

鹿角盘成分提取及其工艺的优化

关晴^{1,2}, 赵海平^{1,3}, 李春义^{1,3*}

1. 中国农业科学院特产研究所, 特种动物分子生物学省部共建国家重点实验室(长春 130112);

2. 吉林农业大学动物科学技术学院(长春 130118); 3. 吉林省鹿茸工程研究中心(长春 130112)

摘要 摸索鹿角盘提取条件, 优化提取工艺。利用正交试验考察水提法和酶解法对鹿角盘提取率的影响。水提法: 料液比1:25 (g/mL), 100 °C煎煮6 h, 提取率为28.11%。单酶酶解法: 胃蛋白酶酶解工艺为料液比1:30 (g/mL), pH 1.8, 加酶量4%, 酶解温度37 °C, 酶解4 h, 提取率为22.39%; 胰蛋白酶酶解工艺为料液比1:20 (g/mL), pH 8.0, 加酶量4%, 酶解温度55 °C, 酶解6 h, 提取率为20.99%。复合酶解酶解工艺: 先胃蛋白酶, 处理条件为料液比1:20 (g/mL), pH 1.8, 加酶量1%, 酶解温度37 °C, 酶解12 h; 后胰蛋白酶, 处理条件为料液比1:20 (g/mL), pH 8.0, 加酶量0.4%, 酶解温度37 °C, 酶解2 h, 提取率可达31.84%。按照复合酶解工艺, 对水提法最佳条件下提取后的鹿角盘进行复合酶解, 提取率仅为1.33%。利用水提和酶解的方法筛选出鹿角盘的最优提取条件, 制备工艺合理。由结果看出, 两个方法中得到的提取率差异不明显。复合酶解得到的提取物种类和含量多于水提法的种类和含量。

关键词 鹿角盘成分; 提取; 提取工艺; 优化; 提取率

Extraction of Deer Hard Antler Button Powder and Optimization of Its Extraction Procedure

GUAN Qing^{1,2}, ZHAO Haiping^{1,3}, LI Chunyi^{1,3*}

1. State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Institute of Special Animal and Plant Sciences of CAAS (Changchun 130112);

2. Animal Science and Technology College, Jilin Agricultural University (Changchun 130118);

3. Deer Antler Engineering Research Center of Jilin Province (Changchun 130112)

Abstract To explore the extraction conditions of deer hard antler button (DHAB), optimize the extraction procedures. Effects of water extraction method and enzymatic digestion method on the extraction rates of DHAB was studied by using orthogonal tests. Using the water extraction method, solid to liquid ratio was 1:25 (g/mL), extraction temperature 100 °C, extraction 6 h, the highest extraction rate of 28.11% was obtained. Single enzyme digestion to the optimum enzymolysis procedures of pepsin: solid to liquid ratio was 1:30 (g/mL), pH 1.8, enzymolysis 4 h, quantity of enzyme loading 4%, digestion temperature 37 °C, the extraction rate was 22.38%; The optimum enzymolysis procedures of trypsin: solid to liquid ratio was 1:20 (g/mL), pH 8, enzymolysis 6 h, quantity of enzyme loading 4%, digestion temperature 55 °C, extraction rate was 20.99%; Combined enzyme digestion process: solid to liquid ratio of pepsin was 1:20 (g/mL), pH 1.8, enzyme loading 1%, digestion temperature 37 °C, enzymolysis 12 h; After, solid to liquid ratio of trypsin was 1:20 (g/mL), pH 8.0, quantity of enzyme loading 0.4%, digestion temperature 37 °C, enzymolysis 2 h. The extraction rate was 31.84%. DHAB extracted under the best conditions of water extraction combined enzymolysis, the extraction rate was only 1.33%. Conclusion: the optimal extraction conditions of the DHAB were selected for water extraction and enzymatic digestion methods, and the extraction process was simple. Based on the results obtained by using these two methods, extraction rates were not significantly different. The specie and content of the extract obtained by the combined enzymolysis was more than that of the water extraction method.

Keywords deer hard antler button ingredient; extraction; extraction procedures; optimization; extraction rate

2015年版《中国药典》有记载: 鹿角盘是鹿科动物马鹿或梅花鹿等茸龄翌年春季脱落的角基^[1], 它含有矿物质元素、氨基酸、蛋白质、多肽、多糖、脂类、胆固醇和性激素等多种成分^[2]。在传统动物性中药里, 鹿角盘药用历史悠久, 不但具有温肾阳, 强筋骨, 行血消肿的功效^[3], 近年来还被多次报道具有治疗乳腺增生^[4], 抗炎镇痛^[5]等作用。

