

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103512828 A

(43) 申请公布日 2014.01.15

(21) 申请号 201310482730.5

(22) 申请日 2013.10.16

(71) 申请人 山东轻工业学院

地址 250353 山东省济南市西部新城大学科
技园大学路 3501 号齐鲁工业大学

(72)发明人 李天锋 许静 姜青伟 唐小龙

(51) Int. GI

G01N 7/18 (2006.01)

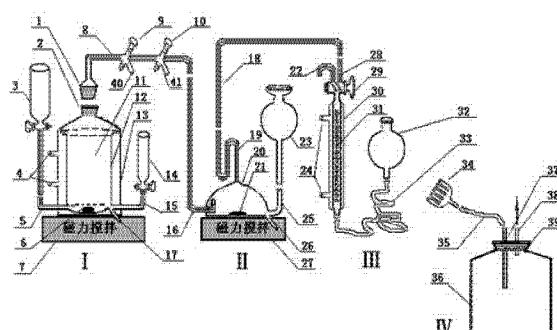
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一种伯胺基含量准确测定方法

(57) 摘要

本发明在 Van 方法的基础上, 提供一种伯胺基含量准确测定的方法, 尤其涉及一种明胶、蛋白质等大分子生物化合物分子中伯胺基含量准确测定的方法, 准备好伯胺基定量仪, 排空体系内的空气, 固定亚硝酸浓度、冰醋酸与亚硝酸配比、待测液浓度、测试温度、测试时间等测试条件, 解决了生物大分子中伯胺基含量测定受环境条件制约大以及大分子反应平衡时间长的问题, 对氨基酸其标定误差为 0.5%, 对明胶其测定偏差为 1%。



1. 一种伯胺基含量准确测定的方法,尤其涉及一种明胶、蛋白质等生物大分子中伯胺基含量准确测定的方法包括如下步骤:

- 1) 准备伯氨基定量仪;
- 2) 排空体系内的空气;
- 3) 配制待测液;
- 4) 进行测定;按下述公式计算伯氨基含量:

$$C_0 = \frac{n_{N_2}}{m_0} = \frac{n_0}{m_0} = \frac{\rho \cdot V}{\eta \cdot M \cdot m}$$

其中, n_0 为待测生物大分子样品中伯氨基含量(mol), n_{N_2} 为测得的氮气的量(mol), ρ 为待测生物大分子样品的质量浓度, m 为待测生物大分子样品总质量(g), ρ 为氮气的质量密度(g/mL), 根据量气时的温度 T 及大气压 P 查表得到, V 为测量氮气的体积(mL), M 为氮气分子量(g / mol), C_0 为待测生物大分子样品中伯氨基含量(mol/g)。

2. 根据要求 1 所述的一种伯胺基含量准确测定的方法,尤其涉及一种明胶、蛋白质等生物大分子中伯胺基含量准确测定的方法,其特征是,步骤 1)所述的准备伯氨基定量仪,具体操作如下:各旋塞涂抹真空硅脂,密封好各个接口,其中半球洗气瓶排液口(26)和反应器排液口(17)用止水夹夹好,以防止液体泄漏。

3. 根据权利要求 1 所述的一种伯胺基含量准确测定的方法,尤其涉及一种明胶、蛋白质等生物大分子中伯胺基含量准确测定的方法,其特征是,步骤 2)的具体操作如下:首先将洗液,从缓冲瓶(23)缓缓倒入,注满半球洗气瓶(20),并使洗液至缓冲瓶(23)体积的 1/3 处;调节斜孔三通旋塞(29)以洗液充满至斜孔三通旋塞(29)处,旋动斜孔三通旋塞(29),使斜孔三通旋塞(29)不与各方相通;从水准瓶(32)注入去离子水,旋动斜孔三通旋塞(29)使量气管与排液口(22)相通,抬高水准瓶(32)的位置,当量气管(31)充满去离子水后,旋动斜孔三通旋塞(29),使斜孔三通旋塞(29)不与各方相通;旋动三通旋塞(10),使半球洗气瓶(20)中的洗液充满至三通旋塞(10),然后调节三通旋塞(10)使得半球洗气瓶(20)不与反应装置(I)、回收装置(IV)相通;该操作可以使量气、洗气装置中的空气被完全排出,此时半球洗气瓶(20)与量气管(31)中均充满液体,并与外界空气隔绝;开启循环水浴,设定测试所需温度,从加料管(3)加入冰醋酸,然后加入亚硝酸钠水溶液,关闭加料管(3),加去离子水液封,用少量去离子水将加料管(14)下部细管中气体赶入反应器(11),关闭加料管(14);旋动三通旋塞(9),使反应器(11)和三通旋塞(10)相通;开启磁力搅拌(7),反应器(11)内反应生成 NO 气体,保持 5 分钟,排净反应器(11)内空气。

