

海螵蛸提取物活性成分分析及止血机制

刘书豪^{1,2,3,4}, 王有宪⁴, 邵仲柏⁴, 蒋凯俊⁴, 曹联攻⁴, 李 冰⁴, 沈金阳^{1,2,3,4*}, 刘玮炜^{1,2,3,4*}

(1. 江苏海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏海洋大学, 江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室, 江苏 连云港 222005; 3. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005; 4. 江苏海洋大学药学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: **目的** 分析海螵蛸提取物活性成分, 并研究其止血机制。**方法** 以水、乙醇、石油醚为溶剂, 分别采用热回流、浸泡残渣、超声处理等方法制备海螵蛸提取物。通过化学试剂反应现象判断提取物活性成分, 检测提取物凝血时间、凝血四项 (PT、APTT、TT、FIB) 来分析止血机制。**结果** 海螵蛸提取物可能含有甾体三萜、挥发油和油脂、皂苷、有机酸、内酯和香豆素、糖类、氨基酸等成分。水提物体外促凝效果最好, 醇提物、石油醚提取物较弱。与空白组比较, 水提物各剂量组 APPT、PT 缩短 ($P<0.05$), 并呈剂量依赖性。**结论** 海螵蛸提取物活性成分丰富, 水提物具有良好的体外促凝效果, 其机制可能为激活外源性凝血系统、促进内源性凝血系统中凝血因子释放酶原。

关键词: 海螵蛸; 提取物; 活性成分; 止血机制

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)10-3366-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.057

海螵蛸是头足纲乌贼科动物无针乌贼或金乌贼的干燥内壳^[1], 分布于浙江、福建、山东等沿海地区。碳酸钙、壳角质与粘液质占其成分含量的 90% 左右, 还含有少量氯化钠、磷酸钙、镁盐等^[2-3]。海螵蛸成分构成中成分众多^[4], 具有极大的研究开发价值。当前, 对海螵蛸的研究多集中于治疗胃溃疡和成骨作用^[5-7], 但对凝血止血机制的研究报道较少。郑杰^[8]等用黄芪和乌贼骨各 30 g, 再配伍其他止血药治疗由肾虚导致的术后出血不止, 在服药 4 剂后出血即止, 可见海螵蛸可协同他药发挥止血作用; 盛福韶^[9]用大黄炭海螵蛸粉, 取适量涂于凡士林油纱条上, 填塞出血鼻腔, 连用 7 d, 有效率达 94.4%。海螵蛸作为一味海洋中药, 其良好的凝血效果已被证实, 但是其具体止血机制仍不清楚, 其止血活性物质也不明确, 并且关于其止血作用机制和体外止血研究鲜有报道。因此, 本实验对海螵蛸提取物进行体外促凝血检测, 探索其活性成分和止血机制。

1 材料

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (河南省予华仪器有限公司); TDL-40B 电动离心机 (杭州南开日新生物技术有限公司); AS-LGJ-10FG 冷冻干燥机 (郑州宏朗仪器设备有限公司); ACLTOPT00LAS 全自动凝血分析仪 (西班牙巴塞罗纳沃芬公司)。云南白药 (云南白药集团股份

有限公司)。新鲜海螵蛸购于连云港新浦区苍梧生活广场, 经江苏海洋生物资源与环境重点实验室刘玮炜教授鉴定为金乌贼 *Sepia esculenta* Hoyle 内壳, 粉碎研磨制得。昆明种小鼠饲养于南京中医药大学康达医学院, 动物生产许可证号 SCXK(苏)2016-0002, 动物实验伦理委员会审批号 Jou-2020-Y-01-A。

2 方法

2.1 提取物制备

2.1.1 水提物 药材研磨后过 40 目筛, 称取 10 g, 加去离子水 100 mL, 室温浸泡 6 h, 在 80 ℃ 下搅拌热回流 2 h^[10], 滤过, 重复提取 1 次, 合并 2 次水提液, 滤渣超声提取 40 min, 合并滤液, 25 ℃、4 000 r/min 离心 15 min 后取上清, 置于 60 ℃ 烘箱中烘干浓缩后, 旋转浓缩至近干, 冷冻干燥, 即得。

