

3 讨论

根据国家商务部颁布《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》药材重金属限量标准, 铅(Pb) $\leq 5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 镉(Cd) $\leq 0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 汞(Hg) $\leq 0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 铜(Cu) $\leq 20.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 砷(As) $\leq 2.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。26批全草中, 铅的含量均超标, 7批镉的含量超标。10批分部位考察的样品中, 根中铅含量均超标, 9批镉的含量超标; 茎中5批铅的含量超标, 10批镉的含量超标; 叶中1批铅的含量超标。根据SPSS 19.0软件统计结果, 可从一定程度上认为地稔全草中铅超标与根中铅含量较高有关; 地稔根、茎中镉的含量均超标, 且无显著性差异, 与全草中镉含量也均无相关性, 而叶中镉含量均符合要求, 故全草样品大部分镉含量符合要求。此外, 以有效成分为指标进行分部位含量测定研究结果表明, 叶中有效成分含量最高, 显著高于根、茎^[7], 结合以上因素, 依据用药安全性原则, 建议以地上部位入药。

中药材重金属来源很复杂, 一是源自环境的污染如土壤、大气、水、化肥、农药的施用, 以及工业“三废”对中药材的直接污染和间接污染; 二是中药在采集运输和加工过程(加工炮制、提取溶媒、工艺设备、接触器皿等)中的污染; 三是与药用植物自身遗传特性及主动吸收功能和对重金属元素的富集能力有关^[8]。本研究所用样品采摘自丽水及其周边地区, 这说明地稔当中铅含量较高不是特例, 炮制方法为洗净、阴干、切断, 可排

除器皿中重金属的污染, 初步认为地稔中铅、镉含量较高很可能是植物本身具有重金属富集性。有学者报道中药的铅、镉含量与临床的不良反应有一定关系, 且含量越高其不良反应就越明显^[9], 因此, 需深入研究地稔药用植物特性, 趋利避害选择种植区域, 从源头减少重金属污染。

REFERENCES

- [1] QIN X Y, LUO J Y, GAO Z G. Chinese Journal of Yao Pharmacy(中国瑶药学) [M]. Nan Ning: Guangxi Nationalities Press, 2002: 712.
- [2] CHEN Z Y, LI S F. The general investigation of traditional She medicine-Melastoma dodecandrum [J]. Chin Tradit Herb(中草药), 2007, 38(7): Appendix 1.
- [3] State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Herbal Medicine(中华本草) [M]. Vol 5. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1999: 678-680.
- [4] 陆龙根. 植物类中药材中砷镉和铅的含量及安全性评价[J]. 微量元素与健康研究, 2003, 20(1): 53-54.
- [5] 梁启超, 李荣辉, 刘爽. 降低中药中重金属含量方法的研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2012, 29(2): 48-50.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2010: 80, 122, 205, 283, 附录 48-49.
- [7] LIU M, YU L, LI S F, et al. Determination of gallic acid and quercetin in different parts and period of traditional She medicine-Melastoma dodecandrum [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(11): 1351-1355.
- [8] JIN X L. Heavy metal pollution source of Chinese herbs and its control measures [J]. West J Tradit Chin Med(西部中医药), 2011, 24(7): 24-26.
- [9] LIANG Q F. Study on the relation between harmful reaction of traditional chinese medicine and the content of Pb and Cd [J]. Guangdong Trace Elements Sci(广东微量元素科学), 1997, 4(5): 53-56.

