

凯氏定氮法和考马斯亮蓝法测定方格星虫多糖中蛋白质的含量

刘玉明¹, 钱甜甜¹, 蒋定文¹, 何颖¹, 沈先荣^{1*}, 江叔奇²

(1. 海军医学研究所, 上海 200433; 2. 浙江中医药大学, 杭州 310053)

[摘要] 目的: 建立一种快速、简单、准确测定方格星虫多糖中蛋白质含量的方法。方法: 分别采用凯氏定氮法和考马斯亮蓝法测定蛋白质含量, 并进行稳定性、精密度、重复性和回收率测定。结果: 凯氏定氮法和考马斯亮蓝法测定方格星虫多糖中蛋白质的含量分别为 2.40%、2.22%, 其回收率分别为 98.69%、100.97%, 2 种方法测得蛋白质含量基本相同, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论: 综合考虑, 凯氏定氮法简便、快速、准确, 可用于方格星虫多糖中蛋白质的质量控制。

[关键词] 方格星虫多糖; 凯氏定氮法; 考马斯亮蓝法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0096-03

[doi] 10.11653/syjf2013190096

The Comparison with Kjeldah and Coomassie Brilliant Blue Method on Testing Protein Content of the Polysaccharide from *Sipunculus nudus*

LIU Yu-ming¹, QIAN Tian-tian¹, JIANG Ding-wen¹, HE Ying¹, SHEN Xian-rong^{1*}, JIANG Shu-qi²

(1. Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China;

2. Zhejiang Traditional Medicine University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a simple, rapid and accurate method of protein content analysis of polysaccharide from *Sipunculus nudus*. **Method:** Using Kjeldah method and Coomassie brilliant blue method to test protein content of the polysaccharide from *S. nudus*. Also the precision and accuracy of the two methods were tested. **Result:** The content of protein was 2.40% and 2.22% by the two method and the average recovery rates were 98.69% and 100.97% respectively. The content by the two methods was almost the same and had no marked difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** In summary, Kjeldah method is simple and accurate and could assay the protein content of polysaccharide from *S. nudus* rapidly.

[Key words] polysaccharide from *Sipunculus nudus*; Kjeldah method; Coomassie brilliant blue method

方格星虫 *Sipunculus nudus* Linnaeu 俗称沙虫, 是星虫动物门方格星虫目方格星虫科方格星虫属的裸体方格星虫的全体。现代医学研究表明方格星虫

含有丰富的多糖、蛋白质、微量元素等活性物质, 海洋星虫的保健功能在我国古代医药专著《海药本草》和《本草纲目》中均有记载。除作食用外, 民间还把它作为治疗虚火上炎及滋阴补肾之食疗药物, 一般用于目赤、面部潮红。夏日盛暑因烈日暴晒、身体发热、便秘的患者, 用之可缓解症状, 因疲劳过度四肢乏力, 多服可精神焕发、精力迅速恢复, 故闽南人称之为“动物人参”。沿海民间常用以取代昂贵的冬虫夏草, 因而又被称为“海洋里的冬虫夏草”^[1]。方格星虫多糖是从方格星虫中提取分离得到的一种提取物, 药效学研究结果表明该提取物在促智^[2]、抗疲劳^[3]、抗辐射^[4]、提高免疫力^[5]等方面

[收稿日期] 20131203(002)

[基金项目] 国家科技重大专项新药创制项目(2008ZXJ09004-027)

[第一作者] 刘玉明, 博士, 副研究员, 从事药物核辐射防护及中药现代化研究, Tel: 021-81883186, E-mail: liuyuming888627@sohu.com

[通讯作者] * 沈先荣, 博士, 研究员, 从事海洋药物在核辐射损伤和核事故应急中的防护研究, Tel: 021-81883171, E-mail: xianrong-shen@163.com

具有显著的功效。我课题组前期对其提取工艺进行过优化^[6],提取方法主要是传统的水提醇沉法^[7],该提取物除含有多糖之外,蛋白也是其活性成分之一,快速、简单、准确地对其中的蛋白质含量进行测定,这对于方格星虫多糖提取物的开发应用和质量控制具有重要的意义。

目前关于方格星虫多糖中蛋白质含量的测定方法未见报道,为此,我们采用了凯氏定氮和考马斯亮蓝 2 种方法进行研究,为方格星虫多糖的质量控制奠定基础,也为其新药申报项目资料,提供必要的实验方法和数据。

