

不同产地茯苓中总蛋白的含量差异比较^Δ

罗心遥*, 刘俊, 李慧君, 王天合, 杨玉莹, 夏和元, 叶晓川[#](湖北中医药大学药学院/中药资源与中药化学省级重点实验室, 武汉 430065)

中图分类号 R286.0 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)06-0692-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.06.11

摘要 目的:比较不同产地茯苓中总蛋白的含量差异。方法:以牛血清白蛋白为对照,0.4 mol/L 氢氧化钠溶液为提取溶剂,考马斯亮蓝 G-250 为显色剂,采用紫外分光光度法于 595 nm 波长处测定茯苓中总蛋白含量,并通过聚类分析对 34 批(S1~S34)不同产地的茯苓进行分类。结果:牛血清白蛋白检测质量浓度的线性范围为 1.45~17.40 μg/mL($r=0.999\ 6$);精密度、稳定性(20 min)、重复性试验的 RSD 均小于 3%;加样回收率为 100.14%~104.26%(RSD=1.43%, $n=9$);34 批不同产地茯苓中总蛋白的含量为 0.388 4%~1.129 7%。聚类分析结果显示,34 批茯苓中,湖北省英山县产茯苓(S2、S3)的总蛋白含量>1%,归为一类;湖北、云南、安徽和湖南产茯苓(S1、S5~S10、S12、S13、S16、S17、S19~S21、S23~S25、S28、S30、S31)的总蛋白含量为 0.653 5%~0.946 1%归为一类;剩余批次含量为 0.388 4%~0.601 2%,归为一类。结论:所建方法可用于茯苓中总蛋白的含量测定。34 批不同产地茯苓总蛋白含量以湖北省英山县产茯苓最高,云南、安徽等地次之。

关键词 茯苓;蛋白;含量测定;差异;聚类分析

Comparison of Total Protein Content Difference of *Poria cocos* from Different Producing Areas

LUO Xinyao, LIU Jun, LI Huijun, WANG Tianhe, YANG Yuying, XIA Heyuan, YE Xiaochuan (College of Pharmacy, Hubei University of TCM/Provincial Key Lab of TCM Resource and TCM Chemistry, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** Compare the difference of total protein content of *Poria cocos* from different producing areas. **METHODS:** Using bovine serum albumin (BSA) as control, 0.4 mol/L sodium hydroxide solution as extraction solution, Coomassie brilliant blue G-250 as chromogenic reagent, visible spectrophotometry at 595 nm was used to determine the contents of total protein of *P. cocos*; cluster analysis was used to classify 34 batches (S1-S34) of *P. cocos* from different producing areas. **RESULTS:** The linear range of BSA was 1.45-17.40 μg/mL ($r=0.999\ 6$). RSDs of precision, stability (20 min) and reproducibility tests were all lower than 3%; recoveries were 100.14%-104.26% (RSD=1.43%, $n=9$). The contents of total protein in 34 batches of *P. cocos* from different producing areas were 0.388 4%-1.129 7%. The results of cluster analysis showed that among 34 batches of *P. cocos*, the total protein content of *P. cocos* produced in Yingshan county of Hubei province (S2, S3) was higher than 1%, clustered into one category; the total protein contents of *P. cocos* produced in Hubei, Yunnan, Anhui and Hunan (S1, S5-S10, S12, S13, S16, S17, S19-S21, S23-S25, S28, S30, S31) were 0.653 5%-0.946 1%, clustered into one category, and the remaining batch content were 0.388 4%-0.601 2%, clustered into one category. **CONCLUSIONS:** Established method is suitable for the content determination of total protein content of *P. cocos*. The protein content of *P. cocos* from Yingshan county of Hubei province is the highest, followed by Yunnan and Anhui in 34 batches of *P. cocos* from different producing areas.

