

狼毒根、茎中蛋白质和氨基酸的分析

任学敏¹, 邢会存¹, 李金娜¹, 甄攀^{2*}

(1. 河北北方学院理学院, 河北 张家口 075000;

2. 河北北方学院应用化学研究所, 河北 张家口 075000)

[摘要] 目的:测定狼毒根、茎中蛋白质的含量及氨基酸的种类和含量。方法:用考马斯亮蓝 G-250 显色,分光光度法测定蛋白质含量;全自动氨基酸分析仪分析氨基酸的种类和含量。结果:狼毒根、茎中蛋白质的质量分数分别为 12.26, 3.93 mg·g⁻¹。狼毒根、茎中均含有 14 种氨基酸,相同氨基酸 13 种。根中有蛋氨酸而茎中没有,茎中有丝氨酸而根中没有。根中有 6 种人体必需氨基酸,茎中有 5 种人体必需氨基酸。根中氨基酸的质量分数为 0.116 4~39.561 3 mg·g⁻¹;茎中氨基酸的质量分数为 0.026 1~0.469 1 mg·g⁻¹。结论:狼毒根中蛋白质和氨基酸的含量均大于其茎中含量。单从蛋白质和氨基酸的角度而言,狼毒根的药用价值更高。

[关键词] 狼毒; 牛血清白蛋白; 蛋白质; 氨基酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0074-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200074

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140829.1416.011.html>

[网络出版时间] 2014-08-29 14:16

Analysis of Protein and Amino Acid in the Root and Stalk of *Stellera chamaejasma*

REN Xue-min¹, XING Hui-cun¹, LI Jin-na¹, ZHEN Pan^{2*}

(1. College of Science of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Institute of Applied Chemistry of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study was to determine the protein content in the root and stalk of *Stellera chamaejasma*, and to analyze the amino acid composition. **Method:** The protein content was determined by spectrophotometry with colored by coomassie brilliant blue G-250; the amino acid composition were analyzed by automatic amino acid analyzer. **Result:** The protein content in the root and stalk of *S. chamaejasma* were 12.26 mg·g⁻¹ and 3.93 mg·g⁻¹, respectively. There were 14 kinds of amino acids both in the root and stalk of *S. chamaejasma*, with 13 common amino acids. Of the 14 amino acids, the root contained met but in the absence of ser, and the stalk lacked met, while contained ser. The root contained 6 kinds of essential amino acids for human body, while the stalk contained 5. The amino acid content in the root was in a range of 0.116 4-39.561 3 mg·g⁻¹, while that in the stalk was in a range of 0.026 1-0.469 1 mg·g⁻¹. **Conclusion:** The contents of protein and amino acid in the root were higher than those in the stalk of *S. chamaejasma*. So the root has higher medical value than stalk in terms of protein and amino acid content.

[Key words] *Stellera chamaejasma*; bovine serum albumin; protein; amino acid

狼毒以干燥根入药,它喜冷凉气候、向阳环境,一般生长在干燥向阳山坡、干旱草原以及高山、亚高

山草地,除西部沙漠地区外,广泛分布在我国西北、西南、东北等地。狼毒全株有毒,根部毒性最大,花

[收稿日期] 20140324(007)

[基金项目] 河北省医学科学重点研究课题(20100480)

[第一作者] 任学敏,硕士,助教,从事药物及中间体合成及分析研究, Tel:18931311095, E-mail: xueminren@126.com

[通讯作者] *甄攀,硕士,教授,从事药物化学及药物分析研究, Tel:18932633176, E-mail: zhenpan8051226@126.com

粉刷毒。如果在含有大量花期狼毒植株的草地上放牧,家畜也可能因吸入狼毒花粉导致中毒。狼毒始载于《神农本草经》,历代本草均有记载,功能与主治为逐水祛痰、破积杀虫,治水肿腹胀,痰、食、虫积,心腹疼痛,慢性气管炎,咳嗽,气喘,淋巴结,皮肤病,骨结核,疥癣,抗肿瘤,抗菌,抗病毒,抗 HIV 等^[1-5]。狼毒主要成分有香豆素类、黄酮类、二萜类、木脂素类、多糖等^[6-8]。有关狼毒中蛋白质和氨基酸的研究报道较少。文献报道^[9],狼毒中的蛋白质对肿瘤细胞的生长具有抑制作用,且与蛋白质的浓度呈量效关系。本文分析了狼毒根、茎中蛋白质和氨基酸的含量以及氨基酸的种类,建立了狼毒的质量监控方法,为指导狼毒药材的临床使用提供了依据。

1 材料

U-3900 型分光光度计(日本 HITACHI),L-8900 型全自动氨基酸分析仪(日本日立),牛血清白蛋白(上海蓝季科技发展有限公司提供,批号 101110,相对分子质量 67 000),氨基酸对照品(批号 013-08391,氨基酸标准混合液,H 型,和光纯药株式会社提供),考马斯亮蓝 G-250、乙醇、磷酸、乙醚、95%乙醇、HCl、无水乙醇等均为分析纯。

