

L-精氨酸测定方法的研究*

蒙绮芳 赖碧清 周锡梁

(深圳大学理学院应用化学系 深圳 518060)

摘 要 就放置时间、温度、盐类对精氨酸坂口试剂测定法的影响进行研究,得出结论: $T = 20.5^{\circ}\text{C}$, 放置时间为 40 min 及加入 0.1 mg/mL 的盐溶液对标准曲线进行校正,使此测定方法准确度提高。

关键词 精氨酸 坂口反应 沉淀法 准确度

坂口试剂测定法是根据精氨酸 δ -胍基与坂口试剂反应后,可产生橙红色颜色的特殊性质,用分光光度计检测不同标准浓度精氨酸的光密度读数,绘制精氨酸浓度与光密度读数关系的函数线,从而在所制的标准曲线上查得被检对象对应的精氨酸浓度^[1]。我们在实验中发现,用此方法测定精氨酸的含量,受放置时间、温度、盐类等因素的影响,要想得到彼此完全重合的标准曲线,存在一定困难,对生产过程中精氨酸含量测定的准确性造成很大的影响,因此我们采用对比的方法进行实验,检查放置时间、温度、盐素等因素对标准曲线的影响,选取较佳条件进一步完善此种测定方法。

1 标准曲线制作:

准确吸取标准精氨酸溶液 0, 1, 2, 3, 4, 5

mL 分别置于已编号的试管内,加蒸馏水至 5 mL,即配成精氨酸含量分别为 0.00, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg 的标准试液,分别加入 1.0 mL 冷 α -萘酚——尿素混合液,摇匀,置冰浴中,2 min 后加入 1.0 mL 冷次溴酸钠,摇匀并放入冰浴中,反应 5 min 后取出,平衡温度,进行比色测定并绘出标准曲线。

2 结果与讨论

2.2 放置时间对标准曲线的影响

实验是在测试液平衡温度后,取出在一定温度条件下($T = 20.5^{\circ}\text{C}$)改变放置时间,每 20 min 测定一次光密度读数。我们将三次不同时间测定得出的光密度读数绘出函数图 1。根据图 1 我们计算了标准曲线的斜率,结果列于表 1。

表 1 不同放置时间所得标准曲线斜率的标准偏差的比较

Table 1 Comparison of standard deviations obtained from the slopes of standard curves in different lay up times.

放置时间/min	斜 率				标准偏差 S
	K_1	K_2	K_3	K	
20	5.280	6.133	5.833	5.749	0.433
40	5.280	5.300	5.200	5.260	0.053
60	5.000	5.200	4.800	5.000	0.200
80	4.800	5.060	4.667	4.842	0.200

* 收稿日期: 1998-05-04

从表 1 和图 1 看出,以精氨酸浓度与光密度读数关系绘出的标准曲线的斜率随着放置时间延长越来越小。放置时间与光密度读数的关系是:随放置时间延长,光密度读数越来越小;取同一时间间隔,放置时间对光密度读数的影响随放置时间延长而变小。从表 1 可看出: $T=20.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,比色反应放置 40 min,三次实验所得的标准曲线斜率的标准偏差最小,即所得标准曲线的重现性最好。

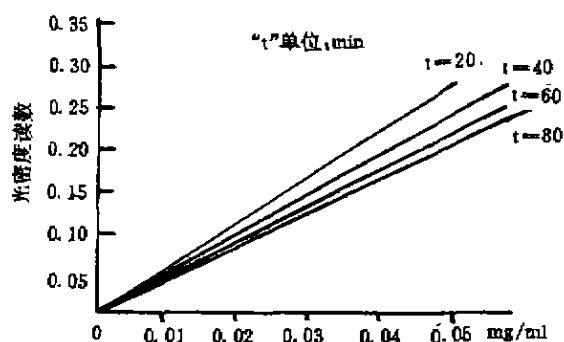


图 1 不同放置时间精氨酸浓度与光密度读数的函数图

Fig1 Curves of OD vs. Arginine concentrations at different lay up times.

