

· 化学与分析 ·

新疆 4 种动物骨质和骨髓蛋白中常量 微量元素比较分析

帕尔哈提·柔孜^{1,2}, 艾合米丁·外力^{1,2}, 陈志慧¹,
雅森·米吉提^{1,2}, 高彦华¹, 帕丽达·买买提^{3*},
阿布力米提·伊力^{1*}, 阿吉艾克拜尔·艾萨¹

(1. 中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆特有药用资源利用重点实验室, 乌鲁木齐 830011;
2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 新疆医科大学护理学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:测定新疆特色羊、牛、马、骆驼 4 种动物腿骨骨髓粉末、骨髓油、骨髓蛋白及骨质蛋白中常量微量元素含量及骨髓蛋白相对分子质量,为传统动物药质量标准完善提供参考。方法:用电感耦合等离子发射光谱法(ICP-OES)测定 Ca, K, Na, B, P, Ba, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Sr, Zn, Si 15 种元素含量,并用一位电泳查看骨髓蛋白相对分子质量。结果:4 种骨髓蛋白条带均显示在 66 kDa 处,各元素线性关系良好,检出限在 0.13 ~ 3.99 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,精密度 RSD 在 0.2% ~ 2.7%,回收率在 92.5% ~ 101.4%,大量常量、微量元素均富集在骨质和骨髓蛋白中,其中马骨髓蛋白有益元素最丰富,其中 Ca, P 质量分数分别高达 24.92, 10.83 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。Na, K, Ca, P, Mg 等 5 种元素含量为骨质蛋白 > 骨髓蛋白 > 骨髓粉末 > 骨髓油; Fe, Cu, Zn, Mn 等其他元素含量为骨髓蛋白 > 骨质蛋白 > 骨髓粉末 > 骨髓油。结论:建立的 ICP-OES 适用于各类动物骨质和骨髓样品中常量微量元素比较分析,灵敏度高。建议以蛋白、多肽为重点对动物药骨髓和骨质进行开发利用,既能够提高其综合利用率,也为相关功能食品、药品的研发提供理论依据。

[关键词] 多浪羊; 新疆褐牛; 伊犁马; 新疆双峰骆驼; 骨质蛋白; 骨髓蛋白; 常量元素; 微量元素

[中图分类号] R284.1; R2-031; R289; R29 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0039-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181208

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180328.1141.002.html>

[网络出版时间] 2018-03-28 13:38

Comparison Analysis of Protein, and Macroelements, Trace Elements Composition in Bone and Bone Marrow of Four Types of Xinjiang Characteristic Animals

PARHAT Rozi^{1,2}, AHMIDIN Waili^{1,2}, CHEN Zhi-hui¹, YASEN Mijiti^{1,2}, GAO Yan-hua¹,
PARIDA Muhammat^{3*}, ABULIMITI Yili^{1*}, HAJIAKBER Aisa¹

(1. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory Basis of Xinjiang Indigenous Medicinal Plants Resource Utilization, Urumqi 830011, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. School of Nursing, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[收稿日期] 20180127(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660380);国家“千人计划”项目(99-11091085101);新疆医科大学与中科院新疆理化所技术研究所技术服务项目

[第一作者] 帕尔哈提·柔孜,在读博士,从事生物大分子提取与活性筛选, Tel:0991-3838635, E-mail:2507444580@qq.com

[通信作者] * 阿布力米提·伊力,研究员,博士生导师,从事天然药物生物大分子物质基础研究, Tel:0991-3835708, E-mail:abu@ms.xjbu.ac.cn; * 帕丽达·买买提,副教授,硕士生导师,从事康复护理研究, Tel:0991-4360391, E-mail:parida0331@126.com

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of macroelements and trace elements in bone marrow powder (BMPD), bone marrow oil (BMO), bone marrow protein (BMP) and bone protein (BP) from 4 types of Xinjiang characteristic animals: sheep, bovine, horse, and camel, measure the molecular weight of BMP, and provide a reference for improving the quality standard of traditional animal drugs. **Method:** Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-OES) was used to determine the contents of 15 elements including Ca, K, Na, B, P, Ba, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Sr, Zn and Si; 1-DE electrophoresis was used to identify the molecular weight of BMP. **Result:** Four types of animals BMP bands were all shown at 66 kDa; the trace elements showed good linearity; detection limits range was 0.13-3.99 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, with precision RSD of 0.2%-2.7% and recovery rate of 92.5%-101.4%. A large number of constant and trace elements were enriched in BP and BMP, of which horse BMP showed the highest level of beneficial trace elements, with a content of 24.92, 10.83 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively for Ca and P; the content of Na, K, Ca, P, Mg was as follows: BP > BMP > BMPD > BMO; the content of Fe, Cu, Zn, Mn and other elements: BMP > BP > BMPD > BMO. **Conclusion:** The established ICP-OES method was suitable and highly sensitive for the comparative analysis of trace elements in BM and bone samples from different sources of domestic animals. It was suggested that, protein and peptide should be extracted intensively to improve not only the comprehensive utilization of bone and bone marrow, and also could provide theoretical basis for the research and development of functional foods and medicines.

