

文章编号:2095-7386(2016)01-0017-04

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.01.004

几种用于肽粉中蛋白质含量测定方法的比较

贾维宝,刘良忠,黄婷,曹宇翔,朱哲,李文杰
(武汉轻工大学 食品科学与工程学院,湖北 武汉 430023)

摘要:考虑到生产实际,为了找到一种准确、简便的测定市售肽粉中蛋白质含量的方法,实验以凯氏定氮法为参考,通过对双缩脲法、福林酚法、考马斯亮蓝法、紫外吸收法测定不同分子质量段的肽粉中蛋白质含量的比较,筛选出测定肽粉中蛋白质含量的最适方法。结果分析表明:用双缩脲法测定的肽粉中蛋白质含量最接近于凯氏定氮法,结果准确,操作简单,且适用于小分子质量肽粉中蛋白质的测定。

关键词:肽粉;蛋白质测定;方法比较

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

Comparison of several methods for determining the content of protein in peptides

JIA Wei-bao, LIU Liang-zhong, HUANG Ting, CAO Yu-xiang, ZHU Zhe, LI Wen-jie

(School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Taking into account the actual production, in order to find an accurate and simple method to determine the content of protein in peptides, the experiment was based on the method of kjeldahl determination, the comparison of the biuret method, Folin phenol method, coomassie blue staining, uv absorption method for determining the content of protein in different molecular peptides to screening out the best method. Results show that the data of biuret method are close to by kjeldahl determination. This method is very simple and accurate. And it also suitable to determination the protein in short peptides.

Key words: peptides, protein determination, method comparison

1 引言

蛋白质是构成生物体细胞组织的重要成分,食物中的蛋白质是人体中氮的唯一来源,具有糖类和脂肪不可替代的作用^[1]。蛋白质的测定方法一般可分为间接方法和直接方法。间接方法是通过测定样品中蛋白质的含氮量进行推算蛋白质含量的方

法;直接方法则是根据蛋白质的物理和化学性质,直接测定蛋白质含量的方法^[2]。蛋白质含量测定法,目前包括定氮法^[3],双缩脲法^[4],福林酚法(Lowry法),紫外吸收法^[5]和考马斯亮蓝法^[6]。凯氏定氮法较复杂,但准确,往往以凯氏定氮法测定的蛋白质作为其他方法的标准蛋白质^[7-8]。

氨基酸彼此以酰胺键相互连接形成的化合物称

收稿日期:2015-10-30.

作者简介:贾维宝(1989-),男,硕士研究生,E-mail:15681901206@163.com.

通信作者:刘良忠(1963-),男,教授,博士,E-mail:liu2022888@163.com.

作肽,含 10 个以上氨基酸残基(<50 个)的肽通常被称为多肽,而含 10 个以下的称为寡肽(低聚肽,小肽,短肽),低聚肽的相对分子质量一般较低,通常在 1 000 Da 以下。肽是由氨基酸组成的聚合物,主要来自于蛋白质合成或分解的中间产物,其具有良好的加工特性、营养功能和生理活性。

为了方便研究人员对市场上销售的肽粉中蛋白质含量进行快速检测,实验以凯氏定氮法做参考,考察用双缩脲法、福林酚法、紫外吸收法和考马斯亮蓝法测定肽粉中蛋白质含量的准确性及适用性,筛选出最简便、快捷的检测方法。

2 实验材料与方法

2.1 实验样品

甲基红:天津市科密欧化学试剂开发中心;溴甲酚绿:国药集团化学试剂有限公司;牛血清清蛋白:北京天勤一和生物科技有限公司;酒石酸钾钠:天津市凯通化学试剂有限公司;考马斯亮蓝 G-250:上海展云化工有限公司;福林酚试剂:天津百伦斯生物科技有限公司;蛋清肽粉(分子质量<3 000):实验室自制;蛋清肽粉(分子质量<1 000):实验室自制,其他试剂均为分析纯。

2.2 实验仪器

可见分光光度计:尤尼柯仪器有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器:郑州科丰仪器设备有限公司;微量滴定装置,定氮蒸馏装置等。

2.3 实验方法

2.3.1 微量凯氏定氮法

精密称取蛋清肽冻干粉 1.5 g 于干燥洁净的凯氏烧瓶中,加入 6 g 无水 K_2SO_4 , 0.2 g $CuSO_4$, 20 mL H_2SO_4 。先小火加热待泡沫停止后加大火,保持液面微沸,直到溶液呈蓝绿色透明时再继续加热 0.5—1 h。冷却后加水定容至 100 mL,然后进行微量蒸馏和滴定。最后按照公式(1)计算样品的蛋白质含量,并做平行实验,计算其平均值再进行分析。

$$\text{蛋白质含量}(\%) = \frac{(V-V_0) \times 0.014 \times C}{m \times 0.1} \times F \times 100 \quad (1)$$

