

· 研究简报 ·

厦门港浮游动物体内色氨酸的荧光法测定

张润, 郭卫东*, 郭东晖, 吴芳, 夏恩琴, 吴鼎勋

(厦门大学海洋学系, 亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 建立了海洋浮游动物体内色氨酸的荧光分析方法. 将 1 mg 左右样品置于安瓿瓶中, 加 1 mL 5.5 mol/L NaOH 为水解液, 在 110℃ 水解 20 h. 水解产物用 HCl 中和, 然后用 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液调节 pH 为 10.5, 在激发波长 225 nm, 发射波长 350 nm 处测定荧光强度. 方法线性范围 0~0.07 mg/L, 检测限为 2.5×10^{-3} mg/L, 回收率 99.5%~109.3%. 应用该方法测量了 7 种从厦门港采集的浮游动物的色氨酸含量.

关键词: 荧光法; 色氨酸; 浮游动物; 厦门港

中图分类号: Q 503

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)05-0738-03

浮游动物是海洋生态系统的一个重要组分, 它既能以浮游植物、细菌、碎屑等为食, 同时它们又是鱼类仔稚鱼和甲壳、软体动物幼体等的食物, 特别是许多名优水产品的适口饵料. 此外, 浮游动物还可通过分泌排泄、垂直移动及生物泵的作用, 参与海洋环境中有机物质的迁移循环, 因此浮游动物在海洋生态系统中起着极其重要的作用.

氨基酸是蛋白质的基本结构单位, 通常占到生物有机碳的 40%~60%, 有机氮的 42%~72%^[1], 是大多数海洋生物体内氮的主要存在形式和有机碳的重要组分. 作为一类重要的养殖饵料生物, 浮游动物体内氨基酸, 特别是必需氨基酸的含量与组成, 是评价其营养价值的一个重要指标^[2,3]. 如 Ronnestad 等(1993) 研究发现, 仔鱼开始摄食后, 氨基酸作为分解代谢的重要物质, 可能有高达 60% 的能量由氨基酸提供, 因此, 饵料中的氨基酸是早期仔稚鱼主要的营养物质来源^[4]. 色氨酸是动物生长的 8 种必需氨基酸之一^[3], 是排在赖氨酸之后的第二限制氨基酸, 动物自身不能合成, 必须从食物中摄取, 因此测定包括色氨酸在内的海洋浮游动物的氨基酸组成及其含量和比例对海洋水产养殖有重要的实用价值.

另一方面, 氨基酸是由浮游动植物形成的海洋沉降颗粒物质的重要组成部分, 约占其中有机质含量的 30%~60%, 沉降颗粒以及沉降的微体生物壳体中的氨基酸作为一种生物地球化学指标已经用于许多海区

沉降颗粒通量以及有机物来源、演化及其它环境信息的研究^[5].

在通常浮游动物和沉降颗粒物氨基酸的分析中, 都是使用 HCl 来水解蛋白质. 在酸水解条件下, 色氨酸被破坏, 所以文献报道中色氨酸的数据往往空缺^[5,6], 造成资料的不完整. 本文根据色氨酸的荧光特性, 建立了一种简便、快捷、高灵敏度的海洋浮游动物中色氨酸的定量分析方法, 并利用该方法分析了采自厦门港的 7 种浮游动物的色氨酸含量.

1 材料与方法

1.1 样品

浮游动物样品于 2004 年 3~5 月夜间在九龙江河口区以浮游生物网采集. 样品经纱绢过滤后用锡箔包装, 当场冷冻; 在实验室中经镜检分类后(表 1), 在烘箱中 60℃ 下烘 48 h, 研磨, 置于干燥器中备用.

1.2 试剂与仪器

1) 试剂 色氨酸标准储备液(50 mg/L): 用 L-色氨酸(上海生物工程技术有限公司) 配制, 4℃ 冷藏; 色氨酸标准使用液(1 mg/L): 取储备液于实验前新鲜配制; pH 缓冲溶液: 取 0.5 mol/L KH_2PO_4 与 0.5 mol/L NaOH 溶液按不同体积比混合, 得到 8 种不同缓冲溶液, pH 值范围是 9.0~12.0; 含 0.1% 淀粉的 5 mol/L NaOH 溶液(需新鲜配制); NaOH: 1 mol/L; 酚酞: 0.1%; HCl: 6 mol/L. 所用试剂均为分析纯, 所用水均为 Milli-Q 纯水.

2) 仪器 Shimadzu RF-5301 荧光分光光度计.

1.3 实验部分

1) 光谱特性

收稿日期: 2004-07-05

基金项目: 国家自然科学基金(40106007)和福建省自然科学基金(B9910004)资助

作者简介: 张润(1982-), 男, 硕士研究生.

