

壁虎药材蛋白质提取工艺优化

包华音*

(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:优化建立壁虎药材蛋白质的提取工艺。方法:通过比较超声和回流两种提取方式对壁虎药材蛋白质提取率的影响,筛选适合的提取方式。分别对 pH、料液比、提取温度、提取时间 4 种影响因素进行单因素考察,并采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以蛋白提取率为指标,优选建立壁虎药材蛋白质的提取工艺。结果:超声提取的蛋白质含量显著高于回流提取,建立了壁虎药材蛋白质的最佳提取工艺:pH 12,料液比 1:20,提取温度 50 ℃,超声提取时间 80 min。结论:该研究建立的蛋白质提取工艺稳定、合理、可行,为壁虎药材的质量评价和生物活性物质的进一步研究提供了实验依据。

[关键词] 壁虎;蛋白质;提取工艺;单因素考察;正交试验

[中图分类号] R284.1;R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0077-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170077

Optimization of Protein Extraction Technology of Gekko Swinhoanis

BAO Hua-yin*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study was to optimize the extraction technology of protein in Gekko Swinhoanis. **Method:** The proper extraction method was selected by comparing the effect of ultrasonic and

[收稿日期] 20131204(010)

[基金项目] 《山东省中药材标准》2012 版标准研究;山东省高等学校青年骨干教师国内访问学者项目(鲁教人函(2012)9 号);山东中医药大学青年骨干培养计划项目(ZYDXY1340)

[通讯作者] *包华音,博士,讲师,从事中药质量控制与资源研究,Tel:13064057985,E-mail:baohuayin@163.com

醇-水(48:5:47)时效果最好。

3.4 提取条件优化

3.4.1 溶剂优化 分别考察了 100% 甲醇、100% 乙醇、90% 甲醇和 90% 乙醇对样品的提取效率,结果表明 100% 乙醇提取效率最高。

3.4.2 溶剂倍量优化 分别考察了 10,15,20 倍量溶剂对提取效率的影响,结果表明无差异,因此确定用最少量,即 10 倍量。

3.4.3 提取时间优化 分别考察提取时间为 1,2,3 h 对提取效率的影响,结果表明,提取时间为 2 h 与 3 h 无明显差异,而提取时间为 1 h 的提取效率较低,考虑节省时间的因素,确定提取时间为 2 h。

[参考文献]

[1] 汪发缙,唐进,陈心启,等. 中国植物志. 第 15 卷

[M]. 北京:科学出版社,1978:61.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:78.

[3] 林琳,林寿全. 黄精与玉竹的生药性状及组织特征比较[J]. 中草药,1994,25(5):261.

[4] 杨慧洁,杨世海,张海弢,等. 玉竹化学成分、药理作用研究进展及开发利用现状[J]. 人参研究,2012(3):40.

[5] 吕晓茜,包京珊,张蕾,等. 玉竹总皂苷超声波提取工艺研究[J]. 中国现代中药,2012,14(5):45.

[6] 郭焕杰,赵焕新,白虹. 玉竹中甾体皂苷及高异黄酮类化合物的波谱学特征[J]. 中医药学报,2012,40(5):41.

[7] 张洪. 玉竹的化学成分及质量控制研究[D]. 南京:中国药科大学,2011:181.

[责任编辑 顾雪竹]

reflux extraction on protein extraction rate of Gekko Swinhoanis. Then single factor analysis was done for four influencing factors, such as pH, ration of liquid to material, temperature and time. The optimized extraction technology was investigated using orthogonal test with the content of protein as the index for the first time. **Result:** The protein content by ultrasonic extraction was significantly higher than that by reflux extraction. The best extraction condition of protein in Gekko Swinhoanis was proposed, that's the powder of Gekko Swinhoanis was extracted for 80 minutes with 20 times amount of water (pH 12) by ultrasonic. **Conclusion:** The optimum extraction condition was stable, reliable and feasible, and could provide a experimental basis for formulating the quality standards and further study of bioactive substances of traditional Chinese medicine Gekko Swinhoanis.

