

响应面法优化鹰嘴豆铁蛋白提取工艺

辛敏^{1,2}, 黄昀^{1*}, 詹欣^{1,2}, 王然^{1,2}, 唐劲天^{1,2}

(1. 清华大学工程物理系粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084;
2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 优选鹰嘴豆铁蛋白的提取工艺。方法: 在单因素试验基础上, 选择缓冲液 pH、料液比、盐析盐摩尔浓度为自变量, 干膏量及铁蛋白、总蛋白得率为响应值, 根据 Box-Behnken 原理采用三因素三水平响应面分析法优选鹰嘴豆铁蛋白的提取工艺参数。结果: 最佳提取工艺条件为缓冲液 pH 7.46, 料液比 1:4, 盐析盐摩尔浓度 50 mmol·L⁻¹; 铁蛋白得率 0.002 556%, 与理论预测值 0.002 633% 偏差较小。结论: 采用响应面法优选的鹰嘴豆铁蛋白提取工艺稳定合理, 为提高铁蛋白得率和植物补铁制剂的开发利用提供参考。

[关键词] 鹰嘴豆; 铁蛋白; 响应面分析法; 提取工艺; 邻菲咯啉显色法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)14-0012-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140012

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1143.007.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 11:43

Optimization of Extraction Process of Ferritin from *Cicer arietinum* by Response Surface Methodology

XIN Min^{1,2}, HUANG Yun^{1*}, ZHAN Xin^{1,2}, WANG Ran^{1,2}, TANG Jin-tian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Particle & Radiation Imaging, Ministry of Education, Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of ferritin from *Cicer arietinum*. **Method:** On the basis of single factor tests, response surface methodology (RSM) was applied for optimizing extraction conditions with solid-liquid ratio, buffer pH, salt concentration as independent variables and yields of ferritin and total proteins, dry weight of extract as response value. According to Box-Behnken principles, RSM with three factors and three levels was used. **Result:** Optimum extraction conditions for ferritin from *C. arietinum* was as follows: buffer pH of 7.46, solid-liquid ratio of 1:4, molar concentration of MgCl₂ 50 mmol·L⁻¹; yield of ferritin was 0.002 556%, whose deviation was small with theoretical predicted value of 0.002 633%. **Conclusion:** RSM for optimizing extraction process of ferritin was stable and feasible, it could improve extraction conditions of ferritin and provide a reference for development and utilization of plant iron supplements.

[Key words] *Cicer arietinum*; ferritin; response surface methodology; extraction technology; phenanthroline colorimetric method

铁蛋白为一种铁贮藏蛋白,广泛存在于动物、植物及微生物体中,是由 24 个同源或异源亚基结合而

[收稿日期] 20131104(009)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81102889)

[第一作者] 辛敏, 硕士, 从事微生物与生化药学研究, Tel:010-62796784, E-mail: mthsyj@yeah.net

[通讯作者] * 黄昀, 博士, 从事天然产物研究与开发, Tel:010-62796784, E-mail: sungood591@sina.com

成的一个蛋白质复合体,具有调节生物体细胞内铁代谢平衡的功能^[1]。研究发现植物铁蛋白补铁效果好,可有效缓解铁缺乏症且无毒副作用,相对于其他血红素铁,植物铁蛋白因具有蛋白外壳的保护,可有效防止植酸对铁吸收率的抑制,是一种新型的天然铁补充剂。

鹰嘴豆为传统维吾尔医用药材^[2],具有抗肿瘤、抗氧化、抗 HIV 等生物活性^[3]。目前有关植物铁蛋白的提取研究主要集中于豆科植物,如大豆^[1]、红小豆^[4]和羽扇豆^[5]等。刘文营等^[6]首次通过盐析与柱色谱法得到电泳纯度的鹰嘴豆铁蛋白。故本实验在单因素试验基础上,拟通过 Box-Behnken 响应面法考察提取液种类与 pH、料液比、盐析盐种类等因素对鹰嘴豆铁蛋白提取工艺的影响,优化鹰嘴豆铁蛋白的提取参数,为鹰嘴豆的资源开发提供参考。

1 材料

EnVision 型酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司),himac CF 16RX 型冷冻离心机(日本日立集团),Venticell 型烘箱(德国 MMM 公司),NANOpure 型超纯水系统(美国 Barnstead 公司),BM255C 型搅拌机(美的集团有限公司),Seven Easy 型酸度计(瑞士梅特勒-托利多公司)。

