

# DETERMINACIÓ DE LISINA DISPONIBLE EN SUPLEMENTS PROTEÍNICS PER C. L. A. E. \*

per

*JOAN RABASEDA I FERRER*

Departament de Química Analítica. Facultat de Química  
Universitat de Barcelona

## SUMMARY

An optimization of the method for the determination of available lysine using the method based on the reactivity of the  $\epsilon$ -aminogroup with fluorodinitrobenzene (FDNB) is described. We proposed to carry out the hydrolysis in closed vessels in an autoclave. The conditions for different meals were established by using the modified sequential simplex method. For the meals studied, four hours of hydrolysis are enough. The use of high pressure liquid chromatography (HPLC) in determining the available lysine was studied and the optimum conditions to separate and quantify  $\epsilon$ -FDNB-lysine were established.

## 1. OBJECTE DEL TREBALL

L'objectiu d'aquest treball és d'establir un mètode d'anàlisi de lisina disponible en farines de peix i de soia utilitzant 1-fluoro-2,4-dinitrobenzè en la derivatització de la proteïna, realitzant la hidròlisi àcida amb autoclau i separant i quantificant el derivat N- $\epsilon$ -2,4-dinitrofenil-L-lisina per C. L. A. E.

Les condicions d'anàlisi que s'estableixin han de permetre obtenir resultats exactes i reproductibles.

\* Aquest treball forma part de la memòria presentada per l'autor, l'octubre de 1985, per a accedir al Grau de Llicenciat en Ciències Químiques. Ha estat dut a terme sota la direcció de la Dra. Gemma Rauret i Dalmau, catedràtica del Departament de Química Analítica, Facultat de Química U.B. Va obtenir el Premi per a Estudiants de la Societat Catalana de Ciències, en la seva Secció de Química, de la convocatòria del 23 d'abril de 1986.

## 2. INTRODUCCIÓ

Un acurat coneixement de la composició dels aliments és de vital importància per a formular productes alimentaris amb un valor nutricional òptim. Els aminoàcids essencials tenen un paper molt important en el món de la nutrició animal, principalment en la dels animals monogàstrics (porc, conill, aviram) perquè són aquells aminoàcids no sintetitzables per l'organisme o bé sintetitzables massa lentament per satisfer les necessitats nutricionals.

Per a la síntesi de proteïnes els animals necessiten una vintena d'aminoàcids, i dins el grup d'aminoàcids essencials els més importants són la lisina (figura 1), la metionina i el triptòfan, perquè són els més deficitaris a les proteïnes d'origen vegetal.

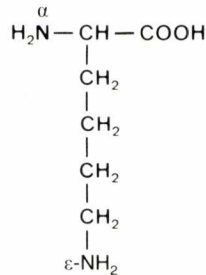


Figura 1. Lisina.

El baix contingut de lisina de molts aliments en limita el valor nutritiu. A més, la possibilitat que aquesta lisina es trobi en una forma tal que no sigui útil per a la síntesi proteica creà la necessitat d'establir mètodes d'anàlisi per a determinar la lisina que sí que és apta per a la biosíntesi proteica o lisina disponible.

Les farines de llavors olioses constitueixen una de les principals fonts suplementàries de proteïna utilitzades en la fabricació de pinsos. Aquestes farines requereixen un escalfament moderat per tal de millorar llur qualitat nutritiva, i destruir enzims nocius i inhibidors de creixement. En el decurs dels tractaments tèrmics i durant la conservació de les proteïnes, poden esdevenir-se reaccions múltiples al mateix si de la matèria primera. Els aminoàcids que reaccionen (especialment mitjançant reaccions de Maillard) generalment no són pas alliberats per la hidròlisi enzimàtica que s'esdevé al tub digestiu de l'animal, i per tant no són disponibles per a la biosíntesi de proteïna. La disminució de la disponibilitat en determinades condicions pot assolir el 50%.

En el cas concret de la lisina, la seva disponibilitat ve restringida perquè

el grup -NH<sub>2</sub> en posició ε reacciona amb grups carbonil i carboxil (figura 2) o interacciona amb tanins, quinones i altres constituents dels aliments.<sup>1</sup> Els enllaços resultants d'aquestes reaccions són resistents als enzims del tub digestiu, però tanmateix la hidròlisi àcida que es realitza en fer una anàlisi convencional d'aminoàcids sí que trenca aquests enllaços alliberant la lisina. És per això que dins del món de la nutrició animal hom parla de lisina total i lisina disponible.

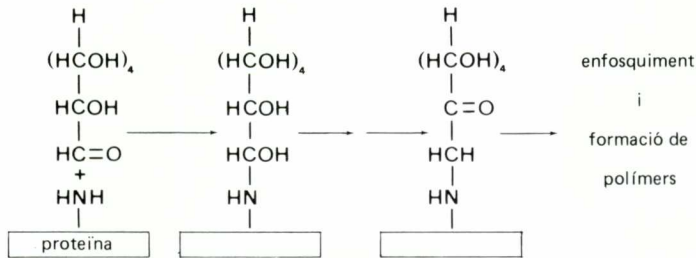


Figura 2. Representació dels primers passos de la reacció de Maillard.

