

鳖甲炮制前后肽类含量比较

韩秋俊¹, 毕葳², 王伟¹, 李取胜¹, 王鹏龙¹, 徐士勋¹, 王艳慧¹,
绪扩¹, 汪林¹, 程亚涛¹, 李强¹, 雷海民^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立双缩脲反应-酶联免疫检测仪对肽类的快速定量方法,测定鳖甲炮制前后肽类含量差异,探讨鳖甲炮制科学性。方法:应用 0.02 g·mL⁻¹酒石酸钠钾 50 μL,5% 氢氧化钠 20 μL,0.5% 硫酸铜 50 μL 的双缩脲显色剂测定鳖甲炮制前后肽类含量,检测波长 580 nm。结果:鳖甲七肽在 0.10~5.00 g·L⁻¹与吸光度呈良好的线性关系,醋鳖甲平均总肽含量为 6.99%,生鳖甲平均总肽含量为 1.04%。结论:醋鳖甲总肽含量明显高于生鳖甲总肽含量,醋制法可提高鳖甲有效成分溶出度。

[关键词] 鳖甲;寡肽;双缩脲反应-酶联免疫检测仪;含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0086-03

Comparative on Peptide Content in Pre-and-Post-Processed
Trionycis Carapax

HAN Qiu-jun¹, BI Wei², WANG Wei¹, LI Qu-sheng¹, WANG Peng-long¹, XU Shi-xun¹, WANG Yan-hui¹,
XU Kuo¹, WANG Lin¹, CHENG Ya-tao¹, LI Qiang¹, LEI Hai-min^{1*}

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: A rapid method was established for quantitative determination of peptide based on biuret reaction-enzyme-linked immunosorbent detector, and peptide content in the same geographical origin of pre-and-post-processed Trionycis Carapax was analyzed. Method: The developer was 0.02 g·mL⁻¹ sodium potassium tartrate solution (50 μL), 5% NaOH (20 μL), 1% CuSO₄·5H₂O (50 μL). The wavelength of detection was at 580 nm. Result: The calibration curves were linear in the ranges of 0.00-5.00 g·L⁻¹ for septa-peptide from Trionycis Carapax. Peptide content in vinegar-processed samples was 6.99%, while the same content in crud samples was 1.04%. Conclusion: Peptide content in vinegar-processed samples was significantly higher than the one in crud samples. The content of Trionycis Carapax is increased greatly after vinegar by decoction.

[Key words] Trionycis Carapax; peptide; enzyme-linked immunosorbent detector-biuret reaction; content determination

鳖甲始载于《神农本草经》,具有滋阴清热、平肝、潜阳、软坚散结的功效。生鳖甲质地坚硬,临床常用鳖甲的醋制品。传统炮制理论认为,制法可以使药材质地发生改变有利于有效成分煎出,现代药

理初步推测小分子肽类为其抗肝纤维化的主要有效成分^[1-3],因此,快速有效测定生鳖甲、醋鳖甲煎出物中肽类物质的含量不仅有利于鳖甲药材的质量控制,还可以用于比较二者有效成分的含量,阐释鳖甲

[收稿日期] 20120627(419)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073017)

[第一作者] 韩秋俊,在读硕士生,Tel:15201391326,E-mail:hqjun2009@163.com

[通讯作者] *雷海民,教授,博士生导师,从事中药先导化合物的发现与开发研究,Tel:010-84738640,E-mail:leihaimin@126.com

醋制的科学涵义。

近年从中药中陆续分离出具有免疫、抗肿瘤、抗氧化、抗疲劳、降脂降压等多种活性^[4-7]的肽类成分。目前可参考的肽类成分含量测定方法主要包括定氮法、Folin-酚试剂法、BCA法、考马斯亮蓝法以及双缩脲法^[8-10]。由于中药中许多成分均含氮元素,因此定氮法无法准确测定中药中肽类成分的含量;Folin-酚试剂法和BCA法只适用于含巯基和酚基等还原基团的肽类;考马斯亮蓝法根据其显色原理,不适于测定水溶性肽类的含量;双缩脲反应主要针对肽键显色,可以用于常规肽类的含量测定;毕藏等^[11]用该法测定了鳖甲中总肽含量,但是存在用量较大,操作繁琐的问题,不利于大批样品检验。在前期研究基础上,本实验选择从鳖甲中分离获得的七肽^[12]为对照品,结合双缩脲反应和酶联免疫检测仪应用96孔板对生鳖甲和醋鳖甲的肽类进行含量测定比较研究。

1 材料

1.1 药物和试剂 生鳖甲、醋鳖甲购于同仁堂,产地湖北,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲七肽,实验室从鳖甲中分离纯化确证结构,委托上海科肽生物科技有限公司合成。氢氧化钠,硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$),酒石酸钾钠($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)。

