

## 教学园地 Teaching

## 关于茛三酮法测定脯氨酸含量中脯氨酸与茛三酮反应之探讨

李绍军 龚月桦 王俊儒 梁宗锁\*

西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌 712100

测定脯氨酸含量的方法通常用磺基水杨酸或酒精提取再与酸性茛三酮反应生成稳定的红色产物, 然后于波长 520 nm 处比色, 通过标准曲线或回归方程计算脯氨酸的含量。关于其测定原理, 一些植物生理学实验指导明确指出: “在酸性条件下, 脯氨酸和茛三酮反应生成稳定的红色产物, 用比色法于 520 nm 波长下测定脯氨酸的含量。”<sup>[1,2]</sup>然而, 在各种生物化学教科书<sup>[3~6]</sup>中描述氨基酸茛三酮反应时, 则为: “在弱酸性条件下, 2 个亚氨基酸——脯氨酸和羟脯氨酸与茛三酮反应并不释放 NH<sub>3</sub>, 而直接生成黄色化合物, 其结构式如图 1, 最大光吸收在 440 nm。”为了对两种教材中不同的说法进行比较, 我们查阅了各种文献, 设计一些试验并进行了验证。

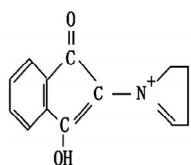


图1 黄色产物

## 1 两种说法的来源

关于黄色产物及其最大光吸收在 440 nm 的描述广泛存在于国内生物化学教科书<sup>[3~6]</sup>和少数植物生理学实验指导<sup>[7]</sup>中, 生化教科书一般没有指出该反应的具体反应体系, 文献 7 在“实验 55”中同意生化教科书的说法并有详细步骤, 根据其中的参考文献我们发现其主要来源于 Hyman<sup>[8]</sup>的文献。文献 8 指出其反应体系由 NaCN、醋酸缓冲液、水合茛三酮组成, 脯氨酸或羟脯氨酸与之反应后的产物是黄色的, 最大吸收峰在 440 nm。文献 7 来源是 8, 反应体系更改为 KCN、柠檬酸缓冲液、水合茛三酮、脯氨酸。在文献 7 第 3 版<sup>[1]</sup>中则取消了这个试验。

关于红色产物及其最大光吸收在 520 nm 的描

述主要在植物生理学逆境指标测定脯氨酸含量实验中<sup>[1,2,9~12]</sup>。这些文献认为脯氨酸与酸性茛三酮反应生成红色物质, 有互变异构体 I 和 II (图 2)。产物在酸性条件下最大吸收峰 520 nm, 碱性条件下最大吸收峰 630 nm<sup>[10]</sup>。反应体系是醋酸缓冲液、水合茛三酮、脯氨酸。

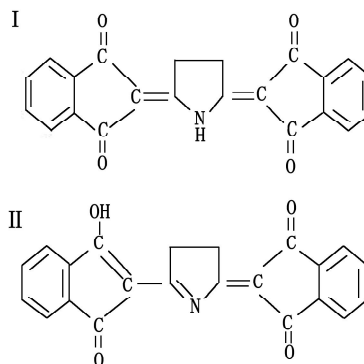


图2 红色产物互变异构体I和II

通过资料对比我们提出以下几个问题: (1) 有无氰化物对反应产生何种结果? (2) 酸性体系以柠檬酸为好还是醋酸为好? (3) 产物在水相好还是甲苯相中更好? 我们设计了相应试验并进行了验证。

## 2 验证试验

实验中用到的试剂有: 10 μg·mL<sup>-1</sup> 标准脯氨酸溶液、酸性茛三酮溶液(2.5 g 茛三酮, 加入 60 mL 冰醋酸和 40 mL 2 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸, 于 70℃ 下加热溶解, 冷却后贮于棕色试剂瓶中备用)、分析纯冰醋酸、0.2 mol·L<sup>-1</sup> pH 5.0 的柠檬酸溶液、KCN。用各自不加脯氨酸的体系溶液调零, 以龙尼柯(上海)仪器有限公司 WFJ 7200 型可见光分光光度计测定可见光区域实验产物的吸收曲线。

