

国外谷物 蛋白质赖氨酸分析测定法

上海科学技术情报研究所 编

上海科学技术文献出版社

国外谷物蛋白质赖氨酸分析测定法

上海科学技术情报研究所 编

*

上海科学技术文献出版社出版

(上海高安路六弄一号)

、新华书店上海发行所发行

上海科学技术情报研究所印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/16 印张 4.5 字数 115,000

1979年12月第1版 1979年12月第1次印刷

印数: 1--3,100

书号: 16192·8 定价: 0.60 元

《科技新书目》143-84

前 言

谷物的蛋白质品质育种已成为近代育种技术的主要内容之一。对蛋白质数量、品质的分析方法以及筛选技术也日益受到重视,取得进展。实践证明,采用化学分析法,快速、简便,适用于分析大批样品,特别是近年来由于一般分析仪器和测定技术的迅速发展和普遍提高,谷物蛋白质的测定大量地采用了仪器分析法,更是极大地提高了工作效率,保证了谷物品质育种的顺利进行。

为了学习国外蛋白质品质育种工作中先进的分析、筛选技术,我们查阅了七十年代以来国外的有关文献,选择了谷物蛋白质、赖氨酸分析、测定方法的文章10篇编译成集。译文集共分二部分,第一部分介绍化学分析法,第二部分介绍物理测定法。供国内农业科技、教学工作参考。

目 录

根据染料结合力来估计蛋白质的质量和数量.....	1
用染料结合法和双缩脲法测定糙米和精米的蛋白质.....	6
用双缩脲法测定小麦蛋白质时淀粉干扰的评定和排除.....	10
测定小麦蛋白质含量的凯氏法、染料结合法和双缩脲法的比较.....	17
在添加赖氨酸的小麦和压碎小麦中测定添加的赖氨酸.....	23
用改革的三硝基苯1-磺酸(TNBS)法测定玉米种子蛋白质中有效 赖氨酸含量.....	29
不须水解而能测定谷粒中赖氨酸的快速法.....	34
农产品光学分析器.....	47
对测定硬红冬小麦蛋白质含量用的二种红外分析仪的评价.....	57
分析谷物蛋白质含量的质子激活法.....	64

根据染料结合力来估计 蛋白质的质量和数量

R. Mossberg

〔摘要〕 在作物育种中，特别是在有关质量性状的育种工作中，对快速而经济的筛选大量样品的方法一直是非常需要的。就测定氨基酸成分而言，普通方法太复杂、太费时，而且也太昂贵。本文作者在探索快速筛选法当中，对染料结合力和碱性氨基酸含量之间的关系进行了研究。

他用小麦、大麦、燕麦、黑麦、黑小麦和玉米为样品的研究结果指出，染料结合力与碱性氨基酸含量的相关比它与氮或粗蛋白质含量的相关更密切。因此，藉助于染料结合力的方法似乎非常适用于作物育种，它可为筛选氨基酸含量高的品种提供一种简单的解决方法。采用本方法时必须进行补助分析，例如：采用测定氮含量的凯氏法和测定碱性氨基酸类型的氨基酸色层分析，以确定所选择的品种中碱性氨基酸的含量高是由于总蛋白质含量增加还是由于氨基酸类型改变。这样，那些比较复杂而昂贵的方法就可限于尽可能少量的筛选材料，而迅速、经济的能够自动化的染料结合法则用于大批筛选。

我们在Weibullsholn作物育种研究所采用染料结合法来估计粗蛋白质含量，已经有些年了。这些方法是把一种偶氮嘧啶染料溶液与含有蛋白质的样品混和。染料即与蛋白质的咪唑、胍和氨基团结合。这些基团可能来源于组氨酸、精氨酸、赖氨酸等碱性氨基酸以及蛋白链的游离氨基。倘若蛋白质中的氨基酸相当恒定，获得的染料结合力与粗蛋白质或氮含量之间的相关是很密切的。染料结合法曾被试用于小麦、大麦、牛奶和乳制品、牧草、肉和肉制品以及普通食品中的粗蛋白质的估计。但是，在不同的小麦品种中，粗蛋白质与染料结合力之间的关系有显著的差异，染料结合法也曾被用来对鱼粉和大豆进行试验性的蛋白质质量测定。对大麦的研究表明：粗蛋白质与染料结合力之间的关系还受到加工处理的影响，而营养价值和赖氨酸总含量也同样受到影响。缺乏赖氨酸这一必需的氨基酸，是植物蛋白质的一般特性，同时也是谷物蛋白质的特有现象。赖氨酸除在正常情况下，在谷物中是限量的，而且不稳定。许多情况，例如贮藏的种子太潮湿，种子在干燥以前贮藏得太久或干燥得不适当，对赖氨酸都有很大影响。在这些情况下，赖氨酸容易与碳水化合物起反应而形成复杂物质，以致不能由于酶作用而从这种复杂物质中释放出来。因此，这种氨基酸就不能在动物体中被用于合成蛋白质。更严重的损害是可能最后将赖氨酸完全破坏。因此，赖氨酸有两种重要而明显的情况值得我们注意，即：它的普遍缺乏和它在各种情况下的不稳定性。

上述结果以及赖氨酸的普遍缺乏促进了对染料结合的生化特性以及它在农业和食品工艺

方面的实际应用的进一步研究。本文的目的在于介绍一些这种研究的结果。

材 料 和 方 法

对已知其氨基酸成分的65份谷物样品测定其染料结合力,样品包括大麦14份、黑麦11份、小麦15份、燕麦7份和黑小麦18份。此外还包括玉米样品2份,即不透明—2号的突变体及其亲本系。

