

正交试验优选板蓝根多肽的提取工艺^Δ

南楠^{1,2*},刘西京^{1#},侯安国²(1.深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院,广东深圳 518055;2.云南中医药大学中药学院,昆明 650500)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)11-1009-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.11.17

摘要 目的:优选板蓝根多肽的提取工艺。方法:以溶剂种类、提取时间、溶剂用量为考察因素,以凯氏定氮法和二喹啉甲酸法测定多肽得率,并以此为评价指标,采用正交试验优选提取工艺。结果:在室温下,板蓝根多肽的最佳提取工艺为用15倍量的超纯水浸泡24 h,该条件下,收率可达70%。结论:所选工艺合理、简便,可用于提取板蓝根中多肽。

关键词 板蓝根;多肽;正交试验

Optimization of Extraction Technology of Total Peptides from *Isatis indigotica* by Orthogonal Test

NAN Nan^{1,2}, LIU Xi-jing¹, HOU An-guo²(1.School of Applied Chemistry&Biological Technology, Shenzhen Polytechnic, Guangdong Shenzhen 518055, China; 2.College of TCM, Yunnan College of TCM, Kunming 650500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize extraction technology of total peptides from *Isatis indigotica*. METHODS: With type and amount of solvent, extraction time as indexes, orthogonal test was performed to optimize the extraction technology using the yield of peptides determined by Kjeldahl determination and BCA as index. RESULTS: The optimum extraction technology was soaking in 15-fold hyperpure water for 24 h; the yield of peptides was 70%. CONCLUSIONS: The optimum condition is reasonable and easy, and can be used for the extraction of peptides from *I. indigotica*.

KEYWORDS *Isatis indigotica*; Peptides; Orthogonal experiment

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根,具有清热解毒、凉血利咽之功效^[1]。长期以来,研究人员对板蓝根的药效物质基础进行了大量的研究,部分研究认为板蓝根中的游离氨基酸是有效成分^[2-3]。2010年版《中国药典》(一部)也对板蓝根中游离氨基酸进行了定性鉴别^[4]。笔者在研究中发现,板蓝根中多肽含量较高,经人工胃肠液消化后,通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法检测发现,板蓝根多肽被降解成小分子多肽,而不是降解成游离氨基酸。整体药理试验也表明,板蓝根多肽有抗流感病毒的作用(另文发表),因此多肽可能为板蓝根的主要物质基础之一,故有必要对板蓝根多肽的提取工艺进行优化。笔者采用正交试验,以新版国家标准凯氏定氮法和2,2'-联喹啉-4,4'-二甲酸二钠盐(BCA)法测定多肽含量,考察提取溶剂、提取时间、溶剂用量对多肽提取的影响,并对这两种测定方法进行比较。

1 材料

1.1 仪器

KDN-04A型半自动凯氏定氮仪(上海贝特仪器设备厂);Multiskan spectrum全波长酶标仪(美国Thermo公司);96孔板(美国康宁公司);MF1-A10超纯水机(美国Millipore公司);5180R高速离心机(德国Eppendorf公司)。

^Δ 基金项目:广东省自然科学基金自由申请项目(No.S2011010004460);深圳市战略性新兴产业发展专项资金项目(No.JCYJ20120617141750876);深圳职业技术学院校级青年创新项目

* 硕士研究生。研究方向:中药分析、中药药剂。E-mail: nn6050207@163.com

通信作者:高级工程师,博士。研究方向:中药化学及活性。电话:0755-26019310。E-mail:liuxijing@szpt.edu.cn

1.2 药材

板蓝根,2011年10月购自甘肃,经湖南省中医研究院刘春海副研究员鉴定为真品。

1.3 试剂

BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型,碧云天生物技术研究所);其他化学试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材的提取

板蓝根药材适当粉碎,过40目筛,称取50 g,按试验安排在常温下进行浸取。用纱布粗滤,以离心半径为8 cm,6 000 r/min离心10 min,取上清液。平行试验2次。

