

老鹳草鞣质的提取工艺及其免疫作用的试验研究

阎巧娟 韩鲁佳 江正强 刘向阳

高微微

(中国农业大学农业工程研究院)

(中国医学科学院药用植物研究所)

摘要 为确定提取老鹳草鞣质的合理生产工艺, 及为药物复配提供药理学依据, 采用水回流法、水温浸法、丙酮回流法、冷浸搅拌法和乙醇回流法进行了老鹳草鞣质的提取试验; 采用 MTT 方法检测了不同工艺生产的老鹳草鞣质对 ConA 和 LPS 刺激鸡外周血中淋巴细胞增殖反应的影响。试验结果表明: 水温浸法、丙酮回流法和乙醇回流法鞣质得率和质量分数均较高, 考虑经济因素则水温浸法为好。除乙醇回流法外的 4 种方法提取的老鹳草鞣质在质量浓度较低时对 ConA 诱导的鸡外周血 T 淋巴细胞及 LPS 诱导的 B 淋巴细胞的增殖均有显著的促进作用。

关键词 老鹳草; 鞣质; 提取; 免疫效果

中图分类号 R 28

Extraction and Immunosuppressive of Tannins From Herba Geranium

Yan Qiaojuan¹, Han Lujia¹, Jiang Zhengqiang¹,

Liu Xiangyang¹, Gao Weiewei²

(1. Agricultural Engineering Institute, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract To determine a reasonable extraction technology and provide a reliable pharmacologic base for the complex ratio of the traditional Chinese medicine, extraction of Tannins from *Herba Geranium* by water reflux, warm water immersion, acetone solution reflux, cold water immersion with stir and alcohol solution reflux were carried out. The effects of *Herba Geranium* Tannins produced by different extraction technology were investigated on chicken lymphocyte proliferation *in vitro* with MTT method. The results showed that the extraction yield and content of tannins extracted by warm water immersion, acetone solution reflux and alcohol solution reflux were all higher, the method of warm water immersion was better on the basis of cost. Except the method of alcohol solution reflux, the tannins extracted by the other 4 methods increased markedly the ConA and LPS-induced proliferation of T and B lymphocytes respectively under low concentration.

Key words *Herba Geranium*; tannins; extraction; immunosuppressive effect

老鹳草是我国的传统中药, 来源于牻牛儿苗科植物牻牛儿苗 (*Erodium stephanianum* Willd) 及老鹳草 (*Geranium wilfordii* Maxim.) 的干燥地上部分^[1]。其主要化学成分包括鞣质、

收稿日期: 2002-04-06

国家“十五”科技攻关项目子课题

阎巧娟, 北京清华东路 17 号 中国农业大学(东校区) 191 信箱, 100083

黄酮类、有机酸和挥发油等, 其中的鞣质尤为丰富。鞣质是一种具有沉淀蛋白质特性的水溶性多元酚类化合物, 不仅具有常见的收敛、抗菌消炎、止血、驱虫、止泻、抗多种病原虫感染性疾病的作用, 还具有抗肿瘤、抗突变、抗脂质过氧化、抗变态反应, 抑制胃蛋白酶, 预防应激性胃肠损伤, 降压、降脂, 改善肝肾功能等功用, 并对中枢神经系统有镇静作用^[2]。

目前, 国内对老鹳草鞣质提取分离的研究报道较少。由于鞣质遇酸、碱, 及在高温条件下不稳定, 文献中对其提取方法的报道分歧也较大。老鹳草中药理活性成分较多, 不同提取工艺直接影响其药效。笔者通过淋巴细胞转化试验对5种不同提取工艺生产的老鹳草鞣质对鸡免疫细胞的影响进行了研究, 旨在研究鞣质的提取工艺和方法, 为确定合理的生产工艺和药物复配提供药理学依据^[3-5]。

1 材料与方 法

1.1 原材料及仪器

原料: 老鹳草, 购于北京市海淀区医药经营公司。

试验动物: 55日龄健康AA肉仔鸡。

试剂: 蒸馏水为实验室自制; 皮粉、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等均为AR级; Percoll细胞分层液为Pharmacia公司产品; RPMI 1640培养基和SDS为GibcoBrl公司产品; LPS(细菌脂多糖), ConA(刀豆素A)和MTT(噻唑蓝)均为Sigma公司产品。