2.1.2 醇提物 取药材粉末 10 g, 加 100 mL 95% 乙醇浸泡 24 h, 50 ℃ 加热回流提取 2 h, 过滤, 滤渣提取 1 次, 超声提取 40 min, 合并 3 次滤液, 离心后取上清, 蒸干, 即得。

2.1.3 石油醚提取物 取药材粉末 10 g, 加 100 mL 石油醚, 室温浸泡^[11]一段时间后搅拌 2 h, 滤过, 滤渣用石油醚同法提取 1 次, 超声提取 40 min, 合并 3 次滤液, 离心后取上清, 蒸干, 即得。

收稿日期: 2021-05-30

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项 (201505023); 江苏省自然科学基金项目 (BK20151281); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (KYCX20-2894, KYCX20-2897, SJCX20-1212)

作者简介: 刘书豪 (1994—), 男, 硕士生, 从事海洋化学研究。Tel: 13675214406, E-mail: 1916637635@qq.com

* 通信作者: 沈金阳 (1989—), 男, 讲师, 从事中药药剂学研究。Tel: 15861298497, E-mail: shenjy@jou.edu.cn

刘玮炜 (1965—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事有机合成研究。Tel: 13705133357, E-mail: liuweimei323@163.com

2.2 活性成分分析 向盛有供试液的试管中或滤纸片上加入相关的化学试剂,根据反应现象(颜色、沉淀等)来判断某种活性成分在海螵蛸提取物中是否存在^[12]。

2.3 凝血时间检测 采用摘眼球取血法取小鼠血液,制备枸橼酸钠抗凝血液,玻璃试管中加入药液 0.2 mL (37 ℃ 水浴预温),再加入氯化钙溶液 0.2 mL,摇匀后于各管内同时加入小鼠抗凝血液 0.5 mL,以云南白药为阳性对照,生理盐水为空白对照,置于 37 ℃ 水浴箱中振荡摇晃后立即计时,每 5 s 轻轻倾斜试管 1 次,观察有无凝血,到倾斜试管血块凝固于管底而不流动时停止计时,即为凝血时间^[13],重复 3 次,取平均值。

2.4 凝血四项检测 采用摘眼球取血法取小鼠血液,制备枸橼酸钠抗凝血液(1 份抗凝液+9 份全血),轻轻颠倒混匀,3 000 r/m 离心 15 min,收集上清液。取待测血浆 0.1 mL,分为醇提物高(4.0 mg/mL)、中(2.0 mg/mL)、低(1.0 mg/mL)剂量组,水提物高(4.0 mg/mL)、中

(2.0 mg/mL)、低(1.0 mg/mL)剂量组,石油醚提取物高(4.0 mg/mL)、中(2.0 mg/mL)、低(1.0 mg/mL)剂量组,云南白药(2.0 mg/mL)组,加入 0.05 mL 样品,另设阴性对照组,加入 0.05 mL 生理盐水,混匀,置于全自动凝血分析仪上,检测凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APPT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)水平,重复 6 次,取平均值。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 13.0 软件进行处理,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 成分分析 由表 1 可知,海螵蛸提取物可能含有甾体三萜类、挥发油和油脂、皂苷、有机酸、内酯、香豆素、糖类、氨基酸,未发现蛋白质、蒽醌类、酚类、鞣质等成分。

表 1 提取物成分分析结果

成分	实验	指标	结果	结论
三萜	氯仿-浓硫酸反应	上层呈青色,下层有绿色荧光	+	存在
挥发油、油脂	油斑实验	常温下挥发有油斑	+	存在
酚类、鞣质	三氯化铁反应	无蓝、暗绿蓝紫色	—	不存在
有机酸	pH 试纸	试纸显黄色,呈酸性	+	存在
蒽醌	碱性试验	溶液无色透明,未显示红色	—	不存在
内脂、香豆素	荧光试验	存在黄色荧光	+	存在
糖类	费林反应	棕红色沉淀	+	存在
皂苷	泡沫反应	激烈振荡产生大量持久性泡沫	+	存在
蛋白质	双缩脲反应	蓝色	—	不存在
氨基酸	茚三酮反应	蓝、蓝紫色	+	存在

