

835-30 型氨基酸分析仪使用情况初报*

郑云兰 赵铁男 张钦海 沙立先

(黑龙江省农业科学院综合化实验室)

近年来育种工作对种子品质分析除蛋白、脂肪、淀粉、粗纤维、灰分外,并对蛋白质的组成也开展了研究。测定农作物种子中各种氨基酸含量,查明作物体内氨基酸种类和变化规律,已成为培育高产、质佳、育种工作的重要依据。

氨基酸的测定主要有:纸层析、薄板层析、微生物、化学分析和仪器分析等方法。由于现代物理、化学、电子科学技术的发展,氨基酸的分析正向快速、准确自动化方向迈进。氨基酸自动分析仪的研制成功,是生化分析中的重大突破,促进了农业科学研究手段的飞速发展。

835 型氨基酸自动分析仪,是日本日立厂 1978 年产品。它是在综合快速的 633 型高灵敏度的 635 型以及 KLA-5 型氨基酸分析仪优点的基础上而改制的新型自动分析仪,该仪器有三种型号:

835-10 型(手动进样、手动打程序、手动计算);

835-30 型(自动进样、自动进程序、手动计算);

835-50 型(自动进样、自动进程序、积分仪自动显示数据);

特点是操作简单,灵敏度高,精度可达 10^{-9} 。70 分钟可分析 17 种氨基酸含量。

近几年来,我国先后从日本购入此种仪器,我院 1978 年底引进,经向国内兄弟单位学习,于 1979 年 5 月自己动手安装,反复调试排除障碍后,已对小麦、大豆、玉米、高粱、水稻、谷子等作物种子进行了氨基酸的

含量测定,现将分析结果和仪器使用情况汇总如下:

一、试验材料和方法

1. 试验材料

供试作物有小麦:新 1 号、京红 8 号、鉴 26。大豆:黑农 26 号。玉米:北玉 5 号、华农 1 号、中单 2 号、野鸡红(O₂)。谷子:龙谷 23 号。高粱:晋杂 4 号、117B。水稻:粳稻初胜、秈稻 IR44。其中除新一号小麦、黑农 26 号大豆、北玉 5 号玉米、龙谷 23 号谷子为本院育种所品种外,其余皆为全国赖氨酸分析方法标准化统一样品。

2. 试验方法

准确称取待测样品 10~20 毫克,放入硬质玻璃管中,加 6N 冷冻盐酸 2~4 毫升(盐酸加入量视样品中蛋白质的含量多少而定)然后抽至真空,用酒精喷灯封闭管口,在 110℃ 烘箱中水解 24 小时,此时,90% 以上的氨基酸几乎全部分离出来。将制好的水解液以 0.01 N 盐酸洗入 50 毫升磁蒸发皿中,在 80~90℃ 水浴上浓缩蒸干,然后以柠檬酸缓冲液溶解、稀释、定容 10 毫升,取 0.5 毫升于样品管中进行测定。同时取氨基酸标准液进行测定。

本分析仪,采用专利 2619 混合离子交换树脂,样品水解液自动进入离子柱(不锈钢柱),用流量稳定的 P₁ 泵输送规定的缓冲液,

* 供试样品的种子水分和脂肪为刘敏学同志分析,谨致谢意。

按事先编好的程序卡规定的程序自动淋洗。从离子柱分离出的氨基酸与 P₂ 泵输送的茚三酮显色液在混合器中充分混合，然后在温度为 100℃ 左右反应槽中进行发色，生成紫色色素 Diketohydrindlidone Diketohydrindamine (DrDA) 此紫色溶液经分光光度计用 570mμ 和 440mμ 两个波长连续比色测定。光密度值进行信号放大，记录仪自动绘出各种氨基酸峰谱。然后，以标准氨基酸峰谱为基准，用 D、W 法进行样品结果计算。

计算公式：

氨基酸因数

$$= \frac{\text{氨基酸分子量} \times \text{标准氨基酸浓度}}{\text{标准氨基酸峰面积}}$$

氨基酸%

$$= \frac{\text{氨基酸因数} \times \text{样品峰面积}}{\text{样品重 (微克)}} \times 100 \times K \text{ (水分)}$$

