

蚂蟥酶解工艺研究

孙雪, 袁瑞娟*, 赵智婕, 詹雪艳, 王雄飞, 段天璇*

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: **目的** 确定蚂蟥的最佳酶解工艺。**方法** 选取活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 3种抗凝活性指标, 以外翻肠囊实验筛选蚂蟥酶解物在肠吸收前后最佳活性测定指标。采用胃蛋白酶、胰蛋白酶、复合酶 (先胃蛋白酶后胰蛋白酶) 对蚂蟥进行酶解, 以筛选得到的最佳活性指标考察酶的种类、酶底比、酶解时间以及酶解温度对蚂蟥酶解工艺的影响。**结果** TT 是测定蚂蟥酶解物抗凝活性的最佳指标, 采用胰蛋白酶对蚂蟥酶解可获得高活性的酶解产物, 最佳的酶解条件为温度 73 °C, 酶底比 10%, 酶解时间 8 h。**结论** TT 作为抗凝指标进行酶解工艺考察, 可反映整个凝血过程, 结果更可靠, 且该法操作简便, 灵敏度高。所优选的酶解工艺简单可行, 可为蚂蟥合理提取提供依据。

关键词: 蚂蟥; 胃蛋白酶; 胰蛋白酶; 活化部分凝血活酶时间; 凝血酶原时间; 凝血酶时间; 外翻肠囊法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)17-2482-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.17.011

Study on enzymolysis process for *Whitmania pigra*

SUN Xue, YUAN Rui-juan, ZHAO Zhi-jie, ZHAN Xue-yan, WANG Xiong-fei, DUAN Tian-xuan

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To optimize the enzymolysis process for *Whitmania pigra*. **Methods** In order to select an appropriate index for study on the enzymolysis process, the activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), and thrombin time (TT) of enzymatic products were determined before and after intestinal absorption, respectively, using an isolated everted intestine model. The enzymolysis of *W. pigra* was carried out by pepsin, trypsin, and the complex enzyme of pepsin and trypsin. According to the selected indexes, the enzymolysis process was optimized under different conditions, such as the kind of enzyme, ratio of enzymes to substrates, time of enzymolysis, and temperature of enzymolysis. **Results** TT was an appropriate index. Enzymatic products with high activity could be obtained only using trypsin. After optimization, the best enzymolysis conditions were as follows: 10% trypsin was added in the solution of *W. pigra*, and the reaction was proceeded under 73 °C for 8 h. **Conclusion** TT is a reliable and sensitive anticoagulation index for enzymolysis. The enzymolysis technology is simple and stable, which could supply the supports for reasonable extraction of *W. pigra*.

Key words: *Whitmania pigra* Whitman; pepsin; trypsin; activated partial thromboplastin time; prothrombin time; thrombin time; everted intestine model

水蛭是一味传统中药,《中国药典》2010年版收载了3种水蛭:水蛭科动物蚂蟥(即宽体金线蛭 *Whitmania pigra* Whitman)、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 和柳叶蚂蟥 *Whitmanaia acranulata* Whitman^[1],其中蚂蟥是我国市场上使用最多的品种,具有抗凝、抗血栓等作用^[2]。目前文献报道的水蛭抗凝成分主要是凝血酶抑制剂,如水蛭素、菲

牛蛭素、森林山蛭素以及其他成分,如溶纤素、待可森等^[3-5]。对于水蛭有效成分的提取方法有水提法、有机溶剂提取法、酶提取法和湿法超微粉碎法^[6]。由于其活性成分为蛋白类,口服后会被胃肠道消化酶酶解,因此对其进行酶解法提取可能是更合理的提取方法。目前,关于采用酶解法对水蛭进行提取的研究已有少量报道,但在提取工艺优化过程中选

收稿日期: 2014-04-17

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7133247); 北京中医药大学药物分析教学团队; 北京中医药大学自主课题 (2014-JYBZZ-XS-117)

