

L-鸟氨酸快速定量检测方法

黄爱清¹ 苏国成² 王璋¹

1(中国食品发酵工业研究院,北京,100027) 2(集美大学生物工程学院,厦门,361201)

摘要 在参照 Chinard 的 L-鸟氨酸测定方法的基础上,确定了一种有效、高灵敏度的 L-鸟氨酸快速定量检测方法。用 6 mol/L H_3PO_4 -冰乙酸(1/3, V/V)配制浓度为 25 mg/mL 茚三酮混合酸溶液作为显色液,在 100℃ 水浴锅中 60 min 反应后,波长 510 nm 下比色测定 L-鸟氨酸浓度。该反应体系稳定,受其他氨基酸的影响程度很小,或者在发酵液等的实际测定体系中存在量极少而可以忽略不计,线性范围为 0~0.20 $\mu\text{mol/mL}$,检测精度为 0.01 $\mu\text{mol/mL}$ 。

关键词 L-鸟氨酸,茚三酮,分光光度法

L-鸟氨酸是一种非蛋白氨基酸,是尿素循环中重要中间代谢产物之一;同时也是脯氨酸、谷氨酸、精氨酸和多胺代谢的关键中间代谢产物。其分析检测方法主要有氨基酸分析仪法^[1]、液相色谱^[2~4]、气相色谱^[5,6]、离子交换色谱^[7,8]、酶法分析^[9~13]和比色法^[10,11,14~17]。但是,这些方法或者准确性差、精确度低,或者所需费用高、耗用时间长,迄今为止,L-鸟氨酸一直没有一个合适、有效、可以被广为接受的快捷分析方法。Chinard^[14]阐述了在低酸性条件下,1 mol L-鸟氨酸可以与 2 mol 茚三酮反应生成一种红色物质,且灵敏度比较高,而且在这种低酸性条件下,除脯氨酸、羟脯氨酸、瓜氨酸和赖氨酸外,其他大部分氨基酸不会形成有色物质,因此,对反应干扰不大。本实验针对 Chinard 方法中脯氨酸、赖氨酸等对测定仍存在严重的干扰,在实际应用上还有一定困难等多种问题,集中分析研究了测定体系中吸收波长、混酸比例等一系列可能减少 L-鸟氨酸显色反应的干扰因素,确定了一种既简单、快速,又具有较高灵敏度的 L-鸟氨酸定量分析检测方法。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

L-鸟氨酸单盐酸盐(99%)和 L-精氨酸(99%)为 Sigma 公司产品,L-瓜氨酸(99%)为 Acros 公司产品,其他氨基酸均为购自北京欣经科生物技术有限公司的 Amresco 公司分装产品,纯度均为 99%;茚三酮(AR),北京化学试剂公司;85% H_3PO_4 (AR),北京益利精细化学品有限公司;冰乙酸(AR),北京化学试剂公司;其他试剂均为国产分析纯。721 分光光度

计,上海精密科学仪器有限公司。

1.2 试剂的配制

所有试剂溶液配制后均采用相应容量瓶定容,并置于 4℃ 冰箱贮存备用。

1.2.1 6 mol/L H_3PO_4 溶液的配制

准确量取 41 mL 85% H_3PO_4 后以蒸馏水定容至 100 mL。

1.2.2 混酸溶液的配制

6 mol/L H_3PO_4 与冰乙酸(HAc)分别以 1:5、1:3 的体积比配制。

1.2.3 25 mg/mL 茚三酮反应液的配制

准确称量 1.250 g 茚三酮,加入到装有 50 mL 混酸的烧杯中于 70℃ 水浴中使茚三酮完全溶解后定容,并转入棕色试剂瓶中。

1.2.4 L-鸟氨酸单盐酸盐标准液的配制

准确称取 0.034 g L-鸟氨酸单盐酸盐,加入装有 70 mL 蒸馏水的烧杯中,充分溶解后定容至 100 mL,其浓度相当于 2.0 $\mu\text{mol/mL}$ 。