二、试验结果

1. 对六种作物种子中氨基酸含量的分析

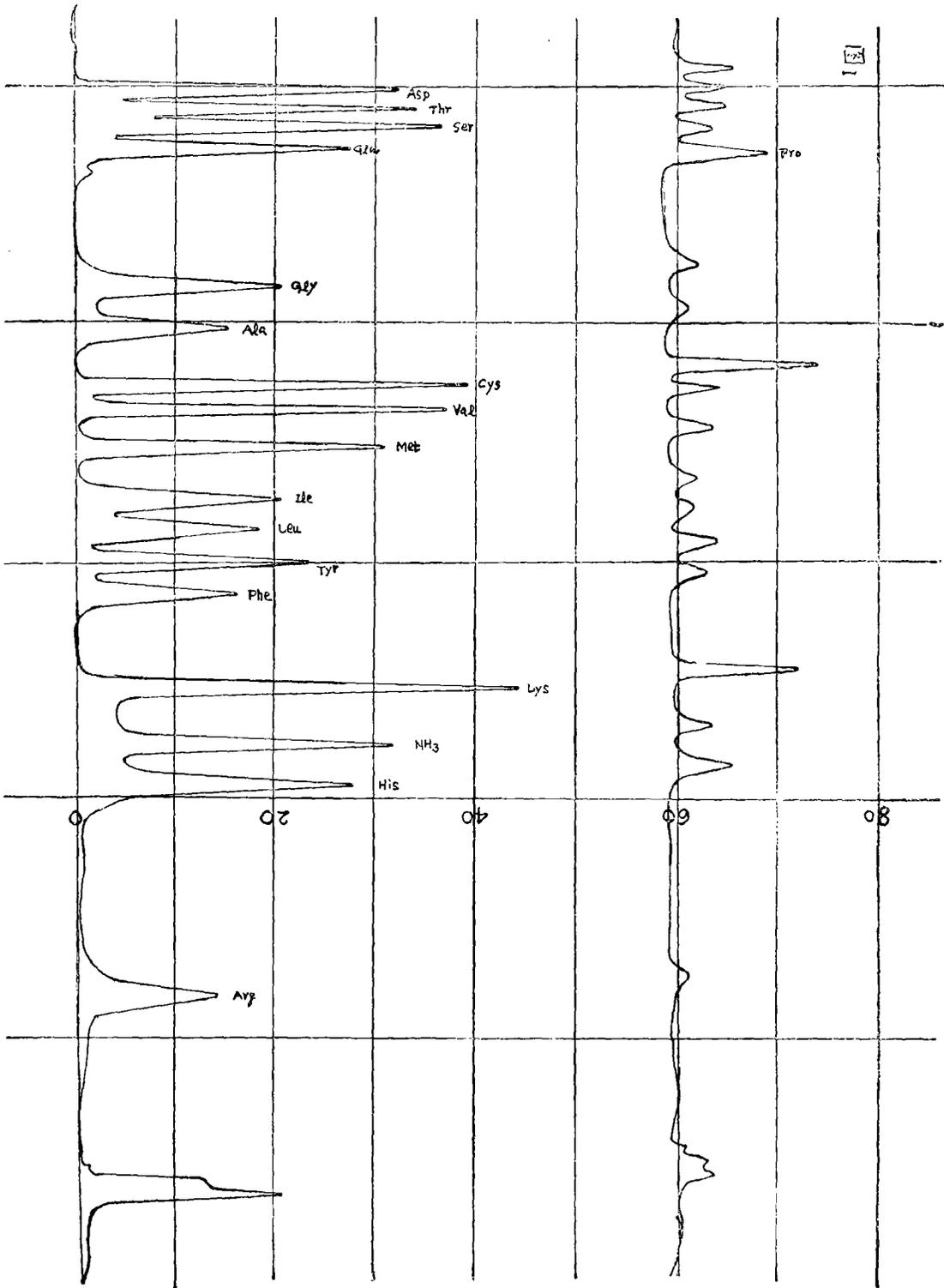
1979 年我们选用小麦、大豆、玉米、高粱、谷子、水稻六种作物作为供试样品进行 17 种氨基酸含量的测定（不包括氨峰），分析结果如表 1。

