

分光光度法检测蜂皇胎制品中游离赖氨酸含量

中山大学天然药物研究室(广州 510089) 蔡丽玲* 张世忠 郑谋生 刘捷

摘要 蜂皇胎制品中游离赖氨酸用离子交换树脂分离后,先与铜离子络合,再与 1-氟-2,4-二硝基苯(FDNB)反应,经后处理,用分光光度法测定。

关键词 蜂皇胎 赖氨酸 1-氟-2,4-二硝基苯 分光光度法

蜂皇胎即蜂王幼虫,对人体具有很高的营养价值及治病保健价值^[1],已开发保健品。目前对蜂王幼虫的有效成分尚不十分清楚,但已知所含游离赖氨酸的含量较高,可通过检测游离赖氨酸含量来监测蜂皇胎制剂的质量。测定赖氨酸的方法有很多,但测定蜂皇胎制品中游离赖氨酸含量的方法文献中未见报道。本文以较简单的设备,用离子交换树脂分离出游离赖氨酸,使用铜离子络合赖氨酸的 α -氨基和羧基,让 ϵ -氨基与 1-氟-2,4-二硝基苯(FDNB)反应,经酸化和用乙醚提弃副反应物后^[2],以分光光度法成功地测定了蜂皇胎制品中的游离赖氨酸并用于生产质量监控。

1 材料与方 法

岛津 UV-240 紫外可见光分光光度计,蜂皇胎冻干粉和胶囊(天一保健品有限公司提供)。

1.2 试剂与溶液的配制:所用试剂均为分析纯试剂,其中磷酸铜悬浮液为自制,即在不断搅拌下,将 200ml 硫酸铜溶液(33.3g 无水硫酸铜溶于 1000ml 蒸馏水)慢慢加到 400ml 磷酸三钠溶液(68.5g 磷酸三钠溶解于 1000ml 蒸馏水)中,离心分离,沉淀物悬浮于硼酸盐缓冲液(54.6g 10 个结晶水的四硼酸钠溶于 1000ml 蒸馏水)后再离心分离,反复 3 次,最后沉淀物悬浮于 1000ml 硼酸盐缓冲

液,摇匀待用。

1.3 测定波长选择:适量赖氨酸和其它氨基酸溶液加入磷酸铜悬浮液,经 FDNB 衍生和酸化醚提弃副产物的水溶液,以空白液作参比绘制 250~450nm 的吸收光谱图。除形成的 ϵ -DNP 赖氨酸和 O-DNP 酪氨酸有吸收外,其它氨基酸均无吸收。尽管 ϵ -DNP 赖氨酸的最大吸收在 365nm,但在此波长 O-DNP 酪氨酸尚有一定吸收,而在肩峰 395nm 处 O-DNP 酪氨酸的吸收已很小可忽略,故选用 395nm 作测定波长。

1.4 绘制标准直线:量取 20ml 含赖氨酸盐酸盐(0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0mg)溶液,分别加入 20ml 磷酸铜悬浮液,1mol 10% 甘氨酸水溶液,不断振摇 15min,加入 0.5ml 10% FDNB 甲醇溶液,振摇 5min,在沸水浴中加热 15min 后取出,立即加入 25ml 1mol/L 盐酸溶液并不断摇动,待冷至室温后装入 100ml 容量瓶并加水到刻度,摇匀,离心。量取 40ml 上清液用乙醚提取 3 次,每次 25ml 乙醚,弃去乙醚层,水层在 65℃ 水浴热 20min,吹空气 2min 以除尽乙醚。冷却后,以空白液作参比,测定在 395nm 波长处的吸收度,得出吸收度 A 与赖氨酸毫克数的回归方程为 $A = 0.0436 + 3.93mg$, 相关系数 $r = 0.999 (n=4)$ 。

2 实验结果

* Address: Cai Liling, Department of Medical Natural, Zhongshan Medical College, Guangzhou

