

的差异,也产生了峰数量的差异,它们反映了大黄各种炮制品内在的质量差别。大黄经过炮制后,其醇提物中的游离蒽醌类成分发生了变化。本实验建立的 HPLC 指纹图谱方法可以为大黄不同炮制品的鉴定提供依据,可以作为大黄不同炮制品的内在质控方法和标准。该方法亦可进一步为大黄的成分和疗效间建立联系,为大黄的安全性评价与临床合理应用提供参考。

参考文献:

- [1] Mueller S O. Gentoxicity of the laxative drug components emodin, aloë-emodin and danthron in mammalian cells: eopoisomerase II mediated [J]. *Mutat Res*, 1996, 371:165.
- [2] 石 荣,王少云,姜维林,等. 大豆异黄酮 HPLC 指纹图谱研究[J]. *中草药*, 2006, 37(2):202-205.
- [3] 李秀才. 大黄的研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 1998, 33(10):581.
- [4] 叶定江,张世臣,潘三红. *中药炮制学*[M]. 北京:中国中医药出版社,1999.
- [5] 高学敏. *中药学*[M]. 北京:人民卫生出版社,2000.

半枝莲酸性多糖 SBPs 的纯化、性质及抗氧化活性研究

王志远,戴 玲*,朱业云,廖洪梅,张 凯

(安徽大学生命科学学院,安徽省中药研究与开发重点实验室,安徽 合肥 230039)

摘 要:目的 研究半枝莲酸性多糖 SBPs 的纯化、性质及抗氧化活性。方法 半枝莲烘干粉碎,经热水浸提,醇析,去蛋白,去单寡糖后依次经 DEAE-Cellulose-52 和 Superdex 200 纯化,所得多糖 SBPs 经快速色谱纯化系统(FPLC)和聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度,并利用 FPLC 测定相对分子质量,苯酚-硫酸法测定总糖的量,间羟联苯法测定酸性糖的量,GC-MS、红外光谱等方法对其组成和性质进行研究。同时采用邻苯三酚法及 Fenton 体系测定 SBPs 对 O_2 和 $\cdot OH$ 的清除作用。结果 SBPs 为均一组分,总糖、酸性糖的量分别为 96.02%和 19.90%,平均相对分子质量约为 1.11×10^4 ,GC-MS 分析其单糖组成为:鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖,物质的量的比依次为 1.00 0.13 0.80 0.10 0.34 0.56 3.04。SBPs 清除 O_2 和 $\cdot OH$ 作用明显,IC₅₀ 分别为 800.00、90.42 $\mu g/mL$ 。结论 SBPs 为酸性杂多糖,表现出较好的体外抗氧化活性,提示其可能具有抗衰老作用。

关键词:半枝莲;酸性多糖;纯化;理化性质;抗氧化活性;自由基

中图分类号:R284.2;R286.02;R286.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)05-0728-04

半枝莲来源于唇形科黄芩属植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 的干燥全草,具有解热、抗癌、免疫调节等药理作用,其主要化学成分为黄酮类、二萜类、多糖类等^[1]。早期研究表明从半枝莲中提取的多糖组分在体外可促进 Con A 诱导的小鼠脾细胞淋巴细胞转化^[2],另有报道从半枝莲中提取的多糖组分 SPS₄ 对 S₁₈₀ 肉瘤细胞及腹水肝癌细胞均有一定的抑制作用^[3]。本实验从半枝莲中分离纯化得到一酸性多糖 SBPs,并对其性质和抗氧化作用进行了研究,以期半枝莲资源的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料:快速色谱纯化系统(FPLC)为 AKTA Purifier 10(瑞典 Pharmacia Biotech);气质联用仪为 Shimadzu GC/MS2010, DB-5 MS 毛细管柱;红

外光谱仪为 Nexus-870(美国 Nicolet);紫外/可见分光光度计为 Ultrospec 3100 pro(瑞典 Pharmacia Biotech);电泳仪/槽为 Power/PAC3000 和 Mini PROTEAN3 Cell(美国 Bio-Rad);凝胶成像系统 Image MasterVDS(瑞典 Pharmacia Biotech)。冻干燥机为 ALPHA 1-2(德国 Christ)。半枝莲购自安徽合肥市皖健药房,由安徽大学生命科学学院何家庆教授鉴定为半枝莲 *S. barbara* D. Don; Superdex 200 10/300 GL 预装柱,Pharmacia 公司产品;标准葡聚糖(Dextran) T500、T70、T40、T10 及蓝葡聚糖 2000 均为 Sigma 公司产品;DEAE-Cellulose-52 为 Whatman 公司产品,其他试剂和标准单糖均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 半枝莲多糖的提取:称取 40 烘干粉碎的

