

对二甲胺基苯甲醛法测定谷物籽粒色氨酸

崔淑文 马东霞

(中国农业科学院综合分析室, 北京)

对二甲胺基苯甲醛 (P-DMAB) 法测定色氨酸的报道比较多, 但多数用于纯蛋白质和肽的色氨酸测定。近年来, 虽然也发表过用此法测定谷物、饲料及豆类食品色氨酸文章^[1,2], 但程序较繁杂。我们在 Манзюк^[3] 工作基础上, 对显色温度和时间条件做了较大的改进, 从而建立了一个比较快速、简便、准确、适于谷物色氨酸测定的对二甲胺基苯甲醛方法。本方法已列为国家标准, 即将进行鉴定。现介绍如下:

材料与 方法

一、测试材料: 水稻、玉米、小麦、小黑麦、高粱、谷子等籽粒。

二、主要仪器、试剂

1. 721 型分光光度计。
2. 5% 对二甲胺基苯甲醛 (P-DMAB) 溶液: 5g P-DMAB 溶于 10% HCl 中, 定容 100 ml。
3. 1% NaNO₃ (W/V); 10% KOH (W/V); 浓 HCl 12M。
4. L-色氨酸、层析纯、上海生化所制。
5. L-色氨酸标准溶液: 准确称 25mg L-色氨酸 (105℃ 干燥两小时), 加少量 0.1N NaOH 溶解, 定量地转移到 250ml 容量瓶中, 用蒸馏水定容, 浓度为 100μg/ml。

6. 牛血清清蛋白: 含氮 15.48%, 新疆化学所制。

7. 溶菌酶: 含氮 15.52%, 美国产。

三、测定程序

1. 称 40mg 粉碎过 0.25mm 孔筛, 脱脂的

谷物样品于 20ml 具塞试管中, 加 1ml 10% KOH, 振摇(切忌粘壁)。在 40±1℃ 培养箱中水解 18 小时。

2. 取出试管冷至室温后加 0.2ml 5% P-DMAB, 振摇; 加 0.2ml 1% NaNO₃, 振摇; 再加 5ml 浓 HCl (为防止发热, 将试管放在冷水中操作); 然后于 40±1℃ 培养箱中显色 45 分钟。

3. 取出试管冷至室温, 用蒸馏水定容, 以 4000 转/分速度离心 10 分钟, 取上清液以试剂空白作对照, 在 590nm 波长下测吸光度。

4. 标准曲线的绘制

分别吸 L-色氨酸标准溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.7, 0.8ml 于 20ml 具塞试管中, 加 1ml 10% KOH, 振摇; 加 0.2ml 5% P-DMAB, 振摇; 加 0.2ml 1% NaNO₃, 振摇; 再加 5ml 浓 HCl (为防止发热, 将试管放在冷水中操作), 然后于 25℃ 培养箱中显色 75 分钟; 取出试管冷至室温后用蒸馏水定容, 在 590nm 波长下测吸光度; 以色氨酸浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

四、结果计算

色氨酸, % (干重)

$$= \frac{a \times 10^{-3}}{m(100 - \text{水分}\%)} \times 100$$

式中 a = 标准曲线上查得的色氨酸质量 (μg)

m = 试样质量 (mg)

