

DOI: 10.3976/j.issn.1002-4026.2011.06.014

考马斯亮蓝法快速测定乳品中蛋白质含量

孙士青, 王少杰, 李秋顺, 李雪梅, 史建国

(山东省科学院生物研究所, 山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南 250014)

摘要: 采用考马斯亮蓝 G-250 染料染色法对市售乳品中蛋白质进行测定, 在 595 nm 波长处测定溶液的吸光度。实验结果表明, 标准蛋白质在 10 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间呈现良好的线性关系。该法简便快速、灵敏度高、重现性好, 是测定乳品中蛋白质的有效方法。

关键词: 乳品; 蛋白质含量; 考马斯亮蓝法; 测定

中图分类号: TS201.2⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1002-4026(2011)06-0053-03

Coomassie brilliant blue method based protein content determination in milk

SUN Shi-qing, WANG Shao-jie, LI Qiu-shun, LI Xue-mei, SHI Jian-guo

(Shandong Provincial Key Laboratory of Biosensor, Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract: We employed the dyeing method of Coomassie brilliant blue G-250 to determine the protein content of milk, measuring the absorbency at the wavelength of 595 nm. Experiment shows that a good linear relationship exists between the absorbency and the content of standard proteins in the range of 10 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This approach has such advantages as simplicity, rapidity, good reproducibility and sensitivity, especially suitable for the determination of milk protein.

Key words: milk; content of proteins; Coomassie brilliant blue dyeing method; determination

乳品是一类营养丰富、全面的食品, 是人体所需蛋白质的重要来源。乳品中蛋白质测定的国家标准方法是凯氏定氮法, 即将样品用强酸硝化后测定硝化液中的总氮含量, 再由总氮量计算出蛋白质的含量。该法测得的结果其实是蛋白质和非蛋白质含氮物的总量, 而且检测时间长、用酸量大、污染严重、分析结果离散度高^[1]。

本研究采用考马斯亮蓝 G-250 染色法对市售乳品中的蛋白质含量进行测定, 与传统分析方法相比, 该方法操作简便、经济且结果较为准确, 尤其适合于测定低浓度的蛋白质样品。

1 实验材料、仪器设备及原理

1.1 实验材料

市售鲜牛奶: 伊利、蒙牛、佳宝; 牛血清白蛋白: 进口分装, Sigma 公司; 考马斯亮蓝 G-250: 进口分装, 上海进出口试剂公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器设备

UV-210 可见 - 紫外分光光度计(日本 UNICO); DL-5 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.3 实验原理

蛋白质分子多肽链中具有酰胺基结构,这些结构可以与棕红色的考马斯亮蓝 G-250 染料的阴离子相互作用形成染色复合物,使溶液的颜色由棕红色变为蓝色,其最大吸收波长也由 465 nm 变化为 595 nm,当待测溶液中蛋白质含量在 1 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,蛋白质 - 考马斯亮蓝复合物在 595 nm 波长下的吸光度与蛋白质含量成正比,据此可用于蛋白质含量分析^[2]。

2 方法

2.1 蛋白质对照品溶液的制备

精密称取牛血清白蛋白 10.00 mg,用少量蒸馏水溶解,再用蒸馏水稀释至 100 mL,即为 0.1 mg/mL 蛋白质对照品溶液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放。

2.2 考马斯亮蓝 G-250 溶液制备

精密称取考马斯亮蓝 G-250 100.00 mg 加入 95% 乙醇 50 mL、85% 磷酸 100 mL,溶解充分后用蒸馏水稀释至 1000 mL,最终试剂中考马斯亮蓝 G-250 含量为 0.01%,乙醇含量为 4.7%,磷酸含量为 8.5%,置棕色瓶中密塞备用^[3]。

2.3 供试品溶液制备(脱脂乳制备)

取供试鲜牛奶在 3000 r/min 离心 10 min,弃去上层乳脂,精密吸取脱脂鲜奶 0.5 mL 加蒸馏水稀释至 100 mL,即得供试品溶液。

2.4 工作曲线

分别精密吸取蛋白质对照品溶液 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL 于 10 mL 具塞试管中,各管加水至 1 mL,加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 4 mL,混匀,放置 10 min 于 595 nm 波长处测定吸光度^[4]。

