

果蔬氨基酸成分测定方法的比较分析

胡家禹¹, 俞静芬², 张志祥¹, 凌建刚^{2*} (1. 宁波市惠贞书院, 浙江宁波 315016; 2. 宁波市农业科学研究院, 浙江宁波 315040)

摘要 果蔬中富含大量的氨基酸, 且部分氨基酸是人类自身无法合成的。测定果蔬中的氨基酸含量, 在植物营养分析研究中必不可少。由于测定方式存在差异, 可通过比较分析多种常见蔬菜氨基酸含量测定方法, 探讨出更符合当前经济生产的营养测定方式, 或是改进方案, 促进果蔬生产的进一步发展。

关键词 果蔬; 氨基酸成分; 测定方法

中图分类号 TS207.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)31-0042-03

Comparison Analysis of Determination Ways for Amino Acid Composition of Fruits and Vegetables

HU Jia-yu¹, YU Jing-fen², ZHANG Zhi-xiang¹, LING Jian-gang^{2*} (1. Ningbo Huizhen Academy, Ningbo, Zhejiang 315016; 2. Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo, Zhejiang 315040)

Abstract Fruits and vegetables are rich in amino acid, but some of them can't be synthesized. Determining fruits and vegetables' amino acid content is essential in plant nutrition analysis. By analyzing and comparing determination ways for amino acid content in several common fruits and vegetables, eventually figured out that there are many new approaches fit to the modern economic production, which promotes the development of production of seasonal fruits and vegetables.

Key words Fruits and vegetables; Amino acid composition; Determination way

氨基酸是蛋白质的基本结构单位, 是动物体合成蛋白质的原料。植物蛋白作为蛋白质的一种, 是由植物中提取的, 其营养与动物蛋白相仿, 且更易于消化^[1-3]。大豆、花生和核桃等都富含丰富的植物蛋白, 近年来研究发现, 植物蛋白对人体的健康发挥着动物蛋白无法比拟的作用^[4]。同时, 果蔬可溶性蛋白质含量也是一个重要的生理生化指标, 是果蔬品质和营养的重要评价指标之一。许多可溶性蛋白质是植物细胞的重要组成部分, 对植物的酶活性、抗衰老性、抗病性等都具有不可替代的作用, 对它的测定在植物营养分析研究中必不可少。因此, 分析测定氨基酸的含量是果蔬营养成分研究中最重要项目之一。

目前氨基酸成分测定主要有凯氏定氮法、氨基酸分析仪测定和液相色谱法等, 在测定豆类、薯类和谷类植物的蛋白质含量等方面应用非常广泛^[5]。除此之外, 甲醛滴定法、气相色谱法、纸色谱法和电化学法等也有一定的应用。笔者比较分析了多种常见蔬菜氨基酸含量的测定方法, 探讨出更符合当前经济生产的测定方式。

1 化学法

利用化学方法测定氨基酸含量, 一般是利用化学试剂与氨基酸发生颜色反应从而判断被测物中氨基酸的含量, 常用方法有凯式定氮法、双缩脲反应法、茚三酮比色法、考马斯亮蓝法等。

1.1 凯氏定氮法 凯氏定氮法是通过测定样品中总氮的含量, 然后根据蛋白质和氨基酸中的氮含量, 得知氨基酸、蛋白质总量。目前常用的凯氏定氮法有 3 种, 分别是全量法、微量法、改良后的凯氏定氮法^[5-7]。为了比较其中微量法和改良后的凯氏定氮法的准确度, 史玮等对同一份大豆样品进行

5 组平行对照试验, 结果显示, 采用改良后的凯氏定氮法测定大豆蛋白质含量自动化程度高, 标准偏差更小, 重复性更好^[8]。

向长萍等采用凯氏微量定氮法测定苦菜的粗蛋白含量时, 同样发现测得的数据与其他测定法相比较而言, 准确度更高^[9]。但是凯氏微量定氮法操作步骤复杂、试剂耗量多、测定周期长, 会为试验者带来许多困扰。贾丽艳等对自动凯氏定氮仪法进行了改良, 分别测定了同一份绿豆粉样本中氨基酸的含量, 并收集了相应的回收率试验数据^[10]。研究显示, 改进的自动凯氏定氮仪法明显缩短了消化装置的时间, 从而节省了人力, 同时, 从试验后废弃物排放含量中可以看出, 改进后的测定方法明显减少了污染气体的排放。改进后的凯氏定氮法在一定程度上提高了测定效率, 值得大范围推广和使用。