KEYWORDS *Poria cocos*; Protein; Content determination; Difference; Cluster analysis

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 [*Poria cocos* (Schw.) Wolf] 的干燥菌核,始载于《神农本草经》^[1],是我国公布的第一批食药同源品种之一^[2]。茯苓性平,味甘、淡,归心、肺、脾、肾经,具有利水渗湿、健脾和胃、宁心安神的功效^[3]。现代药理研究表明,茯苓含有多糖类、三萜类、蛋白类以及甾体类等化学成分,具有抗肿瘤、调节免疫、抑菌、抗炎、抗氧化、抗纤维化等作用^[4-9]。目前,有关植物蛋白及真菌蛋白的药用价值已引起学者的广泛关注,多种植物蛋白及真菌蛋白被报道具有降血糖、降血脂、

抗氧化、抗肿瘤等生理活性^[10-13]。而现有关于茯苓活性成分的研究主要集中在多糖及三萜类成分^[4-5],对其蛋白成分的研究甚少,其原因可能与茯苓蛋白的提取较为困难有关^[4]。本课题组前期研究发现,以水为溶剂几乎不能提取茯苓总蛋白,这增加了含量测定难度。为此,本研究采用紫外分光光度法,以 0.4 mol/L 氢氧化钠溶液为提取溶剂测定茯苓中总蛋白的含量,并对全国 8 个省份 34 批不同产地茯苓中总蛋白的含量进行检测,同时结合聚类分析进行分类,旨在为茯苓资源质量评价及后续进一步研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

1800 型紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司);BT25S 型十万分之一分析天平[赛多利斯科学仪器

^Δ 基金项目:国家重点研发计划项目(No.2017YFC1703004)

* 硕士研究生。研究方向:中药及其制剂的物质基础。E-mail: xzdiyiqq.com

[#] 通信作者:研究员,博士生导师,博士。研究方向:中药及其制剂的物质基础。E-mail: Chuan9069@hbtcm.edu.cn

(北京)有限公司]; Milli-Q型纯水系统(美国Millipore公司); DZF-6050型真空干燥箱(上海博讯实业有限公司); KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 88-1型大功率磁力搅拌器(常州国华电器有限公司)。

1.2 药材与试剂

分别收集来自全国8个省份不同地区不同种植田的茯苓共34批(编号:S1~S34), 经湖北中医药大学药学院叶晓川教授鉴定均为多孔菌科真菌茯苓 [*P. cocos* (schw.) wolf] 的干燥菌核。茯苓药材信息来源见表1。牛血清白蛋白(BSA)标准品(批号: EZ2811E172, 纯度: $\geq 98.0\%$)、考马斯亮蓝 G-250 显色剂(批号: EZ2811F373)均购自赛国生物科技有限公司; 无水乙醇、磷酸、氢氧化钠均为分析纯, 水为超纯水。

表1 茯苓药材信息来源

Tab 1 Information source of *P. cocos*

编号	产地	采收时间	编号	产地	采收时间
S1	湖北英山石头咀镇	2018.07	S18	云南大理市永平县	2018.04
S2	湖北英山石头咀镇	2018.11	S19	云南大理市永平县	2018.07
S3	湖北英山石头咀镇	2018.11	S20	云南丽江永胜镇	2018.04
S4	湖北英山雷家店镇	2018.11	S21	云南景谷傣族彝族自治县	2018.07
S5	湖北英山雷家店镇	2018.11	S22	云南普洱市孟连县	2018.07
S6	湖北英山吉利中药材公司种植基地	2018.11	S23	云南保山腾冲市	2018.12
S7	湖北罗田县九资河镇	2018.11	S24	云南保山腾冲市	2018.04
S8	湖北罗田县九资河镇	2018.07	S25	云南保山腾冲市	2017.11
S9	湖北罗田县九资河镇	2018.11	S26	云南保山腾冲市	2018.12
S10	湖北罗田县九资河镇	2018.11	S27	云南保山腾冲市	2018.12
S11	湖北麻城县木子店镇	2017.09	S28	湖南怀化鹤城区	2018.04
S12	湖北麻城县木子店镇	2018.11	S29	河南商城县黄柏山	2017.11
S13	湖北恩施土家族苗族自治州利川市	2018.03	S30	安徽安庆岳西县	2017.07
S14	云南楚雄大地基乡	2018.04	S31	安徽安庆岳西县	2018.12
S15	云南楚雄大地基乡	2018.07	S32	贵州铜仁德江县	2018.07
S16	云南楚雄猛虎乡	2018.12	S33	福建南平顺昌县	2017.10
S17	云南楚雄双柏县	2018.12	S34	广西岑溪马路镇	2018.07