狼毒采自河北省张北县,由我院中医学院赵恒成副教授采集并鉴定为瑞香科瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* L.。

2 方法

2.1 试剂的配制 考马斯亮蓝 G-250 染料试剂:称取考马斯亮蓝 G-250 25 mg,溶于 95% 的乙醇 12.5 mL 后,再加入 85% H_3PO_4 12.5 mL,用水稀释至 250 mL,转移至棕色试剂瓶中。

牛血清白蛋白标准溶液的配制:准确称取 10 mg 牛血清白蛋白,溶于 100 mL 蒸馏水中,即得 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液。

2.2 样品溶液的制备 蛋白质样品溶液制备:精密称定瑞香狼毒的根 0.820 9 g、茎 1.646 2 粉末(过 60 目),分别用蒸馏水分 3 次浸泡提取,共浸泡 4 h,过滤,滤液蒸馏水定容在 50 mL 量瓶中。

氨基酸样品溶液制备:精密称定瑞香狼毒的根 1.068 2 g、茎 1.296 1 g 粉末,分别用乙醚浸泡 3 次,共浸泡 4 h,以除去脂类物质。过滤,取残渣,在 80 °C 水浴中用 70% 乙醇浸泡,每次 30 min,过滤,残渣用无水乙醇洗涤 3 次,取滤液。在 85 °C 恒温振荡器中水浴加热,蒸干,用 $0.020\ 0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸 6.00 mL 溶解,并定容在 50 mL 量瓶中。

2.3 实验方法 蛋白质含量测定:各样品平行吸取

3 份,每份 1.00 mL 分别置标记为 2,3,4 的 50 mL 量瓶中,另取 1.00 mL 蒸馏水置标记为 1 的 50 mL 量瓶中,各加入 5.00 mL 已配制好的考马斯亮蓝 G-250 染料试剂,充分混合,放置 2 min 后,蒸馏水定容,以 1 号作为参比,在 595 nm 下测量 2,3,4 号比色管的吸光度,通过标准曲线计算提取液中蛋白质的含量。

氨基酸含量及种类分析:提取液用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤,精密吸取一定量的滤液,注入全自动氨基酸分析仪进行分析测定。

3 结果

3.1 蛋白质

3.1.1 吸收曲线 吸取牛血清白蛋白对照溶液 3.0 mL 置于 50.00 mL 量瓶中,加入 5.00 mL 考马斯亮蓝 G-250 染料试剂,放置 2 min 后用蒸馏水定容。用 UV-3900 型分光光度计在 200 ~ 750 nm 扫描,吸收曲线见图 1。最大吸收波长是 595 nm。

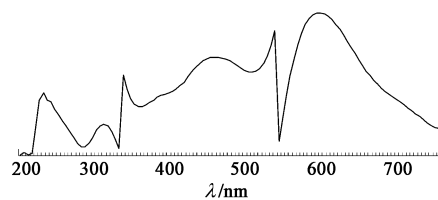


图 1 狼毒样品蛋白质测定 UV

3.1.2 标准曲线 精密吸取牛血清白蛋白标准溶液 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 mL, 分别置 50.00 mL 量瓶中,加入考马斯亮蓝 G-250 染料试剂 5.00 mL,放置 2 min 后,分别用蒸馏水定容,在 595 nm 下测定吸光度。同法制备平行空白。以吸光度 A 对质量浓度 C 得出标准曲线,回归方程是 $A = 0.021\ 5C + 0.023$ ($r = 0.997\ 1$),在 $1.00 \sim 24.00\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系。

3.1.3 精密度考察 以标准曲线测定中的 4 号为样品,重复测定吸光度 A,分别为 0.268, 0.269, 0.268, 0.270, 0.272, 0.271, RSD 0.63%,表明精密度较好。

3.1.4 稳定性考察 以标准曲线测定中的 4 号为样品,显色后每隔 10 min 测量 1 次吸光度 A,120 min 内吸光度的 RSD 2.2%,表明显色后的化合物在 120 min 内基本稳定。

3.1.5 重复性试验 精密称定狼毒根的粉末 0.6 g,狼毒茎的粉末 1.5 g,各 5 份。分别按本文建立的方法提取和测定,狼毒根中蛋白质的质量分数分别为 12.6, 13.2, 12.9, 12.2, 13.4 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD

3.7%; 狼毒茎中蛋白质的质量分数分别为 3.51, 3.90, 3.66, 3.59, 3.82 mg·g⁻¹, RSD 4.4%。

3.1.6 加样回收率试验 称取狼毒根和茎各适量, 精密称定, 分别加入一定量的牛血清白蛋白标准对照品, 按本文方法提取和测定。测得结果见表 1。

表 1 狼毒根和茎的加样回收率试验 (n=2)