设备和溶液

(1)染料溶液包括Acilane Orange G(拜耳C.I.15970)15.84克/升; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.98克/升;百里酚0.30克/升。在水浴上加热到大约80℃以加快染料的溶解。

(2)旋风锤式磨机。

(3)能够水平摇动几枝试管或塑料瓶的摇床。

(4)校准得自动吸移40.0毫升染料溶液的移液管。

(5)过滤设备可用通过玻璃纤维滤器进行抽滤的专门装置,或用30毫升玻璃漏斗(滤孔密度4号)或具有滤帽的塑料瓶。

(6)色度计用具有短光路比色槽的特制色度计,或于分光光度计的475毫微米处设一短光路比色槽。

方 法

把样品磨碎并混合均匀。取1克(1,000)样品移置于装有一些玻璃球的60毫升试管里,用自动移液管加入40毫升染料溶液,立刻用橡皮塞塞紧试管,用手有力地摇动以使样品和染料混和。然后把任意数目的样品放在摇床上同时进行水平摇动。正确的摇动时间和速度须根据摇床的特点和所选择的最适方法来决定。一般摇动30~40分钟就会得到可以重复的结果。然而,如不摇动几小时,就不能完全着色,所以必须正确控制摇动时间。摇动后把试管竖立几分钟再行过滤。在此时间内,大量颗粒下沉,从而简化了过滤手续。样品可保持在此一阶段上达三小时而不显著影响染料结合力值。然后用不起化学作用的材料过滤样品,将滤液供测定透光率(T)用。对稀释到一定浓度的染料溶液测定其透光率,据此制备校正曲线,用以判定未知样品的染料结合力。应该强调指出:每批新鲜染料必须进行一次校准。

结 果

表1所列是按照Moore和Stein方法测定谷物碱性氨基酸含量的结果。样品是用整粒种子磨成的粉。表中的mM值是每类供试谷物的所有样品的平均值,惟玉米除外。表中列出两个玉米值,因为它们之间的蛋白质成份显然不同。其它谷物则并不如此(图1)。表1示出,不透明—2号将碱性氨基酸特别是赖氨酸的含量从表中的最低值提升到最高值。如果不是这样的话,则应以燕麦的赖氨酸含量为最高。

图1所示是氮和碱性氨基酸之间的相关,图2所示是氮和染料结合力之间的相关。这两个图指示出颇为相同的情况,即:除玉米外,任何一种谷物的用以比较的参数之间的相关很密切。但不同谷物的回归线很可能不相等,这与不同谷物的碱性氨基酸含量不同的情况是相符的(表1)。

表 1 不同谷物的碱性氨基酸的平均含量

谷 物	样品数	mM 碱性氨基酸/16 g 氮			
		赖氨酸	组氨酸	精氨酸	共 计
大 麦	14	24	14	27	65
小 麦	15	19	14	25	58
燕 麦	7	27	14	35	76
黑 麦	11	25	14	28	67
黑 小 麦	18	19	14	25	58
玉米(普通)	1	17	18	23	58
玉米(不透明-2号)	1	32	20	33	85

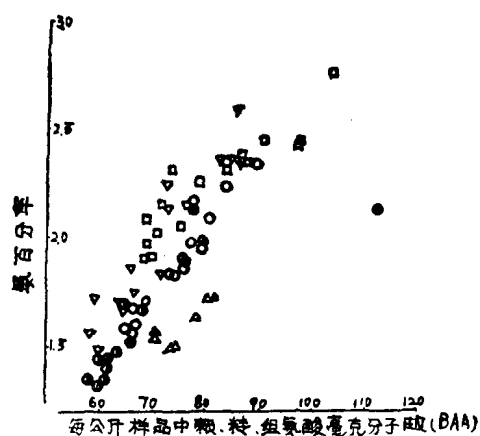


图 1 不同谷物的氮含量与碱性氨基酸(BAA)的关系

▽—小麦 ○—大麦 △—燕麦 ●—黑麦 □—黑小麦 ●—玉米

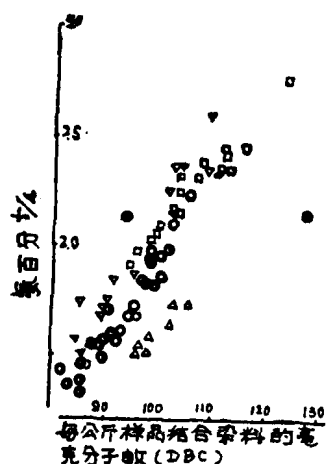


图 2 不同谷物的氮与染料结合力 (DBC)之间的相关

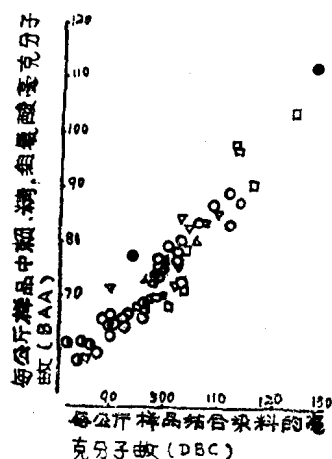


图 3 不同谷物的碱性氨基酸(BAA)与染料结合力(DBC)之间的关系

(注)因为所用染料纯度知道得不够精确,所以图中每公斤样品所结合的染料的mM值只可被视为是初步的。

图3示出染料结合力与碱性氨基酸之间的相关。在这项比较中值得注意的是：包括两个玉米样品在内的不同谷物很可能沿着同一条回归线分布，导致一种非常密切的相关。以上三个图所表示的结果说明：染料结合力与碱性氨基酸含量的相关比它与氮(或粗蛋白)含量的相关更密切。但是，蛋白质中的碱性氨基酸含量相差很小的那些谷物，其氮-碱性氨基酸和染料结合力-碱性氨基酸的相关大约是相等的(表2)。

