

牡蛎软体活性物质提取工艺的研究

刘春美¹, 徐春梅², 谢 辉¹, 丁安伟¹ (1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029; 2. 南京信息工程大学, 江苏 南京 210044)

摘要 目的: 优选牡蛎软体活性物质的最佳提取工艺。方法: 采用正交设计实验 $L_9(3^4)$, 以牡蛎软体提取物中牛磺酸的含量和浸出物得率为考察指标。结果: 最佳提取工艺为牡蛎软体加 10 倍量水, 煎煮 2 次, 每次 1h。结论: 该工艺是稳定可行的。

关键词 牡蛎; 正交实验; 提取工艺

中图分类号: R931.74 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006-0111(2005)02-0084-03

Research on extraction of active components in oyster soft tissue

LIU Chun-mei¹, XU Chun-mei², XIE Hui¹, DING An-wei¹ (1. School of pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China. 2. Nanjing University of Information Science & Technology, Nanjing 210044, China)

ABSTRACT Objective: To select the optimal extracting technology of active components in oyster soft tissue. **Methods**: The extracting technology was investigated using the orthogonal designed methods $L_9(3^4)$, with the content of taurine and the amount of the extracts as the detecting index. **Results**: The optimal extracting technology was as follows: the oyster soft tissue was refluxed in 10 times of the amount of water for two times, 1h each time. **Conclusion**: This extracting technology is workable and reliable.

KEY WORDS Oyster; Orthogonal designed methods; extracting technology

牡蛎软体(又名牡蛎肉、蛎黄)为牡蛎科动物近江牡蛎(*Ostrea rivularis* Gould)等的肉^[1,2]。牡蛎软体中含有丰富的糖原、蛋白质、氨基酸、维生素等成分,具有滋阴养血功能^[2]。研究表明牡蛎肉干品中牛磺酸的含量约占 5.06%^[3],牛磺酸是一种含硫氨基酸,对热稳定,微溶于水,在动物体中多以游离状态存在,具有多种生理活性^[4,5]。可以说,牡蛎肉提取物的医疗保健作用,在很大程度上与牛磺酸有关^[4]。为此,我们以牛磺酸的含量为指标,采用正交试验法,对牡蛎软体中生物活性物质的提取工艺进行优选。

1 实验材料

1.1 药材 牡蛎由南京市惠民桥水产批发市场购得,经本校中药鉴定教研室吴启南副教授鉴定为近江牡蛎和大连湾牡蛎。

1.2 试剂 硅胶 G(青岛海洋化工厂),牛磺酸对照品(南京制药厂,纯度为 99.6%以上),茚三酮(上海试剂三厂,AR),本实验所用试剂均为分析纯。

1.3 仪器 CAMAG TLC SCANNER 及自动点样器, CAMAG REPROSTAR 薄层色谱数码摄像系统(德国)。

2 实验方法与结果

2.1 工艺设计 牡蛎去壳取肉,匀浆后,采用煎煮法,选择加水量、煎煮时间和煎煮次数作为考察因素,以提取物中牛磺酸的含量及浸出物得率为考察指标,应用 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验,因素水平安排见表 1。煎煮滤过后浓缩成稠膏。

表 1 因素水平表

水 平	因 素		
	A 加水量(倍)	B 煎煮次数	C 煎煮时间(h)
1	8	1	0.5
2	10	2	1
3	12	3	1.5

2.2 浸出物得率测定 分别取总量 1/10 的稠膏,置干燥恒重的蒸发皿中,精密称重,于 105℃ 的烘箱中烘 3h,取出置干燥器中冷却至室温,迅速称重,计算浸出物得率。

2.3 提取物中牛磺酸的含量测定

2.3.1 薄层扫描条件 展开剂:乙醇:水(7:3),展距 8cm;显色剂:0.2% 茚三酮乙醇液,105℃ 加热至斑点清晰;反射法线性扫描: $\lambda_s = 519\text{nm}$, $\lambda_R = 618\text{nm}$;狭缝: $10.0 \times 0.4\text{mm}$, $S_x = 3$ 。