[Key words] duolang sheep; Xinjiang brown cattle; Yili horse; Xinjiang bactrian camel; bone marrow protein; bone protein; macroelements; trace elements

动物类中药是中国传统药学的重要组成部分,具有活性强、疗效佳、显效快等特点,在中药处方配伍及中成药生产方面占有十分重要的位置^[1]。动物类药物来源于动物整体(全蝎、蛤蚧、海马等),器官(虎骨、鸡内金、熊胆等),分泌物、排泄物及生理或病理产物(麝香、羚羊角、五灵脂、牛黄、马宝等),活性成分主要以蛋白质、油脂、矿物质等高营养物质为主^[2]。禽畜骨骼自古以来就有壮筋骨,延年益寿的记载^[3]。骨骼由骨膜、骨质、骨髓等构成,是蛋白质和钙质组成的网状结构,管内充满了含多种营养物质的骨髓^[4-5]。骨髓中不仅含有大量的蛋白质、脂肪、钙、磷、铁、锌、铜、镉等微量元素,还有磷蛋白、磷脂质、软骨素、黏多糖、生长素、各种氨基酸及多种维生素等健康有益因子,是十分宝贵的天然药食资源。骨中的蛋白质含量很高,可与鲜肉媲美,而且骨蛋白是较好的可溶性蛋白质,生物价高,是一种优质的蛋白源^[6-7]。

我国中药和民族药中骨质和骨髓作为珍贵药物,具有很好的疗效^[8-10]。羊骨髓具有益阴补髓、润肺泽肌作用;羊骨具有补肾、强筋骨、止血作用;牛骨髓具有润肺、补肾、填髓作用;牛骨具有痲痹、截疟、敛疮作用;马骨具有醒神、解毒敛疮作用。已有报道中对骆驼骨和骨髓及马骨髓应用文献记载较少。维吾尔族药未将骨髓列单味药,但常见于治疗骨折的处方中^[9-11]。4种动物骨和骨髓均有补肾、填髓、强

筋骨、开窍、解毒敛疮等多种作用。中医药古籍记载骨髓和骨质分开应用,作用和主治上也有一定差异。目前,国内外相关基础研究主要围绕骨头坏死,骨髓移植等疾病治疗方面^[12-14]。加之,食药加工业一般均使用全骨,未能将两者有效地分离开发应用,导致资源浪费。

现代研究表明常量、微量元素对人体的生理功能具有特殊的调节作用,人体健康长寿的关键在于体内元素的平衡^[15-16]。骨骼中活性物质源于蛋白质、矿物质和脂肪等,禽畜骨骼为原料制成的骨肽片,复方骨肽冻干粉针剂,复方骨肽注射液等治疗风湿、类风湿性关节炎^[17],预防骨质疏松^[18],加速四肢骨折愈合,止痛^[19],造血^[20],对NK^[21]和T细胞的活化^[22]等作用已有报道,临床应用广泛,疗效确切,其中优质的蛋白与矿物质可能与调节骨代谢,镇痛抗炎等作用有关。因此本文将4种动物腿骨骼的骨质和骨髓分开,制备骨髓粉末、骨髓油、骨髓蛋白及骨质蛋白,探讨4种动物蛋白与元素变化趋势,对民族药中蛋白质和元素成分协助解析物质基础和作用机制研究提供科学依据。

1 材料

4种动物腿骨收自新疆各地,均由中国科学院新疆生态与地理研究所阿布力米提研究员鉴定为多浪羊、新疆褐牛、伊犁马、新疆双峰骆驼的腿骨,凭证标本存放于新疆理化技术研究所生物大分子化合物

实验室。样品来源分别为多浪羊(新疆伽师县),新疆褐牛(新疆塔城地区),伊犁马(新疆昭苏县),新疆双峰骆驼(新疆乌苏市)。B, Cu, Mg, Mn, Fe, Zn, Sr, Ba, Ni 多元素对照溶液(质量浓度 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 批号 04-1767-2004); Na, K 对照溶液(质量浓度 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 批号 04-1763-2004); Ca, P, Si 对照溶液(质量浓度均 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 批号分别为 04-1720-2004, 04-1741-2004a, 04-1752-2004a), Si 对照溶液(质量浓度均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 批号 04-1752-2004a), 均购自于国家有色金属与电子材料分析测试中心。低范围蛋白质相对分子质量标准(4.1 ~ 66 kDa)重庆科润生物医药研发有限公司, $10\% \text{ SDS}$, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$ (pH 6.8), $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$ (pH 8.8) 等均为购自于北京白鲨易生物科技有限公司, 元素测定前处理用酸为优级纯, 其余试剂均为分析纯。

VISTA-PRO 型全谱直读等离子发射光谱仪(美国 Varian 公司); MARS 5 型微波消解仪(美国 CEM 公司), DF-10IS 型集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城工贸有限公司), DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), 165-8001 型小型电泳仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]; RE252A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。ME204 型 1/1 万电子天平(梅特丽-托利多仪器上海有限公司), Allegra™ 25R Centrifuge 型离心机(美国 Beckman Coulter 公司), FDU-2100 型冷冻干燥仪(北京泰亚赛福科技发展有限责任公司)。

2 方法

2.1 样品前处理 4 种动物腿骨骼样品先存放于 $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱, 使骨髓硬化成块, 便于富集。骨质和骨髓用手持式切割机和刀具分开, 清洗 3 ~ 5 次去除瘀血和杂物之后收集骨髓; 用液氮(1:6)冷冻粉碎成粉末, 备用。骨质用蒸馏水浸泡数次, 以除去肉块和骨腔内瘀血和残留骨髓, 待用。

