

不同炮制方法对全蝎有效成分和活性的影响

侯 林, 姬 涛, 田景振*, 王 超

山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

摘 要: 目的 研究不同炮制方法对全蝎有效成分和活性的影响。方法 冻干全蝎采用冰箱预冷、冷冻干燥机干燥的方法加工, 传统炮制参照《中国药典》2005年版方法; 不同炮制工艺全蝎参照《中国药典》2010年版测定醇浸出物得率, 水溶性蛋白的测定采用考马斯亮蓝法, 抗肿瘤活性比较采用小鼠荷瘤试验。结果 冻杀干燥法加工的全蝎醇浸出物得率显著高于传统清水煮制全蝎, 但低于盐水煮制全蝎; 水溶性蛋白的量也显著高于传统炮制品; 抗肿瘤活性也显著强于传统炮制品。结论 冻杀干燥法加工全蝎可以有效地防止其活性蛋白质因加热而变性失活和被水溶解而造成的损失, 显著地提高其蛋白含量和抗肿瘤活性。

关键词: 全蝎; 冻杀干燥; 抗肿瘤; 炮制; 活性蛋白

中图分类号: R283.1 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)05-0897-03

Effect of different processing methods on active components in *Scorpio* and their activities

HOU Lin, JI Tao, TIAN Jing-zhen, WANG Chao

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

Key words: *Scorpio*; lyophilization; anti-tumor; processing; active protein

全蝎为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥全体, 功能息风镇痉, 通络止痛, 攻毒散结, 其有效成分主要为蝎毒蛋白等, 近年来对全蝎的研究方兴未艾^[1-2]。中医临床用的全蝎是通过清水煮烘或盐水煮烘加工而成^[3], 经过长时间的水煮, 大量的蛋白成分变性失活或被水溶解而损失。由此可见传统的全蝎加工方法不利于其有效成分的保持, 导致药效降低。为尽量保留全蝎的有效成分及提高其临床疗效, 本实验采用低温冻杀全蝎, 冷冻干燥机干燥的方法加工全蝎, 并对其与两种传统炮制工艺的全蝎的醇浸出物得率、水溶性蛋白含量、抗肿瘤活性进行比较研究。

1 仪器与材料

LGJ-10D 型冷冻干燥机 (北京军事医学科学院); 日立 UV-3010 紫外可见分光光度计; LD4-2A 型低速离心机 (北京医用离心机厂); 考马斯亮蓝 G-250 (生工生物工程 (上海) 有限公司); 牛血

清蛋白 (生工生物工程 (上海) 有限公司); M211-01 非预染蛋白质分子量标准 (上海博蕴生物科技有限公司); 环磷酸腺苷 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 07093021)。

全蝎购自蒙阴县药材公司, 经山东中医药大学生药系王厚伟副教授鉴定为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch; 昆明种小鼠雄性 18~22 g (山东鲁抗医药股份有限公司), 许可证号: SCXK (鲁) 20050017; S180 荷瘤小鼠 (山东医学科学院)。

2 方法与结果

2.1 全蝎的加工工艺

2.1.1 清水煮制^[4] 取活蝎 50 g, 称定, 清水洗 3 遍, 倒入 10 倍量的沸水中, 随时补入清水, 煮 3 h, 取出, 低温烘干或阴凉处风干, 得清水制全蝎。

2.1.2 盐水煮制^[4] 取活蝎 50 g, 称定, 清水洗 3 遍, 倒入 10 倍量的 15% 盐水中, 随时补入清水, 煮 3 h, 取出, 低温烘干或阴凉处风干, 得盐水制全蝎。

收稿日期: 2010-08-22

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题 (2006BA106A15-1)

作者简介: 侯 林 (1984—), 男, 山东省苍山县人, 在读博士研究生, 研究方向为中药新药研究。

Tel: 13789801721 (0531)89628597 E-mail: houlin5027@163.com

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

2.1.3 冻杀制 取活蝎 50 g, 称定, 清水洗 3 遍, 待风干后放入冰箱 -24 ℃ 冷冻 12 h, 取出低温干燥或阴凉处风干, 得冻杀制全蝎。

2.2 加工工艺对全蝎得率的影响

根据全蝎的鲜质量与干质量计算出干率 (干率 = 干质量/鲜质量), 并使用 SAS 统计软件进行方

差分析, 结果见表 1。可见, 3 种加工工艺的出干率有显著性差异 ($P < 0.05$), 其中盐水制全蝎因为含有大量的盐分而出干率最高, 冻杀制组的出干率明显高于清水组, 可能与煮制过程中的水溶性成分流失有关。

