

茚三酮法定性定量检测丝氨酸

关洪亮,熊倩,余训民,李庆新

(武汉工程大学环境与城市建设学院,湖北 武汉 430074)

摘要:为了快速简便地检测氨基酸水解液中丝氨酸的含量,提出了一种基于氨基酸纸上层析的改进茚三酮显色法,并将其应用于难以分离的氨基酸的检测。首先,将茚三酮加入到展层剂中,再对氨基酸混合液进行层析。在一定条件下将层析后的茚三酮与氨基酸进行显色反应,根据不同颜色即可鉴别丝氨酸。然后,对不同剂量的丝氨酸标准液使用上述方法绘制丝氨酸标准液的吸光度—含量的标准曲线,用以计算氨基酸水解液丝氨酸的含量。结果表明:茚三酮法定性定量检测丝氨酸的最佳实验条件为溶液 pH 在 4.5 左右,显色剂用量为每 10 mL 展层剂中加入 2.5 mL 0.1% 茚三酮,并在 105 °C 下加热 5 min。

关键词:丝氨酸;茚三酮;显色法;含量测定

中图分类号:TQ028.5

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2012.11.009

0 引言

随着人们对丝氨酸生理作用的深入认识和医药保健事业的不断发展,医药、食品、饲料等行业对丝氨酸的需求量正迅速扩大。虽然 L-丝氨酸属于非必需氨基酸,但它却具有许多重要的生理功能及用途,在医药、食品、化妆品中均有较为广泛的应用。因此,测定混合氨基酸中丝氨酸的含量对丝氨酸的开发利用具有重要意义。

α -氨基酸与茚三酮在弱酸性溶液中共热,反应后经失水脱羧生成氨基茚三酮,再与水合茚三酮反应生成紫红色或蓝色物质,如图 1。脯氨酸等仲胺氨基酸与茚三酮反应生成黄色物质。丝氨酸和茚三酮在弱酸性条件下共热可以生成紫红色的缩合物^[1-3],且其颜色随着丝氨酸的含量变化而有所不同。

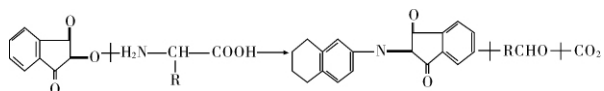


图1 α -氨基酸与茚三酮的显色反应

Fig.1 Colour reaction of α -amino acid and ninhydrin

上述反应生成的紫红色缩合物颜色的深浅还与反应的 pH、显色剂的用量、反应的温度及时间有关。本文利用显色反应,采用比色法定量检测丝氨酸并探讨了最佳的反应条件。

1 实验材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

722E 可见光分光光度计;层析滤纸;毛细管;25 μ L 微量进样器;薄层色谱展开缸(规格 100 \times 100);干燥箱;带塞玻璃试管(比色管)。

1g/L 的 L-丝氨酸标准溶液:称取 0.1 g 丝氨酸溶于 100 mL 去离子水中。

展层剂:按照“正丁醇:95%乙醇:冰醋酸:水=4:1:1:2”比例配制,均为 AR。

0.1%茚三酮溶液:称取 0.1 g 茚三酮溶于 95%乙醇中,定容至 100 mL,均为 AR。

层析液(0.1%茚三酮—展层剂):每 10 mL 展层剂中加入 2.5 mL 0.1%茚三酮溶液。

洗脱液:按照“V(0.1%CuSO₄):V(75%乙醇)=2:38”比例配制。称取 0.1565 g CuSO₄·5H₂O 溶于去离子水中,定容至 100 mL,配制成 0.1%CuSO₄ 溶液。

待测样品:氨基酸混合液,含有丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸等。

1.2 实验方法

1.2.1 茚三酮法定性检测丝氨酸 将预先配制的层析液倒入展开缸中静置 20 min,使缸内环境达到平衡,在距滤纸下端 2 cm 处划一横线,将待测样品用毛细管点样于横线上,点样半径不要

收稿日期:2012-07-05

基金项目:武汉工程大学科学研究基金项目(13102051)

作者简介:关洪亮(1974-),男,湖北武汉人,讲师,博士。研究方向:水污染控制。

超过 2 mm,将 L-丝氨酸标准溶液用毛细管点样于距待测样品点 1.5 cm 处的横线上,点样半径不要超过 2 mm.待样液自然挥发干后倾斜放入展开缸中,下端 1 cm 左右浸入层析液中,上端高出展开缸的部分延展开缸边缘折叠挂于展开缸上,确保滤纸不与展开缸内壁接触,如图 2.待层析液上行至距折线 1 cm 左右时取出滤纸,放入 105 °C 的干燥箱中干燥 5 min^[4].

