

蝉蜕蛋白的提取工艺优化及体外抗氧化活性研究^Δ

李 涛*,程雪娇,胡美变,刘玉杰,吴纯洁[#](成都中医药大学药学院,成都 611137)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0968-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.25

摘要 目的:优化蝉蜕蛋白的提取工艺,并考察其体外抗氧化活性,为蝉蜕蛋白的深入研究提供参考。方法:以蛋白提取量为响应值,在单因素试验基础上,采用Box-Behnken响应面法对超声波辅助提取蝉蜕蛋白的液料比、超声时间、提取次数等条件进行优化,并进行验证试验。以维生素C(VC)为阳性对照,以对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和2,2'-连氮基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)自由基的清除率为指标,评价蝉蜕蛋白的体外抗氧化活性。结果:蝉蜕蛋白的最佳提取条件为液料比28:1(mL/g),超声时间65 min,提取2次。验证试验中,蝉蜕蛋白的平均提取量为65.45 mg/g(RSD=1.68%, $n=3$),与预测值的相对误差为5.48%。蝉蜕蛋白对ABTS和DPPH自由基均有一定的清除效果,当蝉蜕蛋白质量浓度为0.2 mg/mL时对ABTS自由基的清除率即达97.0%,其作用与VC相当;蝉蜕蛋白对DPPH自由基的清除能力稍弱,半数清除浓度为0.96 mg/mL,其作用不及VC。结论:采用Box-Behnken响应面法优化蝉蜕蛋白的提取条件准确、可靠;蝉蜕蛋白具有一定的体外抗氧化活性。
关键词 蝉蜕蛋白;超声波辅助提取;工艺优化;Box-Behnken响应面法;体外抗氧化活性

Optimization of Extraction Technology of Protein from *Cryptotympana pustulata* and *in vitro* Antioxidant Activity Study

LI Tao, CHENG Xuejiao, HU Meibian, LIU Yujie, WU Chunjie (College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize extraction technology of protein from *Cryptotympana pustulata* and investigate its *in vitro* antioxidant activity, so as to provide reference for further research of protein from *C. pustulata*. METHODS: Using extraction amount of protein as response value, based on single factor test, Box-Behnken response surface methodology was used to optimize the ratio of liquid to material, ultrasonic time and extraction times. Validation test was conducted. Using Vitamin C (VC) as positive control, *in vitro* antioxidant activity of protein from *C. pustulata* was evaluated by using scavenging rate of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2, 2'-azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical as index. RESULTS: The optimal extraction condition of protein from *C. pustulata* was as follows as the ratio of liquid to material 28:1 (mL/g), ultrasonic time of 65 min, extracting for twice. In validation test, average extraction amount of protein from *C. pustulata* was 65.45 mg/g (RSD=1.68%, $n=3$), relative error of which to predicted value was 5.48%. The protein from *C. pustulata* showed strong scavenging effect on ABTS and DPPH free radicals. When the concentration of protein from *C. slough* was 0.2 mg/mL, and the scavenging rate of it to ABTS free radicals was 97%, the effect of which was similar to VC. The protein from *C. pustulata* showed weak scavenging ability to DPPH free radical, IC₅₀ was 0.96 mg/mL, the effect of which was not as good as VC. CONCLUSIONS: The extraction technology of protein from *C. pustulata* optimized by Box-Behnken response surface methodology shows high accuracy and good reliability. The protein from *C. pustulata* shows certain antioxidant activity *in vitro*.
KEYWORDS Protein from *Cryptotympana pustulata*; Ultrasonic assisted extraction; Technology optimization; Box-Behnken response surface methodology; Antioxidant activity *in vitro*

蝉蜕为蝉科昆虫黑蚱(*Cryptotympana pustulata* Fabricius)的若虫羽化时脱落的皮壳,味甘,性寒,入肺、肝经,具有疏散风热、明目退翳、利咽、解痉等功效^[1]。蝉蜕属于临床用量较大的动物药之一,已有两千多年的用药历史,其既可内服也可外用。现代药理研究表明,蝉蜕具有解热、祛痰平喘、抗惊厥、兴奋子宫平滑肌和改善血

