

法可行。

3.2 全方各峰的归属分别经各药材、阴性及对照品对照确认,其中12为小檗碱,g9为葛根素,q8为黄芩苷,甘草虽然产生3个峰,但由于在方中甘草的量较少,受到的干扰相对较大,出峰时间的相对稳定性较差,只有一个峰的相对迁移时间的RSD<5%,但如果把RSD放宽至10%,则3个峰相对迁移时间皆可用于定性。

3.3 方法学考察表明该法可用于葛根芩连方指纹图谱的建立,其中黄连、黄芩分别有5个峰可以定量;葛根有6个峰可以定量,其他11个成分可用相对迁移时间定性。

3.4 葛根芩连汤中成分复杂,含有多种生物碱、黄酮类、皂苷类成分,采用高效液相色谱法,即使采用梯度洗脱也很难在一个色谱柱上使各类成分得到较好的分离,高效毛细管电泳的原理是利用成分在电压的驱动下,在电解质溶液中淌度的不同而得到分离,分离的效率高,各类物质都可以得到较好的分离,分析时间短,样品的处理比较简单,体现其在中药分析特别是中药复方的分析中的优势。

本法可为葛根芩连方及其他含葛根、黄芩、黄连的方剂物质基础及配伍规律研究提供分析方法;可为黄连药材、葛根药材、黄芩药材及葛根芩连制剂质量标准及其他含葛根、黄芩、黄连复方制订指纹图谱的建立提供参考。

References

- [1] Dai K J, Luo J B, Tan X M, *et al* Influence of various compatibility on puerarin content in Gegen Q inlian Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(6): 506-508.
- [2] Tan X M, Dai K J, Luo J B, *et al* Influence of compatibility on content of baicalin in Gegen Q inlian Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(7): 598-600.
- [3] Dai K J, Luo J B, Wu Z H, *et al* Influence of compatibility on glycyrrhizic acid in Gegen Q inlian Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(12): 1084-1087.
- [4] Liu Y M, Shuenn-Jyi S. Determination of quaternary alkaloids from *Coptidis Rhizoma* by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1992, 623: 196-199.
- [5] Liu Y M, Shuenn-Jyi S. Determination of coptisine, berberine and palmatine in traditional Chinese medicinal preparations by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1993, 639: 323-327.
- [6] Zhou H L, Wei L X, Yang D H. Determination of alkaloids in coptis-cinnamomum compatibility by capillary electrophoresis [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(5): 308-310.
- [7] Sun L H, Hu Y M, Zou D L, *et al* Determination of puerarin in *Radix Puerariae* and Naodesheng Tablets by HPCE [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2000, 35(10): 694-696.
- [8] Zhang G H, Wang Y Z, Zhang Y Y. Determination of *Protoberberinium* alkaloids in *Coptidis Rhizoma* and traditional Chinese pharmaceutical preparations by high performance capillary electrophoresis (HPCE) [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1995, 13(4): 247-249.
- [9] Han F M, Cheng Z Y, Yang X, *et al* Determination of baicalin in *Radix Scutellariae* preparation by high performance capillary electrophoresis [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2000, 18(3): 280-282.
- [10] Xie P S. On the feasibility of application of chromatographic fingerprint identification to herbal medication [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(6): 391-394.

蚕砂中叶绿素类金属配合物清除活性氧作用研究

冯清¹, 刘莉¹, 罗丰¹, 孙获娜¹, 李早英^{*}

(1. 华中科技大学同济医学院 医学化学系, 湖北 武汉 430030; 2. 武汉大学生命科学院, 湖北 武汉 430072)

摘要:目的 研究蚕砂中提取、精制叶绿素类金属配合物[Fe²⁺(I)、Cu²⁺(II)、Mn²⁺(III)、Co²⁺(IV)]作为抗活性氧(O₂⁻、H₂O₂、OH·)模拟酶。方法 核黄素—蛋氨酸光照测其清除O₂⁻作用, H₂O₂氧化维生素C法测其催化H₂O₂的分解, Fenton-苯甲酸荧光法测其对OH·清除作用, 小鼠肝匀浆法测其抗脂质过氧化作用。结果 1×10⁻⁵~1×10⁻⁶ mol/L具有良好的清除O₂⁻作用, 活性顺序为: Cu²⁺>Mn²⁺>Co²⁺>Fe²⁺; 约1×10⁻⁷ mol/L具有分解H₂O₂作用, 活性顺序为: Cu²⁺>Mn²⁺>Fe²⁺>Co²⁺; 约1×10⁻⁸ mol/L具有清除OH·的功能, 活性顺序为: Cu²⁺>Co²⁺>Fe²⁺>Mn²⁺; 约1×10⁻⁸ mol/L可使脂质过氧化产物明显减少, 活性顺序为: Cu²⁺>Co²⁺>Mn²⁺>Fe²⁺。结论 蚕砂中叶绿素类金属配合物可作为抗多种活性氧(O₂⁻、H₂O₂、OH·)模拟酶。