* 通讯作者: wdguo@yanan.xmu.edu.cn

色氨酸有 2 个激发光谱峰(225 nm 和 280 nm) 和 1 个发射光谱峰(350 nm)^[7], 280 nm 激发时在 320 nm 左右出现水的拉曼峰, 对测定有干扰, 所以本研究选用灵敏度高而干扰少的 225 nm 作激发波长, 在 290~380 nm 范围扫描荧光光谱, 于 350 nm 处读取荧光强度值. 激发/发射光谱狭缝宽度设为 5 nm/10 nm, 高速扫描.

2) 实验方法

称取 1 mg 左右浮游动物样品于安瓿瓶内, 加入新鲜配制的含 0.5% 可溶性淀粉的 6.0 mol/L NaOH 溶液 1 mL, 向安瓿瓶内充纯氮气 3 min 后用酒精喷灯封口, 放入烘箱中在 110 °C 条件下水解 20 h 后, 放置于暗处冷却至室温.

水解产物转移至已加有 1.4 mL 6 mol/L HCl 的 50 mL 容量瓶中, 用 Milli-Q 水反复冲洗水解管 7~8 次, 直至完全转移为止, 其总量在 40 mL 左右, 加入 1 滴 0.1% 酚酞, 使溶液呈粉红色, 然后用 6 mol/L HCl 调至溶液无色, 再用 1 mol/L NaOH 滴至溶液呈粉红色, 此时溶液 pH 8.2. 用 Milli-Q 水定容, 摇匀. 吸取 2 mL 于 10 mL 刻度试管中, 用 pH 10.5 的缓冲液定容后摇匀. 以 225 nm 作为激发波长, 在 350 nm 处测量荧光强度.

3) 检测限和精密度

在最佳条件下, 色氨酸浓度在 0~0.07 mg/L 范围内有良好的线性关系. 方法的检测限(LOD = 3σ/K, K 为工作曲线斜率)为 2.5×10^{-3} mg/L, 9 次平行测定中华假磷虾和蚤状幼体样品, 其相对标准偏差(RSD)分别为 3.14% 和 1.77%.

2 结果与讨论

2.1 条件实验

1) 缓冲液 pH 的影响

色氨酸的荧光信号与缓冲液的 pH 值有密切关系^[8]. 本实验用缓冲溶液调节浓度为 0.03 mg/L 的色氨酸标准溶液的 pH 值在 9.0~12.0 之间, 其相对荧光强度见图 1, 在 pH 10~11 时, 色氨酸荧光信号强度较强且比较稳定, 本实验选择 pH = 10.5.

2) 水解液浓度的影响

测定蛋白质中色氨酸含量时, 通常采用碱水解法. 为考察 NaOH 水解液浓度对浮游动物水解的影响, 分别向 1 mg 瘦尾胸刺水蚤样品中加入不同浓度的 NaOH 水解液 1 mL 进行水解, 水解物用 6 mol/L HCl 调 pH 至中性后, 定容至 50 mL, 取 2 mL, 用 pH 为 10.5 的缓冲液定容至 5 mL. 实验结果表明, NaOH

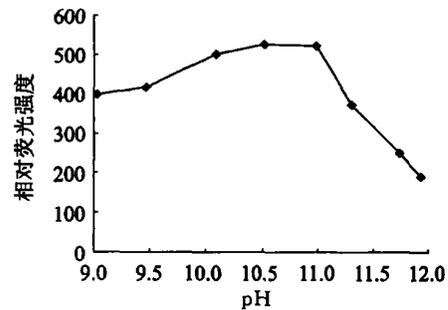


图 1 pH 对荧光强度的影响

Fig. 1 Effect of pH on fluorescence intensity

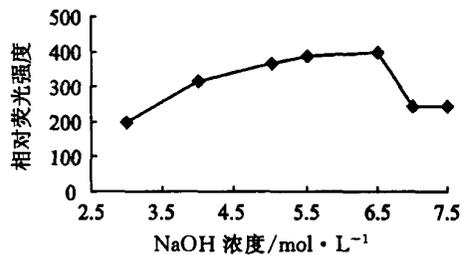


图 2 水解液浓度对荧光强度的影响

Fig. 2 Effect of concentration of hydrolyzing solution on fluorescence intensity

浓度在 5.0~6.5 mol/L 范围内比较适宜(图 2), 本实验选用 6.0 mol/L.

2.2 样品分析

按上述方法测定了从厦门港采集的 7 种浮游动物中的色氨酸含量, 结果列在表 1.

