

柴胡总皂苷提取物体外溶血作用

张国松¹, 封传华^{1,2}, 罗晓健^{1,2}, 胡鹏翼¹, 肖志强¹, 王跃生^{1,3*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 考察柴胡总皂苷提取物的溶血作用和抗氧化剂对柴胡总皂苷溶血的影响。方法: 通过肉眼观察和分光光度法考察不同浓度柴胡皂苷的溶血作用及抗氧化剂对柴胡总皂苷溶血的影响。结果: 柴胡总皂苷质量浓度为在 0.01, 0.02 g·L⁻¹ 时, 其溶血曲线呈 S 形, 溶血当量为 0.01 mg, 溶血指数为 1:10 万, 抗氧化剂与柴胡总皂苷组溶血率低于同浓度柴胡总皂苷组。结论: 柴胡总皂苷具有一定的溶血作用, 且溶血强度与浓度呈剂量依赖性, 抗氧化剂的加入能减轻柴胡总皂苷的溶血作用。

[关键词] 柴胡总皂苷; 体外; 溶血作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0166-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110823.1118.012 **[网络出版时间]** 2011-08-23 11:18

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110823.1118.012.html>

Hemolytic Effects of Extraction of Saikosaponins *in vitro*

ZHANG Guo-song¹, FENG Chuan-hua^{1,2}, LUO Xiao-jian^{1,2}, HU Peng-yi¹, XIAO Zhi-qiang¹, WANG Yue-sheng^{1,3*}

(1. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study hemolytic effect of extraction of saikosaponins and antioxidants on the hemolytic effect of extraction of saikosaponins. **Method:** The hemolytic effects by different concentrations of saikosaponins and antioxidant effects of saikosaponins hemolytic were observed by naked eye and UV. **Result:** For saikosaponins with concentrations of 0.01, 0.02 g·L⁻¹, its hemolytic curve showed s-shaped, hemolytic equivalent was 0.01 mg, hemolytic index was 1:100 000, antioxidant and saikosaponins group hemolytic rate was lower than the concentration of saikosaponins group. **Conclusion:** Saikosaponins has hemolytic effect with a certain degree, and hemolytic strength and concentration is dose-dependent, addition of antioxidants can reduce the hemolytic effect of saikosaponins.

[Key words] saikosaponins; *in vitro*; hemolytic

柴胡总皂苷提取物是以北柴胡为原料, 经提取、分离纯化、干燥而制得, 其主要有效成分为柴胡皂苷 a, d, 属齐墩果烷型皂苷。近代药理学研究表明, 柴

胡皂苷具有抗炎、保肝、抗肝纤维化、降低血中胆固醇和调节内分泌等多方面药理活性^[1-2]。但绝大多数皂苷具有溶血作用, 限制了皂苷作为药物的发展^[3]。本实验对溶血实验有影响的几个因素进行了考察, 建立溶血试验方法, 并用此方法对不同浓度柴胡总皂苷进行溶血测定, 观察其对红细胞的溶血随时间的作用过程, 同时考察了不同氧化剂对柴胡总皂苷溶血的影响, 并对柴胡总皂苷的溶血机制进行了初步探讨。

[收稿日期] 20110331(004)

[基金项目] 国家重大新药创制专项(2009ZX09103)

[第一作者] 张国松, 硕士, 从事中药新剂型与新制剂研究, Tel: 0791-7119617

[通讯作者] *王跃生, 研究员, 博士生导师, Tel: 0791-7119617, E-mail: Wylw915@126.com

1 材料

1.1 试药 柴胡总皂苷提取物(中试产品,批号20100725,柴胡总皂苷质量分数为68%),0.9%氯化钠注射液(江西科伦药业有限公司,批号20100920),葡萄糖(广东汕头市西陇化工厂,批号090630),冰乙酸(广东汕头市西陇化工厂,批号050115),维生素C(北京金诺欣成化工有限公司,批号20100618),维生素E(郑州浩力化工有限公司,批号201008112),甘露醇(上海华龙化工,批号20100715),胆固醇(武汉亚法生物技术有限公司,批号20100806)。

1.2 动物 家兔1只,清洁级,雄性,体重1.1 kg,购于江西医学院动物室,许可证号SCXK(赣)2005-0001。

1.3 仪器 RE型系列旋转蒸发仪(上海亚容生化仪器厂),101-3-BS型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械),HH-6型电热恒温水浴锅(国华电器有限公司),AL-104型电子天平(梅特勒-托利多),TDZ4-WS型台式低速自动平衡离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司),UV-2550型紫外分光光度计(日本岛津)。

