

经验交流

紫外吸收法测定粮食中色氨酸

胡云梯

(新疆八一农学院)

童秀珍

(自治区卫生防疫站)

色氨酸是人体必需的氨基酸之一。色氨酸缺乏,可限制蛋白质、5-羟色胺和尼克酸的合成,氮平衡也受障碍,引起血浆蛋白和血红蛋白含量的减低。因此色氨酸测定是评价食物营养与选育作物良种的一个重要依据。

色氨酸测定通常是利用色氨酸与乙醛酸或对二甲氨基苯甲醛形成红紫色缩合物进行比色。1967年 H. Edelhoch 曾提出用紫外吸收法测定色氨酸和酪氨酸^[1]。但尚未见有粮食中色氨酸分析的报道。本文介绍我们在这方面的工。

仪器和试剂 1.751 型分光光度计, 2.磷酸盐缓冲剂(将 3.465 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 1.0 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于水, 稀释至 500 毫升, $\text{pH} = 6$), 3.色氨酸标准液(准确称取 20 毫克色氨酸、溶于 5 毫升 0.1 N NaOH, 用盐酸调 pH 至 6, 稀释至 100 毫升, 每毫升含色氨酸 200 微克。保存在冰箱内) 4.酸性蛋白酶溶液:(取 800 毫克酸性蛋白酶, (新疆生物土壤沙漠研究所生产)溶于 50 毫升 0.2N 醋酸, 加 50 毫升 0.2N 醋酸钠溶液, 过滤, pH 约为 5。保存在冰箱内)。5.酪氨酸溶液,(称 20 毫克酪氨酸溶于 5 毫升 0.1 N NaOH, 用盐酸调 pH 至 6, 稀释至 100 毫升, 每毫升含酪氨酸 200 微克)。

实验步骤 1.绘制工作曲线 在 8 个 50 毫升容量瓶中, 加入 0.0、1.25、2.50、5.00、7.50、10.00、

12.50、15.00 毫升色氨酸标准液, 各加入 10.0 毫升酸性蛋白酶溶液和 6.0 毫升酪氨酸溶液(谷物酪氨酸按试样 0.3% 加入, 豆类按试样 0.7% 加入), 用水稀至刻度。

取上述标准液 1.0 毫升注入刻度管, 加 3.0 毫升磷酸盐缓冲液, 用水稀至 10 毫升, 摇匀, 用石英吸收池在 288 nm 读取吸收值并绘制工作曲线(图 1)。

2.脱脂 取 1—2 克磨粉试样, 用滤纸包好, 置脂肪抽取器中, 用乙醚在水浴上回流浸提 4 小时, 取出蒸干乙醚。

3.水解 称取 200 毫克谷物脱脂试样(豆类称 100 毫克)置试管中, 一支试管作空白, 加 5.0 毫升酸性蛋白酶溶液, 摇匀, 盖上软木塞, 在 45℃ 恒温箱中水解 16—24 小时, 移入 50 毫升容量瓶, 用水稀至刻度, 干滤器过滤。

4.萃取 取滤液 6 毫升置 25 毫升分液漏斗中, 加 4 毫升氯仿, 振摇 1 分钟, 分层后, 弃去氯仿层, 如此重复萃取四次。

5.测定 取萃取后试液 2.0 毫升置刻度管中, 加 3 毫升磷酸盐缓冲液, 用水稀释至 10 毫升, 摇匀, 用石英杯在 288 nm 测量吸收值。从工作曲线查出试液浓度, 计算色氨酸百分含量。

$$\text{色氨酸}\% = \frac{CV}{GU} \%$$

C = 浓度(微克/毫升) V = 试液总体积(毫升)

U = 取用的试液体积(毫升) G = 试样(毫克)重(脱脂试样需换算成原样重)。

表 1 粮食中色氨酸测定结果

序号	试样	本法结果 %	比色法结果 %
1	小麦	0.18	0.16
2	红高粱	0.24	0.26
3	小米	0.14	0.12
4	普通玉米	0.07	0.055
5	高色玉米	0.17	0.15
6	大豆	0.40	0.43

