

# 鳖甲水提物 W-A-80 在模拟胃肠液中消化情况分析

韩秋俊, 徐士勋, 王鹏龙, 王艳慧, 程亚涛, 周燊,  
褚福浩, 宋霖翔, 李国梁, 李强, 雷海民\*  
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** 目的: 研究鳖甲水提物 W-A-80 在模拟胃、肠环境中消化情况, 探讨其体内转化形式。方法: 采用水提醇沉法制备鳖甲水提物 W-A-80, 模拟胃肠液环境, 于 37 ℃ 消化。以寡肽产率为指标, 通过双缩脲反应-酶联免疫检测仪法考察胃蛋白酶和胰蛋白酶于不同酶底比、酶解时间的寡肽(截留相对分子质量 < 3 500)产率变化; 平衡透析法测定模拟胃肠液消化后所得寡肽与体外小鼠肝组织的蛋白结合率。结果: 确定酶解条件为人工胃液酶底比 1:10, 于 37 ℃ 酶解 3 h, 不同质量浓度寡肽与肝组织的蛋白结合率分别为 31.63%, 19.93%, 9.65%; 人工肠液酶底比 1:100, 于 37 ℃ 酶解 11 h, 不同质量浓度寡肽与肝组织的蛋白结合率分别为 48.75%, 47.43%, 22.72%; 均明显高于空白对照的 7.00%, 5.31%, 4.60%。结论: 鳖甲水提物 W-A-80 经模拟胃肠液消化有大量寡肽产生, 且活性显著强于原液, 推测寡肽可能是鳖甲抗肝纤维化的物质基础。

**[关键词]** 鳖甲; 模拟胃液; 模拟肠液; 寡肽; 肝组织蛋白结合率

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0023-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013140023

## Digestion Analysis of Water Extract W-A-80 from Trionycis Carapax in Simulated Gastrointestinal Fluid

HAN Qiu-jun, XU Shi-xun, WANG Peng-long, WANG Yan-hui, CHENG Ya-tao, ZHOU Shen,  
CHU Fu-hao, SONG Ji-xiang, LI Guo-liang, LI Qiang, LEI Hai-min\*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore *in vivo* transformation form of aqueous extract W-A-80 from *Trionycis Carapax* through investigating its digestion in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF). **Method:** Aqueous extract W-A-80 from *Trionycis Carapax* was prepared by water extraction and alcohol precipitation method, it was digested at 37 ℃ in SGF and SIF. With yield of oligopeptides as index, effect of different enzyme-substrate ratios and reaction time of pepsin and trypsin on yield change of oligopeptides (interception relative molecular mass < 3 500) was investigated by enzyme-linked immunosorbent detector-biuret reaction; Equilibrium dialysis was adopted to determined protein binding rate of prepared oligopeptides with liver tissue of mice *in vitro*. **Result:** Optimum enzymatic hydrolysis conditions were determined that digested 3 h with pepsin enzyme substrate ratio of 1:10 at 37 ℃ in SGF and 11 h with trypsin enzyme substrate ratio of 1:100 at 37 ℃ in SIF; Protein binding rates of different concentrations of oligopeptides with liver tissue in mice were 31.63%, 19.93%, 9.65% and 48.75%, 47.43%, 22.72%, respectively, both significantly more than that of blank control group which were 7.00%, 5.31%, 4.60%. **Conclusion:** A large amount of oligopeptides generated when aqueous extract W-A-80 was digested in simulated gastrointestinal fluid, and their activity were significantly

**[收稿日期]** 20130127(002)

**[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(2011-CXTC-15)

**[第一作者]** 韩秋俊,在读硕士,从事中药先导化合物的开发研究, Tel:010-8473640, E-mail:hqjun2009@163.com

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

stronger than undisposed, so we speculated oligopeptides may be materials basis of *Trionycis Carapax* for anti-liver fibrosis.

