



A kép illusztráció / Picture is for illustration only

Kiss Dóra^{1,3}, Juhászné Tóth Réka^{1,3}, Zurbó Zsófia^{1,4}, Csapó János^{1,2}

Érkezett: 2020. január – Elfogadva: 2020. március

Élelmiszerek aminosav összetételének meghatározása fotometriás módszerekkel, 2. rész - A metionin, a cisztin, a lizin és az arginin meghatározása

Kulcsszavak: aminosavak meghatározása, fehérje hidrolízis, aminosavak színreakciói, fotometria, metionin, cisztin, cisztein, lizin, arginin

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Az élelmiszerek aminosav tartalmának fotometriás meghatározásáról szóló összefoglaló közleményünk második részében két esszenciális (metionin, lizin) és két félig esszenciális aminosav (cisztin, arginin), az irodalomban közölt meghatározási módszereit ismertetjük. A két kéntartalmú aminosav szelektív meghatározását az teszi lehetővé, hogy úgy a metionin metil-merkaptó csoportja, mint a cisztin redukciójával képződött cisztein szulfhidril csoportja olyan speciális származékképzési reakciókba vihetők, amelyek csak ezekre az aminosavakra jellemzők. Ugyanez elmondható a lizin ϵ -amino csoportjáról és az arginin guanidin-csoportjáról is, amelyekkel speciális színreakciókat létrehozva lehetővé válik az érintett aminosavak egyedi meghatározása.

A metionin meghatározására a legalkalmasabb reakció az, amelynek során a metionin katalizálja a platina és palládium komplexek elszíneződését, amelyből következtetni lehet a metionin mennyiségére. Megfelelő körülmények között a reakciót a szerves szulfidok és a cisztin sem zavarják. A cisztin-, cisztein-meghatározás első lépése a cisztin redukciója ciszteinné, amelyet a cisztein és a származékképző reagens – leggyakrabban a 5,5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoészav) – között lezajló reakció követ. A mennyiségi meghatározást a keletkezett színes vegyület fotometriás mérésével lehet elvégezni. A lizin esetében a lizin szabad ϵ -amino csoportját reagáltatják a származékképzővel, leggyakrabban az 1-fluoro-2,4-dinitro-benzollal, majd mérik a színintenzitást. Az arginin esetében leggyakrabban a guanidin-csoport és az α -naftol valamint nátrium hipobromid közti reakció a meghatározás alapja.

2. Bevezetés

A fehérjeépítő aminosavak közül az ember számára a metionin és lizin esszenciális, a cisztein és az arginin pedig félig esszenciális aminosav, mert a ciszteint egy esszenciális aminosavból, a metioninból szervezetünk képes előállítani, az arginint pedig a szervezet

ugyan elő tudja állítani, de bizonyos fiziológiás körülmények hatására esszenciálissá válhat a szervezet számára. A lizin és a metionin élelmiszer-alapanyagaink két limitáló aminosava, ezért az élelmiszerek tápértékének meghatározásakor, a fehérje biológiai értékének számolásakor, feltétlenül ismerni kell e két aminosav mennyiségét.

¹ Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertechnológiai Intézet

² SAPIENTIA Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Kar, Élelmiszertudományi Tanszék

³ Debreceni Egyetem, Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

⁴ Debreceni Egyetem, Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

A cisztin és cisztein az élelmiszer-fehérjékben csak kis koncentrációban fordul elő, ezért mennyiségüket az összes aminosav jelenlétében nehéz meghatározni. Ezen túlmenően mindkét aminosav érzékeny az oxidációra, ezért a műszeres analitikai technikákkal általában oxidáció után, ciszteinsav formában határozzák meg őket. A cisztein szulfhidril csoportja reaktívabb, mint a diszulfid híd a cisztinben, ezért a meghatározás elengedhetetlen lépése a redukció, melynek során a cisztin ciszteinné alakul, így a cisztin ciszteinként határozható meg. Az arginin az élelmiszer-fehérjékben az ember szükségletéhez viszonyítva általában optimális mennyiségben fordul elő, de a fiatalabb korcsoportoknál, illetőleg bizonyos betegségekben szenvedő egyének számára esszenciálissá válhat, ezért fontos mennyiségének meghatározása [2, 9, 12, 18, 33].

