

天龙仿生酶解制备小分子肽优选工艺

刘玉军¹, 代龙^{1*}, 魏永利²

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] 目的: 优选天龙仿生酶解工艺。方法: 采用福林酚比色法测定样品中小分子肽的含量, 并以此为指标, 分别对胃蛋白酶和胰蛋白酶的加酶量及酶解时间进行考察。结果: 加5倍量去离子水, 加热至沸腾, 放至室温, 用稀盐酸调pH 2.0, 加入药材质量2.0%的胃蛋白酶, 37℃保温振荡2.0 h, 用10%氢氧化钠溶液调pH 8.0, 加入药材质量2.0%的胰蛋白酶, 50℃保温振荡4.0 h, 放至室温, 离心(5 000 r·min⁻¹ × 5 min), 分离上清液, 微滤(0.22 μm), 超滤, 收集相对分子质量 < 3 000的滤液。结论: 所优选的仿生酶解工艺稳定。

[关键词] 天龙; 仿生酶解; 小分子肽; 福林酚法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0004-03

Optimization Preparation Process of Small Peptide from Gecko by Bionic Enzymatic Hydrolysis

LIU Yu-jun¹, DAI Long^{1*}, WEI Yong-li²

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize enzymatic hydrolysis technology of Gecko. **Method:** Folin phenol colorimetry was adopted to determine the content of small peptide, and used it as index, investigated dosage and reaction time of pepsin and trypsin respectively. **Result:** Optimum technology was as followed: added 5 times water, bioled, kept in room temperature, adjusted to pH 2.0 by diluted HCl, added 2.0% pepsin to medicinal quality, oscillated 2 h at 37℃, adjusted pH to 8.0, added 2.0% pepsin to medicinal quality, oscillated 4 h at 50℃, kept in room temperature, centrifuged (5 000 r·min⁻¹ × 5 min), separated supernatant, microfiltration (0.22 μm), ultrafiltration (3 000), collected filtration of relative molecular weight less than 3 000. **Conclusion:** Optimum enzymolysis process was steady.

[Key words] Gecko; bionic enzymolysis; small peptide; folin phenol method

天龙为壁虎科动物无蹼壁虎 *Gecko swinhoana* Gunther. 的干燥全体^[1], 具有祛风定惊、止咳平喘、

解毒散结、通络止痛等功效, 临床常用于非小细胞肺癌、肝癌、胃肠道癌等恶性肿瘤的治疗^[2], 其抗肿瘤物质基础不明确。现代消化理论认为, 蛋白质口服后不能直接被吸收进入血液, 而是经过胃肠道转化成小分子肽才能被吸收^[3-4], 因此抗肿瘤的物质基础可能存在于经胃肠道转化后的小分子肽中。用体外仿生酶解工艺制备天龙小分子肽, 从中寻找天龙抗肿瘤的的物质基础。本文在预试验基础上, 对影响酶解效率的主要因素酶用量及酶解时间作单因素优选。

[收稿日期] 20110728(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073031); 科技部“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-411)

[第一作者] 刘玉军, 在读硕士, 从事中药制剂工艺及质量标准研究, Tel: 0531-68684868, E-mail: liuyj8723@163.com

[通讯作者] *代龙, 教授, 从事中药新药开发及新剂型研究, Tel: 0531-82960689, E-mail: dailongdailong@263.net

1 仪器与试剂

Milipore Labscale TFF 型超滤系统 (Milipore 公司), PHS-3C 型精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司), UV1100 型紫外分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司), AB135-S 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司)。胃蛋白酶 (酶活力 $\geq 1\ 200\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)、胰蛋白酶 (酪蛋白转化力 ≥ 25.0)、牛血清白蛋白均购自国药集团化学试剂有限公司, 碱性铜试液、福林酚试液均按照《中国药典》2010 年版有关项下配制。

2 方法与结果

2.1 福林酚比色法^[5] 采用福林酚比色法测定酶解液中小分子肽的含量。精密量取牛血清白蛋白对照品溶液 ($0.236\ 8\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 分别置试管中, 加水至 1.0 mL, 加碱性铜试液 1.0 mL, 摇匀, 加入福林酚试液 4.0 mL, 立即混匀, 置 55 °C 水浴中准确反应 5 min, 置冷水浴 10 min, 照紫外-可见分光光度法, 在 650 nm 的波长处测定吸光度, 以牛血清白蛋白加入量为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 回归方程为 $Y = 2.738\ 6X + 0.027\ 9$ ($r = 0.999\ 4$), 牛血清白蛋白加入量在 0.047 36 ~ 0.236 80 mg 线性关系良好。

