

10批市售僵蚕商品药材质量评价^Δ

赵建国^{1*},曲伟红¹,余敬谋¹,吕璐¹,张磊¹,谭常丽²(1.九江学院药学与生命科学学院,江西九江 332005; 2.九江学院药学本科2008级,江西九江 332005)

中图分类号 R931.74 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1399-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.28

摘要 目的:采用多指标评价市售僵蚕药材质量状况,为临床合理用药提供参考。方法:按照2015年版《中国药典》(一部)对市售10批僵蚕药材外观性状进行观察,对水分、总灰分含量进行测定,采用傅里叶变换红外光谱法对药材进行鉴别,采用紫外-可见分光光度法和高锰酸钾滴定法分别测定有效成分蛋白质和草酸铵的含量。结果:10批僵蚕的水分含量在2.84%~4.07%之间(RSD<5%,*n*=3),总灰分含量在7.79%~34.32%之间(RSD<5%,*n*=3);紫外和红外光谱图基本相似,均能反映出蛋白质多肽类物质的特征峰;蛋白质含量在29.87%~57.19%之间(RSD<0.5%,*n*=3),草酸铵含量在0.27%~4.77%之间(RSD<5%,*n*=3)。结论:10批市售僵蚕均为正品且为炮制品;水分含量符合2015年版《中国药典》(一部)规定,但总灰分含量未达其要求;其主要成分为蛋白质多肽类物质,但有效组分蛋白质多肽与草酸铵含量差异较大。

关键词 僵蚕;傅里叶变换红外光谱法;蛋白质;草酸铵

Quality Evaluation of 10 Batches of *Bombyx batryticatus* Medicinal Materials in the Market
ZHAO Jianguo¹, QU Weihong¹, YU Jinmou¹, LYU Lu¹, ZHANG Lei¹, TAN Changli²(1.College of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiangxi Jiujiang 332005, China; 2.Grade 2008, Pharmacy Undergraduate, Jiujiang University, Jiangxi Jiujiang 332005, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the quality of *Bombyx batryticatus* medicinal materials in the market by multi-index, and provide reference for clinical rational drug use. METHODS: Referring to the *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, part 1), the appearance characters of samples were observed, moisture and the total ash were detected, Fourier transform infrared spectroscopy was adopted to identify the medicinal materials, UV-Visible spectrophotometry and potassium permanganate titration were respectively used to determine the contents of active ingredient protein and ammonium oxalate. RESULTS: The moisture ranged in 2.84%-4.07% (RSD<5%, *n*=3), total ash in 7.79%-34.32% (RSD<5%, *n*=3), UV and FTIR spectra were basically similar, and both can reflect the characteristic peaks of protein peptides. Protein content ranged in 29.87%-57.19% (RSD<0.5%, *n*=3), ammonium oxalate content in 0.27%-4.77% (RSD<5%, *n*=3). CONCLUSIONS: The 10 batches of samples are authentic and processed products, moisture fits the requirement in pharmacopoeia while total ash does not; and the main ingredient is protein peptides. However, effective protein polypeptide content shows great differences as well as ammonium oxalate.

KEYWORDS *Bombyx batryticatus*; Fourier transform infrared spectroscopy; Protein; Ammonium oxalate

僵蚕(*Bombyx batryticatus*)为蚕蛾科昆虫家蚕(*Bombyx mori* Linnaeus)4~5龄的幼虫感染(或人工接种)白僵菌[*Beauveria bassiana*(Bals.) Vuillant]而致死的干燥体,具有息风止痉、祛风止痛、化痰散结之功效,广泛用于高温惊厥、癫痫、抽搐、血管神经性头痛、咳嗽、哮喘等症的治疗^[1]。现代研究表明,僵蚕具有抗凝、抗惊厥、抗癌、抗氧化等多种药理作用^[2-5]。僵蚕化学成分有蛋白质多肽类如白僵菌素、环(*D*-脯-*D*-缬)二肽、环(*S*-脯-*R*-亮)二肽、环(*D*-脯-*D*-异亮)二肽、环(*D*-脯-*D*-苯丙)二肽等^[6],黄酮类^[7],多糖类^[8],有机酸类如草酸铵、枸橼酸铵、脂肪