鹰嘴豆于 2011 年 10 月购自新疆木垒县,经中国医学科学院药用植物研究所刘新民教授鉴定为豆科植物鹰嘴豆 *Cicer arietinum* L. 的干燥种子;凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),水为二次蒸馏水或超纯水,其余试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 Fe^{2+} 标准曲线的绘制 准确称取 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 晶体 1.0 g,置于 10 mL 棕色量瓶中,加水溶解并定容;精密量取该溶液 1 mL,置于 100 mL 棕色量瓶中,加水稀释至刻度,作为待测母液。精密移取母液 0,1,2,3,4,5 μL 于 96 孔板中,分别加水稀释至 180 μL ,加入 20% 连二亚硫酸钠溶液 30 μL 还原,加入 0.1% 邻菲咯啉溶液 40 μL 染色,混匀,放置 2 min,采用酶标仪混匀 10 s,于 510 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 0.142C - 0.023$ ($R^2 = 0.999$),线性范围 4 ~ 20 $mg \cdot L^{-1}$ 。

2.2 提取液中 Fe^{2+} 含量测定 采用邻菲咯啉显色法测定。在 96 孔酶标板小孔中加入待测液 10 μL 和超纯水 20 μL ,按 2.1 项下方法显色和测定,计算 Fe^{2+} 浓度。

2.3 蛋白质标准曲线的绘制 选用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒,精密移取 1.0 $g \cdot L^{-1}$ 蛋白质标准溶液 0,1,4,7,10,13,16,20 μL 于 96 孔板中,分别加水稀释至 20 μL ,加入考马斯亮蓝 G-250 180 μL 染色,混匀,放置 2 min,采用酶标仪混匀 10 s,于 595 nm 处检测,以 A 为纵坐标,C 为横坐标,得回归方程 $A = 7.403C + 0.287$ ($R^2 = 0.986$),线性范围 0.005 ~ 0.1 $g \cdot L^{-1}$ 。

2.4 样品中蛋白质含量测定 利用考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合显蓝色的特性,在 96 孔酶标板小孔中加入待测液 15 μL 和超纯水 5 μL ,按 2.3 项下方法显色和测定,计算总蛋白浓度。

2.5 提取液干重的测定 精密量取待测提取液 7.5 mL 至干燥培养皿中,于 60 $^{\circ}C$ 鼓风干燥直至恒重,平行测定 3 次,计算提取液干重。

2.6 单因素试验考察 参考文献[7]中豌豆种子铁蛋白的预处理及盐析,增加种子匀浆后用缓冲液清洗 3 次(20,20,10 mL)的步骤。分别考察缓冲液种类(KH_2PO_4 -NaOH, Tris-HCl 缓冲液)和 pH(7.0,7.5,8.0,8.5,9.0)、料液比(1:1,1:2,1:3,1:4)、盐析盐种类[50 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$, 饱和度 15% ~ 20% 的 $(NH_4)_2SO_4$]、盐析盐摩尔浓度(10,20,30,40,50,60,70,80 $mmol \cdot L^{-1}$)对鹰嘴豆铁蛋白提取工艺的影响。

2.6.1 缓冲液种类 计算 KH_2PO_4 -NaOH, Tris-HCl 缓冲液处理时铁蛋白提取率分别为 0.001 4%, 0.001 2%,说明 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液有利于铁蛋白的富集且杂蛋白少、纯度高。

2.6.2 pH 计算 pH 分别为 7.0,7.5,8.0,8.5,9.0 时,铁蛋白提取率分别为 0.002 0%, 0.002 2%, 0.001 9%, 0.001 9%, 0.001 8%,当缓冲液 pH 7.5 时,铁蛋白提取率存在最大值且与其余组存在显著性差异。

2.6.3 料液比 当料液比为 1:1,1:2,1:3,1:4 时,铁蛋白提取率分别为 0.001 3%, 0.002 7%, 0.003 1%, 0.003 6%,说明适当缓冲液用量有利于蛋白质的溶出,使铁蛋白含量增加,但料液比过大会使铁蛋白浓度降低且会增加后续工艺的浓缩成本。

