

鳖甲活性多肽的提取及膜分离纯化工艺优选

李水清, 孔菲菲, 张方蕾, 叶晓川*, 刘焱文
(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

[摘要] **目的:** 优选鳖甲活性多肽的提取工艺及膜分离工艺。**方法:** 以多肽提取量和浸膏得率为指标, 通过正交试验考察料液比、提取时间、提取次数对鳖甲多肽提取工艺的影响; 以膜渗透通量或膜效能为指标, 运用单因素试验优选鳖甲活性多肽的膜分离工艺。**结果:** 最佳提取工艺为醋鳖甲粉碎过 24 目筛, 加 6 倍量水提取 3 次, 每次 3 h; 多肽提取量达 2.442 g, 浸膏得率 11.71%。膜分离纯化条件为鳖甲多肽质量分数 6%, 截留相对分子质量 20,8 kD 的超滤膜操作压力分别为 0.18~0.21、0.8 MPa; 蛋白质截留率 83.67%, 相对分子质量 < 8 000 的鳖甲多肽纯度达 57.62%。**结论:** 膜分离技术可用于鳖甲活性多肽的制备。

[关键词] 鳖甲; 多肽; 提取工艺; 膜分离工艺; 正交试验; 渗透通量; 膜效能

[中图分类号] R284.2; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0011-04

[doi] 10.11653/syfy2014020011

Optimization of Extraction and Membrane Separation Technology for Active Polypeptides in Trionycis Carapax

LI Shui-qing, KONG Fei-fei, ZHANG Fang-lei, YE Xiao-chuan*, LIU Yan-wen
(Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and membrane separation technology of active polypeptides in Trionycis Carapax. **Method:** With extract yield and extraction amount of total polypeptides as evaluation indexes, orthogonal test was employed to optimize extraction process of polypeptides in Trionycis Carapax by taking solid-liquid ratio, extraction time and times as factors. Single factor tests were adopted to investigate membrane separation technology of active polypeptides in Trionycis Carapax with membrane permeation flux or efficacy as index. **Result:** Optimum extraction technology was as following: smashed vinegar Trionycis Carapax through a 24 mesh sieve, extracted three times with six-fold the amount of water for 3 hours each time; Extract yield was 11.71% and extraction amount of total polypeptides was up to 2.442 g. Membrane separation conditions were as follows: The concentration of polypeptides in Trionycis Carapax extract 6%, operating pressure of ultrafiltration membrane with relative molecule weight cut off of 20 and 8 KD running at 0.18-0.21 and 0.8 MPa, respectively; Under these operating conditions, retention rate of protein was 83.67%, purity of polypeptides (relative molecular mass < 8 000) in Trionycis Carapax achieved 57.62%. **Conclusion:** Membrane separation techniques could be used for preparation of active polypeptides in Trionycis Carapax.

[Key words] Trionycis Carapax; polypeptides; extraction process; membrane separation technology; orthogonal test; permeation flux; membrane efficacy

[收稿日期] 20130624(013)

[基金项目] 武汉市科技攻关计划项目(201260523194)

[第一作者] 李水清, 博士, 主任药师, 从事中药化学物质基础研究, Tel:027-88920834, E-mail:wuhankff@sina.cn

[通讯作者] * 叶晓川, 博士, 研究员, 从事中药药效物质基础及质量评价研究, Tel:027-88920834, E-mail:yxxc1965@163.com

鳖甲始载于《神农本草经》，具有滋阴潜阳、软坚散结、退热除蒸的功效，主治阴虚发热、症瘕、虚风内动等症^[1]。现代药理研究证实鳖甲提取物具有明显抗肝纤维化作用，临床用于治疗肝纤维化疾患疗效良好^[2-4]。前期研究曾对鳖甲抗肝纤维化的有效物质进行分析，结果显示鳖甲水提液中相对分子量 < 6 000 的肽类成分具有显著的抗肝纤维化作用^[5]。本实验采用正交试验优选鳖甲多肽的提取工艺，以膜渗透通量、膜效能为指标筛选膜分离条件，确定鳖甲抗肝纤维化活性部位的纯化工艺，为鳖甲活性部位的新药开发提供实验依据。

