

文章编号:1674-2869(2010)03-0020-05

不同 pH 值条件下的丝氨酸标准曲线

彭继明,张佑红*,徐鹏,陈林,马静,危威

(武汉工程大学化工与制药学院,绿色化工过程省部共建教育部重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘要:根据丝氨酸与茚三酮反应后溶液在 570 nm 处有最大吸光值,用分光光度法测定丝氨酸含量,确定了丝氨酸与茚三酮反应的最佳时间和相对用量。为了准确测定磷脂制备体系中丝氨酸含量,绘制了 pII 值分别为 4.5,5.0,和 6.0 时的丝氨酸标准曲线。结果表明:pH 值为 4.5 时,丝氨酸的含量与 A570 值在 0~0.20 g/L 范围内呈良好的线性关系 $y=5.595x+0.056(R^2=0.9912)$;pH 值为 5.0 时丝氨酸的含量与 A570 值在 0~0.10 g/L 范围内呈良好的线性关系 $y=10.59x+0.023(R^2=0.9985)$;pH 值为 6.0 时,丝氨酸的含量与 A570 值在 0~0.04 g/L 范围内呈良好的线性关系 $y=37.388x+0.0052(R^2=0.9915)$ 。

关键词:分光光度法;L-丝氨酸;线性关系;标准曲线

中图分类号:Q517

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2010.03.005

0 引言

丝氨酸是人体中物质代谢、生理活动、抵抗疾病必不可少的物质,在医药、食品、化妆品中有广泛的应用。丝氨酸含量的变化不仅可以为疾病的诊断、治疗效果的观察提供有价值的信息及资料,还是检验食品和化妆品是否合格的重要标准,因此准确测定丝氨酸含量具有极其重要的意义^[1-5]。测定丝氨酸量的方法有高效液相色谱法^[6],氨基酸自动分析仪法^[7-10],但二者需要较贵重的仪器设备且操作步骤复杂。已有大量的文献报道,用分光光度法测定丝氨酸的含量,准确率极高,与氨基酸自动分析仪检测的含量的误差在 2% 以内^[11]。因此,氨基酸与茚三酮反应在临床检验、卫生分析、食品工业和药品检验等方面被广泛采用,在蛋白质合成和结构鉴定中也常用来完成定性和定量测定^[12-14]。该反应受多种因素的影响,主要有:反应 pII 值、显色剂含量、反应时间、温度、氨基酸种类等^[15-18]。关于反应的最佳 pH 值的报道有很多,但观点并不一致,从 pII 值 4.0~9.0 为最佳均有报道^[19-20]。

在实际应用的反应体系中,基于反应体系的特点,准确测定丝氨酸的含量时,不宜加入过多的酸或碱调节 pH 值(因为加入酸或碱引起的体积变化,会导致丝氨酸浓度发生较大变化)。研究丝氨酸磷脂制备体系中的丝氨酸含量时,体系存在以

下几个特点:**a.** 丝氨酸与茚三酮反应,在处于文献报道的缓冲溶液最佳 pH 值时,磷脂酶 D 的活性有可能丧失(当 pH 为 4.0~7.0 时,磷脂酶 D 有活性。**b.** 在酸性、碱性和中性环境中,丝氨酸与茚三酮反应的机理不同,生成的有色物质也不相同。**c.** 为了研究酶的动力学,反应在 pH 值分别为 4.5,5.0,5.5,6.0,7.0 的缓冲液中进行,缓冲液的 pH 值难以调至文献报道的丝氨酸与茚三酮反应的 pII 值。**d.** 实验过程中测定最佳反应时间和酶量时,需连续取样,每次取样量为 0.2 mL(取样量较小),加入酸碱调节 pH 值至最佳,容易引起较大的误差。为了获得磷脂酶 D 在丝氨酸磷脂制备体系中的最佳 pII 值,需要得到丝氨酸在几种不同 pII 值下的标准曲线。

本实验采用茚三酮显色法,测定了丝氨酸与茚三酮反应的最佳时间和相对用量,并确定丝氨酸在 pII 值分别为 4.5,5.0 和 6.0 时的丝氨酸标准曲线。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

