

doi:10. 13407/j. cnki. jpp. 1672-108X. 2016. 12. 017

· 论 著 ·

酶渗漉与醇渗漉提取颠茄草中莨菪碱的效果比较

陈芳,常明泉 (湖北医药学院附属太和医院,湖北十堰 442000)

[摘要] 目的:应用酶渗漉法和醇渗漉法分别提取颠茄草中主要活性物质莨菪碱,考察两种溶媒提取的提取率,选择最佳提取方法。方法:用 pH 值为 2.0、体外消化活力为 24~30 U/mL 的胃蛋白酶溶液为溶媒渗漉颠茄草,以 80% 乙醇为溶媒提取的渗漉液做对照,用高效液相色谱法测定两组提取液中莨菪碱的含量,比较两种溶媒的提取率。结果:酶渗漉法莨菪碱提取率为 4.87 mg/g,醇渗漉法提取率为 3.66 mg/g,酶渗漉法比醇渗漉法提取率高 33.1% ($P < 0.05$)。结论:应用酶渗漉法提取颠茄草能显著提高莨菪碱的提取率,降低成本,具有实用价值。

[关键词] 颠茄草;酶渗漉;醇渗漉;莨菪碱

[中图分类号] R284

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-108X(2016)12-0047-03

Comparison between the Effectiveness of Enzyme Percolation Method and Alcohol Percolation Method Used in Extracting of Hyoscyamine in Belladonna Herb

Cheng Fang, Chang Mingquan (Taihe Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Hubei Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective:** Enzyme percolation method and alcohol percolation method were respectively utilized to extract hyoscyamine in belladonna herb, in order to select the best extraction method. **Methods:** The pepsin solution, pH was 2.0, in vitro digestion energy was 24~30 U/mL, was utilized as solvent to percolate hyoscyamine. In the control, the 80% ethanol solution was utilized as solvent to percolate hyoscyamine. High performance liquid chromatography was utilized to test the content of hyoscyamine in extracting solution of two groups and extraction rates from two groups were compared. **Results:** The extraction rate of hyoscyamine extracting by enzyme percolation method was 4.87 mg/g, it was 33.1% higher than alcohol percolation method which was 3.66 mg/g ($P < 0.05$). **Conclusion:** Enzyme percolation method used in extracting hyoscyamine can significantly increase the extraction rate of the main active substance- hyoscyamine. It can help reducing cost and has practical value.

[Keywords] belladonna herb; enzyme percolation; alcohol percolation; hyoscyamine

颠茄口服液是我院的在研制剂,主药成份为颠茄草提取液,该提取液的主要药理成份为莨菪碱,主要起抗痉止疼的作用。提取颠茄草的传统方法是乙醇渗漉法,常将其制备成酊剂、浸膏或干浸膏使用^[1,2]。近年来超声技术、萃取技术广泛应用于中草药的提取,生物酶提取技术也逐渐应用于中药单味或复方制剂的提取中,并获得较高评价。为了提高颠茄草的提取率,降低科研和生产成本,本实验借鉴文献方法,应用自制的酸性胃蛋白酶溶液为溶媒渗漉提取颠茄草,以提取液中的莨菪碱为指标,与传统醇渗漉提取法对照,比较两种提取方法对颠茄草中莨菪碱的提取率。

1 仪器与材料

玻璃渗漉筒(台州市椒江玻璃仪器厂,70×93);U-3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司),FA2004 分析天平(上海精益电子分析仪器厂,精度 0.000 1 g);颠茄草(十堰市太和医院门诊药房提供,由湖北医药学院药学院叶立红副教授鉴定为茄科植物颠茄草 *Atropabelladonn* aL 的全草),莨菪碱对照品(中国食品药品研究院提供,批

