

不同炮制方法对僵蚕体外抗氧化活性及其对酪氨酸酶抑制能力的影响

赵清^{1,2}, 霍利琴², 贾天柱^{1*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 河北大学中医学院, 河北 保定 071000)

[摘要] 目的: 探讨不同炮制方式对僵蚕提取物体外抗氧化活性及其对酪氨酸酶抑制能力的影响。方法: 以生品僵蚕为对照, 以二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)、羟自由基(·OH)、三价铁离子还原能力及小鼠肝微粒体脂质过氧化为指标, 考察不同僵蚕炮制品甲醇提取部位体外抗氧化能力的差异; 以 L-多巴为底物, 考察不同僵蚕炮制品提取物对酪氨酸酶抑制能力的差异; 采用 HPLC 比对和确定甘蒸僵蚕新增成分的归属。结果: 当提取液生药质量浓度为 2~30 g·L⁻¹ 时, 生品、微波品、甘蒸品和麸炒品对 DPPH· 的清除率基本一致, 清蒸僵蚕的清除率最低; 生药质量浓度为 20 g·L⁻¹ 时, 各炮制品对·OH 的清除率均达到最大, 清除能力顺序为生品 > 甘蒸品 > 微波品 > 麸炒品 > 清蒸品; 生药质量浓度为 8~80 g·L⁻¹ 时, 各炮制品的总还原能力大小为甘蒸品 > 微波品 > 生品 > 清蒸品 > 麸炒品; 生药质量浓度为 80 g·L⁻¹ 时, 各炮制品对小鼠肝脏微粒体脂质过氧化的抑制率均达到最大, 抑制能力顺序为生品 > 甘蒸品 > 微波品 > 麸炒品 > 清蒸品; 生药质量浓度为 20 g·L⁻¹ 时, 各炮制品对酪氨酸酶的抑制率达到最大, 抑制能力排序为甘蒸品 > 生品 > 清蒸品 > 麸炒品 > 微波品。HPLC 图谱比对结果显示, 与生品及其他炮制品相比, 甘蒸僵蚕甲醇提取部位增加了蔗糖甘草苷、甘草苷和甘草酸铵等抗氧化活性成分。结论: 僵蚕经加热炮制后, 体外抗氧化活性与对酪氨酸酶的抑制能力有所降低。甘蒸僵蚕的整体抗氧化活性不劣于生品是因为辅料甘草汁中活性物质起到了相应的贡献作用。

[关键词] 僵蚕; 炮制工艺; 体外抗氧化活性; 酪氨酸酶抑制能力活性; 二苯代苦味酰基自由基; 羟自由基

[中图分类号] R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0017-07

[doi] 10.11653/syfy2014030017

Effects of Different Processing Methods on *in vitro* Antioxidant Activity and Inhibiting Capacity for Tyrosinase of Bombyx Batryticatus

ZHAO Qing^{1,2}, HUO Li-qin², JIA Tian-zhu^{1*}

(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Dalian 116600, China;
2. College of TCM, Hebei University, Baoding 071000, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss effects of different processing methods on *in vitro* antioxidant activity and inhibiting capacity for tyrosinase of Bombyx Batryticatus extracts. **Method:** By contrast with raw Bombyx Batryticatus, *in vitro* antioxidant capacity differences of methanol extracts of different Bombyx Batryticatus processed products were investigated by taking DPPH radicals, hydroxyl radicals, trivalent iron ions reducing ability and mouse liver microsomal lipid peroxidation as indicators; Inhibiting capacity differences of extracts of different Bombyx Batryticatus processed products for tyrosinase were investigated with L-Dopa as substrate; HPLC was adopted to match and determine ascription of new compositions in Bombyx Batryticatus steamed with licorice-juice. **Result:** When the crude drug concentration in the range of 2-30 g·L⁻¹, DPPH removal rate of steamed Bombyx Batryticatus extract was most minimum but other ones were basically the same; On the crude drug

[收稿日期] 20130806(010)

[基金项目] 河北省中医药管理局项目(2009151);河北省自然科学基金青年基金项目(H2214201042)

