

水提取和半仿生提取盒果藤中7种微量元素的形态分析比较^Δ

轩辕欢^{1*},董文杰¹,刘冲^{2#},霍仕霞³(1.新疆医科大学附属中医医院药学部,乌鲁木齐 830002;2.新疆维吾尔自治区药物研究所,乌鲁木齐 830004;3.新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所,乌鲁木齐 830049)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)22-3072-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.22.13

摘要 目的:研究水提取和半仿生提取后盒果藤中与抗白癜风有关的元素提取率及存在形态。方法:分别采用水提法和半仿生提取法。用微孔滤膜分离盒果藤提取液中的可溶态与悬浮态元素;大孔树脂分离可溶态中有机态和无机态微量元素;火焰原子吸收光谱法测定盒果藤中铜、锌、铁、钙、镁、锰、镉7种元素的含量并进行形态分析。结果:水提后,盒果藤中7种微量元素的提取率为40.47%~72.49%;悬浮颗粒比例为3.69%~8.78%;镉元素可溶态中有机态/无机态比例为104.36%,铜、锌、铁、钙、镁、锰可溶态中有机态/无机态比例为3.94%~48.39%。半仿生提取后,除锰元素外,盒果藤中微量元素提取率均高于水提法,铜、锌、铁、钙、镁、镉的提取率为77.69%~90.19%;各元素悬浮颗粒比例为0.39%~8.57%;可溶态中有机态/无机态比例为72.74%~180.79%。结论:盒果藤中铜、锌、铁、钙、镁、锰、镉等元素较易溶出,且溶出后主要以无机态形式存在。半仿生提取后,除锰元素外,其他元素溶出率均显著上升,且溶出后微量元素的有机态比例显著提高,微量元素的溶出和有效利用率均高于水提法。

关键词 盒果藤;水提取;半仿生提取;微量元素;火焰原子吸收光谱法;形态分析

抗血管生成的作用等^[7-8]。本研究分别通过体外试验、体内实验发现,桑黄多糖具有明显的抗肿瘤作用。

近年来研究发现,PTEN是继p53之后又一抑癌基因,越来越多的研究显示PTEN参与多种信号通路的传导,其通过抑制肿瘤生长、诱导细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用,PTEN失表达是肿瘤发生的标志之一^[9-11]。C-myc基因是较早发现的一组癌基因,C-myc的扩增与肿瘤发生和转归密切相关,亦可作为验证抗肿瘤药物发挥抗肿瘤作用的一个检测指标^[12]。因此,探索桑黄多糖对PTEN与C-myc基因表达的影响对于从基因水平探索其抗肿瘤机制具有重要的意义。本研究发现,与对照组比较,桑黄多糖高、中、低剂量组均能明显上调PTEN基因表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$),亦能明显下调C-myc基因表达($P<0.05$),提示桑黄多糖通过影响PTEN与C-myc基因表达水平发挥其抗肿瘤作用。

本研究为桑黄多糖抗肿瘤机制的进一步探索奠定了基础,为促进桑黄的研发利用提供了重要参考价值。

参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:2784.
- [2] 张敏,纪晓光,贝祝春,等. 桑黄多糖抗肿瘤作用[J]. 中药药理与临床,2006,22(3/4):56-58.
- [3] 张万国,胡晋红,蔡溱,等. 桑黄对四氯化碳致大鼠肝损伤

的保护作用[J]. 中国药房,2003,14(5):267-269.