2 方法

2.1 柴胡粗多糖的提取 取已粉碎好的北柴胡根部粉末于沸水中提取3次,滤过,上清液浓缩后用冰乙酸除蛋白,用稀盐酸调至中性后离心($5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,10 min),上清液加3倍量95%乙醇醇沉过夜,将沉淀用无水乙醇洗2~3遍,真空干燥得柴胡粗多糖^[4]。

2.2 试液的配制

2.2.1 1%红细胞悬浮液的制备^[5] 家兔耳缘静脉取血10~20 mL,置烧杯中,用缠有少量脱脂棉的玻璃棒轻轻搅拌,取出血液中的纤维蛋白以防止凝血。将去纤维蛋白血移入刻度离心管中,加入10倍量生理盐水混匀后离心($3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),弃去上清液。以此方法重复4~5次至上清液澄清透明,读取充分沉降在底部的红细胞体积,用生理盐水为稀释剂按体积比配制成浓度为1%的红细胞悬浊液置于4℃冰箱保存备用。

2.2.2 总皂苷试液的配制 准确称取柴胡总皂苷100 mg置于研钵中,先滴入聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯(吐温80)0.075 g(约2~3滴)并进行快速研磨,再用生理盐水进行稀释,并定容至25 mL量瓶

中,置于4℃冰箱保存备用。

2.2.3 不同浓度聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(吐温80)的制备 精密称取吐温80 0.1,0.2,0.3,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 g,分别置于250 mL量瓶中,加入生理盐水使其溶解,并稀释至刻度,配制成质量浓度分别为0.4,0.8,1.2,2,4,8,10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 备用。

2.3 最大吸收波长的确定 取蒸馏水2.5 mL,加1%红细胞悬浊液2.5 mL,轻轻混匀。置(37 ± 0.5)℃水浴中保温30 min,取出,离心10 min($3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),吸取上清夜至比色皿中。另取3 mL生理盐水做空白对照,通过紫外分光光度计于500~600 nm扫描,测定吸光度(A)。

2.4 溶血率的计算

$$\text{溶血率} = \frac{(A_{\text{样}} - A_{\text{阴}})}{A_{\text{阳}} - A_{\text{阴}}} \times 100\%$$

$A_{\text{阳}}$:完全溶血(100%)管A; $A_{\text{阴}}$:完全未溶血(0%)管的A; $A_{\text{样}}$:样品在某个浓度时的A。

2.5 不同质量浓度吐温80对柴胡皂苷溶血的影响

将上述配制的不同浓度的吐温80溶液,以生理盐水做空白,紫外分光光度计在500~600 nm波长范围内进行扫描,测定各质量浓度的吐温80在576 nm波长处的A。

2.6 吐温80对血红细胞的溶血率的考察 准确吸取上述各浓度的吐温80溶液2.5 mL于各试管中作为样品管。另取2.5 mL蒸馏水作为阳性对照管,2.5 mL生理盐水作为阴性对照管。向上述各管中分别加入1%红细胞悬浮液2.5 mL,混匀,置(37 ± 0.5)℃水浴中,1 h后取出,立即冰浴以终止溶血,离心10 min($3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),取上清液于576 nm波长处测其吸光度,根据2.4溶血率公式计算不同质量浓度吐温80溶液的溶血率。每种浓度吐温80溶液做平行实验3次,取其平均值。

2.7 柴胡总皂苷的溶血性考察

2.7.1 溶血率-时间曲线 准确吸取柴胡总皂苷试液,用生理盐水稀释成0.01,0.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 2个浓度,分别吸取2.5 mL于各试管中作为样品管。另取2.5 mL蒸馏水作为阳性对照管,2.5 mL生理盐水作为阴性对照管。按照2.6方法测定A,根据2.4溶血率公式计算不同浓度柴胡总皂苷试液不同时间的溶血率。每种质量浓度柴胡总皂苷试液做平行实验3次,取其平均值。

2.7.2 溶血当量测定 准确吸取柴胡总皂苷试液,用生理盐水稀释成0.000 8,0.002,0.005,0.010,

0.020, 0.040 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别吸取各质量浓度溶液 2.5 mL 于各试管中作为样品管。另取 2.5 mL 蒸馏水作为阳性对照管, 2.5 mL 生理盐水作为阴性对照管。按照 2.6 方法测定 A, 根据 2.4 溶血率公式计算各质量浓度柴胡总皂苷试液的溶血率。每种浓度柴胡总皂苷试液做平行实验 3 次, 取其平均值。溶血当量是指每毫升标准 1% 红细胞悬浮液所消耗的皂苷量。

2.8 柴胡总皂苷抗溶血的研究

2.8.1 抗氧化剂对溶血的影响

配制不同质量浓度的抗氧化剂的生理盐水溶液, 以生理盐水做空白, 紫外分光光度计在 500 ~ 600 nm 波长进行扫描, 测定各溶液在 576 nm 波长处的 A。