[第一作者] 赵清,在读博士,讲师,从事中药饮片炮制工艺与炮制原理研究,Tel:0312-5075645,E-mail:wshxr2003@163.com

[通讯作者] *贾天柱,教授,博士生导师,从事饮片工艺创新与炮制原理解析研究,Tel:0411-87586499,E-mail:jiatz@lnutcm.edu.cn

concentration of $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, clearance rates for hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) of each processed products were maximum of their owns, removing abilities were presented as raw products > licorice-juice steamed products > microwave processed products > bran fried products > steamed products; In the concentration range of $8\text{-}80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, total reducing abilities of different products were presented as licorice-juice steamed products > microwave processed products > raw products > steamed products > bran fried products; On the concentration of $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, inhibition of all processed products to mice liver microsomal lipid peroxidation were up to maximum of their owns with order of raw products > licorice-juice steamed products > microwave processed products > bran fried products > steamed products; On the concentration of $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, inhibition rates of all processed products for tyrosinase were up to maximum of their owns with subsequence as licorice-juice steamed products > raw products > steamed products > bran fried products > microwave processed products. By comparing with raw products and other processed products, HPLC profiles showed that methanol extracts of licorice-juice steamed products possess new compounds of liquiritin apioside, liquiritin, ammonium glycyrrhetate and other antioxidant components. **Conclusion:** *In vitro* antioxidant activity and inhibition for tyrosinase of *Bombyx Batryticatus* were weakened after being heated. Overall antioxidant activity of licorice-juice steamed *Bombyx Batryticatus* was not less than raw products on account of active materials in licorice-juice played a key role in the consideration.

[**Key words**] *Bombyx Batryticatus*; processing technology; *in vitro* antioxidant activity; inhibiting capacity for tyrosinase; diphenyl-generation bitterness acyl radical; hydroxyl radical

僵蚕又名白僵蚕,《神农本草经》将其列为中品,具有“去三虫,灭黑黧,令人面色好”的记载,作为美白皮肤的天然药物,已被开发成诸多的祛斑产品,受到消费者的青睐。现代研究表明酪氨酸酶(Tyr)为皮肤黑素合成的关键酶,其活性与黑色素合成量相关,调节 Tyr 活力即可调节黑素生成量^[1]。宫盛昭等^[2]研究发现 70% 乙醇微波提取的白僵蚕提取液对酪氨酸酶的抑制作用较强,这或许是僵蚕能“灭黑暗”的原由所在。Koo 等^[3]研究表明僵蚕提取物对阿耳茨海默氏病具有潜在的防治作用,能减轻 β 淀粉样蛋白对体外培养的大鼠海马星形胶质细胞的毒性,作用机制是通过抑制脂质过氧化和保护抗氧化的酶,提高超氧化物歧化酶活力,减轻自由基对脑细胞的毒性作用,最终显示出良好的抗氧化活性。金洁等^[4]研究发现除三氯甲烷提取物抗氧化活性较弱外,僵蚕其他提取部位均具有明显的抗氧化活性,其中甲醇提取部位活性最强。僵蚕作为传统的息风止痉类中药,对肝阳上亢、肝风内动引起的惊厥抽搐疗效显著。试验研究表明僵蚕提取物能明显对抗戊四氮(MET)引起的动物癫痫发作,同时对癫痫小发作具有良好的临床应用前景^[5]。癫痫发作的本质是大脑皮质神经元的过度同步放电,反复发作时会造成慢性脑缺氧,使组织中产生自由基,而反复的癫痫样放电亦会受自由基所启动的膜脂质过氧化反应的调节影响,因为细胞膜上的脂质过氧化反应可抑制 ATP 酶的活性,影响细胞间的离子转

运,导致神经元膜电活动的异常^[6-7]。僵蚕具有的抗氧化活性物质能减少大脑皮质细胞的脂质过氧化反应,减轻自由基对细胞膜的攻击,起到稳定膜电位的作用,有利于癫痫的治疗。

僵蚕入药时多采用炮制品,炮制方法以麸炒为主,此外还有清炒、姜制、酒制、甘草制、甘草面粉制、甘草麦麸制等^[8-9],但炮制工艺对僵蚕抗氧化活性及其对酪氨酸酶抑制能力的影响尚未见报道。本实验对僵蚕炮制的加热方式进行了拓展,除麸炒外,还设计了蒸制和微波炮制。文献报道甘草中诸多成分如黄酮类化合物等具有良好的抗氧化活性^[10],故基于“引入辅料协同增效”的从制原则,本实验设计了甘草汁蒸制僵蚕,并以生品僵蚕为对照,考察各炮制品提取物对酪氨酸酶抑制能力的差异;以二苯代苦味酰基自由基(DPPH \cdot)、羟自由基、三价铁离子还原体系及小鼠肝微粒体脂质过氧化为指标,考察各炮制品甲醇提取部位体外抗氧化能力的差异,为探明炮制过程对僵蚕抗氧化活性与抑酶能力的作用机制提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(AT3300 型自动柱温箱,美国安捷伦公司),Multiskan MK3 型酶标仪(美国赛默飞公司),U3010 型紫外-可见分光光度计(日本日立),FSH-2 型可调高速电动匀浆器(江苏佳美演艺设备有限公司)。