2.3 加工工艺对全蝎醇浸出物得率的影响^[3]

表 1 不同加工工艺全蝎的出干率、醇浸出物得率和可溶性蛋白量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of different processing technologies on rate of yield, alcohol extract, and soluble protein in *Scorpio* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

加工工艺	鲜质量/g	干质量/g	出干率/%	醇浸出物得率/%	水溶性蛋白/%
清水制	50.36	16.91	33.57 ± 1.41 ^C	10.43 ± 0.600 ^C	0.469 ± 0.006 5 ^B
盐水制	50.33	22.48	44.93 ± 1.09 ^A	23.32 ± 0.434 ^A	0.436 ± 0.004 5 ^B
冻杀制	50.58	20.20	39.92 ± 0.85 ^B	15.43 ± 0.735 ^B	8.840 ± 0.370 0 ^A

字母不同的两组之间有显著性差异 ($P < 0.05$), 表 2 同

There is significant difference between two sets with different letters ($P < 0.05$), Table 2 is same

取不同加工工艺的全蝎粗粉 (20 目) 约 2 g, 精密称定, 置 250 mL 锥形瓶中, 加稀醇 50 mL, 静置 1 h, 称定质量, 水浴加热至沸, 并保持微沸 1 h, 放冷, 称定, 补充减失的质量, 摇匀, 抽滤。精密量取滤液 25 mL, 置干燥至恒定质量的蒸发皿中, 在水浴上蒸干后, 105 ℃ 烘箱烘 3 h, 置干燥器中 30 min, 精密称定, 重复 3 次, 使用 SAS 统计软件对结果进行方差分析, 结果见表 1。3 种加工工艺全蝎的醇浸出物得率存在显著性差异, 其中盐水制的全蝎最高^[5], 是由于盐溶于稀醇所致, 冻杀制组的醇浸出物得率显著高于清水制组, 可以说明冻杀制可以增加全蝎的醇浸出物得率。

2.4 加工工艺对全蝎可溶性蛋白的影响^[6]

可溶性蛋白的测定采用考马斯亮蓝染色法, 以牛血清蛋白作为对照品, 标准曲线方程为 $Y = 141.56X - 1.1487$, $r = 0.9993$, 牛血清蛋白在 0~100 μg 线性关系良好。

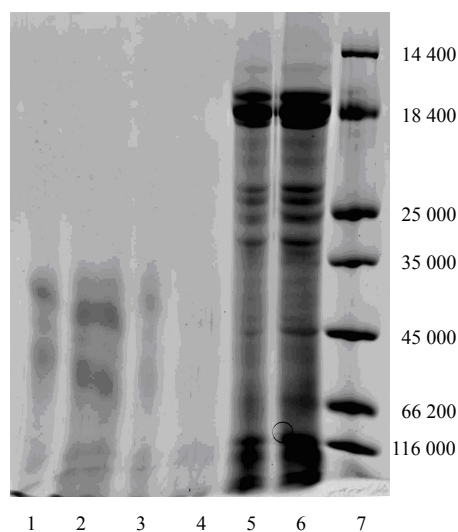
精密称取各炮制品 (粗粉) 2 g, 各称取 3 份, 加入 40 mL 蒸馏水, 密塞, 静置 30 min, 恒温振荡器常温振荡 1 h, 3 500 r/min 离心 15 min 后倾出上清液, 沉淀加 40 mL 蒸馏水继续振荡 1 h, 离心, 合并两次上清液, 定容至 100 mL, 作为供试品溶液进行测定, 结果见表 1。

2.5 加工工艺对全蝎 SDS-PAGE 电泳的影响^[7-8]

2.5.1 样品液的制备 称取 3 种样品各 0.5 g, 加入 10% 醋酸乙酯的石油醚溶液浸泡 10 min 脱脂, 倾去上清液, 连续操作 2 次, 水浴挥干溶剂, 加入 5 mL 电极缓冲液超声提取 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 得样品提取液, 取 0.8 mL 提取液加入 0.2 mL

样品缓冲液沸水浴加热 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 即得样品液。

2.5.2 电泳 配置 12% 的分离胶, 各个样品分别加样 10、20 μL, 200 V 恒压电泳, 将胶移入平皿中, 加入 20 mL 左右考马斯亮蓝染色液于脱色摇床上缓慢震荡 10 min, 弃去染液, 将凝胶在水中漂洗数次, 加入脱色液脱色 1 h。结果见图 1。由电泳图可知, 蛋白谱带以冻杀制组最多, 且带的颜色最深, 清水



