

茚三酮比色法定量检测赖氨酸条件的研究

刘飞飞, 李群, 于岚

(青岛大学化学化工与环境学院, 青岛 266071)

摘要: 根据 α -氨基酸和茚三酮在一定条件下发生显色反应的原理, 研究了茚三酮比色法测定赖氨酸含量的方法, 探讨了溶液 pH、显色剂用量、加热时间和冷却时间对茚三酮比色法定量检测赖氨酸的影响, 并测定了赖氨酸标准曲线。结果表明: 溶液 pH 为 6.0, 显色剂用量为 1.0 mL, 加热 15 min, 冷却 10 min, 波长 570 nm 处测定吸光度为茚三酮比色法测定赖氨酸含量的最佳检测条件。

关键词: 赖氨酸; 茚三酮; 比色法; 含量测定

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-2513(2010)05-0223-03

Research of determination of lysine by ninhydrin colorimetry

LIU Fei-fei, LI Qun, YU Lan

(College of Chemistry Chemical and Environmental Engineer, Qingdao University, Qingdao 266071)

Abstract: According to the colorimetry principle of α -amino acid and ninhydrin, the method of quantitative determination of lysine by ninhydrin colorimetry was researched, and the pH value of the solution, dosage of the ninhydrin, heated time and cooled time were investigated in order to find the optimum conditions of determination of lysine by ninhydrin colorimetry. The optimum conditions were as follows: the pH value was 6.0, and the ninhydrin was added 1.0 mL, heated 15 min and cooled 10 min, finally determined at 570 nm.

Key words: lysine; ninhydrin; colorimetry; content determination

赖氨酸是人体必需而又无法自身合成的第一限制性氨基酸, 有“第一缺乏氨基酸”之称, 是海洋降压药“藻白金”的主要合成原料^[1~3]。赖氨酸在维持体内酸碱平衡, 合成核蛋白、血红蛋白、促进大脑神经细胞的再生、参与脂肪代谢、提高机体抵抗力、保持人体氮平衡等生理活动中发挥着重要作用^[4,5]。赖氨酸浓度多采用甲醛滴定法测定, 但此法是以酚酞为指示剂, 根据滴定终点时碱的消耗量来计算赖氨酸浓度^[6,7], 误差较大。

赖氨酸和茚三酮在弱酸性条件下共热可以生成紫红色物质, 且其颜色随赖氨酸浓度的变化而

改变^[8]。根据此显色反应, 本文研究了溶液 pH、显色剂用量、加热时间、冷却时间对茚三酮比色法定量检测赖氨酸的影响, 得到了最佳实验条件, 并测定了赖氨酸标准曲线, 为赖氨酸含量的测定提供了一种新的更为简单便捷且精密度较高的检测方法。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

赖氨酸, AR, 晋州冀荣氨基酸有限公司; 茚三酮, AR, 天津市光复精细化工研究所; 冰醋酸,

收稿日期: 2010-01-14

作者简介: 刘飞飞 (1985-), 女, 在读硕士研究生, 从事昆布氨酸螯合物研究。

AR, 上海埃彼化学试剂有限公司; 氢氧化钠, AR, 青岛合力兴化玻有限公司; 醋酸钠, AR, 上海埃彼化学试剂有限公司; 其他试剂均为分析纯。

DK-98-1 型恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司; AE-100 型电子分析天平, 天津市泰斯特仪器有限公司; UV-3010PC 紫外可见分光光度计, 日本日立有限公司; DZ-1A 型真空干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 试剂的制备

赖氨酸标准液的配制: 准确称取赖氨酸 100mg 溶于 100mL 蒸馏水作为母液, 准确量取 5mL 母液并定容至 50mL 作为工作液; 茚三酮试剂的配制: 称取水合茚三酮 1g, 加 50mL 蒸馏水和 80mg 氯化亚锡, 搅拌均匀置于暗处, 静置过夜, 过滤后加水定容至 100mL^[9]; 缓冲溶液的配制: 分别配制 pH 为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 的醋酸盐缓冲溶液。

1.3 实验方法

准确量取 2.0mL 赖氨酸溶液, 加入一定量的缓冲溶液和茚三酮试剂, 水浴加热, 冷却后定容至 25mL, 在 570nm 处测定其吸光度。研究不同 pH、显色剂用量、加热时间、冷却时间对赖氨酸溶液吸光度的影响。

