

· 药剂与炮制 ·

四角蛤蜊醇沉上清液的脱盐工艺优化

冯子芳, 刘睿, 程建明, 王欣之, 陈丽叶, 程颖, 殷嘉晨, 吴皓*
(南京中医药大学 江苏省海洋药用生物资源研究与开发重点实验室,
江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023)

[摘要] 目的:优化四角蛤蜊醇沉上清液电渗析脱盐工艺,分析脱盐前后的成分变化和安全性,为该资源的研究与开发提供参考。方法:以脱盐率、含固量转移率和氨基酸(以牛磺酸、丙氨酸计)转移率为综合评价指标,通过正交试验考察上样液质量浓度、药液 pH 和脱盐时间对电渗析脱盐工艺的影响,比较四角蛤蜊醇沉上清液脱盐前后成分的变化,采用急性毒性试验评价脱盐前后的安全性。结果:四角蛤蜊醇沉上清液的最佳脱盐工艺为药液质量浓度 $34.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 药液 pH 4~5, 脱盐时间 1.5 h。脱盐率 >90%, 含固量转移率 >65%, 牛磺酸、丙氨酸保留率均 >90%。脱盐前半数致死量 (LD_{50}) $27.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 经电渗析脱盐后最大耐受量 $37.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。结论:脱盐后的四角蛤蜊醇沉上清液毒性成分、盐分显著下降,效应物质基本保留,安全性明显提高。优选的脱盐工艺稳定可行,为该资源的后续研究与开发提供了理论依据。

[关键词] 四角蛤蜊; 脱盐工艺; 综合评分; 急性毒性试验; 脱盐率

[中图分类号] R283.6; R285.5; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0001-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151229.1123.002.html>

[网络出版时间] 2015-12-29 11:23

Pharmacodynamics Investigation and Desalination Process Optimization of Ethanol Supernate of *Macra veneriformis*

FENG Zi-fang, LIU Rui, CHENG Jian-ming, WANG Xin-zhi,
CHEN Li-ye, CHENG Ying, YIN Jia-chen, WU Hao*

(*Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Jiangsu Key Laboratory of Research and Development in Marine Bio-resource Pharmaceutics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

[Abstract] **Objective:** To optimize desalination process of ethanol supernate of *Macra veneriformis*, and analyze its changes in chemical composition and safety. **Method:** Taking desalination rate, transfer rates of solid content and amino acids (in the amount of taurine and alanine) as comprehensive evaluation index, orthogonal test was adopted to optimize desalination process with the concentration of sample solution, pH of liquid and desalination time as factors. Composition changes of ethanol supernate of *M. veneriformis* before and after desalination was compared, and its safety was evaluated by acute toxicity test. **Result:** The best desalination process was as follows: sample solution concentration of $34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH of 4-5 and desalination time of 1.5 h.

[收稿日期] 20150727(008)

[基金项目] 国家海洋公益性行业科研专项(201305007,201405017);国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2013AA093003);江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD);江苏省大学生实践创新训练计划项目(201510315052Z);南京中医药大学健康产业创新项目

[第一作者] 冯子芳,在读硕士,从事海洋药物研究, Tel:15251870659, E-mail:798772485@qq.com

[通讯作者] *吴皓,博士生导师,教授,从事中药炮制学、海洋药物研究, Tel:025-85811206, E-mail:whao5795@vip.sina.com

With optimum process for desalinating, desalination rate was over 90%, transfer rate of solid content was more than 65%, retention rates of taurine and alanine were more than 90%. Lethal dose (LD_{50}) of ethanol supernate before desalination was $27.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, while after desalination with electro dialysis, the maximum tolerated dose increased to $37.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. **Conclusion:** Toxic ingredients in ethanol supernate of *M. veneriformis* after desalination reduce significantly, but at the same time, effective components still remain and safety has improved significantly. Optimized desalination process is stable and feasible, it can provide theoretical basis for further research and development of *M. veneriformis*.

