

獐牙菜新素的制备及保肝作用研究

唐 斌^{1,2}, 申秀萍², 张铁军^{2*}, 田成旺², 刘昌孝²

(1. 天津医科大学药学院, 天津 300070; 2. 天津药物研究院 药效及药代动力学省部

共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘要:目的 优化獐牙菜新素 [(5Z)-5-乙叉基-8-羟基-3,4,5,6,7,8-六氢-1H-吡喃[3,4-c]嘧啶-1-酮, EHPO] 的制备工艺, 考察其保肝作用。方法 经生物发酵, 并采用 Al_2O_3 柱色谱法等色谱技术纯化、制备 EHPO; 采用 CCl_4 致小鼠急性肝损伤模型考察 EHPO 保肝作用。结果 所建立的制备方法可获得质量分数大于 95% 的 EHPO, 药效试验表明该化合物能显著性降低小鼠血清 ALT、AST 水平, 减少 MDA 量, 增强 SOD 活力 ($P < 0.05$)。结论 化合物 EHPO 具有显著的保肝作用。

关键词: 獐牙菜新素; 保肝作用; CCl_4

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)11-1788-03

藏茵陈是一种药用历史悠久的藏药, 来源于龙胆科植物獐牙菜属的多种植物, 始载于藏医药书《四部医典》, 有清热解毒、清肝利胆的功效。历代藏医药著作如《晶珠本草》、《鲜明注释》等均有记载。该药对乙肝、急性黄疸肝炎等疾病具有明显的临床疗效。现代药理学研究表明该类药材具有保肝^[1,2]、抗氧化^[3]、抗真菌^[4]等药理学活性。以獐牙菜苦苷为主的环烯醚萜类化合物是其所含的代表性成分。已有文献报道该类化合物在体内通常会经肠道菌群的作用转变为活性化合物^[5]。本课题组前期已采用黑曲霉菌与獐牙菜苦苷共同培养, 分离并获得一新化合物, 命名为獐牙菜新素[neoswertin, (5Z)-乙叉基-8-羟基-3,4,5,6,7,8-六氢-1H-吡喃[3,4-c]嘧啶-1-酮, EHPO]^[6]。在此基础上, 本实验对该化合物制备工艺进行优化, 并采用 CCl_4 致小鼠急性肝损伤模型初步探讨其保肝作用。

1 材料与仪器

1.1 材料: ICR 种雄性小鼠, 体质量 20 g 左右 (中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供); HPD-300 型树脂 (河北沧州宝恩化工有限公司); 乙腈、甲醇为色谱纯, 獐牙菜苦苷为自制, 质量分数 > 95%; 氧化铝、醋酸乙酯、石油醚等其他试剂均为国产分析纯)。

1.2 仪器: Bio-Rad550 酶标仪 (Bio-Rad 公司); 7080 全自动生化仪 (日立); LD5-2A 低速离心机 (北京医用离心机厂); PL203 型电子天平 [梅特勒托利多仪器 (上海) 有限公司]; P3000 型制备液相色

谱仪 (北京创新通恒公司)。

2 方法与结果

2.1 菌体培养: 黑曲霉菌保存于 PDA 培养基 (4 °C)。优化基础培养基, 并最终确定生成 EHPO 培养基组成为: 葡萄糖 5 g/L、蛋白胨 7.5 g/L、 KH_2PO_4 5 g/L、 MgSO_4 1.2 g/L、 MnSO_4 1.51 g/L、NaCl 0.59 g/L, 初始 pH 值 6.0。

取孢子悬液接入发酵培养基中 (250 mL 摇瓶中培养基装液量为 50 mL) 置于 28 °C、175 r/min 摇床培养 36 h。再取獐牙菜苦苷储备液, 加于培养液中 (最终质量浓度为 0.5 mg/mL), 并采用 HPLC 法实时监控 EHPO 的产量。流动相为乙腈-0.1% 磷酸水 (10 : 90), 275 nm 检测, 体积流量 1 mL/min, 120 h 后停止发酵。

