

葡萄籽原花青素对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力的改善作用及其机制研究[△]

陈伟^{1*}, 李晓², 陈美华¹, 王晓丹¹, 马健¹, 王浩¹, 张继国^{1#}(1.泰山医学院药学院, 山东泰安 271016; 2.山东省东阿县人民医院药剂科, 山东东阿 252200)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1760-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.08

摘要 目的:探究葡萄籽原花青素(GSP)对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠学习记忆能力的改善作用及其机制。方法:将50只大鼠随机分为假手术组、模型组和GSP高、中、低剂量组(400、200、100 mg/kg),除假手术组外其余大鼠海马组织注射 β -淀粉样蛋白1-42(A β ₁₋₄₂)建立AD模型,造模后48 h开始灌胃相应药物,假手术组和模型组大鼠灌胃相同体积的生理盐水,每日1次,连续给药21 d。给药14 d后采用新物体识别实验检测各组大鼠的新事物识别指数(TI);从给药16 d开始进行Morris水迷宫实验,学习5 d记录逃避潜伏期,末次给药后记录探索潜伏期和探索次数,Western blot法检测大鼠海马组织中NOD样受体蛋白3(NLRP3)的表达水平;酶联免疫吸附法检测大鼠海马组织中白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β 的含量。结果:5组大鼠Morris水迷宫学习5 d内的逃避潜伏期差异均无统计学意义($P>0.05$);与假手术组比较,模型组大鼠TI明显减小,探索潜伏期明显延长,探索次数明显减少,海马组织中NLRP3、IL-6、IL-1 β 水平均明显提高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,GSP各剂量组大鼠探索潜伏期明显缩短,探索次数和TI均明显增加,海马组织中NLRP3、IL-6、IL-1 β 水平均明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论:GSP可改善AD模型大鼠的记忆能力,其机制可能与抑制NLRP3炎性小体通路,减少炎症因子IL-6、IL-1 β 的产生有关。

关键词 葡萄籽原花青素;阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白1-42;NOD样受体蛋白3;炎症因子

Improvement Effects of Grape Seed Proanthocyanidins on Learning and Memory Ability of Alzheimer Disease Model Rats and Its Mechanism Study

CHEN Wei¹, LI Xiao², CHEN Meihua¹, WANG Xiaodan¹, MA Jian¹, WANG Hao¹, ZHANG Jiguo¹(1.School of Pharmacy, Taishan Medical College, Shandong Taian 271016, China; 2.Dept. of Pharmacy, Dong'e County People's Hospital, Shandong Province, Shandong Dong'e 252200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the improvement effects and its mechanism of grape seed proanthocyanidins (GSP) on learning and memory ability of Alzheimer's disease (AD) model rats. METHODS: Totally 50 rats were randomly divided into sham operation group, model group and GSP high-dose, medium-dose and low-dose groups (400, 200, 100 mg/kg). Those groups were given A β ₁₋₄₂ in hippocampus of rats to establish AD model except sham operation group and given relevant medicine intragastrically 48 h after modeling. Sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 21 d. 14 d after administration, new object recognition test was adopted to test new recognition index (TI). Morris water maze test was conducted since 16 d after administration. The escape incubation period of rats were recorded 5 d during learning. Exploration incubation period and the times of exploration were recorded after last administration. Western blot was used to detect the expression of NLRP3 in rat hippocampus. ELISA was used to determine the content of IL-6 and IL-1 β in rat hippocampus. RESULTS: There was no statistical significance in escape incubation period among 5 groups within 5 d of Morris water maze learning ($P>0.05$). Compared with sham operation group, TI of model group was decreased significantly, while exploration incubation period was prolonged significantly; the times of exploration was decreased significantly; the levels of NLRP3, IL-6 and IL-1 β in hippocampus were increased significantly, with statistical significance ($P<0.05$). Compared with model group, exploration incubation period of GSP groups were shortened significantly, while the times of exploration and TI were increased significantly; the levels of NLRP3, IL-6 and IL-1 β in hippocampus were decreased significantly, with statistical significance ($P<0.05$). CONCLUSIONS: GSP can improve the memory ability of AD model rats, the mechanism of which may be associated with inhibiting NLRP3 inflammatory corpuscle pathway and reducing the generation of inflammatory factors as IL-6 and IL-1 β .

