

Mikromennyiségű fehérjetartalom meghatározása borban, megnövelt érzékenységgű biuret reakcióval

MOLNÁR ISTVÁN

Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1977. július 9.

Növényi eredetű mintákban, élelmiszerekben levő kis mennyiségű fehérje meghatározása meglehetősen körülményes feladat. Általában a kis mennyiségű fehérje mellett nagyságrenddel nagyobb mennyiségben vannak jelen a meghatározást zavaró anyagok, így cukrok, fenolok, aminosavak, szerves savak. Számos fehérjereakció ismeretes, amelyekkel mennyiségileg meghatározhatók a fehérjék, feltéve, ha nincsenek jelen a meghatározást zavaró vegyületek.

A *Loewry-féle* (1) fehérjemeghatározási módszer, amely a peptidláncban levő aromás aminosavak redukcióján alapul, igen érzékeny a meghatározást zavaró vegyületekre, elsősorban a fenolokra, redukáló cukrokra, szabad aromás aminosavakra és minden olyan vegyületre, amely redukálja a *Folin* fenolreagenst. A módszer nem azonos eredetű fehérjékre eltérő eredményt ad, azok aromás aminosavtartalmától függően. A biuret-reakció (2), amelynek lényege, hogy a fehérjeláncban levő hat szomszédos aminosavmolekula egy rézatomot köt meg, érzékeny a szabad aminosavakra és a biuret reagenst redukáló vegyületekre, így a redukáló cukrokra. A *Voigt* féle fehérje meghatározási módszer (3), amelynek jól bevált a fehérjék lecsapására szolgáló része, a kicsapással az egyéb nitrogéntartalmú anyagoktól elválasztott fehérjék nitrogén tartalmát határozza meg *Kjeldahl* előírása szerint. Kis mennyiségű fehérjék meghatározása esetén a módszer meglehetősen nagy szórású.

A biuret reakción alapuló olyan érzékeny és specifikus módszert dolgoztunk ki a fehérjék meghatározására, amelyet nem zavarhatnak a nem fehérje természetű anyagok és csak a peptidlánc vesz részt a reakcióban.

Kísérleti rész

Anyagok és módszerek

Üvegből készült, 10 cm hosszú és 0,9 cm belső átmérőjű kromatográfiás oszlop vagy alul zárható üvegcső kis holt térfogattal.

Sephadex G-25 medium típusú dextrán gél (Pharmacia gyártmány). A gél 0,2 mol/liter nátriumhidroxid oldatban duzzasztjuk az oszlopba töltés előtt.

Biuret reagens:

A reagenst a *Weichelbaum* (4) reagens módosításával készítettük. A reagens nátriumhidroxid koncentrációja 0,2 mol/liter. A hozzáadott KNa - tartarát megakadályozza a reakcióelegy megzavarosodását.

KNa - tartarát · 4H₂O p.a

60 g

NaOH p.a

40 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ p.a
KJ p.a

6 g
5 g

desztillált vízzel 1 literre feltöltve.

A reagenst műanyag edényben hűtőszekrényben tároljuk.

Na-dietilditiokarbamat reagens

1,0 g Na dietilditiokarbamatot feloldunk 200 cm³ desztillált vízben. A reagens szobahőmérsékleten is hosszú ideig stabilis.

Nátriumhidroxid, 0,2 mol/liter

Kénsav, 0,2 mol/liter

Humán szérum albumin (HSA), liofilizált.

(Humán Oltóanyag Intézet készítménye)

1 mg/cm³ koncentrációjú törzsoldatot készítünk belőle, amelyet nátriumhidroxiddal hűtőszekrényben tárolunk.

A meghatározás módja

Fehérjék elválasztása a zavaró anyagoktól alkoholos lecsapással.

50 cm³ mintához 1 cm³ 10 százalékos sósavat és 180 cm³ 96 százalékos etilalkoholt adunk, 3 óráig állni hagyjuk, majd 3,9 cm³ 9 százalékos nátriumsulfátot és 15 cm³ 96 százalékos etilalkoholt adunk hozzá és 4 óráig állni hagyjuk, utána szűrjük és mossuk a következő összetételű mosófolyadékkal:

410 cm³ 96 százalékos alkohol

82 cm³ desztillált víz

10 cm³ 9 százalékos nátriumsulfát és

5 cm³ 10 százalékos sósav.