1.2.5 其他氨基酸标准溶液

准确称量 0.030 g L-天冬氨酸(Asp)、0.026 g L-亮氨酸(Leu)、0.035 g L-精氨酸(Arg)、0.023 g L-缬氨酸(Val)、0.041 g L-色氨酸(Trp)、0.026 g L-异亮氨酸(Ile)、0.018 g L-丙氨酸(Ala)、0.033 g L-苯丙氨酸(Phe)、0.024 g L-苏氨酸(Thr)、0.030 g L-蛋氨酸(Met)、0.029 g L-谷氨酸(Glu)、0.023 g L-脯氨酸(Pro)、0.035 g L-瓜氨酸(Cit)、0.015 g L-甘氨酸(Gly)、0.022 g L-半胱氨酸(Cys)、0.037 g L-赖氨酸盐酸盐(Lys)和 0.036 g L-酪氨酸(Tyr),分别以蒸馏水定容至 100 mL,浓度各相当于 2.0 $\mu\text{mol/mL}$ 。使用时,准确吸取适量上述氨基酸标准溶液,分别用适量蒸馏水稀释成 0.20 $\mu\text{mol/mL}$ 的氨基酸溶

第一作者:硕士研究生(王璋高级工程师为通讯作者)。

收稿日期:2005-09-15

液。

1.3 实验方法

1.3.1 基本操作程序

参照 Chinard 建议的方法并进行改良。即准确吸取 2.0 mL L- 鸟氨酸单盐酸盐标准液于 10 mL 的具塞比色管中,加入混酸溶液,在恒温水浴锅中反应显色后取出,迅速冷却至室温,再加入适量冰乙酸使得比色液体积达到 10 mL 后测定 OD 值。空白对照组则分别以蒸馏水和混酸溶液替代,进行同样的分析比较。

1.3.2 吸收波长的选择

以 0.20 $\mu\text{mol/mL}$ L- 鸟氨酸单盐酸盐标准液为分析样液,分别测定了 400~640 nm 之间的 OD 值。

1.3.3 显色温度的影响

L- 鸟氨酸标准样液同 1.3.2,分别在 60℃、70℃、80℃、90℃ 和 100℃ 下反应,在 1.3.2 所确定的最适吸收波长处测定 OD 值。

1.3.4 反应时间的影响

在确定的最适吸收波长和反应温度的基础上,分别考察 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min 和 60 min 时的 OD 值。

1.3.5 H_3PO_4 与冰乙酸体积比对反应的影响

由于 6 mol/L H_3PO_4 与冰乙酸配比不同,可能会引起不同的 pH 值,从而影响反应体系的灵敏度。因此,选择 6 mol/L H_3PO_4 与冰乙酸体积比为 1:5、1:3、1:1、3:2 和 3:1 进行混合,配成酸性溶液,考察不同配比下,茚三酮反应液对 0.20 $\mu\text{mol/mL}$ L- 鸟氨酸测定的灵敏度的影响。

1.3.6 线性范围的选择

分别吸取 0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL、6.0 mL、7.0 mL、8.0 mL、9.0 mL、10.0 mL、11.0 mL、12 mL 的 2.0 $\mu\text{mol/mL}$ L- 鸟氨酸单盐酸盐标准液,分别用适量蒸馏水稀释并定容至 100 mL,即 0.01 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.02 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.04 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.06 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.08 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.10 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.12 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.14 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.16 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.18 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.20 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.22 $\mu\text{mol/mL}$ 和 0.24 $\mu\text{mol/mL}$ 的 L- 鸟氨酸单盐酸盐标准梯度溶液,依据实验操作程序进行显色反应,在上述所确定的吸收波长下分别测定其 OD 值,以 L- 鸟氨酸单盐酸盐浓度为横坐标(X)、OD 值为纵坐标(Y)绘制曲线,从图上 OD 值的变化趋势分析确定茚三酮反应液所能检测的 L- 鸟氨酸的线性范围。

1.3.7 显色液的稳定性测试

由上述单因素所确定的最适反应条件,使用 0.20 $\mu\text{mol/mL}$ L- 鸟氨酸作为待测样液,分别测定了反应后显色物质 OD 值的经时变化状况。