2.2 骨髓蛋白的提取 称取骨髓粉末 100 g, 加水提取。料液比 1:5, 温度 $45 \text{ }^\circ\text{C}$, 提取 4 h, 提取数 3 ~ 5 次。每次提取后用分液漏斗分离油水(提取物)层, 油层再加蒸馏水提取, 合并滤液, 加正己烷脱脂, 适当浓缩后冷冻干燥, 得到骨髓蛋白粉。

2.3 骨质蛋白的提取^[23] 称取骨头(去除骨髓) 1000 g, 分成小块, 用高压锅水蒸煮提取。料液比 1:7, 共提取 4 次(6, 4, 2, 2 h)。每次提取后去除油层, 再加同量蒸馏水反复提取至颜色变清。合并滤液, 加正己烷脱脂, 脱脂液经适当浓缩后冷冻干燥, 得到骨质蛋白粉。

2.4 骨髓油脂的提取 称取骨髓粉末 50 g, 加正己烷 150 mL, 置于索氏提取器中 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 浸提 8 h, 经减压蒸馏, 得骨髓油脂。

2.5 SDS-PAGE 电泳分析 参照文献[24-25]方法并做适当改进修改。浓缩胶质量分数为 8%, 分离胶质量分数为 12%, 胶厚 1.0 mm。称取骨髓和骨质蛋白样品 10 mg, 加水 1 mL 溶解, 离心, 取上清液。蛋白样品按 $V(4 \times \text{蛋白质上样缓冲溶液}) - V(\text{蛋白质样品})(1:4)$, 在沸水中煮沸 5 min, 取 $10 \mu\text{L}$ 上样。初始电压为 75 V 电泳, 分离 0.5 h 后电压调到 150 V。电泳完毕后, 固定(1 ~ 2 h), 用考马斯亮蓝染色-250 进行染色(1.5 ~ 2 h), 脱色(反复更换脱色液直到背景清晰), 拍照。

2.6 等离子发射光谱仪样品处理 所制备的蛋白样品采用微波消解法, 油脂样品采用干法灰化法处理。

2.6.1 微波消解法 精密称取每个样品 0.5 g(精确至 0.0001 g) 于消解罐中, 加入 HNO_3 10 mL, 按消解程序消解, 赶酸, 加去离子水定容至 25 mL。

2.6.2 干法灰化 称取 1 g(精确至 0.0001 g) 样品于瓷皿中, $650 \text{ }^\circ\text{C}$ 下灰化 2 h 后, 加入 HNO_3 10 mL, 加热溶解, 赶酸, 加去离子水定容至 25 mL。

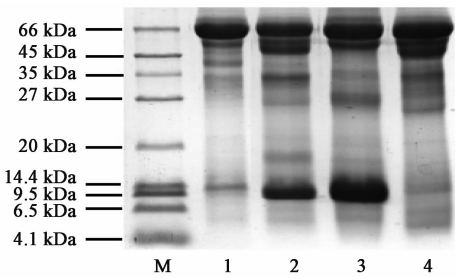
2.7 仪器工作条件 载气为氩气, 入射功率设定 1.25 kW, 等离子气流量 $15.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助气流量 $1.50 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 雾化气流量 $0.95 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 一次读数时间 5.0 s, 仪器稳定延时 15 s, 水平观测。

2.8 方法的评价试验 ICP-OES 法对每个元素的测定, 都可以同时选择多条特征谱线, 实验选择共存元素谱线干扰少、信噪比高的分析波长。选择 15 种元素最佳谱线, 1% 的硝酸作为空白溶液, 调整仪器的检测限和灵敏度, 验证仪器的准确性和精密性; 将微波消解法处理的样品中加入定量的对照溶液, 随样品前处理后进行回收率试验; 重复测定标准溶液 6 次, 计算其 RSD; 测试 10 次空白溶液, 取 3 倍相对标准偏差计算检出限; 用元素的对照储备液配置成质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的元素对照溶液, K 配置成 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照溶液, 绘制标准工作曲线。

3 结果与分析

3.1 4 种动物骨髓蛋白电泳分析 4 种不同动物骨髓蛋白条带存在一定的差异, 表现在蛋白图谱带数目和强度上。根据谱带强度可分为 2 级, 显示在 66 kDa 处的为 I 级谱带, 显示在 9.5 ~ 14.4 kDa 的为 II 级谱带。4 种骨质蛋白均具有 I 级谱带, 除了

骆驼骨髓蛋白外均有 II 级谱带, 骆驼骨髓蛋白在 6.5 kDa 上下处出现条带, 但不清晰, 种间的 II 级谱带强度分布有显著差异, 表现在谱带颜色深浅不同, 即谱带所对应的蛋白质浓度有显著差异。对 4 种骨质蛋白电泳分析得出的图谱不清晰, 原因可能是高温蒸煮破坏空间结构, 故不做分析。骨髓粉末含油量为 90% ~ 95%, 不易进行电泳分析。综上, 4 种骨髓蛋白 I 级谱带与牛血清白蛋白(相对分子质量为 66 kDa) 谱带相近, 其余多肽部分需进一步纯化分离鉴定, 见图 1。



