

鳖甲水提物和醇提物对单胺氧化酶活性影响的研究

徐士勋, 周燊, 绪扩, 韩秋俊, 雷海民*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**评价鳖甲水提物和醇提物总氨基酸及寡肽类成分含量及两种提取物对单胺氧化酶(MAO)活性影响的比较研究,考察两种化学成分与药效的关系,探讨鳖甲提取工艺及有效组分。**方法:**分别采用水提和醇提制备鳖甲药材的提取物,分别以谷氨酸和鳖甲七肽为标准物质建立总氨基酸和寡肽类含量测定标准曲线,测定鳖甲水提物和醇提物总氨基酸和寡肽类含量,并按照单胺氧化酶试剂盒说明书测定两种提取物对体外 MAO 活性作用。**结果:**水提法和醇提法的浸膏得率分别为 20.6% 和 5.4%;鳖甲水提物和醇提物中寡肽类含量分别(48.13 ± 3.27)% 和 (20.17 ± 2.49)%;总氨基酸含量分别为(23.68 ± 1.76)% 和(55.88 ± 2.41)%;水提物和醇提物均具有抑制 MAO 活性作用,MAO 抑制率分别为(65.12 ± 1.34)% 和(50.95 ± 1.13)%。**结论:**鳖甲水提物浸膏得率及寡肽含量均大于醇提法;总氨基酸含量则是醇提物高于水提物。二者均有抑制 MAO 活性效果,且水提物的 MAO 抑制效果略优于醇提物;提示鳖甲中寡肽类成分和总氨基酸类成分都具有抑制 MAO 活性作用,且水提物效果更佳,因此鳖甲以水提为佳,推测寡肽类成分和氨基酸类成分可能均为其有效物质。

[关键词] 鳖甲; 水提取物; 醇提取物; 单胺氧化酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0139-04

[doi] 10.11653/syfy2014010139

Effect of *Carapax trionycis*' Water Extract and Ethanol Extract on MAO Activity

XU Shi-xun, ZHOU Shen, XU Kuo, HAN Qiu-jun, LEI Hai-min*

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate effect of the *Carapax trionycis*' total amino acids and oligo-peptide' content of the aqueous extract and alcohol extract on monoamine oxidase (MAO) activity. **Method:** *C. trionycis* aqueous extract and alcohol extract were prepared, then glutamic acid and *C. trionycis*' oligo-peptide were used to establish standard material content respectively to calculate aqueous extract and alcohol extract total amino acid and oligo-peptide content, and observe the effect on MAO *in vitro*. **Result:** The extracted yield of the aqueous extract and alcohol extract was 20.6% and 5.4%, respectively; the oligo-peptide content of the aqueous extract and alcohol extract was (48.13 ± 3.72)% and (20.17 ± 2.49)% respectively; the total amino acid content of the aqueous extract and alcohol extract was (23.68 ± 1.76)% and (55.88 ± 2.41)% respectively; the aqueous extract and alcohol extract have inhibitory effect on MAO and the inhibition rate was (65.12 ± 1.34)% and (50.95 ± 1.13)% respectively. **Conclusion:** After the water was extracted, the extract yield is better than that of the alcohol extract; the aqueous extract and alcohol extract have inhibitory effect on MAO activity, and the effect of the aqueous extract is slightly stronger than that of the alcohol extract; the aqueous extract oligo-peptide content was higher than that of alcohol extract; alcohol extract total amino acid content is higher than that of the aqueous extract. It is better to extract the C using water, and water soluble constituents and alcohol soluble components in

[收稿日期] 20130619(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073017);北京中医药大学科研创新团队项目(2011-CXTD-15)

[第一作者] 徐士勋,从事中药先导化合物的研发研究,Tel:18810614378,E-mail:xushixun432@163.com

[通讯作者] *雷海民,博士,教授,博士生导师,从事中药先导化合物的研发,Tel:010-8473640,E-mail:leihaimin@126.com

C have inhibitory activity on MAO and they are effective chemical constituents.