4. 根据权利要求 1 所述的一种伯胺基含量准确测定的方法,尤其涉及一种明胶、蛋白质等生物大分子中伯胺基含量准确测定的方法,其特征是,步骤 4)的具体操作如下:打开磁力搅拌(27),旋动三通旋塞(10),使反应装置(I)与洗气装置(II)相通;在加料管(14)中加入待测液,缓慢打开加料管(14)旋塞,使待测液缓慢流入反应器(11),并用少量去离子水冲洗加料管(14),以正辛醇液封;加料结束时闭合加料管(14);反应器(11)从加入待测液开始计时,反应 30~300 分钟停止反应;打开加料管(3)旋塞,使得加料管(3)中液体进入反应器(11),将反应器(11)中气体完全赶入半球洗气瓶(20);旋动三通旋塞(10),使反应器(11)与废液瓶(36)相通,不与半球洗气瓶(20)相通;打开反应器(11)的排液口(17)

排净反应液；增大半球洗气瓶(20)下方磁力搅拌(27)的搅拌速度，搅拌一定时间后，关闭磁力搅拌(27)，静置，旋动量气管(31)上部的斜孔三通旋塞(29)，把半球洗气瓶(20)内气体赶入量气管(31)，当洗气液流至斜孔三通旋塞(29)处时，旋动斜孔三通旋塞(29)，使得斜孔三通旋塞(29)连接的各方互不相通；然后静置5~20分钟，提高水准瓶(32)，使水准瓶(32)内液面凹面与量气管(31)内液面凹面相平，读取量气管(31)中气体体积V，同时记录此时气压P与量气管循环水浴温度T，用于计算待测液中伯氨基含量。

5. 根据权利要求1所述的一种伯胺基含量准确测定的方法，尤其涉及一种明胶、蛋白质等生物大分子中伯胺基含量准确测定的方法，其特征是，步骤2)，洗液的配置为称取10~40克高锰酸钾，0.5~3克氢氧化钠，将二者混合后溶于200mL去离子水中；测定温度设置在25~70℃之间；冰醋酸为10~30毫升；亚硝酸钠的质量百分浓度为10~60%，用量为10~30毫升。

6. 根据权利要求1所述的一种伯胺基含量准确测定的方法，尤其涉及一种明胶、蛋白质等生物大分子中伯胺基含量准确测定的方法，其特征是，步骤3)，待测生物大分子样品溶液的质量百分浓度为1~60%。

7. 根据权利要求1所述的一种伯胺基含量准确测定的方法，尤其涉及一种明胶、蛋白质等生物大分子中伯胺基含量准确测定的方法，其特征是，步骤4)，半球洗气瓶(20)下方的磁力搅拌应保持3~10分钟；关闭磁力搅拌后，静置5~20分钟。

一种伯胺基含量准确测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种伯胺基含量准确测定的方法，尤其涉及一种明胶、蛋白质等生物大分子中伯胺基含量准确测定的方法。

背景技术

[0002] 甲醛滴定法、茚三酮比色法、TNBS 比色法、Van Slyke 法以及气相色谱法是测定伯胺基含量的常用方法。其中，甲醛滴定法通过滴定甲醛与游离伯胺基结合后解离出的 H⁺ 推算伯胺基含量，然而整个滴定过程中不发生滴定突跃，表明该法不能测准伯胺基含量；TNBS 比色法是利用三硝基苯磺酸与伯胺基发生烷基化反应测定伯胺基含量，然而羧基 α 碳上的氢、活泼亚甲基等也可参与烷基化反应，该法副反应多，实验误差大；茚三酮比色法中存在类似的问题。Van Sykel 法通过量取伯胺基与亚硝酸反应产生 N₂ 的体积计算伯胺基含量。气相色谱检测法利用了 Van Slyke 法并通过气相色谱检测 N₂ 含量，然而气相色谱不能集气，要求反应在为 5-10 分钟内结束，尽管该方法能准确测定小分子中氨基含量，却不能满足大分子反应时间长的需求。相对而言，Van Slyke 法具有副反应少、可靠性高、满足大分子反应平衡时间长等显著特点，是测定多肽反应体系中伯胺基转化率的最优方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的是在伯胺基定量仪装置研制基础上(ZL2012202419656)，提供一种伯胺基含量准确测定的方法，尤其涉及一种明胶、蛋白质等大分子生物化合物分子中伯胺基含量准确测定的方法，为生物大分子化合物结构测定提供实验依据。