[Key words] *Maetra veneriformis*; desalination process; comprehensive score; acute toxicity test; desalination rate

四角蛤蜊属于软体动物门,瓣鳃纲,真瓣鳃目,蛤蜊科^[1],其肉质鲜美、营养丰富,是沿海地区常见的食用贝类。《本草经集注》记载四角蛤蜊“煮之醒酒”。《嘉佑本草》记载其“润五脏,解酒毒”。现代研究表明四角蛤蜊水提醇沉上清液中含有核苷类、氨基酸类、糖类、不饱和脂肪酸类等成分^[2],具有降血糖、保肝、调节免疫等生物活性^[3]。四角蛤蜊软体经水煎煮、醇沉,得到上清液和粗多糖沉淀两部分,课题组前期研究表明粗多糖沉淀部分具有抗氧化、降糖和增强免疫等功效,上清液本为多糖制备工艺的废弃资源,本项目以综合利用的研发思路对其进行开发,以提高资源利用率。

前期研究发现海洋生物在提取分离过程中,无机元素如 Na^+ , K^+ , Cl^- 等离子含量较高,且经过煎煮、醇沉等系列工艺处理后,这些小分子无机盐离子和海洋生物体内的重金属可能会被进一步富集,具有一定毒性,为保证后续产品开发的安全性,需先脱离这些无机元素和重金属。四角蛤蜊醇沉上清液中主要为小分子物质,由于其相对分子质量接近,所以超滤不适合,并且其不能很好地循环利用,成本还高。离子交换是另一种报道较多的脱盐技术,课题组前期对离子交换树脂进行了考察,发现离子交换树脂用于脱盐损失大,预处理时间长且再生需要消耗大量的再生剂。电渗析过程简单、消耗化工原料少、无污染。本实验以脱盐率、含固量转移率及氨基酸(以牛磺酸、丙氨酸计)转移率^[4-5]为综合评价指标,通过正交试验优化四角蛤蜊醇沉上清液的电渗析法脱盐工艺,分析脱盐前后的成分变化和安全性,为该资源的研究开发提供参考。

1 材料

JQ-ED 型电渗析器(浙江省金华市金华金秋环保水处理有限公司),DDST-308A 型电导率仪(上海雷磁仪器厂),2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,包括 2489 型紫外检测器),PB-10 型 pH 计和

BP211D 型电子分析天平(德国 Satorius 公司),UNIQUE-s15 型超纯水机(美国 Millipore 公司),UV-7504 型紫外-可见分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司),DGG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司),R-210 型旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司),3-16pk 型高速离心机(美国 Sigma 公司)。

四角蛤蜊(江苏省海洋水产研究所,批号 20141016,经江苏省海洋水产研究所万夕和研究员鉴定为蛤蜊科动物四角蛤蜊 *Maetra veneriformis* 的新鲜软体部分),牛磺酸、丙氨酸(中国食品药品检定研究院,批号分别为 20140721,20140824),甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

ICR 小鼠,雌雄各半,清洁级,体重 $18 \sim 22 \text{ g}$,由上海斯莱克动物公司提供,合格证号 SCXK(苏)2012-0002。

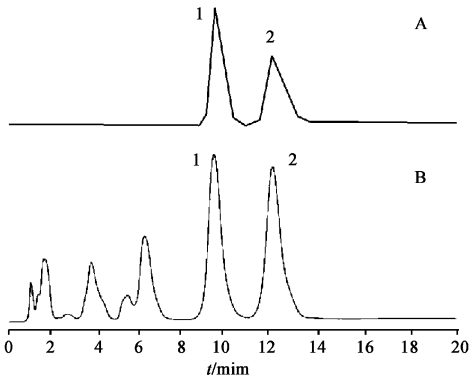
2 方法与结果

2.1 醇沉上清液的制备及电渗析脱盐 取四角蛤蜊软体,沥干后绞碎,加入 3 倍量水煎煮,每次 40 min,煎煮 2 次,滤去肉渣,合并滤液,浓缩至原软体质量的 $1/3$, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,加乙醇使醇含量至 80%,静置,抽滤,得上清提取物,浓缩回收乙醇至无醇味,得四角蛤蜊醇沉上清液,备用。取四角蛤蜊水提醇沉上清液,稀释至铁离子质量浓度 $< 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,初始电压 30 V,调至流速淡水 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$,浓水 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$,极水 $40 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 后,实验过程中浓、淡水室的流速保持一致,仪器开始运作,定时检测电导率,当脱盐达到要求,收集样品液。

2.2 指标性成分的测定

2.2.1 色谱条件^[6] 以邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生化结合 HPLC-UV 测定牛磺酸、丙氨酸含量。Kromasil C₁₈ 色谱柱(2.5 mm × 50 mm, 5 μm),流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 2 μL,流动相甲醇-0.05 mol·L⁻¹ 乙酸钠溶液(pH 6.0,冰乙酸调制)(23:77),检

测波长 330 nm, 柱温 40 ℃。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 牛磺酸; 2. 丙氨酸

图 1 四角蛤蜊醇沉上清液 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of ethanol supernate of *Mactra veneriformis*