1.2 茚三酮比色法 茚三酮比色法是利用氨基酸在一定 pH 范围内能与茚三酮生成蓝紫色化合物的原理, 实现对氨基酸的鉴别。一般可以用比色法定量测定^[11]。

王昂等^[12]利用了茚三酮比色法测定谷氨酸含量, 借此试验对茚三酮比色法的优劣进行了进一步的探究。研究显示, 溶液的浓度、反应温度、时间等都会对试验产生相应的干扰, 如当谷氨酸浓度在 80~140 μg/mL 时, 只有在 90℃ 加热 20 min 以上才可完全反应。刘飞飞等^[13]探究了不同条件对茚三酮比色法测定赖氨酸浓度的影响, 主要从溶液 pH 和显色剂用量 2 个方面深入探究, 发现赖氨酸溶液在 pH 6.0 处有最大吸光度, 显色剂取 1.0 mL 时吸光度同样达到饱和状态, 从而得出结论: 最佳试验条件需要满足以上 2 点。这在一定程度上为茚三酮比色法测定氨基酸做出了巨大的贡献。王文平^[14]在测定豆芽氨基酸时对该方法进行了改进, 向反应体系中增加了抗坏血酸浓度, 减少了试验中因氨基酸含量不足带来的影响。茚三酮比色法在测定果蔬鲜样的游离氨基酸时得到广泛运用。

基金项目 宁波市科技新苗培养计划项目; 宁波市农业重大重点项目 (2013C11007)。

作者简介 胡家禹 (1998 -), 男, 浙江宁波人, 高中生。* 通讯作者, 副研究员, 从事蔬菜保鲜、运输研究。

收稿日期 2016-09-02

由此看来,利用茚三酮比色法测定氨基酸类型和浓度时,需要发挥其操作简单、成本低、准确度高的优点,同时要掌控好反应条件,使试验精度更高。掌握好该方法可以较快地测得植物蛋白中氨基酸含量,减少检测的时间和操作步骤,更快地达到试验目的。

1.3 双缩脲法 果蔬经研磨后配成相应溶液,溶液中的pH、温度、某些有机离子含量都有可能对氨基酸含量测定产生干扰。蛋白质能在碱性环境中与 Cu^{2+} 发生反应,生成紫红色产物,根据生成物质量计算出蛋白质浓度,故使用双缩脲法可以有效规避这些因素的干扰^[15-17]。此方法应用于蛋白质测定已有近百年历史,它被认为是一种较为经典的蛋白质测定方法。

刘邻涓等^[18]利用该法测定了荞麦蛋白质含量,结果与标准溶液中蛋白质含量基本相等,说明双缩脲法精确度较高。他们还发现这种方法不仅适用于蛋白质溶解度高的样品的总蛋白质含量分析,还适用于只需要分析出样品中高溶解度蛋白质的含量。陈宁清等^[19]对比了在使用不同的仪器、校准物、检测试剂情况下双缩脲检验蛋白质的精度,发现仪器对结果偏倚不大,但是不同的校准物和检测试剂对测试结果影响较大,因此有必要根据实验室状况筛选相应的试剂。

双缩脲法具有简便、快速等优点,能有效应用到蔬菜氨基酸含量测定中。但是,在选取标准样品、绘制标准曲线时,需考虑是否与待测样品相同或相近,因此当待测样品种类多样时,不宜用该方法测蛋白质总量。

1.4 考马斯亮蓝法 考马斯亮蓝法是蛋白质研究领域一种新建立的测定蛋白质含量的方法,该方法以考马斯亮蓝试剂为蛋白质染色,最后定量测得离子的量进而计算出蛋白质的量^[20-22]。与传统方法相比,该法具有易操作、更快、更敏捷、受干扰程度低等优点。

经大量的研究表明,在测定植物的可溶性蛋白质时,凯氏定氮法、双缩脲法等都存在着一一定的缺陷。由于考马斯亮蓝试剂会与蛋白质结合,形成染料复合物,对不同物质起到分辨作用,因此能较好地排除糖类、甘氨酸、其他化合物干扰,其试验结果同样与蛋白质标准曲线近乎吻合^[23-25]。

