

用茚三酮与($\alpha + \epsilon$)氨基的显色反应测定真丝纤维受损程度

唐 薇

(浙江丝绸工学院)

【提要】 本文介绍了用于估价丝纤受损程度的简单测试方法。该方法基于丝纤维上的 ($\alpha + \epsilon$) 氨基与茚三酮的反应, 不需要复杂的仪器, 但测定结果的重演性和准确度好。本文也测定了一些经过碱处理的丝纤。结果表明, 处理后纤维上 ($\alpha + \epsilon$) 氨基含量增加。

一、引 言

测定蛋白质纤维受化学或光、热损伤程度的常用方法为强力法和粘度法。这两种方法测定的工作量大, 需特殊测定条件, 粘度法正确性差。利用茚三酮与氨基酸或多肽的特殊化学反应可以测定 α 或 ϵ 氨基含量^[1]。当真丝纤维受到化学试剂, 尤其是酸碱的作用后酰胺键断裂释放出 α 氨基和羧基。不论断裂片断的大小, 水解一个酰胺键就释放出一个末端氨基和一个末端羧基。利用末端氨基与茚三酮的特殊显色反应可以测出真丝纤维受酸、碱损伤的程度^[2]。有人曾利用此法

测定羊毛纤维受损的程度^[2], 但以前所介绍的方法均需在氮气存在的条件下进行, 茚三酮溶液必须每天配置。本文所用方法因严格控制测试液的pH并加入吡啶和异丙醇, 因此可不需在氮气下进行。茚三酮溶液的稳定性也较好^[3~5]。

二、实 验

1. 原理

茚三酮在水溶液中成为水合茚三酮。水合茚三酮与氨基酸或多肽一起加热发生氧化、脱氨、脱羧作用, 并被还原成还原茚三酮。放出的氨和还原茚三酮再与另一分子的

茛三酮反应而生成具有特定结构的紫色化合物,吸收波长570nm。

测定溶液的光密度能反映溶液中紫色化合物的含量,而紫色化合物的含量与放出的氮含量成正比,也即反映出被测物上末端氨基的含量,在真丝纤维上的 ϵ 氨基也能发生类似的反应。真丝纤维或固相的大分子多肽每个分子末端氨基都能与水合茛三酮反应而放出氮存在于溶液中,氮再进一步与一个分子还原茛三酮和一个分子茛三酮反应。因此,虽然纤维不能溶于水,但反应能定量地进行。

该方法简单而迅速,但只是一个相对的方法,并将外标准(标准亮氨酸溶液和标准参比纤维)与被测试样同时进行测定,通过校准以提高测定的准确性。

2. 药品

亮氨酸、茛三酮、异丙醇、吡啶和丙酸均为A.R.级,丙酸钠和乙二醇甲醚为C.P.级。

3. 溶液配置

(1) 吡啶水溶液(10:90 V/V); (2) 异丙醇水溶液(10:90 V/V); (3) 乙醇水溶液(50:50 V/V)。

在烧杯中称取茛三酮5.0克和丙酸钠52.95克,加入已处理过的乙二醇甲醚125毫升及少量蒸馏水,用电磁搅拌器搅拌至完全溶解,然后加入23.25毫升丙酸,搅匀后转移至250毫升容量瓶中,再用蒸馏水稀释至刻度,即配成淡黄色茛三酮溶液,在冰箱中放置24小时后用于测定。

因为过氧化物对茛三酮溶液的显色有影响,因此必须去除乙二醇甲醚中的少量过氧化物。每500毫升乙二醇甲醚中加硫酸亚铁5克,振摇1~2小时后滤去硫酸亚铁,蒸馏,收集121~125°C的馏份。收集液应无色透明。

4. 样品准备

(1) 标准丝素的制备——生丝皂法精练初练:生丝经丝光皂12.5克/升95°C练60分钟→95°C水洗10分钟→60°C水洗10分钟。

复练:将已经初练的生丝用丝光皂10克/升95°C练60分钟→95°C水洗10分钟→60°C水洗10分钟→冷水充分洗涤→自然晾干。

以上所用的浴比均为1:100。

(2) 标准丝素的碳酸钠处理

将以上标准丝素分别在不同浓度的碳酸钠溶液中处理30或60分钟,处理温度95°C,浴比1:50。处理后的纤维用冷水反复洗涤至洗涤液呈中性,再用0.01摩的醋酸溶液浸渍30分钟后用冷水洗涤,自然晾干或在真空烘箱中30°C烘干。

