

# 正交试验优化再生丝素的醇沉脱盐工艺

于丽,王厚伟\*,徐凌川  
(山东中医药大学药学院,济南 250014)

**[摘要]** 目的:优化再生丝素的醇沉脱盐工艺。方法:用中性盐氯化钙制备再生丝素溶液,以用醇沉脱盐,采用正交试验法对主要影响丝素蛋白质醇沉工艺参数的因素(乙醇体积分数、乙醇用量、醇沉时间)进行考察,优化脱盐工艺。结果:再生丝素的醇沉脱盐工艺:醇沉时间 4 h,乙醇体积分数 100%,乙醇用量 6 倍于再生丝素液体积,此时丝素溶液的质量浓度  $0.08 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。醇沉脱盐率可达到 97.34%,丝素蛋白得率 77.28%。结论:该方法稳定、可行,脱盐率高,可运用于蛋白脱盐工艺中。

**[关键词]** 再生丝素;正交试验;醇沉脱盐

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0045-03

## Optimization of Precipitation Desalination Technology for Regenerated Silk Fibrion (RSF) by Orthogonal Test

YU Li, WANG Hou-wei\*, XU Ling-chuan

(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize precipitation desalination technology for regeneration silk fibroin by orthogonal test. **Method:** Application of neutral calcium chloride prepared regenerated silk fibroin solution, desalination was applied by ethanol precipitation, desalination technology was optimized by orthogonal test with investigating factors (the concentration of ethanol, the amount of ethanol, precipitation time) of affecting

**[收稿日期]** 20110628(012)

**[第一作者]** 于丽,在读硕士,从事动物药与中药生物工程研究, Tel:15969682643, E-mail:shuixian07410@126.com

**[通讯作者]** \*王厚伟,副教授,硕士生导师, Tel:13791138419

### [参考文献]

- [1] Liu L, Fang Y Q. Analysis of the distribution of  $\beta$ -asarone in rat hippocampus, brainstem, cortex and cerebellum with GC-MS[J]. J Med Plants Res, 2011, 5(9):1728.
- [2] Zanolì P, Avallone R, Baraldi M. Sedative and hypothermic effects induced by  $\beta$ -asarone, a main component of *Acorus calamus*[J]. Phytother Res, 1998, 12(Supp 1):S114.
- [3] Cho J, Ho Kim Y, Kong J Y, et al. Protection of cultured rat cortical neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of *Acorus gramineus*[J]. Life Sci, 2002, 71(5):591.
- [4] 方永奇,李翎,吴启端.  $\beta$ -细辛醚对小鼠脑组织基因表达谱的影响[J]. 中药材, 2003, 26(9):650.
- [5] 方永奇,方若鸣,方更利,等.  $\beta$ -细辛醚对慢性点燃癫痫大鼠脑组织 c-fos 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(5):534.
- [6] 楼步青. 中药巴布剂研究思路探讨[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(7):617.
- [7] 万鲲,高申. 苦参碱巴布剂基质的研究[J]. 解放军药学学报, 2008, 24(6):498.
- [8] 杜建平,施之琪,柳俊. 均匀设计法优选痹痛消巴布剂基质配方研究[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(3):230.
- [9] 李湘玉,张大军,王兆华. 清凉巴布剂基质配比的研究[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(6):378.
- [10] 陈永财,邵炳忠. 如意金黄散巴布剂制备工艺研究[J]. 中国药师, 2008, 11(12):1434.
- [11] 刘淑芝,费虹. 中药巴布剂制备工艺的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(3):9.

[责任编辑 仝燕]

precipitation process parameters for fibroin protein protein. **Result:** Optimum precipitation desalination technology for regeneration silk fibroin was: precipitated 4 h with 6 times the amount of 100% ethanol, at this point the concentration of silk fibroin solution was  $0.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Precipitation desalination efficiency could reach 97.34%, yield of silk fibroin protein was 77.28%. **Conclusion:** This method was stable and feasible, it had high desalination efficiency and could be used in desalination technology of protein.

