

Gyors módszer élelmiszerek és takarmányok ciszteintartalmának meghatározására ioncserés oszlopkromatográfiával

CSAPÓ JÁNOS

Mezőgazdasági Főiskola, Kaposvár

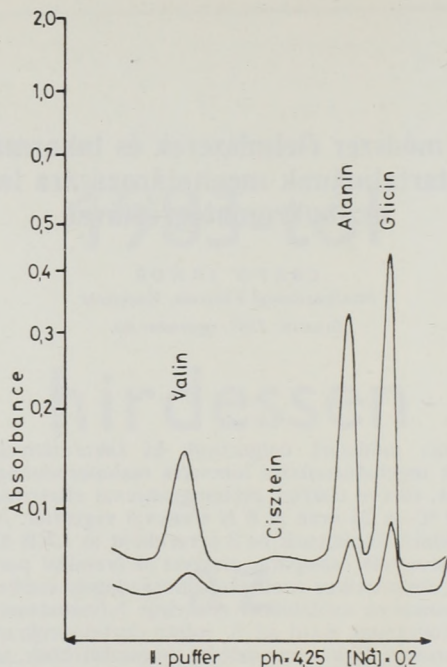
Érkezett: 1981. november 30.

Pontos és gyors módszert dolgoztunk ki takarmányok és élelmiszerek ciszteintartalmának meghatározására ioncserés oszlopkromatográfiával. A fehérjében lévő ciszteint, illetve cisztint perhangyasavval ciszteinsavvá oxidáltuk, a hidrolízist 110 ± 2 °C-on 24 órán át 6 N sósavval végeztük. A hidrolizátum feldolgozása után 5 mintát tápláltunk be 3 percenként az LKB 4101-es típusú aminosav-analizátor ioncserélő oszlopára, amelyet az áramlási paraméterek megváltoztatása nélkül az automatikus analizátor mintaadagoló szerkezete tett lehetővé. Az öt minta ciszteinsavvá oxidálódott ciszteinje folyamatosan 3 percenként jelenik meg a kromatogramon, majd az 5. minta ciszteinsavja után jelenik meg az 1. minta aszparaginsavja. Ekkor az analízist megszakítottuk, az ioncserélő oszlop regenerálása, majd egyensúlyozása után tovább folytatható a ciszteinsav-meghatározás.

Bevezetés

Kis fehérjetartalmú anyagoknál (takarmányok és élelmiszerek egy része), amelyek kevés ciszteint és cisztint tartalmaznak a többi aminosavhoz viszonyítva a hagyományos egyoszlopos vagy kétoszlopos eljárás a cisztein meghatározására meglehetősen pontatlan és bizonytalan a következők miatt: A lapos, kicsiny ciszteinsúcsot integrátor nélkül nagyon nehéz kiértékelni, nagy a szubjektív tévedés lehetősége. Megnövelve a cisztein mennyiségét az ioncserélő-oszlopra magasabb koncentrációjú minta bevitelével a ciszteinen kívül a többi aminosav kiértékelhetlenné válik, sőt a túl magas koncentrációban jelenlévő alanin és valin a ciszteinsúcsot elfedi, kiértékelhetlenné teszi.

Az 1. ábrán egy broilertáp tipikus kromatogramrészlete látható. Az ábrán jól értékelhető a glicin, az alanin és a valin, ezzel szemben a cisztein lapos csúcsát nehéz kiértékelni. Jelentős veszteség léphet fel a ciszteintartalomban a hidrolízis ideje alatt végbemenő bomlás és oxidáció miatt. A kén tartalmú aminosavak bomlására először *Martin és Synge* (3) mutatott rá, majd *Schram, Moore és Bigwood* (6) javasolta, hogy a kén tartalmú aminosavakat perhangyasavval oxidált mintából célszerű meghatározni. Ezt a meghatározási módszert *Moor* (4) módosította és tette rutinszerűen használhatóvá. *Yoritaka és Ono* (7) kimutatta, hogy a cisztein a hidrolízis során elbomolhat alaninná, szerinné és glicinné, *de Osono és munkatársai*