液流变学等药理作用^[2-4],因其疗效确切且安全性较高,在儿科、神经科、五官科等均得到了广泛的应用,主要用于治疗小儿夜啼、小儿抽动症、咳嗽、肾炎、产后急性尿潴留等疾病^[5-6]。

动物药的主要化学成分是蛋白质、多肽和氨基酸,近年来许多学者对多种动物药的蛋白质展开研究,发现动物药的蛋白质具有多种药理作用,如抗氧化、抗凝血、抗肿瘤、降血糖和抗肝纤维化等^[7-11]。目前,关于蝉蜕的现代研究甚少,关于其研究多集中于氨基酸与微量元素方面,尚未见蝉蜕蛋白质(以下简称“蝉蜕蛋白”)提取条件优化及抗氧化活性的相关报道。因此,笔者拟通过超

Δ 基金项目:国家中药标准化项目(No.ZYB2H-Y-SC-41);中药饮片关键技术创新团队(No.16TD0014)
* 硕士研究生。研究方向:中药炮制与制剂。E-mail: 2418692118@qq.com
[#] 通信作者:研究员,博士。研究方向:中药炮制与制剂。电话: 028-61801001。E-mail:wcj-one@263.net

声波辅助提取蝉蜕蛋白,采用Box-Behnken响应面法优化其提取工艺,并对最优条件提取的蝉蜕蛋白进行体外抗氧化活性研究,为蝉蜕蛋白的深入研究提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

TU-1901双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);PHS-3C精密酸度计(上海雷磁仪器厂);DB-206SC电热鼓风恒温干燥箱(成都天宇试验设备有限责任公司)。

1.2 药材、药品与试剂

蝉蜕饮片购自成都岷江源药业股份有限公司(批号:20160810,产地:四川),经成都中医药大学卢先明教授鉴定为蝉科昆虫黑蚱的若虫羽化时脱落的皮壳;维生素C(VC,成都市科龙化工试剂厂,批号:2015121901,纯度: $>99.7\%$);牛血清白蛋白(上海伯奥生物科技有限公司,批号:090165,纯度: $>99.0\%$);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,美国Sigma公司,批号:D9132,纯度: $>97\%$);2,2'-连氮基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)(ABTS,上海美仑生物技术有限公司,批号:D1220A,纯度: $>99\%$);甲醇、乙醇、石油醚(沸点: $30\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)、氢氧化钠、盐酸、硫酸铜、酒石酸钾钠、过硫酸钾等试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 蛋白含量的测定

以牛血清白蛋白为对照品,采用福林酚法^[12]测定样品中蛋白含量。碱性铜试液的制备:分别称取碳酸钠10 g、氢氧化钠2 g和酒石酸钾钠0.25 g,溶于500 mL水中,作为A液;再称取硫酸铜0.5 g,溶于100 mL水中,作为B液;将A液与B液按50:1的体积比混匀,即得。

2.1.1 标准曲线的绘制 取牛血清白蛋白15.0 mg,精密称定,置于25 mL量瓶中,加水定容至刻度,即得0.6 mg/mL的牛血清白蛋白对照品溶液。分别精密量取上述对照品溶液0.1、2、3、4、5 mL至5 mL的量瓶中,加水定容至刻度,即得不同质量浓度(0.00、0.12、0.24、0.36、0.48、0.60 mg/mL)的对照品溶液。精密量取各质量浓度的对照品溶液1.0 mL,分别置于具塞试管中,分别加入碱性铜试液5.0 mL,摇匀,室温静置10 min后,向各试管中加入福林酚试液(取2 mol/L福林酚试剂1 mL,加水至2 mL)0.5 mL,立即混匀,室温放置30 min,采用紫外-可见分光光度计于650 nm波长处测定吸光度。以牛血清白蛋白质量浓度为横坐标(x , mg/mL)、吸光度为纵坐标(y)绘制标准曲线,得标准曲线方程为 $y=1.011\ 1x+0.061\ 9$ ($r^2=0.999\ 8$),表明牛血清白蛋白检测质量浓度线性范围为0.12~0.60 mg/mL。

