

Cisztein-meghatározási módszerek tanulmányozása

SIMONNÉ SARKADI LÍVIA és SZERZŐ ZSOLT
Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 1983. december 2.

Az élelmiszerek minőségének fejlesztésére, a takarmányozás hatékonyságának fokozására irányuló törekvések eredményeképpen az elmúlt években mind az élelmiszeripar, mind a takarmánygyártás területén előtérbe került a fehérjék táplálkozástani minőségének megállapítása. A fehérjeminőség azt fejezi ki, hogy az elfogyasztott táplálékfehérje az adott élőlény aminosav és nitrogén igényét milyen mértékben képes kielégíteni. Meghatározására a szakirodalomban számos módszert ajánlanak. Utóbbiak elvégzéséhez elengedhetetlenül szükséges a fehérje aminosav-összetételének ismerete.

Az aminosav-összetétel meghatározására általánosan alkalmazott hidrolízis módszer a sósavas hidrolízis. Utóbbi körülményei között azonban két igen fontos aminosav, a triptofán és a cisztein is nagymértékű károsodást szenved. Meghatározásukra tehát másfajta hidrolízist kell alkalmazni.

A cisztein meghatározására legelterjedtebb módszer az oxidációt követő hidrolízis. A ciszteiből oxidációval stabil ciszteinsavat képeznek, amely már a sósavas hidrolízis alatt is állandó marad. Az oxidáció elvégzésére a számos lehetőség közül leggyakrabban a perhangyasavas eljárást alkalmazzák. Ezt a módszert Hirs és munkatársai dolgozták ki (1). A perhangyasavas eljárás az alábbi lépésekből áll:

- perhangyasavas-reagens készítés (hangyasav + hidrogénperoxid)
- oxidáció
- az oxidálószer eltávolítása
- hidrolízis
- aminosav-analízis.

A ciszteinsavvá történő konverzió 90 – 95%. A reagenskészítés szokásos módja:

1 rész 30%-os hidrogén-peroxidot és 9 rész 88%-os hangyasavat öntenek össze, majd 1 órán át szobahőmérsékleten állni hagyják. Az elkészített reagens megfelelő mennyiségét a mintához adják és 4 órán át jeges fürdőben hűtik. A reakciót hidrogén-bromid adagolásával állítják le, végül vákuum-pumpa segítségével eltávolítják az oxidálószeret és a maradékot elhidrolizálják 6 mól/dm³ sósavval.

Lee és munkatársai (2) ezt az eljárást némi módosítással hajtották végre, amennyiben 1 cm³ 30%-os hidrogén-peroxid és 19 cm³ 88%-os hangyasav elegyítésével készítették a reagenst, amelyet 2 órán át hagytak állni szobahőmérsékleten és 0 °C-ra való hűtés után adták a mintához.

Az oxidációt 0 °C-on 2,5 órán át végezték, majd hideg víz adásával állították le a reakciót és liofilizálás után hidrolizálták. Újabban a perhangyasavas oxidáció mellett elterjedően van egy újabb módszer, amely egyszerűsíti a cisztein-meghatározás eddigi fáradságos módját.

Savige és munkatársai (3) az oxidációt dimetil-szulfoxid jelenlétében sósav-és ecetsaveleggyel végezték (12 mól/dm³ sósav : jégecet : DMSO = 4 : 4 : 1) 30 percig, majd ezt követte a 6 mól/dm³ sósavas hidrolízis.

Lipton és munkatársai (4) az oxidációt DMSO : víz = 9 : 1 eleggyel végezték 20 órán át 24 °C-on, az oxidálószeret liofilizálással távolították el, majd ezt követte a 6 mól/dm³ sósavas hidrolízis.

A fenti eljárásoknál a perhangyasavas oxidáció menetéhez hasonlóan az oxidációs lépés mindig megelőzte a hidrolízist.

Spencer és munkatársai (5) e két folyamatot egy lépésben hajtották végre, azaz a mintákhoz egyidejűleg adták oxidálószerként a dimetil-szulfoxidot és hidrolizálószerként a 6 mól/dm³ sósavat.

Ezzel a módszerrel egy lépésben megoldható az oxidáció és a hidrolízis egyaránt, így lényegesen csökken a meghatározás időigénye és csökken (az előkészítési lépések számának csökkenésével) a hibalehetőség.

Ezek a módszerek jól reprodukálhatóak, de feltétlenül szükséges az adott laboratóriumi körülményeknek megfelelően, a vizsgált mintafajtákat is beleértve, az átalakítás mértékének megállapítása. Ezért a módszerek összehasonlítására standard ciszteinnel kísérletsorozatot végeztünk, illetve az általunk legkedvezőbbnek ítélt Spencer-féle módszernek meghatároztuk az optimális kivitelezési feltételeit. E paraméterek birtokában kiválasztottunk három minta fajtát, amely várhatóan magas, közepesen magas, illetve kis cisztein tartalmú. Ezek analízisével is adatokat gyűjtöttünk a módszer pontosságáról és megbízhatóságáról.

