

文章编号:1000-9973(2005)08-0050-03

茚三酮比色法测定谷氨酸含量的研究

王昂,王丽丽*,仪宏,赵紫华

(河北科技大学 生物科学与工程学院,河北 石家庄 050018)

摘要:依据 α -氨基酸与茚三酮显色反应的原理,研究了比色法定量检测谷氨酸的方法,着重探讨了此显色反应的影响因素、反应条件及注意事项。作为定量检测谷氨酸的方法,它与常规的谷氨酸检测方法相比,具有简便实用的特点。适用于一般实验室的样品分析及谷氨酸生产过程中的产品检测。

关键词:谷氨酸;茚三酮;显色反应;比色法

中图分类号:TS201.2 **文献标识码:**B

Research of determination of glutamic acid by colorimetry

WANG Ang, WANG Li-Li*, YI Hong, ZHAO Zi-hua

(College of Bioscience & Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: This paper investigates the method of quantitative determination of glutamic acid by colorimetry in the principle of color reaction between α -amino-acids and ninhydrin, and mainly discusses the effect factors, reaction conditions and points for attention of this color reaction. As a method of quantitatively determining glutamic acid, it is characterized by simplicity and practicability compared with conventional methods of determining glutamic acid. It is available in common lab operations and determination in the process of glutamic acid production.

Key words: glutamic acid; ninhydrin; color reaction; colorimetry

多年来,国内的味精厂家大都采用瓦式呼吸仪和谷氨酸自动分析仪法作为定量检测谷氨酸的方法^[1,2]。此法虽准确度高,但其技术要求高、设备投入大,不适宜一般实验室操作及谷氨酸产品的粗测。谷氨酸和茚三酮在弱酸条件下共热反应可以生成蓝紫色物质,其颜色的深浅主要与谷氨酸的浓度有关^[3~5]。本文利用此显色反应,采用比色法定量检测谷氨酸,实验中收到了很好的效果。

但在实验过程中,我们发现很多因素如浓度、pH值、反应温度、时间等,对显色反应有很大的影响^[6]。如忽视了这些影响因素,会使实验产生较大的误差。现就此显色反应做一全面的分析,供大家参考。

1 材料与方法

1.1 试剂的制备

缓冲溶液的制备:配制pH 6.0的

NaAc—HAc 缓冲溶液。

谷氨酸标准液的配制:用天平准确称取 1.0000g 谷氨酸标准品,溶于 1L 缓冲溶液中。再采用逐级稀释法配得浓度为 80μg/mL、90μg/mL 至 140μg/mL 的谷氨酸标准液。

茚三酮试剂的制备:称取 0.5g 茚三酮溶于 100mL 水中得到 5g/L 的茚三酮水溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的确定

分别吸取 80~140μg/mL 的谷氨酸标准液 5mL 于 25mL 的比色管中,各加入 1mL 的茚三酮试剂,加上塞充分摇匀。将其置于 90℃ 下水浴 20~25 min,冷却至室温,用 7200 型分光光度计在 569nm 下测得其光密度值^[2]。以标准液的光密度值和浓度做一标准曲线。

1.2.2 样品的测定

稀释待测液于 80~140μg/mL 内(谷氨酸发酵液浓度一般在 8%~14%,测量时稀释 1000 倍即可),调 pH 为 6.0。以同样的反应量与反应条件进行反应,并在 569nm 下测定其光密度值。由以上所得标准曲线对应查得待测稀释液的浓度,再乘以稀释倍数即为谷氨酸待测液的浓度。

2 结果与讨论

2.1 茚三酮显色反应的结果分析

2.1.1 标准曲线的测定

谷氨酸浓度在 80~140μg/mL 范围内与茚三酮反应,表现出由浅蓝到深蓝的颜色递增变化。以下是我们用茚三酮比色法测得的一组数据(表 1)及由此得到的标准曲线(图 1)。

表 1 谷氨酸标准液的光密度值

谷氨酸浓度 (μg/mL)	80	90	100	110	120	130	140
颜色变化	浅蓝	浅蓝	蓝色	蓝色	深蓝	深蓝	深蓝
OD ₅₆₉	0.190	0.495	0.900	1.226	1.533	1.800	1.955