2.1.2 样品中蛋白含量的测定 取蝉蜕适量,置于40℃烘箱中烘干,粉碎过三号筛,室温条件下按6:1(V/m , mL/g)的液料比加入石油醚脱脂3次,每次1 h。脱脂后挥干石油醚,40℃干燥,即得蝉蜕脱脂粉末。精密称取蝉蜕脱脂粉末2 g,置于锥形瓶中,按一定液料比加入

75%乙醇,然后用氢氧化钠调节溶液pH至10,超声提取(超声功率为200 W,频率为40 kHz)一定的时间和次数,提取液滤过,滤液置于250 mL量瓶中,加水定容至刻度,按照“2.1.1”项下操作,测定样品溶液的吸光度并计算蛋白含量。

2.1.3 精密度的试验 精密量取“2.1.1”项下质量浓度为0.36 mg/mL的对照品溶液1.0 mL,按“2.1.1”项下方法测定其吸光度,并计算样品中蛋白的含量,平行测定6次。结果,蛋白含量的RSD为1.87%($n=6$),表明仪器精密度的良好。

2.1.4 重复性试验 精密称取蝉蜕脱脂粉末6份,每份2 g,根据得到的最优工艺条件按“2.1.2”项下方法进行提取,按“2.1.1”项下方法测定其吸光度,并计算样品中蛋白的含量。结果,样品中蛋白含量的RSD为1.45%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.1.5 稳定性试验 精密称取蝉蜕脱脂粉末2 g,根据得到的最优工艺条件按“2.1.2”项下方法进行操作,依法加入碱性铜和福林酚试液后摇匀,按“2.1.1”项下方法测定分别放置30、40、45、50、55、60 min时样品的吸光度,并计算样品中蛋白的含量。结果,样品中蛋白含量的RSD为1.65%($n=6$),表明该法在显色后60 min内稳定性良好。

2.1.6 准确度试验 精密称取6份已测定蛋白含量的蝉蜕脱脂粉末(含蛋白130.10 mg),加入等量的牛血清白蛋白,稀释至适宜浓度,根据得到的最优工艺条件按“2.1.1”项下方法操作并测定样品的吸光度,并计算样品中蛋白的含量。结果,蝉蜕蛋白的平均加样回收率为99.4%,RSD为2.35%($n=6$),表明该方法准确度较高。

2.2 单因素试验优化蝉蜕蛋白的提取工艺

蝉蜕蛋白的提取量受多种因素的影响,蛋白含有可解离的氨基和羧基,pH会影响解离基团的解离、改变蛋白所带电荷,从而影响蛋白的溶解性^[13]。查阅大量文献发现,液料比、提取时间、提取次数是影响蛋白提取率的关键因素^[14-17]。故本研究选样品溶液pH、液料比、超声时间、提取次数为因素,考察其对蝉蜕蛋白提取量的影响。

2.2.1 样品溶液pH对蝉蜕蛋白提取量的影响 精密称取蝉蜕脱脂粉末2 g,置于锥形瓶中,加入15倍量75%乙醇,用氢氧化钠分别调样品溶液pH至7、8、9、10、11,室温超声提取2次,每次60 min。提取液滤过,合并滤液,加水定容至250 mL,按照“2.1.1”项下操作,测定样品吸光度并计算其中蛋白含量,结果见图1A。

由图1A可知,蝉蜕蛋白提取量随样品溶液pH的增大而增大,当样品溶液pH小于10时,随着溶液pH的增大蝉蜕蛋白提取量变化较快,当样品溶液pH大于10时,变化趋于平缓,考虑到强碱可能会导致蝉蜕蛋白结构破坏,从而引起蛋白变性失活,因此本研究将蝉蜕蛋白提取液的pH固定为10。

