

· 中药工业 ·

## 地鳖虫抗肿瘤成分提取方法的研究<sup>△</sup>

富尧<sup>1</sup>, 张慧明<sup>2</sup>, 许龙<sup>1</sup>, 吕冬云<sup>1\*</sup>

(1. 佳木斯大学 生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154002; 2. 佳木斯大学 基础医学院, 黑龙江 佳木斯 154002)

**[摘要]** **目的:** 对地鳖虫的脂类提取物的最佳提取方法进行研究。**方法:** 通过对索氏提取与超声法的对比, 对超声时间、温度、原料浸泡时间、有机溶剂的选择进行实验, 得出最佳的脂类提取条件。**结果:** 本实验通过单因素分析, 得出超声 40 min 时提取率为最高, 达到 17.23%, 60 min 时提取率反而下降为 13.7%; 超声温度在 50 ℃ 时提取率最高, 达到 15.95%, 随后在温度达到 60 ℃ 时下降到 14.02%, 70 ℃ 时下降到 10% 以下; 浸泡 6 h 时提取率最高, 达到 18.74%。而继续延长浸泡时间 12、24、48 h, 对脂类的提取量没有影响; 有机溶剂无水乙醚提取率最高。**结论:** 超声法应用无水乙醚浸泡 6 h, 超声温度 50 ℃, 超声时间 40 min 为地鳖虫脂类物质提取的最佳条件。

**[关键词]** 地鳖虫; 提取率; 超声波

### Study on Extraction of Antitumor Constituents from *Eupolyphaga sinensis*

FU Yao<sup>1</sup>, ZHANG Huiming<sup>2</sup>, XU Long<sup>1</sup>, LYU Dongyun<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi 154002, China;

2. Basic Medical Sciences, Jiamusi 154002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the extraction of lipophile fraction of *Eupolyphaga sinensis*. **Methods:** Through the comparison of Soxhlet extraction and ultrasonic extraction, the extraction conditions for the lipophile fraction were optimized with ultrasonic time, temperature, soaking time of raw material, organic solvent as the factors. **Results:** In this study, single factor analysis, The extraction rate was 17.23%, and the extraction rate decreased to 13.7% at 60 min; Ultrasonic temperature at 50 ℃ when the extraction rate of the highest, reaching 15.95%, then the temperature reached 60 ℃ to 14.02%. 70 ℃ down to 10% or less; The highest extraction rate was 18.74% when soaked for 6 h. While the prolonged soaking time 12h, 24h, 48h had no effect on the extraction of lipids; Organic solvent anhydrous ether extraction rate of the highest. **Conclusion:** The optimized condition was as follows: anhydrous ether soak 6 h, ultrasonic temperature 50, ultrasonic time 40 min.

**[Keywords]** *Eupolyphaga sinensis* Walker; extraction rate; ultrasonic

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.4.018

地鳖虫 *Eupolyphaga sinensis* Walker 属颚亚门, 六足总纲, 有翅亚纲, 蜚蠊目, 鳖蠊科, 地鳖亚科, 地鳖属。《本草纲目》: 【释名】地鳖(《本经》)、土鳖(《别录》)、蚬虫(《纲目》)。《雷公炮制药性解》: 味咸, 性寒, 有毒, 入心肝脾三经。主留血壅瘀, 心腹寒热洗洗, 祛坚积症瘕、下乳通经。现代药学表明, 其逐瘀、破积的功能对于肿瘤的发生、发展有着一定的抑制作用。地鳖虫体内的纤溶活性蛋白 EPS72 对人肺癌细胞株 A549 有

着体外抑制肿瘤的作用<sup>[1]</sup>, EFP 蛋白对 S180 和 H22 实体瘤有一定的抑瘤作用, 对 H22 和 S180 腹水瘤细胞端粒酶活性有一定降低作用, 可提高 Caspase-3 表达水平, 诱导细胞凋亡<sup>[2]</sup>。同时, 地鳖虫抗肿瘤有效脂溶性物质在体外对消化道肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用<sup>[3]</sup>。脂溶性物质不溶于水, 对这种脂溶性物质的有效提取成为我们研究的方向。本实验对地鳖虫脂类物质提取的最佳方法进行研究。