2.2 发酵液的预处理: 发酵液离心、滤过后, 控制温度不高于 65 °C, 减压浓缩, 滤过, 然后采用石油醚等体积萃取 6 次。去除蛋白等大分子物质以及脂溶性物质。经 HPLC 检测, 未能从沉淀、石油醚层中检出 EHPO, 该步骤样品中的 EHPO 无损失。经筛选, 采用 HPD-300 型大孔树脂对 EHPO 进行初步纯化, 浓缩液直接上柱吸附, 控制流速为 1 BV/h。根据培养基中各组分以及代谢产物的性质采用水、10% 乙醇各 3BV 去除培养基中水溶性杂质, 然后采用 50% 乙醇洗脱 EHPO, 流速 1 BV/h, 分步收集洗脱液, 冻干。分别测定每份洗脱液中 EHPO 的量, 至 EHPO 洗脱完全, 计算 EHPO 的转移率。结果表明, 通过大孔树脂可将盐类等水溶性杂质去除。

收稿日期: 2009-02-25

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目 (08JCZDJC24700)

作者简介: 唐 斌 (1980—), 博士在读, 研究方向为生物中药与中药药理。

* 通讯作者: 张铁军 Tel: (022) 23006848 E-mail: tiezheng4@126.com

EHPO 的转移率为 83.4%。

2.3 氧化铝柱色谱法纯化工艺研究

2.3.1 洗脱剂比例的确定:采用薄层色谱法确定洗脱剂比例,再利用 Al_2O_3 对 50% 乙醇洗脱部分所含培养基各组分的结合性能差异,对其进行梯度洗脱。 Al_2O_3 装样量为每克 30 g Al_2O_3 。采用醋酸乙酯、醋酸乙酯-甲醇 (4:1)、醋酸乙酯-甲醇 (3:2)、醋酸乙酯-甲醇 (2:3)、醋酸乙酯-甲醇 (1:4) 溶液等体积进行梯度洗脱 (每个梯度 2 BV),分步收集洗脱液,流速 1 BV/h。将洗脱液蒸干,甲醇复溶,采用 HPLC 法测定每份洗脱液中 EHPO 质量浓度并绘制洗脱曲线图 (图 1),以进一步确定最佳洗脱剂。

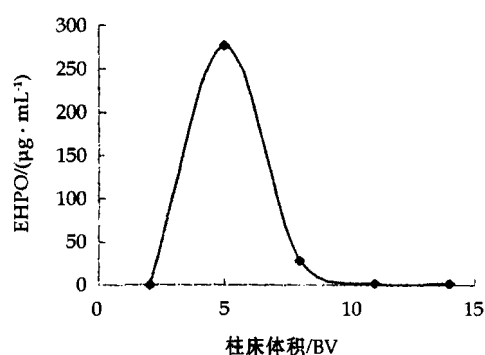


图 1 不同洗脱剂对 EHPO 的洗脱作用

Fig. 1 Effect of different eluants on EHPO elution

从图 1 可知,醋酸乙酯-甲醇 (4:1) 溶液洗脱部分含有较多的 EHPO,采用该比例的展开剂进行的薄层试验表明 EHPO 的 $R_f=0.2$,符合分离的要求。故确定洗脱剂为醋酸乙酯-甲醇 (4:1) 溶液,并采用醋酸乙酯溶液,以及醋酸乙酯-甲醇 (3:2) 溶液作为除杂试剂。

2.3.2 洗脱终点的确定:同法上样后,采用醋酸乙酯 2 BV 除杂,再采用醋酸乙酯-甲醇 (4:1) 溶液洗脱 EHPO,分步收集各流分。减压浓缩,甲醇复溶,测定每个流分中 EHPO 的质量浓度,并绘制洗脱曲线图 (图 2),以确定洗脱剂用量。

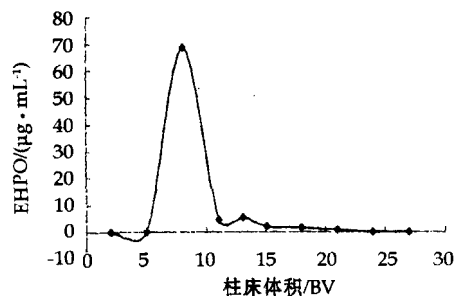


图 2 洗脱剂体积对 EHPO 洗脱效果的影响

Fig. 2 Effect of eluant volume on EHPO elution

图 2 表明 EHPO 主要集中在 4~6 BV 的洗脱液中,占总洗脱量的 94.6%,但 9 BV 洗脱液可更加完全地将 EHPO 洗脱下来,故选用 9 个柱体积的洗脱进行洗脱。