表 2 不同谷物的染料结合力、氮含量和碱性氨基酸(赖氨酸、组氨酸和精氨酸)含量之间的相关系数

谷 物	样品数	相 关 系 数		
		氮-碱性氨基酸	氮-染料结合力	碱性氨基酸-染料结合力
大 麦	14	0.984	0.968	0.960
小 麦	15	0.945	0.965	0.943
燕 麦	7	0.839	0.948	0.886
黑 麦	11	0.961	0.963	0.975
黑 小 麦	18	0.853	0.930	0.901
玉 米	2	—	—	—
共 计	67	0.759	0.767	0.940

表 3 谷物的染料结合力、赖氨酸含量、氮含量和碱性氨基酸量之间的相关系数

	样 品 数	相 关 系 数 (r)
氮-碱性氨基酸	67	0.759
氮-赖氨酸	67	0.471
氮-染料结合力	67	0.767
染料结合力-碱性氨基酸	67	0.940
染料结合力-赖氨酸	67	0.819

正如上面所述，碱性氨基酸与染料结合力之间的相关是密切的。对哺乳动物来说，碱性氨基酸中仅赖氨酸是不可缺少的。因此，从实际观点出发，只有染料结合力与赖氨酸之间的相关具有意义，而表3列出了这项相关系数(r)和其它一些相关系数，以便比较。从表我们可以看清，染料结合力-赖氨酸的相关比染料结合力-碱性氨基酸的相关稍弱，但比氮-染料结合力和氮-赖氨酸的相关密切。这些情况说明在三个碱性氨基酸之间存在着密切的协方差。

讨 论

染料结合法是简便的，且能用普通的实验设备进行。某些步骤如能用特制设备进行，效果可能更好。特别是用比色计，尤其是这样。由于被测定溶液的色强高，必须用具有短光(0.2毫米)的特制比色计，或在比色测定之前把溶液稀释一百倍或以上。虽然可在真空条件

下通过普通的玻璃漏斗过滤，但建议用特制的过滤装置在抽滤下通过玻璃纤维滤器过滤，或用具有过滤帽的塑料瓶。

染料结合法所依据的是蛋白质的碱性基团能与染料分子结合并使之沉淀的一种能力。由于染色依靠染料浓度，因此，建议不使这项浓度低于0.5毫克/毫升。

使常规染料结合测定法自动化，确有很大优点。用连续分析系统Technicon进行的初步试验是很有希望的。这至少对过滤、比色和记录似乎是有用的。此外还有可能象Udy-React-R磨机那样把磨碎和染色合并为一道工序，使得几乎整个过程自动化。

这个方法似乎非常适合于作物育种工作，因为它为筛选氨基酸含量高的品种提供一个简单的解决方法。但随后必须进行补助分析，例如：测定氮和粗蛋白质的凯氏法分析和测定氨基酸类型的氨基酸色层分析，以确定根据染料结合力测定来选择其类型的基本氨基酸含量高，是由于总蛋白质含量的增加还是由于氨基酸类型的改变。而这两种情况都使人感兴趣。因此，比较复杂而昂贵的方法将被限制使用于较少量的筛选材料，而快速、经济的染料结合法则被用于大批筛选。最近，这种分析技术的配合使用的效果已经在大麦的实践中得到证明。

染料结合力还会反映发热变质的大麦的总赖氨酸含量(图4)和营养价值(图5)的变化。在少数几份鱼粉试样中，这个方法也显示了与Carpenter法测定的有用的赖氨酸有良好的相关。因此，染料结合法很有可能不仅对作物育种有用，而且在涉及谷物和谷物产品的其它领域中也是有用的。例如：关于不透明-2号玉米，如果要在它与普通黄玉米之间作出价格上的差异并把它保持下去，就须有一项不费钱的方法以测定高赖氨酸玉米。在需要大规模估计蛋白质数量和质量的情况下，染料结合法似乎是一个接近现实的方法。

