

## 五味子蛋白的提取纯化及含量测定

万志强<sup>1</sup>, 严铭铭<sup>1\*</sup>, 展月<sup>1</sup>, 邵帅<sup>1</sup>, 于雷<sup>2</sup>, 于红威<sup>2</sup>, 赵大庆<sup>1</sup>

(1. 长春中医药大学研发中心, 长春 130117; 2. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

**[摘要]** 目的: 采用 3 种方法对五味子进行蛋白质提取, 寻找一种简单有效的五味子蛋白提取方法。方法: 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法对蛋白提取物进行分析, 同时依据 Lowry 法对五味子总蛋白含量进行测定, HPLC 测定五味子蛋白提取物中氨基酸的含量。结果: 3 种方法提取总蛋白质量分数分别为 58.44%, 19.21%, 26.18%, 其所含氨基酸质量分数分别为 57.46%, 15.41%, 23.14%。结论: 采用脱脂硫酸铵沉降法提取所得总蛋白及其所含氨基酸含量较高、纯度较合理, 方法较可行。

**[关键词]** 五味子; 蛋白; 氨基酸; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0116-03

## Separation, Purification and Determination of Protein in *Schisandra chinensis*

WAN Zhi-qiang<sup>1</sup>, YAN Ming-ming<sup>1\*</sup>, ZHAN Yue<sup>1</sup>, SHAO Shuai<sup>1</sup>, YU Lei<sup>2</sup>, YU Hong-wei<sup>2</sup>, ZHAO Da-qing<sup>1</sup>

(1. R&D Center, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a simple method for effectively extracting protein from schisandra with the comparison of three extractive methods. **Method:** The extracts of the three methods were determined with SDS-PAGE, the content of protein was determined with the Lowry method, and a HPLC method was established for the determination of the amino acids in schisandra extract. **Result:** The protein content of the three methods was 58.44%, 19.21% and 26.18%. The amino acids content of the three methods was 57.46%, 15.41% and 23.14%. **Conclusion:** Purified protein and its amino acids were obtained by defatted ammonium sulfate precipitation procedure, and the content of protein was acceptable. This method is easily and more feasible.

**[Key words]** *Schisandra chinensis*; protein; amino acid; determination of content

五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill 属木兰科植物, 是一味传统常用中药, 始载于《神农本草经》, 列为上品, 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功效, 临床用于治疗久咳虚喘、梦遗滑精、遗尿尿频、久泻不止、自汗、盗汗、神经衰弱、肝炎等疾病。

五味子木质素成分研究较多, 蛋白质成分研究报道较少, 林伟卓<sup>[1]</sup>应用凯氏定氮法对五味子全氮及氨基酸含量进行了测定。针对其蛋白质成分进行的预实验表明: 五味子蛋白具有提高小鼠免疫力的作用, 对骨质疏松症有明显的改善作用。本文通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对其蛋白组成进行研究; 采用 Lowry 法<sup>[2]</sup>、HPLC<sup>[3]</sup>对蛋白质及其所含氨基酸进行含量测定。

### 1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱仪, G1316A 型紫外检测器, Agilent 工作站(美国 Agilent 公司); DYY-BC 型电泳仪(北京市六一仪器厂), PowerDry LL3000 型冷冻干燥机(丹麦 Heto 公司), AB265-S 型天平(瑞士

**[收稿日期]** 20100715(001)

**[基金项目]** 吉林省科委重点项目(20106041)

**[第一作者]** 万志强, 硕士研究生, 研究方向: 中药有效成分与应用开发, Tel: 13604311160, E-mail: onezhiqiang@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 严铭铭, 教授, 博士, 从事中药化学研究及新药研发, Tel: 13578990277, Fax: 0431-86172337, E-mail: yanmm595@yahoo.com.cn

Mettler Toledo 公司), FE20 实验室 pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], XH420 型 D455 透析带(北京鼎国生物技术有限责任公司, 截留范围 8 000 ~ 14 000)。

五味子采于吉林长白山, 经长春中医药大学药学院姜大成教授鉴定为北五味子 *S. Chinensis*, 牛血清白蛋白对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 14069-200919), 福林酚试剂(北京鼎国生物技术有限公司, 试剂甲和试剂乙), 混合氨基酸对照品(日本 Hitachi 公司), 乙腈(美国 Fisher 公司), 2,4-二硝基氟苯(FDNB)等, 其他试剂为国产分析纯。