[**Key words**] Gekko Swinhoanis; protein; content determination; single factor exploration; orthogonal test

壁虎又名守宫、天龙等,具有祛风定惊,解毒散结的功效^[1]。壁虎对多种恶性肿瘤、结核病、骨髓炎、瘰疬、窦道等疑难杂症疗效确切^[2]。近年来壁虎的抗肿瘤作用已引起医药界的广泛关注,具有广阔的研究和开发前景。已有研究表明,多肽或蛋白质类物质是大多数动物药中的有效成分,壁虎多肽及其他蛋白质组分对肿瘤细胞有着较强的诱导凋亡的作用^[3-5]。因此,对蛋白质含量的定量控制是确保壁虎药材质量的一个重要方面。

壁虎目前未载入 2010 年版《中国药典》,也无地方标准。本研究采用超声法提取壁虎药材中的蛋白质,通过单因素考察和正交试验设计筛选建立优化的蛋白质提取工艺,以期对中药壁虎质量标准的制订与生物活性物质的进一步研究提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 仪器 CPA225D 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),UV-754 型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),PB-10 型 pH 计(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

1.2 试剂 牛血清白蛋白/Bovine Serum Albumin (BSA,批号 F20040213,国药集团化学试剂有限公司),考马斯亮蓝 G-250(Fluka 进口分装)。所用化学试剂、药品均为分析纯并新鲜配制,水为双蒸水。

1.3 药材 药材购自亳州药材市场,经山东中医药大学石俊英教授鉴定均为壁虎科动物无蹼壁虎 *Gekko swinhoanis* Güenther。

2 方法与结果

2.1 药材预处理 称取壁虎药材粉末(过四号筛) 100.00 g,于 P₂O₅ 干燥器中干燥 12 h,用石油醚索氏提取 12 h,收集干燥药渣备用。

2.2 BSA 标准溶液的配制 准确称取 BSA 10.0 mg,用双蒸水溶解并定容至 100 mL,即得 0.1 g·L⁻¹

的 BSA 标准溶液。

2.3 精密度试验 吸取 0.1 g·L⁻¹ BSA 标准液 400 μL,补加双蒸水至 1 mL,加入 5 mL 考马斯亮蓝染色溶液,显色 5 min 时在 595 nm 处测定溶液的吸光度,重复操作 6 次,RSD 1.20%,结果表明仪器精密度良好。

2.4 标准曲线的绘制 参照 Bradford 法^[6]。取 7 支试管,分别精密加入 BSA 标准液 0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1 mL,各补加双蒸水至 1 mL,制成不同浓度的 BSA 溶液。向 7 支试管中分别加入 5 mL 考马斯亮蓝染色溶液染色 5 min。以第 1 支试管中的溶液为空白对照,测定其余 6 支试管中溶液在 595 nm 处的吸光度。以蛋白质质量浓度(g·L⁻¹)为横坐标,吸光度为纵坐标,进行线性回归分析。得到的线性回归方程为 $Y = 6.6154X + 0.01$ ($r = 0.9990$),线性范围为 0 ~ 100 μg。结果表明,线性关系良好,可以用来进行蛋白质含量的测定。

2.5 蛋白质提取方式的筛选 精密称定预处理后的药材粉末 6 份,各 2 g。向其中 3 份粉末中各加入蒸馏水 50 mL,称重。40 °C 超声提取 60 min,称重并补足失重。8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液减压浓缩并定容至 25 mL 作为待测超声提取液。向另 3 份粉末中加入蒸馏水 50 mL,回流提取 2 次,每次 1 h。合并两次回流提取液,8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,将上清液减压浓缩并定容至 25 mL 作为待测回流提取液。精密吸取回流和超声提取液各 0.1 mL,按 2.4 项下方法测定吸光度,每个样品平行测定 3 次。结果两种方法测定可溶性蛋白质分别为回流 0.99%,超声 1.5%;RSD 分别为 1.59%,1.03%。可以看出,超声提取的蛋白质含量显著高于回流提取。

2.6 蛋白质提取条件的单因素考察

2.6.1 pH 对蛋白质提取率的影响 称定预处理后

的药渣粉末 6 份,各 0.85 g(相当于脱脂前的药材粉末质量为 1.000 g),加入蒸馏水 20 mL(调 pH 分别为 2, 4, 6, 8, 10, 12), 40 ℃ 超声提取 30 min。8 000 r·min⁻¹离心 10 min,将上清液定容至 25 mL 作为待测溶液。每个处理重复 3 次。分别吸取一定量的待测溶液,按 2.4 项下方法测定吸光度,并根据标准曲线计算药材蛋白质含量。结果表明,随着 pH 的升高,蛋白质提取率显著增加。当 pH 12 时,蛋白质提取率最高,为 20.06%。故确定本研究正交试验中 pH 因素的 3 个水平为 8,10,12。

