

## · 实验研究 ·

## HPGFC-ELSD 法测定商陆多糖的重均相对分子质量

徐从立, 陈海生, 谭兴起, 柳润辉, 宣伟东

(第二军医大学药学院天然药物化学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**测定商陆多糖的重均相对分子质量。**方法:**将商陆多糖分离纯化,采用 HPGFC-ELSD 法测定重均相对分子质量分布。测定条件为 TSK 柱(G 2000 SW, 7.5 mm×300 mm);水为流动相,流速 1.0 ml/min;漂移管温度 40℃;气体(N<sub>2</sub>)压力 2.0×10<sup>5</sup> Pa。**结果:**多糖重均相对分子质量的线性范围为 10 000~170 000( $r=0.973$ ),测得商陆多糖重均相对分子质量约为 76 896.4。**结论:**该法为多糖重均相对分子质量测定提供了简便实用的分析方法。

**[关键词]** 商陆多糖;高效凝胶过滤色谱法;蒸发光散射检测器;重均相对分子质量

**[中图分类号]** R 917 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0116-02

### Determination of weight average molecular weight of *Phytolacca acinosa* Roxb. polysaccharide by HPGFC-ELSD method

XU Cong-Li, CHEN Hai-Sheng, TAN Xing-Qi, LIU Run-Hui, XUAN Wei-Dong (Department of Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To determine the distribution of weight average molecular weight in the *Phytolacca acinosa* Roxb. polysaccharide. **Methods:** *Phytolacca acinosa* Roxb. polysaccharide was isolated and purified by high performance gel filtration chromatography (HPGFC) with evaporative light scattering detector (ELSD). Determination conditions were as follows: column: TSK (G 2000 SW 7.5 mm×300 mm); mobile phase: water; flow rate: 1.0 ml/min; drift tube temperature: 40℃; nebulizer gas (N<sub>2</sub>) pressure: 2.0×10<sup>5</sup> Pa. **Results:** The linear range of weight average molecular weight of polysaccharide was 10 000-170 000 ( $r=0.973$ ). The weight average molecular weight of *Phytolacca acinosa* Roxb. polysaccharide was 76 896.4. **Conclusion:** HPGFC-ELSD is a practical, reliable method for the determination of the polysaccharide weight average molecular weight.

**[KEY WORDS]** *Phytolacca acinosa* Roxb. polysaccharide; high performance gel filtration chromatography; evaporative light scattering detector; weight average molecular weight

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 116, 封三]

商陆(*Phytolacca acinosa* Roxb.)又名夜呼、野萝卜,为商陆科植物商陆和垂序商陆的根。近年研究发现商陆所含多糖成分具有增强免疫、抗肿瘤和保护造血功能的作用<sup>[1]</sup>。多糖的性质往往与其重均相对分子质量( $M_w$ )大小有关,例如:多糖溶液的黏度不但随浓度的增大而增大,而且与多糖的重均相对分子质量大小有关。在生物学研究中,发现某些多糖由于重均相对分子质量的不同所产生的效应差异较大<sup>[2]</sup>。因此测定多糖重均相对分子质量对研究其的性质具有重要意义。为了进一步研究商陆多糖的重均相对分子质量与生物学活性之间的组效关系,本研究对商陆粗多糖进行了纯化,并采用高效凝胶过滤色谱法(HPGFC),以蒸发光散射检测器(ELSD)作为检测手段,建立测定商陆多糖重均相对分子质量的分析方法。

#### 1 方法和结果

1.1 仪器与试剂 高效液相泵(LC-10A,日本岛津);ELSD(SEDEX 55,法国);冰冻干燥机(Virtis,美国);SR 色谱数据工作站(三锐科技有限公司);Sephadex G-25(Pharmacia,瑞典);葡聚糖标准品 Dextran T 10、T 40、T 70、T 90、T 170(Pharmacia,瑞典);双蒸水;苯酚(重蒸)、浓硫酸、三氯乙酸、

正丁醇、乙醇、氯仿均为分析纯;商陆粗多糖从陕西麟游产商陆中提取。

1.2 色谱条件 高效凝胶过滤柱 TSK, G 2000 SW, 7.5 mm×300 mm(LKB-Prodokter AB, Bromma, 瑞士);柱温 25℃;流动相为重蒸水;流速 1 ml/min;ELSD 漂移管温度 40℃;气体(N<sub>2</sub>)压力 2.0×10<sup>5</sup> Pa。

1.3 标准品溶液的制备 精密称取葡聚糖标准品各 1.0 mg 置于 1 ml 容量瓶,加水至刻度,制成 1.0 mg/ml 的标准溶液。

1.4 供试样品的制备 称取 5 g 商陆粗多糖,加水 10 ml 溶解,以 Saveg 法除去蛋白,室温离心(3 000 r/min),弃去不溶物,水溶液加入无水乙醇 40 ml,得沉淀,沉淀加水溶解,70℃减压回收至无醇味,加水稀释至 10 ml,进行 Sephadex G-25 柱层析,以水洗脱,每份收集 20 ml,以苯酚-硫酸法比色检测,收集含糖流分,浓缩后,冰冻干燥得商陆多糖,称取该多糖 1.0 mg 置于 1 ml 容量瓶,加水至刻度,以该溶液 20 μl 进