1 材料

KDN-103F 型凯氏定氮仪(上海纤检仪器有限公司),方格星虫多糖(实验室自制),考马斯亮蓝 G-250 (AR 级,中国医药集团上海化学试剂公司,批号 20010910),牛血清白蛋白对照品(BSA,生化试剂,上海伯奥生物科技有限公司,批号 050912),硫酸铜(AR 级,生工生物工程有限公司,批号 3498B008),硫酸钾(AR 级,上海振欣试剂厂,批号 20070403),浓硫酸(AR 级,中国医药集团上海化学试剂公司,批号 20020412),葡萄糖(AR 级,上海化学试剂分装厂,批号 0690404)。

2 方法与结果

2.1 凯氏定氮法

2.1.1 实验原理^[8-9] 蛋白质是含氮的有机化合物,样品与硫酸和催化剂一同加热消化,使蛋白质分解,分解的氮与硫酸组合成硫酸铵,然后碱化蒸馏使氮游离,用硼酸吸收,再用已知摩尔浓度硫酸标准溶液滴定,根据硫酸消耗量乘以换算系数,即为蛋白质含量。

2.1.2 精密度试验 精密称量 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 共 6 份,照上述方法进行测定,结果氮平均含量 12.50 mg, RSD 3.54%,表明仪器精密度良好。

2.1.3 重复性试验 精密称取星虫多糖 0.3 g,共 6 份,照上述方法进行测定,氮平均含量 0.38%, RSD 3.39%,表明重复性良好。

2.1.4 加样回收试验 精密称取星虫多糖(已测定含氮量,含氮量为 0.38%) 0.3 g,共 6 份,分别置干燥的消化管中,再依次精密加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30 mg,按以上试验步骤操作,测定含氮的总量,计算回收率,测定结果见表 1。

2.1.5 样品的含量测定 精密称取 3 批星虫多糖 0.3 g,每批 3 份,共 9 份,照上述方法进行测定,测定氮含量乘以换算系数 6.25^[10],即得蛋白含量,结

表 1 多糖加样回收率试验($n=6$)

No.	样品含氮 /mg	氮加入量 /mg	氮测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	1.12	6.36	7.25	96.93	98.69	2.0
2	1.10	6.57	7.52	98.16		
3	1.12	6.36	7.42	99.20		
4	1.14	6.40	7.43	98.66		
5	1.12	6.36	7.65	102.3		
6	1.14	6.36	7.26	96.88		

果见表 2。

表 2 星虫多糖中蛋白质含量的测定($n=3$)

样品批次	蛋白质含量	RSD
第 1 批	2.31	1.7
第 2 批	2.50	2.0
第 3 批	2.38	2.1

2.2 考马斯亮蓝法^[11]

2.2.1 实验原理 蛋白质分子均具有酰胺基团,棕红色的考马斯亮蓝 G-250 染料上的阴离子与蛋白质的酰胺结合,使溶液变为蓝色,其最大吸收峰为 595 nm,蛋白质在 1 ~ 1 000 μg 其吸光度与蛋白质含量成正比,故可用于测定蛋白质含量^[12-13]。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称取 3 批海洋星虫多糖 30 mg,分别置 50 mL 量瓶中,加水超声溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 蛋白质标准溶液的制备 精确称取牛血清白蛋白 10.0 mg,用少量蒸馏水溶解定容至 100 mL,即为 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白质标准液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.2.4 考马斯亮蓝 G-250 溶液的制备 精密称取考马斯亮蓝 G-250 100.0 mg 加入 95% 乙醇 50 mL,再加入 85% 磷酸 100 mL,最后用蒸馏水定容至 1 000 mL,最终试剂含 0.01% 考马斯亮蓝 G-250,4.7% 乙醇,8.5% 磷酸,置于棕色瓶中备用。

2.2.5 标准曲线的制作 分别精密吸取蛋白质标准溶液 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 置于 10 mL 具塞试管中,分别加蒸馏水至 1 mL,加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 5 mL 混匀,放置 10 min,于 595 nm 处测吸光度,回归方程为 $Y = 0.2153X - 0.0135$ ($R^2 = 0.9988$)。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液 1 mL,每隔 10 min 测定 1 次,考察其稳定性,得 RSD 2.08%,结果表明在显色 60 min 时间内吸光度稳定性较好。

2.2.7 精密度试验 精密吸取标准溶液(100 $\text{mg}\cdot$

L⁻¹) 0.5 mL 进行精密度试验,连续 6 次测定其吸光度,得 RSD 1.58%,表明精密度好。

2.2.8 重复性试验 精密吸取来自同一批海洋星虫多糖样品 6 份,按样品测定方法,分别测定其吸光度,检验该测定方法的重复性,得 RSD 2.63%,表明重复性较好。

