

RP-HPLC 法测定白细胞中 LTB₄ 和 5-HETE 的含量*

□林景瑞 陈晓辉** 毕开顺 (沈阳药科大学药学院 沈阳 110016)
王灵芝 乔延江 (北京中医药大学中药信息工程中心 北京 100102)

摘要:目的:建立了 5-脂氧酶抑制剂筛选模型的 RP-HPLC 测定方法。方法:采用 Brava BDS C₁₈ 柱(250mm×4.6mm, 5μm),流动相为甲醇-0.02%乙酸水溶液,流速为 0.8 mL·min⁻¹, 5-LOX 的主要产物 LTB₄ 和 5-HETE 的检测波长分别为 275nm 和 235nm。结果:LTB₄ 和 5-HETE 分别在 2.0~50.0 μg·mL⁻¹($r = 0.9999$)和 5.0~125.0 μg·mL⁻¹($r = 1.0000$)范围内呈良好的线性关系;回收率分别为 100.0%和 97.7%(RSD 分别为 1.1%和 1.5%);日内、日间精密度的 RSD 分别为 0.7%,1.1%和 0.3%,1.3%。结论:该法分离效果和重复性均良好,且结果准确可靠,可用于 LTB₄ 和 5-HETE 的检测,为筛选新的具有抗炎活性的中药成分奠定了基础。

关键词:高效液相色谱法 LTB₄ 5-HETE 5-脂氧酶抑制剂

炎症是十分常见而又重要的基本病理过程,人类的绝大多数疾病都与炎症过程有关^[1]。中药在抗炎药物研究中,因药效好、不良反应少以及来源丰富等优势,越来越受到人们的重视,研究和开发新的具有抗炎活性的中药也逐渐成为热点^[2-3]。据文献报道^[4]有抗炎作用的中药有效成分按其化学结构分为苷类、生物碱类、黄酮类、挥发油类等。本文拟从 5-脂氧合酶(5-Lipoxygenase, 5-LOX)途径入手,研究中药在抗炎中的应用,建立 5-LOX 抑制剂筛选模型,从中药单体化合物库中筛选出有活性的 5-LOX 抑制剂或其母核,再进行新药的进一步开发。5-LOX 途径是炎症反

应中的重要过程,其产物白三烯 B₄(LTB₄)和 5-羟廿碳四烯(5-HETE)具有高度的生物活性和药理作用,参与了许多疾病的病理过程^[5],是强有力的炎症细胞趋化因子^[6]。本文建立了同时测定 LTB₄ 和 5-HETE 的 RP-HPLC^[7-8]法,为筛选新的具有抗炎活性的中药成分奠定了基础。

一、仪器与试剂

1. 仪 器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);HHS112 型恒温振荡水浴箱(江苏省医疗器械厂);MH-1 型微量振荡器(江苏海门其林贝尔仪器公

收稿日期:2009-06-08

修回日期:2009-06-19

* 北京市科委重点实验室(JD100260652):清热解毒中药有效成分发现研究,负责人:乔延江;国家中医药管理局中医药行业科研专项(200707010):针对病毒性疾病的中药活性发现关键技术研究,负责人:朱晓新。

** 联系人:陈晓辉,教授,博士生导师,主要研究方向:中药药效物质基础的研究,药物质量控制分析方法的研究和药物体内动力学过程的研究,Email:cxh-syphu@yahoo.com.cn。

司); QL-901 漩涡振荡器 (江苏海门麟仪器厂); DeLta320pH 指示计(上海梅特勒-托利多有限公司); SZM F124 制冰机 (日本 SANYO 电气公司); Agilent-8453 紫外可见分光光度计 (美国安捷伦科技公司); 微量加样器 (德国 Eppendorf 公司); MLS-3780 自动灭菌锅 (日本 SANYO 电气公司); Biofuge 低温高速离心机 (德国 Heraeus 公司)。

2. 试 药

角叉菜胶 (美国 Sigma 公司), LTB₄ (美国 Sigma 公司), 5-HETE (美国 Sigma 公司), 钙离子载体 A23187 (美国 Sigma 公司), 花生四烯酸 (美国 Sigma 公司), 前列腺素 B₂ (美国 Sigma 公司), 甲醇 (色谱纯, 英国 Caledon 公司), 乙腈 (色谱纯, 英国 Caledon 公司), 乙醇 (分析纯, 北京化工厂), 石油醚 (分析纯, 北京化工厂), 乙酸乙酯 (分析纯, 北京化工厂)。