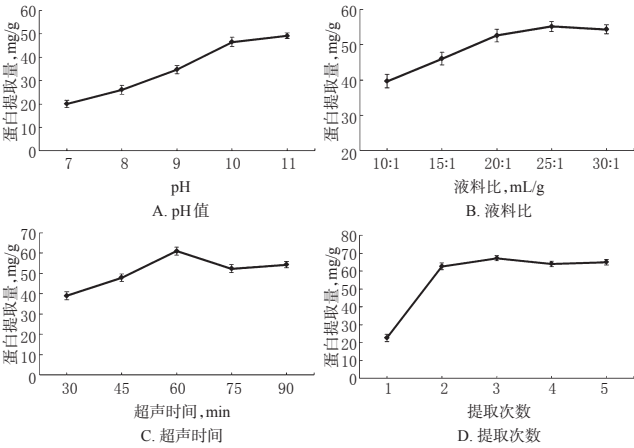


图1 单因素试验结果

Fig 1 Result of single factor tests

2.2.2 液料比对蝉蜕蛋白提取量的影响 精密称取蝉蜕脱脂粉末 2 g,置于锥形瓶中,分别按 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 (V/m , mL/g)的液料比加入相应量的 75%乙醇,用氢氧化钠调溶液 pH 至 10,室温超声提取 60 min,提取 2 次,滤过,合并 2 次提取液;将提取液加水定容至 250 mL,按照“2.1.1”项下操作测定样品溶液吸光度并计算其中蛋白含量,结果见图 1B。

由图 1B 可知,蝉蜕蛋白的提取量随着液料比的增加而增大,当液料比达到 25:1 时,提取量达到最大,此后继续增加液料比,蛋白提取量变化比较缓慢。故选择液料比 25:1 作为响应面分析液料比因素的中心点。

2.2.3 超声时间对蝉蜕蛋白提取量的影响 精密称取蝉蜕脱脂粉末 2 g,置于锥形瓶中,加入 25 倍量的 75%乙醇,用氢氧化钠调溶液 pH 至 10,分别于室温条件下超声提取 30、45、60、75、90 min,提取 2 次,滤过,合并滤液,加水定容至 250 mL,按照“2.1.1”项下操作测定样品溶液吸光度并计算其中蛋白含量,结果见图 1C。

由图 1C 可知,超声时间少于 60 min 时,蝉蜕蛋白提取量随着超声时间的延长而增加;超声时间为 60 min 时,蛋白提取量最大,继续延长超声时间,蛋白提取量有降低的趋势,这可能是由于超声时间过长,蛋白发生降解造成的。故选择超声时间 60 min 作为响应面分析超声时间因素的中心点。

2.2.4 提取次数对蝉蜕蛋白提取量的影响 精密称取蝉蜕脱脂粉末 2 g,置于锥形瓶中,加入 25 倍量 75%乙醇,用氢氧化钠调溶液 pH 至 10,室温超声提取 60 min,分别提取 1、2、3、4、5 次,提取液滤过,合并滤液,加水定容至 250 mL。按照“2.1.1”项下操作测定样品溶液吸光度并计算其中蛋白含量,结果见图 1D。

由图 1D 可知,提取 1 次时蝉蜕蛋白不能被很好地提取出来,提取次数超过 2 次时,随着提取次数的增加,蛋白提取量略有提高,但变化较缓慢。故选择提取次数为 2 次作为响应面分析提取次数因素的中心点。

2.3 Box-Behnken 响应面法优化蝉蜕蛋白的提取工艺 结合单因素试验结果,最终选择液料比(X_1)、超声

时间(X_2)、提取次数(X_3)为因素,以蝉蜕蛋白提取量(Y)为响应值,进行 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 试验设计,以优化蝉蜕蛋白的提取工艺,总共设计了 17 组试验点,因素与水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

