

3 讨论

有关文献研究^[6,7]和笔者前期研究表明,黄芩苷属复原型前体药物,即黄芩苷在胃肠道菌群作用下转化为黄芩素被吸收,然后在肠黏膜细胞内复原为黄芩苷。因此,本实验根据黄芩苷的结构特点,采取与传统酯类前药相反的思路,将苷类药物水解成苷元黄芩素,并比较了黄芩苷和黄芩素在大鼠体内的口服生物利用度。结果表明,黄芩苷水解成其苷元黄芩素后可以改善苷类化合物的理化性质和渗透性,提高了黄芩苷的口服吸收和生物利用度,为以中药苷类活性成分为先导化合物进行结构改造以提高其口服吸收提供了新的思路。

黄芩中的主要成分是黄芩苷,高达 9%~14%^[8],只含有微量的黄芩素,约为 0.2%左右^[9],因此,从黄芩中提取分离黄芩素是不足取的。人们致力于研究将黄芩苷转变成黄芩素,目前主要有两种方法,即酶法水解^[10]和强酸水解^[3]。强酸水解对药物本身破坏较大,环境污染严重;酶法水解转化率高、无污染。基于此,采用生物技术将中药苷类药物

水解成其苷元具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Xing J, Chen X Y, Sun Y M, *et al.* Interaction of baicalin and baicalein with antibiotics in the gastrointestinal tract [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57: 743-750.
- [2] 毛凤斐,朱家壁,屠锡德,等.黄芩苷的人体吸收研究[J].南京药学院学报,1983,21(1):61-66.
- [3] 车庆明.一种制备黄芩素的方法[P].中国专利:CN1398862.2003-02-26.
- [4] 路通,宋珏,谢林,等.HPLC法同时测定灌胃黄芩水煎剂后大鼠血浆中黄芩苷和汉黄芩苷的质量浓度及药动学研究[J].中草药,2005,36(6):870-873.
- [5] 王弘,陈济民.黄芩苷在大鼠胃,离体小肠的吸收动力学研究[J].沈阳药科大学学报,2000,17(1):5-7.
- [6] Akao T, Kawabata K, Yanagisawa E, *et al.* Baicalin, the predominant flavone glucuronide of *Scutellariae Radix*, is absorbed from the rat gastrointestinal tract as the aglycone and restored to its original form [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52(12): 1563-1568.
- [7] Xing J, Chen X Y, Zhong D F. Absorption and enterohepatic circulation of baicalin in rats [J]. *Life Sci*, 2005, 78: 140-146.
- [8] 王本祥.现代中药药理学[M].天津:天津科技出版社,1997.
- [9] 王慕邹.常用中草药高效液相色谱分析[M].北京:科学出版社,1999.
- [10] 金凤鸾.酶法水解黄芩甙葡萄糖醛酸基制备黄芩素的方法[P].中国专利:CN 1584039A, 2005-02-23.

凝胶过滤色谱-蒸发光散射法监测麦冬多糖色谱分离的研究

林晓¹,姜艳¹,徐德生^{1,2*},冯怡¹

(1.上海中医药大学 中药现代制剂技术教育部工程研究中心,上海 201203;

2.上海中医药大学附属曙光医院,上海 200021)

摘要:目的 探讨高效凝胶过滤色谱-蒸发光散射检测法(HPGPC-ELSD)用于监测多糖分离纯化的可行性和优点。方法 以麦冬多糖为模型多糖,比较DEAE Sepharose™ Fast Flow、Sephadex G-50和G-25柱色谱的纯化效果,比较分别以HPGPC-ELSD和传统的蒽酮-硫酸法测定结果为收集标准时的纯化情况。结果 通过HPGPC-ELSD测定确知,DEAE Sepharose 可将麦冬多糖粗提物中的非中性糖部分除去;Sephadex G-50和G-25均不能够很有效地将粗多糖中的麦冬多糖与低聚糖和单糖分离。结合HPGPC-ELSD和蒽酮-硫酸法的优点,将其合理组合用于监测麦冬多糖的凝胶色谱分离,可以同时确保多糖色谱分离纯化的速度和质量。结论 以HPGPC-ELSD测定结果作为收集标准特别适合于较难分离或纯化要求较高的多糖类成分的分离纯化。