现阶段国内外对于鹿角盘的研究日益深入, 主要

归为两个方面: 一是研究鹿角盘某种成分的生物学活性^[6-7]; 二是通过对化学成分的研究进而探索鹿角盘的药理作用^[8-11]。实际生产中, 鹿角盘质地坚硬, 不易粉碎^[12], 药典中利用热浸法提取鹿角盘浸出物不得少于17%^[1], 可见其提取率不高。提取率低下, 很大程度上影响了鹿角盘的有效利用率, 造成了相当的浪费。

为此, 试验拟从鹿角盘提取的切入点出发, 采用不同的提取方法, 优化对鹿角盘成分的提取工艺, 所

得结果的应用将最大程度的获取鹿角盘中各种生物活性物质,有效提高鹿角盘的利用率。探究鹿角盘成分的提取条件,优化其提取工艺,为进一步分离、研究鹿角盘的药理作用奠定基础,对研发鹿角盘产品、临床应用和实际生产具有借鉴价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

梅花鹿鹿角盘,购于吉林省长春市双阳区鹿乡镇,经中国农业科学院特产研究所魏海军研究员鉴定为正品;胃蛋白酶(1:3 000)、胰蛋白酶(1:250)、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶,购于长春市华益生物科技有限责任公司;浓盐酸、氢氧化钠(均为国产分析纯)。

1.2 仪器与设备

鹿角盘粉碎机(中国双阳鹿乡镇自制);HK-08B流水式中药粉碎机(中国广州市旭朗机械设备有限公司);BFM-681“贝利”微粉机(中国济南倍力粉技术工程有限公司);PHS-3C pH计(中国上海仪电科学仪器股份有限公司);AKTA purifier中低压层析系统(层析柱为SuperdexTM75 10/300 GL凝胶过滤层析柱,美国GE公司);台式高速离心机(分析电子天平);电热恒温水浴锅;振荡器;电热恒温鼓风干燥箱等实验室常用设备及玻璃器皿。

1.3 鹿角盘超微粉的制备

将梅花鹿鹿角盘浸泡在清水中3 h,利用毛刷和手术刀片剔除干净鹿角盘表面稀疏细小孔洞中的杂质,清洁后65℃烘箱中烘干。用斧头将其劈成约4 cm²的小块,使用鹿角盘粉碎机粉至粗沙大小的颗粒,称之为粗粉。每次将20 g左右粗粉放入中药粉碎机内,选用200目筛子,使之粉碎成细粉。用微粉机分批次将细粉碾磨成超微粉,密封保存,备用。

1.4 水提法的提取工艺

利用水提法提取鹿角盘成分,通过单因素和正交试验相结合的方法优化提取工艺^[14]。

1.4.1 水提条件单因素试验

称取1 g鹿角盘超微粉,按设定条件(温度、料液比、水提时间)进行提取。水提过程中注意混匀液体,保持恒温,固定体积。待提取液冷却,5 000 r/min离心15 min,取出上清液,烘干残渣,利用减重法计算提取率。

$$\text{提取率} = \frac{\text{样品质量(g)} - \text{提取后烘干的样品质量(g)}}{\text{样品质量(g)}} \times$$

$$100\% \quad (1)$$

1.4.2 水提条件正交试验

以单因素试验为基础,利用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正

交试验表,以鹿角盘成分提取率为评价指标,对料液比、温度、提取时间和不同的溶剂等因素进行比较,因素水平见表1。利用Latin正交设计助手软件进行数据分析。

表1 水提条件正交试验的因素水平表

水平	因素			
	A料液比/ (g·mL ⁻¹)	B温度/℃	C时间/h	D溶剂
1	1:5	40	2	ddH ₂ O
2	1:15	80	4	PBS
3	1:25	100	6	NaCl

注:PBS: 0.01 mol/L磷酸缓冲液;NaCl: 0.9%生理盐水

1.5 酶解法的提取工艺

1.5.1 单酶筛选

选取胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、胰蛋白酶四种蛋白酶对鹿角盘成分进行酶解试验,蛋白酶条件的确定按照文献[14-16]中最适酶解条件而进行筛选。

1.5.2 胃蛋白酶提取工艺

1.5.2.1 胃蛋白酶提取工艺单因素试验

胃蛋白酶单因素条件筛选中,主要考察料液比、加酶量和酶解时间这3个单因素对鹿角盘成分提取率的影响。称取1 g鹿角盘超微粉,按设定条件(料液比、酶解时间、加酶量)进行提取。参比相关酶解文献^[17],设定pH 1.8,酶解温度37℃,注意100℃沸水灭酶活15 min,后续操作过程,提取率的计算同水提法相同。

1.5.2.2 胃蛋白酶提取工艺正交试验

以单因素试验为基础,利用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验表,对料液比、酶解时间、加酶量和酶解温度4个因素进行比较。因素水平见表2。利用Latin正交设计助手软件进行数据分析。