二、方法与结果

1. 标准品溶液制备

分别精密称取 LTB₄ 和 5-HETE 对照品适量, 加甲醇溶解并制成 LTB₄ 浓度为 $0.10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 5-HETE 浓度为 $0.25\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合标准品储备液。

2. 内标物溶液制备

精密称取 PGB₂ 对照品适量, 用甲醇溶解并制成浓度为 $0.20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

3. 供试品溶液制备

Wistar 大鼠乙醚麻醉后, 于胸腔注射 1% 角叉菜胶 0.3mL, 4h 后将大鼠断头处死, 剪开右侧胸腔, 吸取胸腔渗出液, 加入 1mL Tris 缓冲溶液, 分 4 次洗胸腔, 合并所有胸腔渗出液和洗出液。在 1000rpm (4℃) 的条件下离心 10min, 沉淀细胞用 1640 培养液悬浮^[4], 调整细胞浓度至 1.1×10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

取白细胞悬液 0.9mL (1.1×10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$), 加药或溶剂, 37℃温孵 10min。依次分别加入下列试剂: $5\mu\text{L}$ 浓度为 $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} , $5\mu\text{L}$ 浓度为 $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Mg^{2+} , $5\mu\text{L}$ 浓度为 $5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 花生四烯酸, $5\mu\text{L}$ 浓度为 $40\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的钙离子载体 A23187, 混匀, 继续温孵 30min 后, 立即转移到预加 2mL 无水乙醇的离心管中终止反应, 涡悬振荡 2min, 加入 $20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标物 PGB₂ $10\mu\text{L}$ 。

向温孵后的乙醇溶液中加入双蒸水 10.5mL (使乙醇的浓度降为 15%), 于 5000rpm 离心 10min。上清液用 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸调节 pH 至 3.0 后, 过 Sep-Pak 固

相萃取小柱。依次用 15% 乙醇 20mL、双蒸水 20mL、石油醚 10mL 和乙酸乙酯 10mL 洗柱, 收集乙酸乙酯部分, 在氮气流中减压除去溶剂。残渣用 $100\mu\text{L}$ 甲醇溶解, 取 $10\mu\text{L}$ 进样。

4. 色谱条件

色谱柱: Grace Brava BDS-C₁₈ 柱 ($4.6\text{mm}\times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$); 流动相: 甲醇-0.02% 醋酸水溶液, 梯度洗脱 (0~5min, 比例为 77.8:22.2; 5~8min 比例由 77.8:22.2 调至 85:15; 8~18min, 比例为 85:15), 流速为 $0.8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长为 235nm 和 275nm, 柱温为 30℃, 进样体积为 $10\mu\text{L}$ 。在此条件下, 理论塔板数按 LTB₄ 计算不低于 8000, 3 种成分与相邻峰之间分离度均大于 1.5。阴性样品对供试品测定无干扰。结果见图 1。

5. 标准曲线与线性关系

精密量取对照品储备液 0.20、0.30、0.50、2.0、3.0、5.0mL, 分别置于 10mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1.0mL, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别取上述标准系列混合溶液 $10\mu\text{L}$ 进样, 在上述色谱条件下测定, 峰面积比值(y)对浓度(x)进行线性回归, 得 LTB₄ 和 5-HETE 的回归方程分别为: $y=6.470x+1.923$ ($r=0.9999$) 和 $y=13.58x+10.64$ ($r=1.0000$)。LTB₄ 和 5-HETE 的线性范围分别为 $2.0\sim 50.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $5.0\sim 125.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

6. 精密度试验

取同一浓度对照品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 计算 LTB₄ 和 5-HETE 含量的 RSD 分别为 0.1% 和 0.9%, 结果表明仪器精密度良好。

7. 重复性试验

按“供试品溶液的制备”项下方法操作制备 6 份供试品溶液, 在上述色谱条件下进样分析, LTB₄ 和 5-HETE 含量的 RSD 分别为 0.5% 和 0.7%, 表明方法重复性良好。

8. 稳定性试验

取供试品溶液在室温下放置, 分别于 0、1、2、4、8、24h 进样分析, LTB₄ 和 5-HETE 含量 RSD 分别为 0.7% 和 1.1%, 表明供试品溶液在 24h 内稳定。

9. 回收率试验

按“供试品溶液的制备”项下所述方法, 自“Wistar 大鼠乙醚麻醉后”起, 同法操作, 至“用 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸调节 PH 至 3.0”, 吸取制备好的供试品 0.5mL, 加入 LTB₄ 和 5-HETE 溶液适量。样品过 Sep-Pak 固相萃取小柱后, 依次用 15% 乙醇 20mL、双蒸水 20mL、石油醚 10mL 和乙酸乙酯 10mL 洗柱, 收集乙酸乙酯

