

响应面分析法优化湿法超微粉碎地龙蛋白的提取工艺

杨丰云¹, 付廷明¹, 郭立玮^{1*}, 刘峰², 张伟²

(1. 南京中医药大学, 中药复方分离工程重点实验室, 南京 210029;
2. 陕西步长制药有限公司, 西安 710075)

[摘要] 目的: 优选采用湿法超微粉碎法提取地龙蛋白的工艺。方法: 在单因素试验基础上, 以浸泡时间、料液比、提取温度、粉碎时间为影响因素, 蛋白质得率为响应值, 根据中心组合试验设计原理采用四因素三水平的响应面分析法, 对湿法超微粉碎提取地龙蛋白条件进行优化。结果: 湿法超微粉碎提取地龙蛋白的最佳工艺条件为浸泡时间 4.7 h, 料液比 1 : 11, 提取温度 17 ℃, 粉碎时间 10 min。在此条件下蛋白质得率 3.46%。结论: 湿法超微粉碎提取技术适用于地龙蛋白提取。该试验优选提取工艺稳定可行, 适于工业化推广。

[关键词] 湿法超微粉碎; 地龙; 响应面分析法; 蛋白质; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0033-05

Optimization of Extraction Technology for Wet Ultrafine Grinding Technology on Earthworm Protein by Response Surface Methodology

YANG Feng-yun¹, FU Ting-ming¹, GUO Li-wei^{1*}, LIU Feng², ZHANG Wei²

(1. Key Laboratory of Separation Engineering for Chinese Medicine Compound, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Shanxi Buchang Pharmaceutical Co. Ltd, Xi'an 710075, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of earthworm protein by wet ultrafine grinding technology. **Method:** On the basis of single-factor test, extraction technology of wet ultrafine grinding method on earthworm protein was optimized with soaking time, solid-liquid ratio, extraction temperature and grinding time as influencing factors, yield of protein as response value. According to central composite test design principles, 4 factors and 3 levels of response surface analysis method was used. **Result:** Optimum extraction process of

[收稿日期] 20120101(002)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09401-308-008); 江苏省中医药局科技项目(LZ09007)

[第一作者] 杨丰云, 硕士研究生, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:15250986529, E-mail:yfyfj@sina.com

[通讯作者] * 郭立玮, 博士, 博士生导师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:025-86798188, E-mail:guoliwei815@yahoo.com.cn

作为指标成分进行含量测定, 具有一定的片面性, 不能完全代表该复方的药效, 因此在今后研究中应综合考虑盐酸小檗碱含量及其他有效成分确定工艺。

[参考文献]

- [1] 武佳, 谭桂莲, 杨红. 黄连中盐酸小檗碱提取工艺探究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2): 437.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2005: 162.
- [3] 吴晋荣, 邢耘. 高效液相色谱法测定一清颗粒盐酸小檗碱含量[J]. 医药导报, 2009, 28(2): 242.

- [4] 刘倩, 刘永刚, 喇孝瑾, 等. 正交试验法优选复方茜草胶囊提取工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 4.
- [5] 黄家卫, 盛振华. 黄连中盐酸小檗碱的水提工艺研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(3): 528.
- [6] 赵琳琳, 马燕, 赵媛, 等. 栝楼根丸水提取工艺正交优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 24.
- [7] 谢秀琼. 中药新制剂开发与应用[M]. 2版, 北京: 人民卫生出版社, 2000: 138.

[责任编辑 全燕]

earthworm protein by wet ultrafine grinding technology was as follows: soaked 4.7 h, solid-liquid rate 1:11, extraction temperature 17 °C, grinding time 10 min. Under these conditions, yield of protein could be up to 3.46%. **Conclusion:** Wet ultrafine grinding technology was suitable for extraction of earthworm protein. This optimize extraction technology was stable, feasible and suitable for large-scale promotion.