表 1 因素与水平表

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	X_1 (液料比),mL/g	X_2 (提取时间),min	X_3 (提取次数)
1	20:1	45	1
0	25:1	60	2
1	30:1	75	3

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果

Tab 2 Design and results of Box-Behnken test

试验号	因素			Y ,mg/g
	X_1	X_2	X_3	
1	0	0	0	65.04
2	0	0	0	65.61
3	0	1	1	56.81
4	-1	1	0	49.26
5	0	1	-1	35.43
6	0	0	0	65.27
7	0	0	0	63.89
8	1	0	0	60.46
9	0	0	1	41.89
10	1	0	-1	37.83
11	-1	0	1	44.12
12	1	-1	0	39.09
13	0	1	1	24.66
14	0	0	0	64.69
15	1	0	-1	33.03
16	1	-1	0	45.26
17	1	0	1	61.95

采用 Design-Expert 8.0.5 软件对表 2 中的数据进行分析,得到超声辅助提取蝉蜕蛋白的二次回归方程为 $Y=64.90+5.00X_1+6.38X_2+9.23X_3+1.26X_1X_2+3.26X_1X_3+1.04X_2X_3-5.92X_1^2-10.46X_2^2-14.74X_3^2$,方差分析结果见表 3。

表 3 方差分析结果

Tab 3 Analysis result of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	2 935.52	9	326.17	343.80	<0.000 1
X_1	200.00	1	200.00	210.81	<0.000 1
X_2	325.89	1	325.89	343.50	<0.000 1
X_3	681.17	1	681.17	717.99	<0.000 1
X_1X_2	6.33	1	6.33	6.67	0.036 4
X_1X_3	42.45	1	42.45	44.74	0.000 3
X_2X_3	4.31	1	4.31	4.54	0.070 6
X_1^2	147.75	1	147.75	155.74	<0.000 1
X_2^2	460.57	1	460.57	485.46	<0.000 1
X_3^2	915.28	1	915.28	964.75	<0.000 1
残差	6.64	7	0.95		
失拟项	4.92	3	1.64	3.80	0.114 9
纯误差	1.72	4	0.43		
总和	2 942.16	16			
$R^2=0.994 8$		$R_{adj}^2=0.972 3$			

由表 3 可知,本研究所选模型的 $P<0.000 1$,表明该模型具有显著性;同时,失拟项的 $P=0.114 9>0.05$,不

具有显著性,表明模型无误,模型拟合度较好; $R^2=0.994\ 8$, $R_{adj}^2=0.972\ 3$ 说明该模型可以解释97.23%的数据。综上所述,该模型具有较好的准确性和可靠性,可用于超声辅助提取蝉蜕蛋白量的预测和分析。方差分析结果表明,液料比、超声时间和提取次数对蝉蜕蛋白提取量均具有显著影响,影响大小为提取次数>提取时间>液料比,且液料比、提取次数和液料比、超声时间的交互作用及二次项对蝉蜕蛋白提取量均具有显著影响。

