

花鹿茸、马鹿茸碱基成分的HPLC定量分析和其MAO活性抑制作用

北京医科大学药学院(100083) 杨秀伟*

摘要 采用高效液相色谱法对花鹿茸和马鹿茸中的次黄嘌呤、尿苷、尿嘧啶进行含量分析,比较研究了它们对单胺氧化酶活性的抑制作用。

关键词 花鹿茸 马鹿茸 HPLC 单胺氧化酶

鹿茸系鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 和马鹿 *C. elaphus* L 未角化或稍角化的幼角。前者谓花鹿茸,后者称马鹿茸。系抗老,防衰,滋补,强壮的要药之一。在系列的研究里,我们报道了花鹿茸^[1]、马鹿茸^[2]化学成分的研究和花鹿茸水提物的乙醇溶性部分对单胺氧化酶(MAO)-B活性的抑制作用,次黄嘌呤是其活性成分之一^[3]。嗣后,我们又研究了其对抗癌药阿霉素所致心肌细胞拍动异常的改善,促使低Ca⁺⁺引起心肌拍动振幅低下的回复等^[4]的研究。今报道花鹿茸和马鹿茸碱基成分的HPLC定量分析和它们对MAO活性的抑制作用。

1 仪器与条件

岛津LC-4A型高效液相色谱仪,联机SPD-M1A检测,紫外检测波长260nm,检出感度0.7AUFS。Nucleosil 5NH₂柱(φ4.6×250mm);流动相为0.2mol/L NaH₂PO₄-0.1mol/L NaCl缓冲液,流速为0.6ml/min。

2 材料

花鹿茸和马鹿茸系吉林省市场品,经作者鉴定无误。尿嘧啶、尿苷、次黄嘌呤对照品购自日本和光纯药株式会社。

3 供试液的制备

3.1 50%和70%乙醇提取物的制备:分别精密称取花鹿茸和马鹿茸粗粉200g,用50%和70%乙醇回流提取(600ml×3, 1h)。滤取提取液,减压回收溶媒,分别得花鹿茸的50%和70%乙醇提取物的残渣A13.5g(收率6.8%), B14.5g(7.3%);马鹿茸的50%和70%乙醇提取物的残渣C15g(7.5%), D13.8g(6.9%)。

3.2 水提取物的制备:分别精密称取花鹿茸和马鹿茸粗粉200g,用水煮沸提取(600ml×3, 1h)。滤取提取液,减压浓缩至400ml,然后加入1200ml 95%乙醇。去其沉淀,减压回收溶媒,分别得花鹿茸残渣E48.4g(24.2%)和马鹿茸残渣F42.4g(21.2%)。

分别取一定量A、B、C、D、E和F残渣,用0.2mol/L NaH₂PO₄-0.1mol/L NaCl缓冲液溶解,并定容至一定体积,供定量分析用。

4 定量分析

4.1 标准曲线的绘制:分别精密称量尿嘧啶、尿苷、次黄嘌呤1mg,用1ml 0.2mol/L NaH₂PO₄-0.1mol/L NaCl缓冲液溶解。然后,分别精密抽出每种溶液一定量,组成系列浓度梯度,做为标准溶液。取各标准溶液(5μl),分别注入HPLC,峰高(Y)和绝对进样量间呈良好的线性关系。标准直线方程,尿嘧啶为:Y=208X-11.7, r=0.993;尿苷为:Y=138X-6.3, r=0.997;次黄嘌呤为:Y=256X-2.1, r=0.995。

*Address: Yang Xiuwei, College of Pharmacy, Beijing Medical University, Beijing

4.2 样品测定：分别取A、B、C、D、E和F供试液一定量，进样，测定结果如表。

表 不同溶剂的提取物收量、收率和尿嘧啶、尿苷、次黄嘌呤的含量a)

名称	提取物		尿 嘧 啶	尿 苷	次黄嘌呤
	收量 ^{b)} (g/200g)	收率 (%)	mg(收率)	mg(收率)	mg(收率)
A	13.5	6.8	28.8(0.21) ^{c)}	48.4(0.36)	25.9(0.19)
B	14.5	7.3	52.8(0.36)	38.5(0.27)	31.7(0.22)
C	15.0	7.5	45.6(0.30)	39.7(0.26)	39.0(0.26)
D	13.8	6.9	81.2(0.59)	29.9(0.22)	65.1(0.47)
E	48.4	24.2	48.1(0.10)	9.6(0.02)	34.6(0.07)
F	42.4	21.2	97.1(0.23)	29.4(0.07)	66.0(0.16)