作者简介: 孙雪 (1988—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药分析。E-mail: sunxue010216@126.com

*通信作者 袁瑞娟, 博士, 讲师。E-mail: rjyuance@126.com

段天璇, 女, 副教授, 研究生导师, 研究方向为中药化学成分分析及质量分析。Tel: (010)84738618 E-mail: duantx@sina.com

择的活性测定指标比较混乱,并且这些指标均是体外指标,是否适合体内过程并未报道^[7-8]。因此本实验首先对蚂蟥酶解物进行外翻肠囊法^[9]实验,对肠吸收前后的样品分别进行活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)测定,确定蚂蟥酶解物在肠吸收前后各活性指标的区别,选出最佳的活性指标,然后在该指标指导下,采用胃蛋白酶、胰蛋白酶、复合酶(先胃蛋白酶酶解,后胰蛋白酶酶解)对蚂蟥酶解工艺考察,为蚂蟥的提取方法提供依据。

1 仪器与材料

LG—PABER 型血小板聚集凝血因子分析仪,北京世帝科学仪器公司;赛多利斯PB—10 pH计,深圳市凯铭杰仪器公司;5 mL离心机,白洋离心机厂。

蚂蟥,市售,经北京中医药大学中药学院鉴定系杨瑶珺教授鉴定为蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman 的干燥全体;胃蛋白酶 1:10 000, Sigma P7000,北京环亚泰克生物医学技术有限公司;胰蛋白酶 1:250, Amresco0458,北京拜尔迪生物技术有限公司;APTT、PT、TT试剂盒,上海太阳生物技术有限公司;盐酸、氢氧化钠、氯化钠、磷酸二氢钾等均为分析纯试剂。

SD大鼠(雄性),体质量为180~220 g,清洁级,动物许可证号为SCXK(京)20120001;健康日本大耳白兔(雄性),体质量约2 kg,符合国家健康一级动物标准,动物许可证号为SCXK(京)20100001。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

0.1 mol/L 盐酸溶液:取盐酸9 mL,加蒸馏水稀释成1 000 mL,即得;pH 6.8 磷酸盐溶液:取0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液250 mL,加0.2 mol/L 氢氧化钠溶液118 mL,用水稀释至1 000 mL,摇匀,即得^[10]。台氏液:NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、NaHCO₃ 1.0 g、NaH₂PO₄ 0.05 g、MgCl₂ 0.1 g、CaCl₂ 0.2 g、葡萄糖1.0 g,纯水定容至1 000 mL。

2.2 抗凝活性指标的筛选

2.2.1 酶解物样品制备 称取适量蚂蟥,按料液比1:10(g:mL)加入pH 6.8 磷酸盐溶液,加入7.5%胰蛋白酶,于63 °C条件下,酶解6 h。酶解液85 °C加热15 min 灭活后以4 000 r/min 离心15 min,收集上清液,调至pH为7.0,冷冻干燥。取适量蚂蟥

胰蛋白酶酶解物,台氏液配制成质量浓度为50 mg/mL的溶液,备用。

2.2.2 外翻肠囊法实验模型 参照文献方法^[11],实验前大鼠禁食12 h,自由饮水,ip 25%乌拉坦,沿腹中线剖开腹部,迅速取出大鼠小肠,放入冷台氏液中冲洗,至无内容物流出,截取长度为8 cm的回肠2段,小心剥离肠段表面的肠系膜和脂肪,用细玻璃棒将肠管翻转使黏膜面朝外,翻转后结扎一端,将小肠另一端固定于自制取样口,向肠内注入1 mL空白台氏液,作为受药体系,然后将肠段垂直放入含有50 mg/mL蚂蟥胰蛋白酶酶解物溶液(按“2.1.1”项下配制)或台氏液(作为空白对照)的试管中。整个装置放入37 °C恒温水浴中进行实验,并通入空气以保持离体肠囊的活性。于2 h后取肠囊内溶液,15 000 r/min 下离心10 min,取上清液作为样品溶液或者空白肠液,备用。