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称定牛磺酸、丙氨酸对照品各 100 mg, 加水制成 1 g·L⁻¹ 的溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取四角蛤蜊水提醇沉上清液 1 mL, 加水稀释至 100 mL, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入 OPA 衍生试剂 1 mL, 摇匀, 室温反应 1.5 min, 立即加入 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾终止液 1 mL, 摇匀, 加甲醇定容至刻度, 即得。

2.2.4 标准曲线的绘制 取 2.2.2 项下混合对照品溶液逐级稀释, 精密吸取 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中, 加水定容, 摇

匀, 配成 0.008, 0.01, 0.02, 0.04, 0.1 g·L⁻¹ 的系列对照品溶液, 平行 3 份。按 2.2.3 项下方法进行衍生化反应, 按 2.2.1 项下条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得牛磺酸和丙氨酸回归方程分别为 $Y = 7\,901.5X - 39\,613$ ($r = 0.999\,9$), $Y = 6\,386.5X - 6\,417.5$ ($r = 0.999\,7$), 线性范围分别为 8.056 ~ 100.7, 8.144 ~ 101.8 mg·L⁻¹。

2.2.5 精密度试验 取牛磺酸、丙氨酸混合对照品溶液, 按 2.2.3 项下方法进行衍生化反应, 按 2.2.1 项下条件连续进样 6 次, 计算峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取 2.2.3 项下供试品溶液, 平行 6 份, 按 2.2.1 项下条件测定, 结果牛磺酸、丙氨酸含量的 RSD 分别为 1.6%, 1.8%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 0.5, 1, 1.5, 2 h 按 2.2.1 项下条件进样, 观察测定时间对待测物稳定性的影响。结果 2 h 内牛磺酸、丙氨酸峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 2.4%, 表明 2 h 内衍生物是稳定的。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的样品 6 份, 分别加入牛磺酸、丙氨酸对照品储备液适量, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下条件测定, 结果牛磺酸、丙氨酸平均回收率分别为 98.96%, 97.50%, RSD 分别为 1.6%, 1.2%, 表明该方法回收率符合要求。见表 1。

表 1 牛磺酸、丙氨酸加样回收率试验

Table 1 Recovery test of taurine and alanine

样品中量/g		加入量/g		测得量/g		回收率/%		平均值/%		RSD/%	
牛磺酸	丙氨酸	牛磺酸	丙氨酸	牛磺酸	丙氨酸	牛磺酸	丙氨酸	牛磺酸	丙氨酸	牛磺酸	丙氨酸
505.44	613.35	601.36	602.36	1 114.58	1 204.91	101.29	98.21				
508.32	616.58	602.99	601.24	1 096.60	1 211.94	97.56	99.02				
510.27	612.05	606.12	606.33	1 116.90	1 198.01	100.08	96.64	98.96	97.50	1.6	1.2
509.04	610.37	604.21	601.26	1 109.74	1 196.55	99.42	97.49				
502.66	609.96	603.14	600.45	1 094.69	1 197.27	98.16	97.81				
501.59	607.53	599.24	607.17	1 084.49	1 189.44	97.27	95.84				

2.2.9 样品测定 分别取混合对照品溶液和供试品溶液 2 μL, 按上述方法测定样品中牛磺酸、丙氨酸的含量。

2.3 电渗析脱盐工艺的优化

2.3.1 单因素试验^[7] 为优化电渗析脱盐工艺, 查阅相关文献, 对影响四角蛤蜊醇沉上清液脱盐工艺的各因素进行单因素试验考察, 包括上样量、

上样液浓度、电压、药液 pH 和脱盐时间等, 发现电压对有效成分的影响不大, 主要影响脱盐效率; 上样体积确定时, 上样量和上样液浓度相关。综合考虑, 选择上样液浓度、药液 pH 和脱盐时间为考察因素。

2.3.2 正交试验 选取药液浓度、药液 pH 和脱盐时间为考察因素, 以脱盐率^[8]、含固量转移率和氨

基酸(以牛磺酸、丙氨酸计)转移率的综合评分为指标,取 2.1 项下四角蛤蚧水提醇沉上清液 9 份,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,试验安排及结果见表 2。脱盐率 = $[(T_{d_{in}} - T_{d_{out}})/T_{d_{in}}] \times 100\%$, 式中 $T_{d_{in}}$, $T_{d_{out}}$ 分别为电渗析器进口、出口电导率值。含固量转移率 = 样品室的含固量/初始上样液的含固量。

表 2 四角蛤蚧醇沉上清液电渗析脱盐工艺正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis of electro dialysis desalination process of ethanol supernate of *Mactra veneriformis*