2.6.2 料液比对蛋白质提取率的影响 称定预处理后的药渣粉末 5 份,各 0.85 g。分别加入蒸馏水 5,10,15,20,30 mL,40 ℃ 超声提取 30 min。于 8 000 r·min⁻¹离心 10 min,将上清液分别定容至 5,10,15,20,30 mL 作为待测溶液。每个处理重复 3 次。分别吸取一定量的待测溶液,按 2.4 项下方法测定吸光度,并根据标准曲线计算药材蛋白质含量。结果表明,蛋白质提取率随溶剂量增加而增加,料液比为 1:20 时提取率趋于平稳。故正交试验料液比因素的 3 个水平选择 1:10,1:15,1:20。

2.6.3 提取温度对蛋白质提取率的影响 称定预处理后的药渣粉末 6 份,各 0.85 g。加入蒸馏水 20 mL,分别在 20,30,40,50,60,70 ℃ 时超声提取 30 min。8 000 r·min⁻¹离心 10 min,将上清液定容至 25 mL 作为待测溶液。每个处理重复 3 次。分别吸取一定量的待测溶液,按 2.4 项下方法测定吸光度,并根据标准曲线计算药材蛋白质含量。结果表明,随着提取温度的升高,蛋白质提取率逐渐增加,至 50 ℃ 时提取率趋于平稳,而 70 ℃ 时提取率显著降低,为 50 ℃ 时的 87%,这可能与温度较高时可溶性蛋白质变性沉淀有关。因此,本研究中提取温度因素的 3 个水平选择 40,50,60 ℃。

2.6.4 提取时间对蛋白质提取率的影响 称定预处理后的药渣粉末 7 份,各 0.850 g。加入蒸馏水 20 mL,40 ℃ 分别超声提取 10,20,30,40,60,80,100 min。8 000 r·min⁻¹离心 10 min,将上清液定容至 25 mL 作为待测溶液。每个处理重复 3 次。分别吸取一定量的待测溶液,按 2.4 项下方法测定吸光度,并根据标准曲线计算药材蛋白质含量。结果表明,随着超声提取时间的延长,壁虎药材可溶性蛋白质提取率呈现上升趋势。提取时间为 80 min 时提取率最高,是 30 min 时的 1.52 倍,此后趋于平稳。因此,正交试验提取时间因素的 3 个水平选择提取率较高的 40,60,80 min。

2.7 蛋白提取工艺的正交试验优选

2.7.1 正交试验设计 本试验选取 4 个因素:A(pH),B(料液比),C(温度),D(时间),每个因素设 3 个水平,选用 L₉(3⁴)正交表,以可溶性蛋白质提取率为指标进行试验。因素水平表见表 1。

表 1 壁虎药材蛋白质提取工艺优选因素水平表 L₉(3⁴)

水平	A pH	B 料液比	C 温度 /℃	D 提取时间 /min
1	8	1:10	40	40
2	10	1:15	50	60
3	12	1:20	60	80

2.7.2 供试品溶液的制备 称定预处理后的药材粉末 9 份,各 0.850 g。按照表 2 确定的试验方案分别加入 pH 为 A 的 B 倍量的蒸馏水,在温度 C 条件下超声提取 D min,静置片刻,冷至室温。8 000 r·min⁻¹离心 10 min。保留上清液,即得到供试品溶液。每个处理重复 3 次。

2.7.3 供试品溶液蛋白质含量的测定 分别吸取一定量的供试品溶液,按 2.4 项下方法测定吸光度,并根据标准曲线计算药材蛋白质含量。

2.7.4 蛋白质最佳提取工艺的确定 利用 SPSS 软件对本研究中的四因素三水平正交试验结果进行统计分析和正交试验方差分析,结果见表 2,3。

从示差分析结果可以看出,因素 A,B,C,D 的 P 均 < 0.05,各水平间均有显著性差异,壁虎药材可溶性蛋白质的最佳提取工艺为 A₃B₃C₂D₃,即 pH 12,料液比为 1:20,提取温度 50 ℃,超声提取时间 80 min。

2.8 重复性试验 按照确定的最佳提取工艺分别制备供试品溶液,平行处理 6 份,按 2.4 项下方法测定吸光度。壁虎药材蛋白质质量分数 31.20%,RSD 1.19%,结果表明样品测定符合技术要求,重复性良好。

