灭菌乳中氨基酸测定条件改进

翁 霞，辛 广，梁文涛
(鞍山师范学院化学与生命科学学院，辽宁 鞍山 114007)

摘 要：考察茚三酮比色法测定灭菌乳中氨基酸条件的主要影响因素。通过单因素及正交试验对其测定条件进行改进。结果表明：水浴时间对测定结果影响显著，要严格控制。茚三酮比色法测定灭菌乳中氨基酸的最佳条件为：水浴时间 30min、水浴温度 70℃、茚三酮用量 1.2mL，在此条件下测得灭菌乳中氨基酸含量为 1.62g/100mL。
关键词：灭菌乳；氨基酸；测定条件

Optimization of Ninhydrin Reaction Conditions for Determination of Amino Acid Content in Sterilized Milk

WENG Xia，XIN Guang，LIANG Wen-tao
(College of Chemistry and Life Sciences, Anshan Normal University, Anshan 114007, China)

Abstract：One-factor-at-a-time and orthogonal array design methods were used to optimize the major reaction conditions affecting the determination of amino acid content in sterilized milk by ninhydrin colorimetric method. Water-bath heating time influenced significantly determination results so that it required strict control. The optimal determination conditions were 1.2 mL of ninhydrin solution and heating for 30 min in 70 ℃ water-bath. Under these conditions, the amino acid content in sterilized milk was determined to be 1.62 g/100 mL.
Key words：sterilized milk；amino acid；determination conditions
中图分类号：TS252.7 文献标识码：A 文章编号：1671-5187(2012)02-0038-03

奶是大自然赋予人类的理想食品，其近乎完善的营养价值被誉为“白色血液”和“生命之泉”。而牛奶作为目前奶类中最容易生产、最容易得到的食物被全世界消费者所食用[1]。一般牛奶的主要化学成分含量为：水分 87.5%、脂肪 3.5%、蛋白质 3.4%、乳糖 4.6%、无机盐 0.7%[2]。牛奶所含氨基酸种类和组成比例完善，牛奶蛋白质含有人体生长所需的全部必需氨基酸，且组成比例和人体所需要的非常接近，不仅消化率可达到 98%～100%，而且利用率也极高[3-4]。牛奶中的蛋白主要为酪蛋白、乳清蛋白和免疫球蛋白，而其中酪蛋白占蛋白总量的 80%，且 β- 酪蛋白具有较强的抗变异原机制，能减少癌变[5]，还具有促进心血管的健康、控制高血压、增强免疫机能、改善睡眠状况等功效[6-7]。牛奶及其制品中游离氨基酸含量的测定，目前相关报道较少，且没有方法标准。本实验借鉴氨基酸分析仪的检测原理，茶叶[8]、牛肉[9]、酱油[10]中游离氨基酸及赖氨酸[11]、谷氨酸[12]的测定方法，建立测定牛奶及其制品中游离氨基酸含量的测定方法[13]。本实验对茚三酮比色法测定灭菌乳中氨基酸的条件进行改进，以确定最佳实验方案，为牛奶及乳制品中氨基酸的快速定量检验及方法标准提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

蒙牛全脂灭菌乳 内蒙古蒙牛乳业(集团)有限公司；*L*- 酪氨酸(生物纯) 上海康达氨基酸厂；茚三酮、磷酸氢二钠、活性炭 国药集团化学试剂有限公司；柠檬酸 天津市瑞金特化学品有限公司；浓盐酸 北京化工厂；氢氧化钠 沈阳市化学试剂厂；甲醛、邻苯二甲酸氢钾 沈阳市荣兴化工厂；其余试剂均为分析纯。

TU-1810 紫外 - 可见分分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司；FA1104 电子天平 上海良平仪器仪表有限公司；PB-10 酸度计 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司；HH-4 数显恒温水浴锅 郑州国华电器有限公

