

# 蜚螂中间体的大孔树脂纯化工艺优选及检测

谭承佳<sup>1</sup>, 马家骅<sup>2,3\*</sup>, 蒋巧梅<sup>3,4</sup>, 杨明<sup>3</sup>

(1. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621000; 2. 西南科技大学, 四川 绵阳 621010;  
3. 成都中医药大学, 成都 611137; 4. 四川升和药业股份有限公司, 成都 611130)

**[摘要]** 目的: 优选蜚螂提取物的 DA201-C 型大孔树脂纯化工艺。方法: 采用单因素试验考察 DA201-C 型树脂的吸附性能和影响纯化工艺的 pH、洗脱剂、上柱流速等因素; 采用氨基酸自动分析仪检测纯化后的中间体。结果: 最佳纯化工艺条件为上样液质量浓度  $17.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 吸附流速  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , pH 4.0, 依次用 1 BV 水和 4 BV 70% 乙醇洗脱, 脱盐率达 98.81%, 多肽回收率达 87.39%, 所得醇洗脱物含结合型氨基酸(多肽)32.26%。结论: 该工艺分离效果较好, 可用于蜚螂中间体的脱盐与纯化。

**[关键词]** 蜚螂; DA201-C 大孔树脂; 脱盐; 氨基酸; 多肽

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0008-03

**[doi]** 10.11653/syjf2013110008

## Optimization and Detection of Purification Technology for Intermediates of *Catharsius molossus* by Macroporous Resin

TAN Cheng-jia<sup>1</sup>, MA Jia-hua<sup>2,3\*</sup>, JIANG Qiao-mei<sup>3,4</sup>, YANG Ming<sup>3</sup>

(1. Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China;  
2. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;  
3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;  
4. Sichuan Sunnyhope Pharmaceutical Co. Ltd, Chengdu 611130, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize purification technology of *Catharsius molossus* extract by DA201-C macroporous resin. **Method:** Single factor test was adopted to evaluate absorption capacity of DA201-C macroporous resin and some factors affecting purification technology, such as pH, eluting agent, flow rate and other factors. Automatic amino acid analyzer was used to analyze purified intermediates. **Result:** The best purification technology were as follows: the concentration of the sample solution  $17.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , adsorption rate  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , pH of the sample solution 4.0, eluted by 1 BV of deionized water and 4 BV of 70% ethanol, respectively. Desalination rate was up to 98.81%, the recovery rate of peptides in intermediates of *C. molossus* was up to 87.39%, the total content of bound amino acids (polypeptides) in alcohol eluate was 32.26%. **Conclusion:** This technology was simple, feasible and could be used for desalination and purification of intermediates of *C. molossus*.

**[Key words]** *Catharsius molossus*; DA201-C macroporous resin; desalination; amino acids; polypeptides

蜚螂为鞘翅目金龟子科昆虫屎壳螂 *Catharsius molossus* Linnaeus 的干燥体, 又名屎壳郎、推屎爬、铁

甲将军等, 首载于《神农本草经》, 后为历代本草收载, 具有较好的活血化瘀、破癥之功<sup>[1-3]</sup>, 临床常用

**[收稿日期]** 20121228(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30902005); 绵阳市科技计划项目(11F020)

**[第一作者]** 谭承佳, 在读博士, 讲师, 从事中药新制剂与天然产物开发研究, Tel:0816-6089531, E-mail: meditanjia@126.com

**[通讯作者]** \* 马家骅, 博士, 副教授, 从事中药药剂学研究, Tel:0816-6089531, E-mail: jiahuama@163.com

于治疗前列腺增生症。课题组通过前期药效物质基础研究<sup>[4-6]</sup>,推断其药效组分可能为多肽等生物活性物质,但蛻螂作为动物药,成分复杂,且产地常采用盐水烫制法进行加工,使得药材中含有大量无机盐,影响对其提取物生物活性的分析、药效物质基础的筛选、后续制剂的研究,故有必要对蛻螂提取液进行脱盐与纯化。查阅文献发现,大孔吸附树脂对蛋白质、酶、多肽等化合物的脱盐与纯化效果较好<sup>[7-9]</sup>,因此,本实验选择脱盐效果好、活性组分保留率高的 DA201-C 型大孔吸附树脂对蛻螂提取液的脱盐与纯化工艺进行研究,为动物类药材中蛋白质多肽的分离纯化提供实验依据。

## 1 材料

FA1104 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),DBS-1000 型电脑全自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂),SHZ-88 型台式水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂),UV-1700 型紫外-可见分光光度仪(日本岛津公司)。

