

超声辅助酶解制备金钱白花蛇源 ACE 抑制肽工艺优化

朱俊吉, 宋美莹, 白秀林, 牛家耀, 许佳, 罗婕宁, 闻崇炜*
(江苏大学药学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 目的 优化超声辅助酶解制备金钱白花蛇源血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制肽工艺。方法 以醇溶蛋白质 (BmESPs) 为底物, 筛选蛋白酶。在单因素试验基础上, 以超声功率、超声时间、酶底比、酶解时间为影响因素, ACE 抑制率为评价指标, 响应面法优化制备工艺。再对酶解产物进行 SDS-PAGE 表征, 并测定其 IC_{50} 值。结果 最佳条件为超声功率 240 W, 超声时间 25 min, 酶底比 7%, 酶解时间 3.1 h, ACE 抑制率为 80.65%。25 kDa 以上的 BmESPs 可被充分水解, 其 IC_{50} 值为 0.32 mg/mL。结论 该方法稳定可靠, 可为金钱白花蛇开发利用及其药效物质基础研究提供参考。

关键词: 金钱白花蛇; 血管紧张素转化酶 (ACE); 抑制肽; 超声辅助酶解; 制备工艺; 响应面法

中图分类号: TQ464.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-0966-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.036

蛋白质是一切生命的物质基础, 也是人体必需的营养素和生命活动的重要调节剂, 还是生物活性肽的重要来源, 经蛋白酶水解、酸碱处理、微生物发酵等过程可释放出具有免疫调节、抗肿瘤、降血压、降胆固醇等生理功能的生物活性肽^[1-3], 其中血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制肽通过抑制 ACE 活性, 阻断血管紧张素合成, 延迟缓激肽降解, 从而发挥降血压作用, 而且安全性高, 副作用少, 备受研究人员关注^[4-5]。目前, 已从麦芽、刺参、南极磷虾、南瓜籽、青刺果、桑叶等诸多食源性或药源性蛋白质中制得 ACE 抑制肽, 均具有较强的生物学活性^[6-11]。

金钱白花蛇为眼镜蛇科动物银环蛇 *Bungarus multicinctus* Blyth 的幼蛇干燥体, 具有祛风、通络、止痉功效, 临床用于治疗风湿顽痹、半身不遂、破伤风等^[12], 含有氨基酸、核苷酸、微量元素、脂类等小分子成分, 也富含蛋白质类大分子成分, 但这些蛋白质分子结构复杂, 提取分离困难, 至今尚无对其资源开发利用的系统报道。因此, 本实验优化超声辅助酶解制备金钱白花蛇源 ACE 抑制肽工艺, 以期为该药材开发利用及其药效物质基础研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器 VE-180 垂直电泳槽 (上海天能科技有

限公司); Flex-200 酶联免疫分析仪 (杭州奥盛仪器有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); KQ-250DB 数控超声波清洗器、傅立叶红外光谱仪 (美国尼高力仪器公司); UV-2550 紫外分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); H1650-W 离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 凝胶成像系统 (深圳勤翔科技有限公司); SHZ-82 气浴恒温振荡箱 (江苏中大仪器科技有限公司); ALPHA-1-1LD 冷冻干燥机 (德国 Marin Christ 公司)。

1.2 试剂与药材 木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶 (上海庞博生物科技有限公司); 碱性蛋白酶 (山东隆科特酶制剂有限公司); 酸性蛋白酶 (南宁东恒华道生物科技有限责任公司); 胰蛋白酶、菠萝蛋白酶 (国药集团化学试剂有限公司); 蛋白质分子量标准品、牛血清白蛋白 (上海生工生物工程股份有限公司); 马尿酸-组氨酰-亮氨酸 (HHL, 美国 Sigma 公司); 其他化学、生物试剂均购自国药集团化学试剂有限公司、上海阿拉丁生化科技股份有限公司、生工生物工程 (上海) 股份有限公司、加拿大 Bio Basic Inc 公司、美国 Amresco 公司。新鲜猪肺购自沈阳爱生鲜电子商务有限公司。金钱白花蛇购自亳州中药材市场, 经亳州学院汤建教授鉴定为正品, 符合 2020 年版《中国药典》规定。

收稿日期: 2025-12-07

基金项目: 江苏省镇江市重点研发计划 (社会发展) (SH2021010, SH2024096); 大学生实践创新训练计划 (202410299973X); 江苏大学第二十三批大学生科研项目 (Y23A183)