No.	A 药液质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	B 药液 pH	C 脱盐时间/h	D(空白)	脱盐率/%	含固量转移率/%	氨基酸转移率/%	综合评分
1	34.0	4.95	1.5	1	93.28	64.88	188.38	97.59
2	34.0	6.00	2.0	2	96.81	60.09	174.11	94.53
3	34.0	7.00	2.5	3	96.80	62.22	170.58	94.94
4	17.0	4.95	2.0	3	99.06	52.55	141.78	86.80
5	17.0	6.00	2.5	1	98.96	55.03	164.81	91.57
6	17.0	7.00	1.5	2	95.73	57.15	168.30	91.81
7	8.5	4.95	2.5	2	99.26	50.00	138.58	85.19
8	8.5	6.00	1.5	3	98.20	58.58	166.36	93.15
9	8.5	7.00	2.0	1	98.72	55.90	143.96	88.56

表 3 综合评分的方差分析

Table 3 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	MS	F	P
A	120.227	60.114	44.861	<0.05
B	22.266	11.133	8.308	>0.05
C	60.813	30.407	22.691	<0.05
D(误差)	2.68	1.34		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ 。

由直观分析可知,各因素影响作用大小顺序为 $A > C > B$ 。方差分析表明因素 A, C 均为主要影响因素,具有显著性,因素 B 则无显著性差异,故药液质量浓度选取 $34 g \cdot L^{-1}$,脱盐时间定为 1.5 h,而因素 B 影响不大,从工业生产和降低物耗方面考虑,就不调 pH,选择原液上样,得最佳脱盐工艺为 $A_1 B_1 C_1$ 。pH 4.95 是原液的 pH,单因素试验中考察的 pH 范围为 4~9,其中 pH 4~5 最优且脱盐率和各有效成分的保留相差不大,故工业生产放大时, pH 4~5 即可。

取四角蛤蚧水提醇沉上清液,稀释至 $34 g \cdot L^{-1}$,共 3 份,按最佳脱盐工艺进行验证试验,结果平均脱盐率 92.85% (RSD 1.8%),含固量转移率平均值 65.34% (RSD 0.7%),原液中牛磺酸、丙氨酸质量分别为 13.406, 14.978 g,经电渗析脱盐后,醇沉上

评分时以各指标的试验最大值为参照将数据进行归一化处理,给以不同权重^[9]。考虑到实验的主要目的是脱盐,故脱盐率的权重系数 0.4;含固量是衡量成分保留的重要因素,牛磺酸和丙氨酸是报道具有保肝活性的物质,故二者权重系数均为 0.3,方差分析见表 3。

清液中牛磺酸、丙氨酸质量分别为 12.786, 14.438 g (RSD 分别为 1.4%, 2.6%),表明该工艺稳定可行、重复性好。

2.4 脱盐前后成分变化 取验证试验的醇沉上清液 3 份,参考文献[10],比较脱盐前后的主要成分变化,计算脱盐率 93.93%,脱盐前后盐分质量分数分别为 27.14%, 2.75%,含固量转移率 65.18%,糖转移率 75.62%,氨基酸转移率 84.28%,说明脱盐后盐分大大下降,各有效物质基本保留。

2.5 脱盐前后安全性评价 取四角蛤蚧水提醇沉上清液,稀释至铁离子质量浓度 $< 0.3 mg \cdot L^{-1}$,药液质量浓度 $34 g \cdot L^{-1}$,初始电压 30 V,用电导 $3 \sim 8 ms \cdot cm^{-1}$ 的 0.5% 氯化钠溶液作为循环液,仪器开始运作,脱盐时间 1.5 h,收集样品液,备用。

2.5.1 急毒试验^[11] 参照《中药药理研究方法学》,将未脱盐的四角蛤蚧醇沉上清液浓缩至刚好通过灌胃针头作为最大浓度,按最大给药量进行灌胃,取健康 ICR 小鼠 60 只,试验前小鼠禁食不禁水 16 h,分组,每组 10 只,各组给药剂量分别为 39.61, 33.67, 28.62, 24.33, 20.68, 17.58 $g \cdot kg^{-1}$ 。给药后观察动物的死亡情况,给药 4 h 后,各组剩余小鼠数量分别为 0, 2, 5, 7, 9, 10 只。根据 Bliss 法及计算公式,得半数致死量 (LD_{50}) 27.18 $g \cdot kg^{-1}$, 100% 致死

