

不同土壤环境人参中蛋白质含量与氮含量的对比分析研究

刘 哲¹, 陈晓林², 张连学³

(1. 吉林医药学院, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林省人参鹿茸办, 吉林 长春 130021; 3. 吉林农业大学, 吉林 长春 130118)

摘 要:以人参为试材, 比较分析了不同土壤环境种植人参后其水溶性蛋白质含量的变化规律及土壤中氮含量的变化。结果表明: 平地人参水溶性总蛋白质及主要蛋白亚基含量均高于其相应的林地人参的蛋白质含量; 农田土中氮含量较高; 平地人参生长环境有利于蛋白质的合成。

关键词:不同土壤; 人参; 水溶性蛋白; 氮

中图分类号:S 567.5⁺1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)18-0151-03

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)属五加科(Araliaceae)人参属多年生草本植物, 根状茎肉质。人参为人所知至少已有 4 000 a 的历史, 人参属几乎所有种均可入药, 在东汉(公元 25~220 年)的《神农本草经》中列为上品^[1]。

人参的种质资源主要包括野生人参(山参 wild mountain ginseng)资源和各地的栽培人参(栽培参、园参 garden ginseng)资源^[2]。而近年来传统阔林栽参越来越受到限制, 老参地发挥“余热”也十分有限。为此, 我国正积极发展平地栽参项目, 以减轻对环境的破坏。但有关农田土种植人参中水溶性蛋白质的研究一直鲜有报道。为此, 该试验选取 2 种土壤种植的 4、5 a 生人参, 以水溶性总蛋白质以及土壤有机质含量为指标作比较分析, 研究农田土全氮与栽培人参中水溶性蛋白质含量的变化规律, 以期为人参栽培技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试人参样品采自吉林省抚松县。采样方式采取五点采样法, 在同一地域内分别采集 4、5 a 生, 腐殖土和农田土种植的人参各 1 kg, 土样各 0.5 kg。人参经吉林农业大学张连学教授鉴定为正品。人参样品洗净后 40℃烘干备用; 土样烘干 3 次至恒重, 进行土样有机质含量测定。

电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9140A 型, 上海精宏试验设备有限公司; 紫外分光光度计 UV-754 型, 山东高密

彩虹分析仪器有限公司; 分析电子天平 TG628A 型, 日本岛津公司; 6 孔恒温水浴锅, 常州奥华仪器有限公司; 超声波清洗器 KQ-250B 型, 昆山市超声仪器有限公司; 电子天平 TP 型, 余姚汇铭称量校验设备有限公司; 桌上型冷冻干燥机, VIRTIS 公司; 高速冷冻离心机 GL-21LM 型, 湖南星科科学仪器有限公司; 牛血清白蛋白(BSA), 上海新兴医药保健品科技开发中心; 考马斯亮蓝 G-250, 上海生化试剂采购供应站试剂厂; 其它试剂均为国内分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 人参水溶性蛋白质的提取 分别称取人参样品粉末 3 份, 每份 10 g, 加 20 mL 含 0.15 mol/L NaCl 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4), 4℃浸提 24 h, 5 000 r/min 离心 30 min, 上清液用 80%硫酸铵沉淀, 4℃静置过夜。沉淀加 3 倍体积 pH 7.4 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解, 过夜透析, -20℃预冻, 冻干, 得水溶性人参总蛋白质^[3]。

1.2.2 标准曲线的制作 0.1 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA)考马斯亮蓝 G-250 试剂: 0.01 g 考马斯亮蓝 G-250 溶于 5 mL 95%乙醇中, 加入 10 mL 85%磷酸, 定容至 100 mL。分别取 0~8 号试管, 依次加入试剂, 室温静置 3 min, 以 0 号管为空白, 于波长 595 nm 处比色。以蛋白质浓度为横坐标, 吸光度 A 值为纵坐标绘制标准曲线, 得到回归方程 $Y=8.355X-0.047$, $R^2=0.9992$, 表明线性关系良好。