A szűrőpapír megszikkadása után a szűrőpapíron levő fehérje csapadékot feloldjuk 50 cm³ 0,2 mol/liter koncentrációjú nátriumhidroxid oldatban oly módon, hogy az oldatot 15 percig 60 C fokon melegítjük keverés nélkül, enyhe rázogatóással. A szobahőmérsékletre hűtött oldatból végezzük a meghatározást.

Géloszlop készítése

A 10×0,9 cm-es kromatográfiás oszlopba vagy csappal ellátott üvegcsőbe előzetesen duzzasztott Sephadex G 25 gél-t töltünk 6 cm-es ágymagasságig. A gélágyon keresztülengedünk 12 cm³ 0,2 M koncentrációjú NaOH oldatot és a folyadék-szintet leengedjük a gélágy felszínéig.

Biuret reakció

A 0,2 mol/liter koncentrációjú nátriumhidroxidban feloldott fehérje mintából 5,0 cm³-t egy 25 cm³-es csiszolt dugós üvegedénybe pipetázunk, hozzáadunk 5,0 cm³ Biuret reagenst és szobahőmérsékleten állni hagyjuk 15 percig.

A fehérjéhez nem kötött réz eltávolítása

A reakcióelegyből 2,0 cm³-t felviszünk a gélágy tetejére és a lecsepegő oldatot egy 10 cm³-es körjeles csiszolt dugós kémcsőbe gyűjtjük. Az oldat lecsepegése után még 3×2,0 cm³ oldatot engedünk át a gélágyon és a lecsepegő oldatot a kémcsőbe gyűjtjük össze.

A fehérjéhez kötődött réz meghatározása

A 10 cm³-es körjeles kémcsövet jelig töltjük Na-dietilditiokarbamat reagenssel és jól összekeverjük, majd 10 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk. Az oldat fényelnyelését 440 nm-en 1 cm optikai úthosszú üvegküvetében határozzuk meg

vakpróbával szemben Beckman ACT A. C III Spektrofotométeren. A vakpróbát oly módon készítjük, hogy $5,0\text{ cm}^3$ $0,2\text{ mol/liter}$ koncentrációjú nátriumhidroxid oldathoz $5,0\text{ cm}^3$ biuret reagenst adunk és jól összekeverjük. Az elegyből $2,0\text{ cm}^3$ -t viszünk fel a géloszlop tetejére a fent leírt módon.

Géloszlop regenerálása

A gélágyon 5 cm^3 -es részletekben 25 cm^3 $0,2\text{ mol/liter}$ koncentrációjú kénsav-oldatot engedünk át. A kénsav feloldja és eluálja a feleslegben maradt rezet az oszlopból. A savas mosást követően 12 cm^3 $0,2\text{ mol/liter}$ koncentrációjú nátriumhidroxid oldattal regeneráljuk az oszlopot.

Eredmények

Humán szérum albuminra (HSA) vonatkoztatva határoztuk meg a módszer jellemzőit, érzékenységét és pontosságát. A HSA törzsoldatból 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 és $800\text{ mikrogramm/cm}^3$ fehérjét tartalmazó oldatokat készítettünk és párhuzamos mérésekkel meghatároztuk az egyes fehérjetartalmaknak megfelelő fényelnyelést 440 nm -en.

A kétértékű réz ionok lúgos közegben komplexet képeznek a peptidkötésben levő egymással szomszédos aminosavakkal. A komplex kolorimetriás meghatározását zavarja a feleslegben levő réz, valamint komplex kis moláris extinciókoefficiense. Az érzékenység és pontosság növelése érdekében a fehérjemeghatározást visszavezettük a komplexben kötött réz meghatározására, mivel a kötött réz mennyisége arányos a kötő fehérjék mennyiségével. A fehérjéhez kötött réz meghatározása érdekében a reagens felesleges réztartalmát kvantitatívan el kell távolítani a peptid – réz komplex mellől.

