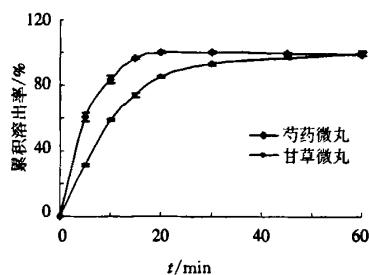


表9 甘草微丸粉体学参数($n=5$)Table 9 Micromeritics parameter of Gancao pellets ($n=5$)

批号	收率/%	圆整度/(°)	堆密度/(g·mL ⁻¹)	脆碎度
061211	88.71±1.67	17.92±0.58	0.75±0.004	0.51±0.06
061223	86.48±1.53	16.83±0.49	0.74±0.003	0.48±0.04
061229	88.96±1.42	16.54±0.61	0.75±0.002	0.53±0.07

速为100 r/min,水浴温度(37±0.5)℃,于设定时间取样5 mL,同时补加同温等量磷酸盐缓冲液。经0.45 μm微孔滤膜滤过,吸取续滤液10 μL,采用HPLC法分别测定芍药苷、甘草酸的峰面积,根据线性方程计算质量浓度。以微丸中有效成分的实际质量为100%,计算芍药苷、甘草酸的累积溶出率。结果表明两种微丸在30 min内体外溶出均达90%以上,因此可以认为是微丸。结果见图2。

图2 芍药微丸和甘草微丸中有效成分的体外溶出曲线($n=3$)Fig. 2 Dissolution curves of active components in pellets ($n=3$)

3 讨论

用挤出滚圆的方法分别制备了芍药、甘草微丸,

其在30 min内体外溶出均达90%以上,且微丸圆整度好、收率高,可进一步通过包衣制备芍药、甘草缓释微丸,为芍药甘草方效应组分释药行为的配伍研究奠定基础^[3]。

药物的溶解度是药物的一项重要理化性质,中药复方为多成分组成的混合物,每种成分的各自溶解度不同。本实验分别测定药物不同指标性成分在不同介质中的表观溶解度,为溶出介质的选择提供了依据。提取物的理化性质、粉体学性质对微丸的处方及工艺有重大的影响,为中药复方各组分进行制剂的适宜性研究提供借鉴意义。

中药提取物一般易吸潮,无论在乙醇中或水中黏度均较大。润湿剂或黏合剂的用量稍改变,软材性质将产生较大变化,即在挤出滚圆中适合成球的润湿剂或黏合剂的用量范围较窄。在以中药提取物为原料的微丸制备过程中,控制软材润湿剂的比例是挤出滚圆工艺中最关键的因素。相对增加中药物料软材制备的湿度,能降低黏性和韧性,使之能被剪切打断、成球;降低湿度,则挤出物塑性增强,韧性增大,滚圆中不易被剪切打断,即使被打断在滚圆中也多呈哑铃型或棒状。

参考文献:

- [1] 王文刚,崔光华. 挤出-滚圆制微丸工艺的进展[J]. 中国新药杂志, 2001,10(9):661-664.
- [2] Beert I, Remon J P. Influence of granulation liquid on the drug release rate from pellets made by extrusion-spheronization [J]. *Int J Pharm*, 1993, 95(1):135-141.
- [3] 冯怡,徐德生,洪燕龙,等. 药物释药系统产品市场与中药复方释药系统[J]. 中国中药杂志, 2006,31(20):1669-1670.