[△] 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(No.81601229);山东省高等学校科技计划项目(No.J14LM03);山东省医药卫生科技发展计划项目(No.2017WS595);泰安市科技发展计划项目(No.20132083)

* 讲师,硕士。研究方向:神经药理学。电话:0538-6229751。E-mail:chenweilxq@163.com

通信作者:教授,硕士。研究方向:神经药理学。电话:0538-6229751。E-mail:jgzhang@tsmc.edu.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种慢性中枢神经系统退行性疾病,发病率逐年升高,但其发病机制尚不明确,现有治疗方法效果均不甚满意^[1]。 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)聚集是AD患者脑内的主要病理学特征之一。A β 沉积后激活小胶质细胞引起的炎症反应是AD的发病机制^[2]。NLRP3炎性小体属于胞内模式识别受体NOD样受体(NOD-like receptors, NLRs),在AD的发生发展中发挥了关键作用^[3]。葡萄籽原花青素(Grape seed proanthocyanidins, GSP)是从葡萄籽中提取的多酚类化合物,可改善血管性痴呆大鼠的学习记忆能力^[4],可保护A β_{25-35} 诱导的小鼠海马神经元损伤^[5],但对AD的作用尚未见公开报道。本研究以海马组织内注射A β_{1-42} 建立AD大鼠模型^[6],研究GSP对AD大鼠学习记忆能力的影响及其抑制炎症反应的可能机制,为GSP治疗AD提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

5804 R型高速台式低温离心机(德国Eppendorf公司);STRONG-II型脑立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司);INFINITE200 pro型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);Powerpac Basic型垂直电泳、电泳槽及转膜系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

GSP原料药(陕西省天之润生物科技有限公司,批号:TZR20140825,纯度:95.36%);BCA蛋白试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:20161109);ECL化学发光检测试剂盒(美国Thermo Scientific Pierce公司);A β_{1-42} (美国Sigma公司,批号:A9810,纯度: $\geq 95\%$);白细胞介素6(IL-6)和IL-1 β 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司,批号:20161223、20161008);NLRP3抗体(美国Santa Cruz公司); β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗和山羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物公司)。

1.3 动物

SPF级8周龄SD大鼠, δ ,体质量180~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001。本实验通过泰山医学院伦理委员会批准。

2 方法

2.1 分组与给药

所有大鼠自由饮食饲养7 d,按随机数字表法分组,分为假手术组、模型组和GSP高、中、低剂量组(400、200、100 mg/kg),每组10只,GSP给药剂量按文献^[4]与预实验确定。GSP以生理盐水制备混悬液,用前摇匀。造模48 h后各组大鼠开始灌胃相应剂量的药物,假手术组和模型组灌胃相同体积的生理盐水,每天1次,连续21 d。

2.2 建模

实验前一周以生理盐水将白色干粉A β_{1-42} 溶解制成5 μ g/ μ L溶液,并置于37 $^{\circ}$ C温箱中孵育1周,老化为具有神经毒性的凝聚状态的A β_{1-42} 。大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪,暴露前囟,以前囟为原点,向后4.0 mm,旁开2.5 mm穿刺点转穿颅骨,自脑表面进针3 mm,将2 μ L凝聚状态A β_{1-42} 在10 min内缓慢注入海马组织CA1区,假手术组注入等量生理盐水,留针5 min以保证其充分扩散;缓慢退针,局部消毒并缝合皮肤^[6]。

2.3 新物体识别实验

首次给药14 d后各组大鼠进行新物体识别实验评价大鼠的学习能力^[7]。实验分为适应、训练和测试三个阶段。适应阶段中,将大鼠逐个放入空箱中适应环境,每只大鼠适应10 min。24 h后开始训练,将2个完全一样的物体A放入行为箱的2个角落并固定,然后逐个放入大鼠探究学习A,训练10 min;间隔1 h后进入测试阶段,将行为箱中的其中一个物体A换成颜色、形状均不同的新物体B,记录大鼠对物体A和B的探究时间,分别表示为TA和TB,每只大鼠的测试时间为5 min,计算新物体识别指数TI=(TB-TA)/(TB+TA)。每只大鼠实验结束后清除粪便,并用75%乙醇擦拭行为箱和物体,清除排泄物及残留味道。