酸、棕榈酸、赤藓酸等^[9],甾类如豆甾醇-7,22-二烯-3 β ,5 α ,6 α -三醇、 β -谷甾醇和甾体-11 α -羟基化合物等^[9],维生素及18种微量元素等。僵蚕中主要化学成分是蛋白质,含量约为50%,用酸水解法测得僵蚕中含有17种氨基酸残基,其中甘氨酸含量最高,其次为丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸、谷氨酸等^[10]。2015年版《中国药典》(一部)^[11]仅从性状、鉴别、水分、总灰分与醇浸出物的含量等项目对其质量进行分析,并未明确规定有效成分及其含量。

僵蚕为临床常用的一味动物类中药,其抗惊厥的主要成分是草酸铵^[11]和白僵菌素^[3],其抗凝、抗血栓药效组分主要为蛋白质多肽类和草酸铵^[12-13]。本研究拟采用定性指标(药材的性状与光谱特征)、杂质的量(水分与总灰分)和定量指标(蛋白质多肽类和草酸铵含量),对从九江市药店购买的10批僵蚕样品进行质量分析与评价,

^Δ 基金项目:江西省卫生计生委中医药科研课题(No.2014A119);九江学院校级科研课题(No.KJ201008)
* 副教授,硕士。研究方向:中药质量标准。E-mail: zhao-jg10000@163.com

为僵蚕的安全、有效应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

TENSOR27 傅里叶变换红外分光光度计,包括DTGS检测器、OPUS 5.5红外分析软件(德国布鲁克公司);UV-1901紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);BA300电子显微镜[麦克奥迪(厦门)电气股份有限公司];BT423S电子天平(德国赛多利斯集团)。

1.2 药材与试剂

僵蚕样品(购于九江市10家药店,样品批号和产地详见表1);溴化钾为光谱纯,高锰酸钾、草酸钠、浓硫酸、氯化钙等均为分析纯。

表1 僵蚕样品的批号与产地

Tab 1 Batch numbers and origins of *B. batryticatus* samples

样品编号	批号	产地
1	110624	湖南
2	091201	浙江
3	20091201	江西
4	101124	湖南
5	101024	安徽
6	1006001	安徽
7	100320	江西
8	20090601	江西
9	1008247	江西
10	011111	安徽

2 方法

2.1 样品粉末与提取液的制备

僵蚕样品粉碎成粗粉,过二号筛,备用。分别称取样品粉末约10 g,精密称定,用8倍量的蒸馏水在常温下超声(功率:1 000 W)提取2次,每次30 min,合并滤液后用蒸馏水定容至250 mL量瓶中,即得僵蚕提取液,备用。

2.2 性状观察

根据2015年版《中国药典》(一部)规定,直接取僵蚕样品进行性状鉴别。

2.3 水分测定

按2015年版《中国药典》(四部)中0832水分测定法中的第二法(烘干法)测定。具体操作如下:取僵蚕粉末2~5 g,共3份,平铺于干燥至恒质量的扁形称量瓶中,厚度不超过5 mm,精密称定,开启瓶盖在100~105℃干燥5 h,将瓶盖盖好,移至干燥器中,放冷30 min,精密称定;再在上述温度干燥1 h,放冷,称取质量,至连续2次称取的质量差异不超过5 mg为止。根据减失的质量计算含水量(%)。含水量(%)=(干燥前质量-干燥后质量)/干燥前质量×100%。2015年版《中国药典》(一部)规定含水量不超过14%为合格。