1. ábra

Broilertáp kromatogram részlete. LKB 4101 aut. aminosav-analizátor

(5) szerint lebomolhat homociszteinné, homocisztinné és glicinné is. Hirs (2) a ribonukleáz aminosav-összetételének meghatározásánál a kéntartalmú aminosavakat nagy pontossággal tudta meghatározni a perhangyasavas oxidációt követő hidrolízissel. Dove és Freny (1) az oxidáció és a hidrolízis hatását vizsgálták a tejpor aminosav-összetételére. Részletesen vizsgálták a perhangyasavas oxidáció körülményeit, a túloxidációt és annak megakadályozását. Megállapították, hogy míg a hidrolízis feltételeinek maximális betartásával (vákuumban történő hidrolízis, a levegő teljes kizárása) a metionin nem különbözik lényegesen az oxidált vagy a nem oxidált mintából meghatározva, a cisztein viszont 40%-kal kevesebbnek adódik a nem oxidált formában, mint perhangyasavas oxidációt követő ciszteinsav alakban történő meghatározás után.

A hagyományos módszernél előálló metodikai nehézségek és a többek által bizonyított oxidációs és egyben bomlási veszteségek miatt csak a cisztein meghatározására egy gyors és pontos módszert dolgoztunk ki, amely a ciszteinmeghatározás pontosságát a többi aminosavéval azonos szintre emeli, a módszer termelékenysége pedig 5–15-szerese az oxidációval, illetve anélkül végzett cisztein meghatározásának.

Anyak és módszer

A vizsgált anyagok

Elvégeztük 2 nagy ciszteintartalmú peptid (oxitocin, vazopresszin), a pep-szin, különböző tejporok, húslisztek és baromfitápok („broilerindító”, „broiler-nevelő”) ciszteintartalmának meghatározását oxidáció nélkül és perhangyasavas oxidációval. A tejporok és a húslisztek és a baromfitápok nyers-fehérjeteralmát a Kjel-Foss gyorsnitrogén-elemzővel határozzuk meg (tejporok és húslisztek esetén $N\% \times 6,38$, a baromfitápoknál $N\% \times 6,25$).

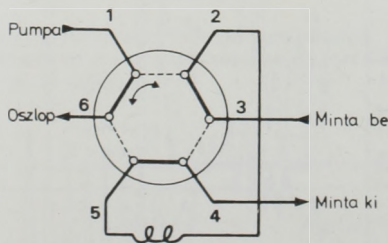
Az oxidáció és hidrolízis

A vizsgált minták várható ciszteintartalmának megfelelően 10–13 mg zsír-talanított vizsgálati anyagot bemértünk 10 cm³-es előzőleg krómkénsavval kítisz-tított orvosi ampullába. A Hirs (2) módszere szerint előállított perhangyasavból 0,8 cm³-t adtunk 20 mg fehérjére, majd az ampullákat 15 percre 50 °C-os vízfürdő-be helyeztük. Ezután az ampullákat azonnal –40 °C-ra hűtöttük le, majd azokat liofilezéssel leszáritottuk.

Az oxidált mintákat 24 órán át 110 ± 2 °C-on 6 N sósavval hidrolizáltuk. A hidrolizátum pH-ját 4 N nátrium-hidroxiddal pH = 2,2-re állítottuk be, majd az egé-szet 25 cm³-es lombikba mostuk át pH = 2,2 nátriumcitrát pufferrel. A mintát Filtrak 388-as szűrőpapíron szűrtük, majd az aminosav-analizátorba történő be-táplálásig –25 °C-on mélyhűtőpultban tároltuk teflon edényekben.

