

DA-201C 型大孔树脂对土鳖虫酶解液的除盐工艺考察

王少平，曾以旺，陈燕瑞，刘国飞，代龙*
(山东中医药大学，济南 250355)

[摘要] 目的:考察 DA-201C 型大孔树脂对土鳖虫酶解液的脱盐纯化效果。方法:采用 DA-201C 型树脂对土鳖虫酶解液进行脱盐试验,通过单因素试验考察上样液 pH 和质量浓度、洗脱剂种类和用量对土鳖虫小肽的影响。通过 folin-酚法测定活性成分小肽含量,检测波长 650 nm,利用电导率测定除盐率。结果:最佳除盐工艺为上样液与树脂柱体积比 1:1,上样液质量浓度 10 mg·L⁻¹,上样液 pH 7.0,吸附流速 1.5 BV·h⁻¹,加水 3 BV 洗除杂,加 75% 乙醇 3 BV 洗脱。除盐率 99.1%,小肽回收率 86.05%。结论:采用 DA-201C 型大孔树脂对土鳖虫酶解液进行纯化除盐处理的方法简便、易行。

[关键词] 除盐;土鳖虫;酶解液;小肽;DA-201C

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2;R282.74 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)22-0009-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220009

Inspection for Desalting Process of Eupolyphaga Enzymatic Hydrolysate with DA-201C Macroporous Resin

WANG Shao-ping, ZENG Yi-wang, CHEN Yan-rui, LIU Guo-fei, DAI Long*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] Objective: To investigate desalination purification effect of Eupolyphaga enzymatic hydrolysate by DA-201C macroporous resin. Method: Desalination test of Eupolyphaga enzymatic hydrolysate was adopted by DA-201C macroporous resin, effects of pH and concentration of sample solution, type and amount of

[收稿日期] 20140414(003)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09103002-021)

[第一作者] 王少平,在读硕士,从事中药新剂型与新药开发研究,Tel:13964178435,E-mail:934988991@qq.com

[通讯作者] *代龙,教授,从事中药新剂型与新药开发研究,Tel:13156189167,E-mail:druglab@sina.com

巴布剂的制备。

巴布剂中含有大量高分子水溶性基质,给其含量测定时样品的前处理带来了较大困难。本文在供试品溶液制备条件的选择中,比较了不同提取溶剂(25% 甲醇,50% 甲醇,75% 甲醇,甲醇,乙醇及正丁醇)、提取方式(回流法、超声法、萃取法)、提取时间(20,30,40,60 min)、溶剂用量(25,50,75 mL)对重楼总皂苷巴布剂中重楼皂苷Ⅱ和重楼皂苷Ⅶ提取效果的影响,结果表明 2.5.3 项下方法对这 2 种成分的提取效果均较好。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 9.

[2] 夏裕发,李煌,张勋,等. 双藤痹痛凝胶膏剂的体外释放及其透皮吸收[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(12):925.

[3] 张洪兵,朱雪瑜,张铁军,等. 星点设计-效应面优化法优选复方止痛巴布剂基质处方[J]. 中草药,2013,44(8):985.

[4] 张纪兴,王建平,朱峰,等. 均匀设计法优化跌打镇痛巴布剂的基质处方[J]. 中药材,2011,34(6):971.

[5] 李懿,何佳,赵庭周,等. HPLC 同时测定不同产地滇重楼中的 6 种重楼皂苷[J]. 中成药,2012,34(1):113.

[6] 鹿静,魏希颖,张琼,等. 灯笼花素巴布剂的处方优选[J]. 中成药,2013,35(3):504.

[责任编辑 刘德文]

eluent on Eupolyphaga small peptides were investigated by single factor tests. Folin method was employed to determine the content of small peptides with detection wavelength at 650 nm. **Result:** Optimum desalination process was as follows: resin-sample solution of 1:1, the concentration of sample solution for 10 mg·L⁻¹, pH of 7.0, adsorption rate of 1.5 BV·h⁻¹, washed impurity with 3 BV of water and eluted by 3 BV of 75% ethanol; desalination rate was 99.1% with small peptides recovery of 86.05%. **Conclusion:** This optimized desalination process is simple and feasible, it can achieve desired purpose of Eupolyphaga enzymatic hydrolysate.

