

[ 8 ] 成 蕾, 陈志有, 尚志梅, 等. 重唇石斛化学成分研究[J]. 中草药, 2020, 51(12): 3126-3130.

[ 9 ] Zhang M S, Linghu L, Wang G, *et al.* Dendrobine-type alkaloids from *Dendrobium nobile* [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 20: 1-7.

[ 10 ] Cheng L, Guo D L, Zhang M S, *et al.* Dihydrophenanthrofurans and bisbibenzyl derivatives from the stems of *Dendrobium nobile* [J]. *Fitoterapia*, 2020, 142: 104586.

[ 11 ] Shang Z M, Li X F, Xiao S J. Two new bibenzyl compounds from *Dendrobium lindleyi* [J]. *Rec Nat Prod*, 2020, 14(6): 416-420.

[ 12 ] 邵曰凤, 胡粉青, 邹 澄, 等. 石斛属植物化学成分和药理活性研究现状[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(S1): 152-157; 121.

[ 13 ] Yu J D, Chen Y P, Shao Y T, *et al.* Chemical constituents of *Bulbophyllum wendlandianum* (Kraenzl.) Dammer and their chemotaxonomic significance [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2021, 96: 104264.

[ 14 ] 汪代芳, 俞桂新, 赵宁毅, 等. 金钗石斛茎的化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1492-1495.

[ 15 ] 李来明, 李国强, 吴 霞, 等. 黄药子芪类化学成分的研究[J]. 中草药, 2014, 45(3): 328-332.

[ 16 ] 张友源, 宋希强, 梅文莉, 等. 海南石斛化学成分研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2015, 23(3): 317-322.

[ 17 ] Wang J, Wang T J, Xie P, *et al.* New phenanthrene derivatives with nitric oxide inhibitory and radical-scavenging activities from *Pholidota imbricata* Hook. [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(4): 251-256.

不同提取和测定方法对蟾酥蛋白提取率和含量的影响

王 鹏<sup>1</sup>, 张 雯<sup>1</sup>, 周 迪<sup>2</sup>, 张刘强<sup>1</sup>, 吴迎春<sup>1</sup>, 郭夫江<sup>1\*</sup>, 李医明<sup>1\*</sup>  
(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院肿瘤一科, 上海 200437)

**摘要:** **目的** 考察不同提取和测定方法对蟾酥蛋白提取率和含量的影响。**方法** 分别采用碱提醇沉法、Tris-NaCl 溶液法、PBS 溶液法、丙酮沉淀法提取蛋白, 测定其提取率。分别采用 Bradford 法、BCA 法测定蛋白含量。**结果** Tris-NaCl (pH 7.8) 溶液法提取率最高, Bradford 法、BCA 法所得结果无显著差异。**结论** Tris-NaCl (pH 7.8) 溶液法为蟾酥蛋白最佳提取方法, Bradford 法、BCA 法可用于该成分含量测定。

**关键词:** 蟾酥; 蛋白; 提取率; 含量; 提取方法; 测定方法

中图分类号: R284.1                      文献标志码: A                      文章编号: 1001-1528(2022)10-3195-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.021

Effects of different extraction and determination methods on the extraction rate and content of protein in *Bufonis Venenum*

WANG Peng<sup>1</sup>, ZHANG Wen<sup>1</sup>, ZHOU Di<sup>2</sup>, ZHANG Liu-qiang<sup>1</sup>, WU Ying-chun<sup>1</sup>, GUO Fu-jiang<sup>1\*</sup>, LI Yi-ming<sup>1\*</sup>  
(1. College of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Oncology I, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

收稿日期: 2021-07-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81973458); 上海市中药药效物质研究院计划 (E-14017)

作者简介: 王 鹏 (1986—), 男, 博士生, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (021) 65291920, E-mail: wp85270810@163.com

\* 通信作者: 郭夫江 (1972—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药活性成分及其应用。Tel: (021) 51322181, E-mail: gfj@shutcm.edu.cn

李医明 (1966—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (021) 51322191, E-mail: ymli@shutcm.edu.cn

网络出版日期: 2021-10-20

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20211020.0951.002.html>

**ABSTRACT: AIM** To investigate the effects of different extraction and determination method on the extraction rate and content of protein in *Bufois Venenum*. **METHODS** Alkali extraction and ethanol precipitation method, Tris-NaCl solution method, PBS solution method and acetone precipitation method were applied to extracting protein, respectively, after which the extraction rate was determined. Bradford method and BCA method were adopted in the content determination of protein, respectively. **RESULTS** Tris-NaCl (pH 7.8) solution method demonstrated the highest extraction rate. The result obtained by Bradford method and BCA method displayed no significant difference. **CONCLUSION** Tris-NaCl (pH 7.8) solution method was the best extraction method for protein in *Bufois Venenum*. Both Bradford method and BCA method can be used for the content determination of this component.

