

氨基酸分析前处理技术的改进

——直接中和水解液的研究

张 明 胡传璞 卢亦军

(吉林省农科院大豆研究所)

摘 要

本文叙述了标准蛋白水解分析前处理的一种改进方法。在水解液中直接加入中和溶液使待测样品的pH值符合分析要求,然后,用氨基酸分析仪分析。实验结果表明:本法操作简便、峰保留时间稳定、分辨率良好、满足分析要求。与常规处理方法比较,省去了加热(或冷冻)、减压蒸干等步骤,简化了仪器设备,缩短了前处理时间,并且,氨基酸的回收率也有所提高。

引 言

在利用氨基酸分析仪进行样品测定时,所遇到的困难之一,就是将水解液浓缩蒸干的去酸过程。在这一过程中,不仅需要必要的设备和苛刻的条件,而且,水解后产生的游离氨基酸,在蒸干时,可能会相互反应或被氧化,使得某些氨基酸的回收率受到一定的影响。

通过实验表明,上述问题可用氢氧化钠溶液中和水解液的方法来解决。该方法在实际应用中,得到了令人满意的结果。

本文将从理论到实际应用上介绍对该项实验的研究结果。

原 理

在一定条件下,洗脱液的pH值和钠离子强度(以下简称为 Na^+)与氨基酸从柱上洗脱的速度和氨基酸峰的保留时间有关。当洗脱液的pH值降低时,氨基酸正电性增强,它和树脂结合的越牢固,越不容易洗脱,使保留时间延后;当洗脱液中 Na^+ 增强时,有更多的钠阳离子与带正电荷的氨基酸进行交换,使它们的洗脱速度加快,保留时间提前。根据上述关系,笔者摸索了直接中和水解液上机测定的方法。

当加碱中和水解液后,上机液中钠离子浓度较大,影响了氨基酸与离子交换树脂的结合,使洗脱加速,保留时间提前,这一因素的影响,可采用降低上机液pH值的方法抵消,使保留时间恢复正常。

实 验 方 法

(一)材料和试剂:

1. 蛋白含量为5—100%的各种样品。

2. 中和液的构成:

试剂级别至少为分析纯,配制用水为二次蒸馏后的去离子水。

溶液代号	柠檬酸 (克/升)	氢氧化钠 (克/升)
A	6.3	23.6
B	6.3	11.6

(二) 操作步骤:

1. 样品水解:

根据样品中蛋白质含量, 称取适量的样品加酸水解并定容(具体步骤见氨基酸分析仪使用说明书)。

2. 水解液的中和:

取定容后的水解液 1 毫升滴入 10 毫升烧杯中(烧杯底部浸在冰水中)。然后, 加入 4 毫升中和液, 此时总体积为 5 毫升(体积变化极小, 可忽略)。

3. 上机分析:

将中和后的液体用定量滤纸过滤或离心后上机分析。

蛋白质含量、称样量、加酸量、

表 1 定容体积、中和液量关系

样品蛋白质含量 (%)	称样量 (mg)	加酸量 6 NHCl (ml)	定容体积 (ml)	加中和液量 (ml)
5~20	60	10	25	(A液) 4
20~40	30	10	25	(A液) 4
40~60	30	10	50	(B液) 4
60~100	20	10	50	(B液) 4

注: 上机液的 pH 值的参考值如下:

用 A 液中和后的上机液的 pH 值为 1.6 左右;

用 B 液中和后的上机液的 pH 值为 1.8 左右。

(三) 样品中蛋白质含量、称样量、

加酸量及定容体积, 加入中和液量的关系 (见表 1)

结 果

笔者用此方法对大豆、玉米、小麦、谷子、松叶、花粉、人参、鱼粉、食品、饮料和药品等十几个种类的 2,500 多份样品进行了测试分析, 实用效果良好。用此方法所测色谱参数结果见表 2。

表 2 同一大豆样品各氨基酸保留时间及峰面积变异系数

氨基酸名称	保 留 时 间			峰 面 积		
	测定次数	标准差 Sn-1	变异系数 CV %	测定次数	标准差 Sn-1	变异系数 CV %
ASP	10	0.022	0.23	10	22.98	1.03
THR	10	0.018	0.18	10	122.10	1.22
SER	10	0.018	0.16	10	15.46	1.07
GLU	10	0.033	0.27	10	43.76	1.31
PRO	10	0.042	0.32	10	26.62	1.19
GLY	10	0.048	0.30	10	21.19	1.21
ALA	10	0.064	0.36	10	18.31	1.28
VAL	10	0.021	0.09	10	16.93	1.30
MET	10	0.026	0.11	10	62.61	1.99
ILE	10	0.028	0.10	10	112.20	1.23
LEU	10	0.026	0.09	10	20.53	1.21
TYR	10	0.023	0.08	10	135.90	2.54
PHE	10	0.024	0.08	10	86.37	1.34
LYS	10	0.026	0.08	10	21.43	1.28
HIS	10	0.030	0.08	10	86.57	1.53
ARG	10	0.029	0.06	10	99.01	0.99