A partir de la hipòtesi biològica segons la qual només la lisina amb el grup ε-NH<sub>2</sub> lliure és disponible per a la nutrició, han estat establerts diversos mètodes d'anàlisi per a la determinació de lisina disponible. HARESING I LEWIS<sup>2</sup> classifiquen els mètodes de determinació de la disponibilitat d'un aminoàcid en cinc grups, un dels quals el formen els mètodes químics. Aquests mètodes generalment inclouen les etapes següents: derivatització de la proteïna, hidròlisi àcida per reflux de la proteïna derivatitzada, separació i quantificació del derivat de l'aminoàcid. El reactiu ideal per a l'anàlisi de lisina disponible hauria de reaccionar selectivament amb el grup ε-NH<sub>2</sub> de la lisina, hauria de formar un derivat estable a les condicions d'hidròlisi àcida i separable quantitativament de la resta de compostos que en resulten. A la pràctica, l'agent derivatitzant més utilitzat és l'1-fluoro-2,4-dinitrobenzè (FDNB), que forma el derivat ε-2,4-dinitrofenil-lisina (ε-DNP-lys) (figura 3). La reacció del FDNB amb els grups amino fou utilitzada per SANGER<sup>3</sup> per a determinar els aminoàcids N-terminals de proteïnes. Sanger comprovà que el derivat ε-DNP-lys és un dels més estables a la hidròlisi àcida.

La principal diferència entre els diversos mètodes químics existents rau en el sistema de separació del derivat i en el procediment de quantificació d'aquest. Històricament, l'estudi més important sobre la determinació de lisina disponible el dugué a terme CARPENTER.<sup>4</sup> Aquest autor utilitza FDNB com a agent de derivatització i, després d'una hidròlisi àcida per reflux i d'una sèrie d'extraccions, mesura l'ε-DNP-lys alliberat espectrofotomètri-

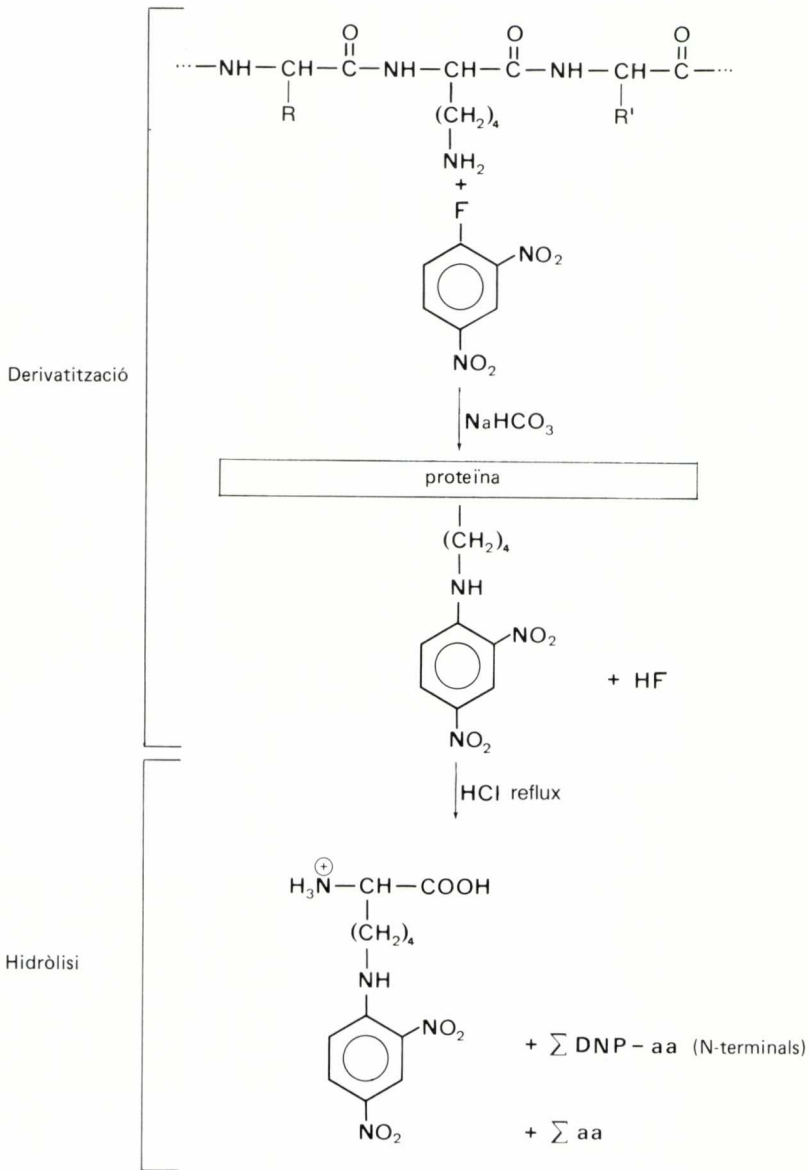


Figura 3. Esquema dels passos de derivatització i hidròlisi dels mètodes basats en la reacció del FDNB.