3.2 提取物对小鼠凝血时间的影响 由表 2 可知,与空白对照组。组比较,水提物组凝血时间缩短($P<0.05$),接近阳性对

表 2 提取物对小鼠凝血时间的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	凝血时间/s						平均值
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 6 次	
水提物组	20	10	15	15	20	15	15.83±3.76 *
醇提物组	60	65	60	55	65	65	61.67±4.08
石油醚提取物组	70	75	70	75	80	70	73.33±4.08
空白组	90	90	85	95	95	90	90.83±3.76
阳性对照组	20	10	25	30	20	25	21.67±6.83

注:与空白组比较,* $P<0.05$ 。

3.3 提取物对小鼠凝血四项的影响 由表 3 可知,与空白组比较,水提物各剂量组小鼠 PT、APPT 缩短($P<0.05$),并呈剂量依赖性,但各提取物组 TT、FIB 水平无明显变化($P>0.05$)。

4 讨论

体外止血实验表明,海螵蛸提取物中水提物体外促凝效果良好,其活性成分中有良好的体外促凝物质。海螵蛸主要促凝血成分为 Ca 离子、甲壳素、壳聚糖和提取物多糖^[1],其中甲壳素不溶于水,壳聚糖是甲壳素的脱乙酰化产物,海螵蛸中 Ca 离子存在形式为其主要成分 CaCO₃,并

且难溶于水,推测活性成分可能为提取物多糖。凝血过程是一系列的酶促反应,包括内源性、外源性、共同凝血 3 个途径,使血浆纤维蛋白原变为纤维蛋白,血液由溶胶状态变为凝胶状态^[14]。凝血四项检测结果表明,海螵蛸水提物能缩短小鼠 PT、APTT,高剂量下更明显,但 TT、FIB 基本无变化,其促凝血作用可能与外源性凝血途径和内源性凝血途径中影响凝血因子有关,同时其质量浓度提高时可积极影响内源性凝血中促进凝血活酶形成过程中凝血因子、激肽释放酶原的过程。

表 3 提取物对小鼠凝血四项的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	PT/s	APPT/s	TT/s	FIB/(g·L ⁻¹)
空白组	14. 20±0. 13	34. 70±0. 71	17. 50±0. 77	1. 71±0. 08
阳性对照组	13. 50±0. 47	36. 57±2. 13	19. 90±1. 33	1. 75±0. 13
石油醚提取物低剂量组 (1. 0 mg/mL)	13. 83±0. 18	34. 90±0. 24	18. 28±0. 21	1. 71±0. 09
石油醚提取物中剂量组 (2. 0 mg/mL)	13. 53±0. 12	35. 35±0. 45	18. 10±0. 20	1. 78±0. 16
石油醚提取物高剂量组 (4. 0 mg/mL)	13. 12±0. 16	35. 88±0. 34	18. 05±0. 37	1. 77±0. 17
醇提物低剂量组 (1. 0 mg/mL)	13. 52±0. 37	35. 07±0. 44	18. 58±0. 31	1. 69±0. 12
醇取物中剂量组 (2. 0 mg/mL)	13. 42±0. 15	35. 57±0. 50	19. 68±1. 06	1. 63±0. 07
醇取物高剂量组 (4. 0 mg/mL)	13. 48±0. 20	36. 98±0. 46	21. 23±0. 46	1. 69±0. 08
水取物低剂量组 (1. 0 mg/mL)	13. 10±0. 16 *	34. 50±1. 37 *	18. 20±0. 79	1. 72±0. 13
水取物中剂量组 (2. 0 mg/mL)	12. 67±0. 20 *	31. 75±4. 47 *	17. 38±3. 76	1. 74±0. 17
水取物高剂量组 (4. 0 mg/mL)	12. 02±0. 20 *	18. 97±3. 87 *	18. 68±1. 76	1. 79±0. 11

注：与空白组比较, * $P<0.05$ 。

参考文献：

[1] 王 丹,王晶娟. 海螵蛸止血作用的现代研究进展[J]. 中医药学报, 2018, 46(6) : 117-122.