**KEY WORDS:** *Bufois Venenum*; protein; extraction rate; content; extraction methods; determination methods

蟾酥是蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 的干燥分泌物<sup>[1]</sup>, 作为一味重要的传统中药, 其化学成分复杂, 临床用途较广, 具有解毒、止痛、开窍醒神功效, 在麝香保心丸、六神丸等中起着重要的作用。随着对蟾酥研究的逐步深入, 其小分子化学成分及药理活性机制日益清晰, 主要用于抗肿瘤、强心、抗菌、镇痛等方面<sup>[2-5]</sup>, 甚至局部麻醉, 而且疗效显著。

生物大分子药物由于具有高活性、强特异性、低毒性和生物功能明确等特点而受到重视, 但对动物类中药中蛋白类大分子成分的研究较少。近年来, 人们对天然来源大分子, 例如核酸、蛋白质的替代药物越来越感兴趣<sup>[6]</sup>, 它们与中药中的小分子次级代谢产物共同发挥有效作用。研究天然产物中蛋白质的结构和功能时, 首先要得到高纯度的蛋白, 故高效的提取分离方法是基础。

以往对蟾酥的研究集中在蟾酥甾烯等小分子成分上<sup>[7]</sup>, 而对其大分子成分关注较少。本实验分别采用碱提醇沉法、Tris-NaCl 溶液法、PBS 溶液法、丙酮沉淀法提取蟾酥鲜浆中蛋白, 并通过优化提取溶液的 pH 值来改善提取效果, 提高蛋白提取率。另外, 蛋白质含量的准确测定也至关重要, 通常有凯氏定氮法<sup>[8]</sup>、福林酚法 (Lowry 法)<sup>[9]</sup>、双缩脲法<sup>[10]</sup>、考马斯亮蓝法 (Bradford 法)<sup>[11]</sup>、2, 2'-联喹啉-4, 4'-二羧酸法 (BCA 法)<sup>[12]</sup>、紫外-可见分光光度法<sup>[13]</sup>等, 本实验分别采用 Bradford 法、BCA 法测定蟾酥蛋白含量, 旨在为该类成分含量测定提供参考。

## 1 材料

1.1 药材与试剂 蟾酥鲜浆 (用于蛋白提取和含量研究, 上海金蟾健康科技有限公司, 批号 20170419; 用于不同来源药材蛋白含量比较, 产地

汉中、山东、浙西、江西、安徽、临沂小、临沂大、皖北、上海、河南)。BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司)。NaOH、Tris、氯化钠、乙醇、丙酮、PBS 溶液均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器 5810R 离心机 (德国 Eppendorf 公司); Ultracel®-3K 超滤管 (德国 Merck Millipore 公司); Paradigm® 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); 96 孔板 (美国 Corning 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 蟾酥蛋白提取

2.1.1 碱提醇沉法 取-80℃冷冻蟾酥鲜浆 5 g, 各 3 份, 分别置于 3 个烧杯中, 室温解冻 1 h。为考察提取液碱性强弱对蛋白提取率的影响, 在加入 100 mL 去离子水后用 1 mol/L NaOH 溶液分别调节 3 份提取液 pH 至 7.8、9.0、10.2, 加去离子水至最终体积为 200 mL, 烧杯中加入搅拌子, 室温提取 5 h, 静置, 将上清液转移至若干个 50 mL 离心管中, 3 900 r/min 离心 1 h, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 合并滤液, 加入 200 mL 冰乙醇<sup>[14]</sup> (-20℃放置 2 h), 离心收集沉淀, 200 mL 溶液 (含 25 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl, pH7.8) 复溶。

2.1.2 Tris-NaCl 溶液法 取-80℃冷冻蟾酥鲜浆 5 g, 各 3 份, 分别置于 3 个烧杯中, 室温解冻 1 h。为考察 Tris-NaCl 提取液酸碱性对蛋白提取率的影响, 分别于 3 个烧杯中加入 Tris-NaCl (含 25 mmol/L Tris、500 mmol/L NaCl, pH5.4) 溶液、Tris-NaCl (含 25 mmol/L Tris、500 mmol/L NaCl, pH7.8)<sup>[15]</sup> 溶液、Tris-NaCl (含 25 mmol/L Tris、500 mmol/L NaCl, pH10.2) 溶液至最终体积为 200 mL。烧杯中加入搅拌子, 室温提取 5 h, 静置, 将上清液转