cament. Aquest mètode presenta un conjunt de problemes: el derivat  $\epsilon$ -DNP-lys no és completament estable a la hidròlisi àcida, la derivatització no és específica dels grups amino de la lisina en posició  $\epsilon$ , ja que tots els grups nucleofílics de la proteïna (en particular els grups  $-\text{SH}$  de la cisteïna,

–NH de la histidina i –NH<sub>2</sub> dels aminoàcids N-terminals) poden reaccionar amb el FDNB, i els carbohidrats presents en els aliments poden provocar l'aparició de compostos que interfereixen la determinació de lisina disponible tendint a augmentar els valors dels resultats obtinguts. Per aquestes raons BOOTH<sup>5</sup> proposà modificacions d'aquest mètode i diversos autors<sup>6-9</sup> han estudiat com evitar la interferència dels carbohidrats.

Per a separar l'ε-DNP-lys de la mescla resultant de la hidròlisi àcida de la proteïna derivatitzada, les tècniques cromatogràfiques utilitzades per diferents autors són: la cromatografia de bescanvi iònic,<sup>10-11</sup> l'absorció en alumina,<sup>12</sup> la partició líquid-líquid.<sup>13</sup> L'ús de la cromatografia líquida d'alta eficiència (C.L.A.E.) per a la separació i quantificació de la lisina total ha estat proposada per diferents autors.<sup>14, 15, 16</sup> Per a la determinació de lisina disponible, PETERSON I WARTHESEN<sup>15</sup> utilitzen també aquesta tècnica.

Dos "reviews" interessants sobre la determinació de lisina disponible han estat publicats.<sup>17, 1</sup> La principal limitació comuna a tots els mètodes descrits és la poca reproductibilitat: el coeficient de variació (C.V.)\* dels resultats obtinguts és del 4% en el mètode de Carpenter modificat per Booth i només pot ésser reduït a l'1,5% aplicant el mètode de Raao<sup>10</sup> a farines de cotó.

En el present treball han estat optimitzades les condicions d'anàlisi per a la determinació de lisina disponible en farina de soia i farina de peix, dos dels suplementes proteïnics més utilitzats en la fabricació de pinsos. Aquesta optimització ha permès de solucionar algun dels problemes anteriorment esmentats alhora que ha millorat considerablement la precisió en la determinació quantitativa. Ha estat introduïda la utilització de l'autoclau i de recipients tancants en la hidròlisi àcida. El mètode d'optimització simplex seqüencial<sup>18</sup> ha estat utilitzat per a establir les millors condicions d'hidròlisi. La separació i quantificació del derivat de lisina ha estat feta per C.L.A.E., en l'establiment de les condicions cromatogràfiques hom ha minimitzat l'error d'injecció i ha estat determinada la precisió del procés de separació i quantificació. També ha estat estudiada l'estabilitat dels patrons, i hom ha identificat un producte de la reacció de derivatització que no havia estat descrit amb anterioritat en la literatura sobre la determinació de lisina disponible. Finalment hom ha determinat el límit de detecció, la precisió i l'exactitud del mètode proposat.

\* C.V. =  $\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$  on  $s$  = desviació estàndard i  $\bar{x}$  = mitjana

### *Part experimental*

#### Aparells:

– Espectrofotòmetre: SP6-500 UV PYE UNICAM

- Autoclau: Microclave S-477 Selecta
- Aparell de C.L.A.E.: Millipore. Divisió Cromatografia WATERS.
  - sistema de repartiment de la fase mòbil: model M-45 (isocràtic)
  - injector: model U6K
  - mòdul de compressió radial: Z module
  - columna: cartutx 8 NV-C18  $\varnothing$  5  $\mu$
  - detector: model 440. Detecció a 254 nm.

Reactius:

- N- $\epsilon$ -2,4-DNP-L-Lisina SIGMA
- 1-fluoro-2,4-dinitrobenzè p.a. Scharlau-FEROSA
- 2,4-dinitrofenol p.a. Scharlau-FEROSA
- 2,6-dimetilfenol MERCK

i àcids, sals i dissolvents d'elevada puresa.

### 3. ESTUDI DE LES CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES

Amb la fase estacionària nova-pack C-18 han estat assajades les següents fases mòbils per tal d'optimitzar la separació dels components de les mostres hidrolitzades: acetonitril-aigua, acetonitril-aigua-àcid acètic, metanol-aigua i metanol-amortidor acètic/acetat 0.01M en diferents proporcions. Els millors resultats han estat obtinguts amb el sistema metanol-amortidor acètic/acetat 0.01M quan la relació metanol: fase aquosa és 1:1. Amb aquesta fase mòbil, si el flux és de 3 ml/min, el temps d'anàlisi és només de 8 min i el temps de retenció per a l' $\epsilon$ -DNP-lys és de 2 min.