2 结果与讨论

2.1 茚三酮显色反应的影响因素

2.1.1 溶液 pH 的影响

准确量取 2.0mL 赖氨酸溶液, 分别加入 1.0mL pH 为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 的醋酸盐缓冲溶液和 1.0mL 茚三酮试剂, 水浴加热冷却定容后, 在 570nm 处测定其吸光度, 结果见图 1。

从图 1 可知, 赖氨酸溶液在 pH 为 6.0 处有最大吸光度, 即赖氨酸与茚三酮的显色反应宜在弱酸性环境下进行, 这也与文献报道^[10,11]相吻合。

2.1.2 显色剂用量的影响

准确量取 2.0mL 赖氨酸溶液, 加入 1.0mL pH 为 6.0 的醋酸盐缓冲溶液, 分别加入 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4mL 茚三酮试剂, 水浴

加热冷却定容后, 在 570nm 处测定其吸光度, 结果见图 2。

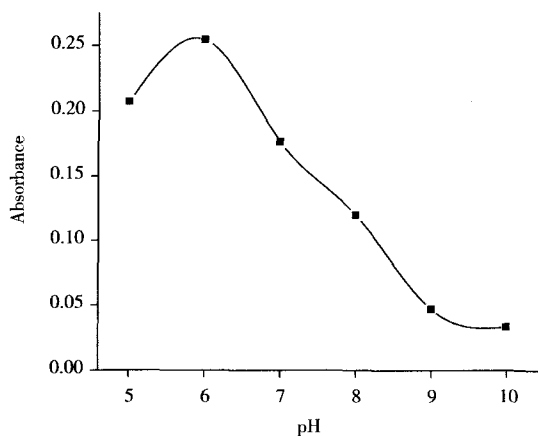


图 1 pH 对赖氨酸溶液吸光度的影响

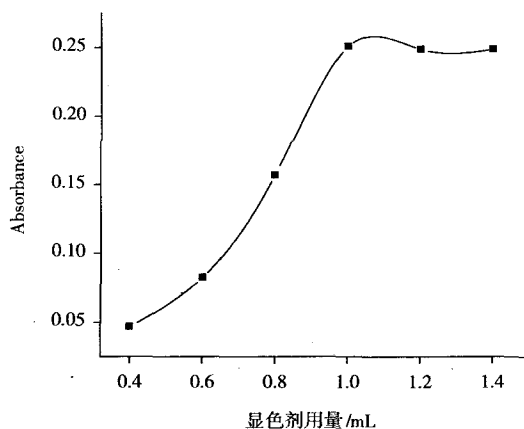


图 2 显色剂用量对赖氨酸溶液吸光度的影响

从图 2 可知, 随茚三酮显色剂用量的增加, 溶液的吸光度先是不断增大后趋于平衡, 在显色剂用量为 1.0mL 时溶液的吸光度已接近最大值, 继续增加显色剂用量, 赖氨酸溶液的吸光度不再发生明显变化, 故 1.0mL 为显色剂最佳用量。

2.1.3 加热时间的影响

准确量取 2.0mL 赖氨酸溶液, 加入 1.0mL pH 为 6.0 的醋酸盐缓冲溶液和 1.0mL 茚三酮试剂, 分别水浴加热不同时间, 冷却定容后在 570nm 处测定其吸光度, 结果见图 3。从图 3 可知, 加热 15min 时赖氨酸溶液达到最大吸光度。

表1 重复性实验结果

序号	1	2	3	4	5
吸光度	0.2547	0.2515	0.2514	0.2497	0.2493

根据公式及表1数据可得:

平均值 $\bar{x} = (0.2547 + 0.2515 + 0.2514 + 0.2497 + 0.2493) / 5 = 0.2513$

标准偏差 $S = \{[(0.2547 - 0.2513)^2 + (0.2515 - 0.2513)^2 + (0.2514 - 0.2513)^2 + (0.2497 - 0.2513)^2 + (0.2493 - 0.2513)^2] / 4\}^{1/2} = 0.213\%$