* 收稿日期:2008-09-19

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(03043301)

作者简介:王志远(1981—),男,安徽人,硕士研究生,从事生化与分子生物学研究。E-mail: wangzhiyuan_810913 @126.com

*通讯作者 戴 玲 Tel:(0551)5107341 E-mail: dialing2 @ah163.com

半枝莲干粉 100 g, 用 2 000 mL 热水(70 ℃)分别浸提 3 次, 合并提取液浓缩至 2 000 mL, 加 3 倍体积的 95 %乙醇沉淀, 静置 24 h, 离心。沉淀用无水乙醇和丙酮各洗 2 次, 用 Sevage 法去除蛋白、透析、干燥得粗多糖。

1.2.2 半枝莲多糖的分离纯化: 将粗多糖溶于少量蒸馏水, 离心, 上清液用 DEAE-Cellulose-52 色谱柱(2.6 cm ×50 cm)分离, 先用蒸馏水洗脱, 再用 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱, 分管收集(4.2 mL/管)得水 wash 和盐洗两种多糖组分。采用快速色谱纯化系统进一步纯化盐洗组分, 色谱柱: Superdex 200 10/300 GL, 进样量: 1 mL (样品质量浓度为 15 mg/mL), 洗脱液: 含有 0.5 mol/L NaCl 的 pH 7.2 (0.02 mol/L) 磷酸缓冲液(PBS), 体积流量: 1.5 mL/min, 检测波长: 205、260、280 nm; 分管收集(0.2 mL/管)洗脱液, 并结合苯酚-硫酸法检测其吸收峰位, 收集管中的含糖部分, 透析、浓缩、冷冻干燥得纯化多糖 SBPs。

1.2.3 SBPs 均一性鉴定: 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定质量分数, 分离胶浓度为 6 %, 电极液为 pH 8.9 的硼砂-硼酸缓冲液, 先 10 mA 恒流, 待溴酚蓝指示剂进入分离胶后改为 150 V 恒压电泳, 甲苯胺蓝染色。FPLC 法测定质量分数, 取 15 mg/mL 纯化多糖水溶液, 过 Superdex 200 色谱柱, 进样量为 0.1 mL, 水洗脱(体积流量 1.0 mL/min), 检测波长为 205、280 nm, 苯酚-硫酸法检测糖峰位。

1.2.4 SBPs 相对分子质量测定: 取 T 系列 Dextran 标准葡聚糖及蓝葡聚糖 2000 各 10 mg, 溶于 1 mL、0.5 mol/L NaCl 的 pH 7.2 (0.02 mol/L) PBS 中, 进样 0.1 mL, 采用 Superdex 200 色谱柱, 体积流量为 1.0 mL/min, 每管收集 0.2 mL, 苯酚-硫酸法显色, 490 nm 处测其吸光度, 测得洗脱体积(V_e)和外水体积(V_0)。以相应的 V_e/V_0 为横坐标, 各相对分子质量(M_r)的对数值为纵坐标绘制标准曲线。SBPs 溶解后, 同法过柱, 从标准曲线中查算相对分子质量。

1.2.5 总糖及酸性糖的测定: 总糖测定采用苯酚-硫酸法, 以 Dextran T40 作为标准。酸性糖测定采用间羟联苯法, 以葡萄糖醛酸作为标准。

1.2.6 紫外光谱和红外光谱检测: 取精品多糖 SBPs 1.5 mg, 以适量蒸馏水溶解, 用波长 200 ~ 400 nm 进行紫外扫描, 以蒸馏水为对照。红外光谱检测采用样品与 KBr 混合压片法, 4000 ~ 400 cm^{-1} 红外光谱仪扫描。

1.2.7 糖组分分析: 取 3 ~ 5 mg 样品, 放入 10 mL 试管中, 加入 2 mol/L 三氟醋酸(TFA) 2 mL, 充 N_2 后封管, 110 ℃下水解 3 h。水解液减压蒸干(<40 ℃), 除尽 TFA。完全酸水解产物 NaBH_4 还原, 加入数滴醋酸分解过剩的 NaBH_4 , 减压浓缩还原液至小体积, 加入 0.3 mL 甲基咪唑和 2 mL 醋酐, 进行乙酰化。反应 30 min 后, 加入 5 mL 水终止反应。加入 2 mL CHCl_3 萃取, 萃取液减压浓缩进行 GC-MS 分析。GC-MS 测定条件: 载气及流量: He, 1 mL/min; 进样口温度: 280 ℃, 气化室温度: 280 ℃, 离子源温度: 200 ℃。柱温采用程序升温: 50 ℃→(30 ℃/min)→170 ℃→(3 ℃/min)→220 ℃→(10 ℃/min)→280 ℃(保持 5 min)。进样体积: 0.1 μL , 分流比为 100:1。