2.2 温度对标准工作曲线的影响

为了检查温度对测试液的光密度读数影响,确定放置平衡的最佳温度,我们选取不同温度条件,以相同放置时间(40 min)进行多次检测,并将测定得出的光密度读数绘出函数图 2。根据图 2 我们计算了标准曲线的斜率,结果列于表 2。

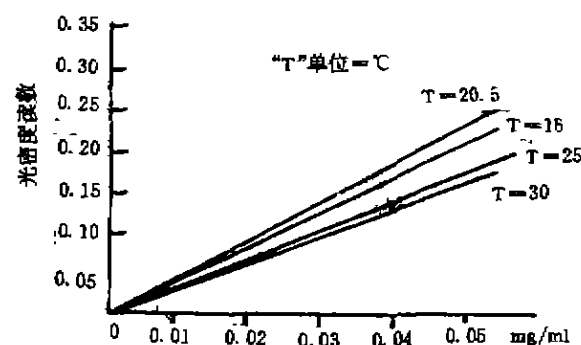


图 2 不同放置温度精氨酸浓度与光密度读数的函数图

Fig2 Curves of OD vs. Arginine concentrations under different temperatures.

表 2 不同温度条件下所得标准曲线斜率的标准偏差的比较

Table2 Comparison of standard deviations obtained from the slope of standard curves under different temperatures.

温度/ $^{\circ}\text{C}$	斜 率				标准偏差 S
	K_1	K_2	K_3	K	
30	3.8	3.333	4.05	3.728	0.364
25	2.533	3.233	4.1	3.289	0.785
20.5	5.2	5.3	5.28	5.26	0.053
16	4.4	4.8	4.3	4.5	0.265

从表 2 可知: $T=20.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, $S=0.053$,在四个不同的温度中,多次实验的标准偏差最小,即 $T=20.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的标准工作曲线的重现性最好。

2.3 盐类对工作曲线的影响

应用本方法于生产中测定母液精氨酸含

量时,我们发现测得的含量数据与实际有较大差距。分析可能是盐的影响。为此做了盐影响的实验。按表 3 所列比例分别加入试剂,配成被检液,平衡温度后,放置 40 min,进行比色测定,绘制工作曲线。将此工作曲线与精氨酸标准工作曲线进行比较,检测结果见表

4~5。

表3 被检液配置比例

Table3 Composition of tested solutions.

试剂	试 管 编 号				
	1	2	3	4	5
标准精氨酸液/0.01mg/mL	0	1	2	3	4
氯化铵溶液或氯化钠溶液/0.1mg/mL	1	1	1	1	1
水/mL	4	3	2	1	0

表4 T=20.5℃条件下标准精氨酸溶液加入铵盐测出的光密度读数

Table4 Optical density readout at T=20.5℃, after adding ammonium to the standard Arginine solution.

浓度/mg/mL	3月12日测定			3月12日测定			3月13日测定		
	光 密 度 读 数			光 密 度 读 数			光 密 度 读 数		
0.01	0.031	0.030	0.031	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035
0.02	0.065	0.066	0.065	0.065	0.065	0.065	0.075	0.075	0.075
0.03	0.105	0.104	0.105	0.101	0.101	0.101	0.120	0.120	0.075
0.04	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.160	0.160	0.160

表5 T=20.5℃条件下标准精氨酸溶液加入钠盐测出的光密度读数

Table5 Optical density readout at T=20.5℃ after, adding sodium to the standard Arginine solution.

浓度/mg/mL	3月16日测定			3月18日测定			3月18日测定		
	光 密 度 读 数			光 密 度 读 数			光 密 度 读 数		
0.01	0.040	0.040	0.040	0.046	0.047	0.048	0.050	0.050	0.050
0.02	0.080	0.081	0.080	0.096	0.096	0.096	0.100	0.100	0.100
0.03	0.120	0.120	0.120	0.137	0.137	0.137	0.138	0.139	0.139
0.04	0.160	0.160	0.160	0.165	0.165	0.165	0.175	0.174	0.174

根据表4~5的光密度读数作图3~4。

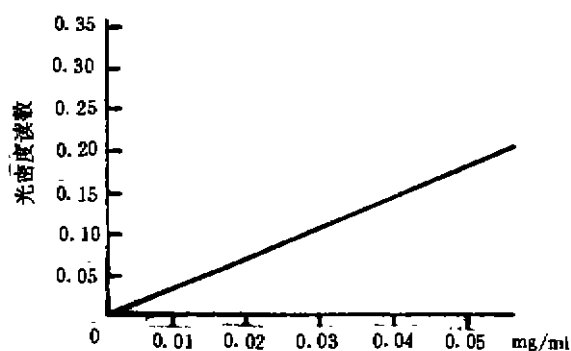


图3 标准精氨酸溶液加入铵盐测出的光密度读数函数图

Fig3 Curves of optical density readout after adding ammonium to standard Arginine solution.