[**Key words**] *Trionycis Carapax*; simulated gastric fluid; simulated intestinal fluid; oligopeptides; liver tissue protein binding rate

鳖甲具有滋阴潜阳、退热除蒸、软坚散结等功效。研究表明,鳖甲水提物及其为君药的复方成药,如复方鳖甲软肝片、鳖甲煎丸、抗纤抑癌方等,在防治肝纤维化方面均具有很好疗效<sup>[1-4]</sup>。现代药理研究认为,小分子肽类可能为其抗肝纤维化的主要有效成分<sup>[5-7]</sup>,但研究多集中于鳖甲中天然存在的寡肽物质,尚无关于鳖甲酶解寡肽的报道。鳖甲经过胃肠道后受到胃肠环境的影响,在体内是否会发生物质转化并发挥药效的机制尚不清楚。因此,本实验通过改良《美国药典》提供的人工胃/肠液配方,以酶解后寡肽产率为测定指标,考察鳖甲水提物 W-A-80 在模拟胃/肠环境的胃蛋白酶、胰蛋白酶加入量和反应时间;同时以前期建立的药物-体外肝组织蛋白结合药理模型为基础,比较模拟胃/肠消化后寡肽的肝组织蛋白结合率,探讨鳖甲水提物 W-A-80 在模拟胃/肠液中消化稳定性,阐明其体内作用形式。

## 1 材料

DSHZ-300 型多用途水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂),pH 计、AE240 型 1/10 万电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),MH-1 型微量 SPEC 振荡器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司),TRA MAX190 型酶联免疫检测仪(96 孔板,Costar 公司),八道加样器(Thermo 公司),透析膜(截留相对分子质量 3 500, Sigma 公司)。

鳖甲(购于同仁堂,产地湖北,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲),胃蛋白酶(1:3 000)、胰蛋白酶(1:250)均购自 Sigma 公司,试剂均为分析纯。

成年雄性小鼠,北京中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证 SCXK(京)2012-0001。

## 2 方法与结果

**2.1 人工胃液的配制** 称取 NaCl 2.0 g,胃蛋白酶适量,浓盐酸 7 mL,用双蒸水定容至 1 L,即得 pH 1.2 的人工胃液。

**2.2 人工肠液的制备** 称取  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.8 g,溶于 250 mL 双蒸水中,振荡,依次加  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 和双蒸水 190,400 mL,加适量胰蛋白酶混匀,用  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 调 pH 7.5,用双蒸水定容至 1 L,

即得。

### 2.3 双缩脲试剂的制备<sup>[8-9]</sup>

**2.3.1**  $0.02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  酒石酸钾钠溶液 精密称取酒石酸钾钠 2.0 g 于 100 mL 量瓶中,加去离子水溶解并稀释至刻度,即得。

**2.3.2** 5% NaOH 溶液 精密称取氢氧化钠 5.0 g 于 100 mL 量瓶中,加去离子水溶解并稀释至刻度,即得。

**2.3.3** 0.5% 硫酸铜 精密称取硫酸铜 0.5 g 于 100 mL 量瓶中,加去离子水溶解并稀释至刻度,即得。

**2.4 透析液的配制** 依次称取磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化钠 14.11,2.59,1.99 g,溶解于 500 mL 水中,加入  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液适量,调节 pH 7.4,用水定容至 1 L,即得。

**2.5 鳖甲水提物 W-A-80 的制备** 取醋鳖甲粉末适量,加 10 倍量双蒸水煮沸提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,浓缩成浸膏,加 95% 乙醇至乙醇体积分数 80%,取上清液,冷冻干燥,备用。

