

养殖中常用饵料组成的色氨酸含量测定

孙 谧

(中国水产科学院黄海水产研究所, 青岛 266003)

本文就碱水解法^[1]中的若干具体问题进行了探讨,并用普通玻璃水解管与聚四氟乙烯水解管进行了比较。在日立835-50型氨基酸自动分析仪上用专用于色氨酸分析的30min短程序,得到了较好的回收率和重现性。本法操作简单并且基本上可满足分析饲料中色氨酸的要求,同时也可应用于食品和纯蛋白样品中色氨酸的测定。

1 实验方法

1.1 玻璃管与聚四氟乙烯管水解的比较

水解试剂 内含5%氯化亚锡的5 mol NaOH 溶液,临用时配制。

样品水解 分别准确称取样品50.0mg于玻璃管及聚四氟乙烯管中,分别加入5mL水解液,通高纯N₂搅动,以排除空气,再加5mL水解液冲下管壁上附着的样品。玻璃管马上用喷灯封口,聚四氟乙烯管则旋紧盖子置110±1°C烘箱中水解20h。

水解液处理 将水解液倒入50mL容量瓶,再将容量瓶置冰水浴中,加约7mL 6mol 盐酸中和,使pH为6~7。然后定容至刻度。摇匀后过滤,取上澄液于自动氨基酸分析仪的样品瓶中,进行测定。样品盘中需注入4°C冷却水或在进样前将样品从4°C冰箱中现取。

1.2 玻璃管水解回收率测定

准确称取样品20~40mg,分别按管号加入标准色氨酸(表2),按上法水解并用氨基酸分析仪测定,用下式计算:

$$\text{回收率} = \frac{(\text{样} + \text{标准}) \text{测定值} - (\text{样}) \text{测定值}}{\text{标准(加入值)}} \times 100\%$$

表1 对比测定结果

管号	样品名称	样重 (mg)	水解液 (mL)	色氨酸 (%)
玻 ₁	玉米	101.56	10	0.057
玻 ₂	玉米	101.94	5	0.057
塑 ₁	玉米	101.52	10	0.056
塑 ₂	玉米	101.10	5	0.038

1.3 氨基酸自动分析仪程序设计和分析条件

1.3.1 分析程序

步骤	外存贮器 代码	操作 代码	时间 代码
1	1	5	0
2	2	11	0
3	3	53	0
4	4	1	1
5	1	6	16
6	4	2	17
7	1	5	22
8	6	2	30

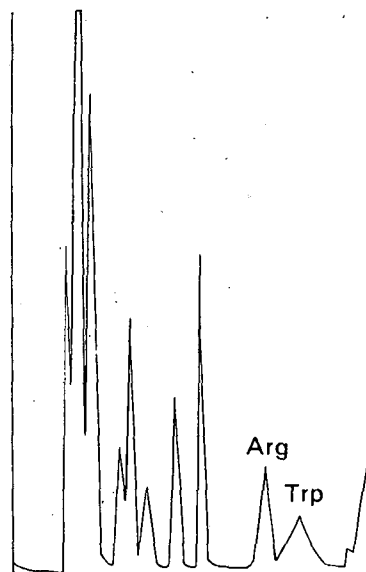


图 标准分析图谱

参数修改I 频道: (02) 0; (03) 2 600;

II 频道: (03) 60 000;

付表号采用7

(26)-7E-0E

2 050

2 150

5 000

55

2

60 000

1.3.2 分析条件

缓冲液 将原机内4号配方中每1 000mL中多加14g 柠檬酸钠定为IPH-5盛于5号缓冲液瓶中,目的在于将色氨酸与精氨酸分开。

分离柱 2.6mmID×150mm

脱氨柱 4mm ID×50mm

柱温 53°C

树脂号 2 619#

流速 缓冲液0.225mL/min; 茚三酮0.3 mL/min

1.3.3 标准色氨酸配制

准确称取DL-Tryptophan(美NBC公司试剂) 20.41mg于100mL容量瓶中加入2mL 2%NaOH使溶解并定容至刻度,贮冷暗处备用。该液浓度为1 000 nmol/mL,用时用pH2.2缓冲液稀释10倍后作标准液,浓度为5.00nmol/50μL。标准分析图谱见图1。

2 结果与讨论

玻璃管和聚四氟乙烯管水解测定结果见表1。

各种样品色氨酸回收率比较结果见表2。

色氨酸专用程序峰保留时间变异系数测定结果见表3。测定样品186个,每隔10个取一个色氨酸峰保留时间。

用以上方法测定样品近百种,结果与文献值相近(表略)。

从表1可见玻璃管与聚四氟乙烯管水解测定结果相近。从表2,3可看出测定结果的重复性和回收率较

表2 样品色氨酸回收率

样品	管号	样品 (mg)	标准色氨酸 (mg)	色氨酸测定值 (mg)	回收率 (%)
色氨酸	1	0	0.2	0.202	99.60
	2	0	0.2	0.196	99.60
酪蛋白	3	20.0	0.2	0.347	85.50
	4	20.0	0.2	0.420	
	5	20.0	0	0.238	
	6	20.0	0	0.213	
豆饼	7	40.0	0.2	0.387	88.50
	8	40.0	0.2	0.378	
	9	40.0	0	0.204	
	10	40.0	0	0.208	

高,数据与文献值比基本一致。

在设计程序上所耗时间为Bernardo^[1]等人所用时间的1/2,因而试剂耗费也较少,同时出峰时间重复性很好,仪器虽经长时间运转,但色氨酸的相对保留时间变化较小。样品用中和法不经脱盐而直接上机,钠离子浓度大,但仪器连续运转近百小时分析近200个样品之后再转向正常72min程序,门冬-苏、苏-丝等氨基酸的分辨率无明显降低,说明对树脂的分离效率影响不大。

从以上结果可见,用玻璃管代替聚四氟乙烯管水解供测定色氨酸样品可以得到同样的回收率;用氨基酸自动分析仪尚可保持稳定的分析条件,所得结果重现性较好。另外设计了30min短程序大大缩短了分析时间并节约了试剂。

表3 色氨酸峰保留时间变异系数测定

样品号	峰保留 时间 (min)	
4 039	20.73	n:20 $\bar{X}$:20.81 SD:0.057 CV:0.27 %
4 049	20.82	
4 059	20.76	
4 069	20.82	
4 079	20.77	
4 089	20.77	
4 099	20.80	
4 109	20.76	
4 119	20.80	
4 129	20.88	
4 139	20.80	
4 149	20.77	
4 159	20.82	
4 169	20.82	
4 179	20.92	
4 189	20.84	
4 199	20.81	
4 209	20.76	
4 219	20.92	
4 227	20.92	

参考文献

- [1] Bernardo Lucas and Angela Sotelo, 1980. Effect of different alkalies. Temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. *Analytical Biochemistry* 109: 192-197.