收稿 2004-11-12 修定 2005-01-27

资助 国家自然科学基金(90302005)。

\*通讯作者(E-mail: liangz819@163.net, Tel: 029-87092373)。

**2.1 氰化物对反应的影响** 我们设定反应体系为: 2 mL 标准脯氨酸溶液、2 mL 酸性茛三酮、2 mL 冰醋酸, 一支试管加入 0.005 g KCN, 另一试管不加 KCN, 均于水浴中加热 20 min。结合文献资料与实验结果(图 3)发现, 脯氨酸与茛三酮共热, 有 KCN 时产物为黄色, 可见光区域最大吸收峰在 420 nm 处, 说明结构可能为图 1; 无 KCN 时产物为红色, 最大吸收峰为 520 nm, 显示结构可能为图 2。从化学反应机制来说, 由于存在氰化物与不存在氰化物两种情况下生成的产物及其颜色不同, 说明两者很可能是不同的反应。

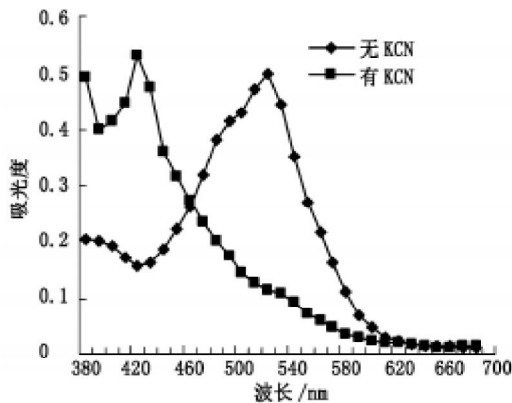


图3 KCN对脯氨酸测定吸收曲线的影响

图 4 中, 反应体系为: 2 mL 标准脯氨酸溶液、2 mL 酸性茛三酮、0.005 g KCN, 一支试管加入 2 mL 冰醋酸(pH 1.0), 另一试管补充 2 mL 蒸馏水(1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调 pH 至 7.0), 均于水浴中加热 20 min。结果显示: 有 KCN、无醋酸时, 反应产物呈黄色, 产物吸收峰并不是 440 nm, 而是 430 nm; 有 KCN 和醋酸时, 反应产物呈橙黄

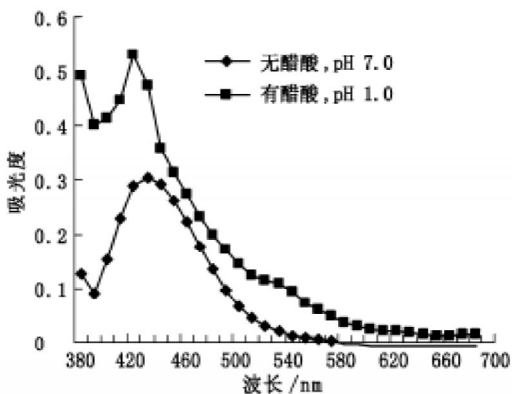


图4 在KCN存在时醋酸对脯氨酸测定中吸收曲线的影响

色, 吸收峰是 420 nm。可见酸性强弱移动了吸收峰, 显示其产物在不同 pH 下的结构是可变的。

KCN 是剧毒物质, 为了安全、快速、准确测定起见, 我们认为应采用无 KCN 的脯氨酸与酸性茛三酮共热的体系更加合理。因此, 以下实验都采用无 KCN 的体系。

**2.2 不同酸性支持体系对脯氨酸与酸性茛三酮反应的影响** 在脯氨酸含量测定中, 测定系统有用柠檬酸的<sup>[7]</sup>, 更多是用醋酸<sup>[2,8~10]</sup>。我们分别用柠檬酸和醋酸进行了实验。图 5 中反应体系为:

2 mL 标准脯氨酸溶液、2 mL 水合茛三酮、2 mL 柠檬酸溶液。3 支试管分别作未加热、水浴加热 8 min 和水浴中加热 20 min 实验。结果(图 5)显示: 在未加热时, 溶液颜色未发生变化, 说明脯氨酸与茛三酮可能没有进行反应; 在柠檬酸系统中, 沸水浴中加热 8 min 后, 有淡红色产物生成, 且在波长为 520 nm 处有最大吸收值; 当继续加热到 20 min 时, 出现了红色沉淀, 将该红色沉淀过滤后测得的吸光值明显下降, 但吸收峰仍为 520 nm。