收稿日期: 2015-10-28

不同炮制方法对玳瑁浸出物及氨基酸含量的影响

林源¹, 卜其涛², 王凤芹², 汪秀月², 陆维承¹, 张成中^{2*} (1.温岭市中医院, 浙江 温岭 317500; 2.阜阳市食品药品检验检测中心, 安徽 阜阳 236015)

摘要: 目的 测定玳瑁药材浸出物、氨基酸的含量及炮制对结果的影响。方法 采用药典规定方法测定浸出物的量。全自动氨基酸分析仪测定经厌氧管充氮密封酸水解后玳瑁中氨基酸的含量。结果 炮制后浸出物的量明显提高。玳瑁中氨基酸含量较高, 17种单体氨基酸总量达75%, 其中酪氨酸、甘氨酸、脯氨酸、亮氨酸等含量较高。结论 炮制能明显提高玳瑁浸出物的量, 其中砂烫醋淬后显著高于生品。全自动氨基酸分析仪能够很好地测定酸水解后的玳瑁氨基酸的含量。**关键词:** 玳瑁; 浸出物; 氨基酸; 全自动氨基酸分析仪

基金项目: 温岭市科技局基金(2014C311072)

作者简介: 林源, 男, 主管中药师 Tel: 13566665731 E-mail: bear_84321@163.com *通信作者: 张成中, 男, 硕士, 主管中药师 Tel: 18900580280 E-mail: zhangchzh09@163.com

Study on the Effect of Different Processing Methods on Extracts and Amino Acids in Eretmochelydis Carapax

LIN Yuan¹, BU Qitao², WANG Fengqin², WANG Xiuyue², LU Weicheng¹, ZHANG Chengzhong^{2*} (1. Wenling Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenling 317500, China; 2. Fuyang Institute for Food and Drug Control, Fuyang 236015, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine extracts and amino acids in Eretmochelydis Carapax. **METHODS** The extract was determined in methods of Chinese Pharmacopoeia. Eretmochelydis Carapax was hydrolyzed in the anaerobic nitrogen-sealed tube by hydrochloric acid. Total amino acids content was determined by Amino Acid Autoanalyzer. **RESULTS** The extract was increased significantly with processing. The content of amino acids in Eretmochelydis Carapax was high. The total content of 17 kinds of amino acids was 75%, and the content of tyrosine, glycine, proline, leucine was high. **CONCLUSION** The extract was increased with processing. There was a significant difference between the extract of vinegar-processed and the extract of crude. The content of amino acid in Eretmochelydis Carapax can be accurately determined by Amino Acid Autoanalyzer.

KEY WORDS: Eretmochelydis Carapax; extract; amino acids; Amino Acid Autoanalyzer

玳瑁(*Eretmochelys imbricate* Linnaeus)来源于龟鳖目 Testudinata, 潜颈龟亚目 Cryptodira 海龟科 Cheloniidae 玳瑁属 Eretmochelys, 背甲共有 13 块, 作覆瓦状排列, 所以又称十三鳞, 古名瑇瑁、文甲等, 具有清热解毒、镇心安神之功, 可用于热病神昏、谵语惊狂、惊风抽搐、痈肿疮毒、斑疹等。玳瑁临床应用以生用为主, 亦有炮制使用, 炮制以蒸后镑极薄片及丝为主, 《圣惠方》等文献中载有滑石粉制玳瑁的应用, 现代科学研究发现具有多种药理活性^[1]。玳瑁甲片含有角蛋白、胶质、微量元素等, 其体内所含的氨基酸种类和数量均较陆生龟鳖类高^[2]。氨基酸是合成蛋白质、多肽的基本组成物质, 是构成体内各种酶、抗体及某些激素的原料, 并且具有调节生理机能、供给热能及促进生长发育, 补充代谢消耗掉的能量的作用。目前氨基酸分析方法主要有衍生化间接分析法(如衍生化离子交换色谱法^[3]和衍生化高效液相色谱法^[4]等)及无需衍生化的直接分析法(如 LC-MS/MS^[5]、高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培法等), 氨基酸自动分析仪的分析原理则是基于阳离子交换树脂分离-柱后茚三酮衍生化分光光度检测方法^[6]。本实验所涉氨基酸分析实验均采用氨基酸全自动分析仪测定完成。本实验同时研究了不同溶剂对不同玳瑁炮制品浸出物量的影响。

