

正交试验优化麝香中多肽类成分的提取工艺

徐志伟¹, 才凤², 李洪江², 李双², 解雨婷³, 翟延君^{1*}

(1. 辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁省药物研究院, 沈阳 110015;
3. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

〔摘要〕 目的:优选麝香总多肽的研磨提取工艺,为麝香的品种鉴定与质量评价提供参考。方法:采用福林酚法测定麝香总多肽含量。以麝香总多肽含量为指标,通过正交试验考察提取时间、溶媒种类及用量对提取工艺的影响。结果:最佳提取工艺为三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(pH 8.0,0.025 mol·L⁻¹),料液比 1:100,研磨时间 3 h,放置过夜;麝香总多肽平均质量分数达 20.71%,经冷冻干燥技术处理后麝香总多肽收率 62.4%。结论:优选的提取工艺稳定可行,获得麝香总多肽的提取率较高,为麝香的品质分析提供实验依据。

〔关键词〕 福林酚法;麝香;总多肽;冷冻干燥法

〔中图分类号〕 R283.6;R284.1;R284.2;R282.74 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)22-0023-03

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220023

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.1121.020.html>

〔网络出版时间〕 2014-10-10 10:17

Optimization of Extraction Process of Polypeptides from Moschus by Orthogonal Design

XU Zhi-wei¹, CAI Feng², LI Hong-jiang², LI Shuang², XIE Yu-ting³, ZHAI Yan-jun^{1*}

(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;
2. Pharmaceutical Research Institute of Liaoning Province, Shenyang 110015, China;

〔收稿日期〕 20140402(020)
〔基金项目〕 国家教育部博士基金项目(20112133110001);辽宁省自然科学基金项目(2010010264-401);沈阳市科委基金项目(F12-277-1-13)
〔第一作者〕 徐志伟,在读硕士,从事中药品种鉴定与质量评价研究,Tel:15140635679,E-mail:375390398@qq.com
〔通讯作者〕 *翟延君,教授,博士生导师,从事中药品种鉴定与质量评价研究,Tel:0411-85890138,E-mail:lnzyzyj@sohu.com

〔参考文献〕

[1] 蒋跃绒,陈可冀.川芎嗪的心脑血管药理作用及临床应用研究进展[J].中国中西医结合杂志,2013,33(5):707.

[2] 杨雪梅.川芎嗪药理作用研究进展[J].中国生化药物杂志,2010,31(3):215.

[3] 张国清,赵江花.川芎嗪在心血管疾病中的药理作用研究进展[J].中国当代医药,2009,16(4):142.

[4] Schnyder A, Huwyler J. Drug transport to brain with targeted liposomes[J]. NeuroRX,2005,2(1):99.

[5] Oku N, Tokudome Y, Asai T, et al. Evaluation of drug targeting strategies and liposomal trafficking [J]. Curr Pharm Des,2000,6(16):1669.

[6] Venkateswarlu V, Manjunath K. Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles[J]. J Control Release,2004,95(3):627.

[7] Allen T M. Liposomal drug formulations: rationale for development and what we can expect for the future[J]. Drugs,1998,56(5):747.

[8] 杨宜华,王萌萌,董凯,等. HPLC 法测定注射用盐酸川芎嗪的含量[J].徐州医学院学报,2014,34(5):306.

[9] 张岩. 盐酸青藤碱柔性脂质体的制备及评价[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2008.

〔责任编辑 刘德文〕

3. *Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To optimize extraction process of total polypeptides from Moschus and provide a reference for species identification and quality evaluation of Moschus. **Method:** The content of total polypeptides was determined by Folin phenol method. With the content of total polypeptides as index, orthogonal test was adopted to optimize extraction process by taking extracting time, the amount and type of solvent as factors. **Result:** Optimum extraction process of total polypeptide was as follows: with Tris-HCl buffer (pH 8.0, 0.025 mol·L⁻¹) as extracting solution, grinding time of 3 h, solid-liquid ratio of 1:100; the content of total polypeptides was 20.71%, after freeze-drying, yield of total polypeptides was 62.4%. **Conclusion:** Optimized extraction process is stable and feasible with high extracting rate, this method can provide experimental basis for quality analysis of Moschus.