作者简介: 朱俊吉 (2000—), 男, 硕士, 研究方向为分子生药学。E-mail: zhu_junji0212@163.com

* 通信作者: 闻崇炜 (1971—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为分子生药学。E-mail: wenchw@ujs.edu.cn

2 方法与结果

2.1 醇溶蛋白质提取 参照刘梦等^[13]报道的方法,并略作修改。药材粉碎,过70目筛,称取适量粉末,室温下按料液比1:35加入40%乙醇,超声(功率180 W)提取24 min,12 000 r/min离心10 min,保留上清液,以牛血清白蛋白为标准,采用Bradford法定量。

2.2 ACE提取及其抑制率测定 参照吴琼英等^[14]报道的方法制备ACE,并略作修改。新鲜猪肺剪成小碎块,加入适量组织缓冲液(含0.9% NaCl的0.5% Triton X-100溶液),4℃匀浆后静置6 h,8 000 r/min离心15 min得粗酶液,分别以36%、64%饱和度硫酸铵分段盐析,收集沉淀,透析袋(分子量8 000~14 000 Da)透析5次,每间每隔6 h换新鲜透析液至无剩余 SO_4^{2-} ,即得(比酶活为0.003 6 U/mg)。

参照Ko等^[15]的方法测定ACE抑制率,并略作修改。吸取ACE 20 μL ,加入20 μL 样品、40 μL 含0.005 mol/L HHL的基础缓冲液(含0.3 mol/L NaCl的0.1 mol/L 硼酸溶液),37℃水浴15 min,加入120 μL 1 mol/L HCl终止反应,再加入800 μL 乙酸乙酯萃取生成的马尿酸,充分涡旋混匀,10 000 r/min离心10 min,吸取600 μL 上清,沸水浴至溶剂完全挥发,冷却后加入100 μL ddH₂O充分混匀至完全溶解,作为样品组;空白组除补加20 μL 基础缓冲液外,其他操作同上。HPLC法测定马尿酸含量,色谱条件为WondaSil C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相超纯水(含0.1%甲酸)(A)-乙腈(含0.1%甲酸)(B),梯度洗脱(0~10 min, 10% B; 10~50 min, 10%~42% B);体积流量0.5 mL/min;柱温30℃;检测波长228 nm;上样量20 μL ,抑制率计算公式为抑制率= $[(A_a - A_b) / A_a] \times 100\%$,其中 A_a 、 A_b 分别为空白组、样品组马尿酸峰面积。

2.3 蛋白酶种类筛选 取样品适量,按酶底比6%分别加入木瓜蛋白酶(最适pH 6.5,最适温度55℃)、中性蛋白酶(最适pH 6.5,最适温度55℃)、酸性蛋白酶(最适pH 3.5,最适温度50℃)、碱性蛋白酶(最适pH 9.5,最适温度50℃)、胰蛋白酶(最适pH 6.5,最适温度37℃)、菠萝蛋白酶(最适pH 8.0,最适温度55℃)、风味蛋白酶(最适pH 6.5,最适温度50℃)进行酶解反应,制备ACE抑制肽,测定其抑制率,结果见图1。由此可知,木瓜蛋白酶解产

物ACE抑制率最高(63.35%),故选择其进行后续研究。

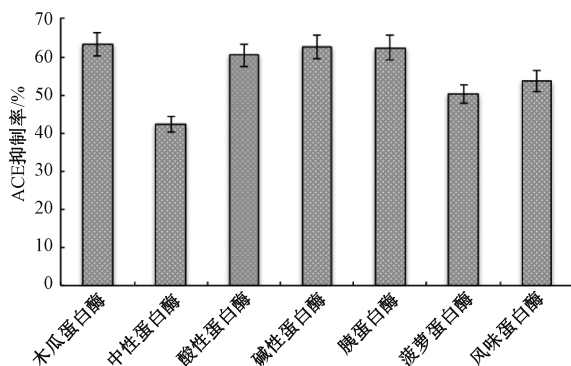


图1 蛋白酶种类对ACE抑制率的影响

2.4 超声方式筛选 分别考察超声前加酶(调节pH至6.5,先按酶底比6%加入木瓜蛋白酶,在55℃下酶解一段时间后进行超声)、不超声、超声预处理对ACE抑制率的影响,结果见图2。由此可知,超声前加酶时ACE抑制率最高(63.97%),故选择其进行后续研究。

