

· 化学与分析 ·

HPLC 在线检测消癌平注射液清除 ABTS^{·+} 活性

高翔^{1,2}, 王燕², 朱丹妮², 李迩娜³, 张仓³, 余伯阳^{1*}

(1. 中国药科大学现代中药教育部重点实验室, 南京 210009;

2. 中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198; 3. 南京圣和药业有限公司, 南京 210038)

[摘要] 目的:利用 HPLC 在线检测消癌平注射液对 ABTS^{·+} [2,2'-联氨-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)自由基]的清除活性,研究其抗氧化活性物质基础。方法:消癌平注射液经 HPLC 在柱后与 ABTS^{·+} 工作液混合并充分反应后,经过检测器记录反应信号,通过对照品鉴定各主要成分,并计算其清除率。结果:已鉴定出新绿原酸、咖啡酸、绿原酸,其对 ABTS^{·+} 的清除率分别为9.9% ,22.5% ,16.5% 。结论:消癌平注射液中酚酸类物质对 ABTS^{·+} 有较强的清除作用;此方法可实现中药制剂抗氧化活性成分的在线检测。

[关键词] 消癌平注射液; 高效液相色谱; 2,2'-联氨-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸); 自由基

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)05-0054-04

On-line Scavenging Activity of Xiaoaiping Injection for
ABTS^{·+} Radicals by HPLC

GAO Xiang^{1,2}, WANG Yan², ZHU Dan-ni², LI Er-na³, ZHANG Cang³, YU Bo-yang^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Chinese Medicine (China Pharmaceutical University),

Ministry of Education, Nanjing 210009, China; 2. Department of Complex Prescription
of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

3. Nanjing Sanhome Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210038, China)

[Abstract] **Objective:** To study the scavenging activities of Xiaoaiping injection for ABTS^{·+} by HPLC to trace the active constituents on-line. **Method:** Solution of Xiaoaiping injection was passed through HPLC to enter into the PEEK coil contained the ABTS^{·+} working solution, and signals were recorded, and their chemical constituents were identified by standard references, and their scavenging rates were calculated. **Result:** Neochlorogenic acid, caffeic acid and chlorogenic acid were identified, about the scavenging activities for ABTS^{·+}, and their scavenging rates were 9.9%, 22.5%, 16.5% respectively. **Conclusion:** Phenolic acids in Xiaoaiping injection make a significant contribution to the scavenging activities for ABTS^{·+}. It is shown that the method for on-line detection is an advantageous tool to rapidly determine antioxidants from traditional Chinese medicine.

[Key words] Xiaoaiping injection; HPLC; ABTS; free radical

[收稿日期] 20111011(004)

[基金项目] 国家“十二五”重大专项(2011ZX09201-201-02);
江苏高校优势学科建设工程项目

[第一作者] 高翔,硕士研究生,从事中药化学资源与生物技术, E-mail:gaoxiang172@163.com

[通讯作者] *余伯阳,教授,博士生导师,从事中药和天然药物资源化学、中药生物技术、中药新药研发等,
Tel: 025-86185158, E-mail: boyangyu @ yahoo.
com.cn

消癌平注射液是中药通关藤 *Marsdenia tenacissima*(Roxb.) Wight et Arn. 经现代化工艺制成的单方制剂,临床多用于治疗消化系统恶性肿瘤,如原发性肝癌^[1]、食管癌^[2]和胃癌^[3],亦有益于肺癌^[4]和血液系统恶性肿瘤^[5]的治疗,疗效显著。肿瘤的发生与多种因素有关,其中自由基是重要的因素之一,当自由基产生过多或机体清除自由基的能力下降时,产生的自由基及过氧化反应将会导致机

体损伤、引起癌症等疾病的发生^[6-8]。

ABTS 法最早由 Miller 等人提出,采用分光光度计,以测定 ABTS^{·+} 工作液中加入样品反应后吸光度的变化,来评价物质的抗氧化活性^[9]。该方法被广泛用于体外测定样品的抗氧化能力^[10-11]。近年来,通过两台 DAD 检测器联用将 ABTS 法运用于 HPLC 的柱后分析,其色谱图可直观反映各成分清除自由基能力的强弱,该技术可实现样品中清除自由基活性成分的在线检测^[12]。