2.4 响应面分析

将一个因素固定在零水平,通过对表2的数据进行响应曲面分析,考察另两个交互因素对蝉蜕蛋白提取量的影响,结果见图2。

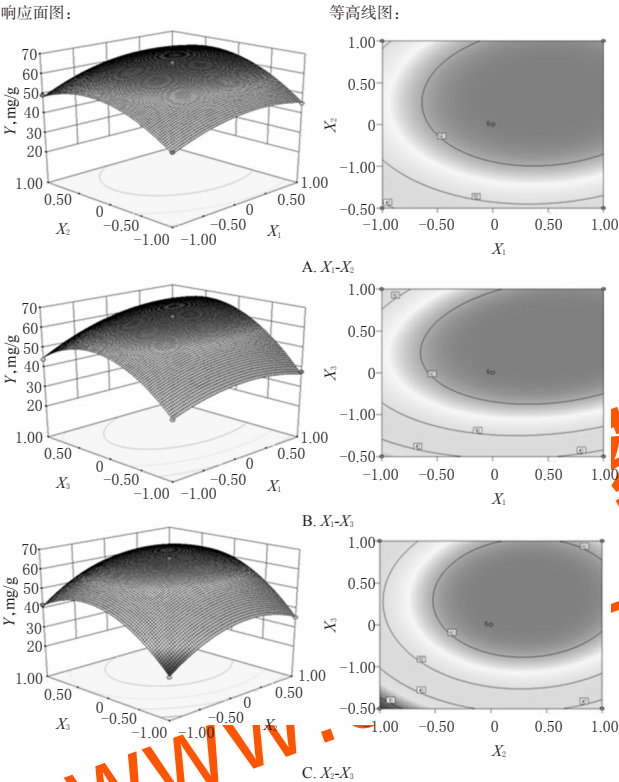


图2 各因素对蝉蜕蛋白提取量影响的响应面图和等高线图

Fig 2 Response surface plot and contour map of the effects of each factor on the amount of protein from *C. pustulata*

由图2可知,液料比和超声时间对蝉蜕蛋白提取量有影响,固定液料比不变,随着超声时间的延长蝉蜕蛋白提取量先增加后降低;固定超声时间不变,蝉蜕蛋白提取量随液料比的增加而提高,且超声时间对蝉蜕蛋白提取量的影响较大。液料比和提取次数交互作用的等高线图较椭圆,表明其对蝉蜕蛋白提取量具显著影响,曲线的左侧较右侧陡峭,表明提取次数影响较大。超声时间与提取次数的交互作用等高线图较圆,说明其影响不显著。得到蝉蜕蛋白的最优提取工艺为液料比27.84:1(mL/g)、提取时间65.38 min、提取次数2.39次,此时蝉蜕蛋白提取量为69.25 mg/g。

2.5 验证试验

考虑到实际的可操作性,将上述得到的最优工艺条件进行了修正,最终确定蝉蜕蛋白的提取条件为:取样量2 g,液料比(28:1, V/m , mL/g),超声时间65 min,提取2次。以修正后的条件进行验证试验,平行3次,最终得到的蝉蜕蛋白提取量为65.45 mg/g($RSD=1.68\%$, $n=3$),与预测值(69.25 mg/g)的相对误差为5.48%,表明该模型准确可靠^[18-19]。

2.6 蝉蜕蛋白的体外抗氧化活性研究

将最优条件下提取获得的提取液用盐酸调pH至蝉蜕蛋白的等电点($pH=5.8$),然后以离心半径为9.5 cm、5 000 r/min离心10 min,纯净水洗涤沉淀2次,合并洗液,调溶液pH至中性,置于透析袋中,4℃透析48 h,冷冻干燥,纯净水复溶至所需质量浓度,对其进行体外抗氧化活性研究。

2.6.1 DPPH自由基清除能力测定 参照文献[20]方法,分别取2 mL不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)的蝉蜕蛋白溶液和VC溶液于具塞刻度试管中,再分别加入2 mL DPPH溶液(用无水乙醇稀释制备成0.2 mmol/L),混合均匀,避光条件下室温反应30 min,于517 nm波长处测定溶液的吸光度,每个样品重复试验3次,取平均值,并计算DPPH自由基清除率: $DPPH\ 自由基清除率 = [1 - (A_s - A_0)/A_c] \times 100\%$,其中, A_s 为样品与DPPH混合液的吸光度, A_0 为样品与无水乙醇混合液的吸光度, A_c 为纯净水与DPPH混合液的吸光度,结果见表4。

表4 蝉蜕蛋白对DPPH和ABTS自由基的清除活性考察结果

Tab 4 Determination results of scavenging ability of protein form *C. pustulata* to DPPH and ABTS free radicals