取 6 份瘦尾胸刺水蚤样品, 取样量在 1 mg 左右,

表 1 厦门港浮游动物中色氨酸的含量(干质量)

Tab. 1 Determination of tryptophan in zooplankton from Xiamen Bay (dry mass)

样品种类	名称	色氨酸含量 / mg · g ⁻¹
桡足类	瘦尾胸刺水蚤 (<i>Centropages tenuiremis</i>)	7 070
端足类	中华螺赢蜚 (<i>Corophium sinensis</i>)	2 890
磷虾类	中华假磷虾 (<i>Pseudeuphausia sinica</i>)	4 960
长尾类	日本毛虾 (<i>Acetes japonicus</i>) 的 仔虾(postlarva)	6 770
短尾类	蚤状幼体(zoea)	1 850
	大眼幼体(megalopa)	5 510
毛颚类	百陶箭虫 (<i>Sagitta bedoti</i>)	8 750

表 2 回收率试验
Tab. 2 Recovery test

样品名称	样品含量/ μg	加标量/ μg	加标后测得量/ μg	回收量/ μg	回收率/%
瘦尾胸刺水蚤	0.706	1.000	1.735	1.029	102.9
百陶箭虫	1.159	1.000	2.205	1.045	104.5
短尾类蚤状幼体	0.021	0.075	0.103	0.082	109.3
		0.200	0.220	0.303	99.5

按上述水解法处理, 仪器条件同上, 6 次测定结果的相对标准偏差为 3.35%, 表明该方法的重现性较好。

对瘦尾胸刺水蚤、百陶箭虫和短尾类蚤状幼体的水解液进行加标回收实验, 测定结果见表 2, 回收率为 99.5%~109.3%, 回收实验给出满意的实验结果。

2.3 讨论

常见的色氨酸分析方法有比色法、氨基酸自动分析仪、高效液相色谱、离子交换层析等方法^[9]。比色法要求的设备简单, 但操作比较烦琐。而氨基酸自动分析仪和高效液相色谱等方法存在样品分析时间长、操作步骤多、需要消耗有机试剂等缺点。与这些方法相比, 荧光法具有简便、灵敏、易掌握等优点, 结果重现性好, 可实现浮游动物中色氨酸含量的快速分析。

参考文献:

[1] Lee C, Cronin C. The vertical flux of particulate organic nitrogen in the sea: decomposition of amino acids in the Peru upwelling area and the equatorial Atlantic [J]. J. Mar. Res., 1982, 40: 227-251.

[2] 刘镜恪. 海水仔稚鱼早期阶段氨基酸的营养生理研究进展 [J]. 海洋水产研究, 2003, 24(1): 75-79.

[3] 韩阿寿, 梁亚全, 高淳仁, 等. 斑节对虾的精氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸的需求量研究 [J]. 中国水产科学, 1995, 2(2): 7-14.

[4] Ronnestad I, Naas K E. Routine metabolism in Atlantic halibut at first feeding a first step towards an energetic model [A]. Physiology and Biochemistry of Marine Fish Larval Development [C]. Bergen: University of Bergen, 1993. 279-284.

[5] 徐鲁强, 陈建芳, 唐运干, 等. 南海北部沉降颗粒氨基酸通量及生物地球化学意义 [J]. 海洋学报, 1997, 19(2): 57-64.

[6] 刘承松, 陈清潮, 吴云华. 几种海洋浮游动物生化成份的分析 [J]. 热带海洋, 1982, 1(2): 170-175.

[7] 夏恩琴, 郭卫东, 吴芳, 等. 海水溶解色氨酸的荧光分析 [J]. 台湾海峡, 2004, 23(3): 274-279.

[8] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等. 荧光分析法 (第 2 版) [M]. 北京: 科学出版社, 1991. 495

[9] 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.

Measurement of the Content of Tryptophan for Zooplankton from Xiamen Harbour with Fluorescence Method

ZHANG Run, GUO Weirong*, GUO Donghui, WU Fang, XIA Erqin, WU Dingxun
(Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A sensitive method for rapid determination of tryptophan contents in zooplankton samples by spectrofluorimetry was proposed. Seven zooplankton samples were collected from the Jiulong River Estuary of Xiamen Harbour at night by plankton net from March 2004 to May 2004. Each single species were picked out under microscope at the laboratory. They were immediately dried to constant weight at 60°C for 48 h and were grinded into powder before analysis. 1 mg of zooplankton sample was placed into the ampoule bottle for hydrolysis. 1 mL of solution of 5.5 mol/L NaOH containing 0.5% soluble starch was added as hydrolytic solution. Hydrolyzate was neutralized with 6mol/L after hydrolysis at 110°C for 20 h. And then it was adjusted to pH=10.5 with the buffer KH_2PO_4 -NaOH. The fluorescence intensity was determined at excitation/emission wavelength 225 nm/350 nm. The linear range of calibration graph was 0~0.07 mg/L. The detection limit was 2.5×10^{-3} mg/L. The recovery rate of sample addition experiments was 99.5%~109.3%. The contents of tryptophan in seven zooplankton samples were $8750 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (*Sagitta bedoti*), $7070 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (*Centropages tenuiremis*), $2890 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (*Corophium sinensis*), $4960 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (*Pseudeuphausia sinica*), $6770 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (postlarva of *Acetes japonicus*), $1850 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (zoaea of Brachyura) and $5510 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (megalopa of Brachyura), respectively.

Key words: fluorescence method; tryptophan; zooplankton; Xiamen Harbour