2.2.3 血浆制备 将健康兔耳缘iv乌拉坦麻醉后,颈动脉取血,3.8%枸橼酸钠抗凝(1:9),混匀后以4 000 r/min,离心15 min,取上清液,分离出血小板血浆(PPP)。

2.2.4 TT测定 取PPP 50 μL于测试杯中,加入样品溶液50 μL,预温5 min后加入TT试剂,用血小板聚集凝血因子分析仪测定凝固时间。以台氏液或空白肠液为阴性对照。

2.2.5 APTT测定 取PPP 50 μL于测试杯中,加入样品溶液50 μL,加入37 °C预温APTT试剂50 μL,37 °C孵育5 min,加入37 °C预温的0.025 mol/L CaCl₂溶液50 μL,记录凝固时间。以台氏液或空白肠液为阴性对照。

2.2.6 PT测定 取PPP 50 μL,加入样品溶液50 μL,37 °C预温5 min,加入37 °C预温PT试剂0.1 mL,记录凝固时间。以台氏液或空白肠液为阴性对照。

分别测定蚂蟥胰蛋白酶酶解物及酶解物肠吸收液的APTT、PT、TT,确定最佳的抗凝活性指标。结果见表1。由表1可看出酶解物在肠吸收前后和空白组对比均可延长APTT、PT、TT 3种指标。在肠吸收前3种指标的空白延长率分别为53.73%、23.94%和199.72%。而经过肠吸收后3种指标的空白延长率分别为15.27%、0.64%和58.83%。无论是从肠吸收前的样品还是经过肠吸收的样品均可以看出,TT的延长最为显著,APTT稍有延长,但没有TT显著,而PT延长效果最弱。

表1 蚂蟥胰蛋白酶酶解物及其肠吸收液抗凝活性测定结果 ($n=3$)

Table 1 Anticoagulant activity of enzymatic products by trypsin and intestinal absorption liquids of <i>W. pigra</i> ($n=3$)							
反应液	APTT/s	PT/s	TT/s	反应液	APTT/s	PT/s	TT/s
蚂蟥胰蛋白酶酶解物(50 mg·mL ⁻¹)	52.13±1.10	14.47±0.12	42.97±2.30	蚂蟥胰蛋白酶酶解物肠吸收液	37.80±0.95	11.43±0.06	22.33±0.12
台氏液	33.97±2.00	11.76±1.27	14.33±0.12	空白肠液	32.80±1.10	11.36±0.35	14.07±0.21
空白延长率/%	53.73	23.94	199.72	空白延长率/%	15.27	0.64	58.83

因此选择 TT 为蚂蟥酶解物抗凝活性指标, 进行下一步酶解工艺的优化。

2.3 胃蛋白酶酶解工艺研究

称取蚂蟥粗粉 2.00 g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液, 密闭, 置于不同温度的水浴中, 分别加入一定量胃蛋白酶酶解一定时间。将酶解液置 85 °C 水浴中灭活 15 min, 冷却至室温后, 以 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 调 pH 至 7.0, 测定 TT。

2.3.1 酶解温度对蚂蟥胃蛋白酶酶解物活性的影响在酶底比 (g : g) 1.25%, 酶解时间 4 h 条件下, 考察了酶解温度分别为 37、45、53、61 °C 对蚂蟥酶解物活性的影响, TT 测定结果分别为 (21.13±0.38)、(20.37±0.35)、(19.30±0.92)、(18.47±0.67) s ($n=3$)。发现不同温度下的蚂蟥酶解物 TT 有所不同, 随温度升高, 酶解物的 TT 逐渐缩短, 可能是温度升高影响了酶的活性。因此确定最佳酶解温度为 37 °C。