2. 标准氨基酸峰谱及三种作物种子氨基酸峰谱

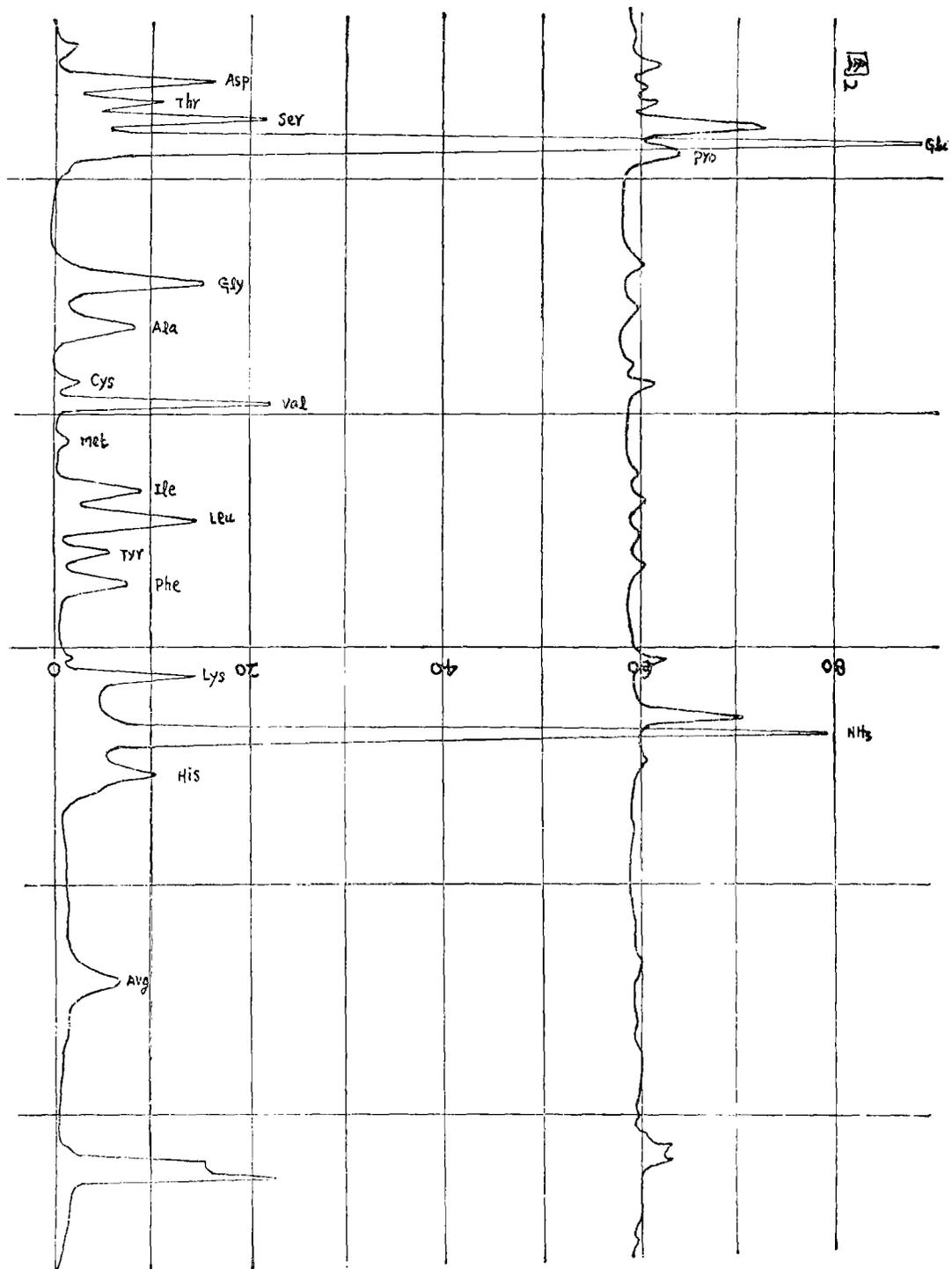
表 1 不同作物种子氨基酸含量 (%)