质量浓度,mg/mL	DPPH自由基清除率,%		ABTS自由基清除率,%	
	蝉蜕蛋白	VC	蝉蜕蛋白	VC
0.2	30.2	94.1	97.0	98.9
0.4	38.1	95.4	97.8	99.2
0.6	43.2	96.4	98.1	99.4
0.8	47.5	96.9	98.4	99.5
1.0	51.0	98.7	98.6	99.4

由表4可知,蝉蜕蛋白对DPPH自由基具有一定的清除活性,但与活性较强的VC相比,其对DPPH自由基清除能力较弱。在质量浓度为0.2~1.0 mg/mL范围内,蝉蜕蛋白对DPPH自由基清除率随着蛋白浓度升高而增强,其半数清除浓度(IC_{50})为0.96 mg/mL。

2.6.2 ABTS自由基清除能力测定 参照文献方法^[21],制备7 mmol/L的ABTS溶液和2.45 mmol/L的过硫酸钾溶液,将两溶液等体积混合,室温、避光条件下反应过夜,作为母液。吸取1 mL的母液,用45 mL的甲醇稀释至在734 nm波长处的吸光度为 0.7 ± 0.005 ,即为ABTS的工作液。分别取2 mL的蝉蜕蛋白溶液和VC溶液(质量浓度均分别为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)于具塞刻度试管中,再加入4 mL的ABTS工作液,避光反应6

min, 734 nm 波长处测吸光度, 每个样品重复试验 3 次, 取平均值, 并计算其对 ABTS 自由基的清除率: $\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_s - A_0)/A_c] \times 100\%$, 其中, A_s 为样品与 ABTS 混合液的吸光度, A_0 为样品与甲醇混合液的吸光度, A_c 为纯净水与 ABTS 混合液的吸光度, 结果见表 4。

由表 4 可知, 蝉蜕蛋白与 VC 对 ABTS 自由基均具有较强的清除活性。在质量浓度为 0.2 mg/mL 时, 蝉蜕蛋白对 ABTS⁺ 自由基清除率即达 97.0%, 其作用与 VC 相当。

3 讨论

笔者在前期试验中考察了提取溶剂和提取方法对蝉蜕蛋白提取量的影响, 分别以水和不同浓度的乙醇作为提取溶剂, 结果以 75% 乙醇作为提取溶剂时蛋白提取量较高, 且超声辅助提取较浸提法提取得率高、提取时间短, 故本研究以 75% 乙醇作为提取溶剂, 采用超声辅助提取法提取蝉蜕蛋白。在超声提取过程中, 随着超声时间的延长, 超声温度会逐渐升高, 易使蛋白受热变性^[22], 为控制超声温度, 笔者每隔 15 min 更换 1 次超声提取器里的水以使其保持常温, 从而减少对提取蛋白的破坏。试验过程中, 用盐酸调节蝉蜕蛋白提取液的 pH 值使蛋白沉淀, 通过称量沉淀物的质量确定蝉蜕蛋白的等电点 (质量最大时对应的 pH 值) 为 5.8。通过研究福林酚法、考马斯亮蓝法和二喹啉甲酸法测定蝉蜕蛋白含量的差异, 发现福林酚法测定结果准确, 且有文献报道对于多肽含量较高的蛋白质含量的测定, 选择福林酚法测定较准确^[23], 故本研究选择福林酚法测定蝉蜕蛋白的含量。

本研究选择液料比、超声时间、提取次数为考察因素, 在单因素试验的基础上, 进行 Box-Behnken 响应面设计, 优选出蝉蜕蛋白的提取工艺。通过方差分析和验证试验表明, 此模型准确可靠。液料比、超声时间和提取次数对蝉蜕蛋白提取量有显著性影响, 且影响大小为提取次数 > 超声时间 > 液料比。通过响应面法优选, 结合实际情况确定了最优提取条件: 液料比为 28:1, 超声时间 65 min, 提取 2 次, 此条件下进行 3 次验证试验, 结果蝉蜕蛋白提取量为 65.45 mg/g, 与二次方程预测值接近。