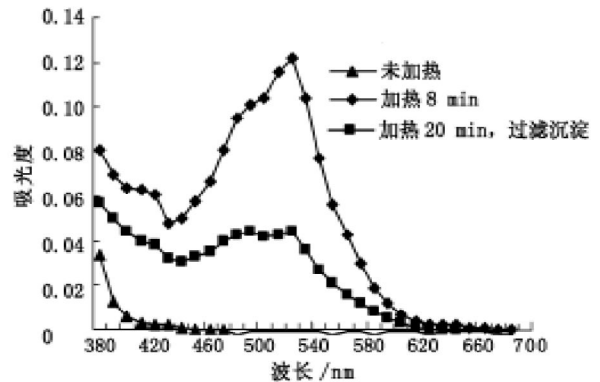


图5 加热时间对测定脯氨酸柠檬酸体系吸收曲线的影响

用冰醋酸取代柠檬酸, 体积不变, 用 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 和 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调 pH 至 1.5, 加柠檬酸的试管置于水浴中 8 min, 加冰醋酸的试管在水浴中为 20 min。结果(图 6)显示: 用柠檬酸时其特征吸收峰值较低; 用醋酸时同样浓度的脯氨酸和茛三酮反应, 加热 8 min 后开始显现红色, 20 min 后溶液颜色深度稳定, 产物特征吸收峰更明显。图 5、图 6 的结果表明醋酸优于柠檬酸, 以下实验均采用冰醋酸、脯氨酸、茛三酮反应体系。

**2.3 水相与甲苯相对脯氨酸测定的影响** 产物可溶

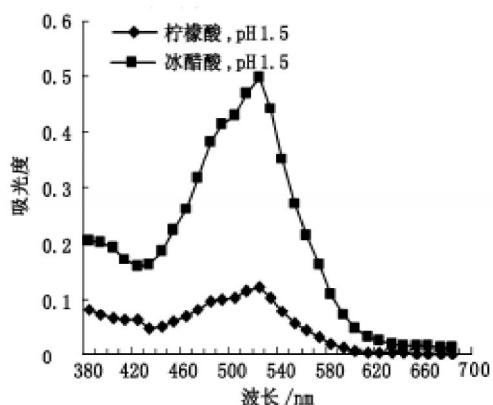


图6 柠檬酸与醋酸对测定脯氨酸吸收曲线的影响

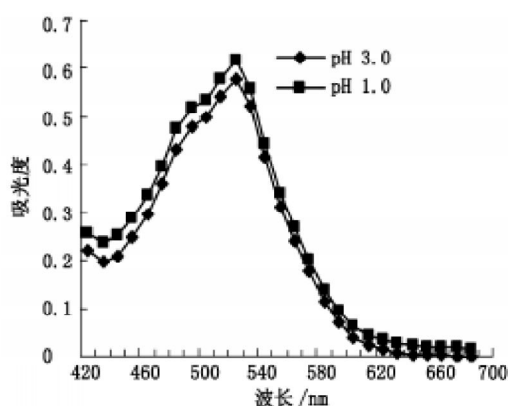


图8 不同pH下甲苯相中产物的吸收曲线

于水相与甲苯相, 何种溶液相测定产物浓度最好? 图7中反应体系为: 2 mL 标准脯氨酸溶液、2 mL 酸性茛三酮、2 mL 冰醋酸, 分别用1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH调pH 1.0和3.0, 于水浴中共热20 min。图8反应体系与图7相同, 冷却后用甲苯萃取产物。结果表明, 在可见光区域, 不同pH值条件下生成的产物特征吸收峰不管溶于水相还是甲苯相都是520 nm, 产物是红色。水相中pH的变化会极大影响产物特征吸收峰的吸收值(图7), 而甲苯中pH的变化对吸收值几乎没有影响(图8)。

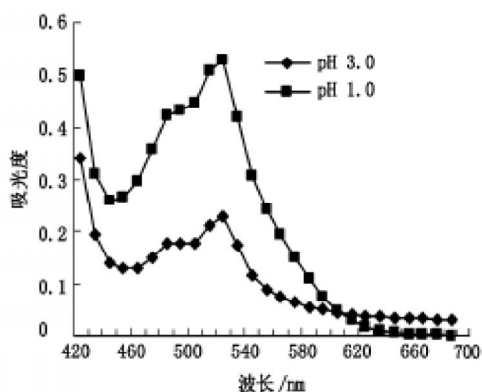
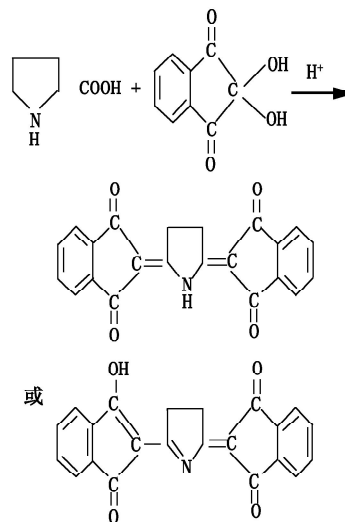
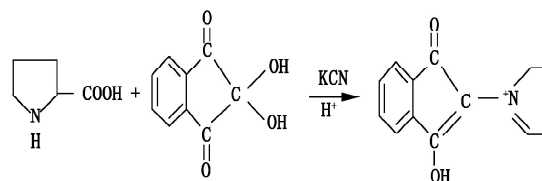