关键词: 蚕砂; 叶绿素类金属配合物; 抗活性氧; 脂质过氧化

中图分类号: R286.02; R286.07

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)07-0751-04

* 收稿日期: 2003-10-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29972035); 湖北省科技攻关项目(2002P0325)

Scavenging effect on active oxygen of metal chlorophylls from silkworm excrement

FENG Q ing¹, L U L i¹, LUO Feng¹, SUN Di-na¹, L I Zao-ying²

(1. Department of Medicine and Chemistry, College of Tongji, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: **Object** Four metal chlorophylls produced by chlorophyll extracted from silkworm excrement were used as varied function in micry of antiractive oxygen. **Methods** The first function, scavenging $O_2^{\cdot-}$, has been proved by using riboflavin-methionine photoreduction methods. The second function, scavenging H_2O_2 , has been demonstrated by using the oxidating Vc. The third function, scavenging $OH^{\cdot}$, has been demonstrated by using Fenton reaction. The complexes were measured by the liver homogenate technique of mice. **Results** Four model compounds could scavenge $O_2^{\cdot-}$ in the concentration of 10^{-5} — 10^{-6} mol/L and the activity order was as follow: $Cu^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+}$. All could decompose H_2O_2 in the concentration of 1×10^{-7} mol/L and the activity order was: $Cu^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+}$. All could scavenge $OH^{\cdot}$ in the concentration of 1×10^{-8} mol/L and the activity order was: $Cu^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+}$. All showed that they had obvious action of decreasing the lipid peroxidation in the concentration of 1×10^{-8} mol/L. The activity order of anti-lipid peroxidation of complexes was as follow: $Cu^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+}$. **Conclusion** All above mentioned complexes were considered to be qualified in mic enzymes of antiractive oxygen.

Key words: silkworm excrement; metal chlorophylls; antiactive oxygen; lipid peroxidation

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是指氧的某些代谢产物和一些反应的含氧产物,包括氧自由基如超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($HO^{\cdot}$)等,和一些非自由基的含氧物如过氧化氢(H_2O_2)。现已证实很多疾病如自身免疫性疾病、缺血、再灌注损伤等炎症性疾病的发生均与活性氧的损伤作用有关^[1,2]。但机体却有一套严密的防御系统与之对抗,如:超氧化歧化酶(superoxide dismutase, SOD)能清除 $O_2^{\cdot-}$,过氧化氢酶(catalase, CAT)能清除 H_2O_2 ;但从动物中提取各种酶操作繁杂,成本很高,且易失活等缺点限制了其应用。笔者根据天然酶活性中心结构特点,首次提出用天然叶绿素蚕砂提取物合成叶绿素类金属配合物作为抗 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $OH^{\cdot}$ 模拟酶。本实验对蚕砂提取物和叶绿素金属配合物清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $OH^{\cdot}$ 和抗脂质过氧化活性进行了测试。

1 仪器与试剂

756MC 紫外-可见光谱仪、荧光光度计、分析天平、恒温光照箱。

核黄素、蛋氨酸、亚硝基四氮蓝啉(NBT)为BR级;过氧化氢、维生素C、乙二胺四乙酸二钠、硫酸亚铁、还原铁粉、苯甲酸、氢氧化钾、磷酸二氢钾、氯化钠、乙酸、正丁醇为AR级;硫代巴比妥酸(TBA)、十二烷基磺酸钠(SDS)为Sigma公司产品(加热溶解配制成所需浓度);磷酸缓冲液(pH 7.81, 0.05 mol/L: 13.6 g 磷酸二氢钾和 4.8 g 氢氧化钾配制 2 L; pH 7.40, 0.2 mol/L: 27.2 g 磷酸二氢钾和 6.8 g 氢氧化钾配制 1 L)、醋酸缓冲液(pH 3.50, 20%:

