

- sorption resin on separate and pure *Panax notoginseng* [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2003, 1(10): 79.
- [2] Ou L L, Shi Z Q, Shi R F, et al. Studies on separation and purification of saponins from *Panax notoginseng* with strong-

ly polar macroporous adsorption resin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药) 2003, 34(10): 905.

- [3] Geng J L, Shen Y, Song X W. Developments studies on saponins in *Panax notoginseng* leaves [J]. *J Yunnan Coll Tradit Chin Med* (云南中医学院学报), 2001, 24(3): 7.

罗布麻、绿茶及其配伍对活性氧清除能力的比较

徐仰仓

(天津科技大学 海洋生物制品研究室, 天津 300457)

茶叶中含有多种对人体健康有益的物质,能有效清除氧自由基和脂类自由基,预防脂质过氧化,提高血清 SOD 酶的活性,延缓衰老^[1]。罗布麻茶是近年来常见的一种保健茶,具有清除过氧亚硝酸离子^[2],清除羟自由基^[3],抑制脂质过氧化^[4],提高血清中 SOD、CAT 和 GSH-PX 酶活性的作用^[5]。罗布麻和绿茶的抗氧化能力的差别以及将两者混合,实现功能互补还未见研究报道。因此本实验考察了绿茶和罗布麻抗氧化能力的差异以及两者混合后抗氧化能力的改变。

1 仪器与材料

AL204 电子天平(梅特勒-托利多上海有限公司),752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器有限公司),电热恒温水浴锅(天津市中环实验电炉有限公司)。

芦丁、氮蓝四唑(NBT)为 Sigma 公司产品,核黄素、血红蛋白为生化试剂,其他试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

罗布麻干叶和绿茶干叶购自天津市中新药业药店,产地均为云南。

2 方法和结果

2.1 样品溶液的制备:罗布麻干叶和绿茶干叶购回后,以芦丁为对照,采用 UV 法测定其中黄酮的量^[6],结果罗布麻干叶中的黄酮的质量分数为 45.2 mg/g,茶叶中的黄酮的质量分数为 79.6 mg/g。将 100%罗布麻、50%罗布麻+50%绿茶,100%绿茶 3 种配伍样品以 50%乙醇 37℃水浴浸提 24 h,减压浓缩至 20 mL,即得罗布麻、罗布麻+绿茶、绿茶醇提液。

2.2 提取液对超氧阴离子(O_2^-)的清除作用:采用核黄素-NBT 还原法^[7]测定。0.1 mL 醇提液、0.2 mL 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mL 1.5 mmol/L NBT, 2.55 mL 磷酸缓冲液(pH 7.8), 0.05 mL 0.12 mmol/L 核黄素组成反应体系,25℃下光照 10 min,在 560 nm 波长下测定样品组吸光度(A_1)值,同法以水为对照组成反应体系,测定对照组吸光度(A_2)值,计算清除率[清除率=($A_2 - A_1$)/ $A_2 \times 100\%$]。结果茶叶、茶叶+罗布麻和罗布麻醇提液的清除率分别为 71.4%、52.3%、38.1%($n=3$)。可见茶叶醇提液的清除效果最好,茶叶+罗布麻醇提液的清除效果次之,罗布麻醇提液的清除效果最差。

2.3 对羟自由基($\cdot OH$)的清除作用: $\cdot OH$ 自由基由 Fenton 反应产生,采用水杨酸比色法测定 $\cdot OH$ 自由基^[7]。0.5 mL 10 mmol/L 水杨酸,样品组采用 2.8 mL 0.4 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)+0.2 mL 醇提液,对照组采用 3.0 mL 0.4 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4), 0.5 mL 3.8 mmol/L Fe^{2+} -EDTA 溶液, 1 mL 4 mmol/L H_2O_2 组成反应体系,25℃反应 90 min 后,用乙醚抽提 2,3-二羟基苯甲酸,分别在 510 nm 波长处测定样品组吸光度(A_1)和对照组吸光度(A_2),计算清除率[清除率=($A_2 - A_1$)/ $A_2 \times 100\%$]。结果茶叶、茶叶+罗布麻和罗布麻醇提液的清除率分别为 18.6%、48.8%、69.8%($n=3$)。可见茶叶醇提液对 $\cdot OH$ 的清除效果最差,茶叶+罗布麻醇提液的清除效果次之,罗布麻醇提液的清除效果最好。

2.4 对过氧化氢(H_2O_2)的清除作用:采用碘化钾

收稿日期:2006-09-19

基金项目:国家自然科学基金项目(30670493);天津市高等学校科技发展基金项目(20040711)