(3) 标准丝素的碳酸钠和氢氧化钠混合碱处理

将以上标准丝素分别在不同配比的碳酸钠和氢氧化钠的混合碱溶液中处理30或60分钟,处理温度95°C,浴比1:50,以后处理同碳酸钠。

5. 真丝纤维试样中 $(\alpha + \epsilon)$ 氨基含量的测定

正确称取纤维30.00毫克三份,分别放入20毫升具塞试管中,加入异丙醇水溶液2毫升,吡啶水溶液2毫升和茛三酮溶液4毫升,摇匀后用包有铝箔的塞子塞住试管,放入沸水浴中加热50分钟。在此期间不断加入沸水以保持水浴水面高度不变。取出试管后摇动试管并打开瓶塞,趁热立即加入20毫升乙醇水溶液稀释溶液并停止反应(稀释必须在溶液还热的情况下进行)。重新盖好塞子,将试管置于冷水浴中冷却15分钟后,把试管内溶液小心转移到100毫升容量瓶中(注意不要把纤维转移过去,如有大量细小纤维需经过滤),然后用蒸馏水多次洗涤试管,洗涤液一并倒入容量瓶,最后稀释至100毫升。在721型分光光度计上测定溶液的光密度。

在做以上试样测定时另作一空白对照液,以排除其他试剂的影响,尤其是吡啶中 NH_3 的影响。

6. 标准亮氨酸溶液中末端氨基的测定
分别正确吸取1毫升 1×10^{-3} 摩、 2×10^{-3}

摩、 3×10^{-3} 摩和 4×10^{-3} 摩亮氨酸溶液各三份代替真丝试样，加入试剂和其他操作均与测试真丝试样相同，然后分别测定反应后溶液的光密度值，同时作空白对照试验。

7. 标准参比丝素 ($\alpha + \epsilon$) 氨基含量统计值的测定

$$-\text{NH}_2 \text{ (微摩尔/克)} = \frac{1\text{ml标准亮氨酸溶液中亮氨酸量}(\mu\text{mol}) \times \text{被测纤维的光密度}}{\text{被测纤维干重(克)} \times \text{标准亮氨酸溶液的光密度}}$$

8. 被测纤维试样 ($\alpha + \epsilon$) 氨基含量的测定

按真丝纤维中 ($\alpha + \epsilon$) 氨基含量的测定方法测定试样和外标准1毫升 2×10^{-3} 摩亮氨酸

$$-\text{NH}_2 \text{ (微摩尔/克)} = \frac{K1\text{ml标准亮氨酸溶液中亮氨酸量}(\mu\text{mol}) \times \text{被测纤维的光密度}}{\text{被测纤维干重(克)} \times \text{标准亮氨酸溶液的光密度}}$$

其中： $K = \frac{\text{测得标准参比丝素的统计平均值}}{\text{与被测试样同时测定时标准参比丝素的测定值}}$

三、结果与讨论

1. 显色反应时加热时间对测试光密度的影响

用 2×10^{-3} 摩标准亮氨酸和真丝丝素作被测试样分别与茚三酮反应，加热不同时间，测得煮沸时间与光密度值的关系，如图1所示。

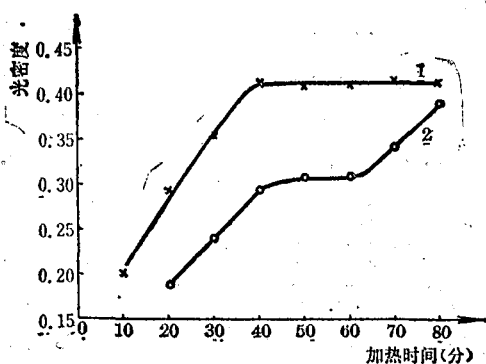


图1 加热时间与光密度的关系

1—亮氨酸；2—真丝丝素。

从图1可以看出：加热时间对显色反应有很大的影响。对亮氨酸来说加热约40分钟就可完成显色反应，以后延长加热时间，光

正确称取经过精练的标准参比丝素30.00毫克10~15份，测定其 ($\alpha + \epsilon$) 氨基含量，同时测定1毫升 2×10^{-3} 摩亮氨酸溶液经反应后的光密度值作外标准，并算出标准参比丝素上 ($\alpha + \epsilon$) 氨基含量的统计平均值 ($-\text{NH}_2$ 微摩尔/克纤维)。计算式如下：

