

醚、石油醚等 待测液提取效果好。本实验在此基础上比较了几种常见提取溶剂的提取效率,以乙酸乙酯作为提取溶剂时测得峰面积较大,但有杂质干扰,第二次正交试验在乙酸乙酯中加入石油醚,降低了杂质蛋白的干扰,且提取效率亦不低于单用乙酸乙酯,故本实验选择乙酸乙酯+石油醚为提取溶剂。

参考文献

- (1)李惠芬,许俐,姚立鹃,等. 高效液相色谱法测定氯硝西洋血药浓度(J). 中国药学杂志 2001,36(7):470-472.
- (2)赵焱,余勤,梁茂植,等. RP-HPLC 法同时测定血浆中苯巴比妥、

- 苯妥英钠和卡马西平浓度(J). 华西药学 2004,19(1):104-105.
- (3)曾明辉,吴正中,陈秋虹,等. HPLC 法同时测定血清中苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平的浓度(J). 中国药师,2003,6(12):798-799.
- (4)王增寿,朱光辉,李光乾. 高效液相色谱法测定血清中苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平、氯硝西洋的浓度(J). 中国现代应用药学杂志 2002,19(2):155-156.
- (5)韩丽萍,骆科,张延军. 反相 HPLC 法同时测定多种抗癫痫药物的血清浓度(J). 广东药学院报 2002,18(1):24-26.

· 实验研究 ·

树脂法提取海洋微生物小分子代谢产物的研究

刘荣丽¹,廖云莉²,黄宏南^{3*},周芬霞¹(1. 福建中医药大学 福州 350122;2. 厦门大学 厦门 361005;3. 福建省疾病预防控制中心 福州 350001)

摘要:目的 采用大孔吸附树脂建立海洋微生物小分子代谢产物库的粗提取方法。方法 以吸附率、解吸率、蛋白与总糖吸附率、指纹图谱为评价目标,对常用的 11 种不同极性的大孔吸附树脂进行筛选。结果 DM11 与 SD300 串联吸附对发酵液中化合物的吸附率达 7.528%,总糖与蛋白去除率分别为 90.98% 和 77.69%,且此法几乎不损失乙酸乙酯萃取部分化合物。结论 DM11-SD300 串联树脂吸附法能快速有效地提取发酵液中的小分子化合物,为海洋微生物小分子代谢产物库的建立提供了实验基础。

关键词:大孔吸附树脂;发酵液;粗提取

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1006-3765(2013)-09-0173-04

Studies on extraction of small molecule metabolites produced by marine microorganisms with macroporous adsorption resin

LIU Rong-li¹,LIAO Yun-li²,HUANG Hong-nan^{3*},ZHOU Fen-xia¹(1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish a crude extraction method for the library of small molecule metabolites produced by marine microorganisms using macroporous adsorption resin (MAR). **METHODS** 11 types of MARs were selected based on their adsorption rate, desorption rate, protein and polysaccharide adsorption rate. **RESULTS** DM11 and SD300 in series, were used to extract small chemical molecules from bacterial fermentation liquid, by which the adsorption rate is up to 7.528%, while the removal rate of protein and polysaccharides is 90.98% and 77.69% respectively. In addition, this process barely lose compounds that extracted from ethyl acetate. **CONCLUSION** the approach of DM11-SD300 in series could extract small molecule metabolites from fermentation liquid rapidly and effectively, which will make a foundation to achieve the library of small molecule metabolites produced by marine microorganisms.

作者简介:刘荣丽,女(1990-),福建中医药大学药物分析学在读研究生。主要从事保健食品与药品分析。联系方式:13645063936, E-mail: lrl.819@163.com

通讯作者:黄宏南,男。职称:主任技师。主要从事保健食品与药品分析研究

KEY WORDS: Macroporous adsorption resin; Fermentation liquid; Crude extraction

海洋占地球表面积 71% , 拥有多达 95% 的生物资源。海洋微生物因其特殊的生存环境如高盐度、高压、低营养、低温 (特别是深海) 或局部高温和无光照以及不同的生物之间的关系等等, 其代谢产物往往结构新颖、种类繁多、活性独特, 是新药及其先导结构的一个重要来源。常用的溶媒萃取法 (正丁醇、乙酸乙酯) 从微生物发酵液中提取活性物质, 需将大量发酵液进行浓缩后萃取, 溶剂消耗大, 很难满足快速高通量筛选的要求。大孔吸附树脂应用于分离技术是在 20 世纪 60 年代末发展起来的, 由于其理化性质稳定, 不受无机盐及强离子低分子化合物存在的影响, 吸附量大, 溶剂消耗量少、易回收, 成本低, 而愈加适用于稳定性较差的生物样品药物, 因此近些年来关于树脂法分离纯化抗生素的报道也屡见不鲜。王俊波等人应用 AB-8 与 ADS-7 大孔吸附树脂串联吸附法, 以流感病毒神经氨酸酶作为抗流感病毒药物筛选的靶标建立了海洋微生物小分子代谢产物的高通量筛选方法^[1]。

