

Lowry 法测定寡肽的研究

付玉梅 许锦珍 廖群 郭勇

(江中药业股份有限公司 南昌 330096)

摘要 目的: 探讨适合寡肽含量测定的方法。方法: 通过测定海洋肽粉和大豆肽粉中寡肽含量, 比较凯氏定氮法、双缩脲法、考马斯亮蓝 G250 法和 Lowry 法 4 种方法之间的差异。结果: 4 种方法测得的结果具有明显差异。结论: Lowry 法测得结果准确、可靠, 灵敏度较高, 易操作, 较另外 3 种方法更适合于寡肽的含量测定。

关键词: 寡肽; 含量测定; 大豆肽; 海洋肽; Lowry 法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)04-0739-03

Research of Lowry determination of oligopeptides

FU Yu - mei , XU Jin - zhen , LIAO Qun , GUO Yong

(Jiangzhon Pharmaceutical Co. , Ltd. , Nanchang 330096 , China)

Abstract Objective: To select suitable oligopeptide assay method. **Methods:** Determination of oligopeptide for the marine peptide powder and soybean peptide powder , compare the differences between the four kinds of methods , Kjeldahl method; biuret method; Coomassie Brilliant Blue G250 method and Lowry method. **Results:** The measured results in the four kinds of methods have significant differences. **Conclusion:** Lowry method measured results are accurate , reliable , and the method of high sensitivity , easy to operate , the relative other three kinds of method is more suitable for assay of oligopeptides.

Key words: oligopeptides; determination; soybean peptide; marine peptide; Lowry method

肽是氨基酸的聚合物,也是蛋白质的不完全分解产物。按氨基酸残基量分为寡肽和多肽,其中寡肽含有 2~10 个氨基酸残基。现有寡肽主要包括海洋肽、大豆肽、玉米肽等。寡肽具有增强免疫力、促进伤口愈合、提高食物氨基酸和矿物质的利用、阻碍脂肪吸收等功能^[1]。目前有关寡肽的含量测定方法报道很少,绝大部分是关于蛋白质或多肽的测定。罗钦^[2]和李小东^[3]采用茚三酮法测定寡肽,但该方法操作复杂、费时,不适合多批量样品测定。为寻找合适的寡肽测定方法,本文比较几种测定方法,结果表明各方法之间存在明显差异。以 Lowry 法测得值较准确,且方法可靠,易于操作,适合于寡肽含量的测定。

1 仪器与试剂

UV-1206 紫外可见分光光度计(日本岛津),数显恒温水浴锅(HH-2 国华电器有限公司),KND-08AA 消化炉与定氮仪(上海新嘉电子有限公

司)。所有试剂均为分析纯,双蒸水,海洋肽粉和大豆肽粉(中国食品发酵工业研究院),牛血清白蛋白标准品(5 组分,北京经科宏达生物技术有限公司)。

2 样品溶液的制备

2.1 样品的处理 分别称取海洋胶原肽、大豆肽各 0.14 g,置 50 mL 量瓶中,加入 15% 三氯乙酸溶液,定容,摇匀,放置 10 min,沉淀酸不溶性蛋白质,置离心管中,4000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液备用。