2.3.3 发酵液中残存獐牙菜苦苷的纯化工艺:根据薄层试验结果,同法上样后,采用醋酸乙酯溶液 2 BV 除杂,再采用醋酸乙酯-甲醇 (4:1) 溶液洗脱 9 BV,醋酸乙酯-甲醇 (3:2) 溶液洗脱 4 BV 除杂后,采用醋酸乙酯-甲醇 (1:4) 溶液继续洗脱,分离发酵液中残存的獐牙菜苦苷,测定。样品处理方法同前,采用 HPLC 法测定,流动相为乙腈-0.1% 磷酸水 (10:90),检测波长 237 nm,体积流量为 1 mL/min。结果表明獐牙菜苦苷主要存在于醋酸乙酯-甲醇 (1:4) 洗脱部分,12 BV 可将其洗脱完全 (图 3)。因而,最终确定流程为:以 EHPO 为主要目标成分,浓缩后滤过,石油醚萃取除去大分子脂溶性成分,HPD-300 型大孔树脂去除水溶性杂质后,采用 50% 乙醇洗脱、冻干样品, Al_2O_3 柱纯化,依次采用醋酸乙酯 (2 BV),醋酸乙酯-甲醇 (4:1) 溶液 (9 BV),醋酸乙酯-甲醇 (3:2) 溶液 (4 BV),醋酸乙酯-甲醇 (1:4) 溶液 (12 BV) 进行洗脱,即可获得 EHPO,并回收发酵液中残存的獐牙菜苦苷。

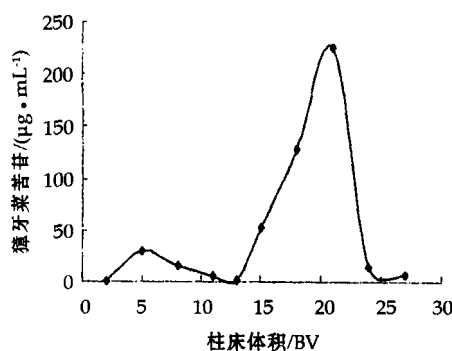


图 3 洗脱剂体积对獐牙菜苦苷洗脱效果的影响

Fig. 3 Effect of eluant volume on swertiamain elution

2.3.4 制备液相精制:采用流动相将上一步获得的醋酸乙酯-甲醇 (4:1) 溶液洗脱部分复溶,经制备液相色谱仪进一步精制,最终使得 EHPO 的质量分数达到 95% 以上。

2.4 EHPO 保肝作用

2.4.1 实验动物:ICR 种雄性小鼠,体质量 20 g 左右,饲养在有中央空调的观察室 (津设施准第 012 号,符合屏障级标准)中,喂饲鼠专用全价营养块料 (天津市华荣实验动物科技有限公司生产),饮自来水。

2.4.2 模型制备与药物处理:雄性小鼠,随机分成 5 组,每组 10 只。分别为对照组、模型组、阳性药水

飞蓟宾 (200 mg/kg) 组、EHPO (20,5 mg/kg) 组。各给药组每日给药 1 次,连续给药 7 d。对照组及模型组给予同体积去离子水。于给药第 2 天和第 6 天给药后 1 h,除对照组外,其余各组均 ip 给予 0.1% 四氯化碳 10 mL/kg。于第 7 天给药后 2 h (造模后 24 h),摘眼球取血 (取血前禁食 16 h)。分离血清,采用相应试剂盒测定丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA),同时剖取肝脏,称质量后计算肝脏系数。取肝左叶冻存备用。取冻存肝组织制备肝匀浆,测定肝组织中 SOD、MDA。各组取平均数分别与对照组比较,采用 SPSS 统计软件进行统计学分析,组间行 *t* 检验。结果见表 1 和 2。EHPO 可降低 CCl₄致急性肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 水平 (*P*<0.05),降低肝脏系数 (*P*<0.05、0.01);与模型组比较,EHPO 显著提高

肝损伤小鼠血清及肝匀浆中 SOD 活性 (*P*<0.01, 0.001),且显著降低 MDA 水平 (*P*<0.01、0.001)。

表 1 EHPO 对 CCl₄致急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 水平和肝脏系数的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

Table 1 Effect of EHPO on serum ALT, AST levels and liver index of hepatic injury mice induced by CCl₄ ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