量(LD_{100}) $39.61 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 安全剂量(LD_0) $17.58 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 95%可信区间 $24.919 \sim 29.677 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.5.2 最大耐受量试验 经电渗析脱盐后,四角蛤蜊水提醇沉上清液未测出 LD_{50} ,测得小鼠最大耐受量 $34.78 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,折合四角蛤蜊软体为 $999.87 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。取 ICR 小鼠 40 只,雌雄各半,随机分为试验组与空白组,每组 20 只,试验组灌胃脱盐后的四角蛤蜊醇沉上清液,空白组给予等量生理盐水,给药后观察小鼠行为、活动情况,若有死亡,解剖后肉眼观察各主要脏器有无异常改变,连续观察 14 d。小鼠给药量倍数[每只小鼠的耐受药量/小鼠平均体重(20 g)] \times [(成人平均体重(60 kg)/成人每日用量)],即小鼠给药量相当于临床每日用药量的 738 倍。

3 讨论

海水是高盐溶液,其中约 90% 是氯化钠,因此生长在海水环境中的海洋生物,其体内的无机盐类成分远高于陆地生物,为海洋生物医药产品的研究开发带来困难,故需要选择合理、合适的脱盐方法。脱盐工艺广泛应用于食品医药、纯水制备和废水处理^[12]等领域,常见的脱盐方法有电渗析技术、离子交换技术、反渗透膜技术等。

前期研究发现四角蛤蜊醇沉上清液具有保肝活性,其效应物质可能是小分子糖、氨基酸、核苷等,而单因素试验表明脱盐前后氨基酸比糖及核苷含量变化大,因此在设计正交试验时,选取氨基酸为考察指标。可能是由于氨基酸类是两性物质,在电场作用下容易发生迁移,造成了少量的损失,因此,以氨基酸转移率为指标优化四角蛤蜊醇沉上清液的电渗析脱盐工艺,可减少氨基酸类效应物质的损失。而上清液中氨基酸含量以丙氨酸、牛磺酸较高,且二者都是报道有保肝活性的物质,故选择二者作为电渗析脱盐的评价指标。

四角蛤蜊醇沉上清液在脱盐前,其 LD_{50} $27.18 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,具有一定毒性,经脱盐后,盐质量分数由 27.14% 降到 2.75%,盐分大量脱除,未测出 LD_{50} ,最大耐受量 $34.78 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,按等效剂量^[13]折算,相当于临床人日用量的 738 倍,因此,该制剂经

试验证实是安全的,为相关功能性保健产品的开发提供了实验基础与理论依据,为海洋提取物研究开发过程中的脱盐关键技术提供了参考方法。

[参考文献]

- [1] 郑文文,王令充,吴皓,等.四角蛤蜊粗多糖的免疫调节作用研究[J].中国药师,2011,14(2):151-154.
- [2] 嵇晶.四角蛤蜊小分子抗氧化物质研究[D].南京:南京中医药大学,2012.
- [3] 刘睿,吴皓,程建明,等.江苏沿海低值贝类资源综合利用现状与展望[J].南京中医药大学学报,2015,31(1):93-96.
- [4] 周建伟,周炯亮,庄志雄.牛磺酸对四氯化碳所致肝损伤保护作用的探讨[J].卫生毒理学杂志,1995,9(4):231-235.
- [5] 曹雯,廖明,周燕,等.牛磺酸、表没食子儿茶素没食子酸酯和三羟基异黄酮联合用药对肝纤维化大鼠的治疗作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(4):107-111.
- [6] 李娜,王欣之,吴皓,等.江苏东部沿海四种低值贝类软体中牛磺酸动态积累规律与适宜采收期研究[J].食品工业科技,2015,36(3):54-59.
- [7] 李娟,陈振,郑之明,等.双极膜电渗析分离发酵液中 L-乳酸[J].生物加工工程,2009,7(6):45-50.
- [8] 于丽,王厚伟,徐凌川.正交试验优化再生丝素的醇沉脱盐工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):45-47.
- [9] 张岩,高学理,杨洋.基于电渗析技术的氨基酸发酵母液脱盐方法[J].食品与发酵工业,2013,39(10):97-100.
- [10] 鲍晓东,赵金平,连胜利.正交试验法分析平帕汤治疗帕金森病的最佳配伍比例[J].中医杂志,2013,54(20):1774-1777.
- [11] 陈奇.中药药理研究方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2011:118.
- [12] 关莹.电渗析法深度处理农药生产废水[D].南京:南京理工大学,2014.
- [13] 谢秀琼,张世臣.中药新制剂开发与应用[M].3版.北京:人民卫生出版社,2006:41-43.

[责任编辑 刘德文]