[0004] 本发明采取的技术方案为，准备好伯胺基定量仪，排空体系内的空气，配制一定浓度的待测液，固定亚硝酸钠的浓度及冰醋酸与亚硝酸钠的配比，选定测试时间、测试温度，对明胶、蛋白质溶液等生物大分子化合物溶液进行测定。

[0005] 上述伯胺基测定方法，包括步骤如下：

- 1) 准备伯氨基定量仪；
- 2) 排空体系内的空气；
- 3) 配制待测液；
- 4) 进行测定；按下述公式计算伯氨基含量：

$$C_0 = \frac{n_{N_2}}{m_0} = \frac{n_0}{m_0} = \frac{\rho \cdot V}{\eta \cdot M \cdot m}$$

其中，n₀ 为待测生物大分子样品中伯氨基含量(mol)，n_{N₂} 为测得的氮气的量(mol)， ρ 为待测生物大分子样品的质量浓度，m 为待测生物大分子样品总质量(g)， ρ 为氮气的质量密度(g/mL)，根据量气时的温度 T 及大气压 P 查表得到，V 为测量氮气的体积(mL)，M 为氮气分子量(g / mol)，C₀ 为待测生物大分子样品中伯氨基含量(mol/g)。

[0006] 优选的，步骤 1) 所述的准备伯氨基定量仪，具体操作如下：各旋塞涂抹真空硅脂，密封好各个接口，其中半球洗气瓶排液口(26)和反应器排液口(17)用止水夹夹好，以防止

液体泄漏。

[0007] 优选的,步骤 2),具体操作如下:首先将洗液,从缓冲瓶(23)缓缓倒入,注满半球洗气瓶(20),并使洗液至缓冲瓶(23)体积的 1/3 处。调节斜孔三通旋塞(29)以洗液充满至斜孔三通旋塞(29)处,旋动斜孔三通旋塞(29),使斜孔三通旋塞(29)不与各方相通。从水准瓶(32)注入去离子水,旋动斜孔三通旋塞(29)使量气管与排液口(22)相通,抬高水准瓶(32)的位置,当量气管(31)充满去离子水后,旋动斜孔三通旋塞(29),使斜孔三通旋塞(29)不与各方相通。旋动三通旋塞(10),使半球洗气瓶(20)中的洗液充满至三通旋塞(10),然后调节三通旋塞(10)使得半球洗气瓶(20)不与反应装置(I)、回收装置(IV)相通。该操作可以使量气、洗气装置中的空气被完全排出,此时半球洗气瓶(20)与量气管(31)中均充满液体,并与外界空气隔绝。

[0008] 开启循环水浴,设定测试所需温度,从加料管(3)加入冰醋酸,然后加入亚硝酸钠水溶液,关闭加料管(3),加去离子水液封,用少量去离子水将加料管(14)下部细管中气体赶入反应器(11),关闭加料管(14)。旋动三通旋塞(9),使反应器(11)和三通旋塞(10)相通。开启磁力搅拌(7),反应器(11)内反应生成 NO 气体,保持 5 分钟,排净反应器(11)内空气。

[0009] 优选的,步骤 4),具体操作如下:打开磁力搅拌(27),旋动三通旋塞(10),使反应装置(I)与洗气装置(II)相通。在加料管(14)中加入待测液,缓慢打开加料管(14)旋塞,使待测液缓慢流入反应器(11),并用少量去离子水冲洗加料管(14),以正辛醇液封。加料结束时闭合加料管(14)。反应器(11)从加入待测液开始计时,反应 30~300 分钟停止反应。打开加料管(3)旋塞,使得加料管(3)中液体进入反应器(11),将反应器(11)中气体完全赶入半球洗气瓶(20)。旋动三通旋塞(10),使反应器(11)与废液瓶(36)相通,不与半球洗气瓶(20)相通。打开反应器(11)的排液口(17)排净反应液。增大半球洗气瓶(20)下方磁力搅拌(27)的搅拌速度,搅拌一定时间后,关闭磁力搅拌(27),静置,旋动量气管(31)上部的斜孔三通旋塞(29),把半球洗气瓶(20)内气体赶入量气管(31),当洗气液流至斜孔三通旋塞(29)处时,旋动斜孔三通旋塞(29),使得斜孔三通旋塞(29)连接的各方互不相通。然后静置 5~20 分钟,提高水准瓶(32),使水准瓶(32)内液面凹面与量气管(31)内液面凹面相平,读取量气管(31)中气体体积 V,同时记录此时气压 P 与量气管循环水浴温度 T,用于计算待测液中伯氨基含量。

[0010] 优选的,步骤 2),洗液的配置为称取 10~40 克高锰酸钾,0.5~3 克氢氧化钠,将二者混合后溶于 200mL 去离子水中;测定温度设置在 25~70℃ 之间;冰醋酸为 10~30 毫升;亚硝酸钠的质量百分浓度为 10~60%,用量为 10~30 毫升。