2.2 标准溶液 精密称取牛血清白蛋白适量(按各方法要求),置量瓶中,加水溶解,定容,需现配。

3 测定

3.1 凯氏定氮法 按 2005 年版中国药典三部附录 VIA 蛋白质测定。

3.2 双缩脲法 按 2005 年版中国药典三部附录 VI B 蛋白质测定第三法测定。

3.3 考马氏亮蓝法 G-250 按文献 4 中的检测方法测定,以低浓度制作标准曲线。

3.4 Lowry 法 按 2005 年版中国药典三部附录 VI B 蛋白质测定第二法测定。

4 结果

4.1 标准曲线及线性关系 分别对双缩脲法、考马

氏亮蓝 G-250 法、Lowry 法的标准曲线进行制作 (凯氏定氮法不用对照品, 所以未作工作曲线), 其结果见表 1。

表 1 不同检测方法的工作曲线结果

Tab 1 Different test methods the results of the working curve

编号 (No.)	双缩脲法 (biuret)		考马氏亮蓝 G-250 法 (coomassie brilliant blue G-250)		Lowry 法 (Lowry method)	
	浓度(concentration) /mg · mL ⁻¹	A	浓度(concentration) /mg · mL ⁻¹	A	浓度(concentration) /mg · mL ⁻¹	A
1	0.770	0.047	0.020	0.180	0.030	0.139
2	1.540	0.100	0.039	0.356	0.061	0.204
3	3.080	0.202	0.059	0.565	0.091	0.269
4	4.620	0.303	0.078	0.654	0.122	0.343
5	6.160	0.401	0.098	0.669	0.152	0.415
r	0.9999		0.9543		0.9995	
线性方程 (linear equation)	A = 0.0657C - 0.0018		A = 0.5378C + 0.1004		A = 2.271C + 0.0668	

4.2 样品测定结果的比较 以上 4 种方法分别测定海洋肽粉和大豆肽粉中的寡肽含量, 双缩脲法测得结果分别为 65.86% 与 63.08%; 凯氏定氮法测得结果分别为 92.50% 与 81.56%; Lowry 法测得结果分别为 86.84% 与 76.11%; 考马氏亮蓝 G-250 法均未测得准确值; 凯氏定氮与甲醛滴定的综合法测得实际含量分别为 89.47% 与 79.32%。4 种方法测定的结果相差较大, Lowry 法与凯氏定氮法测得值与之较接近。但凯氏定氮法测定结果中包含寡肽与游离氨基酸, 甚至包含无机氮。所以 Lowry 法相对较可取, 现对其方法进行考察。

4.3 Lowry 法考察

4.3.1 重复性考察 按“2.1”项下方法操作, 精密量取海洋肽上清液 2 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水稀释, 定容, 精密移取稀释液 1 mL, 置 10 mL 具塞比色管中, 制备 5 份。按 Lowry 法测定, 测得其吸收值, 计算其平均值为 0.2638, RSD 为 1.7%。

4.3.2 稳定性考察 按“2.1”项下方法操作, 精密移取海洋肽上清液 2 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水稀释, 定容, 精密移取稀释液 1 mL, 置 10 mL 具塞比色管中, 按 Lowry 法测定, 分别在 0, 20, 40, 60, 80, 120 min 测定其吸光度, 计算其平均值为 0.2635, RSD 为 1.7%。

4.3.3 精密度考察 按“2.1”项下方法操作, 精密移取海洋肽上清液 2 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水稀释, 定容, 精密移取稀释液 1 mL, 置 10 mL 具塞比色管中, 按 Lowry 法测定, 连续测定 5 次, 测得其吸收

值, 计算其平均值为 0.2648, RSD 为 0.44%。

4.3.4 加样回收实验 精密移取 0.0446 mg · mL⁻¹ 标准溶液与供试品溶液各 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加水稀释, 定容, 制备 5 份。精密移取该制备液 1 mL, 置 10 mL 具塞比色管中, 按 Lowry 法测定, 计算其回收率分别为 98.2%, 96.8%, 99.0%, 102.0%, 98.2%; RSD 为 1.8%。

5 讨论与结论

5.1 实验中所用标准品为牛血清白蛋白 (五组分), 其纯度达 99.3%。牛血清白蛋白与人血清白蛋白的荧光光谱和吸收光谱相似^[8], 因牛血清白蛋白比人血清白蛋白价格便宜, 容易购买, 所以本文以牛血清白蛋白为标准品。

5.2 比较 4 种测定方法的线性关系, 考马氏亮蓝法的线性关系相对较差, 双缩脲法与 Lowry 法的线性关系均良好。4 种方法测定样品的数据结果相差较大, 主要是各方法的显色原理不同而导致。

5.3 双缩脲法是在碱性条件下肽键与铜离子呈双缩脲显色反应, 除受一些干扰试剂影响, 主要与碱性条件有关。样品经酸沉淀后的 pH 为 1.5 左右, 对碱性铜试液的显色造成影响, 以致测得 2 个样品中寡肽含量均偏低。且该方法灵敏度较低, 需要样品量大, 不适用于寡肽含量测定。

