

# 美洲大蠊提取物抗肝损伤药效比较及工艺评价

黄晶<sup>1</sup>, 梅明<sup>1</sup>, 许润春<sup>1</sup>, 熊永爱<sup>1</sup>, 李晨晨<sup>1</sup>, 杨明<sup>1,2\*</sup>

(1. 成都中医药大学, 成都 611137;

2. 江西中医学院中药现代制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**比较不同工艺制备的美洲大蠊提取物抗肝损伤药效与主要成分含量差异。**方法:**采用水或乙醇分别回流法、闪式法和磁力搅拌法提取美洲大蠊,通过 CCl<sub>4</sub> 所致小鼠急性肝损伤模型考察药效,采用考马斯亮蓝法和茚三酮法测定美洲大蠊提取物中总肽及游离氨基酸含量,结合出膏率计算加权得分,考察不同提取工艺的差异。**结果:**水闪式提取物具有良好的对抗 CCl<sub>4</sub> 所致急性肝损伤小鼠血清 MDA 增多、抑制血清转氨酶增高、减轻肝组织病变的作用。各提取物中出膏率分别为 16.64%, 20.84%, 16.19%, 15.75%, 19.53%, 16.82%, 总肽质量分数分别为 0.82%, 0.03%, 0.96%, 0.02%, 0.64%, 0.02%, 游离氨基酸质量分数分别为 1.99%, 1.11%, 2.12%, 1.15%, 2.10%, 1.03%, 综合评分分别为 90.64, 37.31, 99.46, 42.53, 82.42, 39.00。**结论:**美洲大蠊水闪式提取物具有良好的抗肝损伤药效与工艺指标评分。

**[关键词]** 美洲大蠊; 闪式提取法; 总肽; 游离氨基酸; 肝损伤

**[中图分类号]** R283.6; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0046-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013190046

## Comparison of Effects Against Hepatic Injury among Americana Linn Extracts and Evaluation of Extraction Processes

HUANG Jing<sup>1</sup>, MEI Ming<sup>1</sup>, XU Run-chun<sup>1</sup>, XIONG Yong-ai<sup>1</sup>, LI Chen-chen<sup>1</sup>, YANG Ming<sup>1,2\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare differences of efficacy against hepatic injury and contents of major ingredients among Americana Linn extracts prepared by different processes. **Method:** With water and ethanol as solvents, Americana Linn was extracted by reflux method, smashing method and magnetic stirring method, respectively. Efficacy was tested with acute hepar-injured mice model caused by CCl<sub>4</sub>, the contents of total peptides and free-amino acid were determined by Bradford and Ninhydrin colorimetric method, combining with cream rate, differences among processes was investigated by calculating weighted score. **Result:** Water smashing-extract could obviously resist increasing of MDA, ALT and AST in serum and relieve pathological changes of acute hepar-injured mice caused by CCl<sub>4</sub>. In each extracts, cream rates were 16.64%, 20.84%, 16.19%, 15.75%, 19.53% and 16.82%, respectively; The contents of total peptides were 0.82%, 0.03%, 0.96%, 0.02%, 0.64%, 0.02%, respectively; The contents of free amino acid were 1.99%, 1.11%, 2.12%, 1.15%, 2.10%, 1.03%, respectively; Composite scores were 90.64, 37.31, 99.46, 42.53, 82.42, 39.00, respectively. **Conclusion:** Water smashing-extract of Americana Linn had a good efficacy against hepatic injury and a high score of technic indexes.

**[Key words]** Americana Linn; smashing extraction method; total peptides; free-amino acid; hepatic injury

**[收稿日期]** 20130312(027)

**[第一作者]** 黄晶,在读硕士,从事中药制剂研究, Tel:13548032297, E-mail:837716122@qq.com

**[通讯作者]** \* 杨明,博士,教授,从事中药新制剂、新技术及新工艺研究, Tel:028-61800127, E-mail:sunmoonyang@qq.com

美洲大蠊具有抗肝炎肝损伤、改善纤维化、抗肿瘤<sup>[1]</sup>、增强免疫力、改善微循环、抗菌<sup>[2]</sup>等药理作用。目前,已有学者选取水或乙醇为溶剂,采用室温搅拌提取<sup>[3]</sup>或浸渍提取<sup>[4]</sup>的方式得到了美洲大蠊活性部位。本实验以水或乙醇为溶剂,分别采用回流、闪式和磁力搅拌提取法制备美洲大蠊提取物,进行药效与主要成分含量的比较,以评价不同提取工艺的优劣。

