

功能不甚明了,可能参与吞噬过程中微粒摄取、吸收、膜融合、DNA合成和转录等生理过程^[4]。磷脂酶A₂活性的传统测定方法是滴定法(滴定脂肪酸),药品和试剂用量大,成本高,且特异性和敏感性不高,已逐渐淘汰;采用高效液相色谱法直接测定脂肪酸难度亦大(生成的脂肪酸需进行衍生化反应)。目前主要采用合成底物测定PLA₂的催化活性,通常是在甘油磷脂的Sn-2位接上可显色的基团(如1-十六酰基-2-花生四烯酰疏基-甘油-3-磷酸胆碱)、或荧光基团(Sn-2位酰基的末端接上萘基团等)或同位素基团(将磷脂用¹⁴C同位素标记),或合成与磷脂结构类似能被PLA₂水解的非磷脂化合物(6-庚酸-7羟基香豆素等)。上述底物被PLA₂水解后通过紫外-可见分光光度法测定显色的产物,或通过荧光分光光度法测定荧光产物,或通过放射检测测定同位素标记的产物。这些方法较为成熟,且灵敏度高,但需要特殊标记物或专用仪器而难以推广应用^[5]。

本实验以磷脂酰胆碱和胆固醇等为主要材料,采用薄膜分散法-超声-微滤膜挤出-葡聚糖凝胶柱色谱分离-冷冻干燥联用技术制备包封羧基荧光素的脂质体(固态脂质体便于保存),利用PLA₂能水解磷脂破坏脂质体造成羧基荧光素渗漏的原理,将药物、PLA₂和复水后的液态荧光脂质体共同温孵,采用荧光分光光度计检测从脂质体渗漏的羧基荧光素的荧光强度,该强度反映药物对PLA₂的抑制强度。采用本法氯丙嗪(PLA₂公认抑制剂)对PLA₂的

有效浓度为微摩尔级,且具有明显量效关系,与国外报道^[6]相近(国外学者以放射性标记法测定氯丙嗪抑制猪胰腺sPLA₂活性的IC₅₀为517 μmol/L,即0.16 mg/mL),表明该方法是可行的。目前甘草酸对PLA₂的抑制作用已得到国内外学者的证实^[7]。本实验的研究结果表明芍药甘草汤、甘草和甘草酸对PLA₂活性均具有较强的抑制作用,且量效关系明显,但白芍抑制作用较弱,芍药苷几乎无抑制作用。在相同剂量条件下芍药甘草汤抑制PLA₂活性强于单味甘草和白芍,说明甘草和白芍具有协同效果。甘草酸是芍药甘草汤抑制磷脂酶A₂活性的重要成分,其他活性成分有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Dennis E A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂ [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(18): 13057-60.
- [2] 邱耕,涂植光,李晓文.苦参碱对内毒素致炎大鼠PLA₂活性影响及其抗炎机制研究[J].中草药,2002,33(7):630-632.
- [3] 赵承梅,沈彬,华潜棠,等.中药清解灵配合胆管减压引流对急性重症胆管炎大鼠胆器中磷脂酶A₂和氧自由基含量的影响[J].天津中医学院学报,2004,23(1):16-18.
- [4] 王晓辉,颜光涛.磷脂酶A₂抑制剂的研究进展[J].标记免疫分析与临床,2003,10(1):33-36.
- [5] 赵树铭,康格非.磷脂酶A₂测定方法进展[J].国外医学:临床生物化学与检验学分册,1995,16(6):242-244.
- [6] Chang J, Musser J H, McGregor H. Phospholipase A₂: function and pharmacological regulation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1987, 36(15): 2429-2436.
- [7] Okimatsu E, Moromizato Y, Watanabe S, et al. Inhibition of phospholipase A₂ and platelet aggregation by glycyrrhizin, an antiinflammation drug [J]. *Acta Med Okayama*, 1983, 37(5): 385-391.