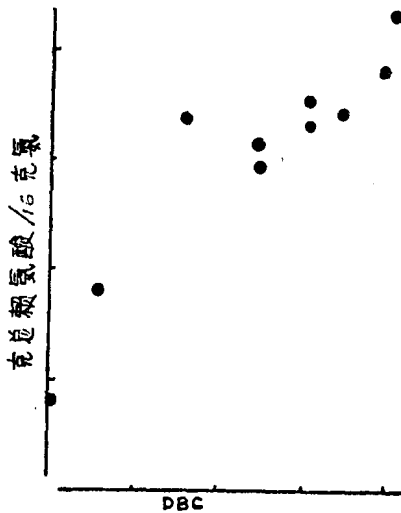


图4 发热变质的大麦样品的总赖氨酸含量与染料结合力(DBC)之间的关系

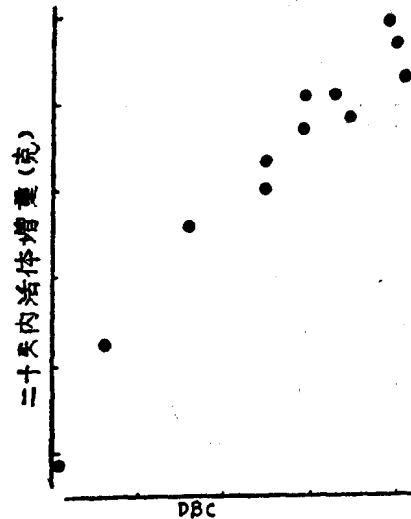


图5 发热变质的大麦样品的营养价值与染料结合力之间的相关
(注)营养价值是通过小白鼠饲养试验予以估计的

钱新蓉译 吴 铎校

用染料结合法和双缩脲法测定 糙米和精米的蛋白质

Lucila C. Parial and L. W. Rooney

[摘要] 对精米和糙米的蛋白质染料结合比色和双缩脲值(吸收率)与用凯氏法(Kjeldahl)测定的蛋白质含量之间用直线回归式作了测定。对根据酸性橙12号染料与蛋白质之间的反应而制定的两种染料结合法以及对单样分析和多样测定所作修改作了调查研究。代表45个品种的水稻试样,其蛋白质百分含量(凯氏法 $N\% \times 5.95$)的变化范围从4.6到12.9%。用单样和多样染料结合法的精米的相关系数分别是0.986和0.961,糙米的相应的“r”值是-0.969和-0.984。精米和糙米的双缩脲试验的相关系数分别是0.964和0.961。测定蛋白质的四个方法也都用于分析来自另一收获季节的32个水稻品种的精米和糙米试样。用两种染料结合法测定精米和糙米的平均蛋白质含量在统计学上与用凯氏法测定的没有显著差别。而用双缩脲测定的平均蛋白质值在统计学上则有较大差别。在水稻育种工作中,上述比色法在用于蛋白质的常规测定时是令人满意的、快速、简易而且比较经济的方法。

发展高蛋白质的水稻品种,已引起人们较多的注意。为了通过品种的改良以达到这一目的,需要比较快速、经济和正确的测定蛋白质的方法用以筛选大量的水稻品系和选择杂交后代。

比色染料结合法与双缩脲法广泛应用于测定各种食物和食物原料的蛋白质含量。双缩脲法成功地应用于测定谷物、大豆产品和肉的蛋白质。它包括蛋白质与氢氧化钾胶溶和用硫酸铜处理。在一定条件下,产生的有色溶液的色强度与蛋白质含量是成比例的。在有关染料的研究中,Fraenkel-Conrat和Cooper指出:脱离橙-G染料的磺(酸)基与在蛋白质分子上的碱性基发生反应,形成不溶的蛋白质染料复合物。染料结合法已被用于测定小麦和小麦产品、牛奶、肉、鱼、蚕豆和坚果粉及大豆产品的蛋白质含量,并被用于大麦蛋白质的常规分析。然而,用染料结合法测定精米和糙米中的蛋白质的效果还没有完全探索清楚。

本文叙述分析测定精米和糙米中的蛋白质含量的两个经过修改的染料结合法并根据用凯氏蛋白质测定法获得的值来比较用双缩脲法和染料结合法的效果。

材 料 和 方 法

样品的收集和制备

从国际水稻研究所获得1966年两季生长在菲律宾产量试验小区中的45个水稻品种。把稻

谷的试样在Satake实验室去壳，糙米用标准Mc Gill 3号水稻磨碾成精米。另把一份稻谷用于去壳后专作测定糙米中的蛋白质之用。精米和糙米两种试样都在Weber磨坊磨成粉，过0.010英寸的筛。所有分析测定都做二个重复，含水量以11%为准。统计计算用两个重复的平均数。

修改的染料结合法

单样法 用于某些谷粒的单样蛋白质分析的仪器和染料结合法已有详细叙述。用于水稻时修改如下：称取米粉试样800毫克，放入型号为React-R的磨子，这种磨子是一个具有金属端部的特殊的管子，金属端部有一个滑动的金属柱塞。精确地加入酸性橙12号染料40.0毫升，并把试样放在React-R-摇动器中用力摇动。精米作试样时，摇动3分钟以使染料与蛋白质完成反应，糙米时则要摇动5分钟。把经过反应的试样过滤并在波长为485毫微米处比色，测定未结合(过剩)染料的吸收率。未结合染料的数量是按照蛋白质含量加以校准的。

多样法 为做成批或多样测定，称取米粉800毫克，放入50毫升的聚乙烯瓶内，加入40.0毫升的酸性橙12号染料。把60个试样同时放在Eberbach摇动器内，每分钟摇动60下，摇动幅度为1.5英寸。完成染料和蛋白质之间的反应，精米需要摇动一小时，糙米要3小时。经过反应的试样过滤后，在485毫微米测定未结合染料和吸收率。

双缩脲法

双缩脲法是由Pinckney报道而由Webb应用于水稻的一种方法。精米和糙米都称取1.0克放入试管(25×150毫米)并与2毫升四氯化碳混合。精确地加入40毫升双缩脲试剂B。把试样摇动90分钟。48个试样同时放在一具机械的摇动器上，每分钟摇动50下，摇动幅度为1.5英寸。摇动后，取试样15毫升进行离心分离，直到澄清，并在550毫微米测定吸收率(同时作空白试验)。

