

全蝎匀浆提取工艺的研究

孟琳, 姬涛, 侯林, 田景振*

(山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355)

摘要:目的 以全蝎为研究对象, 比较水回流法、醇回流法、匀浆法、酶解法 4 种不同提取方法, 优选最佳提取方法的工艺条件。方法 以可溶性蛋白得率及总提取物得率为指标, 确定最佳提取方法, 并用小鼠抗惊厥药效验证该提取方法的可行性, 进而采用正交试验优选出最佳工艺条件。结果 从提取液蛋白得率及总提取物得率分析, 匀浆提取明显优于其他 3 种方法; 匀浆提取的最优工艺为加入 12 倍量的水, 高速, 匀浆提取 2 次。结论 经小鼠抗惊厥药效验证, 采用匀浆法对全蝎进行提取是可行的; 验证试验表明, 优选的匀浆提取工艺稳定可行。

关键词:全蝎; 提取; 匀浆; 抗惊厥

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-0577-04

全蝎为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥体, 性味辛、平, 有毒, 归肝经, 具有息风镇惊、攻毒散结、通络止痛功能, 临床用于小儿惊风、抽搐痉挛、中风口喎、半身不遂、破伤风、风湿顽痹、偏正头痛、疮疡、瘰疬等症^[1]。全蝎主要药效成分为蝎毒, 蝎毒的主要活性成分是蛋白质类^[2]。近年来, 随着国内外生物医学、生物化学及分子生物学的发展, 人们对于全蝎和蝎毒的研究越来越多, 临床上的应用也不断拓宽。王起振等^[3]从蝎毒中分离纯化出的一种蝎毒镇痛活肽 SAP, 对大鼠小鼠的内脏痛和肢体痛均有较强的镇痛作用; 韩雪飞^[4,5]从粗毒中分离纯化了镇痛活性肽 SV-IV, 临床验证对多种急、慢性疼痛均有较强抑制作用, 从蝎毒抗癌多肽分离纯化得到的纯化组分 AP-III 在高浓度时对小鼠肝癌的抑制率达 46.69%; 在全蝎的抗癫痫活性研究中, 从蝎毒中分离纯化出的抗癫痫肽 AEP 已证明具有明显的抗癫痫作用。惊厥与癫痫具有密切关系。刘崇铭等^[6]通过比较安定、蝎毒及分离出的抗癫痫肽 AEP 对 3 种小鼠惊厥模型的作用, 发现 AEP 的抗惊厥作用较强于蝎毒。全蝎毒素类似蛇神经毒素, 毒性甚剧, 对心血管系统、呼吸系统、泌尿系统等都会有损害。关于全蝎的提取, 有传统的水煎煮、醇回流提取以及当前较热门的酶解法, 而全蝎的匀浆提取尚未有文献报道。全蝎总蛋白提取效率的优劣直接影响到后续的分离纯化, 继而影响药效。基于此, 本实验对全蝎匀浆提取与前 3 种方法进行了比较, 并优选出最佳提取工艺。

1 仪器与试剂

SYC-15 超级恒温水浴(南京桑力电子设备厂); JJ-2 组织捣碎匀浆机; LD4-2A 低速离心机(北京医用离心机厂); UV-3010 紫外可见分光光度计; PHS-3C 精密型 pH 计(上海三信仪表厂)。

胃蛋白酶(Pepsin)活力 1:3 000, 购于中国医药集团上海化学试剂公司(BR, 250 g, 批号 F20031224); 胰蛋白酶(Trypsin)活力 1:250, 购于国药集团化学试剂有限公司(BR, 25 g, 批号 F20041022); 牛血清白蛋白(Albumin, Bovine Biottech, 批号 B67328 上海生工生物工程有限公司); 考马斯亮蓝 G-250(Coomassie Brilliant Blue G-250, Ultra Pure, 批号 0241B75, 上海生工生物工程有限公司); 蒸馏水购于济南诚信化玻公司; 人工胃液(取 1.8 mL 盐酸, 加入 200 mL 蒸馏水即得); 人工肠液(取 1.36 g 磷酸二氢钾溶于 50 mL 蒸馏水中, 加入 25 mL 0.2 mol/L 氢氧化钠即得); 其他试剂均为分析纯。蝎粉经山东中医药大学药系王厚伟副教授鉴定为钳蝎科动物东亚钳蝎冻杀制后粉碎过 20 目冻干粉。