2.6.4 盐析盐种类 选择 $MgCl_2$ 和 $(NH_4)_2SO_4$ 盐析铁蛋白的提取率分别为 0.002 2%, 0.001 4%,试验发现加入 $MgCl_2$ 先析出淀粉再析出铁蛋白,可通过离心去除部分淀粉,故选用 $MgCl_2$ 。

2.6.5 盐析盐摩尔浓度 当盐析盐摩尔浓度分别为 10,20,30,40,50,60,70,80 $mmol \cdot L^{-1}$ 时,铁蛋白提取率分别为 0.001 6%, 0.001 6%, 0.001 8%,

0.001 9%, 0.002 0%, 0.002 2%, 0.002 0%, 0.001 9%, 说明当盐摩尔浓度在 10 ~ 60 mmol · L⁻¹ 时, 随摩尔浓度的增加, 铁蛋白提取率增大。

2.7 响应面试验 根据单因素试验分析结果, 选择缓冲液 pH、料液比和盐析盐摩尔浓度为自变量, 设计三因素三水平共 15 个试验点的 Box-Behnken 响应面试验, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 其中包括 12 个析因点试验, 3 个零点重复试验用于估计试验误差。采用 Design-Expert 8 软件对试验数据进行回归分析, 建立以铁蛋白得率为响应值的全变量二次回归方程。

表 1 鹰嘴豆铁蛋白提取工艺响应面试验因素水平

水平	X ₁ 缓冲液 pH	X ₂ 料液比	X ₃ 盐析盐 /mmol · L ⁻¹
-1	7.0	1:2	50
0	7.5	1:3	60
1	8.0	1:4	70

表 2 鹰嘴豆铁蛋白提取工艺 Box-Behnken 响应面试验安排

No.	X ₁	X ₂	X ₃	铁蛋白得率/%	总蛋白得率/%	干膏量/g
1	-1	-1	0	1.423 × 10 ⁻³	0.109	0.170
2	-1	0	1	1.527 × 10 ⁻³	0.160	0.285
3	-1	0	-1	1.897 × 10 ⁻³	0.203	0.287
4	-1	1	0	2.254 × 10 ⁻³	0.162	0.295
5	0	-1	-1	1.828 × 10 ⁻³	0.176	0.314
6	0	-1	1	1.904 × 10 ⁻³	0.182	0.302
7	0	0	0	2.051 × 10 ⁻³	0.201	0.340
8	0	0	0	2.085 × 10 ⁻³	0.209	0.332
9	0	0	0	2.152 × 10 ⁻³	0.190	0.369
10	0	1	1	2.527 × 10 ⁻³	0.216	0.420
11	0	1	-1	2.535 × 10 ⁻³	0.222	0.398
12	1	0	1	1.615 × 10 ⁻³	0.207	0.313
13	1	-1	0	1.676 × 10 ⁻³	0.166	0.290
14	1	0	-1	1.908 × 10 ⁻³	0.208	0.301
15	1	1	0	2.208 × 10 ⁻³	0.213	0.400

经回归拟合, 得自变量对铁蛋白提取率影响的回归方程为 $Y = -7.586 + 2.031X_1 + 0.082X_2 + 5.282 \times 10^{-6}X_3 - 0.015X_1X_2 + 3.873 \times 10^{-4}X_1X_3 - 2.113 \times 10^{-4}X_2X_3 - 0.134X_1^2 + 0.013X_2^2 - 2.518 \times 10^{-5}X_3^2$ ($R^2 = 0.9528$)。回归方程的方差分析见表 3, 表明该模型回归极显著, 失拟项不显著, 相关性较好, 校正 $R^2 = 0.8677$, 说明响应面 86.77% 的变化