1.2.3 样品水溶性总蛋白质含量的测定 样品液的制备: 取蛋白冻干粉 10 mg, 定容至 50 mL 容量瓶中, 取 0.2 mL 蛋白质溶液加入 0.8 mL 蒸馏水, 加入考马斯亮蓝 4 mL, 在 595 nm 处测其吸光值。根据样品的吸光值, 对照标准曲线可以计算出水溶性总蛋白质的含量。稳定性试验: 因蛋白质易变性, 故取 4 a 生农田土人参样品溶液, 分别在 0、20、30、40、60 min,

第一作者简介: 刘哲(1983-), 男, 硕士, 助教, 研究方向为生药学及新药研发。E-mail: oscarlzh@163.com.

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2007BA138B01)。

收稿日期: 2013-07-18

在 595 nm 处测定吸光度值。重现性试验:取 5 a 生腐殖土人参样品溶液,不同试验人员按含量测定方法重复 5 次测得其含量平均值。加样回收试验:精密称取 3 份已知含量的 5 a 生农田土人参样品 10 mg,分别定容至 50 mL 容量瓶中,摇匀备用。取 0.2 mL 蛋白质溶液加入 0.8 mL 蒸馏水,加入考马斯亮蓝 4 mL,加入一定量对照品(牛血清白蛋白),充分振荡摇匀后,冷至室温,于 595 nm 处测其吸光值,测定含量,计算加样回收率。

1.2.4 人参 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳指纹图谱 供试品溶液的制备:参照 1.2.1 取透析液 0.1 mL,经 0.22 μ m 滤膜过滤即得。采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法,双垂直电泳槽。分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 5%。浓缩胶电压为 70 mV,分离胶电压 140 mV,电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250,染色(甲醇:水:冰醋酸=4.5:4.5:1),最后用 7.5%甲醇和 5%冰醋酸的水溶液脱色至背景清晰^[4]。

1.2.5 土壤氮含量测定 样品处理:精确称取上述土壤样品 1.5 g 于 50 mL 的消化管中(每个样品 3 次重复),每支消化管中分别加入 2.0 g 加速剂(K_2SO_4 : $CuSO_4 \cdot H_2O$ =10:1)和 5 mL 浓 H_2SO_4 ,然后将样品和空白试剂置于电炉子上消解,至土壤溶液为透明灰白色,溶液冷却后,定容至 50 mL,摇匀后过滤,滤液用于 2 种分析方法样品氮含量测定。按照 GB 7173-87 凯氏定氮法测定土壤样品中含氮量。取 25 mL 上述土壤样品的消煮液于凯氏瓶中,同时快速地向凯氏瓶中加入 10 mol/L NaOH 20 mL,然后向凯氏瓶中通入蒸气,待三角瓶中收集馏出液达 100 mL 左右时,取下三角瓶,用浓度为 0.001 mol/L 的 H_2SO_4 滴定馏出液,读取消耗 H_2SO_4 的体积。土壤全氮 = $[(V - V_0) \times C \times 0.014 \times 50 / 25 \times 100\%] / m$ 。式中,V:滴定 25 mL 待测液时耗酸体积(mL); V_0 :滴定空白液时耗酸体积(mL);C:硫酸标准液浓度(mol/L);m:土样质量(g)。

2 结果与分析

2.1 稳定性试验测定结果

取 4 a 生农田土人参水溶性总蛋白质样品溶液,分别在 0、20、30、40、60 min 测定吸光度值(试验编号为 1~5),RSD 为 0.38%(表 1),符合 2005 年版《中国药典》规定,表明试验的稳定性良好。

2.2 重现性试验测定结果

在不同试验分析人员、不同测定日期的条件下,分别取 5 a 生腐殖土人参水溶性总蛋白质样品配制溶液,得到 RSD 为 0.13%;分别取 4 a 生农田土西洋参样品配制溶液,得到 RSD 值为 0.62%(表 1);均符合 2005 年版《中国药典》规定^[4],表明试验的重现性良好。