二苯代苦味酰基自由基(DPPH \cdot)、蘑菇酪氨酸

酶(Tyr)、L-多巴(L-Dopa)、福林酚(Folin-Phenol)试液均购于上海金穗生物科技有限公司,双氧水、水杨酸、铁氰化钾、2-硫代巴比妥酸(TBA)均购自天津登科试剂厂,芦丁、没食子酸对照品(均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为20120822,20130409),僵蚕(购置于成都荷花池药材市场,经我院中药鉴定教研室崔桂华教授鉴定为蚕蛾科昆虫家蚕*Bombyx mori* Linnaeus 4~5龄的幼虫感染白僵菌而致死的干燥体),水为超纯水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 僵蚕炮制品的制备

2.1.1 清蒸僵蚕 取僵蚕100 g,清水淘洗2次,沥干,放入蒸锅中进行加热,以蒸锅圆汽时为记时点,蒸1 h,取出,置于鼓风干燥箱中于55℃烘干,即得。

2.1.2 麸炒僵蚕 参照2010年版《中国药典》附录ⅡD中麸炒法,将炒制容器加热,至撒入麸皮即刻烟起,随即投入僵蚕,迅速翻动,炒至表面呈黄色或深黄色,取出,筛去麸皮,放凉,每100 g僵蚕用麦麸10 g。

2.1.3 微波炮制僵蚕 取僵蚕100 g,清水淘洗2次,闷润1 h,放入微波炉中加热,于1 500 W条件下加热90 s,膨胀鼓起、质脆、略显黄色,取出放凉。

2.1.4 甘草汁蒸制僵蚕^[11] 取甘草饮片6 g,加10倍量清水煎煮3次,每次1 h,滤过,合并滤液,浓缩至60 mL,得甘草汁。取僵蚕100 g,清水淘洗2次,沥干。将甘草汁全部拌入僵蚕中,放入蒸锅中加热,以蒸锅圆汽时为记时点,蒸1 h,取出,置于鼓风干燥箱中于55℃烘干。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 抗氧化活性提取物 分别取僵蚕生品、清蒸品、麸炒品、甘草汁蒸制(甘蒸)品、微波炮制品适量,粉碎,全部通过40目筛。精密称取各样品细粉4.0 g,加10倍量甲醇水浴回流提取2次,每次1 h,过滤,合并滤液至同一蒸发皿中,水浴挥干甲醇,残留物用甲醇转移并定容至50 mL量瓶中,-4℃冷藏,封口备用,每次使用前均需过0.45 μm微孔滤膜。

2.2.2 酪氨酸酶抑制剂^[2] 分别取各样品细粉4.0 g,加10倍量75%乙醇回流提取2次,每次1 h,过滤,合并滤液,减压回收乙醇至无醇味,全部蒸干。

2.3 总黄酮的含量测定

2.3.1 总黄酮标准曲线绘制^[12] 精密吸取芦丁对照品溶液(0.764 g·L⁻¹) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于10 mL量瓶中,用50%

乙醇定容至刻度,摇匀,静置10 min,以50%乙醇为空白参照,于360 nm处测定吸光度(A),以芦丁对照品溶液质量浓度为横坐标,A为纵坐标,得回归方程为 $A = 29.067C$ ($r = 0.9995$),线性范围0.007 64~0.076 4 g·L⁻¹。

2.3.2 样品测定 分别精密吸取2.2.1项下提取液0.5 mL,各加入50%乙醇4.5 mL,摇匀,静置10 min,以50%乙醇为参照,于360 nm处测定A,计算提取液(生品、清蒸品、麸炒品、甘蒸品、微波炮制品)中总黄酮质量分数分别为0.813%, 0.556%, 0.567%, 0.709%, 0.632%,表明僵蚕炮制后总黄酮含量会降低。

2.4 总酚的含量测定

2.4.1 总酚标准曲线绘制 精密吸取焦性没食子酸甲醇贮备液(0.632 g·L⁻¹) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于2 mL棕色量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,得系列对照品溶液。精密吸取各溶液0.5 mL,各加入福林酚试液1.0 mL和0.4 mol·L⁻¹碳酸钠溶液5.0 mL,于40℃水浴避光保存30 min,取出,避光保存1.0 h,在760 nm处测定A,以质量浓度为横坐标,A为纵坐标,得回归方程 $Y = 7.1053X + 0.0557$ ($r = 0.9992$),线性范围0.015 56~0.249 2 g·L⁻¹。

2.4.2 样品测定 精密吸取2.2.1中各提取液1.0 mL,按2.4.1项下方法测定A,结果各样品中总酚提取量分别为3.596, 2.995, 3.436, 3.989, 3.121 mg·g⁻¹,除甘蒸僵蚕外,其他炮制品中总酚含量均低于生品。