## 1 材料

JHBE-50T型闪式提取器(河南金鼎科技发展有限公司),88-1型数显恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司),UV-1700型紫外-可见分光光度计(日本岛津)。美洲大蠊(购自云南腾冲,经生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* L.),昆明种小白鼠[成都达硕生物科技有限公司,体重18~22g,雌雄各半,动物许可证号SCXK(渝)2008-24],牛血清白蛋白(BSA)、丙氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为140619-201120,140680-201002),联苯双酯滴丸(浙江医药股份有限公司新昌制药厂,批号120801,1.5mg×250丸),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 提取物的制备** 取50℃烘干的药材最粗粉适量,于室温下分别加10倍量水或乙醇,分别按回流法(每次1h)、闪式法(每次3min,90V)和磁力搅拌法(每次12h)提取2次,滤过,合并滤液,依次制得水回流(A)、95%乙醇回流(B)、水闪式(C)、95%乙醇闪式(D)、水搅拌(E)、95%乙醇搅拌(F)提取液。

**2.2 抗CCl<sub>4</sub>急性肝损伤作用考察** 取2.1项下各提取液适量,减压浓缩,用0.5%CMC-Na<sup>[5]</sup>配制成1g·mL<sup>-1</sup>的供试药液。阳性药联苯双酯滴丸粉末用0.5%CMC-Na配制成15g·L<sup>-1</sup>的混悬液。取小鼠100只,雌雄各半,随机等分为10组(空白对照组、溶剂对照组、模型对照组、阳性对照组、样品A~F组)。空白对照组灌胃纯净水,溶剂对照组和模型对照组灌胃0.5%CMC-Na,其余组均灌胃相应药物,给药剂量均为10mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,连续给药10d。末次给药后对各组(除空白、溶剂对照组以外)按10mL·kg<sup>-1</sup>腹腔注射0.2%CCl<sub>4</sub>油溶液复制模型<sup>[6]</sup>,24h后眼球取血,分离血清,测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)活性及丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性<sup>[7]</sup>;处死小鼠后立即解剖取全肝和脾脏,称定质量,计算脏器系数;分离肝左叶固定于10%福尔马林中送检。采用SPSS 17.0软件进行统计处理,结果见表1。

小鼠肝组织病理形态评分标准<sup>[3]</sup>为仅见胞浆淡染,占肝细胞总数的1/4以下者计0.5分,以胞浆疏松化为主,占肝细胞总数的1/3以下者计1.0分,以气球样变为主,占肝细胞总数的1/3~1/2者计2.0分,以气球样变为主,占肝细胞总数的1/2以上者计3.0分;仅见点状坏死,占肝细胞总数的5%以下者计0.5分,以点状坏死为主,占肝细胞总数的10%以下者计1.0分,以小片状坏死为主,占肝细胞总数的10%~20%者计2.0分,以大片坏死为主,占肝细胞总数的20%以上者计3.0分。