[**Key words**] wet ultrafine grinding; earthworm; response surface methodology; protein; extraction technology

地龙为环节动物门钜蚓科动物参环毛蚓、通俗环毛蚓、威廉环毛蚓或栉盲毛蚓的干燥体。前 1 种习称“广地龙”，后 3 种习称“沪地龙”^[1]。据现代药理学研究表明，地龙蛋白具有较强的抗血栓作用^[2-6]。

采用传统水提或者醇提工艺，蛋白质会受到高温或者有机溶剂破坏而变性，进而影响其药理活性。湿法超微粉碎是将药材与溶剂一起加入到粉碎机，应用强大机械振动研磨组织，使溶剂迅速到达组织内部，通过减小药材粒径、增加溶出面积、缩短成分溶出路径、从而提高提取效率的一种提取新技术^[7]。该提取技术在较短的时间内即可完成药物提取，且整个操作过程可控制在低温条件下进行，尤其适用于一些热敏性药物的提取，如蛋白质、多肽类成分。响应面分析法(RSM)是利用合理的试验设计，采用多元二次回归方程，拟合因素与响应值之间的函数关系，通过对回归方程的分析来寻求最佳工艺参数，解决多变量问题的一种统计方法，具有周期短，回归方程精度高，能研究多种因素间交互作用等优点^[8-10]。目前，地龙提取工艺主要为水提和醇提^[11-12]，采用湿法超微粉碎提取技术提取动物类药材未见报道，本试验采用湿法超微粉碎提取技术，以蛋白质得率为指标，利用响应面分析法对提取参数进行优化，为地龙抗血栓药物的深度开发和综合利用提供科学依据。

1 材料

湿法超微粉碎机(自制), Anke TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂), 754 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司), 地龙(亳州市永刚饮片有限公司, 批号 101030, 经南京中医药大学研究生院关启南教授鉴定为参环毛蚓), 牛血清白蛋白对照品(Sigma, A7030), 考马斯亮蓝 G-250(Ameresco 公司)。

2 方法与结果

2.1 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量^[13]。精确称取牛血清白蛋白(BSA)对照品 51.50 mg, 用蒸馏水溶解并定容至 50 mL, 得质量

浓度 1.03 g·L⁻¹ 的标准蛋白溶液。分别吸取标准蛋白溶液 0.00, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mL 于 10 mL 比色管中, 加蒸馏水补至 0.1 mL, 混匀。以蒸馏水为空白对照组, 做 3 组平行试验, 分别加入 5 mL 考马斯亮蓝染液 G-250, 混匀, 室温显色 2 min。以 BSA 为标准, 采用紫外-可见分光光度计于 595 nm 波长处测定吸光度(A)。以标准蛋白质质量浓度(C)为横坐标, A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $A = 0.627C + 0.008$ ($r = 0.998$)。

2.2 蛋白质得率 准确吸取地龙湿法超微粉碎提取液 0.1 mL, 做 3 组平行试验, 每管加入考马斯亮蓝染液 G-250 5 mL, 混匀, 室温显色 2 min。于 595 nm 波长处测定 A, 代入回归方程即可算出供试液蛋白质质量浓度(C)。按式 1 计算蛋白质得率。

$$\text{蛋白质得率} = (A - 0.08) \times V / 627W \times 100\% \quad (1)$$

式中 V 为溶液体积, W 为投入生药材质量。

2.3 单因素试验

2.3.1 浸泡时间对地龙蛋白质得率的影响 在提取温度 25 °C, 料液比 1:10, 粉碎时间 5 min 的恒定条件下, 考察不同浸泡时间对地龙蛋白质得率的影响。结果发现不经过浸泡处理的地龙, 蛋白质得率明显低于经过浸泡处理的地龙。推测可药物溶出需要完成 3 个阶段^[14], 不经过浸泡的地龙, 不能立即实现浸润与渗透阶段, 蛋白质无法立即充分溶出, 因此得率最低。故选择浸泡 4 h 为最佳。