用此法测定粮食中色氨酸, 结果列于表 1。

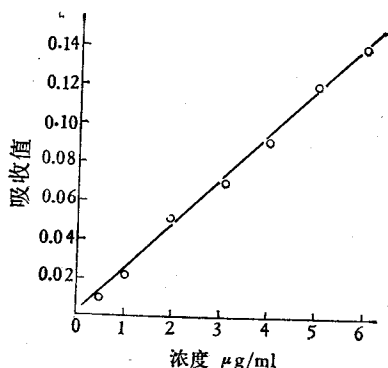


图 1 工作曲线

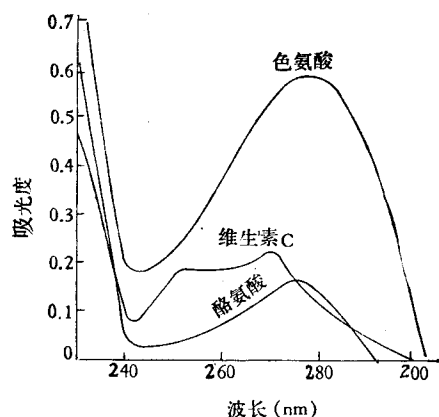


图2 色氨酸酪氨酸维生素C的吸收光谱
(色氨酸、酪氨酸均为20微克/毫升,在pH6磷酸盐缓冲剂中,维生素C为水溶液,20微克/毫升)

本法适用于谷物和豆类中色氨酸测定,但不适用于某些油料作物,如棉籽中有棉酚和菜籽中有黑芥甙等一类干扰物质,难以除去。

图2是色氨酸、酪氨酸的吸收光谱,在pH=6的磷酸盐缓冲溶液中,它们的吸收峰分别在280 nm和275 nm。在此条件下,色氨酸和酪氨酸的吸收曲线在288 nm处几乎不重叠。因此,可在288 nm单独测定色氨酸。为补偿试样中酪氨酸在此波长所产生的少量吸收,我们在绘制工作曲线时于色氨酸标准液中加入适量酪氨酸。

图3是酪氨酸在不同pH的吸收曲线。当pH=10.5,则酪氨酸吸收峰与色氨酸吸收峰重合^[2]。测定时溶液的最适pH为6。

粮食中可溶性碳水化合物、饱和脂肪酸、非共轭型不饱和脂肪酸及多数维生素,吸收峰都在270 nm以下。

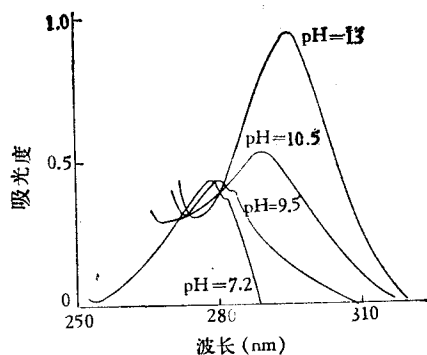


图3 不同pH下酪氨酸的吸收曲线

本法干扰主要来自共轭型不饱和脂肪酸,含有共轭双键的不饱和脂肪酸,其吸收发生红移。含有三个共轭键时,吸收峰约在270 nm^{[3][4]}。为了消除干扰,试样先用乙醚脱脂,还需用氯仿萃取试样的水解液,以除去残存的共轭型不饱和脂肪酸。

维生素C与色氨酸的吸收曲线在288 nm处有一小部分重叠(图1)。但维生素C易被空气氧化成脱氢型,其吸收在210 nm以下,因粮食中维生素C一般含量很少,故可不加考虑。

参 考 文 献

- [1] Edelhoch, H., *Biochemistry*, 6, 1948, 1967.
- [2] Rady, H., et al.: *Proteins*, New York, 220, 1973.
- [3] Mellon, M. G. *Analytical Absorption Spectroscopy*, 236, 347, 407, 1957.
- [4] AOAC, 12th Ed., 493, 1975.
- [5] 江苏无锡酶制剂厂等:《537酸性蛋白酶菌株选育及发酵研究报告》1977年。

[本文于1981年3月20日收到]

氨基酸分析仪出现峰高降低的故障分析及检修

赵德永 周鑫生

(北京市药品检验所)

氨基酸分析仪在生化和药物分析中的应用日趋广泛。用氨基酸分析仪测定氨基酸标准液时,在一定条件下,每次测定的结果,各峰应有固定的高度,当仪器产生某些故障时,则表现为峰形变化及峰高降低,灵敏度下降。

现以AA-100型氨基酸分析仪为例,具体分析如何排除故障,提高灵敏度,达到精确测量的目的。

仪器总体结构见方框原理图1,仪器的流程是样品从进样器(10)到分离柱(9),缓冲液泵将三种缓冲液分别压入分离柱,经分离的氨基酸在恒温反应器(4)内与从茚三酮泵(2)压入的茚三酮在一定温度下发生反应,再经光度鉴定器(5)把反应液的颜色变化转变为光电讯号,最后由记录器(8)记录电讯号的峰形。

当出现峰高降低时,我们从以下五个部分来分析