

基于高速逆流色谱的大极性海参多肽分离方法研究

全凯军^{1,2},段文达^{1,2},王玉¹,裴栋¹,黄新异^{1,2*},邸多隆^{1,2*}

¹中国科学院兰州化学物理研究所 西北特色植物资源化学实验室,兰州 740000;²中国科学院大学,北京 100049

摘要:本文通过对 HEMWat 溶剂体系中 28 种常用溶剂系统单相以及整体极性进行系统分析,探讨了无法用常规 J 型逆流色谱实现对大极性化合物实现有效分离的原因。根据分析结果建立了一种以分离物质理化性质为基础选择潜在改性剂,样品在溶剂系统上相中的溶解程度为判断指标进行筛选逆流色谱溶剂系统改性剂,进而得到适宜的溶剂系统对大极性海参多肽样品进行系统分段方法。经过两步分离,共得到 8 个随极性分布的海参多肽片段,为海参多肽最佳活性物质的追踪和筛选提供了技术支持。

关键词:高速逆流色谱;HEMWat 溶剂体系;大极性化合物;海参多肽;样品前处理

中图分类号:R93

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)2-0311-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.2.021

Separation study of strong polar polypeptide from sea cucumber by high speed countercurrent chromatography

QUAN Kai-jun^{1,2}, DUAN Wen-da^{1,2}, WANG yu¹, PEI Dong¹, HUANG Xin-yi^{1,2*}, DI Duo-long^{1,2*}

¹CAS Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences (CAS), Lanzhou, 730000, China;

²University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China

Abstract: The reason why the strong polar compounds couldn't be well separated by conventional J type high speed countercurrent chromatography has been studied by analyzing the total and single phase's polarity distribution rules of commonly used 28 kinds HEMWat solvent systems in this paper. According to the results, an effective sample pre-treatment method was established to segment the Sea Cucumber polypeptides. The method is based on the polypeptides' physical and chemical properties to find a suitable modifier improving the distribution behavior of the samples in mobile phase and stationary phase. After two-step separation, eight sea cucumber polypeptide fractions with different polarity were obtained, which provided technical support for the tracking and screening of the best active substance of sea cucumber polypeptide.

Key words: high speed counter-current chromatography; HEMWat solvent systems; high polar compounds; sea cucumber polypeptide; pretreatment technology

海参多肽(Sea cucumber polypeptide)是以海参为原料,经蛋白酶酶解后分离得到的具有多种功能特性的生物活性物质。研究发现海参多肽具有抗氧化^[1]、降血压^[2]、降血脂^[3]、抗疲劳^[4]、抗癌^[5]以及镇痛^[6]等生物活性,在食品、医药、保健品等行业具有很大的应用价值。但海参多肽活性的研究多以混合肽为研究对象,存在生物活性物质基础不明确的问题。目前对海参多肽的分离纯化主要是对其进行

脱盐和脱色处理得到纯度较高的粗多肽^[7,8]和使用不同技术从分子量角度进行分离纯化得到具有高纯度的多肽单体^[9]。上述分离技术使得海参的营养价值得到更好地研究和应用,但依然存在分离不系统、微量活性成分易丢失、制备量小等问题,这就限制了它的进一步开发利用,因此急需建立一种新的方法实现对海参多肽较系统地分段处理,为海参多肽生物活性物质基础研究和系统分离提供技术支持。

高速逆流色谱(High speed counter-current chromatography, HSCCC)是在液-液分配基础上建立的一种连续的分配色谱技术,与其他柱色谱技术相比,具有无不可逆吸附、无分解变性、活性保留、制备量

收稿日期:2018-03-14 接受日期:2018-11-02

基金项目:国家自然科学基金(21505144,21605149)