2.3.2 料液比对地龙蛋白质得率的影响 固定浸泡时间为 4 h, 提取温度 25 °C, 粉碎时间 5 min 的条件下, 考察不同料液比对蛋白质得率的影响。结果可知, 料液比 1:5, 蛋白质得率最低, 而料液比 1:10, 1:15, 1:20, 蛋白质得率并无明显差别。故选用料液比 1:10。

2.3.3 提取温度对蛋白质得率的影响 在浸泡时间为 4 h, 料液比 1:10, 粉碎时间 5 min 的恒定条件下, 考察不同提取温度对蛋白质得率的影响, 结果发现 4 ~ 25 °C 时, 蛋白质得率最高, 提取温度达 37 ~ 50 °C 时, 蛋白质得率明显降低。故选用 25 °C 为最佳提取温度。

2.3.4 不同粉碎时间对蛋白质得率的影响 在浸泡时间 4 h,料液比 1:10,提取温度 25 ℃ 的恒定条件下,考察不同粉碎时间对蛋白质得率的影响。结果发现粉碎时间 10 min,蛋白质得率最高,之后随粉碎时间延长,蛋白质得率反而出现下降。故选用 10 min 为最佳粉碎时间。

单因素结果表明,最佳提取条件为浸泡时间 4 h,料液比 1:10,提取温度 25 ℃,粉碎时间 10 min。在该条件下,地龙蛋白质得率最高。因此选取浸泡时间 2~6 h,料液比 1:5~1:15,提取温度 20~30 ℃,粉碎时间 5~15 min 进行后续响应面法设计,优化地龙蛋白质提取工艺参数。

2.4 响应面分析法优选工艺

2.4.1 中心组合试验设计 根据 Box-Behnken 设计原理,结合单因素试验结果,以浸泡时间、料液比、提取温度、粉碎时间 4 个因素为自变量,蛋白质得率为响应面值,每个因素取 3 个水平,采用 Design Expert 8.0.5 统计分析软件的响应面分析法安排试验。试验结果水平因素安排见表 1,响应面分析试验设计及结果见表 2。

表 1 湿法超微粉碎法地龙蛋白提取工艺因素水平

水平	A 浸泡时间 /h	B 提取温度 /℃	C 料液比 /g·mL ⁻¹	D 粉碎时间 /min
-1	0	0	1:5	5
0	4	25	1:10	10
1	8	50	1:15	15

2.4.2 回归模型的方差分析 利用 Design Expert 8.0.5 软件对表 2 试验数据进行回归分析,得二次多元回归方程(式 2)。

$$Y = 3.37 + 0.25A - 0.80B + 0.090C + 0.11D - 0.23AB + 0.16AC - 0.015AD - 0.027BC + 0.067BD - 0.020CD - 0.9A^2 - 1.35B^2 - 0.40C^2 - 0.73D^2 \quad (2)$$

响应面分析中对试验结果进行拟和的二次模型方差分析见表 3。

由表 3 结果可知,模型极显著,失拟项不显著;模型的调整确定系数 $R_{Adj} = 0.9384$,说明该模型拟合程度良好,误差小,可用此模型对湿法超微粉碎提取蛋白的得率进行分析及预测。

模型回归方程的系数显著检验得出,一次项 A ($P = 0.0024 < 0.01$),二次项 A^2 ($P < 0.0001$), B ($P < 0.0001$); B^2 ($P < 0.0001$), C^2 ($P < 0.0006$), D^2 ($P < 0.0001$) 均达到极显著影响 ($P < 0.01$)。表明浸泡时间、料液比、提取温度、粉碎时