大鼠灌胃棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷后血清中药物的分析

许彤彤,王邠,郭慧,赵玉英,张庆英^{*}

(北京大学医学部药学院 天然药物学系 天然药物与仿生药物国家重点实验室,北京 100083)

摘要:目的 研究大鼠灌胃棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷后血清中药物的分析检测方法。方法 大鼠灌胃250 mg/kg 棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷,收集血样,进行适当的前处理,采用HPLC-DAD、LC-MS^a法对血清样品进行检测。结果 HPLC-DAD和LC-MS^a两种方法均能检测到血清中的棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷,但未能检测到其代谢产物。血清样品前处理中的离心转速、pH值、纯化方法对血清中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的分析检测有明显影响。结论 建立了大鼠灌胃棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷后血清中药物的快速灵敏的分析检测方法,为棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的进一步药动学研究提供参考依据。

关键词:棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷;高效液相色谱;高效液相色谱-质谱联用

中图分类号:R285.61;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)07-1004-04

收稿日期:2007-09-07

基金项目:国家自然科学基金重点项目(20432030);长江学者和创新团队计划资助项目(985-2-063-112)

作者简介:许彤彤(1982-),女,北京大学医学部生药学专业硕士研究生。E-mail: xutong821124@163.com

* 通讯作者 张庆英 Tel: (010) 82801725 Fax: (010) 82801592 E-mail: qyzhang@bjmu.edu.cn

Analysis of rat serum after orally administrating gossypetin-8-O-glucuronide

XU Tong-tong, WANG Bin, GUO Hui, ZHAO Yu-ying, ZHANG Qing-ying

(Department of Natural Medicines, State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

Abstract: Objective To develop an analysis method used for rat serum after ig administration of gossypetin-8-O-glucuronide. Methods Rats were ig administrated by gossypetin-8-O-glucuronide at the dose of 250 mg/kg, then the blood was collected, pre-treated appropriately, and detected by HPLC-DAD and LC-MS^a. Results In rat serum, gossypetin-8-O-glucuronide was detected by both HPLC-DAD and LC-MS^a methods, but no other metabolites were detected by the both methods. The pre-treatment of samples, such as centrifugal speed, pH value, purification method, could markedly affect the detection of gossypetin-8-O-glucuronide in rat serum. Conclusion A rapid and sensitive method for analysis of rat serum after ig administration of gossypetin-8-O-glucuronide is established and this study will be useful for the further study of gossypetin-8-O-glucuronide.

Key words: gossypetin-8-O-glucuronide; HPLC; LC-MS^a

棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷(gossypetin-8-O-glucuronide, hibifolin)为锦葵科秋葵属植物黄蜀葵 *Abelmoschus manihot* (Linn.) Medicus 花中最高的黄酮类化合物^[1], 为黄蜀葵花的主要活性成分之一, 具有良好的抗炎活性^[2,3]和神经细胞保护作用^[4]。研究药物在生物体内的吸收、分布、代谢和排泄对于阐述药物的药效作用机制、指导其临床合理用药具有重要的意义。本实验对大鼠灌胃棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷后含药血清的前处理、检测以及血清药物浓度随时间的变化等进行了研究, 为进一步进行棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷体内代谢的研究提供了参考依据。

1 仪器与试剂

配有 ESI 源及 LCQ 数据处理系统的 LCQ 型液相色谱-质谱联用仪(Finnigan MAT. San Jose, CA);日本岛津高效液相色谱仪, 岛津 SPD M10Avp PDA 检测器; 1/10 000 电子分析天平(美国 Denvor); WinchemTM C₁₈固相萃取柱(北京蕴泉科技有限公司); HPD-600 大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司)。

棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷对照品由本研究室从黄蜀葵花中分离得到, 并经¹H-NMR 和¹³C-NMR 鉴定其化学结构, 面积归一化法计算质量分数大于 85%; 色谱纯乙腈为美国 Fisher 公司产品; HPLC 用超纯水由本校实验中心制备; 其他试剂均为北京化工厂分析纯产品。

清洁级 SD 大鼠, 体质量(200±10)g, 合格证号为: SCXK 京 2002-0001, 雄性, 购于北京大学医学部实验动物科学部。

2 方法与结果

2.1 给药药液的制备: 取棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷用蒸馏水或 10% 抗坏血酸水溶液配制成质量浓度为 12.5 mg/mL 的药液。

2.2 含药及空白血液的采集: 取健康大鼠, 随机分为给药组和空白组, 禁食 24 h 后, 给药组灌胃棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷 250 mg/kg 体质量, 空白组口服相同体积的空白对照溶液, 30 min 后腹主动脉取血, 收集相应的空白组和给药组血样, -20 ℃ 保存备用。

2.3 血清样品的检测: 取空白组和给药组血样离心制备空白血清和含药血清, 并经适宜的前处理方法后分别采用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)和高效液相色谱-质谱连用仪(LC-MS^a)进行检识。

2.3.1 HPLC-DAD 分析条件: 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-pH 4 的醋酸/醋酸氨缓冲溶液(B), 梯度洗脱(0 min: 10% A; 20 min: 14% A; 40 min: 20% A; 50 min: 25% A); 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 380 nm; 进样量为 20 μL; 柱温为 30 ℃。