表 1 稳定性、重现性试验测定结果

Table 1	The result of stability and repeatability	
试验编号	稳定性试验含量/%	重现性试验含量/%
1	8.70	7.65
2	8.67	7.63
3	8.64	7.64
4	8.64	7.63
5	8.61	7.63
平均值/%	8.65	7.64
RSD/%	0.38	0.13

2.3 加样回收率试验测定结果

平均加样回收率为 99.15%在 95%~105%之间,RSD 为 0.19%(表 2),符合 2005 年版《中国药典》规定^[4],符合试验要求。

表 2 加样回收率的测定结果

Table 2	The result of recovery determination						
试验编号	样品量/mg	样品含量/mg	加对照品量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	10.00	0.80	1.10	1.89	99.09		
2	10.00	0.81	1.10	1.90	99.18	99.15	0.19
3	10.00	0.81	1.10	1.90	99.18		

2.4 样品水溶性总蛋白质含量测定

从表 3 可以看出,4 a 生和 5 a 生的农田土人参中,水溶性总蛋白质的含量(8.66%、8.11%)分别高于其相应的腐殖土人参的水溶性总蛋白质含量(7.75%、7.64%),且差异极显著($P < 0.01$);此外,随着参龄的增加,人参的水溶性总蛋白质含量有所降低。

表 3 农田土、腐殖土人参水溶性蛋白质含量

Table 3	Ginseng manufacture of protein content				%
样品类型	人参粗粉质量/g	平均吸光度 A	蛋白质含量/%	含量测定	
4 a 生人参-农田土	10.01	0.5561	8.66	$8.66 \pm 0.028^{**}$	
4 a 生人参-腐殖土	10.01	0.5488	7.75	7.75 ± 0.019	
5 a 生人参-农田土	10.00	0.5333	8.11	$8.11 \pm 0.060^{**}$	
5 a 生人参-腐殖土	10.00	0.5728	7.64	7.64 ± 0.010	

注:与同年生腐殖土人参相比 * * $P < 0.01$ 。

2.5 人参 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳指纹图谱结果

由图 1 可知,人参水溶性蛋白质分子量主要分布在 18~66 kDa 之间,主要包括分子量大约为 65、31、29、27、25、18 kDa 的蛋白亚基。人参中分子量为 31 kDa 和 29 kDa 的 2 个亚基为人参的主要蛋白亚基。从不同土壤条件来看,相同参龄农田土人参的主要蛋白亚基含量高于相应的腐殖土人参的蛋白亚基含量;从参龄高低来看,4 a 生人参的主要水溶性蛋白质含量高于其相应生长环境的 5 a 生人参的蛋白质含量,与样品水溶性总蛋白质含量的变化趋于一致。

2.6 土样氮含量测定结果

由图 2 可知,种植 4 a 生人参的农田土与腐殖土中全氮含量分别为 1.53 g/kg 和 1.45 g/kg;种植 5 a 生人参的农田土与腐殖土中全氮含量分别为 1.54 g/kg 和 1.41 g/kg。根据测定结果,全氮在农田土中含量较高。

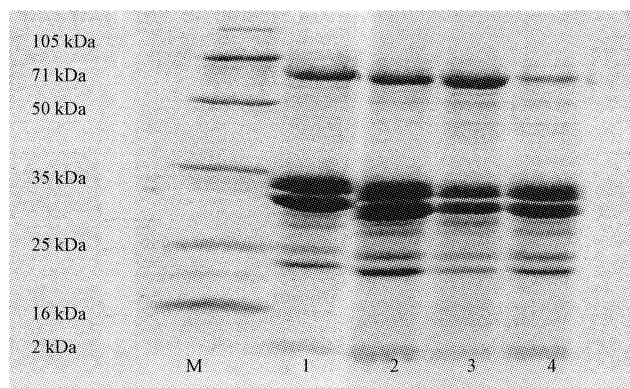


图1 4、5 a 人参水溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图

注:1;4 a 生腐殖土人参;2;4 a 生农田土人参;3;5 a 生腐殖土人参;4;5 a 生农田土人参。

Fig.1 SDS-PAGE of 4,5 a ginseng hydrophilic proteins

Note:1;4 years' ginseng of humus soil;2;4 years' ginseng of farmland soil;3;5 years' ginseng of humus soil;4;5 years' ginseng of farmland soil.