<sup>△</sup> [基金项目] 佳木斯大学研究生创新课题(LZR2014\_002); 佳木斯大学自然科学研究项目(JMSUJCMS2016-064)

\* [通信作者] 吕冬云, 教授, 研究方向: 应用昆虫; E-mail: lvdongyun1@eyou.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

地鳖虫粉末(国家标准物质网, 编号: 121533); 无水乙醇、无水乙醚、正己烷、丙酮(哈尔滨博士德生物有限公司, 分析纯)。

旋转蒸发仪 RE-2000A(上海亚荣生化仪器厂); KQ-250DE 型医用数控超声机(昆山市超声仪器有限公司); 电子精密天平 JA5002(上海精天电子有限公司); 离心机(上海安亭公司); DGX-9023 鼓风干燥箱(太仓市华利达实验设备有限公司); 索氏提取器(实验室常规仪器); 1 L 烧杯、大试管等。

### 1.2 方法

1.2.1 超声法提取脂类物质 取地鳖虫粉末 2 g 放入大试管中, 加入 20 mL 的有机溶剂浸泡, 分别以浸泡时间、超声时间、超声温度、不同的溶剂为单一因素提取脂类物质, 滤出溶剂, 剩下的残渣放入烘干箱 80 ℃, 10 h 烘干。烘干后称重(确保固体物质完全干燥), 计算提取率, 见公式(1)。含有脂类的有机溶剂汇集到一起, 放入旋转蒸发仪中, 提取脂类物质。

$$\text{脂类}(\%) = \frac{\text{提取出脂类重量}(\text{g})}{\text{样品重}(\text{g})} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 单因素试验 分别以超声时间、超声温度、粉末浸泡时间、不同溶剂进行单因素试验, 最终确定最佳提取工艺。见表 1。

表 1 单因素水平

水平	超声时间/min	超声温度/℃	粉末浸泡时间/h
1	10	20	0
2	20	30	3
3	30	40	6
4	40	50	12
5	50	60	24
6	60	70	48

1.2.3 不同溶剂对提取率的影响 脂类物质不溶于水, 可溶于有机溶剂, 而且有机溶剂的种类不同, 脂类的提取量也不相同。我们用无水乙醚、无水乙醇、正己烷、丙酮 4 种常用的脂类提取溶剂, 用超声法提取地鳖虫的脂类物质, 超声 50 min, 30 ℃ 浸泡 6 h 后提取, 方法同上, 烘干称重计算提取率。

1.2.4 索氏提取与超声提取法的比较 取 5 只试管, 标号, 分别加入地鳖虫粉末 2 g, 无水乙醚 20 mL, 浸泡 6 h, 30 ℃ 超声 50 min。残渣烘干计算提取率。同

时取等量的粉末与无水乙醚, 加入索氏提取器中进行提取, 残渣烘干计算提取率。将两种方法进行比较。

## 2 结果

### 2.1 时间因素

超声时间以 60 min 为上限, 图中可以看出随着超声时间的延长, 脂类提取率逐渐增大, 呈抛物线趋势, 但是, 并不是无限增大的, 超声 40 min 时提取率为最高, 达到 17.23%, 60 min 时提取率反而下降为 13.7%。见图 1。

