

考马斯亮蓝法测定茶籽多糖中蛋白质含量条件的优化

王艾平, 周丽明

(上饶师范学院 生命科学学院, 江西 上饶 334001)

摘要: 为建立高效、快速测定茶籽多糖中蛋白质含量的方法, 以吸光度为考察指标, 通过单因素和正交试验, 对采用考马斯亮蓝法测定茶籽多糖溶液中蛋白质含量的试验条件(考马斯亮蓝 G-250 用量、反应时间、反应温度)进行了优化。结果表明, 优化后的方法为: 精确吸取茶籽多糖溶液 1.0 mL, 加入考马斯亮蓝 G-250 溶液(0.01%) 4.0 mL, 以蒸馏水补至总体积为 10.0 mL, 混匀, 25 °C 条件下放置 35 min, 于 595 nm 处测定其吸光度。该方法的精密度 *RSD* 为 0.506%; 稳定性 *RSD* 为 0.836%; 重现性 *RSD* 为 1.57%; 样品的平均加标回收率为 99.19%, *RSD* 为 0.86%, 表明该方法是测定茶籽多糖溶液中蛋白质含量的有效方法。

关键词: 茶籽多糖; 蛋白质; 考马斯亮蓝法; 优化

中图分类号: TS229 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)03-0150-04

Determination of Protein Content in *Camellia oleifera* Seed Polysaccharides by Coomassie Brilliant Blue Method

WANG Ai-ping, ZHOU Li-ming

(College of Life Science, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China)

Abstract: To establish a highly efficient determination method of protein content in *Camellia oleifera* seed polysaccharides, three factors including the amount of Coomassie brilliant blue G-250, reaction temperature and reaction time were optimized by single factor and orthogonal experiments using the absorbance as index. The optimized method was that 1.0 mL solution of *Camellia oleifera* seed polysaccharides and 4.0 mL solution of Coomassie brilliant blue G-250 were added together, and then the total volume of the solution reached 10.0 mL by adding H₂O. The solution was kept 35 min at 25 °C. The absorbency of the solution was measured at 595 nm. The *RSD* of precision, stability and reproducibility was 0.506%, 0.836% and 1.57%, respectively. The average recovery was 99.19% and the *RSD* was 0.86%. The method was effective for the determination of protein content in polysaccharides from *Camellia oleifera* seeds.

Key words: *Camellia oleifera* seed polysaccharides; protein; Coomassie brilliant blue method; optimization

油茶为茶科山茶, 是我国南方特有的重要木本食用油料树种, 与油棕、油橄榄和椰子并称世界四大木本油料植物^[1], 其籽含 25%~35% 的茶油。据统计, 我国年产油茶籽约 54.98 万 t, 其中以湖南、江西两省产量最大, 占全国总产量的 60% 以上^[2]。油茶籽榨油之后的副产品——油茶饼粕年均产量约 39.71 万 t^[3], 其中含 10%~15% 的茶皂素、10%~20% 的蛋白质、30%~50% 的糖类物质、2% 以上的

单宁、0.4% 以上的咖啡因和一定量的黄酮类物质^[4]。据报道, 油茶籽多糖能够明显延长血栓形成时间、缩短血栓长度, 从而起到抗血栓的药理作用; 此外, 油茶籽多糖还能降低血糖, 对糖代谢紊乱具有一定的修复作用^[5]。因此, 从油茶饼粕中提取油茶籽多糖对于加强油茶饼粕的综合利用、增加油茶企业的收益具有重要意义。在茶籽多糖的众多提取方法中, 蛋白质是粗提取物中不可避免的杂质之一。

收稿日期: 2013-09-24

作者简介: 王艾平(1961-), 男, 江西上饶人, 教授, 本科, 主要从事生物活性物质研究。E-mail: 1328662368@qq.com

研究茶籽多糖中蛋白质含量的测定方法对油茶籽多糖的纯化工序研究具有重要意义。目前,关于茶籽多糖中蛋白质含量的测定方法鲜有完整报道。鉴于此,通过单因素和正交试验,对采用考马斯亮蓝法测定茶籽多糖溶液中蛋白质含量的试验条件进行了优化,以期建立高效、快速测定茶籽多糖中蛋白质含量的方法。

1 材料和方法

1.1 材料、仪器与试剂

试验材料:油茶饼粕由上饶山之源科技股份有限公司提供;准确称取脱脂干燥的油茶饼粕 5 g,按料液比 1:9 加入蒸馏水 45 mL,回流温度 75 °C,回流 2.0 h 后过滤,滤液浓缩后加入无水乙醇,使乙醇体积分数达到 80%,静置过夜,使多糖沉淀,再用丙酮和乙醚洗涤沉淀,沉淀复溶于 100 mL 蒸馏水中,制得茶籽多糖溶液^[6]。

