

解于 *N,N*-二甲氧基甲酰胺中,再加入琥珀酸酐及二甲氨基吡啶反应,经过一系列处理、纯化等过程,才能得到 7-琥珀酰基紫杉醇,操作相当繁琐而费时。在本实验中,选用了 7-木糖基紫杉醇,这是一种天然存在的紫杉醇衍生物,市场有商品供应,可直接利用高碘酸氧化法,将其与载体蛋白联接。此方法较前述文献方法省略了衍生物合成步骤,更加简便易行,且具有较高的合成效率(在每个 BSA 分子上可成功联接约 4~5 个 7-木糖基 TAX 分子)。

制备单克隆抗体使用的实验动物可为家兔或小鼠。日本九州大学正山和田中实验室获得了近 40 种针对生药中生理活性成分的单克隆抗体,建立了酶联免疫吸附反应检测法,几乎全部是使用 BALB/c 小鼠作为免疫对象^[7,10]。本实验使用两只小鼠,均产生了明显的免疫反应;但由于动物个体差异,抗血清效价也有所不同。测得效价较高的小鼠抗血清效价为 1:3 200,竞争 ELISA 结果显示抗血清能够特异性识别游离 TAX,证明了合成的人工抗原 TAX-BSA 有较好的免疫原性,可为 TAX 的单克隆抗体的制备及后续应用提供技术基础(抗体的交叉反应性一般于单克隆抗体制备过程中检测)。

本实验使用 MALDI-TOF-MS 法测定了 TAX-BSA 中结合的半抗原 TAX 分子数目。与传统的鉴定方法(紫外光谱扫描法、标记抗原示踪法和凝胶电泳等)相比,该技术具有高灵敏度,供试品用量少,结

果直观、准确^[11],是比较理想的抗原复合物中半抗原数目的测定方法。

参考文献:

- [1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [2] Schiff P B, Fant J, Horwitz S B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol [J]. *Nature*, 1979, 277(5698): 665-667.
- [3] Nightingale S L. From the food and drug administration [J]. *JAMA*, 1992, 268(11): 1390.
- [4] Anonymous. FDA approves treatment IND protocol for taxol [J]. *Clin Pharm*, 1992, 11(11): 912.
- [5] 刘 涤,章国瑛,王 晓,等. 红豆杉资源与紫杉醇生产概况 [J]. 植物资源与环境, 1997, 6(1): 48-53.
- [6] 马丽玲,晁 志,田中宏幸. 单链抗体技术及其在药用植物研究中的应用 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 附 4-附 6.
- [7] Zhu S, Shimokawa S, Shoyama Y, et al. A novel analytical ELISA-based methodology for pharmacologically active saikosaponins [J]. *Fitoterapia*, 2006, 77(2): 100-108.
- [8] 蔡碧双,邵幼岩,林纪昀,等. 甘草酸人工抗原的合成鉴定及免疫原性分析 [J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(1): 19-22.
- [9] Paul G, Raybould T J G, Gary S B, et al. An enzyme immunoassay for the determination of taxol and taxanes in *Taxus* sp. tissues and human plasma [J]. *J Immunol Meth*, 1993, 158(1): 5-15.
- [10] Tian M, Tanaka H, Shang M Y, et al. Production, characterization of a monoclonal antibody against aristolochic acid and development of its assay system [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36(2): 425-436.
- [11] 刘益华,徐俊福. 基质辅助激光解吸飞行时间质谱在生物大分子中的应用 [J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(3): 192-193.

三种海龙中甾醇类成分的 GC-MS 分析

陶 莉¹,王有为^{2*}

(1. 浙江海洋学院食品与药学院、医学院,浙江 舟山 316004; 2. 武汉大学药学院,湖北 武汉 430072)

海龙为我国常用名贵中药材,其性温,味甘,归肝肾经,具温肾壮阳、散结消肿之功效。用于阳痿遗精,瘰癧痰核,跌扑损伤等症^[1]。《本草纲目拾遗》记载,海龙功同海马而力倍之^[2]。《中国药典》历版均收载海龙,并确定来源为海龙科动物刁海龙 *Solenognathus hardwickii* (Gray)、拟海龙 *Syngnathoides biaculeatus* (Bloch) 和尖海龙 *Syngnathus acus* Linnaeus 的干燥体。现代研究表明,海龙含有大量甾醇类^[3]、脂肪酸^[4]、蛋白质^[5]等成

分,具有抗肿瘤^[6]、激素样^[7]等药理作用。本实验通过对 3 种海龙中甾醇类成分的 GC-MS 测定,比较分析了 3 种海龙的甾醇类成分。

1 仪器和材料

1.1 实验材料:3 种海龙均购自河北安国药材市场,经浙江海洋学院赵盛龙教授分别鉴定为刁海龙 *Solenognathus hardwickii* (Gray)、拟海龙 *Syngnathoides biaculeatus* (Bloch)、尖海龙 *Syngnathus acus* Linnaeus。药材晾晒干燥后粉碎,过