## 2 方法

### 2.1 蛋白质提取

**2.1.1 脱脂硫酸铵沉降法** 取适量五味子, 捣碎, 6 倍量石油醚简单回流提取, 滤去石油醚, 得五味子药渣。取药渣 300 g, 用 10 倍量蒸馏水超声提取 2 h, 过滤后滤液部分加固体硫酸铵至饱和度 85%, 静止后于 -20 °C 条件下加入 80% 丙酮, 离心后取沉淀, -20 °C 挥净丙酮, Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)溶解, 离心, 过滤后取续滤液为粗蛋白提取液。

**2.1.2 直接提取法** 取适量五味子, 捣碎, 取 300 g, 用 10 倍量 Tris-HCl (pH 7.0) 搅拌提取 1 h, 静止, 离心, 过滤后取续滤液为粗蛋白提取液。

**2.1.3 三氯乙酸(TCA)和丙酮制干粉提取法** 取五味子适量, 粉碎, 用 3 倍量丙酮溶液(内含 10% TCA, 0.07%  $\beta$ -巯基乙醇, 10% PVP)搅拌提取 1 h, 离心后取沉淀, 悬浮于 -20 °C 80% 丙酮(含 0.07%  $\beta$ -巯基乙醇)中, 混悬液 -20 °C 沉降 1 h, 上清液离心后去沉淀, 4 °C 真空干燥, Tris-HCl 缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.0)溶解后 4 °C 静置 4 h, 离心去续滤液为粗蛋白提取液。

### 2.2 蛋白质的纯化

**2.2.1 样品透析** 将上述 3 种粗蛋白提取液在 4 °C 条件下用 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)透析 12 h, 得透析液。

**2.2.2 样品脱色** 分别取 3 种透析液 10 mL, 加入 0.1 g 活性炭搅拌脱色 3 min, 静止、过滤, 滤液冻干得五味子仁蛋白冻干样 I, II, III。

**2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳**<sup>[4]</sup> 低相对分子质量标准蛋白(1.2 g·L<sup>-1</sup>)、样品上样量(2.4 g·L<sup>-1</sup>)均为 20  $\mu$ L。分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%。浓缩胶电压为 70 mV, 分离胶电压 140 mV。

电泳结束后用考马斯亮蓝 R250 染色(甲醇-水-冰乙酸, 4.5:4.5:1), 最后用 7.5% 甲醇和 5% 冰乙酸的水溶液脱色至背景清晰。

**2.4 蛋白质含量测定** 精密称取牛血清白蛋白对照品, 配成 1.37 g·L<sup>-1</sup> 溶液。精密称取 3 种蛋白提取物, 配成 1.5 g·L<sup>-1</sup> 溶液。

按 Lowry 法对五味子仁蛋白提取物进行含量测定。分别精确量取白蛋白对照溶液 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加试剂甲 5 mL, 混匀, 室温放置 10 min, 快速加入试剂乙 0.5 mL, 混匀后室温放置 1 h, 以第 1 管为空白, 采用分光光度法于 765 nm 处测定其吸收度, 测量结果为 0.095, 0.170, 0.322, 0.462, 0.602。以蛋白质含量( $X$ ,  $\mu$ g)为横坐标, 吸收度( $Y$ )为纵坐标进行相关分析, 得回归方程  $Y = 0.7246X + 0.0259$  ( $r = 0.9998$ )。

量取上述蛋白样品溶液 1 mL, 计算蛋白含量。

### 2.5 氨基酸含量测定

**2.5.1 对照品混合溶液和供试品溶液的配制** 精密称取混合氨基酸对照品, 配成 312.5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 溶液。精密称取 3 种蛋白提取物, 配成溶液。各加入 6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 20 mL, 抽真空密封, 恒温 110 °C 水解 24 h, 放冷, 滤过。取 2 mL 棕色瓶, 分别加入上述水解样品 30  $\mu$ L, NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.0) 溶液 30  $\mu$ L, 1% FDNB 乙腈溶液 10  $\mu$ L<sup>[5]</sup>, 60 °C 水浴暗处放置 1 h, 加入 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.0) 溶液 1 mL, 摇匀, 经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 待 HPLC 分析。

**2.5.2 色谱条件** Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5  $\mu$ m), 流动相 A KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2, 0.04 mol·L<sup>-1</sup>)-B 乙腈-水(55:45), 线性梯度洗脱(0 ~ 4 min, 0% B; 4 ~ 10 min 14% B; 10 ~ 20 min, 40% B; 20 ~ 21 min, 80% B; 21 ~ 25 min, 100% B), 检测波长 360 nm, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C。