式中: V —样品滴定时消耗的标准 HCl 溶液体积(mL);

V_0 —空白滴定时消耗的标准 HCl 溶液体积(mL);

C —标准 HCl 溶液的摩尔浓度(mol/L);

F —氮换算成蛋白质的系数;

m —试样的质量(g)。

2.3.2 双缩脲法的测定分析

取 7 支试管,分别加入 0 mL, 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL, 1.0 mL, 1.2 mL 的 10 mg/mL 标准蛋白质溶液,用水补足到 1 mL,然后加入 4 mL 双缩脲试剂。充分摇匀后,在室温(20—25 °C)下放置 30 min,于 540 nm 处进行比色测定,用未加蛋白质溶液的第一支试管作为空白对照液。以蛋白质含量为横坐标,光吸收值为纵坐标绘制标准曲线。然后用上述同样的方法测定不同浓度、不同分子质量的蛋清肽粉的蛋白质浓度与吸光度的线性关系,绘制标准曲线。并做平行实验,计算其平均值再进行分析。

2.3.3 福林酚法(Lowry 法)的测定分析

取 7 支试管,分别加入 0 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL, 1.0 mL 标准蛋白质溶液(浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$)。用水补足到 1.0 mL,然后每支试管加入 5 mL 试剂甲(50 份 A 与 1 份 B 混合,即为试剂甲。A 液:10 g Na_2CO_3 , 2 g NaOH 和 0.25 g 酒石酸钾钠($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$),溶解于 500 mL 蒸馏水中。B 液:0.5 g 硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)溶解于 100 mL 蒸馏水中),在旋涡混合器上迅速混合,于室温放置 10 min,再逐管加入 0.5 mL 福林酚试剂,立即混匀。然后在室温下放置 10 min,以未加蛋白质溶液的第一支试管作为空白对照,于 750 nm 处测定各管中溶液的吸光度值。以蛋白质浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制出标准曲线。然后用上述同样的方法,测定不同浓度、不同分子质量的蛋清肽粉的蛋白质浓度与吸光度的线性关系,绘制标准曲线。并做平行实验,计算其平均值再进行分析。

2.3.4 考马斯亮蓝法的测定分析

取 7 只试管分别加入 0 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL, 1.0 mL 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 牛血清清蛋白标准液,补充水到 1.0 mL。然后每只试管加入 5.0 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂,摇匀放置 5 min,在紫外—可见分光光度计 595 nm 处测定吸光值。然后以吸光值为纵坐标,牛血清清蛋白的浓度为横坐标绘制标准曲线。然后用上述同样的方法,测定不同浓度、不同分子质量的蛋清肽粉的蛋白质浓度与吸光度的线性关系,绘制标准曲线。并做平行实验,计算其平均值再进行分析。

2.3.5 紫外吸收法的测定分析

取 7 只试管分别加入 0 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 0.6 mL 的 1.25 mg/mL 牛

血清蛋白标准溶液,加水至 4 mL,在 280 nm 条件下测定其吸光值。以蛋白质浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制出标准曲线。然后用上述同样的方法测定不同浓度、不同分子质量的蛋清肽粉的蛋白质浓度与吸光度的线性关系,绘制标准曲线,并做平行实验,计算其平均值再进行分析。

2.4 不同蛋白质测定方法测定蛋清肽蛋白含量的比较

取适量低分子质量($<1\ 000$)的蛋清肽冻干粉样品分别配成质量分数为 3%,6%,9% 的溶液,然后分别用凯氏定氮法,双缩脲法,福林酚法,考马斯亮蓝法,紫外吸收法测定其中的蛋白质含量,具体实验操作分别参照 2.3.1,2.3.2,2.3.3,2.3.4 中的测定方法。最后对不同方法 3 次平行测定结果的平均值进行分析比较。

3 结果分析

3.1 不同蛋白测定方法对不同分子质量蛋清肽粉中蛋白含量的测定

3.1.1 双缩脲法的测定分析

由图 1 数据绘制标准曲线得:双缩脲法测定的牛血清蛋白标准曲线方程为 $y = 0.0334x + 0.1201$ ($R^2 = 0.9996$),蛋清肽粉(分子量 $\leq 3\ 000$ Da)曲线方程为 $y = 0.0274x + 0.1591$ ($R^2 = 0.9922$),蛋清肽粉(分子量 $\leq 1\ 000$ Da)曲线方程为 $y = 0.029x + 0.1121$ ($R^2 = 0.9948$),均有较好的线性关系,从而说明双缩脲法适用于测定肽粉中的蛋白质含量,也适用于小分子质量肽粉中蛋白质的测定。