Az élelmiszerek aminosav-összetételét a legtöbb laboratóriumban ioncserés oszlopkromatográfiával (IEC), vagy annak elvén működő automatikus aminosav-analizátorral [11, 13, 17, 21], illetve nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) határozzák meg [13, 18]. A szükséges készülékek beszerzése és működtetése azonban igen költséges, melyet egy kisebb laboratórium nem engedhet meg magának. Esetenként nincs is szükség az összes aminosav meghatározására, ezért felesleges lehet a költséges nagyműszeres technikákkal az összes aminosavat egymástól elválasztani, majd mennyiségileg meghatározni, elég lehet egy vagy két esszenciális, esetleg limitáló aminosav koncentrációjának mérése. Vizsgálataink célja ezért olyan fotometriás módszerek kidolgozása, melyekkel a fehérjék metionin-, cisztin-, lizin- és arginin-tartalma egyszerűen, nagyműszerek alkalmazása nélkül is meghatározható. Ilyen módszerek alkalmazásával a nagyműszerekkel nem rendelkező laboratóriumokban is lehetővé válhat az esszenciális, ill. féligesszenciális aminosavak mérése. Dolgozatunkban a metionin, a cisztin, a lizin és az arginin fotometriás meghatározásával kapcsolatos, az irodalomban közölt módszerekből készítettünk egy összeállítást.

2.1. A fehérjék hidrolízise

A fehérjék aminosav összetételének meghatározása előtt a fehérjéket szabad aminosavakká kell hidrolizálni. A fehérje hidrolízis nemzetközileg elfogadott módszerét Moore és Stein [26] dolgozták ki, melynek során élelmiszerek esetében a minta fehérjetartalmától függően 20-200 mg anyagot mérnek be, és a hidrolízist 6 M sósavval végzik 110 ± 1 °C-on, 24 órán át. A hidrolízis előtt gondoskodni kell az oxigén teljes eltávolításáról, amit a lefagyasztott folyadék feletti tér evakuálásával, nitrogéngázzal való átöblítéssel, vagy e kettő kombinációjával lehet elérni. A hidrolízis optimális hőmérséklete 110 ± 1 °C, amelynek ingadozása kerülendő, ugyanis alacsonyabb hőmérsékleten (105 °C) végzett hidrolíziseknél a peptidkötések felbomlása már nem kvantitatív, magasabb hőmérsékleten pedig az érzékenyebb aminosavak bomlásával kell

számolni. Hidrolízis után a sósavat rotációs vákuumdesztillálóval vagy liofilezéssel távolítják el.

3. A fehérje aminosav-összetételének meghatározása fotometriás módszerekkel

3.1. A metionin fotometriás meghatározása

A legegyszerűbben alkalmazható nitroprusszid-nátriumos módszert McCarthy és Sullivan [25] írták le a metionin fotometriás meghatározására, melynek érzékenysége azonban gyenge, és a színreakciót a hisztidin és a triptofán jelenléte is zavarja. A zavaró hatást a glicin feleslegben való adagolásával ki lehet küszöbölni, és a módszert automatikussá lehet fejleszteni. Az eljárás során 5 ml tesztoldathoz 1 ml 14,3 M nátrium-hidroxid oldatot, 1 ml 1%-os glicin oldatot, 0,3 ml 10%-os nitroprusszid-nátrium oldatot adtak, miközben az elegyet minden alkalommal összekeverték. 5-10 percre 35-40 °C-os vízfürdőbe helyezték, ezt követően két percre nulla °C-os víz-jég keverékével lehűtötték, és állandó keverés mellett 5 ml sósav-foszforsav elegyet adtak hozzá (8 térfogat koncentrált sósav és 1 térfogat 85%-os foszforsav). Intenzív keverést követően az elegyet vízben lehűtötték, majd 5-10 percen keresztül szobahőmérsékleten tartották. A metionin kalibráló sorozatát is hasonló módon készítették. A tömény nátrium-hidroxid oldat alkalmazásával elérték, hogy a glicin és a hisztidin nem adott színreakciót, a sósav és a foszforsav együttes alkalmazása pedig tisztább színű oldatot eredményezett, mint a foszforsav hozzáadása nélküli származékképzés. A minták abszorbanciáját, 520 és 580 nm-hullámhossz tartományban mérték.