A lúgos közegben tartaráttal oldatban tartott kétértékű réz ionokat a poliszacharidok és így a dextrán alapú Sephadex gél is abszorpcióval megkötik (5,6). A peptid – réz komplexet is tartalmazó oldatot a dextrán gélen átengedve a gél abszorbeálja a fehérjéhez nem kötött rezet, viszont a peptidhez kötött rezet átengedi. Vizsgáltuk azt az esetet, amikor a biuret oldat nem tartalmazott fehérjéket. Ez esetben nem jutott át réz a gélágyon a hosszú lúgos eluáció ellenére sem, tehát a gél kvantitatíve visszatartja a fehérjéhez nem kötött rezet.

A reakcióelegy réztartalmát vizsgálva megállapítottuk, hogy a használt mennyiségű és összetételű biuret reagensben levő réz elegendő ahhoz, hogy teljesen végbemenjen a peptid – réz komplex képződése. Nagyobb réztartalmú biuret reagens használata feleslegesen terheli az oszlopot. A biuret reakció szobahőmérsékleten 15 perc alatt teljesen végbemegy, hosszabb reakcióidő, illetve az oldat melegítése nem növelte a peptidrész komplex mennyiségét.

Az alkalikus oldatban peptid komplexben levő réz meghatározását Na-dietilditiokarbamáttal végeztük. A reagens alkalmas arra, hogy lúgos közegben a peptid komplexben levő rezet felszabadítsa és színreakcióba lépjen vele. A réz-dietilditiokarbamát sárga színe 3 perc alatt kialakul és legalább 1 óráig állandó. A színes termék kloroformba való áztatása feleslegesnek bizonyult, létjogosultsága akkor van, ha növelni akarjuk a meghatározás érzékenységét.

A kétértékű rezet lúgos közegben redukáló vegyületek jelenléte zavarja a meghatározást, hasonlóképpen a négy-nél több aminosavat tartalmazó peptidek is, ezektől előzetes alkoholos lecsapással el kell választani a fehérjéket. A kicsapott fehérjék meleg lúgban való oldással mennyiségi változás nélkül oldatba vihetők.

Humán szérum albuminra vonatkoztatva a megadott koncentráció viszonyok között 100 és $800\text{ mikrogramm/cm}^3$ tartományban mérhető a fehérjetartalom. Az 1. táblázat tartalmazza az egyes fehérjekoncentrációkra kapott átlagos fényelnyelést 440 nm -en. A szórások a mérési tartománytól függően $\pm 0,005$ és $\pm 0,015$ ér-

tékek között változnak, a százalékos szórások (variációs koefficiensek) 4,8 és 1,6 százalékok közé esnek.

A középértékeket vizsgálva, a középérték mellé írt megbízhatóságtól azt követjük meg, hogy az esetek 99 illetve 99,9 százalékban tartalmazza a valódi értéket.

A megbízhatóság megkapható a $\frac{t}{N} - S$ összefüggésből az N mért értékből számított S szórás és a megfelelő $N - 1$ szabadsági fokhoz valamint statisztikus biztonsághoz tartozó t értékek behelyettesítése után. A $P = 5$ százalék valószínűségi szinten $t = 2,2$ és a mérési tartománytól függően a középértékek 95 százalékos biztonsággal a $\pm 0,009$ értékekkel változnak meg. A $P = 1$ százalék valószínűségi szinten $t = 3,11$ és a középértékek hibahatára 99 százalékos biztonsággal $\pm 0,004$ és $\pm 0,013$ értékek közé esik a koncentrációtartománytól függően.

Az eredmények potosságát a mérési eredmény (középérték) szórásával jellemezve, a középérték szórása ($S_k = S/N$) a $\pm 0,001$ és $\pm 0,004$ értékek között változik a koncentrációtartománytól függően.

Az egyes fehérjekoncentráció tartományok statisztikai vizsgálata után meghatároztuk a fehérjetartalom és az optikai fényelnyelés közötti összefüggés jellegét. Az összefüggés 100–800 mikrogramm/cm³ fehérjetartalom esetén lineáris és elsőfokú regressziós egyenlettel írható le. Az egyenletet az $a = -0,02025$ és $b = 0,0048$ állandók jellemzik és az egyenlítés szórása $S = \pm 0,0048$. A regressziós egyenlet

