

荧光法测定婴儿奶粉中色氨酸的含量

任大喜, 提伟钢, 李景红, 霍贵成*

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:建立了婴儿奶粉中色氨酸的荧光分析方法, 以 NaOH 为水解液水解婴儿奶粉, 在激发波长 225nm, 发射波长 350nm 处测定色氨酸的荧光强度。方法线性范围 0~0.07mg/L, 检测限为 0.0015mg/L, 回收率在 95%~105% 之间。此法快速、简便、灵敏度高。

关键词: 荧光法, 婴儿奶粉, 色氨酸

Abstract: This paper setup a procedure of fluorescence method to measure tryptophan in infant powder. NaOH containing 0.5% soluble starch was used as hydrolytic solution. The fluorescence intensity of tryptophan was determined with excitation wavelength 225nm and emission wavelength 350nm. The linear range of calibration graph was 0~0.07mg/L. The detection limit was 0.0015mg/L. There coverly rate of sample was among 95%~105%.

Key words: fluorescence method; infant milk powder; tryptophan

中图分类号: TS207.3 文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2007)07-0203-02

婴儿时期生长发育迅速, 需要大量的营养, 该时期营养素摄入量将影响其一生的健康, 因此必须保证婴儿食品中各种营养素的含量和质量^[1,2]。色氨酸是必须氨基酸中的一种, 是人和动物体生长发育必不可少的。据报道, 色氨酸对蛋白质代谢、脂肪代谢及烟酸的合成都有重要的影响^[3]。Cortamira 等报道, 色氨酸缺乏还会导致胰岛素分泌降低^[4]。在通常的氨基酸分析中一般都使用酸处理来水解蛋白质, 但是在酸水解条件下, 色氨酸极易被破坏。所以在大多数的文献报道中都缺少色氨酸的数据, 造成资料的不完整, 这不能不说是一个很大的遗憾。本文建立了一种分析奶粉中色氨酸含量的快速、灵敏的荧光分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

婴儿奶粉 购于附近的超市; 乳清粉 为新西兰进口; 脱脂粉 购于黑龙江飞鹤乳业有限公司; 冻干

粉 为实验室自制; L-色氨酸 配成浓度 50mg/L 的标准储备液; 含 0.5% 淀粉的 6mol/L NaOH 溶液 需新鲜配制; pH=10.5 的缓冲溶液 0.5mol/L KH₂PO₄ 与 0.5mol/L NaOH 溶液按 8.5:10 体积分数混合; 6mol/L HCl。

日立 f-4500 荧光分光光度仪 配 1cm 的吸收池。

1.2 实验方法

1.2.1 色氨酸标准工作曲线

1.2.1.1 标准溶液的配制 分别移取 0.0、0.05、0.10、0.20、0.25、0.30、0.35mL 1mg/L 色氨酸标准使用液于 5mL 刻度试管中, 用 pH=10.5 的 KH₂PO₄-NaOH 缓冲液定容, 则标准溶液浓度分别为 0.00、0.01、0.02、0.04、0.05、0.06、0.07mg/L。

1.2.1.2 荧光光谱及其测定条件 色氨酸有 2 个激发光谱峰(225nm 和 280nm)和 1 个发射光谱峰(350nm), 这里选用灵敏度高而干扰少的 225nm 作激发波长, 在 295~380nm 扫描荧光光谱, 于发射波长 350nm 处读取荧光强度值。激发光谱狭缝宽度为 5nm, 发射光谱狭缝宽度为 10nm, 高速扫描。以标准溶液浓度为横坐标, 荧光强度为纵坐标绘制标准曲线。如图 1 所示, 可见色氨酸在 0~0.07mg/L 范围内线性良好。

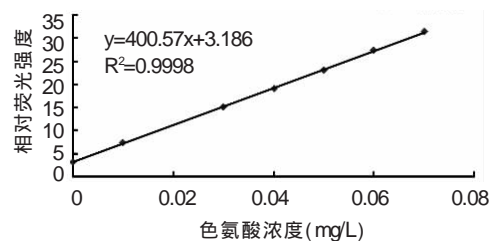


图 1 色氨酸标准工作曲线

1.2.2 样品水解 称取 2mg 左右各种奶粉样品于水解管内, 加入新鲜配制的内含 0.5% 可溶性淀粉的 6mol/L NaOH 溶液 2mL, 将水解管进行充纯氮 3min, 封口, 在烘箱中 110℃ 水解 20h 后, 放置于暗处冷至室温。

将水解物转移至已加有 1.4mL 6mol/L HCl 的 50mL 容量瓶中, 用纯水冲洗水解管 7~8 次, 直至完全转移为止, 其总量在 40mL 左右, 加入 1 滴 0.1% 酚酞, 使溶液呈粉红色, 然后用 6mol/L HCl 滴至溶液无色, 再用 1mol/L NaOH 滴至溶液呈粉红色, 用蒸馏水