* 收稿日期:2008-12-02

基金项目:浙江省卫生厅中医药青年基金项目研究计划(2005 Y011)

作者简介:陶 莉(1980—),女,湖北襄樊人,讲师,研究方向为天然药物化学。

30 目筛,备用。

1.2 试剂和仪器:石油醚、乙醚、甲醇、氢氧化钾、无水硫酸钠、氯化钠均为分析纯;Waters GCT Premier(美国沃特斯公司)。

2 方法

2.1 样品处理方法^[8]:取 3 种海龙粗粉各 5 g,置索氏提取器中,加石油醚冷浸过夜,回流提取 6 h,回收溶剂得石油醚提取物。提取物中加 10% KOH 甲醇溶液,剧烈振摇 2 min,置 60℃ 水浴中皂化,每隔 15 min 振摇一次,待溶液澄清后再反应 1 h。皂化物加水稀释,乙醚萃取 3 次,饱和 NaCl 溶液洗涤。合并乙醚萃取液,无水 Na₂SO₄ 脱水干燥,回收溶剂,即得非皂化物。非皂化物用乙醚溶解,定容至 25 mL,待测。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件:毛细管色谱柱 DB-5MS(30 m × 250 μm,0.25 μm);载气:氦气,恒流,流量:1 mL/min;进样口温度:290℃;检测器温度:280℃;分流比:1/150;柱温 280℃;进样量:1 μL。

2.2.2 质谱条件:EI 源,电子能量 70 eV,源温 230℃;谱库:NIST2005 标准质谱图库。

3 结果

经 GC-MS 分析后,3 种海龙中检测的甾体化合物及其相对质量分数见表 1。

表 1 3 种海龙中甾醇类成分分析

Table 1 Analysis of sterols in extracts from three kinds of sea dragons

样品	化合物	分子式	相对保留 时间/min	质量分数 / %
拟海龙	胆甾醇	C ₂₇ H ₄₆ O	10.01	98.25
	胆甾-4-烯-3-酮	C ₂₇ H ₄₄ O	12.68	1.75
刁海龙	胆甾醇	C ₂₇ H ₄₆ O	10.01	98.73
	胆甾-4-烯-3-酮	C ₂₇ H ₄₄ O	12.71	1.27
尖海龙	胆甾烷醇	C ₂₇ H ₄₈ O	9.44	2.44
	表胆甾醇	C ₂₇ H ₄₆ O	9.66	1.73
	胆甾醇	C ₂₇ H ₄₆ O	10.01	90.42
	胆甾-4-烯-3-酮	C ₂₇ H ₄₄ O	12.71	5.41

可以看出,拟海龙、刁海龙和尖海龙中均含有胆甾醇和胆甾-4-烯-3-酮,拟海龙和刁海龙成分和量极为相似。胆甾醇在 3 种海龙中量都很高,质量分数均超过 90%,胆甾-4-烯-3-酮作为胆固醇的主要氧化产物,量较少。尖海龙中除含有上述两种甾醇成分外,还含有其还原产物胆甾烷醇和异构体表胆甾醇,但量也很少。

4 讨论

在人体或哺乳动物体内,胆固醇是雄性激素、雌性激素、黄体激素、副肾皮质激素等类固醇激素的转化前体。同时在鱼体内,也证明了胆固醇会合成类固醇激素,并大量分布于多数器官尤其是生殖器官中。又由于海龙明显的激素样作用,据此可以推测,在所检 3 种海龙中也可能含有此类激素成分,进而能对人体产生激素样作用。但由于量过低,导致未被检测到。事实上,张朝晖等^[3]的研究也证明了这一点。

此外,在对 3 种海龙的 GC-MS 分析中,还发现 3 种海龙中存在微量的粪甾烷(coprostone)、粪甾醇(coprostanol)、粪甾烷酮(coprostanone)等成分,根据胆甾醇在鱼体内的代谢特点,认为这些成分为海龙肠内细菌还原胆甾醇的产物。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京:人民出版社,1957.
- [3] 张朝晖,徐国钧,徐洛嫻,等. 尖海龙中甾体类化合物的 GC/MS 分析[J]. 海军医学高等专科学校,1997,19(2):65-67.
- [4] 岳雪莲,杨天文,危北海. 海龙、海马脂肪酸的分析[J]. 中国中药杂志,1996,21(2):105-106.
- [5] 李晓波,张朝晖,秦孙星,等. 粗吻海龙抗肿瘤活性蛋白的制备方法[P]. 中国专利:CN1793168,2007-11-07.
- [6] 李春香,边洪荣,邹国林,等. 尖海龙提取物抗癌作用的研究[J]. 武汉大学学报:理学版,2001,47(6):761-765.
- [7] 黄建设,张 德. 粗吻海龙脂溶性部位的化学成分和药理活性分析[J]. 中草药,2004,35(增刊):39-40.
- [8] 文 震,党 志,朱志鑫. GC-MS 测定海龙与海星中甾醇类化合物的研究[J]. 海洋通报,2003,12:92-95.

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