本实验通过对 11 种常用的大孔吸附树脂进行比较研究, 建立了快速获取海洋微生物小分子代谢产物粗提取物的串联吸附方法, 为海洋微生物小分子代谢产物库的建立提供了实验基础。

1 材料与试剂

1.1 材料与试剂 大孔吸附树脂 ADS-7、HPD600、HPD400、HPD 400A、HPD700、HPD750 (河北沧州宝恩吸附材料科技有限公司); DM11 和 SD300 (浙江争光实业股份有限公司); NKA-II (南开大学化工厂); AB-8 (安徽三星树脂科技有限公司); D101 (天津市海光化工有限公司)。主要试剂: 葡萄糖、氢氧化钠、亚硫酸氢钠、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、盐酸、磷酸、无水乙醇、甲醇均为分析纯; 考马斯亮蓝 G250 (国药集团化学试剂有限公司); BSA 标准蛋白溶液 (天根生化科技有限公司, 批号 lot#k9819)。发酵液: 由国家海洋局第三海洋研究所提供。

1.2 仪器 普通层析柱 (3.6cm i. d. × 20cm, 上海楚定分析仪器有限公司); JA4103 电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); UV-9100 型紫外分光光度计 (奥生源科技有限责任公司); 美国 Waters 2695 型高效液相色谱系统, 配 Waters 2998 型二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站; ELSD-UM500 (上海通微分析技术有限公司), N2000 工作站; GL10MD 型大容量高速冷冻离心机 (湘仪离心机仪器有限公司); 平板超滤膜, 截留分子量 30 万 (上海名列化工科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 总糖含量的测定: 3,5-二硝基水杨酸比色法^[2], 以葡萄糖为标准品。

1.3.2 蛋白含量的测定: 考马斯亮蓝法^[3], 以牛血清蛋白为标准品。

1.3.3 HPLC-PDA/ELSD 色谱条件: 色谱柱为 Eurospher 100-5 C₁₈ 柱 (4.6mm × 250mm 5μm); 流动相: A (甲醇), B (水); 梯度洗脱: 0 ~ 5min 5% A, 5 ~ 25min 5% → 35% A, 25 ~ 40min,

35% A → 100% A, 40 ~ 50min 100% A; 流速 0.8mL · min⁻¹; 柱温 30 ± 5℃; 进样量 20μL, 二极管阵列检测器扫描波长为 210 ~ 600nm。蒸发光散射检测器条件: 蒸发温度 35℃, 空气流量 2.5L · min⁻¹。

1.3.4 树脂预处理: 大孔吸附树脂先用乙醇浸泡 24h, 充分溶胀, 以除去树脂中醇溶性杂质。湿法装柱, 树脂装至柱高 2/3 处, 用 95% 乙醇以 2BV · h⁻¹ 的流速通过树脂层, 洗至流出液加水不变为白色浑浊为止, 最后用去离子水以 2BV · h⁻¹ 的流速洗尽乙醇。

1.3.5 静态吸附树脂筛选实验: 破碎后的发酵液经 8000r · min⁻¹ 离心除去菌丝体, 过截留分子量为 30 万的超滤膜得澄清溶液作为原液。在 250mL 锥形瓶中, 加入 5.00g 预处理过的树脂和 150mL 发酵液原液, 用玻璃纸封口, 置于摇床振摇 (200r · min⁻¹, 20℃) 24h 后取出, 过滤得残余液。将过滤后的大孔吸附树脂置于 250mL 锥形瓶中, 分别加入 50% 甲醇溶液和纯甲醇 150mL, 封口后放入摇床上振摇 (200r · min⁻¹, 20℃) 24h 进行解吸, 过滤, 合并两部分滤液为解吸液, 常温干燥恒重后的解吸物用不同浓度甲醇定容至 20mL, 取 1mL 过 0.22μm 有机滤膜后进行色谱分析。各指标计算如下: 吸附率 % = $\frac{m - m_r}{m} \times 100$, 解吸率 % = $\frac{m_d}{m - m_r} \times 100$, 蛋白吸附率 % = $\frac{p - p_r}{p} \times 100$, 总糖吸附率 % = $\frac{s - s_r}{s} \times 100$ 。式中: m-发酵液原液常温干燥恒重后的质量 g; m_r-残余液常温干燥恒重后的质量 g; m_d-解吸液常温干燥恒重后的质量 g; p-发酵液原液中蛋白质含量 g; p_r-残余液中蛋白质含量 g; s-发酵液原液中总糖含量 g; s_r-残余液中总糖含量 g;