[Key words] *Carapax trionycis*; water extract; alcohol extract; MAO

鳖甲入肝、脾、肾三经,有清热软坚散结、行血祛癖之效用,为治疗肝阴不足、肝脾肿大之有效药可用于治疗慢性肝炎、肝硬化、肝癌,现代药理研究表明,鳖甲对肝脏的治疗及保护作用主要集中在抗肝纤维化方面^[1],鳖甲及其复方在防止肝纤维化方面具有重要意义^[2-3]。肝纤维化与单胺氧化酶(MAO)有密切关系,MAO是反映肝纤维化及肝细胞损耗的重要指标,血清中MAO的活性大致可反映肝纤维化的程度,血清MAO水平与肝纤维化程度呈正相关^[4],随着肝纤维化进展以及假小叶形成,MAO明显升高^[5]。传统鳖甲用药是水煎煮用药,而《中国药典》则是乙醇溶液煎煮^[3],因此本实验比较了水提法和65%乙醇提取法的总氨基酸含量、肽类含量以及2种提取物对单胺氧化酶(MAO)抑制活性的效果。

1 材料

1.1 药物 鳖甲(中国药材集团公司,产地湖北,批号060103。经中国药材公司戴中博士鉴定,来源为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegman. 的背甲)水提物和醇提物系分别为鳖甲经水提和65%乙醇回流提取,浓缩、干燥制备而得。色甘酸钠滴眼液(武汉五景药业有限公司,批号11020801),优降宁(阿拉丁试剂,上海);鳖甲七肽(本实验室从鳖甲分离纯化单体)。

1.2 动物 健康雄性ICR小鼠18~20g,北京中医药大学实验动物中心提供,许可证SCXK(京)2012-0001。

1.3 试剂 生理盐水,无水乙醇,蒸馏水,氢氧化钠,硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$),酒石酸钾钠($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$),谷氨酸,磷酸氢二钠,磷酸二氢钾,茚三酮,果糖,碘酸钾,所有药品均为分析纯;所有用水均为娃哈哈纯净水;单胺氧化酶试剂盒(南京建成生物试剂有限责任公司)。

1.4 仪器 Spectra Max190型酶标仪(美国Molecular Devices公司),TU-1810紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),Sartorius-BS124S型电子分析天平(德国赛多利斯股份有限公司),KQ-500DE型数控超声波清洗仪(北京医疗设备二厂),TDL-5-A Centrifuge高速离心机(上海安亭科学仪器厂),XW-80A旋涡混合仪(海门市其林贝雨仪器制造有限公司),202型电热恒温干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司),万能粉碎机(天津

市泰斯特仪器有限公司),旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司)。

2 方法

2.1 提取物制备

2.1.1 鳖甲水提液的制备 取鳖甲药材以粉碎机粉碎,过200目筛,加10倍量水,煎煮2h,共煎煮3次,4层纱布过滤,浓缩后冻干。

2.1.2 鳖甲醇提液的制备 取鳖甲药材以粉碎机粉碎、过筛,加入10倍量65%乙醇,共煎煮2h,煎煮3次,4层纱布过滤,浓缩后冻干。

2.2 鳖甲水提、醇提后肽类含量比较^[6]

2.2.1 波长的确定 七肽对照品显色后作酶联免疫检测仪500~600nm波长扫描,确定最大吸收波长为570nm。

2.2.2 样品制备 供试品溶液制备:取上述鳖甲水提物、鳖甲醇提物冻干粉末,配制成 $1.00\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右溶液待用。

对照品溶液制备:精密称取七肽对照品粉末15.00mg(含量>98%)配制成 $15.00\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,依次稀释成10.00,7.50,5.00,2.50,1.00,0.50,0.25,0.10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,在570nm下测量吸光度(A)。

