

广西虎纹捕鸟蛛毒成分的氨基酸测定及红外光谱定性分析

刘圆圆 黄新 谢赛华 谭芳 张峥峥 刘磊

【摘要】 目的 通过质量分析的方法初步鉴定蛛毒的毒素化学成分。**方法** 采用氨基酸自动分析仪对蛛毒的多种氨基酸成分进行定性及定量的研究,并且辅以红外光谱法进行定性研究。**结果** 通过氨基酸测定法从虎纹捕鸟蛛中鉴定到谷氨酸、胱氨酸、赖氨酸含量较多,分别为 8.15%、7.86%、7.64%,氨基酸总量为 55.93%;从样品粉末的红外光谱可知:该化合物可能含-C-H,-OH,N-H,-CO-N-H,苯环等主要氨基酸基团。**结论** 结果表明该鉴别方法操作简便、专属性强,可用于蛛毒的定性鉴别和含量测定,初步建立了虎纹蛛毒成分的定性鉴定研究方法。

【关键词】 虎纹蛛毒;氨基酸测定;红外光谱

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.02.006

Amino acid assay of toxin from the spider Guangxi Selenocosmia Huwena and qualitative analysis by infrared spectrometry LIU Yuan-yuan, HUANG Xin, XIE Sai-hua, et al. Guilin Traditional Chinese Medical Hospital, Guilin 541002, China

Corresponding author: HUANG Xin, E-mail: nnhuangxin@163.com

【Abstract】 Objective Preliminary identification of the chemical composition of toxin from the spider Guangxi Selenocosmia Huwena with the method of quality analysis. **Methods** Automatic amino acid analyzer on a variety of amino acid composition of spider poisons was adopted to perform a qualitative as well as quantitative research, and the former was supplemented by infrared spectrometry. **Results** By using amino acids analysis the chemical composition of Guangxi Selenocosmia Huwena toxin was identified, and the finding was the spider Guangxi Selenocosmia Huwena contains higher levels of glutamic acid, cystine, lysine, which were 8.15%, 7.86%, and 7.64%, respectively, and the total amino acids was 55.93%. The infrared spectrometry showed that the sample powder may contain-C-H,-O-H, N-H,-CO-N-H, benzene ring and other major amino group. **Conclusion** The results showed that the identification method, being simple, and specific, could be used for spider poison qualitative identification and determination, and the specific approaches for such method was tentatively established.

【Key words】 Selenocosmia Huwena toxin; Amino acids assay; Infrared spectrometry

当今对蜘蛛毒素的研究,已成为继蛇毒、蝎毒后的又一研究热点。本文通过研究旨在分析虎纹捕鸟蛛毒毒素的成分,为临床应用提供必要的实验

基础。蜘蛛作为药用,据唐朝陈藏器的《本草拾遗》记载,药用蜘蛛“主一切疗肿附骨疽蚀等疮,宿肉赘瘤”。虎纹捕鸟蛛 *Selenocosmia huwena*,最近被鉴定为蜘蛛新种,属于捕鸟蛛科 *Theraphosidae*^[1],主产于海南、广西宁明一带^[2]。从虎纹捕鸟蛛中分离纯化的粗毒作为一种天然的毒素,它是由神经毒性肽、蛋白质和低分子量物质所构成的复杂混合物,具有抗肿瘤、镇痛^[3]等多种活性。虎纹蛛毒素的化学成分主要包括蛋白质类、酶、多胺、氨基酸、核苷酸等^[4]。本研究主要应用红外光谱及氨基酸测定法对虎纹蛛毒的化学成分初步分析。

基金项目:广西壮族自治区中医药管理局中医药科技专项(GZ-KZ10-056)

作者单位:541002 桂林市中医医院药剂科(刘圆圆、谢赛华、谭芳);广西中医药大学附属瑞康医院神经外科(黄新、张峥峥、刘磊)

作者简介:刘圆圆(1985-),女,硕士,药师。研究方向:药物分析。E-mail:275189113@qq.com

通讯作者:黄新(1960-),本科,教授。研究方向:脑肿瘤手术治疗。E-mail:nnhuangxin@163.com

1 原料药材

广西虎纹捕鸟蛛毒素(螫肢末端的毒腺分泌的毒液提取)从广西南方蜘蛛毒研究所提取、及购买于广州中医药大学。将蛛毒粉末样品置于冰箱中 4℃ 冻存,备用。

2 实验仪器及试剂

IR NEXUS470 型傅立叶红外分光光度计(美国尼高力仪器公司);METTLER-AE100 电子分析天平(瑞士 METTLER 公司);L-8800 全自动氨基酸分析仪(日本日立公司);甲醇(AR)(批号:20070127,上海试一化学试剂有限公司);95%乙醇(AR)(批号:20090616,成都市科隆化工试剂厂);丙酮(AR)(批号:20030902,中国医药集团化学试剂有限公司);淀粉酶(郑州中兴添加剂有限公司);茚三酮(上海科丰化学试剂公司)。