- [4] 洪海,金光日,金光玉,等. 桑黄多糖对肥大细胞脱颗粒的机制[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(18):1532-1534.
- [5] 胡启明,梅余霞,梁运祥. 桑黄多糖体外免疫活性研究[J]. 食品科技,2013,38(9):142-145.
- [6] 吕方冰,张娜,俞淑文. 桑黄多糖抗肿瘤机制研究进展[J]. 上海中医药杂志,2015,49(9):87-89.
- [7] 赵澜. 桑黄多糖的抗肿瘤及抗血管生成作用[D]. 上海:华东师范大学,2007.
- [8] 王华林,温万芬. 桑黄的药用价值研究进展[J]. 时珍国医国药,2015,26(11):2747-2750.
- [9] Ye YT, Zhong W, Sun P, et al. Apoptosis induced by the methanol extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in non-small cell lung cancer through PTEN-mediated inhibition of PI3K/Akt pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.jep.2016.12.051.
- [10] Egawa H, Jingushi K, Hirono T, et al. The miR-130 family promotes cell migration and invasion in bladder cancer through FAK and Akt phosphorylation by regulating PTEN[J]. *Sci Rep*, 2016, doi:10.1038/srep20574.
- [11] Ebbesen SH, Scaltriti M, Bialucha CU, et al. Pten loss promotes MAPK pathway dependency in HER2/neu breast carcinomas[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(11):3030-3035.
- [12] Khaleghian M, Shakoori A, Razavi AE, et al. Relationship of amplification and expression of the C-MYC gene with survival among gastric cancer patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(16):7061-7069.

^Δ 基金项目:新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(No.2016B03038-3-3);新疆维吾尔自治区科技人才培养项目(No.qn2015yx042)

* 主管中药师。研究方向:中药学。电话:0991-6642410。E-mail:huoshixia1983@163.com

通信作者:副研究员,硕士。研究方向:药物分析。电话:0991-6642410。E-mail:273932681@qq.com

(收稿日期:2017-03-24 修回日期:2017-05-25)

(编辑:邹丽娟)

Comparison of Speciation Analysis of 7 Trace Elements in *Opercalina turperthum* by Water Extraction and Semi-bionic Extraction

XUANYUAN Huan¹, DONG Wenjie¹, LIU Chong², HUO Shixia³ (1. Dept. of Pharmacy, Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China; 2. Materia Medica Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830004, China; 3. Uighur Medicine Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830049, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the extraction rate and speciation of antivittiligo-related elements in *Opercalina turperthum* by water extraction and semi-bionic extraction. METHODS: Water extraction and semi-bionic extraction were respectively used. Water-soluble state and suspension state in extract of *O. turperthum* were separated by microporous filtering film; organic and inorganic trace elements in water-soluble state were separated by macroporous resin. The contents of Cu, Zn, Fe, Ca, Mg, Mn and Sr were detected by flame atomic adsorption spectrophotometry, and speciation analysis was conducted. RESULTS: After water extraction, extraction rates of 7 trace elements were 40.47%-72.49%; ratio of suspended particles was 3.69%-8.78%; ratio of organic state/inorganic state was 104.36% in water-soluble state of Sr and 3.94%-48.39% in water-soluble state of Cu, Zn, Fe, Ca, Mg, Mn. After semi-bionic extraction, except for Mn, extraction rates of trace elements were higher than water extraction, extraction rates of Cu, Zn, Fe, Ca, Mg, Sr were 77.69%-90.19%; ratio of suspended particles was 0.39%-8.57%; the ratio of organic state/inorganic state was 72.74%-180.79% in water-soluble state of elements. CONCLUSIONS: Cu, Zn, Fe, Ca, Mg, Mn and Sr in *O. turperthum* are dissolved easily, mainly existing in the form of inorganic state. After semi-bionic extraction, except for Mn, the dissolution rate of other elements and the proportion of organic trace elements after dissolution increase significantly. Both dissolution and effective utilization rate of trace elements by semi-bionic extraction are higher than water extraction.