[0011] 优选的,步骤 3),待测生物大分子样品溶液的质量百分浓度为 1~60%。

[0012] 优选的,步骤 4),半球洗气瓶(20)下方的磁力搅拌应保持 3~10 分钟;关闭磁力搅拌后,静置 5~20 分钟。

[0013] 以本专利法方法测得的蛋白质、氨基酸分子中伯氨基含量,与其每个分子中所含伯氨基的百分含量进行比对,求算相对偏差;以本专利法方法测得的明胶分子中伯氨基含量,以多次测定值计算平均值,再以每次的测定值与平均值进行比较,计算测试误差。

[0014] 有益效果:如权利要求书 1 所述的一种伯氨基含量准确测定的方法,尤其涉及一种明胶、蛋白质等生物大分子中伯氨基含量准确测定的方法,不仅可为氨基酸、合成化合物

等小分子中伯胺基含量准确测定提供方法,而且为明胶、蛋白质等生物大分子中伯胺基含量准确测定提供方法。该测试方法从仪器装置的排列、组合、增加新功能入手,提高了装置自身的测试精密度,具体如下:反应器增加了水浴夹套、磁力搅拌装置后,使反应器的控温精度准确到±0.1℃,与利用室温控制反应器温度的实验操作方法相比较,伯胺基含量测试结果偏差从7~12%减小到2~3%;以磁力搅拌强化NO的反应吸收,洗气效率大为提高,避免了振荡洗气所带来的洗气不完全的问题。将温度控制、磁力搅拌装置与反应、洗气装置结合,从实验效果上赋予用于伯胺基测定的仪器具有控温、搅拌、易于赶气、洗气方便完全、易于清洗反应器等诸多新功能。从理论角度出发,通过上述一系列组合设置。

[0015] 从生物大分子的结构特点以及在水溶液中的聚集行为作为理论基础,研究了亚硝酸钠浓度、冰醋酸与亚硝酸配比、待测液浓度、反应温度、反应时间等因素对伯氨基含量测定的影响,解决了大分子反应需要充分搅拌、反应平衡时间长等问题,回避了传统范斯莱克装置的测试结果受环境条件制约大的问题,同时大大提高了生物大分子化合物中伯胺基的测定精度。测试结果表明,对氨基酸其标定误差为0.5%,对明胶其测定偏差为1%。

附图说明

[0016] 图1 伯胺基定量仪,其中:I、反应装置,II、洗气装置,III、量气装置,IV、回收装置
1、连接管磨口 2、反应器磨口 3、加料管 4、循环水接口 5、细颈进料管,6、磁子 7、
磁力搅拌 8、连接管 9、三通旋塞 10、三通旋塞 11、反应器,12、反应器内壁 13、水浴夹
套 14、加料管 15、细颈进料管 16、细颈玻璃管,17、排液口 18、细颈玻璃管 19、S形细颈玻
璃管 20、半球洗气瓶 21、磁子,22、排液口 23、缓冲瓶 24、循环水接口 25、粗颈玻
璃管 26、排液口,27、磁力搅拌 28、进气口 29、斜孔三通旋塞 30、水浴夹套 31、量
气管,32、水准瓶 33、硅胶管 34、六通连接管 35、硅胶管 36、废液瓶 37、进液管,38、排气
管 39、橡胶塞 40、排液(气)口 41、排液(气)口;

图2 利用伯胺基定量仪测定明胶分子中伯胺基含量;

图3 利用传统 Van Slyke 装置测定明胶分子中伯胺基含量;

图4 伯氨基定量仪测试明胶分子中伯胺基含量数据与TNBS比色法的测定结果对比;

图5 测试温度、时间与明胶分子中伯氨基含量数据的关系;

图6 亚硝酸钠的质量百分浓度与明胶分子中伯氨基含量测定数据的关系;

图7 明胶质量百分浓度与伯氨基含量测定数据的关系。

具体实施方式

[0017] 蛋白质、氨基酸具有明确的分子结构,以本专利方法测得的蛋白质、氨基酸中伯胺基含量,与其每个分子中所含伯胺基的百分含量进行比对,求算相对偏差;明胶分子没有明确的分子结构,以多次测试值计算平均值,然后以每次测试值与平均值进行比较,计算测试误差。

[0018] 实施例1:

本发明所述方法测定明胶分子中伯胺基含量结果与传统 Van Slyke 装置测定结果对比。

[0019] 具体操作如下:准备伯氨基定量仪,各旋塞涂抹真空硅脂,密封好各个接口,其中

半球洗气瓶排液口(26)和反应器排液口(17)用止水夹夹好,以防止液体泄漏。

[0020] 首先将洗液,从缓冲瓶(23)缓缓倒入,注满半球洗气瓶(20),并使洗液至缓冲瓶(23)体积的1/3处。调节斜孔三通旋塞(29)以洗液充满至斜孔三通旋塞(29)处,旋动斜孔三通旋塞(29),使斜孔三通旋塞(29)不与各方相通。从水准瓶(32)注入去离子水,旋动斜孔三通旋塞(29)使量气管与排液口(22)相通,抬高水准瓶(32)的位置,当量气管(31)充满去离子水后,旋动斜孔三通旋塞(29),使斜孔三通旋塞(29)不与各方相通。旋动三通旋塞(10),使半球洗气瓶(20)中的洗液充满至三通旋塞(10),然后调节三通旋塞(10)使得半球洗气瓶(20)不与反应装置(I)、回收装置(IV)相通。该操作可以使量气、洗气装置中的空气被完全排出,此时半球洗气瓶(20)与量气管(31)中均充满液体,并与外界空气隔绝。

[0021] 开启循环水浴,设定测试温度为30℃,从加料管(3)加入冰醋酸20毫升,然后加入质量百分浓度为40wt%的亚硝酸钠水溶液20毫升,关闭加料管(3),加去离子水液封,用少量去离子水将加料管(14)下部细管中气体赶入反应器(11),关闭加料管(14)。旋动三通旋塞(9),使反应器(11)和三通旋塞(10)相通。开启磁力搅拌(7),反应器(11)内反应生成NO气体,保持5分钟,排净反应器(11)内空气。

[0022] 打开磁力搅拌(27),旋动三通旋塞(10),使反应装置(I)与洗气装置(II)相通。在加料管(14)中加入质量浓度为5wt%的明胶水溶液,缓慢打开加料管(14)旋塞,使5wt%的明胶水溶液缓慢流入反应器(11),并用少量去离子水冲洗加料管(14),以正辛醇液封。加料结束时闭合加料管(14)。反应器(11)从加入待测液开始计时,反应60分钟停止反应。打开加料管(3)旋塞,使得加料管(3)中液体进入反应器(11),将反应器(11)中气体完全赶入半球洗气瓶(20)。旋动三通旋塞(10),使反应器(11)与废液瓶(36)相通,不与半球洗气瓶(20)相通。打开反应器(11)的排液口(17)排净反应液。增大半球洗气瓶(20)下方磁力搅拌(27)的搅拌速度,搅拌一定时间后,关闭磁力搅拌(27),静置,旋动量气管(31)上部的斜孔三通旋塞(29),把半球洗气瓶(20)内气体赶入量气管(31),当洗气液流至斜孔三通旋塞(29)处时,旋动斜孔三通旋塞(29),使得斜孔三通旋塞(29)连接的各方互不相通。然后静置5~20分钟,提高水准瓶(32),使水准瓶(32)内液面凹面与量气管(31)内液面凹面相平,读取量气管(31)中气体体积V,同时记录此时气压P与量气管循环水浴温度T,用于计算5wt%的明胶水溶液中的伯氨基含量,测定结果见图2。

[0023] 同时在室温条件下使用传统Van Slyke装置测定,(见图3),对比测定结果。

[0024] 从图2和图3中我们可以看出,利用伯氨基定量仪,在确定的温度、测试时间、物料浓度、亚硝酸钠浓度、亚硝酸钠与冰醋酸的配比下,测得数据的稳定性较高,测得数据的相对误差<1%。传统Van Slyke装置由于无法固定测试温度,在室温条件下测得的数据稳定性较差,测定数据的相对误差>5%,很难满足我们对数据稳定性的要求。

[0025] 实施例2:

本发明所述方法测定明胶分子中伯胺基含量结果与TNBS比色法的测定结果对比,设定测定温度为45℃,测定时间为40分钟,其他同实施例1。

[0026] 使用伯氨基定量仪测定的明胶分子中伯胺基含量结果见图4。同时,利用TNBS比色法测定结果作比对,见图4。

[0027] 测定,伯氨基定量仪对明胶伯氨基含量测定的数据稳定性较好,相对误差为0.5%。而TNBS比色法测定的明胶伯氨基含量的数据稳定性较差,相对误差达到7%。

利用该结果可以表明，在确定的反应时间、温度的条件下，伯氨基定量仪测得的数据准确性更高，说明 Van Slyke 法具有副反应少、可靠性高、满足大分子反应平衡时间长的显著特点，是测定生物大分子中伯氨基含量的最优方法。而 TNBS 比色法副反应多，实验误差大。

