

地龙渗漉工艺参数优选

徐玉玲¹, 谭清红², 伍利华³, 王晓霞⁴, 吴南轩⁴, 梁悦⁴, 刘涛^{4*}

(1. 成都大学 实验技术中心, 成都 610106; 2. 四川科伦药物研究院有限公司, 成都 610000;
3. 广西中医药大学, 南宁 530001; 4. 成都大学 生物产业学院, 成都 610106)

[摘要] 目的: 优选地龙的渗漉工艺参数。方法: 采用体外溶血法, 以含固量和蛋白酶活性为综合评价指标, 通过单因素试验优选地龙的渗漉工艺。结果: 尿激酶在 25 ~ 125 U · mL⁻¹ 与溶圈面积呈良好线性关系, 最佳渗漉工艺参数为地龙粉碎为粗粉, 浸泡时间 0.5 h, 渗漉速度 2 mL · min⁻¹, 加 8 倍量 60% 乙醇渗漉; 渗漉液体积 220 mL, 含固量 3.252 g, 蛋白酶活性 5 624.7 U · g⁻¹。结论: 纤维蛋白原平板法可快速、简便、准确地测定地龙中酶的活性, 优选的工艺参数稳定可行, 为地龙有效成分的充分利用提供新选择。

[关键词] 地龙; 酶活性; 渗漉工艺; 纤维蛋白原平板法

[中图分类号] R283.6; R284.2; R282.74 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)21-0041-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210041

Optimization of Percolation Process Parameters of Pheretima

XU Yu-ling¹, TAN Qing-hong², WU Li-hua³, WANG Xiao-xia⁴, WU Nan-xuan⁴, LIANG Yue⁴, LIU Tao^{4*}

(1. Experiment Technology Center of Chengdu University, Chengdu 610106, China;
2. Sichuan Kelun Pharmaceutical Research Institute Co. Ltd, Chengdu 610000, China;
3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;
4. Faculty of Biotechnology Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize percolation parameters of Pheretima. **Method:** By using external hemolysis method, with solid content and protease activity as indicators, single factor tests were adopted to optimize percolation process. **Result:** The concentration of urokinase in 25-125 U · mL⁻¹ showed a good linear relationship with soluble circle area, the best percolation processing parameters were: crushed Pheretima to a coarse powder, soaked 0.5 h with percolation rate of 2 mL · min⁻¹, added 8 times the amount of 60% ethanol for percolation; percolate volume, solid content and protease activity were 220 mL, 3.252 g, 5 624.7 U · g⁻¹. **Conclusion:** Fibrinogen plate method can be fast, easy and accurate to determine enzyme activity in Pheretima, these optimized process parameters was stable and feasible, it provides new choice for full utilization of active ingredients from Pheretima.

[Key words] Pheretima; enzyme activity; percolation process; fibrinogen plate method

地龙性善走窜, 通经活络, 性味咸寒, 具有清热、熄风、降压、平喘、通络、利尿之功效, 含有丰富的酶类, 其中纤维蛋白溶解酶、蚓激酶、蚓胶质酶对体内凝血和纤溶系统具有广泛影响^[1]。凝血酶、类凝血酶活性的体外活性评价可采用纤维蛋白原平板法测定, 该法基本原理为将酶的作用底物——纤维蛋白原均匀地分布于琼脂平板上, 通过向板样孔内加入酶溶液进行扩散反应, 酶在扩散过程中与底物发生

[收稿日期] 20140325(010)
[基金项目] 四川省卫生厅科研课题(130406)
[第一作者] 徐玉玲, 高级工程师, 从事中成药质量研究及管理, Tel:028-61302236, E-mail: xuyuling19750818@sina.com
[通讯作者] * 刘涛, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中成药新药开发及再评价研究, Tel:028-61302236, E-mail: liutao0578@sina.com

水解反应,使纤维蛋白原水解成纤维蛋白并发生交联呈乳白色沉淀,白色沉淀圈大小与酶活力呈正相关^[2]。目前,地龙的提取方法包括超声法^[3]、渗漉法^[4]、水煎煮法^[5]、浸渍法^[6]等,渗漉法在提取过程中不用加热,对于动物药中酶及蛋白质等成分无破坏,可保护有效成分,故本实验选择渗漉法提取地龙中有效成分。

目前大多数地龙活性研究选择蛋白质量和凝血酶时间为指标,但蛋白质含量不能直接反映地龙的药效,凝血酶时间的测定操作亦相对复杂,要求高,重复性不强。本实验拟通过纤维蛋白原平板法优选地龙的渗漉工艺,该方法测定酶活性能有效反映地龙的药效。