1.2 仪器 METTLER AE240 型 1/10 万分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)、微量 SPEC 振荡器 MH-1 型(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、TRA MAX190 酶联免疫检测仪、96 孔板(Costar 公司)、八道加样器(Thermo 公司)。

2 方法和结果

2.1 波长的确定 七肽对照品显色后作酶联免疫检测仪 500 ~ 650 nm 波长扫描,确定最大吸收波长为 580 nm。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 50.00 mg 七肽对照品粉末(含量 > 98%)用水定容至 5 mL,配制成 $10.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 分别取生鳖甲和醋鳖甲药材粉末约 5 g,加入 100 mL 水,称重,50 kHz 超声提取 1 h,放凉,补重,过滤,取上清液 100 μL ,依次加入 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酒石酸钾钠溶液 50 μL ,5% NaOH 溶液 20 μL ,0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液 50 μL ,振荡,待测。

2.4 线性关系的考察 精密吸取 0.10,0.25,0.50,1.00,2.50,5.00,7.50,10.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 七肽对照

品溶液 100 μL ,分别依次加入 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酒石酸钾钠溶液 50 μL ,5% NaOH 溶液 20 μL ,0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液 50 μL ,振荡,于 580 nm 波长下测定吸光度(A)。以七肽的浓度 $C(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 为横坐标,A 为纵坐标,绘制标准曲线得回归方程为 $A = 0.047C + 0.001 (r = 0.999\ 5)$ 。对照品质量浓度在 0.10 ~ 5.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度呈良好线性。

2.5 精密度试验 精密称取 2.68 mg 七肽对照品溶于 3 mL 水,吸取该对照品溶液 100 μL ,依次加入 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度酒石酸钾钠 50 μL ,5% NaOH 溶液 15 μL ,0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 50 μL ,振荡摇匀,于 580 nm 波长下测定 A,重复测定 6 次,RSD 1.83% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批次醋鳖甲药材粉末各 6 份,按 2.3 项下超声提取制备溶液,过滤,取上清液 100 μL ,依次加入 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酒石酸钾钠 50 μL ,5% NaOH 20 μL ,0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液 50 μL ,摇匀,于 580 nm 波长下测定 A,摇匀,测定,所测总肽相对含量 6.99%,RSD 2.98% ($n = 6$),表明该法重复性良好。

2.7 显色稳定性试验 取 2.6 项下醋鳖甲上清液 100 μL ,按 2.4 项下方法显色后,分别在 0,10,30,60,120 min 测定其吸收度,RSD 1.60% ($n = 5$),表明样品显色后在 120 min 内稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的醋鳖甲药材粉末 6 份,每份约 2.5 g,加入七肽对照品适量以及 100 mL 水,按 2.3 项下超声提取制备供试液,取供试液 100 μL ,按照 2.4 项下操作,依次加入酒石酸钾钠、氢氧化钠、硫酸铜,微量 SPEC 振荡器振荡,于 580 nm 下测定。以测定浓度与实际浓度作比较,计算回收率,结果见表 1。

表 1 鳖甲七肽的加样回收率测定 ($n = 6$)

称样量 /g	样品中 含量 /g	加入量 /g	实测量 /g	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
2.501 0	0.179 3	0.185 0	0.368 2	102.11		
2.501 3	0.174 8	0.180 0	0.356 4	100.89		
2.505 0	0.176 5	0.177 8	0.358 4	102.31		
2.500 5	0.175 8	0.173 6	0.341 2	95.28	100.49	2.82
2.500 3	0.174 8	0.180 2	0.360 2	102.89		
2.505 4	0.175 0	0.185 0	0.359 0	99.46		

2.9 生鳖甲和醋鳖甲中肽类含量测定 分别取生鳖甲和醋鳖甲药材粉末约 5 g,加入 100 mL 水,称重,各平行操作 3 份。50 kHz 超声提取 1 h,放凉,补重,过滤,取上清液 100 μL ,按照 2.4 项下操作,

依次加入酒石酸钾钠、氢氧化钠、硫酸铜,微量 SPEC 振荡器振荡,于 580 nm 下测定,重复测定 5 次,测得生鳖甲和醋鳖甲肽含量平均值分别为 1.04%,6.99%,结果见表 2。

表 2 两种鳖甲样品中肽类含量测定

药材种类	鳖甲量	肽类总含量	平均值	RSD
	/g	/mg	/%	/%
生鳖甲	5.003 3	54.255 2	1.04	4.27
	5.005 0	52.255 2		
	5.009 1	49.872 4		
醋鳖甲	5.003 0	360.638 3	6.99	2.94
	5.009 3	340.553 2		
	5.003 1	349.010 6		