2.4 总灰分测定

按2015年版《中国药典》(四部)中2302灰分测定法测定。具体操作如下:取僵蚕粉末3 g,共3份,置炽灼至恒质量的坩埚中,称定质量(准确至0.001 g),于电炉上进行炭化,至炭化完全随即冷却后,转移至马弗炉中,

逐渐升温至600℃,使完全灰化,降温至200℃后从炉中取出放入干燥器中冷却至恒质量,称定并计算其总灰分含量(%)。总灰分含量(%)=(灼烧前质量-灼烧后质量)/灼烧前质量×100%。2015年版《中国药典》(一部)规定灰分不超过6%为合格。

2.5 红外光谱测定

采用溴化钾压片的傅里叶变换红外光谱法测定。称取适量经105℃恒温干燥的样品粉末,与溴化钾粉末按比例(1:150, m/m)充分混匀,于玛瑙研钵中研磨,用粉末压片机压制成半透明溴化钾晶片,在4 000~400 cm⁻¹范围内进行扫描(分辨率为2 cm⁻¹,扫描次数32次),得到红外光谱图。采用OPUS 5.5红外分析软件对光谱图进行基线校正和归一化叠加处理。

2.6 蛋白质含量测定

采用紫外-可见分光光度法测定。精密量取“2.1”项下僵蚕提取液1 mL,共3份,置于50 mL量瓶中,加蒸馏水定容,于200~400 nm波长范围内扫描,记录光谱图和260 nm、280 nm波长处的吸光度值(记为A₂₆₀、A₂₈₀)。其中,蛋白质质量浓度(mg/mL)=1.45A₂₈₀-0.74A₂₆₀;蛋白质质量含量(%)=(蛋白质质量浓度×溶液体积×稀释倍数)/(僵蚕粉末质量×1 000)×100%。

2.7 草酸铵含量测定

采用高锰酸钾滴定法^[8]测定。精密量取“2.1”项下僵蚕提取液6 mL,共3份,置于10 mL离心试管中,加2 mL蒸馏水,于75℃水浴中滴加氯化钙溶液(0.25 mol/L)3 mL,使草酸钙完全沉淀,放冷,离心(离心半径为6 cm,2 000 r/min,下同)20 min。加约8 mL蒸馏水洗涤1次后离心20 min,用吸管吸去上清液,沉淀用1 mol/L的硫酸15 mL溶解后转移至250 mL锥形瓶中。用0.2 mmol/L的高锰酸钾标准溶液滴定,溶液由无色变为浅红色即为滴定终点。根据消耗高锰酸钾标准溶液的体积计算出草酸铵含量(草酸根88.1%以草酸铵形态存在,11.9%以其他阳离子盐形态存在)。草酸铵含量(%)=(5×6 mL僵蚕提取消耗的高锰酸钾体积×高锰酸钾滴定液的浓度×草酸铵的摩尔质量×250×0.881)/(2×6×僵蚕粉末的质量)×100%。

3 结果

3.1 性状观察结果

所有僵蚕样品均略呈圆柱形,多弯曲皱缩,长2~5 cm,直径0.5~0.7 cm。表面灰黄色,被有白色粉霜状的气生菌丝和分生孢子。其中,3、6、10号样品表面的石灰粉覆盖较明显,10号样品可见明显虫眼,详见图1。僵蚕头部较圆,足8对,体节明显,尾部略呈二分歧状。质硬而脆,易折断,断面平坦,外层白色,中间有亮棕色或亮黑色的丝腺环4个,气微腥,味微咸。

3.2 水分与总灰分测定结果

10批僵蚕样品的水分、总灰分含量分别在2.84%~4.07%、7.79%~34.32%之间,RSD分别在0.67%~3.97%(n=3)、0.19%~2.90%(n=3)之间,详见表2。