溶液的光密度。为了提高测定值的正确性，每次测定三个标准参比丝素样以作校准。计算式如下：

被测纤维上 ($\alpha + \epsilon$) 氨基含量：

密度基本不变。对真丝纤维开始时光密度随加热时间的增加而提高。在40~60分钟之间曲线较平坦，而60分钟以后曲线又急剧上升，这可能是由于加热60分钟后真丝纤维上的 $-\text{NH}_2$ 已完全反应，精氨酸上的胍基开始参加反应^[4]，也可能因加热时间过长，在很弱的酸性条件下纤维有一定量的水解而导致曲线又复上升。对此现象还有待进一步研究。

从以上实验可知加热时间以50分钟为宜，在这时间范围内，即使加热时间稍有变化，对测定值影响很小。

2. 去除乙二醇甲醚中过氧化物的必要性

在茚三酮显色反应中，当试剂中含有过氧化物时，它将破坏还原茚三酮，不利于有色物质的生成。生成的有色物质也容易分解，显色液放置一段时间后很快褪色。用去除及不除去过氧化物的乙二醇甲醚分别配成茚三酮溶液，然后用这两种溶液测定亮氨酸，作出加热时间对光密度影响曲线，如图2所示：

从图2可知，用去除过氧化物的乙二醇甲醚所配成的茚三酮溶液时，加热40分钟后曲线呈水平直线，反应很稳定。但是，当使

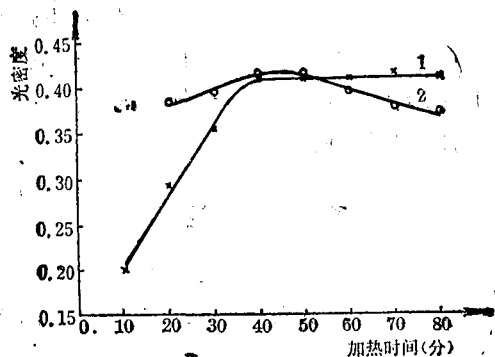


图2 乙二醇甲醚中过氧化物对显色的影响
1—去除过氧化物；2—含有过氧化物。

用不去除过氧化物的乙二醇甲醚所配制的茚三酮溶液时，加热40分钟后随着时间的延长光密度值急速下降。加热时间稍有变化就可能造成很大的测定误差，因此，去除乙二醇甲醚中的过氧化物是十分必要的。

3. 该法适用的被测物浓度范围

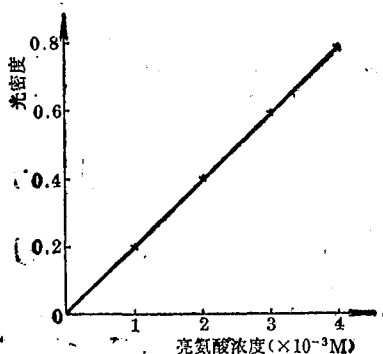


图3 亮氨酸浓度与光密度的关系

从图3可知当亮氨酸浓度范围在 4×10^{-3} 摩以下，测得光密度小于 0.78 时严格遵守皮尔定律，计算所得的线性相关系数 $r = 0.9998$, $A = 0.004$, $B = 0.195$, 线性方程为：

$$E(\text{光密度}) = 0.004 + 0.195C$$

其中：C为亮氨酸浓度。

根据实验测得30毫克未受损真丝试样显色后光密度值约为0.3左右，经损伤后的丝素光密度也小于0.784，所以本法适用于真丝受损程度的测定。

4. 分析方法的正确性和重演性

分别测定1毫升 2×10^{-3} 摩亮氨酸标准溶液10次及标准参比丝素15次，所得结果为亮氨酸统计平均光密度 (\bar{X}) 0.398、标准偏差 σ_{n-1} (光密度) 0.0037、变异系数 C 0.95%、最大相对误差1.3%。标准参比丝素 ($\alpha + \epsilon$) 氨基平均值 (\bar{X} (微摩尔/克纤维) 57.9、标准偏差 σ_{n-1} (微摩尔/克纤维) 0.465、变异系数 0.79%、最大相对误差1.3%，从而说明该方法的重演性较好，能满足工业纤维分析的要求。