2.3.2 LC-MS^a 分析条件: 色谱条件为 YMC-Pack ODS-A 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈(A)-pH 4 的醋酸/醋酸氨缓冲溶液(B)梯度洗脱(0 min: 10% A; 20 min: 14% A; 40 min: 20% A; 50 min: 25% A); 体积流量为 1 mL/min; 分流入质谱体积流量为 0.25 mL/min; 检测波长为 380 nm; 进样量 20 μL; 柱温 30 ℃。质谱检测条件: ESI 离子源负离子扫描模式下多级质谱全扫描进行测定; 扫描范围 m/z 150~800; 离子源喷射电压 4 kV; 毛细管电压 30 V; 管透镜补充电压 20 V; 毛细管温度 330 ℃; 鞘气

(N₂)流速:60 amu。

2.3.3 血清样品的检测结果:通过与对照品对照的方法对血清中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷进行了指认,结果两种方法在含药血清中都检测到了棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷,但均未能明显检测到其代谢产物(图1、2),这初步说明棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷主要以原型药的形式吸收入血。

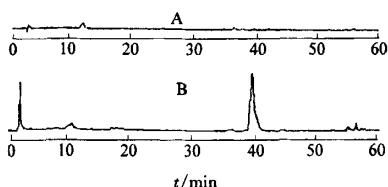


图1 空白血清(A)和含药血清(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank serum (A) and serum after ig administration of gossypetin-8-O-glucuronide (B)

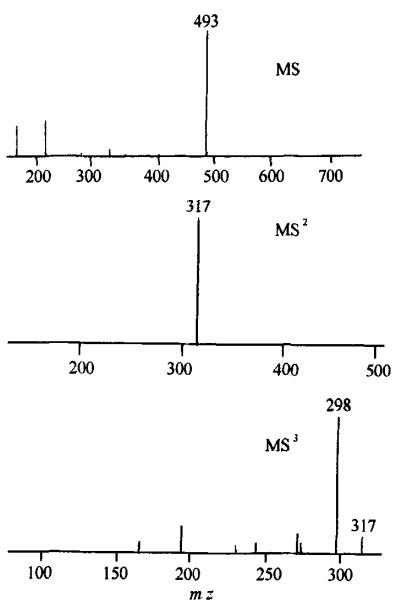


图2 含药血清中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的MS, MS², MS³质谱图

Fig. 2 MS, MS², and MS³ Spectra of gossypetin-8-O-glucuronide in rat serum

2.4 样品前处理方法的考察

2.4.1 离心转速对血清中药物质量浓度的影响:取给药组血样,平均分为2组,分别在8 000、4 500 r/min下离心10 min,取上清液2.5 mL,调pH值至2,加入甲醇15 mL,离心,取上清液,氮气吹干,200 μL 50%乙腈复溶,所得样品分别进行HPLC检识。结果表明8 000 r/min所得样品中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的峰面积明显大于4 500 r/min所得样品

中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的峰面积。

2.4.2 pH值对血清中药物质量浓度的影响:取给药组血样,8 000 r/min离心取上清液,平均分为5份,每份2.5 mL,分别调pH值至2、2.5、3、3.5、4,然后加入甲醇15 mL,离心,取上清液,氮气吹干,200 μL 50%乙腈复溶,所得样品分别进行HPLC检识。结果表明pH值为2、2.5时样品中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的峰面积明显大于pH值为3、3.5、4时,而且pH值为2时样品中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的峰面积稍大于pH值为2.5。

2.4.3 纯化方法对血清中药物质量浓度的影响:取给药组血样,离心取上清液,调pH值至2,然后取3份,每份2.5 mL,分别按以下方法进行处理:(1)甲醇沉淀法:血清中加入甲醇15 mL,离心,取上清液,氮气吹干,200 μL 50%乙腈复溶。(2)反相C₁₈固相萃取柱萃取法:以10 mL甲醇和10 mL水活化固相萃取柱,然后将2.5 mL含药血清经固相萃取小柱,先用5 mL水洗脱,继之以2 mL 60%甲醇洗脱,收集60%甲醇洗脱液,氮气吹干,200 μL 50%乙腈复溶。(3)大孔吸附树脂法:将2.5 mL含药血清经HPD-600大孔吸附树脂小柱,分别用水,30%、80%甲醇洗脱,收集80%甲醇洗脱液,氮气吹干,200 μL 50%乙腈复溶。所得样品分别进行HPLC检识,结果表明甲醇沉淀法所得棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的峰面积最大;固相萃取柱萃取法所得样品中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的峰面积较小,约为甲醇沉淀法中峰面积的1/10;而大孔吸附树脂法所得样品中几乎未能检测到棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷。