2 结果与讨论

2.1 静态树脂筛选实验结果 海洋微生物发酵液中的物质复杂多样, 为获得小分子代谢产物应尽量除去其中的蛋白、多糖等大分子物质, 故树脂应具备较高的吸附率与解吸率, 而对蛋白、多糖的吸附率低。极性树脂 SD300, 非极性树脂 DM11, 中极性树脂 HPD400 在发酵液的吸附中具有较大优势 (见表 1)。

2.2 液相指纹图谱分析

大孔吸附树脂是一种非离子型共聚物, 它能借助范德华力从溶液中吸附各种有机物质。根据“类似物容易吸附类似物”的原则, 一般非极性吸附剂适宜于从极性溶剂 (例如, 水) 中吸附非极性物质。相反, 高极性吸附剂适宜从非极性溶剂中吸附极性化合物, 而中等极性吸附剂则对上述两种情况均具有吸附能力^[4]。

图 1a 为极性树脂解吸物指纹图谱, 从吸附范围来比较 SD300 ≈ NKA-II > HPD600 > ADS-7, 可见 ADS-7 树脂吸附能力极强, 难以在甲醇中解吸, SD300 与 NKA-II 对具有紫外吸收的化合物的吸附基本一致, 均集中于极性部分。但 SD300 解吸质量高于 NKA-II, 主要表现其对无紫外吸收化合物的吸附, 具体 (见图 1b) 这可能与 SD300、NKA-II 在孔径和比表面

积上的差异有关。此外,在实验过程中发现 SD300 的残余液呈无色,说明该树脂具有良好的脱色能力,这已被相关报道所证实⁽⁵⁾。比较弱极性树脂 AB-8 与非极性树脂 D101、DM11 的指纹图谱基本一致(见图 1c),皆集中于对中等极性至弱极性化合物的吸附,对极性物质的吸附明显弱于极性树脂。

表 1 大孔树脂的物理性质与静态吸附筛选实验结果

名称	树脂类型	平均孔径 /nm	比表面积 /m ² ·g ⁻¹	吸附率 /%	解吸率 /%	蛋白吸附率 /%	总糖吸附率 /%
ADS-7	强极性	27.5	≥100	18.6	0.758	76.3	9.57
HPD600	极性	8	≥550	13.7	3.33	85.0	2.55
NKA-II	极性	15	≥200	22.5	3.35	34.4	13.0
SD300	极性	6	≥800	33.0	6.43	48.2	12.6
AB-8	非极性	13.5	≥500	17.3	4.73	71.5	13.2
D101	非极性	10.5	≥400	17.3	3.67	83.0	13.4
DM11	非极性	8	≥800	17.4	4.77	85.4	9.36
HPD400	中极性	8	≥500	21.7	3.76	88.1	2.77
HPD400A	中极性	8.5	≥500	15.5	3.20	88.9	4.89
HPD700	中极性	8.5	≥650	12.8	4.66	92.1	18.7
HPD750	中极性	8.5	≥650	21.9	2.99	98.0	8.72

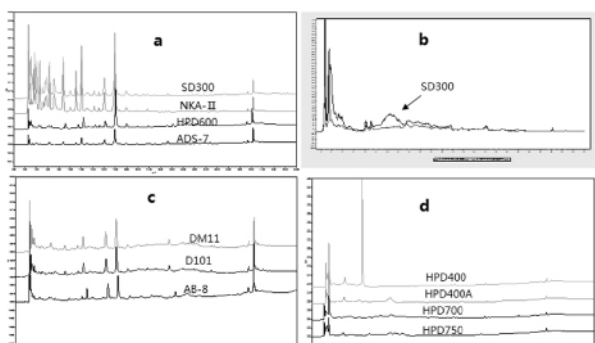


图 1 树脂解吸液指纹图谱

a 极性树脂;b SD300 和 NKA-II 解吸液 ELSD 图谱;c 非极性树脂;d 中极性树脂

2.3 串联树脂吸附 为最大化获取代谢产物,将筛选出的非极性树脂 DM11 与极性树脂 SD300 串联,与中极性树脂 HPD400 在相同条件下对发酵液进行吸附解吸对比。结果显示,HPD400 的解吸质量仅为 DM11-SD300 串联吸附解吸量的 31.90%,且指纹图谱(见图 2)表明 DM11-SD300 串联吸附的化合物更全面。此外,DM11-SD300 串联树脂的蛋白与总糖去除率分别高达 77.69% 和 90.98%。