[0028] 实施例 3：

测试温度、时间对氨基酸中氨基中伯氨基含量测定结果的影响。

[0029] 由于组成明胶的氨基酸种类较多，我们选取了其中具有代表性的丙氨酸、甘氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸进行了测定。在进行测定之前对以上氨基酸根据其性质差异分别进行了纯化处理。对于丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸，主要利用氨基酸在不同溶剂中溶解性的差异，分别用无水乙醇对其进行了多次沉析，然后真空干燥后备用。对于谷氨酸，则利用其在不同 pH 的水中溶解性差异，通过调节溶液 pH 对其进行多次重结晶，真空干燥后备用。

[0030] 将纯化后的氨基酸分别配制成 0.1 摩尔 / 升的溶液，然后取 2 毫升用伯氨基定量仪进行了测定，测定时间分别为 30 分钟、60 分钟、90 分钟，测定温度分别为 40℃、45℃、50℃，亚硝酸钠 40wt%，亚硝酸 / 冰醋酸 1:1(V/V)，然后根据公式计算出氨基酸中伯氨基的含量。其他同实施例 1。

[0031] 由表 1 可知，氨基酸中伯氨基含量的测定一定程度上受测定温度和时间的影响，当测定温度 $\geq 45^\circ\text{C}$ 、测定时间 ≥ 60 分钟时，伯氨基定量仪测得的氨基酸中伯氨基含量的相对偏差均小于 1%，由此可知，测试温度、时间等实验条件是决定伯氨基含量转却测定的关键要素。

[0032] 表 1 测试温度、时间与氨基酸中伯氨基含量测定数据的关系

氨基酸	测试条件	40℃	45℃	50℃	理论值	相对偏差
甘氨酸	30分钟	0.17004	0.18413	0.19258	0.2000	时间 ≥ 60 分钟 0.32%
	60分钟	0.20155	0.20414	0.20011		
	90分钟	0.20414	0.20373	0.19733		
丙氨酸	30分钟	0.1922	0.1971	0.1955	0.2000	时间 ≥ 60 分钟 0.72%
	60分钟	0.1991	0.1982	0.1987		
	90分钟	0.1981	0.2004	0.1989		
赖氨酸	30分钟	0.40036	0.40143	0.40286	0.4000	0.52%
	60分钟	0.40893	0.40143	0.40264		
	90分钟	0.39821	0.40446	0.40429		
精氨酸	30分钟	0.28702	0.34304	0.3649	0.4000	时间 > 60 分钟 温度 ≥ 45℃ 0.97%
	60分钟	0.30523	0.39317	0.3936		
	90分钟	0.34149	0.39386	0.40388		
谷氨酸	30分钟	0.16901	0.17842	0.18957	0.2000	时间 ≥ 60 分钟 0.87%
	60分钟	0.19155	0.20133	0.19906		
	90分钟	0.19842	0.19725	0.19873		

实施例 4：

测试温度、时间对明胶分子中伯氨基含量测定的影响。配制明胶质量百分浓度为 5%、亚硝酸钠质量百分浓度为 40%，亚硝酸 / 冰醋酸 1:1（体积比）的条件下研究了测定温度及测定时间对伯氨基含量测定的影响，测定温度分别为 30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、70℃，测定时间分别为 0.5h、1h、1.5h、2h、3h、4h、4.5h、5h、5.5h、6h、6.5h、7h。其他同实施例 1。

[0033] 从图 5 中可以看出，用伯氨基定量仪测得的明胶伯氨基含量随反应温度的增加、反应时间的增长呈增加趋势。当测定温度在 40–50℃之间，测定时间 >4h 时，测得的明胶的伯氨基含量趋于稳定；当测定温度 >50℃，测得的伯氨基含量随着测定时间的增加、测定温度的升高而迅速增加。研究结果表明，测试温度、时间是影响明胶等生物大分子中伯胺基含量的关键要素。明胶是由胶原蛋白水解得到的，是生物大分子，是两性聚电解质，其分子中含有多种极性基团和非极性基团，在水溶液中，可发生聚集，不同温度聚集状态不同，引起伯氨基暴露量的变化。明胶是生物大分子，发生化学反应需要足够长的平衡时间，因此，随着时间增加，测得的伯氨基含量呈现先增加后平衡的趋势。

实施例 5：

亚硝酸钠的质量百分浓度对明胶分子中伯氨基含量测定的影响，改变亚硝酸钠质量浓度分别为 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60% 下进行了测定，其他同实施例

2。

[0035] 从图 6 中可以看出当亚硝酸钠质量浓度 <30% 时, 测得的伯氨基含量随着亚硝酸钠浓度的增加而增大 ; 当亚硝酸钠质量浓度 >30% 时, 测得的伯氨基含量趋于稳定。