**[作者简介]** 徐从立(1970-),男(汉族),硕士,讲师。

E-mail: conglixu@163.com

样,经 HPGFC-ELSD 检测为单一峰( $t_R=5.473$  min)。

1.5 线性关系考察 分别取 Dextran T 10、T 40、T 70、T 90、T 170 标准溶液 20  $\mu$ l 进样,色谱峰保留时间  $t_R$  分别为 8.22、5.86、5.67、5.64、4.31min。以色谱峰的保留时间对标准品  $M_w$  的对数值进行回归,回归方程为: $t_R=20.03-2.981 \lg M_w$ , $r=-0.973$ 。 $M_w$  线性范围 10 000~170 000。

1.6 精密度和稳定性试验 取 Dextran T 70 的标准品溶液连续进样,记录色谱峰保留时间,计算相对标准偏差  $RSD=0.82\%$  ( $n=5$ );取同一供试品溶液日内每隔 2 h 进样 1 次,日内  $RSD=0.98\%$  ( $n=6$ ),连续 3 d 进样重复进样,日间  $RSD=1.53\%$  ( $n=4$ )。结果显示标准品溶液在 72 h 内稳定,以 1 d 内测定最佳。

1.7 重现性试验 取 1.4 项下制备的多糖样品,按供试样品溶液制备方法制成质量浓度为 1.0 mg/ml 的溶液,依法测定商陆多糖的  $M_w$ ,结果  $RSD=1.84\%$  ( $n=6$ )。

1.8 样品测定 精密量取对照品溶液(Dextran T 70)和样品溶液各 20  $\mu$ l,进样,结果保留时间  $t_R=5.47$  min ( $n=3$ ),代入回归方程求得商陆多糖重均相对分子质量  $M_w=76 896.4$ 。

## 2 讨论

蒸发光散射检测器是一种通用检测器,其原理是:柱洗脱液进入雾化器针管,在针的末端,洗脱液和  $N_2$  混合形成液滴,液滴流经加热的漂移管将溶剂挥发,样品在溶剂蒸气中形成小颗粒。被分析检测的物质颗粒通过一束狭窄的散射光由光电倍增管收集。ELSD 的响应取决于被分析颗粒的数量和大小<sup>[3]</sup>。由于样品测定过程中排除了用 UV 检测器时的溶剂干扰,大大改善了分析效果,该方法尤其适合于紫外吸收

较弱的样品的测定。由于本实验所用的葡聚糖标准品无紫外吸收,又无专属性很好的显色剂,因此本研究首次采用了以 ELSD 为检测器,对商陆多糖的  $M_w$  进行了测定,结果表明,ELSD 检测器对无紫外吸收的多糖的测定具有良好的稳定性、较高的灵敏度和重现性,所选用的色谱条件对商陆多糖具有较高的分离度。

流动相离子强度对多糖的保留时间有一定影响,商澎等<sup>[4]</sup>报道了不同离子强度的流动相对葡聚糖保留时间的影响,指出离子强度越低  $M_w$  与  $t_R$  回归方程的线性越差。由于本实验采用 ELSD 为检测器,一定离子强度的溶液含对该检测器存在较大影响,故本实验以双蒸水为流动相,结果回归方程的线性亦较好。

## 【参考文献】

- [1] 谢学建,张俊慧,马爱华.商陆多糖研究进展[J].时珍国医国药,1999,10(1):68-70.
  - [2] 张惟杰 主编.糖复合物生化研究技术[M].第2版.杭州:浙江大学出版社,1999.97-98.
  - [3] 冯埃生,邹汉法,汪海林,等.影响高效液相色谱/挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察[J].药物分析杂志,1996,16(6):414-416.
  - [4] 商澎,梅其炳,曹之宪,等.当归多糖组分的高效液相色谱分析[J].中国药学杂志,2000,35(5):332-335.
- Shang P, Mei QB, Chao ZX, et al. Analysis of Angelica polysaccharides constituents by high-performance liquid chromatography [J]. Zhongguo Yaoxue Zazhi (Chin Pharm J), 2000,35(5):332-335.
- [收稿日期] 2003-05-10 [修回日期] 2003-12-03  
[本文编辑] 曹静,尹茶

## Apoptosis is involved in the cardiac damage induced by sinoaortic denervation in rats

TAO Xia, ZHANG Shu-Hui, CHU Zheng-Xu, SU Ding-Feng (Department of Pharmacology, Basic Medical College, Second Military Medical University, Shanghai, China)

[SUMMARY] The arterial baroreflex plays an important role in the maintenance of the stability of blood pressure. Sinoaortic denervation (SAD) produces severe organ damage in rats. The present study was designed to investigate whether apoptosis, which is a ubiquitous physiological mode of cell death distinct from cell mortality induced by injury and necrosis, is involved in SAD-induced cardiac damage. Male Sprague-Dawley rats (10 weeks old) were used. Rats underwent SAD ( $n=9$ ) or sham operation ( $n=10$ ). Sixteen weeks after operation, the heart tissues were taken for investigations including electron microscopy, immunohistochemistry, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Cardiac hypertrophy and fibrosis was found in SAD rats. The number apoptotic cardiomyocytes was increased in SAD rats compared with sham-operated rats. The expression of Bcl-2 mRNA and protein (an inhibitory factor of apoptosis) in cardiomyocytes was decreased in SAD rats. In contrast, the expression of Bax, Fas and Fas ligand mRNA and proteins (promoters of apoptosis) in cardiomyocytes was significantly increased in SAD rats. In conclusion, the present study reveals a high level of apoptosis in cardiomyocytes in SAD rats. It is proposed that apoptosis is involved in SAD-induced cardiac damage.