

光度法快速测定大豆水溶性蛋白质的研究

赵宇明¹, 姜俊¹, 张建宁¹, 翟丽莉²

(1. 大连市产品质量监督检验所, 辽宁 大连 116021; 2. 大连宇达新材料化工研究所, 辽宁 大连 116012)

摘要:在室温条件下的酸性介质中,大豆水溶性蛋白质能与偶氮洋红 G (azocarmine G) 迅速结合,生成紫红色复合物,该复合物的最大吸收波长为 580 nm,比偶氮洋红 G 红移了 50 nm,其吸光强度与大豆水溶性蛋白质的质量浓度在 $3 \sim 34 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内存在较好的选择性和较宽的线性关系。依此建立了测定大豆水溶性蛋白质的新方法,同时优化了大豆水溶性蛋白质的提取过程。该方法具有快速、稳定的特点,与凯氏法所得测定结果基本一致。

关键词:蛋白质;偶氮洋红 G;水溶性蛋白质;分光光度法

中图分类号:TS210.7

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)01-0124-03

Investigation on Rapid Measurement of Water-soluble Soybean Protein through Spectrophotometry

ZHAO Yu-ming¹, JIANG Jun¹, ZHANG Jian-ning¹, ZHAI Li-li²

(1. Dalian Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Dalian 116021; 2. Dalian Yuda New-material Institute of Chemical Industry, Dalian 116012, Liaoning, China)

Abstract: A purple-red complex could be formed rapidly between azocarmine G and water-soluble soybean protein in acidic medium. The absorbance of this complex had a maximum absorption wavelength at 580 nm and exhibited a bathochromic shift of 50 nm compared with the maximum absorption wavelength of azocarmine G. Its absorbance with the concentration of soluble proteins at least in $3 \sim 34 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ was linearly. A method on rapid measurement of water-soluble soybean protein was established based on above-mentioned. Simultaneously we optimized the extraction procedure of water-soluble soybean protein. The results obtained by this method was rapid, stable. And the results were same with that obtained by Kjeldahl's method.

Key words: Protein; Azocarmine G; Water-soluble protein; Spectrophotometry

在众多的植物性蛋白质中,营养价值最高的是豆类蛋白质(又称大豆蛋白)^[1-2],在大豆蛋白质中可以溶解于水的部分称为大豆水溶性蛋白质,约占总大豆蛋白含量的 20% ~ 30%,这部分蛋白质是可以被人体直接吸收利用,与人体蛋白质的组成及结构也最相近。

蛋白质的定量测定在医学及食品科学研究中具有重要意义。蛋白质含量测定的光谱分析方法有直接紫外光谱法、分光光度法、荧光光度法^[3]、共振瑞利散射光谱法等,其中,染料结合分光光度法的研究最为普遍^[4-7]。偶氮洋红 G 是酸性三苯甲烷类染料^[8],又称为偶氮胭脂红 G(或酸性红 101),是一种良好的组织染色剂和氧化还原指示剂。以其作为测定大豆水溶性蛋白质的光度试剂至今未见文献报道。研究发现,在酸性介质中,大豆水溶性蛋白质能

与偶氮洋红 G 在室温下迅速结合并使体系的吸光度发生明显改变,并基于此反应建立了一个快速提取并测定大豆水溶性蛋白质的光度分析法。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

UV/VIS 752 型紫外-可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);PHS-3C 型酸度计(上海伟业仪器厂);2300 型自动定氮仪(瑞典福斯特卡托公司);Arium611 型超纯水器(德国 Sartorius 公司)。

偶氮洋红 G: $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; H_2SO_4 : $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;大豆水溶性蛋白标准溶液(自制: $13.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,用凯氏法标定浓度);大豆样品由大连商品交易所提供。试剂均为分析纯,水为高纯水。

收稿日期:2009-07-24

第一作者简介:赵宇明(1977-),男,工程师,硕士,现从事食品检测与方法研究。E-mail:zhao_yuming@126.com。

1.2 试验方法

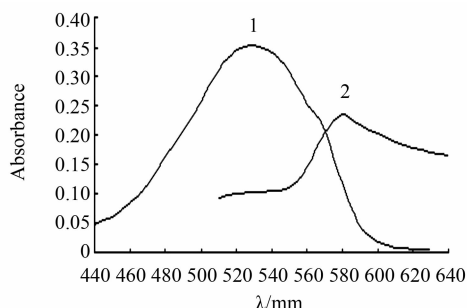
1.2.1 大豆水溶性蛋白质的提取 在 50 mL 的离心管中称取固态样品 0.5 g, 加入高纯水 50 mL, 加盖后混合均匀。在旋涡搅拌器上涡旋 1 min, 然后 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 将上清液转移到 250 mL 容量瓶中。向离心后的残渣中加入高纯水 50 mL, 在旋涡搅拌器上涡旋 1 min, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 将上清液转移到 250 mL 容量瓶中。重复上述步骤 2 次, 将离心清液全部转移到 250 mL 容量瓶中, 加高纯水定容后摇匀容量瓶, 将滤液过滤到洁净的三角瓶中备用。