2.2 板蓝根多肽的含量测定

2.2.1 凯氏定氮法 按国家标准GB 5009.5-2010版凯氏定氮法,精密吸取上清液10 ml,依法测定板蓝根浸提液中多肽含量,计算多肽得率(多肽得率=提取的多肽质量/板蓝根质量×100%)。

2.2.2 BCA法 别精密吸取1、2、4、8、12、20 μl的1 mg/ml牛血清白蛋白(BSA)标液,加于96孔板中,加水补足20 μl,各孔加入200 μl BCA工作液,放入酶标仪中,在562 nm波长下检测。设定程序如下:振荡30 s,在37℃下孵育15 min。以BSA质量浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=0.010x+0.146$ ($r=0.9989$)。结果表明,BSA质量浓度在0~90.909 μg/ml范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.2.3 样品含量测定 精密吸取上清液40 μl,加超纯水于1 ml量瓶中,吸取20 μl加入96孔板中,然后加入200 μl BCA工作液,按“2.2.1”、“2.2.2”项下方法测定。

2.3 正交试验优选工艺

根据预试验和笔者经验,选取溶剂种类(A)、提取时间(B)、溶剂用量(C)为考察因素,以多肽得率为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。因素与水平见表1;正交试验结果见表2;方差分析结果见表3。

表1 因素与水平
Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A	B,h	C,倍
1	超纯水	6	8
2	磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L,pH8.0)	12	10
3	磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L,pH6.0)	24	15

表2 正交试验结果
Tab 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D(空白)	多肽得率,%	
					凯氏定氮法	BCA法
1	1	1	1	1	8.44	6.53
2	1	2	2	2	10.14	6.36
3	1	3	3	3	10.34	6.66
4	2	1	2	3	7.48	4.90
5	2	2	3	1	8.74	5.18
6	2	3	1	2	8.73	4.88
7	3	1	3	2	8.09	6.53
8	3	2	1	3	8.51	6.32
9	3	3	2	1	9.14	5.63
凯氏定氮法	K_1	28.92	24.015	26.307	26.319	
	K_2	24.95	27.389	26.133	26.958	
	K_3	25.75	28.215	27.179	26.342	
	R	3.96	4.200	1.040	0.640	
BCA法	K_1	19.55	17.960	17.040	17.340	
	K_2	14.96	17.860	17.580	17.770	
	K_3	18.48	17.170	18.370	17.880	
	R	4.59	0.790	1.330	0.540	

表3 方差分析结果
Tab 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P	
凯氏定氮法	A	2.94	2	1.47	32.55	<0.05
	B	3.30	2	1.65	36.52	<0.05
	C	0.39	2	0.20	4.37	
	D(误差)	0.09	2	0.05	1.00	
BCA法	A	3.84	2	1.92	70.82	<0.05
	B	0.12	2	0.06	2.27	
	C	0.37	2	0.18	6.77	
	D(误差)	0.05	2	0.03	1.00	

注: $F_{0.01}(2,2)=99.00, F_{0.05}(2,2)=19.00$

note: $F_{0.01}(2,2)=99.00, F_{0.05}(2,2)=19.00$

由表2、表3可知,采用凯氏定氮法测定时,各因素对多肽得率的影响顺序为 $B>A>C$,因素A、B对多肽得率的影响有统计学意义($P<0.05$),最佳提取工艺为 $A_1B_3C_3$,即用15倍量超纯水浸泡24 h。采用BCA法测定时,各因素对多肽得率的影响顺序为 $A>C>B$,其中因素A对多肽得率的影响有统计学意义($P<0.05$),最佳提取条件为 $A_1B_1C_3$,即用15倍量超纯水浸泡6 h。考虑到在BCA法中B对结果的影响最小,而在凯氏定氮法中B对结果有较大影响,综合考虑,选取最佳提取工艺为 $A_1B_3C_3$,即用15倍量超纯水浸泡24 h。