1.2.8 SBPs 对 O_2 自由基的清除试验^[4]: 取 4.5 mL 50 mmol/L pH 8.2 Tris-HCl 溶液于试管中, 加入不同浓度的多糖试样液 0.1 mL, 置于 25 ℃水浴中预热 20 min; 加入经 25 ℃水浴锅中预热的 2.5 mmol/L 邻苯三酚溶液 20 μL , 以蒸馏水为空白, 混匀, 准确反应 4 min, 立即用 10 mol/L HCl 1 滴终止反应, 在 320 nm 测其吸光度(A_i), 并计算清除率(I) [$I = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100\%$, A_0 为空白吸光度]

1.2.9 SBPs 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除试验: 按照 Smirnoff (1989) 的方法^[5] (有改动)。反应体系中含 0.03 %的 H_2O_2 0.5 mL、8 mmol/L Fe^{2+} 的 EDTA 溶液 0.5 mL、10 mmol/L 水杨酸 0.5 mL、不同浓度的多糖试样液 0.1 mL, 最后加 H_2O_2 启动反应, 25

恒温水浴中反应 90 min 后向各管中加入 10 mol/L HCl 1.2 mL 结束反应, 再加入 0.5 g NaCl, 补水至 6 mL 刻度处, 混匀后加入冷乙醚 4 mL, 充分混匀, 静置分层后移取乙醚层 3 mL 于 10 mL 刻度离心管中 40 ℃恒温水浴蒸干乙醚。依次滴加 10 %三氯乙酸 0.15 mL, 10 %钨酸钠 0.25 mL, 0.5 %亚硝酸钠(新鲜配制) 0.25 mL, 放置 5 min 后再加入 1 mol/L KOH 0.25 mL, 最后滴加去离子水至 4 mL 处, 混匀, 空白用 0.1 mL 蒸馏水代替样液于 510 nm 处测定吸光度(A_i), 并计算清除率(I) [$I = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100\%$, A_0 为空白吸光度]。

2 结果

2.1 半枝莲多糖 SBPs 的分离纯化: 半枝莲粗多糖经 DEAE-Cellulose-52 柱色谱和 Superdex 200 进一步纯化, 结果见图 1, 可见 SBPs 为单一峰, 峰形基本对称。不同浓度样品缓冲液处理的 SBPs 在聚丙烯酰胺凝胶电泳呈单一谱带, 见图 2, 证明 SBPs 为较

纯且均一的组分。

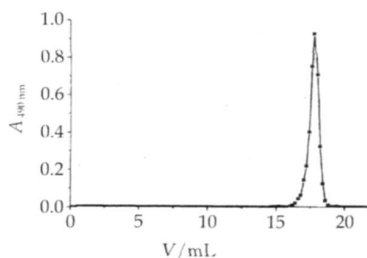


图 1 SBPs 过 Superdex 200 柱色谱的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of SBPs on Superdex 200 column

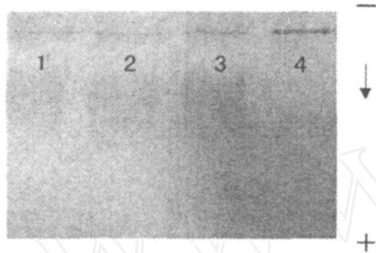


图 2 SBPs 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2 PAGE of polysaccharide SBPs

2.2 SBPs 的糖质量分数、组成和相对分子质量: 苯酚-硫酸法测得 SBPs 的总糖质量分数为 96.02%, 间羟联苯法测得其酸性糖的质量分数为 19.90%。SBPs 的水解产物经 GC-MS 分析, 主要由鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其物质的量比分别为 1.00 0.13 0.80 0.10 0.34 0.56 3.04。以 Dextran 系列相对分子质量对数 ($\lg Mr$) 对其在 Superdex 200 柱上的洗脱体积与外水体积之比 (V_e/V_0) 作图, 得到标准曲线, 标准方程为 $\lg Mr = -1.4723 V_e/V_0 + 7.2778$, $r = 0.9918$ 。从而计算得到 SBPs 的相对分子质量为 1.11×10^4 。