移至若干 50 mL 离心管中,3 900 r/min 离心 1 h,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,合并滤液。

2.1.3 PBS 溶液法 取-80 ℃冷冻蟾酥鲜浆 5 g,置于烧杯中,室温解冻 1 h。由于 100 mmol/L PBS (pH7.0) 溶液前期被优选用于蛋白提取<sup>[16]</sup>,故在烧杯中加入该溶液至最终体积为 200 mL,烧杯中加入搅拌子,室温提取 5 h,静置,将上清液转移至若干个 50 mL 离心管中,3 900 r/min 离心 1 h,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,合并滤液。

2.1.4 丙酮沉淀法 取-80 ℃冷冻蟾酥鲜浆 5 g,置于烧杯中,室温解冻 1 h,加入磷酸缓冲溶液(20 mmol/L, pH8.0) 至最终体积为 200 mL,烧杯中加入搅拌子,室温提取 5 h,静置,上清液转移至若干个 50 mL 离心管中,3 900 r/min 离心1 h,取上清液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,合并滤液,加入 200 mL 冰丙酮<sup>[17-18]</sup>(-30 ℃放置2 h),离心收集沉淀,200 mL 溶液(含 25 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl, pH7.8) 复溶。

2.2 超滤去除小分子 在 4 ℃、3 900 r/min 条件下用超滤管<sup>[19]</sup>离心浓缩蟾酥提取物溶液,使蛋白与小分子分离,将滤液弃去,合并浓缩液,用相应条件下提取液溶解浓缩物后继续超滤,重复 5 次,最后将浓缩物用相应的提取液或复溶溶液溶解并定容至 100 mL,在-80 ℃下保存。

2.3 蛋白含量测定

2.3.1 BCA 法 参考文献 [20] 报道,取 1.2 mL 蛋白配制液,加到蛋白标准液(含 30 mg BSA)中,充分溶解后制成 25 mg/mL 标准品溶液,取 20 μL,稀释液稀释至终质量浓度为 0.5 mg/mL。分别吸取 0、1、2、4、8、12、16、20 μL,加到 96 孔板的标准品孔中,加稀释液至最终体积为 20 μL,质量浓度分别为 0、25、50、100、200、300、400、500 μg/mL,见表 1。取不同提取方法得到的样品(50 倍稀释)各 20 μL,加到 96 孔板中,加入 200 μL BCA 工作液(将 5 mL BCA 试剂 A 和 100 μL BCA 试剂 B 充分混匀,即得,室温 24 h 内稳定),室温放置 120 min,酶标仪测定 562 nm 波长处吸光度。以标准品质量浓度为横坐标( $X$ ),吸光度为纵坐标( $A$ )进行回归,得方程为  $A = 0.001\ 0X + 0.103\ 1$  ( $r = 0.999\ 4$ ),计算蛋白含量和提取率,公式为蛋白浓度 =  $\frac{\text{吸光度值}-\text{截距}}{\text{斜率} \times 1\ 000}$ 、蛋白

含量 =  $\frac{\text{蛋白浓度} \times \text{稀释因子}}{1\ 000}$ 、提取率 =  $\frac{\text{蛋白含量}}{\text{样品质量}} \times$

100%, 结果见表 2。

表 1 标准曲线加样 (BCA 法)

Tab. 1 Sample addition of standard curves(BCA method)

| 序号 | 0.5 mg/mL<br>BSA/μL | 标准品稀释<br>液/μL | BSA/<br>(μg·mL <sup>-1</sup> ) | OD <sub>562</sub> |
|----|---------------------|---------------|--------------------------------|-------------------|
| 0  | 0                   | 0             | 0                              | 0.101             |
| 1  | 1                   | 19            | 25                             | 0.122             |
| 2  | 2                   | 18            | 50                             | 0.158             |
| 3  | 4                   | 16            | 100                            | 0.217             |
| 4  | 8                   | 12            | 200                            | 0.315             |
| 5  | 12                  | 8             | 300                            | 0.405             |
| 6  | 16                  | 4             | 400                            | 0.519             |
| 7  | 20                  | 0             | 500                            | 0.626             |

