

# pH、无机盐和有机溶剂对美洲大蠊醇提取物中蛋白质稳定性的影响

吴少辉,罗廷顺,张成桂,巫秀美,刘光明\*

(大理学院药学院,云南 大理 671000)

**[摘要]** 目的:对美洲大蠊醇提取物中蛋白质稳定性进行研究。方法:通过采用 UV 法和 Folin-酚试剂法,考察了 pH、无机盐和有机溶剂等影响因素对蛋白质稳定性的影响。结果:pH、氯化钠、硫酸铵、乙腈和甲醇随着剂量的增加,在不同程度上破坏了蛋白质的结构。结论:不同的影响因素通过改变蛋白质物理化学性质,破坏了蛋白质的稳定性。

**[关键词]** Folin-酚试剂法;美洲大蠊;紫外分光光度法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0074-04

## Stability of Protein of Ethanol Extract from *Periplaneta americana* with pH, Inorganic Salt and Organic Solvent

WU Shao-hui, LUO Ting-shun, ZHANG Cheng-gui, WU Xiu-mei, LIU Guang-ming\*

(College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China)

**[Abstract]** **Objective:** Studying the stability of the protein of atitumor activity from *Periplaneta americana*. **Method:** The factors of pH, inorganic salt and organic solvent on stability of the protein were studied by the UV and Lowry method. **Result:** pH, sodium chloride, ammonium sulfate, acetonitrile and methanol are added and the structure of protein is changed. **Conclusion:** The physical and chemical properties are changed by different kinds of factors, and finally the stability of the protein is damaged.

**[Key words]** lowry method; *Periplaneta americana*; UV method

美洲大蠊(*Periplaneta americana*),俗称蟑螂、偷油婆等,为蜚蠊目(Blattodea)昆虫,原产于南美洲,是古老的昆虫类群之一<sup>[1]</sup>,其体内含有蛋白质、淀粉酶、细胞色素、糖类等多种营养成分<sup>[2]</sup>。现代研究表明它具有抗癌、解毒、治疗心血管疾病等功效<sup>[3-4]</sup>,近年来对美洲大蠊药用价值的研究越来越多。

随着基因重组技术的发展,蟾蜍<sup>[5]</sup>、虻虫<sup>[6]</sup>和虎纹捕鸟蛛<sup>[7]</sup>等动物药得到了很大的开发和研究,

药用蛋白质的商品化生产也已成为现实,蛋白质的不稳定性在很大程度上限制了其广泛的应用<sup>[8]</sup>,其影响因素较多,主要是 pH、无机盐和有机溶剂<sup>[9-11]</sup>等通过改变蛋白质的物理、化学性质,进一步对其稳定性造成不同程度的影响,美洲大蠊醇提取物中蛋白质的分离、纯化受到上述因素不同程度的影响,因此,对美洲大蠊醇提取物中蛋白质稳定性的研究具有重要的意义。

### 1 材料

美洲大蠊醇提取物由本实验室自制,Aquapro 系列实验室超纯水机(重庆颐洋企业发展有限公司),CP-先行者系列电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司],DHG-9240 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),Sigma 1-14 小型台式离心机(德国 Sigma 公司),SY8200T 型超声波清洗仪(上海声源超声波仪器设备有限公司),pH 计(上海一恒科学仪器有限公司),T6 型分光光度计(上海元析

**[收稿日期]** 20111216(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30560181);云南省重点产业创新工程基金项目(2008IF012)

**[第一作者]** 吴少辉,硕士,E-mail: shaohuiwu007@126.com

**[通讯作者]** \*刘光明,教授,硕士生导师,从事天然药物化学研究,Te: 0872-2254511, E-mail: lgm888999@yahoo.com.cn

仪器有限公司),常用玻璃仪器(大理天利恒经贸有限公司)。

小牛血清白蛋白(购自昆明晨绿生物科技开发有限公司),无水碳酸钠、氢氧化钠、硫酸铜、酒石酸钾钠、钨酸钠、磷酸、硫酸锂及其他试剂均为分析纯,Folin-酚试剂B为实验室自配。

## 2 方法

**2.1 蛋白质含量的测定** 采用Folin-酚试剂法<sup>[12-16]</sup>,使用牛血清白蛋白作为标准蛋白。称取0.3 000 g牛血清白蛋白,加适量超纯水完全溶解,转移至100 mL量瓶中,定容至刻度,摇匀,备用。分别吸取牛血清白蛋白溶液0.1,0.15,0.2,0.25,0.3,0.35,0.4,0.45 mL,分别加入蒸馏水0.5,0.4,0.35,0.3,0.25,0.2,0.15,0.1,0.05 mL,试剂A 2.5,2.5,2.5,2.5,2.5,2.5,2.5,2.5,2.5 mL,混匀,室温放置10 min,各试管再各加试剂B 0.25 mL,于762 nm处测定吸光度,以吸光度(A)为纵坐标,牛血清白蛋白质量浓度(C)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $A = 15.73C + 0.0685 (r = 0.9975)$ 。结果表明牛血清白蛋白在 $9.23 \sim 41.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