动物药为“血肉有情之品”, 其因疗效显著、安全性高获得广大学者的关注, 本结果表明, 最优条件下提取的蝉蜕蛋白具有较好的抗氧化活性, 这可为天然抗氧化剂的开发提供研究基础。然而, 本研究仅进行了体外抗氧化活性研究, 故将在后续研究中需对其进行体内抗氧化活性研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 369.
- [2] 杨璐, 李国玉, 王金辉. 蝉蜕化学成分和药理作用的研究现状[J]. 农垦医学, 2011, 33(2): 184-186.
- [3] 安磊. 蝉蜕的抗惊厥作用[J]. 中国医药导报, 2008, 5(15): 35-36.

- [4] 高长久, 张梦琪, 曹静, 等. 蝉蜕的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医药学报, 2015, 43(2): 110-112.
- [5] 曹唯仪, 杜清华, 赵韶华, 等. 蝉蜕不同提取工艺抗凝与纤溶活性比较研究[J]. 中医药信息, 2012, 29(6): 45-48.
- [6] 张驰, 杨屈. 蝉蜕的药理作用及临床应用研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(11): 194-195.
- [7] 徐新丽. 壁虎多肽的制备及其抗肿瘤机制研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2014.
- [8] 张丹, 孙玉红, 李茂, 等. 美洲大蠊多肽提取物对荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(6): 681-686.
- [9] 张海娜. 蚕蛹活性多肽的制备及降血压、降血糖活性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [10] 刘春娟. 不同分子量鹿茸多肽抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(13): 53-56.
- [11] 李春艳, 陈衍杰, 李树楠, 等. 美洲大蠊提取物含药血清体外抗肝纤维化的实验研究[J]. 中药材, 2013, 36(5): 707-711.
- [12] 徐志伟, 才凤, 李洪江, 等. 正交试验优化麝香中多肽类成分的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 23-25.
- [13] 李冬梅, 张锦茹, 田同. 蛋白质沉淀分离[J]. 粮食与油脂, 2007(7): 9-11.
- [14] 惠入杰, 冯静, 蔺黔鑫, 等. 多指标-正交试验优化沙棘叶和沙棘籽中黄酮的提取工艺[J]. 中国药房, 2017, 28(34): 4856-4859.
- [15] 赵昱玮, 南敏伦, 丁森, 等. Box-Behnken 响应面法优化紫穗槐根中总黄酮提取工艺[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1177-1179.
- [16] 廖红丹. 响应面法优化茯苓苦瓜胶囊粗多糖和总皂苷的综合提取工艺[J]. 中国药房, 2016, 27(1): 92-95.
- [17] 孙天霞, 尹翌秋, 张鹏飞, 等. 响应面法优化莲子蛋白提取工艺研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(2): 250-255.
- [18] 常星洁, 刘汉清, 邹建荣, 等. 响应面法优化女贞子有效成分的提取工艺[J]. 中成药, 2012, 34(5): 839-842.
- [19] 刘艳清, 汪洪武, 蔡璇, 等. 响应面法优化栀子总黄酮提取工艺研究[J]. 中药材, 2014, 37(2): 333-337.
- [20] ZENG PY, WU JG, LIAO LM, et al. In vitro antioxidant activities of endophytic fungi isolated from the liverwort *Scapania verrucosa*[J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10(10): 3169-3179.
- [21] JIN L, GUAN X, LIU W, et al. Characterization and antioxidant activity of a polysaccharide extracted from *Sarcandra glabra*[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(1): 524-532.
- [22] 杨慧, 王赵改, 陈丽娟, 等. 香椿籽蛋白质超声波辅助提取工艺及其功能性质比较[J]. 河南农业科学, 2016, 45(1): 147-151.
- [23] 闫萍, 牛勃, 张悦红, 等. 蚯蚓提取物中蛋白质含量测定方法的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 27-29.

(收稿日期: 2017-10-24 修回日期: 2018-01-17)

(编辑: 林 静)