2.3.2 标准曲线绘制 精密称取牛磺酸 2.03mg, 置 5mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 即得浓度为 0.406 mg/mL 的标准溶液, 分别吸取标准溶液 1、2、3、4、5 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙醇: 水 (7: 3) 为展开剂, 预饱和 30min 后, 上行展开 8cm, 取出, 晾干, 喷以 0.2% 茚三酮乙醇试液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点清晰, 取出, 在薄层板上覆盖同样大小的玻璃板, 周围用胶布固定, 放置 30min 后进行扫描测定, 以点样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标, 各斑点的峰面积积分值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算出回归方程为 $Y = 2956073X + 2862.82$, $r = 0.999$, 说明在 0.406 ~ 2.03 μg 内牛磺酸含量与峰面积积分值具有良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 同板精密度: 精密吸取标准品溶液 3 μ L, 重复点样 5 次于同一薄层板上, 按标准曲线绘制方法展开、显色, 测定, 结果见表 2, $RSD = 1.12\%$ 。异板精密度: 精密吸取标准品溶液 5 μ L, 重复点样 5 次于不同薄层板上, 按标准曲线绘制方法展开、显色, 测定, 结果见表 3, $RSD = 2.97\%$ 。

表 2 同板精密度

编号	点样量 (μL)	峰面积积分值	$RSD(\%)$
1	3	3179.6	1.12
2	3	3104.7	
3	3	3164.3	
4	3	3180.5	
5	3	3196.3	

表 3 异板精密度

编号	点样量 (μL)	峰面积积分值	$RSD(\%)$
1	5	6557	2.97
2	5	6526	
3	5	6128.2	
4	5	6294.4	
5	5	6543	

2.3.4 稳定性考察 精密吸取标准品溶液 3 μ L 点于同一薄层板上, 按标准曲线绘制方法展开、显色, 置薄层扫描仪上每隔 15min 对同一斑点扫描测定一次, 结果见表 4, $RSD = 2.09\%$, 表明避光放置 1h 内稳定。

表 4 稳定性考察

时间 (min)	点样量 (μL)	峰面积积分值	$RSD(\%)$
0	3	3158.9	2.09
15	3	3174.3	
30	3	3257.5	
45	3	3217.5	
60	3	3326.1	

2.3.5 重现性实验 精密称取 1 号正交实验稠膏 5 份, 每份约 0.1g, 按样品测定项下进行含量测定, 结果见表 5, 平均含量为 4.1527mg/g 生药, RSD 为 2.14%。

表 5 重现性实验

取样量 (g)	点样量 (μL)	峰面积积分值	牛磺酸含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)	$RSD(\%)$
0.1054	2	2628.8	4.1853	4.1527	2.14
0.1056	2	2672.0	4.2473		
0.1052	2	2627.1	4.0368		
0.1052	2	2632.5	4.0832		
0.1054	2	2643.6	4.2108		

2.3.6 加样回收实验 取已知含量的 1 号稠膏 5 份, 每份约 0.1g, 精密称重, 分别加入牛磺酸对照品 5mg, 按样品制备及测定项下进行含量测定, 结果见表 6, 平均回收率为 98.93%, RSD 为 2.69% ($n = 5$)。

表 6 加样回收实验

稠膏量 (g)	含量 (mg)	加入量 (mg)	实测值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	$RSD(\%)$
0.1052	5.13	5.10	10.15	99.22	98.93	2.69
0.1054	5.14	5.05	9.73	95.50		
0.1056	5.15	5.10	9.95	97.07		
0.1057	5.15	5.00	10.24	100.89		
0.1074	5.24	5.02	10.46	101.95		

2.3.7 供试品溶液制备及测定 分别取总量 1/24 的稠膏, 置离心试管中, 精密称重, 加入 70% 乙醇 8mL, 超声提取 20min, 离心取上清液, 重复以上操作 2 次, 合并上清液, 水浴蒸干, 用 70% 乙醇定容至 10mL, 供点样用。

分别精密吸取对照品溶液 1 μ L、5 μ L 及各样品液 2 μ L 点于同一薄层板上, 按标准曲线绘制方法展开、显色, 并测定各样品和对照品的峰面积, 按随行外标 2 点法计算各样品中牛磺酸含量。结果见表 7。