注:反应条件 90℃ 水浴 25 min,谷氨酸标准液 5mL,茚

三酮水溶液 1mL,pH6.0

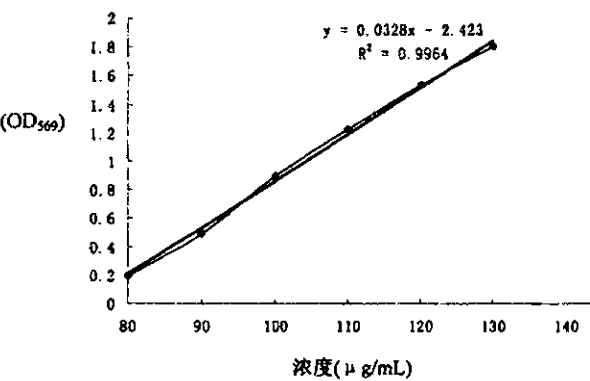


图 1 标准曲线

2.1.2 样品测定分析

将被测样品稀释 1000 倍后,由此法检测浓度为 89g/L。为检验此方法的准确性,向每 1 mL 被测样品中分别加入 20μg、40μg 的谷氨酸纯品。测得数据如下:

表 2 样品的光密度值

谷氨酸待测液	OD ₅₆₉	比色法测得的浓度(g/L)
I	0.447	89
Ⅱ	1.250	110
Ⅲ	1.805	130

注:表中 I 表示谷氨酸待测稀释液,Ⅱ、Ⅲ为每 1 mL 分别加入了 20μg、40μg 谷氨酸纯品的稀释液

由此可见,当向每 1 mL 样品中多加入 20μg、40μg 的谷氨酸纯品时,所测得的结果即落入相应的浓度区间。这说明该方法的准确度较高,适于谷氨酸的定量检测。

2.2 茚三酮显色反应的影响因素分析

茚三酮与谷氨酸的显色反应灵敏度较高,但同时也受到多种因素的影响。当实验条件控制不好时,会造成实验数据的较大偏离,从而产生较大的误差。此显色反应的影响因素主要有以下几方面。

2.2.1 谷氨酸浓度的影响

实验表明,谷氨酸与茚三酮水溶液在表 3 所注条件下反应的最低显色浓度为 70μg/mL。随谷氨酸浓度变大,显色逐渐变深。当浓度大于 140μg/mL 时,所显颜色过深且其光密度值

超出量程。当谷氨酸浓度在 80~140 $\mu\text{g/mL}$ 时,颜色变化明显且显色较稳定,因此我们选定此浓度范围作为测定范围。

表 3 浓度对显色反应的影响

谷氨酸浓度($\mu\text{g/mL}$)	颜色变化
60	基本无色
70	略带浅蓝
100	浅蓝
150	深蓝

注:90℃下水浴 25 min,谷氨酸标准液 5mL,茚三酮水溶液 1mL,pH6.0

2.2.2 pH 值的影响

以 100 $\mu\text{g/mL}$ 的谷氨酸标准液在不同 pH 下进行显色反应,测得结果如表 4。

表 4 pH 值对显色反应的影响

谷氨酸浓度($\mu\text{g/mL}$)	pH 值	颜色变化
100	2	无色
100	4	无色
100	6	浅蓝
100	8	浅蓝
100	10	浅蓝

注:90℃下水浴 25 min,谷氨酸标准液 5mL,茚三酮水溶液 1mL

由表 4 可见,显色反应随 pH 的不同颜色有明显的变化。当 pH 在 4 以下时不显色,而 pH 在 6~10 时,颜色变化明显。但因茚三酮的水溶液在碱性条件下溶液本身带有明显的淡黄色,因此 pH 选定在 6 左右较好,此时基本无颜色干扰且显色稳定。

2.2.3 温度及反应时间的影响

实验表明,温度和反应时间对此显色反应的影响也很大。以 100 $\mu\text{g/mL}$ 的谷氨酸标准液在 70℃进行显色发应时,发现即使加热 30 min 也基本无颜色变化。当温度为 80℃时,加热 30 min 以上有颜色变化,而当温度为 90℃时,加热 15 min 左右即有明显的颜色变化,沸水加热时颜色变化也很明显。但考虑到蒸发影响,所以实验选用 90℃作为最

佳反应温度。

在显色反应中,反应时间主要根据具体的颜色变化而定。一般来说,当谷氨酸浓度在 80~140 $\mu\text{g/mL}$ 时,90℃加热 20 min 以上即可完全反应。时间太短,反应不完全,颜色梯度不明显,所以最佳反应时间在 20~25 min。

表 5 温度及反应时间对显色反应的影响

谷氨酸浓度($\mu\text{g/mL}$)	pH	反应时间(min)	反应温度(℃)		
			70	80	90
100	6.0	15	无色	无色	无色
100	6.0	20	无色	无色	浅蓝
100	6.0	25	无色	无色	浅蓝
100	6.0	30	无色	浅蓝	浅蓝

