

# 新型蛋氨酸测定方法的建立

孙晓东, 王雅琴\*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘 要:** 本文建立了一条快速、简便、精确度高的蛋氨酸测定方法。蛋氨酸与过量氯胺-T 反应生成蛋氨酸亚砷, 过量的氯胺-T 与 NTB 发生氧化反应生成 DTNB, 一定范围内剩余的 NTB 的量与蛋氨酸量成正比, 412nm 测定其 OD 值; 同时加入掩蔽剂 DEPC 可有效消除其他氨基酸尤其是含巯基氨基酸的干扰。该方法适用于大量的蛋氨酸菌种的筛选工作。

**关键词:** 蛋氨酸; 测定方法

## New Determination Method of Assaying Methionine Strains

SUN Xiao-dong, WANG Ya-qin\*

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** A rapid simple, convenient and highly sensitive determination method of assaying Methionine was established in this paper. Methionine might be determined colorimetrically from the conversion of nitrothiobenzoate to 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) by chloramines-T remaining after oxidation of methionine to methionine sulfoxide by a known excess of reagent. The interference of amine acid especially amine acid, containing sulphydryl groups might be effectively suppressed by reaction with DEPC. The method was applicable to large amount of methionine strains screening.

收稿日期: 2003-09-16 \* 通讯作者

作者简介: 孙晓东(1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物工程。

王雅琴(1956-), 女, 副教授, 研究方向为生物化学与分子生物学。

(Pro)较差为 0.99810, 相关性较好。

为保证分析结果的准确性, 本文以同一标准氨基酸样品和同一测试样品各重复 6 次进样分析, 各种氨基酸的保留时间( $R_t$ )、相对峰面积( $A_x/A_t$ )及其标准偏差(RSD%)列于表 4。从表 4 可看出, 保留时间的最大标准偏差 RSD 是天冬氨酸(3.02%)和谷氨酸(2.46%), 其它氨基酸均小于 1%, 效果较满意。在相对峰面积中, 最大标准偏差为脯氨酸 Pro(7.82%), 其次为赖氨酸 Lys(5.90%), 效果较差, 这可能与其衍生化反应程度或衍生物的稳定性或含量高低有关。

### 2.5 回收率试验

本文采用单点和多点加入法将各种单氨基酸标准液定量加入分析试样作回收率试验, 实验结果表明: 各种氨基酸的回收率范围为 92.21%~114.24%, 结果令人满意。

### 2.5 讨论

#### 2.5.1 pH 值对分析测试的影响

流动相的最佳 pH 值为  $7.2 \pm 0.025$ , pH 值的变动范

围不应超过  $\pm 0.1$ , 否则会导致氨基酸峰重叠、保留时间和出峰顺序发生变化; OPA 衍生化反应的 pH 值大于 8.5, 而 FMOC 衍生化反应的 pH 值必须大于 9.0。

2.5.2 本法衍生化反应 2min 内完成, 18 种氨基酸在 22min 内出峰完全且分离良好, 溶剂峰(22min 之后出峰)不影响检测, 是一种理想的全谱氨基酸分析方法。

### 参考文献:

- [1] 傅亮, 倪冬姣, 等. 氨基酸高效液相色谱分析[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1994, 7(2): 77.
- [2] 刘保冬, 王维, 等. 葡萄酒中游离氨基酸的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 1997, 16(6): 5-7.
- [3] 朱曙东, 赵昇皓. 氨基酸的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 1994, 12(1).
- [4] 陈平, 纳鹏君, 等. 反相高效液相色谱测定敦煌壁画胶结材料中氨基酸[J]. 分析测试技术与仪器, 2002, 8(2).
- [5] 李建国. 荔枝三高栽培技术[M]. 中国农业大学出版社, 1999.

Key words: Methionine; determination method

中图分类号 TS201.2

文献标识码 B

文章编号 1002-6630(2004)12-0159-03

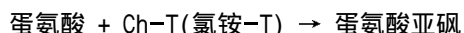
蛋氨酸又名甲硫氨酸, 为体内甲基的主要供体, 也是唯一含硫醚的氨基酸。其生理功能主要表现在: 参与体内甲基的转移; 维持机体生长发育和氮平衡, 在临床上可用于防治肝脏疾病、治疗蛋白质不足引起的营养不良等症状。因此蛋氨酸在饲料工业、医药工业、保健品行业以及食品行业具有广泛用途。