作者简介:徐仰仓(1964—),男,甘肃人,副教授,博士(后),从事自由基研究,在该领域内发表学术论文 20 余篇,获省部级奖 1 项。

Tel: (022)60601458 Fax: (022)60600358 E-mail: xuyc@tust.edu.cn

比色法测定^[7]。3 mL 反应体系中含有: 50 μ L 0.5 mmol/L H_2O_2 , 2.0 mL 50 mmol/L HCl, 0.25 mL 1.0 mmol/L 钼酸铵, 0.25 mL 1.0 mol/L KI, 0.25 mL 0.5 mg/mL 淀粉溶液, 0.2 mL 醇提液或者以水为对照组成反应体系, 室温反应 20 min 后, 分别在 570 nm 波长处测定样品组吸光度(A_1)和对照组吸光度(A_2), 计算清除率[清除率=(A_2-A_1)/ $A_2 \times 100\%$]。结果茶叶、茶叶+罗布麻和罗布麻醇提液的清除率分别为 22.7%、26.7%、30.7% ($n=3$)。可见罗布麻醇提液的清除效果最好。相对对照组来说, 3 种醇提液均有清除过氧化氢的作用, 但它们间的清除能力没有明显的差异。

2.5 对一氧化氮(NO)的清除作用: NO 气体根据 Zhao 的方法^[8]制备, NO 在水溶液中的饱和浓度根据 Borutaite 的方法^[9]计算。采用血红蛋白法测定 NO^[7]。2.3 mL 40 mmol/L 磷酸缓冲溶液 (pH 7.7), 0.4 mL 1.6 μ mol/L 氧合血红蛋白(HbO_2), 0.1 mL 1.0 mmol/L NO 溶液, 0.2 mL 醇提液或者以水为对照组成反应体系。分别在 401、411 nm 波长处测定吸光度值, 以 $A_{401} \text{ nm}/A_{411} \text{ nm}$ 表示 NO 的相对水平。计算样品组中 NO 的相对水平(C_1)和对照组中 NO 的相对水平(C_2), 得清除率[清除率=(C_2-C_1)/ $C_2 \times 100\%$]。结果茶叶、茶叶+罗布麻和罗布麻醇提液的清除率分别为 24.7%、53.1%、63.0% ($n=3$)。可见罗布麻醇提液具有较高的清除能力, 而茶叶醇提液的清除效果则较低, 茶叶+罗布麻醇提液的清除能力解介于茶叶与罗布麻醇提液之间。

2.6 对亚油酸氧化的影响: 亚油酸氧化程度的测定参照闫祥华的方法^[10], 略加改动。亚油酸氧化程度用硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)和共轭双烯两个指标表示。1.6 mL 3.6 mmol/L 亚油酸, 0.2 mL 提取液, 50 μ L 1.0 mmol/L NO 溶液, 50 μ L 0.5 mmol/L H_2O_2 , 50 μ L 3.8 mmol/L Fe^{2+} -EDTA 溶液, 50 μ L 0.12 mmol/L 核黄素组成反应体系, 混匀后 25 $^\circ\text{C}$ 下光照 45 min。取 500 μ L 与 2.0 mL 乙醇混匀, 测定 234 nm 处的吸光值(A_{234}), 表示反应体系中共轭双烯的相对水平。在剩余的 1.5 mL 反应液中加入 2.0 mL 0.67% 硫代巴比妥酸(TBA)溶液, 混匀, 置沸水浴 30 min 后取出, 自来水冷却 5 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 测定 532 nm 处的吸光值(A_{532}), 表示反应体系中 TBARS 的相对水平。TBARS 是亚油酸氧化的末

端产物 MDA 与 TBA 反应后的产物, 当以它作为指标时, 茶叶+罗布麻醇提液对亚油酸氧化的抑制率为 82.4%, 罗布麻醇提液的抑制率是 64.7%, 茶叶醇提液的抑制率为 57.6%。共轭双烯是亚油酸氧化的中间产物, 当以它为指标时, 茶叶+罗布麻醇提液对亚油酸氧化的抑制率为 75%, 罗布麻醇提液的抑制率是 59.2%, 茶叶醇提液的抑制率为 51.3%。

3 讨论

在清除 O_2^- 方面, 罗布麻不如茶叶; 在清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基方面, 罗布麻明显强于茶叶; 在清除 H_2O_2 方面, 罗布麻与茶叶没有统计意义上的差别, 而在清除 NO 方面, 罗布麻又好于茶叶。 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 是生物体内主要的活性氧, 能破坏细胞膜、损伤细胞的大分子物质蛋白质、核酸等, 最终导致细胞衰老甚至死亡。因 O_2^- 带负电荷, 难以接近细胞膜、核酸等带负电荷的物质, 因而, 它对细胞的伤害远不如 $\cdot\text{OH}$ 自由基。因此, 从活性氧的角度看, 罗布麻对细胞的保护作用要好于传统的茶叶。NO 是近年来发现的另一个重要的自由基, 它也是一个“双刃剑”, 当它与细胞内的 O_2 相互作用后便形成过氧亚硝基, 后者对细胞的破坏作用远远超过了 O_2^- 本身。因此, 清除多余的 NO, 同样能起到保护细胞免受自由基损伤的作用。而罗布麻清除 NO 的功能强于传统茶叶。因此, 从活性氮的角度看, 罗布麻对细胞的保护作用也好于传统的茶叶。