3 讨论

双缩脲比色法是蛋白含量测定的经典方法之一,具有准确、操作简便、干扰因素少等优点。课题组前期建立了用双缩脲试剂测定肽类含量的^[9],但是用量较大,操作繁琐。

3.1 酒石酸钠钾浓度筛选 七肽溶液取高、中、低 3 个不同的量平行操作,进行筛选。将配置七肽溶液稀释为 1.00,2.00,5.00 g·L⁻¹ 3 个浓度,各加入 100 μL 于 96 孔板,分别加入 50 μL 0.005,0.01,0.02,0.05,0.1 g·mL⁻¹ 酒石酸钾钠溶液,再分别加入 5% NaOH 20 μL 和 1% CuSO₄ 50 μL,充分震荡,于 580 nm 下测定,质量浓度为 0.005,0.01 g·mL⁻¹ 时有浑浊产生,当质量浓度≥0.02 g·mL⁻¹ 时吸光度值基本不变,因此酒石酸钾钠的最佳质量浓度为 0.02 g·mL⁻¹。

3.2 NaOH 溶液的浓度筛选 考察 4 个浓度的 NaOH 1%,2%,5%,10%,溶液的吸光度随着 NaOH 浓度的增加而增加,当 NaOH 的浓度到达 5% 时,吸光度不再随 NaOH 浓度的变化而变化。因此,我们选择 5% 的 NaOH 溶液。

3.3 硫酸铜溶液浓度筛选 分别考察 4 个浓度硫酸铜 0.5%,1%,2%,5%,溶液的吸光度随着硫酸铜浓度的增加而增加,当硫酸铜的浓度在 0.5%~1% 时,吸光度达到最大并趋于平稳;但当硫酸铜的浓度达到 2%,空白和 1 mL 样品组产生了明显的沉淀影响吸光度值。因此,选择 0.5% 的硫酸铜溶液。

最后,确定了酶联免疫检测仪-双缩脲反应的优化条件:样品溶液(100 μL)+0.02 g·mL⁻¹ 酒石酸钾钠(50 μL)+5% NaOH(20 μL)+0.5% 硫酸铜(50 μL)。酶联免疫检测仪-双缩脲法用量少,操作简单,效率高,为测定肽含量具有很好的应用意义。

醋鳖甲抗肝纤维化的有效部位为小分子肽类,

本实验应用建立的酶联免疫检测仪-双缩脲法测定了鳖甲生品和醋制品中肽类含量,发现醋制品肽类含量明显高于生品。这与文献报道肽类物质是醋鳖甲抗肝纤维化作用和增强免疫等生理活性相关的功效成分相吻合,为临床选择用药以及进一步研究鳖甲的活性成分提供一定的参考依据。该研究提供了简便、快速肽类含量测定方法,为补充鳖甲药材定量指标和阐述鳖甲药效物质基础提供参考。

[参考文献]

[1] 高建蓉,张赤志,邵志华,等. 鳖甲对肝星状细胞增殖影响的研究[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(11): 1618.

[2] 施婧妮. 陈进文. 高建蓉,等. 鳖甲炮制前后抗肝纤维化有效物质部位 HPCE 指纹图谱的比较研究[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(2):63.

[3] 杨莹. 鳖甲中寡肽类化合物治疗慢性肝损伤的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2011:23.

[4] Ding Guo-Fang, Huang Fang-Fang, Yang Zui-Su, et al. Anticancer activity of an peptide isolated from hydrolysates of Sepia Ink[J]. Chinese Journal of Natural Medicines,2011,9(2):151.

[5] Deng Chao, Tang Lu-hong, Chen Wei, et al. Effects of collagen peptide from *Cyanea nozakii* on mouse immune function [J]. Agr Sci Technol,2009,10(2):118.

[6] You Li-jun,Zhao Mou-ming, Regenstein Joe M. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion [J]. Food Chemistry, 2011, 124(1):188.

[7] Kang Min-Gu, Jae-Ho Kim, Byung-Hak Ahn, et al. Characterization of new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from korean traditional rice wine[J]. J Microbiol Biotechnol, 2012,22(3):341.

[8] 张厚峰,张淑. 双缩脲法与凯氏法测定饲料蛋白质的比较研究[J]. 饲料与畜牧,2008(3): 49.

[9] 张汉明,李茂星,郭美丽. 凯氏定氮法和 Folin-酚法测定胸腺素多肽含量的差异探讨[J]. 中国生化药物杂志,1999, 20(1):31.

[10] 李海玲,彭书明,李凇,等. 4 种常用蛋白浓度测定方法的比较[J]. 中国生化药物杂志,2008,29(4): 277.

[11] 毕葳,邢延一,李燕燕,等. 应用双缩脲反应测定鳖甲中总肽含量的方法学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(15):63.

[12] 雷海民. 抗乙肝病毒肽类及其衍生物,中国申请号: 201010187949.9[P].

[责任编辑 顾雪竹]