可采用该模型解释; 变异系数 6.16%, 说明试验数据可靠, 分析结果可信。各自变量交互作用对铁蛋白得率影响的响应面与等高线见图 1 ~ 3。

表 3 铁蛋白得率二阶回归方程的方差分析

变异来源	f	SS	MS	F	P
模型	9	0.015	1.65 × 10 ⁻³	11.21	0.008 0
X ₁	1	4.04 × 10 ⁻³	4.04 × 10 ⁻³	27.41	0.003 4
X ₂	1	8.84 × 10 ⁻⁵	8.85 × 10 ⁻⁵	0.60	0.473 7
X ₃	1	2.86 × 10 ⁻¹¹	2.86 × 10 ⁻¹¹	1.94 × 10 ⁻⁷	0.999 7
X ₁ X ₂	1	2.23 × 10 ⁻⁴	2.23 × 10 ⁻⁴	1.51	0.273 6
X ₁ X ₃	1	1.50 × 10 ⁻⁵	1.50 × 10 ⁻⁵	0.10	0.762 7
X ₂ X ₃	1	1.79 × 10 ⁻⁵	1.79 × 10 ⁻⁵	0.12	0.742 1
X ₁ ²	1	4.11 × 10 ⁻³	4.11 × 10 ⁻³	27.87	0.003 2
X ₂ ²	1	6.05 × 10 ⁻⁴	6.05 × 10 ⁻⁴	4.10	0.098 7
X ₃ ²	1	2.34 × 10 ⁻⁵	2.34 × 10 ⁻⁵	0.16	0.706 8
纯误差	2	5.33 × 10 ⁻⁵	2.67 × 10 ⁻⁵		
残差	5	7.37 × 10 ⁻⁴	1.47 × 10 ⁻⁴		
失拟项	3	6.84 × 10 ⁻⁴	2.28 × 10 ⁻⁴	8.55	0.106 5
总和	14	0.016			