A meghatározás pontosságát jellemző statisztikai értékek

1. táblázat

HSA g/cm ³	Fényelnyelés 440 mm-en A ₄₄₀	Szórás S	Variációs koefficiens S %	Középérték hibahatára P = 5 %	Középérték hibahatára P = 1 %	Középérték hibahatára P = 0,1 %	Középérték szórása S _k
100	0,104	0,005	4,8	0,003	0,004	0,006	0,001
200	0,212	0,010	4,7	0,006	0,009	0,013	0,003
300	0,340	0,010	2,9	0,006	0,009	0,013	0,003
400	0,450	0,011	2,5	0,007	0,010	0,014	0,004
500	0,569	0,014	2,4	0,009	0,013	0,018	0,004
600	0,688	0,015	2,2	0,010	0,013	0,019	0,004
700	0,814	0,015	1,8	0,010	0,013	0,019	0,004
800	0,932	0,015	1,6	0,010	0,013	0,019	0,004

A tényleges és a számított fehérjetartalmak értékei

2. táblázat

HSA g/cm ³	Mért fényelnyelés	Számított fényelnyelés	Számított HSA tartalom g/cm ³
100	0,104	0,098	104,8
200	0,212	0,217	195,8
300	0,340	0,336	303,6
400	0,451	0,454	397,1
500	0,569	0,573	496,5
600	0,688	0,691	596,8
700	0,814	0,810	703,0
800	0,932	0,929	802,4

Borok fehérjetartalmának meghatározása

Borminta	Optikai elnyelés 440 nm-en	Fehérjetartalom mg/l
Badacsonyi Olasz rizling	0,160 0,158 0,160	84 ± 2
Pécsi Olasz rizling	0,116 0,171 0,122	66 ± 2
Pécsi Kövidinka	0,104 0,103 0,104	60 ± 2
Pécsi Chardonnay	0,297 0,293 0,296	141 ± 3
Pécsi Rizlingszilváni	0,264 9,263 0,260	128 ± 3
Tokaji Hárslevelű	0,380 0,383 0,378	178 ± 4
Egri Olasz rizling	0,296 0,303 0,300	144 ± 3
Tokaji Furmint	0,178 0,180 0,177	167 ± 4

$Y = -0,02025 + 0,0048 \cdot X$. A 2. táblázatban megadtuk az egyes fehérjekoncentrációkhoz tartozó fényelnyelési átlagértékeket, valamint a regressziós egyenlethez számított fényelnyeléseket és az ezekhez tartozó fehérjetartalmakat. A regressziós egyenlettel a fehérjetartalom igen jó közelítéssel számolható. Az egyenlítés szorosságát jellemző mérőszám, a korrelációs együttható értéke 0,998, ugyancsak igen szoros egyenlítésre mutat.

A fehérjetartalmat grafikus vagy numerikus módszerrel kaphatjuk meg a fényelnyelés mért értékeiből. A grafikus meghatározáshoz kalibrációs egyenest kell felvenni, a numerikus meghatározást a fordított regresszióval számolt egyenlettel végeztük, amellyel a fehérjetartalmat a mikrogram fehérje/cm³ = 17,2 + (842 ± 20) A₄₄₀ formulával adja meg, ahol A₄₄₀ a 440 nm-en 1 cm-es küvettában mért fényelnyelés. A módszerrel meghatároztuk a borok fehérjetartalmát, minden mintából 12 meghatározást végezve. Az 50 cm³ borból kicsapott fehérjét 25 cm³ 0,2 mol/liter koncentrációjú nátriumhidroxid oldatban oldottuk fel és ebből végeztük a meghatározást. Az eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

Következtetések

A polipeptidekre specifikus biuret reakció felhasználható a fehérjék mennyiségi meghatározására kis fehérjekoncentráció esetén is, hogyha a biuret reakció lezajlása után a felesleges rezet eltávolítjuk és a fehérjéhez kötött rezet kolorimet-

