

# 炮制去油对美洲大蠊主要成分和药效的影响

王鹏飞, 许润春\*, 李江维, 张喻娟

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** **目的:**研究压榨美洲大蠊主要成分含量变化,并考察压榨美洲大蠊药材对 CCl<sub>4</sub> 致小鼠肝损伤保护作用,为该药材的临床应用提供参考。**方法:**采用压榨法去除美洲大蠊油脂,利用茚三酮显色法和苯酚-硫酸法分别测定美洲大蠊药材中总氨基酸及总多糖含量,通过 CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤模型考察压榨美洲大蠊的药效。**结果:**压榨美洲大蠊中油脂质量分数 8.5%,总氨基酸及总多糖质量分数分别为 13.334, 21.06 mg·g<sup>-1</sup>,压榨美洲大蠊显著降低 CCl<sub>4</sub> 肝损伤小鼠的肝重系数,显著降低小鼠血清中丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶含量。**结论:**美洲大蠊经炮制减毒后,炮制品具有抗肝损伤药效。

**[关键词]** 美洲大蠊; 肝损伤; 总多糖; 氨基酸; 油脂

**[中图分类号]** R283.3; R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0020-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210020

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150924.1044.008.html>

**[网络出版时间]** 2015-09-24 10:44

## Effect of Processing Degreasing on Main Ingredients and Efficacy of *Periplaneta americana*

WANG Peng-fei, XU Run-chun\*, LI Jiang-wei, ZHANG Yu-juan (Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate content change of main ingredients in *Periplaneta americana* by mechanical pressing, and investigate protective effect of pressed *P. americana* on liver injury in mice induced by CCl<sub>4</sub>. **Method:** Oil in *P. americana* was removed by mechanical pressing, ninhydrin colorimetry and phenol-sulfuric acid method were used to measure contents of total amino acids and total polysaccharides in *P. americana*, respectively. Efficacy of pressed *P. americana* was investigated by acute liver injury model of mice induced with CCl<sub>4</sub>. **Result:** Content of oil in pressed *P. americana* was 8.5%, contents of total amino acids and total polysaccharides were 13.334, 21.06 mg·g<sup>-1</sup>, respectively. Pressed *P. americana* can significantly reduce liver weight coefficient of mice with liver injury and significantly decrease contents of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in serum of mice. **Conclusion:** After processing attenuated, processed product of *P. americana* has efficacy of anti-liver injury.

**[Key words]** *Periplaneta americana*; liver injury; total polysaccharides; amino acids; oil

美洲大蠊俗称蟑螂,入药始载于《神农本草经》,并将其列为中品,谓“味:咸、寒;治:血瘀症坚寒热、破积聚、喉咽毕、内寒无子”<sup>[1]</sup>。现代研究多集中于美洲大蠊提取物的药效<sup>[2]</sup>,具有抗肝损

伤<sup>[3]</sup>、促进血管增生、组织修复<sup>[4]</sup>等药理作用。《新修本草》中载有“蜚蠊,味咸寒,有毒……”,《全国中草药汇编》载“蟑螂性味功能:咸,寒,有小毒。散瘀消积,解毒利尿”<sup>[5]</sup>。但周琼等<sup>[6-7]</sup>研究发现美

**[收稿日期]** 20150413(021)

**[第一作者]** 王鹏飞,在读硕士,从事中药炮制与制剂研究, Tel:18428364330, E-mail:1017169733@qq.com

**[通讯作者]** \*许润春,博士,副教授,从事中药炮制与制剂研究, Tel:13308064016, E-mail:309786953@qq.com

洲大蠊粉的大鼠半数致死量( $LD_{50}$ )  $> 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 以 $LD_{50}$ 分级属于无毒。美洲大蠊粉连续给药4周, 肝肾功能检查、肝脏病理检查无异常。课题组前期通过对美洲大蠊油脂急性毒性研究显示美洲大蠊油脂属于无毒, 说明美洲大蠊对正常动物无毒副作用。近年有研究显示美洲大蠊药材全粉对酒精性肝损伤有一定的毒副作用<sup>[8]</sup>, 本课题组亦证明美洲大蠊粉未直接给药后对 $\text{CCl}_4$ 所致小鼠急性肝损伤有一定的毒副作用, 且其拮抗药效部位为美洲大蠊油脂部位。为降低美洲大蠊油脂对美洲大蠊药效的拮抗作用, 消除其毒副作用。本实验秉承中药炮制减毒的目的, 采用传统中药炮制技术——压榨去油法去除美洲大蠊药材中油脂, 动态检测美洲大蠊总多糖及总氨基酸的含量变化, 考察其炮制品对 $\text{CCl}_4$ 致小鼠急性肝损伤的保护作用, 以通过炮制去油法消除美洲大蠊药材的毒副作用, 保障其临床安全合理用药。