1 材料

UV-2401 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), WTM-1812D 型膜分离实验设备(杭州沃腾膜工程有限公司), GZX-9146 型数显鼓风干燥箱(上海博讯实业公司), JA-5003 型电子天平(上海右一仪器有限公司)。鳖甲(湖北九州通医药集团股份有限公司, 经湖北中医药大学药学院吴和珍教授鉴定为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲), 双缩脲试剂盒(南京建成生物工程研究所), 水为纯净水或去离子水, 所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 多肽含量测定 采用双缩脲法, 按试剂盒说明测定。

2.2 鳖甲多肽提取工艺优选^[6] 称取鳖甲 25.0 g, 共 9 份, 选择料液比、提取时间、提取次数为考察因素, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 合并提取液, 加水定容至 500 mL, 以浸膏得率及多肽提取量为考察指标, 优选鳖甲多肽的提取工艺条件, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3, 4。

表 1 鳖甲多肽水提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 提取时间/h	C 提取数/次
1	1:6	1	1
2	1:8	2	2
3	1:10	3	3

由直观分析可知, 各因素对多肽提取量的影响顺序为 $B > C > A$, 方差分析表明因素 B, C 对鳖甲多肽提取效果的影响具有显著性差异, 因素 A 则无显著影响。各因素对浸膏得率的影响顺序为 $C > B > A$, 方差分析表明仅因素 C 对浸膏得率的影响具有显著性差异, 其他因素则无显著影响, 故确定鳖甲多肽的最佳提取条件为 $A_1B_3C_3$, 即加 6 倍量水提取 3 次, 每次 3 h。称取鳖甲 3 份, 每份 25 g, 按优选的工

艺条件进行 3 次验证试验, 结果多肽平均提取量 2.442 g (RSD 3.06%), 浸膏平均得率 11.71% (RSD 0.64%)。

表 2 鳖甲多肽水提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D (空白)	多肽提取量/g	浸膏得率/%
1	1	1	1	1	2.155	10.03
2	1	2	2	2	2.316	11.59
3	1	3	3	3	2.499	13.01
4	2	1	3	2	2.227	12.25
5	2	2	1	3	2.169	11.05
6	2	3	2	1	2.332	12.28
7	3	1	2	3	2.204	11.69
8	3	2	3	1	2.360	12.69
9	3	3	1	2	2.260	11.28
多肽提取量	K_1	2.323	2.195	2.195	2.282	
	K_2	2.243	2.282	2.284	2.269	
	K_3	2.275	2.364	2.362	2.291	
	R	0.080	0.169	0.167	0.023	
浸膏得率	K_1	11.543	11.323	10.787	11.667	
	K_2	11.860	11.777	11.853	11.707	
	K_3	11.887	12.190	12.650	11.917	
	R	0.344	0.867	1.863	0.250	

表 3 多肽提取量方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.010	2	12.168	>0.05
B	0.043	2	52.256	<0.05
C	0.042	2	51.705	<0.05
D(误差)	0.001	2		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ (表 4 同)。

表 4 浸膏率方差分析

误差来源	SS	f	F	P
A	2.189×10^{-5}	2	2.023	>0.05
B	0	2	10.420	>0.05
C	0.001	2	48.470	<0.05
D(误差)	1.082×10^{-5}	2		

2.3 鳖甲多肽膜分离工艺

2.3.1 微滤 为了防止大颗粒悬浮杂质及大分子蛋白污染超滤膜, 超滤前经过 0.3 μm 微滤膜预处理。将鳖甲提取液用水稀释, 于 25 $^{\circ}\text{C}$, 0.2 MPa 的条件下微滤, 待药液微滤至加入量的 80% 时, 向截留液中加入适量水, 搅拌, 继续微滤, 待微滤液收集

至体积等于药液加入量时,停止微滤^[7-8]。

2.3.2 操作压力对渗透通量的影响 由于鳖甲提取液中含有大量大分子蛋白,为了防止膜孔堵塞或膜损害,采用截留相对分子质量 20 kD 的膜超滤。固定提取液中鳖甲多肽质量分数 4%,超滤时间 1 h,温度 25 ℃时,考察操作压力 0.15,0.18,0.21,0.24 MPa 对膜渗透通量的影响,结果见图 1。表明在不同时间段内,操作压力越高,膜渗透通量越大;超滤开始后,随着时间的延长,渗透通量下降,原因是浓差极化形成的凝胶层污染了膜;当操作压力过大时,除增加耗能外,超滤过程形成的凝胶层厚度和致密度均增加,加重膜的污染,故超滤压力选择 0.18 ~ 0.21 MPa^[9]。