1 材料

FA2004 型电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司生产),LDZX-50KBS 型不锈钢式立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂),DHP-9032 型电热恒温箱(石家庄乐恩仪器设备有限公司),YB5001B 型数显卡尺(卡夫威尔有限公司)。

地龙购自荷花池中药市场,批号 20110321,经刘涛研究员级高级工程师鉴定为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)的干燥体;牛凝血酶试剂(上海经科化学科技有限公司,批号 20131230),牛血纤维蛋白原试剂(上海经科化学科技有限公司,批号 20131230),医用注射尿激酶(丽珠集团丽珠制药厂,批号 20131023),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 酶活性的测定

2.1.1 纤维蛋白原平板的制备^[7-9] 取经灭菌的直径 10 cm 培养皿,加入 1% 琼脂溶液 10 mL,3 g·L⁻¹ 牛血纤维蛋白原溶液 15 mL 和 50 U·mL⁻¹ 牛凝血酶 0.6 mL,摇匀,静置 30 min 使其凝固,用打孔器打出直径 3 mm 的小孔,置于约 4 ℃ 冰箱保存备用。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密移取 25,40,60,80,100,125 U·mL⁻¹ 的尿激酶各 30 μL,点入 2.1.1 项下纤维平板的小孔中,37 ℃ 恒温培养 17 h 后测定溶出的透明圈,以尿激酶质量浓度为横坐标,溶出圈的面积为纵坐标,得线性方程 $Y = 0.247\ 2X + 0.588\ 5$ ($r = 0.999\ 1$),线性范围 25 ~ 125 U·mL⁻¹。

2.1.3 样品测定 取样品适量,加 0.9% 氯化钠溶液配成适应质量浓度,按 2.1.2 项下方法测定溶出的透明圈相互垂直的直径,计算蛋白酶活性。

2.1.4 空白试验 分别选择 0.9% 氯化钠溶液,

50% 乙醇,60% 乙醇,70% 乙醇,80% 乙醇作为样品,各取 3 份,按 2.1.2 项下方法测定溶出的透明圈相互垂直的直径,结果发现空白溶媒均未产生透明圈,表明溶媒对试验结果无影响。

2.2 含固量的测定 精密量取渗漉液 100 mL 置于恒重蒸发皿中,水浴蒸至浸膏状,于 105 ℃ 干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算含固量。

2.3 单因素试验考察 采用渗漉法提取,影响因素包括药材前处理、渗漉速度及溶媒种类、浓度、用量。参考文献[3-6]和预试验确定了提取溶媒为乙醇,渗漉速度 2 mL·min⁻¹,药材浸泡时间 0.5 h,选择药材粉碎程度、溶媒用量、乙醇体积分数为考察因素。

2.3.1 药材粉碎程度 取同一批地龙碎片(经全地龙药材剪碎为长度约 1 cm)、最粗粉、粗粉各 35 g,分别置于不同烧杯中,加入 70% 乙醇 60 mL 浸泡 0.5 h 后分别装入渗漉器,控制流速 2 mL·min⁻¹,溶媒用量 10 倍,结果渗漉液体积分别为 240,210,215 mL,计算固含物量依次为 1.798,2.204,3.172 g,故药材粉碎程度选择粗粉。

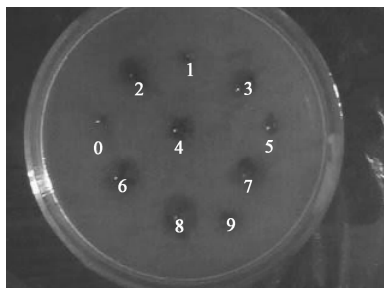
2.3.2 乙醇体积分数 取同一批地龙粗粉 4 份,每份 35 g,分别置于对应编号的烧杯中,分别加入 50%,60%,70%,80% 的乙醇溶液 60 mL 浸泡 0.5 h 后分别装入渗漉器,控制流速 2 mL·min⁻¹,溶媒用量 10 倍,以含固量和蛋白酶活性的综合评分为指标,权重系数分别为 0.2 和 0.8,结果见表 1 和图 1,故选择溶媒为 60% 乙醇。

表 1 地龙渗漉工艺中乙醇体积分数及用量的考察

因素	参数	含固量 /g	蛋白酶活性 /U·g ⁻¹	综合评分
乙醇体积分数	50%	2.904	4 579.425	89.95
	60%	3.093	5 102.002	99.32
	70%	3.201	4 239.024	86.47
	80%	2.803	4 767.872	92.27
乙醇用量	6 倍	2.925	5 345.938	90.92
	8 倍	3.509	5 693.300	99.08
	10 倍	3.311	5 759.683	98.87

