

原子吸收光谱间接测定色氨酸的研究¹

胡宝祥 杨未 刘文涵^o 王晓兵
(浙江工业大学化学工程与材料学院 杭州市朝晖六区 310014)

摘 要 色氨酸(Tryptophan, Trp)在碱性条件下与新生成的 ZnS 悬浮液反应,生成可溶性碱式色氨酸锌配合物,再用塞曼原子吸收光谱测定溶液中的总锌浓度即可间接的得到色氨酸的含量。优化了测定的最佳条件,在 pH 9.10 的 2% 硼砂底液中于室温下,使色氨酸试液与新生成的 ZnS 悬浮液反应 22min,离心分离后测定上层清液的 FAAS 响应。在所选定的条件下色氨酸测定的线性浓度范围为 0—18.5 mg · mL⁻¹,特征浓度为 0.219mg · mL⁻¹,检出限为 1.414mg · mL⁻¹。该法用于样品中的色氨酸测定,其相对标准偏差 RSD 为 4.12%,方法的回收率在 70.1%—120.3%之间。并对测定机理进行了探讨。

关键词 火焰原子吸收光谱法,色氨酸,间接测定,硫化锌法。

中图分类号:O657.31;Q517 文献标识码:A 文章编号:1004-8138(2006)06-1307-04

1 引言

L-色氨酸(Tryptophan, Trp)又名氨基吲哚丙酸,是天然的氨基酸,而 DL、D 型色氨酸是非天然氨基酸,D-色氨酸在我国目前仍处于实验室研究阶段,其工业化生产依然处于空白。色氨酸是血胺的重要前体物,它具有一定镇静作用,如抑制睡眠、温度调节、疼痛敏感性及攻击行为。广泛应用于医药、食品、农牧渔业、农药、化妆品、保健品等领域。可用作氨基酸输液,综合氨基酸制剂,孕妇营养补剂和婴幼儿的特殊奶粉添加剂,烟酸缺乏症治疗药等等。

利用原子吸收光谱间接测定谷氨酸曾有报道^[1-3],一般为利用金属铜的化合物,如磷酸铜沉淀或其悬浮液与氨基酸反应,形成铜配合物,离心沉降后,测定上层清液中的铜含量,来达到间接测定氨基酸含量的目的。由于该方法所用的磷酸铜的 K_{sp} 不是很小,因而在测定清液中本底铜离子的浓度会影响测定,使本底背景含量有所提高。

本文在硫化锌法原子吸收光谱间接测定谷氨酸^[4-6]的基础上,试验发现 L-色氨酸亦能与 K_{sp} 很小的、新生的硫化锌悬浮液反应,生成碱式色氨酸锌配合物,离心分离 ZnS 沉淀后,用火焰原子吸收测定上层清液中的锌含量,进而间接的测定色氨酸的含量。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

180-80 型塞曼火焰原子吸收分光光度计(日本日立公司);日立牌锌空心阴极灯;HI 9321 Microprocessor pH Meter(意大利 Hanna Instruments)。

¹ 浙江省分析测试基金(04128)、浙江省应用化学重中之重实验室开放课题资助

^o 联系人,电话:(0571)88320487;E-mail:liuw@h.zj.cn;http://liuw.h.zj.com

作者简介:刘文涵(1956—),男,浙江省杭州市人,教授,硕士生导师,主要从事仪器分析、分析仪器技术,计算机化学及在线检测的教学和科研工作。

收稿日期:2006-08-28;接受日期:2006-09-22

L-色氨酸($C_{11}H_{12}N_2O_2$)标准溶液($50mg \cdot mL^{-1}$):准确称取 2.5000g L-色氨酸(上海康捷生物科技发展有限公司生产,生化试剂,层析纯)溶于 10mL $0.1mol \cdot L^{-1}$ 的 NaOH 溶液,用蒸馏水在 50mL 容量瓶中稀释至刻度。用时临时配制,不宜放置过长时间。

氯化锌溶液(5%):称取 5.0g $ZnCl_2(AR)$ 溶于 95mL 的离子交换水中,摇匀。

硫化钠溶液(3%):称取 $Na_2S(AR)$ 固体 3.0g,溶于 97mL 的离子交换水中,摇匀。

硼砂溶液(2%, pH= 9.10):称取 20g 固体硼砂溶于 980mL 的离子交换水中。

试剂均为 AR 级或以上,实验用水为离子交换水。

2.2 实验步骤

硫化锌悬浮液的制备:取 2mL 5%氯化锌溶液,边搅拌边加入 3mL 3%硫化钠溶液,摇匀后离心分离,倾去上层清液,用 6mL 2%硼砂水溶液将沉淀洗涤两次,加 0.3g 固体 NaCl,用 2%的 $Na_2B_4O_7$ 溶液将沉淀稀释至 100mL。

准确移取一定量的色氨酸标准溶液或样品溶液于 10mL 离心管中,加入 1.5mL ZnS 悬浮液,用力振荡均匀,放置 22min,用离子交换水稀释至 6.00mL,摇匀,离心分离后,以试剂空白为参比,用塞曼火焰原子吸收测定上层清液中锌的 FAAS 信号响应。