斑点免疫印迹法快速测定地龙炮制品中蚓激酶及其水解产物

王厚伟

(山东中医药大学药学院,山东 济南 250355)

摘要:目的 测定参环毛蚓、秉氏环毛蚓、日本杜拉蚓和天锡杜拉蚓炮制品中蚓激酶及其水解产物,建立斑点免疫印迹法评价相应生药材药效成分明确的中药炮制品质量新方法。方法 以兔抗蚓激酶单抗为一抗,应用斑点免疫印迹法对地龙炮制品中蚓激酶及其水解产物作定性检测,杂交信号应用Quantity One软件作定量分析。结果 现行中药材参环毛蚓与山东产地方品种:秉氏环毛蚓、日本杜拉蚓、天锡杜拉蚓炮制品中蚓激酶及其水解产物的质量分数分别为125.23、118.34、81.05、72.13 μg/g。结论 秉氏环毛蚓炮制品中蚓激酶及其水解产物与现行地龙炮制品参环毛蚓无显著差异,理论上可作为广地龙的替代品。斑点免疫印迹法简便快捷,结果准确,无需大型设备,可用于地龙与类似中药材炮制品的品质评价。

收稿日期:2008-03-28

基金项目:山东省教育厅资助项目(J06L17);山东省优秀中青年科学家奖励基金资助项目(2007BSB14087);山东省中药理论与技术创新团队资助项目

作者简介:王厚伟(1973—),山东日照人,博士,讲师,主要研究方向中药生物工程。Tel:(0531)82613129 E-mail:houlweiw@163.com

关键词:地龙;斑点印迹;蚓激酶

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1652-04

Rapid determination of lumbrukinase and its hydrolysates in processed earthworm by dot blotting

WANG Hou-wei

(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract: Objective To determine the lumbrukinase contents and its hydrolysates in processed earthworm, set up a new evaluating method of dot blotting to evaluate the qualities of those processed Chinese medicines as earthworm. **Methods** Contents of lumbrukinase and its hydrolysates in processed earthworm were determined by dot blotting with rabbit antibody of anti-lumbrukinase as the first antibody. Blotting signal was analyzed by Quantity One software. **Results** Contents of lumbrukinase and its hydrolysates in processed earthworm of *Pheretima aspergilum*, *P. pingi*, *Drawida japonica*, and *D. gisti* were 125.23, 118.34, 81.05, and 72.13 $\mu\text{g/g}$, respectively. **Conclusion** There was no significant difference between the processed earthworms of *P. aspergilum* and *P. pingi* in the content of lumbrukinase and its hydrolysates, both of which were higher than those of the other two species in Shandong. Theoretically, the processed products of *P. pingi* could be used as the succedaneum of *P. aspergilum* in the clinical of traditional Chinese medicine. Dot blotting, as a convenient and accurate method, could be broadly used for the evaluation of the processed products of Chinese crude drugs similar to earthworm.

Key words: earthworm; dot blotting; lumbrukinase

蚓激酶是活体地龙中含有的一种具有溶栓药效的纤维蛋白水解酶,是该种生药材质量评价的重要指标成分。中医临床应用的是地龙的干燥体,是将新鲜活体地龙经沸水烫死后洗净、去除内脏、切段,以及干燥等工艺加工而成。蚓激酶对温度敏感,在炮制过程中容易遭受地龙中其他蛋白酶的攻击而发生水解或降解,地龙炮制品中的蚓激酶活性很低,无法作为其品质评价指标。大量研究表明,地龙炮制品发挥溶栓药效作用的主要物质基础是蚓激酶的水解产物与未发生水解作用的少量蚓激酶^[1]。鉴于蚓激酶水解产物的不确定性,传统用于中药质量评价的HPLC法无法直接测出地龙炮制品中该类组分的量。因此还没有建立这类直接应用于中药炮制品质量评价的便捷方法,除非作繁琐的药效学检验。基于大分子蛋白质抗原的水解产物大都能够与原抗原抗体结合的特性,本实验拟用斑点免疫印迹的方法检测地龙炮制品中蚓激酶及其水解产物。斑点免疫印迹法是一种建立在Western-blotting技术上的基于药物免疫原性的免疫杂交方法^[2]。基于蚓激酶抗体对地龙炮制品中的蚓激酶及其水解产物的免疫识别作用,以兔抗蚓激酶单抗为一抗,与地龙炮制品水提液在硝酸纤维素膜上作免疫杂交,经HRP标记的二抗催化底物ECL显色,应用Quantity One软件对杂交斑点作定量分析,可以平行比较不同质地龙炮