2 方法与结果

2.1 全蝎加工品提取方法

2.1.1 水回流提取^[7]: 称取冻干蝎粉 10 g, 加入 8 倍量的水, 回流提取 3 次, 每次 45 min, 合并 3 次提取液, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 滤过, 定容至 250 mL, 备用。

2.1.2 醇回流提取^[7]: 称取冻干蝎粉 10 g, 加入 4 倍量 50% 乙醇, 回流提取 3 次, 每次 30 min, 合并 3 次提取液, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 滤过, 定容至 250 mL, 备用。

①收稿日期: 2009-07-05

作者简介: 孟琳(1984—), 女, 山东济宁市人, 硕士, 2007 年本科毕业于山东中医药大学, 研究方向为中药药剂学。

Tel: 13589007199 E-mail: menglin19850615@163.com

* 通讯作者 田景振 Tel: (0531) 89628080 E-mail: tianjingzhen@163.com

2.1.3 匀浆提取: 称取冻干蝎粉 10 g, 加入 10 倍量水, 高速匀浆反复 3 次, 每次 20~ 30 s, 间隔暂停几秒, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 滤过, 残渣继续加水重复匀浆提取一次, 离心, 滤过, 合并 2 次提取液, 定容至 250 mL, 备用。

2.1.4 酶解提取^[8]: 称取冻干蝎粉 10 g, 加入 20 倍量人工胃液, 再加入 0.75 g 胃蛋白酶, 于 40 ℃ 恒温水浴中酶解 4 h, 85 ℃ 水浴灭活 15 min, 冷却至室温, 3 000 r/min 离心 15 min, 倾去上清液, 向残渣加入与人工胃液等量的人工肠液, 再加入 0.5 g 胰蛋白酶, 于 53 ℃ 酶解 4 h, 85 ℃ 水浴灭活 15 min, 冷至室温, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液滤过, 定容至 250 mL, 备用。

2.2 蛋白质测定方法的建立

2.2.1 考马斯亮蓝 G-250 溶液的制备^[9]: 精密称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50 mL 90% 乙醇, 加入 100 mL 质量浓度为 0.85 g/mL 的磷酸, 作为母液保存, 使用时用水稀释到 1 L。试剂的最终浓度为 0.01% 考马斯亮蓝 G-250, 质量浓度为 0.085 g/mL 磷酸。

2.2.2 牛血清白蛋白标准液制备: 结晶牛血清白蛋白或酪蛋白, 预先经微量凯氏定氮法标定该蛋白质的质量分数或者根据牛血清白蛋白的消光系数是 6.6 来计算其质量分数。取 10 mg 牛血清白蛋白标准品, 加水溶解, 定容至 100 mL, 配成质量浓度为 100 μg/mL 蛋白质标准储备液, 冰箱中保存^[6]。

2.2.3 标准曲线的绘制: 取 5 只试管, 一只加入 1.0 mL 蒸馏水作空白, 其他 4 只分别加入 0.1、0.2、0.3、0.4 mL 上述牛血清白蛋白标准液, 蒸馏水定容至 1.0 mL, 每只试管加入 5.0 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液, 摇匀放置 5 min, 采用玻璃比色皿, 在紫外-可见分光光度计 595 nm 处测定吸光度。以牛血清白蛋白的质量(X)对 A₅₉₅ 吸光度(Y)进行线性回归, 得回归方程 Y= 0.010 4 X+ 0.552 7, r= 0.999 1。

2.2.4 精密度试验: 取 0.2 mL 蛋白质质量为 261.6 μg 的蝎粉醇提液, 按 2.2.3 项下测定吸光度, 连续测 5 次。计算, RSD 为 0.47%。

2.2.5 稳定性试验: 取 0.2 mL 蛋白质质量为 261.6 μg 的蝎粉醇提液, 按 2.2.3 项下测定吸光度, 每隔 10 min 测一次, 共测 6 次, 计算得 RSD 为 1.2%, 在 1 h 内稳定(70 min 时吸光度为 0.902, 已经不稳定)。