1-清水制 10 μL 2-清水制 20 μL 3-盐水制 10 μL 4-盐水制 20 μL
5-冻杀制 10 μL 6-冻杀制 20 μL 7-Marker 10 μL
1-water boiled scorpion 10 μL 2-water boiled scorpion 20 μL 3-saline water boiled scorpion 10 μL 4-saline water boiled scorpion 20 μL 5-freeze dried scorpion 10 μL 6-freeze dried scorpion 20 μL 7-marker 10 μL

图 1 不同加工工艺全蝎 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 1 SDS-PAGE electropherogram of *Scorpio* with different processing technologies

制组有几条颜色比较浅的条带，而盐水制组基本上没有可见的条带，传统加工工艺处理的全蝎蛋白损失殆尽与蛋白测定结果一致。

2.6 抗肿瘤活性^[9]

选择接种后 7~10 d 状态较好的 S180 荷瘤小鼠，抽吸腹水 5 mL，加生理盐水稀释至 15 mL 即得细胞悬液。将肿瘤细胞悬液皮下接种于小鼠右前肢腋下，每只 0.2 mL。

将 60 只接种肿瘤细胞的小鼠随机分为对照组、清水制组、盐水制组、冻杀制组和环磷酰胺组，清水制组、盐水制组、冻杀制组分别 ig 蝎粉 0.05 g/只，对照组 ig 等体积的生理盐水，阳性对照组 ip 环磷酰胺 0.06 mg/只。连续给药 12 d 后，将小鼠称定质量，处死，剥离肉瘤组织，称质量，并进行方差分析。结果见表 2。

表 2 不同方法加工全蝎抗肿瘤活性比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)
Table 2 Antitumor activity of *Scorpion* with different processing technologies ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组 别	体质量/g	肿瘤质量/g	肿瘤系数/%
对照	26.3±3.78	1.234±0.264	4.692±0.810 ^A
清水制	26.6±4.35	0.858±0.126	3.226±0.509 ^B
盐水制	28.9±3.38	0.902±0.175	3.121±0.483 ^B
冻杀制	29.2±3.10	0.688±0.119	2.356±0.413 ^C
环磷酰胺	27.1±4.56	0.422±0.105	1.557±0.206 ^D

3 讨论

根据醇浸出物测定结果可知，3 种加工方法的醇浸出物得率有显著性差异，其中盐水煮制全蝎的浸出物得率最高，因为盐制全蝎中含有大量的盐分。

蛋白量测定结果显示，经冻干加工处理过的全

蝎蛋白的量是传统炮制方法的 20 倍左右，可见传统加工方法的煮制过程已经使全蝎的蛋白类成分损失殆尽，经抗肿瘤活性证实，冻杀制全蝎的抗肿瘤活性显著优于传统炮制方法。

全蝎作为疗效确切的中药，应用十分广泛。目前对全蝎的炮制加工方法，采用水煮杀，再晾晒干燥的工艺，采用该工艺方法活蝎因受热刺激易将蝎毒排出体外，且全蝎的有效成分不耐热^[10]，溶于水，不利于全蝎有效成分的存留；采用全蝎低温冻杀，冻杀干燥的工艺，可以最大限度地保留全蝎的有效成分，提高其抗肿瘤活性。

参考文献

[1] 孟琳, 姬涛, 侯林, 等. 全蝎匀浆提取工艺的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 577-580.
[2] 徐连明, 邵杰, 付小环, 等. 正交试验优选全蝎盐制工艺的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1811-1812.
[3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[4] 张永清, 李剑芳. 不同方法加工全蝎的对比研究 [J]. 中国医药科技, 2006, 13(1): 34-37.
[5] 赵宇萍, 平忠明. 全蝎含盐量对稀乙醇浸出物的影响 [J]. 江苏药学与临床研究, 2001, 9(3): 28.
[6] 徐杰伟, 温少磊, 蔡早育. 考马斯亮蓝法测定微量蛋白的条件探讨 [J]. 江西医学检验, 2003, 21(5): 353-354.
[7] 王家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
[8] 史克莉, 陈振江. 几种动物类中药材 SDS-PAGE 的电泳鉴别 [J]. 中成药, 2004, 26(5): 411-413.
[9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
[10] 肖伟, 赵维诚, 于德泉. 全蝎抗癌成分的初步研究 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2000, 14(1): 18-19.