2.4 Morris水迷宫实验

实验分为定位航行实验和对位空间探索实验两部分^[6]。给药后第16天开始进行定位航行实验评价大鼠的学习能力,在第一象限放置隐蔽平台,选任一象限将大鼠面向池壁放入水池,记录大鼠从入水至爬上隐蔽平台所需的时间,即为逃避潜伏期。如2 min内大鼠未找到隐蔽平台,则将大鼠引导至平台并停留10 s,并将逃避潜伏期记录为2 min。每天训练4次,计算所需时间的平均值为当天的逃避潜伏期,连续训练5 d,每天固定时间段训练。给药21 d后进行对位空间探索实验评价大鼠的记忆能力,即将隐蔽平台撤掉,在原放置平台的对位象限处放入大鼠,记录大鼠首次进入原平台位置的时间,即探索潜伏期,并记录2 min内大鼠进入原平台区的次数,即探索次数。

2.5 Western blot法检测海马组织中NLRP3表达水平

对位空间探索实验后,处死大鼠,分离脑海马组织,-80 $^{\circ}$ C冻存。用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液匀浆后冰上裂解30 min,4 $^{\circ}$ C下12 000 \times g离心20 min,经BCA蛋白试剂盒测定蛋白浓度,加上样缓冲液后煮沸5 min。取30 μ g总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),凝胶蛋白电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,8%脱脂奶粉封闭4 h, β -actin(1:2 000)、NLRP3(1:800)抗体室温孵育2 h,4 $^{\circ}$ C过夜,TBST缓冲液充分洗膜后,经山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗室温孵育2 h,加ECL于凝胶成像系统中曝光显影。应用Image J

软件检测灰度值,以 β -actin为内参,以NLRP3与内参灰度值的比值表示海马组织中NLRP3的相对表达量。实验重复3次。

2.6 ELISA法测定大鼠海马组织中IL-6、IL-1 β 的含量

取大鼠海马组织,4℃下1500×g离心20min,收集上清液,经BCA蛋白试剂盒测定蛋白浓度。上清液加入平衡液,根据IL-6、IL-1 β ELISA试剂盒说明书,样品加入预先包被IL-6、IL-1 β 抗体的酶标板孔中,于37℃反应1h,充分冲洗酶标板孔,再与HRP酶底物共同孵育显色,加入终止液,应用酶标仪于450nm波长处测定吸光度,计算IL-6、IL-1 β 的含量。实验重复3次。

2.7 统计学方法

用GraphPad Prism 5.0软件进行统计处理,各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采取单因素方差分析,组间两两比较应用SNK- q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 TI

与假手术组比较,模型组大鼠的TI明显减少($P<0.05$),提示注射 $A\beta_{1-42}$ 会损害大鼠的学习记忆能力。与模型组比较,GSP高、中、低剂量组大鼠的TI明显增加($P<0.05$),且各剂量组间差异无统计学意义($P>0.05$),提示从灌胃GSP 14d开始已经发挥改善学习能力的作。各组大鼠的TI测定结果见表1。

表1 各组大鼠的TI测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药剂量,mg/kg	TI
假手术组		0.61±0.13
模型组		0.33±0.12*
GSP高剂量组	400	0.51±0.12*
GSP中剂量组	200	0.50±0.10*
GSP低剂量组	100	0.49±0.03*

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, * $P<0.05$

3.2 逃避潜伏期

与假手术组比较,模型组大鼠学习期内的逃避潜伏期均有所延长,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,GSP高、中、低剂量组大鼠学习期内的逃避潜伏期均有缩短,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠学习期内的逃避潜伏期见表2。

表2 各组大鼠学习期内的逃避潜伏期($\bar{x} \pm s, n=10, s$)

Tab 2 Escape incubation period of rats in each group during learning period ($\bar{x} \pm s, n=10, s$)

组别	给药剂量,mg/kg	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
假手术组		64.38±27.25	34.21±19.85	18.92±5.32	16.46±7.53	23.75±11.07
模型组		58.54±19.92	46.46±18.94	33.79±11.06	24.25±9.23	26.58±14.97
GSP高剂量组	400	53.04±18.31	32.38±18.36	19.46±7.27	20.25±8.13	21.50±8.66
GSP中剂量组	200	59.54±17.56	38.17±16.04	21.88±8.71	20.38±8.93	22.33±16.75
GSP低剂量组	100	60.88±18.62	37.83±17.42	22.96±6.19	21.54±9.87	27.04±13.48

3.3 探索潜伏期与探索次数

与假手术组比较,模型组大鼠的探索潜伏期明显延长($P<0.05$),探索次数明显减少($P<0.05$);与模型组比较,GSP高、中、低剂量组大鼠的探索潜伏期均明显缩短($P<0.05$),探索次数明显增加($P<0.05$),但各剂量组间差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠的探索潜伏期和探索次数见表3。

