

用茚三酮显色反应测定烟草中氨基酸含量

李红武¹, 王璐¹, 周桂园², 董高峰¹, 张强^{1*}

(1. 云南烟草科学研究所, 云南昆明 650106; 2. 红云红河烟草(集团)责任有限公司, 云南昆明 650202)

摘要 应用茚三酮与氨基酸的显色反应, 采用分光光度法测定烟草中氨基酸的含量。分析并确定了试验条件: 磷酸盐缓冲溶液的 pH 值 6.70, 用量为 1.0 ml; 最大吸收波长为 570 nm; 2% 茚三酮溶液的用量为 1.5 ml。试验考察了显色反应时间及稳定性。用未显色的样液作参比, 消除了样液基体中的色素和杂质对检测结果的影响, 提高了测定结果的准确度。此方法操作简便、快捷, 灵敏度高, 检测成本低, 特别适用于烟草研究中数量少、批次多的检测。

关键词 烟草; 氨基酸; 茚三酮; 分光光度法

中图分类号 S572 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2010)27-14926-03

Determination on Amino Acids Contents in Tobacco by Ninhydrin Color Reaction

LI Hong-wu et al (Yunnan Academy of Tobacco Science, Kunming, Yunnan 650106)

Abstract Amino acids content in tobacco was determined by spectrophotometric method using ninhydrin color reaction. The experimental conditions was analyzed and determined as follows: 1.0 ml of phosphate buffer (pH 6.70); maximum absorption wavelength, 570 nm; and 1.5 ml of 2% ninhydrin solution. The coloring time and stability were also studied. The sample solution having no color reaction was used as reference, which eliminated the effects of pigments and impurities in the liquid on detection and improved accuracy. This method is simple, fast, highly sensitive, low-cost, and especially suitable for detection of small quantity and multiple batches in tobacco research.

Key words Tobacco; Amino acids; Ninhydrin; Spectrophotometric method

氨基酸是烟草中的一类重要化合物, 在烟草的生长、调制、醇化或发酵、加工直至成品卷烟抽吸的各个过程中, 都能与还原糖类物质之间发生酶催化和非酶催化的棕色化反应(美拉德反应), 生成多种具有蒸煮、烤香、爆米花香味特征的吡喃、吡嗪、吡咯、吡啶类等杂环化合物, 某些氨基酸如苯丙氨酸还可以自身分解成香味化合物, 如苯甲醇、苯乙醇等。这些物质具有协调香味, 增加烟气丰满度的作用, 对形成优质的烟草和烟气香味有重要贡献^[1]。氨基酸在烟叶燃烧过程中, 会分解成氨, 氨的挥发是烟气刺激性的来源之一。氨基酸的含量与烟草的品质有着密切的关系, 其含量的高低直接影响到烟的味道和烟气的丰满度。一般来说, 氨基酸含量太高, 烟气辛辣、味苦、刺激性强烈; 含量太低, 烟气则平淡无味, 缺少丰满度。因此, 准确测定烟草中氨基酸的含量对优化卷烟配方设计、烟叶加料、调制、醇化或发酵、加工等的研究都具有重要的意义。

在烟草研究中, 测定氨基酸含量的烟样, 批次多, 数量少, 若采用氨基酸自动分析仪测定, 所需仪器较昂贵且专一性强, 检测成本较高; 若采用甲醛电位滴定法(国家推荐的标准检测方法), 虽有较高的准确度, 但方法的灵敏度低, 滴定终点不易掌握, 对甲醛浓度、滴定速度等要求苛刻, 且取样量大、分析速度慢、消耗溶剂多^[2]。若采用高压液相色谱(HPLC)法, 其测定氨基酸的基本原理是利用预柱衍生试剂将氨基酸衍生物为具有荧光性的衍生物, 此技术的关键是有效选择衍生试剂。由于不同氨基酸的结构和化学性质有较大的差异, 因此要定量制备适于荧光分析的所有氨基酸衍生物比较困难^[1]。若采用气相色谱(GC)法, 虽有价格低廉、进样量少、分析速度快等优点, 但其技术关键与 HPLC 一样, 在分析之前首先要对被分离的氨基酸进行衍生化, 由于 GC