1.3.8 其他氨基酸的干扰

分别考察了 0.20 $\mu\text{mol/mL}$ L- 天冬氨酸、L- 亮氨酸、L- 精氨酸、L- 缬氨酸、L- 色氨酸、L- 异亮氨酸、L- 丙氨酸、L- 苯丙氨酸、L- 苏氨酸、L- 蛋氨酸、L- 谷氨酸、L- 脯氨酸、L- 瓜氨酸、L- 甘氨酸、L- 半光氨酸、L- 赖氨酸盐酸盐和 L- 酪氨酸对 L- 鸟氨酸反应显色的灵敏性影响程度。

1.3.9 标准曲线的绘制

根据所确定的线性范围,以 0.01 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.02 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.04 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.06 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.08 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.10 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.12 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.14 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.16 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.18 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.20 $\mu\text{mol/mL}$ 的 L- 鸟氨酸单盐酸盐标准梯度溶液,分别测定其 OD 值,同时绘制标准曲线图,并且进行线性回归分析,求出其线性回归方程。

2 结果与分析

2.1 最适吸收波长的确定

0.20 $\mu\text{mol/mL}$ L- 鸟氨酸单盐酸盐标准样液与茚三酮反应液进行显色反应后,在波长 400~640 nm 之间扫描测定 OD 值,以确定反应产物的最适吸收波长,结果如图 1 所示。

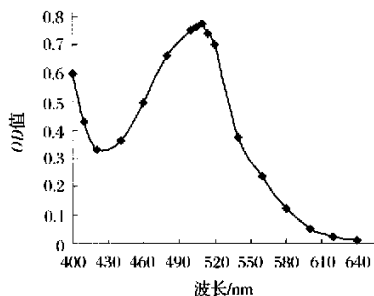


图 1 L- 鸟氨酸反应产物在波长下的吸收值

从图 1 可知,在 400~640 nm 的波长范围内,反应形成的有色物质在 510 nm 处有一个最高吸收峰,OD 值最大,这与 Chinard^[14]报道的 515 nm 有所不同,推测是由于本方法进行了适当改进之后所导致的。在多次的重复验证试验中也都证明最大的吸收峰稳定在 510 nm 之处,所以,以下的实验中除非有具体说明,OD 值均是在此波长下进行测定的。

2.2 反应温度的选择

反应温度对该反应体系有很大的影响,这可以从图2显示出来。不同的反应温度下,茚三酮与 L- 鸟氨酸反应所形成的红色物质的颜色深浅程度具有明显的差别。

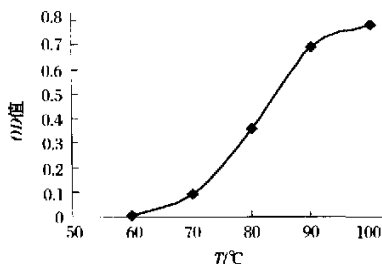


图2 反应温度对 OD_{510nm} 值的影响

从图2可以看出,在60℃下基本上不发生显色反应,从70℃开始,随着显色温度的升高,OD值也随之增大,到90℃为止几乎为直线上升,也基本上符合了温度每增加10℃,反应速度和反应产物增加1倍的一级化学反应方程模式的增长规律。90℃之后,反应明显缓慢,在100℃时,OD值最大。虽然实验采用过其他方法在110℃和120℃左右的温度下进行反应,测试得出的OD值均略有增加,但是,实际操作繁琐,准确性、重复性差。所以,本方法确定的最适反应温度为常压下100℃。

2.3 反应时间的选择

显色反应时间的长短,主要会影响茚三酮与 L- 鸟氨酸之间的反应是否充分,但另一方面,也可能也会影响反应所形成产物的显色性能及其稳定性。图3显示了从5~60 min的反应时间范围内,OD值的变化情况。