2.4 工艺验证试验

取5 000 g板蓝根药材粗粉,共3份,按上述优选的工艺进

行提取,照凯氏定氮法和BCA法测定多肽得率。结果,多肽得率分别为10.58%和6.32%,收率可达70%以上,表明所选工艺稳定、可行,可用于板蓝根中多肽的提取。

3 讨论

蛋白或多肽的测定方法有多种,又各有优缺点^[5-9],如紫外吸收法操作简便快速,但准确度较差;Folin-酚试剂法灵敏度高,对蛋白质和分子质量较小的多肽具有同样的显色反应,但干扰物较多,检出的蛋白含量往往偏高;考马斯亮蓝法灵敏度高,但标准蛋白质选择困难,且对于大量多肽成分存在的溶液不宜用;双缩脲法灵敏度较低,需要的样品量大;凯氏定氮法是测定蛋白或多肽最经典的方法,但本法耗时较长,且含氮的非蛋白质化合物、游离氨基酸等干扰物在样品中普遍存在;BCA法灵敏度高,对于溶液中低含量的多肽也可检出,且干扰物质少。

笔者根据板蓝根的特性,选择凯氏定氮法与BCA法同时测定蛋白质含量,相互验证,以求结果的准确、科学。从试验结果可以看出,两种方法测得的多肽得率相近,凯氏定氮法结果稍偏高,原因是板蓝根浸提液里除了蛋白质和多肽外,还含有许多含氮化合物,如生物碱、核苷类、游离氨基酸类等,换言之,凯氏定氮法的结果是多肽、生物碱、核苷类、游离氨基酸的总和,故测量值偏高。BCA法灵敏度高,干扰少,测定结果相对较准确。两种方法的测定结果差距不大,也说明了在提取液中多肽的含量较高。笔者所在课题组已证实多肽有一定的抗流感病毒作用,因此其在板蓝根“清热解毒”中的作用不应忽视。

一般来说,碱性蛋白或肽采用酸性缓冲溶液提取,酸性蛋白或肽采用碱性缓冲液提取。试验中因不能确定板蓝根中肽的等电点,因此在正交试验设计中采用pH8.0和pH6.0的磷酸盐缓冲液进行提取,测量酸碱两性缓冲溶液和超纯水对总蛋白提取效率的影响。结果显示,无论凯氏定氮法还是BCA法, K_2A 结果较 K_3A 均偏低,说明偏碱性缓冲液比偏酸性缓冲液提取的多肽得率低,推测板蓝根酸性蛋白或肽含量可能低于碱性蛋白或肽。

参考文献

- [1] 孙东东,何立巍,李祥,等.板蓝根化学成分研究[J].中国药房,2007,18(3):172.
- [2] 陈凯,窦月,孟凡刚,等.板蓝根抗炎作用有效部位初步筛选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):200.
- [3] 孙秀霞,张丽莉,孙翠兰.板蓝根抗病毒有效部位研究[J].中国药理学通报,2007,23(6):835.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:191.
- [5] 邵泓,吕晶,陈钢.蛋白质含量测定方法的规范化研究[J].中国药品标准,2011,12(2):135.
- [6] 焦春香,张成桂,刘光明,等.心脉隆注射液中多肽限量检测方法的建立[J].时珍国医国药,2010,23(2):3 127.
- [7] 闫萍,杨琦,于惠珍,等.改良Lowry法和Bradford法测定蚯蚓提取物中蛋白质含量的比较[J].山西医科大学学报,2006,37(1):9.
- [8] 付玉梅,许锦珍,廖群,等.Lowry法测定寡肽的研究[J].药物分析杂志,2011,31(4):739.
- [9] 张云楚,纪宇.双辛可宁酸法测定胎盘多肽注射液中低浓度多肽的含量[J].中国生化药物杂志,2010,31(6):402.

(收稿日期:2013-05-09 修回日期:2013-07-03)