王文平等^[26]对野木瓜多糖中蛋白质含量的测定和罗群^[22]对菜籽粕中蛋白质含量的定量检测均采用考马斯亮蓝法。这些研究得出,考马斯亮蓝法能有效测定可溶性蛋白质含量,这为植物氨基酸的检测提供很好的保障。考马斯亮蓝法为化学法测定蛋白质打下了良好的基础,该方法的使用,也为蛋白质工业做出了巨大的贡献。通过这种方法,可以更进一步地去了解、探究生物蛋白质成分。由于这种方法较为简单易行,成本较低,具有较广阔的应用前景。

2 物理法

利用蛋白质的物理性质测定蛋白质含量,如密度、折射率、紫外吸收、荧光性等,常用的方法有液相色谱法、紫外分光光度法等。与其他方法相比,物理法测氨基酸含量所需要的精确度更高,但在先进仪器的帮助下,也能使得测定结果

更为准确^[27]。

2.1 液相色谱法 液相色谱法分离机理是利用待分离的物质在两相中的分配系数和吸附能力等亲和力的不同进行分离的。通过一系列复杂的物化反应,最后实现对混合物各组分分离和检测。经典液相色谱在测定上存在耗时长、效率低的缺点,而高效液相色谱比起前者实现了自动化操作,同时提高了效率^[28-31]。

高效凝胶过滤液相色谱法的使用是液相色谱法在蛋白质测定上的又一次突破,王梅等^[32]就以此方法对玉米蛋白酶解产物进行了测定,并较为准确地得出其蛋白酶含量和蛋白酶解产物寡肽的分子量。唐玲玲等^[33]为了进一步了解高效液相色谱法的优点,归纳、比较了多种蛋白质的分离检测方法,从而总结出:高效液相色谱法可以较好地弄清楚蛋白质的生理特性,并且该方法具有分离效率高、分析速度快、样品用量少、灵敏度高、分离和测定一次完成等优点。

在测定棉籽蛋白中总棉酚与游离棉酚含量试验中,唐辉等^[34]用高效液相色谱法测量了2种蛋白粉含量,发现回收率为95.3%~101.7%。因此,试验认为高效液相色谱法测定既准确,又可靠。液相色谱法能普遍运用,正是因为这种方法较为快速、方便,因此科学家们不断更新、提升液相色谱仪的性能,以推动蛋白质化学的发展。

2.2 紫外分光光度法 紫外分光光度法是利用一定波长下蛋白质溶液的光吸收值与蛋白质浓度的正比关系,进行蛋白质含量的测定^[35-37]。

花生中含有多种人体必需的氨基酸,如亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸等,而紫外分光光度法能够精确地测定这些氨基酸的含量。徐澜等利用紫外分光光度法测定色氨酸和酪氨酸,意在检验紫外分光光度法是否适用该类氨基酸的检测。经多次测定,徐澜等发现,在有18种不同氨基酸的混合液中,以0.1 mol/L的NaOH为溶媒情况下,在280~310 nm波长中只有色氨酸和酪氨酸能显示,通过该方案可以有效测定色氨酸和酪氨酸的含量。试验还得出,当该方法运用于复方氨基酸注射液测定时,效果也极其显著^[38]。

董欣等^[39]为了提高紫外分光光度法的准确度,又对17种不同的氨基酸进行了紫外光谱的再测定,利用不同的溶媒,寻找不同氨基酸的最适波长。这为氨基酸的研究测定提供了更可靠的技术支持。

3 结语

对于果蔬而言,不同种类的氨基酸是其生长发育中必不可少的成分^[40]。如果能够更加高效、准确地测定果蔬中各种氨基酸的含量,或许能为消费者提供更多选择。然而在实际检测果蔬氨基酸含量时,不同的测定方法各有利弊。总体来说,需要根据相关情况来寻求一个适合的测定方法。但这并不意味着按图索骥进行测量,许多研究者分析比较多种测定方法,探索、制定出新式测定方案,为该种营养物质的测定提供了优良的条件。

参考文献

- [1] 刘晓铭. 蔬菜营养与健康[J]. 农业新技术, 1986(3): 40.
- [2] 顾元龙. 蔬菜营养与保健(二)[J]. 上海蔬菜, 2001(5): 35.