本试验将 HPLC-ABTS 联用技术用于消癌平注射液清除 ABTS^{·+} 活性的在线检测,并利用对照品鉴别了 3 种具清除 ABTS^{·+} 活性的酚酸类成分,得出各主要成分对 ABTS^{·+} 的清除率,为消癌平注射液抗肿瘤物质基础及作用机制的进一步研究提供数据支持。

1 材料

1.1 仪器 岛津 LC-2010C HT 色谱仪,岛津 SPD-M20A 二极管阵列检测器,岛津 LC-10AT 单泵,AE-240 1/10 万天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,上海)。

1.2 试药 消癌平注射液(批号 201011081,南京圣和药业提供)。ABTS[2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸),Sigma 公司],Trolox(6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸,Sigma 公司),过硫酸钾(上海凌峰化学试剂有限公司,AR),乙腈(美国 TEDIA 公司,色谱级),磷酸(南京化学试剂厂,AR),水(Milli Q 超纯水机,美国密理博公司),新绿原酸(购自阿拉丁公司)、咖啡酸(购自阿拉丁

公司)、绿原酸(购自阿拉丁公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 消癌平注射液,取适量经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2 ABTS^{·+} 工作液的制备 取 0.5 mL 70 mmol·L⁻¹ 的过硫酸钾溶液加入到 50 mL 2 mmol·L⁻¹ 的 ABTS 水溶液中,暗处放置,反应 16 h,以水稀释,直至 734 nm 波长处测得吸光度为 0.7 ± 0.05,即得。

2.3 色谱条件 色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 分析柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm)。流动相 0.05% 磷酸溶液(A)-0.05% 磷酸的乙腈溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 20 min,2% ~ 4% B,20 ~ 70 min,4% ~ 7% B,70 ~ 110 min,7% ~ 10% B,110 ~ 115 min,10% ~ 15% B,115 ~ 116 min,15% ~ 2% B)。流速 1 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 300 nm。进样量 20 μL。

2.4 主要活性成分的指认 配制新绿原酸、咖啡酸、绿原酸各 50 mg·L⁻¹ 的对照品混合溶液,按 2.3 项下色谱条件,进行 HPLC 分析。

2.5 检测装置示意图 HPLC-ABTS 联用系统是由岛津 LC-2010C HT 色谱仪、岛津 LC-10AT 单泵、2 台岛津 SPD-M20A DAD 检测器、三通管和 PEEK 管等主要组成部分连接而成(图 1)。ABTS^{·+} 自由基工作液及水(对照)的流速为 0.5 mL·min⁻¹,经单泵与液相流出液进入三通管中混合,再流经 PEEK 管(0.25 mm × 20 m)使其充分反应,后经 DAD 检测器检测,检测波长为 734 nm。

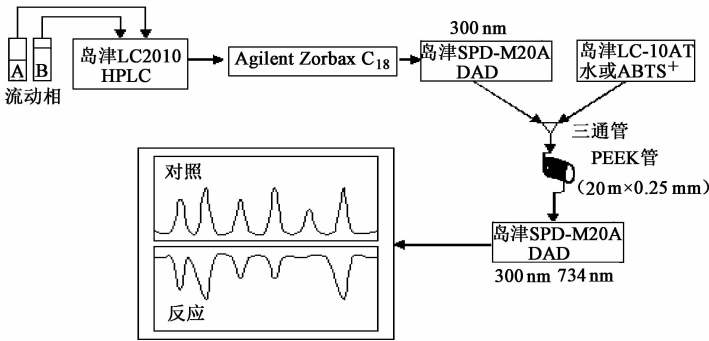


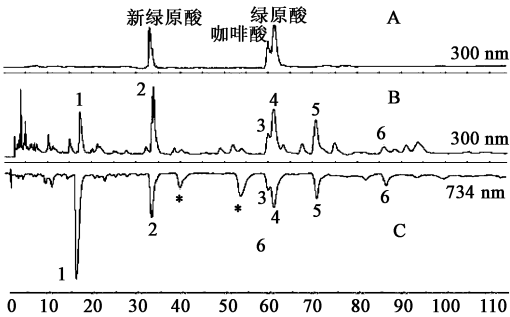
图1 HPLC-ABTS 联用系统

3 结果

3.1 在线检测消癌平注射液清除 ABTS^{·+} 活性 样品中各成分经色谱柱分离后,在柱后与 ABTS^{·+} 工作液混合,并经 PEEK 管充分反应,2 台 DAD 检测器同步记录色谱信号及其清除自由基的信号,具有清除自由基活性的成分以倒峰的形式出现在 734 nm