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 BSA标准品溶液 取BSA标准品适量, 精密称定, 置于10 mL量瓶中, 加水溶解, 制成质量浓度为0.174 mg/mL的BSA标准品溶液, 于4 °C冰箱中保存, 备用。

2.1.2 供试品溶液 取茯苓(编号:S1)适量, 粉碎, 过40目筛。取上述粉末2 g, 精密称定, 加入0.4 mol/L氢氧化钠溶液70 mL, 置于磁力搅拌器上搅拌15 min, 滤过, 精密吸取续滤液5 mL, 置于25 mL量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.2 检测波长的确定

分别精密吸取“2.1”项下BSA标准品溶液和供试品溶液各1 mL, 加入考马斯亮蓝 G-250 显色剂5 mL, 混匀, 以水为空白, 在300~800 nm波长范围内进行扫描, 考察其最佳吸收波长。结果, BSA标准溶液和供试品溶液均在595 nm波长附近有最大吸收, 因此选择595 nm

作为检测波长, 详见图1。

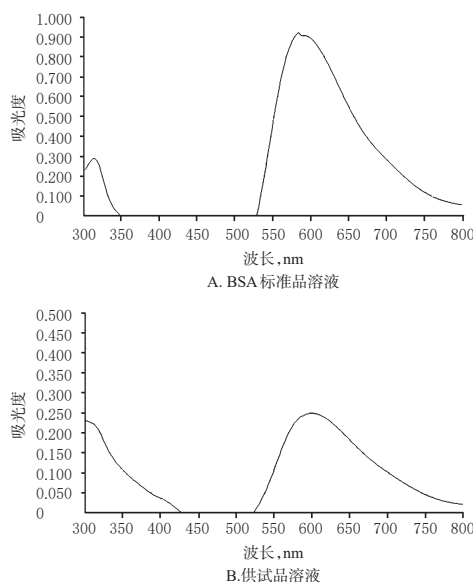


图1 紫外吸收光谱图

Fig 1 UV absorption spectra

2.3 线性关系考察

分别精密吸取“2.1.1”项下BSA标准品溶液0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6 mL, 置于10 mL试管中, 加水至1.0 mL, 再分别加入考马斯亮蓝 G-250 显色剂5 mL, 混匀, 以水为空白, 于595 nm波长处测定吸光度, 以系列BSA标准品溶液质量浓度($x, \mu\text{g/mL}$)为横坐标, 吸光度(y)为纵坐标进行线性回归。结果, BSA的回归方程为 $y = 43.101x + 0.0366$ ($r = 0.9996$), 表明BSA质量浓度在1.45~17.40 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度的线性关系良好。

2.4 精密度的试验

精密吸取“2.1.1”项下BSA标准品溶液0.2 mL, 置于10 mL试管中, 加水至1.0 mL, 加入考马斯亮蓝 G-250 显色剂5 mL, 混匀, 以水为空白, 于595 nm波长处连续测定6次吸光度。结果, BSA吸光度的RSD为0.02% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.1.2”项下供试品溶液(编号:S1)适量, 加入考马斯亮蓝 G-250 显色剂5 mL, 混匀, 分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 min时, 以水为空白, 于595 nm波长处测定吸光度。结果, 吸光度的RSD为1.58% ($n = 11$), 表明供试品溶液在室温下放置20 min内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取茯苓样品(编号:S1)粉末2 g, 共6份, 精密称定, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 加入考马斯亮蓝 G-250 显色剂5 mL, 混匀, 以水为空白, 于595 nm波长处测定吸光度并按标准曲线法计算茯苓总蛋白的含量。结果, 茯苓总蛋白的平均含量为0.9461%, RSD为2.74% ($n = 6$), 表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的茯苓样品(编号:S1)2 g,共9份,精密称定,分别按已知蛋白含量的80%、100%、120%加入BSA标准品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,加入考马斯亮蓝G-250显色剂5 mL,混匀,以水为空白,于595 nm波长处测定吸光度并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=9$)
Tap 2 Results of recovery tests($n=9$)