2.8.2 抗氧化剂对柴胡总皂苷溶血的影响

分别称取适量水溶性抗氧化剂维生素 C、甘露醇、葡萄糖、柴胡多糖以及脂溶性抗氧化剂维生素 E 各 0.1, 0.5, 1.0 mg, 加入各试管中, 精密吸取 2.5 mL 0.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的柴胡总皂苷试液于以上各试管中, 轻轻摇匀。另取 2.5 mL 蒸馏水作为阳性对照管, 2.5 mL 生理盐水作为阴性对照管。按照 2.6 方法测定吸光度, 根据 2.4 溶血率公式计算各质量浓度柴胡总皂苷试液的溶血率, 平行试实验 3 次, 取其平均值。

2.8.3 胆固醇对柴胡总皂苷溶血的影响

取胆固醇约 10 mg, 加入 0.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的柴胡总皂苷试液, 超声 10 min, 按 2.7.2 方法测溶血当量。

3 结果

3.1 最大吸收波长的确定

测得其最大吸收波长为 576 nm, 各供试品均无吸收干扰, 且此波长下 A 处于紫外分光光度计测量稳定范围内, 故选此波长作为检测波长。

3.2 不同浓度吐温 80 对柴胡皂苷溶血实验的影响

0.4 ~ 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吐温 80 溶液在 576 nm 处, A 为 0.000 ~ 0.007, 干扰吸收相当小, 可忽略不计。

3.3 吐温 80 对红细胞的溶血率的考察

吐温 80 溶液的质量浓度在 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有溶血现象发生, 而在 1.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下时不发生溶血, 因此可用 $\leq 1.2 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吐温 80 溶液实现对水溶性差的柴胡总皂苷的增溶作用。

3.4 柴胡总皂苷的溶血作用

3.4.1 溶血率-时间曲线

由图 1 可以看出, 0.01, 0.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 柴胡总皂苷溶液的溶血趋势大致相同, 溶血曲线均呈类似 S 形, 说明不同质量浓度柴胡总

皂苷溶液的溶血现象均不为匀速, 而是在某一段时间内溶血特别快。

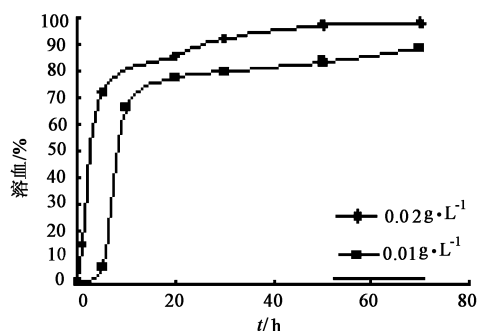


图 1 柴胡总皂苷溶血率随时间变化曲线

3.4.2 溶血当量测定

由图 2 可以看出, 不同浓度柴胡总皂苷的溶血作用曲线为具有类似于 S 形的关系曲线。当溶液中总皂苷含量在 0.002 ~ 0.01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 溶血率达到突变, 溶血当量为 0.01 mg, 溶血指数为 1:10 万。观察离心后不同浓度柴胡总皂苷溶液的溶血情况发现, 浓度小于 0.002 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 有红色沉淀出现, 说明有未溶血的红细胞残留。

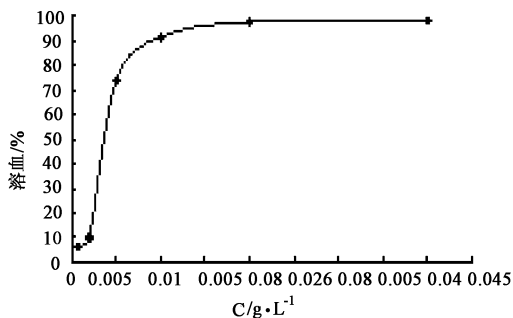


图 2 不同浓度柴胡总皂苷溶血作用曲线图

3.5 抗溶血的研究

3.5.1 抗氧化剂的溶血作用

结果显示本实验所用的各抗氧化剂的生理盐水溶液在 576 nm 处 A 均在 0 ~ 0.003, 干扰吸收相当小, 可忽略不计。

3.5.2 抗氧化剂对柴胡总皂苷溶血的影响

从图 3 可以看出水溶性抗氧化剂维生素 C、甘露醇、葡萄糖、柴胡多糖以及脂溶性抗氧化剂维生素 E 均对柴胡总皂苷引起的红细胞溶血有一定的抑制作用。随着各抗氧化剂加入量的增加, 溶血率也随之减小, 维生素 C 抗溶血作用尤为明显。