[**Key words**] regenerated silk fibroin; orthogonal test; precipitation desalination

蚕茧为蚕蛾科昆虫家蚕蛾的茧壳,又名蚕衣、茧黄、蚕茧壳,性温、味甘、无毒。据《本草纲目》记载,属于止血药,治便血、尿血、血崩、消渴、反胃、疔疮、痈肿。蚕茧主要由丝素和丝胶组成,其中含丝胶 22% 左右,丝素占 70% ~ 80%。丝素不溶于水,但有一定的溶胀性,而丝胶可以溶于水。蚕茧入药时煎煮,仅有丝胶溶出而发挥药效,大量的丝素蛋白被作为药渣丢弃,造成资源和药材的浪费。

现代研究证明丝素蛋白和其水解产物具有促进酒精代谢、降血压、降低血液胆固醇含量及明显降血糖作用<sup>[1]</sup>;丝素蛋白具有很好的生物相容性,能制备成膜、凝胶、微球、纳米纤维、微胶囊等多种形态的材料,丝素可作为药物的载体,改进中药提取物的剂型。再生丝素的制备工艺已有大量报道,也有相关的专利,实现再生丝素药用和作为药物载体产业化的共性关键技术是脱盐工艺。因为天然丝素不溶于水,可以溶于强酸、强碱和一些中性盐溶液<sup>[2]</sup>,而丝素在酸、碱性环境中会被降解,因此选用高浓度的中性盐溶液来溶解丝素最为可行。在中性盐溶液中,氯化钙较其他溶液价格低、毒性小而作为溶解丝素的首选溶剂。

超滤技术和透析被广泛地应用于蛋白质的脱盐。苏锋等<sup>[2]</sup>研究表明采用超滤技术对溶液进行脱盐制备丝素蛋白过程中发生了变性;实验室规模采用透析袋脱盐,透析脱盐存在处理量小,耗时长且费用高的缺点。而且透析和超滤之后,溶液的体积增大,浓缩成为问题。作者提出了醇沉脱盐工艺,并应用正交试验对工艺进行了优化,得出了再生丝素中性盐制备工艺的最佳醇沉脱盐工艺条件。

## 1 材料

蚕丝(购于山东农业大学),无水氯化钙(江苏强盛化工有限公司), $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$  标准溶液(天津华特化研科技有限公司),重铬酸钾(天津龙强化工),其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 脱胶** 将剥去茧衣的蚕茧剪成茧片,洗净晾干,称取 5 g 置烧杯中,加入  $0.5\% \text{ Na}_2\text{CO}_3$  溶液 500

mL,煮沸脱胶 30 min,滤过,取茧片重复操作 1 次。将经过 2 次脱胶后的茧丝用蒸馏水洗净,60 °C 低温烘干,即获得脱胶丝,称重。

**2.2 丝素蛋白溶液制备** 称取 20 g 氯化钙,制备 40% 氯化钙溶液,溶解脱胶丝,即得。

**2.3 脱盐** 将所得的丝素蛋白溶液浓缩至 40 mL,加入 8 倍量无水乙醇,在 -10 °C 的冰箱中静置 4 h。取出,离心,上清液取沉淀即得脱盐丝素蛋白。

**2.4 丝素蛋白得率及脱盐率的测定** 取上述沉淀物,低温蒸干,称重。加入蒸馏水溶解定容至 50 mL。精密吸取 5 mL,加水定容至 50 mL。以 5% 的重铬酸钾为指示剂,用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$  标准溶液滴定  $\text{Cl}^{-1}$ ,测定氯化钙的残留量。随着乙醇体积分数、乙醇用量、醇沉时间的不同,丝素蛋白的得率和脱盐率也不同。

$$\text{脱盐率} = (20 - 0.05 \times M \times V) / 20 \times 100\%$$

$$\text{丝素蛋白的得率} = (m_1 - 0.05 \times M \times V) / m_2 \times 100\%$$

$M$  为氯化钙的摩尔质量; $V$  为消耗  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$  标准溶液的体积; $m_1$  为离心后沉淀物的质量; $m_2$  为脱胶后丝素的质量。

## 2.5 单因素对脱盐效果的影响

### 2.5.1 乙醇体积分数对蛋白醇沉脱盐效果的影响

乙醇体积分数是影响醇沉的重要因素,有机溶剂的浓度越高越好,但蛋白质在高浓度的有机溶剂中易变性,所以要考察浓度对醇沉效果的影响。乙醇的体积分数分别为 80%, 85%, 90%, 95%, 100%。选择醇沉时间为 6 h,加入 6 倍量乙醇。结果蛋白得率分别为 8.19%, 16.09%, 26.09%, 44.84%, 34.75%, 脱盐率分别为 99%, 99.22%, 99.36%, 98.25%, 98.86%。