* 通信作者 E-mail: didl@licp.cas.cn

大和溶剂系统选择多等优点^[10],被作为一门高效的制备或半制备分离技术广泛用于天然产物活性物质的制备分离^[11-13]。应用逆流色谱技术对多肽分离研究也已有众多报道^[14-16],但上述研究主要是采用特定逆流色谱设备用双水相体系或使用特别的逆流色谱技术如 PH 区带精制逆流色谱^[17]、螺旋柱逆流色谱^[18]等进行单肽的分离制备或对多肽标准品进行方法学研究,而使用 HSCCC 对多肽粗品进行系统分段的研究却鲜有报道。此外,目前使用最广泛的高速逆流色谱,又叫 J 型逆流色谱^[19],是建立在一种特殊的同步行星式运动模式基础上能够实现常规中小极性天然物质的快速、高效分离,但由于其运动模式的限制,对适合多肽分离的大极性溶剂体系如双水相很难得到有效保留,因此对多肽等大极性化合物分离效果不佳,这就极大限制了高速逆流色谱技术在大极性物质如多肽的系统分离和活性筛查研究中的应用^[20]。

本文通过对 28 种逆流色谱中常用的 HEMWat 溶剂体系极性规律进行分析,探讨了无法用 J 型 HSCCC 实现对大极性多肽有效分离的原因,进而建立一种基于分离物质理化性质选择适宜的溶剂改性剂实现对大极性分离物质有效分段的样品前处理方法,并对海参多肽样品进行了分段研究,为海参多肽的最佳活性物质的筛选追踪和进一步的开发利用提供了技术支持,同时也为使用 HSCCC 实现其他大极性物质如蛋白质多糖的分离提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

TBE-300C 型高速逆流色谱仪(上海同田生物

技术有限公司,中国); NU3000 紫外检测器和 NP7000 恒流泵(江苏汉邦科技有限公司,中国); Easy Chrom 工作站(江苏汉邦科技有限公司,中国); HX-2050 恒温循环器(北京博医康实验仪器有限公司,中国); BUCHI 旋转蒸发器(瑞士步琪有限公司,瑞士)。1260 HPLC 色谱仪(安捷伦科技有限公司,美国),色谱柱为: Spherisorb C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 柱号: E2721217)。表 1 和表 2 中所列的 HEMWat 溶剂体系的配比数据是由英国 Dynamic Extractions 有限公司提供。

1.1.2 试剂

高速逆流色谱分离所用到的试剂包括:分析级正丁醇(重庆化学试剂有限公司);超纯水是由 Spring-R10 水纯化系统(中国厦门科学仪器有限公司)制备得到;分析纯乙酸和三乙胺(天津大茂化学试剂厂);实验所用海参多肽由青岛市资源化学与新材料研究中心提供,分子量范围在 800 ~ 3 000 Da。

1.2 HEMWat 溶剂体系极性分析

HEMWat 溶剂体系是逆流色谱中一类比较有代表性的溶剂体系,其溶剂组成如表 1 所示。为实现溶剂系统的科学配置,DE 研发团队利用气相色谱分离分析技术对 HEMWat 溶剂体系分层后的组成进行了研究,建立了一套多元溶剂体系上下相体系的科学配制新方法,其组成情况如表 2 所示。本文根据罗氏极性公式: $P = X_1P_1 + X_2P_2 + X_3P_3 + \dots + X_nP_n$,以 Rohrschneider Snyder 为极性参数(表 3)对 HEMWat 溶剂体系 28 个不同组成的两相溶剂系统整体和单相极性分别进行计算并对其规律进行分析。

表 1 HEMWat 溶剂体系组成

Table 1 The composition of the HEMWat solvent systems

序号 No.	正己烷 Hexane	乙酸乙酯 EtOAc	甲醇 MeOH	正丁醇 Butanol	水 Water	序号 No.	正己烷 Heptane	乙酸乙酯 EtOAc	甲醇 MeOH	正丁醇 Butanol	水 Water
1	0.00	0.00	0.00	50.00	50.00	15	20.00	30.00	20.00	0.00	30.00
2	0.00	10.00	0.00	40.00	50.00	16	22.73	27.27	22.73	0.00	27.27
3	0.00	20.00	0.00	30.00	50.00	17	25.00	25.00	25.00	0.00	25.00
4	0.00	30.00	0.00	20.00	50.00	18	27.27	22.73	27.27	0.00	22.73
5	0.00	40.00	0.00	10.00	50.00	19	30.00	20.00	30.00	0.00	20.00
6	0.00	50.00	0.00	0.00	50.00	20	33.33	16.67	33.33	0.00	16.67
7	2.50	47.50	2.50	0.00	47.50	21	35.71	14.29	35.71	0.00	14.29
8	5.00	45.00	5.00	0.00	45.00	22	37.50	12.50	37.50	0.00	12.50