2.9 稳定性试验 按照确定的最佳提取工艺分别制备供试品溶液,分别放置 5,10,15,20,25,30 min,按 2.4 项下方法测定吸光度。RSD 1.76%,结果表明样品在 30 min 内测定是稳定的。

2.10 加样回收率试验 采用标准加入法,称取已知蛋白质含量的壁虎药材样品 6 份,分别加入 16 mg 对照品,按照确定的最佳提取工艺制备供试品溶液,按 2.4 项下方法测定吸光度,并计算加样回收率,见表 4。平均回收率为 96.82%,RSD 1.97%。

表 2 壁虎药材中蛋白质提取 $L_9(3^4)$ 正交试验及直观分析 ($n=3$)

No.	A	B	C	D	蛋白质质量分数/%		
1	1	1	1	1	3.01	3.05	3.05
2	1	2	2	2	4.51	4.53	4.58
3	1	3	3	3	5.81	5.90	5.93
4	2	1	2	3	6.73	6.74	6.64
5	2	2	3	1	6.33	6.49	6.53
6	2	3	1	2	8.25	8.28	8.31
7	3	1	3	2	5.74	5.84	5.87
8	3	2	1	3	10.75	10.68	10.87
9	3	3	2	1	13.06	13.03	12.94
K_1	40.37	46.67	66.25	67.49	-	-	-
K_2	64.30	65.27	72.76	55.91	-	-	-
K_3	88.78	81.51	54.44	70.05	-	-	-
R	5.379	3.871	2.036	1.571	-	-	-

表 3 壁虎中蛋白质提取正交试验方差分析

变异来源	SS	f	MS	F	P
总变异	229.179	26	-	-	-
A	130.197	2	65.099	12 446.363	<0.05
B	66.759	2	33.379	6 381.887	<0.05
C	19.160	2	9.580	1 831.609	<0.05
D	12.969	2	6.485	1 239.818	<0.05
误差	0.094	18	0.005	-	-

表 4 壁虎药材中蛋白质加样回收率

样品中 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
15.60	16.02	30.90	95.51		
15.54	16.05	30.98	96.20		
15.75	16.04	31.22	96.45		
15.93	16.02	32.04	100.56	96.82	1.97
15.84	16.06	31.38	96.76		
15.66	16.03	30.96	95.45		

3 讨论

壁虎药材的传统炮制方法是在去除内脏后低温炕干以利于保存,在炮制过程中可能会导致蛋白质和酶等活性物质的破坏。研究表明,多肽及其他蛋白组分是其抗肿瘤作用的重要活性成分^[3]。因此,蛋白组分含量的定量测定可作为壁虎药材质量评价的一个重要指标。

考马斯亮蓝染色法 (Bradford 法) 灵敏度高,测定快速、简便,染色稳定,干扰物质少。方法学考察结果表明,该方法完全可以满足本研究的技术要求,可以用来进行蛋白含量的测定。

本研究中比较了回流和超声两种提取方式下蛋

白质得率的高低。结果表明,超声方式提取的蛋白量高于回流提取。超声波产生强烈的空化效应、高的加速度和搅拌作用等,都可加速药物有效成分进入溶剂,提取效率高,并且免去了高温对提取成分的影响^[7]。

为了充分提取药材中的蛋白质,以便更好地考察不同产地壁虎药材的质量,本研究对壁虎药材蛋白质的提取条件进行了单因素考察,并通过正交试验设计优选出壁虎药材蛋白质的最佳提取工艺:pH 12,料液比 1:20,50℃超声提取 80 min。研究表明,优选建立的蛋白质提取工艺合理、可行,为中药壁虎质量标准的建立和生物活性物质的进一步研究提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:400.
- [2] 叶云珍. 中药壁虎的研究进展 [J]. 中药材,2009,32(7):1160.
- [3] 侯新楠. 壁虎抗肿瘤研究 [D]. 北京:北京中医药大学,2008.
- [4] 包华音. 中药壁虎质量控制关键技术与质量评价体系研究 [D]. 山东:山东中医药大学,2012.
- [5] 顾响响, 俞晓斐, 王春梅. 鲜壁虎酶解物对小鼠 H_{22} 移植瘤抑制作用的研究 [J]. 中药材,2013,36(7):1050.
- [6] Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72:248.
- [7] 牛波, 邱海霞, 田景振, 等. 超声强化提取技术 [J]. 山东中医杂志,2000,19(10):629.

[责任编辑 顾雪竹]