## 1 材料

TU-1810 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), AU5800 型全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司)。美洲大蠊(购自云南腾冲, 经成都中医药大学药教研室卢先明教授鉴定为蜚蠊科大蠊属昆虫美洲大蠊 *Periplaneta americana*), 葡萄糖、丙氨酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110833-201205, 140680-201202), 联苯双酯滴丸(浙江万邦药业股份有限公司, 批号 A02131105), 试剂均为分析纯。昆明种小鼠, 由成都达硕生物科技有限公司提供, SPF 级, 体重( $20 \pm 2$ ) g, 雌雄各半, 许可证号 SCXK(川)2013-24。

## 2 方法与结果

### 2.1 美洲大蠊炮制去油

**2.1.1 压榨法去油** 60℃烘干的美洲大蠊, 粉碎, 过一号筛, 将药材用草纸包裹, 置于压滤机中反复压榨, 每1h更换1次草纸, 压至草纸上无油脂, 取出, 即得压榨美洲大蠊。

**2.1.2 石油醚脱脂去油** 取美洲大蠊药材, 烘干, 粉碎, 过一号筛, 用石油醚加热回流3次, 每次1h, 脱脂后将药材晾干, 即得去油美洲大蠊。

**2.2 油脂的含量测定** 取美洲大蠊, 分别加2.0, 1.5, 1.0倍量石油醚加热回流提取3次, 提取时间分别为1.5, 1.0, 1.0h, 过滤, 合并提取液, 减压浓缩, 回收溶剂至无石油醚挥出, 静置24h。分别测得去油美洲大蠊、压榨美洲大蠊、美洲大蠊(原药材)中油脂质量分数分别为0.0%, 8.5%, 27.2%。

### 2.3 总氨基酸的含量测定<sup>[9-10]</sup>

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精密称取丙氨酸对照品20.64mg置于100mL量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 得储备液。精密取该储备液5mL, 置于50mL量瓶中, 加水稀释至刻度, 得对照品溶液。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 精密称取美洲大蠊药材约2.5g, 加10倍量85%乙醇回流提取3次, 每次1h, 合并提取液, 过滤, 将滤液置100mL量瓶中, 用85%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 取提取液1mL置于100mL量瓶中, 用85%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.3.3 检测波长的选择** 精密吸取丙氨酸对照品溶液、水、供试品溶液及85%乙醇各1mL, 分别置于10mL量瓶中, 精密加入柠檬酸缓冲液(pH 5.0)1mL, 1%维生素C溶液0.1mL, 茚三酮乙醇液2mL, 摇匀, 置于100℃水浴中加热15min, 取出, 迅速冷却至室温, 用60%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 采用紫外-可见分光光度计进行全波长扫描, 结果显示对照品溶液与供试品溶液在570nm处均有最大吸收, 且试剂无干扰, 故确定检测波长570nm。

**2.3.4 标准曲线的绘制** 精密吸取对照品溶液0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0mL分别置于10mL量瓶中, 精密加入柠檬酸缓冲液(pH 5.0)1mL, 1%维生素C溶液0.1mL, 茚三酮乙醇液2mL, 加水至8mL, 摇匀, 置于100℃水浴中加热15min, 取出, 迅速冷却至室温, 用60%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 于570nm处测定吸光度A。以质量浓度为横坐标, A为纵坐标, 得回归方程 $A = 0.1785C - 0.021$  ( $r = 0.9998$ ), 线性范围0.4128~4.128  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.3.5 精密度试验** 取供试品溶液1mL, 按2.3.4项下方法显色, 于570nm处连续测定6次A, 计算RSD 0.2%。

**2.3.6 重复性试验** 精密称取供试品, 平行6份, 按2.3.2项下方法制备供试品溶液, 按2.3.4项下方法显色, 于570nm处测定A, 结果RSD 1.1%。

**2.3.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 每间隔1h测定1次A, 连续考察6h, 结果RSD 1.3%, 表明供试品溶液在6h内稳定。

**2.3.8 加样回收率试验** 精密取6份已知丙氨酸含量( $10.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的样品, 每份1.0mL, 共9份, 等分为3组, 分别加入丙氨酸对照品溶液0.4, 0.5, 0.6mL, 按2.3.2项下方法制备供试品溶液, 按2.3.4项下方法显色, 于570nm处测定A, 计算平均加样回收率101.5%, RSD 2.0%。