KEYWORDS *Opercalina turperthum*; Water extraction; Semi-bionic extraction; Trace element; Flame atomic absorption spectrophotometry; Speciation analysis

盒果藤(*Opercalina turperthum* L.)为维吾尔医常用药材,维吾尔医认为盒果藤具有燥湿作用,能排出体内湿寒性物质,也能排出体内黏稠性的津液和灼烧津液(腐败津液),常用于治疗白癜风^[1]。目前,关于盒果藤化学成分及药理药效方面的研究较少。笔者前期对盒果藤中与白癜风相关的微量元素进行了测定,结果发现盒果藤中除含有丰富的钙(Ca)、镁(Mg)等常量元素外,还含有铁(Fe)、铜(Cu)、锌(Zn)、锰(Mn)、锶(Sr)等微量元素^[2]。但是,这些微量元素的生物可利用度与其化学形态有很大关系。近年来,微量元素化学形态分析日益受到人们的关注,对中药活性成分的认识也不仅局限于微量元素的总量,还在于微量元素在中药不同的存在状态。有机态的微量元素易络合,可增强生物活性,提高微量元素的利用率,从而提高药效。Cu²⁺是形成酪氨酸酶的重要辅基离子;某些递氢的氧化酶中均含有Zn²⁺, Zn²⁺减少可能导致色素形成障碍;Fe、Ca、Mg参与机体正常生理功能,构成体内重要的载体、参与电子传递,对黑素的合成、转运有着至关重要的作用;Sr参与黑素合成和转运;Mn具有较强的清除自由基作用。而这些元素均以有机态的形式发挥生物活性,同时有机态的元素也易与植物中的化合物形成络合物,易于溶出而被机体吸收。因此,在本研究中笔者对盒果藤中的Cu、Zn、Fe、Ca、Mg、Mn、Sr 7种元素进行形态分析,比较了水提和半仿生提取后这7种元素的提取率、浸留颗粒吸附率,为其抗白癜风药效物质基础的研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

TAS-990型原子吸收分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);ML-1.5-4型可调式电热板(北京永光明医疗仪器厂);DHG-9123型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏试验设备有限公司);Cu、Zn、Fe、Ca、Mg、Mn、Sr空心阴极灯(上海威格拉斯仪器有限公司)。

1.2 药材与试剂

单元素标准液:Cu(批号:GBW08615)、Zn(批号:GBW08620)、Fe(批号:GBW08616)、Ca(批号:GBW080118)、Mg(批号:GBW080126)、Mn(批号:GBW080157)、Sr(批号:GBW080565)均购自国家标准物质研究中心(质量浓度均为1 000 μg/mL);LSA-10大孔吸附树脂(西安蓝晓科技有限公司);盒果藤购自新疆维吾尔自治区维吾尔医医院,经该院药剂科艾尼瓦尔主任药师鉴定为真品;硝酸、高氯酸均为优级纯;水为二次去离子水。

2 方法与结果

2.1 标准系列工作液的制备

分别精密移取Cu、Zn、Fe、Ca、Mg、Mn、Sr标准液10 mL置于100 mL量瓶中,0.1%硝酸定容,作为各元素标准贮备液。分别精密移取Cu、Zn、Mn、Sr贮备液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,Fe、Ca贮备液0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL,Mg贮备液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL,置于100 mL量瓶中,0.1%硝酸定容,即配制成Cu、Zn、Mn、Sr质量浓度

为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列工作液,Fe、Ca质量浓度为0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列工作液,Mg质量浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列工作液。

2.2 仪器工作条件

参考文献[3-7],采用火焰原子吸收光谱法。原子吸收分光光度计工作条件见表1^[3-7]。

表1 各元素所用原子吸收分光光度计工作条件

Tab 1 Working conditions of flame atomic absorption spectrophotometry for each element

元素	燃气流量, mL/min	灯电流, mA	狭缝宽度, nm	积分时间, s	采样延时, s
Cu	2 000	2	0.4	2	2
Zn	1 400	2	0.4	2	2
Fe	2 200	4	0.2	1	1
Ca	1 900	3	0.1	2	3
Mg	1 900	2	0.4	1	2
Mn	1 500	3	0.4	4	4
Sr	1 900	1	0.4	1	1

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 以各元素标准液的质量浓度为横坐标(x)、吸光度值为纵坐标(y)进行线性回归,结果见表2。