取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
2.061 2	19.501	15.54	35.448	102.62		
2.059 5	19.485	15.66	35.813	104.26		
2.056 6	19.458	15.78	35.260	100.14		
2.060 2	19.492	18.94	38.681	101.32		
2.058 1	19.472	19.13	38.824	101.16	102.01	1.43
2.056 1	19.453	19.01	39.171	103.73		
2.057 6	19.467	23.59	43.136	100.33		
2.060 5	19.494	23.68	43.528	101.49		
2.060 3	19.493	23.92	44.142	103.05		

2.8 不同产地茯苓中总蛋白的含量测定

取34批茯苓样品(编号:S1~S34)粉末2 g,每批平行取3份,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,然后加入考马斯亮蓝G-250显色剂5 mL,混匀,以水为空白,于595 nm处测定吸光度并按标准曲线法计算茯苓总蛋白含量,结果见表3。

表3 34批不同产地茯苓中总蛋白含量的测定结果($n=3, \%$)

Tab 3 Determination results of total protein contents in 34 batches of *P. cocos* from different producing areas($n=3, \%$)

编号	蛋白含量	编号	蛋白含量	编号	蛋白含量	编号	蛋白含量
S1	0.946 1	S11	0.600 9	S21	0.653 5	S31	0.712 1
S2	1.048 5	S12	0.719 2	S22	0.576 0	S32	0.556 7
S3	1.129 7	S13	0.770 3	S23	0.795 1	S33	0.443 3
S4	0.601 2	S14	0.454 2	S24	0.762 2	S34	0.470 1
S5	0.706 8	S15	0.600 0	S25	0.812 2		
S6	0.882 8	S16	0.751 1	S26	0.433 0		
S7	0.750 6	S17	0.762 7	S27	0.580 1		
S8	0.933 1	S18	0.388 4	S28	0.678 3		
S9	0.708 3	S19	0.705 7	S29	0.531 1		
S10	0.869 9	S20	0.743 3	S30	0.673 1		

2.9 聚类分析

为评价茯苓产地与总蛋白含量的相关性,将34批茯苓总蛋白含量测定结果代入SPSS 22.0软件,采用聚类分析法结合平均欧式距离(d)进行分析,生成34批不同产地茯苓总蛋白含量的聚类分析树状图,详见图2。

由图2可知,当 $d=10$ 时,34批茯苓可聚分为3类,其中S2、S3聚为一类,该类样品总蛋白含量最高(均 $>1\%$),均产于湖北省英山县石头咀镇;S1、S5~S10、S12、S13、S16、S17、S19~S21、S23~S25、S28、S30、S31聚为一类,该类样品总蛋白含量较高(0.653 5%~0.946 1%),

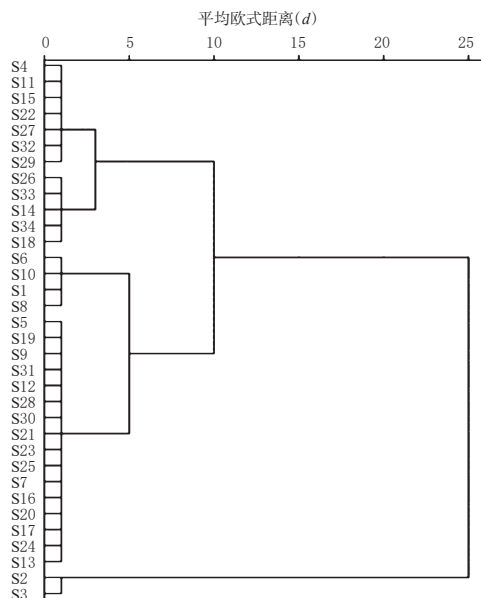


图2 34批不同产地茯苓总蛋白含量的聚类分析树状图
Fig 2 Cluster analysis dendrogram of total protein content of in 34 batches of *P. cocos* from different producing areas

