

卷柏提取物对去势大鼠股骨中羟脯氨酸含量的影响

王小兰^{1,2}, 郑晓珂^{1,2}, 魏悦¹, 武慧敏¹, 宁桃丽², 朱艳琴^{1*}

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 河南省中药材开发工程技术研究中心, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 采用柱前衍生化法对去势大鼠股骨中羟脯氨酸(HyP)的含量进行测定, 观察卷柏提取物对去势大鼠股骨中 HyP 含量的影响。方法: Wistar 雌性大鼠摘除卵巢后 1 周开始 ip 卷柏总提物 665 mg·kg⁻¹, 卷柏正丁醇部位 85 mg·kg⁻¹, 卷柏水部位 490 mg·kg⁻¹, 持续 11 周后处死, 取其股骨, 采用 2,4-二硝基氯苯柱前衍生化反相高效液相色谱法, 观察卷柏提取物对去势大鼠股骨中 HyP 含量的影响。结果: HyP 0.125~2.00 g·L⁻¹ 线性关系良好 ($r=0.9994$), 精密度试验 RSD < 1%, 24 h 内稳定性试验 RSD < 5%, 加样回收率均在 90%~110%; 卷柏水部位和正丁醇部位均能增加去势大鼠股骨中 HyP 含量。结论: 卷柏提取物能增加去势大鼠股骨中 HyP 含量, 其中卷柏水部位和正丁醇部位, 对去势大鼠骨质疏松具有一定的干预作用。

[关键词] 卷柏; 去势大鼠; 羟脯氨酸; 高效液相色谱; 2,4-二硝基氯苯

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0132-05

Experimental Study of Extract of *Selaginella tamariscina* on Content of Hydroxyproline in Femur of Ovariectomized Rats

WANG Xiao-lan^{1,2}, ZHENG Xiao-ke^{1,2}, WEI Yue¹, WU Hui-min¹, NING Tao-li², ZHU Yan-qin^{1*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Henan Engineering Research Center of Development of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of the extract of *Selaginella tamariscina* on the content of hydroxyproline in femur of ovariectomized rats. **Method:** Wistar rats were ovariectomized except for the normal group. One week after operation, the rats were treated with different medicines. Eleven weeks after treated the medicines, the rats were killed, the content of hydroxyproline in femur of ovariectomized rats was determined by RP-HPLC with pre-column derivatization by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB). **Result:** Calibration curves showed good linearity within the concentration range of 0.125-2.00 g·L⁻¹ for hydroxyproline. The RSD of precision was less than 1%, the RSD of stability of the sample was less than 5% in 24 hours and recoveries of assay were 90%-110%. The water part group and n-butanol part group of *S. tamariscina* could increase the content of hydroxyproline in femur of ovariectomized rats. **Conclusion:** The extract of *S. tamariscina* can increase the content of hydroxyproline in femur of ovariectomized rats, suggesting that the water part group and n-butanol part group of *S. tamariscina* can intervene the osteoporosis in ovariectomized rats.

[Key words] *Selaginella tamariscina*; ovariectomized rats; hydroxyproline; RP-HPLC; DNCB

[收稿日期] 2011-01-19

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-440); 河南省重大公益性科研项目(081100910800)

[第一作者] 王小兰, 研究实习员, 硕士, 从事中药活性成分及其作用机制研究, Tel: 13613805754, E-mail: wxl_325@163.com

[通讯作者] *朱艳琴, 教授, 硕士, 从事中药抗肿瘤研究, Tel: 13526581155, E-mail: jc.zyqin@163.com

卷柏化学分析表明含有大量的黄酮类、木脂素类、核苷类和其他多酚类化合物^[2-3]。

绝经后骨质疏松症是因雌激素缺乏引起的以骨量减少、骨胶原蛋白减少为特征的代谢性疾病。羟脯氨酸(hydroxyproline, HyP)是胶原的特异氨基酸^[4],是评估胶原蛋白含量的特征指标。本实验采用去势大鼠模型,其股骨经盐酸水解后,采用2,4-二硝基氯苯(DNCB)柱前衍生化反相高效液相色谱法,测定大鼠股骨中HyP的含量,探讨卷柏不同部位提取物对去势大鼠股骨中HyP含量的影响。