Analízis

Az összes cisztein meghatározását az LKB 4101-es típusú aminosav-anali-zátorral, Merck ciszteinsav standardot használva végeztük. Az ioncserélő oszlop mérete 500 × 6 mm; az ioncserélő-gyanta Chromex UA –8-as; az áramlás 60 cm³/óra puffer és 30 cm³/óra ninhidrin; az oszlop hőmérséklete 50 °C; a cisztein megha-tározásához használt A puffer 0,2 N (Na⁺) koncentrációjú, pH = 3,25; a regenerálás 0,4 N nátrium-hidroxiddal történt 5 percig; az ekvibrálást A pufferrel vé-geztük 35 percig.



- 1.helyzet ——— Minta terhelés
2.helyzet - - - - - Minta beadagolás

2. ábra

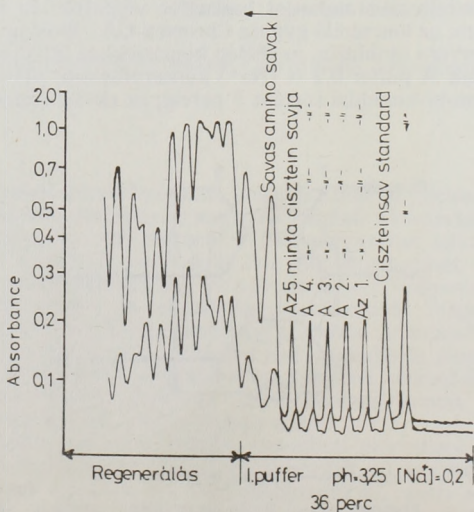
Az LKB 4101 aut. aminosavanalizátor mintaadagolójának vázlata

Az LKB 4101-es automatikus aminosav-analizátor mintaadagoló berendezése (2. ábra) lehetővé tette, hogy az áramlási paraméterek lényeges megváltoztatása nélkül több mintát tápláljunk be egymás után az ioncserélő oszlopra. Az ábrán 1-es helyzetben a minta beadagolása történik a kalibrált teflonspirálba, majd a 2-es helyzetben a pufferpumpa a spirálból az oszlopra nyomja a mintát. Az egyes helyzetből a kettős helyzetbe történő átváltás kevesebb mint fél másodpercet vesz igénybe, így az áramlási paraméterek gyakorlatilag változatlanok maradnak. Az öt minta ciszteinsavvá oxidálódott ciszteinje folyamatosan 3 percnként egymás után jelenik meg a kromatogramon, majd az ötödik minta ciszteinsavja után jelenik meg az első minta azparaginsavja. Ekkor az analízist megszakítjuk, az ioncserélő oszlop regenerálása, majd egyensúlyozása után folytatható a ciszteinsav meghatározása.

A marhapepszin ciszteintartalmának meghatározását mutatja – a fenti módszerrel – 5 db 20 mg-os bemérésből megfelelő hígítás után a 3. ábra. Az ábrán jól feltűnik a csúcsok szeparálódása és a csúcsok nagysága alapján látszik, hogy a módszer reprodukálhatósága megfelelő. 3 percről 2 percre csökkentve a betáplálások közti időt, a meghatározás termelékenysége megnő (5 helyett 7 minta ciszteinsav-tartalmát lehet meghatározni egy menetben), a csúcsok szeparálódása kissé romlik, bár a meghatározás pontossága nem különbözik lényegesen a 3 percnkénti betáplálásnál kapott eredményektől. Egy ilyen 2 perces egymás utáni betáplálással készült tipikus aminosav-kromatogramot mutat a 4. ábra (a marhapepszin ciszteintartalmának meghatározása).