2.5 僵蚕提取物对DPPH清除率的测定^[12] 精密量取2.2.1项下提取液0.1, 0.5, 1, 1.5 mL, 分别置于4 mL离心管中,用甲醇补足至3.9 mL,各加入1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼的乙醇溶液(DPPH溶液)0.1 mL,使样品液终生药质量浓度依次为2, 10, 20, 30 g·L⁻¹,混合液剧烈震荡后,室温避光反应30 min,用紫外分光光度计于517 nm处测定吸光度(A),计算清除率,结果见图1。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

式中 A_0 为未加提取液时DPPH·溶液的吸光度, A_1 为加入提取液时DPPH·溶液的吸光度, A_2 为提取液在517 nm处的吸光度。由图1可知,各样品液对二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)的清除率随总酚和总黄酮质量浓度的增大呈先升高后稳定的趋势;生品、微波品、甘蒸品和麸炒品对DPPH·的清除率基本一致,生药质量浓度为10 g·L⁻¹时,清除率顺

序为微波僵蚕(95.25%) > 生品僵蚕(94.70%) > 甘蒸僵蚕(94.51%) > 麸炒僵蚕(92.32%) > 清蒸僵蚕(83.18%); 清蒸僵蚕提取液生药质量浓度在2~20 g·L⁻¹对DPPH·的清除率小于生品和其他炮制品,而在20~30 g·L⁻¹时清蒸僵蚕对DPPH·的清除率与生品僵蚕、微波僵蚕、甘蒸僵蚕和麸炒僵蚕基本一致。

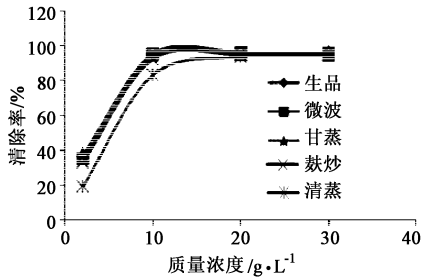


图1 僵蚕各炮制品提取物对DPPH·自由基的清除率

2.6 僵蚕提取物对羟自由基(·OH)清除能力的测定^[13] 取2.2.1项下不同提取液0.2, 0.5, 0.8, 1.0 mL, 分别置于8 mL离心管中, 用甲醇补足至1.6 mL, 加入9 mmol·L⁻¹的FeSO₄溶液0.8 mL, 混匀, 加入8.8 mmol·L⁻¹过氧化氢0.8 mL, 静置10 min, 加入9 mmol·L⁻¹水杨酸溶液0.8 mL, 混匀, 使样品液终生药质量浓度依次为4.0, 10.0, 16.0, 20.0 g·L⁻¹, 室温反应30 min, 于3 000 r·min⁻¹离心10 min, 取上清液于510 nm处测定A, 以60%甲醇作参比调零, 计算羟自由基清除率, 结果见图2。

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率} = [1 - (A_2 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

式中A₀为用去离子水代替水杨酸时溶液的吸光度, A₁为空白吸光度值, A₂为加样品的吸光度值。由图2可知, 当样品液终生药质量浓度为4~20 g·L⁻¹时, 样品液中总酚和总黄酮类物质对羟自由基(·OH)的清除率基本随质量浓度的增加呈上升趋势, 于20 g·L⁻¹的清除率顺序为生品僵蚕(79%) > 甘蒸僵蚕(72%) > 微波僵蚕(60%) > 麸炒僵蚕(51%) > 清蒸僵蚕(48%)。

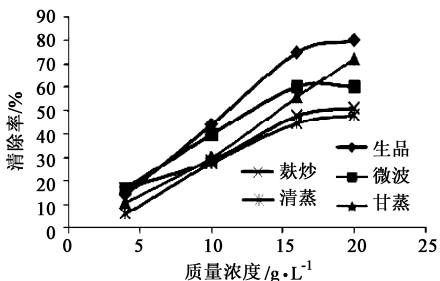


图2 僵蚕各炮制品提取物对羟自由基的清除作用

2.7 僵蚕提取物总还原能力的测定^[14] 取2.2.1

项下各提取液0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mL, 分别置于8 mL离心管中, 用甲醇补足至0.5 mL, 使生药质量浓度依次为8, 16, 32, 48, 80 g·L⁻¹, 各加入磷酸盐缓冲液(pH 6.6)2.5 mL和1%铁氰化钾溶液2.5 mL, 置于50℃水浴保温20 min, 加入10%三氯乙酸溶液2.5 mL, 于3 000 r·min⁻¹离心10 min, 精密吸取上清液2.5 mL, 加入蒸馏水2.5 mL和0.1%三氯化铁溶液0.5 mL, 混匀后于700 nm处测定A, 以甲醇作空白对照, A越大, 还原力越强, 结果见图3。表明随总酚和总黄酮质量浓度的增加, 僵蚕生品及其不同炮制品总还原能力均呈上升趋势, 其中甘蒸僵蚕和微波僵蚕总还原效果较好, 二者均明显大于生品僵蚕、清蒸僵蚕和麸炒僵蚕。