表 2 湿法超微粉碎提取地龙蛋白试验安排

No.	A	B	C	D	蛋白质得率 /%
1	0	0	1:10	10	2.16
2	8	50	1:10	10	0.46
3	8	0	1:10	10	2.23
4	4	0	1:5	10	2.16
5	0	25	1:10	15	1.42
6	0	25	1:10	5	1.16
7	8	25	1:10	15	2.1
8	4	25	1:10	10	3.54
9	0	50	1:10	10	0.41
10	4	25	1:10	10	3.21
11	8	25	1:10	5	1.9
12	4	50	1:5	10	0.66
13	4	0	1:10	15	2.41
14	4	50	1:15	10	0.82
15	4	0	1:10	5	2.41
16	4	25	1:15	5	2.18
17	4	50	1:10	5	0.34
18	8	25	1:5	10	2.15
19	4	25	1:10	10	3.1
20	8	25	1:15	10	2.57
21	4	25	1:15	15	2.44
22	4	50	1:10	15	0.61
23	4	25	1:5	5	1.92
24	4	25	1:5	15	2.26
25	4	0	1:15	10	2.43
26	0	25	1:15	10	1.97
27	4	25	1:10	10	3.37
28	0	25	1:5	10	2.18
29	4	25	1:10	10	3.64

间都对蛋白质得率有显著影响。各因素对湿法超微粉碎提取蛋白质得率的影响大小依次为提取温度 > 浸泡时间 > 粉碎时间 > 料液比。二次项 AB, AC, AD, BC, BD, CD, 均无显著差异,说明浸泡时间与提取温度、浸泡时间与料液比、浸泡时间与粉碎时间、提取温度与料液比、提取温度与粉碎时间、料液比与粉碎时间的交互作用对湿法超微粉碎提取地龙蛋白质的得率无显著影响。

2.4.3 响应面工艺优化分析 由图 1 可知,当提取温度不变时,随着浸泡时间延长,蛋白质得率呈现先

表 3 回归方程的方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	24.28	14	1.75	31.46	<0.000 1
A	0.76	1	0.76	13.58	0.002 4
B	7.68	1	7.68	138.14	<0.000 1
C	0.097	1	0.097	1.75	0.207 3
D	0.15	1	0.15	2.65	0.125 7
AB	0.21	1	0.21	3.81	0.071 4
AC	0.099	1	0.099	1.78	0.202 9
AD	9.0×10^{-4}	1	9.000×10^{-4}	0.016	0.900 6
BC	3.025×10^{-3}	1	3.025×10^{-3}	0.054	0.818 9
BD	0.018	1	0.018	0.33	0.576 0
CD	1.600×10^{-3}	1	1.600×10^{-3}	0.029	0.867 7
A ²	5.20	1	5.20	93.49	<0.000 1
B ²	11.76	1	11.76	211.51	<0.0001
C ²	1.06	1	1.06	19.04	0.0006
D ²	3.43	1	3.43	61.78	<0.000 1
残差	0.78	14	0.056		
失拟度	0.58	10	0.058	1.15	0.483 4
纯误差	0.20	4	0.050		
总离差	25.26	28			

增高后降低的趋势,在浸泡时间 5 h 左右,蛋白质得率达到最大。与单因素考察结果一致。同理,在温度低于 20 ℃ 时,蛋白质得率随温度的升高而升高;当浸泡时间达到 5 h,提取温度为 20 ℃ 左右时,蛋白质得率达到最高,继续延长浸泡时间或者升高提取温度,蛋白质得率下降。推测可能由于浸泡时间过长,蛋白质在微生物的作用下,发生降解。提取温度过高时,蛋白质发生变性,甚至发生沉淀,从而导致蛋白质得率下降。