相对标准偏差 $RSD = \frac{S}{\bar{x}} = 0.847\%$

由此可以表明, 茚三酮比色法定量检测赖氨酸的方法精密度较高且具有良好的重现性。

2.3 赖氨酸标准曲线的绘制

配制不同浓度的赖氨酸溶液, 加入 1.0mL pH 为 6.0 的醋酸盐缓冲溶液和 1.0mL 茚三酮试剂, 水浴加热 15min, 冷却 10min 后定容, 在 570nm 处测定其吸光度, 浓度和吸光度关系曲线如图 5 所示。从图 5 可知, 赖氨酸溶液浓度和吸光度呈线性关系, 其回归方程为 $y = 1.5964x - 0.06013$, 相关系数 $R^2 = 0.9992$ 。

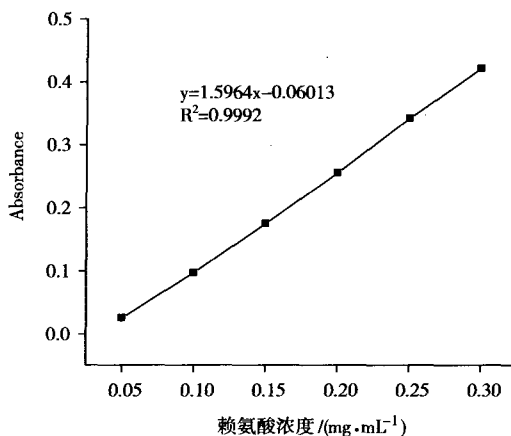


图5 赖氨酸标准曲线

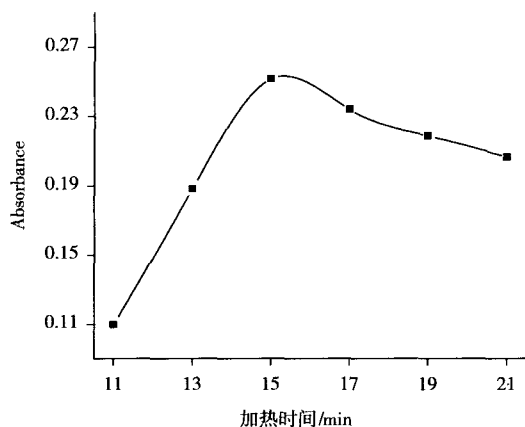


图3 加热时间对赖氨酸溶液吸光度的影响

2.1.4 冷却时间的影响

准确量取 2.0mL 赖氨酸溶液, 加入 1.0mL pH 为 6.0 的醋酸盐缓冲溶液和 1.0mL 茚三酮试剂, 水浴加热 15min, 冷却不同时间后定容, 在 570nm 处测定其吸光度, 结果见图 4。从图 4 可知, 冷却 10min 后赖氨酸溶液有最大吸光度。

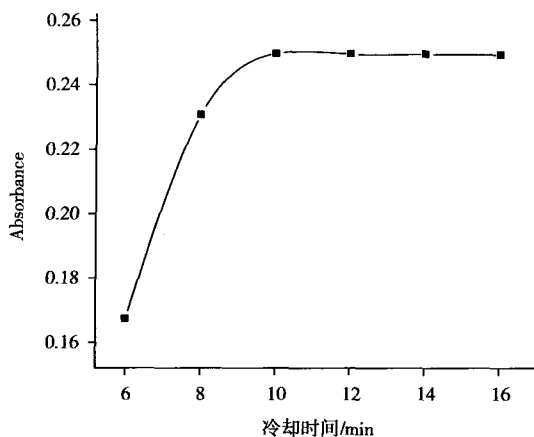


图4 冷却时间对赖氨酸溶液吸光度的影响

2.2 测定方法的精密度

精密度一般用相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 表示:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

取一定量的赖氨酸溶液, 参照 1.3 显色, 并进行 5 次比色测定, 结果见表 1。

3 结论

研究了茚三酮比色法定量检测赖氨酸含量的方法, 并探讨了溶液 pH、显色剂用量、加热时间和冷却时间对茚三酮比色法定量检测赖氨酸的影响。

(下转第 234 页)

参考文献:

- [1] 惠伯棣. 胡萝卜素化学及生物化学 [M]. 北京: 中国轻工出版社, 2005. 01.
- [2] Wolfgang Schalech. Bioavailability of Xanthophylls in Plasma and Retina and Evidence for Protection from Blue Light Damage and Glare [J]. Symposium of Workshop on Lutein and Eye Health, Beijing China, 2009. 03. 05.
- [3] Kirschfeld, K. Carotenoid pigments: their possible role in protecting against photo-oxidation in eyes and photoreceptor cells. Proc R Soc Lond B. 1982 (216): 71-85.
- [4] Markus Dchtler Tobias, Glaser, et al. Combined HPLC-MS and HPLV-NMR online coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereo isomers in spinach and in retina [J]. Anal Chem, 2001 (73): 667-674.
- [5] 向智男, 宁正祥. 功能性色素-玉米黄质的特性、提取及其

研究应用 [J]. 食品与科技, 2005 (1): 74-77.

- [6] Samuel F. Lock wood, et al. Methods for the synthesis of zeaxanthin. United States Patent, US2006/0088905A1.
- [7] David shepherd, morges, et al. Production of zeaxanthin. United States Patent, 3951743.
- [8] 宋秀琴, 马建峰, 等. 玉米黄色素稳定性研究 [J]. 化学世界, 1993 (1): 504-506.
- [9] 林高英, 等. 天然色素玉米黄的提取 [J]. 山东科学, 2000 (2): 20-22.
- [10] 张忠华, 等. 玉米蛋白粉黄色素提取工艺研究 [J]. 粮食与油脂, 2002 (11): 5-6.
- [11] 林红秀, 等. 超临界 CO₂ 萃取玉米黄色素的研究 [J]. 郑州粮食学院学报, 1999 (3): 57-60.
- [12] Lutein monographs [F]. Forum of FCC, 2009. 06.

(上接第 225 页)

响, 测定了赖氨酸标准曲线并得到了最佳实验条件: 溶液 pH 为 6.0, 显色剂用量为 1.0mL, 加热 15min, 冷却 10min 后定容, 在波长 570nm 处测定吸光度。与传统的测定方法相比, 该方法具有操作简单, 准确度高, 稳定性和重现性均较好等优点。

参考文献:

- [1] 李顺心, 李群. L-赖氨酸锌螯合物的合成表征 [J]. 应用化工, 2007, 36 (12): 1218-1220.
- [2] 周俊, 宋代军. 赖氨酸营养研究进展 [J]. 饲料工业, 2006, 27 (8): 48-50.
- [3] 彭衍磊, 李群. 海洋降压药-藻白金的清洁化合成研究 [J]. 西安工程科技学院学报, 2006, 20 (6): 727-730.
- [4] 胡立新, 占稳, 张婷. 微波固相合成赖氨酸锌配合物 [J]. 化学与生物工程, 2007, 24 (10): 25-27.

[5] Debatosh D, Akshay B, Vidya C. Lysine: Is it worth more [J]. Cytotechnology. 2001, 36, 3-32.

- [6] 翁连进, 甘林火, 王士斌, 等. 717 型阴离子交换树脂吸附 L-赖氨酸的特性 [J]. 离子交换与吸附, 2004, 20 (2): 119-124.
- [7] 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学分析方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1982, 59-61.
- [8] 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.
- [9] 周国兰, 何萍, 郑文莉, 等. 茚三酮比色法测定茶叶中游离氨基酸总量方法存在问题的探讨 [J]. 化学分析计量, 2009, 18 (5): 79-81.
- [10] 陈忠云. α -氨基酸和茚三酮反应的颜色与条件 [J]. 邵阳师专学报, 1995, 10 (5): 56-59.
- [11] 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.

FIC2011 第十五届中国国际食品添加剂和配料展览会
暨第二十一届全国食品添加剂生产应用技术展示会

时间: 2011 年 3 月 23 ~ 25 日

地点: 上海光大会展中心 上海国际展览中心 上海世贸商城

一个展会, 三个展馆, 规模更大, 内容更精彩!

主办: 中国食品添加剂和配料协会, 中国贸促会轻工行业分会, 《中国食品添加剂》杂志社

电话: 010-59795833

传真: 010-59071335, 59071336

网址: www.fi-c.com

联系人: 张越宸 张昕