**2.2 pH、无机盐和有机溶剂对蛋白质稳定性的影响** 将配制好的一定浓度的美洲大蠊醇提取物调节至不同pH、不同浓度无机盐和有机溶剂溶液,测定其蛋白质含量和扫描UV图。

**2.2.1 pH对美洲大蠊醇提取物中蛋白质稳定性的影响** 分别称取美洲大蠊醇提取物样品6份,每份11.0 mg,分别加入超纯水10.0 mL及10.0  $\mu\text{L}$  ( $4.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的氢氧化钠溶液,振荡、离心,移取少量于离心管中离心(10.0 min,  $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),离心结束,若有沉淀,反复操作,判断样品是否完全溶解,直至样品完全溶解。

分别采用浓盐酸及 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液调节其pH分别为5,6,7,8,9,10,11等6个pH梯度,于4  $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,测试其UV图及蛋白质含量。

**2.2.2 氯化钠对美洲大蠊醇提取物中蛋白质稳定性的影响** 样品制备同2.2.1。按照盐浓度依次为 $0.5, 1, 1.5, 2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,计算其加入盐量分别为0.292 2,0.584 4,0.876 6,1.168 8 g,加入完毕后,振荡、摇匀,于摇床上摇匀1 h,4  $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,测试其UV图及蛋白质含量。

**2.2.3 硫酸铵对美洲大蠊醇提取物中蛋白质稳定性的影响** 样品制备同2.2.1。按照盐浓度依次为

$0.5, 1, 1.5, 2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,计算其加入盐量分别为0.660 7,1.321 4,1.982 1,2.642 8 g,加入完毕后,振荡、摇匀,于摇床上摇匀1 h,4  $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,测试其UV图及蛋白质含量。

**2.2.4 乙腈对美洲大蠊醇提取物中蛋白质稳定性的影响** 样品制备同2.2.1。按照有机溶剂浓度(体积比)依次为0%,10%,20%,30%,40%,50%,计算其加入乙腈量分别为0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,加入完毕后,振荡、摇匀,于摇床上摇匀1 h,4  $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,测试其UV图及蛋白质含量。

**2.2.5 甲醇对美洲大蠊醇提取物中蛋白质稳定性的影响** 样品制备同2.2.1。按照有机溶剂浓度(体积比)依次为0%,10%,20%,30%,40%,50%,计算其加入甲醇量分别为0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,加入完毕后,振荡、摇匀,于摇床上摇匀1 h,于摇床上摇匀1 h,4  $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,测试其UV图及蛋白质含量。

## 3 结果与分析

**3.1 不同pH条件下蛋白质含量变化及UV图谱变化趋势** 见图1。

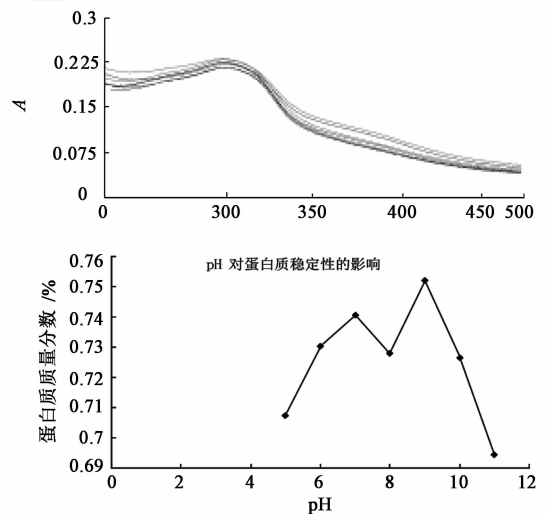


图1 美洲大蠊醇提取物中蛋白质含量随pH的变化

美洲大蠊醇提取物水溶液在pH 7,9时蛋白质含量最高,随着pH条件的改变,蛋白质含量变化显著,在5~7,8~9时,其蛋白质含量与pH呈正相关,而当7~8,9~11时其蛋白质含量与pH负正相关。pH对美洲大蠊醇提取物的影响较大,蛋白质分子是两性物质,当样品溶液的pH低于蛋白质等电点时,蛋白质便呈正离子状态;当溶液的pH高于蛋白质的等电点时,蛋白质分子则成负离子状态。在等电点附近,水化作用最弱,溶液越不稳定<sup>[17]</sup>。对