2.1 样品含量测定:精确称适量蜂皇胎制品 80ml,置 100ml 容量瓶中,超声波 10min,加水到刻度,摇匀,滤过,弃去初滤液,取续滤液 20ml 以每分钟 1~2ml 速度流过装有 10ml 732 氢型阳离子交换树脂小柱,以 20ml 水洗柱,弃去洗脱液,以 2mol/L 氨水 40ml 洗脱,弃去前 10ml 洗脱液,再用水洗脱,收集 50ml 洗脱液,洗脱液煮沸直至溶液 pH 值小于 9,冷却至室温,按绘制标准直线方法操作,将所测的吸收度值由标准直线计算出样品所含游离赖氨酸量(表 1)。同一样品测定偏差均在 6% 以内。

2.2 样品添加赖氨酸回收率:称取适量已测定含量的样品,添加相当其所含量的赖氨酸盐酸盐,测定游离赖氨酸总量,计算添加回收率,对于冻干粉的回收率在 95%~105%(n=6),对于胶囊回收率在 95%~110%(n=4)。

2.3 蜂皇胎稳定性试验:应用本法考查了蜂皇胎胶囊在加温初步稳定性试验和常温稳定性试验时的游离赖氨酸含量变化,结果列于表 2。

表 1 蜂皇胎制品的游离赖氨酸(以盐酸盐计)含量(mg/g)

冻干粉			胶囊		
批号	次数	含量($\bar{x} \pm S$)	批号	次数	含量($\bar{x} \pm S$)
0712	10	47.8±2.27	30111	3	4.29±0.17
0710	11	45.8±3.09	1216	4	4.09±0.21
0815	10	52.5±2.08	1123	4	3.87±0.19

表 2 稳定性试验游离赖氨酸含量(mg/g)变化

样品	试验前	加温初步稳定性试验			常温稳定性试验	
		1月	2月	3月	半年	一年
1	5.20	5.11	3.74	2.80	4.71	3.22
7	3.57	3.25	3.66	2.74	3.57	3.40

3 讨论

3.1 定量测定游离氨基酸大都用高效液相色谱,花费较高。本文采用分光光度法所需设备简单,而且测定的重现性和回收率良好,能满足日常生产质量控制需要。

3.2 蜂皇胎含大量蛋白质,也可用定氮法来估计其含量。尽管实验发现蜂皇胎制品含氮量与游离赖氨酸含量有一定的相关性($r=0.730, n=6$),但游离赖氨酸更能反应产品质量和稳定性的波动情况。

3.3 蜂皇胎制品除游离赖氨酸外含大量蛋白质和糖类会干扰测定,使用阳离子交换树脂柱处理能很好排除干扰,但操作时需注意控制流速。

3.4 衍生后酸化和醚处理,可破坏会干扰测定的过量 FDNB 的产物并除去所有其它 DNP-氨基酸,只留下干扰物 O-DNP-酪氨酸,后者在 395nm 测定时并不干扰。

3.5 久置 FDNB 甲醇试剂会产生白色沉淀物并使吸收度值偏低,最好使用新鲜配制的试剂。实验发现,使用久置磷酸铜悬浮液(>10d)所测定的吸收度值偏低。欲得较好结果最好与测定样品同时绘制标准直线。

参考文献

- 1 周瑞华,等. 食品科学,1991(6):12
- 2 黄伟坤,等. 食品检验与分析. 北京:轻工业出版社,1991. 67

(1996-08-12 收稿)

Determination of Free Lysine in Queen Bee's Embryo Preparation by Spectrophotometry

Cai Liling, Zhang Shizhong, Zheng Mousheng, et al

Free lysine in a preparation of queen bee's embryo was isolated using cation exchange resin. The α -amino and carboxyl group of lysine was complexed with cupric ion and the ϵ -amino group reacted with FDNB(Fluoro-dinitrobenzene). After acid treatment and extraction with ether, the absorbance of the solution at 395nm was determined by spectrophotometry. Variation coefficient of the determination was less than 6% and the recovery of lysine was 95%~110%.