

化合物Ⅵ:白色针晶,mp 190 ℃~191 ℃;UV、IR、¹H、¹³CNMR 数据与 grandidentatin^[2,5]基本一致,鉴定化合物Ⅵ为 grandidentatin。

化合物Ⅶ:白色针晶,mp 156 ℃~157 ℃;UV、IR、¹H、¹³CNMR 数据与 salireposide^[2,7]基本一致,鉴定化合物Ⅶ为 salireposide。

参考文献

- 1 Thieme H. Pharmazie, 1963, 18:770
- 2 Dommissie R A, Van H L, Vietinck A J. Phytochemistry, 1986, 25(5):1021
- 3 林茂,李守珍. 药学学报, 1993, 28(6):437
- 4 Lindroth L R, Stephen M T, Scriber J M. Biochem Syst Ecol, 1987, 15(6):677
- 5 Pearl I A, Darling S F. Tappi, 1965, 48(9):506
- 6 Pearl I A, Darling S F. J Org Chem, 1962, 27(5):1806
- 7 裴月湖,李晓华,王素贤,等. 中草药, 1983, 14(10):1

(1999-12-21 收稿)

从蜂毒中分离纯化蜂毒肽的实验研究[△]

江西中医学院基础部(南昌 330006) 徐 彭* 欧阳永伟 黄敬耀 张桂英 肖 诚 刘 波

摘 要 为了建立一条适合国内采用的提取纯化蜂毒肽的工艺路线,本课题采用溶媒萃取、化学裂解和含与不含 4 mol/L 脲的醋酸盐缓冲液的两次凝胶过滤柱层析的方法,可以从蜂毒中得到电泳纯的蜂毒肽,其静脉注射的 LD₅₀ 为 4.0 mg/kg,在试管内的 HD₅₀ 为 8.0 mg/L,在 0.25 mg/L 时,即可使红细胞膜的流动性有明显增强。

关键词 蜂毒 蜂毒肽 分离纯化 溶媒萃取法 化学裂解法 凝胶过滤柱层析

蜜蜂毒(Bee Venom,简称蜂毒)是由蜜蜂毒腺产生后贮存于毒囊中,当蜜蜂受刺激时从其尾部螫针排出的一种毒液,蜂毒能治病的偶然,开创了人类利用蜂毒治病的悠久历史。虽然蜂毒是经受了千百年长时期考验的对某些疾病确有疗效的天然药物,古今中外对蜂毒医疗应用积有丰富的经验,而且蜂毒资源丰富,现代关于蜂毒的基础与应用研究也相当活跃,但到目前为止,蜂毒的临床应用仍很有限,尚未有任何国家将蜂毒的制剂收入药典,究其原因,主要是蜂毒的成分众多,作用复杂,制成单体制剂的工艺复杂,成本较高,因此,探索提纯蜂毒单体成分的研究很有意义。在蜂毒的众多成分中,以蜂毒肽(melittin)的含量最高,生物活性最强,具有最为广阔的临床应用前景^[1]。国外虽有其分离提纯方法的报道^[2,3],但其工艺复杂、条件苛刻,难以在工业生产中采用。本文报道一条适合国内使用的提取纯化蜂毒肽的工艺路线。

1 试剂与仪器

1.1 蜜蜂毒:购自浙江省缙云县养蜂场,系由西方蜜蜂(*Apis mellifera*,亦称为意蜂)的工蜂螫针排出的一种毒液,用取毒器收集并干燥成粉末状。购进后,经蒸馏水(4 ℃)溶解并过滤除去蜜蜂螫针等不溶物,冷冻干燥得淡黄色粉末(此为原料蜂毒),干燥

器内保存备用。

1.2 试剂:葡聚糖凝胶 Sephadex G-10、G-25、G-50 均为中国长征制药厂产品,盐酸胍、溴化氰均为华美生物工程公司进口分装产品、化学纯,Ampholin 为瑞典 LKB 公司产品,亚硫酸钠和对氯汞苯甲酸均为国产化学纯,氨水、正丁醇、甲酸等均为国产分析纯。

1.3 仪器:HD-85-5 AI 核酸蛋白检测仪为浙江省永嘉电器厂产品,WLB-78-C 型电子微量泵为浙江新昌国康仪器厂产品,BS-100A 自动部分收集器和 TH-1000 梯度混合器均为上海沪西分析仪器厂产品,ZF-Q81 旋转浓缩蒸发器为上海医械专机厂产品,Yamato 冷冻干燥器为日本大和株式会社产品,DYY-Ⅲ 8B 型稳压稳流定时电泳仪为北京六一仪器厂产品,721 分光光度计为上海第三分析仪器厂产品。

1.4 动物:昆明种小鼠、普通种家兔均由江西中医学院动物房提供。

2 方法与结果

2.1 蜂毒肽的分离纯化

2.1.1 蜂毒的溶媒萃取:参照文献^[2],取蜂毒 500 mg,溶于 30 mL 0.15 mol/L NH₄OH 中,加入 20 mL 正丁醇,剧烈振摇,离心(3 000 r/min) 20 min,收集醇层并继续用正丁醇萃取 2 次,合并萃取液,25 ℃回收正丁醇,冷冻干燥,得产物 A(简称 A)437