表 2 蟾酥蛋白含量测定结果 (BCA 法)

Tab. 2 Results of content determination of protein in *Bufo venenosus* (BCA method)

| 提取<br>方法 | 样品质量/g | 吸光度   | 蛋白质量浓度/<br>(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 蛋白含<br>量/g | 提取<br>率/% |
|----------|--------|-------|-----------------------------------|------------|-----------|
| E1       | 5.0    | 0.309 | 0.206                             | 1.03       | 20.6      |
| E2       | 5.0    | 0.300 | 0.197                             | 0.98       | 19.7      |
| E3       | 5.1    | 0.317 | 0.214                             | 1.07       | 21.0      |
| E4       | 4.9    | 0.311 | 0.208                             | 1.04       | 21.2      |
| E5       | 5.0    | 0.350 | 0.247                             | 1.23       | 24.7      |
| E6       | 5.0    | 0.338 | 0.235                             | 1.17       | 23.5      |
| E7       | 5.0    | 0.300 | 0.197                             | 0.98       | 19.7      |
| E8       | 5.0    | 0.267 | 0.164                             | 0.82       | 16.4      |

注: E1 为碱提醇沉法, pH7.8; E2 为碱提醇沉法, pH9.0; E3 为碱提醇沉法, pH10.2; E4 为 Tris-NaCl 溶液法, pH5.4; E5 为 Tris-NaCl 溶液法, pH7.8; E6 为 Tris-NaCl 溶液法, pH10.2; E7 为 PBS 溶液法; E8 为丙酮沉淀法。

2.3.2 Bradford 法 BSA 蛋白标准液(2.0 mg/mL)用 0.9% NaCl 溶液稀释至1 000 μg/mL,按表 3 方法进行稀释,配制 BSA 标准品(0 号管为空白对照)。将 10 μL 标准品及不同提取方法得到的样品稀释 50 倍,置于 96 微孔板孔中,每孔加入 250 μL 考马斯亮蓝试剂,微孔板振荡器混合 30 s,取出微孔板,室温孵育 10 min,酶标仪测定 595 nm 波长处吸光度。以标准品质量浓度为横坐标( $X$ ),吸光度为纵坐标( $A$ )进行回归,得方程为  $A = 0.001\ 2X + 0.350\ 8$  ( $r = 0.997\ 5$ ),计算蛋白含量,结果见表 4。

再比较碱提醇沉法、Tris-NaCl 溶液法、PBS 溶液法、丙酮沉淀法对蟾酥蛋白提取率的影响,结果见图 1。由此可知,碱提醇沉法提取率较低,pH 值对其影响不大;Tris-NaCl 溶液法提取率较高,在 pH 为 7.8 时更明显;PBS 溶液法、碱提醇沉法提取率相差不大,丙酮沉淀法提取率最低;采用 BCA 法、Bradford 法测定蟾酥蛋白含量时,所得结果大致相同。

表 3 标准曲线加样 (Bradford 法)

Tab.3 Sample addition of standard curves (Bradford method)

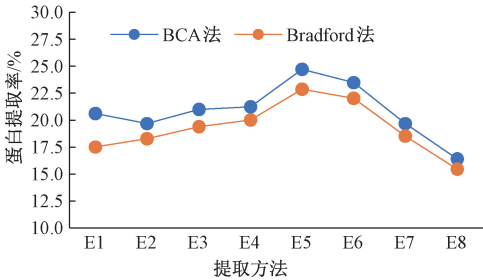
| 管号 | 1×PBS/μL | 1 000 μg/mL BSA/μL | BSA/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | OD <sub>595</sub> |
|----|----------|--------------------|----------------------------|-------------------|
| 0  | 200      | 0                  | 0                          | 0.342             |
| 1  | 780      | 20                 | 25                         | 0.371             |
| 2  | 175      | 25                 | 125                        | 0.495             |
| 3  | 150      | 50                 | 250                        | 0.645             |
| 4  | 100      | 100                | 500                        | 0.973             |
| 5  | 50       | 150                | 750                        | 1.189             |

表 4 蟾酥蛋白含量测定结果 (Bradford 法)