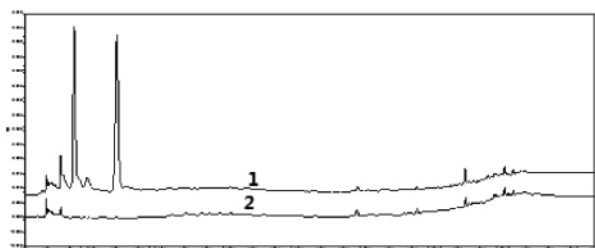


图 2 DM11-SD300(1)与 HPD400(2)解吸液指纹图谱

图 1d 显示了中极性树脂对发酵液的吸附指纹图谱,HPD400 对化合物的吸附明显优于其他 3 种树脂。但总体来讲中极性树脂的吸附能力弱,吸附量较低,同时也容易被解吸,这可能与树脂骨架为甲基丙烯酸酯类有关。

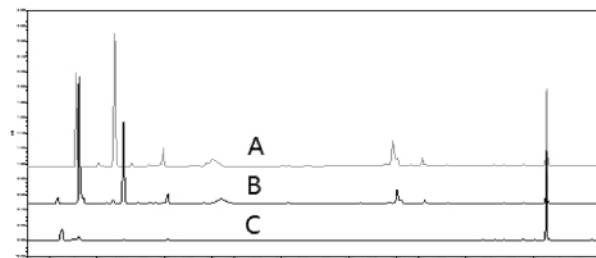


图 3 串联树脂解吸液(A)、发酵液(B)、吸附残余液(C)经乙酸乙酯萃取后的指纹图谱比较

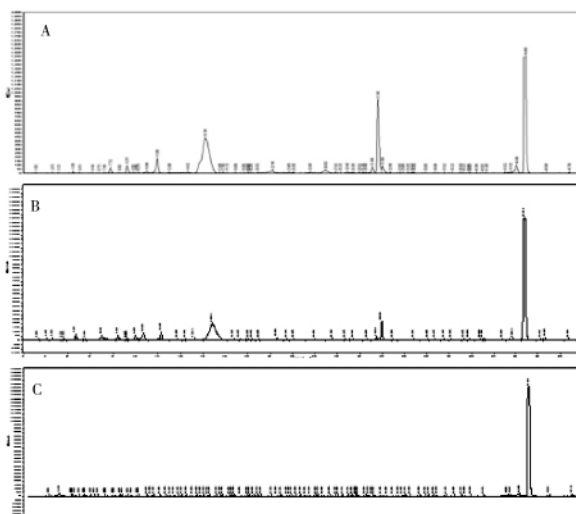


图 4 串联树脂解吸液(A)、发酵液(B)、吸附残余液(C)经乙酸乙酯萃取后的 ELSD 指纹图谱比较

为进一步证明 DM11-SD300 串联树脂对发酵液中各种化

化合物的吸附质量 将这种串联树脂洗脱液、发酵液原液、残余液在相同条件下经乙酸乙酯等体积萃取 3 次,浓缩称重后,用乙酸乙酯定容至相同体积并进行色谱分析。结果,DM11-SD300 串联吸附法对发酵液中化合物的提取率为 7.528%,远远高于乙酸乙酯萃取法的提取率 0.5940%,且 HPLC-PDA/ELSD 分析表明(见图 3、4) 吸附法几乎能够获得乙酸乙酯萃取部分的所有化合物。

3 结论

本文对目前常用的 11 中不同极性大孔吸附树脂进行了筛选,通过考察其吸附率、解吸率、蛋白与总糖吸附率以及 HPLC-PDA/ELSD 指纹图谱分析,筛选出了极性树脂 SD300、非极性树脂 DM11 和中极性树脂 HPD400。再通过 DM11-SD300 串联树脂吸附与中极性树脂 HPD400 以及报道较多的乙酸乙酯萃取法进行比较研究,证明了 DM11-SD300 串联吸附法能最大化、有效地提取发酵液中的小分子代谢产物,此法

对海洋微生物发酵液中化合物的吸附率达 7.528%,蛋白去除率为 90.98%,总糖去除率为 77.69%,且其吸附几乎不损失乙酸乙酯萃取部分化合物,这将为海洋微生物小分子资源库的建立提供实验基础。