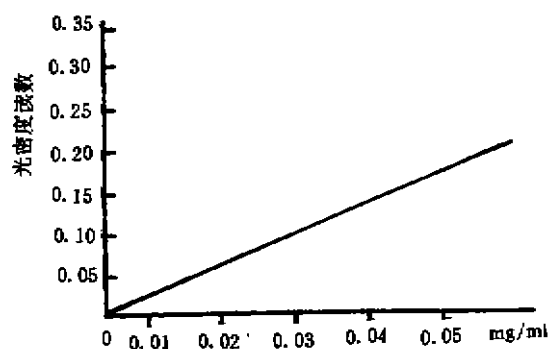


图4 标准精氨酸溶液加入钠盐测出的光密度读数函数图

Fig4 Curves of optical density readout after, adding sodium to standard Arginine solution.

从图 3、图 4 的工作曲线与图 1 标准曲线对比可以看出,铵盐、钠盐对精氨酸的显色反应都有影响,如精氨酸标准浓度为 0.02 mg 时,图 1 对应的吸光读数为 0.104,图 3 对应的吸光读数为 0.072,图 4 对应的吸光读数为 0.088。而图 1 标准曲线上吸光读数为 0.072 所对应的精氨酸含量为 0.0137 mg,比 0.02 mg 下降了 0.0063 mg;吸光读数为 0.088 所对应的精氨酸含量为 0.0168 mg,比 0.02 mg 下降了 0.0032 mg。由此可知,坂口试剂测定法作为生产中的中间测定法,应进行盐类影响的校正。以前没有考虑盐类影响,把测得的被检液光密度读数直接从标准曲线中查找对应浓度,作为检测结果,显然是不准确的。

3 结论

坂口反应测精氨酸含量方法中,标准曲线的绘制是关键问题。从对比实验总结得出:在温度 $T = 20.5^{\circ}\text{C}$ 的条件下,将被检液放置 40 min,然后进行测定,所得的标准曲线重现性较好。在生产实际中应用时,加上盐类影响校正,绘制工作曲线作为标准,测定结果准确度有所提高。

参考文献

- 1 张楚富. 猪毛水解液中精氨酸含量测定. 氨基酸学术论文集. 武汉: 武汉大学出版社, 1983

Study on the L-Arginine Determination with Sakaguchi-Reaction

Meng Qifang Lai Biqing Zhou Xiliang

(Department of Chemistry, Shenzhen University, Shenzhen 518060)

Abstract: The effect of the parameters of temperature (T), lay up time (t), and salt solution on the colorimetric assay of arginine was experimentally studied. The results show that the accuracy of this analysis method could be improved when T is about 20.5°C , t is about 40 mins, and 0.1 mg/ml salt solution is added.

Key words: L-Arginine Sakaguchi-reaction

新书《醌酶原理导论》征订启事

由武汉大学生命科学院教授赵永芳等编著的“醌酶原理导论”一书是在国家自然科学基金资助下,积十余年科研、教学经验、参考国外文献资料撰写而成的。该书已于 1998 年 3 月由武汉大学出版社出版,全书以醌酶及其新辅基的发现、进展和意义为主线,以含吡咯喹啉醌(PQQ)的甲醇脱氢酶、含色氨酸-色氨酸醌(TTQ)的甲胺脱氢酶和含 6-羟基多巴醌(TPQ)的二胺氧化酶的纯化、性质和结构为重点,全面系统地介绍产生醌酶甲基营养菌的培养与特性、辅基 PQQ 的分离与鉴定,以及醌酶辅基合成的分子遗传,同时还概述了醌酶及其辅基的生物学功能与应用。全书共九章,每章后面附有参考文献。本书可作为综合性大学、师范及医农院校本科生和研究生的教材,还可供从事生物化学、分子生物学工作的科技人员和其它有关同志参考。该书订价 15.80 元,欲购者可将书款 18 元(含邮费)汇至武汉大学生命科学院叶文峰收,款到即寄书。邮编 430072