

油菜蜂花粉中游离氨基酸含量的测定

刘春纓,冯 瑛,石玉平,李文茂,王永宁
(青海师范大学 化学系,青海 西宁 810008)

摘要:用双光束紫外分光光度计测定油菜蜂花粉中游离氨基酸的含量。在该过程中,花粉用 43°青稞白酒提取,提取液先用氢氧化钡沉淀除去色素和蛋白质,再用水合茚三酮显色,通过双光束紫外分光光度法测氨基酸含量。结果表明:在相同质量的花粉中,未破壁油菜花粉中游离氨基酸的含量为 1.87%~4.91%,破壁花粉中游离氨基酸的含量为 2.46%~8.26%。该方法中的仪器易于操作,测定结果准确可靠。

关键词:蜂花粉;氨基酸;双光束紫外分光光度计

中图分类号:TS201

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)10-0122-03

蜂花粉是一种绿色天然食品,可以直接食用,也可作为其它食品的基料^[1]。许多化妆品的成分中都含有从花粉中提取的物质^[2]。因为花粉可以平衡人体内分泌,从根本上起到养颜美容的作用。同时还能减轻黄褐斑、色斑,消除皱纹,可使人长久地保持青春容颜^[3]。蜂花粉也可以防治高原、高寒地区心脑血管疾病频发,因为它可以软化血管,消除血管壁上沉积的脂肪、降低血脂;也可以防治脂肪肝、肝硬化,有效保肝护肝^[4]。花粉还能有效治疗前列腺疾病,多年的临床经验表明油菜花粉、荞麦花粉的疗效最佳^[5]。目前,我国治疗前列腺疾病的药物中,前列康被称为前列腺的克星,该药就是以蜂花粉为原料的^[6]。花粉中某些成分还具有杀菌、修复消化道、增加胃肠蠕动的功能。长期服用蜂花粉,可使肠胃病、便秘等病情减轻,并使身体机能日趋恢复^[7-8]。

蜂花粉中含有多种营养物质,例如蛋白质、糖类、脂类、氨基酸、活性酶、维生素、激素、矿物质等,它是一种营养价值极高的天然滋补品。在花粉中存在的氨基酸就有 21 种之多,主要包括蛋白氨基酸和游离氨基酸。游离氨基酸处于游离状态,极易被吸收。所以,它在皮肤的角质层里扮演着湿润因子的角色,能使已经老化、硬化的皮肤重新恢复水合性能,可避免水分的流失。特别是色氨酸和胱氨酸,能大大补充皮肤需要的多种胶原

蛋白,使皮肤弹性增加,可消除、舒展皱纹。所以,花粉被广泛应用于化妆品基料中^[3]。

关于游离氨基酸的测定方法很多,甲醛滴定法^[9]准确性不高;氨基酸自动分析仪使用方便,但仪器昂贵。该文以 43°的青稞白酒为溶剂,提取油菜蜂花粉中的游离氨基酸,用饱和氢氧化钡溶液除蛋白质和色素后,用水合茚三酮显色,采用双光束紫外分光光度计测定游离氨基酸的含量^[10],为蜂花粉资源的进一步开发提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

油菜蜂花粉产于青海省门源县。试验药剂有:43°青稞白酒(青海省互助县青稞酒厂)、95%的乙醇(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司)、丙氨酸(high purity, Japan)、硫酸锌(药用,江苏常州冶炼厂)、氢氧化钡(优级纯,上海试剂总厂第四分厂)和水合茚三酮(分析纯,上海试剂三厂);试验仪器有:电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9145A,上海齐欣科学仪器有限公司)、AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)、Tu-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、SHZ-Ⅲ型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂)、pH-酸度计[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]和酸式、碱式滴定管。

1.2 方法

1.2.1 材料的预处理 把精选后的花粉放在电热恒温鼓风干燥箱中干燥 3 d 后备用。

1.2.2 氨基酸的提取 准确称取干燥未破壁的花粉 10、25、40 g 和破壁的花粉 3.0、7.5、12 g(10 g 未破壁的花粉破壁后可得到质量为 3 g 的破壁花粉,所以折算倍数为 3:10),加 43°的青稞白酒

收稿日期:2012-06-11

基金项目:青海省科技厅资助项目(2011-G-401)