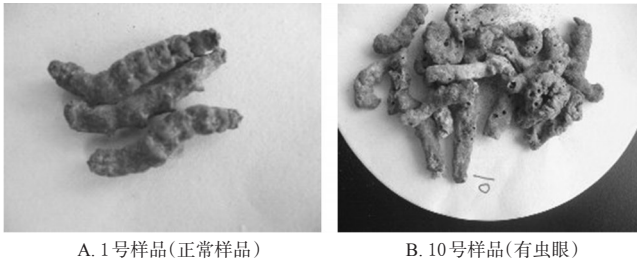


图1 僵蚕的外观性状

Fig 1 Appearance characters of *B. batryticatus* samples

表2 僵蚕水分、总灰分测定结果($n=3, \%$)

Tab 2 Determination results of moisture and total ash in *B. batryticatus* samples($n=3, \%$)

编号	水分		总灰分	
	平均值	RSD	平均值	RSD
1	4.07	0.85	8.17	1.28
2	2.92	2.72	19.79	1.25
3	3.44	3.97	30.67	2.90
4	3.02	2.83	14.14	0.70
5	2.98	0.67	25.75	0.59
6	3.24	1.25	43.32	2.39
7	3.68	2.33	7.79	0.19
8	3.58	0.84	12.17	0.95
9	2.84	2.23	26.15	0.82
10	3.00	1.66	34.32	0.08
$\bar{x} \pm s$	3.28 ± 0.4028		22.12 ± 11.84	

3.3 红外光谱测定结果

10批僵蚕样品的红外光谱图相似,其中在 $4\ 000 \sim 1\ 250\text{ cm}^{-1}$ 范围内共有峰6个,分别为 $3\ 450 \sim 3\ 200$ 、 $1\ 644$ 、 $1\ 533$ 、 $2\ 925$ 、 $2\ 855$ 、 $1\ 445\text{ cm}^{-1}$ 。指纹区 $1\ 250 \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 范围稍有差异,详见图2。

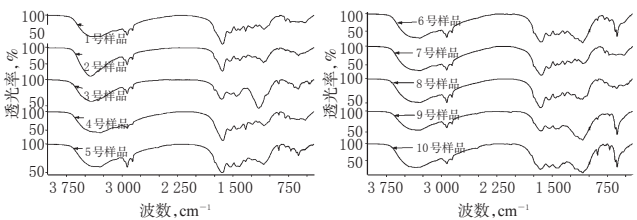


图2 10批僵蚕样品的红外光谱图

Fig 2 FTIR spectra of 10 batches of *B. batryticatus* samples

3.4 蛋白质与草酸铵测定结果

10批僵蚕样品在 $200 \sim 400\text{ nm}$ 波长范围内紫外吸收光谱相似,均有2个最大吸收峰,分别为 $210 \sim 220$ 、 $260 \sim 280\text{ nm}$,详见图3。10批僵蚕样品蛋白质与草酸铵含量分别在 $29.87\% \sim 57.19\%$ 、 $0.27\% \sim 4.77\%$ 之间,RSD分别为 $0.02\% \sim 0.10\%$ ($n=3$)、 $0.54\% \sim 4.55\%$ ($n=3$)。其中,10号样品蛋白质含量最高,7号样品蛋白质含量最低;1号样品草酸铵的含量最高,而3号样品草酸铵的含量最低,详见表3。

4 讨论

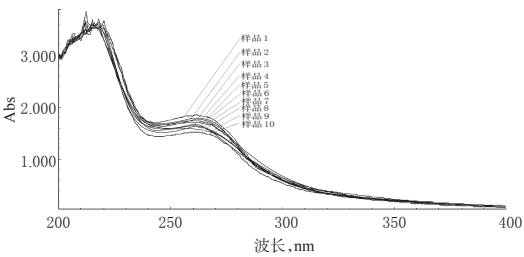


图3 10批僵蚕样品的紫外吸收光谱图

Fig 3 UV-Vis spectra of 10 batches of *B. batryticatus* samples

表3 10批僵蚕样品蛋白质与草酸铵含量测定结果($n=3, \%$)