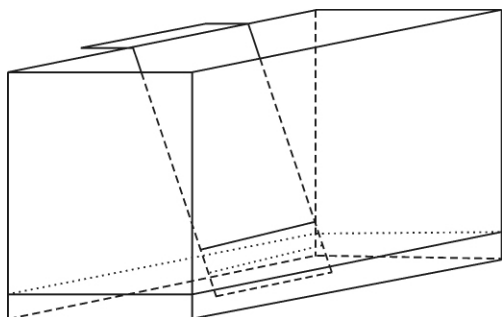


图 2 层析示意图

Fig. 2 Diagrammatic sketch of chromatography

1.2.2 茚三酮法定量检测丝氨酸 将预先配制的层析液倒入展开缸中静置 20 min,使缸内环境达到平衡,在距滤纸下端 2 cm 处划一横线,用微量进样器取 1 g/L 丝氨酸标准溶液点样于横线

上,待样液自然挥发干后倾斜放入展开缸中,如图 2.待层析液上行至距折线 1 cm 左右时取出滤纸,放入干燥箱中,在 105 °C 条件下干燥 5 min.干燥后的滤纸上会呈现明显的氨基酸显色斑点,剪下氨基酸显色斑点,将其放置于带塞玻璃试管中(比色管),用 4 mL 洗脱液洗脱 35 min,再倒入比色皿中静置 24 h(确保液体中的纸末全部沉淀),以洗脱液为对照液,在 722E 分光光度计上(波长 570 nm 处)测定吸光度^[5-6].

2 检测结果与讨论

2.1 茚三酮显色反应的影响因素

2.1.1 溶液 pH 的影响 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液和 1+1 的硫酸溶液将层析液分别配制成 pH 为 1.03、2.02、2.50、3.05、4.50 的溶液,用微量进样器取 5 μ L 丝氨酸标准溶液点样,进行层析显色.

由于层析液在碱性条件下分层,所以用 1 mol/L 的 NaOH 溶液和 1+1 的硫酸溶液将 1 g/L 丝氨酸标准溶液分别配制成 pH 为 6.56、8.77、9.50、11.05、12.05,取 5 μ L 点样,将层析液配制成弱碱性溶液,进行层析显色^[7].

实验结果归纳于表 1.

表 1 pH 对显色反应的影响
Table 1 pH on the colour reaction

pH 值	1.03	2.02	2.50	3.05	4.50	6.56	8.77	9.50	11.05	12.05
颜色	不显色	不显色	淡紫色	紫色	紫色	红色	红色	淡红色	不显色	不显色

注: 1 g/L 丝氨酸标准溶液 5 μ L; 105 °C 下烘干 5 min; 每 10 mL 展层剂加入 2.5 mL 0.1% 茚三酮溶液

由表 1 可知,当溶液 pH 低至 2.0 时不显色,从 pH 为 2.5 开始有淡紫色出现,但 pH 超过 9.5 时淡红色不是很明显,之后不再显色,可知显色范围在 2.50~9.50 之间, α -氨基酸^[1]和茚三酮的显色反应对介质的 pH 值非常敏感.

学者研究表明: α -氨基酸和茚三酮显色反应中,主要的颜色产物均通过缩合形成.与羰基化合物和氨的衍生物之间的反应类似,在弱酸性条件下,这种缩合反应更容易发生^[5,8],酸性条件还能减少氨基以外的其它基团对显色反应的干扰,使显色反应生成的颜色产物更稳定.强酸性介质中虽然能增强茚三酮或 1,3-茚三酮羟基的反应能力,但在强酸性条件下却降低了参与缩合反应的氨基、羟基等新核基团的活性,使有色的缩合产物形成困难而且缩合生成的颜色产物在强酸性介质中也不稳定.在碱性条件下,显色反应需加热才能完成,而且在离热后,空气中的氧分子或其他氧化物容易与还原型的有色缩合产物发生氧化还原反

应,引起颜色变化甚至褪色.又因在碱性介质中,很多基团或化合物的还原能力得到加强,扩大了茚三酮的显色反应范围,使得副反应增多,从而使反应、反应产物及产物颜色变得复杂化,在分子内部因素和外来因素的双重影响和干扰下,不利于茚三酮对 α -氨基酸的检验和测定,并且碱性介质中颜色的不稳定也妨碍了对 α -氨基酸的准确分析^[5].

