

维药制剂药渣中蛋白质及游离氨基酸的含量测定

张凤雪¹ 文 娥¹ 李柯翱² 季志红² 田树革³

(1 新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐, 830054; 2 新疆奇康哈博维药股份有限公司, 乌鲁木齐, 830026;

3 新疆医科大学中心实验室, 乌鲁木齐, 830054)

摘要 目的:测定药渣中蛋白质及氨基酸的含量。方法:用考马斯亮蓝 G-250、茆三酮显色,分光光度法测定蛋白质及氨基酸的含量。结果:CBB G-250 显色测定蛋白质线性范围 0.081 ~ 0.202 mg,加样回收率 102.06%、RSD 为 0.99%;茆三酮显色测定氨基酸的线性范围 0.016 ~ 0.029 mg/mL,加样回收率 99.83%、RSD 为 1.82%。结论:CBB G-250 和茆三酮显色,均具有简便、快速、灵敏度高、成本低、重现性好等特点。

关键词 药渣;蛋白质;氨基酸;茆三酮;考马斯亮蓝;分光光度法;含量测定

Determination of Protein and Free Amino Acid within the Residues of Uyghur Medicine

Zhang Fengxue¹, Wen E¹ Li Ke'ao², Ji Zhihong², Tian Shuge³

(1 College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2 Xinjiang Qikang Habo

Uyghur Medicine Limited Liability Company, Urumqi 830026, China; 3 The Central Laboratory

of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract Objective: To determine the content of protein and free amino acid within the residues of the Uyghur medicine. **Methods:** The protein and amino acid content were determined by spectrophotometry with colored by coomassie brilliant blue G-250 and ninhydrin. **Results:** The linear range of protein determined by CBB G-250 chromogenic assay was 0.081 ~ 0.202mg, recovery was 102.06%, RSD was 0.99%; the linear range of free amino acid by Ninhydrin chromogenic assay was 0.016-0.029mg/mL, recovery was 99.83%, RSD was 1.82%. **Conclusion:** CBB G-250 and ninhydrin chromogenic assay is simple, rapid with high sensitivity, low cost, fine reproducible characteristics and so on.

Key Words Residues of medicine; Protein; Free amino acid; Ninhydrin; Coomassie brilliant blue; Spectrophotometry; Content determination

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.02.039

我国药渣根据原料来源,类型主要有中药渣、生物制药药渣、藏药渣、抗生素类药渣等,其中中药渣所占的比例最大。据统计,中药渣在我国的排放量逐渐增加,平均年排放量已达 3 千万吨^[1]。药渣中含有丰富的粗蛋白、碳水化合物、粗纤维、无机物和粗脂肪等^[2-5],这些药渣若被丢弃会对环境造成严重的污染,这些药渣的处理将是刻不容缓的问题。本实验测定蛋白质及氨基酸的含量,有效的解决药渣的处理难题,易污染等问题,并为后期如何利用药渣栽培食用菌^[6-7]、制成有机肥^[8-9]提供理论依据和数据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 KQ-5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AL04 型万分之一电子天平(德国梅特勒-托利多仪器有限公司),752 紫外可

见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),B-260 型水浴锅(上海亚荣生化仪器厂),TDL-40B 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂 牛血清白蛋白(批号:0332-201304,上海励瑞科技有限公司),精氨酸(批号:100080-200908,中国药品生物制品检定所),CBB G-250(Fluka 进口分装,中国医药集团上海化学试剂公司),茆三酮(批号:20140216,上海科丰实业有限公司),磷酸,乙醇等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 游离氨基酸的含量测定

2.1.1 测定波长的选择 取样品溶液和对照品溶液适量,在紫外分光光度计中进行 400 ~ 800 nm 波长扫描,二者均在 567 nm 附近有最大吸收,因此选择 567 nm 为测定波长^[10-11]。