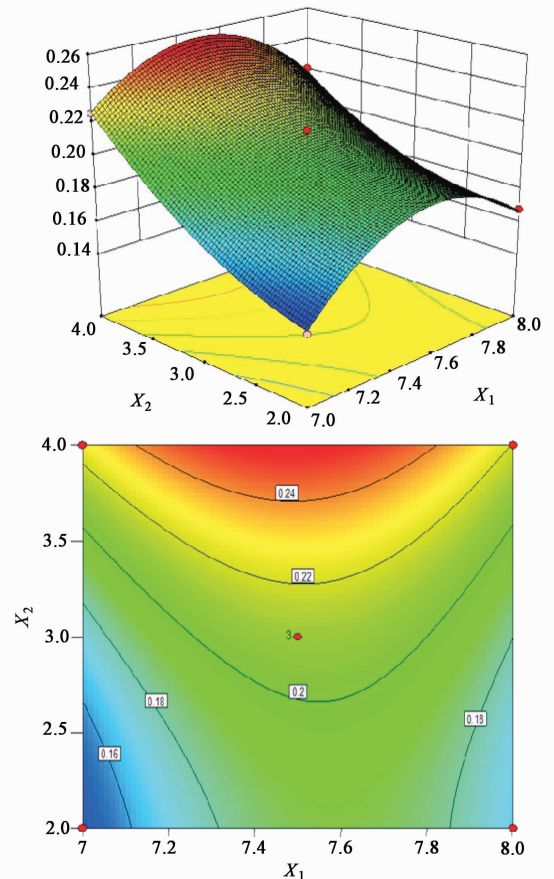


图 1 料液比与缓冲液 pH 对鹰嘴豆铁蛋白提取率 ($\times 10^{-4}$) 影响的响应面与等高线

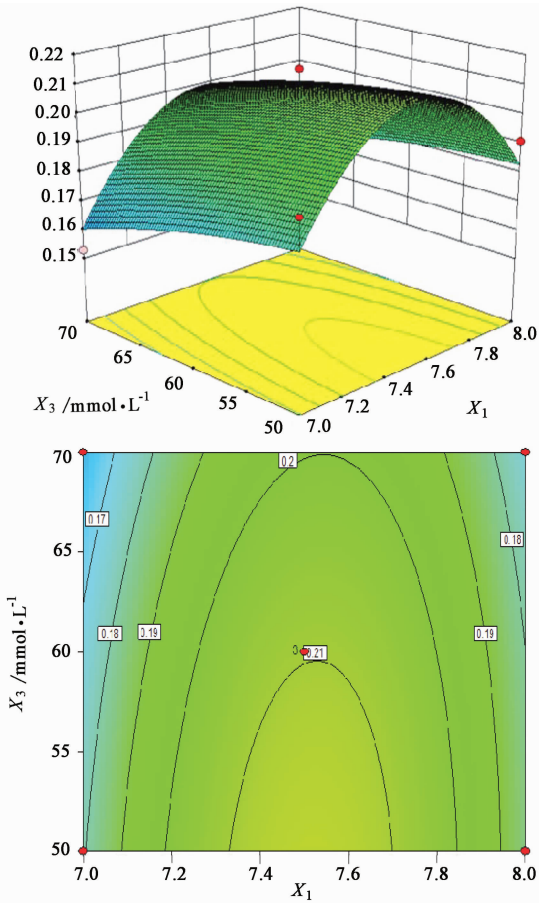


图2 盐析盐摩尔浓度与缓冲液 pH 对鹰嘴豆铁蛋白提取率 ($\times 10^{-4}$) 影响的响应面与等高线

由图1可知,随 X_1 的增加,铁蛋白得率先升高后下降,于 pH 7.5 时存在最大值。随 X_2 不断增加,铁蛋白得率不断提高,但铁蛋白摩尔浓度降低,故选取料液比 1:4。由图2可知, X_2 为 0 水平时, X_1 和 X_1^2 均对铁蛋白得率具有显著性影响。图3显示在 X_1 为 0 水平时, X_2 和 X_3 对铁蛋白得率交互影响, X_3 对铁蛋白得率影响不显著,铁蛋白得率随 X_2 的增大而增大。各自变量影响鹰嘴豆铁蛋白提取工艺的顺序为 $X_1 > X_2 > X_3$,经回归模型得最佳工艺为缓冲液 pH 7.46,料液比 1:4,盐析盐摩尔浓度 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,此时铁蛋白得率 0.002 633%。为检验响应面分析法的可靠性,按最佳提取条件进行 3 次验证试验,结果铁蛋白得率 0.002 556% (RSD < 3%),与理论预测值偏差较小,说明该模型预测性良好。

3 讨论

综合考虑生产成本及得率等因素,使铁蛋白得率达到最大值,宜尽可能避免杂蛋白对铁蛋白纯化的干扰,故试验中还选择了总蛋白得率及干膏量为评价指标。经回归拟合,得各自变量对总蛋白得率