2.5 药物溶解度对血清中药物质量浓度的影响:将棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷分别用纯净水和10%抗坏血酸溶解,大鼠灌胃后30 min收集血样,离心,分别取上清液2.5 mL,调pH值至2,按甲醇沉淀法处理血清样品,所得样品分别进行HPLC检识。结果表明用10%抗坏血酸溶解后的棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷灌胃大鼠所得血清样品中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的峰面积明显大于大鼠灌胃以纯净水溶解的棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷所得血清样品中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的峰面积。

2.6 血中药物质量浓度随时间的变化:大鼠灌胃棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷后,分别在20、30、45、60 min由腹主静脉取血收集血样,8 000 r/min离心,每份取上清液2.5 mL,调pH值至2,按甲醇沉淀法处理血清样品,所得样品分别进行HPLC检识。结果表明棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷在灌胃给药后

迅速吸收,于30 min左右达到最大血药浓度,之后逐渐降低,至60 min后趋于平缓。

3 讨论

HPLC-DAD的分离度好,灵敏度高,而且可以提供每个成分的全波长扫描紫外谱图,这对于血中药物及其代谢产物结构类型的初步确认具有重要指导意义。LC-MS^a法将HPLC的高分离效能与MS的强大结构测定功能组合起来,对被测物不需复杂的分离富集即可获得被测物的分子结构信息,从而能够在没有对照品的情况下对未知物进行定性分析,为中药化学成分尤其是代谢产物的快速分析提供了一个重要的新技术。

血清样品前处理方法对血清中棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的分析检测有明显影响。如高速离心以及酸性条件有助于棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷的解离;加入助溶剂如抗坏血酸改善棉花皮素-8-O-

葡萄糖醛酸苷溶解性后,可导致其吸收率提高,血药浓度增加。

本实验建立了快速灵敏的棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷含药血清的前处理与检测方法,阐明了大鼠灌胃后血药浓度随时间的变化趋势,该研究结果为进一步进行棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷吸收、分布、代谢和排泄研究提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 赖先银. 黄蜀葵花化学成分、质量控制、血尿药物动力学及活性研究 [D]. 北京: 北京大学, 2005.
- [2] 王先荣, 周正华, 杜安全, 等. 黄蜀葵花黄酮成分的研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(2): 91-92.
- [3] Ferrandiz M L, Alcaraz M J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids [J]. Agents Actions, 1991, 32(3-4): 283-288.
- [4] Zhu J T T, Choi R C Y, Chu G K Y, et al. Flavonoids possess neuroprotective effects on cultured pheochromocytoma PC12 cells: A comparison of different flavonoids in activating estrogenic effect and in preventing β-amyloid-induced cell death [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(6): 2438-2445.

穿龙薯蓣淀粉的理化性质研究

袁毅¹, 张黎明^{1*}, 王书军², 高文远²

(1. 天津科技大学生物工程学院 天津工业微生物重点实验室, 天津 300457;

2. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要: 目的 为了充分了解穿龙薯蓣,通过多种分析方法对穿龙薯蓣淀粉物理化学性质进行研究。方法 采用扫描电子显微镜(SEM)、粒度分析仪、X-射线衍射、差示扫描量热仪(DSC)和布拉班德粘度仪。结果 通过与木薯、马铃薯淀粉的物理化学性质的比较,穿龙薯蓣淀粉显示了相对较小、椭圆形,大小不均匀的颗粒。晶体类型显示为C型,含直链淀粉为26.3%。凝胶化温度最高,其熔值介于马铃薯与木薯。根据布拉班德图谱得知穿龙薯蓣淀粉具有较低的黏度峰值、较高的回生值和较低的衰退值。结论 穿龙薯蓣淀粉与其他相关植物的块茎类淀粉来源不同,物理化学性质也存在明显不同。

关键词: 穿龙薯蓣; 淀粉; 直链淀粉

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2008)07-1007-04

Physicochemical properties of starch obtained from *Dioscorea nipponica*

YUAN Yi¹, ZHANG Li-ming¹, WANG Shu-jun², GAO Wen-yuan²

(1. Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Objective To study the medicinal plants of *Dioscorea nipponica*, the physicochemical properties of starch in *D. nipponica* were investigated by means of various analytical methods. **Methods** *D. nipponica* starch was characterized by scanning electron microscope (SEM), X-ray diffraction, granule size analysis, DSC, and Brabender Viscograph system. **Results** Compared with tapioca and potato starch, the morphology of *D. nipponica* starch showed smaller particles, oval shaped, and dissimilar granules in size.