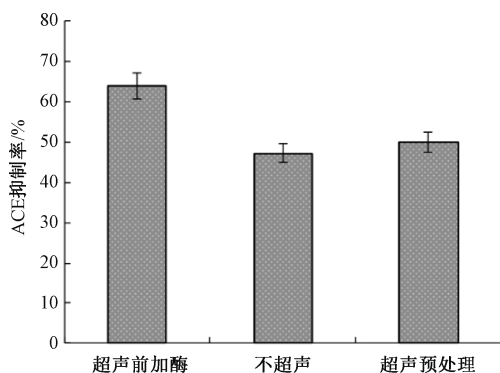


图2 超声方式对ACE抑制率的影响

2.5 单因素试验 固定超声时间25 min、酶底比6%、酶解时间3.5 h,考察超声功率对ACE抑制率的影响,发现随着超声功率增加ACE抑制率呈升高趋势,为250 W达到最大值71.65%,之后反而降低,故将其中心点设置为250 W,见图3A。固定超声功率250 W、酶底比6%、酶解时间3.5 h,考察超声时间对ACE抑制率的影响,发现随着超声时间延长,ACE抑制率缓慢升高,为25 min时达到最大值68%,之后反而降低,故将中心点设置为25 min,见图3B。固定超声功率250 W、超声时间25 min、酶解时间3.5 h,考察酶底比对ACE抑制率的影响,发现随着酶底比增加,ACE抑制率升高,为6%时达到最大值70%,之后反而降低,故将其中心点设置为6%,见图3C。固定超声功率250 W、超声时间25 min、酶底比6%,考

察酶解时间对 ACE 抑制率的影响,发现随着酶解时间延长,ACE 抑制率缓慢升高,为 3.5 h 时达到最大值 70.5%,之后反而降低,故将其中心点设置为 3.5 h,见图 3D。

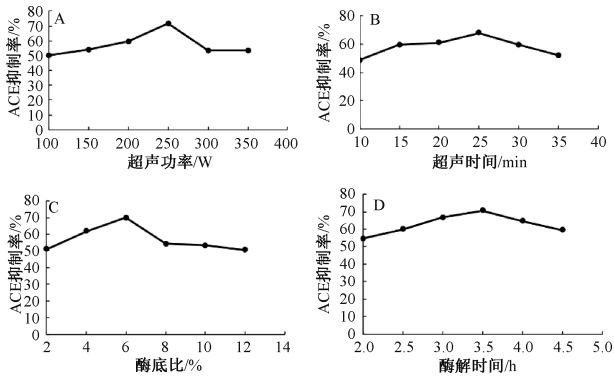


图 3 单因素试验结果

2.6 响应面法 在单因素试验基础上,以超声功率(A)、超声时间(B)、酶底比(C)、酶解时间(D)为影响因素,ACE 抑制率(Y)为评价指标,采用 Design Expert 软件进行四因素三水平设计,因素水平见表 1,结果见表 2。

表 1 响应面法因素水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 超声功率/W	200	250	300
B 超声时间/min	20	25	30
C 酶底比/%	4	6	8
D 酶解时间/h	3	3.5	4

对表 2 结果进行回归,得方程为 $Y = 78.29 - 4.96A - 0.94B + 3.82C - 0.51D - 2.28AB + 0.49AC - 1.62AD + 0.96BC + 1.69BD - 4.24CD - 11.49A^2 - 1.69B^2 - 4.52C^2 - 2.20D^2$, 方差分析见表 3。由此可知,模型 $P < 0.01$, 具有高度显著性;失拟项 $P > 0.05$, 表明模型拟合良好;因素 A、C、AB、CD、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 有显著或极显著影响 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

响应面分析见图 4。最终确定,最优工艺为超声功率 241.822 W, 超声时间 24.444 min, 酶底比 7.658%, 酶解时间 3.076 h, ACE 抑制率为 80.704%。

2.7 验证试验 根据实际情况,将“2.6”项下优化工艺修正为超声功率 240 W, 超声时间 25 min, 酶底比 7%, 酶解时间 3.1 h, 并进行验证试验。结果,ACE 抑制率为 80.65%, 与预测值 80.704% 接近,表明该工艺稳定可行,具有较好的指导意义。