riáson meghatározzuk. A zavaró anyagoktól a fehérjéket alkoholos kicsapással választjuk el, majd a fehérjéket adott térfogatú meleg lugban feloldjuk és az oldatból végezzük a meghatározást. Amennyiben a minta 200 mikrogramm/cm³-nél kevesebb fehérjét tartalmaz, a fehérjecsapadékot a kiindulási térfogat arányos törtrézében oldjuk fel, ily módon növelve a fehérje látszólagos koncentrációját. Tovább növelhető a meghatározás érzékenysége, ha a színes terméket átrázzuk kloroformba és a kloroformos extrakt fényelnyelését határozzuk meg, illetve ha a réztartalmat atomabszorpciós spektrofotometriával határozzuk meg, mint azt tettük a vizsgálat elején. Később áttértünk a kolorimetriás módszerre, mivel az atomabszorpciós spektrofotometriás rézmeghatározás kevésbé elterjedt. A kalibrációs humán szérum albumint használtuk, amelyből 10,3 mg köt meg 1 mg rezet. A biuret reakció a polipeptid láncre jellemző, ezért a legtöbb fehérje azonos arányban köt meg rezet, tehát a vonatkoztatási fehérje megválasztása nem rejt magában hibalehetőséget. Végeredményben a réz mérésére visszavezetett meghatározás rendelkezik a biuret módszer előnyeivel, ugyanakkor kiküszöböli annak egyetlen hátrányát, az érzéketlenséget.

IRODALOM

- (1) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randol, R. J.; J. Biol. Chem. 193, 265. 1951.
- (2) Gornal, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M.; J. Biol. Chem. 177, 755, 1949.
- (3) Weichelbaum, T. E.; Amer. J. Clin. Pathol. 16, 40, 1964.
- (4) Sephadex Gel Filtration in Theory and Practice. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.
- (5) Klungsoyr, L.; Anl. Biochem. 27, 91, 1969.
- (6) Sváb J.; Biometriai módszerek a kutatásban. Budapest, 1973.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВА ПРОТЕИНА В ВИНЕ С ПОМОЩЬЮ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИИ ПОВЫШЕННОЙ ЧУСТВИТЕЛЬНОСТИ

И. Молнар

Для определения малого количества белка автор разработал метод основывающийся на измененной биуретовой реакции определения. Автор определение белка сводит на измерении содержания меди таким образом, что после осуществления процесса биуретовой реакции из раствора удалил лишнюю медь и измерил с белками связанное количество меди, которое количество является стехиометрически пропорциональным с количеством белка. Определение автор проводил колориметрически диэтилдитиокарбаматом натрия, приводит статистические данные ошибок метода и исследовал их применимости для определения содержания белка вина. С целью устранения мешающих определению веществ, предварительно осаждал белок спиртом, а потом перевел его щелочью в раствор.

BESTIMMUNG VON MIKROMENGEN DES PROTEINGEHALTES IN WEIN MITTELS EINER BIURETREAKTION ERHÖHTER EMPFINDLICHKEIT

I. Molnár

Durch eine Modifikation der auf der Biuretreaktion fussenden Bestimmung wurde eine Methode zu Bestimmung geringer Proteinmengen im Wein entwickelt. Die Proteinbestimmung wird auf die Messung des Kupfergehaltes zurückgeleitet. Dabei wurde nach Beendigung der Biuretreaktion das überschüssige Kupfer aus der Lösung entfernt, und dann die Menge des zu Proteinen gebundenen Kupfers gemessen, die stöchiometrisch der Proteinmenge proportionall ist. Die Bestimmung wurde kolorimetrisch mit Natriumdiäthylthiocarbamat ermittelt. Die fehlerstatistischen Angaben der Methode werden präsentiert und die Anwendbarkeit der Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes von Wein wurde untersucht. Um die die Bestimmung störenden Substanzen zu entfernen, wurden die Proteine vorangehend mit Alkohol ausgefällt, sodann mit Alkali wieder in Lösung gebracht.

DETERMINATION OF MICRO AMOUNTS OF PROTEINS IN WINE BY BIURET REACTION OF INCREASED SENSITIVITY

I. Molnár

A method was developed for the determination of minute amounts of proteins in wine by the modification of the process based on the biuret reaction. The determination of protein is based on the measurement of copper in that the excess of copper is removed from the solution after the and the amount of copper bound to proteins is measured which is stoichiometrically proportional to the amount of proteins. The determination is carried out by colorimetry with the use of sodium diethylthiocarbamate. Statistical error data of the method are given, and the suitability of the procedure for the determination of protein contents in wine was examined. In order to remove substances interfering with the determination, proteins are previously precipitated and then redissolved in alkali.