

经验交流

中国梨木虱分泌物中氨基酸的分离与分析*

刘敬兰 周鸿娟 周清泽 李大乱 张翠瞳 徐国良

(河北师范大学实验中心 石家庄 050016) (河北省农林科学院石家庄果树研究所 石家庄 050061)

提 要 利用离子交换色谱法分离了中国梨木虱分泌物中的氨基酸;利用毛细管气相色谱法对梨木虱分泌物中氨基酸的三氟乙酰丁酯衍生物进行了分析。用标准样对照定性,内标法定量。分泌物中共检出 13 种氨基酸。

关键词 毛细管气相色谱法,中国梨木虱,分泌物,氨基酸

分类号 O658

1 前言

中国梨木虱(*Psylla Chinesis Yang et Li*)是危害梨园的害虫,其分泌的黏液往往滴落到叶和果上,使叶腐蚀、霉变,早期脱落,果实被污染,影响果树生长。中国梨木虱喜欢隐藏在其分泌物内^[1]。目前生产上应用的绝大多数农药(包括复配农药)不能破除梨木虱分泌物将其杀死,因此对梨木虱的防治效果不理想。研究分泌物的性质、组成及其破除方法,已成为解决梨木虱防治问题的重要部分。迄今为止,有关梨木虱分泌物的性质、组成的分析,国内外还未见有文献报道。本文利用离子交换色谱法分离了梨木虱分泌物中的氨基酸,利用毛细管气相色谱法分析和测定了氨基酸的三氟乙酰丁酯衍生物。通过与标准样对照来定性,用内标法定量。本文共检测出 13 种氨基酸。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

仪器 日本岛津 GC-16A 气相色谱仪,带 C-R3A 数据处理机;氢火焰离子化检测器。

试剂 17 种标准氨基酸(上海康达氨基酸厂);苯乙烯型强酸性阳离子交换树脂(上海医用核子仪器厂);3 mol/L 盐酸-正丁醇溶液;三氟乙酸酐;CaCl₂干燥的氯仿;梨木虱分泌液(河北省农林科学院石家庄果树研究所采集)。

2.2 色谱条件

OV-101 交联毛细管柱(25 m×0.25 mm i. d.);程序升温:起始温度 100℃,保持 3 min,以 10℃/min 的速率升至 250℃,保持 16 min;汽化室温度 270℃;FID 温度 270℃。载气(N₂):流速 30 mL/min,尾

吹 40 mL/min,分流比 50:1。

2.3 实验步骤

2.3.1 梨木虱分泌物中氨基酸的柱色谱分离

将苯乙烯型强酸性阳离子交换树脂用 1 mol/L 盐酸洗至酸性,用蒸馏水洗去过量的盐酸至无 Cl⁻,湿法装柱(16 cm×2.5 cm)。称取分泌液 2.2379 g,用少量水溶解后,加入 Pb(Ac)₂ 溶液以沉淀蛋白,离心 5 min(除去固体物质)。取溶液部分进离子交换树脂柱。先用蒸馏水洗脱样品中的糖,并用 Molish 反应检验,洗脱至不再出现紫色环。再用 1 mol/L 的氨水洗脱氨基酸,并不断用茚三酮溶液检验,洗脱至无蓝色反应产生为止。淋洗得到的氨基酸溶液在 60℃ 水浴中减压浓缩至干,得到氨基酸粗品 0.1728 g,占梨木虱分泌液质量的 7.35%。

2.3.2 标准氨基酸的衍生化

准确称取各标准氨基酸 5.00 mg,用 0.1 mol/L 的盐酸溶解,配制成质量浓度为 1.00 g/L 的各标准溶液。配制相同质量浓度的赖氨酸溶液作内标溶液。

准确吸取 1 mL 标准氨基酸溶液置于衍生化试管中,加入等量的赖氨酸标准溶液,按参考文献[2]方法进行酯化和酰基化处理后,取氨基酸衍生物的氯仿溶液 1 μL 进样进行色谱分析。