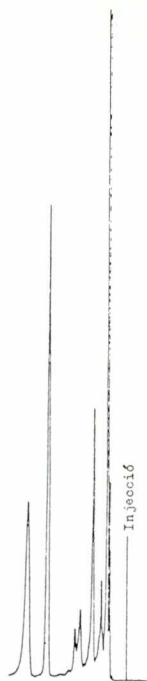
Com a solució patró ha estat utilitzada  $\epsilon$ -DNP-lys en H<sub>2</sub>O (solució A), en amortidor acètic/acetat 0.01M pH 5 (solució B) i en barreges d'aquest amortidor i metanol 1:1 (solució C). L'addició de metanol augmenta la solubilitat del derivat de lisina i com a conseqüència augmenta la precisió (taula 1). Diversos assaigs portats a terme amb mostres hidrolitzades demostren que hom obté una millor reproductibilitat quan la solució es ajustada a pH 5 (solució E) que no pas quan és ajustada a pH 7 (solució D).

També ha estat estudiada la utilització de patrons interns per tal de millorar la precisió i exactitud del mètode de determinació de lisina disponible. Com a patrons interns han estat assajats: àcid 3,5-dinitrobenzoic, àcid benzoic, o-toluidina, 2,6-dimetilfenol, etilbenzoat, 2,4,5-triclorofenol i pentaclorofenol. D'entre tots, el 2,6-dimetilfenol fou l'escollit perquè és el que té un temps de retenció més escaient (figura 4).

A la taula 1 hi ha els valors del coeficient de variació de l'àrea del pic d' $\epsilon$ -DNP-lys en les condicions descrites. A partir d'aquests resultats hom pot treure la conclusió que la solució C per als patrons i la solució E per a les mostres són les que donen millors resultats amb patró intern.

Taula 1. C.V. del procés de la injecció.

injeccions de:	Fase mòbil		
	MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50	MeOH: amortidor acetat 0,01M pH5 50:50	
		sense patró intern	amb patró intern
A. ε-DNP-lys patró en dissolució aquosa	4,11%		
B. ε-DNP-lys patró en dissolució regulada a pH 5	4,16%		
C. ε-DNP-lys patró en dissolució regulada a pH 5 i MeOH	1,59%	1,20%	0,92%
D. solució d'hidrolitzat a pH aproximadament neutre	3,52%	1,60%	
E. solució d'hidrolitzat ajustada a pH 5	1,81%	1,55%	1,06%



Cromatograma resultant de la injecció de la solució d'hidrolitzat, amb addició prèvia de 2,6-dimetilfenol.



Cromatograma resultant de la injecció de la solució d'hidrolitzat.

Figura 4.

#### 4. ESTUDI DE L'ESTABILITAT DE LA SOLUCIÓ PATRÓ I DE LES MOSTRES HIDROLITZADES

Per tal de controlar l'estabilitat de les solucions patró han estat mesurades periòdicament les absorbàncies de la solució d' $\epsilon$ -DNP-lys a 268 i 274 nm. La primera longitud d'ona correspon al màxim d'absorbància d'una solució d' $\epsilon$ -DNP-lys en MeOH : H<sub>2</sub>O i la segona correspon al màxim d'absorbància de la solució patró utilitzada per a la quantificació, amb  $\epsilon$ -DPN-lys i patró intern conjuntament. Mantenint la solució a les fosques i a temperatura ambient, durant 4 mesos no hi han estat observades variacions significatives de l'absorbància, tal com hom pot comprovar a la taula 2.

L'estabilitat de les mostres hidrolitzades també ha estat estudiada analitzant les solucions just després de la hidròlisi i després d'alguns dies. Els resultats obtinguts permeten de concloure que les mostres hidrolitzades són estables i que no cal portar a terme la quantificació immediatament després de la hidròlisi: el resultat de la determinació de lisina disponible d'una farina de peix fou de 4,73% quan l'anàlisi fou duta a terme immediatament després de la hidròlisi, i de 4,74% quan fou duta a terme 15 dies després. Resultats similars foren obtinguts amb altres mostres estudiades.

Cal assenyalar que les solucions que contenen patró intern han d'ésser mantingudes ben tapades en pots pràcticament plens per tal d'evitar pèrdues de 2,6-dimetilfenol per volatilització.

#### 5. IDENTIFICACIÓ DE L'ÚLTIM PIC DEL CROMATOGRAMA

En les condicions cromatogràfiques escollides, en fer una injecció de la solució de mostra hidrolitzada, hom obté el cromatograma de la figura 4. A partir dels temps de retenció han estat identificats els pics corresponents al derivat  $\epsilon$ -DNP-lys, al FDNB, al 2,4-dinitrofenol (DNP) i al patró intern 2,6-dimetilfenol. També apareix un conjunt de pics poc resolts, amb un temps de retenció similar al del DNP. Probablement aquests pics són deguts als 2,4-dinitrofenil derivats dels aminoàcids N-terminals presents a la mos-

Taula 2. Variacions d'absorbància amb el temps d'una solució de 4,16  $\mu$ g d' $\epsilon$ -DNP-lys/ml.