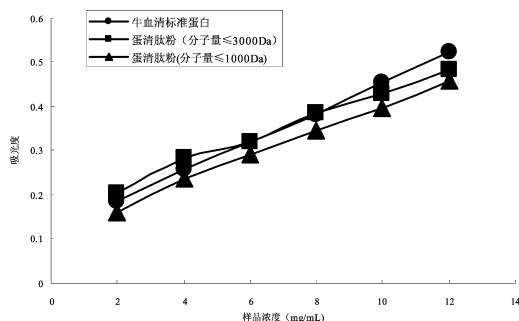


图 1 双缩脲法比较不同肽粉蛋白含量

3.1.2 福林酚法的测定分析

由图 2 数据绘制标准曲线得到:牛血清蛋白标准曲线方程为 $y = 0.0025x + 0.217$ ($R^2 = 0.9989$),蛋清肽粉(分子量 $\leq 3\ 000$ Da)曲线方程为 $y = 0.0015x + 0.2128$ ($R^2 = 0.9953$),有较好的线性关系。而蛋清肽粉(分子量 $\leq 1\ 000$ Da)蛋白含量与

A_{750} 无线性关系,这可能与蛋清肽粉分子质量较小有关。从而说明,对于小分子质量的肽粉中蛋白质含量的测定,福林酚法不适用。

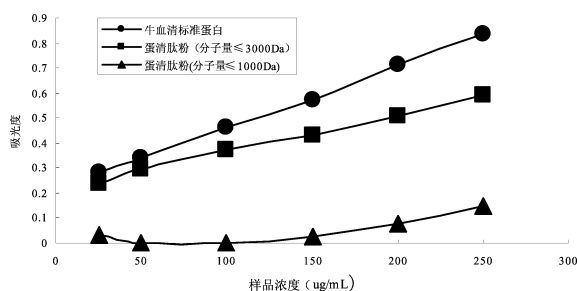


图 2 福林酚法比较不同肽粉蛋白含量

3.1.3 考马斯亮蓝法的测定分析

由图 3 数据绘制考马斯亮蓝法的牛血清蛋白标准曲线方程为 $y = 0.0052x + 0.0143$ ($R^2 = 0.9958$),线性关系良好。而蛋清肽粉(分子量 $\leq 3\ 000$ Da)和蛋清肽粉(分子量 $\leq 1\ 000$ Da)蛋白含量与 A_{595} 均无线性关系。从而表明考马斯亮蓝法不适用于肽粉中蛋白质含量的测定。

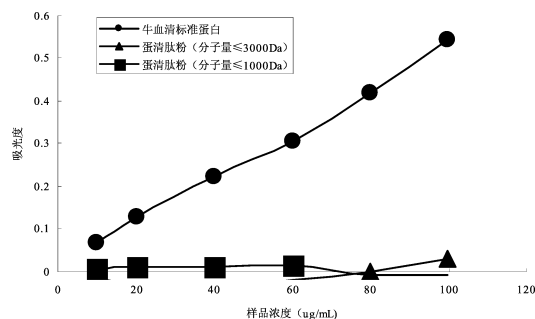


图 3 考马斯亮蓝法比较不同肽粉蛋白含量

3.1.4 紫外吸收法的测定分析

由图 4 数据绘制标准曲线得到:紫外吸收法绘制的牛血清蛋白标准曲线方程为 $y = 0.0011x - 0.1103$ ($R^2 = 0.9901$),线性关系良好。而蛋清肽粉(分子量 $\leq 3\ 000$ Da)和蛋清肽粉(分子量 $\leq 1\ 000$ Da)蛋白含量与 A_{280} 均无线性关系。从而表明紫外吸收法不适用于肽粉中蛋白质含量的测定。