结果和 讨论

一、最大吸收光谱

用可见光-紫外分光光度计 UV-200 扫描

测定 L-色氨酸标准溶液的最大吸收光谱为 590 nm，待测样品液为 590—600nm，见图 1 和图 2。本法测定波长选用 590nm，与文献[2]一致。

二、显色时间和显色温度

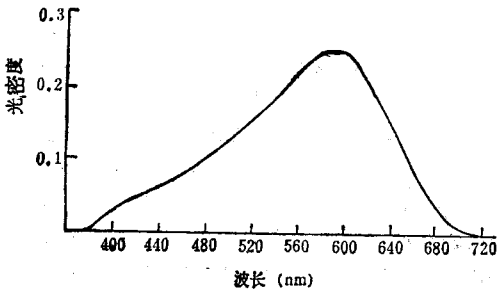


图 1 L-色氨酸标准溶液吸收光谱曲线

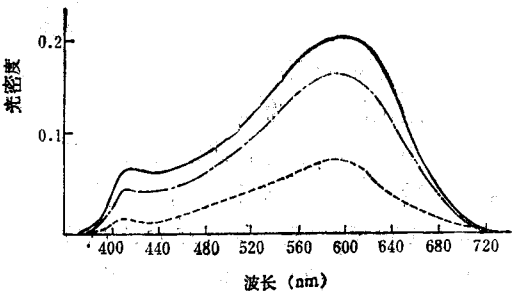


图 2 谷物待测样品液吸收光谱曲线
——小麦 ---水稻 玉米

游离色氨酸和谷物蛋白质经碱水解后色氨酸残基与 P-DMAB 的显色反应，受时间和温度影响很大。文献报道，游离色氨酸的显色温度不宜过高，时间不宜过长，一般为 20—25℃，

表 1 不同显色条件下标准 L-色氨酸测定值的比较

L-色氨酸(μg) 温度℃ 时间(分)		吸 光 度*					相关系数 r
		20	40	60	70	80	
25	60	0.030	0.118	0.200	0.225	0.259	0.9966
	75	0.028	0.114	0.207	0.245	0.288	0.9997
	90	0.028	0.110	0.205	0.247	0.297	0.9995
30	30	0.035	0.097	0.140		0.118	0.8681
	45	0.032	0.115	0.195	0.229	0.246	0.9944
	60	0.030	0.110	0.200	0.245	0.288	0.9993
	75	0.026	0.103	0.194	0.247	0.297	0.9982

* 5 次测定的平均值

表 2 显色温度和时间对样品色氨酸测定值*的影响

样品 色氨酸 温度(℃) 时间(分)		晋杂 5 号(高粱)			垦系 2 号(水稻)			莫 17 (玉米)			丰抗 2 号(小麦)			龙谷 24(谷子)		
		平均值 (%)	标准差	变异系数 (%)	平均值 (%)	标准差	变异系数 (%)	平均值 (%)	标准差	变异系数 (%)	平均值 (%)	标准差	变异系数 (%)	平均值 (%)	标准差	变异系数 (%)
30	45	0.059	0.0017	2.9	0.102	0.0035	3.5	0.077	0.0027	3.5	0.124	0.0063	5.1	0.190	0.0047	2.5
	60	0.061	0.0021	3.4	0.103	0.0027	2.6	0.078	0.0036	4.6	0.134	0.0057	4.3	0.193	0.0039	2.0
	90	0.067	0.0024	3.5	0.103	0.0031	3.0	0.080	0.0012	1.5	0.142	0.0034	2.4	0.197	0.0034	1.7
40	30	0.062	0.0019	3.0	0.104	0.0022	2.1	0.078	0.0017	2.2	0.137	0.0047	3.4	0.195	0.0018	0.9
	45	0.065	0.0009	1.4	0.101	0.0022	2.2	0.077	0.0015	2.0	0.140	0.0024	1.7	0.197	0.0021	1.1
	60	0.066	0.0017	2.6	0.089	0.0067	7.6	0.074	0.0023	3.1	0.137	0.0021	1.5	0.185	0.0115	6.3

* 10 次测定的平均值

1—2 小时。而蛋白质样品的显色条件一般为 25℃2—6 小时^[2,4]。Манзюк 采用 60℃显色 20 分钟^[5]。我们的研究表明: L-色氨酸标准溶液的最佳显色条件为 25℃ 75 分钟;谷物样品溶液为 40℃ 45 分钟。结果见表 1 和表 2。溶液显色后, 3 小时之内稳定。