注:谷氨酸标准液 5mL,茚三酮水溶液 1mL。

2.2.4 其它影响因素

茚三酮的不同溶剂对显色反应也有影响。实验表明,茚三酮的丙酮溶液在 80℃以上时显色较好,而茚三酮的水溶液要在 90℃以上时显色才明显。茚三酮的用量对显色反应的影响不大,可选择 5mL(或 3mL)被测液与 1mL(或 0.5 mL)茚三酮溶液反应。测定时,最好选择谷氨酸标准样与待测稀释液一同水浴,这样可提高测定的准确度。

此外,当被测样品中含有其它氨基酸时也可与茚三酮发生显色反应,从而影响测定结果。但在谷氨酸发酵中,所产的谷氨酸含量一般是其它氨基酸的几十倍,故此影响因素可忽略不计。

总之,茚三酮比色法作为一种谷氨酸的定量检测方法,具有操作简单、成本低的优点。只要控制好实验条件,就能取得较好的测量结果。这对于一般实验室的样品分析及味精生产厂家的谷氨酸产品测定,有较好的实用价值。

参考文献:

[1]吴亚萍.微量呼吸仪测定发酵液谷氨酸含量的误差分析[J].发酵科技通讯,2000,29(3):27-28.

琼脂按一定梯度加入到返混果醋中。摇匀,静置 12h,测其透光率、酸度及色泽变化,其结果见表 6 所示。

表 6 琼脂对返混醋的影响

琼脂用量(g/L)	0	0.5	1.0	1.5	2.0
透光率(%)	48.3	74.3	73.6	71.9	70.0
酸度(g/100mL)	3.399	3.396	3.394	3.395	3.397

由表 6 可见,琼脂对返混果醋的作用效果比较明显,并且对酸度没有大的变化,色泽有所好转。随着琼脂的加入量透光率有所下降,所以选用琼脂时应选用适当的量。

3 结论

通过实验,表明造成果醋返混和颜色加深的主要原因是单宁和多酚类物质,果胶和蛋白质对返混存在一定程度的加重效应。但如果解决了单宁和多酚类物质的问题,果醋变的澄清透亮,并不再出现返混和颜色加深现象,对酸度、香味等也基本上无影响。

综合上述 5 种实验结果,可以发现各种澄清剂对果醋都有不同程度的澄清效果,相比而言,明胶溶液澄清效果最佳,能很好地解决返混

果醋存在的问题,但是明胶的用量并非是越多越好,而是有一个最佳用量为 3%,但不同的批次其用量要根据每批次的小试来确定,以达到最佳的澄清效果。并且操作简单,经济合理。

参考文献:

[1]李世秀. 新型保饮料——果醋的酿造技术[J]. 中国调味品,2001,(10):3—6.

[2]明景熙. 待开发的绿色食品——果醋[J]. 国酿造,1999,(2):5—8.

[3]田瑜. 食醋非生物性返混的研究[J]. 中国酿造, 2003,(2):12.

[4]李琳. 橙汁可溶性成分对橙汁浑浊稳定态的影响[J]. 食品工业科技 2003,(2):29.

[5]韩桂茹. 食醋质量的稳定性[J]. 中国酿造, 1997,(2):40—44.

[6]胡友军. 一种实用的食醋过滤方法—硅藻土过滤法[J]. 中国调味品,2000,(4):224.

[7]郭娟. 食醋返混机理及处理方法探讨[J]. 中国调味品,1997,(2):23—24.

[8]邹锁柱. JA 澄清剂在酒类中的应用研究[J]. 酿酒科技,1994,(5):46.

[9]杨春哲. 果酒稳定性综述[J]. 中国酿造,2000,(3):9—13.

(上接第 41 页)

3 结论

香菇杀青水经酒精发酵后,再添加 10%香菇原汁,酿造食醋,使风味更加突出,具有多种保健功能,可成为一种理想的保健调味品。

利用香菇杀青水及原汁酿造食醋,工艺简

单,成本低廉,是食用菌综合利用再增值的一条新途径。

参考文献:

[1]陈泗传. 果蔬疗法大全[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,1991,761—762.

[2]上海酿造科学研究所. 发酵调味品生产技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999,376—392.

(上接第 52 页)

[2]邢新苗,刘自镭,任建平. 一种简单实用的谷氨酸浓度测定法. 微生物学杂志,2004,24(2):62—63.

[3]张振华. α -氨基酸与茚三酮显色反应影响因素的探讨[J]. 邵阳高等专科学校学报,2000, 13(1):42—44.

[4]张鉴棠,汤秀玉,韩红. 不同pH对氨基酸与茚

三酮呈色反应的影响[J]. 南京铁道医学院学报,1992,11(2):126—128.

[5]王兴红,江东福,马萍. 比色法测定酱油氨基氮含量方法的改进[J]. 中国调味品,1994,(8): 29—30.

[6]常秀莲. pH值对茚三酮与谷氨酸显色反应的影响[J]. 发酵科技通讯,1999,28(4):5—6.