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	正己烷 Hexane	乙酸乙酯 EtOAc	甲醇 MeOH	正丁醇 Butanol	水 Water	序号 No.	正己烷 Heptane	乙酸乙酯 EtOAc	甲醇 MeOH	正丁醇 Butanol	水 Water
9	7.14	42.86	7.14	0.00	42.86	23	40.00	10.00	40.00	0.00	10.00
10	8.33	41.67	8.33	0.00	41.67	24	41.67	8.33	41.67	0.00	8.33
11	10.0	40.00	10.00	0.00	40.00	25	42.86	7.14	42.86	0.00	7.14
12	12.5	37.50	12.50	0.00	37.50	26	45.00	5.00	45.00	0.00	5.00
13	14.29	35.71	14.29	0.00	35.71	27	47.50	2.50	47.50	0.00	2.50
14	16.67	33.33	16.67	0.00	33.33	28	50.00	0.00	50.00	0.00	0.00

表 2 HEMWat 各溶剂体系中每种组分的组成比例

Table 2 The proportion of each component in HEMWat solvent systems

序号 No.	上相 Upper Phases					下相 Lower Phases				
	正己烷 Hexane (%)	乙酸乙酯 EtOAc (%)	甲醇 MeOH (%)	正丁醇 Butanol (%)	水 Water (%)	正己烷 Heptane (%)	乙酸乙酯 EtOAc (%)	甲醇 MeOH (%)	正丁醇 Butanol (%)	水 Water (%)
1	0.00	0.00	0.00	83.84	16.16	0.00	0.00	0.00	8.87	91.13
2	0.00	15.53	0.00	67.21	17.26	0.00	2.29	0.00	7.60	90.12
3	0.00	32.92	0.00	50.35	16.73	0.00	4.27	0.00	6.22	89.51
4	0.00	52.23	0.00	33.78	13.99	0.00	5.80	0.00	4.60	89.61
5	0.00	74.33	0.00	16.48	9.19	0.00	6.91	0.00	2.74	90.35
6	0.00	96.86	0.00	0.00	3.14	0.00	7.83	0.00	0.00	92.17
7	5.11	92.05	0.76	0.00	2.08	0.00	8.26	4.60	0.00	87.13
8	10.30	86.66	1.35	0.00	1.69	0.00	8.42	9.10	0.00	82.48
9	15.08	81.93	1.81	0.00	1.18	0.00	8.37	13.01	0.00	78.62
10	16.89	79.84	2.05	0.00	1.22	0.00	8.79	14.79	0.00	76.42
11	20.76	75.77	2.40	0.00	1.07	0.00	9.21	17.89	0.00	72.90
12	26.70	69.62	2.80	0.00	0.88	0.00	10.33	22.07	0.00	67.60
13	30.69	65.40	3.14	0.00	0.77	0.00	10.54	25.23	0.00	64.23
14	37.37	58.82	3.27	0.00	0.54	0.01	12.72	28.09	0.00	59.18
15	46.70	49.95	2.93	0.00	0.42	0.03	15.20	33.12	0.00	51.65
16	55.71	41.40	2.57	0.00	0.33	0.13	17.70	36.90	0.00	45.27
17	63.44	33.86	2.41	0.00	0.29	0.25	18.99	40.91	0.00	39.85
18	71.20	26.72	1.90	0.00	0.18	0.36	19.70	43.31	0.00	36.63
19	78.44	20.03	1.43	0.00	0.10	0.49	19.57	48.10	0.00	31.83
20	84.77	14.13	1.03	0.00	0.06	0.73	18.04	53.94	0.00	27.29
21	89.01	9.98	0.97	0.00	0.04	1.07	16.22	59.32	0.00	23.40
22	91.09	8.00	0.88	0.00	0.03	1.23	15.02	62.88	0.00	20.87
23	93.26	5.86	0.86	0.00	0.02	1.80	12.38	68.44	0.00	17.37
24	94.82	4.47	0.69	0.00	0.02	2.63	10.82	72.46	0.00	14.09
25	95.17	3.95	0.86	0.00	0.02	3.16	9.54	74.79	0.00	12.50
26	96.67	2.43	0.89	0.00	0.01	5.12	6.71	79.57	0.00	8.60
27	97.20	1.32	1.46	0.00	0.01	9.95	3.45	82.26	0.00	4.34
28	97.51	0.00	2.49	0.00	0.00	25.58	0.00	74.42	0.00	0.00