5.4 凯氏定氮法操作烦琐, 再加上游离氨基酸含量的测定方法, 其整个测定过程非常耗时。

5.5 考马斯亮蓝 G-250 方法的灵敏度虽高, 但染料只与相对分子质量在 3000 以上的多肽和蛋白质

结合,不与小肽或氨基酸起反应^[5,6]。而寡肽的相对分子质量在 2300 以下,所以此方法也不适用于寡肽含量测定。

5.6 样品经三氯乙酸沉淀后,对改良 Lowry 法的干扰少^[7]。此方法灵敏度高,为双缩脲法的 100 倍^[5]。测得样品结果与实际结果较接近,相差 2.63% ~ 3.21%。虽然酚试剂的配制较复杂,但可以低温保存。且方法的各考察项目的 RSD 均小于 2%,说明该方法可靠。比较以上 3 种方法,Lowry 法更适合寡肽含量的测定。

致谢:感谢喻伟华、李治光、廖群等各位老师对本文提出宝贵的意见。

参考文献

- 1 LI Yong(李勇),CAI Mu-yi(蔡木易). Peptides Nutrition(肽营养学). BeiJing(北京). Peking University Medical Press(北京大学医学出版社) 2007. 3
- 2 LUO Qin(罗钦),CHEN Ren-bi(陈人弼),SONG Yong-kang(宋永康) *et al.* Determination method of oligopeptides and free amino acids in fish meal(鱼粉中寡肽和游离氨基酸的测定方法). *Fujian J Agric Sci* (福建农业学报) 2005 20(4): 285
- 3 LI Xiao-dong(李小东),CHEN Chao-hui(陈朝晖),KOU Yu-min(寇裕民) *et al.* Determination method of soy protein peptide(大豆蛋白质肽的测定方法). *Soybean Bull*(大豆通报) 2004 1: 25
- 4 NAN Ya(南亚),LI Hong-gao(李宏高). Coomassie brilliant blue G250 method for rapid determination of protein in milk(考马斯亮蓝 G250 法快速测定牛乳中的蛋白质). *Detection Anal* (检测与分析) 2007 10(12): 41
- 5 YANG Gui-lan(杨桂兰),GUO Xue-ping(郭学平). Comparison of Lowry's and Bradford's method for determination of protein in sodium hyaluronate(Lowry 法和 Bradford 法测定玻璃酸钠中蛋白质含量的比较). *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志) 2003 24(3): 131
- 6 ZHAO Shan-zheng(赵善政). Microgram levels of protein dye binding method(微克水平蛋白质的染料结合比色法). *J Med Lab* (中华医学检验杂志) 1983 6: 210
- 7 ZHANG Yun-ru(张云茹),ZHOU Yue-gang(周跃刚),FAN Shou-cheng(范守城), *et al.* Improved folin phenol protein quantitation method for samples containing ammonium sulphate(硫酸铵存在下的改良福林-酚试剂法). *J Chongqing Inst Technol* (重庆工学院学报) 2008 22(7): 159
- 8 ZHANG Yu-ping(张玉平),WEI Yong-ju(魏永巨),LI Na(李娜) *et al.* Fluorescence quantum yield of human and bovine serum albumin(人血清白蛋白和牛血清白蛋白荧光量子产率的测量). *Chin J Anal Chem* (分析化学研究简报) 2004 32(6): 779

(本文于 2010 年 11 月 12 日修改回)

《药物分析杂志》继续被评为 2011 年度中国科协精品科技期刊示范项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目管理办法(试行)》的有关规定,《药物分析杂志》参与了 2010 年度精品科技期刊示范项目和英文版期刊国际推广项目总结验收及 2011 年度精品科技期刊新增示范项目评审工作。根据中国科协的评审结果,《药物分析杂志》继续成为 2011 年度精品科技期刊示范项目 C 类项目。评选分 A、B、C 三类,各类项目资助额度分别为每项 25、15、5 万元/年。中国科协从 2006 年开始评选精品期刊项目至今,《药物分析杂志》已连续 6 年被评为中国科协精品科技期刊示范项目(C 类)。