表2 各元素标准曲线

Tab 2 Linear relationship of each element

元素	线性方程	r
Cu	$y=0.139 6x+0.001 2$	0.999 9
Zn	$y=0.343 4x+0.008 1$	0.997 6
Fe	$y=0.058 1x+0.006 1$	0.999 1
Ca	$y=0.019 4x+0.003 6$	0.997 2
Mg	$y=0.885 5x+0.017 9$	0.997 1
Mn	$y=0.040 9x-0.009 4$	0.999 2
Sr	$y=50.852 0x-0.021 1$	0.998 4

2.3.2 精密度试验 在规定的条件下,分别对各元素中间浓度的标准工作液连续测定6次,计算RSD分别为Cu 0.90%、Zn 1.10%、Fe 0.76%、Ca 0.62%、Mg 0.79%、Mn 0.89%、Sr 0.43% ($n=6$)。各元素测定结果的精密度均符合分析要求。

2.3.3 准确度试验 精密称定盒果藤粉末0.5 g,共9份,分别加入3个不同体积的标准贮备液(Cu 0.32、0.40、0.64 mL; Zn、Mg 0.8、1.0、1.2 mL; Mn 1.2、1.5、1.8 mL; Fe 0.72、0.90、1.20 mL; Ca 3.6、4.5、5.4 mL; Sr 2.4、3.0、3.6 mL),按“2.4”项下方法处理后,按表1工作条件测定,进行回收率试验。结果7种元素的平均加样回收率为98.92%~100.96% ($RSD \leq 10\%$, $n=9$),表明该方法准确、可行。

2.4 盒果藤中微量元素总含量的测定

将盒果藤药材粉碎后过80目药筛,精密称取0.5 g于高脚烧杯中,共3份,依次加入浓硝酸25 mL、高氯酸0.5 mL,盖上表面皿,冷浸过夜。次日于电热板上加热消解,保持液体呈微沸状态,直至变成无色透明液体,再继续加热,待蒸发至近干为止。冷却后,用少量去离子

水冲洗,转移定容至10 mL比色管中,备用。同时按相同方法制备空白溶液(不加样品处理)作为对照^[8]。盒果藤中各元素总含量测定结果见表3。

表3 盒果藤中微量元素测定结果($\mu\text{g/g}$)

Tab 3 Determination results of speciation analysis of trace elements in *O. turperthum* ($\mu\text{g/g}$)

指标	Cu	Zn	Fe	Ca	Mg	Mn	Sr
总含量	8.13	21.30	189.04	8 942.16	2 189.12	28.02	66.51
水提液	5.01	15.44	87.26	5 365.60	1 489.23	11.34	42.49
水提可溶态	4.52	14.21	80.20	4 930.02	1 388.49	9.09	38.41
水提悬浮态	0.55	1.07	6.97	446.10	89.88	2.46	3.87
水提可溶有机态	1.40	1.87	21.00	1 559.20	354.43	0.35	18.19
水提可溶无机态	3.12	12.08	54.50	3 221.99	982.11	8.89	17.43
半仿生液	6.81	19.21	161.54	7 660.03	1 858.32	12.04	51.67
半仿生可溶态	6.65	17.32	155.05	7 013.45	1 605.43	11.88	49.44
半仿生悬浮态	0.09	0.98	5.08	545.30	187.65	0.11	1.18
半仿生可溶有机态	2.98	7.44	100.23	3 376.22	1 019.45	4.99	30.87
半仿生可溶无机态	3.33	9.01	55.44	3 411.90	522.10	6.86	17.30

2.5 盒果藤中微量元素的提取与测定

2.5.1 水提取 将盒果藤药材粉碎后,过40目药筛,准确称取100 g,加500 mL去离子水浸泡1 h后,加热煮沸。冷却后,用300目纱布过滤,再加适量去离子水淋洗3~4次,共煎煮3次,每次1 h,合并滤液,浓缩后定容至100 mL量瓶中。离心(离心半径为40 cm,转速为10 000 r/min,下同)30 min,取离心液用0.45 μm 滤膜过滤,滤液中的微量元素为可溶态,滤渣中的微量元素为悬浮态^[9-10]。水提液可溶态和悬浮态中7种微量元素的含量测定结果见表3。