氨基酸	小麦	大豆	玉米	高粱	谷子	水稻
	新 1 号	黑农 26 号	北玉 5 号	晋杂 1 号	龙谷 23 号	梗稻初选
天冬氨酸	0.69	5.12	0.35	0.34	0.35	0.44
苏氨酸	0.29	1.44	0.19	0.13	0.15	0.10
丝氨酸	0.52	2.26	0.21	0.36	0.17	0.23
谷氨酸	3.76	7.36	1.11	1.01	0.94	1.01
甘氨酸	0.49	1.82	0.19	0.16	0.15	0.28
丙氨酸	0.42	1.88	0.46	0.41	0.12	0.29
胱氨酸	0.19	0.34	0.05	0.07	0.04	0.04
缬氨酸	0.71	2.26	0.27	0.27	0.32	0.32
蛋氨酸	0.03	0.38	0.02	0.08	0.14	0.04
异亮氨酸	0.17	2.04	0.19	0.16	0.19	0.23
亮氨酸	1.06	0.96	0.99	0.74	0.72	0.53
酪氨酸	0.32	0.86	0.19	0.17	0.15	0.21
苯丙氨酸	0.63	2.04	0.35	0.25	0.29	0.28
赖氨酸	0.37	2.80	0.25	0.19	0.20	0.16
组氨酸	0.37	1.34	0.20	0.18	0.19	0.26
精氨酸	0.62	3.18	0.22	0.24	0.26	0.43
脯氨酸	1.08	0.88	0.21	0.17	0.28	0.11