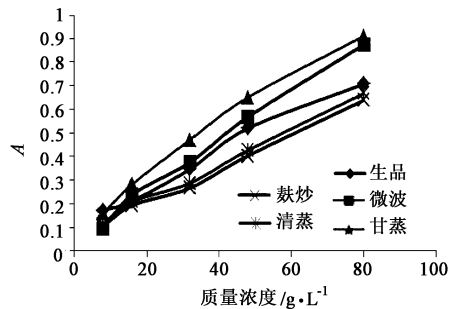


图3 僵蚕各炮制品提取物的总还原能力

2.8 僵蚕提取物对小鼠肝脏脂质过氧化抑制能力的测定^[15] 取健康小鼠, 雌雄均可, 禁食12 h, 次日断头处死, 迅速取出肝脏, 置4℃生理盐水中洗净表面残血, 用滤纸吸干水分, 称定质量, 用pH 7.4的PBS溶液在冰浴条件下制成10%肝匀浆备用, 离心(8 000 r·min⁻¹, 10 min)后备用。取肝匀浆上清液1.0 mL于8 mL离心管中, 加入不同生药质量浓度(8, 16, 48, 80 g·L⁻¹)的提取液1.0 mL, 对照组以甲醇代替提取液, 混匀后于37℃水浴恒温振荡1.5 h, 取出后加10%三氯乙酸2.0 mL以终止反应, 加入0.67%的2-硫代巴比妥酸(TBA)1.0 mL, 混匀后沸水浴中反应15 min, 取出后流水冷却, 于3 000 r·min⁻¹离心15 min, 取上清液于532 nm处比色, 以去离子水为参比调零, 测定A, 计算丙二醛清除率, 结果见图4。

$$\text{丙二醛清除率} = [1 - (A_{\text{加药管}} - A_{\text{药底管}}) / A_{\text{对照}}] \times 100\%$$

式中A_{对照}为以甲醇代替提取液时测得的吸光度, A_{加药管}为加入提取液时测得的吸光度, A_{药底管}为以PBS溶液代替肝匀浆时测得的吸光度。由图4可知, 当提取液生药质量浓度为4~40 g·L⁻¹时, 生品僵蚕、微波僵蚕、甘蒸僵蚕提取液对丙二醛的清除率均为正值, 但清除率随药液质量浓度的增大而绝

对值变小,说明僵蚕炮制品提取液中还原性物质的含量不足以完全对抗脂质过氧化时氧化剂的含量,还会有较多的丙二醛产生;清蒸僵蚕和麸炒僵蚕的清除率虽为正值,但均 < 13.0%,对小鼠肝匀浆自发性脂质过氧化抑制能力较差。随提取液中总酚和总黄酮质量浓度的逐渐增加,生品僵蚕和甘蒸僵蚕提取液抗小鼠肝匀浆自发性脂质过氧化能力均呈上升趋势,于 80 g·L⁻¹时,各样品提取液对丙二醛的清除率达最大,顺序为生品僵蚕(87.03%) > 甘蒸僵蚕(73.21%) > 微波僵蚕(23.99%) > 麸炒僵蚕(14.90%) > 清蒸僵蚕(11.32%)。

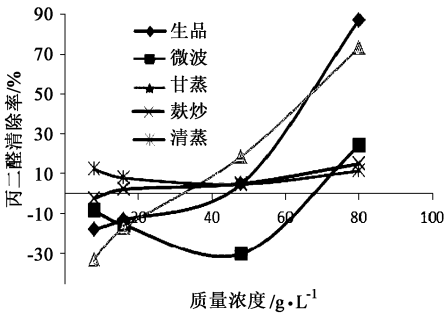


图4 僵蚕各炮制品对小鼠肝脏脂质的过氧化抑制作用

2.9 僵蚕提取物对酪氨酸酶抑制能力的测定^[2]

将 2.2.2 项下提取物干膏用 PBS 溶液溶解并配制成不同质量浓度(5,10,20,40,80 g·L⁻¹),按表 1 设计准确吸取提取物溶液、pH 6.8 的 PBS 溶液和 0.4 mmol·L⁻¹的 L-多巴溶液 0.5 mL,充分混合,加入活度为 136 U·mL⁻¹的酪氨酸酶溶液,于 37 °C 避光孵育 10 min,反应完全后迅速吸取反应液注入酶标板,每孔 200 μL,于 475 nm 处测定吸光度(A),计算酪氨酸酶抑制率,结果见图 5。