[**Key words**] Folin phenol method; Moschus; total polypeptides; freeze-drying method

麝香在我国已有两千多年的应用历史,《神农本草经》将其列为上品^[1],《本草纲目》^[2]列于兽部第 51 卷,历代医药文献均有记载。具有开窍醒神、活血通络、消肿止痛之功效,主治热病神昏、中风痰厥、气郁暴厥、中恶昏迷等证^[3]。目前有关麝香的品种鉴定与质量评价除了经验鉴别^[4]和显微鉴别^[5]外,常以麝香酮、雄甾酮、胆固醇为评价指标^[3,6-7]进行定量分析,而以麝香总多肽为指标的品种分析研究尚未见报道。麝香总多肽是一类重要的活性成分,具有很强的抗炎作用^[8],相对分子质量 5 000~6 000 的多肽抗炎效果为氢化可的松的 20 倍^[9]。本实验以麝香总多肽含量为指标,通过正交试验考察提取时间、溶媒用量及种类对研磨提取工艺的影响,利用福林酚法测定总多肽含量,为麝香的药效物质基础研究、聚丙烯酰胺凝胶电泳分析、总多肽组分分析等研究提供参考,为该药味的品种鉴定与质量评价提供实验依据。

1 材料

U-2010 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),H-1850R 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器发展有限公司),VFD-1000 型真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯仪器公司)。麝香药材购买于安徽亳州药材市场,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为麝香鹿科动物林麝 *Moschus berezovskii* 成熟雄体香囊中的干燥分泌物;牛血清白蛋白对照品(中国食品药品检定研究院,批号 140619-200919),试剂均为分析纯,试液均按 2010 年版《中国药典》附录配制。

2 方法与结果

2.1 总多肽的含量测定

精密吸取一定量提取液

(使显色后溶液的吸光度在 0.3~0.7),置于具塞试管中,分别加入碱性铜试液 5 mL,摇匀,室温放置 10 min,快速加入福林酚试液 0.5 mL,摇匀,室温放置 30 min,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法,在 650 nm 处测定吸光度(*A*),以 *A* 为纵坐标,质量浓度(*C*)为横坐标,得回归方程 $A = 2.028\ 1C + 0.040\ 3$ ($r = 0.999\ 1$),线性范围 0.008~0.040 g·L⁻¹。随着显色后放置时间的延长,样品溶液的 *A* 逐渐上升,每隔 0.5 h 测定 1 次,结果在 3 h 内溶液 *A* 的 RSD 1.98%,说明提取液显色后至少在 3 h 内稳定。平均加样回收率 99.85%,RSD 1.6% ($n = 9$),表明总多肽的含量测定方法准确可靠。

2.2 提取工艺正交试验优选^[10-13] 在预试验基础上,为保留蛋白原有活性,选择溶剂种类[磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4,0.02 mol·L⁻¹)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(Tris-HCl,pH 8.0,0.025 mol·L⁻¹)、乙醇(60%)]及用量、提取时间为考察因素,综合生产成本和实际操作等考虑,适当增加了提取液用量。采用低温研磨法提取麝香细胞内多肽类成分,精密称取麝香粗粉 0.1 g,共 9 份,按 L₉(3⁴)正交表进行试验,加入适量溶剂进行低温研磨提取,放置过夜,采用福林酚法测定麝香总多肽含量,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

由直观分析可知各因素对提取工艺的影响顺序为 $A > B > C$,各因素水平的最佳组合 $A_2B_3C_1$ 。方差分析发现因素 *A* 对总多肽得率具有显著性影响,*B*,*C* 因素则均无显著影响,综合工业生产操作考虑,确定最佳提取工艺 $A_2B_3C_1$,即选择 Tris-HCl 为提取溶剂,料液比 1:100,研磨提取时间 3 h,放置过夜。