2.5.2 半仿生提取 准确称取盒果藤粉末100 g,水煎煮3次,每次的煎煮水溶液调节pH分别为3、7、9,每次加水500 mL,煎煮1 h。每次煎煮冷却后,用300目纱布过滤,再加适量去离子水淋洗3~4次,合并滤液,浓缩后定容100 mL量瓶中,离心30 min。将离心液用0.45 μm 的滤膜过滤,滤液中的微量元素为可溶态,滤渣中的微量元素为悬浮态^[11]。半仿生提取液可溶态提取液和悬浮态提取液中7种微量元素的含量测定结果见表3。

2.6 可溶态中无机态和有机态微量元素的分离与测定

用稀盐酸和氢氧化钠溶液将“2.5.1”“2.5.2”项下可溶态部分的pH调节至3.0。将LSA-10大孔吸附树脂用95%乙醇浸泡24 h,装柱,去离子水冲洗干净后,将可溶态溶液上样。用去离子水洗脱至中性,收集即得可溶无机态,再用甲醇洗脱即得可溶有机态^[12]。可溶无机态和可溶有机态中7种微量元素的测定结果见表3。

2.7 形态分析

根据表3中测定结果,分别计算2种提取方法中各微量元素的提取率、颗粒吸附率和有机态/无机态等形态分析参数^[13-15],结果见表4。

3 讨论

本研究采用常规的湿法消解处理样品,采用硝酸-

表4 盒果藤中微量元素形态分析参数(%)

Tab 4 Parameters of speciation analysis of trace elements in *O. turperthum* (%)

形态分析参数	Cu	Zn	Fe	Ca	Mg	Mn	Sr
水总提取率	61.62	72.49	46.16	60.00	68.03	40.47	63.89
水提颗粒吸附率	6.77	5.02	3.69	4.99	4.11	8.78	5.82
水提有机态/无机态比例	44.87	15.48	38.53	48.39	36.09	3.94	104.36
半仿生总提取率	83.76	90.19	85.45	85.66	84.89	42.97	77.69
半仿生颗粒吸附率	1.11	4.60	2.69	6.10	8.57	0.39	1.77
半仿生有机态/无机态比例	89.49	82.57	180.79	98.95	195.26	72.74	178.44

高氯酸消化液体系,同时进行空白对照以减少试剂及操作带来的干扰和误差,避免高压消解造成的消解不完全。

采用原子吸收光谱法对盒果藤及各提取液中的Cu、Zn、Fe、Ca、Mg、Mn、Sr 7种元素进行测定,精密度和回收率良好,满足微量元素分析的要求,盒果藤中微量元素含量高低排序:Ca>Mg>Fe>Sr>Mn>Zn>Cu。

盒果藤是维吾尔医常用药材,大多以原药材粉碎入药,本研究采用常规的水提取方法提取其微量元素,为今后进行工艺研究提供了参考依据。结果除Fe、Mn元素外,其他元素提取率均大于50%,表明盒果藤中的微量元素较易溶出,可能是Cu、Zn、Ca、Mg、Sr元素在药材中与其他物质的结合方式较简单,易被加热破坏,故易溶出;各元素水提取后悬浮态颗粒吸附率为3.69%~8.78%,原因可能是微量元素与药材中的纤维素、蛋白质等胶体在被提取时,吸附了部分的微量元素,形成了假胶体分散体系。可溶态微量元素中,除Sr元素外,其他元素主要以无机态形式存在,大量的有机态Sr元素和部分其他元素的有机态的存在,可与盒果藤中的有机成分形成配位化合物,进入机体后,受到机体内各种生理因素的影响,改变其脂溶性或分子大小等特征,易与机体内的某些特定的酶、受体等结合,从而发挥药效。

