后以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升至 100 $^{\circ}\text{C}$ ，之后以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升至 280 $^{\circ}\text{C}$ 。电离能 70 eV，扫描速率为每次扫描 0.2 s，入口和离子源温度分别为 280 $^{\circ}\text{C}$ 和 300 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.3 垂钓法的选择性评价 藁本内酯是我国传统中药当归中挥发油的主要活性成分，具有神经保护、舒张血管、抗癌抗肿瘤、镇痛消炎等药理作用。Cao 等^[25]进一步研究藁本内酯对血管舒张作用的机制，发现主要是通过电压门控钙通道和受体门控钙通道阻止细胞外 Ca^{2+} 流入及细胞内 Ca^{2+} 释放实现的。兔红细胞 CMs 表面含有 Ca^{2+} 通道蛋白，藁本内酯可以与之特异性结合。

为了探究新建的垂钓法的选择性，本实验选用藁本内酯作为阳性药物，同时选用了与红细胞 CMs 无作用的 DMSO 作为对照，将一定浓度的 2 种药物的混合药液作为 MNPs 辅助细胞膜垂钓法的选择性评价。

色谱结果如图 6 所示，其中图 6-A 是混合药液的 GC 色谱图，明显可见 2 个色谱峰，分别为 20 min 时的藁本内酯峰和 4.7 min 时的 DMSO 峰，图 6-B 是 20%乙酸从与混合物共孵育的 MN-CMs 上解离下来的成分，只有与之特异性结合的藁本内酯的峰，与 CMs 没有特异性作用的 DMSO 没有出现峰，说明去离子水能够洗下非特异性结合的 DMSO，却不

