

天龙仿生酶解有效部位的最佳脱脂工艺研究

马睿¹, 刘玉军², 魏永利^{1*}, 代龙²(1.山东中医药大学附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 济南 250011; 2.山东中医药大学药学院, 济南 250355)

摘要: 目的 考察天龙仿生酶解所得有效部位的最佳脱脂工艺。方法 采用固体石蜡法对天龙仿生酶解液进行脱脂处理, 以得膏率和有效成分(天龙总小肽)含量为评价指标, 以酶解液浓缩程度、固体石蜡用量、脱脂次数、冷藏时间和温度等为影响因素, 分别采用单因素试验和正交试验优选最佳脱脂工艺参数。结果 所得最佳脱脂工艺参数为: 取天龙仿生酶解原液, 趁热加入相当天龙生药量 40% 的固体石蜡, 加热并搅拌使完全融化, 保持微沸 5 min, 静置冷却至室温, 冷藏(2~4 °C) 6 h, 滤过, 分离石蜡层, 加适量水洗涤 2 次, 合并滤液。结论 所优选的脱脂工艺稳定可行, 除脂效果好, 有效成分损失少, 有助于后续的制剂成型, 可为类似含动物药制剂的脱脂工艺提供参考。

关键词: 天龙; 仿生酶解; 脱脂工艺; 固体石蜡法; 小肽; 白芪龙胶囊

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)13-1608-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.13.002

引用本文: 马睿, 刘玉军, 魏永利, 等. 天龙仿生酶解有效部位的最佳脱脂工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13): 1608-1611.

Study on Optimum Degreasing Process for Active Composition of Gecko by Bionic Enzymatic Hydrolysis

MA Rui¹, LIU Yujun², WEI Yongli^{1*}, DAI Long²(1. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Grade Three Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China; 2. College of Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the optimum degreasing process of active composition obtained by bionic enzymatic hydrolysis of Gecko. **METHODS** The bionic enzymatic hydrolysis solution of Gecko was degreased by solid paraffin method. The yield of extract and the content of active components(total small peptide of Gecko) were used as the evaluation indexes. The optimal degreasing parameters were selected by single factor test and orthogonal test respectively with the concentration of the hydrolyzed solution, the amount of solid paraffin, the times of degreasing and refrigeration time and temperature as the influencing factors. **RESULTS** The optimized degreasing process parameters were as follows: taking the solution of bionic enzymatic hydrolysis of taking Gecko biomimetic enzymatic hydrolysate, adding 40% solid paraffin while hot, heating and stirring to melt completely, keeping micro-boiling for 5 min, cooling quietly to room temperature, refrigerating(2-4 °C) for 6 h, filtering, separating paraffin layer, adding appropriate amount of water to wash twice, and merging filtrate. **CONCLUSION** The selected degreasing process is stable and feasible, with good degreasing effect and less loss of effective components, which is helpful to the subsequent preparation forming and can provide reference for the degreasing process similar to animal medicine preparations.

KEYWORDS: Gecko; bionic enzymatic hydrolysis; degreasing process; solid paraffin extraction method; small peptide; Baiqilong capsules

白芪龙胶囊主要由白花蛇舌草、黄芪、天龙等 5 味中药组成, 为自主研发的中药六类新药, 用于非小细胞肺癌等恶性肿瘤的辅助治疗, 初步临床应用取得了较满意效果。前期研究发现^[1-2], 采用独特仿生酶解工艺制得的有效部位天龙小肽抗肿瘤活性显著, 为白芪龙胶囊发挥“祛邪”作用的关键成分, 然而天龙药材本身含有大量的油脂成分(约 10%)严重干扰了天龙小肽的分级纯化

和后续的制剂成型。本实验在文献研究^[3-6]基础上, 首次将固体石蜡法用于天龙油脂的脱除, 重点对固体石蜡法脱除有效部位天龙小肽中油脂的最佳参数进行研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV1100 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); PHS-3C 型精密 pH 计(上海精密科

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

作者简介: 马睿, 女, 硕士, 药师 Tel: (0531)68617222 E-mail: 513770428@qq.com *通信作者: 魏永利, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0531)68617919 E-mail: 13573775545@139.com