参考文献

- (1) 王俊波,曹文涛. 大孔树脂吸附法高通量快速提取微生物次生代谢产物(J). 华中农业大学学报 2010, 29(06):732-736.
- (2) 董林青,牛国文,刘志毅,等. 应用不同方法测定发酵液中的糖含量(J). 广东化工 2009, 36(09):177-189.
- (3) 李瑞军,李德耀,张现峰,等. 大孔吸附树脂法去除淫羊藿多糖中蛋白的研究(J). 高等学校化学学报 2006, 27(01):67-70.
- (4) 顾觉奋. 离子交换与吸附树脂在制药工业上的应用(M). 北京:中国医药科技出版社 2008, 203-206.
- (5) 黄俊,梅乐和,胡升. γ -氨基丁酸发酵液的絮凝和脱色工艺研究(J). 食品工业科技 2009, 30(07):257-259.

• 药物经济学 •

3 种喹诺酮类药物治疗急性膀胱炎的成本-效果分析

李正平(福建省平潭县医院药剂科 平潭 350400)

摘要:目的 探讨左氧氟沙星、依诺沙星、氟罗沙星等 3 种喹诺酮类药物治疗急性膀胱炎的成本-效果。方法 90 例急性膀胱炎随机分为 3 组 A 组给予盐酸左氧氟沙星治疗, B 组给予葡萄糖酸依诺沙星治疗, C 组给予氟罗沙星治疗,疗程均为 5d。并进行成本-效果分析。结果 A、B、C 3 组的有效率分别为 60%、83%、86%。成本-效果比分别为 4.73、7.01、3.70。在 A 组基础上每增加一个单位疗效, B 组所追加的成本为 12.96 元, C 组所追加的成本为 1.34 元。结论 氟罗沙星组较为经济合理。

关键词:尿路感染;喹诺酮类药物;成本-效果分析

中图分类号:R969.4 文献标识码:B 文章编号:1006-3765(2013)-09-0176-02

急性膀胱炎^[1,2]是一种常见的感染性疾病,一般抗感染治疗。第三代、第四代喹诺酮类抗菌药物^[3,4]具有抗菌谱广,抗菌力强,组织浓度高,与其它常用抗菌药物如头孢类如无交叉耐药性,不良反应少等优点,目前广泛运用于急性膀胱炎的治疗。但喹诺酮类抗菌药物品种众多,选择既经济又有效的药物研究偏少。本研究运用药物经济学的原理,对左氧氟沙星、依诺沙星、氟罗沙星这 3 种喹诺酮类抗菌药物治疗急性膀胱炎进行成本-效果分析,以期寻找有效、安全、经济的药物。

1 一般资料

1.1 一般资料 选取 2011 年 1 月~2011 年 12 月在本门诊治疗的急性膀胱炎患者 90 例,所有患者均符合人卫版第 7 版内科学教科书^[5]中的急性膀胱炎诊断标准^[4]。排除标准:①对喹诺酮类药物过敏者;②严重心、肺、肝、肾功能损害者。其

中男 30 例,女 50 例,年龄 22 岁~60 岁,病程 1d~7d。患者随机分为 3 组(A 组、B 组、C 组),每组各 30 例。3 组患者在年龄、性别、病程上无统计学差异($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 治疗方法 A 组给予盐酸左氧氟沙星(由扬子江药业集团有限公司生产,规则为 0.1g/支,价格为 14.20 元/支)0.4g 静脉滴注,1 日 1 次;B 组给予葡萄糖酸依诺沙星(由福建闽东力捷迅有限公司生产,规则为 0.1g/支,价格为 29.10 元/支)0.4g 静脉滴注,1 日 1 次;C 组给予氟罗沙星(由扬子江药业集团有限公司生产,规则为 0.2g/支,价格为 31.90 元/支)0.4g 静脉滴注,1 日 1 次。3 组疗程均为 5d。

1.3 疗效评定 按国家卫生部颁发的《抗菌药物临床研究指导标准》进行操作,依临床症状、体征、实验室检查、细菌学检查进行综合评价以确定临床疗效,按痊愈、显效、进步、无效四级评定。痊愈指的是症状、体征、实验室检查及细菌学检查均恢复正常。显效指的是上述 4 项中有一项未完全恢复正常。进步指的是用药后病情有所好转,但不够明显。无效指的是用药 3 天后病情无明显进步甚至有所加重。有效率(%) =

作者简介:李正平,女(1963.1-),毕业于北京大学网络教育学院。职称:副主任药师。从事医院药学工作。联系电话:13706996565