1 材料

1.1 动物 Wistar 雌性大鼠 60 只,体重(200±10)g,购自河南省实验动物中心,适应性喂养1周,饲料为该中心提供的固体全价饲料,饮用水为自来水,实验期间饲养在二级动物室,温度(25±1)℃。

1.2 药物 卷柏采自河南省西峡县。用10倍量水煮提2次,过滤,合并滤液并减压浓缩,真空干燥即为卷柏总提取物。卷柏水煎液减压浓缩至相对密度为1:1左右,依次用乙醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别得到乙醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位,将各部位低温减压回收溶剂、浓缩,真空干燥备用。临用前配成所需浓度。阳性药尼尔雌醇片,上海华联制药有限公司生产,批号051001。

1.3 仪器与试剂 岛津 LC-10ATvp 型高效液相色谱仪、SPD-10Avp 可见-紫外检测器及 N-2000 双通道色谱工作站;SK2200H 超声波提取器(上海科导超声仪器有限公司,60KHz);AB204-N 1/万分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);HENGAO TD 纯水过滤装置(Tianjin Hengao Technology Development CO. LTD)。HYP 对照品(北京索莱宝科技有限公司);DNCB(上海科丰化学试剂有限公司);甲醇为色谱纯、乙酸钠、三乙胺、冰醋酸、硼砂、盐酸、氢氧化钠为分析纯,水为双蒸水。

2 方法

2.1 模型建立 除假手术组外,其余各组大鼠均背侧开口,切除双侧卵巢后缝合,假手术组仅作背侧切口,再缝合,但不摘除卵巢。

2.2 分组给药 雌性大鼠 60 只,随机分成假手术组、模型组、阳性药尼尔雌醇组、卷柏总提取物组、卷柏正丁醇部位组、卷柏水部位组,每组 10 只。各组均给予普通全价饲料喂养,饮水为自来水。手术后,

各组大鼠正常饮食 1 周,以恢复创伤。手术后开始给药,持续 11 周。假手术组和模型组 ig 蒸馏水 10 mL·kg⁻¹;尼尔雌醇悬浊液 1 mg·kg⁻¹ ig,1 次/周;卷柏提取物剂量按成人每公斤剂量的 20 倍:卷柏总提取物组 655 mg·kg⁻¹,卷柏正丁醇部位 85 mg·kg⁻¹;卷柏水部位 490 mg·kg⁻¹,均 ig。

2.3 色谱条件 色谱柱: Hypersil-Gold-ODS (250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:(A)液为乙腈;(B)液为 0.05 mol·L⁻¹乙酸钠溶液(加 1 mL 三乙胺,并以冰醋酸调 pH 为 6.4)1 880 mL,加甲醇 120 mL 混匀即得;梯度洗脱程序:0~3 min,15% (A),10 min,19% (A),12 min,25% (A),30 min,35% (A),运行时间 30 min。流速 1.0 mL·min⁻¹;紫外检测波长 360 nm;进样量 10 μL。

2.4 大鼠股骨水解方法 取大鼠股骨,经丙酮脱脂后在 110℃ 烤箱中烘干,于研钵中磨碎。取 50 mg 骨粉放于 10 mL 试管中,加入 1 mL 6 mol·L⁻¹ HCl,封口后在 105℃ 烤箱中水解 24 h,冷却后打开封口,将水解液用 5 mol·L⁻¹ NaOH 中和至中性,定容至 4 mL,离心,取上清液。