M. marker; 1. 羊骨髓蛋白; 2. 牛骨髓蛋白; 3. 马骨髓蛋白; 4. 骆驼骨髓蛋白

图 1 4 种动物骨髓蛋白电泳

Fig.1 SDS-PAGE analysis for four types of animals BMP

3.2 元素测定条件和方法学考察 各元素的检测波长在 200 ~ 800 nm。为确保试验数据的可靠性, 精密度试验分别取各样品溶液测定 6 次, 精密度 RSD 0.2% ~ 2.7%, 各元素 RSD 均 < 3.0%, 表明该法有着良好的重复性。样品最低检出限 0.13 ~ 3.99 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 灵敏度高, 能够准确测定各类骨髓个骨质样品最小含量。对各类骨髓粉末, 骨髓和骨质蛋白, 骨髓油样品进行了加样回收试验, 15 种元素平均回收率为 92.5% ~ 101.4%, 这说明本方法准确性良好。综上, 本方法简单, 具有良好的精密度, 可以满足动物骨各类元素检测, 结果见表 1。

3.3 4 种动物骨髓粉末、骨髓蛋白和骨髓油中常量元素含量比较 4 种骨髓粉末中常量元素平均含量排序为 $\text{Ca} > \text{P} > \text{Na} > \text{Mg} > \text{K}$, 各品种间元素总量变幅在 540.56 ~ 11 749.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 大小依次为马骨髓粉末 > 牛骨髓粉末 > 羊骨髓粉末 > 骆驼骨髓粉末。骨髓蛋白中常量元素平均含量 $\text{Na} > \text{Ca} > \text{P} > \text{K} > \text{Mg}$, 品种间元素平均总量变幅分别为 28 642.85 ~ 49 510.36 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 马骨髓蛋白 > 骆驼骨髓蛋白 > 牛骨髓蛋白 > 羊骨髓蛋白; 骨髓油中常量元素平均含量为 $\text{Ca} > \text{P} > \text{Mg} > \text{K} > \text{Na}$, 品种间

表 1 元素测定试验条件和方法学考察

Table 1 Results of experimental condition and methodology tests of element

元素	波长/nm	回归方程	r	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	精密度 RSD/%	回收率/%
Na	589.592	$Y = 3\ 363.935\ 8X + 23.046\ 2$	0.999 9	3.99	0.9	94.2
K	766.491	$Y = 8\ 494.725\ 6X + 428.258\ 0$	0.999 9	2.36	0.7	93.4
Ca	317.933	$Y = 2\ 019.831\ 1X + 11.696\ 4$	0.999 9	0.52	2.6	96.1
P	213.618	$Y = 56.970\ 4X + 2.829\ 6$	0.999 9	2.25	2.3	92.5
Mg	279.553	$Y = 9\ 620.693\ 4X + 4.913\ 1$	0.999 6	0.79	0.8	95.3
Fe	238.204	$Y = 304.466\ 0X + 2.220\ 9$	0.999 9	0.58	0.8	99.6
Zn	213.857	$Y = 1\ 591.442\ 8X + 2.869\ 4$	0.999 9	0.68	0.2	95.7
Cu	324.754	$Y = 3\ 322.365\ 4X + 20.995\ 5$	0.999 9	0.79	0.7	97.1
Cr	267.716	$Y = 247.692\ 5X + 5.286\ 3$	0.999 9	3.91	1.0	99.2
Ba	455.403	$Y = 338\ 241X + 126.603\ 0$	0.999 8	0.13	0.6	97.3
Ni	231.604	$Y = 242.188\ 6X + 4.363\ 52$	0.999 9	0.62	0.6	99.7
Sr	407.771	$Y = 265\ 798X + 813.690\ 0$	0.999 3	0.84	0.9	92.9
Si	251.611	$Y = 86.316\ 2X + 1.296\ 0$	0.999 9	1.77	2.7	93.7
B	249.772	$Y = 200.885\ 0X + 11.696\ 8$	0.999 9	1.02	0.8	101.4
Mn	257.610	$Y = 3\ 051.882\ 2X + 2.830\ 2$	0.999 9	0.53	0.9	98.7

元素总量变幅分别为 20.65 ~ 70.97 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 马骨髓油 > 牛骨髓油 > 羊骨髓油 > 骆驼骨髓油; 综上, 骨髓粉末、蛋白和油中常量元素含量差异较大, 骨髓蛋白上述 5 种常量元素含量均高于骨髓粉末和油, 其中

马骨髓粉末、蛋白、油中元素含量均高于其他制备部位, 其蛋白中 Ca 质量分数最高(24 924.47 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 骨髓油中元素种类和含量较少, 说明骨髓蛋白是矿物质成分富集的最佳部位, 结果见表 2。

表 2 骨髓粉末、骨髓蛋白和骨髓油中常量元素质量分数

Table 2 Macroelements content of bone marrow powder (BMPD), bone marrow protein (BMP), bone marrow oil (BMO) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

种类	Na	K	Ca	P	Mg	合计
羊骨髓粉末	132.10	25.18	934.88	559.83	58.74	1 710.73
牛骨髓粉末	123.14	9.62	2 685.71	1 005.36	90.72	3 914.55
马骨髓粉末	189.26	40.01	8 432.95	2 956.08	131.37	11 749.67
骆驼骨髓粉末	4.49	1.80	382.95	137.33	13.99	540.56
羊骨髓蛋白	11 786.09	6 159.87	3 760.61	5 905.49	1 030.79	28 642.85
牛骨髓蛋白	16 693.21	5 867.49	4 693.64	5 375.05	1 034.60	33 663.99
马骨髓蛋白	9 567.65	2 963.07	24 924.47	10 830.96	1 224.21	4 9510.36
骆驼骨髓蛋白	21 060.81	4 467.98	5 055.53	5 277.03	986.21	36 847.56
羊骨髓油	1.22	2.05	12.02	19.54	5.27	40.10
牛骨髓油	1.08	0.56	21.40	20.58	4.71	48.33
马骨髓油	1.0	1.86	49.03	15.24	3.84	70.97
骆驼骨髓油	-	-	4.38	15.14	1.13	20.65

