

大豆籽粒色氨酸测定 (P—DMAB)法的研究

郑云兰 刘庆翔

(黑龙江省农业科学院综合化验室)

STUDY ON DETERMINATION METHOD OF TRYPTOPHANE IN SOYBEAN SEEDS(P—DMAB METHOD)

Zheng Yunlan Liu Qingxiang

(The Comprehensive Chemical Laboratory, Heilongjiang
Academy of Agricultural Sciences)

目前,色氨酸国内外广泛应用的方法有离子交换色层法、二羟基乙酸法(乙醛酸法)、对二甲胺基苯甲醛(P—DMAB)酸解及碱解分光光度法、萤光法等。Milker (1967)将P—DMAB程序用于谷物饲料的常规分析,得到谷物中色氨酸回收率为80%,纯动物蛋白为95%。Slump和Schreuder (1969)采用氢氧化钡水解蛋白对食品分析获得满意效果。色氨酸过去已用各种方法加以分析,这些方法已由Friedman和Finley (1971)给以评论。Piomb和Lozano (1980)报告了测定谷物和豆类食品色氨酸的常规自动分析程序。黑龙江省农科院分析室1973年已开始用二羟基乙酸与色氨酸生成紫色化合物方法,快速比色测定玉米小麦籽粒中色氨酸含量的程序。

原理:谷物及豆类籽粒的蛋白质,在碱性条件下,水解成游离色氨酸;在酸性介质中,有硝酸盐存在条件下,色氨酸吲哚环与对二甲胺基苯甲醛反应,生成兰色化合物,在一定范围内颜色深浅与色氨酸含量成正比。因此,可用分光光度计进行比色测定。

一、试剂配制

(1) 对二甲胺基苯甲醛(P—DMAB)溶液:5克A. R. P—DMAB溶解于10%盐酸溶液中,并定容100毫升,避光保存在冰箱(4℃)中。

(2) 1%硝酸钠溶液,1克 A. R. 硝酸钠以蒸馏水溶解,定容100毫升。

* 本文经王连静研究员审阅,特此致谢!

本文于1987年6月29日收到。This Paper was received June 29, 1987.

(3) 10%氢氧化钾溶液: 10克A. R. 氢氧化钾用蒸馏水溶解定容100毫升。

(4) 色氨酸标准溶液: 准确称取干燥的L-色氨酸25毫克, 以少量温热蒸馏水溶解, 然后用水定容250毫升, 摇匀备用。此标准母液为0.1毫克/毫升。

二、操作 方法 程序

1. 标准曲线绘制

分别吸取0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9毫升L-色氨酸标准母液, 放入具磨口比色管中, 加1毫升10%氢氧化钾溶液, 摇匀加5%P-DMAB 0.2毫升, 充分摇匀, 加1%硝酸钾0.2毫升, 充分摇匀后, 再加5毫升A. R. 浓盐酸(冰水中进行, 以防色氨酸因反应过热而受到破坏), 然后于25℃保温箱中75分钟显色, 取出冷至室温后用蒸馏水定容20毫升, 在波卡590nm下以空白为对照读取光密度值, 最后以光密度值为纵坐标, 色氨酸标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线。此标准曲线有效范围为20—80 γ (微克)。

2. 样品测定

本研究测了黑农26号等30个品种, 由黑龙江省农科院大豆所供给。

准确称取过60目筛孔的风干均匀样品10—40毫克(视样品含量多少而定, 大豆1毫克为宜)于20毫升比色管中, 加1毫升10%氢氧化钾, 充分摇匀(防止样品颗粒粘附管壁), 于40℃保温箱中水解18小时, 取出水解液冷至室温, 加5%P-DMAB 0.2毫升摇匀。加1%硝酸钾0.2毫升, 摇匀。再加5毫升A. R. 浓盐酸(冰水中进行), 然后于40℃保温箱中显色45分钟后, 取出冷至室温, 用蒸馏水稀释定容20毫升摇匀, 再以3000转/分离心15分钟(同时作空白), 在波卡590nm下以空白为对照, 取离心上清液进行比色测定。记下光密度值, 在标准曲线上查得光密度相对应的色氨酸 γ (微克)。代入公式计算结果。