号 100046);甲醇为色谱纯,无水乙醇、乙醇为分析纯;酸性胃蛋白酶溶液(pH 值为 2.0,体外消化活力为 24~30 U/mL^[3],十堰市太和医院新鲜配制),水为纯化水(太和医院自制)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 酶渗漉液的制备 取经过鉴定的颠茄草烘干粉碎后过 10 目筛,精密称取该药粉 300.0 g,于玻璃渗漉筒内,加酸性胃蛋白酶溶液适量,使液面高出药粉约 3 cm,密闭,浸渍 48 h;自出口快速收集初漉液约 50 mL,回收至渗漉筒中,控制渗漉筒出口,以 1 mL/min 的速度收集渗漉液,至渗漉液与药材比为 1:5,整个渗漉过程在 35℃~38℃ 条件下进行;收集全部渗漉液,混匀,精密量取渗漉液 100 mL,置蒸发皿中水浴蒸干,残留物加无水乙醇适量溶解,溶液转移至 25 mL 容量瓶中,定容,摇匀,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得酶渗漉液。

2.1.2 醇渗漉液的制备 取经过鉴定的颠茄草烘干粉

基金项目:太和科研基金资助项目,编号 2013JJXM021;湖北省科学技术鉴定成果,登记号 EK2014D 150074001486。

作者简介:陈芳(1969~),女,大学本科,副主任药师,主要从事医院药学工作,E-mail: 907622985@qq.com。

通讯作者:常明泉(1963~),男,大学本科,副主任药师,主要从事新药研究,E-mail: 907622985@qq.com。

碎后过 10 目筛,精密称取该药粉 300.0 g,于玻璃渗漉筒内,加 80% 乙醇适量,使液面高出药粉约 3 cm,密闭,浸渍 48 h;自出口快速收集初漉液约 50 mL,回收至渗漉筒中,控制渗漉筒出口,以 1 mL/min 的速度收集醇渗漉液,至渗漉液与药材比为 1 : 5,整个渗漉过程在室温 35 ℃ ~ 38 ℃ 条件下进行;收集全部渗漉液,混匀,精密取渗漉液 100 mL,置蒸发皿中水浴蒸干,残留物加无水乙醇适量溶解,溶液转移至 25 mL 容量瓶中,定容,摇匀,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得醇渗漉液。

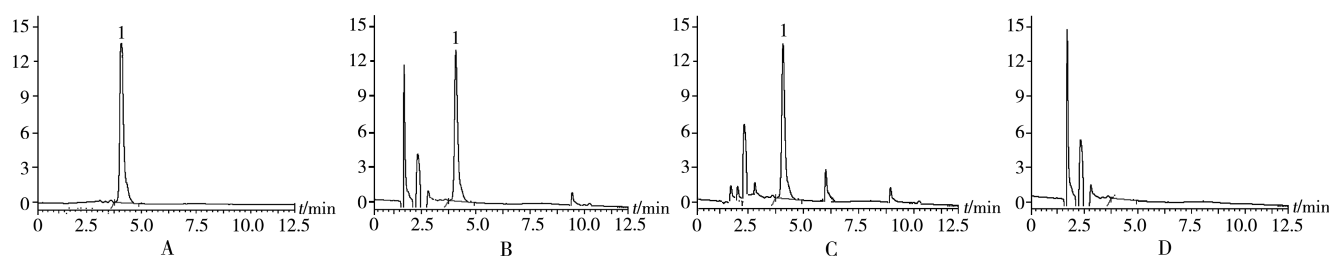
2.1.3 空白溶液的制备 精密吸取酸性胃蛋白溶液 100 mL 置蒸发皿中,按上述酶渗漉样品溶液的方法制备,即得。

2.1.4 对照品溶液的制备 精密称取氢溴酸莨菪碱对

照品适量,加流动相溶解制备成 2.6 μg/mL 的对照品溶液,即得。

2.2 两种渗漉方法的提取效果比较

2.2.1 色谱条件及适用性考察^[45] Diamonsil-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.25% 十二烷基烷基硫酸钠溶液(用醋酸调节 pH 至 2.5)-乙腈(60 : 40);流速 1.0 mL/min;检测波长 210 nm;进样量 20 μL;柱温 30 ℃。取“2.1”项下的各溶液,在该色谱条件下分别进样 3 次,记录各样品溶液的色谱图、计算平均峰面积,结果表明对照品溶液和供试品溶液在相应时间均有相同色谱峰出现,空白溶液没有色谱峰出现,说明该方法适用于各组颠茄草渗漉液中莨菪碱的含量测定。见图 1。