粗蛋白质

总氮量是用官方的AACC微凯氏法测定的，粗蛋白质含量是 $N\% \times 5.95$ 。

结果和讨论

染料结合吸收值与用凯氏法测定的蛋白质含量之间的关系

图1示出用单样法时，将未结合染料的吸收率作为精米的蛋白质含量的函数。用多样染料结合法时同样的关系示于图2。在本研究中，未结合(过剩)染料的吸收率值与蛋白质含量有关，并被用于回归直线的绘制。表1概括了用单样及多样染料结合法时获得的精米和糙米的回归式和相关系数。用两个方法处理精米和糙米时所获得的相关系数都十分明显。从统计学上讲，两个染料结合法的回归直线的斜度和位置是相似的。精米的以蛋白质百分率表示的回归直线的标准偏差，用单样法和多样法时分别是0.28和0.48。糙米的标准偏差分别是0.40和0.29。

双缩脲吸收率值和凯氏蛋白质含量之间的相关：

图3表示精米的双缩脲吸收率值和用凯氏法测定的蛋白质含量之间的相关。由双缩脲试验中获得的精米和糙米的回归式和相关系数概括于表1。精米和糙米两方的相关系数都很显著。精米的以蛋白质百分率表示的标准偏差是0.46，糙米的是0.30。

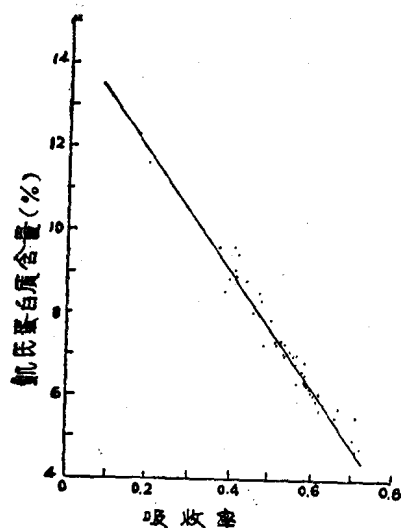
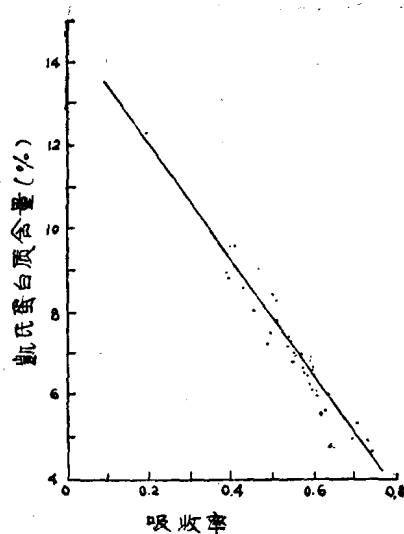


图 1(左) 用单样染料结合法测定的未结合酸性橙 12 号染料的吸收与精米的凯氏蛋白质含量之间的相关。 $Y = -14.09X + 14.68 (r = -0.986^{**})$

图 2(右) 用多样染料结合法测定的未结合酸性橙 12 号染料的吸收和精米的凯氏蛋白质含量之间的相关。 $Y = -13.60X + 14.67 (r = -0.961^{**})$

表 1 精米和糙米的回归公式及染料结合法和双缩脲法的吸收值与凯氏蛋白质含量之间的相关系数

方 法		回 归 公 式	n	r	Sy·x
精 米	染料结合-单样	$Y = -14.09X + 14.68$	45	-0.986**	±0.28
	染料结合-多样	$Y = -13.60X + 14.67$	45	-0.961**	±0.48
	双 缩 脲	$Y = 15.48X - 0.083$	42	0.964**	±0.46
糙 米	染料结合-单样	$Y = -13.87X + 14.12$	45	0.969**	±0.40
	染料结合-多样	$Y = -14.12X + 14.78$	45	-0.984**	±0.29
	双 缩 脲	$Y = 16.04X - 0.233$	42	0.981**	±0.30

Y = 预测的蛋白质含量(%);

X = 吸收率。

由于碱性双缩脲溶液的染色可能引起干扰,把具有红糠皮的 3 个品种从试样中剔除。

各个蛋白质测定方法的比较

用两种修改的染料结合法、双缩脲法和微量凯氏法分别分析了在 1967 年干季生长在 IRRI 的 32 个水稻品种的精米和糙米的蛋白质含量。表 1 所示回归式用于比色测定蛋白质含量。方差分析用于检验预测的蛋白质含量平均数之间的差数。Duncan 的多范围测试方法用于比较在 1% 水平上的平均数。精米和糙米都获得了很高的 F 值(表 2),而且在用微量凯氏法和用两种染料结合法测定的蛋白质的平均数之间没有获得差数(表 3)。用双缩脲法测得的精米和糙米(表 3)的平均蛋白质含量在统计上(1% 水平)比其它方法高。

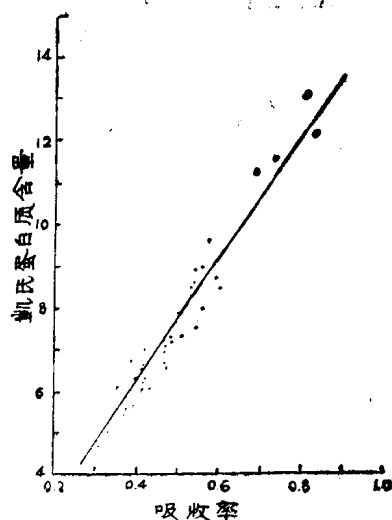


图 3 精米的双缩脲吸收值与凯氏蛋白质含量之间的相关
 $Y = 15.48X - 0.083 (r = 0.964^{**})$

表 2 测定精、糙米蛋白质含量四种方法方差分析

来 源	精 米		糙 米	
	DF	MS	DF	MS
方 法	3	7.69**	3	8.10**
品 种	31	14.96**	31	14.61**
误 差	93	0.32	93	0.24