2.2.3 显色剂配制 应用 $0.02\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酒石酸钠钾50 μL ,5%氢氧化钠20 μL ,0.5%硫酸铜50 μL ,先加酒石酸钠钾,再加氢氧化钠,最后加硫酸铜,比例为5:2:5。

2.2.4 线性关系的考察 精密吸取上述配制的七肽对照品溶液100 μL ,加入上述显色剂溶液100 μL ,振荡,于570nm波长下测定A。以七肽的质量浓度(C)为横坐标,A为纵坐标,绘制标准曲线得回归方程为 $A = 0.0399C - 0.0029$ ($R = 0.9998$)对照品质量浓度在 $0.1\sim 5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与A呈良好线性。

2.2.5 精密度实验 精密吸取上述配制的 $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 七肽对照品溶液100 μL ,吸取该对照品溶液100 μL ,加入显色剂100 μL ,震荡摇匀,在570nm处测量吸光度,重复6次,RSD 2.17%。

2.2.7 显色稳定性试验 取样品溶液100 μL ,加入显色剂 $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,在0,20,40,60,80,100min测A,RSD 1.52%,表明该反应在100min内稳定。

2.2.8 加样回收率实验 取上述鳖甲水提物和醇

提物部分样品各 6 份,每份约 1.7 mg,加入七肽对照品适量以及水,取供试液 100 μL ,加入显色剂 100 μL ,微量振荡器振荡,于 570 nm 下测定。以测定浓度与实际浓度作比较,计算回收率,发现回收率良好。

2.3 总氨基酸含量测定方法学考察^[7]

2.3.1 测定波长的选择 对照品溶液及供试品溶液在 200 ~ 800 nm 进行扫描,发现均在 570 nm 处有最大吸收峰,故选择 570 nm 作为检测波长。

2.3.2 样品配制 供试品溶液的制备:取上述鳖甲水提物和醇提物粉末,配制成 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右溶液待用。

标准氨基酸溶液:精密称取谷氨酸对照品粉末 15 mg(含量 > 98%)用移液枪配制成 16.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,依次稀释成 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 570 nm 下测 A 。

2.3.3 显色剂配制 显色剂配制:称取 1 g 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 0.6 g 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4), 0.05 g 茚三酮, 0.03 g 果糖,用水溶解稀释至 50 mL 摇匀, pH 6.6 ~ 6.8, 贮存于棕色瓶中。低温保存,可使用 2 周。稀释液:称取 2 g 碘酸钾,溶于 600 mL 水中,加 400 mL 95% 乙醇,摇匀应无色透明。

2.3.4 线性关系考察 分别从中精密吸取 2 mL 谷氨酸标准溶液,另取 2 mL 纯净水做空白。加入 1.0 mL 显色剂,摇匀。在沸水浴上加热 16 min,取出,在常温放置 20 min 后加 5 mL 稀释液,摇匀,用水定容至 10.0 mL,摇匀。于 570 nm 波长下测定 A 。以 A 为纵坐标,浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线。

2.3.5 精密度试验 精密吸取上述配制的 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酸对照品溶液 2 mL,测定 A ,重复 5 次。

2.3.6 显色稳定性试验 取已制备好的样品溶液显色后,每隔 20 min 测定其吸收值,进行显色的稳定性考察。

2.3.7 回收率试验 取上述鳖甲水提物和醇提物部分样品各 6 份,每份约 1.7 mg,加入谷氨酸对照品适量以及水,取供试液适量,加入显色剂,微量振荡器振荡,于 570 nm 下测定以测定浓度与实际浓度作比较,计算回收率。

2.4 鳖甲水提物、醇提物对 MAO 活性影响

2.4.1 供试药品制备 临床常用药物前处理:依据各种药物不同理化性质。单胺氧化酶抑制剂阳性药优降宁用纯净水溶解,浓度为 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。鳖甲水提物、鳖甲醇提物、鳖甲七肽(M.551)纯净水溶至预定浓度。供试药品配好后,均过 0.22 μm 滤膜;4 $^{\circ}\text{C}$