注：“-”表示未检出(表 3,5 同)。

3.4 4 种动物骨髓粉末、骨髓蛋白和骨髓油中微量元素含量比较 4 种骨髓粉末中微量元素平均含量大小为 $\text{Fe} > \text{Sr} > \text{B} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ba} > \text{Mn}$, 其他 3 种 (Cr, Ni, Si) 未检测出, 品种间元素总量变幅分别为 $6.69 \sim 76.78 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 大小为马骨髓粉末 > 羊骨髓粉末 > 牛骨髓粉末 > 羊骨髓粉末。骨髓蛋白中微量元素平均含量为 $\text{Fe} > \text{Si} > \text{Zn} > \text{Sr} > \text{B} > \text{Ba} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Mn}$, 品种间元素总量变幅分别为 $490.06 \sim 947.43 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 大小为羊骨髓蛋白 > 牛骨髓蛋白 > 马骨髓蛋白 > 骆驼骨髓蛋白。骨髓油中微量元素平均含量为 $\text{Fe} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{B} > \text{Cr} > \text{Ba} > \text{Sr} > \text{Mn}$, 其中

Cr, Ni, Si 等元素未检测出, 品种间元素总量变幅分别为 $1.89 \sim 5.28 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 大小为牛骨髓油 > 骆驼骨髓油 > 马骨髓油 > 羊骨髓油; 综上, 骨髓蛋白上述 10 种元素含量均高于骨髓粉末和油, 各骨髓蛋白的 Si 含量均高于其他样品, 牛和马骨髓蛋白 Si 含量达到最高。骆驼骨髓粉末中 Si, Mn 等多种元素未检出, 这可能由于样品质地较硬, 加之干法灰化过程中有些元素会损失等有关。有害微量元素 Pb, As, Be, Bi, Cd, Sn 等均未检测出, 这初步表明骨髓矿物质中不含有害元素。综上, 骨髓蛋白中含有大量与人体健康与生命相关的必需微量元素, 结果见表 3。

表 3 骨髓粉末、骨髓蛋白和骨髓油中微量元素质量分数

Table 3 Trace elements content of BMPD, BMP, BMO $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

种类	Fe	Zn	Cu	Cr	Ba	Ni	Sr	Si	B	Mn	合计
羊骨髓粉末	20.24	2.23	2.41	-	0.93	-	2.83	-	2.89	0.15	31.68
牛骨髓粉末	5.89	1.48	1.58	-	1.46	-	6.43	-	7.55	0.19	24.58
马骨髓粉末	36.35	4.95	5.03	-	3.18	-	22.63	-	4.37	0.27	76.78
骆驼骨髓粉末	0.22	0.25	1.86	-	0.49	-	0.95	-	2.89	0.028	6.69
羊骨髓蛋白	799.51	36.54	6.95	4.30	3.01	1.13	14.95	58.51	21.38	1.15	947.43
牛骨髓蛋白	620.28	43.58	8.55	4.56	13.79	1.62	18.77	72.39	22.32	0.84	806.70
马骨髓蛋白	407.16	32.60	4.39	4.44	17.45	5.32	72.98	72.38	26.70	0.74	644.16
骆驼骨髓蛋白	282.69	36.80	8.67	4.96	9.10	2.61	29.27	48.78	64.84	2.34	490.06
羊骨髓油	0.23	0.09	0.48	-	0.03	-	0.06	-	0.91	0.09	1.89
牛骨髓油	3.19	0.27	1.01	-	0.21	-	0.12	-	0.4	0.08	5.28
马骨髓油	0.27	0.39	0.95	-	0.12	-	0.17	-	0.32	0.02	2.24
骆驼骨髓油	2.33	1.13	0.55	0.65	0.09	-	-	-	-	-	4.75

3.5 4 种动物骨质蛋白中常量元素含量比较 4 种骨质蛋白中各常量元素平均含量为 $\text{Na} > \text{K} > \text{P} > \text{Ca} > \text{Mg}$, 品种间元素总量变幅分别为 49 631.79 ~

83 826.71 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 牛骨质蛋白 > 骆驼骨质蛋白 > 马骨质蛋白 > 羊骨质蛋白; Ca 含量羊骨质蛋白 > 马骨质蛋白 > 牛骨质蛋白 > 骆驼骨质蛋白, 见表 4。

表 4 4 种动物骨质蛋白常量元素质量分数

Table 4 Macroelements content in four types of animal bone protein (BP)

种类	Na	K	Ca	P	Mg	合计
羊骨质蛋白	35 961.93	9 459.20	1 726.53	2 187.13	297.00	49 631.79
牛骨质蛋白	56 671.25	19 716.69	1 084.42	6 070.04	284.31	167 653.42
马骨质蛋白	43 989.62	15 617.24	1 695.52	2 487.25	262.02	128 103.30
骆驼骨质蛋白	55 767.11	13 721.03	1 084.16	2 955.08	276.47	147 607.70

3.6 4 种动物骨质蛋白中微量元素含量比较 4 种动物骨质蛋白中各总微量元素含量大小为 $\text{Si} > \text{Fe} > \text{B} > \text{Zn} > \text{Sr} > \text{Cr} > \text{Ba} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Mn}$, 品种间元素含量变幅范围为 187.60 ~ 457.86 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 大小为马骨质蛋白 > 骆驼骨质蛋白 > 羊骨质蛋白 > 牛骨质蛋白。综合表 4, 5, 骨质蛋白中 15 种元素总含量大小