3. 结果计算

$$\text{色氨酸}\% = \frac{\gamma \times 100}{m \times 1000} \times \text{水分}$$

m—样品重(10—40毫克)

四、结 果 和 讨 论

1. 显色后稳定时间和最大吸收光谱试验

取五个大豆样品进行色氨酸含量测定, 显色后离心, 其比色上清液放置半小时、1小时直至26小时, 其光密度测定值基本一致, 显色后24小时内颜色稳定不变。

用可见紫外分光光度计扫描测定L-色氨酸标准溶液的最大吸收光谱为590nm与文献报导一致(Spies³ 1967)。

2. 显色温度和时间试验

(1) 蛋白经碱水解后与 P—DMAB 试剂显色反应, 受温度时间影响较大, 此乃为影响结果的重要条件。B. T. Mahazlek(1975)采用60℃显色20分, G. Piombo和 Y. F. Lozano采用室温 45 分。为摸索出准确度、精密度好的最佳试验程序, 我们在显色温度和时间上做了一些对比试验, 40℃ 45分和60分结果相近, 40℃ 45分和60℃ 20分结果相近。在我们的条件下, 40℃显色45分样品反应比较完全, 测定结果重现性好。也可采用60℃20分。见表 1

表 1 不同温度和时间显色对样品测定的影响
Table 1 The effect of showing-colour of different temperature and time on sample of determination

品 种 名 Varieties	温 度 Temp.	时 间 Time (minute)	样 品 重 复 次 数 Times of repeat sample					平均数 Means	标 准 差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation
			1	2	3	4	5	\bar{x}	S	C. V%
黑农26号 Heinong 26	40℃	45'	0.550	0.545	0.552	0.551	0.550	0.549	0.0028	0.51
		60'	0.545	0.545	0.549	0.550	0.560	0.550	0.0071	1.29
	60℃	20'	0.550	0.545	0.545	0.547	0.550	0.548	0.026	0.47
		45'	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色
丰抗12 Fengkang 12	40℃	45'	0.570	0.565	0.580	0.575	0.567	0.571	0.0091	1.07
		60'	0.568	0.570	0.577	0.575	0.565	0.572	0.0033	1.03
	60℃	20'	0.539	0.570	0.570	0.537	0.573	0.568	0.0030	0.54
		45'	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色
牡丰2号 Mufeng 2	40℃	45'	0.551	0.550	0.515	0.552	0.551	0.550	0.0029	0.53
		60'	0.549	0.559	0.545	0.550	0.552	0.551	0.0072	1.31
	60℃	20'	0.550	0.546	0.545	0.543	0.552	0.549	0.0027	0.49
		45'	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色
绥农4号 Suinong 4	40℃	45'	0.570	0.568	0.570	0.573	0.574	0.571	0.0061	1.08
		60'	0.568	0.572	0.757	0.575	0.571	0.572	0.0059	1.04
	60℃	20'	0.547	0.547	0.543	0.548	0.550	0.550	0.0028	0.51
		45'	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色
黑河4号 Heihe 4	40℃	45'	0.549	0.550	0.549	0.550	0.553	0.551	0.0030	0.54
		60'	0.548	0.548	0.547	0.556	0.554	0.552	0.0072	1.30
	60℃	20'	0.545	0.546	0.547	0.548	0.550	0.548	0.0026	0.47
		45'	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色

(2) 标准曲线显色温度一般都在20—25℃下进行(温度过高色氨酸易破坏), 我们作了25℃—30℃两个温度及不同显色时间45分、60分、75分、90分的对比试验, 其结果

见表 2（光密度为五次重复平均值）

表 2 不同条件下色氨酸标准曲线

Table 2 Standard tryptophane curves under different conditions

色氨酸 Tryptophane		光 密 度 $\lambda=590\text{nm}$							
时 间	Temp.	20	30	40	50	60	70	80	90
25℃	60'	0.030	0.070	0.117	0.165	0.210	0.259	0.296	0.328
	75'	0.029	0.071	0.119	0.168	0.215	0.260	0.310	0.336
	90'	0.028	0.068	0.110	0.162	0.203	0.256	0.308	0.330
30℃	45'	0.032	0.072	0.115	0.172	0.200	0.240	0.292	0.329
	60'	0.030	0.073	0.116	0.163	0.210	0.259	0.308	0.330
	75'	0.035	0.076	0.105	0.175	0.194	0.252	0.298	0.323