表3 HEMWat 体系中各溶剂的 Rohrschneider Snyder 极性值

Table 3 The Rohrschneider Snyder of each solvent in HEMWat

极性参数 Polarity parameter	正己烷 Hexane	乙酸乙酯 Ethylacetate	甲醇 Methanol	正丁醇 Butanol	水 Water
Rohrschneider snyder(P')	0.10	4.40	5.10	3.90	10.20

1.3 改性试剂的确定和优化

改性剂的选择是通过分析海参多肽的理化性质,选择能够影响其分子存在形式的物质作为潜在改性剂。以能够模拟有机相的正丁醇/乙酸乙酯/水(5:2:1)为测试溶剂,在多个 10 mL 透明玻璃试管

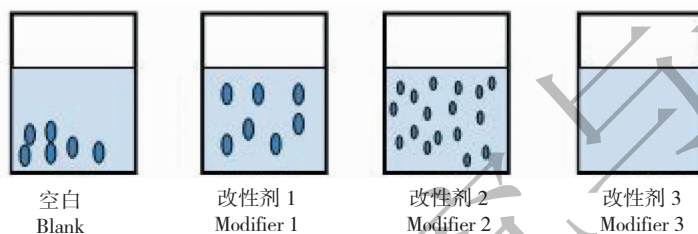


图1 改性试剂的筛选原理图

Fig. 1 The schematic of screening the solvent modifier

1.4 分离条件的确定

本论文的目的在于建立一个基于溶剂改性剂快速筛选策略使用 J 型高速逆流色谱对大极性海参多肽按照极性差异进行系统分段的样品前处理技术,且此类大极性化合物的 K 值的准确测定本身存在技术难题,因此直接选择极性溶剂系统水/正丁醇为基准体系,以固定相保留率为首要判断指标,对水/正丁醇/乙酸乙酯(5:5:0,5:4:1,5:3:2)三个溶剂系统进行分离测试筛选,使用筛选后的最优溶剂系统对流速(4、8、10、20 mL/min)进行优化。

1.5 酸碱交替分离

多肽是由不同氨基酸组成,因此由成百上千多肽组成的混合肽不会仅具有单一的酸碱性。1.3 中描述的筛选方法是根据混合肽整体表现出来的性质去选择适宜的添加剂,如海参粗多肽由于整体显酸性因此选择乙酸作为改性剂,但其中有部分化合物是显碱性的,在加入乙酸的性溶剂系统中以解离形式存在,趋向与溶解在下相中被优先洗脱出来,形成一个还有较多显碱性肽的混合组份,因此可通过选择极性稍大的溶剂系统,改用碱性三乙胺作为改性剂对由第一步分离获得的第一个极性段进行二次分离,由于三乙胺的加入可使它们以分子形式存在,促进其在有机相中的分配,从而实现二次分离,两步综

中分别加入 6 mL 测试溶剂和 2 mg 海参多肽粗品,然后逐一加入 1 mL 备选改性剂,观察海参多肽粗品在测试液中的溶解情况,原理如图 1 所示,能够促进样品在测试溶剂中溶解的改性剂即为适宜的改性剂。