2.3.2 酶底比对蚂蟥胃蛋白酶酶解物活性的影响在酶解温度 37 °C, 酶解时间 4 h 条件下, 考察了酶底比分别为 1.25%、2.5%、5%、7.5%、10% 时, 蚂蟥酶解产物的 TT 值, 结果分别为 (16.53±0.12)、(16.50±0.10)、(15.57±0.06)、(15.63±0.06)、(15.10±0.20) s ($n=3$)。可看出随胃蛋白酶酶底比增大, 蚂蟥酶解物 TT 呈下降趋势, 因此选择 1.25% 为最佳酶底比。

2.3.3 酶解时间对蚂蟥胃蛋白酶酶解物活性的影响在酶解温度 37 °C, 酶底比 1.25% 条件下, 考察酶解时间分别为 0.5、2、4、6、8 h 对蚂蟥酶解物 TT 值的影响, 结果分别为 (16.63±0.25)、(17.43±0.31)、(18.63±0.21)、(17.85±0.17)、(17.60±0.46) s ($n=3$)。可看出随酶解时间的延长, 蚂蟥酶解产物的 TT 随之增长, 4 h 后, TT 出现下降。因此酶解时间为 4 h 较合适。

由上述结果可得蚂蟥胃蛋白酶的最佳工艺条件

为酶底比 1.25%, 酶解温度 37 °C, 酶解时间 4 h。

2.4 胰蛋白酶酶解工艺研究

称取蚂蟥粗粉 2.00 g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL pH 6.8 磷酸盐溶液, 密闭, 置于不同温度的水浴中, 分别加入一定量胰蛋白酶酶解一定时间, 将酶解液置 85 °C 水浴灭活 15 min, 冷却至室温后, 以 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 调至 pH 为 7.0, 即得。

2.4.1 酶解温度对蚂蟥胰蛋白酶酶解物活性的影响在酶底比 7.5%, 酶解时间 6 h 条件下, 考察 37、53、63、73 °C 不同酶解温度对蚂蟥胰蛋白酶酶解物 TT 的影响, 结果分别为 (28.90±1.01)、(33.50±2.71)、(54.20±1.57)、(50.40±5.46) s ($n=3$)。可看出在 63 °C 以下时, 温度对 TT 影响较大; 超过 63 °C 时, TT 稍稍下降, 故最适温度为 63 °C。

2.4.2 酶底比对蚂蟥胰蛋白酶酶解物活性的影响在酶解温度 63 °C, 酶解时间 8 h 条件下, 考察酶底比分别为 1.25%、2.5%、5%、7.5%、10% 时, 对蚂蟥胰蛋白酶酶解物 TT 的影响, 结果分别为 (25.97±0.38)、(30.33±0.68)、(40.80±1.44)、(43.87±1.07)、(50.90±2.17) s ($n=3$)。可看出随胰蛋白酶酶底比增大, 蚂蟥酶解物的 TT 逐渐延长, 为节约实验成本, 因此确定最佳酶底比为 7.5%。

2.4.3 酶解时间对蚂蟥胰蛋白酶酶解物活性的影响在酶解温度 63 °C, 酶底比 7.5% 条件下, 考察酶解时间为 0.5、2、4、6、8 h 时, 对蚂蟥胰蛋白酶酶解物 TT 的影响, 结果分别为 (29.43±2.67)、(32.13±1.96)、(42.93±1.72)、(50.60±0.26)、(45.03±3.23) s ($n=3$)。可看出随胰蛋白酶酶解时间变化, TT 呈上升趋势, 6 h 后 TT 缓慢降低。因此选取 6 h 为最佳酶解时间。