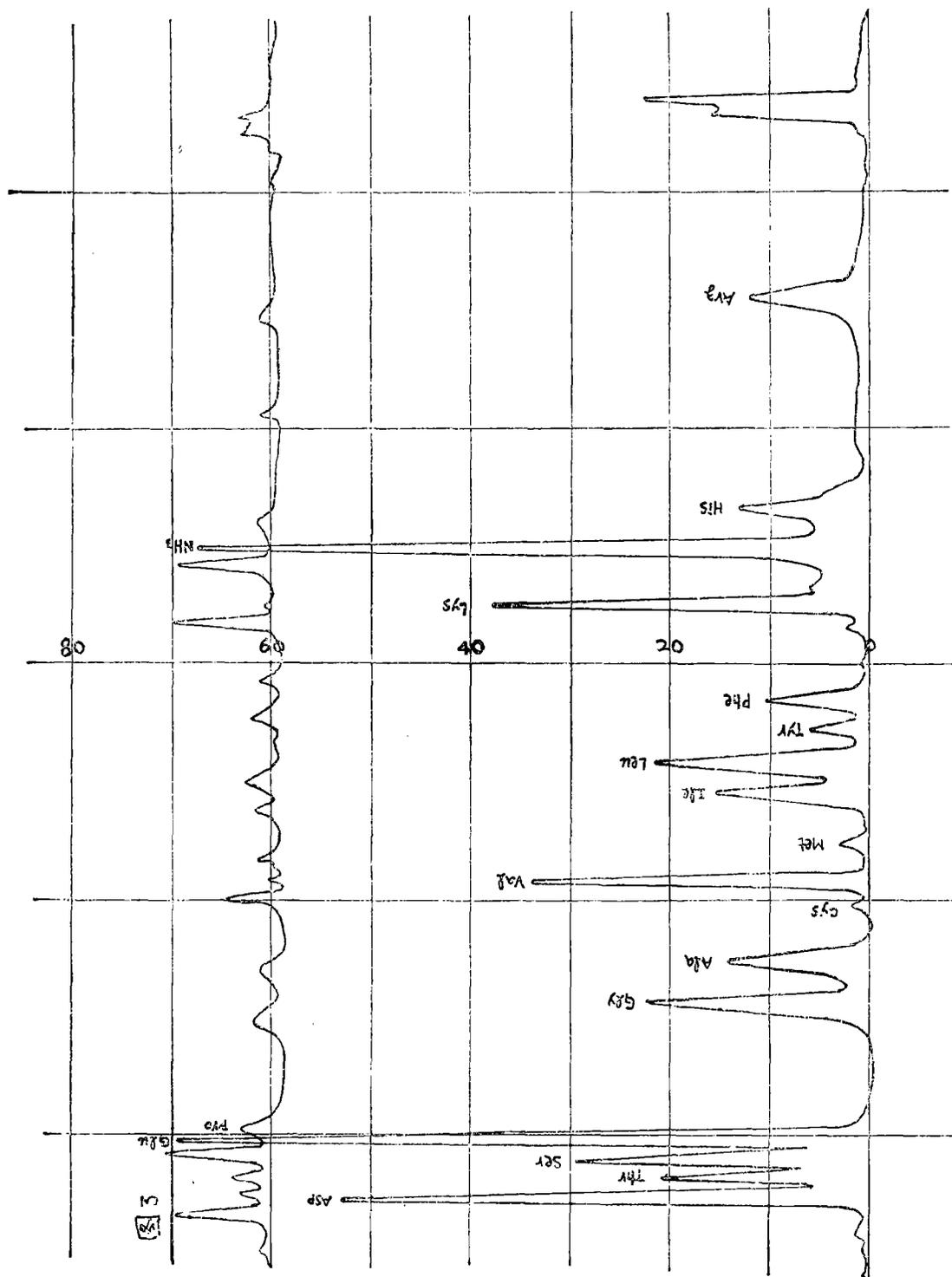
(1) 标准氨基酸峰谱图 1



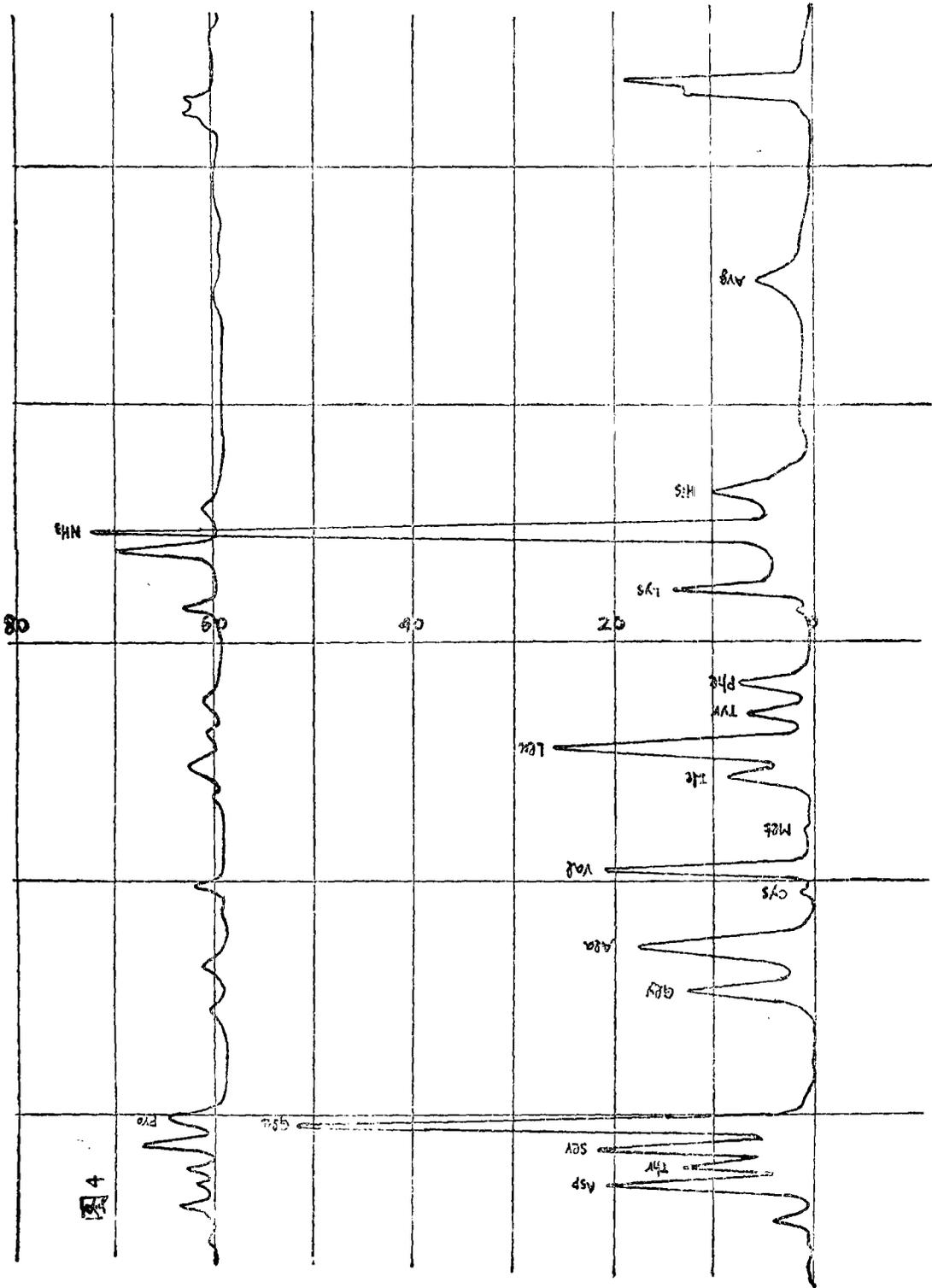
(2) 小麦种子新1号氨基酸峰谱图 2



(3) 大豆种子黑农 26 号氨基酸峰谱图 3



(4) 玉米种子北玉5号氨基酸峰谱图 4



3. 不同作物种子样品脱脂与不脱脂分析结果的对比试验。

为查明作物种子中脂肪含量对分析结果

的影响, 我们进行了大豆和玉米两品种脱脂与不脱脂的对比试验, 测定结果见表 2。

表 2 脱脂和不脱脂对结果的影响

作物 项 目 氨基酸	大豆 黑农 23 号			玉米 北玉 5 号		
	脱 脂	不 脱 脂	偏 差	脱 脂	不 脱 脂	偏 差
天冬氨酸	5.12	4.60	0.52	0.35	0.33	0.02
苏氨酸	1.44	1.30	0.14	0.19	0.18	0.01
丝氨酸	2.26	2.03	0.23	0.21	0.19	0.02
谷氨酸	7.56	6.63	0.73	1.11	1.06	0.05
甘氨酸	1.82	1.65	0.17	0.19	0.18	0.01
丙氨酸	1.88	1.69	0.19	0.46	0.44	0.02
胱氨酸	0.34	0.30	0.04	0.05	0.05	0.00
缬氨酸	2.26	2.03	0.23	0.27	0.26	0.01
蛋氨酸	0.38	0.34	0.04	0.02	0.02	0.00
异亮氨酸	2.04	1.85	0.19	0.19	0.18	0.02
亮氨酸	0.96	0.87	0.09	0.99	0.94	0.05
酪氨酸	0.85	0.78	0.08	0.19	0.18	0.01
苯丙氨酸	2.04	1.84	0.20	0.35	0.34	0.01
赖氨酸	2.80	1.53	0.27	0.25	0.23	0.02
组氨酸	1.34	1.21	0.13	0.20	0.18	0.02
精氨酸	3.18	2.86	0.32	0.22	0.20	0.02
脯氨酸	0.88	0.79	0.09	0.21	0.19	0.02

从表 3 看出大豆脂肪含量较高, 脱脂与不脱脂对氨基酸分析结果偏差较大, 不脱脂样品结果偏低, 而玉米偏差很小, 所以, 在进行玉米氨基酸结果计算时, 脂肪含量可以忽略不计。