Tab.4 Results of content determination of protein in *Bufois Venenum* (Bradford method)

| 提取方法 | 样品质量/g | 吸光度   | 蛋白质质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 蛋白含量/g | 提取率/% |
|------|--------|-------|--------------------------------|--------|-------|
| E1   | 5.0    | 0.561 | 0.175                          | 0.88   | 17.5  |
| E2   | 5.0    | 0.570 | 0.183                          | 0.91   | 18.3  |
| E3   | 5.1    | 0.588 | 0.198                          | 0.99   | 19.4  |
| E4   | 4.9    | 0.586 | 0.196                          | 0.98   | 20.0  |
| E5   | 5.0    | 0.625 | 0.229                          | 1.14   | 22.9  |
| E6   | 5.0    | 0.615 | 0.220                          | 1.10   | 22.0  |
| E7   | 5.0    | 0.573 | 0.185                          | 0.93   | 18.5  |
| E8   | 5.0    | 0.536 | 0.154                          | 0.77   | 15.4  |

注: E1 为碱提醇沉法, pH7.8; E2 为碱提醇沉法, pH9.0; E3 为碱提醇沉法, pH10.2; E4 为 Tris-NaCl 溶液法, pH5.4; E5 为 Tris-NaCl 溶液法, pH7.8; E6 为 Tris-NaCl 溶液法, pH10.2; E7 为 PBS 溶液法; E8 为丙酮沉淀法。



注: E1 为碱提醇沉法, pH7.8; E2 为碱提醇沉法, pH9.0; E3 为碱提醇沉法, pH10.2; E4 为 Tris-NaCl 溶液法, pH5.4; E5 为 Tris-NaCl 溶液法, pH7.8; E6 为 Tris-NaCl 溶液法, pH10.2; E7 为 PBS 溶液法; E8 为丙酮沉淀法。

图 1 蟾酥蛋白不同提取方法比较

Fig.1 Comparison of different extraction methods of protein in *Bufois Venenum*

2.3.3 对比试验 分别采用 BCA 法、Bradford 法测定 Tris-NaCl 溶液法 (pH7.8) 所提取蟾酥蛋白含量各 6 次, 结果见表 5。由此可知, 2 种方法重复性均良好;  $F = 1.86$ ,  $F < F_{0.05,5,5}$  ( $F_{0.05,5,5} = 5.05$ ), 表明 2 种方法精密度接近;  $t = 0.67$ ,  $t < t_{0.05,10}$  ( $t_{0.05,10} = 2.23$ ), 表明 2 种方法所得结果无显著差异。

表 5 BCA 法、Bradford 法测定蟾酥蛋白含量比较 (n=6)

Tab.5 Comparison of content determination of protein in *Bufois Venenum* by BCA method and Bradford method (n=6)

| 方法         | 蟾酥蛋白/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 平均值/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | RSD/% |
|------------|-----------------------------|----------------------------|-------|
| BCA 法      | 12.1                        | 12.4                       | 2.37  |
|            | 12.5                        |                            |       |
|            | 12.4                        |                            |       |
|            | 12.8                        |                            |       |
|            | 12.1                        |                            |       |
| Bradford 法 | 12.7                        | 12.5                       | 1.73  |
|            | 12.6                        |                            |       |
|            | 12.5                        |                            |       |
|            | 12.3                        |                            |       |
|            | 12.2                        |                            |       |
|            | 12.4                        |                            |       |
|            | 12.8                        |                            |       |

2.3.4 不同来源蟾酥鲜浆中蛋白含量 采用 Tris-NaCl 溶液法 (pH7.8) 提取 10 个产地蟾酥鲜浆蛋白, 测定其提取率, 结果见表 6。由此可知, 提取率均在 20% 左右, 表明该提取方法稳定可靠。

表 6 不同产地蟾酥鲜浆蛋白提取率测定结果

Tab.6 Results of extraction rate determination of protein in *Bufois Venenum* fresh pulp from various growing areas

| 编号 | 产地  | 提取率/% |
|----|-----|-------|
| 1  | 汉中  | 20.2  |
| 2  | 山东  | 21.3  |
| 3  | 浙西  | 19.5  |
| 4  | 江西  | 18.6  |
| 5  | 安徽  | 19.9  |
| 6  | 临沂小 | 21.1  |
| 7  | 临沂大 | 21.6  |
| 8  | 皖北  | 20.2  |
| 9  | 上海  | 22.3  |
| 10 | 河南  | 23.5  |