图7 不同pH下水相中产物的吸收曲线

是醋酸作为酸性体系), 加热反应后的最终产物是红色的。在这个反应中, 脯氨酸应是缩合了两分子茛三酮, 产物呈红色, 最大吸收波长是520 nm附近, 不是440 nm。脯氨酸与酸性茛三酮直接加热反应结果可能如下:



在有氰化物参与时发生的是另一反应, 产物是黄色的, 仅缩合一分子茛三酮。反应结果可能如下:



### 3 结束语

**3.1 两种反应的实质** 具 $\alpha$ -氨基基团的氨基酸与酸性茛三酮反应为: 氨基酸首先被氧化成醛、NH<sub>3</sub>和CO<sub>2</sub>, 而茛三酮被还原; 接着反应生成的氨和茛三酮还原产物再与另一分子水合茛三酮缩合生成紫色物质<sup>[13]</sup>。

而脯氨酸与酸性茛三酮反应(不管是柠檬酸还

如果要对脯氨酸与酸性茛三酮反应做出详细、完整的反应历程说明, 还需对产物结构作鉴

定, 对反应机制也应进一步研究。

**3.2 生化教材修改建议** 结合文献资料 and 我们的试验, 我们认为, 不少生化教科书描述脯氨酸与酸性茚三酮反应<sup>[3~6]</sup>值得商榷。首先, 茚三酮反应是特指有 $\alpha$ -氨基基团的氨基酸与酸性茚三酮生成紫色产物的反应, 产物进行比色测定时波长为 570 nm<sup>[7]</sup>; 而脯氨酸和羟脯氨酸是亚氨基酸, 没有独立的 $\alpha$ -氨基, 所以并不如平常所说的是简单的茚三酮反应。尽管如此, 脯氨酸仍然能够与酸性茚三酮发生化学反应, 但不属于普通意义上的氨基酸茚三酮反应。据此, 我们认为生化教材在描述脯氨酸与酸性茚三酮反应时应作适当修改: (1) 脯氨酸是亚氨基酸, 没有具 $\alpha$ -氨基的氨基酸酸性茚三酮反应; (2) 脯氨酸可以与茚三酮反应, 在酸性条件下生成的直接产物是红色的, 最大吸收峰值是 520 nm; (3) 脯氨酸与茚三酮在有氰化物存在时反应产物是黄色或橙黄色, 最大吸收值是 420~430 nm(准确的峰值需进一步提纯产物测定)。

**3.3 最佳测定条件** 尽管脯氨酸和茚三酮反应的机制仍有待研究, 但根据实验结果我们认为, 如果从高效、安全的角度考虑宜采取如下方法: 用醋酸作为酸性条件, 茚三酮与脯氨酸水浴共热 20 min 以上, 反应产物用甲苯萃取, 建立标准曲线

或回归方程计算含量。具体方法可参见文献 1、2、9。

### 参考文献

- 1 张志良, 瞿伟箴主编. 植物生理学试验指导. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2003. 258~260
- 2 高俊凤主编. 植物生理学试验技术. 西安: 世界图书出版社, 2000. 201~202
- 3 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法主编. 生物化学(上册). 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2002. 138~139
- 4 郭嵩光主编. 基础生物化学. 北京: 高等教育出版社, 2001. 35
- 5 Garrett RH, Grisham CM. Biochemistry. 2nd ed. Harcourt, Inc. 1999. 94
- 6 张洪渊主编. 生物化学教程. 第2版. 成都: 四川大学出版社, 1994. 63~64
- 7 张志良主编. 植物生理学试验指导. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1990. 172~175
- 8 Hyman R. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. Arch Biochem Biophys, 1957, 67: 10~15
- 9 张殿忠, 王沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离氨基酸含量的方法. 植物生理学通讯, 1990, (4): 62~65
- 10 Troll W, Lindsley J. A photometric method for the determination of proline. J Biol Chem, 1955, 215: 655~660
- 11 朱广廉, 邓兴旺, 左卫能. 植物体内脯氨酸的测定. 植物生理学通讯, 1983, (1): 35~37
- 12 徐新宇, 胡荣海. 作物的抗旱能力和体内游离脯氨酸含量的关系. 国外农业科技, 1983, (9): 19~22
- 13 傅建熙主编. 有机化学. 北京: 高等教育出版社, 2000. 376