

用 SEP-PAK C₁₈ 柱作为氨基酸样品预处理柱的实验研究

周成贵 孙 玮 王一健 赵志斌 崔应瑞 李才安

(第三军医大学中心实验室, 重庆, 630038)

生物样品(蛋白质水解液、血浆中色素)及微量元素锌(Zn)对氨基酸分析均有不同程度的影响。Ito 和 Wunderly 等人先前的研究结果证实了活性炭对氨基酸具有吸附性^[1,2],故不能用于氨基酸样品的预处理。为了适应蛋白质氨基酸研究的需要,本文用 Sep-PakC₁₈ 柱作为蛋白质水解液脱色及生物样品中 Zn 的吸附试验,观察 Sep-PakC₁₈ 柱对蛋白质水解液的脱色效果、对氨基酸含量的影响、以及对发 Zn 元素的吸附效果^[3]。

实验部分

(一)实验分为两个组

1. A 组:比较采用 Sep-PakC₁₈ 柱过柱前后氨基酸含量的变化。分为实验组和对照组(实验组为过柱后氨基酸变化,对照组为未过柱的氨基酸含量)。2. B 组:比较采用 Sep-PakC₁₈ 柱过柱前后头发中 Zn 含量变化,分为实验和对照两组(表略)。

(二)材料 1. Sep-PakC₁₈ 柱系 Millipore 公司产品,此柱经甲醇活化处理后可重复使用。2. 氨基酸

标准液系上海生物制品研究所产品,其浓度配成 2.5μmol/ml。

(三)仪器及条件 1. 采用美国贝克曼公司(Beckman 121MB)型氨基酸分析仪按照体液方法测定氨基酸含量。2. 采用美国实验仪器公司 IL-951 型原子吸收光度计测定发 Zn 含量。

(四)试剂 1. 茚三酮配方按 Beckman 配方进行配制。2. 缓冲液采用 Beckman 公司生产 pH2.83 缓冲液,按 5 倍稀释后用于氨基酸洗脱剂。

(五)样品收集与处理 1. 生物样品的处理:取血浆 1.80ml+1.20ml 10%磺基水杨酸。以 15000rpm/min,离心 15~20min(沉淀蛋白质)。取上清液经 Sep-PakC₁₈ 柱过滤后上机分析。2. 生物样品发 Zn 的收集与处理:收集小儿发样 100mg/人,用剪刀剪至 2mm,放于 50ml 烧杯中,用(AR)级丙酮 20ml 洗发样,加去离子水适量,重复 3 次。按照发样消化处理方法,将发样制成待测液后,再经 Sep-PakC₁₈ 柱过滤,取上清液上机分析。

表 1 过滤前后氨基酸分析测定含量比较(n=10)

氨基酸名称	实验组 ($\bar{X} \pm SD$ nmol/ml)	对照组 ($\bar{X} \pm SD$ nmol/ml)	回收率(%)	P 值
天门冬氨酸	131.61 ± 14.34	139.71 ± 6.02	94.2	>0.05
苏氨酸	259.42 ± 5.15	263.07 ± 5.55	98.6	>0.05
丝氨酸	264.44 ± 5.14	270.24 ± 6.39	97.9	>0.05
谷氨酸	310.59 ± 6.31	315.15 ± 10.43	98.6	>0.05
谷氨酰胺	267.19 ± 9.60	272.30 ± 9.61	98.1	>0.05
脯氨酸	756.87 ± 29.10	767.07 ± 21.03	98.7	>0.05
甘氨酸	382.07 ± 6.86	390.19 ± 10.24	97.9	>0.05
丙氨酸	215.46 ± 5.96	219.68 ± 6.17	98.1	>0.05
瓜氨酸	245.85 ± 8.35	248.12 ± 8.68	99.1	>0.05
缬氨酸	195.46 ± 5.39	198.59 ± 6.15	98.4	>0.05

结果和讨论

实验结果如表 1 所示经 Sep-PakC₁₈ 柱过滤前后比较,十种氨基酸含量均无明显变化(P>0.05)。除天门冬氨酸回收率 94.20%外,苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、瓜氨酸、缬氨酸等 9 种氨基酸的回收率均在 97.00%以上。经

Sep-PakC₁₈ 柱过滤前后发 Zn 含量比较,过 C₁₈ 柱前后的差异非常显著(P<0.01),对照组、实验组均值(n=34)分别为 175.433 ± 2.806mg/g, 26.134 ± 0.764mg/g)。过柱后 Zn 的吸附率在 85.5%以上。

(一)有关活性炭和草酸对氨基酸吸附以及对蛋白水解液中脱色方面的研究,近年来已有这方面的

报道^[4,5]。以上两方法对蛋白水解液脱色效果不太理想,而且对氨基酸、特别是一些芳香族氨基酸有不同程度的吸附,影响了氨基酸的正常含量。我们用 Sep-PakC₁₈ 柱作为蛋白质水解液脱色并观察 Sep-PakC₁₈ 柱对氨基酸含量变化(目前尚未见这方面的报道),结果表明:脱色十分明显,经过 Sep-PakC₁₈ 柱后所有水解液为无色透明的液体。观察 Sep-PakC₁₈ 柱对氨基酸吸附,实验组与对照组比较无明显差异(P>0.05)。说明 Sep-PakC₁₈ 柱作为蛋白质水解液脱色的方法是准确可靠的。