A reakció specifikus a metioninra, ugyanis a többi aminosav ilyen körülmények között nem képez színes vegyületet. Ugyanakkor nem adnak reakciót a metionin oxidált származékai, valamint a homocisztein, a cisztein és a cisztin, és nem ad reakciót a triptofán sem, ha a savat hidegen adják a reakcióelegyhez.

Pieniazek és mtsai. [29] a metionint nátrium-nitráttal és trinátrium-pentaciano-aminoferráttal ecetsavas közegben reagáltatták. A reakciót a cisztin és a cisztein nem zavarja, a hisztidin zavarását pedig pH=1,5-ös glicin pufferrel ki lehet küszöbölni. A módszer érzékenysége itt sem túl nagy, ennek ellenére a színreakcióra alapozva egy átfolyós rendszerű automatikus meghatározást dolgoztak ki. Az oldatok fényelnyelését 520 nm hullámhosszon mérték.

Tonkovic és Hadzija [32] tejsavat, réz-szulfátot és p-hidroxi-difenilt használtak a metionin mennyiségi meghatározására. A vizsgálat alapját szolgáló színreakciót először Barker és Summerson [1] írták le. A módszer lényege az, hogy a metionin a tejsav és a p-hidroxi-difenil (PHD) reakciójának inhibitora, ezért metionin jelenlétében a reakció a metionin koncentrációjával arányosan kisebb színreakciót eredményez. A színintenzitás csökkenés az 5-45 µg metionin-tartományban lineáris, így felhasználható a metionin

koncentrációjának mérésére. A reakciót a fehérjealkotó aminosavak nem zavarják, ezért a módszer a tiszta metioninra vagy fehérje hidrolizátumokra egyaránt alkalmazható. A tejsav és a PHD reakciója során kapott színes termék, a nagyobb tejsav koncentrációtól eltekintve, követi a Lambert-Beer törvényt, a színintenzitás csökkenése arányos a metionin koncentrációjával, ezért a módszer jól használható a metionin koncentrációjának mérésére.

A vizsgálat során 5-45 µg metionin-tartalmú mintához 20 µg tejsavat adtak, majd kémcsőben egy ml vizet, 0,05 ml réz-szulfát oldatot és 6 ml koncentrált kénsavat adtak hozzá, a felforrósodott elegyet pedig folyóvízben lehűtötték. Öt percig forró vízben tartották, majd 20 °C-ra lehűtötték, és 0,1 ml PHD oldatot adtak hozzá. Kapilláris segítségével 30 °C-on 30 percig kevertették levegő áramban. Amennyiben a PHD reagens teljes mértékben nem oldódott fel, az oldatot 90 másodpercre ismét forró vízbe helyezték, majd a lehűlt minta abszorbancióját, a reagens vakkal szemben 560 nm-en mérték.