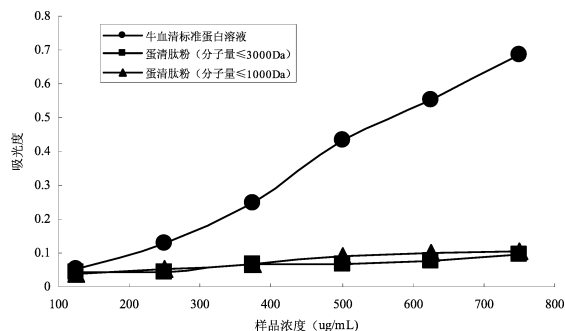


图 4 紫外吸收法比较不同肽粉蛋白含量

3.2 不同蛋白质测定方法测定低分子质量肽粉蛋白含量的结果比较

由图 5 可以看出:当低分子质量蛋清肽冻干粉的质量分数分别为 3%、6%、9% 时,双缩脲法测定蛋清肽溶液中蛋白含量的值分别为 23.6 mg/mL, 43.94 mg/mL, 68.57 mg/mL, 最接近于凯氏定氮法的测定值 23.64 mg/mL, 47.16 mg/mL, 71.33 mg/mL, 其次是福林酚法的测定值 20.8 mg/mL, 35.75 mg/mL, 58.69 mg/mL, 紫外吸收法的测定值 16.2 mg/mL, 27.4 mg/mL, 51.34 mg/mL, 而考马斯亮蓝法测定值 0.64 mg/mL, 6.09 mg/mL, 4.25 mg/mL, 远远小于凯氏定氮法测定值, 误差较大。因此我们可以得出:凯氏定氮法和双缩脲法是测定低分子质量肽粉中蛋白质含量的最适方法。

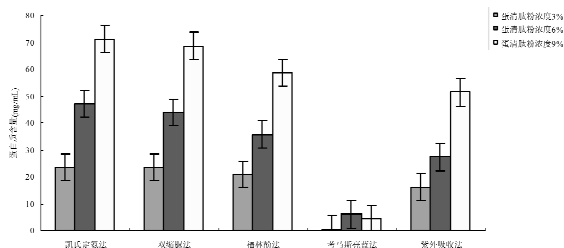


图 5 不同蛋白质测定方法测定肽粉的比较

4 结论

从实验中可以看出,凯氏定氮法是目前分析有机化合物含氮量最常用的方法,是一种蛋白质测定的经典方法,适用样品广泛,测试结果准确^[6],但是,操作较繁琐,耗时长,不适合用于蛋白质含量的快速测定。在对于低分子质量的蛋清肽粉中蛋白质含量的测定时,双缩脲法所测得的结果和凯氏定氮法差距不大(当低分子质量蛋清肽冻干粉的质量分数为 3% 时,双缩脲法测定的蛋白质含量为 23.23 mg/mL,凯氏定氮法测定值为 23.64 mg/mL,误差仅为 1.73%,且操作简单,快速,效果较好。考马斯亮蓝法、福林酚法、紫外吸收法均不适用于小分子质量肽粉中蛋白质含量的测定。引起测定结果差异的原因可能是:紫外吸收法在测定与标准蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质时,有一定的误差且仅适用于测试无色样品,对于有色样品,需进行预处理,排除颜色干扰后才适用于此方法^[9]。Folin-酚法对蛋白质含量的测定会受到酚类、柠檬酸、硫酸铵、Tris 缓冲液、甘氨酸、糖类、甘油等的干扰作用^[10]。考马斯亮蓝染色法快速、灵敏,但只对微量

蛋白有较好的测定线性范围,因此在实验前必须将样品的蛋白浓度稀释至 0.1—1 mg/mL,这对于未知蛋白浓度的样品来说不易操作,而且实验必须在 1 h 内完成,否则测试结果不准确^[11]。双缩脲法对不同蛋白质产生的颜色反应深浅相近,不受温度影响,试剂单一,方法简便,可快速测定蛋白质含量。因此,双缩脲法可以适用于不同分子质量的肽粉中蛋白质含量的快速检测,而对于其的检测限则可作为下一步的研究重点。

参考文献:

- [1] 刘志皋. 食品营养学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1993.
- [2] 路革,于同泉,王淑英,等. 蛋白质测定方法评价[J],北京农学院学报,2006,21(2):65-69.
- [3] Fujinari E M, Manes J D, Bizanek R. Peptide content determination of crude synthetic peptides by reversed-phase liquid chromatography and nitrogen-specific detection with a chemiluminescent nitrogen detector [J]. Journal of Chromatography A, 1996, 743(1): 85-89.
- [4] 萧能贻,余瑞元,袁明秀,等. 生物化学实验原理和方法 2 版[M]. 北京:北京大学出版社,1994: 232-235.
- [5] 刘扬,张占雄. 多肽含量的测定方法的比较[J]. 内蒙古石油化工, 2008(5): 65.
- [6] 李宁. 几种蛋白质测定方法的比较[J],山西农业大学学报,2006,26(2),132-134.
- [7] GB2905-1982,谷类豆类作物种子粗蛋白质测定法(半微量凯氏法)[S].
- [8] GB5511-1985,粮食,油料检验粗蛋白质测定法[S].
- [9] 张爱武. 食品中蛋白质测定方法的研究进展[J]. 农产品加工·学刊,2008(1):80-82.
- [10] 李伟,王鑫,王刚,等. 食品中蛋白质测定方法的比较[J]. 广西质量监督导报,2008,11: 73-74.
- [11] 高崧,刘秀梵,张如宽. 蛋白质分析中 SDS-PAGE 银染法与考马斯亮蓝染色法敏感性的比较[J]. 江苏农学院学报,1995,16(2):30-32.