**2.3.9 样品测定** 取各药材粉末,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.4项下方法显色,于570 nm处测定A,计算去油美洲大蠊、压榨美洲大蠊、美洲大蠊(原药材)中总氨基酸质量分数分别为15.124,13.334,12.104 mg·g<sup>-1</sup>。

#### 2.4 总多糖的含量测定<sup>[11-12]</sup>

**2.4.1 对照品溶液的制备** 精密称取105℃干燥至恒重的葡萄糖对照品78.26 mg,置于100 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,得储备液。精密取该储备液3 mL,置于25 mL量瓶中,加水稀释至刻度,得93.912 mg·L<sup>-1</sup>对照品溶液。

**2.4.2 供试品溶液的制备** 精密称取样品约0.4 g于50 mL圆底烧瓶中,加入6 mol·L<sup>-1</sup>盐酸10 mL和水15 mL,置于沸水中水解1.5 h,加活性炭0.5 g脱色,过滤,用水冲洗残渣,以酚酞为指示剂,用10%氢氧化钠中和至微红色,转移至100 mL量瓶中,加水稀释并定容至刻度,即得。

**2.4.3 检测波长的选择** 分别取葡萄糖对照品、供试品溶液、水各2 mL,分别置于10 mL试管中,各加入5%苯酚溶液1 mL和浓硫酸5 mL,混匀,水浴加热显色30 min,迅速冷却室温,加水定容,混匀,采用紫外-可见分光光度计进行扫描,结果显示对照品溶液与供试品溶液在490 nm处均有最大吸收,故选择检测波长490 nm。

**2.4.4 标准曲线的绘制** 精密吸取对照品溶液0.0,0.2,0.4,0.8,1.2,1.6,2.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,加水至2 mL,按2.4.3项下方法显色,于490 nm处测定A。以质量浓度为横坐标,A为纵坐标,得回归方程 $A = 0.0429C - 0.0266$  ( $r = 0.9995$ ),线性范围1.878~18.78 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.4.5 精密度试验** 取对照品溶液1 mL,按2.4.3项下方法显色,于490 nm处连续测定6次A,计算RSD 0.2%。

**2.4.6 重复性试验** 平行称取供试品6份,精密称定,按2.4.2项下方法制备样品溶液,按2.4.3项下方法显色,于490 nm处测定A,结果RSD 1.2%。

**2.4.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液,于490 nm处每间隔30 min测定1次A,连续考察3 h,结果RSD 1.2%,表明供试液在3 h内稳定。

**2.4.8 加样回收率试验** 精密称取已知葡萄糖含量(47.42 mg·L<sup>-1</sup>)的供试品6份,每份1.0 mL,共9份,等分为3组,分别加入葡萄糖对照品溶液0.4,0.5,0.6 mL,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,按2.4.3项下方法显色,于490 nm处测定A,计算平均

加样回收率100.8%,RSD 1.9%。

**2.4.9 样品测定** 取各药材粉末,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,按2.4.3项下方法显色,于490 nm处测定A,计算去油美洲大蠊、压榨美洲大蠊、美洲大蠊(原药材)中总多糖质量分数分别为24.58,21.06,16.12 mg·g<sup>-1</sup>。

#### 2.5 美洲大蠊对小鼠CCl<sub>4</sub>肝损伤的影响

**2.5.1 样品制备<sup>[6,13]</sup>** 取50℃烘干的美洲大蠊最粗粉,用85%乙醇提取3次,每次提取1.5 h,浓缩,加适量水静置12 h,分离上层油脂,得美洲大蠊油脂。取50℃烘干的美洲大蠊最粗粉,用85%乙醇提取3次,每次提取1.5 h,浓缩,加适量热水搅拌,静置12 h,得0.667 g·mL<sup>-1</sup>美洲大蠊提取液。将去油美洲大蠊粉碎,过5号筛,用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成0.667 g·mL<sup>-1</sup>混悬液。压榨美洲大蠊粉碎,过5号筛,用0.5% CMC-Na配成0.667 g·mL<sup>-1</sup>混悬液。取50℃烘干的美洲大蠊(原药材),粉碎,过5号筛,用0.5% CMC-Na配成0.667 g·mL<sup>-1</sup>混悬液。联苯双酯滴丸研磨粉碎,过5号筛,用0.5% CMC-Na配成15 g·L<sup>-1</sup>混悬液。