制品间蚓激酶及其水解产物的量。

1 仪器与试剂

广地龙药材购自山东中医药大学附属中鲁医院,山东产地方品种日本杜拉蚓 *Drawida japonica* (Mich.) 采集于莱芜水沟的黑色粘土中,天锡杜拉蚓 *D. gisti* (Mich.) 采集于济南郊区草地的褐色粘土中,秉氏环毛蚓 *Pheretima pingi* (Stephenson) 采集于山东省农业科学院药用植物园的沙土中,由本教研室鉴定,按《中国药典》2005年版方法加工为炮制品。蚓激酶标准品(Sigma公司),硝酸纤维素膜与兔抗蚓激酶单抗(济南翔科生物技术有限公司);辣根酶标记山羊抗兔IgG、ECL试剂盒(北京中山公司)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备:准确称量4种地龙炮制品各20g,加入25mmol/L PBS 20mL,搅拌浸润30min后,充分研磨浸提30min,其间,分3次加入60mL PBS。然后,转移至2个50mL离心管4000 $\times g$ 离心30min,上清滤去过脂,收集于250mL量瓶中。沉淀加入20mL PBS重新悬浮,研磨浸提30min,4000 $\times g$ 离心30min,取上清液合并于量瓶中,定容至250mL,即得。

2.2 标准品溶液的制备:精密称取蚓激酶标准品1.6mg,置于10mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,用

作标准品储备液(160 $\mu\text{g/mL}$)。精密量取标准品储备液1、0.75、0.5、0.25 mL,置于4个10 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得质量浓度为16、12、8、4 $\mu\text{g/mL}$ 的蚓激酶抗原标准液。以1 g/L的BSA(小牛血清白蛋白)溶液与50 mg/mL脱脂奶粉作为阴性标准品溶液。

2.3 斑点免疫印迹干扰试验:取50 μL BSA溶液点加到硝酸纤维素膜上,重复5次,以50 mg/mL脱脂奶粉封闭2 h后,室温下先用一抗兔抗蚓激酶抗体(1:1 000稀释)孵育2 h, PBS-T洗膜1 h,再用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(1:2 000稀释)孵育1 h, PBS-T洗膜30 min后,按Amersham公司试剂盒说明书进行ECL显影。显影结果无杂交斑点出现,表明BSA与脱脂奶粉蛋白对蚓激酶抗体无免疫识别作用,该2种阴性标准品溶液对斑点免疫印迹试验结果无干扰。

2.4 线性关系考察:取16、12、8、4 $\mu\text{g/mL}$ 蚓激酶抗原标准液与1 g/L BSA阴性对照溶液各50 μL ,点加到硝酸纤维素膜上(相当于蚓激酶标准品的质量为0、0.2、0.4、0.6、0.8 μg),参照斑点免疫印迹干扰试验项下方法作斑点免疫印迹,印迹斑点采用Quantity one软件作轨迹定量扫描分析(图1-A),背景排除的Rolling Disk Size值设为5。应用轨迹定量法测定不同质量浓度标准液的杂交信号。以质量浓度为横坐标,轨迹信号量为纵坐标,得回归方程 $Y=3.0844 X, R^2=0.9494$ 。结果表明蚓激酶抗原在0~16 $\mu\text{g/mL}$ 内与Dot blotting斑点的轨迹信号量的线性关系良好。

2.5 精密度试验:取广地龙炮制品溶液50 μL ,点加到硝酸纤维素膜上,重复5次,作斑点免疫印迹,应用轨迹定量法测定杂交斑点的轨迹信号量,5次重复的平均值为31.07 INT*mm, RSD为0.9%。