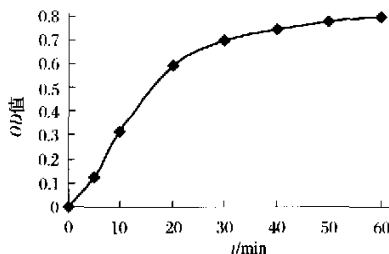


图3 反应时间对 OD_{510nm} 值的影响

可以看到,随着显色反应时间的延长,OD值也随之增大,特别是在0~20 min,OD值变化非常明显,呈线性快速增长趋势;在20~60 min,OD值增长的势头逐步趋于平缓。虽然结果没有表示出来,超

过60 min,OD值几乎不再增加。因此,60 min的反应显色时间已经比较充分。而整个比色测定时间基本上可以控制在2 h、甚至是1.5 h的短时间之内,达到了快速定量分析的目的。

2.4 H_3PO_4 与冰乙酸不同体积比对反应的影响

图4显示了6 mol/L H_3PO_4 与冰乙酸之间的不同体积比对OD值的影响结果。

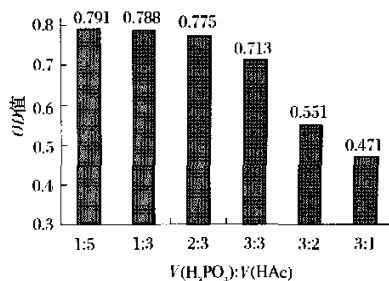


图4 6 mol/L H_3PO_4 与冰乙酸的体积比对 OD_{510nm} 值的影响

由图4可以看出,随着6 mol/L H_3PO_4 与冰乙酸配比的减小,OD值却随之增大,可能是由于配比不同,引起了反应显色体系pH值的变化,使得茚三酮与 L- 鸟氨酸反应形成的红色物质的颜色加深,从而引起OD值的增大。其中,在本反应体系下,所设定的混酸体积比为1:5和1:3,之间的差别缩小,从而使得各自的OD值分别提高为0.792和0.788,这与2:03 ($OD = 0.775$)^[14]比较时,OD值分别增大了0.015和0.013,说明该反应体系的灵敏度有所提高,有利于被检 L- 鸟氨酸浓度的进一步降低。因此,采用6 mol/L H_3PO_4 与冰乙酸体积比为1:03进行混合,用于配制茚三酮酸性显色液。

2.5 线性范围的确定

实验进一步探讨了25 mg/mL 茚三酮酸性溶液对于 L- 鸟氨酸的可检出浓度水平,并分析其相互间的线性范围,结果如图5所示。

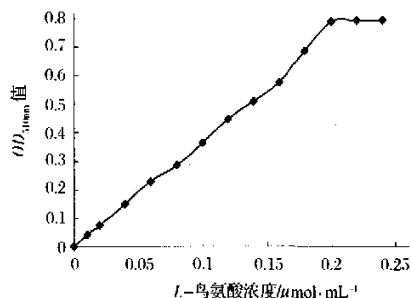


图5 L- 鸟氨酸浓度与 OD_{510nm} 值的关系

由图 5 可知,当 *L*- 鸟氨酸单盐酸盐浓度低于 0.20 $\mu\text{mol/mL}$,均可以采用该反应体系以茚三酮进行显色检测出来,而且具有较好的一一线性对应趋势。当 *L*- 鸟氨酸单盐酸盐浓度大于 0.20 $\mu\text{mol/mL}$ 时,其 OD 值则没有明显的对应变化。从而可知,线性范围在 0~0.20 $\mu\text{mol/mL}$,这说明该分析检测方法的灵敏性很高,对 *L*- 鸟氨酸的可检出度可以达到 0.01 $\mu\text{mol/mL}$ 的微量程度。

2.6 显色液颜色稳定性的确定

如图 6 所示,反应显色后的反应产物的 OD 值在反应后 30 min 之内是相当稳定的。超过 30 min,随着显色液(反应产物)放置时间的延长,显色液的 OD 值有所减小,这可能是由于在放置过程中,有色物质产生分解或者转化为其他产物。因此,显色液适合的