部分,在氮气流中减压除去溶剂。残渣用 100 μ L 甲醇溶解,取 10 μ L 在上述色谱条件下进样分析。计算 LTB₄ 和 5-HETE 的平均加样回收率,分别为 100.0% 和 97.7%(RSD 分别为 1.1%,1.5%)。

10. 样品测定

按“供试品溶液的制备”项下所述方法制备样品溶液,在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,测得 LTB₄ 和 5-HETE 的浓度分别为 3.41 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 和 10.8 μ g $\cdot$ mL⁻¹。

三、讨论

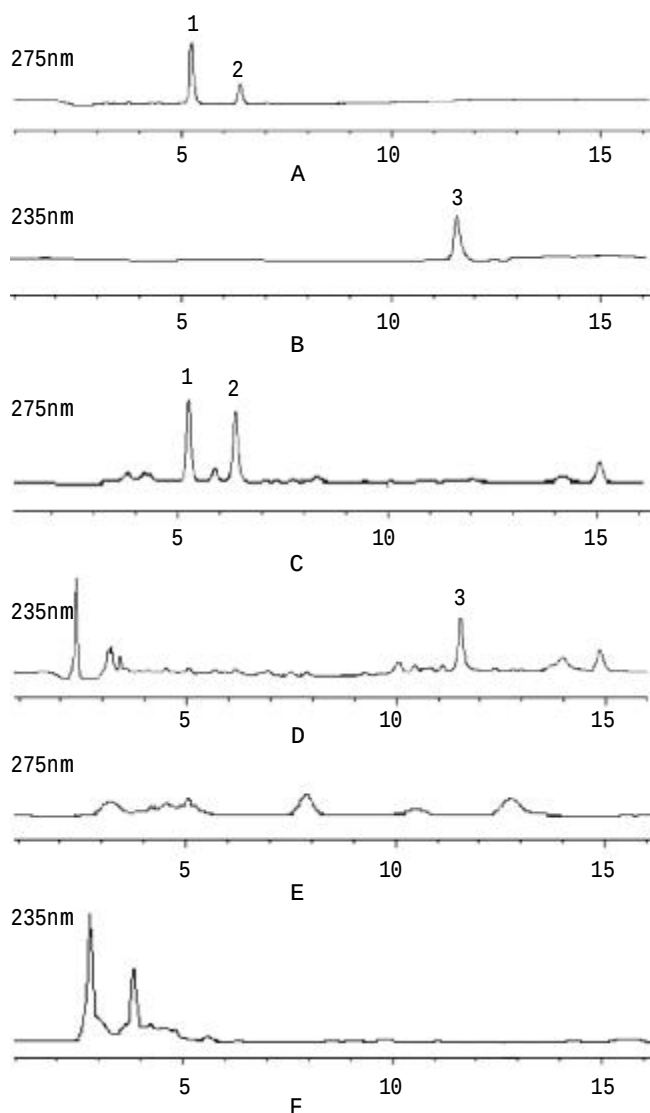


图 1 对照品(A, B)、样品(C, D)及阴性样品(E, F)色谱图

1. 前列腺素 B₂; 2. LTB₄; 3. 5-HETE

1. 实验过程优化

LTB₄ 和 5-HETE 是炎症细胞的 5-LOX 产物,故本实验首先制备有活性的炎症细胞,再加入 Ca²⁺、Mg²⁺、花生四烯酸和钙离子载体 A23187 对细胞反应进行诱导,使细胞产物量增加;利用固相萃取技术对细胞产物进行富集和分离,从而实现其高效液相色谱法的测定。与整体动物实验相比,可以节约时间,降低成本,能更有效、更有针对性地筛选到 5-LOX 抑制剂,缩短新药筛选时间。

2. 色谱条件优化

采用梯度洗脱及双波长法(分别为 LTB₄ 和 5-HETE 最大吸收波长)对 LTB₄ 和 5-HETE 进行了测定,优化了液相色谱测定条件,将复杂的细胞产物分析时间缩短在 16min 之内,很大程度地提高了效率。

3. 流动相的选择

为了优化实验条件,考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-醋酸水和乙腈-磷酸水溶液体系作为流动相对分离的影响,试验表明甲醇-醋酸水溶液体系所得色谱图中色谱峰分离度和峰形均良好,故选用甲醇-醋酸水溶液体系,又比较了甲醇-0.02%醋酸水和甲醇-0.5%醋酸水溶液体系,结果表明甲醇-0.02%醋酸水溶液体系较好。