Anyagok és módszerek

Anyagok

Vizsgálatainkat standard cisztein, illetve ciszteinsav, „Linolac” gyermektápszer-, tojás-, és gyapjűmintákkal végeztük.

A dimetil-szulfoxidos oxidáció optimális körülményeinek meghatározása

A hidrolízist lezárt kémcsőben 6 mól/dm³ HCl-val végeztük úgy, hogy különböző mennyiségű (0,05 – 0,3 cm³) DMSO-ot adtunk a hidrolizálószerhez, valamint az optimális hidrolízisidő megállapítása céljából különböző ideig végeztük a hidrolíziseket. A hidrolízis hőfoka 110 °C volt, amit kémcsőtermosztát segítségével biztosítottunk. A hidrolízis idő letelte után a hidrolizálószerrel NaOH-tartalmú citrát pufferrel semlegesítettük, majd az adott térfogatra töltés és a szűrés után következett az analízis.

A meghatározást csehszlovák gyártmányú Mikrotechna AAA 881 típusú aminosav-analizátor segítségével végeztük. A mennyiségi értékeléshez ciszteinsav standard oldatot használtunk. A készüléket egyoszlopos üzemmódban működtettük és az elucióhoz az aminosav-analízishez használatos első puffert (pH 3,25) használtuk. Mivel a ciszteinsav körülményeink között az első eluálódó aminosav, ezért lehetőség nyílt arra, hogy egymás után 6 mintát (meghatározott időközökkel) vigyünk fel az oszlopra. Így mire az első minta aszparaginsav csúcsa megjelenik (mely természetesen ebből a hidrolizátumból nem határozható meg pontosan) a hatodik minta ciszteinsav csúcsa már eluálódott.

Az analízisek elvégzése után 0,2 mól/dm³ NaOH-val regeneráltuk az oszlopot, majd az első pufferrel való egyensúlyba hozás után kezdtük el az újbóli elemzést.

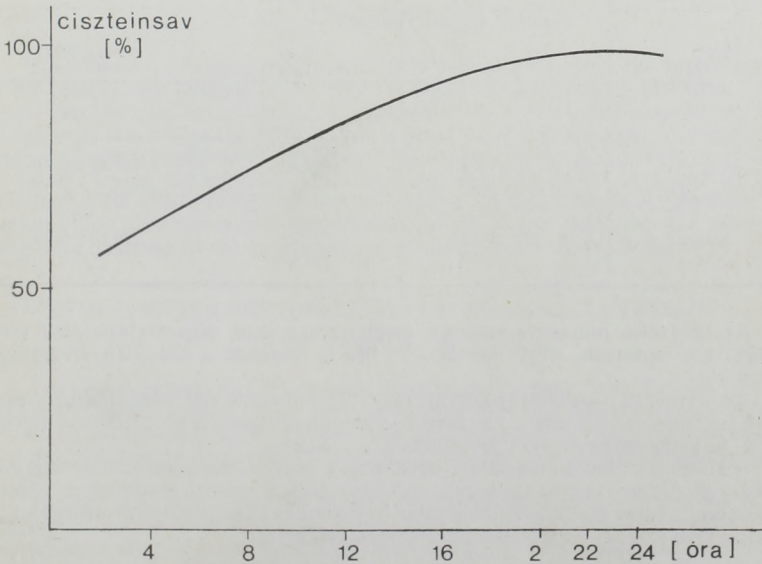
Vizsgálati eredmények és értékelésük

Az oxidálószer-koncentráció megállapításával kapcsolatos eredményeket az 1. táblázat mutatja.

A cisztein-ciszteinsav átalakulást tekintve a 2%-os koncentrációval már el lehet érni a perhangyasavas oxidációval kapott eredményeket. 2,5%, illetve 3%-os koncentráció még jobb eredményre vezetett.

A meghatározás optimalása céljából végzett mérések eredményei

DMSO koncentráció	Bemérési párhuzamosok			Átlag	
	I	II	III		
0,5%	1.	70,1	67,3	68,2	69,9 ± 2,6
	2.	72,7	70,4	66,8	
	3.	75,4	69,8	68,9	
1%	1.	80,7	81,2	84,9	82,6 ± 2,1
	2.	84,3	79,6	82,4	
	3.	81,5	82,7	86,6	
1,5%	1.	92,9	90,2	93,1	91,4 ± 1,6
	2.	91,4	90,7	92,6	
	3.	89,8	93,6	88,6	
2%	1.	95,2	93,9	96,7	94,9 ± 1,7
	2.	93,5	95,7	95,9	
	3.	94,9	91,4	97,2	
2,5%	1.	98,8	97,3	95,3	97,5 ± 1,0
	2.	97,7	98,4	97,6	
	3.	97,0	97,9	97,9	
3%	1.	96,4	98,5	96,3	97,4 ± 1,1
	2.	96,8	96,3	97,7	
	3.	97,2	99,7	98,2	