试验仪器:紫外可见分光光度计(UV-2102, PC 型,尤尼柯上海仪器有限公司)、SSW 型微电脑电热恒温水槽(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)、微量移液器(上海荣泰生化工程有限公司)。

试验试剂:牛血清白蛋白(进口分装, Sigma 公司)、考马斯亮蓝 G-250(进口分装,中国医药集团上海化学试剂公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 溶液的配制

蛋白质标准溶液的制备:精确称取牛血清白蛋白 10.0 mg,用蒸馏水溶解后定容至 100 mL,即为 0.1 mg/mL 蛋白质标准溶液,保存于 4 °C 冰箱中。

考马斯亮蓝 G-250 溶液的制备:精确称取考马斯亮蓝 G-250 100.00 mg,加入 95% 的乙醇 50 mL,再加入 85% 的磷酸 100 mL,最后用蒸馏水定容至 1 000 mL,最终溶液含 0.01% 考马斯亮蓝 G-250、4.7% 乙醇、8.5% 磷酸,置于棕色试剂瓶中备用^[7]。

1.3 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的单因素试验

1.3.1 考马斯亮蓝 G-250 用量 在各试管中均精确加入蛋白质标准溶液 1.0 mL,然后分别加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,各以蒸馏水补至总体积为 10.0 mL,混匀,30 °C 条件下放置 15 min,同时以空白试剂为参比,于 595 nm 处测定其吸光度。

1.3.2 反应时间 各试管中均精确加入蛋白质标准溶液 1.0 mL、考马斯亮蓝 G-250 溶液 4.0 mL,以蒸馏水补至总体积为 10.0 mL,混匀,分别在 30 °C 条件下放置 5、15、25、35、45 min,同时以空白试剂

为参比,于 595 nm 处测定其吸光度。

1.3.3 反应温度 各试管中均精确加入蛋白质标准溶液 1.0 mL、考马斯亮蓝 G-250 溶液 4.0 mL,以蒸馏水补至总体积为 10.0 mL,混匀,分别在 25、30、35、40、45 °C 条件下放置 35 min,同时以空白试剂为参比,于 595 nm 处测定其吸光度。

1.4 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的正交试验

在单因素试验的基础上,以考马斯亮蓝 G-250 用量、反应时间、反应温度为考察因素,以溶液在 595 nm 处的吸光度为考察指标,根据正交表 $L_9(3^3)$ 进行正交试验(表 1),优化考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的测定方法。

表 1 测定方法的正交试验因素水平

水平	因素		
	G-250 用量 (A)/mL	反应时间 (B)/min	反应温度 (C)/°C
1	3.0	25	25
2	4.0	35	30
3	5.0	45	35

1.5 蛋白质标准曲线的制作

分别精确吸取蛋白质标准溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL 于试管中,各管加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 4.0 mL,以蒸馏水补至总体积为 10.0 mL,混匀,25 °C 条件下放置 35 min,同时以空白试剂为参比,于 595 nm 处测定其吸光度并绘制标准曲线。

1.6 优化方法验证

1.6.1 精密度试验 在试管中加入 1.0 mL 蛋白质标准溶液,根据 1.4 优化后的试验条件连续 6 次测定其吸光度,考察其精密度。

1.6.2 稳定性试验 在试管中加入 1.0 mL 蛋白质标准溶液,根据 1.4 优化后的试验条件,每间隔 5 min 测定 1 次吸光度,连续试验 15 min,考察其稳定性。

1.6.3 重现性试验 准确吸取按文献^[6]制备的茶籽多糖溶液各 1.0 mL,根据 1.4 优化后的试验条件,考察该测定方法的重现性,重复 5 次。

1.6.4 加标回收率试验 准确吸取茶籽多糖溶液各 0.5 mL,分别加入 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 蛋白质标准溶液,用蒸馏水补至 1.0 mL,根据 1.4 优化后的试验条件,测定其蛋白质质量浓度,并按公式计算加标回收率。

$$\text{加标回收率} = \frac{\text{加标茶籽多糖溶液} - \text{茶籽多糖溶液}}{\text{液} - \text{中蛋白质质量}} \times \frac{\text{中蛋白质质量}}{\text{加入的蛋白质标样质量}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的单因素试验结果

2.1.1 考马斯亮蓝 G-250 用量 由图 1 可以看出,随着考马斯亮蓝 G-250 用量的增加,吸光度逐渐增加,当加入的考马斯亮蓝 G-250 用量为 4.0 mL 时达到最大吸收值,说明此时蛋白质与考马斯亮蓝 G-250 充分结合;再增大考马斯亮蓝 G-250 的用量时,吸光度略有下降,可能是过多的考马斯亮蓝 G-250 影响了吸光度。因此,考马斯亮蓝 G-250 的适宜用量为 4.0 mL。