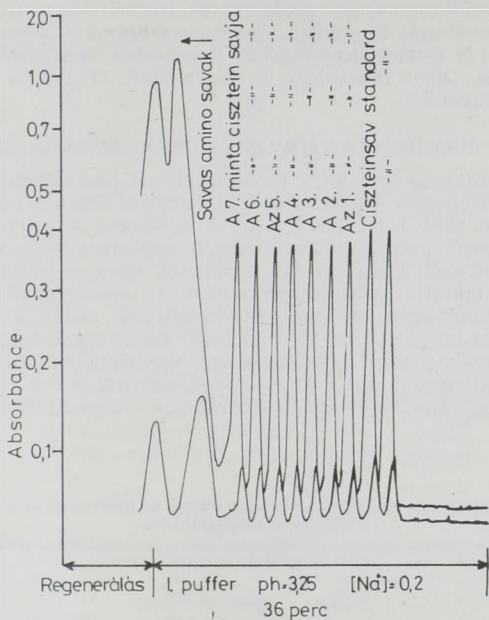
A kromatogramok értékelése

A minták ciszteintartalmának mennyiségi kiértékelését a kromatogramon kapott csúcs alatti területnek ismert koncentrációjú ciszteinsavcsúcs területéhez történt hasonlításal végeztük el. A csúcs magasságát szorozva a csúcs félmagasságával mért szélességével kaptuk meg a csúcs alatti területet.



3. ábra

A marhapepszin ciszteintartalmának meghatározása 3 perces betáplálással. LKB 4101 aut. aminosav-analizátor, perhangyasavas oxidáció után kapott hidrolizátum



4. ábra

A marhapepszin ciszteintartalmának meghatározása 2 perces betáplálással. LKB 4101 aut. aminosavanalizátor, perhangyasavas oxidáció után kapott hidrolizátum

Eredmények

A pepszin, az oxitocin és a vazopresszin ciszteintartalmának meghatározása

A pepszin, az oxitocin és a vazopresszin ciszteintartalma meghatározásának eredményeit mutatja az 1. táblázat.

1. táblázat

A pepszin, az oxitocin és a vazopresszin ciszteintartalma az ismertetett módszerrel meghatározva

	Pepszin	Oxitocin	Vazopresszin
Cisztein % (elméleti érték) ...	2,10	24,08	22,37
Cisztein % (a fenti módszerrel)	2,07	22,61	21,08
± szórás	0,06	0,72	0,28
s %	2,90	3,18	1,33
kitermelés	98,0	94,0	94,2
n	21	11	5

A táblázat adataiból jól látszik, hogy a kitermelés minden esetben 94% fölött van, a variációs koefficiens értéke pedig minden esetben 5% alatt, ami az eredmények kismértékű szórását bizonyítja. A meghatározásokat 3 percenkénti betáplálással végeztük, az n-érték pepszinnél 21 bemérésből, bemérésenként 5 ciszteinsav-meghatározást jelent (hasonlóan az oxitocinnál 11×5 , a vazopresszinnél 5×5 db meghatározás).

A tejporok, a húslisztek és a broilertápok ciszteintartalmának meghatározása

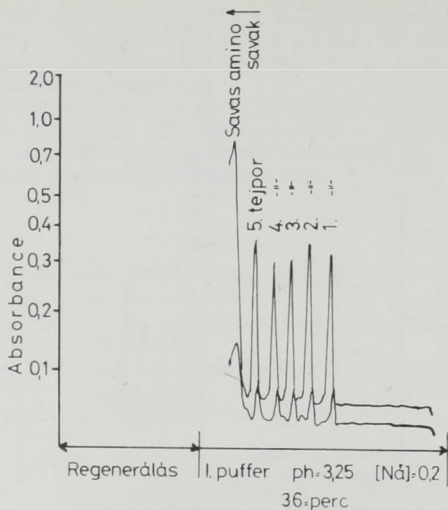
Miután bizonyosodott, hogy módszerünk jól használható ciszteinmeghatározásra nagy ciszteintartalmú peptidek, ill. tisztított fehérjék esetén, elvégeztük több fajta tejpor, több helyről származó és különböző fehérjetartalmú húsliszt és különböző broilertápok ciszteintartalmának meghatározását. A kapott kromatogramot tejporok esetén az 5. ábra, húslisztek esetén a 6. ábra, broilertápok esetén a 7. ábra mutatja. A kromatogramokon az egyes miták 3 perces betáplálási idővel követik egymást. Tejporok és húslisztek esetén a kromatogramon a csúcsok elválása megfelelő, jól kiértékelhető. Broilertápok esetén a kiértékelés már nehezebb, mert a minták ninhidrin-pozitív vegyületet tartalmaznak az aszparaginsav és a ciszteinsav között. A tejporok, húslisztek és broilertápok ciszteintartalmának meghatározására végzett kísérleteink eredményeit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat

A tejporok, a húsliszt és a broilertáp ciszteintartalma az ismertetett és a hagyományos módszerrel meghatározva

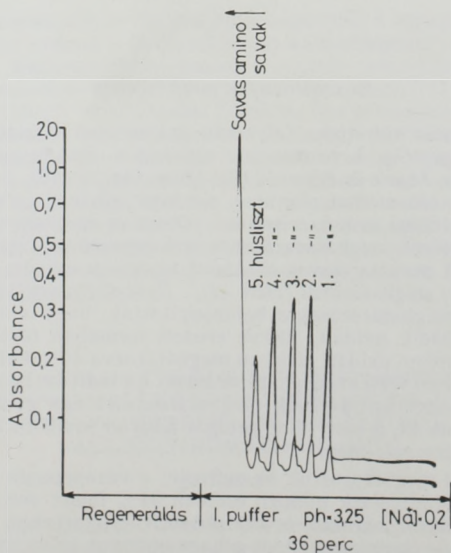
A vizsgált anyag				
	Tejpor	Kolosztrumpor	Húsliszt	Broilertáp
	szarvasmarha			
	gramm aminosav/100 g fehérje			
Ciszteintartalom (nem oxidált mintából)	0,5	0,8	0,6	0,9
Ciszteintartalom (oxidált mintából)	0,8	1,8	1,1	1,6
Nem ox. Cys. tart. × 100	63	44	55	56
ox. Cys. tart. a mérések száma	51	92	84	154

A táblázat adataiból kiderül, hogy az oxidált mintából végzett ciszteinmeghatározás jóval nagyobb értéket adott a nem oxidált mintánál kapott ciszteintartalomnál. A négyfajta anyag általában elmondható, hogy az oxidált mintánál 45%-kal magasabb ciszteinértékeket kaptunk, mint a nem oxidált mintánál. A vizsgált anyagok 70%-ánál a ciszteinvesztesség 43–47% körül, 20%-nál 35 és 55% körül alakul, míg a minták kis részénél mértük csak az átlagból jelentősen eltérő 30 és 60% körüli ciszteinvesztességeket a nem oxidált mintáknál. Ennek ellenére megállapítható, hogy mintánként jelentős eltérések lehetnek a hidrolízis során fellépő ciszteinvesztességben nem oxidált mintáknál, ezért a nagyszámú mérési adat birtokában sem tudunk olyan faktort alkalmazni, melynek alkalmazásával korrektebb eredményeket kaphatunk. Mégis amennyiben nincs mód a perhangyasavas oxidációval végzett ciszteinmeghatározásra, úgy kényszerűségből célszerűnek látszik a ciszteineredményeket 1,8-as faktorial szorozva becsülni.



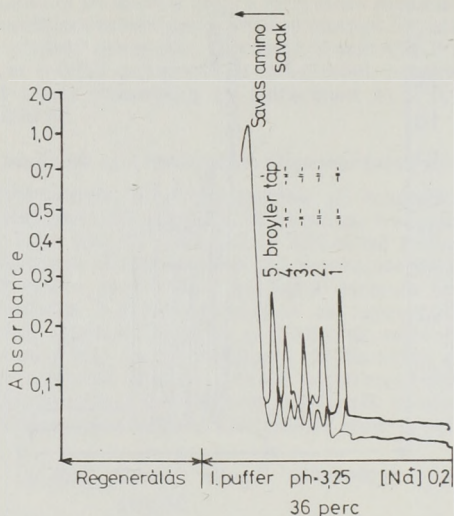
5. ábra

Tejporok ciszteintartalmának meghatározása. LKB 4101 aut. aminoszövetkező, perhangya-savas oxidáció után kapott hidrolizátum