1 仪器与材料

1.1 仪器

S433D 氨基酸全自动分析仪(德国 Sykam 公

司); 阳离子分离柱(LCAK 06/Na 4.6 mm×150 mm); XP205 电子分析天平(Mettler Toledo 公司); MULTIVAP 型氮吹仪(美国 Orgnomation 公司); B6Z-70 数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司); 智能触摸式电磁炉及炒锅(美的集团股份有限公司)。

1.2 材料

玳瑁(安徽省万生中药饮片有限公司, 批号: 20141201), 经阜阳市食品药品检验检测中心主管中药师张成中鉴定为玳瑁 *Eretmochelys imbricate* Linnaeus; 滑石粉(批号: 20131021)、蛤粉(批号: 20150112)均购自安徽省万生中药饮片有限公司; 黄酒、米醋为食品级; 柠檬酸钠缓冲液(pH 3.5、pH 10.85)、样品稀释液、茚三酮显色液、再生液均来自德国 Sykam 公司; 高纯氮气(合肥众益化工产品有限责任公司); 色谱纯甲醇、乙腈(国药集团); 蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司); 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 饮片的炮制^[7]

取玳瑁原药材, 净制后, 制成大小分档的块或片。砂烫(酒醋制)玳瑁, 取净河砂武火(功率 500~800 W, 炒 10 min)炒至灵活状态, 投入大小分档的玳瑁片、块, 翻炒至表面微黄, 鼓起, 特有的气味散出, 取出, 筛去河砂, 放凉, 或趁热投入米醋、黄酒液中, 分别得砂烫玳瑁、砂烫醋制玳瑁及砂烫酒制玳瑁, 河砂用量以能掩埋药材

为度,米酒、醋以浸没药材为度。蛤粉炒(酒醋制)玳瑁,取筛过的蛤粉,中火炒(300~500 W)至蛤粉滑利易翻动时改文火(100~300 W),投入大小分档的玳瑁药材,拌炒至特有气味散出,表面微黄,鼓起,取出,筛去蛤粉,放凉,或趁热投入米醋、黄酒液中,分别得蛤粉炒玳瑁、蛤粉炒醋制玳瑁及蛤粉炒酒制玳瑁。蛤粉用量约为药材量的25%~50%,米酒、醋以浸没药材为度。滑石粉炒(酒醋制)玳瑁,炮制方法与蛤粉制法相同。

2.2 浸出物的测定

按浸出物测定方法(中国药典 2010 年版一部附录 X A)分别考察冷浸法和热浸法,以水及不同浓度的乙醇为溶剂时的浸出物的量。

2.3 氨基酸测定色谱条件

洗脱泵流速: $0.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 衍生泵流速: $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长: 570 nm(用于非 PRO 检测), 440 nm(用于 PRO 检测), 柱温: $58 \sim 74 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 反应器温度: $130 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量: $50 \text{ } \mu\text{L}$ 。流动相 A 为 $0.36 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠缓冲液(pH 3.5)、流动相 B 为 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠缓冲液(pH 10.85)、流动相 C 为 5% 的甲醇水溶液用于检测后清洗色谱柱及仪器、流动相 D 为再生液。

2.4 氨基酸对照品溶液的配制

天冬氨酸(ASP)、苏氨酸(THR)、丝氨酸(SER)、谷氨酸(GLU)、甘氨酸(GLY)、丙氨酸(ALA)、胱氨酸(CYS)、缬氨酸(VAL)、蛋氨酸(MET)、异亮氨酸(ILE)、亮氨酸(LEU)、酪氨酸(TYR)、苯丙氨酸(PHE)、组氨酸(HIS)、赖氨酸(LYS)、精氨酸(ARG)、脯氨酸(PRO)等 17 种氨基酸的混合对照品购自德国 Sykam 公司,临用前稀释至 $0.2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 样品的处理-厌氧管充氮密封水解法^[8]