2.2 天龙待优选酶解工艺 取天龙粉 (60 目) 40 g, 加 5 倍量去离子水, 加热至沸, 放至室温, 用稀盐酸调 pH 2.0, 加入药材质量 3.0% 的胃蛋白酶, 37 °C 保温振荡 5 h, 用 10% 氢氧化钠溶液调 pH 8.0, 加入药材质量 3.0% 的胰蛋白酶, 50 °C 保温振荡 5 h, 放至室温, 离心 ($5\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1} \times 5\ \text{min}$), 分离上清液, 微滤 ($0.22\ \mu\text{m}$), 超滤, 收集相对分子质量 $< 3\ 000$ 的滤液, 定容至 250 mL。

2.3 胃蛋白酶酶解工艺考察

2.3.1 酶用量考察 取天龙粉 6 份, 各 40 g, 加 5 倍量去离子水, 加热至沸, 放至室温, 用稀盐酸调 pH 2.0, 分别加入药材质量 0.5%, 1%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0% 的胃蛋白酶, 其余操作同 2.2, 福林酚比色法测定酶解液中小分子肽含量, 计算肽得率 (肽得率 = $m_{\text{肽}}/m_{\text{药材}} \times 100\%$), 肽得率分别为 6.5%, 12.1%, 18.5%, 25.1%, 25.5%, 25.2%, 结果表明, 加酶量 $> 2.0\%$ 时, 小分子肽得率不再增加, 说明胃蛋白酶已饱和, 因此最佳酶用量为 2.0%。

2.3.2 酶解时间考察 取天龙粉 6 份, 各 40 g, 加 5 倍量去离子水, 加热至沸, 放至室温, 用稀盐酸调 pH 2.0, 加入药材质量 2.0% 的胃蛋白酶, 分别于 37 °C 保

温振荡 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 h, 其余操作同 2.3.1, 结果肽得率分别为 18.8%, 25.5%, 25.3%, 25.6%, 25.3%, 酶解时间 $> 2.0\ \text{h}$ 时, 小分子肽得率不再增加, 说明酶解已充分, 因此最佳酶解时间为 2.0 h。

2.4 胰蛋白酶酶解工艺考察

2.4.1 酶用量考察 取天龙粉 6 份, 各 40 g, 加 5 倍量去离子水, 加热至沸, 放至室温, 用稀盐酸试液调 pH 2.0, 加入药材质量 2.0% 的胃蛋白酶, 37 °C 保温振荡 2.0 h, 用 10% 的氢氧化钠溶液调 pH 8.0, 分别加入药材质量 0.5%, 1%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0% 的胰蛋白酶, 其余操作同 2.3.1, 结果肽得率分别为 6.5%, 13.1%, 19.4%, 25.3%, 25.0%, 25.1%, 加酶量 $> 2.0\%$ 时, 小分子肽得率不再增加, 说明胰蛋白酶已饱和, 因此最佳酶用量为 2.0%。

2.4.2 酶解时间考察 取天龙粉 6 份, 各 40 g, 加 5 倍量去离子水, 加热至沸, 放至室温, 用稀盐酸试液调 pH 2.0, 加入药材质量 2.0% 的胃蛋白酶, 37 °C 保温振荡 2 h, 用 10% 的氢氧化钠溶液调 pH 8.0, 加入药材质量 2.0% 的胰蛋白酶, 分别于 50 °C 保温振荡 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 h, 其余操作同 2.3.1, 结果肽得率分别为 10.3%, 17.5%, 20.0%, 25.5%, 25.0%, 酶解时间超过 4.0 h 时, 小分子肽得率不再增加, 说明酶解已充分, 因此最佳酶解时间为 4.0 h。

2.5 最佳酶解工艺验证试验 取天龙粉 3 份, 各 40 g, 按最佳酶解工艺酶解, 福林酚比色法测定酶解液中小分子肽含量, 计算小分子肽得率, 结果最佳酶解工艺小分子肽平均得率为 25.26%, RSD 1.91%, 说明工艺稳定。