- [3] 李昌龙. 各种氨基酸的作用[C]//2013年国际氨基酸产业发展高峰论坛. 上海:中国生物发酵产业协会,2013.
- [4] 陈贵堂,赵霖. 植物蛋白的营养生理功能及开发利用[J]. 食品工业科技,2004(9):137-140.
- [5] 陈智慧,史梅,王秋香,等. 用凯氏定氮法测定食品中的蛋白质含量[J]. 新疆畜牧业,2008(5):22-24.
- [6] 宗留香,肖青苗,康怀彬. 半微量凯氏定氮法测定蛋白质消化工艺的改进[J]. 食品工业科技,2007(5):232-234.
- [7] 陈智慧,史梅,王秋香,等. 用凯氏定氮法测定食品中的蛋白质含量[C]//高光,朱明文. 首届中国兽药大会暨中国畜牧兽医学动物药理学分会2008年学术年会. 天津:中国畜牧兽医学学会,2008:22-24.
- [8] 史伟,孙莹,徐振斌. 凯氏定氮法测定粮食蛋白质含量方法研究[J]. 粮食科技与经济,2013,38(5):31-32.
- [9] 向长萍,吴昌银,汪李平. 苦瓜营养成分分析及利用评价[J]. 华中农业大学学报,2000(4):388-390.
- [10] 贾丽艳,王丽丽. 对微量凯氏定氮法测定蛋白质含量的改进[J]. 农产品加工·学刊,2010(1):64-65.
- [11] 邵金良,黎其万,董宝生,等. 茛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.
- [12] 王昂,王丽丽,仪宏,等. 茛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] 刘飞飞,李群,于岚. 茛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.
- [14] 王文平. 植物样品中游离氨基酸总量测定方法的改进[J]. 北京农学院学报,1998(3):9-13.
- [15] 程涛,孙艳波,李健. 双缩脲法测定乳中酪蛋白含量[J]. 中国乳品工业,2000,28(3):33-35.
- [16] 张立娟,姜瞻梅,姚雪琳,等. 双缩脲法检测大豆分离蛋白中蛋白质的研究[J]. 食品工业科技,2008,29(7):241-242.
- [17] 李英. 利用一定实验材料和器具设计实验[J]. 中学生物学,2005,21(3):38.
- [18] 刘邻渭,陶健,毕磊. 双缩脲法测定荞麦蛋白质[J]. 食品科学,2004,25(10):258-261.
- [19] 陈宁清,郑司雨. 双缩脲试剂在检测蛋白质上的应用研究[J]. 中国医疗器械杂志,2014,38(6):458-460.
- [20] 邓丽莉,潘晓倩,生吉萍,等. 考马斯亮蓝法测定苹果组织微量可溶性蛋白含量的条件优化[J]. 食品科学,2012(24):185-189.
- [21] 王孝平,邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. 天津化工,2009,23(3):40-42.
- [22] 罗群. 考马斯亮蓝法快速测定菜籽粕中可溶性蛋白质的含量[J]. 成都大学学报(自然科学版),2014,33(2):125-126.
- [23] 安志强,孙新顺,乔文庆. 考马斯亮蓝法测定青霉素发酵液中可溶性蛋白质含量[J]. 河北化工,2010,33(9):60-61.
- [24] 赵英永,戴云,崔秀明,等. 考马斯亮蓝G-250染色法测定草乌中可溶性蛋白质含量[J]. 云南民族大学学报(自然科学版),2006,15(3):235-237.
- [25] 柳荫,吴凤智,陈龙,等. 考马斯亮蓝法测定核桃水溶性蛋白含量的研究[J]. 中国酿造,2013,32(12):131-133.
- [26] 王文平,郭祁远,李琳,等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):115-117.
- [27] 刘俊,吉晓佳. 检测植物组织中多胺含量的高效液相色谱法[J]. 植物生理学学报,2002,38(6):596-598.
- [28] 万丹晶,陈妙芬,翟咏虹. 用HPLC法和氨基酸分析仪测定多维氨基酸片中18种氨基酸[J]. 药学服务与研究,2006(3):212.
- [29] 王艳. 高效液相色谱法的发展和探究[J]. 中国化工贸易,2013(12):313.
- [30] 张玉. 液相色谱法的发展及应用[J]. 中国科技博览,2015(27):349.
- [31] 吴少辉,张成桂,刘光明. 高效液相色谱法在蛋白质分离检测中的应用[J]. 畜牧与饲料科学,2011(8):63-65.
- [32] 王梅,戴军,谷文英. 高效凝胶过滤色谱法测定玉米蛋白酶解产物寡肽的分子量分布[J]. 食品与发酵工业,1998,5(5):25-27.
- [33] 唐玲玲,夏明. 高效液相色谱法在蛋白质分离检测中的应用[J]. 农产品加工·学刊,2009(1):89-92.
- [34] 唐辉,姚新成,田晨煦,等. HPLC法测定食用棉籽蛋白中棉酚含量[J]. 农垦医学,2004,26(1):1-2.
- [35] 付金娥,韦树根,冀晓雯,等. 微波消解-紫外分光光度法测定三叶青总游离氨基酸[J]. 南方农业学报,2015(2):303-307.
- [36] 车兰兰,李卫华,林勤保. 氨基酸分析检测方法的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2011,33(2):39-42.
- [37] 曹红翠. 紫外分光光度法测定蛋白质的含量[J]. 广东化工,2007,34(8):93-94.
- [38] 徐澜,安伟. 紫外分光光度法同时测定色氨酸和酪氨酸[J]. 光谱实验室,2011,28(5):2320-2323.
- [39] 董欣,王丽燕. 氨基酸紫外光谱的再测定[J]. 德州学院学报,2015(2):44-46.
- [40] 黄艳. 常见果蔬中游离氨基酸含量的测定[J]. 安徽农业科学,2013,41(9):4088-4089.