**2.6 鳖甲水提物 W-A-80 在人工胃液酶解程度检测**

**2.6.1 酶底比考察<sup>[10]</sup>** 取胃蛋白酶与鳖甲水提物 W-A-80 酶底比分别为 1:100,1:50,1:10,1:8,1:5,1:3,以双蒸水溶解鳖甲水提物 W-A-80 不加酶作空白对照,均于 37 °C 进行消化,总反应体系 1 mL,鳖甲水提物 W-A-80 质量浓度  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,重复 6 次。酶解 3 h 后,用  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 调 pH 至 7.4,中止反应。将反应液转移至透析袋内,两端扎紧后将其放入盛有双蒸水 2 mL 的 10 mL 西林瓶中,调整透析袋的高度,使透析袋内的液面与透析袋外的液面保持同一水平,并防止透析袋贴壁,透析 3 h 后,取出透析袋置于另一盛有双蒸水 2 mL 的 10 mL 西林瓶中,以双缩脲试剂指示透析情况,直至透析完全,将透析外液转移到 5 mL 量瓶中,用双蒸水定容。应用双缩脲反应—酶联免疫检测仪测定透析外液中寡肽含量<sup>[8-9]</sup>。结果空白对照组和不同酶底比组透析后所得寡肽质量依次为 3.24,4.74,4.53,5.52,5.41,6.15,6.16 mg。采用 SPSS 统计软件进行方差分析,结果表明与空白对照组比较,不同酶底比人工

胃液酶解后寡肽含量均增加极显著性;不同酶底比酶解试验组比较,除酶底比 1:100 与 1:50,酶底比 1:10 与 1:8,酶底比 1:5 与 1:3 酶解后寡肽质量两两之间差异均不显著外,其他组之间酶解后寡肽质量的差异均显著,综合成本与酶解效率考虑,选用酶底比 1:10。

**2.6.2 反应因素和反应时间的考察** 试验设置 2 组,第一组加入酶底比 1:10 的人工胃液,第二组为不含胃蛋白酶的 pH 1.2 盐酸溶液。均于 37 °C 消化,总反应体系 1 mL,鳖甲水提物 W-A-80 质量浓度  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,依次在 0,30,60,120,180,240 min 取样,用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 调 pH 至 7.4,中止反应。加入透析袋,其他操作同 2.6.1 项,酶解时间-寡肽产率曲线见图 1。

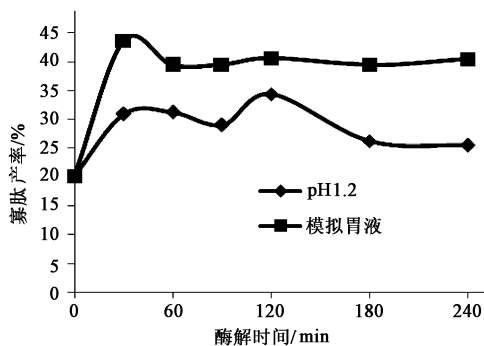


图 1 pH 1.2 盐酸溶液和胃蛋白酶酶解时间寡肽产率曲线

由图 1 可知,第一组在 0~30 min 时,随消化时间的延长,样品不断被分解,30~240 min 寡肽产率达最大值并趋于平衡;第二组则呈现先增加后下降的趋势,120 min 时寡肽产率达最大值;说明在 0~120 min 内酸性环境对鳖甲水提物 W-A-80 水解的影响程度不断加大,120 min 后胃蛋白酶酶解影响较大。

**2.7 鳖甲水提物 W-A-80 在人工肠液酶解程度检测**

**2.7.1 酶底比考察** 取胰蛋白酶与鳖甲水提物 W-A-80 酶底比分别为 1:200,1:100,1:50,1:25,1:10,1:5,于 37 °C 进行消化,以双蒸水溶解 W-A-80 作空白对照。总反应体系 1 mL,鳖甲水提物 W-A-80 质量浓度  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。反应 10 h,加入丙酮使酶灭活,用氮吹仪将丙酮挥净,加入透析袋,其他操作同 2.6.1 项,用双蒸水定容。结果测得空白对照组和不同酶底比组透析后所得寡肽质量分别为 3.36,7.87,8.48,8.49,8.59,8.40,8.36 mg。方差分析表明,与空白对照组比较,不同酶底比人工肠液酶解后寡肽质量均增加极显著;不同酶底比酶解试验组比较,酶