的色谱图中。因此可同时获得样品的 HPLC 图谱及其相应的活性图谱。

由图2可知,在消癌平注射液清除 ABTS^{·+} 的图谱中,有 8 个明显的倒峰,经与消癌平注射液 300 nm 的 HPLC 图谱对比,可确认其中的 6 个倒峰由在该波长下可检测到的物质贡献。通过比较 300 nm



A. 对照品 HPLC;B. 消癌平注射液 HPLC;

C. 消癌平注射液清除 ABTS^{·+}

图2 对照品和消癌平注射液 HPLC 及其清除 ABTS^{·+} 活性图谱

下消癌平注射液的色谱峰峰面积及峰高,发现 1 号峰含量虽不是最高,在相应的清除 ABTS^{·+} 的图谱中却显示出很强的倒峰,表明该成分具有非常强的清除活性。

通过比较对照品的 HPLC 图谱和消癌平注射液 HPLC 图谱的保留时间,可以初步确认图中的 2,3,4 号色谱峰分别为新绿原酸、咖啡酸和绿原酸。

另外在消癌平注射液清除 ABTS^{·+} 活性图谱中,尚有 2 个打 * 号的倒峰无法在消癌平注射液 300 nm 下的 HPLC 图谱中找到明确的对应峰,推测这可能是对其贡献清除活性的成分在 300 nm 下的紫外吸收很弱或没有吸收所致。

3.2 清除率的计算 消癌平注射液中抗氧化物质的抗氧化活性通过其对 ABTS^{·+} 的清除率来衡量。按照下列公式计算清除率:

清除率 = $[(H_0 - H_s) / H_0] \times 100\%$

其中, H₀ 为消癌平注射液在 300 nm 下 HPLC 图谱中的各色谱峰峰高, H_s 为被 ABTS^{·+} 清除后 300 nm 下 HPLC 图谱中的各色谱峰峰高。

清除率越大表明其抗氧化能力越强,通过计算清除率以评价各色谱峰对 ABTS^{·+} 的清除能力,结果见图 3。

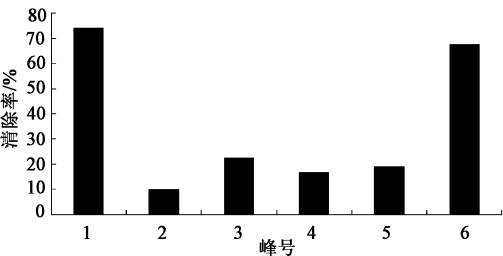


图3 消癌平注射液 1-6 号峰对 ABTS^{·+} 的清除率

如图3所示,1 号峰与 6 号峰对 ABTS^{·+} 的清除

率最高,且明显高于其他峰,分别为 73.9%, 67.4%,表明 1 号和 6 号成分具有最强的清除活性; 3,4,5 号峰的清除率较为接近,分别为 22.5%, 16.5% 和 19.1%,其中已确认 3 号峰为咖啡酸,4 号峰为绿原酸;而 2 号峰新绿原酸的清除活性最低,仅为 9.9%。

3.3 Trolox 等价抗氧化能力 选择 Trolox(一种类似于 VE 的水溶性物质)对照标准体系,待测物质 Trolox 等价抗氧化能力以与待测物质清除自由基能力相当的 Trolox 的量来确定。分别配制不同浓度的 Trolox 溶液,注入上述 HPLC-ABTS 系统,进样量 10 μL,以倒峰峰高为纵坐标,Trolox 的量 (mg × 10⁻⁵) 为横坐标,绘制标准曲线。得线性方程 $Y = 2.823 5X + 10.923 (r = 0.999 9)$,表明 Trolox 在 0.002 ~ 0.600 mg 与清除 ABTS^{·+} 所产生的倒峰峰高,呈良好的线性关系。

将 1 ~ 6 号色谱峰相对应的倒峰峰高代入该线性方程,算出具有相同清除 ABTS^{·+} 活性的 Trolox 的量,见表 1。

表 1 消癌平注射液清除 ABTS^{·+} 活性成分 Trolox 等价抗氧化能力

峰号	活性成分	倒峰峰高	等价 Trolox 的量/μg
1	-	133 486	472. 73
2	新绿原酸	54 484	192. 93
3	咖啡酸	22 816	80. 77
4	绿原酸	42 565	150. 71
5	-	33 372	118. 16
6	-	15 323	54. 23