2.3.3 分泌物中氨基酸的衍生化

将由离子交换柱分离得到的氨基酸粗品移入 5 mL 比色管中,用 0.1 mol/L 的盐酸溶解定容,得到质量浓度为 34.56 g/L 的样品氨基酸溶液。

准确吸取样品氨基酸溶液 2 mL 于衍生化试管中,加入 1 mL 内标溶液,在 60℃ 水浴中用氮气吹干后,按 2.3.2 节进行处理,得样品氨基酸衍生物的氯仿溶液,取 1 μL 进行色谱分析。

* 河北省自然科学基金资助项目
本文收稿日期:1998-01-10,修回日期:1998-04-16

表 1 标准氨基酸的气相色谱分析结果
Table 1 Results of standard amino acids by GC analysis

峰号 No	氨基酸 Amino acid	t_R (min)	f_w	加入值 Added (mg)	实测值 Found (mg)	SD	CV (%)
1	丙氨酸 (Ala)	11.84	0.65	5.00	4.8824	0.130	2.67
2	甘氨酸 (Gly)	12.02	1.13	5.01	4.7945	0.148	3.09
3	苏氨酸 (Thr)	12.90	1.13	5.01	4.9289	0.063	1.29
4	丝氨酸 (Ser)	13.04	0.82	5.02	4.7681	0.090	1.89
5	缬氨酸 (Val)	13.60	1.60	5.01	4.9928	0.107	0.53
6	异亮氨酸 (Ile)	14.50	1.24	5.02	5.0184	0.035	0.70
7	亮氨酸 (Leu)	14.75	1.65	5.03	4.9742	0.101	2.03
8	半胱氨酸 (Cys)	15.27	1.54	5.00	4.8984	0.091	1.85
9	脯氨酸 (Pro)	16.17	0.65	5.01	4.9400	0.106	2.14
10	羟脯氨酸 (Hyp)	16.30	0.64	4.99	4.8302	0.108	2.24
11	蛋氨酸 (Met)	17.63	2.47	4.99	4.8464	0.096	1.98
12	天冬氨酸 (Asp)	18.65	0.92	5.01	4.9847	0.035	0.69
13	苯丙氨酸 (Phe)	18.95	0.64	4.98	4.9388	0.114	2.32
14	赖氨酸 (Lys)	19.90	1				
15	谷氨酸 (Glu)	20.11	1.29	4.98	4.8947	0.090	1.84
16	组氨酸 (His)	22.80	5.23	5.02	5.1338	0.261	5.09

3 结果与讨论

3.1 标准氨基酸的分析

标准氨基酸的测定结果如表 1 所示。由表 1 可见,本方法的重现性较好。

3.2 样品氨基酸的分析

(1)定性分析:与标准氨基酸保留时间对照定性,样品氨基酸衍生物色谱图如图 1 所示。

由图 1 可以看出,样品中检出了 13 种氨基酸。其中谷氨酸质量分数最高,其次是半胱氨酸,其它氨基酸都很低。除氨基酸外,谱图上仍有一些较大的峰,我们认为,这些峰是除氨基酸以外的其它有机酸。这些有机酸在通过离子交换色谱柱时,随氨基酸一起被氨水洗脱下来,又一起进行了衍生化反应,因此也就随氨基酸一起被分析检测出来。通过标样对照得知,15 号峰为乳酸(lactic acid)峰,其它有机酸有待于进一步鉴定。