由上述结果可得蚂蟥胰蛋白酶酶解条件为酶底比 7.5%, 酶解温度 63 °C, 酶解时间 6 h。

2.5 复合酶酶解工艺研究

参照文献报道^[8,12], 称取蚂蟥粗粉 2.00 g, 置于

离心管中，在最佳的胃蛋白酶酶解条件下反应后，再将反应液 pH 调至 6.8，在 63 °C 的恒温水浴中恒温 30 min 后加入酶底比为 7.5% 的胰蛋白酶分别酶解 0.5、2、4、6、8 h，将酶解液置于 85 °C 的水浴中灭活 15 min，冷至室温，以 4 000 r/min 离心 15 min，取上清液，调至 pH 为 7.0，测定其 TT 值。不同酶解时间对产物活性的影响结果分别为 (34.20±2.79)、(39.43±1.16)、(40.63±3.58)、(45.60±2.55)、(42.37±1.78) s (n=3)。可以看出随酶解时间延长，蚂蟥酶解物的 TT 随之延长，6 h 后 TT 稍稍下降。因此酶解时间为 6 h 较合适。

由以上酶解实验结果可以看出，采用胰蛋白酶酶解和复合酶解法产物活性较胃蛋白酶酶解活性高，胰蛋白酶酶解和复合酶解法产物活性基本一致，但前者工艺更简单，确定胰蛋白酶酶解物效果最佳，因此拟对胰蛋白酶酶解工艺进行优化。

2.6 胰蛋白酶酶解工艺优化

实验中以酶解温度 (A)、酶解时间 (B) 和酶底比 (C) 为考察因素，选择不同水平，以 TT 为指标，按正交设计 $L_9(3^4)$ 表安排试验，取蚂蟥胰蛋白酶酶解后的溶液进行测定试验。试验设计及结果见表 2，方差分析见表 3。

由方差分析结果可得出以 TT 为考察指标时，A、B、C 3 因素均有显著性差异，其影响大小依次为 A>B>C。同时结合极差分析结果，确定蚂蟥用胰蛋白酶酶解的最佳工艺条件为 $A_3B_3C_3$ ，即温度 73 °C、酶底比 10%、酶解 8 h。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

编号	A / °C	B / h	C / %	D (空白)	TT / s
1	53 (1)	4 (1)	5.0 (1)	(1)	30.3
2	53 (1)	6 (2)	7.5 (2)	(2)	33.6
3	53 (1)	8 (3)	10.0 (3)	(3)	35.8
4	63 (2)	4 (1)	7.5 (2)	(3)	39.7
5	63 (2)	6 (2)	10.0 (3)	(1)	43.8
6	63 (2)	8 (3)	5.0 (1)	(2)	42.7
7	73 (3)	4 (1)	10.0 (3)	(2)	51.5
8	73 (3)	6 (2)	5.0 (1)	(3)	52.8
9	73 (3)	8 (3)	7.5 (2)	(1)	52.9
K_1	99.7	121.5	125.8	127.0	
K_2	126.2	130.2	126.2	127.8	
K_3	157.2	131.4	131.1	128.3	
R	57.5	9.9	5.3	1.3	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	552.167	2	1 923.927	$P<0.001$
B	19.460	2	67.805	$P<0.05$
C	5.807	2	20.233	$P<0.05$
D (误差)	0.287	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$ $F_{0.001}(2, 2)=999.00$

按照上述优化所得蚂蟥最佳酶解工艺条件平行制备蚂蟥酶解物 4 批，其 TT 值分别为 71.1、65.9、68.6、67.9 s。TT 结果表明在此优化的酶解工艺条件下，蚂蟥酶解物抗凝效果显著。优选的工艺简单可行，重复性较好。