于样品的溶解性,要通过调节 pH 来调整,一般呈碱性。

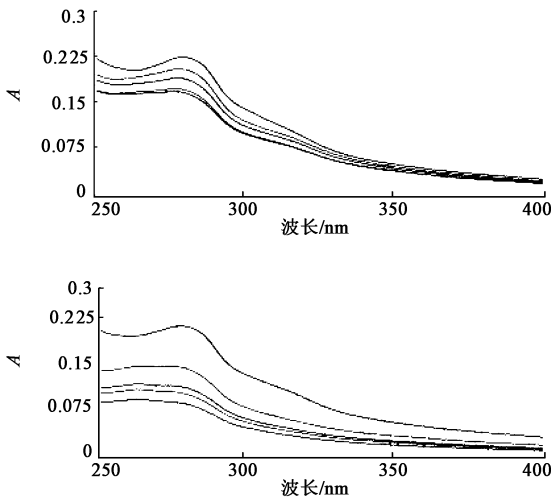
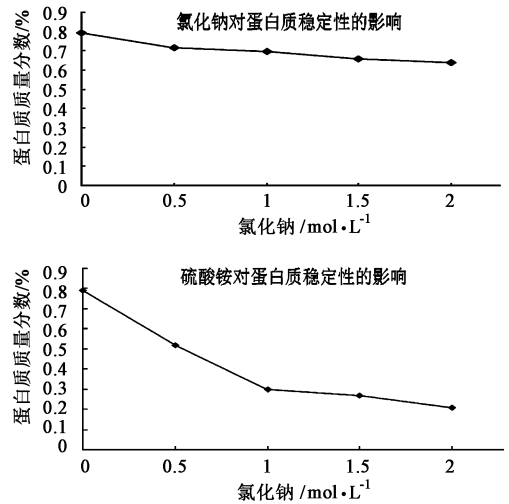


图 2 美洲大蠊醇提取物中蛋白质含量随无机盐的变化

由图 2 可以看出,无机盐盐溶液浓度与美洲大蠊醇提取物中蛋白质含量呈负相关,即美洲大蠊醇提取物中蛋白质含量随着氯化钠和硫酸铵浓度的增加而减少。随着氯化钠或硫酸铵浓度的增大,蛋白质含量降低。蛋白质是有亲水性和疏水性氨基酸组成,其中疏水性氨基酸大部分集中于蛋白质的内部,一小部分分布于蛋白质表面形成不同的疏水区域。在溶剂中,蛋白质分子表面的疏水残基和亲水残基的特征决定其溶解度。虽然在结构上,蛋白质分子上的疏水基团倾向于位于分子内部,剩余部分残基仍会分布在蛋白质分子的表面上,与溶剂发生相互作用<sup>[18]</sup>。疏水残基对蛋白质的分子行为起了很大

3.2 不同浓度的无机盐对蛋白质含量的影响及 UV 图谱变化趋势 见图 2。



的影响作用。

当蛋白质中加入中性盐时,一方面由于盐离子与蛋白质分子中的离子基团作用,降低蛋白质的活度系数,使其溶解度增加。当盐浓度较低时,以这种情况为主,蛋白质表现易于溶解,另一方面,盐与溶液中的水进行水化作用,降低水分子的活度系数,导致蛋白质水合程度的降低,使蛋白质的溶解程度减少。当盐浓度较高时,这种作用起主要作用,蛋白质发生沉淀。