测定时间范围为 30 min,足以完成常规的分光光度比色测定。

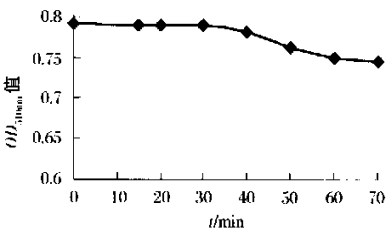


图 6 显色液放置过程中 $OD_{510\text{nm}}$ 值的变化

2.7 其他氨基酸的干扰

表 1 显示了酸性茚三酮与 *L*- 鸟氨酸以及其他多种氨基酸分别进行检测分析试验的显色比较结果。

表 1 各种氨基酸的显色比较

氨基酸	Ala	Arg	Asp	Cit	Cys	Glu	Gly	Ile	Leu
$OD_{510\text{nm}}$	0.001	0.001	0.001	0.058	0.002	0.002	0.001	0.003	0.001
反应颜色	无色	无色	无色	浅红	无色	无色	无色	无色	无色
氨基酸	Lys	Met	Pro	Phe	Thr	Trp	Tyr	Val	Orn
$OD_{510\text{nm}}$	0.081	0.001	0.421	0.002	0.001	0.011	0.001	0.000	0.792
反应颜色	浅黄	无色	浅红	无色	无色	浅黄	无色	无色	深红

可以看出,在该反应测试体系下,酸性茚三酮除了能与脯氨酸(0.421)、赖氨酸(0.081)、瓜氨酸(0.058)和色氨酸(0.011)反应,形成一定程度的色泽外,与其他所列示的氨基酸均不会生成有色物质,这一点与 Chinard^[14]的实验结果相似。但是,这一反应显色方法经过改进之后,脯氨酸的影响已经被大幅度降低,而其他 3 种氨基酸的影响也变得非常微小。所以,其干扰因素主要为脯氨酸,但对于 *L*- 鸟氨酸发酵液来说,脯氨酸的含量一般来说比较低,因此,可以忽略脯氨酸的干扰。*L*- 鸟氨酸发酵液中有可能少量存在的谷氨酸、精氨酸以及瓜氨酸所产生的对于鸟氨酸定量分析的影响作用,也可以通过该检测体系得到排除。

2.8 标准曲线的绘制

图 7 显示了 *L*- 鸟氨酸单盐酸盐浓度与 $OD_{510\text{nm}}$ 值之间具有线性关系。

采用过原点进行回归分析,得到以下一元线性回归方程:

$$Y = 3.765 \times X \quad (1)$$

其中, Y - $OD_{510\text{nm}}$ 值; X - *L*- 鸟氨酸单盐酸盐浓度($\mu\text{mol/mL}$)。

其线性相关系数为 $R^2 = 0.9973$,并经过方差统

计分析后,结果表明 *L*- 鸟氨酸单盐酸盐在 0.20 $\mu\text{mol/mL}$ 的范围内,与 $OD_{510\text{nm}}$ 值之间具有极显著的线性相关性($r > r_{0.01}$)。由该方程还可以推算出计算发酵液中 *L*- 鸟氨酸浓度的公式为:

$$X = 2.01 \times A \times N \quad (2)$$

其中, X - 发酵液等样品中的 *L*- 鸟氨酸浓度(g/L); A - $OD_{510\text{nm}}$ 值; N - 样品溶液的稀释倍数。

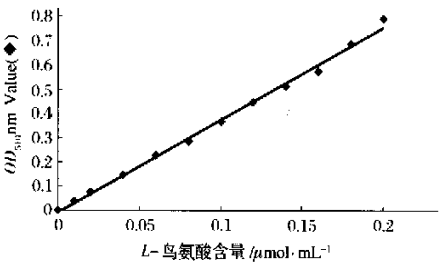


图 7 *L*- 鸟氨酸定量测定的标准曲线

3 小 结

文中就 *L*- 鸟氨酸定量分析检测方法进行了探讨,确定了一种既简单、有效,又具有较高灵敏度的分析方法,为定量测定 *L*- 鸟氨酸发酵液等溶液介质中 *L*- 鸟氨酸的实际含量提供了一种便利的评估方法。