为马骨质蛋白 > 牛骨质蛋白 > 骆驼骨质蛋白 > 羊骨质蛋白; 骨髓和骨质蛋白各元素含量之间有一定的差距。骨髓蛋白钙含量比骨质蛋白多 2 ~ 5 倍, Fe 含量多 1 ~ 27 倍, Zn 含量多 2 ~ 4 倍, P 含量多 2 ~ 5 倍等, 这些数据足够表明骨髓蛋白营养价值优于骨质蛋白, 结果见表 5。

表 5 4 种动物骨质蛋白微量元素质量分数

Table 5 Trace elements content in four types of animal BP

种类	Fe	Zn	Cu	Cr	Ba	Ni	Sr	Si	B	Mn	合计
羊骨质蛋白	29.65	14.96	1.00	4.29	3.54	1.40	10.90	119.04	62.39	0.11	247.28
牛骨质蛋白	37.72	8.34	1.53	5.00	1.16	1.60	5.37	80.82	45.91	0.15	187.60
马骨质蛋白	242.76	15.68	1.13	2.68	3.65	-	9.18	138.66	44.03	0.09	457.86
骆驼骨质蛋白	31.38	17.73	0.90	2.00	1.56	-	6.25	122.64	85.13	-	267.59

3.7 常量微量元素含量综合分析 食药加工企业实际生产或消费者在日常饮食中常用禽畜骨骼全骨, 故对骨髓粉末、油、蛋白和骨质蛋白进行元素测量和元素综合比较具有重要的意义。4 种动物骨骼中常量 + 微量元素含量大小顺序为 $\text{Na} > \text{K} > \text{Ca} > \text{P} > \text{Mg} > \text{Fe} > \text{Si} > \text{B} > \text{Zn} > \text{Sr} > \text{Ba} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Mn}$ 。4 种骨质蛋白 Na 含量均高于其他制备部位, 而骨髓蛋白含有较多的 Ca, Fe, Zn。其中, 马骨髓蛋白元素含量大小为 $\text{Ca} > \text{P} > \text{Na} > \text{K} > \text{Mg} > \text{Fe} > \text{Sr} > \text{Si} > \text{Zn} > \text{B} > \text{Ba} > \text{Ni} > \text{Cr} > \text{Cu} > \text{Mn}$; 羊骨质蛋白元素含量大小为 $\text{Na} > \text{K} > \text{P} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{Si} > \text{B} > \text{Fe} > \text{Zn} > \text{Sr} > \text{Cr} > \text{Ba} > \text{Ni} > \text{Cu} > \text{Mn}$ 。马骨质蛋白元素含量大小为 $\text{Na} > \text{K} > \text{P} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{Fe} > \text{Si} > \text{B} > \text{Zn} > \text{Sr} > \text{Ba} > \text{Cr} > \text{Cu} > \text{Mn}$, 与其他 3 种骨质蛋白相比马骨质蛋白所含的 Fe 元素含量最高。上述各蛋白部位中含量较高的元素依次为 Na, K, P, Ca, Mg, Fe, 而马骨髓蛋白中含量最高的元素依次为 Ca, P, Na, K, Mg, Fe。骨髓和骨质蛋白中质量分数 >

1 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的分别为 Na, K, Ca, P, Mg。

4 讨论与结论

近年来, 元素与药材品种、产地、不同加工工艺对其的变化规律等方面研究取得了很大进展, 各种动物骨骼所含的元素种类和含量差异与药材的药效和营养价值有着重要的关联。王卫等^[26]对牛骨和肉中 P, Fe, Na, Ca 等元素含量进行分析, 结果显示骨的元素含量高于肉。赵志峰等^[27]报道猪超细骨粉及其高温条件下锌和铜等元素含量变化, 高温高压使其元素含量降低及有些未检出, 这可能由于元素在此条件下被烧解。兰社益^[28]报道牛骨粉中 Fe, Ca, P 的含量, 制成粉末后能提高 Fe 等有益元素含量。牦牛骨微量元素研究报道较多^[29-30], 赵勇等^[31]分析不同蒸煮温度和时间对牦牛骨元素含量变化, 温度 120 °C, 蒸煮 0.5 h 后含量达最高值, 随时间延长含量开始降低。本文骨质蛋白在高温下制备所得, 故骨髓和骨质蛋白元素含量差异较大, 这可能由于长时间高温提取易导致有益微量元素的丢失,

故建议蒸煮时间不宜太长。虎已成为濒临灭绝的珍稀野生动物,在国际上受到重点保护,但虎骨在许多处方和民族药中药用历史悠久^[32-33]。与本文元素含量相比,虎骨除 Zn, Mn 以外其他元素含量均较低,若以 Ca, P, K 等含量为指标,可考虑选用马或牛骨髓等蛋白替代,能够促进资源的可持续利用。本实验所制

备的 4 种动物骨髓和骨质蛋白元素含量均高于相应的骨质粉末、肉、不同部位骨质及其骨髓油。上述文献方法未将骨质、骨髓及油脂分开处理,某些元素没有充分析出,导致含量下降。骨髓蛋白元素含量和种类均高于骨质,制作高 Ca, P, Zn 等产品时,选用动物骨髓蛋白能提高其营养价值,对比结果见表 6。