来自于湖北、云南、安徽和湖南;S4、S11、S14、S15、S18、S22、S26、S27、S29、S32~S34聚为一类,该类样品总蛋白含量相对较低(0.388 4%~0.601 2%),来自于湖北、云南、河南、广西、福建和贵州。由此可知,湖北和部分云南产茯苓总蛋白的含量明显高于其他产地,其中湖北省英山县石头咀镇的3个批次茯苓中总蛋白含量均较高。

3 讨论

3.1 样品前处理条件的选择

蛋白质的提取方法主要有回流提取法、酶提取法、超声波提取法、搅拌法等^[15-16]。本课题组前期比较了超声波提取法和磁力搅拌法,结果发现磁力搅拌法可使茯苓粉末更加充分溶解,从而使试验更加准确、快捷,故选择磁力搅拌法。

本研究取茯苓样品(编号:S1),在料液比(1:20, g/mL)、提取溶剂浓度为0.1 mol/L的条件下,考察了不同溶剂(盐酸、氢氧化钠、氯化钠)对茯苓总蛋白提取率的影响。结果显示,以氢氧化钠溶液为溶剂时,茯苓总蛋白的提取效果最佳。笔者在研究中发现,茯苓粉碎成粉末后,具有明显的疏水性,除碱性溶液外,其在超纯水、酸性溶液和盐溶液中几乎提取不出蛋白,如杨岚等^[14]采用水和50%乙醇为提取溶剂,所得水溶性蛋白约 $4.0 \times 10^{-6}\% \sim 7.8 \times 10^{-6}\%$,醇溶性蛋白约 $4.38 \times 10^{-3}\% \sim 6.11 \times 10^{-5}\%$,与茯苓总蛋白含量相差甚远($1.7 \times 10^{-3}\% \sim 2.5 \times 10^{-3}\%$),且测得的总蛋白含量也较低。

本研究又考察了不同浓度氢氧化钠溶液(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mol/L)及不同料液比(1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50, g/mL)

对茯苓总蛋白提取率的影响。结果显示,总蛋白含量可随氢氧化钠溶液浓度的升高而呈先上升后下降的趋势,且当氢氧化钠溶液浓度为0.4 mol/L时,提取的总蛋白含量最高,推测其原因可能为氢氧化钠浓度过大会导致蛋白变性,溶解度降低;当料液比为1:35(g/mL)时,提取的蛋白含量最高,且随着料液比的增加,蛋白含量无明显变化;考虑到实际成本,设置料液比为1:35(g/mL)。

3.2 蛋白含量测定方法的选择

常用的蛋白定量测定方法有凯氏定氮法、双缩脲法、考马斯亮蓝G-250比色法等^[17]。有研究发现,凯氏定氮法易受测定体系中其他含氮化合物的干扰,无法测定准确的含量^[18]。故本研究比较了双缩脲法和考马斯亮蓝G-250比色法,发现前者由于灵敏度低,不适合茯苓总蛋白的测定。考马斯亮蓝G-250比色法的原理为蛋白与染料结合生成深蓝色的结合物,后者在595 nm波长处有最大吸收值,具灵敏度高、抗干扰性强的特点^[17],并具有一定的专属性,因此采用此法进行茯苓总蛋白的定量测定。笔者在研究中发现,当茯苓蛋白样品加入呈酸性的考马斯亮蓝G-250显色剂时会立刻导致茯苓酸性多糖析出,且沉淀显蓝色,离心后的上清液在595 nm波长处检测的吸光度为负值,故可推断茯苓中蛋白与酸性多糖结合在一起形成了糖蛋白。针对加入显色剂出现沉淀而导致无法检测的问题,本研究对提取茯苓总蛋白氢氧化钠溶液浓度及提取液稀释倍数进行了探索;同时考虑到不同产地茯苓中总蛋白含量可能存在较大差异,导致吸光度偏大或偏小,最终确定将样品稀释5倍,并确保加入显色剂后20 min内样品稳定,解决了采用考马斯亮蓝G-250比色法测定茯苓中总蛋白含量有沉淀析出的难题。