表2 胃蛋白酶提取工艺正交试验的因素水平表

水平	因素			
	E料液比/ (g·mL ⁻¹)	F酶解时间/h	G加酶量/%	H酶解温度/℃
1	1:20	2	1	35
2	1:30	4	2	37
3	1:40	6	4	39

1.5.3 胰蛋白酶提取工艺

1.5.3.1 胰蛋白酶提取工艺单因素试验

称取1 g鹿角盘超微粉,按设定条件(料液比、酶解时间、加酶量)进行提取。参照酶解文献的条件^[18],设定pH 8.0,酶解温度45℃,试验操作和提取率计算与胃蛋白酶的酶解相同。

1.5.3.2 胰蛋白酶提取工艺正交试验

以单因素试验为基础,利用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正

交试验表,对料液比、酶解时间、加酶量和酶解温度4个因素进行比较。因素水平见表3。利用Latin正交设计助手软件进行数据分析。

表3 胰蛋白酶提取工艺正交试验的因素水平表

水平	因素			
	E料液比/ (g·mL ⁻¹)	F酶解时间/h	G加酶量/%	H酶解温度/℃
1	1:5	2	1	45
2	1:10	4	2	50
3	1:20	6	4	55

1.5.4 复合酶解提取工艺

借鉴实际生产加工中鹿茸、鹿血等酶解工艺的条件和试验胃蛋白酶,胰蛋白酶单因素提取和正交试验的结果,综合选取复合酶解的条件^[19-21]。摸索酶解时间对胃蛋白酶和胰蛋白酶复合酶解的影响。

称取1 g鹿角盘超微粉,料液比1:20(g/mL)加入双蒸水(ddH₂O),混匀溶液加5 mol/L HCl调pH 1.8,加入1%胃蛋白酶,混匀溶液,37℃烘箱中酶解2、4、6、8和12 h 5个时间点的样品后,100℃沸水灭胃蛋白酶酶活15 min放置室温,加入10 mol/L NaOH调pH 8.0,加入0.4%胰蛋白酶,将上述试验样品在37℃下分别酶解1 h和2 h,5 000 r/min离心15 min,分别保留上清液和沉淀,烘干样品,减重法计算相对应时间点的复合酶解的提取率。

1.6 鹿角霜的复合酶解

将水提工艺中:料液比1:25(g/mL),温度100℃,水煎煮6 h后烘干的鹿角霜(鹿角去杂质高角块^[1])进行胃蛋白酶和胰蛋白酶的复合酶解。试验条件及过程同1.5.4。

1.7 凝胶过滤层析试验

进行凝胶过滤层析的仪器为G公司的AKTA purifier中低压层析系统,洗脱液为0.05 mol/L磷酸盐缓冲液,含0.3 mol/L氯化钠。流速设置为0.5 mL/min,进样量1 mL,样品为水提法和复合酶解中最佳提取工艺条件下得到的提取液,通过260 nm处紫外线吸收被选择性洗脱。

2 结果与分析

2.1 水提法提取结果

2.1.1 单因素条件对鹿角盘成分提取率的影响

如图1,随着料液比的下降,鹿角盘成分的提取率增长较为平缓,当料液比达到1:30(g/mL)时,提取率最高,随后陡然下降;温度的升高使鹿角盘成分的提取率逐渐提高,当温度达到100℃时,提取率最高且提高显著。40℃时提取率最低;鹿角盘成分的提取率随着时间的延长而升高,当时间超过6 h后,提取率提高程度减缓。利用单因素检验结果,选取料液