试剂:卵磷脂(优级纯),丝氨酸(优级纯),南京奥多福尼生物科技有限公司生产;磷脂酶 D(优级纯),Streptomyces Sp. Glycerophospholipid specific;茚三酮(分析纯),氯化亚锡(分析纯),国药集团化学有限公司生产;其他试剂均为分析

收稿日期:2009-09-26

作者简介:彭继明(1984-),女,湖北黄冈人,硕士研究生,研究方向:生物化工。

指导老师:张佑红,教授,博士,硕士研究生导师,研究方向:生物化工。*通信联系人

纯试剂

仪器:HH-S 型恒温水浴锅,上海东玺制冷仪器有限公司生产;Mk3 酶标仪,BCD-251FBNW 超低温冰箱,上海热电仪器有限公司生产;PB 10pH 测定仪,北京赛多利斯仪器有限公司生产;AL204 型电子天平,梅特勒 托利多仪器(上海)有限公司生产。

1.2 实验原理

α -氨基酸在弱酸性溶液中与茚三酮共热,引起氨基酸氧化脱氨、脱羧反应,最后茚三酮与反应产物—氨和还原茚三酮发生作用,生成紫色物质,用分光光度法测定反应后溶液的吸光度值,绘制丝氨酸浓度与吸光度值对应的标准曲线。

1.3 试验步骤

1.3.1 溶液的制备 a. 0.02 mol/L 丝氨酸标准溶液的配制:准确称取 0.1051 g L-丝氨酸(质量分数不低于 99%)溶解定容至 50 mL。b. 0.04 mol/L 茚三酮溶液的配制:称取茚三酮 0.3563 g 于 50 mL 离心管中,加 25 mL 水和 0.0143 g 氯化亚锡(SnCl_2),微微加热使茚三酮溶解,放在暗处,静置过夜,过滤后定容至 50 mL。c. 配制不同 pH 的缓冲溶液:醋酸—醋酸钠缓冲液的 pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5,磷酸氢二钠—磷酸二氢钠缓冲液的 pII 分别为 6.0、7.0。

1.3.2 丝氨酸—茚三酮反应及反应产物的光谱扫描 反应体系:准确量取 0.02 mol/L 丝氨酸标准溶液 0.2 mL, pH 值为 6.0 的缓冲溶液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,再加入 1.0 mL 的 0.04 mol/L 茚三酮溶液,定容至 10 mL。混匀,取出混合液 2 mL 于 10 mL 具塞离心管中,加塞于沸水浴中反应一定时间,取出置冰水中迅速冷却至室温。将丝氨酸标准品与茚三酮反应后的产物在 UV 240 紫外扫描仪上扫描,寻找 400 nm 与 700 nm 之间的最大吸收波长。

1.3.3 显色反应条件的选择 为了研究丝氨酸与茚三酮反应的最佳条件,可改变 1.3.2 的反应体系中的单一因素,并以相应的空白值做对照,在最大吸收波长处测定吸光度,以确定反应的最佳相对用量和时间。

1.3.4 丝氨酸标准曲线的绘制 确定最佳茚三酮用量、最佳反应时间之后,控制丝氨酸标准溶液用量呈梯度变化,参照 1.3.2 的反应体系,测定吸光度,将吸光度对浓度进行直线回归,得丝氨酸标准曲线及方程。

1.3.5 标准曲线准确度的检测 取一定体积的已知浓度的溶液,分别加入 pH 值为 4.5、5.0 和 6.0 的缓冲溶液,按上述方法分别测定其吸光度,

从标准曲线上的数学表达式中计算出丝氨酸的质量浓度,测三次取平均值,计算误差值。

2 结果与分析

2.1 丝氨酸—茚三酮反应产物的测定波长的测定

将丝氨酸标准品反应后的产物在 UV-240 紫外扫描仪上扫描,丝氨酸和茚三酮反应产物在 570 nm 处有最大吸收,故选择 570 nm 为测定波长。

2.2 单因素实验

2.2.1 丝氨酸与茚三酮相对用量的选择 取 1.0 mL 浓度为 0.02 mol/L 的丝氨酸标准溶液于一组 10 mL 的容量瓶,瓶中加入 1.0 mL pH 4.5 的缓冲溶液,分别往瓶中加入 0.6、0.8、1.0、1.2、1.5、1.6、1.8、2.0、2.2 mL 0.04 mol/L 茚三酮溶液,参照 1.3.2 显色测定各显色体系的吸光度,结果如图所示。