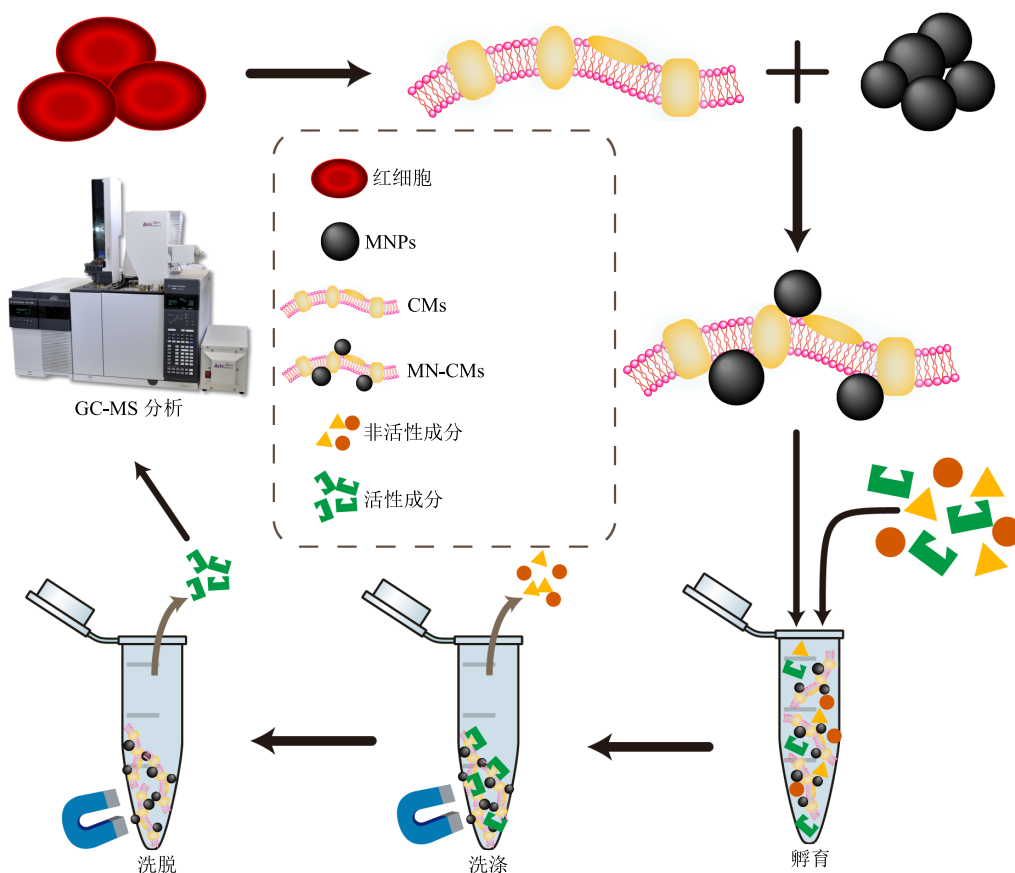


图 5 CMs 的固定化及 MN-CMs 垂钓活性成分过程

Fig. 5 Immobilization of CMs and fishing process of active compounds by MN-CMs

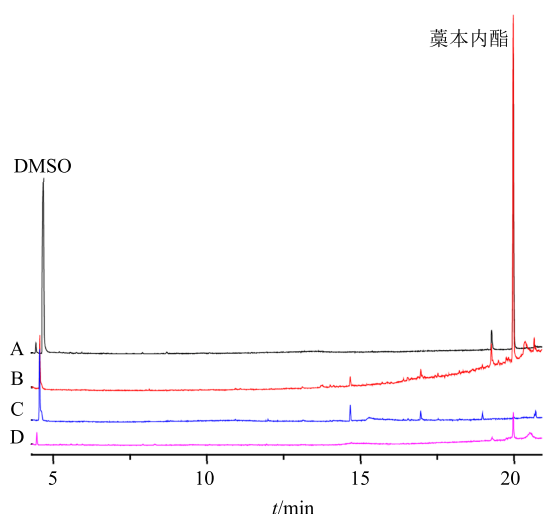


图 6 藁本内酯与 DMSO 的混合物 (A)、MN-CMs 与混合物孵育后的洗脱液 (B)、MN-CMs 未与混合物孵育后的洗脱液 (C) 及 MNPs 与混合物孵育后的洗脱液 (D) 的 GC 结果
Fig. 6 GC results of mixture of ligustilide and DMSO (A), eluent of MN-CMs incubated with mixture A (B), eluent of MN-CMs unincubated with mixture A (C), and eluent of MNPs incubated with mixture A (D)

能将特异性结合的藁本内酯洗下，图 6-C 是 MN-CMs 直接对去离子水进行垂钓，洗涤后用 20% 乙酸解离下来的成分分析结果，发现其藁本内酯和 DMSO 的峰都没有出现，说明图 6-B 中的峰不是 MN-CMs 材料本身的，图 6-D 是裸 MNPs 对混合药液的垂钓解离液，没有出峰说明 MNPs 本身与藁本内酯不会发生特异性结合，图 6-B 中的峰是由于藁本内酯与 MN-CMs 特异性结合后洗脱得到的。图 6 结果表明本实验提出的 MNPs 辅助 CMs 垂钓方法可选择性吸附与 CMs 具有特异性结合的物质，该方法具有较好的选择性。

2.4.4 垂钓法在当归活性成分筛选中的应用 由于 CMs 表面的钙通道蛋白可与溶液中的配体相互作用，制备的 MN-CMs 可用于筛选天然产物中与 CMs 特异性作用的活性成分。当归水提取液中有能与 CMs 上钙离子通道蛋白特异性结合的成分，本实验利用 MNPs 辅助 CMs 垂钓方法筛选当归水提取液中的有效成分。筛选结果见图 7，其中图 7-A 是当归提取液的原液的 GC 色谱图，谱图显示其成分较

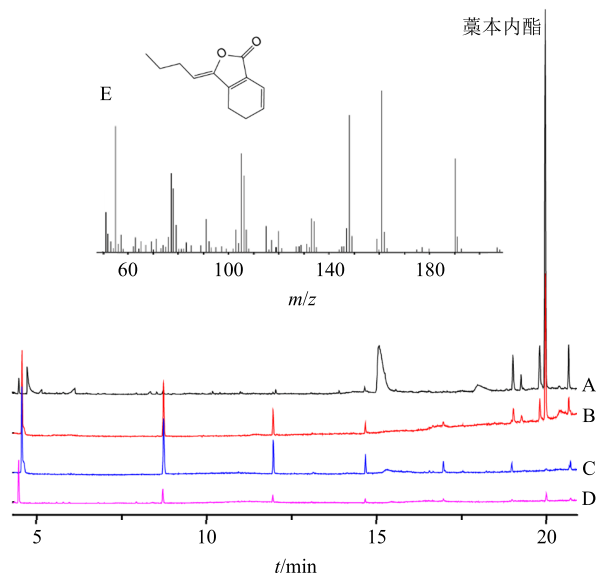


图 7 当归水提取液 (A)、MN-CMs 与提取液孵育后的洗脱液 (B)、MN-CMs 未与提取液孵育后的洗脱液 (C) 及 MNPs 与提取液孵育后的洗脱液 (D) 的 GC 结果, 洗脱成分的 MS 图 (E)