表3 各组大鼠的探索潜伏期和探索次数($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Exploration incubation period and exploration times of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药剂量,mg/kg	探索潜伏期,s	探索次数
假手术组		27.67±19.72	6.67±1.97
模型组		56.67±30.31*	1.17±1.60*
GSP高剂量组	400	24.67±8.94*	5.00±2.61*
GSP中剂量组	200	26.00±10.49*	4.83±2.61*
GSP低剂量组	100	28.67±11.57*	4.21±1.10*

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, * $P<0.05$

3.4 海马组织中NLRP3的表达

与假手术组比较,模型组大鼠海马组织中NLRP3的相对表达量明显增加($P<0.05$);与模型组比较,GSP高、中、低剂量组大鼠海马组织中NLRP3的相对表达量明显减少($P<0.05$),但各剂量组间差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠海马组织中NLRP3表达的电泳图见图1,测定结果见表4。

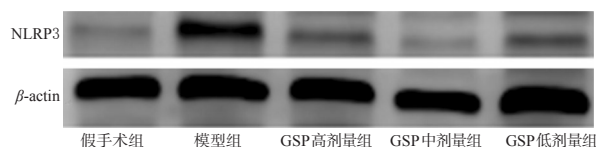


图1 各组大鼠海马组织中NLRP3表达的电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of the expression of NLRP3 in hippocampus of rats in each group

表4 各组大鼠海马组织中NLRP3表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 The expression of NLRP3 in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药剂量,mg/kg	NLRP3
假手术组		0.37±0.13
模型组		0.80±0.13*
GSP高剂量组	400	0.50±0.17*
GSP中剂量组	200	0.54±0.26*
GSP低剂量组	100	0.57±0.17*

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, * $P<0.05$

3.5 海马组织中IL-6、IL-1 β 含量的变化

与假手术组比较,模型组大鼠海马组织中IL-6、IL-1 β 的含量明显增加($P<0.05$);与模型组比较,GSP高、中、低剂量组大鼠海马组织中IL-6、IL-1 β 的含量明显减少

($P < 0.05$), 但各剂量组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠海马组织中 IL-6、IL-1 β 的含量见表 5。

表 5 各组大鼠海马组织中 IL-6、IL-1 β 的含量($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, ng/g)

Tab 5 The contents of IL-6 and IL-1 β in hippocampus of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, ng/g)

组别	给药剂量, mg/kg	IL-6	IL-1 β
假手术组		153.80 \pm 46.56	131.60 \pm 22.25
模型组		256.00 \pm 44.61*	243.40 \pm 31.31*
GSP 高剂量组	400	158.00 \pm 43.64*	144.40 \pm 22.28*
GSP 中剂量组	200	175.30 \pm 58.35*	171.80 \pm 37.30*
GSP 低剂量组	100	180.80 \pm 26.37*	172.10 \pm 48.14*

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$

4 讨论

随着人口老龄化进展, AD 成为危害公共健康最严重的疾病, 医学工作者一直在努力探索 AD 的发病机制, 并提出胆碱能学说、tau 蛋白磷酸化学说及 A β 学说等, 其中 A β 学说占据主导地位^[8]。目前关于炎症学说的研究愈渐增多^[2], 研究认为 A β 沉积可以激活小胶质细胞, 释放炎症因子, 最终导致神经元凋亡或死亡^[9]。还有研究证实, 某些化合物如积雪草苷通过减少 IL-6、TNF- α 的生成抑制炎症反应, 可以保护 AD 模型大鼠学习记忆能力^[6]。

GSP 是从葡萄籽中提取的多酚类化合物, 具有广泛的药理作用, 如抗肿瘤^[9]、肝保护^[10]等。有研究认为 GSP 可通过抗氧化作用改善血管性痴呆模型大鼠的空间学习记忆等^[4], 但 GSP 对 AD 的作用及机制尚未见文献报道。本实验采用经典的向海马组织中注射 A β_{1-42} 的方法建立 AD 大鼠模型, 探究 GSP 对 AD 模型大鼠学习记忆能力的改善作用。结果表明, GSP 在第 14 天时即可明显增加 AD 模型大鼠的 TI, 表现出明显的改善 AD 模型大鼠学习记忆能力的作用。随后本研究通过 Morris 水迷宫实验验证 GSP 治疗 AD 的效果, 其中定位航行实验学习期持续 5 d, 经重复训练, 大鼠均能找到隐蔽平台, GSP 具有缩短 AD 模型大鼠的逃避潜伏期的趋势; 第 21 天对位空间探索实验中, GSP 可明显缩短 AD 模型大鼠的探索潜伏期, 增加探索次数, 进一步表明 GSP 可以改善 AD 模型大鼠的学习记忆能力。