成分	称样量 /g	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
狼毒根	0.421 0	0.30	0.287	95.7	98.7	3.9
	0.432 6	0.20	0.195	97.5		
	0.438 5	0.10	0.103	103.0		
狼毒茎	1.304 5	0.30	0.296	98.7	95.4	3.0
	1.321 4	0.20	0.187	93.5		
	1.340 3	0.10	0.094	94.0		

3.1.7 蛋白质含量的测定 根据以上确定的方法, 测定狼毒根、茎中蛋白质含量, 结果狼毒根中蛋白质的含量为 12.26 mg·g⁻¹; 狼毒茎中蛋白质含量为 3.93 mg·g⁻¹。

3.2 氨基酸 狼毒根、茎中氨基酸的种类和含量见表 3。

表 3 狼毒根、茎中氨基酸的种类和含量 mg·g⁻¹

氨基酸种类	狼毒根	狼毒茎
天门冬氨酸(Asp)	5.760 2	0.188 3
谷氨酸(Glu)	16.335 6	0.469 1
甘氨酸(Gly)	0.226 6	0.091 6
丙氨酸(Ala)	3.035 0	0.302 8
半胱氨酸(Cys)	0.240 6	0.396 8
缬氨酸(Val)	2.661 7	0.257 3
蛋氨酸(Met)	0.116 4	-
异亮氨酸(Ile)	0.762 6	0.073 2
亮氨酸(Leu)	0.482 0	0.109 7
酪氨酸(Tyr)	0.440 5	0.343 8
苯丙氨酸(Phe)	0.602 2	0.370 5
赖氨酸(Lys)	0.162 5	0.026 1
组氨酸(His)	1.258 7	0.066 0
精氨酸(Arg)	39.561 3	0.365 3
丝氨酸(Ser)	-	0.286 4

4 讨论

实验结果表明, 狼毒根中蛋白质的含量大于其茎中的含量, 二者相差显著, 经过 *t* 检验, *P* < 0.01。

狼毒根、茎中均含有 14 种氨基酸, 相同氨基酸

有 13 种, 不同氨基酸 2 种。根中有蛋氨酸而茎中没有, 茎中有丝氨酸而根中没有。狼毒根中有赖氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸等 6 种人体必需氨基酸, 茎中有赖氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸等 5 种人体必需氨基酸。13 种相同氨基酸中, 狼毒根中的含量基本上都大于其茎中含量, 只有半胱氨酸(Cys) 根中的含量略小于茎中的含量。

文献报道^[9], 狼毒中的蛋白质对正常细胞具有细胞毒作用, 对肿瘤细胞的生长具有抑制作用, 且与蛋白质的质量浓度呈量效关系。这说明蛋白质是狼毒的主要活性物质, 其含量高低与狼毒的疗效紧密相关。自古以来狼毒以根入药, 或许与根中蛋白质和氨基酸的含量较高有关, 与本文研究结果一致。

有关狼毒的研究报道, 多是针对其根部的。本文测定了坝上产瑞香狼毒根、茎中蛋白质和氨基酸的含量, 为全面了解狼毒药材提供了依据。本文建立的狼毒中蛋白质和氨基酸的测定方法, 可作为狼毒药材的质量控制方法。

[参考文献]

- [1] 刘文程, 王臣. 瑞香狼毒的化学成分、生物活性及应用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(1):26.
- [2] 刘晓霓, 李玉洁, 杨庆, 等. 瑞香狼毒醇提物体外抗肿瘤作用研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22):3048.
- [3] 孔洁, 吴佳君, 史冠莹, 等. 瑞香狼毒提取物对试验动物急性毒性及活性的初步研究[J]. 四川动物, 2009, 28(2):171.
- [4] 温哲屹, 师光禄, 苏学友, 等. 瑞香狼毒提取物对病原菌及桃酶的生物活性研究[J]. 北京农学院学报, 2008, 23(1):25.
- [5] 靳隽, 陈正跃, 王永学, 等. 瑞香狼毒成分抗惊厥作用的初步研究[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(6):779.
- [6] 冯宝民, 裴月湖. 瑞香狼毒中的化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(1):21.
- [7] 刘欣, 叶文才, 车镇涛, 等. 瑞香狼毒的化学成分研究[J]. 中草药, 2004, 35(4):379.
- [8] 刘桂芳, 付玉芹, 侯风飞, 等. 瑞香狼毒化学成分的研究[J]. 中草药, 1996, 27(2):67.
- [9] 杨申月, 燕志强, 徐蕊, 等. 瑞香狼毒根中活性物质的分离鉴定及作用机理[J]. 西北植物学报, 2011, 31(2):291.

[责任编辑 顾雪竹]