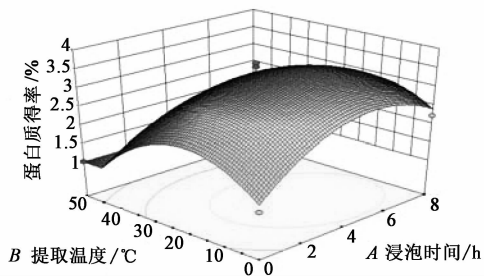


图 1 浸泡时间和提取温度对蛋白质得率的影响

由图 2 可知,当料液比低于 1:11 时,随着料液比的增大,蛋白质得率相应增大。当料液比增大到 1:11 时,继续增大,蛋白质得率无明显变化。其原因可能是料液比过小,溶液中浓度差小,影响蛋白质

溶出,当料液比增大到一定程度,蛋白质已充分溶出,故蛋白质得率并未出现升高。

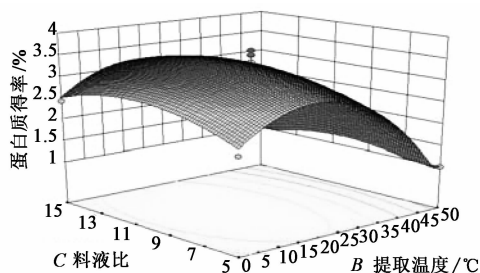


图 2 料液比和提取温度对蛋白质得率的影响

由图 3 可知,粉碎时间与蛋白质得率并不是呈简单的线性相关。当粉碎时间 11 min 左右时,蛋白质得率达到最高。之后继续增加粉碎时间,蛋白质得率反而出现下降趋势,可能是由于地龙组织在超微粉碎过程中,由于粉碎时间过长,出现过小颗粒,大大增加其表面能,故出现吸附现象,一方面可能将蛋白质包裹在颗粒中,随药渣一起被离心去除;另一方面吸附现象在一定程度上增大药物溶出的传质阻力,影响药物的扩散。故蛋白质得率出现下降。

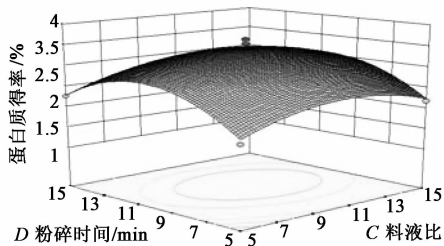


图 3 粉碎时间对蛋白质得率的影响

综合以上结果可知,并利用 Design Expert 8.0.5 软件对回归模型进行进一步的典型性分析,得到湿法超微粉碎提取地龙蛋白质的最优条件为浸泡时间 4.7 h,料液比 1:11,提取温度 17 ℃,粉碎时间 10 min,次条件下,蛋白质理论得率可达 3.53%。

2.5 验证试验 按最优提取工艺条件进行 3 次验证试验,结果蛋白质平均得率 3.46%,RSD 1.98%。说明该优选工艺重复性好,稳定可行。

3 讨论

本文使用的湿法超微粉碎机,是将振动磨进行改装而成,与普通振动磨相比,加工对象适应性强,对动物药、矿物药、含纤维量大、含油率高、含糖量高的物料,在配合一定的工艺措施后可实现细胞级粉碎,产品粒度分布范围更窄。此外,因为整个系统可控制在高度密闭体系中,特别适用于于液体环境粉碎。对粉碎的物料,可加入水、酒精或其他液体进行湿法粉碎,或通入气体进行保护性粉碎。

近年国内外研究表明,地龙蛋白质是发挥抗血栓的有效物质^[14-16]。对于地龙蛋白的获取,较多采用高速匀浆,离心取上清液,有机试剂沉淀,加入裂解液抽提蛋白,冷冻干燥获取粗蛋白^[17-19]。采用此种提取工艺,粉碎效率低,生产规模无法扩大,且在蛋白质抽提中需要加入裂解液辅助,生产成本高^[20]。采用湿法超微粉碎技术可实现细胞极粉碎,可充分保证蛋白质组分的溶出,在蛋白提取过程中无需加入裂解液,可直接将湿法超微粉碎提取液加入有机试剂沉淀,冷冻干燥,获取粗蛋白质。不仅可实现工业化生产,而且提取效率大大提高。