学仪器有限公司); KQ-250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TDL-5-A 型离心机(上海安亭科学仪器厂); Millipore Labscale TFF 型超滤系统(Millipore 公司); HY-5 型回旋式振荡器(金坛市亿通电子有限公司)。

1.2 试剂

天龙(济南兴旺蟾业有限公司, 批号: 20160301), 经山东中医药大学药学院生药教研室李峰教授鉴定系壁虎科动物无蹼壁虎 *Gecko swinhoana* Guenther 的干燥全体; 牛血清白蛋白(中国食品药品检定研究院, 批号: 140619-201120); 碱性铜试液、福林酚试液(按中国药典 2015 年版四部附录 8002 项下配制); 高效切片石蜡(上海华永石蜡有限公司, 批号: 20120801); 胃蛋白酶(国药集团化学试剂有限公司, 酶活力 $\geq 1\ 200\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, 批号: F20070914); 胰蛋白酶(上海蓝季科技发展有限公司, 酶活力 $1\ 000\sim 1\ 500\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 批号: 091105)。

2 方法与结果

2.1 天龙仿生酶解有效部位的制备^[7]

取天龙药材, 粉碎, 过 50 目筛, 加 10 倍量去离子水, 搅拌加热至沸, 放至室温, 用稀盐酸溶液调 pH 至 1.5~2.5, 加入底物量 2% 的胃蛋白酶并搅拌均匀, 37 °C 保温振荡 2 h, 再用 10% 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.5~8.5, 加入底物量 2% 的胰蛋白酶并搅拌均匀, 50 °C 保温振荡 4 h, 并时时调 pH, 使 pH 保持在 8.0 左右, 煮沸杀酶, 放至室温, 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分离上清液, 微滤(0.22 μm), 得天龙仿生酶解液, 1 kg 药材制得 10 L 酶解液。

2.2 评价指标的测定

2.2.1 得膏率 精密量取一定体积的仿生酶解液, 置于已干燥至恒重的蒸发皿中, 在水浴锅上蒸干后, 于 105 °C 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称质量, 计算得膏率(得膏率=膏质量/酶解液相当生药量 $\times 100\%$)。

2.2.2 天龙总小肽含量^[8-9] 以牛血清白蛋白为对照品, 采用福林酚比色法测定酶解液中天龙总小肽的含量。精密量取牛血清白蛋白对照品溶液(0.225 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 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, 立即充分混匀, 置 55 °C 水浴中准确反应 5 min, 马上置

冷水浴中 10 min, 按照 UV 法^[8], 在 650 nm 处测定吸光度。以牛血清白蛋白加入量为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程为 $Y=2.678\ 2X-0.022\ 8(r=0.998\ 4)$, 牛血清白蛋白加入量在 0.045 08~0.225 4 mg 时线性关系良好。稳定性、精密度、重复性试验等方法学考察均符合规定(RSD 分别为 1.12%, 1.33%, 1.06%), 平均加样回收率为 98.26%($n=6$, RSD=1.93%)。精密量取适当浓缩的仿生酶解液 1.0 mL, 自“加碱性铜试液 1.0 mL”起依法测定吸光度, 计算总小肽含量。

2.3 单因素试验

2.3.1 酶解液浓缩程度考察 取天龙仿生酶解液 6 份, 每份各 100 mL, 分别稀释 1 倍、不浓缩、浓缩至 1:1, 2:1, 3:1 和 4:1(m:V), 趁热加入相当天龙生药量 30% 的固体石蜡, 加热并搅拌使完全熔化, 保持微沸 5 min, 静置冷却至室温, 冷藏(2~6 °C)过夜, 滤过, 分离石蜡层, 加适量水洗涤 1 次, 合并滤液。取滤液适量, 分别进行评价指标测定, 得膏率分别为 30.6%, 30.9%, 33.2%, 33.9%, 34.2%, 35.8%, 小肽含量分别为 20.1%, 19.9%, 18.1%, 18.3%, 17.5%, 17.9%。结果表明, 随着酶解液浓缩程度的增加, 脱脂效果越差, 且有效成分损失严重(约 13%), 分析可能与石蜡层疏松吸附有效成分、滤液黏稠呈混悬态等有关。综合考虑, 确定对酶解液不浓缩直接进行脱脂处理。