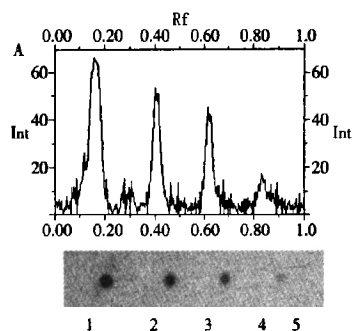
2.6 稳定性试验:取广地龙炮制品溶液50 μL ,点加到硝酸纤维素膜上,分别于0、2、4、6、8 h后与蚓激酶抗体作免疫杂交,杂交信号作轨迹定量扫描分析,计算得其RSD为1.1%。结果表明供试品溶液在8 h内是稳定的。

2.7 重现性试验:称取广地龙炮制品6份,每份20 g,制备供试品溶液,取50 μL 点加到硝酸纤维素膜上,作斑点免疫印迹,杂交信号作轨迹定量分析,计算得其RSD为2.7%。

2.8 加样回收率试验:精确称取0.10 mg蚓激酶标准品,加入到20 mL 1 g/L BSA溶液中,取50 μL 点加到硝酸纤维素膜上,与1:1 000稀释的兔抗蚓激

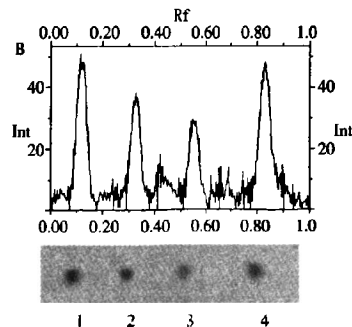
酶抗体作斑点免疫印迹,重复5次,杂交信号应用Quantity One软件作轨迹定量扫描分析,计算得蚓激酶的平均回收率为96.85%, RSD为1.4%。

2.9 样品测定:各取4种地龙炮制品的浸提液50 μL ,点加到硝酸纤维素膜上,与1:1 000稀释的兔抗蚓激酶抗体作斑点免疫印迹,重复5次,杂交信号应用Quantity One做定量分析(图1-B)。根据回归方程得出4种地龙炮制品中蚓激酶及其水解产物的浓度与质量分数,见表1。可见,现行中药材广地龙品种参环毛蚓炮制品药效品质最好,蚓激酶及其水解产物质量分数为125.23 $\mu\text{g/g}$,山东地方野生种质地龙中,秉氏环毛蚓的蚓激酶及其水解产物的量最高,质量分数为118.34 $\mu\text{g/g}$,药效品质与广地龙无显著差异(表2),可以作为现行中药材广地龙的替代品,其他两种山东地龙品种日本杜拉蚓与天锡杜拉蚓的蚓激酶及其水解产物的量显著低于广地龙。



1,2,3,4,5 分别为16、12、8、4、0 $\mu\text{g/mL}$ 的
蚓激酶标准液的免疫印迹斑点

1, 2, 3, 4, and 5 are blotting dot of standard lumbricinase solutions of 16, 12, 8, 4, and 0 $\mu\text{g/mL}$



1,2,3,4 分别为秉氏环毛蚓、日本杜拉蚓、
天锡杜拉蚓与参环毛蚓样品液的免疫印迹斑点

1, 2, 3, and 4 are blotting dot of the processed earthworms of *P. pingi*, *D. japonica*, *D. gisti*, and *P. aspergillum*

图1 免疫印迹斑点(A)与轨迹扫描图(B)

Fig. 1 Dot-blotting (A) and trace-scanning plot (B) of test samples

表1 轨迹定量法测定供试样品蚓激酶及其水解产物($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Determination of lumbrukinase and its hydrolysates in four processed earthworms by trace-tracking analysis ($\bar{x} \pm s$)