分析样品时柱温较高, 因而要定量制备出适于 GC 分析的所有氨基酸衍生物也比较困难^[1]。为了解决此问题, 更加方便、快捷、准确地测定烟草中氨基酸的含量而又不失经济性, 笔者采用茚三酮显色反应和分光光度法对烟草样品进行测定。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂 UV-2401PC 分光光度计(SHIMADZU CORPORATION 日本); HY-5 回旋振荡器(常州国华电器股份有限公司)。2% 茚三酮溶液: 准确称取茚三酮 2.000 0 g, 氯化亚锡($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 作防腐剂) 80 mg, 溶解于热水中, 过滤于 100 ml 的棕色容量瓶中, 冷却至室温, 定容, 低温避光保存。磷酸盐缓冲溶液(pH 值 6.70): 分别准确称取磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 4.535 0 g 和磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 11.938 0 g 于烧杯中, 用少量蒸馏水溶解后, 转移到 500 ml 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。取上述配好的磷酸二氢钾溶液 55.0 ml 与磷酸氢二钠溶液 45.0 ml 混合配制。谷氨酸溶液(0.2 mg/ml): 准确称取干燥的谷氨酸 0.200 0 g 于烧杯中, 用少量的水溶解后, 转移至 100 ml 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。准确吸取此液 10.0 ml 于 100 ml 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。缬氨酸溶液(0.2 mg/ml): 按谷氨酸溶液(0.2 mg/ml)的操作配制。组氨酸溶液(0.2 mg/ml): 按谷氨酸溶液(0.2 mg/ml)的操作配制。氨基酸混合标准溶液(0.2 mg/ml): 分别准确吸取谷氨酸、缬氨酸、组氨酸溶液 25.0 ml 于 100 ml 容量瓶中, 摇匀。所用试剂均为分析纯, 试验用水为二次蒸馏水。

1.2 试验方法 取 2.0 ml 氨基酸混合标准溶液于 50 ml 比色管中, 依次加入 2% 的茚三酮溶液 1.5 ml、磷酸盐缓冲溶液(pH 值 6.70) 1.0 ml, 混合均匀, 于沸水浴锅中加热 18 min, 取出, 迅速用冷水冷却至室温, 定容, 摇匀。稳定 15 min, 以试剂空白作参比, 于 570 nm 波长处用 1 cm 比色皿测定吸光度。

1.3 样品处理 准确称取烟样(干燥、磨细、过 40 目筛)

基金项目 云南中烟工业公司项目(2007YL02)。

作者简介 李红武(1966-), 男, 云南建水人, 硕士, 工程师, 从事卷烟原料研究。* 通讯作者, 工程师, 从事卷烟原料研究。

收稿日期 2010-07-02

0.500 0 g 于 200 ml 的三角瓶中,加入 50.0 ml 蒸馏水,封口,在 HY-5 回旋振荡器上振荡 1 h,过滤出样液备用。空白液:取 2.0 ml 样液于 50 ml 的比色管中,分别加入 2% 茚三酮溶液 1.5 ml 和磷酸盐缓冲溶液(pH 值 6.70) 1.0 ml,定容,摇匀,不加热且现配现用。将比色管放入沸水浴锅中加热 18 min,取出用冷水迅速冷却至室温,定容,摇匀。稳定 15 min,以空白液作参比(调零),用 UV-2401PC 分光光度仪在 570 nm 波长处用 1 cm 比色皿测其吸光度。