A periódusos rendszer platinacsoportjának fémei (platina, palládium) színes komplex jodidokat képeznek, amelyek szerves szulfidokkal vagy merkaptó-vegyületekkel elszíntelenednek a ligandumként viselkedő kéntartalmú vegyületeknek a platinával vagy palládiummal képzett komplexei révén. A színintenzitás csökkenése mellett hasonlóan reagál a metionin és a cisztein is a palládium-fenazino-triazio-komplexszel. Az elszíntelenedési reakció alkalmas a metionin-tartalom meghatározására [19]. A cisztein hatása a platinakompleyre lényegesen kisebb, mint a metioniné. A ciszteint tiazolidin-4-karbonsav keletkezése közben feleslegben adott formaldehiddel lehet lekötöni. A meghatározás során a színes reagens oldat a metionin-tartalommal arányosan elszíntelenedik el. A színintenzitás csökkenése 5-15 mm-es küvettában, 490 nm-en mérhető.

3.2. A cisztin-cisztein fotometriás meghatározása

A cisztin és a cisztein fotometriás meghatározásánál a cisztint a legtöbb esetben redukcióval ciszteinné kell átalakítani. A reakcióhoz szulfidot, nátrium-bórhidridet vagy merkaptó-etanolt használtak. A cisztin redukciójára a ditioeritritet (eritro-2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbután) és a ditiotreit (treo-2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbután) Cleland [10] vezette be. A ditioeritrittel (DTE) és a ditiotreittel (DTT) végzett redukció előnye, hogy ciklikus diszulfid képződése miatt a Cleland-reagens oxidált formája kerül előtérbe, és az a reakció egyensúlyát a cisztein oldalára tolja el. A DTE és DTT alacsony redoxpotenciálja miatt csak kis reagensfelesleg szükséges, hogy a cisztin teljes redukciója végbemenjen.

Gaitonde a cisztein mennyiségi meghatározását ecetsavas-sósavas közegben a ninhidrin és a cisztein, 100 °C-on, 6-10 perc alatt képződött színes reakciótermékének 570 nm-en végzett fotometrlálásá-

val végezte [15]. Az egyéb, természetben előforduló aminosavak mellett a cisztein koncentrációját 411 nm-en a noradrenalin-bitartarátból kálium-ferri-cianidval való oxidálással előállított noradrenokrom vegyület színtelenedésének mérésével is meg lehet határozni [30]. Színreakciót hoztak létre a cisztein, valamint a brucin és a kálium-perszulfát 50%-os kénsavas oldata felhasználásával is, amelyet követően a cisztein mennyiségét 660 nm-en, fotometrlással mérték [27]. A cisztein meghatározására a naftokinon-4-nátrium-szulfonát és a cisztein között létrejött reakcióban keletkezett színes termék abszorbanciójának mérése is használható, amely 520 nm-en mutat fényelnyelési maximumot [22]. Ciszteinnel reagáltatva színreakció képzésére a nátrium-nitrit, a szulfanil-amid és az n-1-naftil-etilén-diamin is alkalmas, amelyek hatására a ciszteinből nitro-izo-cisztein keletkezik, amelynek fényelnyelését 650 nm-en mérték [24].

A cisztein színes vegyületet képez még a tiofluoreszceinnel, az 5,5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoészav)-val, a 2-vinil-kinolinnal és a 4,4'-bis-dimetilamino-difenilkarbinollal. Irodalmi forrásokban említést tesznek a cisztein nitrilo-triecsészav(III)-kloriddal és az 1,10-fenantrolinnal lejátszódó reakcióiról is, amelyek ugyancsak alkalmasak a cisztein meghatározására [4].

Holz [19] Ellman módszerét tartotta legalkalmasabbnak a cisztein automatizált meghatározására, amelynek során a cisztint Cleland-módszere szerint DTE-vel vagy DTT-vel ciszteinné redukálta, a feleslegben lévő redukálószer pedig nátrium-arszennel kötötte meg. Ellman [14] az oldatok fényelnyelését 412 nm hullámhosszon mérte. A cisztein mennyiségét az Ellman-reagenssel (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoészav, DTNB) történő származékképzés után a sárga színű trinitrobenzoészav abszorbanciójának segítségével határozta meg. A DTE-vel valamint a DTT-vel való redukció és az Ellman-reagenssel való meghatározás is tiol-diszulfid cserén alapszik, ezért a cisztein-, illetve cisztin meghatározási módszer specifikus, más aminosavak azt nem zavarják.