比1:5,1:15和1:25(g/mL);温度40℃、80℃和100℃;提取时间2、4和6 h,这3个因素的3个条件作为水提法正交试验的范围。

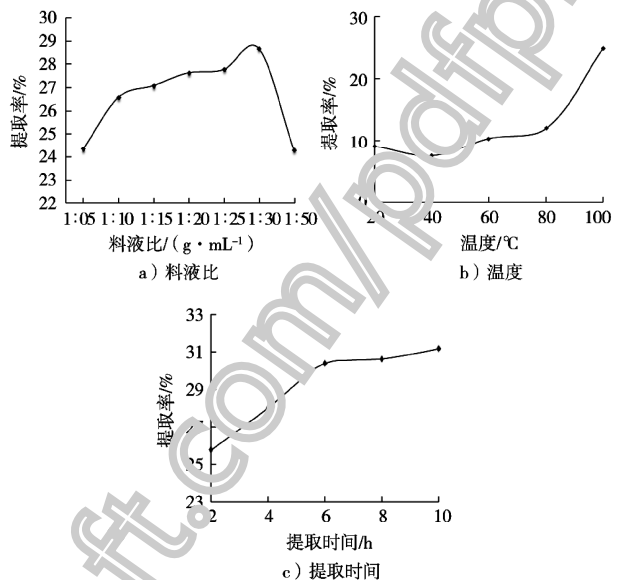


图1 水提法各因素分别对鹿角盘成分提取率的影响

2.1.2 水提条件正交试验结果

表4的正交试验结果表明,影响鹿角盘成分提取率的4个因素的重要性依次为B>C>D>A。提取的最佳组合为A₃B₃C₃D₁。即料液比1:25(g/mL),温度100℃,提取6 h,溶剂为水时,提取率最高。将正交试验结果进行方差分析,结果见表5。

表4 水提条件正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	ER提取率/%
1	1	1	1	1	10.59
2	1	2	2	2	16.80
3	1	3	3	3	29.58
4	2	1	2	3	10.81
5	2	2	3	1	18.85
6	2	3	1	2	24.48
7	3	1	3	2	13.09
8	3	2	1	3	17.20
9	3	3	2	1	28.67
K ₁	56.97	33.60	52.27	58.11	
K ₂	53.14	52.86	55.29	54.48	
K ₃	59.08	82.73	61.64	56.60	
R	2.10	49.16	9.37	3.63	

注:K代表各水平试验指标值总和;R代表极差

表5 水提条件正交试验方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F值
A	6.028	2	3.014	2.720
B	408.480	2	204.240	184.332
C	15.262	2	7.632	6.887
D	2.216	2	1.108	
误差	431.990	8		

其中B因素的差异最显著,也就是温度对提取的影响作用最大,料液比的影响最小。与上述极差分析的结果相一致。

2.1.3 验证试验

称取1 g鹿角盘超微粉,按照上述正交试验所得最佳的提取条件,即按照料液比1:25 (g/mL)加入ddH₂O,温度100℃,提取时间6 h,进行3次平行试验后,5 000 r/min离心15 min,取出上清液,烘干残渣,利用减重法计算提取率。3组样品的鹿角盘成分平均提取率最终为28.11%。

2.2 酶解法提取结果

2.2.1 四种单酶对鹿角盘成分提取率的影响

表6中,胃蛋白酶酶解鹿角盘的提取率最高,达到22.19%,复合蛋白酶酶解的提取率最低,仅有12.83%。胰蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解的提取率相对接近,其中胰蛋白酶的提取率更高一些。

表6 单酶酶解对鹿角盘成分提取率的影响

名称	胃蛋白酶	木瓜蛋白酶	复合蛋白酶	胰蛋白酶
pH	1.8	7	7	7
料液比/(g·mL ⁻¹)	1:20	1:20	1:20	1:20
酶解时间/h	4	4	4	4
加酶量/%	4	4	4	4
酶解温度/℃	37	50	50	50
ER提取率/%	22.19	16.83	12.83	18.84

2.2.2 单酶酶解结果

2.2.2.1 单酶酶解单因素条件对鹿角盘成分提取率的影响

对胃蛋白酶和胰蛋白酶的单因素条件料液比、酶解时间和加酶量进行比较。如图2(a)料液比,胃蛋白酶试验中,随着料液比的下降,鹿角盘成分提取率不断升高。当料液比为1:5 (g/mL)时,酶与底物不能充分结合,反应不完全,导致提取率较低。选择1:20,1:30和1:40 (g/mL)作为胃蛋白酶正交试验的料液比范围;胰蛋白酶料液比对提取率的影响,1:5~1:20 (g/mL)的范围稳步升高,随后越来越趋于平缓甚至下降,最高可达到19.30%,与胃蛋白酶的提取率差异明显。B酶解时间,胃蛋白酶的酶解时间使提取率的提升相对平缓,而胰蛋白酶酶解6 h的提取率是一个分界点,也是最高值,达到21.39%。考虑到酶解时间对鹿角盘的影响和实际生产利用率等问题,选择了2,4和6 h作为两个单酶酶解正交试验的选择范围。C加酶量:当加酶量达到4%时,两种单酶酶解的鹿角盘提取率均达到最高,均呈现先升高后下降的趋势。说明酶在反应体系中的总量逐渐饱和后,继续增大加酶量,鹿角盘的提取率也不会一直提高。由此结果选择1%,2%和4%的加酶量。

2.2.2.2 胃蛋白酶正交试验结果

根据胃蛋白酶单因素条件摸索的范围,以鹿角盘成分提取率为评价指标,得到胃蛋白酶最佳提取工艺。

表7正交试验的结果表明,利用胃蛋白酶酶解影响鹿角盘成分提取率的4个因素的重要性依次为E>G>F>H。即影响酶解程度的大小为:料液比>加酶量>酶解时间>温度。最佳组合为E₂F₃G₃H₂。即按照料液比1:30 (g/mL),酶解4 h,加酶量4%,酶解温度37℃作为胃蛋白酶最佳酶解的提取工艺条件。在最佳提取工艺条件下进行胃蛋白酶的酶解,提取率为22.39%。将正交试验结果进行方差分析,结果见表8。