3.3 不同浓度的有机溶剂对蛋白质含量的影响及 UV 图谱变化趋势 见图 3。

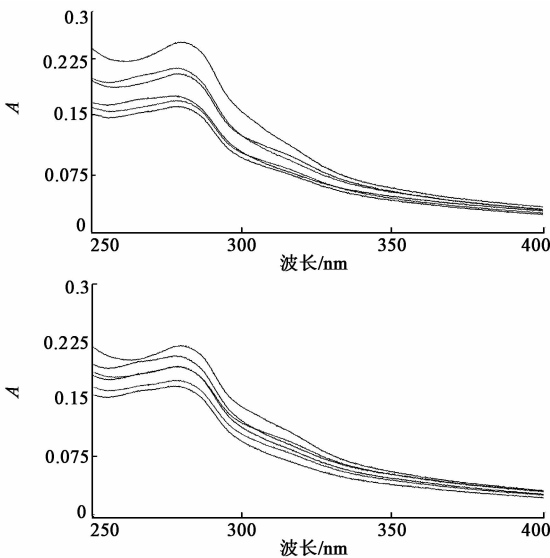


图 3 美洲大蠊醇提取物中蛋白质含量随有机溶剂的变化

由图3可以看出,有机溶剂体积分数与美洲大蠊醇提取物中蛋白质含量呈负相关,即美洲大蠊醇提取物中蛋白质含量随着有机溶剂体积分数的增大而减少。随着甲醇或乙腈浓度的减小,蛋白质含量降低。在等电点附近,蛋白质分子主要以偶极离子形式存在,这时如果添加有机溶剂,由于有机溶剂有较低的介电常数,会使溶液的介电常数减小,增强偶极离子之间的静电引力,从而使分子聚集而沉淀。另一方面,有机溶剂本身的水合作用会破坏蛋白质表面的水合层,也促使蛋白质分子脱水而沉淀<sup>[19]</sup>。

有机溶剂降低了水溶液的介电常数,增加了溶质分子电荷间库仑引力,减少了蛋白质溶解度;此外还与溶剂水作用压缩蛋白质分子表面水花层,使蛋白质脱水而相互聚集析出。

#### 4 结论

通过考察不同 pH 环境、不同浓度无机盐和体积分数的有机溶剂对美洲大蠊醇提取物中蛋白质稳定性的影响,发现其对蛋白质有不同程度的影响。无机盐对蛋白质的影响一方面是随着盐浓度的增大,蛋白质含量降低。从 UV 图谱中可以看出,吸光度急剧下降,尤其是  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,含量最低;另一方面是对比氯化钠和硫酸铵两种盐,可以看出,离子价态也与其蛋白质含量有着正相关关系;同样,有机溶剂对蛋白质含量的降低是由于其介电常数和表面水合层不同程度的破坏造成。综上所述,pH、无机盐和有机溶剂对美洲大蠊醇提取物中蛋白质含量的影响是通过改变蛋白质的存在状态,进而破坏其稳定性。

#### [参考文献]

[1] 戴云,曾茗,项朋志. 蜚蠊的药用价值[J]. 中药材, 2005,28(9):848.  
 [2] 姚廉. 中药蜚蠊化学成分的研究(1). 氨基酸成分的初步分析[J]. 天津药学,1994,6(3):26.  
 [3] 何正春,彭芳,刘光明,等. 美洲大蠊化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2007,32(21):2326.  
 [4] 吴仕筠,代小艳,米长忠. 蜚蠊药用的研究[J]. 中国

民族民间医药,2008,17(9):7.  
 [5] 吴喜燕,高慧敏,王智民. 蟾蜍类药材化学成分的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):207,220.  
 [6] 李军德,黄璐琦,陈敏,等. 中药虻虫研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):228.  
 [7] 刘圆圆,黄新,甄汉深,等. 广西虎纹捕鸟蛛毒的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,17(8):280.  
 [8] Manning M C, Patel K, Borchardt R T. Stability of protein pharmaceuticals [J]. Pharm Res, 1989, 6(11):903.  
 [9] WANG Yao-Bing, NAGATA Shinichi. Participation of ions and solutes on the thermostability of  $\alpha$ -amylase[J]. Chinese Journal of Biotechnology,2004,20(1):104.  
 [10] 李卫芬. 热纤维梭菌  $\beta$ -葡聚糖酶热稳定性机制的研究[D]. 杭州:浙江大学,2005.  
 [11] 王霖,张士瑾,陈玲玲. 蛋白质三级拓扑结构对热稳定性贡献的初步探讨[J]. 中国海洋大学学报,2009,39(5):940.  
 [12] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. 福林酚法测定蛋白质[J]. 食品与药品,2011,13(3):147.  
 [13] 张云茹,周跃刚,范守城,等. 硫酸铵存在下的改良福林-酚试剂法[J]. 重庆工学院学报:自然科学,2008,22(7):159,166.  
 [14] 张康. 生物制品蛋白质含量 Lowry 法测定法应注意的几个问题[J]. Strait Pharm J,2001,13(4):47.  
 [15] 李海玲,彭书明,李凇,等. 4 种常用蛋白浓度测定方法的比较[J]. 中国生化药物杂志,2008,29(4):277,282.  
 [16] 万志强,严铭铭,展月,等. 五味子蛋白的提取纯化及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):119.  
 [17] 李智,林广素. 豆奶粉的稳定性研究[J]. 广西轻工业,2007,2(2):15,53.  
 [18] 陈霞,姜晓雷,李明达,等. 离子强度和 pH 对大麦中热稳定蛋白稳定性的影响[J]. 食品工业科技,2010,31(20):87.  
 [19] 刘媛,谢孟峡. 有机溶剂对 BSA 和 HAS 二级结构的影响[J]. 分析实验室,2011,20:393.

[责任编辑 邹晓翠]