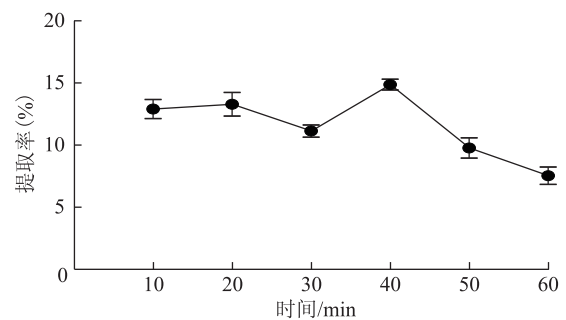


图 1 不同的超声时间对脂类提取率的影响

### 2.2 温度因素

超声时的温度对脂类的提取有着一定的影响, 从图中可看出随着温度的提高提取效率逐渐增大, 超声温度在 50 ℃ 时提取率最高, 达到 15.95%, 随后在温度达到 60 ℃ 时下降到 14.02%, 70 ℃ 时下降到 10% 以下, 可见 60 ℃ 是提取温度的界限。见图 2。

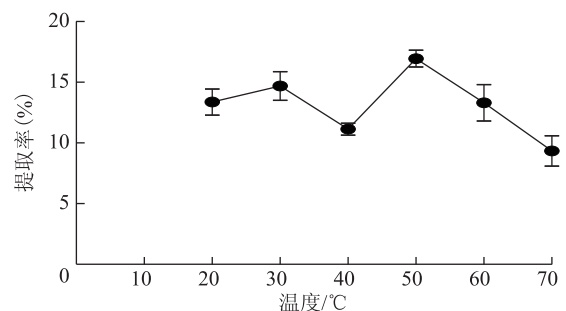


图 2 不同超声温度对脂类提取率的影响

### 2.3 浸泡时间

传统的脂类提取方法中, 对提取物的浸泡是关键步骤, 通常要浸泡 24 h 以上, 时间长、效率低。而效率较高的超声法提取脂类物质对于提取物的浸泡时间也有着条件的限制。图中随着浸泡的时间延长提取率逐渐增大, 浸泡 6 h 时提取率最高, 达到 18.74%。而继续延长浸泡时间(12、24、48 h)对脂类的提取量没有影响。见图 3。

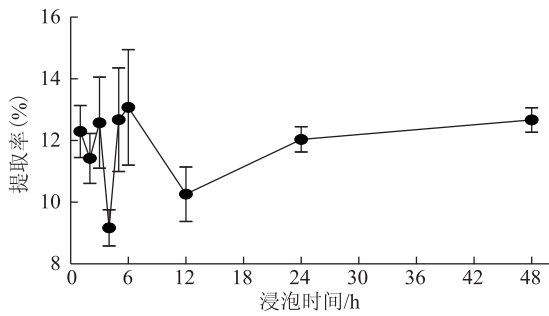


图3 浸泡时间对脂类提取率影响

## 2.4 试剂因素

脂类物质不溶于水，易溶于有机溶剂。我们选择了4种常用的有机溶剂进行脂类的提取，结果见图4。提取率由高到低依次为无水乙醚 > 正己烷 > 丙酮 > 无水乙醇。

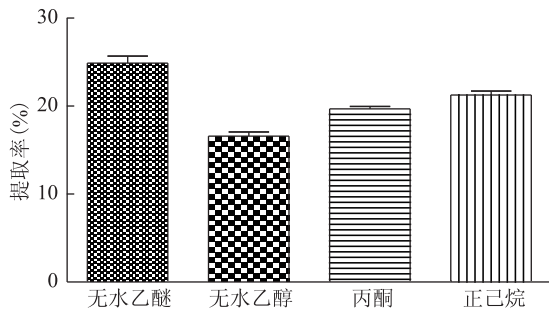


图4 不同有机溶剂对脂类提取率的影响

## 2.5 提取方法的对比

索氏提取法为传统的脂类提取方法，超声法为新型的脂类提取方法。超声法的提取率为18.74%，索氏提取法的提取率为14.78%，将二者进行比较明显可以看出超声法用时短、提取率高，可为后续实验提供依据。见图5。