表1 美洲大蠊提取物对小鼠血清转氨酶活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>	水样变性评分	坏死评分	肝重系数 /%	脾重系数 /mg·g <sup>-1</sup>	MDA /ng·L <sup>-1</sup>	SOD /U·L <sup>-1</sup>
空白对照	23.3 ± 10.7 <sup>4)</sup>	50.9 ± 20.6 <sup>4)</sup>	0.15 ± 0.34 <sup>4)</sup>	0.10 ± 0.21 <sup>4)</sup>	4.16 ± 0.17 <sup>4)</sup>	3.4 ± 0.7 <sup>3)</sup>	1.98 ± 0.16 <sup>4)</sup>	28.8 ± 1.4 <sup>4)</sup>
溶剂对照	32.6 ± 11.4 <sup>4)</sup>	51.6 ± 15.9 <sup>4)</sup>	0.10 ± 0.21 <sup>4)</sup>	0.15 ± 0.34 <sup>4)</sup>	4.25 ± 0.19 <sup>4)</sup>	3.4 ± 0.6 <sup>3)</sup>	1.86 ± 0.25 <sup>4)</sup>	29.5 ± 8.2 <sup>4)</sup>
模型对照	229.0 ± 97.1 <sup>1)</sup>	168.9 ± 46.8 <sup>1)</sup>	1.70 ± 0.67 <sup>1)</sup>	1.60 ± 0.52 <sup>1)</sup>	4.67 ± 0.43 <sup>1)</sup>	4.1 ± 0.8 <sup>2)</sup>	3.87 ± 0.45 <sup>1)</sup>	8.9 ± 4.6 <sup>1)</sup>
阳性对照	74.2 ± 26.2 <sup>3)</sup>	88.6 ± 35.0 <sup>3)</sup>	1.05 ± 0.37	1.55 ± 0.60	4.48 ± 0.30	3.9 ± 1.0	2.45 ± 0.51 <sup>4)</sup>	14.7 ± 2.4
A	198.1 ± 106.5	146.3 ± 81.8	1.30 ± 1.30	0.90 ± 0.81	4.63 ± 0.32	3.6 ± 0.9	2.86 ± 0.74	13.4 ± 2.9
B	188.5 ± 167.3	294.6 ± 161.2	1.10 ± 0.66	1.55 ± 0.60	4.61 ± 0.33	4.1 ± 0.8	2.27 ± 0.21 <sup>4)</sup>	13.5 ± 2.4
C	37.7 ± 19.1 <sup>4)</sup>	78.6 ± 24.1 <sup>4)</sup>	0.45 ± 0.44 <sup>4)</sup>	0.40 ± 0.32 <sup>4)</sup>	4.31 ± 0.24 <sup>3)</sup>	3.4 ± 0.3 <sup>3)</sup>	2.38 ± 0.38 <sup>4)</sup>	14.8 ± 1.9
D	99.5 ± 66.2	124.5 ± 69.2	1.00 ± 0.75	1.45 ± 0.72	4.53 ± 0.40	3.9 ± 1.0	2.31 ± 0.36 <sup>4)</sup>	13.4 ± 2.8
E	52.8 ± 70.7 <sup>3)</sup>	86.1 ± 40.3 <sup>3)</sup>	0.60 ± 0.39 <sup>3)</sup>	0.50 ± 0.33 <sup>4)</sup>	4.45 ± 0.50	3.4 ± 0.8 <sup>3)</sup>	2.33 ± 0.63 <sup>4)</sup>	13.0 ± 4.2
F	142.2 ± 120.2	134.5 ± 47.8	1.05 ± 0.96	1.00 ± 0.71	4.41 ± 0.26	4.1 ± 0.8	2.54 ± 1.00	11.4 ± 3.5

注:与溶剂对照组比较<sup>1)</sup>P < 0.01, <sup>2)</sup>P < 0.05;与模型对照组比较<sup>3)</sup>P < 0.01, <sup>4)</sup>P < 0.05。

由表 1 可知,模型组动物 ALT 和 AST 活性均明显高于空白与溶剂对照组,提示造模成功;与模型组相比,C,E 组与联苯双酯均能明显起到抵抗  $\text{CCl}_4$  引发血清转氨酶升高的作用,而 A,D,F 组仅呈现出降酶趋势,作用不够显著,B 组甚至有加重损伤的趋势。

空白、溶剂对照组肝组织结构完好,肝窦状隙未见扩张,肝细胞大小较均匀,细胞质丰富,细胞核圆形。其余各组分别有不同程度的形态改变,主要损伤形式有肝细胞水样变性和坏死,损伤评分均与空白、溶剂对照组存在显著性差异,提示造模成功。其中模型组病变最重,肝细胞明显肿胀,水样变性严重,细胞界限不清,胞浆淡染,可见明显的炎性浸润和坏死;而 C,E 组仅个别存在水样变性与坏死,炎性浸润较少,评分均与模型组存在显著性差异,提示 C,E 组均具有较明显的改善  $\text{CCl}_4$  所致小鼠肝细胞病理改变的效果。

模型组动物肝重系数明显升高,病理表现为肝细胞炎性浸润、水肿等。与模型组相比,C 组显著降低,结合病理形态学镜检结果猜测 C 组可改善造模导致的肝细胞水样变性,因而 C 组动物肝重系数增高受限。各试验组脾重系数的变化可在一定程度上反映机体的免疫状态不同。模型组与溶剂对照组完全处于排序的高低两端,可见  $\text{CCl}_4$  作为外物刺激对动物的免疫系统产生了激活作用,导致脾重的增加;而 C,E 组改善了  $\text{CCl}_4$  导致的脾重增加,推测可能是通过缓解  $\text{CCl}_4$  对机体的刺激,机制可能与抗氧化、消除炎性浸润、修复等相关。

模型组血清 MDA 含量明显升高,而 SOD 活性降低;联苯双酯和 B,C,D,E 组具有对抗血清 MDA 含量升高的作用,但并未在改善 SOD 活性方面得以体现,可能是通过其他途径清除自由基或抑制过氧化反应,而不是增强 SOD 活性。