2.5 衍生条件的选择

2.5.1 HYP 对照品溶液中 DNCB 加入量的考察 取 HYP 对照品 100 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加水配成 4 g·L⁻¹ 的储备液。取 HYP 储备液 500 μL,加入 3 mL 0.05 mol·L⁻¹ 硼砂缓冲液(pH 9.5)和 0.5 mL 不同浓度的 DNCB 溶液,于 75℃ 衍生 1 h,考察 DNCB 加入量,结果见表 1。当 DNCB 加入量为 8 mg 和 10 mg 时衍生物浓度已达到饱和,再增加衍生剂的量,只会增加 DNCB 的水解产物 DNP-OH 的量,考虑到 DNP-OH 色谱峰对邻近氨基酸组分分离的影响,并结合文献报道^[9-11],本实验选择 HYP 和 DNCB 量的比例为 1:5。

表 1 HYP 对照品溶液中 DNCB 加入量的考察

DNCB /g·L ⁻¹	峰面积	
	DNP-HyP	DNP-OH
4	1 197 444	18 077
8	1 377 499	59 567
16	1 478 236	125 111
20	1 499 209	191 927

2.5.2 股骨样品水解液中 DNCB 加入量的考察 取样品水解液 500 μL,加入 3 mL 0.05 mol·L⁻¹ 硼砂缓冲液(pH 9.5)和 0.5 mL 不同质量浓度的 DNCB 溶液,于 75℃ 衍生 1 h,考察 DNCB 加入量,

结果见表 2。当 DNCB 的加入量达到 10 mg 时, 衍生物浓度已达到饱和, 因此, 确定 DNCB 的加入量为 10 mg。

表 2 样品中 DNCB 加入量的考察

DNCB /g·L ⁻¹	峰面积	
	DNP-HyP	DNP-OH
10	640 492	368 663
15	1 214 260	256 656
20	1 750 707	383 911
30	1 672 430	923 861

2.5.3 pH 对衍生化结果的影响 衍生化反应在碱性溶液中进行, 不同 pH 的衍生缓冲液对衍生化有很大的影响, 因此本实验考察了不同 pH 的碱性溶液。取 HYP 储备液 0.5 mL, 加入 0.5 mL pH 8.0 ~ 10.5 的硼砂溶液和 0.5 mL 20 g·L⁻¹ DNCB 溶液, 于 75 °C 衍生 1 h。pH 9.0 ~ 9.5, 氨基酸衍生化程度最高。当 pH > 10.0, 不利于衍生的进行。因此, 选择 pH 9.0 ~ 9.5。

2.6 供试品溶液制备 取大鼠股骨, 经丙酮脱脂后在 110 °C 烤箱中烘干, 于研钵中磨碎。取 50 mg 骨粉放入 10 mL 试管中, 加入 1 mL 6 mol·L⁻¹ HCl, 封口后在 105 °C 烤箱中水解 24 h, 冷却后打开封口, 将水解液用 5 mol·L⁻¹ NaOH 中和至中性, 定容至 4 mL, 离心。精密吸取上清液 500 μL 至 EP 管中, 依次加入 3 mL 0.05 mol·L⁻¹ 硼砂缓冲液 (pH 9.5) 和 0.5 mL 20 g·L⁻¹ 的 DNCB 溶液。置 75 °C 恒温水浴暗处反应 1 h, 迅速冷却, 离心, 精密吸取上清液 2.5 mL 至小试管, 再加 0.5 mL 稀盐酸, 备用。

2.7 HYP 对照品溶液制备 取 HYP 对照品 1 mg, 精密称定, 置 1 mL 量瓶中, 加水配成 1 g·L⁻¹ 溶液做为 HYP 对照溶液, 精密吸取 500 μL 至 EP 管中, 依次加入 3 mL 0.05 mol·L⁻¹ 硼砂缓冲液 (pH 9.5) 和 0.5 mL 10 g·L⁻¹ 的 DNCB 溶液。置 75 °C 恒温水浴暗处反应 1 h, 迅速冷却, 离心, 精密吸取上清液 2.5 mL 至小试管, 再加 0.5 mL 稀盐酸, 备用。