3 实验方法与结果

3.1 氨基酸测定

3.1.1 原理 氨基酸的组分分析,现在广泛地采用离子交换法,并由自动化的仪器来完成。其原理是利用各种氨基酸的酸碱性、极性和分子量大小不同等性质,使用阳离子交换树脂在色谱柱上进行分离。当样液加入色谱柱顶端后,采用不同的 pH 值和离子浓度的缓冲溶液即可将它们依次洗脱下来,即先是酸性氨基酸和极性较大的氨基酸,其次是非极性的芳香性氨基酸,最后是碱性氨基酸;摩尔质量小的比摩尔质量大的先被洗脱下来,洗脱下来的氨基酸可用茚三酮显色,从而定量各种氨基酸。定量测定的依据是氨基酸和茚三酮反应生成蓝紫色化合物(570 nm)的颜色深浅与各有关氨基酸的含量成正比。但脯氨酸和羟脯氨酸则生成黄棕色化合物(440 nm),故需在另外波长处定量测定。

3.1.2 样品处理 测定样品中各种游离氨基酸含量,可以除去脂肪杂质后,直接上柱进行分析;测定蛋白质的氨基酸组成时样品必须经酸水解。称取干燥的蛋白质样品数毫克,加入 5.7 mol/L 盐酸 2 ml,置于 110℃ 烘箱内水解 24 小时,然后除去过量的盐酸,加缓冲溶液稀释到一定体积,摇匀,使蛋白质完全变成氨基酸后才能上柱进行分析。如果样品中含有糖和淀粉、脂肪、核酸、无机盐等杂质,必须将样品预先除去杂质后再进行酸水解

处理。

3.1.3 样品分析 经过处理后的样品上柱进行分析,上柱的样品量根据所用自动分析仪的灵敏度来确定,一般为每种氨基酸 0.1 μmol 左右(水解样品干重为 0.3 mg 左右)。测定必须在 pH 5 ~ 5.5、100℃ 下进行,反应进行时间为 10 ~ 15 分钟,生成的紫色物质在 570 nm 波长下进行比色测定,而生成的黄色化合物在 440 nm 波长下进行比色测定。

3.1.4 实验结果 测定及分析结果见表 1。

表 1 蛛毒粉末样品的氨基酸测定结果

序号	检验项目	检测结果 (%)	序号	检验项目	检测结果 (%)
1	Asp(门冬氨酸)	6.13	10	Met(蛋氨酸)	0.42
2	Thr(苏氨酸)	1.23	11	Ile(异亮氨酸)	0.74
3	Ser(丝氨酸)	3.23	12	Leu(亮氨酸)	2.84
4	Glu(谷氨酸)	8.15	13	Tyr(酪氨酸)	2.71
5	Pro(脯氨酸)	2.24	14	Phe(苯丙氨酸)	2.23
6	Gly(甘氨酸)	3.61	15	Lys(赖氨酸)	7.64
7	Ala(丙氨酸)	1.28	16	NH ₃ (氨)	1.07
8	Cys(胱氨酸)	7.86	17	His(组氨酸)	1.23
9	Val(缬氨酸)	2.05	18	Arg(精氨酸)	2.34
氨基酸总量		55.93%			

3.2 红外光谱法

3.2.1 实验方法 样品压片:取干燥的样品粉末约 1 mg,置玛瑙研钵中磨细,然后加入干燥的溴化钾约 100 mg,经充分研磨,使之粒度细小,混合均匀,参照空白压片法进行压制,即得样品压片。(为了防止样品变潮,整个过程应该尽可能在红外光下进行)。先将空白片置于仪器的样品光路中,进行扫描得参比光谱图,再将样品片置于仪器的样品光路中,进行扫描后即得到样品的红外光谱图。

3.2.2 实验结果 红外实验主要考察分辨率和扫描次数两个方面。本实验无论是在分辨率为 4 或 8,均为扫描次数为 25 的时候图谱较佳,不仅峰形好,而且基线比较平稳。同时,在分辨率为 4 扫描次数为 25 的红外光谱图比分辨率为 8 扫描次数为 25 的红外光谱图的基线更平稳,所以最终选择分辨率为 4 扫描次数 25 为进行红外光谱的条件,结果见图 1 和表 2。