(上接第41页)

参考文献

- [1] 梁庆华,邱德生. 充分利用芋头原料资源 推动我国芋头产业发展[N]. 中国食品报,2013-6-03(006).
- [2] 徐东旭,张友才,徐永忠. 无公害龙香芋高产栽培技术[J]. 农业科技通讯,2004(1):6-7.
- [3] 施帅,李志方,瞿桂香,等. 泰州芋头营养成分及其淀粉性质的研究[J]. 食品工业科技,2016,37(5):82-83.
- [4] 顾贤永,徐东旭,高文道,等. 兴化龙香芋优质高产栽培技术[J]. 上海蔬菜,2013(3):36-38.
- [5] 吴家浩,薛玉峰,刘翔,等. 兴化龙香芋高效栽培技术[J]. 现代园艺,2014(2):35.
- [6] 王保鱼. 蜂蜜西米露的家庭做法[J]. 中国蜂业,2013(3):58.
- [7] AHMAD F B, WILLIAMS P A, DOUBLIER J L, et al. Physico-chemical characterization of sago starch [J]. Carbohydrate polymers, 1998, 38: 361-362.
- [8] 陈福泉,钟碧璜,吴正双,等. 西米淀粉颗粒性质的研究[J]. 食品科技,2009,34(12):193-196.
- [9] 姜绍通,程元珍,汪洪普,等. 红枣芋泥的配方优化及产品特性研究[J]. 中国食物与营养,2013,19(5):43-47.
- [10] 陈运中,刘章武. 甘薯(芋头)冰激凌工艺和配方研究[J]. 武汉食品工业学院学报,1994(2):7-10.
- [11] 蒋高松, LAWRENCE RAMSDEN, HAROLD CORKE. 芋头在加工食品中的应用[J]. 中国食品工业,1998,5(12):14.
- [12] 檀子贞,王红育,吴雅静. 芋头乳酸菌发酵酸奶的研究[J]. 食品研究与开发,1999,20(3):19-20.
- [13] 吕志俭,姜汝燕. 应用模糊数学评价食品的感官质量[J]. 食品科学,1986(3):1-3.
- [14] 余疾风. 在食品感官质量的模糊综合评价中如何正确的制定权重分配方案[J]. 食品科学,1990(1):15-16.
- [15] 刘安军,刘有志,史建超. 模糊数学评价法在鹅肝酱研制中的应用[J]. 食品研究与开发,2006,27(11):82-83.
- [16] 花旭斌,李正涛,林巧. 模糊数学综合评价方法在苦荞麦食品研究中的应用[J]. 西昌农业高等专科学校学报,2004,18(3):41-42.
- [17] 姬良英. 感官模糊综合评价中权重分配的正确制定[J]. 食品科学,1991(3):9-10.