

含硫氨基酸样品前处理—过甲酸氧化水解法

A300 氨基酸分析仪

原理

饲料中的含硫氨基酸(胱氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸)用过甲酸氧化并经盐酸水解生成磺基丙氨酸和蛋氨酸磺,然后用 A300 全自动氨基酸分析仪经离子交换和茚三酮柱后衍生,通过 570nm 可见光光度检测。

试剂

1. 过甲酸溶液的配制

常规过甲酸溶液: 30%过氧化氢与 88%甲酸按体积比 1: 9 混合,于室温下放置 1h,置冰水浴中冷却 30min,此试剂需现用现配,不可长期放置。

浓缩料用过甲酸溶液: 将常规过甲酸溶液中按 3mg/mL 加入硝酸银即可。此溶液适用于氯化钠含量小于 3% 的浓缩料。

当样品氯化钠含量大于 3%时,氧化剂中硝酸银浓度应 $\geq 1.454 \cdot C_N \cdot m$,其中 C_N 为样品中氯化钠含量 (mg/mL), m 为样品质量 (mg)

2. 氧化终止剂的配制

48%氢溴酸

偏重亚硫酸钠溶液: 33.6 g 偏重亚硫酸钠加超纯水定容至 100mL。

3. 酸解剂的配制

6.0 mol/L 盐酸溶液:将优级纯盐酸与超纯水按 1:1(V/V)混合。

6.8 mol/L 盐酸溶液:将优级纯盐酸 1133 mL 用超纯水稀释至 2000 mL。

7.5 mol/L 氢氧化钠溶液:取优级纯氢氧化钠 30 g,加水溶解并定容至 100 mL。

前处理步骤

取具代表性的饲料样品,用四分法缩减分取 25 g 左右,粉碎并过 0.45 mm 孔径(40 目)筛,充分混匀后装入磨口瓶中备用。

氧化和水解:称取含蛋白质 7.5~25mg 的试样双份(精确至 0.0001g,样品量不超过 75 mg),置于旋转蒸发器 20 mL 浓缩瓶或浓缩管中,于冰水浴中冷却 30min 后加入已经冷却的过甲酸溶 2 mL,加液时需将样品全部润湿,但不要摇动,盖好瓶塞,连同冰浴一起置于 0 °C 冰箱中,反应 16 h。

3.以下步骤依使用不同的氧化终止剂而不同:

若以氢溴酸为终止剂

于各管中加入氢溴酸 0.3 mL, 振摇, 放回冰浴, 静置 30 min, 然后移到旋转蒸发器或浓缩器上, 在 60℃、低于 3.3KPa (25mm Hg 柱)下浓缩至干。用盐酸溶液约 15m L 将残渣定量转移到 20 mL 安瓿瓶中, 封口, 置恒温箱中 $110\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下水解 22~24 h。也可用 6.0 mol/L 盐酸溶液约 25mL 将残渣转移到 50 mL 消煮管中, 于水解炉中 $110\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下回流水解 22~24 h。

取出安瓿瓶或水解管, 冷却, 用水将内容物定量地转移至 50 mL 容量瓶中, 定容。充分混匀, 过滤, 取 1~2 mL 滤液, 置旋转蒸发器或浓缩器中, 在低于 50℃ 的条件下, 减压蒸发至干。加少许超纯水重复蒸干 2~3 次。准确加入一定体积 (2~5 mL) 的样品稀释液 (A300 氨基酸分析仪配套试剂) 振摇, 充分溶解后离心, 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜置于样品瓶中待测。

若以偏重亚硫酸钠为终止剂

于样品氧化液中加入偏重亚硫酸钠溶液 0.5 mL, 充分摇匀后, 直接加入盐酸溶液 17.5 mL, 置 $110\pm 3^{\circ}\text{C}$ 水解 22~24 h。取出水解管, 冷却, 用水将内容物转移到 50 mL 容量瓶中, 用氢氧化钠溶液中和至 pH 约 2.2, 样品稀释液定容, 离心, 取上清液过 0.22 μm 滤膜置于样品瓶中待测。

氨基酸分析受上机样品液中 Na^+ 浓度影响, 色谱峰出峰时间漂移过大, 则需先将水解液定容过滤, 而后取 2~5mL 滤液, 于 50℃ 下, 减压蒸发至约 0.5 mL (切勿蒸干), 用样品稀释液将其转移至 10 mL 容量瓶中, 加氢氧化钠溶液调至 pH=2.2, 样品稀释液定容。混匀, 离心, 取上清液过 0.22 μm 滤膜置于样品瓶中待测。

浓缩料测定首先按 GB 6439 测定其 NaCl 含量。样品处理步骤同上, 只是氧化剂不同。