2.5 样品中蛋白质含量测定

取供试品溶液 0.5 mL,同时作 3 个重复,以随行试剂为空白,按照 2.4 方法分别测定吸光度,计算供试样品中蛋白质含量。

3 结果

3.1 工作曲线回归方程的建立

用可见 - 紫外分光光度计以随行试剂为空白,在 595 nm 波长处测定对照品梯度溶液吸光度,以吸光度为纵坐标 y ,蛋白质浓度为横坐标 x ,进行线性回归得回归方程: $y = 85.153x - 1.6001$, $r = 0.9991$ 。表明蛋白质在 10 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内与吸光度之间符合 Lambert-Beer 定律。

3.2 市售鲜牛奶中蛋白质含量测定

按照前述分析方法每种乳品做 3 个重复,经计算得供试品中蛋白质含量,见表 1。

表 1 市售三种品牌鲜牛奶中蛋白质含量测定结果

Table 1 Determination results of protein contents in three brands of fresh milk

品名	蛋白质含量/%			平均值/%
伊利 20110116	2.95	3.03	3.10	3.03
蒙牛 20110211	3.05	3.10	3.03	3.06
佳宝 20110405	2.92	2.90	2.88	2.90

3.3 供试液稳定性实验

取同一供试品溶液 0.5 mL 按照上述方法操作,每隔 10 min 测定一次,观察其显色稳定性,结果显示,实验溶液显色 60 min 内吸光度稳定性良好见表 2。

3.4 对照品精密度实验

精密吸取对照品溶液 0.5 mL,连续进行 6 次分析,结果见表 3,由表 3 数据可知本法分析精密度良好。

表2 供试溶液显色稳定性

Table 2 Color demonstration stability of experimental solution

时间/min	10	20	30	40	50	60
吸光度	0.487	0.489	0.489	0.485	0.485	0.483

表3 对照品精密度实验

Table 3 Experimental results of contrast precision

样品号	1	2	3	4	5	6	RSD
吸光度	0.552	0.555	0.555	0.552	0.554	0.550	0.203%

3.5 样品重现性实验

精密吸取同一供试品溶液 0.5 mL,连续进行 6 次分析,结果见表 4,由表 4 数据可知本方法分析结果重现性良好。

表4 样品重现性实验

Table 4 Experimental results of sample reproducibility

样品号	1	2	3	4	5	6	RSD
吸光度	0.476	0.480	0.480	0.478	0.476	0.480	0.197%

3.6 对照品回收实验

精密吸取已测得含量的脱脂鲜牛奶供试溶液 0.5 mL,分别加入蛋白质对照品溶液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL,加蒸馏水补足至 1 mL,按照样品测定法测吸光度,计算回收率,见表 5。

表5 回收实验结果

Table 5 Experimental results of recovery rate

样品含量/ μg	加入量/ μg	测得总量/ μg	回收率/%	平均回收率%	RSD
10.16	10	20.130	99.84	100.66%	1.25%
	20	31.013	102.82		
	30	40.426	100.66		
	40	50.227	100.13		
	50	60.048	99.87		

4 讨论

牛乳中乳蛋白的主要成分是酪蛋白和乳清蛋白,乳蛋白的含量随着乳牛品种及营养状况的不同而有差异,在人工饲养条件下可通过乳蛋白含量水平初步判断牛乳的质量与营养价值高低^[5]。

考马斯亮蓝法显色是由其阴离子与蛋白质中的 NH_4^+ 基通过静电引力而发生化学反应,不同蛋白质中 NH_4^+ 基含量不同,不同取代位置的 NH_4^+ 基与染料的相互作用也有差异^[6],因此为使牛乳中蛋白质测定更加准确,最好使用牛血清白蛋白作为测定用标准蛋白质,亦可采用胰凝乳蛋白酶原作标准蛋白质。

由实验结果可知,供试乳品溶液中蛋白质含量在 10 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内时,用考马斯亮蓝染色法测定其中的蛋白质含量,方法简便快速、灵敏度高、重现性好,是测定乳品中蛋白质的有效方法。

参考文献:

- [1] 许家喜. 蛋白质的检测方法与乳制品中的蛋白质含量测定[J]. 大学化学, 2009, 24(1): 66 - 69.
- [2] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测蛋白质含量的研究[J]. 天津化工, 2009, 23(3): 40 - 41.
- [3] 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.
- [4] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质含量[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(1): 115 - 117.
- [5] 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.
- [6] 林智. 食品中蛋白质含量的测定[J]. 当代化工, 2010, 39(2): 224 - 226.