NLRP3 炎性小体的结构由 NLR 蛋白、凋亡相关点样蛋白(ASC)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)的前体(pro-Caspase-1)组成, NLR 蛋白可以识别配体和危险信号, 比如 A β 及细菌、病毒的 DNA 等, ASC 通过 CARD 结构域募集并激活效应蛋白 pro-Caspase-1^[11]。NLRP3 炎性小体是目前研究最多的炎性小体, 在中枢神经系统中存在于星形胶质细胞和小胶质细胞中, NLRP3 炎性小体参与 AD 的发生发展过程^[12], 这一理论为 AD 治疗的研究提供新靶点和新思路。实验证实, 激活 NLRP3 炎性小体, 可以增加 APP/PS1 双转基因小鼠脑内 A β

堆积, 加快 AD 病理演变进程, 而 NLRP3 的基因缺失, 可促进 A β 的消除, 明显改善 APP/PS1 双转基因小鼠空间记忆障碍^[13]。本实验发现, GSP 给药 21 d 时可明显减少注射 A β_{1-42} 的海马组织中 NLRP3 的表达, 表明 GSP 可以抑制 A β_{1-42} 诱导的 NLRP3 炎性小体活化, 发挥抗炎作用。

NLRP3 炎性小体活化, 可通过 Caspase-1 剪切无活性的促炎细胞因子 IL-6、IL-1 β 的前体成为成熟的 IL-6、IL-1 β 等炎症因子^[14]。IL-6、IL-1 β 等炎症因子可激活胶质细胞中核因子 κ B(NF- κ B), 使细胞因子上调, 并且通过激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)-p38 信号增强神经元中 A β 分泌酶 1(BACE1)蛋白的活性, 增加 A β 的合成和沉积^[15]。本实验还发现, GSP 可明显减少大鼠海马组织中 IL-6、IL-1 β 的含量, 据此推测 GSP 可能通过抑制 A β_{1-42} 诱导的 NLRP3 炎性小体活化, 减少 IL-6、IL-1 β 的生成, 进而发挥保护 AD 大鼠学习记忆能力的作用。但 GSP 抑制 NLRP3 炎性小体活化的具体机制尚不明确, 还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] RIEDERER BM, LEUBA G, VERNAY A, et al. The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(3): 268-276.
- [2] CAMERON B, LANDRETH GE. Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(3): 503-509.
- [3] ZHANG YY, FAN YC, WANG M, et al. Atorvastatin attenuates the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the hippocampus of an amyloid β_{1-42} -induced rat model of Alzheimer's disease [J]. *Clin Interv Aging*, 2013, 8(4): 103-110.
- [4] 周恒, 林焕冰, 卓焯, 等. 葡萄籽原花青素对血管性痴呆大鼠空间学习记忆能力的影响 [J]. *药学实践杂志*, 2011, 29(3): 208-211.
- [5] 何清, 杨思雨, 汪琴, 等. 原花青素对 A β_{25-35} 诱导的小鼠海马神经细胞毒性的影响 [J]. *中国临床神经科学*, 2014, 22(5): 481-488.
- [6] 黄雅兰, 黄江, 宋大强, 等. 积雪草苷对阿尔茨海默病模型大鼠海马组织中 PAPR- γ 蛋白表达的影响 [J]. *中国药房*, 2016, 27(34): 4791-4794.
- [7] HATTIANGADY B, MISHRA V, KODALI M, et al. Object location and object recognition memory impairments, motivation deficits and depression in a model of Gulf War illness [J]. *Front Behav Neurosci*, 2014. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00078.
- [8] HUANG Y, MUCKE L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1204-1222.
- [9] 张慧瑛, 邢芙玲, 罗光宏, 等. 葡萄籽原花青素抑制小鼠 B16-F0 黑色素瘤细胞黑色素生成的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(1): 63-66.
- [10] 李小丽, 王楷扬, 胡建辉, 等. 葡萄籽原花青素对 CCl₄ 诱

手性金属-有机骨架材料 $[Zn_2(D-Cam)_2(4,4'-bpy)]_n$ 薄层色谱对苯磺酸氨氯地平外消旋体的分离研究^Δ

张美*,钟帅,刘涵,杨宽林,饶高雄[#](云南中医学院中药学院,昆明 650500)