	A <sub>268</sub>	A <sub>274</sub>
Acabat de preparar	0,839	0,969
4 dies	0,836	0,970
1 setmana	0,847	0,981
2 setmanes	0,825	0,951
1 mes	0,831	0,958
2 mesos	0,830	0,962
3 mesos	0,832	0,963
4 mesos	0,825	0,955



tra, el temps de retenció dels quals és sempre menor que el de l' $\epsilon$ -DNP-lys en aquestes condicions cromatogràfiques.

També apareix en el cromatograma un altre pic amb un temps de retenció molt elevat i amb una àrea no reproductible. Aquesta manca de reproductibilitat féu pensar que aquest darrer pic podia ésser degut a una substància marronosa que precipitava lentament després d'haver filtrat la mostra hidrolitzada. El temps de retenció elevat indicava que es tractava d'una substància poc polar, una substància poc polar és lògic que no sigui gaire soluble en un medi aquós i això concordava amb l'aparició de l'esmentat precipitat després de la filtració. En fer la dilució pipetejant un volum d'una suspensió podria ser molt bé que el precipitat no es repartís igualment pels duplicats i per això l'àrea del pic variés d'una dilució a l'altra. Hom va aïllar, rentar i dissoldre en MeOH aquest precipitat i en injectar la solució resultant en les mateixes condicions cromatogràfiques aparegué només un pic, amb el temps de retenció igual al de l'últim pic del cromatograma. Amb uns quants mil·ligrams d'aquest precipitat hom féu les determinacions següents: punt de fusió, espectre RMN- $^1\text{H}$  en deuterocloroform, i espectres IR i UV en etanol. A partir dels resultats d'aquests assaigs hom pogué identificar el pic en qüestió com el compost 2,4-dinitro-1-etoxibenzè (figura 5), probablement format durant l'evaporació de l'etanol (vegeu l'apartat 8) o durant la derivatització. A la taula 3 figuren les característiques d'aquest compost, i els pics identificats són a la figura 6.

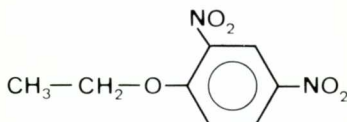


Figura 5. 2,4-dinitro-1-etoxi-benzè.

**Taula 3. Característiques físico-químiques del 2,4-dinitro-1-etoxi-benzè**

*2,4-dinitro-1-etoxi-benzè*

punt de fusió: 86-87°C

solubilitat en aigua:	insoluble
alcohol:	soluble
acetona:	molt soluble
benzè:	soluble

RMN- $^1\text{H}$ : pics a 1.5, 4.4, 7.3, 8.4 i 8.7 ppm ( $\text{CDCl}_3$ )

IR: bandes a 11.621, 3.125, 2.941, 2.857, 1.613, 1.515, 1.351, 1.282, 1.149, 1.053, 1.010, 909, 826 i 741  $\text{cm}^{-1}$

UV: màxims a 293, 252 i 214 nm (MeOH)

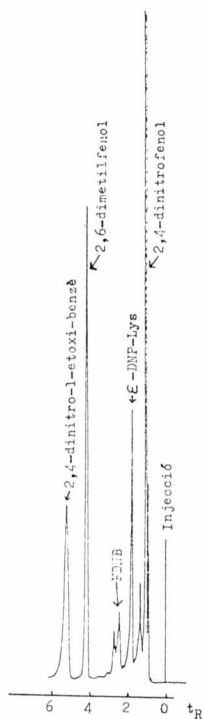


Figura 6

## 6. ESTUDI DE LES CONDICIONS ÒPTIMES DE LA HIDRÒLISI EN AUTOCLAU

Les condicions òptimes d'hidròlisi seran les que alliberin la màxima quantitat d' $\epsilon$ -DNP-lys amb una pèrdua mínima d'aquest compost. Tots els mètodes descrits a la literatura referents a la determinació de lisina disponible utilitzen un temps de reflux entre 12 i 24 hores (excepte per a la hidròlisi àcida de la proteïna de la farina de cotó<sup>19</sup>). MATHESON<sup>13</sup> utilitzà tubs tancats per a la hidròlisi de petites quantitats de proteïnes pures i concloué que les recuperacions eren millors amb aquest mètode.

En aquest treball han estat assajats recipients tancats i una autoclau per a la realització de la hidròlisi àcida. Aquest procediment permet d'escurçar molt notablement els temps d'hidròlisi alhora que possibilita el dur a terme simultàniament i còmoda la hidròlisi d'un conjunt de mostres.

Per tal d'establir aquestes condicions òptimes ha estat utilitzat el mètode símplex seqüencial modificat, mètode que ha estat aplicat amb èxit a diversos problemes analítics<sup>20, 21, 22</sup>. En el present treball, els quatre paràmetres escollits per a l'optimització o variables del símplex han estat: volum d'HCl, concentració d'HCl, temps d'hidròlisi i sobrepressió a l'autoclau

(equivalent a la temperatura d'hidròlisi). La variable a optimitzar era el percentatge de lisina disponible determinat. La seqüència d'optimització ha estat aturada quan la diferència entre els valors obtinguts en dues anàlisis consecutives era similar a la dispersió entre els resultats replicats d'una mateixa mostra.