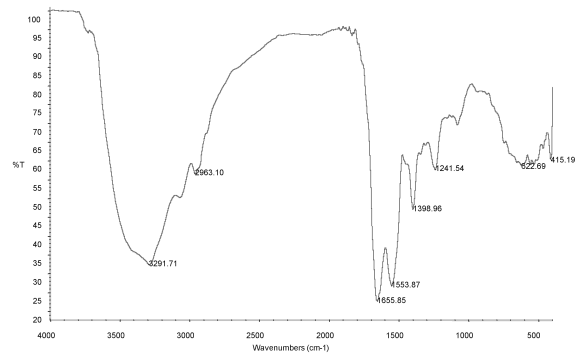


图1 分辨率为4、扫描次数为25的蛛毒粉末样品红外光谱图

表2 蛛毒粉末样品的红外光谱测定数据

吸收峰位 (cm^{-1})	基团	吸收峰强度
3292	-OH 和 N-H 和 C-H	弱
1616 和 1554	-C = C- 和 C = O	弱
3070 和 2962	=CH	强
1399 和 1241	-C-N- 和 C-H	强

红外光谱解析:(1) 3292 cm^{-1} ; $3500 \sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 之间的这个大峰有可能是-OH 和 N-H 和 C-H 的伸缩振动峰。(2) 1616 cm^{-1} 和 1554 cm^{-1} : 苯环的骨架振动峰和羰基的伸缩振动峰。(3) 3070 cm^{-1} 和 2962 cm^{-1} : 芳氢的伸缩振动峰。(4) 1399 cm^{-1} 和 1241 cm^{-1} : 酰胺中的 C-N 的伸缩振动峰和 C-H 的弯曲振动峰。从样品粉末的红外光谱可知: 该化合物可能含-C-H, -OH, N-H, -CO-N-H, 苯环等主要氨基酸基团。

4 讨论

4.1 氨基酸测定

氨基酸测定主要是将处理好的游离氨基酸样品用日立 L-8800 型全自动氨基酸分析仪进行 18 种氨基酸的测定, 氨基酸总量为 55.93%。用离子交换层析的原理将各种氨基酸分离、洗脱, 被洗脱的各种氨基酸与茚三酮产生颜色反应, 并由分光光度计自动定量测定各个氨基酸的含量。整个过程实现全自动化, 操作简单, 不仅可以对氨基酸进行定性分析, 而且可以对各种氨基酸进行准确的含量测定, 现已被广泛应用于食品、饲料、医药质量监控、生化研究、临床检测等领域。显色反应的茚三酮

试剂, 随着时间推移发色率会降低, 故在较长时间测样过程中应随时采用已知浓度的氨基酸标准溶液上柱测定以检验其变化情况。

采用反相色谱原理制造的氨基酸分析仪, 可使蛋白质水解出的 18 种氨基酸在 12 分钟内完成分离, 且具有灵敏度高(最小检出量可达 1 pmol)、重现性好以及一机多用等优点。

4.2 红外光谱法

红外光谱法不仅操作简便, 而且具有很高的分辨率和极快的扫描速度, 它正在被各个学科领域很广泛的应用。随着傅立叶变换红外光谱和计算机技术的不断发展, 利用红外光谱技术可直接获取化学信息, 可快速鉴别化学物品的优劣, 也可作为初步的化学成分的提取提供指导^[5]。实验结果表明蛛毒粉末在红外光谱中有特征的吸收峰, 该吸收峰为氨基酸的主要基团, 可以为蛛毒初步化学成分的鉴别提供辅助依据。

5 结论

采用氨基酸自动分析仪对蛛毒粉末样品的多种氨基酸成分进行定性及定量的方法简便可行; 蛛毒粉末样品的红外光谱显示蛛毒样品具有多种氨基酸特征吸收峰。本课题对虎纹捕鸟蛛的化学成分进行初步研究, 完成了对其粗毒的基本波谱分析、主要成分结构的初步鉴定等基础性研究工作, 为寻找新的抗肿瘤药物和进一步研究其结构和功能关系、药理学性质奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 王家福, 彭贤锦, 谢莉萍. 我国南方捕鸟蛛一新种(蜘蛛目: 捕鸟蛛科)[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 1993, 16(1): 72.
- [2] 潘红平, 蒙健宗, 徐蕴丽, 等. 虎纹捕鸟蛛毒素的提取及毒力的测定[J]. 广西农业生物科学, 1999, 18(4): 274-277.
- [3] 周鸿雁, 毛海峰, 陈嘉勤, 等. 虎纹镇痛肽对脑缺血损伤大鼠神经保护作用的研究[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2006, 18(3): 50-52.
- [4] 李顺意, 梁松平. 虎纹捕鸟蛛毒液中透明质酸酶的纯化和部分性质的研究[J]. 生物化学杂志, 1995, 11(2): 155-160.
- [5] 李发美. 分析化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 252-272.

(收稿日期: 2013-9-30)

(本文编辑: 董历华)