表 6 各类骨及其蛋白常微量元素成分汇总

Table 6 Summary table of macro and trace elements from various kinds of bone and its protein

项目	Na	K	Ca	P	Mg	Fe	Zn	Cu	Mn	参考文献
牛骨	1 200	-	5 450	1 900.0	-	48.0	-	-	-	[26]
牛肉	650	-	110	171.0	-	28.0	-	-	-	
猪超细骨粉	-	-	19.30%	9.39%	-	52.0	7.1	0.4	-	[27]
高温高压(猪骨)	-	-	2.67%	1.22%	-	-	-	-	-	
牛骨粉	-	-	16.24%	8.50%	-	112.3	-	-	-	[28]
牦牛肢骨	4 454.0	254.8	61.4	40.8	1 275.0	12.7	-	-	-	[29]
牦牛骨	5 930	380.0	27.20%	12.60%	4 730	96.4	81.4	2.0	2.0	[31]
羊肋骨	4 580	720.0	18.18%	8.30%	3 200	39.9	89.6	3.2	3.8	
黄牛肋骨	5 390	470.0	21.11%	9.16%	4 000	52.5	48.6	3.4	4.2	
虎骨	0.6	0.2	19.9	9.1	0.4	140.0	94.5	5.0	2.7	[32]
羊骨髓蛋白	11 786.0	6 159.8	3 760.6	5 905.4	1 030.7	799.5	36.5	7.0	1.2	
羊骨质蛋白	35 961.9	9 459.2	1 726.5	2 187.1	297.0	29.6	14.9	1.0	0.1	
牛骨髓蛋白	16 693.2	5 867.4	4 693.6	5 375.0	1 034.6	620.3	43.6	8.6	0.8	
马骨髓蛋白	9 567.7	2 963.1	24 924.5	10 831.0	1 224.2	407.2	32.6	4.4	0.7	
马骨质蛋白	43 989.6	15 617.2	1 695.5	2 487.3	262.0	242.8	15.7	1.1	0.1	

注: - 表示未见报道。

微量元素与人体健康关系是当前生命科学研究中十分活跃的领域之一。中药发挥疗效的物质基础与微量元素所起的协同作用日益受到人们的重视。骨骼中主要元素是 Ca 和 P, 4 种制备部位(粉末、骨髓蛋白、骨质蛋白、油)中 Ca 含量最高的部位是分别是马骨髓粉末, 马骨髓蛋白、羊骨质蛋白、马骨髓油; 磷含量高低顺序分别为马骨髓粉末、马骨髓蛋白、牛骨质蛋白、牛骨髓油。有研究表明, 李亚然等^[18]报道牛骨肽具有较好的预防骨质疏松的作用。刘芳等^[20]主要是以牛骨髓、紫河车、黄芪为主, 采用药物和食物相结合的方法治疗再生障碍性贫血, 具有显著疗效。罗新贵等^[34]报道胎牛骨髓多肽对小鼠骨髓造血细胞具有刺激作用。以上治疗效果与其 Ca, Mn 等元素起效有关。白福生等^[35]研究黄芪等 8 种补血药, 发现其中 Fe, Cu, Zn 的含量均很高。清水宽等^[36]研究治疗血虚、血瘀及肾虚证的生药, 发现其中 Fe, Cu, Zn 等含量较高, 表明这些药材补血等作用与铁等元素有关, 本实验骨髓蛋白中 Fe, Zn, Cu 等元素含量较高, 也可以加补血类保健品或药物

中强化其功能, 但各类骨质和骨髓蛋白所含的元素总量高低和种类存在差异, 需根据具体病情区分应用。赵旭升^[37]报道 7 种安神类中草药, 元素含量大小为 Ca > Fe > Mn > Sr > Mg > Na > Zn, 马骨髓蛋白和骆驼骨蛋白所含的元素含量大小顺序接近于该中草药元素大小排序。骨质和骨髓蛋白元素含量一般大于植物所含的微量元素, 有些植物品种是濒危或保护植物名录中, 为了保护生态平衡和实现中药资源的可持续利用, 合适的条件下使用骨髓蛋白为代替是一种较好的选择。

综上所述, 骨髓蛋白和骨质蛋白是一种优质的蛋白源, 骨髓蛋白主要以牛血清白蛋白与其他多肽类物质组成。微量元素的生理、生化功能广泛, 其在体内有一个合适的含量范围, 超过或不足都不利于人体健康。大量微量元素均富集在骨质和骨髓蛋白中, 骨髓和骨质蛋白常微量元素含量均高于骨髓粉末和油, 其中马骨髓蛋白元素含量最丰富, Ca, P 质量分数分别达到为 24.92, 10.83 mg·g⁻¹; 5 种常量元素(Na, K, Ca, P, Mg)含量大小顺序为骨质蛋白 >

骨髓蛋白 > 骨髓粉末 > 骨髓油; 其他必须微量元素 (Fe, Cu, Zn, Mn 等) 含量大小顺序为骨髓蛋白 > 骨质蛋白 > 骨髓粉末 > 骨髓油。骨髓和骨质以蛋白与多肽有益微量元素含量高, 今后以螯合 Ca, Zn, Fe 等形式开发利用时才能够强化其食药功能, 为充分利用畜骨资源能提供新的途径。

[参考文献]

[1] 王玄, 欧阳罗丹, 代春美, 等. 动物类中药质量控制的生物评价研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(12): 2228-2235.