A vizsgálatok szerint a DTE és a DTT redukáló képessége azonosnak tekinthető, mivel a cisztein- és a cisztin-színintenzitások mindegyik vegyülettel azonosak voltak. A cisztin redukciójára 10-12 perc reakcióidőt javasolnak, bár néhányan a 30 perces időt tartják megfelelőnek. A ciszteintartalmú minták ciszteinmeghatározási eredményei redukálószer hozzáadása nélkül lényegesen alacsonyabbnak bizonyultak, mert a cisztein érzékeny az oxigénre, és a tárolás során részben cisztinné oxidálódik. Redukálószer hozzáadása nélkül az oxidálódott cisztein nem vesz részt a reakcióban, így a meghatározás a valóságosnál alacsonyabb cisztein értékhez vezet. A fotometriás módszer alkalmas élelmiszerek és takarmányok cisztintartalmának nagy sorozatban való meghatározására.

Ohmori és mtsai. [28] egy egyszerű és specifikus vizsgálatot dolgoztak ki a cisztein meghatározására. A ciszteint metanolban p-dimetil-amino-fahéjaldehiddel reagáltatták, 60 °C-on, 2 órán át, kénsav jelenlétében. Az abszorbanciát 587 nm-en mérték, a színes származék 60 °C-on legalább 5 órán keresztül stabil volt. Az eljárás specifikus volt a ciszteinre, mert más aminosavakkal nem jelentkezett színreakció.

3.3. A lizin fotometriás meghatározása

A savas fehérje hidrolízist követően Carpenter és mtsai. [5], illetve Lea és munkatársai [23] az 1-fluoro-2,4-dinitrobenzolt használták a lizin mennyiségének meghatározására. Carpenter és Ellinger [6, 7] ezt az eljárást fejlesztette tovább, amely hasznosnak bizonyult számos állati eredetű minta esetében, a meghatározást azonban jelentősen befolyásolta az α -dinitro-fenil-arginin zavaró hatása. Az interferenciát metoxi-karbonil-klorid alkalmazásával [3] sikerült kiküszöbölni, de ez a kezelés egy színes hisztidin-származék váratlan kialakulásához vezetett [8]. A módszert Carpenter [9] tovább fejlesztette, és a továbbiakban kísérleteit 1-fluoro-2,4-dinitrobenzollal végezte el.

A módszer lényege az, hogy első lépésben a lizin szabad ϵ -amino csoportja reagál az 1-fluoro-2,4-dinitrobenzollal (FDNB), amely egy sárga színű dinitro-fenil (DNP) származékot eredményez. Ezt követően a fehérjét 6 M sósavval aminosavakká hidrolizálják, majd a reagens feleslegét és a fotometriás meghatározást zavaró anyagokat éteres extrakcióval eltávolítják, és végül mérik a vizes maradék abszorbanciáját, amelyből a szabad ϵ -amino csoport mennyiségére, abból pedig a lizin koncentrációjára lehet következtetni. Az eljárás során a 30-50 mg nitrogént tartalmazó mintához 8%-os nátrium-hidrogén-karbonát oldatot, majd az FDNB alkoholos oldatát adták, két órán át kevertették, majd miután a reakció lejártszódott, a fehérjét azonnal 8 M sósavval 16 órán át, refluxáltatva hidrolizálták. A hidrolizátumot megfelelő hígítást követően éterral többször extrahálták, a vizes fázishoz metoxi-karbonil-klorid oldatot adtak, éterral ismét extrahálták, és a vizes fázis abszorbanciáját 435 nm-en, vakkal szemben, mérték. A módszer hátránya, hogy a hisztidin és az arginin zavarták a meghatározást. A hisztidin interferenciát okozó hatása kisebb volt, mivel annak dinitro-fenil (DNP) származéka 435 nm-en nem mutatott maximális abszorbanciát. A módszert hosszú időn át, az automatikus aminosav analízátorok elterjedéséig, rutinszerűen alkalmazták a hasznosítható lizintartalom meghatározására.