2.3 验证试验 精密称取麝香粗粉 0.1 g,共 3 份,按优选的工艺条件进行验证试验,计算总多肽质量

表 1 麝香总多肽提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 提取 溶剂	B 料液比 /g·mL ⁻¹	C 提取时间 /h	D (空白)	总多肽 /%
1	PBS	1: 50	3	1	5. 94
2	PBS	1: 75	4	2	7. 09
3	PBS	1: 100	5	3	7. 91
4	Tris-HCl	1: 50	4	3	11. 86
5	Tris-HCl	1: 75	5	1	16. 67
6	Tris-HCl	1: 100	3	2	20. 51
7	60% 乙醇	1: 50	5	2	3. 91
8	60% 乙醇	1: 75	3	3	7. 28
9	60% 乙醇	1: 100	4	1	7. 21
K ₁	6. 981	7. 237	11. 245	9. 943	
K ₂	16. 349	10. 349	8. 722	10. 503	
K ₃	6. 133	11. 877	9. 496	9. 018	
R	10. 216	4. 640	2. 523	1. 485	

注:提取时间为每隔 30 min 研磨 5 min。

表 2 麝香总多肽方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	192. 847	96. 424	57. 159	<0. 05
B	33. 545	16. 772	9. 942	>0. 05
C	10. 021	5. 011	2. 97	>0. 05
D(误差)	3. 374	1. 687		

注: $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

分数分别为 20. 71% , 20. 60% , 20. 81% , 说明优选的工艺条件稳定可行。将 3 份提取液合并,于 35 ℃ 旋转浓缩,利用冷冻干燥技术^[14]进行干燥, - 60 ℃ 预冻 4 h,按升温程序(0 ~ 4 h, - 40 ~ - 32 ℃ ;4 ~ 8 h, - 32 ~ - 20 ℃ ;8 ~ 12 h, - 20 ~ - 12 ℃ ;12 ~ 16 h, - 12 ~ 10 ℃ ;16 ~ 20 h,10 ~ 22 ℃ ;20 ~ 24 h, 22 ~ 25 ℃ ;24 ~ 28 h,25 ~ 28 ℃)干燥 28 h,得麝香冻干粉,计算麝香总多肽收率 62. 4% 。

3 讨论

麝香中多肽类成分是一类重要的活性成分,采用福林酚法进行含量测定,具有操作简便快速、灵敏

度高、适用范围广等优势,为麝香的药效物质基础研究、凝胶电泳分析及特异性蛋白分离提供参考。采用低温冷冻技术对麝香多肽进行干燥,不但脱水较为彻底,使干燥后的多肽成分性质稳定,便于长时间贮存,而且可更好地控制温度,保护了多肽类成分的活性。

[参考文献]

[1] 吴普,孙兴衍,孙冯翼. [M]. 太原:山西科学技术出版社,2010:84.

[2] 李时珍. 本草纲目 [M]. 哈尔滨:北方文艺出版社, 2007:1083.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:361.

[4] 李卫平,邹龙. 麝香真伪鉴别及应用 [J]. 中南药学, 2011,9(4):282.

[5] 傅颖,杨弘,叶愈青. 麝香真伪的现场快速显微鉴别 [J]. 药物分析杂志,2012,32(4):706.

[6] 张皓冰,何昱,贾国惠,等. 气相色谱/质谱 (GC/MS) 联用技术对麝香的多成分含量分析 [J]. 中成药, 2002,24(11):868.

[7] 张皓冰,陶奕,洪彼坤,等. 气相色谱/质谱 (GC/MS) 联用测定麝香中甾体成分的研究 [J]. 中成药,2005, 7(1):79.

[8] 曹喜红,周远大. 麝香抗炎作用的研究进展 [J]. 中国药房,2007,18(21):1662.

[9] 于德泉,柳雪玫,高淑艳. 天然麝香抗炎有效成分的研究 [J]. 药学学报,1980,15(5):306.

[10] 才凤,李双,李杨,等. 冬虫夏草蛋白超声提取工艺研究 [J]. 实用药物与临床,2013,16(7):593.

[11] 岳喜庆,徐明,王澜儒. 响应曲面法优化鹿茸蛋白提取条件 [J]. 食品研究与开发,2011,32(9):59.

[12] 杨颖,徐代勋,曲勃,等. 梅花鹿鹿茸总蛋白的提取方法比较 [J]. 特产研究,2011(2):11.

[13] 孟琳,田景振. 动物组织蛋白质提纯方法的研究进展 [J]. 食品与药品,2009,11(5):53.

[14] 白秀娟. 醇溶性冻干鹿茸提取物提取方法 [P]. 中国: CN03132527,2004-03-17.

[责任编辑 刘德文]