按确定色谱条件及样品、HYP 对照品处理方法, 得到二硝基苯基羟脯氨酸 (DNP-HyP) 色谱、DNCB 水解物 (DNP-OH) 色谱和样品色谱, 见图 1 ~ 3。

以 DNP-HYP 的色谱峰计算柱效, 理论塔板数 $n = 5.54(t_R/W_{h/2})$, 为使其达到基线分离, 定量分析更准确, 故在系统适用性试验中规定理论塔板数不得低于 6 000。

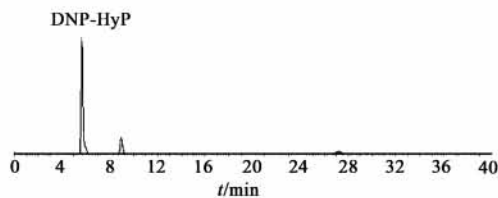


图 1 二硝基苯基羟脯氨酸 (DNP-HyP) 色谱

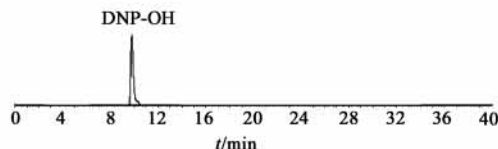


图 2 DNCB 水解物色谱

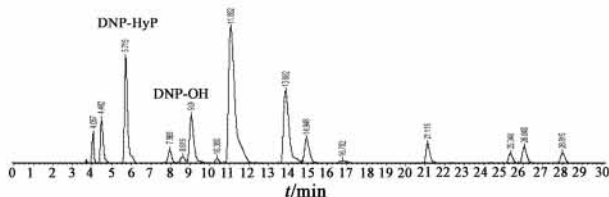


图 3 供试品溶液色谱

3 方法学考察

3.1 线性化范围考察 取适量 HyP, 用水配制成 0.125, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 g·L⁻¹ 系列对照溶液, 按“2.5”项方法制得 DNP-HyP, 并按色谱条件测定, 见表 3。以 DNP-HyP 峰面积 (A) 为横坐标, HyP 浓度 (C) 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 1.25 \times 10^{-7} X + 1.81 \times 10^{-3}$, $r = 0.9994$ 。表明, DNP-HyP 质量浓度 0.125 ~ 2.00 g·L⁻¹ 与衍生物 DNP-HyP 色谱峰峰面积呈正比关系。

表 3 HyP 浓度与衍生物 DNP-HyP 色谱峰峰面积的关系

HyP 质量浓度/g·L ⁻¹	DNP-HyP 峰面积
0.125	478 505
0.25	1 004 599
0.50	1 862 362
1.00	4 160 523
2.00	7 918 244

3.2 精密度实验 取同一样品溶液按“2.1”项下色谱条件重复进样 5 次。测定 HyP 含量的相对标准偏差 RSD 0.65%。说明仪器精密度良好。

3.3 重现性实验 取同一只大鼠骨粉分为 5 份样品, 按“2.4”项下样品制备方法。HyP 含量的相对标准偏差 RSD 3.6%。说明该实验方法重现性良好。

3.4 稳定性实验 同一样品溶液按“2.1”项下色谱条件, 于 0, 1, 5, 12, 24 h 后进样考察样品稳定性。HyP 含量的相对标准偏差 RSD 4.2%。说明样品溶液在 24 h 内稳定性良好, 在此范围内测定结果

准确。

3.5 加样回收率实验 取已知含量的样品5份,按样品中HyP的含量各按1:1比例加入HyP对照品。按“2.4”项下样品制备方法测定HyP的含量,计算加样回收率,结果见表4。结果显示,平均加样回收率在102.01%,RSD小于5%,说明该方法定量准确。

表4 加样回收率试验

编号	样重 /g	HyP 加入量 /mg	HyP 测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.1	27.40	53.34	105.60		
2	0.1	27.38	54.16	102.31		
3	0.1	27.40	55.91	96.07	102.01	4.2
4	0.1	27.39	53.12	106.46		
5	0.1	27.40	54.89	99.63		