基金项目:新疆医科大学中药化学教学团队专项资助(编号:JXTD2013-3)

作者简介:张凤雪(1990.01—),女,2014 级在读硕士研究生,中药化学与中药分析学,E-mail:1165025478@qq.com

通信作者:田树革(1968.05—),男,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:中药化学与质量标准,E-mail:tsgyz@sina.com

2.1.2 标准溶液的配制 精密称取 10 mg 精氨酸对照品,加蒸馏水溶解于 50 mL 容量瓶中,摇匀,得精氨酸对照品溶液的浓度为 0.2 mg/mL 的。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取药渣粗粉 1 g,加 25 mL 蒸馏水超声 30 min,离心,过滤,滤液备用。

2.1.4 显色剂的配制 2% 的茚三酮的配制:精密称取 4 g 茚三酮放入 200 mL 容量瓶中,用乙醇溶解并定容至刻度,备用。pH = 6.8 的磷酸缓冲液的配制:精密称取磷酸二氢钾 3.4 g,氢氧化钠 0.472 5 g,加蒸馏水并稀释至 500 mL,备用^[11-12]。

2.1.5 标准曲线的绘制 精密吸取上述对照品溶液 0.0、0.8、1.0、1.1、1.3、1.4 mL 分别置于 10 mL 具塞试管中,各加入 2% 的茚三酮乙醇溶液 2 mL,摇匀,再加 pH = 6.8 的磷酸缓冲液 1 mL,摇匀,在沸水浴中加热 15 min,取出,在冷水中迅速放凉,用蒸馏水补足至 10 mL,摇匀,在 567 nm 处用分光光度计测量其吸光度值。横坐标为精氨酸对照品溶液的浓度 (mg/mL) 纵坐标为吸光度值 A,绘制标准曲线图,得回归方程: $A = 42.523C - 0.4539$ ($R^2 = 0.9995$),在所测量的游离氨基酸浓度范围内浓度与吸光度呈良好的线性关系。

2.1.6 方法学考察

2.1.6.1 精密度 分别精密吸取 6 份精氨酸对照品溶液各 1.1 mL 于 10 mL 具塞试管中,按照“2.1.5”项下实验方法操作,测定其在 567 nm 处吸光度值, RSD 为 1.02% ($n = 6$)。

2.1.6.2 重复性 取 3 号样品 1 g,按“2.1.3”项下实验方法操作,得滤液,精密吸取提取液 0.8 mL,按照“2.1.5”项下实验方法操作,测定样品中氨基酸吸光度值,并计算, RSD 为 0.92% ($n = 6$)。

2.1.6.3 稳定性试验 分别精密量取精氨酸对照品溶液 1.1 mL,按照“2.1.5”项下实验方法操作,每隔 2 h 测定吸光度值, RSD 为 2.27% ($n = 6$)。试验表明在 10 h 内测定稳定。

2.1.6.4 加样回收率试验 利用加标回收法,分别吸取已知氨基酸含量已知的药渣提取液 0.3 mL,共 6 份,各加入对照品溶液 0.6 mL,按照“2.1.5”项下实验方法操作,测定吸光度值,并计算其回收率,结果见表 1。

2.1.6.5 样品含量测定 取样品 1 g,按“2.1.3”项下实验方法方法操作,得滤液,精密吸取一定量的提取液,按照“2.1.5”项下实验方法操作,测定吸光度值,并计算样品中游离氨基酸的含量,结

果见表 3。

2.2 蛋白质的含量测定

2.2.1 测定波长的选择 取样品溶液和对照品溶液适量,在紫外分光光度计中进行 400 ~ 800 nm 波长扫描,二者均在 595 nm 附近有最大吸收,因此选择 595 nm 为测定波长^[13-14]。

2.2.2 标准溶液的配制 精密称取牛血清白蛋白 (BSA) 对照品 10 mg 置于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 0.1 mg/mL 的 BSA 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取药渣粗粉 1 g,加 25 mL 蒸馏水超声 30 min,离心,过滤,滤液备用。