贮存。

2.4.2 制备单胺氧化酶粗提液^[8] 取 ICR 小鼠 16 只,雌雄各半,将其脱臼处死,取肝脏,称重,加 9 倍量冰生理盐水,制成匀浆,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液备用。

2.4.3 组别设计 空白组:依次按顺序加入 300 μL 粗酶液,300 μL 试剂三(酶灭活剂),50 μL 纯净水,300 μL 试剂一(作为底物),3 mL 试剂二,温孵 3 h,加入 5 mL 试剂四,连续涡旋 2 min,离心,取上清。阴性组:相对于空白组将其他试剂加入完毕温孵 3 h 后,再加入试剂三(酶灭活剂)。药物反应组:相对于空白组将其他试剂加入完毕温孵 3 h 后再加入试剂三(酶灭活剂);不加入 50 μL 纯净水而是 50 μL 不同药物溶液。药物对照组:相对于空白组不加入 50 μL 纯净水而是 50 μL 不同药物溶液。

依据 MAO 试剂盒操作说明进行,在 242 nm 下测定各组样品 A 。根据以下公式计算出抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{(A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}}) - (A_{\text{药物反应组}} - A_{\text{药物空白组}})}{(A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}})}$$

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 寡肽含量测定工作曲线 回归方程 $A = 25.041C + 0.0747$, $r = 0.9998$, 线性范围为 0.1 ~ 5.0 μL 。检测结果的相对标准偏差(RSD 2.17%),表明该分析方法的重现性较好(RSD 1.12%)。鳖甲七肽回收率为 95.6% ~ 102.2%, $\bar{x} \pm s(100.70 \pm 3.41)\%$, RSD 2.6%。6 次结果的 RSD 1.8%,表明鳖甲七肽在 100 min 内是稳定的。

3.2 总氨基酸含量测定工作曲线 回归方程: $A = 0.2578C - 0.0022$, $r = 0.9998$, 线性范围 0.0625 ~ 2.0 μL 。检测结果的相对标准偏差(RSD 1.57%),表明该分析方法的重现性较好(RSD 0.13%)。谷氨酸回收率为 95.5% ~ 105.6%, $\bar{x} \pm s(99.39 \pm 2.21)\%$, RSD 2.21%。6 次结果的 RSD 0.75%,表明谷氨酸在 100 min 内是稳定的。

3.3 鳖甲水提、醇提后浸膏得率比较 取 50 g 左右药材两份,分别以蒸馏水和 65% 乙醇提取,后浓缩提取液,冻干、称重,计算出水提法和醇提法的浸膏得率分别为 20.6% 和 5.4%。

3.4 鳖甲水提物和醇提物中肽类含量测定 570 nm 下测定,重复测定 5 次,测得鳖甲水提物和鳖甲醇提物中肽类含量分别为 48.13% 和 20.17%。见

表 1。

表 1 鳖甲水提物和醇提物中肽类含量测定 (n = 3)

组分	取样量/mg	肽类含量/%	平均值/%	RSD/%
鳖甲水提物	10.12	48.17	48.13	3.27
	10.09	48.08		
	10.03	48.01		
鳖甲醇提物	10.19	20.19	20.17 ¹⁾	2.49
	10.14	20.15		
	10.09	20.13		

注:与鳖甲水提物比较¹⁾P < 0.05(表 2~3 同)。

3.5 样品中总氨基酸含量测定 在 570 nm 波长处测定吸光度,鳖甲水提物总氨基酸的含量 23.68%,鳖甲醇提物总氨基酸的含量 55.88%,见表 2。

表 2 鳖甲中总氨基酸的含量测定 (n = 3)

组分	批号	取样量/mg	总氨基酸含量/%	含量均值/%	RSD/%
鳖甲水提物	1	15.62	23.72	23.68	1.76
	2	15.53	23.70		
	3	15.47	23.68		
鳖甲醇提物	4	15.71	55.91	55.88 ⁽¹⁾	2.41
	5	15.63	55.87		
	6	15.58	55.86		