A. 对照品溶液;B. 酶渗漉液样品;C. 醇渗漉液样品;D. 空白样品;1. 莨菪碱

图 1 高效液相色谱图

2.2.2 线性方程的建立及测定方法学验证

2.2.2.1 线性方程 精密称取对照品适量,加流动相分别制备成浓度为 2.6、13.0、26.0、39.0、65.0、130.0 μg/mL 的莨菪碱对照品溶液,在“2.2.1”项的色谱条件下进样 3 次,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标拟定线性方程为 $Y=0.3081X-0.2941$ ($r=0.9997$),结果表明莨菪碱在 2.60 ~ 130.0 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.2.2.2 精密度实验 精密吸取“2.1”项下对照品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下连续进样 6 次,记录峰面积值,结果 RSD 为 0.44%,表明有良好的精密度。

2.2.2.3 稳定性实验 取“2.1”项下的对照品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下,分别在 0、3、6、12、24、36 h 进样,测定峰面积值,RSD 为 1.19%,表明稳定性良好。

2.2.2.4 重复性实验 分别精密称取颠茄草药粉 5 份,各 300.0 g,按“2.1”项下酶渗漉法制备溶液,在“2.2.1”项色谱条件下测得莨菪碱的平均含量为 4.87 mg/g, RSD 为 1.49%。

2.2.2.5 回收率实验 精密称取已知含量的颠茄草药粉 150.0 g,共 9 份,每组 3 份,分别按样品含量的 80%、100%、120% 加入适量对照品溶液,按“2.1”项下酶渗漉法制备溶液,在“2.2.1”项色谱条件下测定峰面积值,计算含量,结果平均回收率为 97.8%,RSD 为 2.37% ($n=9$)。经过测定方法的验证,结果表明,所选定方法适用于两种渗漉法所得渗漉液中莨菪碱的含量测定。

2.2.3 含量测定 分别取“2.1”项下的酶渗漉和醇渗

漉溶液,在“2.2.1”项色谱条件下测定两组渗漉液中莨菪碱的含量,应用 SPSS13.0 软件对两组结果进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果见表 1。

表 1 两种颠茄草渗漉液中莨菪碱含量测定结果 ($n=3$)

提取方法	含量/(mg/g)	RSD%
酶渗漉法	4.87	1.02
醇渗漉法	3.66	1.21

注:两种提取方法结果比较 $P < 0.05$ 。

3 讨论

以酸性胃蛋白酶溶液为溶媒渗漉提取颠茄草是一种酶解提取方法,该方法模拟人体温度、胃肠道酶活力环境、pH 条件^[6-8],在提取过程中,酸性胃蛋白酶通过对颠茄草植物组织结构的侵蚀与攻击,破坏其致密结构,使其膨胀,进而变得疏松、崩溃、突破细胞间质与细胞壁的双重阻力,减小传递屏障对活性成分从胞内向溶媒扩散的阻力,使植物细胞原生质体中活性成份向提取溶媒扩散,从而提高莨菪碱的提取效率。

制备酸性胃蛋白酶溶液时,当溶液 pH 为 1.5 ~ 3.0 时胃蛋白酶的消化活力最强,所以加入适量稀盐酸调节 pH,并测定其消化活力符合要求后使用。为了保持酶有充足的活性,在酶渗漉提取过程中将提取温度控制在 35 ℃ ~ 38 ℃,以避免温度过高或过低导致酶失活,酶解效应减弱。而为使两种渗漉法在同等条件下进行,将醇

渗漉过程也控制在 35 ℃ ~ 38 ℃ 温度条件下进行。

通过酶渗法与醇渗法提取颠茄草的结果比较,酶渗法莨菪碱的提取率更高,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明酶解效应有利于颠茄草中莨菪碱的溶出。应用酶渗法提取颠茄草,可提高莨菪碱的提取率,节约提取时间、降低成本,具有实用价值。

参考文献:

- [1] 常明泉,郝新才,叶立红,等. 颠胃酸口服液的制备与质量控制[J]. 中国药师, 2011, 14(7): 1050-1051.
- [2] 蔡少青. 生药学[M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 20-24.
- [3] 余刚,胡丽,常明泉. 酶促反应法考察颠胃酸口服液的体外

活力[J]. 医药导报, 2013, 32(6): 704-706.