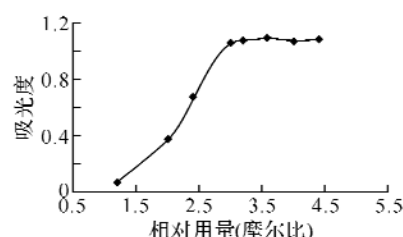


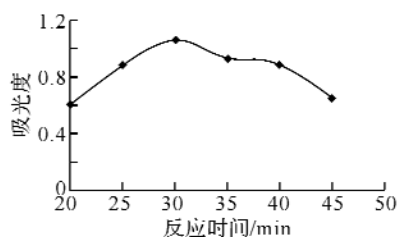
图1 不同茚三酮用量对显色体系吸光度的影响

Fig. 1 Effect of different amount of ninhydrin added on A570 values

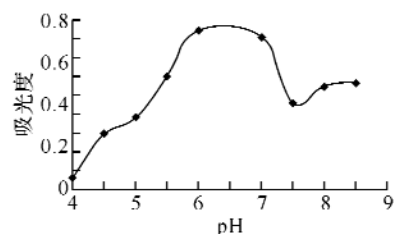
由图 1 可知,取 0.02 mol/L 丝氨酸标准溶液用量为 1.0 mL,茚三酮用量小于 1.5 mL(摩尔比 3:1)时,随着茚三酮用量的不断增加,吸光度值不断变大,当茚三酮用量为 1.5 mL(摩尔比 3:1)时,吸光度接近最大值,从保证实验效果和节约显色剂用量的角度考虑,茚三酮与丝氨酸的摩尔比为 3:1 时比较恰当。

2.2.2 反应时间和 pII 值的选择 取 0.2 mL 浓度为 0.02 mol/L 的丝氨酸标准溶液于一组容量瓶,向瓶中加入 0.3 mL 0.04 mol/L 的茚三酮溶液,参照 1.3.2 显色,研究不同反应时间和不同 pII 值条件下的吸光度,结果如图 2 所示。

由图 2A 可知,反应时间 30 min 时有最大吸光度值。由图 2B 可知,pH 值对丝氨酸与茚三酮的显色反应有极大的影响,且不同 pII 值对其影响的规律并不明显,这是因为在不同的 pH 值条件下,反应的机理并不相同,生成的有色物质也不一样^[21-22]。为了准确测定丝氨酸的含量,必须根据体系 pII 值的需要,测定不同 pII 值条件的丝氨酸含量的标准曲线。



A. 不同反应时间



B. 不同 pH 值条件

图 2 不同反应时间和不同 pH 值条件下
测定丝氨酸标准溶液的吸光度

Fig. 2 Effect of different reaction and pH on A570 values

2.3 几种不同 pH 值条件下丝氨酸标准曲线的绘制

2.3.1 pH 值为 4.5 的丝氨酸标准曲线 取一组 10 mL 的容量瓶,按表 1 依次加入 0.02 mol/L 丝氨酸标准溶液,各加入 pH 为 4.5 的缓冲溶液 1.0 和 1.5 mL 茚三酮.在 100 ℃ 条件下,反应 30 min.按 1.3.2 方法测定吸光度.结果如表 1 所示.

表 1 pH 值为 4.5 时丝氨酸标准溶液数据

Table 1 The standard curve data of serine at pH of 4.5

实验号	0.02mol/L 丝氨酸 标准溶液 体积/mL	0.02mol/L 丝氨酸 标准溶液 质量浓度/(mg/mL)	吸光度
1	0	0	0.039
2	0.2	0.042 036	0.354
3	0.4	0.084 072	0.595
4	0.5	0.105 09	0.691 7
5	0.6	0.126 108	0.777 3
6	0.8	0.168 144	1.027

以标准丝氨酸质量浓度作横坐标,以吸光度值作纵坐标,绘制标准曲线,求得其回归方程为 $y=5.595x+0.056$,相关系数 $R^2=0.9912$.