[0036] 实施例 6 :

明胶质量百分浓度对伯氨基含量测定的影响, 其他同实施例 1。

[0037] 从图 7 中可以看出, 当反应体系中明胶的质量表分浓度小于 10%, 测得的明胶伯氨基含量较稳定, 当测定体系中明胶的质量表分浓度大于 10% 时, 随着测定体系中明胶物料浓度的增加, 测得的伯氨基含量呈下降趋势, 这说明选择适合的浓度是保证明胶等生物大分子中伯胺基含量准确测定的要素。

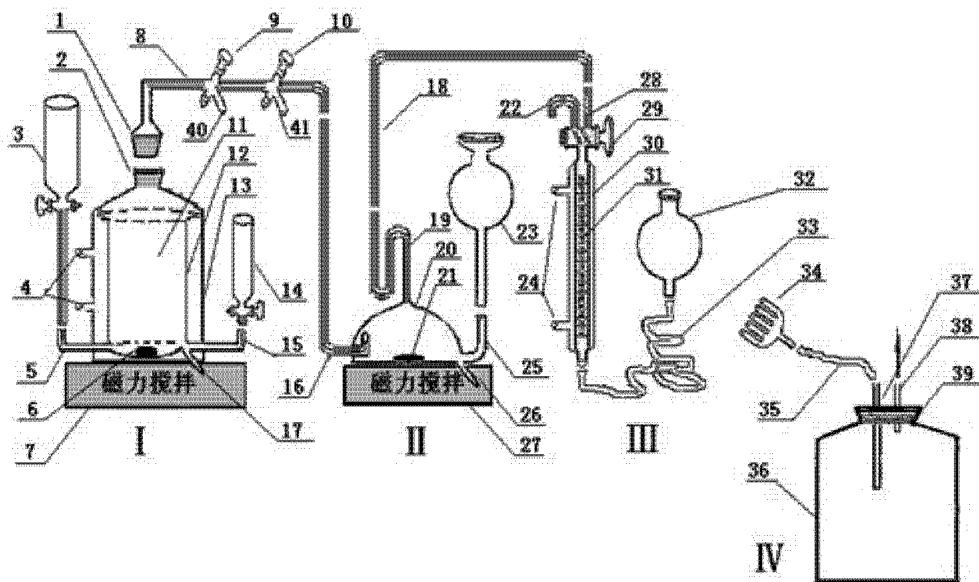


图 1