仪器设备: 回流提取装置, 实验室自制; 微型植物粉碎机, 河北黄骅齐家务科学仪器厂生产; AB204B型电子分析天平, 瑞士梅特勒公司生产; 101A-2型电热恒温干燥箱, 上海实验仪器总厂生产; RE-52AA旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂生产; 细胞培养板、酶标仪, 丹麦产。

1.2 鞣质的提取工艺

为了解不同提取工艺条件对鞣质提取效果的影响, 选用不同溶剂进行了冷浸提取、温浸提取及回流提取。各取老鹳草粗粉20g, 分别按如下工艺进行。

工艺A: 水回流法。用蒸馏水回流提取2次, 第1次提取2h, 加入蒸馏水10倍量(溶质质量为1倍量, 下同), 第2次提取1.5h, 加入蒸馏水6倍量。合并滤液, 真空浓缩, 干燥并粉碎得样品GT₁。

工艺B: 丙酮回流法。用体积分数60%的丙酮溶液回流提取2次, 第1次提取2h, 加入丙酮溶液10倍量, 第2次提取1.5h, 加入丙酮溶液6倍量。合并滤液, 真空浓缩, 干燥并粉碎得样品GT₂。

工艺C: 冷浸搅拌法。加入10倍量室温蒸馏水, 在打浆机中快速搅拌2min, 滤出滤液后再将滤渣加水6倍量, 快速搅拌2min, 合并滤液, 真空浓缩, 干燥并粉碎得样品GT₃。

工艺D: 温浸法。在50℃下水浴温浸2次, 各提取30min。水的加入量第1次为10倍量, 第2次6倍量。合并滤液, 真空浓缩, 干燥并粉碎得样品GT₄。

工艺E: 乙醇回流法。用体积分数为60%的乙醇溶液回流提取2次: 第1次提取2h, 加入乙醇溶液10倍量, 第2次提取1.5h, 加入乙醇溶液6倍量。合并滤液, 真空浓缩, 干燥并粉碎得样品GT₅。

1.3 鞣质质量分数测定方法

皮粉法, 按2000年版《中国药典》附录所述的鞣质质量分数测定法进行。

1.4 免疫试验方法^[6]

用RPMI 1640培养基分别将获得的5种鞣质提取物GT₁~GT₅配成2mg·mL⁻¹含药培养液,于4℃保存。

无菌采鸡心脏外周血4~5mL,肝素抗凝(25单位·mL⁻¹);用相对密度1.063的无菌PercoIl细胞分层液分离淋巴细胞。将制备好的5×10⁶鸡淋巴细胞加入96孔细胞培养板,50μL·孔⁻¹,然后加入待测药液使其终质量浓度分别为5,25和50μg·mL⁻¹;以LPS,ConA分别作为T,B淋巴细胞丝裂原,质量浓度分别为22.5和45μg·mL⁻¹。每个样品做3孔平行样,置于40℃CO₂体积分数为5%的条件下培养48h,每孔加入MTT 10μL,继续培养4h后每孔加入质量分数为20%的SDS 90μL,12h后用酶标仪测定A_{540nm}值,数据用SPSS软件进行统计。

2 结果与讨论

2.1 不同提取工艺对鞣质提取效果的影响

鞣质属多羟基酚类化合物,具有较强的极性,且遇热易氧化变性,故选用极性较大的水和有机溶剂水溶液进行冷浸、温浸和回流提取,结果见图1。可以看出,用水冷浸虽不会破坏有效成分,但浸出率差;用水回流提取,虽能提高浸出率,但杂质含量高且易导致鞣质变性。水温浸法、丙酮回流法和乙醇回流法所得提取物鞣质得率和质量分数都较高,若考虑经济因素,则水温浸法比较好。采用不同方法得到的提取物的成分存在很大差异,从而造成产品药理作用的差异,故根据药理效果筛选和确定合理生产工艺,才能保证产品的药效。

2.2 不同工艺提取物的免疫效果试验

国内对老鹳草鞣质免疫作用的研究很少,相应征等研究了老鹳草鞣质对小鼠耳廓皮肤迟发性超敏反应、佐剂性关节炎继发病变和网状内皮系统吞噬功能的影响,认为老鹳草鞣质对小鼠免疫系统的某些环节有抑制作用^[7]。T,B淋巴细胞是动物体中参与免疫应答的重要细胞类群,ConA,LPS在体外可以分别刺激T,B淋巴细胞增殖,其刺激指数是测定细胞免疫能力的常用指标。