组 别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	肝脏系数/ (mg·g ⁻¹)
对照	—	41.22±61.44	14.46±6.71	45.77±6.48
模型	—	659.76±783.08△△	868.81±834.81△△	59.08±5.51△△△
水飞蓟宾	200	523.93±715.37	728.82±922.02	50.28±6.06**
EHPO	20	195.78±226.11*	340.23±474.03*	51.29±4675*
	5	169.91±134.25*	289.25±249.23*	52.59±7.30*

与对照组比较: △△*P*<0.01 △△△*P*<0.001

与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

△△*P*<0.01 △△△*P*<0.001 vs control group

P*<0.05 *P*<0.01 vs model group

表 2 EHPO 对 CCl₄致急性肝损伤小鼠 SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

Table 2 Effect of EHPO on SOD activity and MDA level of acute hepatic injury mice induced by CCl₄ ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

组 别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)		MDA/(nmol·L ⁻¹)	
		血清	肝匀浆	血清	肝匀浆
对照	—	299.96±18.40	171.31±17.73	12.396±0.543△△△	44.046±12.527△△
模型	—	200.71±33.06△△△	80.78±15.23△△△	24.978±7.822	71.333±29.104
水飞蓟宾	200	246.59±44.26**	150.84±24.16***	10.582±1.705***	60.667±28.146
EHPO	20	315.57±30.79***	142.15±8.53***	14.470±2.531***	48.322±9.032**
	5	274.34±46.74***	156.25±14.90***	12.306±2.119***	42.598±12.342**

与对照组比较: △△*P*<0.01 △△△*P*<0.001; 与模型组比较: ***P*<0.01 ****P*<0.001

△△*P*<0.01 △△△*P*<0.001 vs control group; ***P*<0.01 ****P*<0.001 vs model group

3 讨论

本实验着重对黑曲霉菌与獐牙菜苦苷共同孵育生成的产物 EHPO 的制备工艺进行了研究,并对 EHPO 的保肝作用进行了初步探讨。对于 EHPO 来讲,由于其量较低,在发酵原液中质量分数不足 0.1%,且发酵液中含有大量的蛋白、多糖等物质影响该化合物的纯化,故采用石油醚、大孔树脂等分离手段除杂,初步富集 EHPO。在此基础上,再利用 Al₂O₃对各组分的吸附性能差异,进行梯度洗脱,将含氮目标化合物 EHPO 分离,并去除柠檬酸等黑曲霉自身产生的酸性物质。结果表明 EHPO 主要存在于醋酸乙酯-甲醇 (4:1) 溶液洗脱部分。9 BV 洗脱剂可基本将 EHPO 洗脱完全。经醋酸乙酯-甲醇 (3:2) 溶液 4 BV 除杂后,采用醋酸乙酯-甲醇 (1:4) 溶液洗脱 12 BV 还可回收部分发酵液中残存的獐牙菜苦苷。

在 CCl₄致小鼠急性肝损伤模型中,脂质过氧化是其主要的肝损伤机制。本实验证实 CCl₄可使小

鼠血清 ALT 和 AST 明显上升,同时肝组织 MDA 量明显增加,EHPO 可显著降低小鼠血清 ALT、AST 水平;降低血清、肝组织中 MDA 量;提高血清、肝组织中 SOD 的活性,对 CCl₄致肝损伤小鼠的肝组织有一定的保护作用,能够发挥一定的保肝作用。

参考文献:

- [1] Li J C, Feng L, Sun B H, *et al.* Hepatoprotective activity of the constituents in *Swertia pseudochinensis* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(3): 534-537.
- [2] Karan M, Vasisht K, Handa S S. Antihepatotoxic activity of *Swertia chirata* on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats [J]. *Phytother Res*, 1999, 13(1): 24-30.
- [3] Xiufen W, Hiramagtsu N, Matsubara M. The antioxidative activity of traditional Japanese herbs [J]. *Biofactors*, 2004, 21(1): 281-284.
- [4] Rodriguez S, Wolfender J L, Hakizamungu E, *et al.* An antifungal naphthoquinone, xanthones and secoiridoids from *Swertia calycina* [J]. *Planta Med*, 1995, 61(4): 362-364.
- [5] El-Sedawy A I, Shu Y Z, Hattori M, *et al.* Metabolism of swertiamarin from *Swertia japonica* by human intestinal bacteria [J]. *Planta Med*, 1989, 55(2): 147-150.
- [6] Chang J, Zhao X M, Liu C X, *et al.* Structure elucidation of metabolites of swertiamarin produced by *Aspergillus niger* [J]. *J Mol Struct*, 2008, 878: 22-25.