1.4 空白液选择 在样品处理过程中,由于烟叶本身的色素、糖等物质溶于水,而卷烟中添加的香精香料等物质也溶于水,这些溶于水的物质(杂质)导致了样液的吸光度偏高,从而使检测的结果比实际值偏高。因此,该试验中的空白液不是简单的试剂空白液,还要加入 2.0 ml 样液,以消除样液基体中杂质对吸光度的影响,使检测结果更加准确。

1.5 氨基酸含量计算 测出样液的吸光度,在 UV-2401PC 分光光度计的标准曲线处即可得到样液的氨基酸浓度,根据样液的氨基酸浓度即可计算出样品的氨基酸含量。

2 结果与分析

2.1 磷酸盐缓冲溶液 pH 值的确定 据报道,氨基酸与茚三酮的显色反应宜在弱酸条件下进行^[3]。因此,该试验中将磷酸盐缓冲溶液的 pH 值分别调为 4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.04,分别取谷氨酸(酸性)、缬氨酸(中性)、组氨酸(碱性)溶液 2.0 ml 于 3 组 50 ml 的比色管中(每组 8 个),各加入 2% 茚三酮溶液 1.0 ml,按顺序分别加入不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液 2.0 ml,以 2% 茚三酮溶液 1.0 ml 作空白液,将比色管放入沸水浴锅中加热 18 min,取出用冷水迅速冷却至室温,定容,摇匀。稳定 15 min,以空白液作参比(调零),在 UV-2401PC 分光光度仪上于 500~650 nm 波长处扫描,得出 3 组吸光度的曲线图(图 1、2、3)。

从图 1、2、3 中可以看出,氨基酸与茚三酮的显色反应物在磷酸盐缓冲溶液的 pH 值为 6.5~7.0 时,吸光度最大。磷酸盐缓冲溶液的 pH 值增大或减小,显色反应物的吸光度均减小,甚至不显色(如磷酸盐缓冲溶液的 pH 值 <5)。综合考虑,该试验中选择磷酸盐缓冲溶液的 pH 值为 6.70。

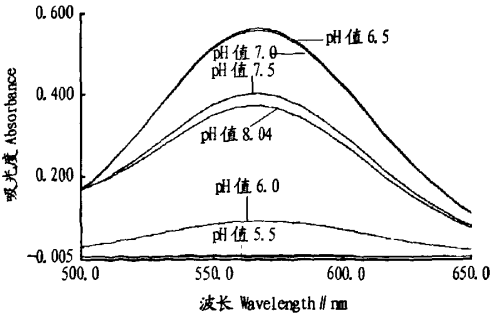


图 1 谷氨酸与茚三酮在不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中显色反应物的吸光度曲线

Fig. 1 Absorbance curves of color reaction productions from glutamate and ninhydrin in phosphate buffer solution at different pH values

2.2 最大吸收波长的确定 从图 1、2、3 中吸光度最大的曲线上可以得出: $\lambda = 570$ nm 时,吸光度最大,即最大吸收波长

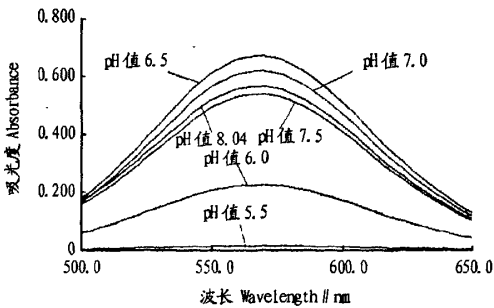


图 2 缬氨酸与茚三酮在不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中显色反应物的吸光度曲线

Fig. 2 Absorbance curves of color reaction productions from valine and ninhydrin in phosphate buffer solution at different pH values