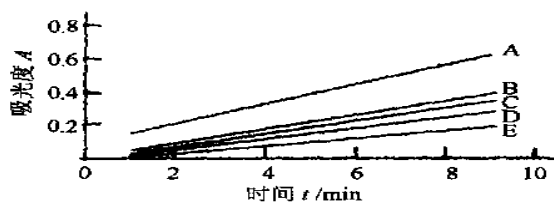
200 g 醋酸和 7.1 g 氢氧化钾配制 1 L)。叶绿素类金属配合物 [Fe^{2+} (I)、 Cu^{2+} (II)、 Mn^{2+} (III)、 Co^{2+} (IV)]按文献^[3]方法合成并经过光谱分析和元素分析合格。

2 方法与结果

2.1 模拟酶清除 $O_2^{\cdot-}$ 的活性:参考文献^[4]改进方法测定配合物清除 $O_2^{\cdot-}$ 的活性。

叶绿素 Mn^{2+} 清除 $O_2^{\cdot-}$ 的各浓度下的动力学曲线见图1。叶绿素 Mn^{2+} 对 $O_2^{\cdot-}$ 清除作用随其量的增加而增大,且其浓度从 1.51×10^{-6} mol/L ~ 8.03×10^{-6} mol/L 时,清除率由 33.24% 上升至 55.96%。模拟酶 I、II、III、IV 清除 $O_2^{\cdot-}$ 50% 的浓度分别为: 5.30×10^{-5} , 3.40×10^{-6} , 6.53×10^{-6} , 1.68×10^{-5} mol/L,即在 1×10^{-5} ~ 1×10^{-6} mol/L 均具有良好的清除 $O_2^{\cdot-}$ 的活性。活性顺序为: $Cu^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+}$ 。其中 Cu 配合物活性最大,提示与 CuZn-SOD 结构相似有关,模拟酶催化作用可能机制见图2。

2.2 模拟酶清除 H_2O_2 的活性:参考文献^[5]改进方法,在 10 mL 比色管中,依次加入 2.0 mL pH 7.4 0.2 mol/L 磷酸缓冲液,0.1 mL 3.90×10^{-5} mol/L 模拟酶,0.5 mL 1.4×10^{-4} mol/L 维生素C 水溶液,用蒸馏水稀释至刻度,在 265 nm 处测定第 6 min 时的吸光度 A 。在相同条件下,加 0.3% H_2O_2 水溶液 5 μ L,测定体系在第 6 min 时的吸光度 A' 。空白以蒸馏水代模拟酶,同上操作,吸光度为 A'' 。 $\Delta A = A' - A''$, $\Delta A_{\text{空}} = A - A''$,清除率为 $\Delta A / \Delta A_{\text{空}} \times 100\%$ 。



A-0 B- 1.51×10^{-6} mol/L C- 2.51×10^{-6} mol/L

D- 5.02×10^{-6} mol/L E- 8.03×10^{-6} mol/L

图 1 各浓度叶绿素 Mn^{2+} 清除 $O_2^{\cdot -}$ 的动力学曲线

Fig 1 Dynamics curve of scavenging $O_2^{\cdot -}$ of Mn^{2+} - chlorophyll under different concentrations

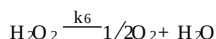
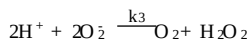
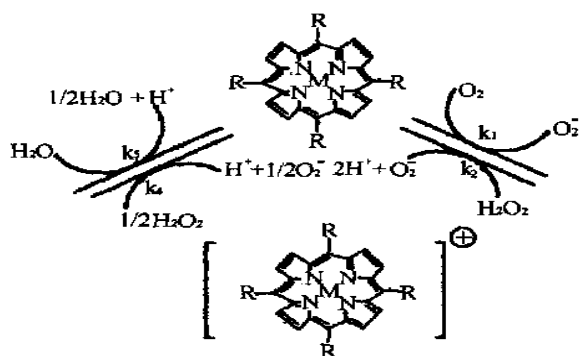


图 2 催化机制

Fig 2 Mechanism of catalysis

3.90×10^{-7} mol/L 模拟酶 I、II、III、IV 清除 H_2O_2 的清除率分别为: 28.24%、48.60%、42.03%、13.95%。即模拟酶在 1×10^{-7} mol/L 均有分解 H_2O_2 的功能, 并且在相同时间内, 其分解率与样品功能活性呈正相关。活性顺序为: $Cu^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+}$, 这种顺序反映的规律有待进一步探讨, 其可能机制见图 2。