不过传统茶叶毕竟有其优势, 它清除 O_2^- 的能力约为罗布麻的 2 倍。因此将两者混合, 实现功能互补。若按 1:1 混合, 则发现混合物清除 NO、 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 、 H_2O_2 的能力始终介于罗布麻和茶叶之间, 但它抑制由 NO、 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 、 H_2O_2 共同引起的亚油酸氧化的能力却最强。因此, 将不同功能的保健药物配伍, 能够较全面地清除体内自由基, 保护细胞免受自由基的氧化损伤。本实验结果表明, 将罗布麻与传统茶叶配伍, 形成一种新的保健茶, 其对自由基损伤的保护作用更明显, 保健功能更强。

References:

- [1] Chen K Y, Li C S. *Newly Compiled Chinese Traditional Medicine Anti-sensence* (新编抗衰老中药学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998.
- [2] Tang S L. The active constituents of scavenging ONOO⁻ ion in *Apocynum venetum* [J]. *Foreign Med Sci: Tradit Chin Med* (国外医学: 中医中药分册), 2003, 25(5): 302-303.
- [3] Cao Y H, Chu Q C, Ye J N. Determination of hydroxyl radi-

- cal by capillary electrophoresis and studies on hydroxyl radical scavenging activities of Chinese herbs [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 376: 691-695.
- [4] Tong Y, Ye Z G. The content of flavone in *Apocynum venetum* and *Poacynum hendersonii* (Hook. f.) Woodson and its anti-lipid peroxidative mechanism [J]. *Foreign Med Sci; Tradit Chin Med* (国外医学中医中药分册), 1996, 18(1): 49.
- [5] Xu L, Chao Z M. Anti-lipid peroxidative actions of apocynum venetum leaf extract [J]. *Foreign Med Sci; Tradit Chin Med* (国外医学: 中医中药分册), 1998, 20(4): 54.
- [6] Fan W G, Xie C X, Li F, Ainken A. Determination of the content of total flavonoids in *Apocynum venetum* L. [J]. *Chin J Spectrosc Lab* (光谱实验室), 2005, 22(3): 464-466.
- [7] Pang Z J, Zhou J, Cheng A. *Study Methods of Free Radical Medicine* (自由基医学研究方法) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
- [8] Zhao B L, Shen J G, Li M, et al. Scavenging effect of chinonin on NO and oxygen free radicals and its protective effect on the myocardium from the injury of ischemia-reperfusion [J]. *Biochim Biophys. Acta*, 1995, 1315: 131-137.
- [9] Borutaite V, Brow G C. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide [J]. *Biochem J*, 1996, 315: 295-299.
- [10] Yan X H, Gu J F, Sun C P, et al. Anti-lipid peroxidative actions of soybean isoflavones and their mechanism [J]. *J Prev Med Chin PLA* (解放军预防医学杂志), 2000, 18(1): 14-17.

HPLC 法测定障眼明片中盐酸小檗碱

丘文珍

(广州中一药业有限公司, 广东 广州 510000)

障眼明片由黄柏、山茱萸、黄芪、菊花、枸杞子、熟地黄、密蒙花、黄精、党参等 22 味中药组成, 能补益肝肾, 退翳明目, 用于初期及中期老年性白内障。黄柏在方中起了重要作用, 而盐酸小檗碱是黄柏主要成分。原标准是采用薄层扫描法进行质量控制, 方法的专属性比较差。因此, 本实验建立 HPLC 法测定盐酸小檗碱, 以期能更好地对本品进行质量控制。

1 仪器与试药

HP-1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器, HP 化学工作站。甲醇为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 盐酸小檗碱对照品(批号: 110713-200208)由中国药品生物制品检定所提供, 障眼明片为本公司产品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: 汉邦科技 Lichrospher (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液(50:50, 每 100 mL 混合液中加 0.1 g 十二烷基磺酸钠^[1]); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 265 nm; 柱温: 35 ℃。理论板数以盐酸小檗碱峰计算不低于 10 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇溶解, 使质量浓度为 59.88 μg/mL。

2.2.2 供试品溶液的制备: 取本品 20 片, 除去包薄膜衣, 研细, 精密称取 1 g 置三角瓶中, 加入体积分数为 0.1% 盐酸 2 mL, 充分润湿后放置 10 min, 加甲醇 100 mL, 超声处理 30 min, 取出, 静置过夜, 摇匀, 滤过, 加甲醇适量洗涤三角瓶, 滤过, 合并滤液, 水浴蒸干, 残渣加水 2 mL 充分润湿, 加无水乙醇 10 mL 使溶解, 上中性氧化铝柱(105 ℃活化 1 h, 100~200 目, 16 g, 内径 2 cm), 用 250 mL 无水乙醇洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇使溶解并定容至 2 mL, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备: 按处方制备不含黄柏药材的样品, 同法制成阴性对照溶液。

2.3 方法可行性考察: 取对照品溶液、阴性对照溶液和供试品溶液, 在上述色谱条件下进样 10 μL, 结果见图 1。可见阴性对照对盐酸小檗碱测定无干扰。

2.4 线性关系的考察: 精密吸取 59.88 μg/mL 盐酸小檗碱对照品溶液, 各进样 3、6、9、12、15 μL, 测定峰面积。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 3625.9X - 2.4141$, $r = 0.99996$, 线