收稿日期：2011-12-21
基金项目：鞍山师范学院院级课程建设项目(2010kcjs23)
作者简介：翁霞(1979—)，女，讲师，硕士，研究方向为食品营养与安全。E-mail：wengxia2005@163.com

司；SHB-B95 抽滤真空泵 郑州长城科工贸有限公司。

1.2 灭菌乳的预处理

准确吸取 10mL 灭菌乳于烧杯中，加入约 40mL 水和 5g 左右活性炭，在 70℃水浴上加热数分钟，用真空泵抽滤，然后用 30mL 左右热水洗涤活性炭，收集滤液于 100mL 容量瓶中，定容摇匀备用。

1.3 最大吸收波长的确定

准确吸取 *L*-酪氨酸标准溶液 2.0mL 置于 20mL 刻度试管中，加入 1.2mL 的茚三酮溶液，然后加入 pH8.0 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液至刻度为 10mL。混合均匀后，放入 70℃的水浴中加热 30min，取出迅速冷却至室温，加磷酸缓冲液至 20mL。然后以空白溶液(即不加入酪氨酸标准液)作对照，用分光光度计在波长 530～590nm 范围内扫描，得最大吸收波长为 565nm。

1.4 标准曲线的制作

准确吸取 0.0、0.8、1.6、2.4、3.2mL 的 0.2mg/mL 酪氨酸标准溶液[14]置于 20mL 刻度试管中，每支试管中加入茚三酮溶液 1.2mL，接着加入 pH8.0 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液[15]至 10mL，然后置于 70℃水浴中加热 30min 后取出，迅速冷却至室温后用磷酸缓冲液定容至 20mL。以空白溶液做对照，在 565nm 波长处测定各溶液的吸光度，以酪氨酸含量(x，mg)为横坐标，以吸光度为纵坐标(y)，绘制标准曲线，得回归方程为：$y = 0.4819x - 0.0006$，相关系数 $R^2 = 0.9938$。

2 结果与分析

2.1 茚三酮比色法测定氨基酸含量的条件确定

2.1.1 茚三酮用量的确定

取 0.4mL 灭菌乳、水浴温度 70℃、水浴时间 30min，茚三酮溶液用量分别为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4mL 进行单因素试验，测得氨基酸含量见图 1。

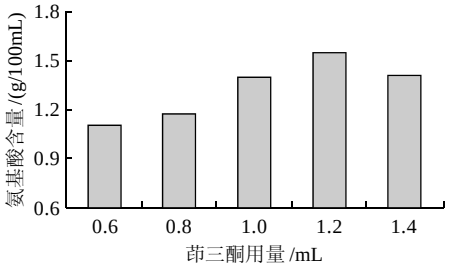

图 1 茚三酮用量对氨基酸含量测定的影响

Fig.1 Effect of ninhydrin solution amount on the determination of amino acid content

由图 1 可知，随着茚三酮溶液用量的增加，氨基酸含量先增加后逐渐减小，当茚三酮溶液用量在 1.2mL 时，氨基酸含量最大。由于氨基酸与茚三酮的结合处于饱和且氨基酸溶液被稀释，所以茚三酮溶液用量增加，氨基酸含量测定值反而减小，因此，确定茚三酮溶液用量为 1.2mL。

2.1.2 水浴温度的确定

取 0.4mL 灭菌乳、茚三酮溶液用量 1.2mL、水浴时间 30min，水浴温度分别为 60、70、80、90、100℃进行单因素试验，测得氨基酸含量见图 2。

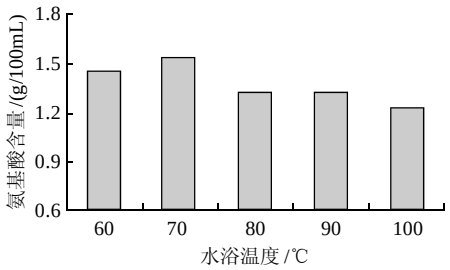

图 2 水浴温度对氨基酸含量测定的影响

Fig.2 Effect of water-bath temperature on the determination of amino acid content