* Address: Xu Peng, Department of Basic, Jiangxi College of TCM, Nanchang

徐 彭 男,1981 年毕业于江西中医学院药学专业,理学士,副教授,江西中医学院基础部副主任。主要从事生物毒素的分离提纯及其生物学作用和中药药理的实验研究,参与或主持过多个国家及省部级科研课题,在国内学术刊物上发表论文 10 余篇。联系电话:0791-6811713。

[△]本课题为国家中医药管理局青年基金资助课题

mg。

2.1.2 产物A的凝胶过滤柱层析:取产物A 100 mg,溶解于10.0 mL含有4 mol/L 脲的醋酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.75, 此为缓冲液甲)中,上葡聚糖凝胶G-50柱(2×80 cm),用缓冲液甲洗脱(图1),洗脱液以溶血试验进行蜂毒肽的生物活性跟踪,收集溶血活性作用最强的吸收峰V共55 mL,旋转蒸发器(25℃)浓缩,浓缩液通过葡聚糖凝胶G-10(2×50 cm)柱脱盐,冷冻干燥,得产物B 77 mg。

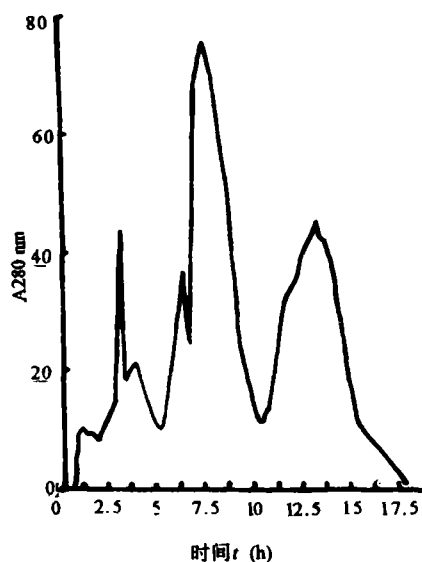


图1 A的Sephadex G-50层析

2.1.3 产物B的化学裂解:参照文献^[3],取产物B 77 mg,溶解于20 mL的含有3 mol/L 盐酸胍、55 mmol/L 亚硫酸钠和2.3 mmol/L 对氯汞苯甲酸的溶液中,整个溶液用NH₄OH调到pH 7.0,在37℃孵化2 h,然后此溶液按上法脱盐并冻干,冻干物溶于装有70%甲酸30 mL的带塞玻璃瓶中,加入50 mg的溴化氰结晶,混合,在室温下保持24 h,然后用水稀释5倍并按上法浓缩、脱盐并冻干,得产物C(简称C)60 mg。

2.1.4 产物C的凝胶过滤柱层析:取产物C 60 mg溶解于2.0 mL 醋酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.75, 此为缓冲液乙)中,上葡聚糖凝胶G-25柱

(1.0×100 cm),用缓冲液乙洗脱(图2),洗脱液以溶血试验进行蜂毒肽的活性跟踪,收集溶血活性作用最强的吸收峰Ⅱ共40 mL,按上法浓缩、脱盐并冻干,得产物D 45 mg,此即为产物蜂毒肽。产物蜂毒肽的得率为39.33 mg/100 mg 蜂毒($437/500 = 0.874, 0.874 \times 45/100 = 0.3933$)。

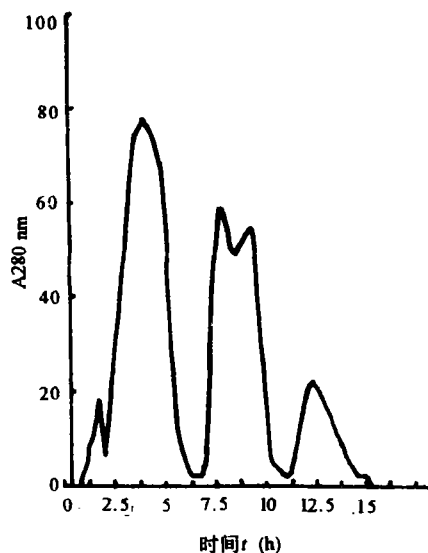


图2 C的Sephadex G-25层析

2.2 产物蜂毒肽的生物活性测定

2.2.1 半数致死量(LD₅₀)的测定:取体重18~20 g健康小鼠100只,雌雄搭配,随机均匀分成10组。产物蜂毒肽及蜂毒各用5个剂量组,剂量按等比级数排列,剂量间比例为1:0.75,静脉注射给药,给药后观察并记录小鼠的死亡情况,实验数据按Litchfield & Wilcoxon方法用对数机率方格纸作图,测得蜂毒的LD₅₀为4.3 mg/kg,产物蜂毒肽的LD₅₀为4.0 mg/kg。

2.2.2 半数溶血量(HD₅₀)的测定:参照文献^[3],取产物蜂毒肽及蜂毒进行溶血试验观察,测得产物蜂毒肽的HD₅₀为8.0 mg/L,蜂毒的HD₅₀为9.0 mg/L。