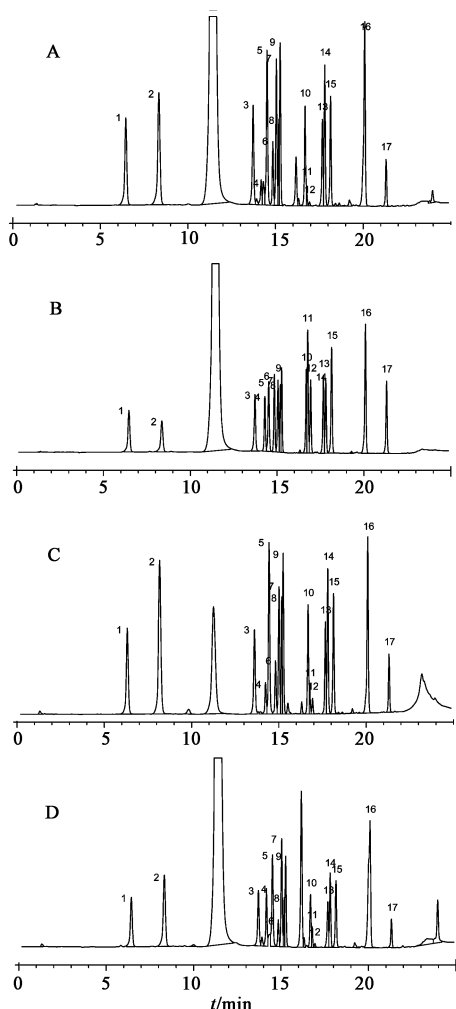
**2.5.3 含量测定** 分别取对照品溶液、供试品溶液各 10  $\mu$ L, 置进样器中, 以保留时间定性, 外标法定量, 测定样品中氨基酸含量。

## 3 结果

**3.1 蛋白的鉴定结果** 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对五味子蛋白 3 种提取方法进行比较, 结果 3 种提取方法所含蛋白基本一致, 但含量稍有区别。其所含蛋白主要分布在 43 × 10<sup>3</sup>, 20 × 10<sup>3</sup>, 14 × 10<sup>3</sup> 附近, 均未见含有相对分子质量较大的蛋白质。

**3.2 蛋白的含量测定** 运用 Lowry 法,对不同提取方法所得的五味子总蛋白进行了含量测定。脱脂硫酸铵沉降法、直接提取法、硫酸铵沉降法所得总蛋白质量分数分别为 58.44%,19.21%,26.18%。

**3.3 氨基酸含量测定** 氨基酸对照品溶液、3 种氨基酸供试液,HPLC、含量测定结果见图 1,表 1。



1. Asp;2. Glu;3. Ser;4. His;5. Arg;6. Gly;

7. Th;8. Pro;9. Ala;10. Val;11. Cys;12. Met;

13. Ile;14. Leu;15. Phe;16. Lys;17. Tyr

A. 17 种氨基酸对照品;B. 脱脂硫酸铵沉降法

所得五味子仁蛋白;C. 直接提取法所得五味子仁蛋白;

D. 三氯乙酸和丙酮制干粉提取法所得五味子仁蛋白

图 1 不同方法提取蛋白质的 HPLC

#### 4 讨论

本研究采用 3 种不同方法对五味子中总蛋白进行了提取,由氨基酸含量测定结果可推知,脱脂硫酸铵沉降法提取五味子蛋白优于其他方法。

五味子蛋白为植物蛋白,本实验室曾对人参蛋白及小飞蓬蛋白<sup>[6]</sup>等植物蛋白进行过研究。通过电

表 1 样品氨基酸含量测定

名称	脱脂硫酸铵		三氯乙酸和丙酮制干粉提取法
	沉降法	直接提取法	
Asp	4.50	1.17	2.04
Glu	12.58	2.55	3.96
Ser	2.64	0.87	1.30
His	1.73	1.28	0.67
Arg	7.10	1.79	2.87
Gly	0.89	0.20	0.46
Thr	3.02	1.35	1.77
Pro	3.33	0.57	0.95
Ala	2.83	0.75	1.32
Val	2.80	0.61	1.12
Cys	0.38	0.13	0.10
Met	0.50	0.06	0.06
Ile	2.63	0.64	1.10
Leu	4.20	1.00	1.84
Phe	2.85	0.80	1.22
Lys	3.15	1.12	1.54
Tyr	2.33	0.52	0.82
Total amino acids	57.46	15.41	23.14

泳比较所分离的蛋白发现,其蛋白谱带大概主要为 7 种,分别主要在  $66 \times 10^3$ ,  $43 \times 10^3$ ,  $30 \times 10^3$ ,  $20 \times 10^3$ ,  $14 \times 10^3$  附近,其中人参蛋白主要集中在  $43 \times 10^3$  附近,且在含有  $97 \times 10^3$  以上的大分子蛋白,而五味子蛋白除主要集中在  $43 \times 10^3$  附近外,在  $14 \times 10^3$  以下含有大量蛋白,这预示五味子蛋白含有相当一部分小分子蛋白,且有可能含有较多的多肽类成分。提示有必要对五味子多肽进行研究。