底比 1:200 与其他各组酶底比酶解后寡肽质量差异显著,其他各组酶底比酶解后寡肽质量差异不显著,故确定酶底比 1:100。

**2.7.2 反应时间考察** 试验设置 2 组,第一组加入酶底比 1:100 人工肠液,第二组为空白对照。37 °C 恒温反应,总反应体系 1 mL,鳖甲水提物 W-A-80 质量浓度  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,依次在 0.5,1,2,3,5,7,9,11,13 h 取样,加热灭活。加入透析袋,其他操作同 2.6.1 项,结果见图 2。

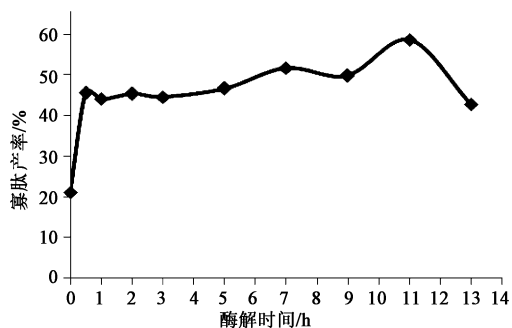


图 2 胰蛋白酶酶解时间寡肽产率曲线

由图 2 可知,第一组在 0~0.5 h 随消化时间的延长,样品迅速酶解,寡肽生成量大于寡肽降解量;0.5~11 h 寡肽产率不断增长,于 11 h 达最大值,酶解平稳增加;11~13 h 寡肽质量降低,寡肽降解量大于寡肽生成量,故选定胰蛋白酶酶解条件为酶底比 1:100,37 °C 消化 11 h。

**2.8 模拟胃/肠液酶解寡肽与肝组织蛋白结合率测定**<sup>[11-12]</sup>

**2.8.1 肝组织蛋白的制备** 将透析袋预处理后置于空白透析液中,于 4 °C 储存备用。取一端扎紧的透析袋,除去袋内、外水分,精密吸取肝组织匀浆 500  $\mu\text{L}$  至透析袋中,扎紧袋口,于冰浴条件下悬浮于 20 mL 空白透析液透析,直至透析外液中加入 3% 三氯乙酸溶液无白色絮状析出,加入双缩脲试剂不显蓝紫色时,方可用作试验肝组织蛋白结合。

**2.8.2 蛋白结合率的测定** 试验设置模拟胃液组、模拟肠液组及空白对照组。将模拟胃液、肠液消化后所得寡肽分别配置成质量浓度 3.00,1.92,0.96  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,以双蒸水所得寡肽同样配置 3 个质量浓度作为空白对照,取上述 3 组含药透析液 2 mL 置于 10 mL 西林瓶中,待用。将 2.8.1 项下已制备装有肝组织蛋白的透析袋放入上述西林瓶中,调整透析袋位置,使透析袋内、外液面应保持同一水平,并避免贴瓶壁,密封瓶口,置于 37 °C 恒温水浴振荡加速使其平衡。透析过程中一部分药物会通过透析袋与肝组织蛋白结合(结合态,透析内液),而另一部分药

物留在透析袋外(游离态,透析外液),结合态与游离态药物处于动态平衡,透析结束后,取出透膜袋,用滤纸吸干附着于袋外壁的透析液,测定袋外溶液中药物质量浓度,计算药物与蛋白的结合率,结果见图 3。

$$f_b = (c_i v_i - c_1 v_1) / c_i v_i$$

其中,  $f_b$  为药物与蛋白的结合率,  $c_i$  为药物原质量浓度,  $c_1$  为试验组透析袋外药物质量浓度,  $v_i$  为药物原体积,  $v_1$  为试验组透析体系总体积。