3.3 不同产地茯苓中总蛋白含量差异分析

34批不同产地茯苓中总蛋白含量测定结果显示,不同产地茯苓中总蛋白含量存在差异,其含量范围为0.388 4%~1.129 7%,聚类分析可将其分为三大类,湖北、云南、湖南和安徽4个茯苓主产区的总蛋白含量较其他产区高,其中湖北省英山县石头咀镇的茯苓总蛋白含量最高。有研究指出,湖北、云南和安徽是茯苓的主产区,茯苓药材品质较好^[18-19],与本研究聚类分析结果一致。本课题组前期研究结果显示,茯苓酸性多糖具有较强的免疫调节功能^[20],本研究又发现茯苓总蛋白可能与酸性多糖结合形成糖蛋白,由此推测茯苓酸性多糖可能以糖蛋白形式发挥免疫活性,而蛋白含量高低可能影响其药理活性,后续可对此进行深入研究。

综上所述,本法可用于茯苓中总蛋白含量的测定。34批不同产地茯苓中总蛋白含量存在一定差异,其中以湖北英山县产茯苓的总蛋白含量最高,可为后续茯苓质量评价及活性研究提供参考。

参考文献

[1] 顾观光.神农本草经[M].杨鹏举,校注.3版.北京:学苑出

版社,2007:98.

- [2] 王利亚.茯苓的开发与应用[J].食品科技,1997,4(8):16-17.
- [3] 张钟媛.茯苓药理作用研究进展[J].继续医学教育,2015,29(5):108-109.
- [4] 胡朝曦,肖毅,周鹏飞,等.茯苓多糖的提取及其抑菌研究[J].怀化学院学报,2012,31(8):15-18.
- [5] 卢华杰,卢燕,刘焱文.茯苓多糖抗氧化作用研究[J].食品研究与开发,2014,35(23):1-3.
- [6] 王颜佳.茯苓抗肿瘤、免疫调节药理作用研究及应用[J].海峡药学,2014,26(5):16-18.
- [7] 张瑜.桂枝茯苓丸加味治疗乙型肝炎肝硬化(瘀血阻络型)的临床观察[D].郑州:河南中医药大学,2016.
- [8] CHANG HH, YEH CH, SHEU F. A novel immunomodulatory protein from *Poria cocos* induces Toll-like receptor 4-dependent activation within mouse peritoneal macrophages[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(14):6129-6139.
- [9] 李洪波,杨瑞雪,陈静,等.茯苓免疫调节蛋白-1抗体的制备及分析[J].中草药,2014,45(20):2912-2916.
- [10] MAITI S, BHUTIA SK, MALLICK SK, et al. Antiproliferative and immunostimulatory protein fraction from edible mushrooms[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2008, 26(2):187-191.
- [11] MORADALI MF, MOSTAFAVI H, GHODS S, et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)[J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(6):701-724.
- [12] 欧力,孔令义.苦瓜中植物蛋白的研究概况[J].中草药,2001,32(10):88-90.
- [13] 赖莹,夏薇,袁源,等.杏仁蛋白降血脂功能的研究[J].中国食物与营养,2011,17(4):66-68.
- [14] 杨岚,尹火青,唐娟,等.3个茯苓品种氨基酸与蛋白质的含量比较[J].中国食物与营养,2018,24(6):44-46.
- [15] 金秋阳,刘鑫宇,胡晶红.蛋白质的提取、分离与纯化研究进展[J].山东化工,2017,46(14):35-38.
- [16] 石红伟.凯氏定氮法检测食物中蛋白质含量与误差分析[J].食品安全导刊,2016(33):124.
- [17] 王永刚,杨光瑞,马雪青,等.荧光光谱法和分子模拟技术研究考马斯亮蓝G-250与牛血清白蛋白的相互作用[J].光谱学与光谱分析,2017,37(8):2474-2479.
- [18] 张越,尹孝莉,常月月,等.不同主产区中药材茯苓中二氧化硫和重金属的含量测定[J].中中药学,2019,17(10):1703-1706.
- [19] 陈卫东,彭慧,王妍妍,等.茯苓药材的历史沿革与变迁[J].中草药,2017,48(23):5032-5038.
- [20] 邓媛媛.茯苓酸性多糖的提取工艺及其药效学研究[D].武汉:湖北中医药大学,2012.

(收稿日期:2019-09-11 修回日期:2019-11-15)

(编辑:唐晓莲)