

饲料及其蛋白源有效赖氨酸测定方法的改进

常碧影 阎惠文 左江湾 张 明*

(中国农业科学院分析测试中心,北京)

提 要

本文在现有国际标准方法的基础上,重点研究了某些可能影响方法准确性、精密度及实验效率的实验条件,并从目前我国多数实验室的实际装备情况出发提出了一个等效,较为实用和简捷的流水线法。

关键词 有效赖氨酸,非有效赖氨酸,DNB-赖氨酸,2,4-二硝基氟苯

近年来,人们不仅了解到赖氨酸是一种必需氨基酸,是谷物及某些油料种子的限制性氨基酸,其含量多少是衡量蛋白质及饲料质量的主要指标,而且发现蛋白中的赖氨酸很不稳定,无论是肉骨粉、鱼粉加工、油料种子热轧及脱溶等人为加热过程,还是在谷物加工贮存的自然氧化、自然发热过程中,均会导致营养价值的下降和赖氨酸的损失。这些损失用常规氨基酸分析法根本不能发现,但在代谢营养上却表现得十分明显。因此,进一步测定饲料及其蛋白源中赖氨酸的有效性,即测定有效赖氨酸的含量,对动物营养的研究、饲料生产、蛋白源的处理加工及有效利用等均有着十分重要的意义。

目前,测定有效赖氨酸的方法很多,有动物试验法、微生物法和化学分析法。前两种在近年来已取得了不少进展,一些新方法如猪迴肠末端氨基酸可消化性的测定与家禽排泄物的分析等均已进入实际应用阶段,但一些技术问题尚未彻底解决,可靠性、精密度也不够理想^[1,2]。化学法相对来说更为简便易行,分析速度快,重复性好。人们从蛋白源受热时,某些赖氨酸的 $\epsilon\text{-NH}_2$ 与糖类的醛基等结合,从而失去营养价值这一基本事实出发,应用不同试剂直接或间接地测定 $\epsilon\text{-NH}_2$ 处于游离状态的赖氨酸的含量(即有效赖氨酸含量),如1-氟-2,4-二硝基

苯法^[3,6]、三硝基苯磺酸法^[4]及染料结合法^[8,9]。这些方法应用起来各有所长,但应用最广的还数1-氟-2,4-二硝基苯法^[9,11]。试验证明该法所测定的具未键合氨基(游离 $\epsilon\text{-NH}_2$)的赖氨酸含量与鸡生长试验等生物试验所测得的赖氨酸有效性呈高度相关,而全赖氨酸与鸡生长间则不存在这种关系^[4,12]。为此,1984年以来,该法相继被国际标准化组织和一些先进国家如美国、法国等定为国际标准或国家标准^[13,14]。本研究的目的是在现有标准法的基础上,进一步研究某些可能影响方法准确度,精密度的操作条件,并从目前我国大多数实验室现有装备的可行性条件出发,提出一个更实用简捷的简化流水线法。

一、实验原理

饲料或蛋白源样品经盐酸水解后,可用离子交换色谱或其它柱色谱测定总的赖氨酸含量。而样品中的有效赖氨酸(即 $\epsilon\text{-NH}_2$ 未被键合者)可在碱性介质中与2,4-二硝基氟苯反应生成稳定衍生物,再以盐酸水解也不会分解,破坏。因此,后者柱色谱测定的只是非有效赖氨酸的含量,样品中总赖氨酸与非有效赖氨酸

* 吉林省农业科学院大豆研究所,吉林。

含量之差即为有效赖氨酸的含量。

二、材料与方 法

(一) 材料

选用玉米、大豆粉、鱼粉和鸡配合饲料为样品,分别代表植物性低蛋白、植物性高蛋白、动物性蛋白和混合(配合)饲料等几种典型饲料。采样后用四分法缩减至5—10 g,粉碎,过0.25 mm 筛,充分混匀。

(二) 试剂与仪器

试剂:

1. 乙醚 分析纯,无过氧化物;

2. NaHCO_3 溶液 80 g/L;

3. 2,4-二硝基氟苯(FDNB)乙醇溶液 将一定量的 FDNB 溶于 95% (V/V) 的乙醇中,使其体积为 0.15:12。该溶液需用前现配;

4. HCl 溶液 6mol/L, 6.5mol/L;

5. 稀释、层析用柠檬酸缓冲液、茚三酮试剂及赖氨酸标准液 pH 及配制方法依不同型号氨基酸分析仪而有所区别,可参照仪器说明书配制。

仪器:

1. 回流水解装置 50ml 水解管或 150ml, 500ml 短颈烧瓶,以玻璃磨口接头与回流冷凝器相接;

2. 油浴或金属块消解炉 温度可稳定于 120—130℃ 之间;

3. 旋转蒸发器;

4. 离心机 4000r/min;