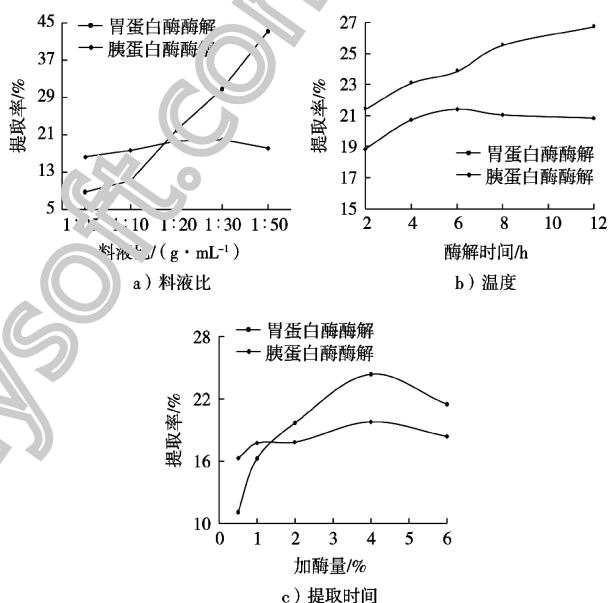


图2 单酶酶解各因素分别对鹿角盘成分提取率的影响

表7 胃蛋白酶提取工艺正交试验设计及结果

试验号	E	F	G	H	ER提取率/%
1	1	1	1	1	16.81
2	1	2	2	2	24.20
3	1	3	3	3	23.13
4	2	1	2	3	24.62
5	2	2	3	1	25.97
6	2	3	1	2	23.45
7	3	1	3	2	24.35
8	3	2	1	3	23.44
9	3	3	2	1	24.12
K ₁	64.13	65.78	63.69	66.90	
K ₂	74.04	73.61	72.94	71.99	
K ₃	71.91	70.70	73.45	71.19	
R	9.91	7.83	9.76	5.09	

注: K各水平试验结果指标值总和; R代表极差

表8 胃蛋白酶提取工艺正交试验方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F值
E	18.127	2	9.064	3.632
F	10.432	2	5.216	2.090
G	20.125	2	10.063	4.032
H	4.991	2	2.496	
误差	53.680	8		

2.2.2.3 胰蛋白酶正交试验结果

由表9得到胰蛋白酶酶解影响鹿角盘提取率的4个因素重要性的先后依次为H>E>F>G。也就是对胰蛋白酶的酶解来说,温度对酶解率的影响最大,其次为料液比,酶解时间,最弱的是加酶量。最佳组合为E₃F₃G₃H₃。即按料液比1:20(g/mL),酶解6h,加酶量4%,酶解温度55℃作为胰蛋白酶酶解提取工艺的最佳条件。在最佳提取工艺条件下进行胰蛋白酶的酶解,提取率为20.99%。将正交试验结果进行方差分析,结果见表10。

表9 胰蛋白酶提取工艺正交试验设计及结果

试验号	E	F	G	H	ER提取率/%
1	1	1	1	1	12.83
2	1	2	2	2	16.79
3	1	3	3	3	20.62
4	2	1	2	3	20.36
5	2	2	3	1	15.16
6	2	3	1	2	17.95
7	3	1	3	2	18.92
8	3	2	1	3	22.21
9	3	3	2	1	16.87
K ₁	50.24	52.11	52.99	44.87	
K ₂	53.46	54.16	54.01	53.65	
K ₃	58.00	55.44	54.70	63.19	
R	7.76	3.32	1.02	18.32	

注:K位各水平试验结果指标值总和;R代表极差

表10 胰蛋白酶提取工艺正交试验方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F值
E	10.134	2	5.067	0.181
F	1.874	2	0.937	0.033
G	0.489	2	0.244	0.009
H	55.979	2	27.989	
误差	68.480	8		

2.2.3 胃蛋白酶和胰蛋白酶复合酶解结果

2.2.3.1 酶解时间对胃蛋白酶和胰蛋白酶复合酶解的影响

由图3的结果可知,复合酶酶解中,胃蛋白酶酶解12h提取率最高,分别达到26.84%和30.03%,其次是酶解4h的时间点,提取率分别是26.34%和29.26%,胰蛋白酶酶解2h的提取率均高于酶解1h的提取率。在胃蛋白酶酶解12h后,胰蛋白酶酶解2h比胰蛋白酶酶解1h的提取率平均高出4%左右,同等胃