合即为酸碱交替分离。

1.5 HSCCC 所得组份 HPLC 分析

对经 HSCCC 分离所得到的各组分进行 HPLC 分析,色谱条件如下:流动相 A 为含有 0.1% 三氟乙酸水溶液, B 为色谱乙腈;梯度洗脱:0~10 min,10~30% B;10~20 min,30% B;流速 1.0 mL/min;检测波长:220 nm 和 280 nm;进样体积:20 μ L。

2 结果与分析

2.1 HEMWat 溶剂体系极性分析

根据 1.2 方法,使用罗氏极性公式对 28 个 HEMWat 溶剂系统的整体极性和单相极性分别进行计算,结果如图 2 所示:28 个溶剂系统分层后的单相极性与整体极性保持相同的变化趋势,如图 2A 所示。以 Rohrschneider Snyder 极性参数的计算结果显示:此体系中上相极性范围:0.22~4.75,下相极性范围:下相:4.93~9.74。通过用下相极性减去上相极性得:28 个溶剂系统上下相极性差值基本一致(约为 5 左右),如图 2B 所示,也就是说逆流色谱溶剂系统分层后上下相极性具有一个相对稳定的差值,这也是两相能够分层的一个必要条件。

2.2 改性试剂的筛选依据和结果

逆流色谱能够实现有效的首要前提是分离物质在所选溶剂系统的上下相中产生适宜的分配(即

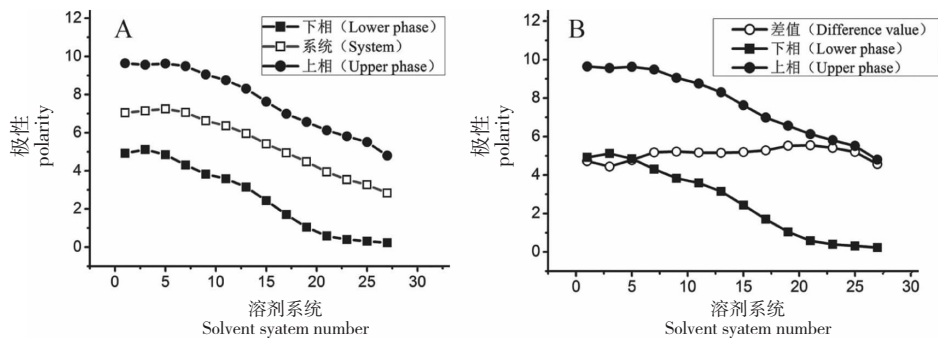


图2 HEMWat 溶剂体系极性分析结果及其分布规律

Fig. 2 The polarity result of the HEMWat solvent systems and its distributing characteristics

0.5 < K < 2)。因物质在两相中的分配是基于“相似相溶原理”,因此对于大极性物质而言,其基本上单一的分配于下相当中,因此无法用常规的溶剂对大极性化合物进行满意的分离。基于以上理由,我们以被分离物质的理化性质为依据,期望添加一定的与其性质相对应的溶剂改性剂(pH 调节剂,配体等),通过调节被分离分子的存在形式以改善其在所选溶剂系统的上相中分配(溶解),最终达到满意的分离。多肽是由多个氨基酸分子构成,因此具有一定的酸碱性,以此为依据,以三乙胺、乙酸和三氟乙酸为酸碱调节剂,正丁醇/乙酸乙酯/水(5:2:1)为测试溶剂,按照 1.3 方法,观察多肽样品的溶解情况。结果显示,在测试溶剂中加入海参多肽样品后不溶解,而是沉淀在试管底部;当分别加入等量的乙酸和三氟乙酸后,原来不溶解的多肽样品基本溶解,且加入三氟乙酸的试管溶液比加入乙酸的试管更加澄清,但其底部有少许样品未溶解,表明乙酸和三氟乙酸的加入都可促进海参多肽样品在测试溶剂中的溶解,这是由于加入乙酸和三氟乙酸的加入均可调节体系的 pH 并与被分离的多肽形成离子对,促进其在有机相中的溶解。而加入三乙胺后,发现原来与正丁醇混溶的少量水从正丁醇中分离出来而产生分层,而多肽样品大多数溶于下相当中,因此三乙胺的加入不利于促进海参多肽在正丁醇有机相中的分配。因此,乙酸和三氟乙酸均可作为适宜的改性剂促进样品在上相中的分配,但由于三氟乙酸价格昂贵,从成本角度而言选择更为经济的乙酸作为溶剂改性剂。此外,实验发现,乙酸的加入可以减少正丁醇与水产生的乳化现象而提高固定相的保留。