A、B、E分别为花鹿茸的50%乙醇、70%乙醇和水提取物，C、D、F分别为马鹿茸的50%、70%乙醇的水的提取物。a) 根据HPLC峰高计算3成分的含量 (n = 3)，b) 200g生药相应提取物的重量，c) 括号内的数值为收率

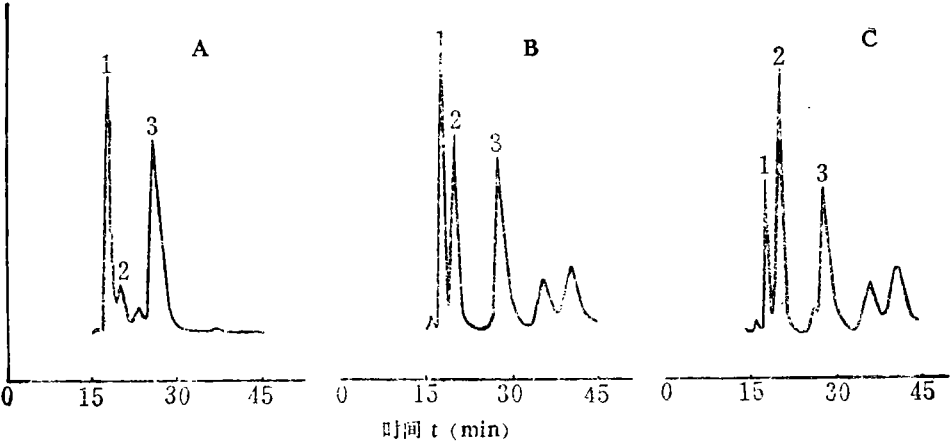


图1 提取物HPLC

A、B、C为花鹿茸水、70%、50%乙醇提取物 1-尿嘧啶 2-尿苷 3-次黄嘌呤

4.3 回收率：分别精密称取上述A、B、C、D、E和F残渣，按样品测定项方法测定尿嘧啶、尿苷和次黄嘌呤的含量。然后，在A、B、C、D、E和F的溶液中加入一定量的对照品尿嘧啶、尿苷和次黄嘌呤，同法测定它们的含量，计算回收率，均在98%以上。

5 对MAO活性的抑制作用

5.1 MAO的制备：实验用体重30g、7周龄的雄性小白鼠，在4℃下，断头，立刻摘出肝脏，放入10倍体积的0.32mol/L蔗糖-10mol/L磷酸缓冲液 (pH7.4) 中，用Polytron PT-10匀浆机匀浆。然后，在600×g离心10min，分取上清，在15000×g再次离心10min，得沉淀物。将此沉淀物悬浮在10mmol/L磷酸缓冲液中，再次在15000×g离心10min，得到较纯的MAO。然后，用10mmol/L磷酸缓冲液配成1mg蛋白质/ml，做为MAO酶源。贮存在-70℃下。

5.2 MAO抑制活性的测定：分别取A、B、C、D、E、F试料和从鹿茸中分得的胆固醇 (I)、胆甾-5-烯-3β-醇-7-酮 (II)、胆甾-5-烯-3β, 7α-二醇 (III)、胆甾-5-烯-3β, 7β-二醇 (IV)、胆固醇十四烷酸酯 (V)、胆固醇油酸酯 (VI)、胆固醇软脂酸酯 (VII)、胆固醇硬脂酸酯 (VIII)、尿嘧啶 (IX)、次黄嘌呤 (X)、肌酸酐 (XI)、烟酸 (XII)、脲 (XIII)、对羟基苯甲醛 (XIV)、对羟基苯甲酸 (XV) 和尿苷 (XVI)，用50mmol/L磷酸缓冲