关键词:麦冬;多糖;高效凝胶过滤色谱;纯化

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)03-0394-04

多糖因其广泛的生物活性和低毒等特点,日益受到人们的青睐。迄今,已发现几百种来源于动物、植物细胞壁和真菌细胞的多糖。多糖最常见的生物活性是免疫调节作用,如抗癌、抗病毒、抗感染、抗氧

化、抗变异或造血等活性。而且,随着新的生物活性的发现,多糖的临床应用范围也在日益扩展。如麦冬多糖近来被证实具有抗心肌缺血活性^[1]。在进行多糖生物活性研究之前,需要将其从提取得到的总

* 收稿日期:2008-06-14

基金项目:国家中医药管理局中医药科学技术专项(06-07ZQ04);上海市青年科技启明星计划(07QA14050);上海市教委重点学科资助项目(J50302)

作者简介:林晓(1974—),男,福建人,博士,副教授,主要从事中西药药剂学研究。Tel:(021)51322211 E-mail:duotang@163.com

*通讯作者 徐德生 Tel:(021)51322493 E-mail:shutcm@163.com

糖中分离纯化出来,分离纯化的程度将直接关系到活性测定结果及其分析。目前,分子质量相对均一多糖分离纯化的一般程序为粗多糖经柱色谱分离,洗脱液分管收集,然后用糖的显色反应或旋光测定来确定洗脱峰,合并同一洗脱峰,冷冻干燥,即得^[2,3]。以糖的显色反应或旋光测定结果作为洗脱液收集标准的优点是快速、简便、对仪器要求低,缺点是缺乏区别不同种类和不同相对分子质量糖的专属性。

麦冬多糖为 α -D-果聚糖,其粗提物主要由非中性糖部分,中性、重均相对分子质量约 5 000 的多糖部分以及低聚糖和单糖(果糖和葡萄糖)部分组成。实验中发现选用糖纯化常用的 DEAE Sepharose, Sephadex G-50 和 G-25 制备色谱柱分离纯化麦冬多糖粗提物时,单一以显色反应测定结果作为洗脱液收集标准的纯化效果不理想,究其原因主要是由于待分离糖组分之间相对分子质量差异较小所致。故本实验设想采用高专属性的 HPGPC-ELSD 来分析判断洗脱峰流份的取舍,结果取得了令人满意的纯化效果。

1 仪器与试剂

HP 8453 可见紫外分光光度计(美国惠普公司);Agilent 1100 高效液相色谱仪,化学工作站(美国安杰伦公司);PL-ELS 1000 蒸发光散射检测器(英国 Polymer 公司);FD-5 真空冷冻干燥机(上海市离心机械研究所);BSZ-100 自动部分收集器,HL-2 恒流泵(上海精科实业有限公司);XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);Shodex Sugar KS-802 凝胶柱(日本昭和电工株式会社)。

浙麦冬(产地:浙江慈溪)经上海中医药大学生药教研室鉴定;DEAE Sepharose TM Fast Flow, Sephadex G-50, Sephadex G-25(瑞典 Pharmacia 公司);果糖(Sino-American Biotechnology Co.);蒽酮(上海化学试剂公司);其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 麦冬多糖粗提物的制备:取干燥麦冬块根,压扁,水煎 3 次(每次加 10 倍量水,每次煮沸 0.5 h),合并水提液并减压浓缩至含生药 1 g/mL。加乙醇至含醇量达 80%,静置过夜,倾去上清液,沉淀干燥后加 15 倍量水溶解,超滤膜(滤过相对分子质量为 1×10^4 ,压力为 0.3 MPa)超滤,取滤过部分,减压浓缩,冷冻干燥,即得(得率约为药材质量的 25%)。

2.2 麦冬多糖的 HPGPC-ELSD 测定:Shodex Sugar KS-802 色谱柱,流动相为双蒸水,体积流量

0.5 mL/min;柱温 25℃;检测器为蒸发光散射检测器(气体流速:1.5 SLM;蒸发温度:110℃;雾化温度:90℃);进样量 20 μ L。

2.3 凝胶柱洗脱液收集标准研究

2.3.1 依赖于蒽酮-硫酸法测定结果的收集标准:从每支收集管取 5 μ L 于带塞试管中,加水 0.5 mL,快速加入 2 g/L 蒽酮-硫酸试剂 2 mL,混匀,冰水快速冷却 30 min 后于波长 625 nm 处测定吸光度。吸光度大于 0.10 的为要收集部分(3.4 mg/L 麦冬多糖产生的吸光度约为 0.10)。