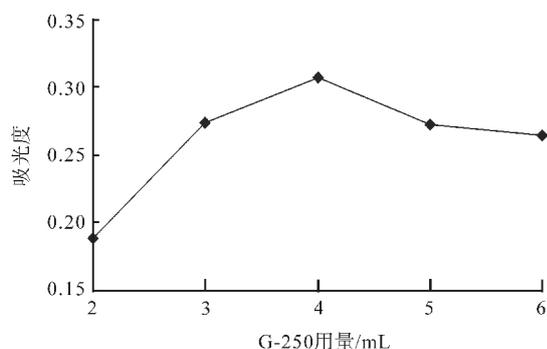


图 1 考马斯亮蓝 G-250 用量对吸光度的影响

2.1.2 反应时间 由图 2 可以看出,随着反应时间的延长,吸光度逐渐变大,反应 35 min 时出现最大吸收值,说明此时蛋白质与考马斯亮蓝 G-250 结合完全;之后吸光度有所下降,可能是反应时间过长造成了显色物质的降解,因此,适宜的反应时间为 35 min。

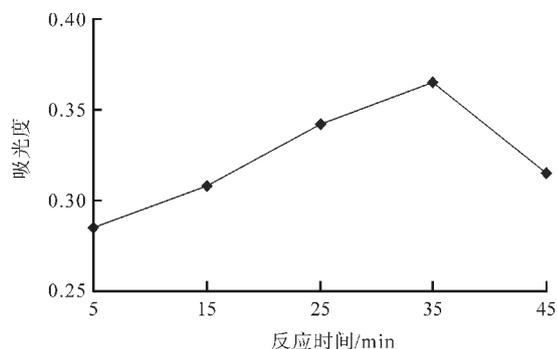


图 2 反应时间对吸光度的影响

2.1.3 反应温度 由图 3 可以看出,随着反应温度升高,吸光度逐渐下降,可能是温度较高导致显色物质不稳定,因此反应温度不宜过高。

2.2 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的正交试验结果

由表 2 可见,各因素对吸光度影响的程度依次为考马斯亮蓝 G-250 量 > 反应时间 > 反应温度;考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的最佳条件组合为

$A_2B_2C_1$,即最佳方法为:精确吸取蛋白质标准溶液 1.0 mL,加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 4.0 mL,以蒸馏水补至总体积为 10 mL,混匀,25 °C 条件下放置 35 min,同时以空白试剂为参比,于 595 nm 处测定其吸光度。按此条件进行验证试验,吸光度为 0.375,高于所有正交试验组合,因此,确定考马斯亮蓝 G-250 溶液用量 4.0 mL、反应时间 35 min、反应温度 25 °C 为最佳试验条件。

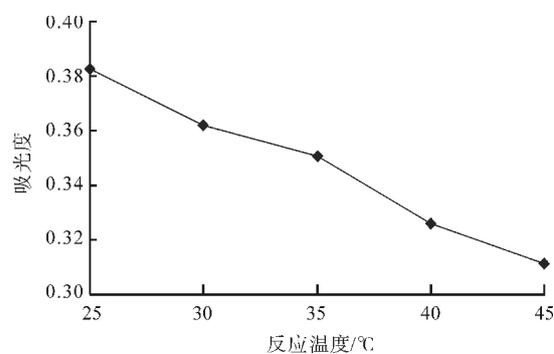


图 3 反应温度对吸光度的影响

表 2 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量 $L_9(3^3)$ 正交试验结果

试验号	G-250 用量 (A)/mL	反应时间 (B)/min	反应温度 (C)/°C	吸光度
1	3.0	25	25	0.285
2	3.0	35	30	0.272
3	3.0	45	35	0.257
4	4.0	25	30	0.344
5	4.0	35	35	0.350
6	4.0	45	25	0.338
7	5.0	25	35	0.332
8	5.0	35	25	0.359
9	5.0	45	30	0.282
k_1	0.271	0.320	0.327	
k_2	0.344	0.327	0.299	
k_3	0.324	0.292	0.313	
R	0.073	0.035	0.028	

2.3 蛋白质标准曲线的制作

由图 4 可以看出,以蛋白质质量浓度对吸光度作回归处理,得到的线性回归方程为 $y = 3.9464x + 0.0008$ ($r = 0.9976$),线性范围 0~0.10 mg/mL。