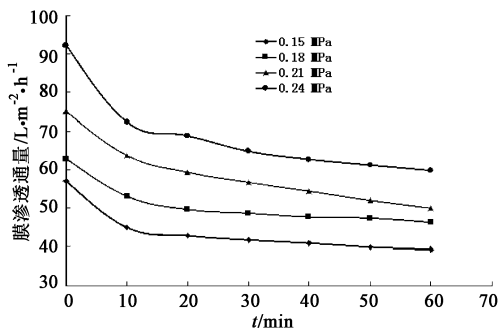


图 1 操作压力对鳖甲多肽超滤渗透通量的影响

2.3.3 鳖甲多肽质量分数对渗透通量的影响 鳖甲多肽质量分数越大,黏度越大,扩散系数越小,超滤膜表面易形成浓差极化和凝胶层,使膜通量减小。固定操作压力 0.18 MPa,温度 25 ℃,超滤时间 60 min,考察鳖甲多肽质量分数分别为 2%,4%,6%,8% 时对超滤膜(截留相对分子质量 20 kD)渗透通量的影响,结果见图 2,表明膜渗透通量随多肽质量分数的升高而降低,当质量分数达 8% 时,渗透通量在较短时间内即可达到相对稳定状态。以单位时间单位膜面积滤出液中多肽含量为评价膜效能的指标,膜效能分别为 0.307,0.655,0.845,1.011 $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$,显示膜效能与渗透通量的变化趋势正好相反。试验过程中发现当鳖甲多肽质量分数过高时,会出现膜组件温度升高的现象,对膜有损害,为了减少膜污染,提高生产效率,同时减少后期浓缩的时间和成本,选择提取液中鳖甲多肽质量分数 6%^[9-10]。

2.3.4 二级超滤 利用截留相对分子质量 20 kD 的超滤膜按优选的工艺条件进行超滤后,继续用截留相对分子质量 8 kD 的膜对滤液进行二级超滤。操作条件为鳖甲多肽质量分数 6%,压力 0.8 MPa,温度 25 ℃。鳖甲提取液经微滤及多级超滤后,截留了大部分相对分子质量 >8 000 的蛋白多肽,透过液

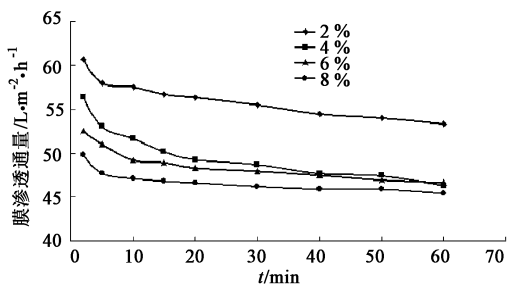


图 2 提取液中鳖甲多肽质量分数对超滤膜渗透通量的影响

颜色变浅,透明澄清。利用双缩脲法测定鳖甲提取液膜分离前后多肽含量,结果表明蛋白质截留率 83.67%,相对分子质量 <8 000 的鳖甲多肽纯度 57.62%,分离效果较为理想。

2.3.5 膜的清洗 由于鳖甲提取液中含有大量的蛋白质,操作一定时间后,超滤膜表面会吸附一定量蛋白质,形成凝胶层,使膜通量下降,故必须定期进行膜清洗。清洗时,先用水冲洗约 20 min,至透过液无色无味后用 0.1% 氢氧化钠循环洗 20 min,水洗至透过液为中性,经清洗后,膜通量恢复至原来的 92.2%,可达到理想的清洗效果。

3 讨论

预试验曾对鳖甲不同粉碎粒度(分别过 24,50,80 目筛)进行考察,结果表明鳖甲粉碎后提取液中多肽含量高于未粉碎直接提取,其中粉碎过 80 目筛的鳖甲多肽含量最高,但与粉碎过 24,50 目的差别不大,故选择将鳖甲粉碎过 24 目筛后回流提取。

传统医学治疗肝病时,采用醋制鳖甲入药,醋制入肝、肾经,鳖甲砂炒醋淬后,质地酥脆,能增强药物入肝消积,软坚散结的作用。前期研究发现醋鳖甲和生鳖甲均具有抗肝纤维化作用,但醋鳖甲的药效优于生鳖甲,可能是鳖甲经过高温醋淬后,部分大分子蛋白变性为活性小分子肽类物质,从而有利于增强鳖甲抗肝纤维化的作用,本文所使用的鳖甲均为醋鳖甲。

预试验发现二级超滤若直接选用截留相对分子质量 6 kD 的超滤膜,容易由于滤孔堵塞而导致活性成分的损失,故选择 8 kD 超滤膜。若不采用多级超滤,而直接选择截留相对分子质量 8 kD 超滤膜,则大分子蛋白易沉积在膜表面,阻塞膜孔,增加扩散阻力,造成通量下降;为了降低超滤对膜的污染,同时保证超滤膜的分离特性和渗透通量并克服浓差极化,最终选用多级超滤。

[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,2010:361.