由图 2 可知，随着水浴温度的增加，氨基酸含量逐渐减小，可能由于茚三酮溶液加热发生分解，与氨基酸结合的量变少。水浴温度为 70℃时，氨基酸含量最高。因此，确定最佳测定水浴温度为 70℃。

2.1.3 水浴时间的确定

取 0.4mL 灭菌乳、茚三酮溶液用量 1.2mL、水浴温度 70℃，水浴时间分别为 10、15、20、25、30、35min 进行单因素试验，测得氨基酸含量见图 3。

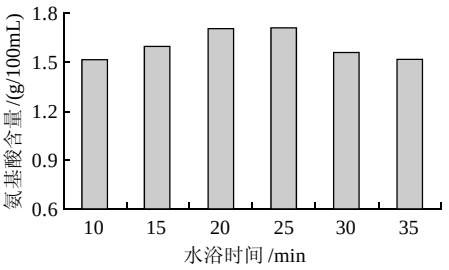

图 3 水浴时间对氨基酸含量测定的影响

Fig.3 Effect of water-bath heating time on the determination of amino acid content

由图 3 可知，在 20～25min 范围内，氨基酸含量趋于稳定且最大，随着加热时间的延长，氨基酸含量略有下降，可能由于茚三酮溶液加热发生分解所致，故确定 20min 为最佳水浴时间。

2.1.4 茚三酮比色法测定条件的正交试验优化

在单因素试验结果基础上，确定选取水浴温度、茚三酮用量、水浴时间这 3 个因素，设计三因素三水平

正交试验，对所得数据进行处理，确定反应的最佳组合条件。

表 1 正交试验设计方案及处理

Table 1 Orthogonal array design arrangement and results

试验号	*A* 水浴温度/℃	*B* 茚三酮用量/mL	*C* 水浴时间/min	*D* 空列	氨基酸含量/(g/100mL)
1	1(60)	1(1.0)	1(10)	1	1.29
2	1	2(1.2)	2(20)	2	1.41
3	1	3(1.4)	3(30)	3	1.48
4	2(70)	1	2	3	1.41
5	2	2	3	1	1.58
6	2	3	1	2	1.40
7	3(80)	1	3	2	1.38
8	3	2	1	3	1.31
9	3	3	2	1	1.44
K_1	4.18	4.08	4.00	4.29	
K_2	4.39	4.30	4.26	4.19	
K_3	4.13	4.32	4.44	4.22	
k_1	1.39	1.36	1.33	1.43	
k_2	1.46	1.43	1.42	1.40	
k_3	1.38	1.44	1.48	1.41	
R	0.08	0.08	0.15	0.02	

由表 1 的极差分析可知，对茚三酮比色法测定氨基酸含量影响最大的是因素 *C*，即水浴时间。水浴温度与茚三酮用量两因素的极差一样大，需进行方差分析进一步确定。通过正交试验直观分析结果得最佳测定条件为 $A_2B_3C_3$，经验证，$A_2B_3C_3$ 组合条件下测得氨基酸含量小于 9 组试验中氨基酸含量最高组 $A_2B_2C_3$，故确定最佳测定条件为 $A_2B_2C_3$，即水浴温度 70℃、茚三酮用量 1.2mL、水浴时间 30min。

表 2 方差分析表

Table 2 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design

变异来源	平方和	自由度	均方	*F* 值
A	0.033	2	0.017	16.5
B	0.032	2	0.016	16.0
C	0.054	2	0.027	27.0*
误差 *e*	0.002	2		
总变异	0.121	8		