3.6 对 MAO 活性的影响 242 nm 下测定各样品的 A 值。5 g·L⁻¹的鳖甲水提物和醇提物对 MAO 的抑制率均 > 50%,见表 3。

表 3 鳖甲水提物和醇提物对单胺氧化酶的抑制作用 (n = 10)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	抑制率/%
鳖甲水提物	5.0	65.12 ± 1.34
鳖甲醇提物	5.0	50.95 ± 1.13
优降宁	5.0	98.34 ± 1.74 ¹⁾
色甘酸钠	5.0	10.58 ± 1.43 ¹⁾

4 讨论

MAO 为一组作用于不同单胺类化合物的酶,广泛存在于肝、肾、脑等组织中,在胶原形成过程中参与胶原成熟最后阶段的架桥形成,使胶原和弹性硬蛋白结合,形成稳定的胶原纤维后,MAO 含量升高,是反映肝纤维化及肝细胞损耗的重要指标。用腹腔镜观察,MAO 活力与肝脏表面结节形成的进程相平行^[9]。肝脏组织学检查,MAO 增高的程度与肝脏的结缔组织增生和小叶节后扭曲密切相关^[10]。因此选择该指标具有一定科学意义,其中色氨酸钠和优

降宁分别是已知对 MAO 无抑制作用和有显著抑制作用的市面流通药物,因此以此 2 种药物评价此活性模型有一定积极意义。

鳖甲水提物浸膏得率大于醇提物浸膏得率,说明鳖甲中成分多为水溶性成分;二者总氨基酸含量和寡肽类含量测定结果说明鳖甲水提物中寡肽类含量大于鳖甲醇提物中;总氨基酸含量则是醇提物大于水提物。以上结果一定程度上说明,鳖甲中的寡肽类成分多为亲水性的,氨基酸类成分部分为亲脂性的;从 MAO 活性结果来看,水提物、醇提物均对 MAO 有较显著抑制活性,说明鳖甲中抑制 MAO 活性物质基础可能为其中的寡肽类和氨基酸,从而发挥抗肝纤维化作用的物质可能是此两类物质。

综合以上结果提示我们鳖甲传统水煎煮用药和药典中规定的乙醇溶液提取都具有一定科学意义,均能够将有效物质提取出来,但是水提法效果更优,应用范围更广;而且鳖甲发挥药效的物质基础与其中的寡肽类成分和总氨基酸类成分有关系。

[参考文献]

[1] 唐尹萍,陈进文,刘焱文,等. 鳖甲与粗鳖甲抗肝纤维化活性部位的化学成分比较[J]. 医药导报,2010,29(9):1127.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2010:361.

[3] 刘鸣昊,薛博瑜. 近 5 年来肝纤维化中医证治用药规律的文献研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):279.

[4] 杨清,王星云,关向荣,等. 病毒性肝纤维化酶谱变化的相关性研究[J]. 中国实验诊断学,2006,10(10):1146.

[5] Batalle R, Brenner D A. Liver fibrosis [J]. J Clin Invest,2005,115:209.

[6] 韩秋俊,毕葳,王伟,等. 鳖甲炮制前后肽类含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):86.

[7] 邢新苗,刘自谔,任建平. 一种简单实用的谷氨酸浓度测定法[J]. 微生物学杂志,2004,24(2):62.

[8] 王豪,周凌华,徐致远,等. 单胺氧化酶的制备及活性测定[J]. 江苏农业科学,2011,19(3):372.

[9] 贾夫洋,张文胜,复方丹. 参联用黄芪注射液对慢性肝炎,肝硬化单胺氧化酶活性的影响[J]. 中国临床保健杂志,2003,6(3):212.

[10] 江绍基. 临床肝胆系病学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1992:106.

[责任编辑 聂淑琴]