Tab 3 Determination results of proteins and ammonium oxalate in 10 batches of *B. batryticatus* samples($n=3, \%$)

编号	蛋白质含量		草酸铵含量	
	平均值	RSD	平均值	RSD
1	36.12	0.06	4.77	0.62
2	41.08	0.10	0.64	4.23
3	41.10	0.02	0.27	5.11
4	37.09	0.04	3.71	0.54
5	47.16	0.04	0.62	4.55
6	33.30	0.04	1.44	1.83
7	29.87	0.07	4.54	0.99
8	33.29	0.05	1.52	2.43
9	43.10	0.02	0.42	1.13
10	57.19	0.03	0.31	1.13
$\bar{x} \pm s$	39.93 ± 7.99		1.82 ± 1.80	

本次检验所分析药材的性状符合2015年版《中国药典》(一部)对僵蚕性状的描述,判断均为正品且为炮制品。10号样品可见明显的虫眼且中空,外观质量较差。僵蚕样品的水分含量在 $2.84 \sim 4.07\%$ 之间,低于2015年版《中国药典》(一部)标准 14% ,符合规定。而总灰分含量在 $7.79\% \sim 34.32\%$ 之间,高于2015年版《中国药典》(一部)标准 6% ,不符合规定。总灰分含量高可能与僵蚕原药材中添加了较多的石灰粉有关。

10批僵蚕样品的红外光谱图在 $4\ 000 \sim 1\ 250\text{ cm}^{-1}$ 范围内共有峰6个,其中 $3\ 450 \sim 3\ 200\text{ cm}^{-1}$ 是N—H、O—H伸缩振动峰, $1\ 644\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 533\text{ cm}^{-1}$ 是蛋白质酰胺I带C=O的伸缩振动峰和酰胺II带N—H的弯曲振动和C—N的振动峰, $2\ 925\text{ cm}^{-1}$ 、 $2\ 855\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 445\text{ cm}^{-1}$ 是 CH_3 、 CH_2 的吸收峰,结果与僵蚕的主成分是蛋白质的结果相符^[14]。10批药材在 $200 \sim 400\text{ nm}$ 波长范围内有2个最大吸收峰,其中 $210 \sim 220\text{ nm}$ 是肽键的特征吸收, $260 \sim 280\text{ nm}$ 是色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等氨基酸残基的吸收峰。根据红外光谱法和紫外光谱法结果,判断僵蚕的主要化学成分是蛋白质多肽类物质。

以上结果表明,市售僵蚕基本上是正品且为炮制品,其主成分为蛋白质多肽类物质,含量在 $29.87\% \sim 57.19\%$ 之间,草酸铵的含量在 $0.27\% \sim 4.77\%$ 之间,质

圆二色光谱在中药小分子与生物大分子相互作用中应用的研究进展^Δ

徐 飞^{1*},于 慧²,陆 彩¹,陈 军¹,谷 巍¹,吴启南¹(1.南京中医药大学药学院,南京 210046;2.江苏省中医院血液科,南京 210029)

中图分类号 R913 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1402-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.29

摘 要 目的:为不同类型中药小分子体外筛选及设计合成改造提供参考。方法:以“圆二色光谱”“中药小分子与DNA”“中药小分子与蛋白质”“Circular dichroism”“Interaction of traditional Chinese medicine and DNA”“Interaction of traditional Chinese medicine and protein”等为关键词,组合查询2005年1月—2016年4月在PubMed、Web of Science、Wiley Online Library、SpringerLink、中国知网、万方、维普等数据库中的相关文献,对圆二色光谱(CD)在中药小分子与DNA、中药小分子与蛋白质相互作用中的应用进行综述。结果与结论:共检索到相关文献349篇,其中有效文献54篇。生物碱、黄酮类、醌类、苯丙素类、植物色素等类型的中药小分子,与DNA相互作用以沟槽结合和嵌插结合2种模式为主;苯丙素类、黄酮类、萜类、生物碱、醌类等类型的中药小分子,与蛋白质结合后,通常使其 α -螺旋、 β -转角和无规则卷曲等二级结构发生改变。后续进行诱导圆二色谱的探索性研究,可得到更多两者相互作用的结合信息,如中药小分子与DNA的结合序列及与蛋白质的结合位点;还可将CD与紫外-可见吸收光谱法、荧光光谱、分子模拟等技术联用,以实现多种技术互为验证、互为补充。