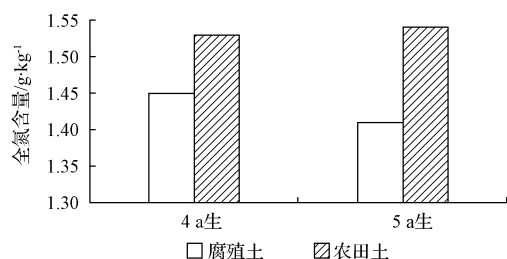


图2 不同土样中全氮含量

Fig.2 The nitrogen content in two kinds of soils

3 讨论与结论

农田土种植的人参中水溶性总蛋白质含量高于腐殖土人参含量,且分子量为 31 kDa 和 29 kDa 的蛋白亚基含量也相应偏高。么宝金等^[5]研究发现,测定的 8 种人参蛋白质中,园参蛋白质的含量均较高且高于野山参蛋白质的含量,该试验结果与此结论趋于一致;谢忠凯等^[6]认为人参施肥偏重氮肥、磷肥,有利于氨基酸的合成,从而进一步有利于合成蛋白质,也从另一个侧面反映出这可能与园参种植过程中大量施加氮肥有关。

在天然氨基酸中,有 20 种参与蛋白质合成^[7];同时必需营养元素在人参生长过程中也参与多种代谢活动。因此认为,在生产中应根据不同栽培方式和所需有效成分为人参有计划地增加相应元素,以促进参根中氨基酸的有效积累,为人参高产优质栽培技术提供理论依据。

参考文献

- [1] 马小琼. 人参化学物质基础分析方法研究[D]. 大连:中国科学院大连化学物理研究所,2005.
- [2] 马小军,汪小全,肖培根,等. 国产人参种质资源研究进展[J]. 中国药理学杂志,2000,35(5):289.
- [3] 张巍,李红艳,马晶,等. 人参水溶性蛋白的纯化工艺研究[J]. 吉林农业大学学报,2008,30(1):37.
- [4] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 三部附录IVC. 北京:化学工业出版社,2005.
- [5] 么宝金,邢楠楠,张梅,等. 园参、野山参、西洋参中水溶性蛋白成分的比较研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(1):51-52.
- [6] 谢忠凯,杨振玲. 长白山区人参土壤钾素营养状况及钾肥肥效[J]. 人参研究,1996(3):4.
- [7] 葛善欣,史俊卿,岳斌,等. 人参根大量营养元素与氨基酸的相关性研究[J]. 中草药,2010(4):639-642.

Contrast and Analysis on the Content of Ginseng Protein and Nitrogen Content in Different Soils

LIU Zhe¹, CHEN Xiao-lin², ZHANG Lian-xue³

(1. Jilin Medical College, Jilin, Jilin 132013; 2. Office of Jilin Ginseng Antler, Changchun, Jilin 130021; 3. Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking ginseng as material, the different soil soluble protein content of ginseng cultivation, the nitrogen content of the soil were compared and analyzed, and the laws of water-soluble protein content of ground ginseng was studied. The results showed that ginseng grew in farmland, its content of total water-solubility protein and the major protein subunits were higher than the ones in humus soil; the nitrogen content in farmland soil was higher. It's may be conducive to the synthesis of proteins for ginseng grows in farmland soil.

Key words: farmland soil and humus soil; ginseng; water-solubility protein; nitrogen