4. 模型在中药中的应用

利用分析化学方法确证学实验证实了所建立模型的可靠性和稳定性,说明该模型可应用于大规模的筛选工作中。将所建立的模型应用于中药单体化合物的筛选中,筛选结果与计算机预测结果相差不大,说明计算机技术和活性筛选技术的结合是发现有活性中药单体化合物的有效手段;筛选结果还显示了如果某中药具有抑制 5-LOX 活性,其主要成分化合物也有极大的可能具有上述活性,这也为有导向的筛选提供了一些思路,可节约时间,提高效率。

四、结论

建立 5-LOX 抑制剂筛选模型对于从中药单体化合物库中筛选 5-LOX 抑制剂具有重要意义。在筛选中同时采用了计算机辅助药物设计技术、细胞技术、分子靶向技术和分析技术等先进技术手段。这些技术手段多元化的结合为中药新药开发技术平台的建立奠定了基础,同时也为中药现代化提供一定的参考思路。

在中药新药研究的早期阶段应用药物筛选技

术,可获得中药单体化合物对细胞产生的数据,从而提高发现活性化合物的速率,加快中药新药开发速度和提高药物筛选质量。本文建立药物筛选技术不仅可用于中药单体的筛选,还可用于复方和中药有效部位的研究,既可阐明中药作用机理,又可为现代化提取工艺和现代剂型在中药中应用做导向,从而为中医药的开发做出贡献。

本文应用 5-LOX 抑制剂筛选模型对具有 5-LOX 抑制活性的中药活性成分提取物进行了跟踪。在分离过程中,由于没有化合物类型的限制,只以活性为指标进行追踪,发现新化合物的可能性很大。对于不当操作还能迅速查明原因,并采取相应的措施进行补救。试验过程充分体现了以 5-LOX 抑制剂筛选模型为指导,既能快速高效地找到中草药中的有效成分,同时也可以解释中草药治病的部分分子机制,对中药的研究具有重要意义,也是中药新药开发的重要手段。

参考文献

- 1 STEINHILBER D. 5-lipoxygenase: a target for anti-inflammatory drugs revisited. *Curr Med Chem*, 1999, 6 (1):71~85.
- 2 曹玺.高通量药物筛选技术在中药现代化研究中的应用.云南中医中药杂志,2007,(12):36~38.
- 3 胡娟娟,杜冠华.药物筛选模型研究进展.基础医学与临床,2001,21(4):302~305.
- 4 季宇彬.中药抗炎免疫有效成分药理与应用.北京:人民卫生出版社,2007:204~268.
- 5 RASK-MADSEN J. 5-Lipoxygenase inhibitors for the treatment of inflammatory bowel disease. *Agents Actions: Special Conference Issue*, 1992:C38~C45.
- 6 司书毅,张月琴主编.药物筛选.北京:化学工业出版社,2007:294~308.
- 7 侯艳宁,朱秀媛,程桂芳.黄芩甙的抗炎机理.药学学报,2000,35(3):161~164.
- 8 JILLY F, ANDREW D, RALPH T, et al. What's all the FLAP about: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2008, 29 (2):72~80.

Determination of LTB₄ and 5-HETE in Leukocytes by RP-HPLC

Lin Jingrui, Chen Xiaohui, Bi Kaishun

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Wang Lingzhi, Qiao Yanjiang

(Research Center of TCM-information Engineering, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: This study aimed to develop an efficient RP-HPLC method for determination of 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibitory activity. The content of LTB₄ and 5-HETE, the main products of the 5-LOX metabolism pathway of arachidonic acid, was determined by the RP-HPLC method. The RP-HPLC was performed on a Brava BDS C₁₈ column (250mm×4.6mm, 5μm) using a mobile phase consisting of 0.02% acetic acid solution-methanol at 30 °C with the flow rate of 0.8mL·min⁻¹ and detection wavelength at 235nm and 275nm. As a result, the calibration curve was linear in the range of 2.0~50.0 μg·mL⁻¹ (r = 0.9999) for determination of LTB₄, and 5.0~125.0μg·mL⁻¹ (r=1.0000) for determination of 5-HETE. The average recoveries of LTB₄ and 5-HETE were 100.0% (RSD=1.1%) and 97.7% (RSD=1.5%), respectively. The intra-day and inter-day RSDs were 0.7%, 1.1% and 0.3%, 1.3%. Being sensitive, accurate and reliable with good reproducibility, this method is available for the screening of new anti-inflammatory active components of Chinese medicine.

Keywords: RP-HPLC; LTB₄; 5-HETE; 5-LOX

(责任编辑:崔建华 李沙沙,责任译审:张立威)