3.4. Az arginin meghatározására fotometriásan

Az aminosavak közül egyedül az arginin rendelkezik guanidin csoporttal, amely olyan színreakciót ad, mely az argininre specifikussá teszi a meghatározást. A Sakaguchi [31] módszere szerint lúgos körülmények között az arginin az α -naftollal és a nátrium-hipobromittal vagy nátrium-hipoklorittal reagál, és az

oxidáció eredményeként egy olyan vörös-barna színű vegyület keletkezik, amely spektrofotometriásan mérhető. A fehérje hidrolizátum számos olyan anyagot tartalmazhat, amelyek megakadályozzák a szín kifejlődését, ezek közül a leggyakoribb az ammónia. Izumi [20] 520 nm hullámhosszon, míg ugyanezen reakciót felhasználva Gilboe és William [16] 490 és 510 nm közötti hullámhossz tartományban határozták meg a minták arginin-tartalmát.

4. Általános áttekintés

A fehérjék 6 M sósavval, 110 \pm 1 °C-on, 24 órán át végzett hidrolízisét követően valósítható meg, a – triptofán kivételével – az aminosavak fotometriás meghatározása. A két kéntartalmú aminosav szelektív meghatározását az teszi lehetővé, hogy mind a metionin metil-merkaptó csoportja, mind a cisztin redukciójával képződött cisztein szulfhidril csoportja olyan speciális származékképzési reakciókba vihető, amelyek csak ezekre az aminosavakra jellemzők. Ugyanez elmondható a lizin ϵ -amino csoportjáról és az arginin guanidin-csoportjáról is, amelyekkel létrehozott speciális színreakciók lehetővé teszik az egyedi meghatározást.

A metionin fotometriás meghatározása során alkalmazható a nitroprusszid-nátriumos színreakció [25], amelyet azonban a hisztidin és a triptofán jelenléte zavar. A zavaró hatás kiküszöbölése után a reakció specifikus a metioninra, ugyanis a többi aminosav ilyen körülmények között nem képez színes vegyületet, és a metionin oxidált származékai, valamint a homocisztein, a cisztein és a cisztin sem adnak színreakciót.

Pieniazek és mtsai. [29] a metionint nátrium-nitráttal és trinátrium-pentaciano-aminoferráttal ecetsavas közegben reagáltatták, Tonkovic és Hadzija [32] pedig tejsavat, réz-szulfátot és p-hidroxi-difenilt használtak a metionin-tartalom meghatározására. A módszer lényege, hogy a metionin a tejsav és a p-hidroxi-difenil (PHD) reakciójának inhibitora, ezért metionin jelenlétében a reakció a metionin koncentrációjával arányosan kisebb színreakciót eredményez.

A platina és a palládium színes komplex jodidokat képeznek, amelyek szerves szulfidokkal vagy merkaptó-vegyületekkel elszíntelenednek a kéntartalmú vegyületeknek, mint ligandumnak, a platinával vagy palládiummal képzett komplexei révén. A színintenzitás csökkenése mellett hasonlóan reagál a metionin és a cisztein is a palládium-fenazino-triazo-komplexszel, mely elszíntelenedési reakció alkalmas a metionin tartalom meghatározására [19]. A cisztein hatása a platinakomplexre lényegesen kisebb, mint a metioniné, és a zavaró hatást is meg lehet szüntetni feleslegben adott formaldehiddel.