2.3 紫外光谱和红外光谱: 精多糖 SBPs 在 200 ~ 400 nm 紫外扫描图谱均显示为末端吸收, 280、260 nm 处无紫外吸收, 表明多糖中无蛋白、多肽及核酸。SBPs 的红外光谱具有多糖的特征吸收峰, 见图 3。3423 cm^{-1} 处有强的 -OH 伸缩振动, 2927 cm^{-1} 处有强的 -CH₃ 伸缩振动, 1620 cm^{-1} 处有 C=O 非对称伸缩振动峰, 1072 cm^{-1} 处有 O-H 变角振动峰, 760 ~ 740 cm^{-1} 和 1150 ~ 1060 cm^{-1} 有吸收峰, 为吡喃糖特征, 在 877 cm^{-1} 处有吸收峰, 证明存在吡喃糖苷键。

2.4 SBPs 对 O_2^- 自由基的清除作用: 分别测定了不同质量浓度的 SBPs、Vc 对 O_2^- 自由基的清除作用, 结果见图 4。以对 O_2^- 自由基有较强清除作用的 Vc 作阳性对照, 从图 4 中可以看出, 对 O_2^- 产生

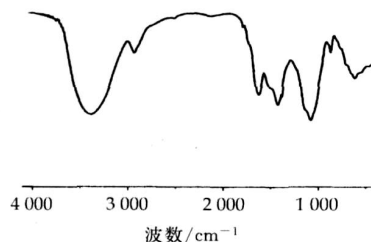


图 3 SBPs 的红外光谱

Fig. 3 IR Spectra of SBPs

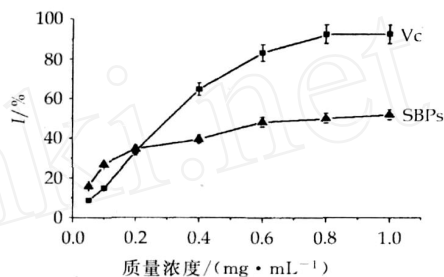


图 4 SBPs 对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig. 4 Scavenging effect of SBPs on O_2^-

50%清除效应所需的 Vc 的质量浓度即 IC_{50} 为 306.18 $\mu\text{g/mL}$, 而 SBPs 的 IC_{50} 为 800.00 $\mu\text{g/mL}$, 这说明该多糖在体外可以清除 O_2^- 自由基, 具有清除超氧阴离子自由基的抗氧化活性。

2.5 SBPs 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用: 测定不同质量浓度的 SBPs 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率, 并与同质量浓度的 Vc 进行比较, 结果见图 5。由图 5 可知, SBPs 和 Vc 在该体系中均有很强的清除能力, Vc 和 SBPs 的 IC_{50} 分别为 162.10 $\mu\text{g/mL}$ 和 90.42 $\mu\text{g/mL}$ 。在低质量浓度范围内 ($< 0.35 \text{ mg/mL}$), SBPs 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力优于 Vc, 随质量浓度增高, 清除能力有所下降, 但仍保持在 50%左右的清除率。

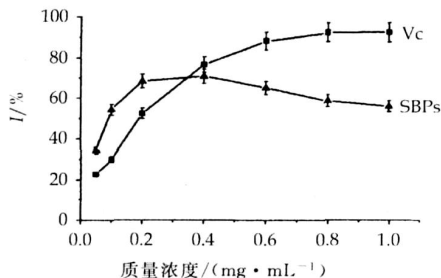


图 5 SBPs 对羟自由基的清除作用

Fig. 5 Scavenging effect of SBPs on $\cdot\text{OH}$

3 讨论

用 0.5 mol/L NaCl 从 DEAE-Cellulose-52 柱上洗脱的半枝莲酸性多糖 SBPs 用间羟联苯法测定其酸性糖质量分数为 19.90%, 区别于孟延发等^[3]报道的半枝莲多糖 SPS₄ 和许益民等^[6]报道的半枝

莲多糖 SBP, 后两者均为中性杂多糖, 三者在单糖组成中基本相同, 但单糖的物质的量比以及相对分子质量大小均存在一定的差异。据此推测 SBPs 为半枝莲中又多糖组分。

已发现大量不同来源的多糖在各种体内、体外实验体系中均表现出良好的抗氧化作用^[7], 还可对已有多糖化合物的结构修饰提高其抗氧化活性^[8,9], 因此多糖是极具开发潜力的一类天然抗氧化剂。在研究抗氧化多糖的过程中, 不少研究提示, 多糖的抗氧化性可能是多糖抗衰老、降血糖、抗肿瘤、抗辐射、增强免疫等功效的药理基础之一。多糖的抗氧化作用与其组成和化学结构有关, 也与药物的质量分数、剂量有关, 虽然目前对多糖的抗氧化机制已有一些解释, 但仍不是很清楚。本实验提取得到的 SBPs 为一水溶性酸性杂多糖, 具较好抗氧化活性, 含糖量达 96%, 不含蛋白, Superdex 200 凝胶过滤柱色谱和聚丙烯酰胺凝胶电泳均表明 SBPs 组成均一旦质量分数较高。这为进一步抗氧化机制和