综上所述, α -氨基酸和茚三酮的显色反应宜在弱酸性下进行.因此,本实验中选定层析液的 pH 为 4.50 左右.

2.1.2 显色剂用量的影响 取 8 组 20 mL 配制好的展层剂,分别加入 0.4、1.2、2.0、2.8、3.6、4.4、5.2、6.0 mL 0.1% 茚三酮溶液,作为层析液,调节层析液 pH 至 4.50 左右.用微量进样器取 1 g/L 丝氨酸标准溶液 15 μ L 点样于滤纸上,进行层析^[9-10].按照实验方法测定每个显色体系的吸光度并绘制成图,结果见图 3.

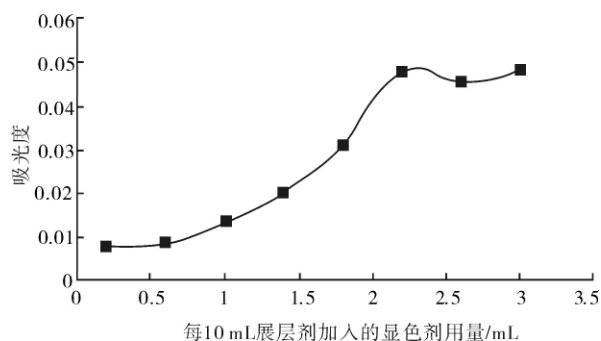


图 3 显色剂用量对吸光度的影响

Fig. 3 Dosage of chromogenic agent on absorbance

由图 3 可看出,吸光度开始时随着显色剂用

量的增加而增大,然后趋于平衡.当显色剂用量为 2.2 mL 时,吸光度上升到最大,之后再增加显色剂用量,吸光度基本无明显变化,因此显色剂用量为 2.2 mL 时最佳.因此,本实验中选择每 10 mL 展层剂中加入 2.5 mL 显色剂.

2.1.3 反应温度及时间的影响 反应需在加热状态下进行,因此反应温度及时间对显色效果也存在较大影响.取 4 组 20 mL 展层剂,分别加入 5 mL 显色剂并调节 pH 至 4.50 左右.用微量进样器取 1 g/L 丝氨酸标准溶液 15 μ L 点样于滤纸上,进行层析^[7].分别放入 105、90、75、60 $^{\circ}$ C 的温度下显色,结果见表 2.

表 2 反应温度及时间对显色效果的影响

Table 2 Reaction temperature and time on colour effects

丝氨酸标准液用量/ μ L	pH	反应时间/min	反应温度/ $^{\circ}$ C			
			60	75	90	105
15	4.87	3.7	无色	无色	无色	紫色
15	4.87	6.5	无色	无色	淡紫色	紫色
15	4.87	8.0	无色	淡紫色	紫色	紫色
15	4.87	13.0	淡紫色	紫色	紫色	紫色

注:丝氨酸标准溶液为 1 g/L;每 10 mL 展层剂中有 2.5 mL 显色剂.

由表 2 可知,当温度为 60 $^{\circ}$ C 时,即使加热 13 min 以上也只显出淡紫色;温度为 75 $^{\circ}$ C 时,加热 7.5 min 才出现颜色变化;温度为 90 $^{\circ}$ C 时,加热 6.5 min 就有颜色变化;当温度上升到 105 $^{\circ}$ C 时,加热 3.7 min 即出现明显的颜色变化.综合各方面的考虑,反应的最佳条件应选在 105 $^{\circ}$ C 下加热 4~5 min.若加热时间过长会导致显色斑点颜色扩散,影响吸光度的测定.

2.2 实验结果分析

2.2.1 标准曲线的绘制 取 5 组 20 mL 层析液,pH 调至 4.55,用微量进样器分别取 1 g/L 丝氨酸标准溶液 5、10、15、20、25 μ L 点样于层析滤纸上,按实验方法进行实验,测定吸光度,以标准溶液的用量与吸光度做丝氨酸标准曲线^[10],见图 4.

从图 4 可知,丝氨酸用量与吸光度呈线性关系,其回归线方程为 $y=0.0017x-0.0002$,相关系数 $R^2=0.9938$.

2.2.2 测定方法的精密度 精密度^[11]一般用相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示.

取一定量的丝氨酸溶液,按照实验方法,进行多次比色测定($n=5$),计算丝氨酸含量,结果见表 3.