- [4] 陈芳,常明泉,肖琴,等. 高效液相色谱法测定颠胃酸口服液中莨菪碱含量测定[J]. 儿科药学杂志, 2012, 18(2): 37-39.
- [5] 周华扬,覃志高. 东莨菪碱含量测定概况[J]. 中国医药指南, 2012, 10(12): 73-74.
- [6] 常明泉,杨光义,常晨,等. 人工胃液对五味子甲素的溶出率考察[J]. 中国药师, 2014, 17(11): 1837-1839.
- [7] 董霞,常明泉,黄良永,等. 人工胃液酶解对五味子乙素溶出率影响[J]. 儿科药学杂志, 2015, 21(2): 31-33.
- [8] 王晨,吴晖,李晓凤,等. 胃蛋白酶酶解提取鸡骨胶原蛋白工艺研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(12): 1300-1303.

(编辑:王乐乐)

(收稿日期:2015-11-07 修回日期:2016-02-25)

doi:10. 13407/j. cnki. jpp. 1672-108X. 2016. 12. 018

• 综述 •

自身免疫性淋巴细胞增生综合征的诊断和治疗进展

陆红宇,杨曦 综述,赵晓东 审校 (重庆医科大学附属儿童医院,重庆 400014)

[中图分类号]R725. 5

[文献标识码]A

[文章编号]1672-108X(2016)12-0049-04

Progress of Diagnosis and Treatment of Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome

Lu Hongyu, Yang Xi, Zhao Xiaodong (Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

自身免疫性淋巴细胞增生综合征(autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS)是一种以淋巴细胞大量异常存活为特征的综合征,由 FAS 凋亡通路失活引发,患者可逐渐发展合并为慢性淋巴细胞增生、难治性血细胞减少、自身免疫疾病,同时有较高并发恶性肿瘤的风险。ALPS 最早于 1967 年由 Canale 和 Smith 首先发现,该病一度被认为是一种极其罕见的疾病,随着其分子病理基础研究的不断深入,现全球已有超过 500 例 ALPS 被诊断和发现,相信随着对 FAS 及其相关影响分子探索的不断深入及此病临床认识的加深,被诊断出的 ALPS 患者会不断增多。本文就国内外近年来对该 ALPS 的相关诊断和治疗进展作一综述。

1 发病机制、分类及分子基础

ALPS 是一种由于 FAS 蛋白介导的凋亡通路受阻而导致淋巴细胞非正常活化的综合征^[1]。正常机体在受特异性抗原刺激后,伴随 T、B 淋巴细胞的活化及增生,细胞会表达高水平的 FAS 蛋白,同时活化的 T 细胞又会增强 FAS 配体(FAS ligand, FASL)的表达,FAS 与 FASL 结合后,大量活化的淋巴细胞进入凋亡程序,清除与自身抗原交叉反应的克隆和由自身抗原激活的细胞克

隆,以限制 T 细胞克隆的无限增殖,防止其对自身组织的损伤^[2]。ALPS 患者由于 FAS 蛋白缺乏,不能通过 FAS 激活死亡结构域(FAS-activating death domain, FADD)从而促发半胱天冬酶级联作用,使得 DNA 降解及蛋白水解过程提前结束。不完全的细胞凋亡会导致慢性淋巴细胞增生、自身免疫性疾病及继发性恶性疾病等^[3]。

随着近年来对 ALPS 疾病的认识和了解,除了 FAS 基因突变导致的相关疾病外,与 FAS 蛋白凋亡途径相关的基因缺陷包括 FASL、FADD、CASP8、CASP10,甚至 KRAS 和 NRAS 等也纳入了 ALPS 的疾病范畴。2013 年,Guo Q 等^[4]通过对过度表达 miR-146a 转基因小鼠研究发现,miR-146 蛋白的过度表达会降低 FAS 的活性,使小鼠产生类似人类 ALPS 的相关疾病特征,如肝脾淋巴结肿大、浸润性肝脏、肺部炎症、外周血双阴性 T 细胞(double-negative T cell, DNT)水平上升及血清 IgG 水平上升。

ALPS 患者中超过 70% 都存在 FAS 基因突变。FAS 发生纯和基因突变时因其突变的严重性,导致其发生胎儿期流产或生后不久继发严重的感染而死亡。目前存活患儿中,最多见的为 FAS 杂合突变,占患儿总数的