蛋白酶酶解4h和胰蛋白酶酶解2h比1h的提取率也平均高出3%左右。综合上述结果,最佳的复合酶酶解条件为胃蛋白酶酶解12h,胰蛋白酶酶解2h。

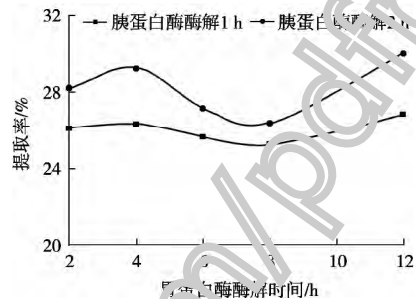


图3 复合酶酶解时间对鹿角盘成分提取率的影响

2.2.3.2 验证试验

称取10g鹿角盘超微粉,按照上述复合酶酶解的最佳提取条件,即料液比1:20(g/mL),酶解温度37℃,酶解时间为胃蛋白酶12h,胰蛋白酶2h,加酶量为胃蛋白酶1:100(g/mL),胰蛋白酶1:250(g/mL),酶解最佳pH为胃蛋白酶1.8,胰蛋白酶8.0,试验操作同1.5.4。进行3次平行试验后,3组样品的鹿角盘成分平均提取率最终为31.84%。这与2.2.3.1中复合酶酶解的提取率基本一致,说明通过复合酶酶解工艺的优化,参数准确、可靠,具有一定的实用价值。

2.3 不同提取方式的结果比较

对上述最佳提取工艺中水提、单酶酶解中的胃蛋白酶酶解、胰蛋白酶酶解和复合酶酶解4种提取方式的提取率进行比较。结果见图4。提取率高低为:复合酶酶解>水提>胃蛋白酶酶解>胰蛋白酶酶解。其中水提和复合酶酶解提取率相对较高,且差异不明显,两种单酶酶解提取率相近,胃蛋白酶酶解提取率高于胰蛋白酶酶解。

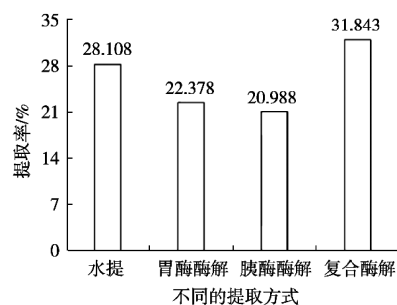


图4 不同提取方式鹿角盘成分提取率的比较

2.4 鹿角霜的复合酶酶解

鹿角霜的复合酶酶解条件和提取率结果见表11。

由此得出,经过最佳水提条件提取的鹿角霜在胃蛋白酶和胰蛋白酶复合酶解的优化工艺后的提取率很

低, 只有1.33%。

表11 复合酶解对鹿角霜提取率的影响

复合酶	pH	料液比/ (g·mL ⁻¹)	酶解时 间/h	加酶量/ %	酶解温 度/℃	ER提取 率/%
胃蛋白酶	1.8	1:20	12	1	37	1.33
胰蛋白酶	8.0	1:20	2	0.4	37	

2.5 凝胶过滤层析结果

从凝胶过滤层析结果中可以看出(图5), 水提和复合酶酶解水溶性成分提取物被洗脱分离, 且水提洗脱分离在复合酶酶解之前, 成分和含量均有所差异, 复合酶酶解的提取物成分和种类明显多于水提法提取物。

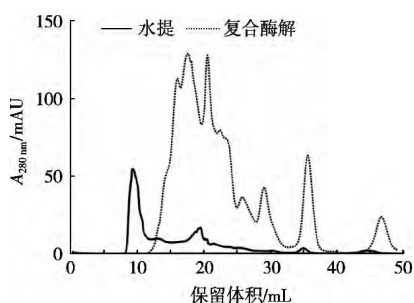


图5 水提和复合酶解的水溶性提取物凝胶过滤层析色谱图

3 讨论

试验主要通过水提法和酶解法对鹿角盘成分进行了提取, 并对其提取工艺进行了优化。水提法是实验室和生产加工普遍使用的方法, 在不添加任何化学物质的前提下提取鹿角盘中的活性成分。酶解法条件温和, 效率高, 不破坏任何氨基酸, 且保留更多营养成分。由单因素分析和正交试验结果看出, 鹿角盘成分的提取受多种因素的影响。因此, 针对临床应用、生产开发等不同研究目标, 选择不同的试验方法, 合理的提取工艺, 优化每种提取工艺的条件, 会极大的提高鹿角盘成分的利用率。