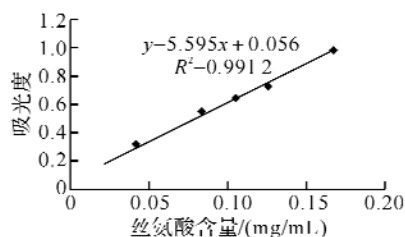


图 3 丝氨酸标准曲线(pH=4.5)

Fig. 3 Serine standard curve (pH = 4.5)

2.3.2 pH 值为 5.0 时的丝氨酸标准曲线 取一组 10 mL 的容量瓶,按表 2 依次加入 0.02 mol/L 丝氨酸标准溶液,各加入 pH 为 5.0 的缓冲溶液 1.0 mL 和 0.525 mL 茚三酮,在 100 ℃

条件下,反应 30 min.按 1.3.2 方法测定吸光度.结果如表 2 所示.

表 2 pH 值为 5.0 时丝氨酸标准曲线数据

Table 2 The standard curve data of serine at pH of 5

实验号	0.02M 丝氨酸 标准溶液 体积/mL	0.02M 丝氨酸 标准溶液 浓度/(mg/mL)	吸光度
1	0	0	0.039
2	0.10	0.021 02	0.270 6
3	0.15	0.031 53	0.391 2
4	0.20	0.042 04	0.501 8
5	0.25	0.052 55	0.614 9
6	0.30	0.063 06	0.733 5
7	0.35	0.073 57	0.849 6

以标准丝氨酸质量浓度作横坐标,以吸光度值作纵坐标,绘制标准曲线,求得其回归方程为 $y=10.59x+0.023$,相关系数 $R^2=0.9985$.

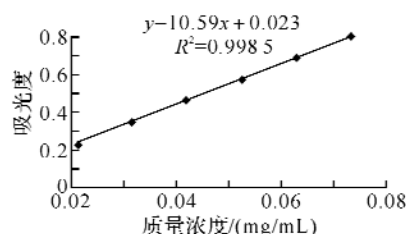


图 4 丝氨酸标准曲线(pH=5.0)

Fig. 4 Serine standard curve (pH = 5.0)

2.3.3 pH 值为 6.0 时的丝氨酸标准曲线 取一组 10 mL 的容量瓶,按表 2 依次加入 0.02 mol/L 丝氨酸标准溶液,各加入 pH 为 6.0 的缓冲溶液 1.0 和 0.21 mL 茚三酮.在 100 ℃ 条件下,反应 30 min.按 1.3.2 方法测定吸光度.结果如表 3 所示.

表 3 pH 值为 6.0 时丝氨酸标准曲线数据

Table 3 The standard curve data serine at pH of 6.0

实验号	0.02mol/L 丝氨酸 标准溶液 体积/mL	0.02mol/L 丝氨酸 标准溶液 浓度/(mg/mL)	吸光度
1	0	0	0.039 0
2	0.04	0.008 407	0.326 5
3	0.06	0.012 611	0.536 6
4	0.08	0.016 814	0.716 8
5	0.1	0.021 018	0.822 5
6	0.12	0.025 222	1.010 5
7	0.14	0.029 425	1.134 0

以标准丝氨酸质量浓度作横坐标,以吸光度值作纵坐标,绘制标准曲线,求得其回归方程为 $y=37.821x+0.0033$,相关系数 $R^2=0.9915$.

2.4 方法准确度的检测

配制浓度为 0.01 mol/L 的丝氨酸的标准溶液 10 mL,分别用移液枪准确量取体积为 200 μL 的溶液三份,放入标号为 1,2,3 的三只 10 mL 的容量瓶中,据相对摩尔比为 (3:1) 的比例,各加入

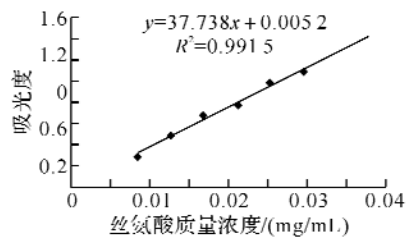


图 5 丝氨酸标准曲线(pH=6.0)

Fig. 5 Serine standard curve (pH = 6.0)

0.02 mol/L 的茚三酮溶液 280 uL,然后依次加入 500 uL,pH 值分别为 4.5,5.0 和 6.0 的缓冲溶液,依 1.3.2 试验步骤,测定三只容量瓶里溶液反应后的吸光度,结果如表 4 所示.