1.2.2 标准曲线及测试 在 50 mL 比色管中, 依次加入大豆水溶性蛋白质标准溶液或样品溶液适量, $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的偶氮洋红 G 溶液 2.0 mL 和 $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 溶液 5.0 mL, 用高纯水稀释到刻度并摇匀, 在室温下以相应的试剂空白为参比, 用 1 cm 比色皿, 在波长 580 nm 处测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 大豆水溶性蛋白的吸收光谱

偶氮洋红 G 溶液在酸性介质中为粉红色, 加入大豆水溶性蛋白质后, 溶液变为紫红色, 其吸收曲线如图 1 所示。在偶氮洋红 G 的空白试剂中加入大豆水溶性蛋白质后, 试剂空白的吸收峰由 530 nm 红移到 580 nm, 表明两者结合生成了复合物, 二者之间的相互作用力主要为偶氮洋红 G 中的 $-\text{SO}_3^-$ 与蛋白质中的 $-\text{NH}_3^+$ 之间的静电引力。选择 580 nm 作为测定波长。



1. 偶氮洋红/水; 2. 偶氮洋红结合体系/偶氮洋红

1. azocarmine G / H_2O ; 2. azocarmine G and water-soluble soyabean protein / azocarmine G

图 1 吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra

2.2 酸度的选择

偶氮洋红 G 与大豆水溶性蛋白质的结合作用

只有在强酸性介质中才能进行, 体系的最大吸光度在 $\text{pH} < 2$ 时依然没有出现, 采用 $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 溶液控制结合体系的酸度, 并考查了在 $0.04\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \sim 1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的范围内酸度对结合体系吸光度的影响。结果表明, 当 H_2SO_4 溶液的加入体积为 5 mL 时, 体系的吸光度达到最大值, 此时结合体系的 H_2SO_4 浓度为 $0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因此, 选择 $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 溶液的加入量 5 mL 作为控制结合体系的最佳酸度条件。

2.3 偶氮洋红 G 的添加量

在 0.25 ~ 4.5 mL 范围内, 考查了 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 偶氮洋红 G 的用量对试验结果的影响。发现结合体系的吸光度随偶氮洋红 G 添加量的增加而增大, 当偶氮洋红 G 的量达到 3 mL 时, 体系放置 15 min 后即出现浑浊。选择偶氮洋红 G 的用量为 2 mL, 在此条件下体系具有灵敏度高、稳定性好的特点。

2.4 反应温度、时间和稳定性

室温条件下, 偶氮洋红 G 与大豆水溶性蛋白质迅速反应, 结合体系的吸光度与各试剂的添加顺序基本无关。体系的吸光度在 5 min 达到最大值, 至少在 2 h 内保持不变。当温度高于 40°C 时, 体系的灵敏度增大, 但同时结合体系很快会出现浑浊现象。

2.5 工作曲线

按上述测定条件, 研究了偶氮洋红 G 与大豆水溶性蛋白质结合体系在 580 nm 处的吸光度 A 与浓度 $C(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ 的关系, 得到线性回归方程为 $A = 6.1109C + 10^{-5}$, $r = 0.9997$ 。线性范围为 $3 \sim 34\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。摩尔吸光系数 (ϵ) 为 $3.36 \times 10^5\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (蛋白质按平均分子量 50 000 计算), 桑德尔灵敏度 (S) 为 $0.030\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。

2.6 选择性试验

研究各种金属离子、氨基酸等对 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大豆水溶性蛋白质的影响, 结果见表 1。在 5% 相对误差内, 大部分共存物的存在对测定无影响, 表明该方法具有较好的选择性。

2.7 大豆水溶性蛋白质样品的分析测定

按实验方法提取并测定了 4 种大豆的水溶性蛋白质含量同时进行加标回收试验 (表 2)。测定所得结果与凯氏法基本一致。

表1 共存物对 10 μg · mL⁻¹大豆水溶性蛋白测定的影响
Table 1 Effects of the foforeign substances on the determination of 10 μg · mL⁻¹ water- soluble soyabean protein