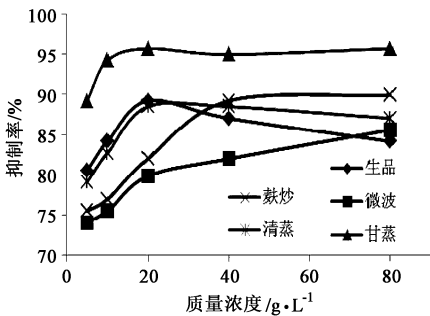


图5 僵蚕各炮制品对酪氨酸酶的抑制能力

$$\text{酪氨酸酶抑制率} = [1 - (A_1 - A_2) / (A_3 - A_4)] \times 100\%$$

式中 A₁, A₂, A₃, A₄ 分别代表 1~4 组溶液的光密度值。由图 5 可知,当提取物溶液生药质量浓度为 5~20 g·L⁻¹时,各僵蚕提取液中总酚和总黄酮类物质对酪氨酸酶的抑制能力随质量浓度的增大而增

大;在 20~80 g·L⁻¹时,除生品、麸炒僵蚕提取液的抑制能力有所增加外,其他僵蚕提取液的抑制能力趋于平稳或降低。在任何质量浓度时,甘蒸僵蚕提取液对酪氨酸酶的抑制能力均强于僵蚕其他品种,于 20 g·L⁻¹时,各僵蚕提取液对酪氨酸酶抑制率的顺序为甘蒸(95.68%) > 生品(90.64%) > 清蒸(88.50%) > 麸炒(82.01%) > 微波(79.85%),于 40 g·L⁻¹时为甘蒸(94.96%) > 麸炒(91.37%) > 清蒸(88.42%) > 生品(87.05%) > 微波(82.01%),于 80 g·L⁻¹时则为甘蒸(95.68%) > 麸炒(89.93%) > 清蒸(87.05%) > 微波(84.07%) > 生品(85.61%)。

表1 酪氨酸酶抑制能力测定中 1-4 组反应液的组成成分 mL

组别	提取物溶液	PBS 溶液	酪氨酸酶液
1	-	1.6	0.4
2	-	2.0	-
3	0.6	1.0	0.4
4	0.6	1.4	-

注:总体积均为 2.0 mL。

2.10 基于 HPLC 的僵蚕炮制品化学成分比对分析

2.10.1 色谱条件

月旭 UltimateC₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 358 nm,流动相 0.1% 磷酸水(A)-90% 乙腈(B)梯度洗脱(0~10 min, 12%~15% B; 10~15 min, 15%~25% B; 15~25 min, 25%~45% B; 25~35 min, 45%~55% B; 35~50 min, 55%~80% B; 50~60 min, 80%~12% B)。

2.10.2 供试品溶液的制备

精密称取僵蚕生品、麸炒品、清蒸品和微波干燥品的细粉(过 40 目筛)各 2.0 g,甘草汁的干燥物 0.5 g,分别置于 5 个圆底烧瓶中,各加入甲醇 20 mL 水浴回流提取 1 h,冷却后过滤,收集滤液于 50 mL 量瓶中,滤渣加 20 mL 甲醇水浴回流提取 30 min,冷却至室温,过滤至同一量瓶中,用少量甲醇反复冲洗滤纸,滤液一并装入同一量瓶中,用甲醇定容,摇匀,得提取液。精密量取提取液 20 mL 置于蒸发皿中挥干试剂,加二氯甲烷 5 mL 清洗各个蒸发皿中干膏,洗涤 2 次,水浴挥干二氯甲烷,用甲醇将蒸发皿中残留物洗涤干净并转移至 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,采集图谱进行分析。

2.10.3 精密度试验

精密称取生品僵蚕粉末,按 2.10.2 项下方法制备供试品溶液,重复进样 6 次,

结果显示各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,二者的 RSD 均 < 1.7%,表明仪器精密度较好。