表 4 丝氨酸标准曲线准确度的检测

Table 4 Serine standard curve of the detection accuracy						
实验号	已知质量浓度/(mg/mL)	pH 值	标准曲线	吸光度	测定质量浓度/(g/L)	误差
1	0.021 01	4.5	$y=5.595x+0.056$	0.217	0.019 69	+3.78%
2	0.021 01	5.5	$y=10.634x+0.023$	0.276 7	0.021 80	3.90%
3	0.021 01	6.0	$y=37.738x+0.0052$	0.785 5	0.020 19	6.26%

3 结 语

用酶标仪分光光度法确定了丝氨酸与茚三酮显色反应的最佳时间为 30 min 和相对摩尔比为 1:3,反应的温度为 100 ℃. 据丝氨酸磷脂制备体系反应后测定丝氨酸含量的需要,笔者还测定了 pH 值分别为 4.5,5.0 和 6.0 时的丝氨酸标准曲线. pH 值为 4.5 时, $y=5.595x+0.056$ ($R^2=0.9912$); pH 值为 5.0 时, $y=10.59x+0.023$ ($R^2=0.9985$); pH 值为 6.0 时, $y=37.388x+0.0052$ ($R^2=0.9915$),用已知质量浓度的丝氨酸标准溶液对标准曲线的准确度进行检测,误差范围为-6.26%~+3.78%. 应用茚三酮-分光光度法测定由卵磷脂制备丝氨酸磷脂体系中的丝氨酸质量浓度时,操作简便,结果准确,节约成本,重复性好.

参考文献:

[1] Scholl-burgi S, Heinz-crian P. Amino acid cerebrospinal fluid/plasma ratios in children; influence of age, gender, and antiepileptic medication [J]. Pediatrics, 2008(4): 920-926.

[2] Karakecili A G, Demirtas T T. Evaluation of L929 fibroblast attachment and proliferation on Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)-immobilized chitosan in serum-containing/serum-free cultures[J]. J Biosci Biocng, 2007(1): 69-77.

[3] Jones C M, Smith M. Reference data for

cerebrospinal fluid and the utility of amino acid measurement for the diagnosis of inborn errors of metabolism[J]. Ann Clin Biochem, 2006, 43:63-66.

[4] Manso Filho H C, McKeever K H, Gordon M E, et al. Developmental changes in the concentrations of glutamine and other amino acids in plasma and skeletal muscle of the Standardbred foal. [J]. Anim Sci, 2009(03):23-29.

[5] Yin Z, Albrecht J, Syversen, et al. Comparison of alterations in amino acids content in cultured astrocytes or neurons exposed to methylmercury separately or in co-culture [J]. Neurochem Int, 2009, 55(1-3): 136-42.

[6] 傅莉,刘信洪,徐春艳,等. HPLC 法监测 DL-丝氨酸的合成研究[J]. 北京化工大学学报:自然科学版, 2003(4):105-108.

[7] Tsiao H Y, Wei T. Enzymatic production of L-Serine[J]. Biotech and Bioeng, 1996(28): 857-867.

[8] Kubota H. Fermentation of L-serine from Glycine byCorynebacterium glycinophilum. [J]. Gen. Appl. Microbiol, 1992(18): 365-37.

[9] Heptner G, Domschke. Amino acid level in plasma-expressed as alpha-amino-nitrogen reaction to stimulation of the exocrine pancreas; approaches to a new pancreatic function test. Klin Wochenschr, 1987, 65: 1054-1061.

[10] 王雅琴,李绪昆. 采用氨基酸自动分析仪测定黄酒中的游离氨基酸[J]. 食品与发酵工程,2005(4): 23-25.