表 3 用四种方法测得的精、糙米的蛋白质含量的范围和平均数的比较

方 法	精 米		糙 米	
	平均数 ^(a) (%)	范 围 (%)	平均数 ^(a) (%)	范 围 (%)
微量凯氏法	7.50a	5.74~11.69	8.25a	6.15~11.74
染料结合-单样	7.75a	5.60~12.15	8.20a	6.10~12.15
染料结合-多样	7.42a	5.55~11.65	8.04a	6.00~11.95
双缩脲	8.18b	5.95~12.50	8.85b	6.03~12.45
	n = 32		n = 32	

a 标以同一字母的平均数用 Duncan 的多范围试验(%)加以比较时没有不同。

本研究结果指出：上述染料结合法和双缩脲法尽管后者可能不如前者，但都是令人满意的测定糙米和精米蛋白质含量的方法。染料结合法有明显的优点：简单、快速、步骤极少。用单样法时包括磨细试样在内，在 5 到 10 分钟内就能获得结果。在对大量试样作蛋白质常规测定时可用多样染料结合法或双缩脲法。这些方法，通过试样多少或试剂浓度的修改和适宜的回归式的决定，很可能被进一步应用于蛋白质含量大于 12% 的试样。

译自《Cereal Chemistry》47(1): 38~43, 1970年

钱新蓉译 吴 铎校

用双缩脲法测定小麦 蛋白质时淀粉干扰的评定和排除

Hisateru Mitsuda and Toshio Mitsunaga

〔摘要〕 用双缩脲法测定小麦蛋白质时,发现用碱性溶液如双缩脲试剂时,可提取的淀粉、有色物质和类脂物曾对测定发生干扰。对它们的干扰作用所进行的比较研究指出:小麦的主要组份淀粉对双缩脲反应的影响最大。在有淀粉存在时,凯氏法蛋白质含量与双缩脲的光密度间的相关性很差。

作者曾发现某些有机溶剂有效地阻滞了小麦淀粉在双缩脲反应混合物中的溶解。进行双缩脲测定前用这些溶剂处理小麦试样,结果,淀粉的影响完全被排除,而双缩脲的光密度与凯氏法蛋白质含量间表现密切相关。

现虽有各种方法如Lowry法、双缩脲法、分光光度法和凯氏法用于测定蛋白质,但谷类中的这项分析通常采用凯氏法。然而,由于凯氏法操作复杂并需要熟练的技术和费时,因此若干简易的比色法得到发展。尽管双缩脲法的准确度相当差,但由于它操作简单,业已为此法提出了许多修改方案。

用双缩脲法时,蛋白质的提取和显色是在碱性酒石酸铜溶液中同时进行的。然而大家知道:用碱性溶液处理谷类,也提取出了干扰物质,因而获得的结果通常是不稳定的。类脂物,各种有色物质和还原糖均干扰双缩脲反应。在测定动物和微生物的组织蛋白质时,类脂物有显著干扰。为了解决这个问题,Pinckney发展了一种方法,即把四氯化碳加入谷类的提取物中,以除去反应系统中的类脂物。采用氯仿的类似方法曾被成功地应用于小麦蛋白质,以排除类脂物的可能影响。可用碱性溶液如双缩脲试剂提取的大麦、稻糠以及小麦麸和胚芽中的有色物质,也是干扰双缩脲反应的。人们认为有色物质的主要组份是黄酮类化合物和类胡萝卜素。前者在碱性溶液中为黄色或褐色,在酸性溶液中无色,而后者几乎不溶于水。糠中与半纤维素、木质素和多酚化合物有关的其它有色物质,在蛋白质测定中也必须加以考虑。最后,必须注意到还原糖(主要是葡萄糖)在把 Cu^{2+} 还原成 Cu_2O 时会干扰双缩脲反应。为了提高双缩脲法的准确度,需要对这些干扰物质的影响作定量研究。

本文对用双缩脲法测定蛋白质时的干扰物质如还原糖、有色物质、淀粉、类脂物和植酸钙镁的影响作了评价,并指出淀粉在小麦蛋白质的分析中影响最大。本研究还指出某些有机化合物有效地阻滞了谷类淀粉在双缩脲反应混合物中的溶解,而在双缩脲法中使用这些化合物即可成功地分析小麦和小麦产品。

实 验

材料与试剂 使用的化学试剂皆是分析纯。卵白胨(2X Cryst Nutritional Biochemical)

Corporation产品)被用作蛋白质标准。小麦和小麦产品是从日本日清面粉公司获得的,使用前未作任何处理。

试剂(A) 在不断搅拌条件下于930毫升蒸馏水中添加10毫升10N氢氧化钾溶液(或10N氢氧化钠溶液)、20毫升25%酒石酸钠钾溶液以及40毫升4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液。

试剂(B) 除不加 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 外,与试剂(A)配制法相同。

小麦和小麦产品中的碱溶组份的分析 通过混合,在一分小麦样品(1.0克)中加入0.5%氢氧化钠或0.5%氢氧化钾溶液100毫升。震荡30分钟后,在 $1100 \times g$ 条件下将上述混合物离心15分钟以获得上层清液,随后对其中的淀粉、葡萄糖、类脂物、黄酮类化合物和有机磷进行分析。