2.2.9 回收率试验 取已知含量的样品溶液 1 mL (蛋白含量为 2.13%),分别加入 0.3 mL 蛋白质标准溶液,照样品测定方法操作,经计算平均回收率为 100.97%,RSD 2.1%,结果见表 3。

表 3 星虫多糖中蛋白质加样回收率试验

No.	样品含量 /mg	对照品量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD /%
1	0.013	0.03	0.044	103.12	100.97	2.1
2	0.013	0.03	0.043	101.23		
3	0.013	0.03	0.042	97.98		
4	0.013	0.03	0.043	101.22		
5	0.013	0.03	0.044	103.3		
6	0.013	0.03	0.042	98.98		

2.2.10 样品中蛋白质含量的测定 取 3 批供试品溶液各 1 mL,同时做 3 个重复,以空白试剂为参比,按上述标准曲线的测定法,分别测定其吸光度,计算样品中蛋白质的含量,3 批样品含量依次为 2.13%、2.34%、2.19%。

3 讨论

2 种方法对海洋星虫多糖中蛋白质含量的测定结果表明,凯氏定氮法略高于考马斯亮蓝法,但无显著性差异。凯氏定氮法适用范围广泛,测定结果准确,重复性好,但操作复杂费时,试剂消耗量大。在本实验中采用模块式消化炉代替传统的消化装置,可同时测定 8 份样品,大大提高了工作效率,适用于批量蛋白质的测定,具有准确、快速、简便、低耗、稳定的优点。考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合反应十分迅速,2 min 左右即达到平衡,其结合物室温下 1 h 内基本保持稳定,但在 5~20 min,颜色的稳定性最好,但在 20 min 之后线性略有降低,会对实验带来误差。

凯氏定氮法是目前分析有机化合物含氮量常用的方法,是测定试样中总有机氮最准确和最简单的方法之一,被国际国内作为法定的标准检验方法^[14]。用凯氏定氮对方格星虫多糖进行样品测定时,要控制好消化时间,时间过短,则样品未完全消化,致使结果偏低;时间过长,结果也会偏低,这可能是由于小部分氮随水蒸汽一起逸出引起的,因此

本实验通过多次摸索,确定消化时间为 1.5 h。

在凯氏定氮法测定时产生 SO₂ 等有害气体,但采用减压真空泵可将有害气体溶解于水中,从而有效避免空气污染。

综上所述,经过对上述 2 种蛋白质含量测定方法进行对比,考马斯亮蓝法比凯氏定氮法结果偏低,最终确定凯氏定氮法作为方格星虫多糖中蛋白质含量的测定方法。

[参考文献]

[1] 张桂和,李理,赵谋明,等.方格星虫营养成分分析及抗疲劳作用研究[J].营养学报,2008,30(3):319.

[2] 何颖,沈先荣,蒋定义,等.方格星虫多糖对记忆障碍小鼠学习记忆能力的影响[J].中国海洋药物,2012,31(1):38.

[3] 夏乾峰,谭河林,覃西,等.方格星虫多糖抗菌活性的初步研究[J].中国热带医学,2007(12):2192.

[4] 沈先荣,蒋定义,陆敏,等.方格星虫提取物的抗辐射作用[J].中国海洋药物,2008,27(2):33.

[5] 李珂娴,沈先荣,何颖,等.方格星虫多糖对小鼠免疫功能的影响[J].中国海洋药物,2012,31(1):46.

[6] 刘玉明,钱甜甜,何颖,等.方格星虫多糖不同提取工艺的比较研究[J].时珍国医国药,2011,22(6):1454.

[7] 张黎明,朱丽,李雪,等.玉屏风总多糖水提醇沉工艺条件优化[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):24.

[8] 李晓艳.浅谈凯氏定氮法测定食品中蛋白质注意事项[J].计量与测试技术,2008,35(8):74.

[9] 刘世琪,吴大章,肖礼娥,等.凯氏定氮法测定小儿智力糖浆中总氮含量[J].现代医药卫生,2009,25(2):188.

[10] 李梅.粮食中粗蛋白质 2 种测定方法的比对分析[J].粮食科技与经济,2008(6):44.

[11] 包华音,石俊英.不同产地和不同部位的壁虎药材蛋白质比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):69.

[12] 王文平,郭祀远,李琳,等.考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J].食品研究与开发,2008,29(1):115.

[13] 赵英永,戴云,崔秀明,等.考马斯亮蓝 G-250 染色法测定草乌中可溶性蛋白质含量[J].云南民族大学学报:自然科学版,2006,15(3):235.

[14] 郭颖娜,孙卫.蛋白质含量测定方法的比较[J].河北化工,2008,31(4):36.

[责任编辑 顾雪竹]