由表 1 可见, 二种温度 (25℃, 30℃) 下, L-色氨酸低含量点 (20 μg, 40 μg) 随时间延长, 吸光度有下降的趋势。而高含量点 (60 μg, 70 μg, 80 μg) 有增高的趋势。从相关系数看, 25℃ 75 分的显色条件为最佳, 在此条件下的 L-色氨酸标准曲线, 经多次测定, 其相关系数 $r > 0.9990$ 。再现性也好。

由表 2 看出在 30℃ 条件下, 随时间延长, 色氨酸含量增多, 特别是对于含量高的样品更为明显。40℃ 条件下 30 分与 45 分数据基本一致。时间增到 60 分时, 含量有降低的趋势。从变异系数看, 40℃ 45 分的条件为最小。

三、硝酸钠溶液浓度

色氨酸和对二甲胺基苯甲醛的缩合产物经 NaNO₂ 氧化显色加快, 颜色深浅也与 NaNO₂ 溶液浓度有关。四种不同浓度的 NaNO₂ 溶液 (0.5%; 1%; 1.5%; 2%) 对比试验, 结果证明, 以 1% 浓度为宜。

四、方法的精密度和准确度

1. 用本法测定 30 个谷物籽粒样品的色氨酸含量, 测定值范围均在文献报道之内^[6]。变异系数除 2 个样品外均在 5% 以内 (1.8—5.4%)。相同的 5 个样品由 5 个实验室 (山西省农科院作物所实验室; 上海市农科院作物所实验室; 黑龙江省农科院中心实验室; 江苏省农科院食品饲料研究所综合实验室) 分别进行测定, 实验室内的变异系数为 0.8—4.4%; 实验室间变异系数均不超过 10%, 说明方法有较好的精密度和再现性。

2. 为了验证方法的准确度, 测定二个纯蛋白质: 牛血清清蛋白和溶菌酶的色氨酸含量。

其值分别为 0.597g/16gN (理论值 0.594g/16gN) 和 7.69g/16gN (理论值 7.76g/16gN), 平均回收率 (10 次平均), 牛血清清蛋白为 100.5%, 溶菌酶为 99.12%。

3. 选 14 个谷物样品, 用本法和 121MB。氨基酸分析仪同时测定色氨酸含量, 结果基本一致 (表 3)。

表 3 本法和 121MB 氨基酸分析仪测定色氨酸含量比较

样 品	色氨酸(%干重)	
	本 法	氨基酸分析仪
双稻(秈稻)	0.14	0.14
珍珠矮(秈稻)	0.12	0.12
初胜(粳稻)	0.10	0.10
平抗(玉米)	0.071	0.067
泊阳秋子(玉米)	0.078	0.074
O ₁₁ (奥帕克玉米)	0.095	0.099
中系O ₁₁ /O ₂ (奥帕克玉米)	0.084	0.087
117B (高粱)	0.11	0.099
丰抗 2 号(冬麦)	0.13	0.15
吉春525(春麦)	0.16	0.17
OH ₁₁₃ (小黑麦)	0.14	0.15
81194(硬麦)	0.13	0.14
龙谷24(谷子)	0.19	0.20
龙谷23(谷子)	0.15	0.15
平 均	0.121	0.125
相 差	0.004%	
相 关	0.9845	

参 考 文 献

- [1] Milker, E. L.: *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 18, 381, 1967.
- [2] Spies, Joseph R.: *Analytical Chemistry*, Vol. 39, No. 12, 1412, 1967.
- [3] Piombo, G. and Lozano, Y. E.: *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 28, No. 3, 489, 1980.
- [4] Jonathan W. Devries, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 28, No. 5, 896, 1980.
- [5] Манзюк, В. Т.: *Селекция и семеноводство* No. 29, 82, 1975.
- [6] Harvery, D.: *Tables of the amino acid in foods and feedingsuffs*, 1956.

[本文于 1986 年 1 月 31 日收到]