2.2.3 对家兔红细胞膜流动性的影响:参照文献^[4,5],取产物蜂毒肽及蜂毒进行对家兔红细胞膜流动性影响的体外试验观察,结果见表1。

表1 蜂毒和蜂毒肽对兔红细胞流动性的影响(n=9)

	药物浓度(mg/L)	荧光偏振度	红细胞膜微粘度	红细胞膜流动性能
对照组	—	0.357±0.006	6.970±0.536	1.123±0.087
蜂毒低剂量组	0.53	0.342±0.020*	5.986±1.270*	1.380±0.338*
蜂毒高剂量组	1.07	0.328±0.020**	5.108±1.082**	1.633±0.355**
蜂毒肽低剂量组	0.25	0.339±0.014*	5.888±0.992*	1.404±0.335*
蜂毒肽高剂量组	0.50	0.333±0.016**	5.267±1.006**	1.594±0.342**

*P<0.05, **P<0.01

2.3 产物蜂毒肽的生化性质鉴定

2.3.1 纯度测定:按文献方法^[6],分别作产物蜂毒肽及蜂毒的十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺电泳,电泳的结果显示:产物蜂毒肽为一条带,蜂毒有5条明显的条带。

2.3.2 等电点测定:按文献方法^[6],用两性载体 Ampholine (pH4~11)作产物蜂毒肽的凝胶等电聚焦电泳,测得其等电点为 10.5。

3 讨论

蜂毒肽是一种含有 26 个氨基酸的小分子多肽,是蜂毒中的最主要毒性成分,生物活性强,尤其是具有很强的溶血活性;含量高,约占蜂毒干重的 50%;属强碱性疏水性多肽,具可逆性的油水两亲性,对生物膜具有特定的作用,已广泛地用作为膜研究的工具药和临床用药的前期实验研究。同时,蜂毒中还有多个其它小分子的多肽,因此,蜂毒肽的分离提纯一直是众多学者关注的问题^[1~3],本研究利用蜂毒肽的油水两亲性和其分子结构中不含巯基及双硫

键^[1],进行溶媒萃取和化学裂解处理,同时利用其在浓度高时常以四聚体形式存在^[1],因而采用在含 4 mol/L 脲(使蜂毒肽的四聚体解散)与不含 4 mol/L 脲的两种不同情况的缓冲液系统中进行凝胶过滤柱层析,虽然整个分离纯化的条件要求不高,但达到了较为理想的分离提纯,所获产品的纯度和得率均较高,生物活性没受影响,因此,本课题所设计的从蜂毒中获取蜂毒肽的分离纯化工工艺路线,可以在国内中小企业中采用。

参考文献

- 1 陈远聪,袁士龙. 毒素的研究与利用. 北京:科学出版社,1988:128
- 2 Kreil G. FEBS LETTERS,1973;241
- 3 Yves M, Urs B, Bernard W F, *et al.* Analytical Biochemistry, 1982;61
- 4 法祥光,甘午君,李会元,等. 中华血液学杂志,1984(2):132
- 5 徐 彭,欧阳永伟,黄敬耀,等. 中草药,1996,27(9):542
- 6 莽克强,徐乃正,方荣祥,等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京:科学出版社,1975:26,81

(2000-06-15 收稿)

荆芥及其相关药材挥发油的成分研究

南京中医药大学(210029) 吴玉兰* 丁安伟 冯有龙

摘 要 采用薄层色谱、气-质联用等方法对荆芥及其相关药材防风、薄荷、紫苏、广藿香、海州香薷等药材挥发油含量及其中所含的主要化学成分进行分析比较,研究其化学稳定性,为药材的鉴别提供依据。

关键词 挥发油 TLC GC-MS 联用

荆芥为传统中医常用的解表药,具有解表散风、透疹等功效,荆芥挥发油为其主要活性成分之一。药理实验表明,荆芥挥发油具有镇痛、抗炎、扩张支气管和抗过敏等作用^[1],我们认为荆芥挥发油含量及其成分分析应作为药材质量评价和控制的重要指标之一。

为了考察荆芥挥发油的稳定性,我们将 1984 年所提荆芥挥发油与新提挥发油进行 TLC 及 GC-MS 分析比较,以研究其主要成分的变化情况。本文还对防风、薄荷、广藿香、紫苏、海州香薷等 5 种药材的挥发油成分及含量进行了研究。这些药材或常与荆芥复方配伍,或挥发油中所含主要成分与荆芥相近,或与荆芥外形易混淆。通过比较研究,找出其间主要差异,为上述药材鉴别及质量控制提供依据。

1 供试药材

荆芥:为唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥地上部分,切成 3~4 mm 小段,产地江苏。

防风:为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkde 的干燥根,切成 2~3 mm 厚的圆片,产地黑龙江。

薄荷:为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分,切成 5~6 mm 的小段,产地江苏。

紫苏:为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt 的干燥带嫩枝的叶,切成 5~6 mm 的小段,产地江苏。

广藿香:为唇形科植物广藿香 *Pogostemon ca-*

* Address: Wu Yulan, Nanjing University of TCM, Nanjing