作为动物体生长过程的必需氨基酸和饲料添加剂的主要成分之一, 与化学合成法相比, 应用微生物发酵生产具有更广阔的前景, 但蛋氨酸在微生物体内含量极低, 需选育一株高产蛋氨酸的菌株。在选育过程中, 建立一条简便、快速且灵敏度高的检测方法意义重大。目前蛋氨酸的测定方法主要有硝普盐法<sup>[1,2]</sup>, 测定范围在25~200  $\mu\text{g}$  之间, 但不能排除胱氨酸、半胱氨酸、高胱氨酸以及色氨酸的干扰; HPLC 法, 其测定值准确, 但存在仪器昂贵、成本高, 测定过程烦琐的弊病; 同时测定含硫量和氨基量两种共有基团以确定蛋氨酸的含量<sup>[3,4]</sup>的方法, 其只适合化学合成蛋氨酸含量的测定。以上方法均不适用于大量的菌种筛选工作。本文建立了NTB显色法测定微量蛋氨酸, 能排除其他氨基酸的干扰, 适用于大量的菌种筛选工作。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验原理

过量的氯铵-T与蛋氨酸发生氧化反应, 生成蛋氨酸亚砷; 剩余的氯铵-T氧化NTB生成DTNB。当NTB过量时, 与氯铵-T反应后剩余的NTB的量在一定范围内, 其OD值与加入的蛋氨酸的量成正比。在氯铵-T为0.03ml, NTB为0.2ml, 蛋氨酸在7.5~25  $\mu\text{g}$  范围内符合比尔定律, 可在412nm处进行比色测定。其反应过程如下:



### 1.2 仪器及试剂

#### 1.2.1 仪器

试管, 移液管, 分析天平(0.1mg), 722型分光光度计。

#### 1.2.2 试剂

(1) 0.1mol/L的pH=8.0的磷酸盐缓冲液, 冷藏保存;

(2) 0.5mg/ml的EDTA(Augus)溶液, 由(1)配制, 冷藏保存;

(3) 0.1mg/ml的蛋氨酸标准溶液, 由(2)配制, 冷藏保存;

(4) 0.01mol/L氯铵-T(Sigma-Aldrich)水溶液, 冷藏保存;

(5) DTNB(5,5'-二硫代双(硝基苯甲酸), Sigma)贮液: 4mg/ml, 由(2)配制, 冷藏保存;

(6) NTB溶液(新鲜配制): DTNB贮液用少量硼氢化钠还原, 盐酸溶液中和过量硼氢化钠由, 直至无气体产生, 磷酸盐缓冲液5~10ml调节pH值至8.0。

(7) DEPC(焦碳酸二乙酯)(Sigma), 冷藏保存;

(8) 硼氢化钠(北京化学试剂公司, 分析纯), 室温保存。

### 1.3 标准直线的绘制

(1) 取0.1mg/ml的蛋氨酸标准液0、0.075、0.10、0.15、0.20、0.25ml于试管中, 加EDTA溶液定容至1.0ml, 同时均加入10  $\mu\text{l}$  DEPC作为掩蔽剂, 室温过夜;

(2) 在(1)中加入3.0ml磷酸盐缓冲液和0.03ml的氯铵-T溶液, 室温反应40min后, 再加入0.2ml NTB溶液, 以试剂空白为对照, 于412nm下测其OD值。绘制OD—蛋氨酸含量( $\mu\text{g}$ )标准直线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛋氨酸标准直线

蛋氨酸标准直线如图所示:

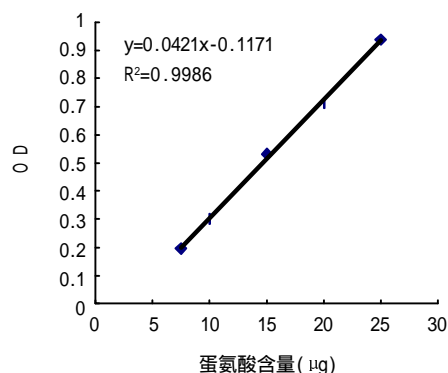


图1 蛋氨酸标准直线

其相关系数 $R=0.9993$ , 可作为测定标准直线, 简便、准确地测定蛋氨酸含量。

### 2.2 回收率实验

在常规的蛋氨酸测定中, 容易受到其他氨基酸尤其是含硫氨基酸的干扰, 而本测定方法, 很大程度上消除了以上干扰, 为了验证其抗干扰性及测定准确性, 本实验选定了几种含巯基的物质(如谷胱甘肽、半胱氨酸)作为干扰物质, 进行了回收率实验。