A cisztin és a cisztein fotometriás meghatározásának első lépése, hogy a cisztint szulfitos, nátrium-bórhidrides vagy merkaptó-etanolos redukcióval

ciszteinné alakítják. A ditioeritritet (eritro-2,3-dihidroxí-1,4-ditiolbután) és a ditiotreitet (treo-2,3-dihidroxí-1,4-ditiolbután) Cleland [10] vezette be a cisztin redukciójára, melynek előnye, hogy egy ciklikus diszulfid képződése miatt a Cleland-reagens oxidált formája kerül előtérbe, ami a reakció egyensúlyát a cisztein oldalára tolja el.

A cisztein fotometriás meghatározása során a ciszteint a ninhidrin és a cisztein között ecetsavas-sósavas közegben létrejövő reakció révén határozták meg. A 100 °C-on, 6-10 perc alatt létrejött színes vegyületet 570 nm-en végzett fotometrálták [15]. A cisztein mennyiségének mérésére alkalmazták a noradrenalin-bitartarátból kálium-ferri-cianiddal való oxidálással előállított noradrenokrom szintelenedését is [30]. Ugyancsak színreakciót hoztak létre a cisztein, valamint a brucin és a kálium-perszulfát 50%-os kénsavas oldata segítségével [27]. Alkalmazták még erre a célra a naftokinon-4-nátrium-szulfonátot [22] és a nátrium-nitritet, a szulfanil-amidot és az n-1-naftil-etilén-diamint is [24]. A cisztein színes vegyületet képez még a tiofluoreszceinnel, az 5,5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoészav)-val, a 2-vinil-kinolinnal és a 4,4'-bis-dimetilamino-difenilkarbinollal, valamint a nitrilo-trieészav-vas(III)-kloriddal és az 1,10-fenantrolinnal is [4].

Holz [19] Ellman [14] módszerét módosítva a cisztint Cleland-módszere szerint DTE-vel vagy DTT-vel ciszteinné redukálta, majd a ciszteint az Ellman-reagenssel (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoészav, DTNB) történő származékképzés után a sárga színű trinitrobenzoészav abszorbanciájának segítségével mérte. A meghatározás a tiol-diszulfid cserén alapszik, ezért a cisztein-, illetve cisztin meghatározási módszer specifikus, más aminosavak azt nem zavarják.

Ohmori és mtsai. [28] a ciszteint p-dimetil-amino-fahéjaldehiddel reagáltatták, az abszorbanciát pedig 587 nm-en mérték. A reakció specifikus volt a ciszteinre, mert más aminosavakkal nem jelentkezett színes származék.

A savas fehérje hidrolízist követően Carpenter és munkatársai [5], illetve Lea és munkatársai [23] az 1-fluoro-2,4-dinitrobenzolt használták a lizin mennyiségének meghatározására. A módszer lényege az, hogy első lépésben a lizin szabad ϵ -amino csoportja reagál az 1-fluoro-2,4-dinitro benzollal (FDNB), mely egy sárga színű dinitro-fenil (DNP) származékot eredményez. Ezt követően a fehérjét 6 M sósavval aminosavakká hidrolizálják, majd éteres extrakcióval eltávolítják a reagens feleslegét, és a fotometriás meghatározást zavaró anyagokat, és végül 435 nm-en mérik a vizes maradék abszorbanciáját, melyből a szabad ϵ -amino csoport mennyiségére, abból pedig a lizin koncentrációjára lehet következtetni.

Az arginin Sakaguchi [31] módszere szerint lúgos körülmények között reagál az α -naftollal és a nátrium-hipobromittal vagy a nátrium-hipoklorittal, és az oxidáció eredményeként egy olyan vörös-barna színű vegyület keletkezik, mely spektrofotometriásan 520 nm hullámhosszon [20] vagy 490 és 510 nm közötti hullámhossz tartományban [16] mérhető.

5. Köszönetnyilvánítás

A publikáció elkészítését az EFOP-3.6.3-VE-KOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.