中图分类号 R914.3;R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1764-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.09

摘要 目的:建立一种分离苯磺酸氨氯地平外消旋体的方法。方法:先合成手性金属-有机骨架材料 $[Zn_2(D-Cam)_2(4,4'-bpy)]_n$ (简称为Zn-MOF)并对其进行X射线粉末衍射表征,由其与GF254硅胶混合制备薄层色谱固定相后用于分离苯磺酸氨氯地平外消旋体;以两个对映体的比移值和分离度为指标优选分离条件(展开剂组成及比例、手性Zn-MOF的用量等)并进行方法的重现性试验。结果:成功合成了手性Zn-MOF材料并经表征证实;优选的分离条件为取0.10 g手性Zn-MOF混合1.5 g GF254硅胶制备薄层色谱板、展开剂为乙腈-仲丁醇(30:70, V/V)。在此条件下,苯磺酸氨氯地平外消旋体实现了有效分离,所得斑点大小均一,比移值 >0.27 ,分离度约为2(RSD=3.8%, $n=3$)。结论:由手性Zn-MOF制备的薄层色谱固定相对苯磺酸氨氯地平外消旋体具有较好的手性识别能力,且其分离方法操作简单,结果直观、准确、重现性好。

关键词 手性固定相; $[Zn_2(D-Cam)_2(4,4'-bpy)]_n$;薄层色谱;苯磺酸氨氯地平外消旋体;分离

Study on Resolution of Amlodipine Benzenesulfonate Racemates by Using Chiral Metal-organic Frameworks $[Zn_2(D-Cam)_2(4,4'-bpy)]_n$ TLC

ZHANG Mei, ZHONG Shuai, LIU Han, YANG Kuanlin, RAO Gaoxiong (College of TCM, Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the resolution of Amlodipine benzenesulfonate racemates. METHODS: The chiral metal-organic frameworks $[Zn_2(D-Cam)_2(4,4'-bpy)]_n$ (called Zn-MOF for short) were synthesized, and X ray powder diffraction characterization was also performed. Chiral Zn-MOF was mixed with GF254 silica gel to prepare TLC solid phase and separate Amlodipine benzenesulfonate racemates. Using specific shift value and resolution degree of 2 enantiomers as index, resolution condition (composition and proportion of developing agent, amount of chiral Zn-MOF) were optimized and reproducibility test of method was also conducted. RESULTS: Chiral Zn-MOF material was successfully synthesized and confirmed after characterization. The optimal resolution condition was as follows as 0.10 g chiral Zn-MOF mixed with 1.5 g GF254 silica gel TLC plate, acetonitrile-butanol as developing agent (30:70, V/V). Under the condition, Amlodipine benzenesulfonate racemates was separated effectively; obtained spots were uniform in size with specific shift value >0.27 and resolution rate of 2 (RSD=3.8%, $n=3$). CONCLUSIONS: The stationary phase of TLC which is prepared by chiral Zn-MOF shows excellent chiral recognition, and resolution method is simple in operation. The result is intuitionistic, accurate and reproducible. The method is suitable for the chiral resolution of Amlodipine benzenesulfonate racemates.

KEYWORDS Chiral stationary phase; $[Zn_2(D-Cam)_2(4,4'-bpy)]_n$; TLC; Amlodipine benzenesulfonate racemates; Resolution

导小鼠氧化性肝损伤的保护作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2016, 27(13): 1752-1755.

[11] SCHRODER K, TSCHOPP J. The inflammasomes[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 821-832.

[12] TAN MS, YU JT, JIANG T, et al. The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.21665030);云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项项目(No.2017FF116-009)

* 讲师,博士。研究方向:药物及其制剂分析。电话:0871-65918232。E-mail:meizhang213@163.com

通信作者:教授,硕士。研究方向:药物化学、中药及其制剂质量分析。电话:0871-65918232。E-mail:917884128@qq.com

(3): 875-882.

[13] HENEKA MT, KUMMER MP, STUTZ A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice[J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 674-678.

[14] YANG CS, SHIN DM, JO EK. The role of NLR-related protein 3 inflammasome in host defense and inflammatory diseases[J]. *Int Neurol J*, 2012, 16(1): 2-12.

[15] MINKIEWICZ J, RIVEROVACCARI JP, KEANE RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome [J]. *Glia*, 2013, 61(7): 1113-1121.

(收稿日期:2018-01-10 修回日期:2018-05-16)

(编辑:邹丽娟)