精密称取玳瑁(粉碎,过 2 号筛)约 0.1 g 置厌氧水解管中,加入 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸 10 mL,将样品全部浸没,冷冻 10 min,充高纯氮气 2 min,勿使液面溅起,移开氮气后立即密封, $(110 \pm 1) \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水解 22 h。取出,放冷,精密量取 0.30 mL, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干,再精密加入样品稀释液 2.00 mL,滤过,取续滤液,即得。

2.6 仪器精密度、检出限试验

精密吸取“2.4”项下浓度为 $0.2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液连续进样 5 次,考察精密度。进样体积 0.05 mL,进样浓度 $200 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以 2 倍噪声与

峰高的比值计算检出限(LOD)。

2.7 样品含量测定

取 3 批玳瑁生品,按“2.5”项下方法制备样品溶液,分别进样,测定样品中 17 种氨基酸的含量。

3 结果

3.1 炮制对浸出物的影响

冷浸法,以水为溶剂浸出物为 1.91%,以 50% 的乙醇为溶剂浸出物为 2.74%。热浸法,以水为溶剂浸出物为 2.59%,以 50% 的乙醇为溶剂浸出物为 6.54%。因此,选择热浸法作为主要研究方法,以 30%, 50%, 70%, 80%, 95% 的乙醇热浸法测定,浸出物结果分别为 $(4.12 \pm 0.13)\%$, $(6.54 \pm 0.20)\%$, $(7.34 \pm 0.36)\%$, $(4.37 \pm 0.22)\%$, $(2.13 \pm 0.11)\%$ 。结果表明,70% 的乙醇热浸法可以得到较高的浸出物,因此,以 70% 的乙醇为溶剂热浸法测定不同炮制方法对玳瑁浸出物的影响,结果见图 1。由图可知,砂烫醋淬后的浸出物量最高达 18.89%,显著高于生品。

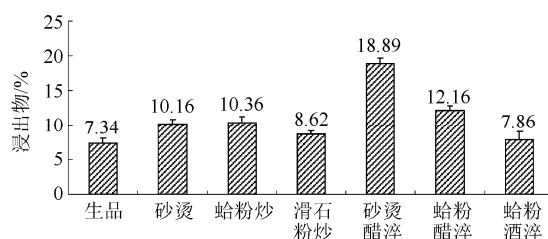


图 1 不同炮制方法对浸出物的影响

Fig. 1 Extract comparison of different processing

3.2 仪器精密度、检出限结果

17 种氨基酸峰面积的 RSD 均 $<1\%$, 最小分离度 $R=1.35$, 平均 $R=3.97$, 表明精密度良好。以 2 倍噪声与峰高的比值计算 LOD, 以 ASP 为标准, LOD 值为 1.7 pmol 。

3.3 样品的含量

玳瑁经水解可以获得多种氨基酸,其中 TYR、GLY、PRO、LEU、CYS、ARG 等含量较高,质量分数均 $>5.00\%$,而 VAL 未检出。结果见图 2 和表 1。

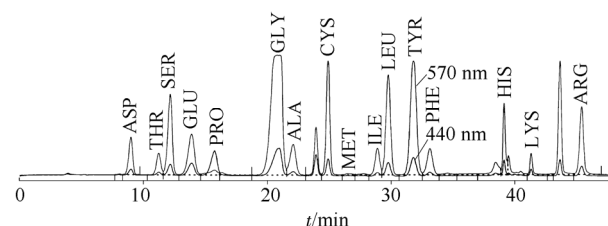


图 2 氨基酸色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of amino acids

表 1 17 种氨基酸的含量($n=3$)

Tab. 1 Content of 17 amino acids($n=3$)