注: 仪器型号: 日本日立公司 835-50型 柱: 2.6×150mm 流速: 0.225ml/分 0.3ml/分

表 3

不同小麦样品各氨基酸保留时间的变异系数

氨基酸 名 称	样 品 总 编 号								测定 次数 n	平均值 $\bar{X}$	标准 差 Sn-1	变异系数 CV%
	549	551	553	555	557	559	561	563				
ASP	9.46	9.53	9.42	9.53	9.41	9.42	9.46	9.46	8	9.46	0.047	0.497
THR	10.33	10.41	10.32	10.42	10.30	10.30	10.36	10.33	8	10.35	0.047	0.45
SER	11.08	11.13	11.04	11.14	11.02	11.05	11.09	11.06	8	11.07	0.043	0.39
GLU	12.05	12.13	12.04	12.16	12.04	12.01	12.09	12.05	8	12.07	0.051	0.42
PRO	13.08	13.18	13.10	13.22	13.12	13.05	13.17	13.08	8	13.13	0.059	0.045
GLV	16.30	16.40	16.29	16.45	16.28	16.26	16.37	16.30	8	16.33	0.066	0.41
ALA	17.97	18.10	17.96	18.18	17.94	17.89	18.08	17.96	8	18.01	0.098	0.55
CYS	20.94	20.90	20.86	20.90	20.90	20.92	20.90	20.90	8	20.90	0.023	0.11
VAL	21.86	21.82	21.78	21.84	21.80	21.80	21.82	21.78	8	21.81	0.028	0.13
MET	23.52	23.46	23.41	23.46	23.42	23.42	23.46	23.41	8	23.45	0.038	0.16
ILE	25.97	25.89	25.84	25.89	25.84	25.85	25.89	25.84	8	25.88	0.045	0.17
LEU	27.32	27.21	27.16	27.21	27.16	27.17	27.21	27.16	8	27.20	0.054	0.20
TYR	29.17	29.10	29.09	29.10	29.08	29.08	29.12	29.80	8	29.10	0.031	0.11
PHE	30.72	30.64	30.61	30.64	30.62	30.61	30.64	30.60	8	30.64	0.038	0.12
LYS	34.82	34.78	34.81	34.84	34.82	34.81	34.81	34.82	8	34.81	0.017	0.046
HIS	39.21	39.20	39.24	39.29	39.25	39.24	39.25	39.26	8	39.24	0.028	0.072
ARG	47.36	47.38	47.41	47.52	47.48	47.49	47.45	47.50	8	47.45	0.059	0.125

注：表 3 中的保留时间，为测定十六个不同小麦后，每隔一个样品选取各氨基酸的保留时间。

我们分别采用中和水解液法和 50℃ 减压蒸干法处理了 9 个不同的大豆样品，测出氨基酸总值，见表 4。

同一样品不同处理方法的氨基酸测定总值比较

表 4

(单位：氨基酸克/百克样)

方 法	氨基酸测定总值 总编号	225	226	227	228	230	231	232	233	234
中和水解液法		41.64	38.22	42.05	41.47	42.21	42.63	44.23	42.79	40.28
减压蒸干法		41.05	37.87	41.07	39.83	39.81	41.41	42.12	40.66	38.28

根据表 4 的数据，我们做了 T 检验， $t = 6.108$ ， $t > t_{0.001}$ ($t_{0.001} = 5.041$)，即 $P < 0.001$ ，说明两种方法处理后，测出的氨基酸总值有非常显著的差异，中和水解液法测定的值，平均比减压蒸干法高 3.73%。

讨 论

从以上的结果可以看出，采用中和水解液法，各氨基酸出峰时间稳定，分离度良好，能满足标准蛋白水解分析的要求，与改进前的方法比较，完全省去减压、加热（或冷冻）、蒸发、再定容等等繁琐的步骤，从而使所需的仪器设备简单化了。而且，节省了人力、物力和时间，减少了去酸时游离氨基酸间的反应和被氧化的可能性，使得氨基酸的回收率明显的提高。因而，此方法对工作条件尚未完善的中、小实验室尤为适用。

在使用此方法时, 应该注意的是: 由于不同厂家或批号的试剂质量不同, 中和后的上机液的pH值可能会有很大出入, 这对分析的准确性影响很大。因此, 对于同一批试剂所配溶液的酸碱性要进行适当调整。

参 考 文 献

1. 835—50型氨基酸分析仪使用说明。
2. <关于氨基酸分析技术最新评述与发展>, 中国农科院综合分析室(1983)。
3. <氨基酸分析技术>, 北京理化测试技术学会(1984)。

AN IMPROVED METHOD FOR THE PRETREATMENT OF AMINO ACID ANALYSIS: A DIRECT-NEUTRALIZATION METHOD OF THE HYDROLYTIC PROTEIN

Zhang Ming Hu Chuanpu Lu Yijun

(Soybean Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences)

ABSTRACT

An improved method was described for pretreatment of standard protein hydrolyzate analysis. Adding directly the neutralizing-liquid into the hydrolysate made that the pH value of the Sample waited to analyse accorded with the demand of analysis. Then the sample was analysed with the Amino Acid Analyzer. Experiment result indicated that using this method the peak-retention-time was stabilized, the resolution was full and the analysis demands for the standard protein hydrolyzate were satisfied. Being compared with conventional pretreatment method, the processes of heating(or freezing)and evaporating to dryness in vac evaporator were left out in this method. Besides this, the method was simple, the time was saved and the recovery of amino acids was increased distinctly.