综上所述,提取物 C 在对抗  $\text{CCl}_4$  所致急性肝损伤小鼠血清 MDA 增多、抑制血清转氨酶增高、减轻肝组织病变与肝重、脾重系数升高等方面均具有良好的作用,对肝损伤具有一定的保护与治疗作用,而其余提取物的作用仅体现于上述某些方面,不全面。

**2.3 出膏率测定**<sup>[8]</sup> 取药材粉末 25 g,按 2.1 项下方法制备提取液 A~F,各量取 100 mL 置恒重的蒸发皿中,水浴挥干溶剂,于 105 °C 常压干燥至恒重,称定质量,计算出膏率分别为 16.64%,20.84%,16.19%,15.75%,19.53%,16.82%。

## 2.4 总肽含量测定<sup>[9]</sup>

**2.4.1 BSA 对照品溶液的配制** 取 BSA 约 10 mg,

精密称定,加水定容至 100 mL,得 102.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  对照品溶液。

**2.4.2 供试品溶液的制备** 称取各药材粉末 25 g,按 2.1 项下方法提取,合并滤液,以相应溶剂定容至 500 mL,作为储备液。精密吸取储备液 A,C,E 各 5 mL,用水定容至 25 mL,滤过,取续滤液作为供试品溶液 A,C,E。取储备液 B,D,F 各 135 mL,减压回收溶剂,加水适量,加热搅拌,过滤,滤液用水定容至 50 mL,摇匀,作为供试品溶液 B,D,F。

**2.4.3 检测波长的确定** 精密吸取对照品溶液、水及供试品溶液各 1 mL,各加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 5 mL,摇匀,于 400~800 nm 扫描,结果显示对照品与供试品在 595 nm 处有最大吸收,且空白无干扰。

**2.4.4 标准曲线的建立** 精密吸取 BSA 对照品溶液 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,加水至 1 mL,按 2.4.3 项下方法显色,于 595 nm 处测定吸光度(A),以质量为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程  $Y = 0.0062X + 0.150$  ( $r = 0.9995$ ),表明 BSA 在 20.46~102.30  $\mu\text{g}$  与 A 呈良好线性关系。

**2.4.5 精密度试验** 精密吸取对照品溶液 1 mL,重复测定 6 次,结果 A 的 RSD 0.157%,表明仪器精密度良好。

**2.4.6 重复性试验** 取同一供试品溶液,精密吸取 6 份,每份 1 mL,结果 A 的 RSD 0.736%,表明该方法重复性良好。

**2.4.7 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液 1 mL,分别于 0,10,20,30,40 min 显色,结果 A 的 RSD 1.115%,表明供试品溶液在 40 min 内稳定。

**2.4.8 加样回收率试验** 精密吸取同一批次样品储备液( $478\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )6 份,每份 1 mL,各加入对照品溶液 4.7 mL,按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液,测定 A,计算平均回收率 98.086%,RSD 2.80%。

**2.4.9 样品测定** 精密吸取 A~F 供试品溶液各 1 mL,于 595 nm 处测定 A,计算提取液 A~F 中总肽质量分数分别为 0.82%,0.03%,0.96%,0.02%,0.64%,0.02%。

## 2.5 游离氨基酸的含量测定<sup>[10]</sup>

**2.5.1 供试品溶液的制备** 精密吸取 2.4.2 项下的储备液各 10 mL,调 pH 至 4.4,沸水浴 5 min,静置,离心( $4500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,10 min),取上清液以相应溶剂定容至 25 mL,得稀释液,分别精密吸取稀释液 A,C,E 各 2 mL 和 B,D,F 各 4 mL,分别以相应提取溶剂定容至 50 mL,即得。

**2.5.2 检测波长的确定** 精密吸取丙氨酸对照品溶液、水、95%乙醇、供试品溶液各1 mL,显色<sup>[10]</sup>,于400~800 nm扫描,结果显示对照品与供试品在570 nm处有最大吸收,且空白、阴性无干扰。

**2.5.3 标准曲线的建立** 精密吸取丙氨酸对照品溶液(15.88 mg·L<sup>-1</sup>)0,0.3,0.6,0.9,1.2,1.5,1.8,2.1,2.4 mL,显色,测定A,以丙氨酸质量为横坐标,A为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.0248X - 0.0064$ ( $r = 0.9994$ ),表明丙氨酸在4.764~38.112 μg与A线性关系良好。