3.4 清除率与等价 Trolox 抗氧化能力比较 分别以各色谱峰的清除率及等价 Trolox 的量为纵坐标绘制图 4,可以看出样品中 1 ~ 6 号色谱峰对 ABTS^{·+} 的清除率与其等价 Trolox 的量并不成正相关关系,6 号峰的峰高及其等价 Trolox 的量均较低,但其对 ABTS^{·+} 的清除率却达到 67.4%,具有较高的清除活力;推测可能是其具有非常活泼的基团、具有较强的供电子能力,与 ABTS^{·+} 反应量较大,提示其抗氧化活性较强,可能是消癌平注射液中抗氧化的重要成分。

4 讨论

ABTS 经活性氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基即 ABTS^{·+},其在 734 nm 具有最大吸收。当被测物质中存在抗氧化活性成分时,则该物质会与 ABTS^{·+} 发生反应而使反应体系褪色,故可以倒峰

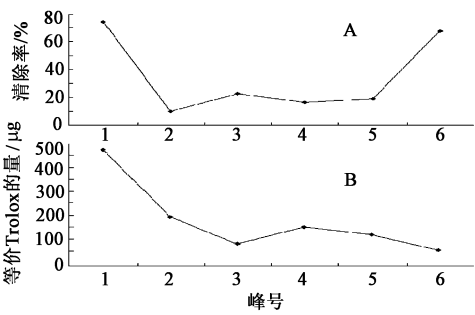


图4 消癌平注射液 1~6 号峰的清除率 (A)
与等价 Trolox 的量 (B) 比较

的形式直观表现在 734 nm 的色谱图中。ABTS 法本质上是一种间接方法,用来检测物质清除 ABTS^{·+}这种自由基的能力,借此来评价其抗氧化活性的大小,与体内真实的氧化分解没有直接关系。

本实验结果表明,在已初步确定的 3 种酚酸类物质中,新绿原酸、咖啡酸和绿原酸对 ABTS^{·+}均具有一定的清除能力。但其他活性成分尚未找到合适对照品,尤其是清除活性最强的 1,6 号峰,故有待进行进一步研究,以期明确其结构。

肿瘤发生与自由基密切相关,消癌平注射液中酚酸类物质为天然产物中有效的自由基清除剂,其可能通过抑制致癌物-DNA 加和物和氧自由基的形成^[13],发挥抗肿瘤作用,其抗肿瘤机制还有待进一步研究。本法可实现对中药及中药制剂中抗氧化活性成分的快速、在线检测,并能同时比较其清除 ABTS^{·+}活性的强弱,具有较好的应用前景。

[参考文献]

[1] 孙钰,沈建华,朱美华,等. “消癌平”对人肝癌细胞治疗作用的实验研究[J]. 上海中医药杂志,2000,7:12.

[2] 张明智,何振,吴广银,等. 消癌平对 Ec29706 食管癌细胞的作用及机制实验研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(5):1182.

[3] 袁秀英,范忠泽,黄秀英. 消癌平注射液治疗 14 例晚期胃癌的临床观察[J]. 上海医药,1996,6:12.

[4] 黄振倩,谭获,王春燕,等. 消癌平注射液联合化疗治疗中晚期肺癌的临床研究[J]. 临床肿瘤学杂志,2007,14(16):1272.

[5] 李东,欧阳建,李翠萍,等. 消癌平注射液对白血病细胞 NB4 作用的初步研究[J]. 中国生化药物杂志,2007,28(4):247.

[6] 寒冬,张凤珍,张凤丽,等. 自由基与癌[J]. 锦州医学院学报,1996,17(3):40.

[7] 刘海. 试述自由基及抗自由基中药[J]. 实用中医药杂志,2007,23(5):327.

[8] D Dreher, A F Junod. Role of oxygen free radicals in cancer development [J]. Euro J Cancer, 1996, 32A(1):30.

[9] Miller N J, Rice-Evans C A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates[J]. Clin Sci, 1993, 84:407.

[10] 李培源,霍丽妮,苏炜,等. 总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS) 法测定江南星蕨的抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):162.

[11] 霍丽妮,李培源,邓超澄,等. 眼树莲不同极性溶剂提取物的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):219.

[12] Irina I Koleva, Harm A G Niederlander, Teris A van Beek. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates [J]. Anal Chem, 2001, 73:3373.

[13] 吴卫华,康桢,欧阳冬生,等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(4):691.

[责任编辑 蔡仲德]