4. 835-30 型仪器测定结果的重现性试验。

为检定仪器性能和重现性程度, 我们分别取小麦新 1 号、玉米北玉 5 号和大豆黑河 3 号, 在 1979 年 9 月 14 日和 10 月 25 日, 9 月 28 日和 11 月 1 日, 11 月 1 日和 11 月 9 日分两次水解、两次测定, 结果见表 3。

从表 3 看出小麦、玉米、大豆种子不同时间分批水解, 氨基酸含量测定结果基本一致。偏差范围仅在 0~0.02% 之间。

5. 835-30 型和 KLA-5 型氨基酸分析仪测定结果对比试验。

为查明 835-30 型氨基酸分析仪分析结果的准确程度, 我们特请辽宁省农科院综合分析室用 KLA-5 型氨基酸分析仪对春麦京红 8 号 (0.34%)、冬麦鉴 26 (0.28%)、玉米华农 1 号 (0.23%)、中单 2 号 (0.23%) 及野鸡红 (0.32%)、高粱 117B (0.19%) 和晋杂 4 号 (0.17%)、粳稻初胜 (0.23%)、秈稻

表 3

小麦、玉米、大豆种子必需氨基酸测定结果 (%)

氨基酸	小麦新 1 号		玉米北玉 5 号		大豆黑·河 3 号	
	9 月 14 日	10 月 25 日	9 月 28 日	11 月 1 日	11 月 1 日	11 月 9 日
赖氨酸	0.37	0.36	0.25	0.24	2.82	2.80
缬氨酸	0.71	0.70	0.27	0.27	1.64	1.64
蛋氨酸	0.08	0.08	0.01	0.02	0.34	0.33
异亮氨酸	0.47	0.46	0.19	0.18	1.46	1.47
亮氨酸	1.06	1.04	0.99	0.99	2.66	2.66
苯丙氨酸	0.63	0.63	0.35	0.34	1.92	1.90
组氨酸	0.37	0.37	0.20	0.20	1.22	1.20
精氨酸	0.62	0.62	0.22	0.21	2.32	2.30
苏氨酸	0.29	0.27	0.19	0.18	1.06	1.05

IR44 (0.23%) 样品进行赖氨酸含量的测定, 从括号中分析数据来看, 两仪器测定结果基本一致。835-30 型氨基酸分析仪分析结果略偏高, 两仪器测定结果偏差仅仅在 0.01~0.02% 幅度之内。

小 结

我们在使用 835~30 型氨基酸分析仪过程中有如下初浅体会:

1. 835~30 型氨基酸自动分析仪是七十年代新型产品, 价格昂贵, 结构复杂, 管道繁多, 容易发生故障, 操作时一定要严格遵守操作程序, 切不可马虎大意。

为了使记录仪基线稳定, 安装时要用铜板地线, 分析时必需采用 99.99% 以上高纯氨以保证分析质量。

2. 室内要安装空调器, 最好使室温恒定在 20℃ 左右, 室温过低时也可用加热器升温, 保证分析正常进行。

3. 仪器长期停运时, 必需定期冲洗管道,

以免管道堵塞。

4. 本仪器所需蒸馏水为无离子水, 分析应在无氨条件下进行。为了节省药品, 样品最好集中成批分析。

5. 为保证分析质量和防止离子柱污染, 对大豆、玉米、谷子样品水解前必需进行脱脂处理。

6. 由于不同蛋白质结构内肽键的不同, 水解时间也不同。在酸水解条件下, 色氨酸几乎全部破坏, 因此对色氨酸分析时, 应采用硷解或酶解进行测定。半胱氨酸酸解过程中也有破坏, 胱氨酸有 85~90% 氧化成半胱氨酸, 蛋氨酸则几乎全部氧化成蛋氨酸砒。缬氨酸和异亮氨酸的肽键不易水解, 需要延长水解时间。但苏氨酸、丝氨酸及酪氨酸在水解过程中易遭破坏, 随着水解时间的延长, 破坏也愈严重。为了获得良好效果, 最好在水解装置中抽真空后充满氮气, 或测定不同水解时间氨基酸的回收率, 用以校正在标准水解条件下所得到的结果。