3 讨论

本实验发现, 不同提取方法下蟾酥中蛋白提取率有差异, 其中丙酮沉淀法最低, Tris-NaCl 溶液法 (pH7.8) 最高, 提取率为 24.7%, 并且该方法操作简单, 对活性蛋白质破坏作用极小, 适用于不同产地的样品基质, 并且提取后的蛋白溶液可以根据临床应用、生产的特殊要求进行缓冲液置换, 满足临床应用和生产的需求。常用蛋白含量的测定方法都存在一定局限性, 例如凯氏定氮法灵敏度较低, 操作繁琐, 实验周期较长; Lowry 法因干扰物质较多, 所得结果通常不准确; 双缩脲法、紫外分光光度法虽然简便快速, 但前者灵敏度低, 后者仅适用于纯化蛋白质的检测。本实验分别采用 BCA

法、Bradford 法测定蟾酥蛋白含量，两者灵敏度高，操作快速简便，并且前者所用试剂及其形成的颜色复合物稳定性良好，干扰物质较少，而后者还具有成本低的优势，结果表明，这 2 种方法重复性理想，精密度高，所得数据无显著差异，均可作为蟾酥蛋白含量的测定方法。

综上所述，本实验可为蟾酥蛋白提取工艺和含量检测方法研究提供参考，也能为其蛋白纯化和活性功能考察提供依据。

参考文献：

[ 1 ] 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，2020：614-615.

[ 2 ] 辛秀兰,张宝璟,苏东海,等.中药蟾酥的药理作用研究进展[J].现代生物医学进展,2012,12(3):588-590;600.

[ 3 ] Xia X L, Jin H Z, Yan S K, *et al.* Analysis of the bioactive constituents of Chansu in rat plasma by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 646-654.

[ 4 ] 孙沛颖,潘一鸣,闫 兵.蟾酥对柠檬色葡萄球菌的抑菌作用[J].牡丹江师范学院学报(自然科学版),2015(4):46-48.

[ 5 ] 杨 琳,段鹏飞,王 琼,等.蟾酥脂溶性提取物的分离分析及其镇痛、抗肿瘤作用研究[J].氨基酸和生物资源,2007, 29(1): 64-67.

[ 6 ] Belting M, Wittrup A. Developments in macromolecular drug delivery[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 480: 1-10.

[ 7 ] 马骁驰,张宝璟,邓 卅,等.中药蟾酥中蟾蜍甾烯类成分研究[J].现代生物医学进展,2009,9(18):3519-3522.

[ 8 ] 张泽泉,罗翠婷,李孔寿,等.凯氏定氮法蛋白质测定的改进探讨[J].海峡预防医学杂志,2017, 23(1): 64-66.

[ 9 ] 杨桂兰,郭学平. Lowry 法和 Bradford 法测定玻璃酸钠中蛋白质含量的比较[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(3):

131-133.

[ 10 ] 钱 锋,张晓非,郝艳茹. 双缩脲法快速测定蛋白质含量[J].数理医药学杂志, 2007, 20(3): 406-407.

[ 11 ] Noble J E. Quantification of protein concentration using UV absorbance and coomassie dyes[J]. *Methods Enzymol*, 2014, 536: 17-26.

[ 12 ] Schoel B, Welzel M, Kaufmann S H E, *et al.* Quantification of protein in dilute and complex samples: modification of the bicinchoninic acid assay [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 1995, 30(2-3): 199-206.

[ 13 ] 古炳明,曾 宝,熊艺花,等. 紫外-可见分光光度法测定巴豆中可溶性蛋白的含量[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(8): 43-45.

[ 14 ] 董渭雪,陈德经,辛 茜,等. 大鲵黏液糖蛋白的抗氧化及防紫外作用[J]. 陕西理工大学学报(自然科学版), 2018, 34(3): 54-58.

[ 15 ] Sharapov M G, Novoselov V I, Fesenko E E, *et al.* Two isoforms of peroxiredoxin 6 of *Xenopus laevis*[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 45(6): 933-940.

[ 16 ] 沈向阳,梁 霄,付 云,等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 198-204; 136.

[ 17 ] Evers D H, Schultz-Fademrecht T, Garidel P, *et al.* Development and validation of a selective marker-based quantification of polysorbate 20 in biopharmaceutical formulations using UPLC QDa detection[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1157: 122287.

[ 18 ] 谢江碧,贺卫国,翁 宁,等. 蚯蚓中抗肿瘤蛋白组分的提取分离及其抗肿瘤活性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(3): 359-366.

[ 19 ] 王子佳,李红梅,弓爱君,等. 蛋白质分离纯化方法研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(8): 8-11.

[ 20 ] 曹玉华. BCA 法测神奇灵颗粒剂中蛋白含量[J]. 中国实用医药, 2009, 4(7): 43-44.