3 讨论

胃蛋白酶作用的最佳 pH 2.0, 温度 37 °C^[6-7], 胰蛋白酶作用的最佳 pH 8.0, 温度 50 °C^[8], 因此可固定 pH 和温度, 仅需对酶用量和酶解时间进行考察。

小分子肽主要指含 2 ~ 15 个氨基酸残基的肽^[9], 其相对分子质量在 3 000 以下, 具有可直接被消化道吸收、转运速度快、耗能低和不易饱和等特点^[3-4], 因此, 选择 3 000 的超滤膜以去除, 仅保留可被胃肠道直接吸收的相对分子质量 $< 3\ 000$ 的部分^[7]。

[参考文献]

- [1] 山东省药品监督管理局. 山东省中药材标准[S]. 济南: 山东友谊出版社, 2002: 273.
- [2] 刘玉军, 李刚, 马睿, 等. 天龙抗肿瘤研究进展[J]. 中国

NKA-9 型大孔树脂纯化蟾皮总生物碱工艺

王元清^{1,2}, 严建业^{2*}, 罗堃², 王璐², 师白梅², 汪兰²

(1. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙 410004; 2. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

[摘要] 目的:建立 NKA-9 型大孔树脂纯化蟾皮总生物碱的工艺条件。方法:以蟾皮总生物碱含量(5-羟色胺计)作为考察指标,优化 NKA-9 型大孔树脂吸附与解析的工艺条件。结果:优选出的最佳纯化工艺为 NKA-9 型大孔树脂在 25 ℃ 进行吸附,样品溶液 pH 9,上样量为 4 BV,吸附时间为 8~10 h,先用 6 BV 水洗,然后用 3 BV70% 的乙醇洗脱。结论:该工艺可用于蟾皮总生物碱的纯化。

[关键词] NKA-9 型大孔树脂; 蟾皮总生物碱; 纯化工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0006-03

Purification Technology of Total Alkaloids from Skin of *Bufo bufo gargarizans* by NKA-9 Macroporous Resin

WANG Yuan-qing^{1,2}, YAN Jian-ye^{2*}, LUO Kun², WANG Lu², SHI Bai-mei², WANG Lan²

(1. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To establish purification technology of total alkaloids from skin of *Bufo bufo gargarizans* by NKA-9 macroporous resin. **Method:** The content of total alkaloid (5-HT) from skin of *B. bufo gargarizans* was chosen as index, optimized condition of adsorption and desorption of NKA-9 macroporous resin and established purification technology condition of total alkaloids from skin of *B. bufo gargarizans*. **Result:** Optimum purification process conditions were: used NKA-9 macroporous resin, adsorption temperature was 25 ℃, loaded 4 times the amount of column volume with pH of sample solution was 9; adsorption time was 8-10 h, firstly eluted with 6 times water of column volume, then eluted with 3 times 70% ethanol of column volume. **Conclusion:** Optimum

[收稿日期] 20110712(008)

[基金项目] 中南林业科技大学青年科学研究基金项目(2009015B);湖南省教育厅科学研究项目(11C1321);湖南省高校科技创新团队项目(湘教通[2010]212号)

[第一作者] 王元清,在读博士,讲师,从事生物药物研究,Tel:0731-85623496,E-mail:wangyuanqing201@126.com

[通讯作者] * 严建业,在读博士,讲师,从事药剂学研究,Tel:0731-88458231,E-mail:yanjianye201@126.com

实验方剂学杂志,2011,17(7):262.

[3] 何平均,倪淑欣,王文权,等. 抗肿瘤寡肽类药物研究进展[J]. 中国医药生物技术,2009,4(4):288.

[4] 陆融,王卓,姚智. 小分子多肽抗肿瘤作用的研究进展[J]. 天津医科大学学报,2005,11(3):499.

[5] 中国药典. 二部[S]. 2010:54.

[6] 张锐昌,徐志宏,刘邻渭. 胃蛋白酶水解小麦蛋白工艺的研究[J]. 食品与机械,2006,22(1):59.

[7] 苏玉永,徐楚鸿,吕永宁. 多酶微片中胃蛋白酶的活力测定[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(4):214.

[8] 李培骏,袁永俊,胡婷,等. 胰蛋白酶水解酪蛋白进程研究[J]. 食品与机械,2005,21(6):23.

[9] Sewald, N, Jakubke, H D. 肽:化学与生物学[M]. 刘克良,何军林,等译. 北京:科学出版社,2005,7:5.

[责任编辑 仝燕]