2.3 模拟酶清除 $OH^{\cdot}$ 的活性: 参考文献^[6]改进方法, 在 10 mL 比色管中, 加入 5.0 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液, 0.5 mL 3.8 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液, 0.5 mL 3.8 mmol/L 硫酸亚铁溶液, 2.0 mL 0.02 mol/L 苯甲酸溶液和 0.5 mL 0.6 mol/L H_2O_2 , 最后加入 0.1 mL 2.0×10^{-6} mol/L 模拟酶, 加至 10 mL, 摇匀, 计时, 室温反应 20 min, 用荧光光度计在 $\lambda_{ex} = 330$ nm, $\lambda_{em} = 400$ nm 处测定体系的荧光强度, 并计算清除率。空白实验以水代 H_2O_2 和模拟酶, 所得苯甲酸的相对荧光强度记为 F_0 , 对照组以水代模拟酶相对荧光强度记为 F_{max} 其他加酶的相对荧光强度记为 F_i 。 $OH^{\cdot}$ 的清除率 = $(F_{max} - F_i) / (F_{max} - F_0)$ 。

2.05×10^{-8} mol/L 模拟酶 I、II、III、IV 清除 $OH^{\cdot}$ 的清除率分别为 35.59%、74.73%、10.71%、40.93%。即模拟酶在 1×10^{-8} mol/L 均具有清除 $OH^{\cdot}$ 的功能, 其清除率与模拟酶的功能活性呈正相关。其活性顺序为 $Cu^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+}$ 。

2.4 模拟酶抗脂质过氧化作用: 参考文献^[4]改进方法, 昆明种小鼠 18~25 g, 绝食 24 h, 颈椎脱臼法处死, 用生理盐水灌洗脱血后取出肝脏, 用 200 g/L 醋酸缓冲液配制成 100 g/L 肝匀浆, 备用。取匀浆 0.2 mL 于具塞试管中, 加 0.1 mL 1.0×10^{-8} mol/L 模拟酶, 恒温 (37 °C) 水浴槽中温育 0.5 h, 然后依次加入 0.2 mL 81 g/L SDS、1.5 mL 200 g/L 醋酸缓冲液、1.5 mL 8 g/L TBA 水溶液, 沸水浴中煮沸 0.5 h, 取出流水冷却, 加 4 mL 正丁醇, 振荡, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 取正丁醇层, 于 532 nm 处测定 A。空白对照以生理盐水代替模拟酶。结果见表 1。模拟酶在约 1×10^{-8} mol/L 均可使脂质过氧化产物明显减少, 有良好的抗脂质过氧化功能。其活性顺序为: $Cu^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+}$ 。其可能机制有待进一步研究。

表 1 模拟酶抗脂质过氧化作用测定结果

Table 1 Properties of antilipid peroxidation of mimic enzyme

模拟酶	动物/只	MDA / (nmol · L ⁻¹)	抑制率/%
对照	24	40.5 ± 0.51	
I	6	34.1 ± 0.44	18.77
II	6	20.4 ± 0.26	49.63
III	6	28.7 ± 0.49	29.13
IV	6	23.9 ± 0.89	40.99

3 讨论

我们突破一种配合物只能模拟单一酶的概念, 成功运用蚕砂提取、精制天然叶绿素类金属配合物作为抗多种活性氧 ($O_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 、 $OH^{\cdot}$) 模拟酶, 特别是创造性的设计了清除 $OH^{\cdot}$ 的模型; 基于蚕砂中叶绿素类金属配合物来源广泛、廉价、无毒、稳定性高、比天然酶相对分子质量小并且易透过细胞和线粒体等优点, 有望经过进一步的药理实验而运用到临床。

References

- [1] Lionel R M. The colours of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds [M]. Oxford: Oxford University Press, 1997.
- [2] Zhao K R, Yang Y J, Cao J D. Oxygen Free Radical and Clinic (氧自由基与临床) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2000.
- [3] Yuan Y. Preparation of chlorophyll paste copper chlorophyll and sodium copper chlorophyll [J]. Chem World (化学世界), 1989, 30(1): 38-40.
- [4] Feng Q, Liu L, Zheng Q F, et al. Dual functions of Co-

- TPPS₄ in scavenging oxygen free radicals and hydrogen peroxide [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 1997, 26(5): 344-347.
- [5] Liang F Z, Du M, Ren J C, *et al* Synthesis and catalytic activity of mimetic enzyme of salicylaldehyde-2-amino-phenyl-thiazole and its complexes [J]. *Chin J Inorg Chem* (无机化学学报), 1999, 5(3): 393-396.
- [6] Ma X Y, Wu Y H, Ding L, *et al* SeGPX activity of organoselenium-containing cyclodextrins and their scavenging effects on ·OH [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1999, 20(8): 1163-1167.