6. ábra

Húslisztek ciszteintartalmának meghatározása. LKB 4101 aut. aminoszövetkező, perhangya-savas oxidáció után kapott hidrolizátum



7. ábra

Brojler tápok ciszteintartalmának meghatározása. LKB 4101 aut. aminosavanalizátor, perhangyasavas oxidáció után kapott hidrolizátum

Az eredmények megbeszélése

A fehérjék savas hidrolízise folyamán számottevő ciszteinvesztés léphet fel [Martin és Syngé] (3). A veszteségek egyrészt a cisztein oxidálódásával kapcsolatosak [Schram, Moore és Bigwood (6), Moor, (4) Hirs (2), Dove és Freney (1),] másrészt a cisztein elbomolhat alaninná, szerinné, glicinné [Yoritaka és Ono (7)], valamint homociszteinné és homocisztinné [Osono és munkatársai (5)]. A fehérjék aminosav-összetételének meghatározásakor szükségszerűnek látszik a kén tartalmú metionit és cisztint perhangyasavas oxidációt követően oxidált alakból (metionin szulfon, ciszteinsav) meghatározni [Hirs (2)]. Dove és Freney (1) a tejporok aminosavösszetételének meghatározásakor bebizonyították, hogy a metionin gyakorlatilag azonosnak adódik oxidált, illetve eredeti formában történt meghatározás után, a cisztein azonban oxidált alakban meghatározva 40%-kal többnek adódott, mint a ciszteinalakban történt meghatározáskor. Ez indított bennünket arra, hogy csak a fehérjék ciszteintartalmának meghatározására egy gyors és termelékeny módszert dolgozzunk ki, a metionint pedig a hagyományos technikával nem oxidált mintából határozzuk meg.

Módszerünkkel meghatároztuk az oxitocin, a vazopresszin és a pepszin ciszteintartalmát. A kitermelések minden esetben 94% fölött voltak. Ez után meghatároztuk több helyről származó és különböző fehérjetartalmú főcstejpor, tejpor, húsliszt és brojler táp ciszteintartalmát a hagyományos és az általunk kidolgozott módszerrel. Átlagosan 45%-kal kevesebb ciszteint kaptunk mind a négy anyagnál a hagyományos módszerrel (nem oxidált minta) meghatározva, mint az általunk kidolgozott módszerrel végezve el a cisztein meghatározását.

Módszerünket alkalmazni lehet bármely hazánkban működő aminosav-analízatornál, amennyiben a 2. ábra alapján mintaadagoló berendezést szereznek be, vagy kissé több energiát befektetve a hagyományos nitrogénnel történő mintaadagolást 3 percenként megismétlik.

Az általunk kidolgozott módszerrel – az oxidáció, a hidrolízis és a hidrolizátum feldolgozására felhasznált időt nem számítva – egy laboráns 8 óra alatt 35–40 élelmiszer- és takarmányminta ciszteintartalmát tudja a többi aminosav meghatározását elérő pontossággal meghatározni.

I R O D A L O M

- (1) *Dove, H. – Freney, I. R.*: Aust. J. Dairy Techn., 34, 1, 1979.
- (2) *Hirs, C. H. W.*: J. Biol. Chem., 219, 611, 1956.
- (3) *Martin, A. J. P. – Syngé, R. L. M.*: Adv. Protein. Chem., 2, 1, 1945.
- (4) *Moore, S.*: J. Biol. Chem., 238, 235, 1963.
- (5) *Osono, K. – Mukai, I. – Tominaga, F.*: Nagasaki Iggakai Zassi, 39, 156, 1955.
- (6) *Schram, E. – Moore, S. – Bigwood, E. I.*: J. Biol. Chem., 57, 33, 1954.
- (7) *Yoritaka, T. – Ono, T.*: Nagasaki Iggakai Zassi, 29, 400, 1954.