2.2.6 加样回收试验: 精密量取蛋白质质量为 261.6 μg 的蝎粉醇提液 0.05、0.1、0.15 mL, 分别加

入蛋白质标准溶液 0.2 mL, 按 2.2.3 项下操作, 测定吸光度, 结果平均回收率为 100.8%, RSD 为 3.4%。

2.3 不同提取方法的比较

2.3.1 不同提取方法对可溶性蛋白得率的影响: 分别取已定容的水提、醇提、酶解液各 0.1 mL, 匀浆液 0.01 mL(经预试若取 0.1 mL 会超出线性范围), 用蒸馏水定容至 1.0 mL。然后每只试管加入 5.0 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂, 摇匀放置 5 min, 于 595 nm 处测定吸光度。按上述回归方程计算相当于牛血清白蛋白的质量, 计算出 250 mL 各提取液的蛋白质量, 结果见表 1。

2.3.2 不同提取方法对总提取物得率的影响: 分别取已定容的 4 种提取液各 50 mL, 置于恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 计算各提取方法提取物得率, 结果见表 2。

表 1 不同提取方法的可溶性蛋白得率的比较

Table 1 Comparison of soluble protein yields extracted by various methods

提取方法	总蛋白得率/ %	$\bar{x} \pm s$	RSD/ %
水回流法	0.987	0.967 ± 0.025	2.6
	0.974		
	0.939		
醇回流法	0.654	0.654 ± 0.002	0.3
	0.656		
	0.653		
匀浆法	12.464	12.063 ± 0.351	2.9
	11.813		
	11.911		
酶解法	0.211	0.205 ± 0.007	3.4
	0.206		
	0.197		

表 2 不同提取方法的总提取物得率的比较

Table 2 Comparison of extract yields by various methods

提取方法	提取物得率/ %
水回流法	12.98
醇回流法	11.08
匀浆法	40.21
酶解法	23.75

2.3.3 不同方法提取液对小鼠抗惊厥作用的影响^[10]: 昆明种小鼠, 体质量 18~ 22 g, 雌雄各半, 购自山东中医药大学动物实验中心; 戊四氮(PTZ), 购自 Sigma 公司。取小鼠 40 只, 随机分 4 组, 每组 10 只, 给药各组分别 ig 水提液、醇提液、匀浆液、酶解液 0.2 mL/10 g, 阴性对照组 ig 等容积的生理盐水, 每日 1 次, 连续 7 d, 末次给药 1 h 后, 各鼠 ip PTZ 60 mg/kg, 以出现持续性惊厥为指标, 记录惊厥潜伏期, 结果见表 3。

表 3 全蝎不同方法提取液对小鼠 PTZ 惊厥潜伏期的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of extract obtained by various methods on latency of PTE induced convulsion ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mL · 10 g ⁻¹)	惊厥潜伏期/min
对照液	0.2	1.45 ± 0.39
水提液	0.2	1.97 ± 0.41*
醇提液	0.2	2.16 ± 0.34*
匀浆液	0.2	2.65 ± 0.57**
酶解液	0.2	2.21 ± 0.27*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

从表 1 及表 2 的试验结果看, 不论是提取液中蛋白得率还是提取物得率, 匀浆法都明显高于其他 3 种方法; 小鼠抗惊厥药效实验结果显示, 与对照组比较, 水提液、醇提液、匀浆液、酶解液均能明显延长戊四氮致小鼠惊厥的潜伏期, 但以匀浆组最为明显 ($P < 0.01$), 有极显著性差异, 表明匀浆提取液对抗戊四氮引起的小鼠惊厥效果最好, 强于水提液、醇提液及酶解液, 验证了匀浆提取法的可行性。因此本研究继续对匀浆法进行提取工艺的优选。

2.4 匀浆提取工艺的优化研究

2.4.1 正交试验设计: 取 10 g 冻干蝎粉, 匀浆提取, 按 2.3.1 项下进行测定。根据预试验以转速、匀浆提取次数、加水量为考察因素, 选择不同水平, 以提取液中可溶性蛋白得率为指标, 按正交设计 $L_9(3^4)$ 安排试验, 结果见表 4~ 6。