[**Key words**] desalination; Eupolyphaga; enzymatic hydrolysate; small peptides; DA-201C

土鳖虫功效破血逐瘀、续筋接骨等,用于治疗跌打损伤、筋伤骨折、血瘀经闭、产后瘀阻腹痛等证^[1]。现代药理研究表明土鳖虫具有溶解静脉血栓、抑制血小板集聚、抗凝血等药理活性,但其溶栓成分组成并不明确。目前土鳖虫主要采用水煎煮法、匀浆法、水提醇沉法等提取^[2-4],存在提取率低、有效成分不明确的问题,且溶栓试验效果不好。

基于人体消化原理,动物药多由蛋白质组成,经过胃肠道相关消化酶的酶解作用转变为小分子活性物质而被人体吸收^[5]。故采用体外仿生酶解技术对土鳖虫进行处理,得到土鳖虫酶解液。由于酶解过程中需加入酸碱调节 pH 以维持反应的进行^[6-7],导致酶解液中增加了大量无机盐。而无机盐的存在不利于土鳖虫溶栓成分的下一步分离纯化,文献中其他分子肽溶液采用 DA-210C 型大孔树脂进行除盐并采用紫外追踪方法(波长 220 nm)控制上样量,结果显示除盐和吸附效果良好^[8]。故本实验采用 DA-201C 型大孔树脂对土鳖虫酶解液进行除盐,通过单因素试验考察不同工艺参数对除盐率的影响,为土鳖虫溶栓成分的分离纯化提供参考。

1 材料

UV-1100 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),AE-240 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),Centrifuge-5804 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司),DZF-6051 型真空干燥箱(上海精宏试验设备有限公司)。土鳖虫仿生酶解液(500 mL,过 3 kDa 超滤膜,土鳖虫药材购自安徽亳州,经山东中医药大学药系教授周凤琴鉴定为鳖蠊科中华冀地鳖 *Stelephaga plancyi* 的雌性全体),牛血清白蛋白(沈阳拜英生物技术有限公司,批号 080108),DA-201C 型大孔树脂(江苏苏青水处理集团),水为去离子水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的制备 称取氢氧化钠 10 g 和碳酸钠 50 g,加水 400 mL 使溶解,作为甲液;取酒石酸钾 0.5 g,加水 50 mL 使溶解,另取硫酸铜 0.25 g,加水

30 mL 使溶解,将两液混合作为乙液;临用前,合并甲、乙液,加水定容至 500 mL,得碱性铜试液。精密称取牛血清白蛋白 10.0 mg,加水溶解并定容至 50 mL,得牛血清白蛋白对照品溶液。精密量取该对照品溶液 0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置具塞试管中,各加水至 1.0 mL,加入碱性铜试液 1.0 mL,摇匀,各加入福林酚试液 4.0 mL,立即混匀,置 55℃ 水浴中反应 5 min,取出,置冷水浴中冷却 10 min,以 0 号管为空白,于 650 nm 处迅速测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 2.3674C + 0.0029$ ($R^2 = 0.9996$)。

2.2 大孔树脂的预处理 取大孔树脂适量,加水浸泡 24 h,倾去水液;加无水乙醇适量,浸泡 24 h;加水洗至无醇味,备用。

2.3 大孔树脂静态吸附能力测定 取预处理好的 DA-201C 型大孔树脂 15 mL,共 12 份,分别置于 250 mL 量瓶中,各加入土鳖虫仿生酶解液(生药质量浓度 43.686 g·L⁻¹)15 mL,放置振荡床上,调节转速 100 r·min⁻¹,分别振荡 0.5,1,1.5,2,3,4,6,9,10,12 h,计算大孔树脂的吸附量和吸附率,见图 1。结果发现约在 3 h 时树脂对土鳖虫酶解液已达最大吸附量,活性成分吸附率 97.24%,说明 DA-201C 型大孔树脂对土鳖虫酶解液具有很好的吸附能力。

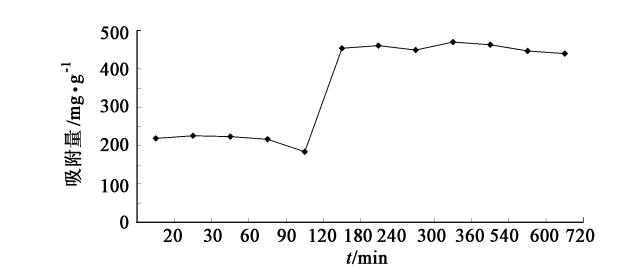


图 1 DA-201C 型大孔树脂对土鳖虫酶解液的吸附曲线

2.4 洗脱剂选择 取预处理好的 DA-201C 型大孔树脂 15 mL,共 4 份,分别置于 250 mL 量瓶中,各加入土鳖虫仿生酶解液(生药质量浓度 43.686 g·L⁻¹)15 mL,放置振荡床上,调节转速 100 r·min⁻¹,振荡 12 h,分别选择水及 75%,85%,95% 的乙醇溶液为洗脱剂,