试验结果见表1。GT₁对ConA诱导的鸡外周血T淋巴细胞及LPS诱导的B淋巴细胞的增殖均无明显的促进作用。GT₂,GT₃,GT₄,GT₅在质量浓度较低时对ConA诱导的鸡外周血T淋巴细胞及LPS诱导的B淋巴细胞的增殖均有极显著的促进作用,但随着样品质量浓度的增高,作用有所减弱,这种现象有待进一步研究。在质量浓度较高时,GT₁和GT₃对LPS诱导的B淋巴细胞的增殖均有明显的抑制作用。

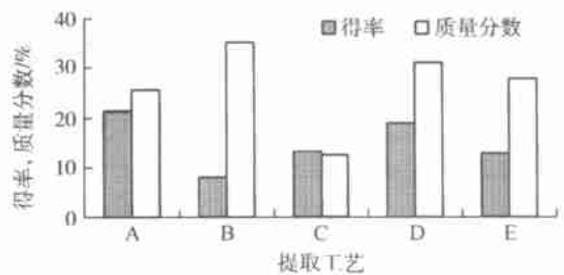


图1 提取工艺对鞣质得率和质量分数的影响

表 1 老鹳草鞣质对鸡外周血 T、B 淋巴细胞的增殖作用

样 品	$\rho/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$A_{540\text{nm}}$ 值	
		ConA ($\rho=45\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LPS ($\rho=22.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
CK(对照)	0	0.730 ± 0.052	0.769 ± 0.019
GT ₁	5	0.781 ± 0.057	0.805 ± 0.020
	25	0.792 ± 0.023	0.773 ± 0.006
	50	0.740 ± 0.009	0.691 ± 0.012 [#]
GT ₂	5	0.888 ± 0.014 ^{**}	0.882 ± 0.041 ^{**}
	25	0.822 ± 0.020 ^{**}	0.774 ± 0.005
	50	0.755 ± 0.019	0.716 ± 0.015
GT ₃	5	0.860 ± 0.029 ^{**}	0.873 ± 0.032 ^{**}
	25	0.782 ± 0.006	0.759 ± 0.021
	50	0.715 ± 0.084	0.629 ± 0.018 [#]
GT ₄	5	0.869 ± 0.029 ^{**}	0.880 ± 0.190 ^{**}
	25	0.803 ± 0.020 [*]	0.822 ± 0.006 ^{**}
	50	0.766 ± 0.040	0.721 ± 0.022
GT ₅	5	0.889 ± 0.020 ^{**}	0.870 ± 0.027 ^{**}
	25	0.804 ± 0.025 [*]	0.823 ± 0.024 ^{**}
	50	0.747 ± 0.018	0.736 ± 0.025

注: Duncan 测验。* 为 $P < 0.05$ (促进作用), ** 为 $P < 0.01$ (促进作用), # 为 $P < 0.05$ (抑制作用)。

3 结 论

5 种提取方法中, 水温浸法、丙酮回流法和乙醇回流法所得提取物鞣质得率和质量分数都较高, 考虑经济因素, 水温浸法是比较好的提取方法。丙酮回流法、冷浸搅拌法、水温浸法和水回流法提取的老鹳草总鞣质在质量浓度较低时 ($\rho=5\%$) 对 ConA 诱导的鸡外周血 T 淋巴细胞, 及 LPS 诱导的 B 淋巴细胞的增殖均有极显著的促进作用。这一结论可在免疫药物或增强剂复配时作为参考。

参 考 文 献

- 1 刘娟, 王良信. 老鹳草的本草考证. 中草药, 1992(5): 276~ 277
- 2 石碧, 狄莹, 何有节, 等. 鞣质的药理活性. 中草药, 1998(7): 487~ 490
- 3 周海燕. 老鹳草的研究概况. 国外医药·植物药分册, 1996(4): 164~ 166
- 4 李景荣, 王明时, 赵守训, 等. 鞣质的研究. 国外医药·植物药分册, 1990(5): 195~ 198
- 5 韩广轩, 王立新, 张卫东, 等. 中药老鹳草的研究概况. 药学实践杂志, 2001(1): 31~ 34
- 6 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 第 1 版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 301
- 7 相应征, 雷汉民, 姜孝文, 等. 老鹳草鞣质类化合物的抗炎、免疫和镇痛作用. 西北国防医学杂志, 1998(3): 172~ 174