2.2.4 显色剂的配制 CBB G-250 染料试剂:称 50 mg CBB G-250,溶于 25 mL 95% 的乙醇后,再加入 50 mL 85% 的磷酸,用水稀释至 500 mL^[15]。

2.2.5 标准曲线的绘制 精密吸取上述溶液 0.0、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2 mL 分别置于 10 mL 具塞试管中,各加入 CBB G-250 染料 5 mL,用蒸馏水补足至 10 mL,轻微振摇,混匀,在 595 nm 处用分光光度计测量其吸光度值。横坐标为 BSA 对照品溶液的含量 (mg),纵坐标为吸光度值 A,绘制标准曲线图,得回归方程: $A = 3.4101C + 0.0975$ ($R^2 = 0.9995$),在所测量的游离氨基酸浓度范围内浓度与吸光度呈良好的线性关系。

2.2.6 方法学考察

2.2.6.1 精密度 精密量取 BSA 对照品溶液 6 份,各 1.2 mL 于 10 mL 具塞试管中,按“2.2.5”项下方法操作,测定其在 595 nm 处吸光度值, RSD 为 0.97% ($n = 6$)。

2.2.6.2 重复性 取 3 号样品 1 g,按“2.2.3”项下实验方法操作,得滤液,精密量取 0.8 mL 提取液,按照“2.2.5”项下方法操作,测定蛋白质在样品中吸光度值,并计算, 1.63% ($n = 6$)。

2.2.6.3 稳定性试验 分别精密量取 BSA 对照品溶液 1.4 mL,按照“2.2.5”项下实验方法操作,每隔 5 min 测定吸光度值, RSD 为 2.02% ($n = 6$)。试验表明在 15 min 内测定稳定。

2.2.6.4 加样回收率试验 利用加标回收法,分别吸取已知蛋白质含量的药渣提取液 0.3 mL,共 6 份,各加入对照品溶液 0.8 mL,按照“2.2.5”项下实验方法操作,测定吸光度值,并计算其回收率,结果见表 2。

2.2.6.5 样品含量测定 取样品 1 g,按“2.2.3”项

下实验方法方法操作,得滤液,精密吸取一定量的提取液,按照“2. 2. 5”项下实验方法操作,测定吸光度值,并计算样品中总蛋白质的含量,结果见表 3。

表 1 药渣中总游离氨基酸回收率试验结果 (n=6)

加标量 (mg)	样品量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
0.095	0.121	0.216	100.00		
0.095	0.121	0.217	101.05		
0.095	0.121	0.215	98.95	99.83	1.82
0.095	0.121	0.218	102.11		
0.095	0.121	0.213	96.84		
0.095	0.121	0.216	100.00		

表 2 药渣中总蛋白质回收率试验结果 (n=6)

加标量 (mg)	样品量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
0.081	0.061	0.145	103.70		
0.081	0.061	0.143	101.23		
0.081	0.061	0.144	102.47	102.06	0.99
0.081	0.061	0.143	101.23		
0.081	0.061	0.143	101.23		
0.081	0.061	0.144	102.47		

表 3 游离氨基酸及蛋白质含量测定试验结果 (n=5)

序号	游离氨基酸			蛋白质		
	样品量 (g)	含量 (mg/g)	RSD (%)	样品量 (g)	含量 (mg/g)	RSD (%)
1	1.0001	2.950	0.11	1.0000	0.854	0.67
2	1.0002	3.400	0.05	1.0000	1.156	0.79
3	1.0002	7.943	0.03	1.0000	5.085	1.33
4	1.0001	2.987	0.06	1.0001	1.027	0.53
5	1.0001	2.825	0.72	1.0001	0.839	0.78
6	1.0000	6.528	0.15	1.0000	1.867	1.76
7	1.0000	5.025	0.14	1.0000	1.263	1.53
8	1.0000	2.117	0.33	1.0000	1.983	1.22
9	1.0001	2.560	0.67	1.0001	1.683	1.65
10	1.0000	7.113	0.04	1.0000	1.453	0.15