收稿日期: 2006-10-23 * 通讯联系人

作者简介: 任大喜(1983-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 乳品科学。

基金项目: 西部奶业计划。

定容。取 1mL 样品于 5mL 刻度试管中,用 KH_2PO_4 - NaOH 缓冲液定容,摇匀,此为样品待测液。

1.2.3 样品测定 样品按照与标准溶液相同的方法进行荧光测定。

1.2.4 样品色氨酸含量计算 采用标准曲线法。

色氨酸含量(mg/g)=标准曲线上查得色氨酸含量(mg/L)* 稀释后总体积(L)/样品量(g)

2 实验结果

2.1 水解液 NaOH 的浓度

为考察 NaOH 水解液浓度对奶粉水解的影响,分别向 2mg 脱脂乳粉样品中加入不同浓度的 NaOH 水解液 2mL 进行水解,结果表明,NaOH 浓度在 6.0~7.0mol/L 范围内比较适宜,本实验选用 6.0mol/L,结果见图 2。

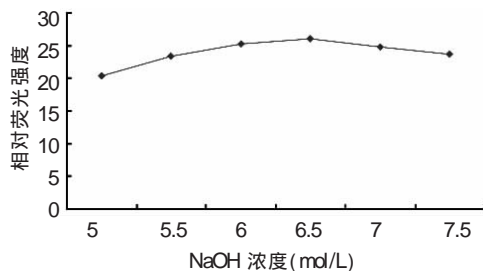


图 2 水解液浓度对荧光强度的影响

2.2 检测限和检测精度

在最佳的条件下,对 0.05mg/L 的色氨酸标准溶液连续测定 10 次,由荧光信号强度的标准差的 3 倍与工作曲线斜率之比,得检测限为 0.0015mg/L。对脱脂乳粉连续取样测定 8 次,相对标准偏差(RSD)为 0.93%。

2.3 样品的检测和回收率实验

取 6 份脱脂粉样品,按上述水解法处理,仪器条件同上,测定结果如表 1 所示,重现性实验的相对标准偏差为 2.84%,表明重现性较好。水解液进行加标回收实验,测定结果见表 2,回收率在 95%~105%之

间,达到了分析实验的要求。

2.4 讨论

碱水解处理后的色氨酸样品,通常可由氨基酸自动分析仪、高效液相色谱等方法进行测定。氨基酸自动分析仪分析色氨酸,方法重现性好,但分析时间过长,且需重新配置缓冲液,操作不便。此外,样品用酸中和碱,不经脱盐直接上机测定,对树脂造成污染^[9]。采用高效液相色谱法分析色氨酸,回收率较低,且其适用范围尚存在争议^[9]。

色氨酸在受到紫外光照射后,会产生比激发波长更长的荧光信号。利用色氨酸的荧光特性就可以用简便、快捷、高灵敏度的荧光光谱分析方法检测婴儿乳粉中色氨酸的含量。荧光光谱分析法不仅适用于检测婴儿奶粉中的色氨酸含量,其它的乳制品也同样适用。

3 结论

本文研究了奶粉中色氨酸含量快速、灵敏的荧光分析方法,方法的线性范围为 0~0.07mg/L,检测限为 0.0015mg/L,回收率在 95%~105%之间。

参考文献:

- [1] 郭素芳,王临虹,赵卫红,郝波,吴久玲,张文坤,周敏. 中国城市母乳喂养行为的研究 [J]. 中国儿童保健杂志, 2001, 8(9): 227~229
- [2] 姜中航,付国红,孙志岩,何卫加,张兰威. 模拟母乳及婴儿配方奶粉的研究[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(5):100~102
- [3] 韩杰. 色氨酸营养研究进展[J]. 中国饲料, 2004, 19: 32~33.
- [4] Cortamira N O, B Seve, Y Lebreton, P Ganier. Effect of dietary tryptophan on muscle, liver and whole-body protein synthesis in weaned piglets[J]. Br J Nutr, 1991, 66:423.
- [5] 李予霞,王少珩. 色氨酸分析方法的筛选研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2001, 5(1):41~44.
- [6] 伍喜林. 色氨酸分析技术的现状和展望 [J]. 饲料工业, 1994, 15(5):29~33.

表 1 重现性实验

样品量 (mg)	色氨酸含量(mg/g)	平均含量(mg/g)	标准偏差	相对标准偏差 (%)
2.1	3.36782	3.18923	0.09053	2.86
2.0	3.13678			
2.0	3.13054			
2.0	3.19139			
1.9	3.13928			
2.0	3.16955			

表 2 回收率实验

样品名	样品含量 (mg)	加标量 (mg)	加标后测得量 (mg)	回收量 (mg)	回收率 (%)
乳粉-1	0.027199	0.01	0.037068	0.009869	98.69
乳清	0.022106	0.01	0.032202	0.010096	100.96
乳粉-2	0.027373	0.01	0.037442	0.010069	100.69
冻干粉	0.035162	0.02	0.055483	0.020321	101.61
脱脂粉	0.048743	0.02	0.068060	0.019317	96.58