2.3.2 依赖于 HPGPC-ELSD 测定结果的收集标准:从每支收集管取 20 μ L 进样测定,呈单一对称色谱峰且保留时间在一定范围内的流份为要收集部分。

2.4 麦冬多糖分离纯化:取麦冬多糖粗提物,少量水溶解,分别或依次上 DEAE Sepharose 柱、Sephadex G-50 柱和 Sephadex G-25 柱,水洗脱,流量为 0.25 mL/min,每支试管收集洗脱液 5 mL,蒽酮-硫酸法在线检测,按 2.3.1 或 2.3.2 项下方法收集合并同一洗脱峰,减压浓缩后,取 5 μ L 采用 HPGPC-ELSD 测定。

结果麦冬多糖粗提物依次上 DEAE Sepharose、Sephadex G-50 和 G-25 柱,经蒽酮-硫酸显色测得的洗脱曲线均仅见一明显且对称的洗脱峰(图 1)。按 2.3.1 项下标准处理洗脱峰,虽然麦冬多糖的质量分数提高了,但不能保证将杂质除尽,而按 2.3.2 项下标准处理洗脱峰则获得了理想的纯化效果(图 2、3)。

对各凝胶柱纯化作用的研究结果表明,DEAE Sepharose 能吸附除去麦冬多糖粗提物中保留时间为 11.129 min 的、在 254 nm 有吸收的物质,而 Sephadex G-50 和 G-25 柱均无此作用。由于该物质既可能被 1 mol/L 高氯酸沉淀,也可与盐酸胍在碱性环境下反应而产生荧光,故推断其为糖肽^[4]。

Sephadex G-50 与 G-25 的作用相似,且均不能很有效地将粗提物中的麦冬多糖与低聚糖和单糖分离。对 Sephadex G-25 柱洗脱液隔管进行 HPGPC-ELSD 测定,发现麦冬多糖色谱峰前后的杂质在洗脱峰降支的后半段均会出现(图 3),即按 2.3.2 项下标准判断图 1-C 中第 24 管之后均为应舍去部分。由于糖纯化用的凝胶柱多为实验者自行制备,填料的质量、处理过程、再生条件、再生次数,装柱时填料的稠度、装柱的方式和速度,填料装好后的柱平衡条件等诸多因素均会影响所制得的凝胶柱的柱效。同