RP-HPLC 法测定酸枣仁汤中棘苕和阿魏酸的含量

李玉娟, 毕开顺*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立测定酸枣仁汤中棘苕和阿魏酸含量的 RP-HPLC 分析方法。方法 色谱柱: Hypersil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 棘苕流动相为乙腈-1% 冰醋酸水溶液 (17:83), 检测波长 334 nm; 阿魏酸流动相为乙腈-1% 冰醋酸水溶液 (16:84), 检测波长 320 nm, 内标物为对羟基苯甲醛。结果 棘苕和阿魏酸分别在 0.960~13.44 μg/mL ($r=0.9998$) 和 2.04~27.2 μg/mL ($r=0.9997$) 与峰面积线性关系良好。平均回收率分别为 98.4% 和 98.8%, RSD 分别为 2.5% 和 2.8%。结论 本法操作简便、快速、准确, 可用于酸枣仁汤中棘苕和阿魏酸的含量测定。

关键词: 酸枣仁汤; 棘苕; 阿魏酸; 高效液相色谱

中图分类号: R286.06

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)07-0754-03

Determination of spinosin and ferulic acid in Suanzaoren Decoction by RP-HPLC

LI Yu-juan, BI Kai-shun

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Object** To develop an RP-HPLC method for determination of spinosin and ferulic acid in Suanzaoren Decoction (SZRD). **Methods** Hypersil C₁₈ column was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-water with 1% glacial acetic acid (17:83) for spinosin and (16:84) for ferulic acid. Detection wavelengths were set at 334 and 320 nm, respectively. The internal standard was *p*-hydroxybenzaldehyde for ferulic acid. **Results** The linear ranges for spinosin and ferulic acid were 0.960—13.44 μg/mL ($r=0.9998$) and 2.04—27.2 μg/mL ($r=0.9997$), respectively. The recoveries for them were 98.4% and 98.8%, respectively. The RSD were 2.5% and 2.8%, respectively. **Conclusion** This method is simple, rapid and accurate, and can be used for the determination of spinosin and ferulic acid in SZRD.

Key words: Suanzaoren Decoction (SZRD); spinosin; ferulic acid; HPLC

酸枣仁汤出自《金匱要略》, 由炒酸枣仁 18 g、茯苓 10 g、川芎 5 g、知母 10 g、甘草 3 g 组成。方中酸枣仁养肝血、安心神, 为君药; 川芎调血养肝、茯苓宁心安神, 为臣药; 知母滋阴降火、清热除烦, 为佐药; 甘草和中缓肝, 为使药。本方临床主治肝血不足, 虚火内扰心神所致的心烦失眠等症^[1]。已有研究表明酸枣仁的君药酸枣仁中棘苕和臣药川芎中阿魏酸为该复方重要镇静、催眠的有效成分^[2]。本实验采用 RP-HPLC 法对酸枣仁汤中棘苕和阿魏酸含量进行测定, 以期客观、全面评价酸枣仁汤质量和完善该复方中药的质量标准提供实验依据。

1 仪器与药品

LC-10A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); SPD-10A 紫外检测器 (日本岛津公司); Ckchrom—chromatography 数据采集系统; ZFQ-85A 型旋转蒸发仪 (上海医械专机厂)。

乙腈、甲醇 (色谱纯), 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯; 棘苕对照品由本教研室提供 (纯度 > 98%); 阿魏酸对照品购自中国药品生物制品检定所。炒枣仁、茯苓、川芎、知母与甘草购自沈阳天益堂药店, 经沈阳药科大学生药鉴定研究室 [许春泉] 高级工程师鉴定, 粉碎, 过 60 目筛, 备用。

* 收稿日期: 2003-10-15

作者简介: 李玉娟 (1975—), 女, 山东泰安市人, 药学博士, 主要从事复方中药药效物质基础和质量控制方法研究。