5. 氨基酸自动分析仪。

(三) 方法

1. 国际标准法 依 ISO 5510-1984 (E)^[1] 进行,只是在具体操作中将样品与试剂用量减半,水解后取部分(10ml 以下滤液蒸干)。

2. 简化流水线法

总赖氨酸的测定 取约 50mg 试样双份,置 50ml 磨口水解管中,加入约 25ml 6mol/L HCl ,装好冷凝器后,于 120—130℃ 金属块加热炉上回流水解 24 小时,冷却,定容至 50ml。

取 1—3ml 滤液于 60—80℃ 下减压蒸发至干,以下步骤同前。

非有效赖氨酸的测定 取约含蛋白 20mg 的样品两份(准确至 0.1mg)置 50ml 水解管中,加入 2ml 8% NaHCO_3 溶液,10 分钟后再加入 3ml FDNB 乙醇溶液(浓度同前)混匀后,加盖,于室温下暗处反应过夜。次日将水解管置 85—90℃ 水浴中蒸去乙醇,直至振摇时不再起泡(或管加内容物失重约 2.5g),加乙醚提取三次(分别用 15ml, 10ml, 10ml),弃去醚液。将水解管置 60℃ 左右水浴中蒸去残存乙醚,加入 25ml 左右 6.5mol/L HCl 水解,以下步骤同总赖氨酸测定。

三、结果与讨论

ISO 法测定的结果见表 1。根据 ISO 法的质量要求,同时测定或相继连续测定的两数据间的差异不得超过其平均值的 10%。该处四样品共测 33 次,只有一样品的一次结果超差,超差率仅 3%,平均相对偏差为 3.6%(包括超差数据),说明 ISO 法不失为一个经典可靠的测定方法。

该法像大多数 ISO 标准一样,安全、可靠,操作参数保险系数很大,然而操作繁琐,分析效率不高,特别是水解液蒸干时要求温度 $\leq 40^\circ\text{C}$,不仅为旋转蒸发系统的真空度提出了很高要求,而且蒸干速度很慢,一个样品取 5ml 试液蒸干即需 1—2 小时,某些国产旋转蒸发器恐难达到此速度。因此我们从总赖氨酸与非有效赖氨酸水解后同一试液中取等量试液,分别在 $\leq 40^\circ$, 60° 以至 80°C 蒸干,然后测定并做统计分析。实验证明 $\leq 40^\circ\text{C}$ 与其它温度蒸干结果无差异(数据未列出)。这与以前的结论也是一致的^[12]。

其次,ISO 法于非有效赖氨酸测定时,样品与 FDNB 反应后需反复蒸干,蒸干初始时易产生大量泡沫,需小心控制温度与真空度,蒸干将尽时又需掌握蒸干程度,否则真空系统进气时易将样品吹跑,蒸干后还需将样品转移,耗费工时,又易造成损失。

表1 ISO 法测典型饲料有效精氨酸含量

测定次数	重复	玉米(%)		大豆粉(%)		鱼粉(%)		配合饲料(%)	
		结果	偏差	结果	偏差	结果	偏差	结果	偏差
一	1	0.24		2.29		4.30		1.09	
	2	0.25	4.1	2.22	3.2	4.38	1.8	1.06	2.8
二	1	0.24		2.17		4.26		0.94	
	2	0.25	4.1	1.99	8.6	4.20	1.4	0.98	4.2
三	1	0.26		2.08		4.21		0.99	
	2	0.24	8.0	2.06	1.0	4.18	4.6	1.00	1.0
四	1	0.23		2.11		4.32		0.89	
	2	0.25	11.3	2.20	4.2	4.30	0.4	0.89	0
五	1	0.27		2.16		4.26		0.94	
	2	0.26	3.8	2.11	2.4	4.08	4.4	0.92	2.2
六	1	0.27		1.99		4.34		0.95	
	2	0.25	7.6	2.06	3.4	4.24	2.4	0.91	4.2
七	1	0.24		2.06		4.20		0.91	
	2	0.24	0	2.03	1.4	3.98	5.4	0.94	1.6
八	1	0.23		2.02		4.18		0.90	
	2	0.24	4.2	1.99	1.4	4.09	2.2	0.96	6.2
九	1	0.23							
	2	0.24	4.2						