第一作者简介:刘春纓(1980-),女,山东省郯城县人,硕士,助教,从事生物无机化学研究。E-mail: wangyn-51 @ 263.net。

通讯作者:石玉平(1956-),女,河北省晋州市人,教授,从事分析化学研究。

80 mL在常温条件下采用冷浸提取法提取7 d,每2 h 搅拌一次。7 d后减压抽滤,滤液备用。残渣按上述操作重复提取2次,滤液即为氨基酸的提取液。

1.2.3 氨基酸提取液的处理 将各氨基酸的提取液分别用饱和的氢氧化钡溶液沉淀蛋白质和色素,再用5%的硫酸锌中和至pH=6.25(花粉本身的pH),过滤,滤液即为样品液。

2 结果与分析

2.1 游离氨基酸含量的测定

2.1.1 显色剂的配制 准确称量水合茚三酮0.25 g,用95%的乙醇在50 mL的容量瓶中定容。由于水合茚三酮见光会变色,应使用前配制,置于棕色试剂瓶中阴冷避光保存。

2.1.2 丙氨酸标准溶液的配制 准确称取丙氨酸0.100 0 g,用蒸馏水溶解,并在100 mL容量瓶中定容,可得1 mg·mL⁻¹的丙氨酸标准溶液。

2.1.3 标准曲线的绘制 分别吸取丙氨酸标准溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL于6支25 mL的刻度比色管中,再分别向6支比色管中加入0.5%的水合茚三酮溶液1.0 mL,摇匀,在沸水中加热15 min,溶液颜色由粉红慢慢变为紫红,最后变为蓝色。用蒸馏水分别定容至25 mL,得到

各溶液的浓度依次为0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mg·mL⁻¹,以空白溶液调0,于585 nm处测其吸光度值分别为0.010、0.016、0.022、0.028、0.035。以吸光度值为纵坐标,以芦丁溶液的浓度为横坐标,用Excel做图(见图1)。

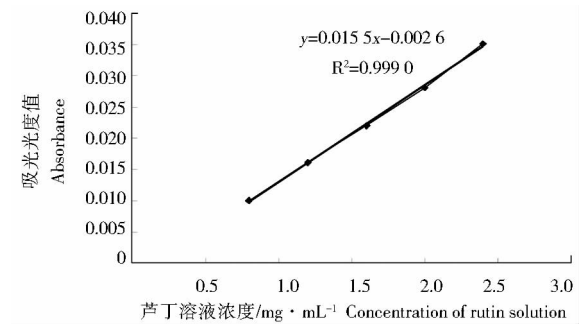


图1 丙氨酸的标准曲线
Fig. 1 Alanine standard curve

得回归方程: $y = 0.015\ 5x - 0.002\ 6$, $R^2 = 0.999\ 0$ 。

2.1.4 样品中游离氨基酸含量的测定 准确吸取每种提取液1.0 mL各3份,分别置于3支25 mL的刻度比色管中,按2.1.3操作,测定吸光度值,带入回归方程,计算溶液中游离氨基酸的浓度,并折算花粉中游离氨基酸的百分含量(见表1,表2,表3)。

表1 未破壁花粉中不同花粉质量与白酒体积比(固液比)测定游离氨基酸的含量比较
Table 1 Comparison on the content of free amino acid in pollen failed to break the wall(solid-to-liquid ratio)

序号 No.	吸光度 Absorbance			滤液体积/mL Filtrate volume			氨基酸质量/ mg Weight of amino acid			氨基酸含量/% Content of amino acid		
	10:80	25:80	40:80	10:80	25:80	40:80	10:80	25:80	40:80	10:80	25:80	40:80
1	0.044	0.080	0.098	75	70	65	225.48	373.03	421.87			
2	0.031	0.035	0.038	76	76	76	164.75	184.36	199.07			
3	0.018	0.021	0.023	76	76	76	101.01	115.72	125.52			
合计 Total							491.24	673.11	746.46	4.91	2.69	1.87

表2 破壁花粉中不同花粉质量与白酒体积比(固:液)测定游离氨基酸的含量比较
Table 2 Comparison on the content of free amino acid in pollen broken the wall(solid-to-liquid ratio)

序号 No.	吸光度 Absorbance			滤液体积/mL Filtrate volume			氨基酸质量/ mg Weight of amino acid			氨基酸含量/% Content of amino acid		
	3.0:80	7.5:80	12:80	3.0:80	7.5:80	12:80	3.0:80	7.5:80	12:80	3.0:80	7.5:80	12:80
1	0.018	0.020	0.023	75	70	65	99.68	102.06	107.35			
2	0.015	0.016	0.018	76	76	76	86.30	91.20	101.01			
3	0.010	0.014	0.015	76	76	76	61.78	81.39	86.30			
合计 Total							247.76	274.65	294.66	8.26	3.66	2.46