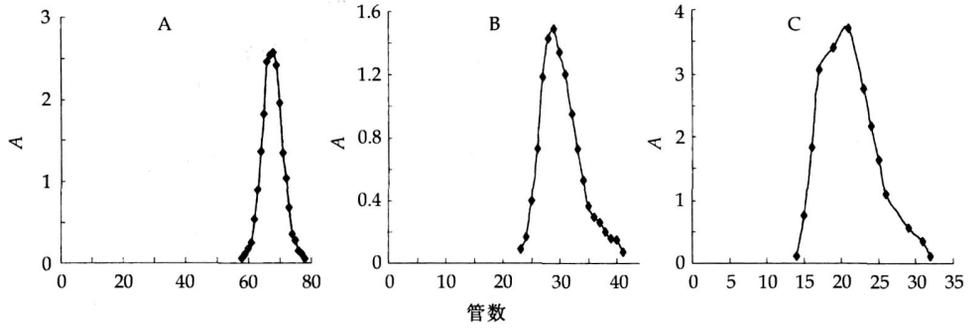
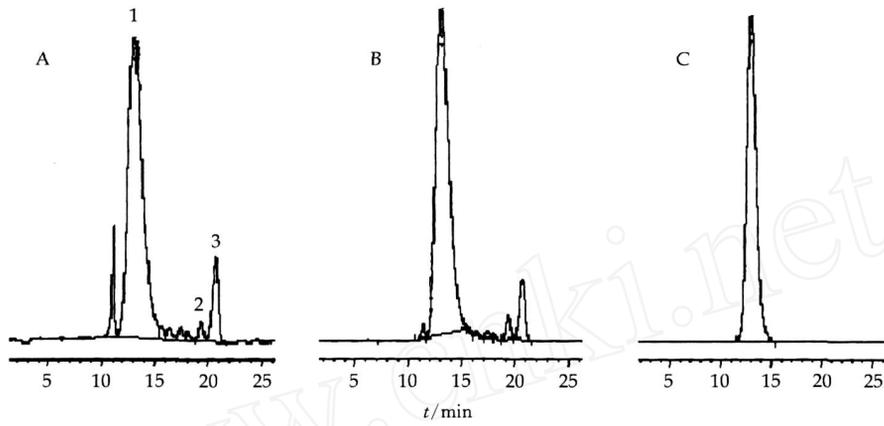
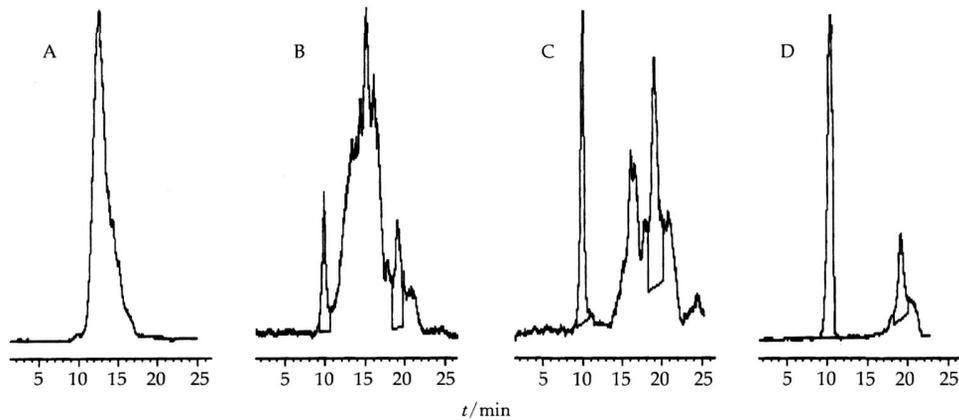


图 1 麦冬粗多糖依次经 DEAE Sepharose FF(A)、Sephadex G-50(B)和 Sephadex G-25(C)凝胶柱的洗脱曲线
 Fig. 1 Elution curves of crude *Ophiopogon japonicus* polysaccharides (OJP) in turn from DEAE Sepharose FF (A), Sephadex G-50 (B), and Sephadex G-25 (C) columns



A-粗多糖 B-以蒽酮-硫酸法测定结果为收集标准所得纯化多糖 C-以 HPGPC-ELSD 测定结果为收集标准所得纯化多糖
 1-麦冬多糖 2-葡萄糖 3-果糖
 A-crude OJP B-OJP purified by using anthrone-sulfuric acid assay to monitor purification process C-OJP purified by using HPGPC-ELSD to monitor purification process 1-OJP 2-glucose 3-fructose

图 2 麦冬多糖的 HPGPC-ELSD 色谱图
 Fig. 2 HPGPC-ELSD Chromatograms of OJP



A-第 25 管 B-第 26 管 C-第 27 管 D-第 30 管
 A-No. 25 tube B-No. 26 tube C- No. 27 tube D-No. 30 tube

图 3 麦冬粗多糖 Sephadex G-25 柱洗脱峰各收集管的 HPGPC-ELSD 色谱图

Fig. 3 HPGPC-ELSD Chromatograms of eluted parts of crude OJP from Sephadex G-25 column

时,待纯化样品的组成、质量浓度,上样时的上样量和上样操作等也会影响色谱分离效果。在如此多的因素作用下,样品各次色谱行为间必定会有或大

小的差异,故每次色谱洗脱流份的取舍只能根据该次 HPGPC-ELSD 测定结果来决定。

取长补短,方可尽善尽美。对于麦冬多糖的凝

胶色谱纯化,合理结合 HPGPC-ELSD 专著性强,显色反应或旋光测定快速、简便的优点,能做到兼顾分离纯化的速度和质量。故确定麦冬多糖分离纯化方法:取麦冬多糖粗提物,少量水溶解,上 DEAE Sepharose 柱,水洗脱,蒽酮-硫酸法在线检测,收集合并同一洗脱峰,减压浓缩后,上 Sephadex G25 柱,水洗脱,蒽酮-硫酸法检测确定峰位后,抽样 HPGPC-ELSD 法测定,取呈单一对称色谱峰且保留时间在一定范围内的流份为要收集部分,合并合格流份,冷冻干燥,即得。