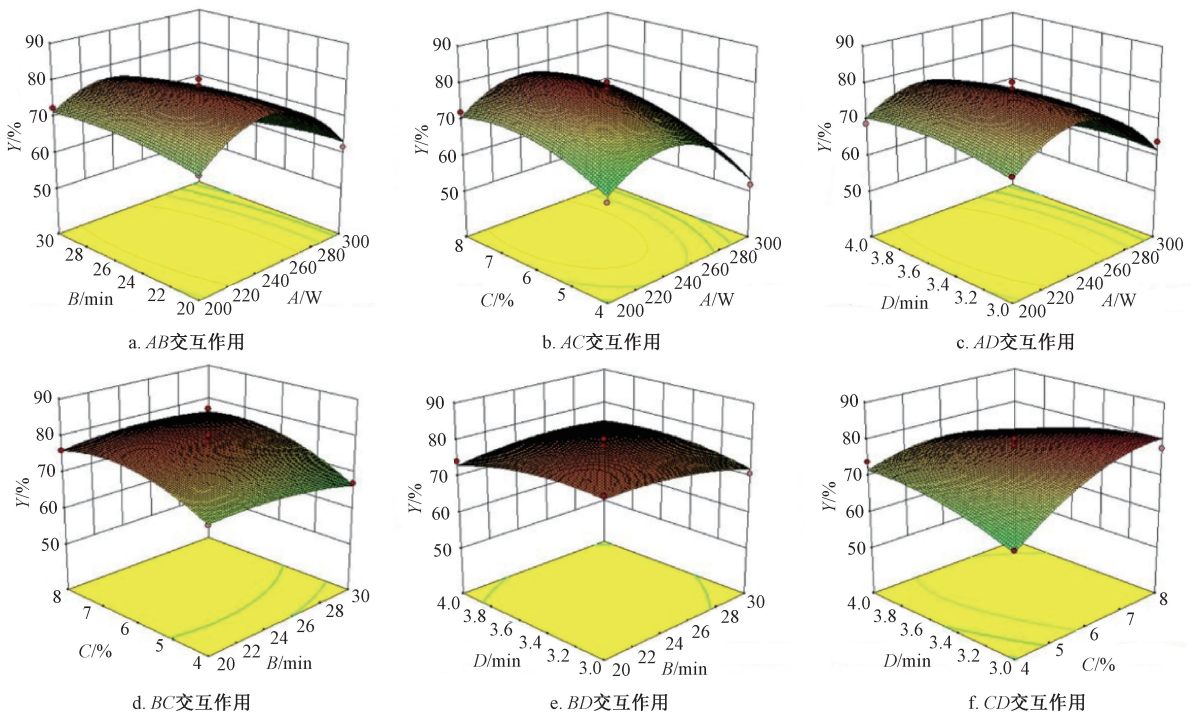
表 2 响应面法设计与结果

试验号	A 超声	B 超声	C 酶底	D 酶解	Y ACE 抑
	功率/W	时间/min	比/%	时间/h	制率/%
1	250	20	4	3.5	70.18
2	200	25	6	3.0	69.12
3	300	25	4	3.5	51.84
4	300	25	6	3.0	64.00
5	200	25	8	3.5	72.18
6	300	25	6	4.0	57.46
7	250	30	6	4.0	73.82
8	250	25	6	3.5	80.41
9	250	30	6	3.0	71.00
10	250	25	6	3.5	78.11
11	300	20	6	3.5	61.71
12	250	30	4	3.5	67.24
13	200	20	6	3.5	68.71
14	250	25	6	3.5	78.23
15	250	25	8	4.0	70.00
16	250	20	6	3.0	78.26
17	250	25	8	3.0	77.71
18	300	25	8	3.5	63.3
19	250	25	6	3.5	76.11
20	250	25	4	3.0	64.68
21	200	25	4	3.5	62.70
22	250	25	6	3.5	78.60
23	200	30	6	3.5	72.53
24	250	20	8	3.5	76.18
25	200	25	6	4.0	69.06
26	250	30	8	3.5	77.06
27	250	25	4	4.0	73.94
28	300	30	6	3.5	56.42
29	250	20	6	4.0	74.33