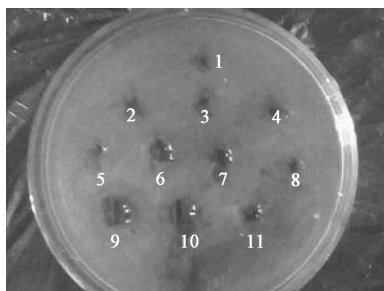
2.3.3 乙醇用量 取同一批地龙粗粉 3 份,每份 35 g,分别置于不同烧杯中,加入 70% 乙醇 60 mL 浸泡 0.5 h 后分别装入渗漉器,控制流速 2 mL·min⁻¹,溶媒用量分别为 6,8,10 倍,结果见表 1 和图 2,故选择溶媒用量 8 倍。

2.4 验证试验 取同一批地龙粗粉 3 份,每份



0. 空白点;1~5. 标准曲线的点样;
6~9. 50%~80%乙醇渗漉提取的样品

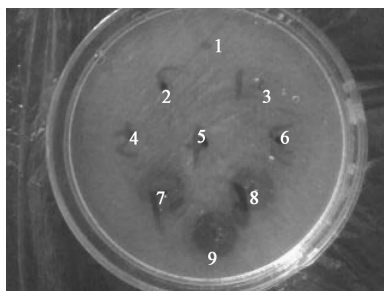
图1 乙醇体积分数对地龙渗漉工艺的影响



1. 空白点;2~8. 标准曲线点样;
9~11. 6,8,10倍70%乙醇提取的样品

图2 溶媒用量对地龙渗漉工艺的影响

35 g,分别置于不同烧杯中,按优选的工艺进行渗漉,结果见图3,渗漉液体积分别为215,225,220 mL,含固量依次为3.489,3.533,3.553 g,蛋白酶活性分别为5 690.454,5 583.346,5 600.300 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{RSD} < 5\%$,表明优选的工艺条件稳定可靠。



1. 空白点;2~6. 标准曲线点样;7~9. 验证样品

图3 地龙渗漉工艺验证试验

3 讨论

将待检样品适当稀释,在同一块纤维蛋白原平板上进行扩散反应,通过测量反应孔沉淀圈大小,建

立坐标系,即可绘制出相应的酶活力标准曲线。同时测量在相同条件下检品反应孔沉淀圈大小,即可在标准曲线上查出对应值而达到定量的目的。目前地龙的提取工艺优选常以提取液中蛋白质质量和凝血酶时间为指标,但蛋白质含量不能直接反映地龙的药效,其次凝血酶时间的测定操作相对复杂,要求高,重复性不好,而采用纤维蛋白原平板法测定酶活性的准确性高,操作简单,测定结果能有效反映地龙药效。

在研究过程中,地龙药材的前处理需考虑影响蛋白酶活性的因素,避免使用高温等降低酶活性的条件,兼顾各种试液的配置条件、溶液混合顺序、点样浓度等,经过预试验确定本文中纤维蛋白原测定的各种参数,结果表明该方法稳定,重复性较强,提示体外活性评价法可作为地龙渗漉工艺参数优选的指标。

[参考文献]

- [1] 郑娟,张茜.地龙活性提取物的主要药效学试验研究[J].科技创业家,2012(17):1.
- [2] 廖共山,班建东.一种检测凝血酶、类凝血酶的新方法——纤维蛋白原平板法[J].广西医科大学学报,2008,25(6):967.
- [3] 李娟,徐玉玲,王永香,等.地龙体外抗凝血部位的制备工艺研究[J].中国中药杂志,2011,36(7):850.
- [4] 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.
- [5] 高华宏,刘昌,王文琼,等.正交试验法优选广地龙提取工艺[J].湖北中医学院学报,2004,6(3):31.
- [6] 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.
- [7] 杨明,董超,史延茂,等.纤维蛋白平板法测定纳豆激酶方法的改进[J].中国酿造,2008(7):77.
- [8] 董培智,朴晋华,党爱华,等.量反应平行线法在溶栓胶囊蚓激酶效价测定方法学研究中的应用[J].中国中药杂志,2010,35(11):1410.
- [9] 班建东,廖共山,黄爱民,等.纤维蛋白原平板法测定水蛭素活性[J].广西医科大学学报,2007,24(6):827.

[责任编辑 刘德文]