(2)样品氨基酸的定量测定:据分析,样品中不含赖氨酸,所以选定以赖氨酸为内标物。定量分析结果见表 2。

由表 2 数据计算出梨木虱分泌物中氨基酸质量分数占柱后氨基酸粗品的 7.94%,占分泌物总量的 0.58%。

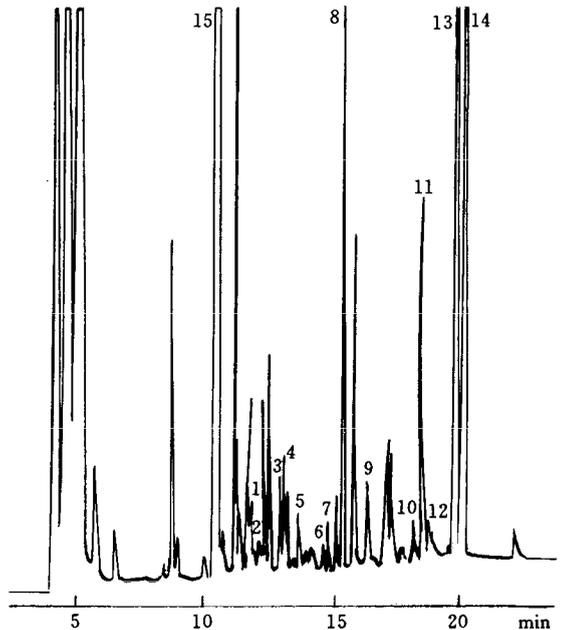


图 1 样品氨基酸及乳酸衍生物气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatogram of amino acid and lactic acid derivatives in sample

1. Ala, 2. Gly, 3. Thr, 4. Ser, 5. Val, 6. Ile, 7. Leu, 8. Cys, 9. Pro, 10. Met, 11. Asp, 12. Phe, 13. Lys (I S), 14. Glu, 15. lactic acid.

表 2 样品中氨基酸的分析结果
Table 2 Results of amino acids in sample by GC

峰号 No	氨基酸 Amino acid	t_R (min)	测得值(mg) Found	$SD \times 100$	CV (%)	相对质量分数(%) Relative mass fraction
1	丙氨酸 (Ala)	11.82	0.0837	0.225	2.69	1.525
2	甘氨酸 (Gly)	12.07	0.1181	0.336	2.82	2.152
3	苏氨酸 (Thr)	12.87	0.1129	0.306	2.71	2.057
4	丝氨酸 (Ser)	12.99	0.1269	0.244	1.92	2.312
5	缬氨酸 (Val)	13.56	0.1052	0.304	2.89	1.917
6	异亮氨酸 (Ile)	14.48	0.0928	0.163	1.75	1.691
7	亮氨酸 (Leu)	14.74	0.1136	0.469	4.13	2.070
8	半胱氨酸 (Cys)	15.21	1.2413	1.217	0.98	22.02
9	脯氨酸 (Pro)	16.16	0.067	0.290	4.28	1.232
10	蛋氨酸 (Met)	17.62	0.0745	1.560	1.46	1.357
11	天冬氨酸 (Asp)	18.63	0.2030	0.603	1.38	3.700
12	苯丙氨酸 (Phe)	18.93	0.0991	0.443	4.47	1.806
13	谷氨酸 (Glu)	20.11	3.0496	5.220	1.71	55.57

参 考 文 献

- 李大乱,张翠瑾,苏海峰等. 林业科学研究,1994,7(6): 666~670
- 史景江,胡永革,岳凤岚等. 分析测试学报,1991,10(2):81~83
- 陈刚,蔡明虹,卓海通等. 色谱,1986,4(2):56~59
- Zomzely C, Marco G, Emery E. Anal Chem, 1962, 34(11):1414-1417
- Fabian V, Morval M, Szakacs M P et al. J Chromatogr, 1991,553:87-92

Separation and Analysis of Amino Acids In Secretion of *Psylla Chinesis* Yang et Li

Liu Jinglan, Zhou Hongjuan and Zhou Qingze

(*Experimental Center, Hebei Normal University, Shijiazhuang, 050016*)

Li Daluan, Zhang Cuituan and Xu Guoliang

(*Shijiazhuang Fruit tree Research Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang, 050061*)

Abstract We used ion-exchange resin column chromatography to separate amino acids in secretion of *Psylla Chinesis* Yang et Li and used capillary gas chromatography to analysis *n*-butyl-*N*-trifluoroacetyl derivatives of the amino acids. Qualitative analysis was done by comparing with the standard amino acids and quantitative analysis is by internal standard method. We determined thirteen amino acids in the secretion.

Key words capillary gas chromatography, *Psylla Chinesis* Yang et Li, secretion, amino acid