Els intervals de variació de les variables del símplex han estat escollits a partir de l'anteriorment esmentada literatura sobre la determinació de lisina disponible. Així tenim que la variació del volum d'HCl assajat és de 15 a 75 ml, i la seva concentració, de 6 a 9 M. Els temps d'hidròlisi són molt més baixos que els apuntats a la bibliografia a causa de la utilització de l'autoclau: oscil·len entre 60 i 240 min. La sobrepressió de l'autoclau ha estat escollida entre 1 i 2 kg/cm<sup>2</sup> (120-133°C). A les taules 4 i 5 figuren les condicions i la resposta de cadascun dels assaigs imposats pel símplex per a una farina de peix i una de soia.

Hom pot comprovar que 11 o 15 assaigs són suficients per a assolir la màxima resposta en cadascun dels tipus de mostra.

**Taula 4. Farina de peix. Desenvolupament del símplex. Variables expressades en magnituds experimentals.**

Símplex núm.	Volum HCl ml	Concentració N	Temps min.	Pressió kg/cm <sup>2</sup>	% lisina disponible
1	15,0	6,00	60	1,0	1,41
2	70,5	6,65	99	1,2	3,42
3	28,1	8,78	99	1,2	3,77
4	28,1	6,65	227	1,2	4,11
5	28,1	6,65	99	1,9	3,94
6 Pref.	62,4	8,37	202	1,8	4,66
7 Pdil.	75,0	9,00	240	2,0	4,28
8 Pref.	15,0	8,89	233	1,9	4,51
9 Pdil.	15,0	9,00	240	2,0	4,88
10 Pref.	45,0	6,88	240	2,0	4,93
11 Pdil.	53,4	6,00	240	2,0	4,91

Hom pot observar també que les condicions d'hidròlisi són diferents per a cada tipus de farina analitzada. El fet que a la bibliografia hi hagi descrits mètodes aplicables a un ampli conjunt de mostres podria portar a pensar que l'especificitat de les condicions d'hidròlisi del procediment proposat representen un inconvenient. Si tenim en compte que les condicions d'hidròlisi establertes per a la farina de peix són pràcticament les mateixes de l'assaig núm. 13 per a la farina de soia, amb un resultat només l'1% més baix que el valor màxim, hom pot concloure que les condicions establertes per a la farina de peix poden permetre d'obtenir resultats acceptables en diferents productes utilitzats com a fonts suplementàries de proteïna, i recordem que

**Taula 5.** Farina de soia. Desenvolupament del símplex. Variables expressades en magnituds experimentals.

Símplex núm.	Volum HCl ml	Concentració N	Temps min.	Pressió kg/cm <sup>2</sup>	% lisina disponible
1	15,0	6,00	60	1,0	1,10
2	70,5	6,65	99	1,2	2,05
3	28,1	8,78	99	1,2	2,04
4	28,1	6,65	227	1,2	2,32
5	28,1	6,65	99	1,9	2,28
6 Pref.	62,4	8,37	202	1,8	2,33
7 Pdil.	75,0	9,00	240	2,0	2,13
8 Pref.	66,4	6,00	214	1,9	2,23
9 Pref.	22,0	7,18	240	2,0	2,30
10 Pref.	15,0	8,43	170	1,6	2,25
11 Pcon.	25,1	7,82	181	1,7	2,28
12 Pref.	45,3	6,61	203	1,8	2,42
13 Pdil.	55,3	6,00	214	1,8	2,54
14 Pref.	55,8	7,45	240	1,5	2,55
15 Pdil.	69,7	7,85	240	1,3	2,56

el mètode proposat és més precís, més ràpid i més còmode que els mètodes descrits a la bibliografia. Tanmateix seran obtinguts resultats òptims aplicant les condicions específiques per a cada tipus de material.

## 7. LÍMITS DE DETECCIÓ, PRECISIÓ I EXACTITUD

El límit de detecció del mètode proposat treballant a la màxima sensibilitat del cromatògraf és de 4.5 ng d' $\epsilon$ -DNP-lys, equivalents a 2 ng de lisina disponible.

La precisió del mètode fou calculada a partir d'anàlisis repetides de cada tipus de mostra. Els resultats figuren a la taula 6. Els coeficients de variació resultants són doncs: 0,96% per a la farina de peix i 1,66% per a la farina de soia.

L'exactitud del mètode ha estat determinada utilitzant el mètode de Carpenter com a patró. Els resultats obtinguts figuren a la taula 7. Els resultats obtinguts pel mètode proposat han estat calculats a partir de 10 determinacions en una mateixa mostra i són dins l'interval definit pels resultats obtinguts pel mètode de Carpenter, que han estat calculats a partir de 3 determinacions.

A la taula 8 hi ha els resultats de lisina total i lisina disponible per a la farina de soia i la farina de peix estudiades.

Taula 6. Resultats obtinguts en anàlisis repetides d'una mateixa mostra.