蛻螂购于成都五块石中药材市场,经成都中医药大学杨明教授鉴定为鞘翅目金龟子科昆虫屎壳螂 *Catharsius molossus* Linnaeus 的干燥体。牛血清白蛋白 V 对照品(瑞士 Roche 公司,批号 A8020),DA201-C 型大孔树脂(江苏苏青水处理工程集团有限公司),水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取牛血清白蛋白对照品 0.254 1 g,置 5 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

### 2.2 含量测定

**2.2.1 多肽** 采用紫外分光光度法于 280, 260 nm 光吸收差法<sup>[10]</sup>或双缩脲法<sup>[11]</sup>来测定。后者步骤为精密量取各待测液适量置玻璃试管中,加水至 2.0 mL,加双缩脲试剂 4.0 mL,混匀,置 37 °C 水浴中 30 min,以相应溶剂为空白,照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2005 年版三部附录 II A),于 540 nm 处测定吸光度(A),计算多肽的含量。

**2.2.2 盐** 参照《中国药典》2010 年版二部氯化钠含量测定项下规定<sup>[12]</sup>。

**2.3 蛻螂提取液的制备** 取蛻螂粗粉用 85% 乙醇渗漉,收集漉液,回收乙醇,浓缩,冷藏除脂,即得。

**2.4 树脂的预处理** 将一定量 DA201-C 型树脂先用无水乙醇浸泡 24 h,使其充分溶胀,用去离子水洗净后充分漂洗至无醇味,抽滤,备用。

### 2.5 DA201-C 型大孔树脂静态吸附与解吸附试验

**2.5.1 静态吸附试验** 取处理好的树脂 3 份,分别置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入蛻螂提取液 15 mL,将其中 2 份提取液的 pH 分别调至 4.0,8.0,塞紧,置恒温振荡器中振荡过夜(160 r·min<sup>-1</sup>),滤过,收集滤液,测定多肽含量和含盐量。结果树脂的吸附率分别为 87.27% (pH 4.0),84.72% (pH 6.7,原液),83.14% (pH 8.0);吸附容量依次为 228.8,222.1,217.9 mg·g<sup>-1</sup>;脱盐率分别为 94.79%,91.03%,92.61%。说明在制备上样液时,可将蛻螂提取液(多肽质量浓度 17.60 g·L<sup>-1</sup>)pH 调至 4.0,按每克树脂约吸附 7.5 mL 上柱。

**2.5.2 静态洗脱试验** 将吸附上蛻螂提取液的树脂过滤,抽干,分别加不同体积分数(50%,70%,85%)的乙醇溶液 30 mL 洗脱,振荡 4 h 后,分别取各洗脱液适量,测定多肽含量和含盐量,计算不同洗脱剂对蛻螂多肽的洗脱率分别为 68.99%,80.71%,81.16%,故选择 70% 乙醇为洗脱剂。

### 2.6 DA201-C 型大孔树脂动态吸附与洗脱试验

**2.6.1 动态吸附试验** 取处理过的 DA201-C 型大孔树脂装入 2.0 cm × 30 cm 玻璃柱中,于室温条件下,取 pH 4.0 蛻螂提取液上柱,分别以 1,2,3 BV·h<sup>-1</sup> 的流速流经树脂柱,待检出多肽时停止上样,记录上柱量,测定流出液中多肽的含量。结果吸附容量分别为 224.6,221.9,216.4 mg·g<sup>-1</sup>,故采用 2 BV·h<sup>-1</sup>。

**2.6.2 动态洗脱试验** 用 2.0 cm × 30 cm 的玻璃柱装入已处理好的 DA201-C 型大孔吸附树脂 30 mL,在室温条件下,精密量取 pH 4.0 蛻螂提取液 70 mL 以 2 BV·h<sup>-1</sup> 经过树脂柱。用 1 BV 去离子水以同样流速洗脱,以每管 10 mL 收集流出液,用去离子水将每管稀释至适宜质量浓度后,以银量法测定水洗液的含盐量。用 7 BV 70% 乙醇洗脱,收集醇洗液,每 10 mL 收集 1 管,用紫外检测器检测流出液在 260 nm 与 280 nm 处的 A,按 A 差值法计算多肽含量,绘制洗脱曲线,见图 1。

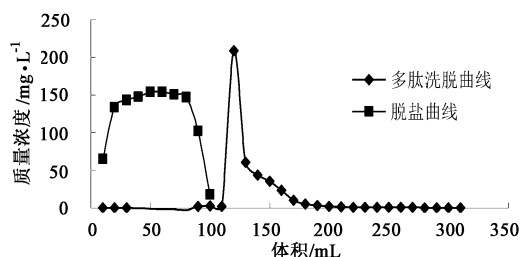


图1 蛻螂提取物中多肽洗脱曲线

由图 1 可知,用 1 BV 水即可将盐基本除去,脱除率达 98.81%,用 4 BV 70% 乙醇洗脱后,多肽洗脱曲线趋于平缓下降,说明已将多肽洗脱完全,收集洗脱液,减压浓缩,采用双缩脲法计算洗脱液中多肽含量,结果多肽回收率达 87.39%。