本研究采用半仿生提取法提取盒果藤中的微量元素,从生物药剂学的角度模拟口服药物在胃肠道的转运过程进行提取,依次在酸性及碱性环境下提取,体外模拟人体的酸碱环境,考察盒果藤中微量元素的溶出特点及形态变化。结果半仿生提取后,除Mn元素外,其他元素的提取率均较水提取率高,可能是改变提取溶剂的酸碱度后,提取时Cu、Zn、Fe、Ca、Mg、Sr的结合方式有所改变,部分无机态的元素在酸碱改变的情况下,与药材中的有机成分结合,增加了溶出率。Mn元素可能是与植物中大分子化合物结合,不易被消解溶出。虽然提取率并未提高,但所溶出的Mn元素主要以正二价状态存在,Mn²⁺为活性态,易氧化,故在酸性环境下受pH改变影响较大。半仿生提取后,无机态的Mn元素价态发生改变,其有机态/无机态比例明显较水提物上升;Cu、Zn、

Fe、Ca、Mg、Sr等元素的有机态比例也明显提高。可见,盒果藤半仿生提取后,微量元素利用率也大大提高。

综上,本研究所得出的结论仅对盒果藤治疗白癜风相关性较大的微量元素进行了形态分析,并对水提取和半仿生提取进行了单独分析和比对,结果半仿生提取对微量元素的溶出和有效利用都较水提取高。本研究为今后该药进行工艺研究提供了参考依据,但仍需与有机成分结合进行研究。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:6518.
- [2] 霍仕霞,闫明,刘晓东,等. ICP-AES法测定盒果藤中的微量元素[J].现代科学仪器,2009(1):56-58.
- [3] 盛丽,苏碧泉.火焰原子吸收分光光度法测定铜操作条件的选择[J].辽宁化工,2006,35(9):557-559.
- [4] 郭丹,陈娜娜,杨西晓,等.原子吸收分光光度法测定常通口服液中微量元素锰的含量[J].中国药房,2005,16(18):1414-1415.
- [5] 张文利,袁思平,田超,等.正交试验设计法在火焰原子吸收操作条件选择中的应用[J].甘肃环境研究与检测,2003,16(3):220-223.
- [6] 张为人,张玉环.正交试验在原子吸收操作条件选择中的应用[J].辽宁城乡环境科技,2004,24(6):34-36.
- [7] 徐春秀,蔡龙飞,林鑫.原子吸收光谱法测定荸荠、莲藕、莲子中铁、锌、钙的含量[J].韩山师范学院学报,2007,28(3):70-73.
- [8] 谢善梅,申湘忠.杨桃中微量元素的测定[J].当代化工,2007,36(6):660-662.
- [9] 张力,马莹莹,徐玲,等.蒙药材多叶棘豆中5种微量元素的形态分析[J].天然产物研究与开发,2012,24(3):345-347.
- [10] 姚艳红.草苁蓉中微量元素次级形态的分析[J].延边大学学报,2012,38(1):75-78.
- [11] 霍仕霞,闫明.半仿生提取法测定补骨脂中的微量元素[J].医药导报,2009,28(12):1612-1615.
- [12] 沈晓芳,张勇,杨成,等.黄芪中微量元素的形态分析[J].分析化学,2006,34(3):396-399.
- [13] 赖鹤望,吴云影.金银花中9种微量元素初级形态分析[J].安徽农业科学,2013,41(28):11326-11328.
- [14] 包玉敏,张力,徐玲,等.蒙药材金莲花中5种微量元素的形态分析[J].吉林大学学报(理学版),2011,49(2):327-330.
- [15] 赖鹤望.火焰原子吸收测定白茅根初级形态中微量元素含量[J].湖北农业科学,2011,50(15):3191-3194.

(收稿日期:2016-11-06 修回日期:2017-06-05)

(编辑:刘明伟)