3 结果与讨论

3.1 色氨酸的测定原理

利用色氨酸在一定条件下能与硫化锌中的锌发生配合反应^[4-6],定量的形成配合物,再将溶液中多余的硫化锌沉淀分离,测定上层清液中的总锌含量,即可以间接的测定色氨酸的含量。经初步试验表明,在碱性条件下,色氨酸根可以从硫化锌中夺取锌,形成更稳定的可溶性碱式色氨酸锌配合物,因而可以采用硫化锌来进行色氨酸的间接测定。

3.2 塞曼原子吸收仪器工作条件选择

经过试验和选择,仪器的最佳工作条件列于表 1。测定表明,锌离子在 $0-3.98Lg \cdot mL^{-1}$ 的浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系,线性回归方程为 $A=0.0907C+0.0865$,线性相关系数为 $r=0.9936$ 。

表 1 塞曼原子吸收测定条件

元素	波长 K(nm)	灯电流 I(mA)	狭缝 S K (nm)	燃烧器高度 h(mm)	空气压力 p(MPa)	乙炔压力 p(MPa)
Zn	213.9	10.0	0.4	7.5	0.186	0.034

3.3 反应酸度的影响

用不同 pH 的缓冲溶液进行色氨酸锌的配合反应试验,结果如图 1。由于 ZnS 在 $pH < 7$ 时会发生溶解,因而只能在碱性溶液中进行考察。随着 pH 的增大,吸光度相应随之增大,在 pH 9.10 时达到最大值,表明此时形成了色氨酸锌的可溶性配合物,可以用于间接测定。故选择以 2%的 $Na_2B_4O_7$ 溶液(pH 9.10)作为 ZnS 悬浮液和色氨酸配合反应的底液。

3.4 反应时间的影响

在室温下测定了 6.0mL 色氨酸标准溶液与 4.0mL ZnS 悬浮液的(在 pH 9.10 下)反应时间对测定值的影响,如图 2 所示。结果表明,反应时间在 0—20min 区间内,溶液中锌的吸光度随反应时间的增加而增大,反应时间达到 20min 后,达到稳定值,表明配合反应基本达到平衡。选择 22min 能满足测定的需要。

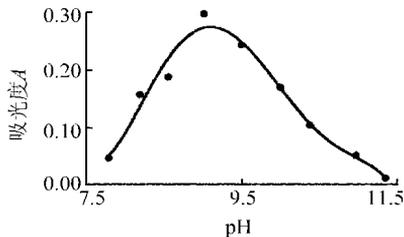


图 1 不同 pH 对色氨酸锌的影响

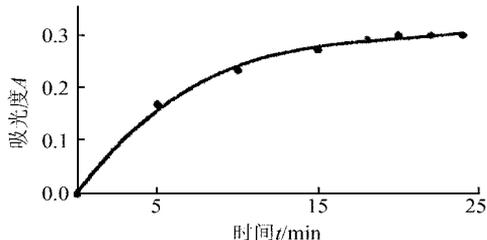


图 2 反应时间与吸光度关系

3.5 ZnS 用量的影响

分别吸取 0.0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL ZnS 溶液和 2.0 mL L-色氨酸溶液于 10 mL 离心管中, 摇匀, 放置反应 22 min 后, 用 2% 硼砂溶液稀释至 6 mL, 离心分离 10 min 后取出。吸取上层清液测定其吸光度信号, 结果如图 3 所示。可以看出随着 ZnS 加入量的增加, 吸光度也增加, 到 1.5 mL 后达到最大值并趋于恒定, 选择 1.5 mL 作为 ZnS 的用量。

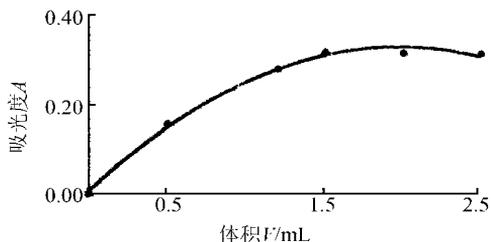


图 3 ZnS 加入量与吸光度关系

3.6 反应温度的影响

试验了从室温 20°C 到 60°C 时, 不同温度下的配合反应后的结果表明反应温度几乎没有影响, 因而实验选择室温作为反应温度。

3.7 色氨酸的校准曲线

在选定的仪器工作条件和室温下, 以 2% 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液为底液, ZnS 悬浮液加入量为 1.5 mL, 再加入不同量的色氨酸, 用水稀释至 6.00 mL 摇匀, 配合反应时间 22 min, 离心分离后, 以试剂空白作参比, 用塞曼火焰原子吸收测定上层清液中锌的 FAAS 吸收值, 得到不同浓度下的色氨酸的校准曲线, 如图 4。从图 4 可以看出测定色氨酸的线性工作范围在 0—18.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内, 其线性回归方程为 $A = 0.0202C + 0.0031$, 相应的线性相关系数为 $r = 0.9935$, 特征浓度为 $0.219 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检出限为 $1.414 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