表 4 因素水平

Table 4 Factors and levels

水平	因素		
	A 转速	B 次数	C 加水量/倍
1	高	1	8
2	中	2	10
3	低	3	12

表 5 正交试验结果

Table 5 Results of orthogonal test

编号	A	B	C	D(空白)	蛋白得率/%
1	1	1	1	1	7.9
2	1	2	2	2	12.5
3	1	3	3	3	12.2
4	2	1	2	3	8.0
5	2	2	3	1	12.2
6	2	3	1	2	11.8
7	3	1	3	2	8.5
8	3	2	1	3	10.3
9	3	3	2	1	11.0
均值 1	10.87	8.13	10.00	10.37	
均值 2	10.67	11.67	10.50	10.93	
均值 3	9.93	11.67	10.97	10.17	
极差 R	0.94	3.54	0.97	0.76	

表 6 方差分析

Table 6 Analysis of variance

因素	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1.449	2	1.527	—
B	24.969	2	26.311	$P < 0.05$
C	1.402	2	1.477	—
D(误差)	0.95	2	—	—

2.4.2 结果: 由方差分析结果看, 3 个因素中匀浆次数为主要因素, 对匀浆提取有显著性影响, 结合直观分析, 提取 3 次相比提取 2 次提取率提高很小, 综合考虑, 确定最佳匀浆提取工艺为 $A_1 B_2 C_3$, 即加 12 倍量水, 高速, 匀浆提取 2 次。

2.5 验证试验: 取冻干蝎粉 10 g, 加入 12 倍量水, 高速匀浆提取 2 次, 3 500 r/min 离心 10 min, 滤过, 合并两次滤液, 定容至 250 mL, 取 25 mL 置于恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 计算提取物得率, 结果见表 7。通过验证性试验表明, 本工艺重现性好, 是合理可行的。

3 讨论

有关全蝎的提取, 文献中报道较多的是传统的水提、醇提及当前较热门的酶解法, 由于所选指标不同, 得到的工艺差别很大。本实验以蛋白质质量及提取物得率为指标, 比较 4 种提取方法, 结果表明, 不论是提取液中总蛋白得率还是提取物得率, 匀浆法都明显高于其他 3 种方法; 药效学实验表明匀浆提取液抗惊厥作用强于水回流提取液、醇回流提取液及酶解提取液, 验证了匀浆提取方法的可行性。

表 7 验证性试验结果

Table 7 Results of verification test

编号	蛋白得率/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
1	1.14		
2	1.18	1.16 ± 0.02	1.7
3	1.15		

此外, 本实验发现水提法的效率高于醇提法, 与现有文献报道不一致^[4], 这可能与提取过程中工艺及所选指标不同有关; 酶解法中, 由于采用了胃蛋白酶、胰蛋白酶进行酶解, 大分子的蛋白质被分解为小分子的多肽及氨基酸, 而考马斯亮蓝法并不能测定氨基酸的量, 因此从蛋白质量来看, 酶解法的最低, 但提取物得率高于水提及醇提法。

本实验对全蝎的提取方法及工艺进行了研究, 至于其提取液有效部位的筛选有待进一步考察。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 谭银合, 郭建生. 全蝎的化学成分及其镇痛作用的研究进展[J]. 湖南中医药导报, 2001, 7(5): 210-212
- [3] 王起振, 张景海, 唐 龙, 等. 东亚钳蝎(Buthus Martensii)

- ikarsh) 毒镇痛活性肽的分离纯化及其镇痛作用研究[J]. 沈阳药学院学报, 1994, 11(4): 273-277.
- [4] 韩雪飞, 徐霞, 申庆红, 等. 蝎毒素 IV 分离、纯化研究[J]. 河南医科大学学报, 1996, 31(3): 1-4.
- [5] 韩雪飞, 王水奎, 陈华艳, 等. 蝎毒抗癌多肽纯化组分 II 对小鼠肝癌的生长抑制作用及带瘤小鼠胸腺重量的影响[J]. 河南医科大学学报, 2000, 35(4): 288-290.
- [6] 刘崇铭, 高殿振, 周新华, 等. 东亚钳蝎毒及其成分抗癫痫肽的抗惊厥作用[J]. 沈阳药学院学报, 1988, 5(2): 110-111.
- [7] 邹龙, 郭建生, 桂卉, 等. 全蝎镇痛成分的提取工艺研究[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(2): 19-21.
- [8] 林超, 王玉蓉, 吴清, 等. 全蝎的酶解工艺研究[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(6): 66-69.
- [9] 赵英永, 戴云, 崔秀明, 等. 考马斯亮蓝 G 250 染色法测定草乌中可溶性蛋白质含量[J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2006, 15(3): 235-237.
- [10] 陈俐, 廖卫平. 石菖蒲萃取挥发油抗癫痫药效研究[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(3): 171-173.