供试样品	斑点轨迹 /(INT×mm)	峰值 /INT	质量浓度 /(μg·mL ⁻¹)	质量分数 /(μg·g ⁻¹)
秉氏环毛蚓	29.2±2.74	50.4±2.13	9.47	118.34
日本杜拉蚓	20.0±1.66	37.9±1.36	6.48	81.05
天锡杜拉蚓	17.8±1.22	29.1±1.08	5.77	72.13
参环毛蚓	30.9±2.98	48.0±2.33	10.02	125.23

3 讨论

应用斑点免疫印迹法对4种地龙炮制品蚓激酶及其水解产物的量的测定结果表明,山东地方品种秉氏环毛蚓炮制品中蚓激酶及其水解产物的量与现行临床应用地龙药材参环毛蚓无显著性差异,理论上,可作为现行地龙药材的替代品。

以现行临床应用的中药材(如水蛭、土鳖虫、全蝎等)为对照,斑点免疫印迹法可对多种中药资源药效品质作平行比较,是一种发现新的现行中药材替代品、扩大中药资源范围的有效手段;对于生药的药

表2 4品种地龙炮制品中蚓激酶及其水解产物质量分数的LSD检验

Table 2 LSD Test of lumbrukinase and its hydrolysates in four species of processed earthworms

组平均数	参环毛蚓: 125.23	秉氏环毛蚓: 118.34	日本杜拉蚓: 81.05	天锡杜拉蚓: 72.13
参环毛蚓: 125.23	0	6.89	44.18	53.10
秉氏环毛蚓: 118.34	6.89	0	37.29	46.21
日本杜拉蚓: 81.05	44.18	37.29	0	8.92
天锡杜拉蚓: 72.13	53.10	46.21	8.92	0

效成分已明确、而在炮制中不稳定的这类中药炮制品,可以应用斑点免疫印迹法进行质量检测与控制,并指导临床用药,具有重大实践意义。

参考文献:

- [1] 王宗伟,梁秀文,范兴亚. 蚯蚓生物工程技术研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(5): 386-387.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

大孔吸附树脂对丁香叶中丁香苦苷的富集工艺研究

刘欣¹,高月娟²,王建明^{2*},许贵军²,薛红梅²

(1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058; 2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的 研究大孔吸附树脂富集丁香苦苷类成分的工艺条件及参数。方法 以丁香苦苷为考察指标,建立HPLC分析方法,通过考察6种大孔吸附树脂对丁香苦苷的吸附分离性能,筛选出AB-8树脂作为分离纯化丁香苦苷类成分的介质,并对AB-8树脂的吸附性能进行研究,考察富集丁香苦苷类成分的最佳工艺条件。结果 丁香叶经水提醇沉浓缩后,以AB-8型大孔树脂为吸附剂,4 BV的水洗脱出去杂质后,收集5 BV 50%乙醇洗脱液为最佳工艺条件。结论 大孔吸附树脂分离工艺可作为富集丁香苦苷类成分的有效方法,并为丁香叶药材的质量控制和新型给药系统的研究奠定基础。

关键词:富集;丁香叶;丁香苦苷;大孔吸附树脂

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1655-05

Enrichment process of syringopicroside in *Folium Syringae Oblatae* with macroporous resin

LIU Xin¹, GAO Yue-juan², WANG Jian-ming², XU Gui-jun², XUE Hong-mei²

(1. College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Academy of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective To study the optimal conditions and parameters for the enrichment process of syringopicroside in *Folium Syringae Oblatae* with macroporous resin. **Methods** With the enrichment degree of syringopicroside as an index, the analytical method of HPLC was developed, AB-8 resin was

收稿日期:2007-05-23

基金项目:教育部博士点专项基金资助项目(20060228005)

作者简介:刘欣(1974—),男,黑龙江省哈尔滨市人,讲师,中药学博士生,浙江大学药学院博士后,主要从事中药新型给药系统、药物作用机制研究。Tel:(0571)88208457 E-mail:Liuxinyll@yahoo.com.cn

*通讯作者 王建明 Tel/Fax:(0451)82196262 E-mail:wangjianming@hljucm.net