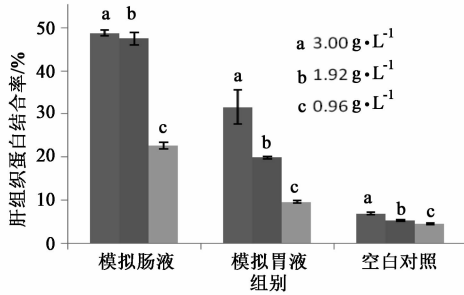


图 3 模拟胃液、肠液和空白对照组中不同质量浓度寡肽与肝组织蛋白结合率

### 3 讨论

在胃肠液中,胃蛋白酶灭酶手段主要有高温灭活、有机溶剂灭活、调整 pH。通过对该 3 种胃蛋白酶灭酶方法的考察,结合透析外液中寡肽产率可知,高温灭活会加大样品的降解程度,增加寡肽产率,胃蛋白酶最终确定采用调整 pH 灭酶法。人体胃消化时间一般 2~3 h,胰蛋白酶消化时间较长,因此,以人体实际的消化时间为依据,本实验分别考察了胃蛋白酶、胰蛋白酶 4, 13 h 内的寡肽含量变化。

为防止肝组织蛋白中存在肽类泄露,影响对样品中寡肽浓度的测定,将获取的肝组织蛋白首先在冰浴条件下透析,用三氯乙酸溶液、双缩脲试剂检测直至反应为阴性,再将其置于不同浓度的寡肽试剂中进行平衡透析结合。结果发现,鳖甲水提物 W-A-80 在胃肠液中稳定性较差;空白对照组和胃、肠液消化后的同一寡肽浓度与肝组织蛋白结合率也存在很大差异。可能是由于不同蛋白酶对鳖甲中蛋白的酶切位点不同所致。胃蛋白酶 A 切割肽链的苯丙氨酸或酪氨酸 C 端<sup>[13]</sup>,如果往某一肽键氨基端数第 3 个氨基酸为碱性氨基酸(如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)或者该肽键的氨基端为精氨酸时,则不能有效地对此肽键进行剪切。而胰蛋白酶主要对亲水性氨基酸(赖氨酸、精氨酸)的 C 端具有特异的分解作用<sup>[14]</sup>。文献报道醋鳖甲中赖氨酸、精氨酸含量远大于苯丙氨酸和酪氨酸<sup>[15-17]</sup>,为胰蛋白酶特异酶切寡

肽提供物质保障。因此,可推知由于鳖甲水提物 W-A-80 经胃、肠液消化后生成寡肽种类不同,与肝组织蛋白结合的寡肽结合情况不同,因而活性表现不同。

通过对鳖甲水提物 W-A-80 经模拟胃、肠液消化后所得寡肽的含量测定及肝组织蛋白结合率差异比较,显示鳖甲水提物 W-A-80 经模拟胃肠液消化有大量寡肽产生,酶解前后寡肽活性差异显著,尤其以肠液消化活性表现最强,初步推测鳖甲酶解后寡肽是其抗肝纤维化的可能性物质基础,寡肽结构可能与胃蛋白酶和胰蛋白酶酶切位点有关,为鳖甲酶解后寡肽的进一步研究奠定基础,同时为其他口服中药研究提供参考。

### [参考文献]

- [1] 谢世平,司富春,赵君玫. 鳖甲煎丸对免疫性肝纤维化大鼠胶原及相关细胞因子表达的影响[J]. 中国医药学报,2004,19(7):412.
- [2] 周光德,李文淑,赵景民,等. 复方鳖甲软肝片抗肝纤维化机制的临床病理研究[J]. 解放军医学杂志,2004,29(7):563.
- [3] 唐尹萍,刘焱文,许腊英. 中药鳖甲提取物抗肝纤维化的实验研究[J]. 湖北中医药大学学报,2011,13(2):44.
- [4] 高建蓉,朱有法,张赤志,等. 鳖甲水煎液对两种肝纤维化大鼠模型的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2009,27(8):1727.
- [5] 高建蓉,张赤志,邵志华,等. 鳖甲对肝星状细胞增殖影响的研究[J]. 实用医学杂志,2007,23(11):1618.
- [6] 施婧妮,陈进文,高建蓉,等. 鳖甲炮制前后抗肝纤维化有效物质部位 HPLC 指纹图谱的比较研究[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(2):63.
- [7] HU C L, TANG Y P, LIU Y W, et al. Synthesis of an active peptide from Carapax Trionycis and its inhibitory effect on the proliferation of hepatic stellate cells[J]. J Chin Pharm Sci, 2012, 21(2):132.
- [8] 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.
- [9] 毕葳,邢延一,李燕燕,等. 应用双缩脲反应测定鳖甲中总肽含量的方法学[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):63.
- [10] Thomas K, Aalbers M, Bannon G A, et al. A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins [J]. Regul Toxicol Pharm, 2004, 39(2):87.