根据表 2 光密度值所绘制的六条曲线可见，25℃ 75分 20—80 γ （微克）色氨酸标准浓度各点均在曲线上，90 γ 开始偏低。30℃ 60分和25℃ 75分相近，也较好。我们认为采用25℃ 显色75分为宜。若室温高于25℃可采用30℃ 60℃分。

该法L—色氨酸标准溶液的含 量分别为20、30、40、50、60、70、80 微克，各标准点溶液浓度测定数据表明，光密度和色氨酸含 量呈良好的线性关系，相关系数 $r>0.9990$ ，

3. 水解时间试验

三个水解时间（16、18、20小时），其色氨酸测定值接近，相关系数均在 0.99 以上。实践分析工作中可采用18小时。

4. 回收率试验见表 3

表 3 标准色氨酸和蛋白质回收率测定结果

Table 3 Result of determination on rate of recovery of standard tryptophane and protein

材 料 名 称 Materia names	测定次数 Times of determination	平均回收率 % Average rate of recovery %	回收率幅度 % Range of rate of recovery %
L—色氨酸 L—Tryptophanes	10	99.5	99—100
牛血清清蛋白 A OX—Serum albumin A	10	103.0	99—104
牛血清清蛋白 B OX—Serum albumin B	10	100.6	96—102
溶 菌 酶 Bacteriolytic ferment	10	99.1	94—103
豆 饼 Soya—bean cake	10	90.0	85—95

5. 方法的准确度和精密度

为进一步验证该法, 我们选用30个大豆样品进行分析, 其测定结果如表 4

表 4 大豆样品色氨酸测定值
Table 4 Detemined value on tryptophana of soybean samples

品种名称 Varieties	色氨酸绝干重 % Tryptophane absolute dry weight %		品种名称 Varieties	色氨酸绝干重 % Tryptophane absolute dry weight %	
	P-DMAB	835—50 Amino acid analysis		P-DMAB	835—50 Amino acid analysis
黑农26号	0.55	0.58	GD1543小金黄	0.55	0.58
黑河3号	0.59	0.60	GD1620肖疆黑豆	0.51	0.55
丰抗12号	0.57	0.59	GD1941铁英青	0.58	0.59
克7910A	0.55	0.57	FD2019黑脐鸡豌豆	0.57	0.58
绥农4号	0.57	0.59	FD2020高丽黄	0.53	0.60
哈尔滨本地	0.57	0.58	FD2344公交5610-2	0.50	0.55
HD305金黄2号	0.57	0.58	GD2417 紫花矮子	0.54	0.56
FD—2019天鹅蛋	0.51	0.53	78原49	0.51	0.54
藏76569—17	0.56	0.58	HD—1226平顶香甲	0.54	0.57
哈77—7578	0.50	0.54	GD1505舒兰满苍金	0.59	0.62
黑河4号	0.54	0.58	GD1518牛毛黄	0.54	0.57
丰收10号	0.51	0.55	HD1322尚志黑豆	0.54	0.56
黄小豆	0.51	0.54	HD836杜丰2号	0.55	0.58
GD2505压破车	0.55	0.57	HD427孙吴大白眉	0.58	0.60
GD1529大洋豆	0.57	0.58	HD1215小金黄A	0.50	0.53

表 4 可见, 结果数据和文献值基本一致。(大豆色氨酸文献值为0.56%, 仪器值为0.60%左右)。

本方法回收率达90%以上, 变异系数在5%之内, 说明有较高的回收率和重复性, 操作简单、快速、成本低、国内易推广。

主 要 参 考 文 献

[1] CIMMYT Research. Bulletin No. 13 May, 1971
[2] В Т Мануюк Селекцую п Сеченьюетчее 1975 No. 29.
[3] Josepn. R. spics Analytical chemistry 1987-Vol. 39 No. 12.
[4] W. Jonathan etc. J. Agric. Food chem 1980. Vol. 28 No. 5
[5] Mendel etc. protein nutritional quality of foods and feeds P423—452 1975.