## 2.2.1 谷胱甘肽存在时回收率实验

巯基还原性极强, 能被弱氧化剂氯铵—T 迅速氧化, 因此蛋氨酸与氯铵—T 的反应受半胱氨酸等含巯基氨基酸以及谷胱甘肽的干扰。采用 DEPC 作为掩蔽剂, 可有效消除其干扰作用, 同时本实验确定了可消除的谷胱甘肽的量, 结果如表 1 所示。

表 1 谷胱甘肽存在时的回收率

蛋氨酸量(μg)	GSH 添加量(μg)	O D	回收率(%)
10	0	0.309	101.2
10	25	0.307	100.7
10	30	0.319	103.6
10	35	0.327	105.5

由上表可知, 10 μl 的 DEPC 可以掩蔽谷胱甘肽的量为 25 μg, 此时蛋氨酸具有良好的回归性。

## 2.2.2 半胱氨酸存在时的回收率实验

半胱氨酸中含有巯基, 对蛋氨酸的测定存在干扰。利用 DEPC 掩蔽的结果如表 2 所示。

表 2 半胱氨酸存在时的回收率

蛋氨酸量(μg)	Cys 添加量(μg)	O D	回收率(%)
10	0	0.309	101.2
10	10	0.312	101.9
10	15	0.332	106.7
10	20	0.351	111.2

由上表可知, 在半胱氨酸量为 10 μg 时, DEPC 可以掩蔽体系中半胱氨酸对蛋氨酸的测定的影响。

## 2.2.3 谷胱甘肽和精氨酸同时存在时的回收率

DEPC 可以掩蔽含巯基物质对蛋氨酸测定的干扰作用, 对于其他氨基酸同时存在的情况也进行了研究(以精氨酸为例)。在谷胱甘肽和精氨酸同时可以接受无干扰作

表 3 二者同时存在时的回收率

蛋氨酸量(μg)	添加氨基酸量(μg)	O D	回收率(%)
10	0	0.309	101.2
10	Arg(150)+GSH(25)	0.296	98.1

用量存在的情况的研究结果如表 3。

由上表可知, DEPC 对含硫物和不含硫氨基酸均具有掩蔽效果, 在谷胱甘肽, 精氨酸同时为掩蔽最大量时, DEPC 仍然具有良好的掩蔽效果, 蛋氨酸的测定基本不受干扰。

若需掩蔽的氨基酸量增加时, 是否可以适当的增加 DEPC 的量达到掩蔽效果, 本文未作探讨。

## 3 结 论

分光光度法测定蛋氨酸适用于大量的菌种筛选工作。本实验确定的 NTB 显色法存在以下优点: (1) 显色法灵敏度高, 能够测出微量蛋氨酸; (2) 在存在其他氨基酸(尤其是含硫氨基酸)的干扰时, 利用 DEPC 作为掩蔽剂, 可以有效消除干扰, 得到准确的测定结果; (3) 方法简单易行, 避免了采用其他方法测定时复杂、存在干扰等弊病, 适用于大量的菌种筛选工作。

## 参考文献:

- [1] Timothy, E McCarthy, M X Sullivan. A new and highly specific colorimetric test for methionine[J]. Biol Chem, 1941, 141: 871-874.
- [2] 何照苑, 张迪青. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 155.
- [3] 胡克燥. 蛋氨酸分析方法的探讨[J]. 浙江化工, 1996, 27 (3): 44-45.
- [4] 钟国清. 蛋氨酸的两种测定方法比较[J]. 江西饲料, 2002, (3): 20-22.

## 信 息

## 新研究表明高维生素 E 摄入有害健康

最新的研究表明, 适量补充维生素 E 有益健康, 但是过量的补充可以起到反作用, 使人的寿命变短。这是来自美国巴尔的摩的研究人员研究发现的。

这个研究从对来自北美、欧洲和中国的超过 13.6 万人进行了调查。这些人每天的维生素 E 摄入量从 16.5 到 2000 个国际单位不等。结果发现, 每天服用 200 个国际单位维生素 E 的人以及更多的人, 在服用 1 年以上的时间之后, 会比那些不补充维生素 E 的人的死亡率要更高。

人们经常补充维生素 E 的目的通常是为了其抗氧化能力, 希望它可以帮助防止不稳定的自由基分子的氧化, 因为这些分子的氧化可以加速衰老并导致心脏病和癌症。