2.3 分离条件的确定

实验发现 TBE-300C 对水/正丁醇体系的保留能力不佳,这是由于正丁醇粘度较高且易与水产生

乳化,因此导致固定相的保留不稳定且平衡后色谱峰基线波动较大,尤其在较高流速下固定相保留更差。因此在兼顾分离效果的基础上重点考虑固定相的保留,对水/正丁醇/乙酸乙酯(5:5:0,5:4:1,5:3:2)三个溶剂系统和 4、8、10、20 mL/min 四个流速进行测试,最终选择水/正丁醇/乙酸乙酯(5:3:2)为基础溶剂系统,4 mL/min 为分离流速,此时固定相保留率可达到 55% ~ 60%。需要说明的是,4 mL/min 的流速未能发挥 TBE-300C 分离快速的优势,但多肽化合物极性较大,出峰时间较快,总分离时间均在 1 小时内,因此可以接受。第一步分离最终色谱条件为:水/正丁醇/乙酸乙酯/乙酸(5:3:2:0.5)溶剂系统上相为固定相,下相为流动相;仪器转速为 900 rpm,流速为 4 mL/min,由头到尾洗脱,检测波长为 220 nm,进样体积为 10 mL,样品浓度为 5 mg/mL。因第一步分离所得 M 是最先洗脱出的组份极性较大,因此在对其进行二次分离时选择极性更大的水/正丁醇/乙酸乙酯/三乙胺(4:4:1:0.5)为溶剂系统用于该组分的分离,其他条件同第一步分离。

2.4 海参多肽分段结果

由图 3 A 可知,通过第一步分离,可将海参多肽样品分为 4 个组份(M、1、2、3,280 nm 下),其中 M 组份还存在明显的肩峰,表明其还存在进一步分离的可能性,因此在水/正丁醇/乙酸乙酯/三乙胺(4:4:1:0.5)为溶剂系统对 M 组份进行二次分离,由于三乙胺的加入,使原来部分具有碱性物质的以分子形式存在,促进了其在上相中的分配,经此次分离,由 M 组份中进一步得到 5 个组份,如图 3 B 所示。因此,通过酸碱改性剂的交替加入,通过两步分离,成功将海参多肽粗品细化为 8 个具有不同极性的片段。各片段 HPLC 分析结果如图 4 所示,各组分的保留时间和组成都存在差异。HSCCC 和 HPLC 是

基于不同的分离机理, HSCCC 是按照极性顺序洗脱, 而 HPLC 则是存在复杂的机理, 因此在 HPLC 保留时间接近的化合物极性也可能存在差异, 因此 HSCCC 与制备型 HPLC 可以正交用于物质的系统

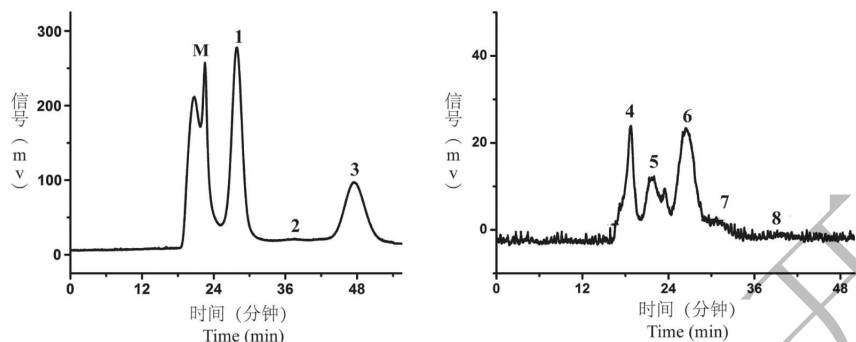


图3 海参多肽样品酸碱交替洗脱分离结果的逆流色谱图谱

Fig. 3 The HSCCC chromatogram of the separation result of the sea cucumber polypeptide