构效关系的研究打下了基础。

参考文献:

- [1] 蒋小岗, 顾振纶. 半枝莲的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(1): 3-5.
- [2] 陆平成, 许益民. 半枝莲多糖对细胞免疫的调节[J]. 南京中医学院学报, 1989(2): 32-33.
- [3] 孟延发, 李志考, 张立. 半枝莲多糖 SPS₄ 组分的纯化性质与分析[J]. 生物化学杂志, 1993, 9(2): 224-228.
- [4] 静天玉, 赵晓瑜. 用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测定法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(1): 84-86.
- [5] Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [6] 许益民, 郭立伟, 陈建伟. 半枝莲多糖的分离、纯化及其理化性质[J]. 天然产物研究与开发, 1992, 4(1): 1-5.
- [7] 冉靓, 杨小生, 王伯初, 等. 抗氧化多糖的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 491-496.
- [8] Qi H M, Zhang Q B, Zhao T T, et al. *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 2441-2445.
- [9] Yang X B, Gao X D, Han F, et al. Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties *in vitro* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1725: 120-127.

HPLC 法测定丹皮酚制剂在犬体内血药浓度及生物利用度

智红英¹, 孙丽芳¹, 宋吉伦¹, 李桂生^{1,2*}, 刘珂^{1,2}

(1. 山东绿叶天然药物研究开发有限公司, 山东 烟台 264003; 2. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264003)

摘要:目的 研究丹皮酚 3 种制剂在犬体内的药动学及生物利用度。方法 6 条犬采用三制剂三周期随机交叉试验设计, 分别单剂量口服对照制剂丹皮酚片(R) 40 mg; 被试制剂丹皮酚软胶囊(T₁); 被试制剂丹皮酚滴丸(T₂); HPLC 测定血药浓度。结果 T₁、T₂ 与 R 的主要药动学参数: t_{max} 分别为(1.42 ± 0.38)、(0.96 ± 0.10)、(1.08 ± 0.20) h; C_{max} 分别为(2.23 ± 0.50)、(2.56 ± 0.58)、(1.94 ± 0.40) μg/mL; t_{1/2(ke)} 分别为(3.09 ± 0.40)、(2.88 ± 0.51)、(2.62 ± 0.52) h; AUC₀₋₁₂ 分别为(11.62 ± 1.07)、(12.57 ± 1.80)、(10.32 ± 1.63) h·μg/mL; AUC_{0-∞} 分别为(14.56 ± 1.41)、(15.41 ± 1.70)、(12.70 ± 2.12) h·μg/mL。相对生物利用度为: T₁ (114.1 ± 14.3)% 和 (116.3 ± 15.1)%, T₂ (122.6 ± 12.4)% 和 (122.8 ± 13.9)%。结论 药动学参数经多因素方差分析显示 AUC₀₋₁₂、AUC_{0-∞}、C_{max} 和 t_{max} 在药物间有显著的统计学差异(P < 0.05), 双单侧 t 检验表明, 两种被试制剂与参比制剂不等效。

关键词: 丹皮酚; 生物利用度; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)05-0731-04

丹皮酚是牡丹根皮和徐长卿全草的有效成分, 具有镇静、催眠、镇痛、解热、抗炎、抗过敏、抗菌、降压、止血、抑制血小板聚集等多种药理作用^[1,2]。其在大鼠、小鼠、家兔、人体内的药动学研究文献已有报道^[3-6]。为了探讨药物剂型对丹皮酚体内代谢过

程的影响, 本实验采用反相高效液相色谱法测定了丹皮酚片、丹皮酚软胶囊以及滴丸在犬体内的药-时曲线, 据此了解三者在大体内的药动学特征和差异, 测算丹皮酚软胶囊和滴丸的相对生物利用度。

1 仪器与材料

* 收稿日期: 2008-11-22

作者简介: 智红英(1973—), 女, 山东郓城人, 主管药师, 硕士, 从事药代和毒代方面工作。

Tel: (0535) 2128672 E-mail: zhihongying@126.com

* 通讯作者 李桂生 Tel: (0535) 2108899 E-mail: guisheng@uye-pharm.com