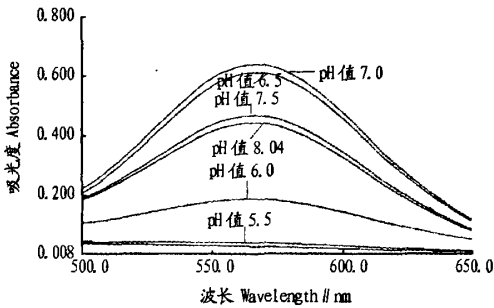


图 3 组氨酸与茚三酮在不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中显色反应物的吸光度曲线

Fig. 3 Absorbance curves of color reaction productions from histidine and ninhydrin in phosphate buffer solution at different pH values

$\lambda_{max} = 570$ nm。

2.3 磷酸盐缓冲溶液(pH 值 6.70)的用量 按照试验方法,在其他条件不变的情况下,以 0.5 ml 为梯度,改变磷酸盐缓冲溶液(pH 值 6.70)的用量,测定其吸光度,得缓冲液用量为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml 时,吸光度依次为 0.588、0.678、0.598、0.555、0.502、0.501。由此可以得出,当磷酸盐缓冲溶液(pH 值 6.70)的用量为 1.0 ml 时,吸光度最大,该试验用 1.0 ml。

2.4 2% 茚三酮溶液的用量 按照试验方法,在其他条件不变的情况下,以 0.5 ml 为梯度,改变 2% 茚三酮溶液的用量,测定其吸光度,得茚三酮用量为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml 时,吸光度依次为 0.532、0.665、0.718、0.668、0.611、0.519。由此可以得出,当 2% 茚三酮溶液的用量在 1.5 ml 时,吸光度最大,该试验用 1.5 ml。

2.5 显色反应时间及稳定性 在常温下,氨基酸与茚三酮显色反应相当缓慢,加热能加快其反应速度。按照试验方法,在其他条件不变的情况下,以 6 min 为起点,以 2 min 为梯度,改变在沸水浴锅中的加热时间,测定其吸光度,得时间为 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 min 时,吸光度依次为 0.432、0.498、0.573、0.680、0.696、0.708、0.747、0.737、0.734、0.732。由此可以得出,当加热时间在 18 min 时,吸光度最

大,该试验用 18 min。低温、避光保存,吸光度在 20 h 内基本不变。原吸光度为 0.111、0.309、0.529、0.680、0.889、1.079 时,20 h 后吸光度依次为 0.109、0.308、0.526、0.675、0.886、1.078。

2.6 标准曲线 分别取氨基酸混合标准溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml 于 50 ml 比色管中,按试验方法进行试验,将测得的吸光度值 0.000、0.111、0.309、0.529、0.680、0.889、1.079,与对应的浓度 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/50 ml 在 UV-2401PC 分光光度计上进行线性回归,即得标准曲线(图 4),回归方程为: $C=0.542\ 0A+0.021\ 3$,相关系数 $r=0.999\ 3$ 。

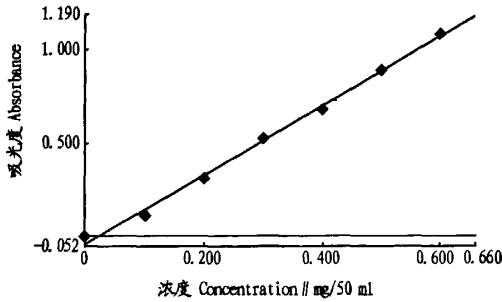


图 4 标准曲线
Fig.4 Standard curve

2.7 选择不同空白液对测定烟样中氨基酸含量的影响 取 5 个不同烟样,分别选择不同空白液测定烟样中的氨基酸含量,得表 1。从表 1 可以看出,选用试剂+样液空白比只用试剂空白测得的吸光度值低,对应烟样中的氨基酸含量也降低,这是由于加样液的空白可以消除样液基体中的杂质对吸光度的影响,使检测结果更加接近实际值。