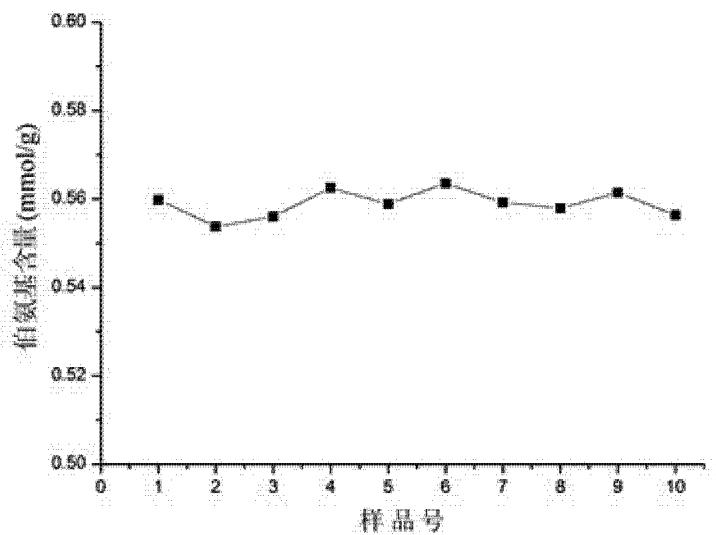


图 2

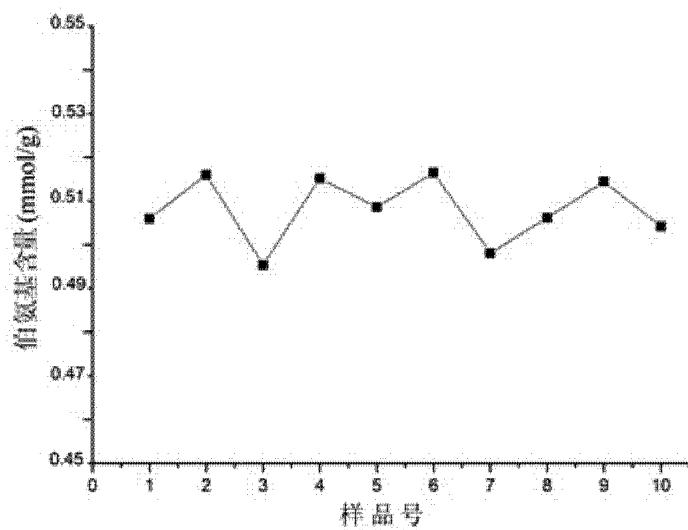


图 3

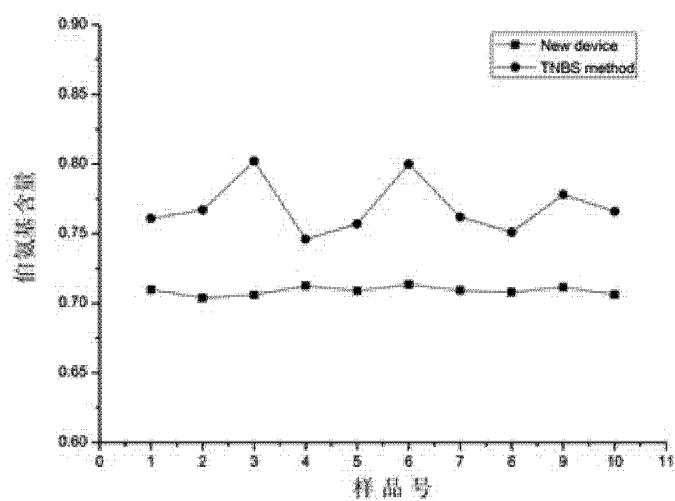


图 4

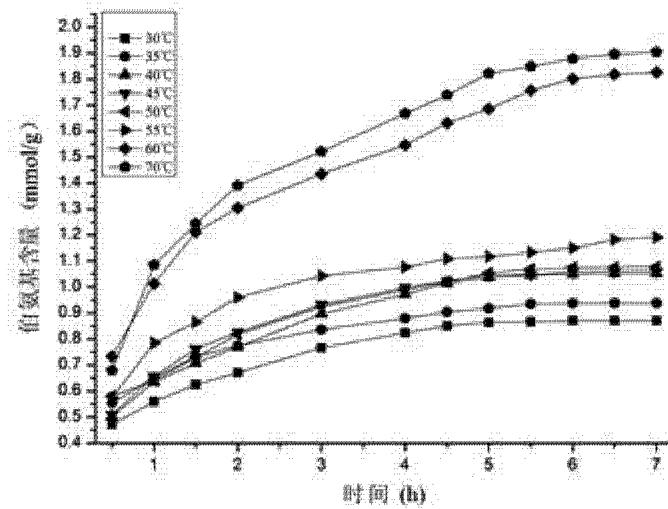


图 5

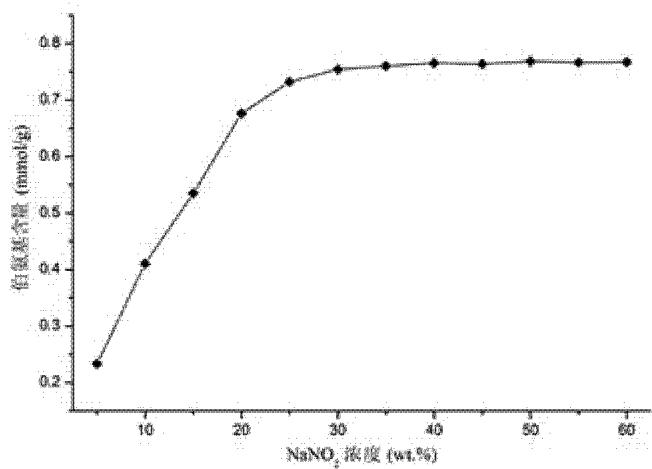


图 6

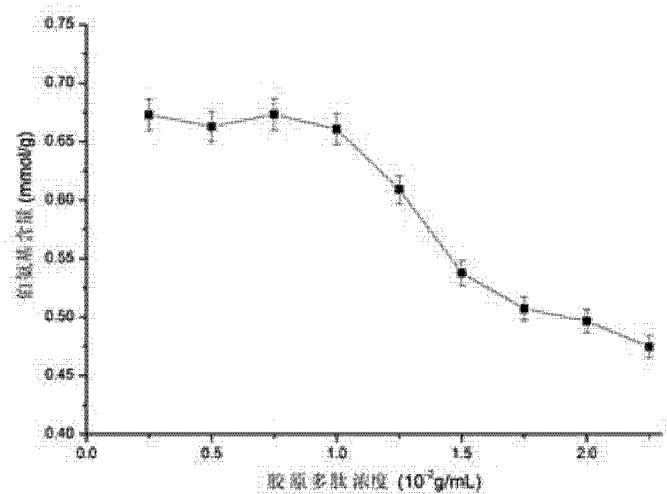


图 7