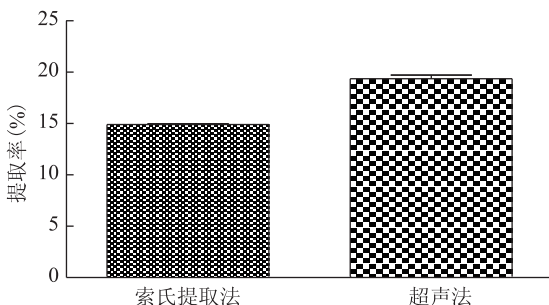


图5 不同提取方法对脂类提取率的影响

## 3 结论

地鳖虫中脂类物质的提取最佳条件为超声法，应用超声法提取时间为40 min、提取温度为50℃，提取前浸泡6 h，浸泡于无水乙醚中。

## 4 讨论

地鳖虫作为传统的中药对肿瘤有着一定的抑制作用，目前对于其纤溶活性蛋白的研究有很多，地鳖虫醇提取物(ESE)蛋白可以抑制人肝癌细胞株HepG2的增值，并促进其凋亡<sup>[4]</sup>。地鳖虫多肽F2-2具有降低血小板聚集率、延长凝血启动时间、降低最大凝固程度以及增加大鼠离体血管环张力的作用<sup>[5]</sup>。目前对于地鳖虫脂类的研究比较少，脂类物质是油、脂肪、类脂的总称。从地鳖虫中提取有效的脂类物质是目前研究的重点。本实验组对地鳖虫脂类的提取及其对肿瘤的抑制作用进行研究，以往的脂类提取方法是索氏提取法，其用时比较长，条件限制比较严格。而超声提取法是目前比较常用的脂类提取的新方法，我们将二者进行比较，发现在其他条件统一的情况下超声法提取脂类物质的提取率为18.74%，索氏提取法提取率为14.78%，见图5。超声波可以使组织中的各类物质通过高频振动和空化作用，使大分子物质分解成容易溶解的小分子物质，有机溶剂可以溶解脂类物质，从而提出。我们用超声法分别对地鳖虫粉末进行脂类提取条件的测定，发现单一条件下，随着超声时间的延长提取效率逐渐增大，40 min为最高，达到17.23%，50 min时降到9.77%，60 min降到更低(见图1)。超声是利用高频率的振动使组织内脂类快速渗出，随着超声时间的延长温度会升高，过高的温度会使脂类挥发，从而降低提取效率，所以在温度条件的检测中，最佳超声温度为50℃，此时提取率最大，见图2，过高的超声频率会增加组织的温度，导致脂类氧化分解，降低提取率。传统的索氏提取需要浸泡提取物质24 h以上，这样可以很好地使有机溶剂与提取物质相互融合，增大提取率，但是有机溶剂会挥发，长时间的浸泡会使提取率降低。超声法所需浸泡时间短，浸泡6 h的提取率达到18.74%，12 h反而下降到10.2%，虽然24 h时又升到了11.8% (见图3)，但因耗时长、提升效率低，不宜采纳。脂类物质不溶于水，溶于有机溶剂，我们采用的4种溶剂中无水乙醚的提取率最高，达到24.23%，最低为无水乙醇17.46% (见图4)。本实验从脂类物质中提取出粗提物，并作用于肿瘤细胞，同时观察其对肿瘤细胞的生物学作用。对于地鳖虫脂类成分的分离，以及对其含量的鉴定将作为后续实验进行。

(下转第571页)

表3 《中华人民共和国药典》法与改进法对3批样品含量测定结果

名称	取样量/mg	定容体积/mL	稀释倍数	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	吸光度	药典法含量(%)	改进法即乘校正因子后的含量(%)
淫羊藿苷	10.16	100	10	10.16	0.365 5		
20141003	33.21	50	50	13.28	0.375 6	78.60	88.03
20141101	34.56	50	50	13.82	0.390 3	78.48	87.90
20150101	35.34	50	50	14.14	0.398 5	78.36	87.77