注：$F_{0.05(2,2)}$=19.00；*. $P < 0.05$，差异显著。

由表 2 可知，水浴时间对茚三酮比色法的影响差异性达到显著水平；而水浴温度与茚三酮用量的影响差异性则不显著，从而可知实验时应严格控制水浴时间。

2.2 正交试验中最佳组合的重现性检验

取 0.4mL 灭菌乳，在茚三酮溶液用量 1.2mL、水浴温度 70℃、水浴时间 30min 条件下进行重现性实验，测定吸光度分别为 0.298、0.303、0.311、0.301，得相对标准偏差(RSD)为 1.84%，小于 5%，表明重现性良好。

2.3 茚三酮比色法对灭菌乳的适用性检验

取灭菌乳 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8mL，在茚三酮溶液用量 1.2mL、水浴温度 70℃、水浴时间 30min 条件下进行适用性实验，测定吸光度分别为 0、0.146、0.309、0.551、0.725，作灭菌乳浓度曲线，见图 4。可知，随着灭菌乳体积的增加，其吸光度相应呈线性增加，相关系数 $R^2 = 0.9944$，说明此法对灭菌乳中氨基酸的测定有良好的适用性。

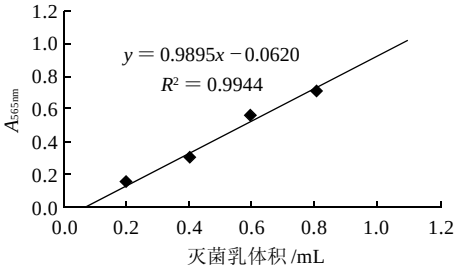

图 4 灭菌乳体积与其吸光度的关系曲线

Fig.4 Curve of sterilized milk concentration

3 结 论

茚三酮比色法测定灭菌乳中氨基酸含量的最佳条件为：水浴时间 30min、水浴温度 70℃、茚三酮用量 1.2mL。在此条件下，测得牛奶中氨基酸含量为 1.62g/100mL。水浴时间对茚三酮比色法的影响差异性达到显著水平；而水浴温度与茚三酮用量对茚三酮比色法的影响差异性则不显著，可知实验时应严格控制水浴时间。本实验重在对氨基酸测定条件进行改进，未将酪氨酸标准品加入灭菌乳中做回收率及精密度实验，但通过重现性及适用性检验，该方法具有操作简单、线性关系好、稳定性好、计算方便等特点。

参考文献：

[1] 李胜利, 高腾云, 杨贞耐, 等. 喝灭菌乳, 好处多[N]. 农民日报, 2010-07-24(01).
[2] 李嘉铭, 陈丛聪, 陆红, 等. 鲜牛奶重要指标的生化实验: 鲜牛奶的性价比分析[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(8): 30-32.
[3] 魏雅宁. 牛奶营养有‘‘三最”[N]. 健康时报, 2008-12-04(13).
[4] 陆东林, 张丹凤, 刘新丽, 等. 牛奶中的氨基酸含量及其营养价值[J]. 新疆畜牧业, 2001(4): 12-14.
[5] 王雪松, 曹德秋. 日常饮用的几种牛奶中酪蛋白含量的测定[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2008, 29(3): 320-322.
[6] 王小生. 必需氨基酸对人体健康的影响[J]. 中国食物与营养, 2005(7): 48-49.
[7] 刘志皋. 食品营养学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010: 191.
[8] 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(4): 162-165.
[9] 刘慧燕, 德力格尔桑, 方海田. 茚三酮比色法测定牛肉中游离氨基酸的试验研究[J]. 保鲜与加工, 2006(2): 23-25.
[10] 赵爱菊, 马美范. 茚三酮比色法测定酱油氨基酸含量中试验条件的探讨[J]. 山东轻工业学院学报, 1996, 10(2): 37-42.
[11] 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.
[12] 王昂, 王丽丽, 仪红, 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): 50-52.
[13] 胡京枝, 董小海, 余大杰. 牛奶及其制品中游离氨基酸含量的测定方法研究[J]. 河南畜牧兽医: 综合版, 2007(10): 29-31.
[14] 张水华. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 182.
[15] 王秀奇, 秦淑媛, 高天慧, 等. 基础生物化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 276.