(二)生物样品(发样、血浆)中都含有微量元素 Zn。Zn 元素可与氨基酸分析仪的离子交换树脂结合后形成络合物^[6],从而污染和损害离子交换树脂,使氨基酸分离柱寿命缩短。我们通过近两年来采用 Sep-PakC₁₈ 柱过滤血浆样品,使血浆样品中的元素 Zn 和样品中的杂质被 Sep-PakC₁₈ 柱所吸附,从而保护了离子交换柱,延长了其寿命(延长近一倍)。观察了 Sep-PakC₁₈ 柱对小儿发 Zn 含量的吸附,结果表明:实验组与对照组比较差异非常明显(P<0.01)。再次说明了 Sep-PakC₁₈ 柱不但具有较好的脱色效果,而且对微量元素 Zn 有较强的吸附能力。综上所述表明:Sep-PakC₁₈ 柱用于生物样品(蛋白质水解液、发样、血样)的预处理,是目前较为理想的一种方法。

参 考 文 献

[1]T. Ito, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 12, 204(1936).
 [2]K. Wunderly, Helv. Chim Acta, 17, 523(1984).
 [3]周成贵等,四川省第五次原子吸收学术报告会论文集,四川江油,447,1990.
 [4]邹学满等,氨基酸杂志,(2),21(1985).
 [5]吴祖道等,氨基酸杂志,(1),28(1986).
 [6]周立东主编,《大型精密仪器讲义——氨基酸分析仪器及方法》,广东省科委条件处印,152页,1983.

(收稿日期:1990年10月14日)

Application of Sep-Pak C₁₈ Column as Pre-Column in Amino Acid Analysis Zhou Chenggui, Sun Wei, Wang Yijian, Zhao Zhibin, Cui Yingrui and Li Caian, Central Laboratory, Third Military Medical College, Chongqing, 630038.

Sep-Pak C₁₈ column was used as pre-column in amino acid analysis. It was found that this pretreatment was effective in removing pigments from amino acid hydrolysates and its adsorption power to zinc was strong. The pretreatment has no adverse effects on the determination of amino acid content in biological samples.

离子色谱法(紫外检测)测定肉制品中的硝酸根和亚硝酸根*

朱 岩

(浙江省测试技术研究所,杭州,310012)

岳伟民 朱利中

(杭州大学化学系,310028)

硝酸盐或亚硝酸盐作为食品发色剂,在腌制肉制品工业中得到广泛应用。由于亚硝酸盐能引起急性中毒,并能形成强烈的致癌作用物亚硝胺类,因此食品卫生要求控制硝酸盐和亚硝酸盐的含量。一般硝酸盐含量小于 500mg/kg,亚硝酸盐不得超过 50mg/kg。

对 NO₂⁻、NO₃⁻ 的分析,有多种分析方法:普通的化学方法操作复杂,费时^[1];近来有人报道用离子色谱法测定 NO₂⁻、NO₃⁻^[2,3]。虽然该方法快速、简便,但由于腌制品中的 Cl⁻ 含量很高,用一般的电导检测十分困难,NO₂⁻、NO₃⁻ 在紫外 210nm 有强烈吸收,而 Cl⁻ 的紫外吸收很小,因此我们以紫外检测法对 NO₂⁻、NO₃⁻ 进行测定。

实验部分

(一)仪器 实验是用 Dionex HPIC-AG4. HPIC-AS4 保护柱和分离柱装在 Varian 液相色谱仪

上,配以 VISTA100 紫外检测器,双笔记录仪对数据进行记录,岛津 UV-3000 紫外可见分光光度计对 Cl⁻、NO₂⁻、NO₃⁻ 进行紫外扫描。

(二)试剂 Cl⁻、NO₂⁻、NO₃⁻ 由分析纯的 NaCl、NaNO₂、NaNO₃ 和二次去离子水配制,流动相由分析纯的 NaHCO₃、Na₂CO₃ 和二次去离子水配制。

(三)色谱条件 参考文献^[2,3]我们选用流动相为 1mmol·L⁻¹ NaHCO₃/1mmol·L⁻¹ Na₂CO₃,流速为 2.0ml/min,紫外检测波长为 210nm,检测量程为 0.005AU,进样体积 10μl。

结果与讨论

(一)紫外检测波长的选择

在 2ml/min 的 1mmol·L⁻¹NaHCO₃/1mmol·L⁻¹Na₂CO₃ 淋洗的条件下,Cl⁻、NO₂⁻、NO₃⁻ 的保留时间分别为 1.10、1.70、2.60min,由于 Cl⁻ 和 NO₂⁻ 的峰