表2 简化(流水线)法与 ISO 法之比较

方法		简化流水线法			ISO 法		
样品	项目	全 Lys	非有效 Lys	有效 Lys	全 Lys	非有效 Lys	有效 Lys
玉米	重复数 n	10	10	10	18	18	18
	平均值 %	0.284	0.038	0.246	0.284	0.034	0.249
	最大值 %	0.29	0.05	0.26	0.30	0.05	0.28
	最小值 %	0.27	0.03	0.24	0.26	0.02	0.23
	标准差	0.007	0.006	0.007	0.013	0.008	0.014
	变异系数 %	2.5	17	2.8	4.7	25	5.7
大豆粉	重复数 n	10	10	10	16	16	16
	平均值 %	2.177	0.115	2.062	2.212	0.108	2.104
	最大值 %	2.24	0.14	2.13	2.40	0.15	2.29
	最小值 %	2.12	0.10	2.02	2.07	0.08	1.99
	标准差	0.033	0.013	0.035	0.100	0.022	0.044
	变异系数 %	1.5	11	1.7	4.5	20	4.4
鱼粉	重复数 n	10	10	10	16	16	16
	平均值 %	4.944	0.771	4.173	4.903	0.686	4.226
	最大值 %	5.09	0.94	4.42	5.11	0.80	4.38
	最小值 %	4.87	0.60	4.04	4.74	0.56	3.98
	标准差	0.074	0.108	0.113	0.123	0.069	0.106
	变异系数 %	1.5	14	2.70	2.5	10	2.5
配合饲料	重复数 n	10	10	10	16	16	16
	平均值 %	1.15	0.188	0.962	1.113	0.16	0.954
	最大值 %	1.21	0.23	1.03	1.21	0.21	1.09
	最小值 %	1.11	0.14	0.90	1.07	0.10	0.90
	标准差	0.033	0.030	0.052	0.039	0.029	0.058
	变异系数 %	2.9	16	5.4	3.5	18	6.1

表 3 简化法与文献值的比较 (g/100g 蛋白)

样 品	项 目	简化法	英国蛋白评价 组联合实验	Roach 及其它	文献
鱼 粉	平均值	6.57	6.34	6.87	[16] [4]
	范围	6.35—6.96	5.80—6.96		
	变异系数	2.1	3.2		
	室内 室间	4.7	6.7		
大豆粉	平均值	5.07	6.14	5.24	[16] [12]
	范围	4.87—5.30	5.61—6.64		
	变异系数	1.8	3.3		
	室内 室间	4.0	6.5		
配合饲料	平均值	4.80	4.43		[16]
	范围	4.51—5.16	4.07—4.90		
	变异系数	3.7	7.5		
	室内 室间	7.1	6.2		
谷物(玉米,小麦)	平均值	2.44	2.63*	2.67	[16] [12]
	范围	2.20—2.60	2.40—2.84		
	变异系数	3.7	9.2		
	室内 室间	5.6	5.2		

ISO 法的样品特别是试剂用量过大,国内多数氨基酸测定仪进样量仅 50 μ l 左右,试样中赖氨酸的最佳浓度也只有 50—100 μ mol/L。国内外有关氨基酸测定标准的样品取量仅几十毫克,盐酸用量也仅十几至几十毫升,因此完全有可能在兼顾测定准确性、精密度的同时,减少样品,特别是试剂的用量。

综合上述试验结果与考虑,我们设计并检验了简化流水线法,其测定结果见表 2。

经统计检验两法的有效赖氨酸结果无差异,但简化法的变异系数却明显降低了。为进一步考查方法的测定质量与操作条件控制的准确性,我们还请了中国农业科学院畜牧所与吉林省农科院大豆所的有关同志对上述样品进行了验证性测定,大家反映去除乙醇时,只要温度不超过 90 $^{\circ}$ C,样品无溢出的危险,操作者可在此时准备下步实验。乙醚提取纯化时两相分明,醚层清澈,无带出样品的可能。当然乙醇去除的完全与否可谓一关键性步骤,但几个实验室一致的结果,及其与英国农业研究委员会蛋白评价组组织的八实验室联合试验、Silcock 法创始人等所测类同样品文献值的可比性,见表 3。从上述不难看出,简化流水线法不仅操作简

便,节省试剂,实验条件易于掌握,可大大提高工效,还可取得与世界先进国家实验室相当或更好的结果。

参 考 文 献

- 1 McNab J M. In: *Recent advances in animal nutrition*. London: W. Haresing & D. Lewis, 1979: 1—9
- 2 Agric. and Food Research Council. *Nutrition abstracts and reviews* (series B), 1987; 57(12): 713
- 3 Carpenter K J. *Biochem J*, 1960; 77: 604
- 4 Rouch A G et al. *J Sci Fd Agric*, 1967; 18: 271
- 5 Booth V H. *J Sci food Agric*, 1971; 22: 658
- 6 Acquislucchi R et al. *Rev Soc Ital Sci Aliment*, 1987; 16(6): 447
- 7 Kakade M L et al. *Anal Biochem*, 1969; 27: 273
- 8 Erbersdobler H F, Anderson T R. *Acc Symp Ser*, 1983; 215: 419
- 9 Carpenter K J, Booth V H. *Nutri Abstr Rev*, 1973; 43: 424
- 10 Friedman M. *Diabetes*, 1982; 31: 5
- 11 Joan Rabassda et al. *Assoc Off Anal Chem J*, 1988; 71(2): 350
- 12 李建凡等. 分析测试通报, 1988; 1: 35
- 13 ISO. *Animal feeding stuffs—determination of available Lysine*, ISO 5510—184 (E)
- 14 AOAC. *Official methods of analysis*. 14th Ed, Arlington, 1984: 43—278
- 15 常碧影等. 中国农业科学, 1982; 1: 35
- 16 Milner C K, Westgarth D R. *J Sci Fd Agric*, 1973; 24: 873

[本文于1989年4月10日收到]