**2.5.2 不同样品考察** 昆明种小鼠80只随机分为空白组、模型组、阳性组、油脂组、提取液组、原药材组、粉末(去油)组、粉末(压榨)组,每组10只。适应性喂养3 d后,空白组和模型组分别灌胃0.5% CMC-Na,油脂组、提取液组、原药材组、粉末(去油)组、粉末(压榨)组分别灌胃对应药物,剂量均为0.667 g·mL<sup>-1</sup>,阳性组灌胃15 g·L<sup>-1</sup>联苯双酯滴丸混悬液,给药体积均为10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,连续给药10 d。末次给药后,除空白组外其余各组均按10 mL·kg<sup>-1</sup>腹腔注射0.2% CCl<sub>4</sub>油溶液,空白组注射等体积食用油,禁食不禁水,24 h后眼球取血,于3 500 r·min<sup>-1</sup>,4℃离心20 min,分离血清置于4℃保存,测定血清丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),处死小鼠后立即取出肝脏,称定质量,计算肝重系数,见表1。结果与空白组比较,模型组小鼠的肝重系数,ALT和AST水平均明显升高,表明模型复制成功。与模型组比较,阳性组、提取液组、粉末(压榨)组肝重系数明显降低,血清中ALT,AST的活性均显著下降;粉末(去油)组、原药材组的肝重系数与模型组比较略有加重,ALT和AST均略有升高。

#### 3 讨论

美洲大蠊作为优良的一线肝病原料药,其制剂如肝龙胶囊、消症益肝片等,药效显著,但偶有不良反应

表 1 美洲大蠊对 0.2% CCl<sub>4</sub> 肝损伤小鼠血清 ALT, AST 水平及肝脏指数的影响

Table 1 Effects of *Periplaneta americana* on serum ALT, AST levels and liver index of mice with liver injury induced by 0.2% CCl<sub>4</sub>

组别	肝重系数	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>
空白	4.4 ± 0.18 <sup>4)</sup>	35.8 ± 6.2 <sup>4)</sup>	163.8 ± 35.5 <sup>4)</sup>
模型	5.5 ± 0.49 <sup>2)</sup>	1 825.9 ± 702.9 <sup>2)</sup>	2 333.0 ± 816.7 <sup>2)</sup>
阳性	4.7 ± 0.21 <sup>1,4)</sup>	1 006.0 ± 652.8 <sup>2,4)</sup>	576.7 ± 193.6 <sup>2,4)</sup>
油脂	5.6 ± 0.44 <sup>2)</sup>	2 250.4 ± 786.9 <sup>2)</sup>	1 966.5 ± 848.6 <sup>2)</sup>
粉末(去油)	5.7 ± 0.39 <sup>2)</sup>	2 730.7 ± 987.5 <sup>2)</sup>	2 427.3 ± 831.8 <sup>2)</sup>
提取液	4.9 ± 0.39 <sup>1,4)</sup>	1 100.0 ± 689.2 <sup>2,4)</sup>	631.7 ± 397.6 <sup>2,4)</sup>
粉末(压榨)	5.0 ± 0.35 <sup>2,3)</sup>	1 312.5 ± 537.7 <sup>2,4)</sup>	696.5 ± 301.5 <sup>2,4)</sup>
原药材	5.7 ± 0.58 <sup>2)</sup>	2 369.8 ± 1194.7 <sup>2)</sup>	2 486.5 ± 948.8 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

发生。周琼等<sup>[6-7]</sup>研究表明在小鼠正常生理条件下,大剂量、长时间灌胃给予美洲大蠊粉末,结果按毒性划分级别美洲大蠊为无毒性药物。然李晨晨等<sup>[8]</sup>通过酒精致小鼠急性肝损伤病理模型条件下给以美洲大蠊粉末,其不同剂量组均显示美洲大蠊不具有保护肝损伤的药理作用,反而均显示加重肝损伤的研究结果,表明美洲大蠊粉末对酒精性肝损伤具有一定毒副作用。本课题组考虑可能是美洲大蠊中油脂部位存在毒副作用,采用急性毒性实验研究证明美洲大蠊油脂部位按照毒性分类原则,其为无毒性药物。采用 CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤病理模型研究不同剂量美洲大蠊药材对小鼠肝损伤的保护作用,研究结果与李晨晨等一致,且显示美洲大蠊提取物(去油)对肝损伤小鼠具有保护作用,美洲大蠊粉末对肝损伤小鼠具有毒副作用,且其毒副作用部位为美洲大蠊油脂部位。综上所述,美洲大蠊油脂在单独使用时,是安全、无毒的,但是在小鼠肝损伤病理模型下,美洲大蠊油脂拮抗美洲大蠊提取液保护肝损伤的药理作用,甚至加重肝损伤。