4 样品测定和结果

按以上确定的样品溶液制备方法和色谱条件,测定大鼠股骨中HYP含量。

结果显示:大鼠去卵巢后股骨中HyP含量下降,模型组与假手术比较,差异显著($P < 0.01$)。尼尔雌醇组大鼠股骨HyP含量明显增加,与模型组比较,差异极显著($P < 0.01$),与假手术组比较,无统计学差异;卷柏水部位组和正丁醇部位组均能增加去势大鼠股骨中HyP含量,与模型组比较差异显著($P < 0.01$)。卷柏总部位也能增加去势大鼠股骨中含量,但作用很弱,与模型组,无统计学差异。结果见表5。

表5 卷柏不同部位对去势大鼠股骨中HyP含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	HyP /mg·g ⁻¹
假手术	-	10	27.20 ± 1.67 ⁴⁾
模型	-	9	19.55 ± 1.98 ²⁾
尼尔雌醇	1 ⁵⁾	10	26.51 ± 1.91 ⁴⁾
卷柏总部位	655	9	21.02 ± 2.04
卷柏水部位	490	8	24.79 ± 2.61 ⁴⁾
卷柏正丁醇部位	85	9	23.94 ± 1.81 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;⁵⁾ 尼尔雌醇为1 mg·kg⁻¹,1次/周。

5 讨论

近年来,高效液相色谱和各种柱前衍生相结合的氨基酸分析技术有很大发展,该技术最重要的步骤是柱前衍生化。目前,衍生化试剂很多,因此有多

种衍生化法^[12-13],本实验采用2,4-二硝基氯苯(DNCB)试剂作衍生化,其原理是DNCB在弱碱性溶液中与氨基酸发生取代反应,生成黄色化合物二硝基苯基氨基酸(dinitro phenyl amino acid,DNP氨基酸),生成的衍生物由于硝基苯环的引入,使DNP氨基酸在360 nm有很强的紫外吸收。

骨HyP是骨胶原特有的氨基酸,骨胶原占骨有机质的90%,所以骨HyP减少是骨基质减少的主要标志。去势大鼠股骨HyP含量明显降低,提示大鼠去卵巢后溶骨能力增强,从而加速了有机质胶原蛋白的降解,使骨吸收增加。而卷柏水部位和正丁醇部位可升高骨HyP含量,推测是由于抑制了破骨细胞的活性使骨有机质含量增加。研究结果显示,卷柏水部位作用好于正丁醇,但仍不及尼尔雌醇组。卷柏提取物对去势大鼠骨质疏松干预的作用机制还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 郑晓珂,吕鹏飞,王玲巧,等. 卷柏等5种中药植物雌激素活性筛选的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(15):1254.
- [2] 郑晓珂,毕跃峰,冯卫生. 卷柏化学成分研究[J]. 药学学报, 2004, 39(4):266.
- [3] 毕跃峰,郑晓珂,冯卫生. 卷柏中化学成分的分离与结构鉴定[J]. 药学学报, 2004, 39(1):41.
- [4] 刘学松,李定国,陆汉明. 肝细胞的胶原合成与肝纤维化[J]. 中华消化杂志, 1994, 14(1):53.
- [5] 李芳,史霄燕. 2,4-二硝基氯苯衍生化法在反相高效液相色谱测定氨基酸中的应用研究[J]. 色谱. 1995, 13(3):200.
- [6] 田静,吕坚. 高效液相色谱法测定大鼠纤维化肝组织中羟脯氨酸含量[J]. 中国药房, 2003, 14(3):145.
- [7] 吴艳,艾连中,丁先锋,等. 柱前衍生反相高效液相色谱法分析碱性氨基酸[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(1):74.
- [8] 刘鸿洲,尤瑞琛. 2,4-二硝基氯苯柱前衍生化法测定氨基酸的改进[J]. 亚热带植物通讯, 1999, 28(1):47.
- [9] 罗晓健,吴志鹏,黄璐琦,等. 氨基酸的柱前衍生高效液相色谱分析在中草药研究中的应用[J]. 中草药, 2005, 36(4):630.