由结果可知乙醇体积分数为 95% 时,蛋白质得率达到最大,但脱盐率为较低,综合评分最高,因此选择乙醇体积分数在 95% 左右进行优化。

**2.5.2 醇沉时间对蛋白醇沉脱盐效果的影响** 一般来说,醇沉时间越长,沉淀析出越完全。但由于蛋白质即使在低温的状态下,在高浓度的有机溶剂中也不稳定,随时间延长,一部分析出的沉淀可能又溶

解在水中。故有必要对醇沉时间进行考察。加入6倍量95%乙醇分别静置3,4,5,6,7 h。结果蛋白得率分别为20%,24.57%,35.24%,34.17%,27.4%,脱盐率分别为98.45%,98.65%,98.96%,99.25%,98.06%。

随醇沉时间的延长,醇沉蛋白质的得率增大,醇沉5 h时所得到的蛋白质得率达到最高;脱盐率随着醇沉时间的延长,脱盐率先增后减,在6 h达最大,综合考虑,选择醇沉时间5 h。

**2.5.3 乙醇用量对蛋白醇沉脱盐效果的影响** 氯化钙易溶于乙醇,乙醇的加入量越高,氯化钙溶解量越高,脱盐率就越高。分别加入4,5,6,7,8倍量95%乙醇静置5 h。结果蛋白质得率分别是30.51%,40.59%,62%,73.33%,59.55%,脱盐率分别是97.43%,98%,98.16%,98.67%,97.83%。

在一定范围内,乙醇的加入量越多,蛋白质的得率逐渐增大,7倍量时达最大。之后逐渐降低,因此选择加入7倍量95%乙醇进行优化。

**2.6 醇沉脱盐工艺的优化设计** 根据前期预试验结果发现,影响醇沉工艺的因素主要有3个,即乙醇体积分数、醇沉时间、乙醇加入倍数。通过正交试验 $L_9(3^3)$ ,以脱盐率和丝素蛋白得率为指标,优选最佳制备工艺条件,因素水平表见表1。数据统计分析,结果见表2~3。

表1 再生丝素醇沉脱盐工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 醇沉 时间/h	C 乙醇 用量/倍
1	90	4	6
2	95	5	7
3	100	6	8

**2.7 最佳工艺验证** 按优选工艺进行醇沉脱盐,平行实验3次。结果脱盐率为分别96.52%,97.18%,97.64%,蛋白得率分别为76.41%,77.39%,77.92%。与正交试验中蛋白得率相比较,说明该优选工艺稳定、可行。

### 3 讨论

采用有机溶剂沉淀蛋白达到脱盐目的的机制有两方面,一是有机溶剂能降低溶液的电解常数,从而增加蛋白质分子上不同电荷的引力,导致溶解度的

表2 再生丝素醇沉脱盐工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	蛋白质 得率/%	脱盐率 /%
1	1	1	1	1	20.92	98.84
2	1	2	2	2	22.45	96.06
3	1	3	3	3	28.42	95.42
4	2	1	2	3	51.94	98.47
5	2	2	3	1	45.53	99.07
6	2	3	1	2	42.56	98.87
7	3	1	3	2	77.28	97.34
8	3	2	1	3	72.33	96.06
9	3	3	2	1	71.87	95.40
$K_1$	71.79	150.14	135.81	138.32		
$K_2$	140.03	140.31	146.26	142.29		
$K_3$	221.48	142.85	151.23	152.69		
R	149.69	9.83	15.42	14.37		

表3 醇沉脱盐工艺蛋白质得率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	3 744.21	2	1 872.11	215.70	<0.05
B	41.30	2	20.65	2.38	
C	36.71	2	18.36	2.12	
误差	17.36	2	8.08		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

降低;二是有机溶剂与水的作用,能破坏蛋白质的水化膜,故蛋白质能在一定浓度的有机溶剂中沉淀析出。有机溶剂多为乙醇。因技术费用低,还可回收再利用,生产周期短,脱盐后体积不会扩增。虽然用醇沉脱盐可达较高的脱盐率,具有一定的优势,但丝素蛋白的得率不是很高,在一定程度上造成了丝素蛋白的损耗,可通过再次醇沉或者醇沉、透析联用的方法以达到更高的得率,节省原料。

### [参考文献]

- [1] 郑丹. SL系列食用丝素蛋白的开发研究[J]. 四川丝绸, 2002(2):13.
- [2] 苏锋, 杨瑞金, 许时婴. 可溶性丝素蛋白脱盐技术[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(4):56.

[责任编辑 仝燕]