2.5 验证试验:经验证该方法简便、可靠且得率较高,对于色谱柱(100 cm × 2.6 cm),上样 3.0 g 麦冬粗提物,最终纯化产物得率为粗提物质量的 $(37.1 \pm 3.6)\%$ ($n=3$)。

2.6 数均/重均相对分子质量麦冬多糖的量效关系:由于多糖的生物活性往往与它的分子大小密切相关,故研究确定多糖的相对分子质量与其生物活性的关系具有重要意义,但从事这方面研究的一个前提也是一个难题是首先需要分离纯化得到不同数均/重均相对分子质量的多糖样品。通过 HPGPC-ELSD 监控,选择性合并糖凝胶色谱洗脱峰的不同洗脱段是获得所需各种数均/重均相对分子质量多糖样品的一种简便方法。本实验即用这种方法获得了在 Shodex Sugar KS-802 高效凝胶色谱柱上达基线分离的各种数均/重均相对分子质量麦冬多糖纯品(图 4)。随后的药理实验发现重均相对分子质量为 4 800、聚分散度为 1.407 的麦冬多糖具有最强的抗心肌缺血活性,相对分子质量增加或下降,麦冬多糖的活性都有所下降,当相对分子质量小于 2.0×10^3 时则活性几乎完全消失,说明一定的空间

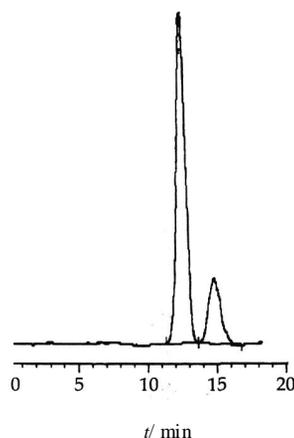


图 4 达基线分离的不同数均/重均相对分子质量麦冬多糖的 HPGPC-ELSD 色谱图

Fig. 4 HPGPC-ELSD Chromatograms of baseline-separated OJP with different number/weight average relative molecular weights

结构是麦冬多糖产生抗心肌缺血活性的必备条件。

3 讨论

综上所述,以 HPGPC-ELSD 测定结果作为糖色谱洗脱峰收集标准特别适合于较难分离或纯化要求较高的多糖类成分的分离纯化。

参考文献:

- [1] 郑琴,冯怡,徐德生,等.麦冬多糖 MDG-1 对鼠实验性心肌缺血的保护作用[J].中国中西医结合杂志,2007,27(12):1116-1120.
- [2] 董群,方积年.山豆根多糖的性质和化学组成[J].中国药理学杂志,2001,36(2):85-87.
- [3] Chen X M, Tian G Y. Structural features of fructans from the root of *Cyathula officinalis* Kuan. [J]. *Chin J Chem*, 2003, 21(7): 858-863.
- [4] Yamauchi S, Nakai C, Nimura N, et al. Development of a highly sensitive fluorescence reaction detection system for liquid chromatographic analysis of reducing carbohydrates [J]. *Analyst*, 1993, 118: 773-776.

水提工艺中黄芩内源酶降解黄芩苷的研究

李建华^{1,2}, 王力生², 邹节明^{1,2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004)

摘要:目的 研究黄芩药材中内源酶在不同温度下降解黄芩苷的活性,减少提取过程中黄芩苷的损失。方法 采用 HPLC 法检测在不同温度下浸泡处理不同时间后的提取液中黄芩苷的量。结果 黄芩药材中内源酶在不同温度下,降解黄芩苷的活性存在显著差异;其中在水温为 50 时,黄芩内源酶降解黄芩苷的活性最强,并且 0~45 min 内黄芩苷的量随时间的变化符合一级动力学过程。结论 在以水为溶媒提取黄芩药材中的黄芩苷时,宜在 80

* 收稿日期:2008-10-27

作者简介:李建华(1974—),男,湖南新宁人,工程师,在读博士生,主要从事中药现代工艺及新剂型研究。

Tel: (0773) 5823082 E-mail: lijianhua614@sohu.com

* 通讯作者 邹节明 Tel: (0773) 5842588 E-mail: zjm@sanjin.com.cn