本研究利用响应面分析法对湿法超微粉碎技术提取地龙蛋白工艺进行优化采用。结果表明此方法具有良好的应用性和预测性,能提供较准确的变量和误差信息。该模型只以总蛋白得率为指标进行工艺评价,对于活性大小是否与总蛋白质成正相关,有待于下一步研究论证。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:113.
- [2] Wang B J, Won S J, Yu Z R, et al. Free radical scavenging and apoptotic effects of cordyceps sinensis fractioned by supercritical carbon dioxide [J]. Food Chem T, 2005,43(4): 543.
- [3] Wang F, Wang C, Li M, et al. Purification, characterization and crystallization of a group of earthworm fibrinolytic enzymes from *Eisenia foetida*[J]. Biotech Let, 2003,25(13): 1105.
- [4] Fan Q, Wu C, Li L, et al. Some features of intestinal absorption of intact fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus* [J]. BBA-GENE ST, 2001, 1526(3):286.
- [5] Yu Q, Li P, and Yang Q. Improving the absorption of earthworm fibrinolytic enzymes with mucosal enhancers [J]. Pharm Bilo, 2010,48(7):816.
- [6] Jessica T, Febrina S, Maggy T, et al. DLBS1033, A protein extract from *Lumbricus rubellus*, possesses antithrombotic and thrombolytic activities [J]. J Biomed Biotech, 2011, 10(1155):1.
- [7] 付廷明,乐康,贺建东,等.湿法超微粉碎法提取麻黄碱的可行性研究[J].现代中药研究与实践,2009,22(6):43.
- [8] Gunawan E R, Basri M A, Basyaruddin A R M, et al. Study on response surface methodology of lipase-catalyzed synthesis of plam-based waxester [J]. Enzyme Microb Technol, 2005, 37(1):739.
- [9] Noordim M Y, Venkatesh V C. Application of response surface methodology in describing the performance of coated carbide tools when turning AISI 1045 steel [J]. J Mater Process Technol, 2004, 145(1):46.
- [10] Li Q H, Fu C L. Application of response surface methnology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein [J]. Food Chem, 2005, 92(4):701.
- [11] 刘瑞连.地龙抗凝活性成分提取工艺的研究[J].中南药学,2009,7(6):425.
- [12] 张砾岩,李玲.地龙抗血栓有效部位的提取方法初探[J].中成药,2010,32(5):758.
- [13] Loffler B M, Kunze H. Refinement of the coomassie brilliant blue G assay for quantitative protein determination [J]. Anal Biochem, 1989(177):100.
- [14] 赵盛瑜,静天玉.蚯蚓纤溶酶的成分分析[J].中国生物化学与分子生物学报,2008,14(4):407.
- [15] Matausic P M, Tomicic M, Micek V. Influences of earthworm extract G-90 on haematological and haemostatic parameters in wistar rats [J]. Eur Rev Med Pharmaco,2011,15(1):71.
- [16] Zhao R, Ji J G, Tong Y P. Isolation and identification of proteins with antitumor and fibrinolysogen kinase activities from *Eisenia foetida* [J]. Acta Bioch Bioph Sin, 2002,34(5):576.
- [17] Tram T B P, Tien D T, Dung X N, et al. Purification and characterization of novel fibrinolytic proteases as potential antithrombotic agents from earthworm *Perionyx excavates* [J]. AMB Express, 2011,1(1):26.
- [18] Il H C, Eui S C, Hun G L, et al. Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellas* [J]. J Biochem Mol Biol, 2004, 37(2):199.
- [19] 翁瑜,曾群力,姜槐,等.双向凝胶电泳比较三种常用蛋白质提取方法[J].中国生物化学与分子生物学报,2005,21(5):691.
- [20] 宋艳梅,李峰,周丽曼.瓜蒌种子蛋白质6种提取方法比较[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):95.

[责任编辑 仝燕]