### 3 结果与讨论

从表1结果可以看出,按照《中华人民共和国药典》2015版淫羊藿总黄酮含量测定方法,以淫羊藿苷为对照品计算混合对照品的含量,仅为91.03%,混合对照品的实际含量应该接近100%,而以朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C为对照品,按照药典方法测定混合对照品的含量,均大于100%。而表2的改进法中分别以朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷为对照品测定的含量,结果分别乘以相应的校正因子,得到混合对照品的含量,除了以朝藿定A为对照的结果外,其他3个对照品计算的含量值都接近100%,与实际结果相符合。因此测定淫羊藿提取物的总黄酮含量,使用药典中淫羊藿苷为对照品时,含量结果应该用改进法乘以校正因子1.12,结果才更加接近真实值。

淫羊藿提取物作为注射用肌萎灵冻干粉的制剂投料中间体,其总黄酮的含量测定准确性对制剂的质量标准有着至关重要的作用。

《中华人民共和国药典》中测定淫羊藿总黄酮的方法主要是针对淫羊藿药材而制定,在朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C含量不高的情况下,误差较小,但是当淫羊藿提取物得到纯化后,朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C含量对总黄酮含量影响很大,按照药典方法以淫羊藿苷为对照品计算误差很大,因为从表2改进法结果可以看出,淫羊藿苷在4个主要成分中分子量最小,比折合分子量值还小,所以药典方法测定淫羊藿总黄酮的值偏低,必须乘以校正

因子进行校正。

用4个对照品进行校正因子折合计算中,除了朝藿定A以外,其余结果均与实际值相符,说明此方法可行,朝藿定A之所以有误差一是它的分子量最大,比折合分子量大很多;二是它在总量中含量很小,二者结合导致计算误差偏大,建议在计算淫羊藿提取物中总黄酮含量时,可以选择朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷为对照品并乘以校正因子。

### 参考文献

- [1] 吴以岭.一种治疗肌肉萎缩及重症肌无力的药物及其制备方法:200410096779.8 [P].2007-12-12.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [3] 孟宪丽,曾南,张艺,等.淫羊藿有效成分对老龄雄性大鼠下丘脑单胺类神经递质及其他脑功能作用的研究[J].中国中药杂志,1996,21(11):683-685.
- [4] 王东芝,李东万,张守刚.淫羊藿在心血管疾病方面的研究进展[J].浙江中医药大学学报,2013,37(1):107-110.
- [5] 赵文昌,宋丽军,温凯航,等.淫羊藿抗骨质疏松症的研究进展[J].中国医药导报,2012,9(25):20-23.
- [6] 钱力,翁文杰,李成荫,等.淫羊藿黄酮类化合物对骨及软骨细胞作用研究进展[J].中国中医基础医学杂志,2012,18(3):347-349.
- [7] 蔡曼玲,季晖,刘悦,等.五种淫羊藿黄酮类成分对体外培养成骨细胞的影响[J].中国药理学通报,2004,21(3):13-14.
- [8] Meng F H, Li Y B, Xiong Z L, et al. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(3): 189-193.

(收稿日期 2016-05-10)

(上接第559页)

### 参考文献

- [1] 王凤霞.中华真地鳖(*Eupolyphaga sinensis*)抗肿瘤蛋白分离纯化及其体外抗转移活性研究[D].济南:山东大学,2013.
- [2] 韩雅莉,曹付春,余磊,等.地鳖纤溶活性蛋白对S180和H22荷瘤小鼠肿瘤的抑制及诱导细胞凋亡作用[J].中国药理学通报,2011,27(10):1387-1391.
- [3] 邹玺,刘宝瑞,钱晓萍,等.土鳖虫脂肪酸乳剂的制备及体内抗肿瘤作用[J].肿瘤,2004,27(4):333-334.
- [4] 葛钢锋,余陈欢,吴巧凤.土鳖虫醇提物对体外肿瘤细胞增殖的抑制作用及其机制研究[J].中华中医药杂志,2013,28(3):826-828.
- [5] 黄镇林,杜清华,王宏涛.土鳖虫多肽F2-2的体外药效研究[J].中医药信息,2014,31(2):4-6.

(收稿日期 2016-03-16)