3.5.3 胆固醇对柴胡总皂苷溶血的影响

加入胆固醇 10 mg 后, 柴胡总皂苷 0.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 未发现明显溶血。

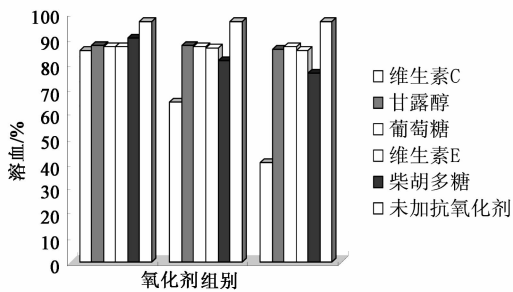


图3 不同抗氧化剂对柴胡总皂苷溶血的影响

4 讨论

柴胡总皂苷水溶性较差,为了进行进一步的溶血和抗溶血研究,需对其增溶。实验发现吐温 80 对皂苷类物质具有良好的增溶作用,但吐温 80 本身具有一定的溶血作用。为了使其对本实验无干扰并有良好助溶作用,我们考察了不同浓度的吐温 80 对血红细胞的溶血情况,结果发现吐温 80 溶液的浓度小于或等于 $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时,不产生溶血,因此可将吐温 80 溶液的浓度控制在 $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以内,可实现对柴胡总皂苷的增溶。

各类皂苷的溶血强弱可通过溶血指数来表示,溶血指数是指一定条件下能使血液中红细胞完全溶解的最低溶血浓度。溶血指数成为皂苷类物质的一个重要生物测定手段而被广泛用于筛选、标识、分离纯化等研究工作^[6]。例如赵云生等^[7]研究发现晋产远志的溶血指数可间接反应其种质资源品质的状况。本研究发现柴胡皂苷的溶血毒性较大,溶血当量为 0.01 mg ,溶血指数为 $1:100\ 000$ 。

皂苷的溶血作用与红细胞膜的脂质过氧化反应有关,红细胞的脂质过氧化反应可造成红细胞的氧化损伤,导致红细胞溶血^[8]。汪红仪等^[9]研究发现抗氧化剂甘露醇、葡萄糖、维 E 可部分拮抗麦冬总皂苷和生脉散引起的溶血作用。本实验证实了这一研究,同时发现加入维生素 C 后,溶血百分率大幅下降,观察各样品管发现,加入维 C 的样品管最终与其它各试管(呈淡红色)不同而呈现浅绿色,具体原因有待进一步研究。

胆固醇又称胆甾醇,是一种环戊烷多氢菲的衍生物。皂苷可与胆甾醇生成难溶性的分子复合物,利用此性质可与其它水溶性成分分离达到精制的目的^[10]。皂苷的溶血是由于与血红细胞壁上的胆甾醇结合生成不溶性分子复合物沉淀,造成细胞膜去稳定。本实验发现皂苷与胆甾醇充分反应后,可使其溶血作用消失,但所生成的难溶性分子复合物是否还具有柴胡总皂苷的相关药理作用(比如抗肝纤维化)还需今后进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 李琰. 柴胡药理作用研究进展[J]. 河北医学, 2010, 16(5): 633.
- [2] 李芳, 李建北, 张东明. 柴胡的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(2): 120.
- [3] 王胜春, 赵慧平. 柴胡的清热与抗病毒作用[J]. 时珍国医国药, 1998, 9(5): 418.
- [4] 杨立明, 王永中. 柴胡多糖的制备及其部分理化性质测定[J]. 安徽农业技术师范学院学报, 2000, 14(3): 27.
- [5] 杨广, 项峥, 康廷国, 等. 人参皂苷溶血测定的实验条件研究[J]. 辽宁中医药大学学报. 2008, 10(6): 190.
- [6] 孙兵, 郝洪谦. 柴胡皂苷对猫睡眠活动调制的实验研究[J]. 天津医科大学学报, 2000, 6(3): 274.
- [7] 徐淑梅, 邓开发. 柴胡对癫痫模型电活动的调制[J]. 中国应用生理学杂志, 2002, 18(3): 294.
- [8] Chiang L C, Ng L T, Liu L T, et al. Cytotoxicity and anti-hepatitis B virus activities of saikosaponins from *Ulm* species[J]. *Planta Med*, 2003, 69(8): 705.
- [9] 刘云海, 陈永顺, 谢委, 等. 柴胡总皂苷抗内毒素活性研究[J]. 中药材, 2003, 26(6): 423.
- [10] Park K H, Park J, Koh D, et al. Effect of saikosaponin-A, a triterpenoid glycoside, isolated from *Bupleurum falcatum* on experimental allergic asthma[J]. *Phytother Res*, 2002, 16(4): 359.

[责任编辑 聂淑琴]