2.3.2 固体石蜡用量考察 取天龙仿生酶解液 6 份, 每份各 100 mL, 分别趁热加入相当天龙生药量 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 的固体石蜡, 加热并搅拌使完全熔化, 其余操作同“2.3.1”项, 测得得膏率分别为 37.7%, 35.4%, 30.2%, 28.4%, 27.9%, 28.8%; 小肽含量分别为 19.2%, 18.8%, 19.6%, 20.9%, 20.5%, 21.3%。结果表明, 当石蜡用量 $\geq 40\%$ 时, 滤液澄清, 石蜡层分离彻底, 得膏率基本稳定在 28% 左右, 说明除脂彻底且无石蜡残留; 同时, 有效成分的含量不受石蜡用量的影响, 稳定在 20% 左右, 因此暂定石蜡用量为 40%, 待进一步考察。

2.3.3 冷藏时间考察 取天龙仿生酶解液 6 份, 每份各 100 mL, 趁热加入相当天龙生药量 40% 的固体石蜡, 加热并搅拌使完全熔化, 保持微沸 5 min, 静置冷却至室温, 分别冷藏(2~6 °C) 2, 4, 6, 8, 10, 12 h, 滤过, 其余操作同“2.3.1”项, 测得得膏率分别为 30.9%, 29.7%, 25.2%, 25.4%,

24.9%, 25.6%; 小肽含量分别为 15.2%, 16.4%, 18.2%, 18.1%, 18.7%, 17.9%。结果表明, 当冷藏放置时间 ≥ 6 h 时, 得膏率不再显著变化, 基本维持在 25%左右, 小肽含量在 18%左右, 说明油脂已完全除去, 且有效成分损失较少, 因此暂定冷藏时间为 6 h, 待进一步考察。

2.3.4 冷藏温度考察 取天龙仿生酶解液 5 份, 每份各 100 mL, 趁热加入相当天龙生药量 40%的固体石蜡, 加热并搅拌使完全熔化, 保持微沸 5 min, 静置冷却至室温, 分别在 2, 4, 6, 8, 10 $^{\circ}\text{C}$ 下冷藏 6 h, 滤过, 其余操作同“2.3.1”项, 测得得膏率分别为 26.5%, 25.6%, 26.1%, 31.8%, 36.7%; 小肽含量分别为 19.0%, 19.4%, 19.3%, 17.5%, 16.2%。结果表明, 冷藏温度是决定石蜡层成型的关键因素, 温度过高, 石蜡凝固不充分, 油脂无法被石蜡充分溶出; 当温度 ≤ 6 $^{\circ}\text{C}$ 时, 得膏率和小肽含量分别维持在 26%和 19%左右, 有限时间内石蜡层凝固充分, 油脂去除完全, 有效成分几乎无损失, 因此暂定冷藏温度为 2~6 $^{\circ}\text{C}$, 待进一步考察。

2.3.5 石蜡层水洗次数考察 取天龙仿生酶解液 6 份, 每份各 100 mL, 趁热加入相当天龙生药量 40%的固体石蜡, 加热并搅拌使完全熔化, 保持微沸 5 min, 静置冷却至室温, 冷藏(2~6 $^{\circ}\text{C}$) 6 h, 滤过, 分离石蜡层, 分别加适量水洗涤 0, 1, 2, 3, 4, 5 次, 合并滤液。取滤液适量, 分别进行评价指标测定, 得膏率分别为 25.7%, 27.8%, 28.2%, 28.5%, 28.1%, 28.6%; 小肽含量分别为 18.9%, 20.2%, 20.6%, 21.0%, 20.9%, 20.5%。结果表明, 石蜡层对有效成分的吸附较少, 水洗 2 次即可洗涤完全, 因此确定石蜡层的水洗次数为 2 次。