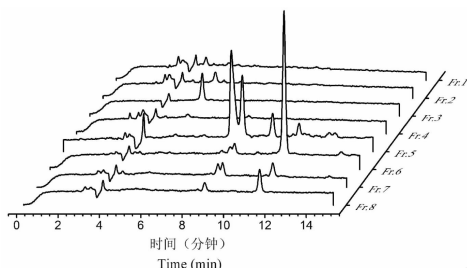


图4 海参多肽样品经 HSCCC 分段后各组份 HPLC 图谱

Fig. 4 The HPLC chromatogram of the separation result of the sea cucumber polypeptide

3 结论

本文通过对逆流色谱溶剂系统极性分布规律的研究, 得出无法用 J 型高速逆流色谱对大极性物质实现有效分离的原因是: (1) J 型高速逆流色谱由于运动模式受限对适宜多肽分离的双水相体系保留太差; (2) 对于能够保留的常规溶剂体系, 大极性化合物几乎单一的分配到溶剂系统下相, 难以满足逆流色谱分离所要求的分离物质在两相中分配合理 (即 $0.5 < K < 2$) 的条件。基于此建立一种以海参粗多肽具有不同等电点为依据, 以促进其在溶剂系统有机相中的溶解为指标筛选得到乙酸可改善海参多肽在正丁醇/水溶剂体系中的分配。因此以乙酸为改性剂, 三乙胺为二次改性剂, 通过酸碱交替洗脱法两步共得到 8 个随极性分布的海参多肽部位。此分离结果一方面可用于对各个部位逐一进行活性评价从而海参多肽最佳活性物质的追踪和筛选, 从而解决了海参多肽生物活性物质基础不明确问题和避免了

分离。此外, 所分离得到的所有组份经茚三酮显色反应鉴定, 各组份经茚三酮显色后均出现紫色斑点, 判断含有多肽样品。

传统分离方法中微量有效物质丢失的可能; 另一方面可通过与其他分离技术如制备液相技术联用进行各个极性片段的进一步分离纯化从而实现海参多肽的系统分离, 最终促进海参多肽生物活性物质基础研究和进一步的开发利用。

参考文献

- 1 Li XP, Wang Q, Li JR, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of sea cucumber [J]. *Sci Tech Food Ind (食品工业科技)*, 2014, 35: 100-103.
- 2 Forghania B, Ebrahimpoura A, Bakarab J, et al. Enzyme hydrolysates from stichopus horrens as a new source for angiotensin converting enzyme inhibitory peptides [J]. *eCAM*, 2012, 2012: 236384-236393.
- 3 Taboada MC, Gonzalez M, Rodriguez E. Value and effects on digestive enzymes and serum lipids of the marine invertebrate *Holothuria forskali* [J]. *Nutrition Res*, 2003, 23: 1661-1670.
- 4 Wang Q, Li YY, Lu HY, et al. Study on memory improvement and fatigue resistance of enzymatic hydrolysate from *acaudina leucoprocta* [J]. *Acta Nutr Sin (营养学报)*, 2011, 33: 580-583.
- 5 Wang N. Study on skin protective property of AJCP and SSCP [D]. Qingdao: Ocean University of China (中国海洋大学), 2007.
- 6 Ridwan BH, Leong TC, Idid SZ. The anti-nociceptive effects of water extract from sea cucumber [J]. *PJBS*, 2003, 24: 2068-2072.
- 7 Hu QP, Pei D, Jiang HM, et al. Optimization of decoloring process of sea cucumber hydrolysates by response surface