传统中药炮制技术具有增强药物疗效和减轻药物毒性的作用。炮制技术中压制去油法采用一定的设备压制,降低药材中含有的油脂含量,具有减毒作用,例如巴豆霜。本文研究结果表明,与模型组比较,美洲大蠊粉末(压榨)组小鼠肝重系数明显降低,小鼠血液中 ALT 和 AST 水平显著降低,具有肝损伤保护作用,且其药效基本与美洲大蠊提取液相当。美洲大蠊原药材粉末及美洲大蠊(去油)粉末直接给药均未能体现药效。由此可见,美洲大蠊通过炮制去油后,维持了药物本身的药效,也消除了美洲大蠊具有的毒副作用。

美洲大蠊中氨基酸含量较高且种类齐全,氨基酸作为合成各种具有重要功能分子的必需前体物,具有

调节免疫、调节代谢等独特功能。多糖类成分为美洲大蠊主要活性物质之一,具有调节免疫、抗肿瘤、抗溃疡等生物活性。本文选用这 2 个指标测定炮制前后美洲大蠊中总多糖及总氨基酸含量,证明影响药效的发挥,不在于其含有的活性物质,关键在于药材中油脂的含量。油脂含量过高或是完全没有油脂,美洲大蠊药材粉末直接给药均不能发挥其药效,且存在一定的毒副作用。采用传统中药炮制中压榨法,油脂质量分数 8.5% 时,美洲大蠊粉末给药具有肝保护作用。

综上所述,采用压榨法去除美洲大蠊药材中油脂,炮制品中总氨基酸及总多糖含量略有增加,但不是影响其药效的关键所在。美洲大蠊炮制品中油脂含量降低,维持了美洲大蠊本身的药效,消除美洲大蠊具有的毒副作用,实现了炮制减毒的目的。但关于其炮制减毒机制尚不明确,有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 孙星衍. 神农本草经[M]. 北京:商务印书馆,1955:90.  
 [2] 何正春,彭芳,宋丽艳,等. 美洲大蠊化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2007,32(21):2326-2329.  
 [3] 马家骅,蒋巧梅,徐华,等. 美洲大蠊抗 CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤作用的研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(3):79-80.  
 [4] 王俊明,何学华,李宏清. 康复新液保留灌肠治疗 26 例溃疡性结肠炎[J]. 西部药学,2006,18(5):629-629.  
 [5] 萧庆慈,肖泓,刘昆平. 蜚蠊的古今应用[J]. 云南中医学院学报,2012,35(1):55-59.  
 [6] 周琼. 美洲大蠊资源开发利用的研究[D]. 福州:福建农林大学,2008.  
 [7] 李树楠,李辉,张华明,等. 美洲大蠊中促进肉芽生长成份的研究[J]. 云南医药,1987(3):174-177.  
 [8] 李晨晨,熊永爱,谭承佳,等. 美洲大蠊对小鼠急性酒精性肝损伤的药理作用研究[J]. 世界科学技术——中药现代化,2014,16(4):758-760.  
 [9] 吴红梅,李晨晨,刘楠,等. 闪式与回流提取美洲大蠊总氨基酸的工艺比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):52-53.  
 [10] 王玮伟,李海波,蒋学云,等. 美洲大蠊药材中总氨基酸提取工艺优化研究[J]. 大理学院学报,2008,7(12):3-5.  
 [11] 肖培云,杨永寿,李龙星,等. 美洲大蠊药材中总糖含量的测定研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2077-2079.  
 [12] 陈战国,周利燕,李鹏程. 苯酚-硫酸法测定太白泡沙参总多糖的含量[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版,2009,37(4):48-51.  
 [13] 黄晶,梅明,许润春,等. 美洲大蠊提取物抗肝损伤药效比较及工艺评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(19):46-49.

[责任编辑 刘德文]