收稿日期:2007-09-14

基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(08JCZDJC15300)

作者简介:袁毅(1981—),江苏大丰人,硕士生,从事天然药物开发与研究。E-mail: gavinyuen81@yahoo.com.cn

*通讯作者 张黎明 Tel: (022) 60601274 E-mail: zhanglmd@yahoo.com.cn

大鼠灌胃棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷后血清中药物的分析

作者: 许彤彤, 王邠, 郭慧, 赵玉英, 张庆英, XU Tong-tong, WANG Bin, GUO Hui, ZHAO Yu-ying, ZHANG Qing-ying
作者单位: 北京大学医学部药学院天然药物学系, 天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京, 100083
刊名: 中草药 [ISTIC PKU]
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期): 2008, 39(7)
被引用次数: 1次

参考文献(4条)

1. 赖先银 黄蜀葵花化学成分、质量控制、血尿药物动力学及活性研究 2005
2. 王先荣;周正华;杜安全 黄蜀葵花黄酮成分的研究[期刊论文]-中国天然药物 2004 (02)
3. Ferrandiz M L;Alcaraz M J Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids[外文期刊] 1991(3-4)
4. Zhu J T T;Choi R C Y;Chu G K Y Flavonoids possess neuroprotective effects on cultured pheochromocytoma PC12 cells:A comparison of different flavonoids in activating estrogenic effect and in preventing β -amyloid-induced cell death[外文期刊] 2007 (06)

本文读者也读过(10条)

1. 梁艳艳.许向阳.李小敏.郭仁平. LIANG Yan-yan. XU Xiang-yang. LI Xiao-min. GUO Ren-ping RP-HPLC法测定盐酸萘甲唑啉鼻用剂型凝胶中盐酸萘甲唑啉的含量[期刊论文]-安徽医药2007, 11(1)
2. 李庆龙.王品.张宗保.石俊英. LI Qing-long. WANG Pin. ZHANG Zong-bao. SHI Jun-ying 尘肺舒胶囊的药效学试验研究[期刊论文]-齐鲁药事2006, 25(11)
3. 周鸣.谢湘林.袁玲.张永和.邓毅峰. Zhou Ming. Xie Xiang-lin. Yuan Ling. Zhang Yong-he. Deng Yi-feng 平咳喘颗粒主要药效学研究[期刊论文]-长春中医药大学学报2007, 23(1)
4. 刘克玄.吴伟康.罗汉川.赵明奇.赵丹洋 四逆汤对大鼠肠缺血再灌注后小肠上皮细胞超微结构的影响[期刊论文]-中国病理生理杂志2004, 20(4)
5. 刘晓东.闫明.张兰兰.霍仕霞. LIU Xiao-dong. YAN Ming. ZHANG Lan-lan. HUO Shi-xia 驱虫斑鸠菊血清药物化学的初步研究[期刊论文]-医药导报2009, 28(6)
6. 陈杰.李展.黄清泉.CHEN Jie. LI Zhan. HUANG Qing-quan 复胃散胶囊中药材的鉴别及欧前胡素的测定[期刊论文]-华西药学杂志2007, 22(4)
7. 黄劲梅.郑清瑗.张雪 健胃理肠片中芍药苷的含量测定[期刊论文]-中成药2007, 29(11)
8. 储林华.查五生.刘锦云.王向中.周晓庆.刘桂明. Chu Linhua. Zha Wusheng. Liu Jinyun. Wang Xiangzhong. Zhou Xiaqing. Liu Guiming 基于均匀设计和主成分分析的粘结NdFeB永磁体制备工艺优化研究[期刊论文]-稀有金属2009, 33(2)
9. 曹勇.张丹.郑广娟.张静 血清药理法研究补肾化瘀解毒方对肺癌耐药细胞内药物浓度的作用[期刊论文]-中药材2003, 26(4)
10. WANG Zhi-xing. 丁怡. DU Li-jun. 王伟. WANG Zhi-xing. DING Yi. DU Li-jun. WANG Wei 苏木药材质量标准研究[期刊论文]-中南药学2008, 6(4)

引证文献(1条)

1. 石芸.池玉梅.谈献和.朱华云.李建萍 黄蜀葵花HPLC指纹图谱及金丝桃苷、槲皮素含量测定研究[期刊论文]-西北药学杂志 2011(6)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200807015.aspx