试验中选取胃蛋白酶和胰蛋白酶进行复合酶解的原因有三点: 一是在四种单酶的筛选中, 两种蛋白酶的提取率高于复合蛋白酶和木瓜蛋白酶。二是利用胃蛋白酶和胰蛋白酶先后进行酶解的过程运用了化学仿生, 模拟胃、胰的酸碱环境^[22]。胃蛋白酶在胃液中可以把蛋白质消化分解成多肽, 胰蛋白酶进而将多肽水解为小肽, 进而分解为氨基酸^[23]。复合酶解能够促使鹿角盘成分溶出, 提高产物获得率, 不仅具有借鉴价值, 更适用于工业生产和产品的开发。三是探索鹿角盘中酶酶解和仿生酶解法在实际生产中的条件, 作用效果、发展和转化等问题, 为以后建立鹿角盘在食

品, 保健中的酶解工艺上探路。这一研究有着广阔的应用前景和空间, 值得进一步完善和推广。

对于最佳水提条件下得到的鹿角霜再进行胃蛋白酶和胰蛋白酶的最佳工艺复合酶解后, 提取率已经很低, 只有1.33%。这主要有两种可能: 一是在试验的最佳水提条件下, 能够提取出的鹿角盘成分中大多数水溶性成分已经被提出, 再不需要酶解。二是有可能水提的长时间加热造成了营养物质的破坏, 其中的蛋白质遭到了破坏, 再利用酶解的作用甚小。这一方法和结果在其它文献和试验中未见报道。下一步研究可从基因、细胞或蛋白水平进行探索讨论。在更注重健康和养生的今天, 人们虽然开始利用鹿角盘进行保健和治疗疾病的意识, 却缺少明确的参考标准该如何食用鹿角盘。如果能在开水冲泡、煎煮的最普遍的用法中直接有效的利用鹿角盘, 或者利用酶解工艺, 将鹿角盘加工后具有最大化的疗效, 这对实际生活和生产用药中具有重大的借鉴意义。

另外, 与其他对鹿角盘提取工艺研究不同的是, 试验没有对鹿角盘某一单体成分如蛋白质、多肽进行分析研究。传统提取方法多数是依据单体成分的化学性质, 选择适合的溶剂、条件进行提取。虽然对认识酶解药物中化学成分和药理作用极其有利, 但往往忽略了药物成分间的关联性, 一定程度上不能更好的体现动物性中药成分的综合作用。鹿角盘作为传统动物性中药, 治疗腮腺炎、乳腺增生、乳房肿痛等药效经受了上千年的考验, 而这并不只是某一单体成分起了作用, 不能以传统提取法的单体成分为主线的“唯成分论”作为凭证^[24]。经过水提和酶解两种方法的研究和对其中单因素的细致研究, 找取最佳条件和提取工艺, 尽所能的将鹿角盘中的各种活性成分极大程度的提取出来, 使鹿角盘自身发挥更大的作用, 不仅为下一步试验提供数据参考, 更为鹿角盘在生产和临床上的实际应用研究奠定了理论基础。

4 结论

试验主要对鹿角盘成分进行提取, 找取最佳的提取方法、优化提取条件。利用水提和酶解的方法筛选出鹿角盘的最优提取条件, 制备工艺合理。水提法条件为料液比1:25 (g/mL), 100℃煎煮6 h, 提取率为28.11%。单酶酶解酶解工艺: 胃蛋白酶条件为料液比1:30 (g/mL), pH 1.8, 加酶量4%, 酶解温度37℃, 酶解4 h, 提取率为22.39%; 胰蛋白酶条件为料液比1:20 (g/mL), pH 8.0, 加酶量4%, 酶解温度55℃, 酶解6 h, 提取率为20.99%。复合酶解酶解工艺: 按照先胃蛋白酶处理, 条件为料液比1:20 (g/mL), pH 1.8, 加酶量1%, 酶解温度37℃, 酶解12 h; 后胰蛋白酶处理, 条件为料液比1:20 (g/mL),