**2.7 乙醇洗脱物的检测** 使用氨基酸自动分析仪对 70% 乙醇洗脱物所含游离氨基酸与构成多肽的氨基酸进行种类和含量检测。

**2.7.1 测定条件** 离子交换柱(2.6 mm × 150 mm),波长 1 频道 570 nm,波长 2 频道 440 nm(Pro, Hypro)。流动相柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,柱温 50 °C,柱泵、茛三酮泵流速分别为 0.025,0.3 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.7.2 供试品溶液的制备** 将样品研成粉末,精密称取,加 6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸置 15 mL 安瓶中,真空封管酸水解,置于 110 °C 烘箱中水解 24 h。冷却后移入 25 mL 量瓶中,并用 6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸稀释至刻度口然后蒸去盐酸,用 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶解,备用。

**2.7.3 样品测定** 准确吸取混合氨基酸标准液 0.20 mL,用 pH 2.2 的缓冲液稀释至 5 mL,作为上机测定用的氨基酸对照品,用氨基酸自动分析仪以外标法测定样品液的氨基酸含量,结果见表 1。说明蛻螂提取液的 70% 乙醇洗脱部位主要含结合型氨基酸,即多肽约 32.26%。

表 1 70% 乙醇洗脱部位氨基酸质量分数 %

种类	酸水解氨基酸	游离氨基酸
天门冬氨酸	2.85	0.00
苏氨酸	1.76	0.00
丝氨酸	1.83	0.00
谷氨酸	4.24	0.00
甘氨酸	4.50	0.00
丙氨酸	1.90	0.01
胱氨酸	0.22	0.04
缬氨酸	1.98	0.00
蛋氨酸	0.15	0.01
异亮氨酸	1.83	0.06
亮氨酸	2.60	0.10
酪氨酸	2.93	2.34
苯丙氨酸	2.63	1.57
赖氨酸	1.68	0.02
组氨酸	0.77	0.00
精氨酸	1.72	0.55
脯氨酸	3.40	0.01

### 3 讨论

本实验采用 DA201-C 型大孔吸附树脂纯化蛻螂提取液,脱盐率 > 98%,多肽回收率 > 87%,表明

DA201-C 型大孔吸附树脂对蛻螂提取液中蛋白、多肽具有较好的吸附特性,能从盐溶液中将多肽类成分分离出来,说明采用大孔树脂对蛋白溶液进行脱盐与纯化处理可行。与常规脱盐方式相比<sup>[13-14]</sup>,大孔树脂脱盐具有洗脱剂用量少、操作简单、费用低等优势,可为工业化生产提供实验依据。实验中发现,不同体积分数乙醇的解吸附效果不同,提示可利用乙醇进行梯度洗脱,根据其疏水性差异可将蛻螂提取液中部分多肽组分分开,便于进一步开展物质基础与质量控制的探寻,具体还有待于更深入研究发掘。

### [参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:2484.

[2] 张蜀武,常德贵,邵继春,等. 通关胶囊治疗前列腺增生症临床观察及机理探讨[J]. 中国中西医结合外科杂志,2001,7(1):10.

[3] 金维良. 前列腺增生证治 6 法[J]. 安徽中医临床杂志,2002,14(4):198.

[4] 赵兴梅,朱敏,杨明,等. 蛻螂抗实验性前列腺增生作用研究[J]. 中药药理与临床,2006,22(5):37.

[5] 蒋巧梅,谭承佳,马家骅,等. 蛻螂抗良性前列腺增生症活性部位的筛选(I)[J]. 中药药理与临床,2012,28(6):100.

[6] 谭承佳,马家骅,吴利凌,等. 蛻螂有效部位的初步表征[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):84.

[7] 宫霞,赵骏. 大孔吸附树脂对酪蛋白酶解液的脱盐作用研究[J]. 食品科学,2006,27(11):301.

[8] 潘道东,林璐. DA201-C 大孔吸附树脂静态吸附 ACE 抑制肽的研究[J]. 食品科学,2009,30(5):20.

[9] 张旭,王锦玉,仝燕,等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):286.

[10] 白秀峰. 生物药物分析[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:285.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 三部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:附录 30.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:761.

[13] 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.

[14] 房泽海,冯怡,徐德生. 鲜地龙平喘活性蛋白提取工艺研究[J]. 中成药,2007,29(8):1143.

[责任编辑 仝燕]