蛋白质含量是用凯氏法测定的;由氮含量变成蛋白质含量的换算因数,小麦是5.83、面粉是5.70、小麦麸是6.25。用0.7N盐酸水解后,通过索莫奇·纳尔森法测定淀粉含量;试样在水解前与水解后的葡萄糖浓度的差数乘0.9之积被假定为淀粉含量。通过比色法测定有色物质,用芸香甙作为标准并以芸香甙含量表示之。植酸钙镁含量是根据有机磷量估计,而有机磷量是用爱伦法测定总磷后从中减去无机磷来求得的。类脂物含量是用勃兰格腾法测定的。

干扰物质对双缩脲反应的影响的评定 在有不同浓度的葡萄糖、芸香甙、小麦淀粉和植酸钙镁钠存在的条件下,用双缩脲法测定蛋白质,以评定这些物质的干扰影响。根据普通小麦样品与脱脂小麦样品的双缩脲色强度的比较评定类脂物的影响。通过石油醚提取除去类脂物。

某些有机溶剂对谷类淀粉溶解度的阻滞作用 对烃、卤代烃、酒精和酮进行了检验。称取0.5克面粉或小麦淀粉试样放入100毫升烧瓶,随后加入待检有机溶剂1毫升,并注意确保材料润湿均匀。继此再加入0.5~5.0%氢氧化钠50毫升。塞好烧瓶并在震荡器上摇动30分钟。在 $1100 \times g$ 条件下将上述分散体离心15分钟以获得上清液,然后按前面的方法进行蛋白质和淀粉分析。

有机溶剂对双缩脲法的影响 取小麦产品的试样0.5克放入100毫升烧瓶,并按上述方法加入待检有机溶剂1毫升和试剂A50毫升。离心以后,对照试剂A读出上清液在550微毫米的光密度。这项读出($0D_a$)不仅是双缩脲所造成,也是反应混合物中从试样提取到的有色物质所造成。为了排除后者的影响,对小麦产品的试样(0.5克)进行上述处理,但以试剂B代替试剂A,并与B对照读出光密度($0D_b$)。 $0D_a - 0D_b$ 被认为是双缩脲所造成的真实光密度。

结果和讨论

直接应用双缩脲法测定小麦蛋白质 用双缩脲处理小麦试样、整粒小麦、面粉和小麦麸,产生了混浊的液体,而它们的光密度与试样的蛋白质含量之间的相关也比较差。事实上,根据用凯氏法测定的样品的蛋白质量与双缩脲的光密度所标绘的曲线,说明两者间的相关系数是极低的,由此排除了直接应用标准双缩脲法的可能性。然而,人们发现,用氢氧化钾代替氢氧化钠作为提取溶剂,即能使相关性略有改进。尽管如此,对小麦样品直接应用此法,还是行不通的。

这种干扰很可能是由从反应混合物中提取到的小麦的某些组份所造成。现将可由碱性溶

液提取到的小麦的主要组份的成份列入表 1。并将每个组份对双缩脲反应的影响介绍于后。

表 1 可用 0.5% 氢氧化钠提取的小麦组份

对每个试样(1克)用 0.5% 氢氧化钠溶液 100 毫升提取并对提取物进行分析, 其结果用毫克/毫升提取物表示。

试 样	还 原 糖	淀 粉	凯 氏 法 蛋白质含量	色 素	有 机 磷	类 脂 物
整 粒	0.090	6.7 —	1.3	0	0.142	0.121
面 粉	0.091	7.1 1.0 ^{a)}	1.2	0	0.049	0.086
麸	0.082	1.2 —	1.4	0.074	0.281	0.325

a) 用 0.5% 氢氧化钾提取时的值

碱性提取的小麦组份的影响 还原糖的影响图 1 和图 2 分别示出双缩脲反应完成后 30 分钟和 120 分钟, 在卵白朊浓度不变的情况下, 双缩脲的光密度(550nm)与葡萄糖浓度的关系。(必须注意双缩脲的色强度在反应完成后 30 分钟达到最高值并在几小时内保持不变)。纵轴上的截距代表在各个浓度条件下的蛋白质的光密度。