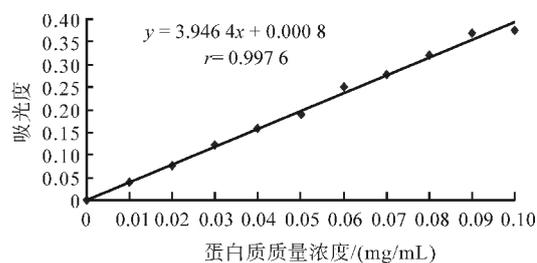


图 4 蛋白质标准曲线

2.4 优化方法的验证结果

由表3—6可以看出,精密度试验、稳定性试验的相对标准偏差(RSD)分别为0.506%、0.836%,说明精密度好、反应体系稳定性良好。由表5可以看出,重现性试验中茶籽多糖溶液中蛋白质平均质量浓度为0.07678 mg/mL, RSD为1.57%,说明

该测定方法重现性良好。在试验过程中,若按2.2操作测得茶籽多糖溶液中的蛋白质质量浓度接近或超过0.1 mg/mL,应将茶籽多糖溶液进行适当稀释后再按2.2操作测定其蛋白质质量浓度。由表6可以看出,样品的平均加标回收率为99.19%, RSD为0.86%,说明测试结果准确度高。

表3 精密度试验结果

项目	试验号						平均	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
吸光度	0.375	0.373	0.378	0.373	0.375	0.376	0.375	0.506

表4 稳定性试验结果

项目	放置时间/min				平均	RSD/%
	0	5	10	15		
吸光度	0.375	0.373	0.370	0.368	0.372	0.836

表5 重现性试验结果(n=5)

项目	吸光度					平均	RSD/%
	0.303	0.303	0.311	0.305	0.302		
蛋白质质量浓度/(mg/mL)	0.07531	0.07658	0.07860	0.07708	0.07632	0.07678	1.57

表6 加标回收率试验结果(n=5)

茶籽多糖溶液中蛋白质质量/mg	加入的蛋白质标样质量/mg	加标茶籽多糖溶液中蛋白质质量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.03839	0.01	0.04825	98.60	99.19	0.86
0.03839	0.02	0.05806	98.35		
0.03839	0.03	0.06812	99.10		
0.03839	0.04	0.07861	100.55		
0.03839	0.05	0.08807	99.36		

3 结论与讨论

本试验结果表明,考马斯亮蓝法测定茶籽多糖中蛋白质含量优化后的方法为:精确吸取茶籽多糖溶液1.0 mL,加入考马斯亮蓝G-250溶液4.0 mL,以蒸馏水补至总体积为10.0 mL,混匀,25℃条件下放置35 min,同时以空白试剂为参比,于595 nm处测定其吸光度。该方法的精密度RSD为0.506%;稳定性RSD为0.836%;重现性RSD为1.57%;样品的平均加标回收率为99.19%, RSD为0.86%,充分说明了该方法具有良好的重现性和较高的准确度,能简单快速测定茶籽多糖溶液中的蛋白质含量。

与经典的蛋白质测定方法——凯氏定氮法相比,本方法不需长时间地消化和蒸馏等步骤,更快捷、方便,且不需要复杂的设备,操作简单。从理论上说,凯氏定氮法是通过测定物质中的氮元素含量,然后推算出蛋白质的含量,测定结果易受到样品中非蛋白氮的影响;而采用考马斯亮蓝法测定茶籽多糖溶液中蛋白

质含量的基本原理是考马斯亮蓝与蛋白质直接结合且颜色深浅与蛋白质含量成正比,因此,测定结果因不受样品中非蛋白氮的影响而更准确。

参考文献:

- [1] 王国霞,邓培渊,杨玉珍,等. 高温胁迫对不同油茶品种细胞膜稳定性的影响[J]. 河南农业科学,2013,42(4):59-63.
- [2] 肖志红,陈永忠. 油茶加工利用研究综述[J]. 林业科技开发,2005,19(2):10-13.
- [3] 张庆华,黄文奎,雷雄,等. 福建省主要油茶产区油茶立地生产力研究[J]. 福建林学院学报,1984,4(2):7-16.
- [4] 张燕,吴谋成. 油菜籽饼中单宁的提取、分离与纯化制备[J]. 华中农业大学学报,1998,17(3):294-299.
- [5] 孙冀平. 茶籽中皂素和多糖的研究[D]. 无锡:江南大学,2003.
- [6] 王艾平,周丽明,张勇,等. 水溶性茶籽多糖提取条件研究[J]. 上饶师范学院学报,2012,32(6):70-73.
- [7] 刘小华,张美霞,于春梅,等. 考马斯亮蓝法测定壳聚糖中蛋白的含量[J]. 中国交通医学杂志,2006,20(2):159-160.