% lisina disponible	
Farina de peix	Farina de soia
4,91 %	2,54 %
4,92 %	2,48 %
4,92 %	2,48 %
4,93 %	2,51 %
4,94 %	2,47 %
4,95 %	2,47 %
4,94 %	2,51 %
5,03 %	2,58 %
4,96 %	2,58 %
5,05 %	2,52 %
$\bar{x}$ = 4,96 %	$\bar{x}$ = 2,51 %
s = 0,047	s = 0,042
C.V. = 0,96 %	C.V. = 1,66 %

Taula 7. Valors de lisina disponible d'una farina de peix i una farina de soia obtinguts pel mètode proposat i pel mètode de Carpenter.

	Farina de peix	Farina de soia
Mètode proposat	4,96 ± 0,03 %	2,51 ± 0,03 %
Mètode de Carpenter	5,17 ± 0,27 %	2,45 ± 0,27 %

Taula 8. Disponibilitat de la lisina en farina de soia i farina de peix.

Mostra	Proteïna bruta	Lisina disponible	Lisina total	Diponibilitat
Farina de soia	48,9 %	2,51 %	2,92 %	85,9 %
Farina de peix	67,0 %	4,96 %	5,23 %	94,8 %

## 8. ANÀLISI DE LISINA DISPONIBLE. PROCEDIMENT ANALÍTIC PROPOSAT

Les solucions necessàries per a efectuar l'anàlisi de lisina disponible són:

NaOH 2N

NaHCO<sub>3</sub> 8% i 1M

HCl 6.88 N

HCl 7.85 N

*Solució de FDNB:* 10 ml de la solució de FDNB en EtOH han de contenir 0.3 ml de FDNB.

*Solució mare de patró intern:* dissolució de 2,6-dimetilfenol en MeOH de 100 mg/ml.

Preparació dels patrons de la recta de calibratge:

*Solució mare d'ε-DNP-lys*: cal preparar una solució aproximadament d'1 mg ε-DNP-lys/ml en MeOH:H<sub>2</sub>O 1:4.

*Patró 1*: 2 ml de la solució mare d'ε-DNP-lys + 10 ml de MeOH + 0,5 ml de solució mare de patró intern. Enrasat a 50 ml amb amortidor/acetat 0,01 M pH 5.

*Patró 2*: 3 ml de la solució mare d'ε-DNP-lys + ídem.

*Patró 3*: 4 ml de la solució mare d'ε-DNP-lys + ídem.

*Patró 4*: 5 ml de la solució mare d'ε-DNP-lys + ídem.

### 8.1. Derivatització

Cal pesar exactament uns 400 mg de farina de peix finament dividida ( $\emptyset \leq 0,5$  mm), o uns 520 mg de farina de soia finament dividida ( $\emptyset \leq 1$  mm); passar-los quantitativament a un pot Pyrex de 100 ml; afegir-hi 2 boles de vidre i 8 ml de NaHCO<sub>3</sub> 8%; agitar-ho; afegir-hi 10 ml de la solució de FDNB en EtOH; tapar el pot; remenar 2 hores.

*Evaporar completament l'EtOH* al bany maria a 95°C (fins que cessa l'efervescència).

### 8.2. Hidròlisi

Un cop evaporat l'EtOH, cal fer:

- per a la farina de peix: afegir curosament 45 ml HCl 6,88 N; remenar el pot fins que tot el CO<sub>2</sub> s'ha desprès; tapar els pots; mantenir-los 240 minuts a 2 kg/cm<sup>2</sup> de sobrepressió dins l'autoclau.

- per a la farina de soia: afegir curosament 70 ml HCl 7,85 N; remenar el pot fins que tot el CO<sub>2</sub> s'ha desprès; tapar els pots; mantenir-los 240 minuts a 1,3 kg/cm<sup>2</sup> de sobrepressió dins l'autoclau.

Deixar refredar. Filtrar les solucions d'hidrolitzat i passar-les quantitativament a un matràs aforat de 200 ml.

### 8.3. Separació i quantificació

Cal prendre 15 ml de la solució d'hidrolitzat arrasada a 200 ml <sup>\*a</sup> i pas-

<sup>\*a</sup> En el cas que aquesta solució hagi estat preparada el dia anterior, caldrà assegurar-se que sigui ben homogènia. L'adsorció de l'ε-DNP-lys sobre DNP i altres compostos ja ha estat descrita<sup>5</sup>, i en el present treball ha estat comprovat que l'ε-DNP-lys s'adsorbeix també sobre el precipitat de 2,4-dinitro-1-etoxi-benzè.

sar-los a un vas de precipitats de 100 ml; afegir-hi 8,5 ml de NaOH 2 N per a la farina de peix i 17,0 ml de NaOH 2N per a la farina de soia; ajustar a pH 5 (al pHmetre) amb Na HCO<sub>3</sub> 1M.

Passar la solució ajustada a pH 5 a un aforat de 50 ml; rentar el vas de precipitats amb 10 ml totals de MeOH i afegir els rentats a l'aforat de 50 ml; afegir-hi 0,5 ml de la solució mare de patró intern; portar a 50 ml amb H<sub>2</sub>O i mantenir l'aforat ben tapat; abans d'injectar la solució al cromatògraf, cal filtrar-la amb un filtre de 0,45 µ de porus.