2.3.8 牛磺酸的转移率测定 精密称取鲜牡蛎肉匀浆液 3 份, 每份约 1.25g, 按样品测定项下制备样品, 得供试液, 供药材含量测定用。另取鲜牡蛎肉匀浆液 30g, 按最佳工艺提取, 并按样品项下制备供试液, 按样品项下点样, 展开, 显色, 测定, 计算得转移率为 89.84%。

(下转第 108 页)

0.9%的氯化钠注射液加入800~1120万U的青霉素钠静滴,个别甚至达到1280万U;其次给药过快或间隔时间过短也可引起神经毒性,门诊患者一般为了赶时间,随到随打,并不可能执行严格的时间间隔,以至间隔时间太短;另外,不合理合并用药也可引起神经毒性,青霉素类药物的基本结构及原理相同,抗菌谱相似,神经毒性也相似,最好避免本类药物合用;另外注意青霉素脑病的表现同一些原发病的某些症状不易区别。特别是婴幼儿、老年人和肾功能减退者出现疑似青霉素脑病症状时,应及时诊治,门诊患者处在流动之中,更应注意观察。

参考文献:

[1] 金蜀蓉. 1998~2000年重庆地区医院用药情况分析[J]. 中国

药房,2001,12(8):476.

- [2] 方旭. 滥用抗生素的伦理思考[J]. 中国医学伦理学,2001,(8)4:25.
- [3] 曾佑群,吴扬. 小儿呼吸道感染抗生素的使用及耐药性分析[J]. 儿科药学杂志,2002,8(2):34.
- [4] 姚磊. 合理用药指南[M]. 北京:人民军医出版社,2002.31.
- [5] 郑秀凤,焦效兰. 临床药物应用指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.554.
- [6] 李维. 乳酸左氧氟沙星序贯疗法与乳酸左氧氟沙星静脉给药的成本-效果分析[J]. 药学实践杂志,2003,(21)1:16.

收稿日期:2004-09-01

(上接第85页)

表7 正交试验结果

试验号	因素				总浸出物(g)	牛磺酸含量(mg)	综合评分
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	1.6925	85.9685	71.26
2	1	2	2	2	1.6627	167.9804	94.87
3	1	3	3	3	1.6481	92.6143	72.04
4	2	1	2	3	1.7952	139.3667	89.92
5	2	2	3	1	1.7225	156.5351	93.07
6	2	3	1	2	1.6324	119.8858	79.73
7	3	1	3	2	1.8530	143.9101	92.84
8	3	2	1	3	1.6944	117.9186	80.82
9	3	3	2	1	1.6506	102.8333	75.15
K1	238.17	254.02	231.81	239.48			
K2	262.72	268.76	259.94	267.44			
K3	248.81	226.92	257.95	242.78			
R	8.18	13.93	9.38	9.32			

3 讨论

由表7结果分析,影响牡蛎软体活性提取物中牛磺酸的因素主次顺序为煎煮次数>煎煮时间>加水量。最佳工艺为加10倍量水,煎煮2次,每次1h。经3次验证最佳工艺得到综合评分分别为96.58,97.21,和98.01,由此可见,最佳工艺可靠。

现有测定氨基酸的方法很多,如氨基酸自动分析仪,仪器价格昂贵;高效液相色谱衍生化法,操作麻烦,影响因素较多;微量滴定法,电位滴定法专属性差;曾试用邻苯二甲醛柱前衍生化的高效液相色谱法测定牛磺酸的含量,由于衍生反应是由手工操作,工序长,反应影响因素多,重现性差。本文采用薄层扫描法测定牡蛎中牛磺酸的含量,可有效地将

牛磺酸与其他氨基酸分离,灵敏度高,方法简便、准确、快速。

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,1998:2375.
- [2] 林钧明,邱珊. 牡蛎肉中牛磺酸的研究近况[J]. 中国海洋药物,1994,(4):23.
- [3] 谭桂利,李瑞声. 牡蛎的化学成分和药用价值[J]. 中国海洋药物,1993,(4):26.
- [4] 李良铸,李明晔编. 最新生化药物制备技术[M]. 北京:中国医药科技出版社,2001:78.
- [5] 郑凌,刘毅. 牛磺酸的研究进展[J]. 中国生化药物杂志,1996,17(2):88.

收稿日期:2004-06-19