洗脱已达吸附饱和的树脂,计算小肽洗脱率分别为 25% ,86.01% ,84.86% ,70.21%。由于土鳖虫酶解液中主要成分为小肽分子,非极性较强,水溶性不好,故采用水洗脱时洗脱率很低;95% 乙醇洗脱能力降低的原因是因为乙醇体积分数过大,造成部分物质不溶解所致。故选择 75% 乙醇为洗脱剂。

2.5 大孔树脂动态吸附工艺参数考察

2.5.1 上样液 pH 取适量预处理好的 DA-201C 型大孔树脂,装入层析柱内,测量柱体积,分别调节不同 pH(4,5,6,7,8,9)的药液上样,加水冲洗去除杂质,待电导率无变化时,加 75% 乙醇洗脱,收集洗脱液,计算大孔树脂对土鳖虫酶解液中肽分子的吸附率分别为 35.14% ,52.46% ,79.82% ,86.05% ,83.72% ,71.69%。结果表明当上样液 pH 7.0 时,大孔树脂对土鳖虫酶解液中肽分子的吸附效果最好,pH 过高和过低时吸附效果均不佳。

2.5.2 上样液质量浓度 将土鳖虫仿生酶解液配制成生药质量浓度分别为 10,20,30,40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速通过树脂柱,加水冲洗树脂柱,待电导率无变化时,加 75% 乙醇进行洗脱,收集洗脱液,计算吸附率分别为 86.05% ,83.32% ,79.83% ,79.38% ,故选择上样液质量浓度 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5.3 吸附流速与上样量 取预处理好的 DA-201C 型大孔树脂 3 份,将土鳖虫仿生酶解液稀释至 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,分别以 1,1.5,2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速通过树脂柱,以 $A_{220 \text{ nm}} = 0.05$ 为渗透点,加 75% 乙醇洗脱,收集洗脱液,结果以 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样时,吸附效果最好,此时上样液体积与树脂柱体积比 1:1。

3 讨论

在层析柱内装满 DA-201C 型大孔树脂,测量柱

体积,将土鳖虫仿生酶解液稀释至生药质量浓度 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,酶解液 pH 调节至 7.0,以 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样,至上样液与柱体积比例为 1:1 时停止上样,加水冲洗层析柱,收集洗脱液,每 25 mL 测量 1 次电导率,至电导率与水的电导率相同时停止冲洗。之后采用 75% 乙醇洗脱,收集洗脱液,分别测定土鳖虫原酶解液和水洗液的电导率,根据电导率与盐含量的关系进行折算,得水洗液中盐含量占上样酶解液盐含量的 99.1% ,表明除盐效果良好。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:18.
- [2] 刘梅,王拥军,施杞,等. 土鳖虫提取工艺研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(8):1657.
- [3] 殷书梅,吴鹏,储益平. 土鳖虫最佳提取部位及有效分子量确定[J]. 中药材,2002,25(2):126.
- [4] 王淑敏,赵学良,王本祥,等. 中药土鳖虫溶栓成分的分纯化研究[J]. 分析化学,2005,33(10):1385.
- [5] 李濯冰,张玉杰,赵韶华,等. 水蛭不同提取工艺抗凝活性比较及酶提物组成分析[A]. 中华中医药学会中药制剂分会. 全国中药创新与研究论坛学术论文集[C]. 北京:中华中医药学会,2009:6.
- [6] 陈季旺,孙勤,夏文水. 鱼降压肽的大孔吸附树脂脱盐及理化性质[J]. 食品科学,2009,30(24):158.
- [7] 黄镇林,曹唯仪,何亮颖,等. 仿生酶解法提取土鳖虫的工艺研究[J]. 中医药信息,2013,30(2):20.
- [8] 范文,阮长青,王鹤霖. DA201-C 大孔吸附树脂对腐乳多肽脱盐作用的研究[J]. 中国粮油学报,2011,26(8):105.

[责任编辑 刘德文]