黄芩苷纳米结晶的制备工艺

张秋菊¹, 洪彤彤¹, 魏世杰^{1,2}, 隋宏^{1,3}, 王文革^{1,3*}

(1. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学附属总医院临床药理研究室, 银川 750004;
3. 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 银川 750004)

[摘要] 目的: 优选黄芩苷纳米结晶的制备工艺并考察其稳定性。方法: 以粒径及多分散系数(PDI)为指标, 采用单因素试验优选黄芩苷纳米混悬液的制备工艺; 经离心富集和冷冻干燥制备黄芩苷纳米结晶, 观察结晶形态, 比较混悬液与冻干粉的初步稳定性; 采用摇瓶法测定平衡溶解度。结果: 最佳制备工艺为黄芩苷溶于二甲基亚砜中配成 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 注入20倍量0.5%卵磷脂水溶液中, 冰水浴下 $30\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速剪切8 min; 制备的纳米混悬液粒径 280.6 nm (PDI=0.047), 纳米结晶粒径 583.6 nm (PDI=0.12), 结晶呈类球形; 室温放置30 d后混悬液粒径急剧增大, 而冻干粉粒径无明显变化。纳米结晶溶解度较原药提高了1.64倍。结论: 沉淀法制备黄芩苷纳米混悬液简便可行且可显著提高纳米结晶中黄芩苷的溶解度, 但工艺条件对纳米结晶粒径及稳定性存在一定影响。

[关键词] 黄芩苷; 纳米结晶; 沉淀法; 稳定性考察; 冷冻干燥工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0014-05

[doi] 10.11653/syfy2013240014

Preparation Technology of Baicalin Nanocrystallines

ZHANG Qiu-ju¹, HONG Tong-tong¹, WEI Shi-jie^{1,2}, SUI Hong^{1,3}, WANG Wen-ping^{1,3*}

(1. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Institute of Clinical Pharmacology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

3. Ningxia Engineering & Technology Research Center For
Modernization of Hui Medicine, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation process of baicalin nanocrystallines and investigate its stability. **Method:** Taking mean particle size and polydispersity index (PDI) as indicators, preparation process of

[收稿日期] 20131022(012)

[基金项目] 2011年宁夏自然科学基金项目(NZ11103)

[第一作者] 张秋菊, 在读硕士, 从事新型载药材料及给药系统研究, Tel: 13629501070, E-mail: zhangqiuju00@126.com

[通讯作者] *王文革, 博士, 副教授, 从事新型载药材料及给药系统研究, Tel: 0951-6880581, E-mail: wangwenpingg@sina.com

[2] 王英凯, 王丹, 唐彤宇. 鳖甲为主的中药治疗肝纤维化的实验室和临床研究[J]. 临床肝胆病杂志, 2002, 18(4): 253.

[3] 高建蓉, 陶君, 张赤志, 等. 鳖甲防治肝纤维化实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(11): 2462.

[4] 姚立, 姚真敏, 余涛. 鳖甲煎口服液对大鼠肝纤维化的影响[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(6): 5.

[5] 高建蓉, 张赤志, 邵志华, 等. 鳖甲对肝星状细胞增殖影响的研究[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(11): 16.

[6] 周大寨, 朱玉昌, 周毅锋, 等. 芸豆蛋白质的提取及超滤分离研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 386.

[7] 郑领英, 王学松. 膜技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 48.

[8] 王爱华. 微滤-超滤法与醇沉法在山楂水提取液精制中的比较[J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(3): 30.

[9] 盛占武, 孙志高, 黄学根, 等. 超滤法提取橙皮苷工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 188.

[10] 蒋菁莉, 任发政, 蔡华伟. 牛乳酪蛋白降血压肽的超滤分离[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 124.

[责任编辑 全燕]