[责任编辑 何伟]

DOI:CNKI;11-3495/R. 20110321. 1135. 012

大鼠真菌性腹腔炎症渗出液的上清液抗真菌作用研究

韦桂宁^{1,2}, 宋大彦³, 何德明¹, 李艳¹, 梁宁生^{1*}

(1. 广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021, 2. 广西中医药研究院, 南宁 530022,
3. 石家庄医学高等专科学校药理教研室, 石家庄 050081)

[摘要] 目的: 观察大鼠真菌性腹腔炎症渗出液的上清液中的抗菌物质对真菌的杀菌作用。方法: 给大鼠 ip 活的白色念珠菌 *Candida albicans* 造成真菌感染模型, 观察腹腔炎症渗出液的上清液对 *C. albicans*、光滑念珠菌 *C. glabrata*、热带念珠菌 *C. tropicalis* 的杀菌作用, 观察温度对上清液抗真菌作用的影响, 并在显微镜下观察杀灭 *C. albicans* 的过程。结果: 造模后 24 h 的腹腔炎症渗出大量渗出液, 渗出液上清液中含有大量的蛋白质, 渗出液上清液对 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* 具有强的杀菌作用, 杀菌作用受温度的影响, 56 ℃ 处理后杀菌活性几乎丧失, 上清液可使 *C. albicans* 菌体萎缩, 然后胞体破碎死亡。结论: 大鼠真菌性腹腔炎症渗出液上清液中存在强的抗真菌物质, 具有强的抗真菌作用, 可能通过对真菌的细胞壁/细胞膜而发挥作用。其可能是未被关注或未发现的抗菌蛋白/肽。

[关键词] 白色念珠菌; 腹腔炎症渗出液上清液; 抗真菌蛋白/肽

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0136-04

Fungicidal Effect of Peritoneal Exudates Supernatant in Rats Infected by *Candida albicans*

WEI Gui-ning^{1,2}, SONG Da-yan³, HE De-ming¹, LI Yan¹, LIANG Ning-sheng^{1*}

(1. Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;
2. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China;
3. Department of Pharmacology, Shijiazhuang Medical College, Shijiazhuang 050081, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the fungicidal activity of the substance in peritoneal exudates from inflammatory fluid of abdominal cavity in rats infected by *Candida albicans*. **Method:** The model of severe abdominal cavity inflammation was prepared by intraperitoneal administration of *C. albicans* to rats. The peritoneal exudates were collected and the fungicidal activity of peritoneal exudation supernatant were determined. **Result:** The peritoneal exudation supernatant collected at 24 h possessed the most potent fungicidal activity. The fungicidal activity of 80% peritoneal exudation supernatant collected at 24 h was dramatically declined after incubated in 56 ℃ for 10 min. *C. albicans* morphology changed gradually and their color turned dark, their thalline was shrunk and their cell wall was degraded after treated by peritoneal exudation supernatant for 30 min, *C. albicans* color turned dark further, the thalline was smaller further, and then was expired due to disruption lastly. **Conclusion:** The supernatant of inflammatory peritoneal exudates from abdominal cavity inflammation rat models infected by *C. albicans* possess potent fungicidal activity against fungus, the substances may be unknown fungicidal protein/

[收稿日期] 20110113(013)

[基金项目] 广西科学基金(桂科自 0832231); 广西卫生厅重点项目(重 200707)

[作者简介] 韦桂宁, 硕士, 主管药师, 主要从事中药药理研究, E-mail: weiguining2004@163.com

[通讯作者] * 梁宁生, 博士, 博士生导师, 主要从事抗菌蛋白、抗肿瘤药物研究, E-mail: Liang01@163.com

[网络出版时间] 2011-03-21 11:35