3 小结

3.1 用茚三酮显色法测定药渣中游离氨基酸的含量的原理 弱酸性溶液中茚三酮与氨基酸共热,可引起氨基酸的脱氨、脱羧反应,最终与还原性茚三酮发生作用,生成紫色物质,颜色深浅与氨基酸含量成正比。该方法简便、快捷、灵敏度高、检测成本低,可用于大样本的检测。

3.2 用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的基本原理 考马斯亮蓝与蛋白质直接结合,颜色深浅与蛋白质含量成正比,因此,测定结果不受样品中非蛋白

氮的影响,结果更准确^[15]。用考马斯亮蓝 G-250,作为蛋白质的显色剂,灵敏度高、简便、快速等优点。与古老的经典的测定蛋白质的方法相比,考马斯亮蓝法,不需要消化且用时较短,加入显色剂后立刻就能测定,可用于蛋白质的检识,灵敏度高,且迅速而简便。

4 讨论

在检测氨基酸过程中,混匀时轻微的震荡,使混合均匀,剧烈震荡会产生气泡,不易定容;水浴温度每次做要保持一致,温度对显色影响较大。在测定蛋白质过程中,加入 CBB G-250 后,立即轻微震荡混匀,再定容,若剧烈震荡会产生大量的气泡,干扰定容。测定时要迅速,该显色反应随时间增长,吸光度值在逐渐降低。

参考文献

[1]蔡景义,周安国.中草药渣在动物生产中的应用[J].黑龙江畜牧兽医,2009(1):56-57.

[2]曹德宾,王广来,李艳秋,等.中药废渣栽培平菇试验初报[J].中国食菌,2008,27(4):17-18.

[3]王小晶,邓宇,方德华.急支糖浆药渣栽培野生平菇的效应研究[J].食用菌学报,2008,16(3):36-38.

[4]潘华峰,邓乔丹,冯毅种,等.中药渣综合利用的可行性分析[J].时珍国医国药,2011,22(8):2026-2027.

[5]陆景伟,王远会,张远陵,等.中药渣在农业上的综合利用研究进展[J].南方农业,2013,7(12):64-67.

[6]吴焱鑫,冀彦锡,任昂,等.中药渣栽培食(药)用真菌研究的概述[J].中国食用菌,2011,30(4):3-6.

[7]谭永忠,陈今朝,韩宗先,等.中药渣栽培平菇试验[J].北方园艺,2012(9):168-170.

[8]王茂,郭鑫,韩峰,等.中药渣有氧发酵有机肥中试及田间肥效试验研究[J].现代农业科技,2014(18):217-218.

[9]唐懋华,成维东.中药渣基质对蔬菜育苗及产量的影响[J].江苏农业科学,2005,33(4):81-82.

[10]胡京枝,董小海,余大杰,等.紫外分光光度法测定含乳饮料中游离氨基酸含量[J].中国食品添加剂,2007(6):164-166,64.

[11]张永芳,张琪,王润梅,等.茚三酮呈色法测定谷子种子中的游离氨基酸含量[J].种子,2014,33(1):111-113,126.

[12]梁英丽,李艳,高孟婷,等.西归中总氨基酸含量测定方法研究[J].大理学院学报,2009,8(10):7-9.

[13]李娟,张耀庭,曾伟,等.应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J].中国生物制品学杂志,2000,13(2):118-120.

[14]王孝平,邢树礼.考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J].天津化工,2009,23(3):40-42.

[15]王艾平,周丽明.考马斯亮蓝法测定茶籽多糖中蛋白质含量条件的优化[J].河南农业科学,2014,43(3):150-153.