# 超临界 CO<sub>2</sub> 流体技术萃取当归挥发油的工艺优选

李晓宁, 杨银花, 赵博琛, 兰颐, 安静, 王琼, 王文平, 吴清\*  
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 优选超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取当归挥发油的工艺条件。方法: 以藁本内酯含量和出油率的综合评分为指标, 采用 HPLC 测定藁本内酯含量, 通过 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验考察萃取压力、温度、时间对萃取效果的影响。结果: 当归挥发油的最佳萃取工艺为萃取压力 30 MPa, 萃取温度 50 ℃, 萃取时间 2 h, CO<sub>2</sub> 流量 25 L·h<sup>-1</sup>, 分离釜 I 压力 8 MPa, 温度 50 ℃, 分离釜 II 压力系统尾压, 温度 35 ℃。结论: 萃取的当归挥发油得率高、质量好, 优选的工艺稳定可行。

[关键词] 当归; 超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取; 藁本内酯

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)14-0027-03

[doi] 10.11653/syfyj2013140027

## Optimization of Supercritical CO<sub>2</sub> Fluid Extraction Process for Volatile Oil from *Angelica sinensis*

LI Xiao-ning, YANG Yin-hua, ZHAO Bo-chen, LAN Yi, AN Jing, WANG Qiong, WANG Wen-ping, WU Qing\*  
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction process parameters of volatile oil from *Angelica sinensis*. **Method:** With composite score of the content of ligustilide and yield of volatile oil as index, the content of ligustilide was determined by HPLC, L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test was used to investigate effect of extraction temperature, extraction pressure, extraction time on extraction efficiency. **Result:** Optimum process parameters were as follows: extraction pressure 30 MPa, extraction temperature 50 ℃, extraction time 2 h, flow rate of CO<sub>2</sub> 25 L·h<sup>-1</sup>, pressure of separation kettle I 8 MPa with temperature at 50 ℃, separation pot II pressure of the system tail pressure with temperature at 35 ℃. **Conclusion:** This optimized process was stable and feasible,

[收稿日期] 20130109(036)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073059)

[第一作者] 李晓宁, 硕士生, 从事中药新技术研究, Tel: 13522025015, E-mail: lxiaoning2011@126.com

[通讯作者] \* 吴清, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, E-mail: qwu@vip.sina.com

- [11] 杨晓宁, 禹玉洪, 李阳, 等. HPLC 法测定丁香酚与大鼠血浆蛋白的结合率[J]. 中草药, 2010, 41(3): 391.
- [12] 黄勇, 牟景丽, 陈慧, 等. 平衡透析法、超滤法结合液质联用技术比较测定注射用复方荛苳中黄酮类成分的血浆蛋白结合率[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 91.
- [13] Mikita C P, Padlan E A. Why is there a greater incidence of allergy to the tropomyosin certain animals than to that of other? [J]. Med Hypotheses, 2007, 69(5): 1070.
- [14] Barrett A J, Rawlings N D, WOESSNER J F. Handbook of proteolytic enzymes [M]. 2 ed. London: Elsevier, 2004: 1267.
- [15] 李彬, 郭力城. 鳖甲的化学成分和药理作用研究概况[J]. 中医药信息, 2009, 26(1): 25.
- [16] 凌笑梅, 张娅婕, 张桂英, 等. 鳖甲提取物中氨基酸、微量元素及多糖含量的测定[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(10): 939.
- [17] 缪华蓉, 沈耀明. 鳖甲内氨基酸成分的研究[J]. 中成药, 1995, 17(12): 37.

[责任编辑 仝燕]