液溶解成不同的浓度, 做为供试液。取上述MAO贮备液1ml, 加入8ml 50mmol/L磷酸缓冲液稀释。测定时, 取120 μ l供试液, 加入15 μ l MAO稀释液, 充分混合, 在37 $^{\circ}$ C温育10min后, 加入15 μ l 14 C标记的MAO底物酪胺(125mmol/L), 反应开始。20min后, 向反应液中加入100 μ l的1mol/L HCl, 使反应停止。然后, 用500 μ l甲苯提取酪胺氧化物3次。取此提取液500 μ l, 加入到10ml液体闪烁液中, 用Beckmann LS-250液体闪烁仪测定酪胺氧化物的放射强度。放射强度越大, MAO活性越强。

6 结果和讨论

6.1 首先选用ODS反相柱分离鹿茸中的尿嘧啶、尿苷和次黄嘌呤, 未达到分离之目的,

继而采用了5NH₂柱。流动相分别为氯化钠饱和的甲醇-水(80:20, V/V)、80%水饱和的氯仿-甲醇和0.2mol/L的乙腈-水(30:70, V/V)时, 上述3种成分亦不能很好分离。

而流动相用0.2mol/L NaH₂PO₄-0.1mol/L NaCl时, 上述3种成分很好地被分离。用三维检测法确证每个峰均为单一成分。在流动相中添加氯化钠, 使峰形尖如柱, 以利于用峰高定量。由于被测样品极性较大, 因此, 增大流动相的极性, 被测样品与NH₂基团的相互作用减少, 使被检物快速流出。

6.2 水、70%甲醇和50%乙醇作为提取溶媒, 对鹿茸成分的提取效果是不一样的, 如表和图1所示。采用含醇的水提取时, 溶出的成分较多。民间以酒泡鹿茸饮之, 似有道理。

6.3 我们曾报道次黄嘌呤是鹿茸抑制MAO的有效成分^[3]。本项研究证明, 花鹿茸的次黄嘌呤含量低于马鹿茸, 但对MAO的抑制作用确比马鹿茸高2倍多, 如图2。因此, 鹿茸的MAO抑制作用有效成分, 尚待深入研究。

6.4 从花鹿茸和马鹿茸中分得的次黄嘌呤、对羟基苯甲醛、对羟基苯甲酸、烟酸均对MAO呈现抑制作用。而另外12种成分对MAO活性无抑制作用, 如图3。

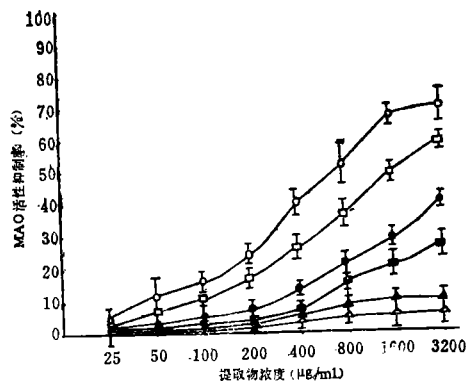


图2 提取物对MAO活性的抑制作用

花鹿茸, ○-70%乙醇 □-50%二 ▲-水
马鹿茸, ●-70%乙醇 ■-50%乙醇 △-水
〔 14 C〕-酪胺为MAO的底物

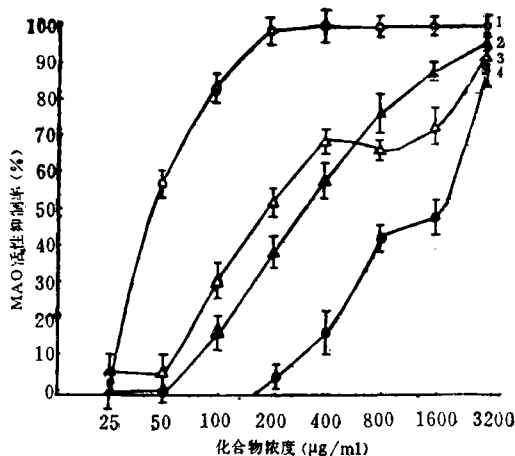


图3 对MAO活性的抑制作用

1-对羟基苯甲醛 2-烟酸 3-次黄嘌呤 4-对羟基苯甲酸
〔 14 C〕-酪胺为MAO的底物

参 考 文 献

- Hattori M, et al. Shoyakugaku Zasshi, 1989, 43(2): 173
- 杨秀伟, 等. 中草药 1994, 25(5): 229
- Wang B X, et al. J Med Pharm Soc

Wakan-Yaku, 1988(5): 116

- Huang S L, et al. Phytotherapy Research, 1990, 4(4): 152

(1993-09-04收稿)