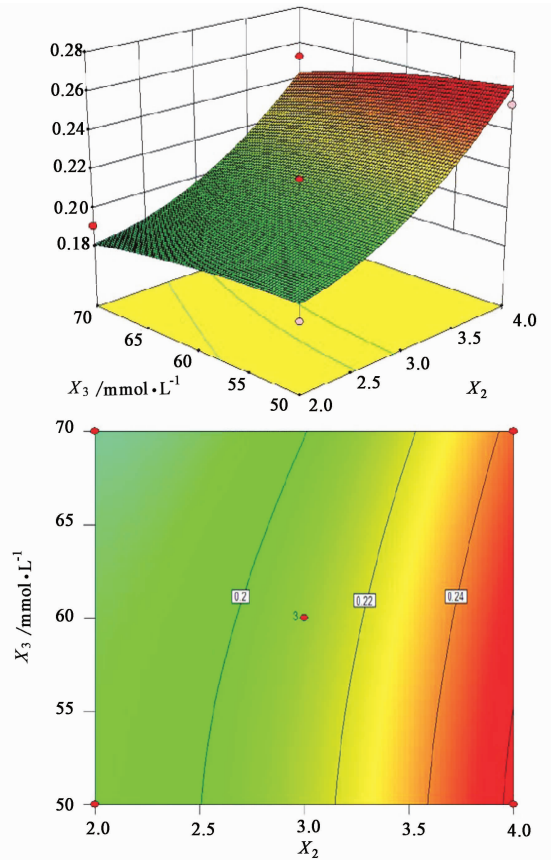


图3 料液比与盐析盐摩尔浓度对鹰嘴豆铁蛋白提取率 ($\times 10^{-4}$) 影响的响应面与等高线

影响的回归方程为 $Y = -3.667 + 1.192X_1 + 0.163X_2 - 0.034X_3 - 3.448 \times 10^{-3}X_1X_2 + 2.094 \times 10^{-3}X_1X_3 - 2.923 \times 10^{-4}X_2X_3 - 0.085X_1^2 - 0.016X_2^2 + 1.540 \times 10^{-4}X_3^2$,对该方程进行方差分析,计算变异系数 6.97%, $R^2 = 0.9316$,校正 $R^2 = 0.8084$,表明该方程可用于分析和预测;各自变量影响鹰嘴豆总蛋白提取率的顺序为 $X_1 > X_3 > X_2$,得最佳提取工艺为缓冲液 pH 7.60,料液比 1:3.78,盐析盐摩尔浓度 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,此时总蛋白得率 0.232%。各自变量对干膏量影响的回归方程为 $Y = -13.209 + 3.657X_1 + 0.049X_2 - 0.019X_3 - 7.600 \times 10^{-3}X_1X_2 + 6.750 \times 10^{-4}X_1X_3 + 8.311 \times 10^{-4}X_2X_3 - 0.241X_1^2 + 2.110 \times 10^{-3}X_2^2 + 9.735 \times 10^{-5}X_3^2$ (变异系数 9.96%, $R^2 = 0.9029$,校正 $R^2 = 0.7280$),表明该方程可用于预测试验结果,各自变量影响鹰嘴豆提取液干膏量的主次顺序为 $X_2 > X_1 > X_3$,得最佳提取工艺为缓冲液 pH 7.64,料液比 1:4,盐析盐摩尔浓度 $70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,此时干膏量 0.428 g。故最终选择了以铁蛋白得率为因变量优选的工艺参数。

正交试验优选雷公藤提取工艺

巴文强, 王利胜*, 王玗, 卢映, 吴俊洪, 黄雨威
(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选雷公藤的提取工艺。方法: 以雷公藤甲素和总二萜内酯提取量为指标, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验考察提取时间、乙醇用量及体积分数对雷公藤提取工艺的影响。采用 HPLC 测定雷公藤甲素含量, 流动相甲醇-水(45:55), 检测波长 218 nm; 利用 UV 测定总二萜内酯含量, 检测波长 550 nm。结果: 乙醇体积分数对雷公藤甲素提取量具有显著性影响, 其他 2 个因素则无显著性差异; 各因素对总二萜内酯提取量均无显著性影响。最佳提取工艺为加 8 倍量 95% 乙醇回流提取 3 次, 提取时间分别为 2, 1, 1 h; 雷公藤甲素、总二萜内酯提取量分别为 4.20, 86.64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 指标成分提取效率较高。

[关键词] 雷公藤; 雷公藤甲素; 总二萜内酯; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0016-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014140016

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1143.006.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 11:43

Optimization of Extraction Process for *Tripterygium wilfordii* by Orthogonal Design

BA Wen-qiang, WANG Li-sheng*, WANG Ding, LU Ying, WU Jun-hong, HUANG Yu-wei

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of *Tripterygium wilfordii*. **Method:** Taking extracting amounts of triptolide and total diterpene lactones as indexes, orthogonal test was adopted to optimize extraction process with extracting time, ethanol concentration and consumption as factors. HPLC was adopted to determine the content of triptolide with mobile phase of methanol-water (45:55) and detection wavelength at 218 nm; UV was employed to determine the content of total diterpene lactones with detection wavelength at 550 nm. **Result:**

[收稿日期] 20131024(021)

[基金项目] 广东省教育部产学研结合项目(2012B091100486)

[第一作者] 巴文强, 硕士, 从事药物制剂新剂型与新技术研究, Tel: 13824431417, E-mail: bawenqiang2009@126.com

[通讯作者] * 王利胜, 教授, 硕士生导师, 从事药物制剂新剂型与新技术研究, Tel: 020-39358043, E-mail: wls68@126.com

[参考文献]

- [1] Lahlou J P, Lescure A M, Briat J F. Purification and characterization of ferritins from maize, pea, and soya bean seeds[J]. J Biol Chem, 1988, 263(21): 10289.
- [2] 肖克来提·木尼拉. 维药鹰嘴豆的国内外应用简介[J]. 中国民族医药杂志, 2003, 11(3): 20.
- [3] 杨建梅, 张慧, 余琛, 等. 鹰嘴豆的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(1): 89.
- [4] 杨秀丽. 红小豆铁蛋白的分离纯化、初步结构表征及

铁吸收活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2010.

- [5] Yun S J, Yang S P, Huang L Y, et al. Isolation and characterization of a new phytoferritin from broad bean (*Vicia faba*) seed with higher stability compared to pea seed ferritin[J]. Food Res Int, 2012, 48(1): 271.
- [6] 刘文营. 鹰嘴豆铁蛋白的分离纯化表征及性质分析[D]. 石河子: 石河子大学, 2011.
- [7] 袁小红. 豌豆种子铁蛋白的纯化及其抗血清的制备[D]. 重庆: 西南农业大学, 2002.

[责任编辑 刘德文]