氨基酸分析表明,3 种提取方法所得蛋白的 Glu,Arg,Leu 含量均较高,且含有 6 种人体自身不能合成的必需氨基酸;其中脱脂硫酸铵沉降法中 3 种氨基酸约占总氨基酸含量一半,说明脱脂硫酸铵沉降法所获得蛋白中氨基酸含量明显有别与其他 2 种提法。同时结果表明脱脂硫酸铵沉降法中总蛋白提取物氨基酸含量最高,超过 50%。这与对 3 种不同提取方法所测定的蛋白含量结果相吻合。

通过与市场热销的美国捷星纽崔莱蛋白质粉相比较:美国捷星蛋白粉含 18 种氨基酸;五味子蛋白中含有 17 种氨基酸,且与纽崔莱蛋白粉成分相似度达 90% 以上,蛋白含量接近。因此,五味子蛋白作为功能性保健食品,具有一定开发价值。

#### [参考文献]

- [1] 林伟卓,陈玉海. 北五味子全氮及氨基酸含量测定[J]. 特产研究,1998,1:35.
- [2] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程[S]. 北京:化学工业出版社,2000:671.

· 资源与鉴定 ·

## 不同产地和来源冬凌草药材的质量评价

陈随清, 崔璨, 裴莉昕, 董诚明, 冯卫生

(河南中医学院, 郑州 450008)

**[摘要]** 目的:评价不同产地冬凌草药材的质量,为冬凌草的利用和开发提供科学依据。方法:采用高效液相色谱法对不同产地冬凌草中冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸的含量进行测定,按照《中国药典》2010年版附录中测定法对冬凌草中水溶性浸出物和醚溶性浸出物进行测定;综合分析评价各冬凌草样品间的差异。结果:不同产地、不同变异类型冬凌草中各种成分的含量有明显差异。冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸是造成不同地区冬凌草质量差异的主要因素,相比较而言醚溶性浸出物对冬凌草质量差异的影响要大于水溶性浸出物;而冬凌草变异类型的质量差异主要是由冬凌草甲素和乙素的含量变化造成的。结论:不同产地和不同变异类型来源的冬凌草在质量上有所不同,应用时应加以区别。

**[关键词]** 冬凌草; 不同产地; 变异类型; 质量评价

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0122-05

## Quality Evaluation of Rabdosiae Rubescentis Herba from Different Place and Origin

CHEN Sui-qing, CUI Can, PEI Li-xin, DONG Cheng-ming, FENG Wei-sheng

(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** The quality of Rabdosiae Rubescentis Herba from different place and origin was evaluated, to provide the scientific basis for the use and development. **Method:** The oridonin, ponicedin, and rosmarinic acid were determined by HPLC, The method of determining the content of water-soluble chemical composition and ether-soluble chemical composition was in line with Pharmacopeia Edition 2010. And the data of different samples was compared and analysed. **Result:** The content of chemical compositions in Rabdosiae Rubescentis Herba from different place and different variance-types has a significant difference. The oridonin, ponicedin, and rosmarinic acid are the main factors causing differences in the quality of Rabdosiae Rubescentis Herba from different places. By comparison, the impact on the quality of Rabdosiae Rubescentis Herba, ether-soluble chemical composition is greater than the water-soluble chemical composition. The difference of variance-types is caused by the content of oridonin and ponicedin. **Conclusion:** It's necessary to distinguish the place and variance-type of Rabdosiae Rubescentis Herba before using it.

**[收稿日期]** 20110223(001)

**[基金项目]** 科技部“十一五”科技支撑计划项目(2006BA106A15-3)

**[第一作者]** 陈随清, 教授, 博士, 研究方向: 中药品种整理及质量标准, Tel: 0371-65676686, E-mail: suiqingchen@sohu.com

[3] Petritis K, Elfakir C, Dreux M. A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids [J]. J Chromatogr A, 2002, 961(1):9.

[4] 严铭铭, 曲晓波, 钟英杰, 等. 梅花鹿鹿茸中促进海马神经细胞增殖蛋白的分离纯化[J]. 中草药, 2007, 38(8):1163.

[5] Morton R C, Gerber G E. Amino acid analysis by dinitrophenyl-ation and reverse-phase high-pressure liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1988, 170:220.

[6] 毕胜男, 严铭铭, 邵帅, 等. 飞蓬中植物蛋白质的提取与分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 18(12):1168.

[责任编辑 邹晓翠]