氨基酸名称	含量/%	RSD/%
ASP	2.27	0.8
THR	1.27	0.8
SER	4.17	0.0
GLU	4.22	1.6
PRO	8.27	0.5
GLY	11.82	0.5
ALA	1.78	0.6
CYS	5.55	0.7
VAL	—	—
MET	0.16	3.0
ILE	1.77	0.6
LEU	6.80	0.3
TYR	14.23	1.2
PHE	2.71	2.1
HIS	3.39	2.1
LYS	0.84	0.6
ARG	5.44	0.4

4 讨论

炮制是根据中医药理论结合临床对中药进行的一系列加工处理,炮制可以使中药增效减毒、可以矫嗅矫味、利于有效成分的溶出。本实验通过对玳瑁浸出物的测定考察了炮制对玳瑁的影响,发现炮制后浸出物的量明显提高,加液体辅料米醋、黄酒可以明显提高浸出物的量,其中砂烫醋淬后浸出物的量显著高于生品。对浸提方法的考察发现热浸法较冷浸法的提取率更高。另外,炮制后玳瑁原有的腥臭味减失,更易于粉碎。

目前测定氨基酸较常用的方法包括 HPLC、全自动氨基酸分析仪测定法、液相串联质谱仪法,后 2 种检测方法较高效液相色谱法柱前衍生及阴离子直接测定法具有方法成熟可靠,稳定性、重现性、线性更优,专属性更强的特点,但 LC-MS/MS 所用仪器价格较高,普及范围不足,对于中小企业来说检验成本较高,因此本实验采用全自动氨基酸分析仪测定。

玳瑁经厌氧酸水解后测得氨基酸含量较高,

总量 $\geq 75\%$,其中 TYR、GLY、PRO、LEU、CYS、ARG 等含量均 $>5.00\%$,GLU、SER、HIS、PHE、ASP 含量也 $>2.00\%$,LYS 及 MET 含量较少,VAL 未检出。TYR 与多巴、多巴胺等的合成有关,多巴胺不足则会令人失去控制肌肉的能力,严重会令患者的手脚不自主地震动或导致帕金森氏症,GLY 是一种神经递质,在控制神经元兴奋性上发挥重要作用^[9],对维持脑功能正常发育有重要作用,玳瑁中所含的大量的 TYR、GLY 或许与其抗惊厥作用有关。

经厌氧管充氮密封酸水解后,蛋白质均分解为氨基酸,炮制品与生品经酸水解所得均为蛋白质水解后的氨基酸,因此,玳瑁经炮制后酸水解检测氨基酸的含量,与生品无显著差异,可见炮制对氨基酸的总量未产生影响。以后的试验中可以测定玳瑁炮制前后未经水解提取获得的游离氨基酸的含量。

REFERENCES

- [1] 林源,张成中. 海洋药物玳瑁的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2011, 30(5): 67-70.
- [2] 关美君,丁源. 我国海洋药物主要成分研究概况[C]. 中国第五届海洋湖沼药物学术开发研讨会论文集, 1999: 38-42.
- [3] LI Y, JIN O, ZHENG G G, et al. Determination of the content of cystine in Compound Amino Acids Injection (18AA) with performic acid oxidation by Amino Acid Analyzer [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(7): 871-874.
- [4] DENG Z Y, LYU L F, HU M M, et al. Content determination of nine kinds of amino acids neurotransmitters in rat brain tissue by HPLC with pre-column PITC derivatization [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(7): 827-831.
- [5] LI T F, XUE W, LI M, et al. Establishment of an LC-MS/MS Method to determine content of six amino acids in rat brain dialysate [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2015, 24(14): 1659-1665.
- [6] DING Y S, MOU S F. Development of analytical methods for amino acids and their applications [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2004, 22(3): 210-215
- [7] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 II D 炮制通则.
- [8] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准委员会. 中华人民共和国国家标准 GB/T 5009.124-2003, 食品中氨基酸的测定[S].
- [9] ZHOU H M, LEI N, LU Y P. Research advances on glycine neurotransmitters [J]. J Biol(生物学杂志), 2011, 28(1): 79-81.

收稿日期: 2015-10-17