今后,该方法仍需在蛋白质、多肽以及以及合成寡肽等物质是否会产生干扰等方面,通过相关试验做进一步分析,以补充整个体系的完整性和系统性。

参 考 文 献

- Peterson D E, BemLoehr R W. Determination of muramic acid, ornithine and diaminopimelic acid during automatic amino acid analysis[J]. *Anal Biochem*, 1970, 33(2): 238~243
- Yoshita H, Nakano Y, Koiso K, et al. Liquid chromatographic determination of ornithine and lysine based on intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization[J]. *Anal Sci*, 2001, 17(1): 107~112
- Pathett M, MonkC, Vaniel M R, et al. Determination of agmatine, arginine, citrulline and ornithine by reversed-phase liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde[J]. *J Chromatog B*, 1988, 245: 269~276
- Zhang W Z, Kaye D M. Simultaneous determination of arginine and seven metabolite in plasma by reversed-phase liquid chromatography with time controlled ortho-phthalaldehyde precolumn derivatization[J]. *Anal Biochem*, 2004, 326(1): 87~97
- Moss CW, Diaz F J, Lambert M A. Determination of diaminopimelic acid, ornithine and muramic acid by gas chromatography[J]. *Anal Biochem*, 1971, 44(2): 458~461
- Moss C W, Lambert M A, Cherry W B. Use of gas chromatography for determining catabolic products of arginine by bacteria[J]. *Appl Microbiol*, 1972, 23(5): 889~893
- Hamilton. P B, Anderson R A. Demonstration of ornithine in gelatin by ion exchange chromatography[J]. *J Biol Chem*, 1954, 211(1): 95~102
- Durham D G, Dickinson J C, Hamilton P B. Ion-exchange chromatography of free amino acids in human intraocular fluids[J]. *Clin Chem*, 1975, 17(4): 285~289
- Matsuzawa T, Ito M, Ishiguro I. Enzyme assays of L-ornithine and L- Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate in tissues and ornithine-load test in human subjects[J]. *Anal Biochem*, 1980, 106(1): 1~6
- Gopalakrishna R and Nagarajan B. A modified method for estimation of ornithine in biological samples[J]. *Anal Biochem*, 1980, 106(2): 472~475
- Bucci L R, klenda B A, Hickson Jr, et al. Ornithine levels in serum after oral dosing measured by a colorimetric assay[J]. *J Nutri Biochem*, 1991, 2(7): 363~367
- Dkuma H, Sato N. Development of the bioenzyme reactor system for the determination of ornithine. Denshi Jouhou Tsushin Gakkai Gijutsu Kenkyu Houkoku (电子情报通信学会技术研究报告, Japan), 2000, 100(252): 137~142
- Almuaibed A M, Townshend A. Flow injection chemiluminescence determination of ornithine and sequential determination of ornithine and lysine by using immobilized lysine oxidase[J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 388(3): 339~343
- Chinard F P. Photometric estimation of praline and ornithine[J]. *J Biol Chem*, 1952, 199(1): 91~95
- Patthy M, Patthy A. Specific color reaction for the determination of lysine and/or ornithine[J]. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung*, 1975, 10(4): 177~286
- Stewart I. Determination of ornithine, lysine, arginine, citrulline and histidine[J]. *J Chromatog*, 1963 (10): 404~407

Rapid Quantitative Determination for L-ornithine Analysis

Huang Aiqing¹ Su Guocheng² Wang Zhang¹

1 (China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

2 (College of Bio-technology, Jimei University, Xiamen 361201, China)

ABSTRACT Based on Chinard's estimation, a quantitative determination of L-ornithine was established with a 25 mg/mL acidic ninhydrin solution prepared by 6 mol/L H_3PO_4 -acetic acid (1/3, V/V) as reagent. The color of the reaction product was developed at 100°C water for 60 minutes and it was checked at the wavelength of 510 nm. A liner relationship between the concentration of L-ornithine and the optical density in the range of 0 to 0.20 $\mu\text{mol/mL}$ was obtained, and the least detectable concentration of L-ornithine was 0.01 $\mu\text{mol/mL}$. The reaction system was demonstrated stable and the influence of other amino acids was negligible or could be avoided from actual situation such as L-ornithine fermentation broth.

Key words L-ornithine, ninhydrin, spectrophotography