**2.5.4 精密性、重复性、稳定性试验** 按文献[10]方法进行试验,结果精密性RSD 0.199%,重复性RSD 1.382%,稳定性RSD 0.515%,表明供试品溶液在1 h内稳定。

**2.5.5 加样回收率试验** 精密吸取同一批次样品储备液(1 061.25 mg·L<sup>-1</sup>)6份,按2.5.1项下方法制备样品稀释液,精密吸取样品稀释液2 mL,各加入丙氨酸对照品溶液(317.6 mg·L<sup>-1</sup>)2.5 mL,加水定容至50 mL,精密吸取1 mL测定A,结果平均回收率101.178%,RSD 2.894%。

**2.5.6 样品测定** 精密吸取供试品溶液各1 mL,测定A,计算提取液A~F中游离氨基酸质量分数分别为1.99%,1.11%,2.12%,1.15%,2.10%,1.03%。

**2.6 工艺评价<sup>[11]</sup>** 根据公式 $Y = (X_1 \times f_1 / X_{1max} + X_2 \times f_2 / X_{2max} + X_3 \times f_3 / X_3) \times 100$ 计算多指标加权得分,进行工艺评价。其中 $X_1, X_2, X_3$ 分别表示总肽、游离氨基酸质量分数和出膏率;总肽、游离氨基酸分别为水、醇提液中主要成分,为主要指标,权重设定为 $f_1 = f_2 = 0.4$ ,出膏率仅为辅助指标,权重设定 $f_3 = 0.2$ ,结果提取液A~F的综合评分分别为90.64,37.31,99.46,42.53,82.42,39.00。表明水提液间差异不大,但明显高于醇提物,揭示以水为溶剂更适于总肽和游离氨基酸的提取;水闪式提取法得分最高,结合提取物药理活性的维持和生产成本与能源的控制,该法具有明显的优势。

### 3 讨论

CCl<sub>4</sub>急性肝损伤模型<sup>[12]</sup>的主要特点在于自由基的过氧化特性及由此引发的脂膜破坏、细胞器损伤、水样变性等。试验结果表明美洲大蠊水闪式提取物对上述模型小鼠具有良好的保护作用且药效优于其他提取物,血清MDA含量测定结果提示其具有减轻过氧化的能力,猜测其药理机制可能与减轻CCl<sub>4</sub>导致的肝细胞过氧化相关。张成桂等<sup>[13]</sup>报道

美洲大蠊抗癌活性成分具有体外抗氧化活性,从侧面辅助了上述猜想,且该抗癌活性成分的本质是小分子多肽混合物,由此推测闪式水提物中发挥抗肝损伤作用的物质可能也是肽类物质,通过对抗自由基的过氧化,减轻脂膜破坏,改善肝脏微循环、减轻肝细胞水肿与坏死,发挥活血化瘀之效。

含量测定结果表明提取物的总肽含量高低与抗肝损伤药效强弱存在一定联系,且前提需保持活性。闪式提取法与回流、磁力搅拌提取法相比,前者具有最高的总肽、游离氨基酸含量,既可避免高温对热敏成分的刺激,又可缩短提取时间从而减少成分的改变,尤适于肽类等物质的提取,这或许也是水闪式提取物药效优于其他的原因之一。

### [参考文献]

- [1] 何旭,普小菲,李娇,等.美洲大蠊提取物对S180荷瘤小鼠肿瘤抑制作用及免疫功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(15):179.
- [2] 李洪文,耿玲,刘光明,等.美洲大蠊脱脂膏及其活性炭脱色物体外抗菌活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):159.
- [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.
- [4] 李树楠,胡忠.一种治疗慢性乙型肝炎药物:中国,CN1424052A[P].2003-06-18.
- [5] 孙晓晶.苏肝清对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[D].江苏:徐州医学院,2009.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2001:1346.
- [7] 甘平,张旭强,何旭,等.美洲大蠊醇提物对小鼠急性肝损伤的保护作用[J].现代药物与临床,2011,26(2):123.
- [8] 赵强强,韩丽,熊永爱,等.闪式与回流提取黄芪皂苷工艺比较[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(13):1.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.二部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:附录54.
- [10] 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.
- [11] 张彤,徐莲英,陶建生,等.多指标综合评分法优选葛根提取工艺[J].中草药,2004,35(1):38.
- [12] 陈卫华,郭松超.肝脏损伤动物模型及观察指标研究现状[J].广西医科大学学报,2007,24(1):156.
- [13] 张成桂,何正春,焦春香,等.美洲大蠊抗癌活性成分体外抗氧化活性分析[J].时珍国医国药,2010,21(9):2249.

[责任编辑 仝燕]