5. 茚三酮溶液的稳定性

茚三酮非常容易发生光氧化作用，使溶液颜色逐步转成红橙色，因此配好的茚三酮溶液应置于棕色瓶内并储藏在冰箱中。经试验，按本方法所配制的茚三酮溶液在冰箱中一般放置有效期为二星期，与 0.002 毫摩尔亮氨酸反应后的光密度值应在 0.385~0.410 范围内，小于此值表示溶液已破坏。此外还发现当天配置的茚三酮测定数值偏低，重演性差。这可能是由于茚三酮溶解后，水合化还需一定时间，因此溶液配好后要在冰箱中放置一天后才能使用。

6. 真丝纤维受损程度测定

用本方法分别测定经碳酸钠和氢氧化钠混合碱和经碳酸钠处理过的标准丝素，实验结果见下表和图 4。

混合碱处理丝素 ($\alpha + \epsilon$)
氨基量 (微摩尔/克纤维)

碱剂用量 (克/升)	标准参比 丝素	NaOH 0.1	NaOH 0.2	NaOH 0.3	
		Na ₂ CO ₃ 0.3	Na ₂ CO ₃ 0.3	Na ₂ CO ₃ 0.3	
处时 理间(分)	30	56.4	55.3	56.0	57.0
60	55.5	56.2	57.5	58.1	

从图表看出用本方法测定真丝纤维受碱损伤的程度是可行的。随着碳酸钠浓度的增加，纤维上 ($\alpha + \epsilon$) 氨基含量增加，在同样碱浓度下处理时间长纤维上 ($\alpha + \epsilon$) 氨基含量增加。另外从图表中还可看出总碱量对丝素损伤的影响比处理初期处理浴 pH 对损伤的影响要大得多。虽混合碱使用氢氧化钠，但因氢

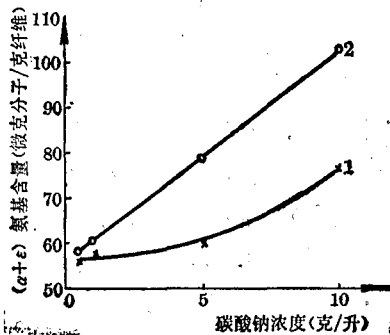


图4 碳酸钠用量对丝素(α+ε)氨基含量的影响
1—处理30分钟; 2—处理60分钟。

氧化钠的用量少(如0.1克/升),由氢氧化钠而放出的OH⁻首先消耗于丝素的吸碱和部分水解,溶液pH下降,纤维受损较少,而且在碱量不多的情况下,胱氨酸和丝氨酸都能与OH⁻反应而生成脱氢丙氨酸。脱氢丙氨酸具有双键能与赖氨酸上的ε氨基进一步反应,生成交链,减少了可测出的ε氨基量^[6],因此在碱较少的条件下处理30分钟,测出的(α+ε)氨基量与处理前差不多甚至稍有减少。当碱用量提高或时间延长后水解而产生的α氨基量增加。

从以上实验也可推断在精练过程中总碱量对丝素损伤的影响比练初pH的影响大,如在练初加一定量强碱,由于丝胶的吸碱量增

大溶解度增加,脱胶速度加快,但只要强碱用量适当,在精练初期就消耗掉,练浴pH迅速下降,精练后期不会引起丝素的严重损伤。这个推断与精练工艺实际相符。

四、结 论

1. 用茚三酮溶液测定真丝纤维上的(α+ε)氨基含量,从而评价真丝纤维受损程度是可行的。

2. 与其他常用测试方法相比,本方法比较简单,不需特殊仪器;重现性好,但必须使用外标准,并同时测定标准参比试样加以校准,以提高测定数据的正确性。

本院81届学生杨秀稳、蒋文杰、82届学生张榕、郑浦生参加了大量实验工作,特此感谢

参 考 资 料

- [1] 张龙翔、张庭芳《生化实验方法和技术》。
- [2] 《Anal. Biochem.》,1973, Vol. 54, p.333.
- [3] 《Milliand Textilberichte (Eng. Ed)》,1983, July p.470.
- [4] 《J. Text. Inst. 》,1981, No.1, p.19.
- [5] 王涛、陈文湘等《用N-端茚三酮溶液显色法检测炭化羊毛的损伤》。
- [6] R. S. Asquith. 《Chemistry of Natural Protein Fibers》.