

# 大豆籽粒含硫氨基酸测定方法试验研究\*

张 明 衣翠文 胡传璞 纪 锋

(吉林省农业科学院大豆研究所)

常碧影

(中国农科院综合分析室)

## 摘 要

作者以氨基酸分析仪为手段,从国内外应用最广泛又较简便的分析含硫氨基酸的方法入手,结合国内实验室的条件研究并提出了大豆籽粒中含硫氨基酸的测定方法。

**关键词** 含硫氨基酸

含硫氨基酸在人与动物的生长发育过程中起着重要的作用,含硫氨基酸的代谢反常往往是一些疾病的重要表徵。但是含硫氨基酸、胱氨酸、蛋氨酸在蛋白质较丰富的大豆籽粒中的含量却较低,特别是蛋氨酸常常被认为是第一限制性氨基酸。因此,在临床、营养、动物科学与农业科学中含硫氨基酸的准确测定有着重要的意义。然而,由于此等含硫氨基酸有许多与其它氨基酸不同的性质,它们无论在游离态还是在肽键合的情况下,都不甚稳定,易于氧化还原,易于进行烷基化反应和其它反应。胱氨酸在酸水解中还原分解、消旋,并与半胱氨酸都易于与色氨酸、碳水化合物以及其它共存物质反应,因此,在常规酸水解后,用离子交换色谱分离测定不能得到满意的结果。而且,目前国内外所使用的含硫氨基酸测定方法,如:微生物法、酶电极法、化学法(总含硫量法和硝普盐法)、气谱法、液谱法、薄层层析法以及近红外反射法又大多有一定的局限性,不是手续繁杂,就是仪器昂贵,有时还需进行大量的校正,因此,尚不能被广泛采用。多年来,国内外学者和部门一直在不懈的努力,以求研究出一种能够被广泛采用的测定含硫氨基酸的方法。

目前,国内外普遍采用的测定含硫氨基酸的方法是过甲酸氧化法,其基本原理是:先将含有含硫氨基酸的蛋白质材料用过甲酸氧化,然后,用 6M 盐酸于 110℃ 下水解,此时,

\* 本实验为中国农科院主持饲料含硫氨基酸测定标准一部分  
国家自然科学基金资助项目  
本文于 1992 年 5 月 4 日收到。  
This paper was received on May 4, 1992.

胱氨酸与半胱氨酸分别转化为磺基丙氨酸,蛋氨酸转化为甲硫氨酸砒,由于这些衍生物在酸性介质中能较稳定的存在,故可以对其进行较准确的测定。

本研究就是在其研究基础上,以国内实际工作条件出发,进一步确定影响测定方法精密密度、可靠性的一些关键性试验条件,探讨出测定大豆籽粒中含硫氨基酸的方法。

## 材 料 与 方 法

### (一)材料

1. 吉林 18 号大豆品种(吉林省农科院大豆所提供)
2. 脱脂豆粉(中国农科院畜牧所提供)
3. 磺基丙氨酸 Sigma Chemical Company
4. 甲硫氨酸砒 WAKO Chemical Industries. LTD
5. 过甲酸试剂 将 30% 的过氧化氢(分析纯)与 88% 的甲酸(分析纯)按 1 : 9 比例混合(v/v),充分摇匀后于室温下放置 2 小时,然后放入冰箱中 0℃ 保存。

### (二)方法

1. 于水解管中称取过 60 目筛的样品约 50 毫克,加入 0℃ 左右的过甲酸试剂 2ml,放入冰箱 0℃ 下反应 16 小时。
2. 向水解管中加 0.3ml 氢溴酸,震荡后静止 30 分钟,于旋转蒸发器上 65℃ 下至干燥。
3. 向水解管中加 15ml 6M 盐酸,盖好瓶盖,置 110±1℃ 水解箱内水解 18 小时。
4. 将水解液定量转移到 50ml 容量瓶中定容至刻度,摇匀后取出 2ml 于旋转蒸发器上 65℃ 下至干燥。
5. 将残渣溶于 2ml pH=2.2 的柠檬酸缓冲液中,充分振摇,过滤后上机测定。
6. 层析及测定:用 HITACHI 835-50 氨基酸分析仪定量测定其组成。

## 结 果 与 讨 论

### 1. 方法的精密度与准确度

#### (1)标准样品回收率的测定

以磺基丙氨酸和甲硫氨酸砒配制成 2.5μmol/ml 标准溶液,取 1ml 进行氧化(氧化后分别在 65℃ 和 35℃ 下蒸干),其它步骤同上,测得其回收率:

表 1 标准样品回收率的测定

	测定次数	平均回收率		变异系数	
		65℃	35℃	65℃	35℃
磺基丙氨酸	6	99.98	99.99	2.14	2.28
甲硫氨酸砒	6	97.35	97.30	1.81	1.51

#### (2)样品回收率的测定

准确称取 40mg 样品加入磺基丙氨酸和甲硫氨酸磺标样,按上述样品处理方法测定回收率,计算公式如下:

回收率= 
$$\frac{(\text{样品} + \text{标准})\text{测定值} - (\text{样品})\text{测定值}}{(\text{标准})\text{加入值}} \times 100\%$$

表 2 样品回收率的测定

样 品	样 品 号	样 重 (mg)	标 样 (ml)	测 定 值 (μg)		回 收 率 (%)	
				CYS	MET	CYS	MET
标 样 吉 林 18 号 脱 脂 豆 粉	1		1	302	360		
	2		1	290	350		
	3	40	0	254	223		
	4	40	0	237	212		
	5	40	1	549	570		
	6	40	1	530	550	99.32	96.33
	7	40	0	290	253		
	8	40	0	270	240		
	9	40	1	570	603		
	10	40	1	580	590	99.66	98.58

注:CYS 为以胱氨酸计,MET 为以蛋氨酸计,以下表格内同。

2. 氧化剂用量的比较

氧化剂用量分别为 2ml、10ml,相应地还原剂用量分别为 0.6ml、3ml,其它步骤同上。结果如下:

表 3 不同氧化剂用量的比较(脱脂豆粉)

	n	CYS( $\bar{x}$ )	cv%	n	MET( $\bar{x}$ )	cv%
2 ml 氧化剂	6	0.69	3.24	6	0.59	2.11
10ml 氧化剂	6	0.70	1.90	6	0.59	1.99

3. 中止条件的比较

以 2ml 过甲酸氧化,分别以 0.3ml 氢溴酸和 0.34g 偏重亚硫酸钠为中止剂中和,其它步骤同上,结果如下:

表 4 不同中止条件的比较(脱脂豆粉)

	n	CYS( $\bar{x}$ )	cv%	n	MET ( $\bar{x}$ )	cv%
氢溴酸	6	0.69	2.45	6	0.59	1.46
偏重亚硫酸钠	6	0.71	1.49	6	0.58	0.99

4. 实验室间变异系数的测定

分别在三个实验室按上述方法进行操作,测定实验室间的变异系数,结果如下:

表 5 实验室间变异系数的比较

吉林农科院大豆所						中国农科院中心分析室				中国农科院畜牧所			
		CYS		MET		CYS		MET		CYS		MET	
	n	$\bar{x}$	cv%	$\bar{x}$	cv%	$\bar{x}$	cv%	$\bar{x}$	cv%	$\bar{x}$	cv%	$\bar{x}$	cv%
吉林 18 号	6	.58	1.3	.54	2.3	.57	1.5	.54	2.0				
脱脂豆粉	6	.70	1.2	.59	2.2	.72	2.4	.60	1.5	.71	1.6	.60	3.1

5. 脱脂与不脱脂处理的比较

同时称取 12 份样品,其中 6 份加丙酮脱脂,步骤如下:在水解管中加 10ml 丙酮,充分

振荡 10 分钟,静止 10 分钟后,小心吸取上清液,如此反复 3 次。将样品管在旋转蒸发器上抽干,然后,再与其它 6 份样品一起加过甲酸水解,以后步骤同上。最后,将这 6 份样品穿插在 12 份样品中测定含硫氨基酸含量,结果如下:

表 6 脱脂与不脱脂处理的比较(吉林 18 号)

	n	CYS( $\bar{x}$ )	cv%	n	MET( $\bar{x}$ )	cv%
脱脂	6	0.60	1.15	6	0.53	2.20
不脱脂	6	0.58	2.42	6	0.50	3.05

从表 1、表 2 可以见标样和样品都有较好的回收率;从表 3、表 4、表 5 可看出不同的氧化剂用量、中止条件及实验室所测结果重复性较一致;从表 6 可看出脱脂与不脱脂处理对所测结果影响不大。脱脂后结果略低,可能是由于在吸取上清液操作时带走极微小的样品颗粒所致。

小 结

过甲酸氧化—盐酸水解法测定大豆籽粒中含硫氨基酸,是一种同时测定胱氨酸与蛋氨酸的较好方法。具有较好的精密度与准确度。该方法简化了试验设备及条件,宜在国内推广使用。

参 考 文 献

[1] Schram. E. Moore. S and Bigwood. E. J. Biochem. J. 1985. 57. 33  
[2] Moore. S. 1963. J. Biol Chem 238. 235  
[3] Friedman. M Krull. L. H. and J. F Cavins J. 1970. Biochem 245 3868  
[4] 中国光学学会光谱专业委员会翻译 AOAC 分析方法手册(1985~1987 年增补篇),1988. 52 页

STUDY ON DETERMINATION METHOD OF SULFUR  
AMINO ACID IN SOYBEAN SEED

Zhang Ming Yi Cuiwen Hu Chuanpu Ji Feng

(Soybean Institute ,Jilin Academy of Agricultural Sciences)

Chang Biying

(The Comprehensive Analytical Laboratory,CAAC)

Abstract

The method of determing sulfur—containing amino acid in soybean seed by means of amino acid analyzer was studied and proposed referring to the methods usually used in the world. The method was suitable for China's laboratories.