表 1 不同处理烟样中的氨基酸含量

Table 1 Amino acids contents in tobacco samples of different treatments

样品编号 Sample no.	试剂空白 Reagent blank		试剂+样液空白 sample solution blank		结果偏差//% Deviation
	吸光度 Absorbance	含量//% Content	吸光度 Absorbance	含量//% Content	
1	0.439	1.576	0.433	1.555	0.021
2	0.598	2.147	0.586	2.103	0.044
3	0.667	2.394	0.650	2.333	0.061
4	0.385	1.382	0.382	1.372	0.010
5	0.453	1.626	0.450	1.616	0.010

2.8 加样回收率试验 取 5 个不同烟样,各加入氨基酸标准溶液 5.0 ml,按照试验方法,测定烟样中的氨基酸含量,得表 2。从表 2 可以看出,加样回收率不低于 95.8%,平均回收率为 97.78%,RSD 为 2.19%,回收率较高。

2.9 重现性试验 取 5 个不同烟样,每个样均做 3 次平行试验,按照试验方法,测定烟样中的氨基酸含量,得表 3。从

表 2 加样回收率试验结果

Table 2 Average recovery rates of samples

样品编号 Sample no.	原始量//mg Original quantity	加入量//mg Adding quantity	测得量//mg Detection quantity	回收率//% Recovery rates
1	7.775	10.0	17.425	96.5
2	10.515	10.0	20.235	97.2
3	11.665	10.0	21.795	101.3
4	6.860	10.0	16.670	98.1
5	8.080	10.0	17.660	95.8

表 3 可以看出,测定烟样中氨基酸含量的相对标准偏差最大仅有 0.85%,重现性较好。

表 3 重现性试验结果

Table 3 Results of reproducibility tests

样品编号 Sample no.	氨基酸含量//% Amino acids content			平均含量//% Average content	RSD//%
	I	II	III		
1	1.555	1.568	1.547	1.557	0.68
2	2.103	2.119	2.098	2.107	0.52
3	2.333	2.308	2.347	2.329	0.85
4	1.372	1.366	1.380	1.373	0.51
5	1.616	1.624	1.606	1.615	0.56

3 结论与讨论

(1)烟草中有 20 余种氨基酸,根据分子中氨基与羧基的数目分为酸性、中性和碱性。从图 1、2、3 中可以看出,酸性、中性和碱性的氨基酸在相同 pH 值和用量的磷酸盐缓冲溶液中显色反应物的最大吸光度并不一致,如果只用 1 种氨基酸来作标准曲线,显然偏。因此该研究中采用酸性、中性和碱性的 3 种氨基酸混合标准液来作标准曲线,更具代表性和科学性。

(2)从表 1 中可以看出,样液基体中的色素和杂质导致了样液的吸光度偏高,从而使检测的结果比实际值偏高。通过改进空白液的使用,消除了样液中的色素和杂质的影响,使检测结果更接近烟草中氨基酸的实际含量。

(3)对于样液基体中的色素和杂质的去除,也有文献报道^[4],先用 Ba(OH)₂ 沉淀,再用 ZnSO₄ 中和。但操作复杂,耗时较长,而且容易产生新的杂质,效果不太理想。

(4)用该研究中的方法检测烟草中的氨基酸含量,操作简便、快捷,灵敏度高,显色液稳定,检测成本低,回收率高,重现性好,特别适用于烟草研究中数量少、批次多的检测。

参考文献

- [1] 王玉林,张峻松,毛多斌,等.烟草中游离氨基酸的分析方法及研究方向[J].郑州轻工业学院学报,2001,16(2):11-14.
- [2] 彭爱红,高军.分光光度法测定石决明口服液中的游离氨基酸氮[J].食品研究与开发,2002,23(1):57-58.
- [3] 张振华.α-氨基酸与氨基酸显色反应影响因素的探讨[J].邵阳高等专科学校学报,2000(1):42-44.
- [4] 梁惠花,刘晓河,王志宝.坝上油菜蜂花粉中游离氨基酸的含量测定[J].张家口医学院学报,2004,21(2):19-20.