- methodology[J]. Food Res Dev(食品研究与开发),2017,38:71-76.
- 8 Zhang CY, Wang YC, Xue CH, et al. Study on the decolorization process of acaudina molpadioides polypeptides with macroporous resin[J]. Food Ferment Ind(食品发酵与工业),2011,37:77-81.
 - 9 Zhao YH. Purification and synthesis of ACE inhibitory peptides from Acaudina molpadioidea protein hydrolysate[D]. Qingdao: Ocean University of China(中国海洋大学),2008.
 - 10 Hu RL, Pan YJ. Recent trends in counter-current chromatography[J]. Trends Anal Chem,2012,40:15-27.
 - 11 Li HC, Wang WW, Tang H, et al. Comparison of counter-current chromatography and preparative high performance liquid chromatography applied to separating minor impurities in drug preparations[J]. J Chromatogr A,2014,1344:51-58.
 - 12 Zhou KX, Zhu JX, Ding LJ, et al. Separation and purification of a diphenyl ether from aspergillus versicolor by high speed counter current chromatography[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:52-55.
 - 13 Milato JV, Ferreira S, Fabiana de S. Use of counter-current chromatography as a selective extractor for the diterpenequinone 7 alpha-hydroxyroyleanone from *Tetradenia riparia*[J]. J Chromatogr A,2018,1537:135-140.
 - 14 Shinomiya K, Kobayashi H, Inokuchin N, et al. Partition efficiency of high-pitch locular multilayer coil for countercurrent chromatography separation of proteins using small-scale cross-axis coil planet centrifuge and application o purification of various collagenases with aqueous-aqueous polymer phase systems[J]. J Liq Chromatogr & Rel Technol,2011,34:182-194.
 - 15 Bezold F, Goll G, Minceva M. Study of the applicability of non-conventional aqueous two-phase systems in counter-current and centrifugal partition chromatography[J]. J Chromatogr A,2015,1388:126-132.
 - 16 Oelmeier SA, Effio CL, Hubbuch J. Alternative separation steps for monoclonal antibody purification: combination of centrifugal partitioning chromatography and precipitation[J]. J Chromatogr A,2013,1319:118-126.
 - 17 Ma Y, Ito Y. Peptide separation by pH-zone-refining counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A,1997,771:81-88.
 - 18 Cao XL, Pei H, Huo LS, et al. Development and evaluation of a spiral tube column for counter-current chromatography[J]. J Sep Sci,2011,34:2611-2617.
 - 19 Weisz A, Ridge CD, Mazzola EP, et al. Preparative separation and identification of novel subsidiary colors of the color additive D&C Red No. 33(Acid Red 33) using spiral high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A,2015,1380:120-129.
 - 20 Wu DT, Pan YJ. Research progresses on countercurrent chromatography[J]. Chinese J Anal Chem,2016,44:319-326.
-
- (上接第 203 页)
- 18 Bae GH, Lee SK, Kim HS, et al. Lysophosphatidic acid protects against acetaminophen-induced acute liver injury[J]. Exp Mol Med,2017,49:e407.
 - 19 Joo MS, Kim WD, Lee KY, et al. AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550[J]. Mol Cell Biol,2016,36:1931.
 - 20 Jain AK, Jaiswal AK. GSK-3 acts upstream of fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2[J]. J Biol Chem,2007,282:16502.
 - 21 Son YO, Pratheeshkumar P, Roy RV, et al. Nrf2/p62 signaling in apoptosis resistance and its role in cadmium-induced carcinogenesis[J]. J Biol Chem,2014,289:28660-28675.
 - 22 Lee DH, Han DH, Nam KT, et al. Ezetimibe, an NPC1L1 inhibitor, is a potent Nrf2 activator that protects mice from diet-induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. Free Radic Biol Med,2016,99:520-532.
 - 23 Wei M, Zheng Z, Shi L, et al. Natural polyphenol chlorogenic acid protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by activating ERK/Nrf2 antioxidative pathway [J]. Toxicol Sci,2017,162:99-112.
 - 24 Monteiro LOF, Fernandes RS, Oda CMR, et al. Protective effect of dioscin against thioacetamide-induced acute liver injury via FXR/AMPK signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother,2018,97:481-488.
 - 25 Wang L, Zhang S, Cheng H, et al. Nrf2-mediated liver protection by esculetin A against acetaminophen toxicity through the AMPK/Akt/GSK3 β pathway[J]. Free Radic Biol Med,2016,101:401-412.