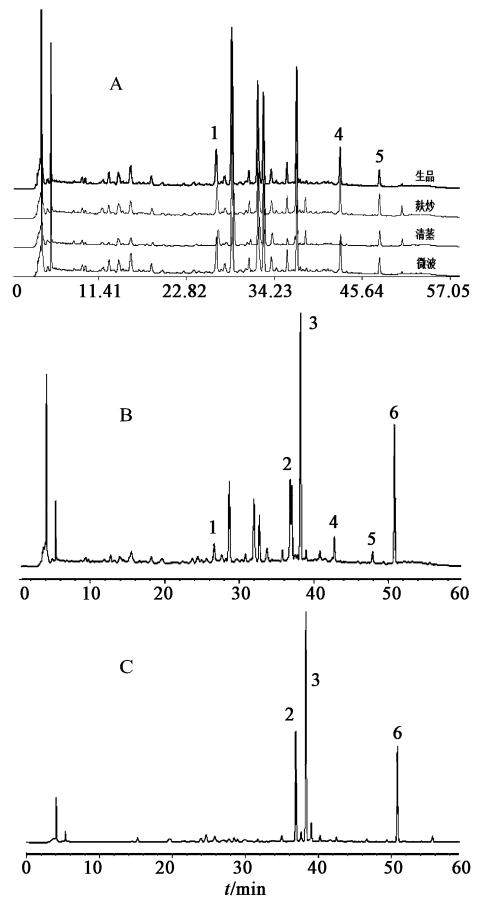
2.10.4 稳定性试验 精密称取甘蒸僵蚕粉末,按 2.10.2 项下方法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 进样测定,结果各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,二者的 RSD 均 < 1.5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.10.5 重复性试验 精密称取甘蒸僵蚕粉末 6 份,按 2.10.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.10.1 项下色谱条件进样测定,结果各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,二者的 RSD 均 < 1.4%,表明本方法重复性较好。

2.10.6 样品比对分析 取不同供试品溶液按 2.10.1 项下色谱条件测定,结果见图 6。表明生品、麸炒品、清蒸品和微波炮制品僵蚕的甲醇提取液中各成分在该色谱条件下分离较好,通过与对照品物质进行比对,确定 1 号峰为芦丁,4 号峰为槲皮素,5 号峰为山奈素;与生品僵蚕及未用液体辅料炮制的品种相比,甘蒸僵蚕甲醇提取物的图谱中增加了 2, 3, 6 号峰,且 3 号峰与 6 号峰的峰面积较大;通过与对照品物质比对后,辅料甘草汁图谱中确定 2 号峰为芹糖甘草苷,3 号峰为甘草苷,6 号峰为甘草酸铵;综合分析,甘蒸僵蚕甲醇提取液在该色谱条件下,增加的色谱峰分别为芹糖甘草苷、甘草苷和甘草酸铵。

3 讨论

研究表明僵蚕甲醇提取部位抗氧化活性最强,故本文未对僵蚕各炮制品的其他提取部位进行对比分析。DPPH·是一种稳定的自由基,与抗氧化剂发生反应,提供 H·而被还原,颜色由深紫色变为淡黄色,当有自由基清除剂存在时,DPPH 的单电子被配对而使颜色变浅,变浅的程度与配对电子数成化学计量关系,因此可通过 A 的测定来检测自由基的清除情况,从而评价样品的抗氧化能力^[10]。Fenton 反应产生羟自由基是抗氧化活性研究中较为成熟的方法,利用 H₂O₂ 和 Fe²⁺ 发生 Fenton 反应以生成具有高反应活性的·OH,·OH 能被水杨酸有效地捕捉,并生成有色物质;但当反应体系中存在能清除自由基的物质时,便会与水杨酸竞争,从而使有色产物生成量减少,以反映对·OH 的清除能力。总还原能力的测定原理则是抗氧化剂将 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺,亚铁氰化钾再与 Fe³⁺ 作用,生成普鲁士蓝,在 700 nm 处有最大吸收度。脂质过氧化是氧自由基损伤组织的重要方式,丙二醛(MDA)是机体氧化系统和抗氧化



A. 生品、麸炒品、清蒸品和微波品; B. 甘蒸僵蚕; C. 甘草汁
图 6 僵蚕甲醇提取液 HPLC

系统失去平衡时产生的一种脂质过氧化物,是反映脂质过氧化损伤的常用指标,其含量的高低可反映脂质氧化的程度,抗氧化剂可对抗超氧自由基的攻击,使 MDA 生成率降低。

临床应用中僵蚕多以炮制品入药,因为生品具有较强的腥咸气味,患者服用时易出现恶心呕吐等症状,若服用不当还会出现过敏,表现为头昏、震颤、共济失调等,即生品不宜直接应用。草酸铵是僵蚕抗惊厥的有效成分之一,生品中草酸铵含量较高,但过量的草酸铵易引起人体血氮升高,加热炮制不仅能适度降低药材中草酸铵含量,同时还能起到除腥杀菌的作用。麸炒法炮制僵蚕具有去腥矫臭的作用,还会给药物表面赋上艳丽的色泽,同时产生特异性香气,使病人乐意接受,但该方法亦存在会产生大量固体尘埃、加热效率低于新型热源、劳动强度较高等缺陷。本实验创新了 2 种炮制方法,即清蒸法和微波炮制法,虽然在抗氧化活性与对酪氨酸酶抑制能力等方面未体现出明显的优势,但在保证炮制品品质相同的前提下,新炮制方法比传统方法更节能、高效、环保。