Fig. 7 GC results water extracts of *A. sinensis* (A), eluent from MN-CMs incubated with extracts (B), eluent from MN-CMs unincubated with the extract (C), elution of MNPs incubated with extracts (D), and MS result of eluted compound (E)

多, 峰形较复杂, 无法确定哪个峰是其活性成分; 图 7-B 是 20%乙酸从与提取液共孵育的 MN-CMs 上解离下来的成分, 显示最高峰在 20 min 时出现, 质谱分析结果 (图 7-E) 鉴定该成分为藁本内酯; 图 7-C 是 MN-CMs 对去离子水进行的垂钓结果, 图 7-D 是磁珠对当归提取液垂钓后的解离液结果, 图 7-C 和 7-D 在 20 min 时都没有出峰, 排除了垂钓材料本身对实验的影响。图 7 结果初步证明了图 7-A 和 7-B 中 20 min 的峰所代表的藁本内酯是当归中潜在的与 Ca^{2+} 通道相作用的成分。但是本实验垂钓结果表明只有藁本内酯被特异性垂钓, 说明该方法具有较高的选择性。

3 讨论

对于天然产物活性成分的研究, 基于 CMs 受体与潜在活性成分的特异性作用的 CMs 亲和色谱避免了传统提取分离分析方法需要对单种天然产物分析成百上千种成分的繁琐工作, 使在筛选活性成分时能够有的放矢, 提高筛选效率。本实验自制 MNPs, 用溶胀法破碎兔红细胞制备红细胞 CMs, 两者结合形成的 MN-CMs 垂钓当归水提取液中的

活性成分, GC-MS 结果证明 MNPs 辅助 CMs 垂钓方法确实能从当归的水提取液中筛选出潜在活性成分藁本内酯。本实验 MNPs 的引入, 方便了特异性结合后的活性成分与 CMs 间的分离过程, 相比于几十分钟的高速离心分离, 磁分离方法只需几分钟就能将 CMs 与药液分离。同时 MNPs 还能够起到稳定 CMs 的作用, 磁分离较离心分离更温和, 这使 MN-CMs 较原 CMs 不易被破碎, 减少了操作过程中的 CMs 损失。MNPs 辅助 CMs 垂钓法具有省时省力、操作方便、稳定可靠、高效灵敏的优点。同时, 本实验方法和 CMC 都是利用活性成分与 CMs 上的受体特异性结合, 达到快速筛选药材中活性成分的目的。20 多年来, CMC 法被广泛认可使用^[26]。据报道^[27], 已有 160 多种中药通过不同 CMC 模型来筛选活性成分, 因此这些中药都可以用本实验方法来尝试进行分析。单就红细胞而言, 长春七^[28]、金刷把^[29]等可能可以运用该法分析。若扩大 CMs 的种类范围, 可尝试用血管细胞 CMs 来分析红毛七^[30], 心肌细胞 CMs 分析心康平^[31], 胰岛 β -细胞 CMs 分析原小檗碱^[32]等。本实验垂钓方法建立的目的是对 CMC 法的简化以及对 CMs 直接垂钓法的优化, 可以更方便、更高效地来筛选潜在的活性成分, 为天然产物的活性成分筛选提供新方法和思路。前人研究表明当归中活性成分主要为挥发性成分^[33], 故 GC-MS 是分析当归中主要成分的常用方法。采用类似的 CMs 垂钓技术, 与 HPLC-MS 联用分析其他中药材中活性成分工作正在开展当中。

参考文献

- [1] 勾明玥, 刘 梁, 张春枝. 五倍子醇提物的抗氧化活性 [J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(2): 90-93.
- [2] 郭瑞霞, 李力更, 王于方, 等. 天然药物化学史话: 天然产物化学研究的魅力 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2019-2033.
- [3] 吕 源. 龙脑与樟脑考辨 [J]. 兰台世界, 2013, 32(16): 142-143.
- [4] Klayman D L. Qinghaosu (*artemisinin*): An antimalarial drug from China [J]. *Science*, 1985, 228(4703): 1049-1055.
- [5] 郭宗儒. 经久不衰的阿司匹林 [J]. 药学学报, 2015, 50(4): 506-508.
- [6] 丁 岗, 董自波, 李智立, 等. 生物色谱法及其在药物研究中的应用 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(4): 354-357.
- [7] 贺浪冲, 杨广德, 耿信笃. 固定在硅胶表面细胞膜的酶