表 3 方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 494.51	14	106.75	31.01	<0.000 1
A	295.72	1	295.72	85.91	<0.000 1
B	10.64	1	10.64	3.09	0.100 5
C	175.19	1	175.19	50.90	<0.000 1
D	3.16	1	3.16	0.92	0.354 1
AB	20.75	1	20.75	6.03	0.027 8
AC	0.98	1	0.98	0.28	0.602 0
AD	10.50	1	10.50	3.05	0.102 6
BC	3.65	1	3.65	1.06	0.320 7
BD	11.39	1	11.39	3.31	0.090 3
CD	72.00	1	72.00	20.92	0.000 4
A^2	856.87	1	856.87	248.94	<0.000 1
B^2	18.58	1	18.58	5.40	0.035 7
C^2	116.94	1	116.94	33.97	<0.000 1
D^2	31.39	1	31.39	9.12	0.009 2
残差	48.19	14	3.44	—	—
失拟项	38.81	10	3.88	1.66	0.331 4
纯误差	9.38	4	2.34	—	—
总和	1 542.70	28	—	—	—

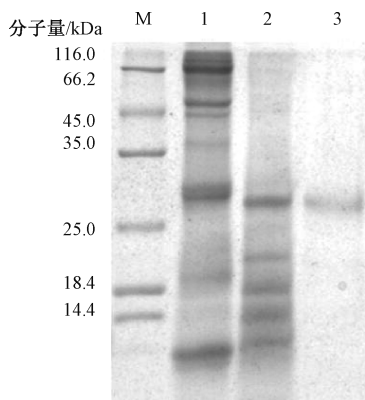
注: $R^2 = 0.968 8$, $R_{Adj}^2 = 0.937 5$ 。



注：A、B、C、D、Y分别为超声功率、超声时间、酶底比、酶解时间、ACE抑制率。

图4 各因素响应面图

2.8 SDS-PAGE 分析 参照刘梦等^[13]报道的方法，酶解产物中加入三氯乙酸至终浓度为10%，涡旋混匀，室温静置10 min，12 000 r/min离心15 min，弃上清，在沉淀中加入适量预冷丙酮，-20℃静置40 min，12 000 r/min离心15 min，沉淀中加入适量裂解液，-20℃裂解4 h，加入适量上样缓冲液进行分析，结果见图5。由此可知，优化后样品中25 kDa以上蛋白质酶解充分，酶解产物分子量均小于20 kDa。



注：M、1~3分别为蛋白质标准品、酶解前样品、酶解后样品、木瓜蛋白酶。

图5 样品 SDS-PAGE 分析图

2.9 IC₅₀值测定 制备系列质量浓度酶解后样品，按“2.2”项下方法测定ACE抑制率。结果，样品

质量浓度为0.2~0.7 mg/mL时ACE抑制率升高，0.7 mg/mL后趋于平稳，回归方程为 $Y = -108.87X^2 + 188.02X - 0.4051$ ($R^2 = 0.9953$)，其中X为酶解后样品质量浓度，Y为ACE抑制率，再测得其IC₅₀值为0.32 mg/mL。

3 讨论与结论

生物活性肽是药源性或食源性蛋白质发挥作的功能形式，超声法可通过空化效应与热效应来物理断裂蛋白质肽键，产生不同于专属性酶解法的新型生物活性肽，并可与酶解相结合，提高蛋白质水解度与活性肽多样性，而且其效率与其功率、时间直接相关，并影响酶解法效率。文献[16-20]以针菇、竹节虾、小麦、辣木籽等食源性蛋白质为对象，考察了超声法制备高活性抗氧化肽与ACE抑制肽的可行性，但鲜有涉及药源性活性肽。本实验优化超声辅助酶解制备金钱白花蛇源血管紧张素转换酶抑制肽工艺，发现在超声功率240 W、超声时间25 min、酶底比为7%、酶解时间3.1 h条件下可产生具有较高ACE抑制率(80.65%)的活性肽产物，其IC₅₀值为0.32 mg/mL，可为该药材开发利用及其药效物质基础研究提供依据，也能为其他药源性蛋白质的精加工提供思路。