关键词 圆二色光谱;中药小分子与DNA;中药小分子与蛋白质;相互作用

圆二色光谱(CD)是一种利用平面偏振光研究生物大分子结构的快速、简单、准确的方法^[1],对生物大分子

二级及三级结构的变化十分敏感,可检测其微小变动,且具高选择性。近年来,CD在中药小分子与生物大分

量差异较大,这可能与药材的炮制方法不同有关。僵蚕质量主要存在两个问题:一是原药材中掺入较多的石灰粉以增加质量;二是有效组分蛋白质多肽与草酸铵含量差异较大。草酸铵和蛋白质含量反映药理作用强弱,可作为评价其质量的指标之一。本文为僵蚕的定性鉴定和定量测定提供了依据,同时为主成分为蛋白质多肽类物质的动物药材的质量评价提供了参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:593.
- [2] 雷田香,彭延古,郝晓元,等.僵蚕抗凝作用的研究进展[J].湖南中医学院学报,2007,27(3):76-77.
- [3] 郭晓恒,吴用彦,宋登敏,等.僵蚕氯仿部位的分离纯化及其抗惊厥活性[J].中国医药工业杂志,2014,45(5):431-433.
- [4] 程杏安,蒋旭红,刘展眉,等.僵蚕7种化学成分抗肿瘤活性的初步研究[J].仲恺农业工程学院学报,2015,28(4):

35-39.

- [5] 徐冲,商思阳,刘梅,等.僵蚕化学成分和药理活性的研究进展[J].中国药房,2014,25(39):3732-3734.
- [6] 黄居敏,邓华勇,蔡英,等.白僵蚕化学成分研究[J].中草药,2015,46(16):2377-2380.
- [7] 黄居敏,张亚梅,李旸,等.僵蚕中总黄酮提取工艺研究[J].安徽农业科学,2015,43(34):154-157.
- [8] 邢东旭,廖森泰,罗国庆,等.白僵蚕多糖的提取工艺条件优化及抗氧化活性测定[J].蚕业科学,2015,41(6):1088-1093.
- [9] 程锁明,翟银成,薛芳,等.僵蚕化学成分的研究[J].中草药,2015,46(24):3630-3636.
- [10] 赵建国,彭新君,曾序求.僵蚕提取物中氨基酸种类与含量测定[J].九江医学,2008,23(1):1-2.
- [11] 严铸云,李晓华,陈新,等.僵蚕抗惊厥活性部位的初步研究[J].时珍国医国药,2006,17(5):696-697.
- [12] 赵建国,彭新君,彭延古,等.草酸铵对僵蚕抗凝作用的影响[J].时珍国医国药,2005,16(6):468-469.
- [13] 彭新君,赵建国,徐爱良,等.僵蚕抗凝活性及其成分的分析[J].湖南中医学院学报,2005,25(1):1-2,22.
- [14] 冀宪领,盖英萍,牟志美,等.白僵蚕的红外指纹图谱鉴别研究[J].光谱学与光谱分析,2007,27(1):66-69.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81303173, No. 81173483);江苏省自然科学基金面上项目(No.BK20161576);江苏省高校自然科学研究面上项目(No.14KJB360001);江苏高校品牌专业建设工程资助项目(No.PPZY2015A070)

* 副教授,硕士生导师。研究方向:中药药效物质的化学生物学研究。电话:025-85811520。E-mail:6612386@qq.com

(收稿日期:2016-04-26 修回日期:2016-09-29)

(编辑:刘明伟)