2.3.6 脱脂次数考察 取天龙仿生酶解液 4 份, 每份各 100 mL, 趁热加入相当天龙生药量 40%的固体石蜡, 加热并搅拌使完全熔化, 保持微沸 5 min, 静置冷却至室温, 冷藏(2~6 $^{\circ}\text{C}$) 6 h, 滤过, 分离石蜡层, 加适量水洗涤 2 次, 合并滤液, 分别进行重复脱脂操作 0, 1, 2, 3 次。取滤液适量, 分别进行评价指标测定, 得膏率分别为 28.2%, 27.3%, 27.0%, 27.2%; 小肽含量分别为 21.0%, 20.9%, 19.6%, 19.8%。结果表明, 按照上述优选的最佳工艺参数进行脱脂处理, 脱脂 1 次即可将油脂脱除干净, 且随着脱脂次数的增多, 有效成分含量有降低趋势; 综合考虑, 确定石蜡脱脂次

数为 1 次。

2.4 正交试验

2.4.1 设计与结果 在上述单因素试验的基础上, 分别选择固体石蜡用量(A)、冷藏温度(B)和冷藏时间(C)作为考察因素, 以得膏率(a)和有效成分(天龙总小肽)含量(b)为考察指标, 综合评分 $Y=X_1 \times 0.5 + X_2 \times 0.5$, $X_1 = a_{\min} / a \times 10$, 以最低值 a_{\min} 为 10 分; $X_2 = b / b_{\max} \times 10$, 以最高值 b_{\max} 为 10 分, 按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验, 进一步优化天龙仿生酶解有效部位的最佳脱脂工艺参数。因素水平设计见表 1, 正交试验结果见表 2。

表 1 正交试验因素与水平设计表

Tab. 1 Table of factor level of orthogonal test

水平	因素		
	固体石蜡用量(A)/%	冷藏温度(B)/ $^{\circ}\text{C}$	冷藏时间(C)/h
1	30	4	4
2	40	6	6
3	50	8	8

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果表

Tab. 2 Result table of $L_9(3^4)$ orthogonal test

编号	因素				得膏率/ %	天龙总小 肽含量/%	综合 评分
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	34.2	18.3	8.12
2	1	2	2	2	32.4	19.3	8.57
3	1	3	3	3	33.1	19.1	8.44
4	2	1	2	3	25.3	19.0	9.59
5	2	2	3	1	28.0	20.1	9.37
6	2	3	1	2	30.1	19.2	8.84
7	3	1	3	2	25.9	19.8	9.67
8	3	2	1	3	29.9	17.5	8.46
9	3	3	2	1	28.3	20.7	9.47
K_1	25.13	27.38	25.42	26.96			
K_2	27.80	26.40	27.63	27.08			
K_3	27.60	26.75	27.48	26.49			
R	0.89	0.33	0.74	0.20			

2.4.2 数据处理 采用 SPSS 19.0 统计软件, 对试验结果进行方差分析, 结果见表 3。方差分析结果表明, 各因素对天龙酶解液脱脂效果的影响大小顺序为 $A > C > B$, 其中固体石蜡用量(A)具有显著性意义。通过上述实验研究, 同时结合单因素试验考察结果, 确定最佳脱脂工艺参数为 $A_2B_1C_2$, 即取天龙仿生酶解原液趁热加入相当天龙生药量 40%的固体石蜡, 加热并搅拌使完全熔化, 保持微沸 5 min, 静置冷却至室温, 冷藏(2~4 $^{\circ}\text{C}$) 6 h。

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验方差分析表Tab. 3 Variance analysis table of $L_9(3^4)$ orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
固体石蜡用量(A)	0.737 2	2	0.368 6	22.753 1	<0.05
冷藏温度(B)	0.082 2	2	0.041 1	2.537 0	>0.05
冷藏时间(C)	0.508 3	2	0.254 2	15.691 4	>0.05
误差(D)	0.032 4	2	0.016 2	1.000 0	-

注: $F_{0.05}^{(2,2)}=19.00$; $F_{0.10}^{(2,2)}=9.00$ 。Note: $F_{0.05}^{(2,2)}=19.00$; $F_{0.10}^{(2,2)}=9.00$ 。