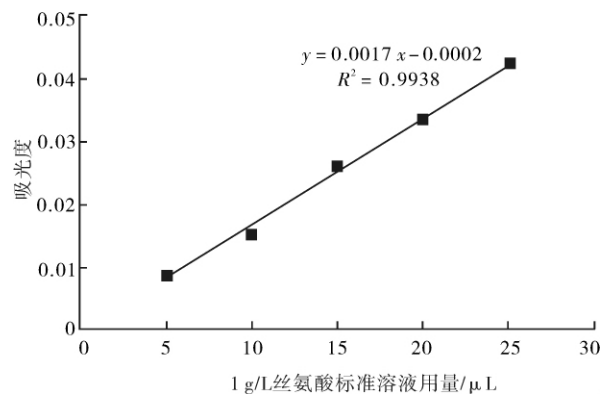


图 4 丝氨酸标准曲线

Fig. 4 Standard curve of serine

表 3 重复性实验结果

Table 3 Repetitive experimental results

序号	丝氨酸含量/ μ g	\bar{x}/μ g	S	RSD/%
1	12.941			
2	13.235			
3	13.059	13.047	0.140	1.076
4	12.882			
5	13.118			

注:pH 为 4.55;105 $^{\circ}$ C 下烘干 5 min;每 10 mL 展层剂加入 2.5 mL 0.1%茚三酮溶液.

由此可见,此测定方法的重复性较好,精密度较高,比较可靠.

3 结 语

茚三酮比色法定量检测丝氨酸操作简单、成本低.只要控制好实验条件,就能取得较好的测量结果.本文探讨了溶液 pH、显色剂用量、反应温度及时间对茚三酮比色法定量检测丝氨酸的影响,测定了丝氨酸标准曲线并得到了最佳实验条件:溶液 pH 为 4.50,显色剂用量为每 10 mL 展层剂中加入 2.5 mL 0.1% 茚三酮显色剂,在 105 °C 下加热 5 min.

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 费格尔 F. 有机分析点滴试验[M]. 北京: 燃料化学工业出版社, 1972: 197-198.
- [3] Ternay A L Jr. Contemporary Organic Chemistry[M].

London: W. B. Saunders co., 1979: 1068.

- [4] 周俊英, 金谷, 张贤萱, 等. 定量化学分析实验[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1995.
- [5] 周圆圆. 毛发水解液中 L-丝氨酸的分离及相关分析检测方法的建立[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [6] 杨晓玲, 赵宗云, 刘永军, 等. 应用纸层析分离鉴定氨基酸方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 368.
- [7] 王昂, 王丽丽, 仪宏, 等. 茚三酮比色法测定谷氨酸含量的研究[J]. 中国调味品, 2005, 8(8): 50-52.
- [8] 普户默 DT. 实用生物化学导论[M]. 吴军, 译. 北京: 科学出版社, 1985: 137.
- [9] 刘飞飞, 李群, 于岚. 茚三酮比色法定量检测赖氨酸条件的研究[J]. 中国食品添加剂, 2010(5): 223-225.
- [10] 彭继明, 张佑红, 徐鹏, 等. 不同 pH 值条件下的丝氨酸标准曲线[J]. 武汉工程大学学报, 2010, 32(3): 20-24.
- [11] 邵金良, 黎其万, 董宝生, 等. 茚三酮比色法测定茶叶中游离氨基酸总量[J]. 中国食品添加剂, 2008(2): 162-165.

Qualitative and quantitative determination of serine by ninhydrine

GUAN Hong-liang, XIONG Qian, YU Xun-min, LI Qing-xin

(College of Environment and Civil Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: An improved ninhydrine colorimetric method was established based on amino acid paper chromatography to detect serine in amino acid hydrolysate rapidly and simply. The method was applied to detect amino acids which were hard to separate. Firstly, ninhydrine was added to the developing agents, and the mixture of amino acids was undertaken chromatography on the filter paper. Chromatography ninhydrine and amino acid produced chromogenic reaction through which serine could be identified. Then, the different doses of serine standard solution were handled in the same way, a absorption-serine concentration standard curve was plotted by using serine standard solution to calculate the content of serine in the hydrolysate. The results show that the method possesses good repeatability, high precision and convenient operation under the best condition that pH of the solution is 5, the chromogenic agent is each 10 mL developing agent by adding 2.5 mL 0.1% ninhydrine and the heating time is 5 min under the temperature of 105 °C.

Key words: serine; ninhydrine; chromatography; content detection

本文编辑: 龚晓宁