- 活性及其色谱特性 [J]. 科学通报, 1999, 44(6): 632-637.
- [8] Liang M J, He L C, Yang G D. Screening, analysis and *in vitro* vasodilatation of effective components from *Ligusticum* Chuanxiong [J]. *Life Sci*, 2005, 78(2): 128-133.
- [9] Hou X F, Zhou M Z, Jiang Q, *et al.* A vascular smooth muscle/cell membrane chromatography-offline-gas chromatography/mass spectrometry method for recognition, separation and identification of active components from traditional Chinese medicines [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(42): 7081-7087.
- [10] Dong Z B, Li S P, Zhu Q, *et al.* Hypothesis of potential active components in *Angelica sinensis* by using biomembrane extraction and high performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(4): 664-669.
- [11] Gao J, Gu H, Xu B. Multifunctional magnetic nanoparticles: Design, synthesis, and biomedical applications [J]. *Accounts Chem Res*, 2009, 42(8): 1097-1107.
- [12] Kumari A, Yadav S K, Yadav S C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems [J]. *Colloid Surfaces B*, 2010, 75(1): 1-18.
- [13] Wang Y, Ma X, Ding C, *et al.* pH-responsive deoxyribonucleic acid capture/release by polydopamine functionalized magnetic nanoparticles [J]. *Anal Chem*, 2015, 862(67): 33-40.
- [14] Kang J H, Super M, Yung C W, *et al.* An extracorporeal blood-cleansing device for sepsis therapy [J]. *Nat Med*, 2014, 34(4): 345-355.
- [15] Guardia P, Di Corato R, Lartigue L, *et al.* Water-soluble iron oxide nanocubes with high values of specific absorption rate for cancer cell hyperthermia treatment [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(4): 3080-3091.
- [16] 张鑫, 李鑫钢, 姜斌. 四氧化三铁纳米粒子的合成及表征 [J]. 化学工业与工程, 2006, 23(1): 45-48.
- [17] 邱星屏. 四氧化三铁磁性纳米粒子的合成及表征 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1999, 38(5): 711-715.
- [18] 李冬梅, 徐光亮. 制备超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子的研究进展 [J]. 中国粉体技术, 2008, 14(4): 55-58.
- [19] Deng H, Li Y D, Peng Q, *et al.* Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microspheres [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44(18): 2782-2785.
- [20] 华永丽, 郭延生, 邓红娟, 等. 当归不同药用部位水提液体外清除自由基作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1582-1584.
- [21] Wang X, Xu L, Zhao X C, *et al.* An insertion/self-fusion mechanism for cell membrane immobilization on porous silica beads to fabricate biomimic carriers [J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(7): 1334-1341.
- [22] Marszall M P, Moaddel R, Kole S, *et al.* Ligand and protein fishing with heat shock protein 90 coated magnetic beads [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(19): 7571-7575.
- [23] Moaddel R, Marszall M P, Bighi F, *et al.* Automated ligand fishing using human serum albumin-coated magnetic beads [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(14): 5414-5417.
- [24] Vanzolini K L, Jiang Z, Zhang X, *et al.* Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: A new tool for plant extract ligand screening [J]. *Talanta*, 2013, 116(22): 647-652.
- [25] Cao Y X, Zhang W, He J Y, *et al.* *Ligustilide* induces vasodilatation via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca^{2+} influx and release [J]. *Vascul Pharmacol*, 2006, 45(3): 171-176.
- [26] 王丽莉, 张铁军. 细胞膜色谱法及其在中药活性成分研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(2): 110-114.
- [27] Hou X, Wang S, Zhang T, *et al.* Recent advances in cell membrane chromatography for traditional Chinese medicines analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 101(3): 141-150.
- [28] 张宇洁, 贺浪冲. 用细胞膜色谱模型筛选长春七抑制 HeLa 细胞增殖的活性成分 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(6): 463-465.
- [29] 张博, 贺浪冲. 用细胞膜色谱法分析金刷把中具有细胞毒活性的有效成分 [J]. 现代医药卫生, 2006, 22(15): 2303-2304.
- [30] 高琨, 贺浪冲, 杨广德. 用细胞膜色谱法筛选研究红毛七中的有效成分 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(1): 16-18.
- [31] 李洪玲, 杨广德, 贺浪冲. 心康平原料药的鉴别和含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2001, 21(5): 348-351.
- [32] Bian X, He L G. Synthesis and antihyperglycemic evaluation of various protoberberine derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(5): 1380-1383.
- [33] 李菁, 葛发欢. 超临界 CO_2 萃取当归挥发油的研究 [J]. 中药材, 1996, 19(4): 187-189.