[2] 罗朝权, 张敏玲, 郑润生, 等. 6种动物类药材中黄曲霉毒素污染的液质联用检测[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3): 67-71.

[3] 闫亚梅, 卢长润, 牟英辉. 骨髓精提取方法的研究[J]. 肉类研究, 1995(3): 38-40, 20.

[4] 吴立芳, 马美湖. 我国畜禽骨骼综合利用的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2005(3): 21-24.

[5] 蔡杰, 洪玮娣, 熊汉国. 我国畜禽骨骼及其蛋白质资源综合利用进展[J]. 肉类研究, 2011, 25(3): 38-42.

[6] 李晶. 畜禽骨的营养价值、开发现状及发展前景[J]. 肉类工业, 2008(2): 41-44.

[7] Miller E J, Rhodes R K. Preparation and characterization of the different types of collagen [J]. Methods Enzymol, 1982, 82: 33-64.

[8] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009.

[9] 艾力阿吉·库尔班尼亚孜艾米琪. 维吾尔医成药宝库[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民卫生出版社, 2006: 1301.

[10] 阿巴拜克热·热合曼. 维吾尔医常用生药[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民卫生出版社, 2005: 796.

[11] 提力瓦地·吾麦尔, 阿里木江·吾斯曼, 古力巴尔·卡生木. 维吾尔医治疗45例膝关节骨性关节炎临床观察[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(4): 34.

[12] 尹啸飞, 周正新. 中医药治疗股骨头坏死临床研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(2): 1-4.

[13] 侯继英. 恶性肿瘤骨髓转移24例临床分析[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(6): 1025-1026.

[14] Tanaka M, Miyamura K, Terakura S, et al. Comparison of cord blood transplantation with unrelated bone marrow transplantation in patients older than fifty years[J]. Biol Blood Mar Transpl, 2015, 21(3): 517-525.

[15] 何燕, 周国华, 王学求. 从微量元素与人体健康关系得到的启示[J]. 物探与化探, 2008, 32(1): 70-74.

[16] 陈春丽, 罗晓湄, 候弈, 等. 微波消解法测定别克参中微量元素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 80-82.

[17] 崔志强. 骨肽注射液在骨科应用的疗效评价[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(13): 98-99.

[18] 李亚然, 张艳玲, 尹中夏, 等. 牛骨肽预防骨质疏松的作用研究[J]. 食品工业, 2017, 38(5): 179-183.

[19] 黄咏红. 复方骨肽临床应用综述[J]. 中医临床研究, 2012, 4(23): 119-120.

[20] 刘芳, 董昌虎, 周智辉. 中西医结合治疗再生障碍性贫血不同骨髓免疫分型的临床观察[J]. 现代中医药, 2011, 31(2): 30-31.

[21] 陈阳述, 余宙耀, 张海松, 等. 胎牛骨髓多肽对小鼠和人巨噬细胞及NK活性的影响[J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(6): 357-358.

[22] 陈阳述, 余宙耀, 张海松, 等. 胎牛骨髓多肽对小鼠和人T细胞功能的影响[J]. 上海免疫学杂志, 1998, 18(2): 119-120.

[23] 刘立新. 猪骨蛋白水提工艺的优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 220-222.

[24] 李晓琳, 张顺捷, 李颖, 等. 刺五加与短梗五加种子的蛋白质电泳分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22): 180-183.

[25] 梁梓强, 梁士可, 张梅, 等. 褐飞虱可溶性蛋白SDS-PAGE电泳分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2015, 54(6): 27-30.

[26] 王卫, 张志宇, 刘达玉, 等. 畜禽骨加工利用及其产品开发[J]. 食品科技, 2009, 34(5): 154-158.

[27] 赵志峰, 谭敏, 郭晶, 等. 动物骨粉的研究开发及应用现状[J]. 食品工业科技, 2008, 29(3): 306-309.

[28] 兰社益. 利用牛骨加工骨质食品的制作技术[J]. 今日科技, 1999(6): 8.

[29] 李天才, 索有瑞. 藏药牦牛骨主要矿物质元素及其特征[J]. 广东微量元素科学, 2002, 9(4): 53-55.

[30] 周利兵, 姜紫勤, 吴启勋. 青海牦牛骨主要矿物质元素的综合评价[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(2): 28-29.

[31] 赵勇, 陈红剑. 牦牛骨中钙、磷及多种微量元素的分析研究[J]. 西藏科技, 2010(7): 39-41.

[32] 索有瑞, 张宝琛, 汪汉卿. 塞隆骨与虎骨中矿物质元素的比较[J]. 中草药, 2004, 35(4): 89-92.

[33] 戈早川, 颜世铭. 虎骨及其类似品微量元素的灰色关联分析[J]. 广东微量元素科学, 1997(7): 66-68.

[34] 罗新贵, 郑国池, 余宙耀, 等. 胎牛骨髓多肽对小鼠骨髓细胞CFUF-GM增殖的实验研究[J]. 中国生化药物杂志, 1996, 17(5): 209-210.

[35] 白福生, 阎效前. 黄芪当归等八种补血药中几种微量元素含量分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1996(9): 40.

[36] 清水宽, 樱井弘, 竹岛繁雄, 等. 有关补血药、活血药及补肾药物微量元素的研究[J]. 北京中医, 1993(5): 53-54.

[37] 赵旭升. 7种安神类中草药中微量元素的因子分析和聚类分析[J]. 微量元素与健康研究, 2008, 25(4): 24-26.

[责任编辑 顾雪竹]