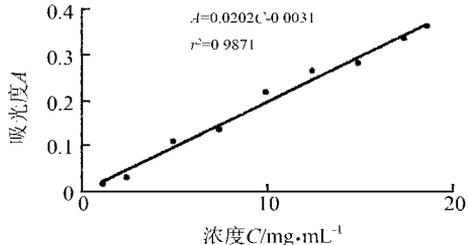


图 4 色氨酸校准曲线

3.8 共存离子的影响

试验了 Cd^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Mo^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 共存时, 在一定量情况下不产生干扰。由于 Ag_2S 的 K_{sp} 比 ZnS 更小, 当有 Ag^+ 存在时, 将会形成 Ag_2S 而解离出 Zn^{2+} , 干扰测定。

3.9 样品分析

取普通自来水配制成的模拟样品, 经稀释后按选定条件进行测定, 结果列于表 2。其回收率在 70.1%—120.3% 之间, RSD 为 4.12%, 总体表明, 该方法可用于色氨酸的测定。

表 2 样品测定结果

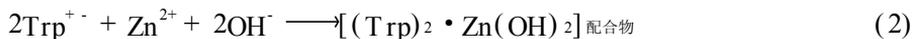
模拟样品浓度 $C(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	实测值 $C(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	平均值 $C(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	标准偏差	相对标准偏差 RSD(%)	回收率 R(%)
3.050 3.050	3.670 3.257	3.464	0.292	8.43	120.34 106.78
6.099 6.099	4.777 5.032	4.905	0.180	3.68	78.33 82.50
9.149 9.149	6.435 6.412	6.424	0.016	0.25	70.33 70.08

3. 10 反应机理

硫化锌在水溶液中存在平衡: $\text{ZnS} \rightleftharpoons \text{Zn}^{2+} + \text{S}^{2-}$, 而色氨酸在一定的碱性溶液中以色氨酸根形式存在, 存在以下平衡:



经研究认为是生成的显 0 价电中性的色氨酸根 $\text{Trp}^{\cdot-}$ 与 ZnS 中解离出的 Zn^{2+} 在碱性条件下反应生成更加稳定的碱式色氨酸锌可溶性配合物。



在所选定的条件下测定溶液中的总锌离子的浓度, 由于硫化锌的 K_{sp} 很小溶液中的锌离子的本底浓度很低, 约在 $10^{-7} \text{Lg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对测定不会带来影响, 溶液中的总锌浓度可以看成仅仅是色氨酸根与锌离子反应生成的配合物浓度, 测定其浓度, 即可间接的得到色氨酸的浓度。

采用本法测定较单纯的色氨酸体系时, 对于所加入的补锌元素因有 S^{2-} 的存在形成沉淀不会产生干扰; 而文献采用磷酸铜法测定时补锌元素将有影响。

参考文献

- [1] 孙智敏, 张德强, 孙汉文. 火焰原子吸收法间接测定调味品中的谷氨酸[J]. 分析仪器, 2000, (3): 33—35.
- [2] 李尚德, 李移, 莫丽儿等. 谷氨酸锌的合成最佳条件研究[J]. 广东微量元素科学, 2001, 8(12): 54—57.
- [3] 杨光, 郎惠云. 原子吸收光谱法在药物分析中的应用及进展[J]. 分析科学学报, 2000, 16(1): 76—80.
- [4] 刘文涵, 单伟光等. 硫化锌法原子吸收间接测定谷氨酸络合反应的机理研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(6): 1191—1193.
- [5] 刘文涵, 章庆新, 张清义等. 谷氨酸的硫化锌法原子吸收光谱间接测定[J]. 分析测试学报, 2003, 22(4): 58—60.
- [6] 刘文涵, 张丹, 郑建珍等. 原子吸收硫化锌法间接测定精氨酸络合反应的机理研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(1): 147—150.

Indirect Determination of Tryptophan by Flame Atomic Absorption Spectrometry

HU Bao-Xiang YANG Wei LIU Wen-Han WANG Xiao-Bing

(College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, P. R. China)

Abstract Tryptophan reacts with zinc sulfide of new suspension in the pH 9. 10, 2% $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ solution and forms a soluble complex of zinc tryptophan. The tryptophan was determined indirectly by determining the total zinc in solution by Zeeman flame atomic absorption spectrometry. The reaction time of tryptophan solution with ZnS is 22min at room temperature. The linear range of tryptophan is 0—18. 5mg $\cdot \text{mL}^{-1}$. The characteristic concentration is 0. 219mg $\cdot \text{mL}^{-1}$. The detection limit is 1. 414mg $\cdot \text{mL}^{-1}$. The recovery is in the range of 70. 1%—120. 3% with the RSD of 4. 12%. The mechanism of reaction was also studied.

Key words Flame Atomic Absorption Spectrometry, Tryptophan, Indirect Determination, ZnS .

本刊可上网查阅

由于本刊在 2001—2009 年被《中国核心期刊(遴选)数据库》收录, 全文上网, 因此, 读者、作者均可直接上网查阅。网址:

<http://www.periodicals.net.cn>

<http://www.wanfangdata.com.cn>

<http://gpsys.periodicals.net.cn>

<http://gps.chinajournal.net.cn>