除甘蒸僵蚕外,其他僵蚕炮制品对 DPPH· 和 ·OH 的清除能力、总还原能力及抗脂质过氧化能力均弱于生品,总黄酮和总酚含量亦明显低于生品,说明加热炮制对僵蚕的抗氧化活性物质具有一定的影响。微波、麸炒、蒸制 3 种炮制方式的炮制温度大小为麸炒 > 微波 > 蒸制,加热时间顺序则为蒸制 > 麸炒 > 微波,综合各考察指标的分析结果可知,在僵蚕炮制品的制备过程中,炮制时间对炮制品的抗氧化活性的影响较炮制温度更显著。甘蒸僵蚕的抗氧化活性与对酪氨酸酶的抑制能力均优于其他炮制品,甚至强于生品,这与辅料甘草汁中抗氧化活性物质的贡献有关,与生品及其他炮制品相比,甘蒸僵蚕甲醇提取部位新增了芹糖甘草苷、甘草苷和甘草酸铵等成分,前两个为黄酮类化合物,后一个为三萜类皂苷,这些物质均具有一定得抗氧化能力,故在治疗氧化应激类疾病如心梗、血栓、高血脂和高血糖等宜使用甘蒸僵蚕。

采用单纯加热方式进行炮制的僵蚕,如清蒸品和微波炮制品,抗氧化活性与对酪氨酸酶抑制能力与麸炒僵蚕较为接近,且均低于生品,但经甘草汁炮制后的僵蚕,抗氧化活性与对酪氨酸酶的抑制能力均强于生品和其他炮制品,说明液体辅料在炮制过程中发挥的作用更明显,符合“引入辅料协同增效”的从制原则。

[参考文献]

- [1] 徐世芳,李晓誉,叶益萍,等. 白芷提取物对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(7):1613.
- [2] 龚盛昭,杨卓如,刘念平. 微波辅助提取白僵蚕中的酪氨酸酶抑制剂[J]. 化学研究与应用, 2006, 18(1):101.
- [3] Koo B S, An H G, Moon S K, et al. *Bombycis corpus*

extract (BCE) protects hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity [J].

Immunopharmacol Immunotoxicol,2003,25(2):191.

- [4] 金洁. 家蚕病原白僵菌的遗传多样性及白僵蚕药理作用的研究[D]. 杭州:浙江大学,2009.
- [5] 姚宏伟,何欣焱,何巧燕,等. 僵蚕和蜈蚣醇提物抗惊厥作用的药效学比较研究[J]. 中国药物与临床, 2006,6(3):221.
- [6] Naziro ğ lu M, Kutluhan S, Yilmaz M. Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca²⁺-ATPase activity, and EEG records in pentylentetrazol induced seizures in rats [J]. *J Membrane Biol*,2008,225(1/3):39.
- [7] 毕克滨,吴勃岩,齐彦,等. 囊立消胶囊对癫痫小鼠脑组织中MDA、SOD、ATP酶的影响[J]. 中医药学报, 2006,34(2):44.
- [8] 张韬,李铁林,江文君,等. 炒制对僵蚕、鳖甲、穿山甲、阿胶外观性状及内在质量的影响[J]. 中国中药杂志,1997,22(8):471.
- [9] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典-现代部分[M]. 南昌:江西科学技术出版社,1989:367.
- [10] 李铭花,杨文建,赵政,等. 甘草不同极性溶剂提取物抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂,2009,23(3):25.
- [11] 李利敏,沈建福,吴晓琴. 8种油茶蒲提取物中活性物质含量及其抗氧化能力的比较研究[J]. 中国粮油学报,2013,28(1):41.
- [12] 曹旭,曹剑锋,陈靠山. 牛蒡根总黄酮抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2012,33(19):138.
- [13] 于子惠,许树军,马英丽,等. 橙皮苷及橙皮素清除自由基活性的研究[J]. 中医药学报,2013,41(1):65.
- [14] 许海顺,蒋剑平,徐攀,等. 红参多糖抗氧化活性的研究[J]. 浙江中医药大学学报,2011,35(6):909.
- [15] 刘刚,王辉,张先洲,等. 青藤碱清除氧自由基和抗脂质过氧化作用[J]. 中草药,2006,37(1):84.

[责任编辑 仝燕]