[11] 王薇,立周. 分光光度法测定生物转化体系中的 L-丝氨酸[J]. 江苏食品发酵,2008(1):43-46.

[12] 周圆圆,朱敏,王磊,等. 变色酸-分光光度法测定丝氨酸含量[J]. 氨基酸和生物资源,2007(1):73-76.

[13] 魏东,谭慧林,杨海燕. L-丝氨酸高产菌株的选育和摇瓶发酵条件优化[J]. 氨基酸和生物资源,2006, 28(1): 46-48.

[14] 高伟,张伟国. L-丝氨酸产生菌的选育与发酵条件的初步研究[J]. 发酵科技通讯,2007,36(2): 12-15.

[15] 欧倩,韦东,武波. 丝氨酸生产菌的筛选及静息细胞培养系统中 L-丝氨酸的合成[J]. 氨基酸和生物资源,2006,28(3): 41-44.

[16] 陈忠云. α-氨基酸与茚三酮显色反应机理研究[J]. 化学与生物工程,2004(6):1-3.

[17] 钱和,郝刚. L-精氨酸高产菌的育选育[J]. 微生物学通报,2005,32(3): 46-50.

[18] 卢发,张伟国. 纸层析-分光光度法测定发酵液中 L-

- 丝氨酸和甘氨酸的含量[J]. 食品与发酵工业, 2007, 31(3): 119-121.
- [19] Zerweck J, Masch A, Schutkowski M, et al. Peptide microarrays for profiling of mA570ification state-specific antiA570ics[J]. MethA570s Mol Biol, 2009, 24: 169-180.
- [20] Stabler T V, Byers S S, Zura R D, et al. Amino acid racemization reveals differential protein turnover in osteoarthritic articular and meniscal cartilage[J]. S Arthritis Res Ther, 2009(2): 34-37.
- [21] 陈忠云. α -氨基酸与茚三酮显色反应机理研究[J]. 化学与生物工程, 2002(6): 11-13.
- [22] 张振华. α -氨基酸与茚三酮显色反应影响因素的探究[J]. 邵阳师范学报, 2003(1): 19-22.

Serine standard curves at different pH

PENG Ji-ming, ZHANG You-hong, XU Peng, CHEN Lin, MA Jing, WEI Wei

(Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, School of Chemical Engineering & Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: According to the principle of color reaction between α -amino-acids and ninhydrin, ninhydrin spectrophotometric method of determining the serine level has been set up and A570 value was determined. The optimal experimental conditions of ninhydrin spectrophotometry such as pH, the relative amount of ninhydrin added and reaction time have been investigated. The results showed that: the relationship of the amount of serine in 0—0.20 g/L with A570 at pH of 4.5 was a good linear $y=5.595x+0.056$ ($R^2=0.9912$); For the serine in 0—0.10 g/L at pH of 5.0, the linear correlation equation is $y=10.59x+0.023$ ($R^2=0.9985$); For the serine in 0—0.04 g/L with A570 at pH of 6.0, the linear correlation equation is $y=37.388x+0.0052$ ($R^2=0.9915$).

Key words: Spectrophotometry; L-serine; linear relationship; standard curve

本文编辑:张 瑞



(上接第 19 页)

Influence of commonly used antioxidants on conjugated linoleic acid glyceride's oxidative stability

ZHOU Dan, CHEM Qi-ming, ZHOU Xuan, ZHAO Qing-ling

(Novel Reactor and Green Chemistry Key Lab of Hubei Province, School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Using intensified oxidation experimental conditions, peroxide value as an indicator, the influence of VC, VE, sodium citrate, licorice antioxidants on Conjugated linoleic acid glyceride's oxidative stability has been studied. As the peroxide value's one-dimensional linear regression equation indicated, all of them on conjugated linoleic acid glycerides has the antioxidant effect, licorice antioxidant has the best anti-oxidant effect. Under the conditions of adding 0.5% VC, 0.1% VE, 0.05% sodium citrate, 0.7% licorice antioxidants into Conjugated linoleic acid glycerides, it has best oxidation stability.

Key words: conjugated linoleic acid glycerides; oxidation stability; peroxide value; antioxidants

本文编辑:张 瑞