共存物 Substances	存在量 Added/ μg · mL ⁻¹	相对误差 Relative error/%	共存物 Substances	存在量 Added/ μg · mL ⁻¹	相对误差 Relative error/%
Cu ²⁺	20	2.05	葡萄糖 Glucose	100	3.09
Mg ²⁺	40	1.54	尿嘧啶 Uracil	150	5.39
Ca ²⁺	10	3.04	抗坏血酸 Ascorbic acid	10	3.06
Cd ²⁺	5	3.03	木瓜蛋白酶 Papain papaya	400	4.02
Mn ²⁺	5	4.87	尿素 Urea	250	3.03
Pb ²⁺	10	4.58	胰蛋白酶 Trypsin	50	3.08
Fe ³⁺	25	4.55	L- 谷氨酸 L- glutamic acid	10	5.27
Al ³⁺	25	4.38	甘氨酸 Glycine	100	2.58
Zn ²⁺	5	1.54	赖氨酸 Lysine	200	4.89
Hg ²⁺	5	4.55	脯氨酸 Proline	600	4.02

表2 样品中水溶性蛋白质的测定结果
Table 2 Results for the determination of protein in samples

样品标号 Sample number	凯氏法结果 Results of Kjeldahl method/%	分光光度法结果 (n = 5) Results of spectrophotometry		加标回收结果 (n = 5) Results of standard addition recovery	
		平均值 Average value/%	RSD /%	回收率 Recovery /%	RSD/%
1	32.6250	32.2806	1.69	99.3	2.31
2	21.3277	21.3218	2.02	102.2	2.34
3	32.9417	33.1850	2.37	102.9	1.13
4	34.3645	33.6540	1.91	100.1	1.40

3 结论

结果表明,采取新的快速提取方法得到的大豆水溶性蛋白质的含量稳定,数据可靠;以偶氮洋红 G 分光光度法测定大豆水溶性蛋白质的含量方便快捷,结果准确,明显优于凯氏法。新方法大大缩减了检测时间,增加了工作效率,同时节约了成本,试剂对环境没有污染,对操作人员无伤害。该法简化了试验流程,为其它含水溶性蛋白质的物质测定提供了一个可行的思路。

参考文献

[1] 程莉君,石雪萍,姚惠源. 大豆加工利用研究进展[J]. 大豆科学,2007,26(5):775-780. (Chen L J, Shi X P, Yao H Y. Research progress on the processing and utilizing of soybean[J]. Soybean Science,2007,26(5):775-780.)

[2] 刘志胜,李里特,辰巳英三. 大豆蛋白营养品质和生理功能研究进展[J]. 大豆科学,2000,19(3):263-268. (Liu Z S, Li L T, Eizo Tatsumi. Nutritional quality and physiological functions of soy protein A Review[J]. Soybean Science,2000,19(3):263-268.)

[3] 黄建华,马洪敏,孙舒婷,等. 荧光法研究牛血清白蛋白与三羟基苯基荧光酮-钼(VI)配合物探针的作用机理[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(10):1899-1902. (Hang J H , Ma H Mi , Sun S T, et al. Study on the mechanism of interaction between TH- PF- Mo (VI) Complex and bovine serum albumin by fluorimetric method [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2006, 26 (10) : 1899-1902.)

[4] Marion M Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry,1976,72(1-2):248-254.

[5] Clark A G, Wong S T. A rapid chromatographic technique for the detection of dye-binding proteins[J]. Analytical Biochemistry, 1978 , 89(2):317-323.

[6] 罗宗铭,张焜,崔英德,等. 蛋白质与酸性染料相互作用的分光光度研究[J]. 光谱学与光谱分析,2001,21(2):251-253. (Luo Z M, Zhang K, Cui Y D, et al. Spectrophotometric study on the interaction of protein with acid dye[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis,2001,21(2):251-253.)

[7] 鲁秀恒,鲁金昌. 大豆水溶性蛋白质快速测定方法的研究[J]. 食品工业科技,2006,27(6):177-178. (Lu X H, Lu J C. A quick method for the analysis of soy soluble protein content[J]. Science of Technology of Food Industry,2006,27(6):177-178.)

[8] 王琳琳,王俊芳,张媛,等. 偶氮胭脂红 G 分光光度法测定蛋白质的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),2008,30(1):83-86. (Wang L L, Wang J F ,Zhang Y, et al. Investigation on the determination of proteins by spectrophotometry with azocarmine G[J]. Journal of Yunnan University,2008,30(1):83-86.)