pH 8.0, 加酶量0.4%, 酶解温度37℃, 酶解2 h的最适工艺, 提取率可达31.84%。另外, 对水提法最佳条件下提取后的鹿角霜进行复合酶解, 提取率仅为1.33%。由结果看出2个方法中得到的提取率差异不明显。但是复合酶解得到的提取物种类和含量明显多于水提法的种类和含量。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典, I 部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 321.
- [2] 张旭霞, 田玉华, 齐琳, 等. 梅花鹿鹿角脱盘化学成分的研究[J]. 吉林畜牧兽医, 2013, 34(8): 11-16.
- [3] 张艳霞, 孙冬梅. 鹿源系列中药材的特点及应用[J]. 中国民间疗法, 2010, 18(9): 61-62.
- [4] 宋易华, 马云龙, 葛建立, 等. 乳康方对乳腺增生大鼠雌孕激素紊乱的作用[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2012, 18(3): 258-260.
- [5] 张程程. 鹿角盘提取物抗炎作用的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2011.
- [6] 苏凤艳, 李慧萍, 王艳梅, 等. 鹿花盘蛋白质的提取与生物活性测定[J]. 动物科学与动物医学, 2001, 18(2): 18-20.
- [7] 田玉华. 梅花鹿角脱盘蛋白多肽的分离纯化及活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [8] 胡薇, 田玉华, 孟星宇, 等. 梅花鹿鹿角脱盘总肽的分离纯化及其抗肿瘤活性研究[J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(7): 96-100.
- [9] 黄凤杰, 吉静娴, 钱璟, 等. 鹿角脱盘多肽的分离纯化及其降糖活性的研究[J]. 药物生物技术, 2010, 17(2): 151-155.
- [10] 曹胜男, 包海鹰, 张媛, 等. 鹿角盘不同提取部位对亚磷酸酰胺致小鼠骨质疏松的防治作用[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(4): 597-599.
- [11] 牛放, 赵雨, 杨菲, 等. 梅花鹿鹿角脱盘提取物抗疲劳作用研究[J]. 食品科技, 2011, 36(11): 218-220.
- [12] WU F F, LI H Q, JIN L J, et al. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: A review of its traditional uses, chemistry and pharmacology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 145(2): 403-415.
- [13] 刘少华, 范宁, 李梁, 等. 响应曲面法优化梅花鹿鹿角盘胶原蛋白提取工艺[J]. 吉林中医药, 2014, 134(10): 1027-1030.
- [14] 王志兵, 邱慧萍, 解耸林, 等. 鹿角盘水溶性成分提取方法的研究和提取工艺的优化[J]. 食品科技, 2007, 32(9): 129-131.
- [15] 徐明, 王喜成. 酶解法制备鹿茸多肽的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 205-207.
- [16] 皮钰珍, 王雨施, 何建斌, 等. 梅花鹿鹿角盘多肽双酶水解工艺及优化研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 204-208.
- [17] 皮钰珍, 刘长江, 王淑琴, 等. 双酶水解法制备鹿胎盘活

性多肽[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(9): 168-171.

- [18] 卫功庆, 刘少华, 范宁, 等. 响应曲面法优化鹿角盘胶原蛋白酶解提取工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(6): 205-214.
- [19] 于文影. 鹿角脱盘多肽的制备及其生物活性的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [20] 徐云凤, 赵雨, 张鹤, 等. 酶解法制备鹿角盘胶原蛋白的工艺[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1): 12-14.
- [21] 杨吉平, 张鹤, 董颖, 等. 双酶法制备梅花鹿鹿茸胶原蛋白的工艺研究[J]. 食品科技, 2014, 39(2): 244-248.
- [22] 王秀丽, 王玉蓉, 赵韶华, 等. 仿生酶解法在通心络虫类药物提取中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2013, 31(7): 1508-1511.
- [23] 王雨施. 梅花鹿角盘多肽的制备及其生物活性的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [24] 刘光瑞, 刘少华. 中国民间中草药[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2003.

信息

冰激凌融化不可再冻 或引发食物中毒

据英国《每日邮报》报道, 英国阿斯顿大学生物科学系的Amreen Bashir讲师警告称, 大多数人并未意识到甜点是一种危险物。在文中, 她介绍了如何降低因食用冰淇淋和水果而患病的风险。

食用冰激凌除了存在糖尿病和肥胖症等风险外, 确实有可能使人患病。事故发生在2015年的美国堪萨斯州首府托皮卡, 在食用了被李斯特菌污染的冰淇淋后, 5人住院, 3人死亡。在该事件中, 李斯特菌自美国蓝铃公司已存在了, 处于每克含1个和10个菌落形成单位(CFU)的水平上, 这实际上大大低于英国冷冻甜品的最大允许值, 即每克含100 CFU。然而, 如果冰淇淋融化后再次冷冻, 售出后也会造成危险。因为将冰激凌从冰箱里取出来融化后, 将其再次放回冰箱, 最后再取出食用。在室温下, 冰淇淋迅速融化, 而这种含乳、含糖液体混合物正是李斯特菌等细菌的完美培养基。

最好的方法是避免将盛冰淇淋的纸杯全部置于外面, 取出所食用量后, 立即将剩余量放回冰箱。商业生产的冰淇淋通常是用巴氏杀菌的鸡蛋制作的, 所以建议在自制冰淇淋时只使用巴氏杀菌奶和奶油。即便如此, 使用巴氏杀菌产品仍然存在安全隐患。

来源: 环球网 2018-08-03