БЫСТРЫЙ МЕТОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЦИСТЕИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И КОРМАХ ИОНООБМЕННОЙ КОЛОННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Я. Чано

Автор для определения содержания цистеина в пищевых продуктах и кормах разработал точный и быстрый метод ионообменной колонной хроматографии. Цистеин имеющийся в белках и цистин окисляли надмуравьиной кислотой в цистеиновую кислоту, гидролиз проводили 6 И соляной кислотой при температуре 110 ± 2 °C, в течении 24 часов. После переработки гидролизата в ионообменную колону аминокислотного анализатора типа LKB 4101 в каждые 3 минуты вносили 5 образцов, помощью прободозирующего механизма автоматического анализатора без изменения параметров потока. В цистеиновую кислоту окисленный цистеин пяти образцов поточно в каждые 3 минуты появится на хроматограмме, потом после цистеиновой кислоты появится аспарагиновая кислота первого образца. В этом случае прекретили анализ и после регенерации и эквilibрации ионообменной колоны продолжали определение цистеиновой кислоты.

EINE SCHNELLMETHODE ZUR BESTIMMUNG DES CYSTEINGEHALTES VON LEBENSMITTELN UND FUTTERN MITTELS IONENAUSTAUSCH – SÄULENCHROMATOGRAPHIE

J. Csapó

Eine genaue und schnelle Methode wurde zur Bestimmung des Cysteingehaltes von Lebensmitteln und Futtern durch Ionenaustausch – Säulenchromatographie entwickelt. Das im Protein anwesende Cystein bzw. Cystin wurde mit Perameisensäure zur Cysteinsäure oxydiert, sodann die Hydrolyse bei 110 ± 2 °C 24 Stunden lang mit 6 N Salzsäure durchgeführt. Nach Aufarbeitung des Hydroly-

sats wurden 5 Muster nacheinander in dreiminütigen Intervallen auf die Ionenaustauschsäule eines Aminosäureanalysiergerätes vom LKB 4101 Typ eingeführt. Dies wurde durch das Mustereinführgerät der automatischen Analyseinrichtung ohne Veränderung der Stromverhältnissen ermöglicht. Die zu Cysteinsäure oxydierten Cysteinmengen des 5. Musters erscheinen nacheinander in Intervallen von 3 Minuten am Chromatogramm, sodann nach der Cysteinsäure des fünften Musters die Asparaginsäure des 1. Musters. Nachdem wird die Analyse unterbrochen, jedoch nach Regenerieren und Äquilibrieren der Ionenaustauschersäule kann die Bestimmung der Cysteinsäure fortgesetzt werden.

A QUICK METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE CYSTEINE CONTENT OF FOODS AND FEEDS BY MEANS OF ION EXCHANGE COLUMN CHROMATOGRAPHY

J. Csapó

An accurate and quick method was developed for the determination of the cysteine content of foods and feeds by ion exchange column chromatography. Cysteine and cystine, respectively, present in the protein was oxidized with performic acid to cysteic acid, then the hydrolysis carried out at $110 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 hours with 6N hydrochloric acid. On processing the hydrolysate 5 samples were introduced after each other in intervals of 3 minutes, on the ion exchange column of an aminoacid analyzer of LKB 4101 type. This could be carried out without any changes in the current conditions, by means of the sample feeding device of the automated analyzer. The cysteine amounts oxidized to cysteic acid present in the 5 samples appear on the chromatogram after each other in 3-minute intervals, then after the cysteic acid of the fifth sample also aspartic acid of the first sample appears. Then the analysis is suspended but after the regeneration and equilibration of the ion exchanger column the determination of cysteic acid can be continued.