表 3 等质量未破壁花粉和破壁花粉中游离氨基酸含量的对比
Table 3 Comparison on the content of free amino acid of the same weight
of the pollen failed to break the wall and broken the wall

项目 Item	游离氨基酸含量/% Free amino acid content		
	10:80(3.0:80)	25:80(7.5:80)	40:80(12:80)
未破壁/% Failed to break the wall	4.91	2.69	1.87
已破壁/% Broken the wall	8.26	3.66	2.46

2.2 测定方法中的影响因素

2.2.1 显色剂对终点颜色的判断不一致造成的影响 水合茚三酮和氨基酸的反应很灵敏,痕量的氨基酸也会对结果造成较大误差,所以操作中仪器必须洗干净。pH 对该显色反应的影响也较大,一般在 pH=6.70 的情况下加热,否则会有副反应发生,对终点颜色的判断造成误差,影响游离氨基酸含量的测定。

2.2.2 色素是否除干净对测定结果的影响 花粉提取液中含有一定量的色素,如果色素有残留,也会影响吸光光度值的测定,进而对游离氨基酸含量的测定造成一定影响。

2.2.3 蛋白质是否除干净对测定结果的影响 如果蛋白质除不干净,蛋白质也会和水合茚三酮发生显色反应,生成的副产物会干扰颜色的变化,影响吸光光度值的测定,从而对游离氨基酸含量的测定造成影响。

2.2.4 用氢氧化钡除色素和蛋白质过程中的多次过滤对测定结果造成的影响 用饱和氢氧化钡除色素和蛋白质的过程中,经过了多次过滤。游离氨基酸极易溶于水,该过程中游离氨基酸的损耗,对测定结果也会有一定的影响。

3 结论

试验结果表明:青海省门源县蜂花粉中游离

氨基酸含量丰富,在花粉质量与白酒体积比 10 g:80 mL 时,无论破壁花粉还是未破壁的花粉,其氨基酸提取率比其它 2 个固液比的都高;在花粉和白酒的固液比一定的情况下,破壁花粉中氨基酸的提取率较高。

参考文献:

[1] 刘小力. 10 种蜂产品氨基酸组成测定与比较分析[J]. 食品科技,2009,34(1):81-83.
[2] 杨继生,黄双源. 蜂花粉在化妆品中的应用[J]. 中国蜂业,1989(2):27-28.
[3] 王开发,张胜隆,支崇远,等. 花粉化妆品的应用和前景[J]. 香料香精化妆品,2002(3):42-43,49.
[4] 郭奕明. 花粉与营养保健[J]. 植物杂志,2002,31(6):39-40.
[5] 杨必成,杨义芳. 花粉治疗前列腺疾病的物质基础研究进展[J]. 中草药,2009(1):144-148.
[6] 左勇. 蜂花粉用于前列腺疾病效果好[J]. 家庭医药,2004(10):30.
[7] 原培森. 蜂花粉对习惯性便秘治疗 100 例[C]//中国中西医结合会. 中西医结合肛肠病研究新进展,2000,6(1):383.
[8] 周建群,余颂涛,金道山,等. 花粉治疗便秘的临床疗效观察[J]. 中西医结合杂志,1988(6):357.
[9] 王虹,任世霞,王永宁. 软二梨中氨基酸的提取及总氨基酸的定量分析[J]. 北方园艺,2011(8):55-56.
[10] 梁惠花,刘晓河,王志宝. 坝上油菜蜂花粉中游离氨基酸的含量测定[J]. 张家口医学院学报,2004,21(2):16-17.

The Determination of Free Amino Acid Content in Rape Bee Pollen

LIU Chun-ying, FENG Ying, SHI Yu-ping, LI Wen-mao, WANG Yong-ning
(Chemical Department of Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008)

Abstract: The content of free amino acids in the rape bee pollen was determined by the double beam ultraviolet spectrophotometry. In the process, samples were extracted with 43 degrees of the barley wine. Pigment and protein were precipitated out by Ba(OH)₂, Ferrocenylmethyl-substituted indenenes three ketone was put in the filtrate and shown the color. The results showed that the content of free amino acid was in the 1.87% to 4.91% range in bee pollen failed to break the wall, and the content of free amino acid was in the 2.46% to 8.26% range in bee pollen broken the wall. The method of the instrument was easy to operate and the result accurate and reliable.
Key words: bee pollen; amino acids; double beam UV spectrophotometer