[2] 卢少海,马 山,周长征. 中药海螵蛸的应用研究进展[J]. 食品与药品, 2014, 16(1) : 65-67.

[3] 郭一峰,冯伟华,焦炳华. 海螵蛸基础研究和临床应用[J]. 中药材, 2007, 30(8) : 1042-1045.

[4] Unai M, William F G. Cephalopods of pacific latin america[J]. *Fish Res*, 2016, 173: 113-121.

[5] 曹卫华. 愈疡安胃汤加味治疗消化性溃疡 86 例[J]. 中国中医药科技, 2015, 22(3) : 311-312.

[6] 郑 红. 海螵蛸对胃粘膜损伤保护及其凝血、止血功效研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.

[7] Mansouri K, Fattahian H, Mansouri N, *et al.* The Role of cuttlebone and cuttlebone derived hydroxyapatite with plate-acta chinese medicine and pharmacology let rich plasma on tibial bone defect healing in rabbit; an experi-mental study[J]. *Kafk Univ Vet Fak Derg*, 2018, 24(1) : 107-115.

[8] 郑 杰,闫 颖. 张吉金辨治崩漏验案 2 则[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(10) : 122-123.

[9] 盛福韶. 大黄炭海螵蛸粉治 34 疗鼻衄 36 例观察[J]. 海南医学, 2012, 23(5) : 94-94.

[10] 宋 瑾. 中草药体外止血及抗菌活性的评价研究[D]. 南宁: 广西大学, 2016.

[11] 吴少锦. 青钱柳非水溶性提取物体外降糖活性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2018.

[12] 曲筱静. 藕节促凝血活性物质的筛选及其作用机制的初步研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.

[13] 王秀琴. 促凝中草药的筛选及其凝血实验的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2004.

[14] 赵 颖,胡少南,郑一敏,等. 见血青提取物止血作用的实验研究[J]. 中国药房, 2013, 24(31) : 2884-2886.

QuEChERS 结合 GC-MS/MS 法同时测定陈皮中 215 种农药残留

张 瑶¹, 高 琳¹, 马桂娟¹, 王紫昕¹, 吴龙国^{2*}

(1. 宁夏食品检测研究院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要：目的 建立 QuEChERS 结合气相色谱串联质谱（GC-MS/MS）法同时测定陈皮中 215 种农药残留。**方法** 1% 乙酸-乙腈提取陈皮，以 PSA、GCB 为净化剂，分析采用 HP-5MS 色谱柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；程序升温；进样量 1 μL，不分流；体积流量 1.2 mL/min；进样口温度 240 ℃；电子电离源，电子能量 70 eV；离子源温度 280 ℃；多反应监测模式；碰撞气氦气；溶剂延迟时间 2.5 min。**结果** 215 种农药在各自范围内线性关系良好（ $r>0.995\ 0$ ），在 0.05、0.1、0.2 mg/kg 水平的平均加样回收率分别为 60.45% ~ 130.05%、66.31% ~ 127.44%、64.21% ~ 118.85%。**结论** 该方法快速高效，简便经济，可用于陈皮中农药残留的快速筛查及日常检测。

关键词：陈皮；农药残留；QuEChERS；气相色谱串联质谱（GC-MS/MS）

中图分类号：R284.1 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2022)10-3368-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.058

收稿日期：2021-06-11
基金项目：宁夏自然基金项目（2019AAC03057）；宁夏青年科技人才托举工程项目（TJGC065）
作者简介：张 瑶（1989—），女，硕士，工程师，研究方向为食品检测与分析。E-mail: 826206581@qq.com
*** 通信作者：**吴龙国（1988—），男，博士，讲师，研究方向为农产品无损检测。E-mail: wlg@nxu.edu.cn