2.5 脱脂工艺最佳条件验证试验

取天龙药材 1 kg, 共 3 批, 按“2.1”项下方法进行的操作, 得天龙仿生酶解液。在“2.4”项下最佳脱脂工艺组合 $A_2B_1C_2$ 下, 进行放大验证试验, 得膏率分别为 28.6%, 28.1%, 28.6%, 总小肽含量分别为 20.8%, 21.5%, 21.6%, 有效部位纯度分别为 72.7%, 76.5%, 75.5%。结果表明, 所优选的脱脂工艺针对有效成分脂溶性低的药物分离效果好, 经多批次验证试验发现, 本法大大降低了油脂含量, 且对天龙小肽的含量几乎无影响, 提高了有效部位纯度, 工艺路线科学合理, 工艺操作简便易行, 值得推广应用。

3 讨论

参考文献报道^[5-6,10-12], 根据药物性质和实际实验条件, 分别选择低温冷藏法、乙醇沉淀法和固体石蜡法进行了预实验考察。结果发现, 低温冷藏法脱脂效果差, 不能达到彻底去除; 乙醇沉淀法对有效成分(天龙小肽)的损失较多; 而固体石蜡法充分利用石蜡热熔冷凝、亲油疏水的特性, 工艺操作简便易行、成本低、周期短、脱脂效果较好, 因此对固体石蜡法脱油脂进行了重点研究。实验中发现, 固体石蜡在加入热酶解液前宜加工成细粉, 便于其迅速熔化, 避免熔化不均匀现象, 降低除脂效率; 另外, 在石蜡完全熔化与酶解液充分混匀后冷却至室温的过程中, 严禁搅拌, 否则石蜡层会疏松黏软, 冷凝不完全, 不仅除脂效果差, 而且会有石蜡残留。

本研究采用福林酚比色法(又称 Lorry 法)测定天龙仿生酶解液中总小肽的含量, 其测定原理是

蛋白质或多肽与碱性铜溶液中的 Cu^{2+} 络合形成铜-蛋白质/多肽复合物, 此复合物与福林酚试剂反应, 产生蓝色化合物, 该蓝色化合物在波长 650 nm 处的吸光度与蛋白质/多肽中的酪氨酸和色氨酸的含量成正比, 根据供试品的吸光度, 计算供试品中蛋白质/多肽的含量。研究表明, 福林酚试剂只有在酸性条件下稳定, 而铜-蛋白质/多肽复合物的显色反应在碱性条件下进行, 因此, 实验中加入福林酚试剂后应立即充分混匀, 否则显色能力会下降, 从而影响测定结果。另外, 实验所用碱性铜溶液要现用现配, 否则容易出现沉淀, 影响实验结果。

REFERENCES

- [1] 李钦青, 孙明江, 代龙, 等. 壁虎不同提取工艺成分抗肿瘤作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1629-1630.
- [2] LIU Y J, LI G, MA R, et al. Latest research progress of *Gekko* on antitumor effect [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(7): 262-264.
- [3] LI X P, FU B H, XU Y H, et al. Study on defatting technology of *Fructus Arctii* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(11): 912-916.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2015: 695.
- [5] 袁海龙, 李仙义, 肖小河, 等. 五味子精制除油试验研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 909-910.
- [6] 卢春霞. 养殖大黄鱼脱脂脱腥工艺优化及其风味成分研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2011.
- [7] LIU Y J, DAI L, WEI Y L. Optimization preparation process of small peptide from gecko by bionic enzymatic hydrolysis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(22): 4-6.
- [8] 中国药典. 四部[S]. 2015: 96, 附录 0401.
- [9] LI H L, PENG S M, LI L, et al. Studies on four conventional methods for protein determination [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2008, 28(4): 277-278, 282.
- [10] LI T, QUAN Q G, SU T T, et al. Optimization of enzymatic defatted conditions of grass carp skin by response surface methodology [J]. China Food Addit(中国食品添加剂), 2017(7): 103-107.
- [11] WEI Y Y, LIU Y, GONG S, et al. Study on degreasing process of polysaccharides from *Centella asiatica* [J]. J Guangxi Univ Sci Technol(广西科技大学学报), 2014, 25(2): 90-94.
- [12] QIN N N, LI T L, ZHANG S S, et al. Optimization of degreasing process of the horse bone [J]. Food Nutr Chin(中国食物与营养), 2013, 19(4): 56-59.

收稿日期: 2018-10-19

(本文责编: 李艳芳)