参考文献：

[1] 胡子聪, 于阿立, 刘香云, 等. 食物蛋白源生物活性肽的

- 研究进展[J]. 食品工业, 2022, 43(6): 271-276.
- [2] 李子健, 刘秀丽, 裴 乐, 等. 生物活性肽的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(12): 20-24.
- [3] Sun J T, Chen Y L, Yang Y, *et al.* Research progress on bioactive peptides from animal sources: A comprehensive review[J]. *Food Chem*, 2025, 490: 14006.
- [4] Guo X R, Shen L. Potentials of food-derived peptides as novel antihypertensive agents and their acting mechanisms[J]. *Food Chem*, 2025, 494: 146183.
- [5] 王晓丹, 薛 璐, 胡志和, 等. ACE抑制肽构效关系研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 305-310.
- [6] 张月圆, 刘 露, 陈佩瑶, 等. 麦芽蛋白质组成分析及其酶解物ACE抑制活性[J]. 中成药 2018, 40(3): 642-646.
- [7] 华 鑫, 孙乐常, 万楚君, 等. 刺参ACE抑制肽制备及降压功效分析[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 125-130.
- [8] 李 爽, 刘小芳, 李福后, 等. 南极磷虾ACE抑制肽的酶解制备工艺优化及其稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(21): 243-250.
- [9] 何海艳, 刘梦婷, 杨爱萍, 等. 南瓜籽蛋白源血管紧张素转化酶抑制肽的制备及其降血压活性[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 214-220.
- [10] 张 璐, 甘雨嫣, 钟玉旺, 等. 青刺果ACE抑制肽的分离纯化、结构鉴定及其体外活性评价[J]. 中国食品学报, 2024, 24(7): 321-331.
- [11] 贾漫雨, 范 伟, 李 娜, 等. 桑叶蛋白血管紧张素转换酶抑制肽的酶解制备[J]. 蚕业科学, 2021, 47(4): 351-357.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [13] 刘 梦, 谢 超, 张林松, 等. 响应面法优化金钱白花蛇毒溶蛋白提取工艺[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(2): 73-77.
- [14] 吴琼英, 马海乐, 崔恒林, 等. 猪肺血管紧张素转化酶的提取纯化及其性质研究[J]. 食品科学, 2004, 25(9): 71-74.
- [15] Ko J Y, Kang N, Lee J H, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from an enzymatic hydrolysate of flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) muscle as a potent anti-hypertensive agent[J]. *Process Biochem*, 2016, 51(4): 535-541.
- [16] 王广慧, 杨志雨, 孟涓涓, 等. 响应面优化超声波预处理辅助酶解法制备金针菇抗氧肽[J]. 中国饲料, 2024(11): 39-46.
- [17] 黄湛媛, 李 丽, 熊宇飞, 等. 超声辅助竹节虾头酶解及抗氧化肽分离研究[J]. 核农学报, 2017, 31(8): 1556-1566.
- [18] 张 曼, 张国治, 张康逸, 等. 超声辅助酶解法制备小麦ACE抑制肽及其稳定性研究[J]. 轻工学报, 2024, 39(5): 29-39.
- [19] 钟玉旺, 安姝璇, 王雪峰, 等. 超声波辅助酶法制备辣木籽ACE抑制肽工艺优化[J]. 中国油脂, 2023, 48(3): 47-51; 89.
- [20] 杨志雨, 王广慧, 孟涓涓, 等. 响应面优化超声波辅助酶解法制备金针菇ACE抑制肽[J]. 湖北农业科学, 2024, 63(11): 153-159; 167.

生津利咽方提取工艺优化

赵雪琛¹, 方婷婷², 谢 凡³, 孙羽亭³, 刘文静³, 杨 莉², 谷丽华^{2*}, 李文艳^{3*}

(1. 上海大学医学院, 上海 200444; 2. 上海中医药大学中药研究所中药标准化教育部重点实验室, 国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海 201203; 3. 上海浦东新区公利医院药剂科, 上海 200135)

摘要: 目的 优化生津利咽方提取工艺。方法 在单因素试验基础上, 以加水量、提取时间、提取次数为影响因素, 梓醇、安格洛昔 C、哈巴俄昔、甘草昔、甘草酸铵峰面积及浸膏得率的综合评分为评价指标, 层次分析法(AHP)结合 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。结果 最佳条件为加水量 10 倍, 提取时间 1.5 h, 提取次数 3 次, 综合评分为 85.7 分。结论 该方法稳定可行, 可用于提取生津利咽方。

关键词: 生津利咽方; 提取工艺; 层次分析法(AHP); Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-0970-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.037

收稿日期: 2025-08-24

基金项目: 上海市浦东新区卫生健康委员会临床药学重点学科项目(PWZxk2022-26); 上海市浦东新区中医药科技创新项目(PDZY-2024-1408)

作者简介: 赵雪琛(1999—), 女, 硕士在读, 从事中药分析研究。E-mail: zhaoxc1231@163.com

* **通信作者:** 李文艳(1971—), 女, 硕士, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药新药、临床药学研究。E-mail: liwenyan_linda@163.com
谷丽华(1980—), 女, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药活性成分及其质量标准研究。E-mail: gulihua1228@163.com