3 讨论

3.1 活性测定指标的选择

在进行水蛭酶解工艺考察时，活性测定方法的选择至关重要。目前文献报道的关于水蛭活性测定方法多采用《中国药典》2010 年版中记载的凝血酶滴定法，该法只反映纤维蛋白原向纤维蛋白的转化环节，且此种方法灵敏度较低，易受多种因素的影响，如凝血酶活性受 pH 影响，pH 3.0 以下，凝血酶失活，此外由于酸性太强，纤维蛋白原析出沉淀，再加入凝血酶也不凝固。部分文献采用凝血酶滴定法为指标考察胃蛋白酶提取工艺时，活性在酸性环境中测定，结果可信度不高^[13]。李濯冰等^[8]采用 APTT 测定抗凝活性，结果表明胃蛋白酶水解得到的产物活性更高。但凝血过程有多种途径，APTT 仅反映内源性凝血途径。因此本实验选择可反映内源性、外源性和共同凝血途径的 3 种指标：APTT、PT 和 TT，通过外翻肠囊法确定蚂蟥酶解物样品在肠吸收前后各指标的差异，确定肠吸收前后均是 TT 的延长最明显，因此选 TT 为酶解工艺的活性指标。该指标包含了凝血的全部过程，以此来考察酶解工艺，结果更可靠。此外该法采用商品化的试剂盒，稳定、灵敏度高，操作更加简便。因此确定 TT 为抗凝活性指标。

3.2 不同酶解方法的比较

实验中分别采用胃蛋白酶、胰蛋白酶和复合酶对其进行了酶解，其中胰蛋白酶酶解物较胃蛋白酶酶解物活性更为显著，该结果与武建卓的研究结果一致^[14]。此外，为模拟药物在体内的消化吸收过程，对蚂蟥先进行胃蛋白酶酶解，然后进行胰蛋白酶酶解，结果表明采用复合酶所得的产物活性与胰

蛋白酶酶解物活性基本相同。这些结果表明蚂蟥活性成分在胃蛋白酶酶解时不易释放,而胰蛋白酶酶解对活性影响更显著,因此提取时可用胰蛋白酶酶解,此外胰蛋白酶的酶解条件更为简单,可节约实验成本。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 李克明, 张国, 武继彪. 水蛭的药理研究概况 [J]. 中医研究, 2007, 20(2): 62-64.
- [3] 欧兴长. 水蛭活血有效成分研究概况 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1997, 4(2): 60-62.
- [4] 刘君, 杨松松. 蚂蟥抗凝血活性成分的分离、纯化及检测 [J]. 中成药, 2007, 29: 590-591.
- [5] Zhong S, Cui Z, Sakura N, *et al.* A rapid method for isolation and purification of an anticoagulant from *Whitmania pigra* [J]. *Biol Chromatogr*, 2007, 2: 439-445.
- [6] 朱华明, 付廷明, 郭立玮, 等. 水蛭的湿法超微粉碎提取及其工艺优化 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2079-2084.
- [7] 钟超, 吴晖, 赖富饶. 酶解菲牛蛭制备抗凝血肽的工艺优化 [J]. 现代食品科技, 2012, 28(2): 164-167.
- [8] 李濯冰, 赵韶华, 张玉杰, 等. 水蛭不同工艺提取物抗凝与纤溶活性比较及酶解物组成分析 [J]. 中成药, 2011, 33(1): 42-44.
- [9] 吴晓青, 陈丹, 程清, 等. 玳玳黄酮自微乳化微丸在大鼠小肠的吸收特性和机制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2222-2226.
- [10] 林超, 王玉蓉, 吴清, 等. 全蝎的酶解工艺研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(6): 66-69.
- [11] 张英丰, 李玉洁, 杨庆, 等. 采用离体外翻肠囊模型进行穿心莲内酯的肠吸收特性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 108-110.
- [12] 黄镇林, 曹唯仪, 何亮颖, 等. 仿生酶解法提取土鳖虫的工艺研究 [J]. 中医药信息, 2013, 30(2): 20-24.
- [13] 侯林, 姬涛, 张玉娟, 等. 水蛭酶提取工艺的研究 [J]. 齐鲁药事, 2009, 28(1): 41-43.
- [14] 武建卓. 可控酶解水蛭制备抗凝血肽的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2009.