1. ábra
Optimális hidrolízisidő megállapítása

Különböző ciszteintartalmú mintákkal végzett mérések adatai

DMSO koncentráció	Minta	mg cisztein/g anyag	Átlag	
KACSATOJÁS				
1,5%	I.	1.	14,96	14,81 ± 0,13
		2.	14,82	
		3.	14,65	
2%	II.	1.	16,32	16,64 ± 0,25
		2.	16,94	
		3.	16,65	
2,5%	III.	1.	16,94	16,68 ± 0,23
		2.	16,72	
		3.	16,39	
LINOLAC GYERMEKTÁP SZER				
1,5%	I.	1.	0,88	0,897 ± 0,017
		2.	0,89	
		3.	0,92	
2%	II.	1.	0,93	0,957 ± 0,025
		2.	0,99	
		3.	0,95	
2,5%	III.	1.	1,01	1,003 ± 0,017
		2.	0,98	
		3.	1,02	
GYAPJÚ				
2%	I.	1.	128,31	127,88 ± 0,71
		2.	126,88	
		3.	128,45	
2,5%	II.	1.	129,41	129,88 ± 0,95
		2.	131,21	
		3.	129,03	

Az oxidációs hidrolízis idejének meghatározásához végzett kísérletek eredményei azt mutatták, hogy már 20–22 óra is elegendő a hidrolízis elvégzésére (1. ábra).

Az optimális oxidálószer-koncentráció és hidrolízis idő megállapítása után „Linolac” gyermektápszerrel, tojással és gyapjúmintákkal is elvégeztük a hidrolízist és hasonló eredményekre jutottunk. (2. táblázat).

A kísérletek alapján megállapítható, hogy a cisztein meghatározására leggyakrabban alkalmazott perhangyasavas oxidáció mellett igen jó eredményre vezet a dimetil-szulfoxidos oxidáció is. Ez utóbbi egyszerű és gyors kivitelezhetősége miatt alkalmasabb lehet a cisztein-meghatározások elvégzésére.

- (1) Hirs, C. H. W.: Meth. in Enz. Vol. XI. 59, (1967)
- (2) Lee, K. S.: J. Biol. Chem. 254, 6248, (1979)
- (3) Savige, W. E., Fontana, A.: Methods in Enz. Vol. XLVII. 453, (1977)
- (4) Lipton, S. H., Bodwell, C. E.: J. Agr. Food Chem. 21, 235, (1973)
- (5) Spencer, R. L.: Anal. Biochem. 32, 185, (1969)

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИСТЕИНА

Л. Шимон – Шаркади и Ж. Сэрзё

Основным методом подготовки для определения аминокислотного состава белков является гидролиз. Однако, возникают затруднения при определении некоторых аминокислот, которые заключаются в том, что при применении в большинстве случаев гидролиза соляной кислотой происходит разрушение и, таким образом, по ходу измерений с помощью аминокислотного анализатора эти аминокислоты невозможно точно определить вместе с остальными аминокислотами.

В своей статье авторы изучали возможность определения цистеина.

После апробации методов авторы выбрали наиболее благоприятный метод с применением диметилсульфоксидного окисления и установили оптимальные условия проведения определения.

Вместе с результатами определений авторы собрали также данные о точности и воспроизводимости метода.

STUDY ON THE METHODS FOR THE DETERMINATION OF CYSTEINE

L. Simon – Sarkadi and Zs. Szerző

Hydrolysis is a fundamental sample preparation method for the determination of the composition of proteins. It makes difficult the determination of some amino acids, that they decompose during the hydrolysis with HCl applied most frequently, so they can not be precisely determined with the other amino acids by amino acid analyser. In this paper the possibilities of the determination of cysteine are studied.

After trying the methods, the one using oxidation with dimethylsulphoxide was found the most favourable and its optimal conditions were determined. The examinations were performed on standards and on natural materials. By the results data were obtained on the accuracy and reproducibility of the method.

STUDIUM DER BESTIMMUNGSMETHODEN VON CYSTEIN

L. Simon – Sarkadi und Zs. Szerző

Zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Eiweiß ist ihre Hydrolyse eine generelle Vorbereitungsmethode. Die Bestimmung einiger Aminosäuren ist jedoch durch ihren Abbau während der am meisten angewandten Hydrolyse durch Salzsäure erschwert, so daß sie mit AAS nicht so exakt bestimmt werden können.

Nach Erprobung mehrerer Methoden wurde die günstigste Methode: eine Oxydation mittels Dimethylsulfoxids ausgewählt und die optimalen Anwendungsbedingungen ermittelt. Die Untersuchungen wurden mit Standards und mit natürlichen Materialien durchgeführt. Mit den Ergebnissen wurden Angaben über die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode gesammelt.