HPLC 法测定白花蛇舌草注射液中去乙酰基车叶草苷酸和鸡屎藤次苷

姚鑫宁, 纪菁, 陈静, 郭兴杰*
(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立白花蛇舌草注射液中去乙酰基车叶草苷酸和鸡屎藤次苷的测定方法。方法 采用 HPLC 法测定, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-0.1% 冰醋酸(3:2:95), 检测波长 230 nm, 体积流量 1.0 mL/min。结果 去乙酰基车叶草苷酸和鸡屎藤次苷的浓度分别在 7.50~90.0 μg/mL ($r=0.9997$) 和 6.00~72.0 μg/mL ($r=0.9999$) 线性关系良好; 平均加样回收率分别为 98.1%、99.0%, RSD 分别为 1.2%、1.1%。结论 本法快速、简便、准确, 可用于同时测定白花蛇舌草注射液中上述两种环烯醚萜类成分。

关键词: 白花蛇舌草注射液; 去乙酰基车叶草苷酸; 鸡屎藤次苷; HPLC

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-0580-03

白花蛇舌草为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草, 研究表明该植物主要含有黄酮类、三萜类、蒽醌类、环烯醚萜类、多糖类等成分, 具有抗肝炎、抗肿瘤、抗病毒、抗炎抑菌、调血脂及降血糖等多种药理活性^[1]。白花蛇舌草注射液是以白花蛇舌草制成的注射剂, 具有清热解毒、利湿消肿的作用。临床用于湿热蕴毒所致的呼吸道感染、扁桃体炎、肺炎、胆囊炎、阑尾炎、痈疖脓肿及术后感染, 亦可用于癌症辅助治疗。本实验室从白花蛇舌草中分离得到了两种环烯醚萜苷类成分, 通过 IR、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 解析, 以及与文献报道的图谱比较, 确证此两种成分结构分别为去乙酰基车叶草苷酸和鸡屎藤次苷^[2], 结构式见图 1。已有文献报道测定白花蛇舌草药材或注射液中对香豆酸^[3]、反式 6-O-对香豆酰鸡屎藤苷甲酯^[4]、齐墩果酸^[5]和熊果酸^[6]等, 但未见有关于去乙酰基车叶草苷酸和鸡屎藤次苷的测定方法的文献报道, 且在研究中发现去乙酰基车叶草苷酸和鸡屎藤次苷在注射液中的量较高。因此本研究首次建立了同时测定白花蛇舌草注射液中去乙酰基车叶草苷酸和鸡屎藤次

苷的方法, 并应用于市售白花蛇舌草注射液的测定中, 为进一步控制白花蛇舌草注射液的质量提供了依据。

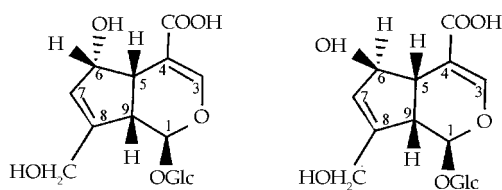


图 1 去乙酰基车叶草苷酸(A)和鸡屎藤次苷(B)的结构

Fig 1 Structures of deacetyl asperuloside acid (A) and scandoside (B)

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AT 型高效液相色谱仪, SPD-10A 型紫外可见检测器, ANASTAR 色谱工作站; 乙腈、甲醇均为色谱纯, 冰醋酸为分析纯, 重蒸水(自制); 去乙酰基车叶草苷酸、鸡屎藤次苷对照品均为本实验室自制(质量分数均不小于 99.0%); 白花蛇舌草注射液(2 mL/支)来自 3 个不同厂家(批号为 080312、080510、080203)及本实验室自制(批号为 080127)。

①收稿日期: 2009-07-07

基金项目: 教育部“春晖计划”科研合作项目(Z2005-110016)

作者简介: 姚鑫宁(1984—), 女, 辽宁鞍山人, 药物分析专业硕士研究生, 2007 年毕业于沈阳药科大学药学专业, 主要从事药物分析及中药质量控制研究。Tel: (024) 23986285 E-mail: gxjhyz@yahoo.com.cn