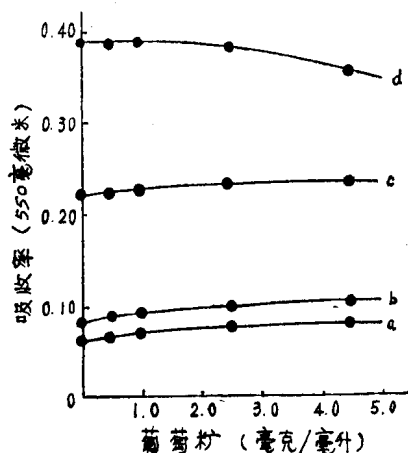


图 1 蛋白质含量不同的试样验完后 30 分钟观察到的葡萄糖对双缩脲吸收率的影响

用卵白朊配制真实混合物 a, 不含蛋白质的对照; b, 0.5 毫克蛋白质/毫升; c, 2.5 毫克蛋白质/毫升; d, 5.0 毫克蛋白质/毫升。

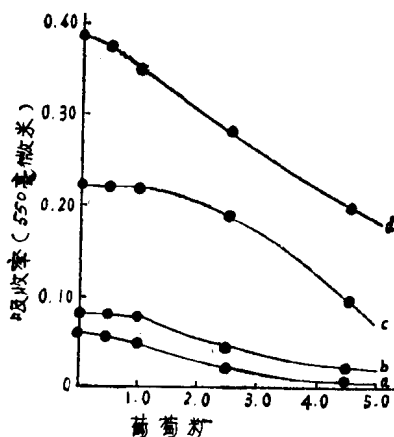


图 2 蛋白质含量不同的试样验完后 120 分钟观察到的葡萄糖对双缩脲吸收率的影响

用卵白朊配制混合物 a, 不含有蛋白质的对照; b, 0.5 毫克蛋白质/毫升; c, 2.5 毫克蛋白质/毫升; d, 5.0 毫克蛋白质/毫升。

单独加入双缩脲试剂的葡萄糖表示出 500 毫微米处的吸收率, 且随葡萄糖浓度而逐渐增加(图 1, a)。这种干扰可能归因于由葡萄糖还原 Cu^{2+} 而形成的 Cu_2O 微粒的光散射作用。当蛋白质浓度较低时, 光密度随葡萄糖浓度而增加(图 1, b 和 c)。另一方面, 当蛋白质浓度高时, 光密度仅在葡萄糖浓度低时表现类似反应, 如进一步增加葡萄糖, 则导致光密度降低(图 1, b)。此外在任何情况下, 光密度总是随时间而降低, 在试样含有大量蛋白质情况下则尤其如此(图 2)。光密度随时间而降低, 可能是由于 Cu_2O 的沉淀, 也可能是由于葡萄糖通过竞

争除去 Cu^{2+} 而使 Cu^{2+} -蛋白质络合物离解。

有色物质(芸香甙)的影响 芸香甙的干扰示于图 3。从图可以看到在固定的蛋白质浓度条件下获得的双缩脲的光密度与加入试样的芸香甙浓度的关系。

在有双缩脲试剂存在的情况下, 芸香甙表示出在 550 毫微米处的吸收率, 并如图 3, a 所示, 光密度是随浓度而增加的。有蛋白质存在时(图 3, b 和 c), 一旦蛋白质浓度增加, 曲线的斜度也增加, 因此仅仅减去曲线 a 并不能从曲线 b 和 c 上消除芸香甙的影响。为此, 大量芸香甙的存在显然干扰了双缩脲测定法。由于这些试样的芸香甙含量大约是 0.074 毫克/毫升, 相当于蛋白质含量的 1/20 左右, 因此, 在小麦蛋白质的分析中, 芸香甙的影响似乎是显著的。

淀粉的影响 图 4 示出溶解于 0.5% 氢氧化钠溶液的纯淀粉的吸收率(550 毫微米), 而这项吸收是随淀粉浓度而直线增加。这种情况部分地归因于淀粉悬浮液的光散射作用。如图 4 所示, 添加双缩脲试剂, 显著地增强了吸收率。最初, 光密度随淀粉浓度迅速增加, 但当逐渐达到最高值后即不再随淀粉增加。

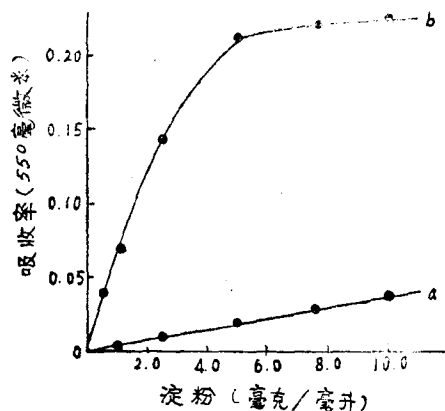


图 4 淀粉碱性溶液的吸收率

a, 淀粉和不含硫酸铜的双缩脲试剂的混合物; b, 淀粉和双缩脲试剂的混合物。

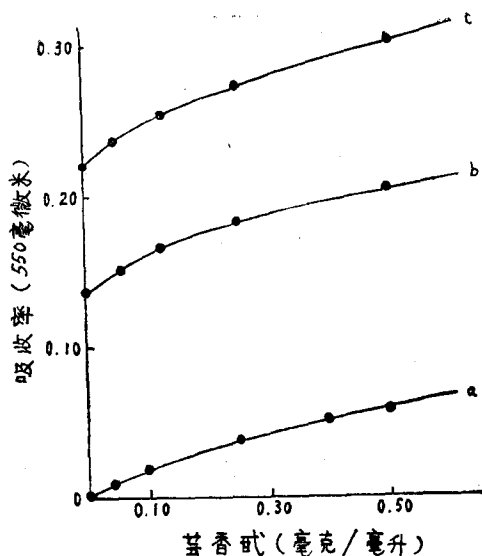


图 3 在蛋白质含量不同的试样验证后观察到的芸香甙对双缩脲吸收率的影响

用卵的脱配制混合物; a, 不含蛋白质的对照; b, 1.25 毫克蛋白质/毫升; c, 2.50 毫克蛋白质/毫升

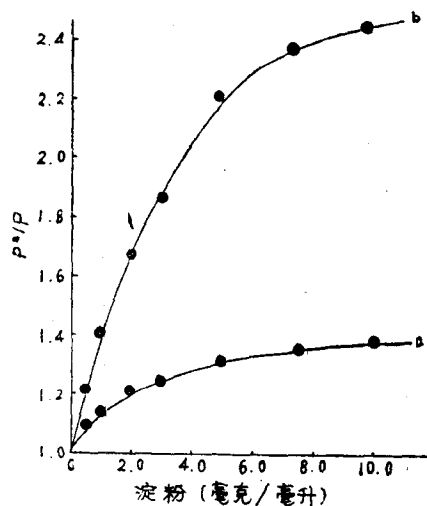


图 5 淀粉对表现双缩脲蛋白质的影响

P^*/P 表示在有淀粉存在条件下测定的表现双缩脲蛋白质含量与真实蛋白质含量的比值。曲线 a 是蛋白质浓度为 5.0 毫克/毫升时获得的, 曲线 b 是 1.0 毫克/毫升时获得的。