Condicions cromatogràfiques: columna Nova-Pak Waters C-18 Ø = 5 µ  
fase mòbil: MeOH: amortidor acetat 0,01M pH 5 50:50  
flux = 3 ml/min

Injectar els patrons de la recta de calibratge a l'inici i al final del cromatograma. Entremig, injectar la solució problema.

Mesurar la relació ( $h_{cm} \epsilon\text{-DNP-lys}/h_{cm}$  patró intern) de la solució problema i calcular a quants µg de lisina correspon segons la recta de calibratge.

A partir del valor obtingut, aplicar l'expressió:

$$\frac{\dots \mu\text{g lys}}{\text{mg mostra pesats} \times 0.0003} = \% \text{ de lisina disponible}$$

## 9. CONCLUSIONS

Del treball dut a terme per a l'establiment d'un mètode de determinació de lisina disponible, hom dedueix les conclusions següents:

1. Amb les condicions cromatogràfiques establertes per a la separació de l' $\epsilon\text{-DNP-lys}$  de la solució resultant de la hidròlisi de la proteïna dinitrofenilada, l'error d'injecció és mínim si hom ajusta la solució d'hidrolitzat a pH 5, hi addiciona metanol i utilitza un patró intern. El patró intern elegit és el 2,6-dimetilfenol. A l'únic precedent bibliogràfic de determinació de lisina disponible per C.L.A.E. hom no utilitza patró intern.

2. La solució d' $\epsilon\text{-DNP-lys}$  més patró intern és estable. No cal quantificar immediatament la solució d'hidrolitzat. Per a evitar la volatilització del patró intern, cal mantenir els recipients on són guardats la solució del patró o de l'hidrolitzat gairebé plens i ben tapats.

3. La precisió del procés de separació i quantificació de l' $\epsilon\text{-DNP-lys}$  per C.L.A.E., expressada amb el coeficient de variació, és 0,78%.

4. Els pics més importants que apareixen al cromatograma de la solució d'hidrolitzat són: DNP,  $\epsilon\text{-DNP-lys}$ , FDNB, i 2,4-dinitro-1-etoxi-benzè. Aquest darrer compost és el responsable de l'aparició de l'últim pic eluït. La seva formació no havia estat descrita anteriorment a la bibliografia sobre l'anàlisi de lisina disponible.

5. Hom ha demostrat la utilitat de l'autoclaueu en l'anàlisi de lisina dispo-

nible. És la primera vegada que hom descriu la realització de la hidròlisi de proteïnes dinitrofenilades amb autoclau i en recipients tapats. Els temps d'hidròlisi queden reduïts a una quarta part respecte als necessaris quan la hidròlisi és duta a terme segons el clàssic reflux. Un altre avantatge de l'ús de l'autoclau és que permet d'hidrolitzar simultàniament moltes mostres.

6. Hom ha optimitzat, utilitzant el mètode símplex seqüencial, el procés d'hidròlisi per a una farina de peix i una farina de soia dinitrofenilades. Les condicions òptimes d'hidròlisi àcida per a les mostres estudiades són:  
farina de peix: 45 ml HCl 6,88N 240 min a 2 kg/cm<sup>2</sup> (133°C)  
farina de soia: 70 ml HCl 7,85N 240 min a 1,3 kg/cm<sup>2</sup> (124°C)

A la bibliografia sobre l'anàlisi de lisina disponible, hom no ha pas trobat descrites amb anterioritat condicions d'hidròlisi diferents segons la natura de la mostra.

Tampoc no ha estat trobat cap precedent bibliogràfic sobre l'aplicació del mètode símplex seqüencial a l'optimització d'un procés d'hidròlisi.

7. Els resultats descrits a les conclusions anteriors han permès de proposar un nou mètode de determinació de lisina disponible on la hidròlisi àcida de la proteïna dinitrofenilada és duta a terme en una autoclau, i se separa i quantifica l' $\epsilon$ -DNP-lys alliberat per C.L.A.E. Només ha estat trobat un precedent bibliogràfic sobre la utilització de la C.L.A.E. en aquesta anàlisi.

8. El límit de detecció del mètode proposat és de l'ordre del nanogram. La precisió és C.V. = 1,66% per a l'anàlisi de lisina disponible en farina de soia, i 0,96% per a l'anàlisi en farina de peix. Els resultats obtinguts pel mètode proposat són continguts dins l'interval definit pels resultats segons el mètode clàssic de Carpenter, el qual ha estat pres com a estàndard.

9. Hom ha aplicat, amb bons resultats, el mètode proposat a l'anàlisi de lisina disponible en farines de peix i de soia.

## AGRAÏMENTS

L'autor agraeix al Dr. Pedroso, del Departament de Química Orgànica, la seva col·laboració en la realització de les anàlisis espectroscòpiques; i al Sr. Josep Morell, de Pinsos Suprem S.A., el seu suport en la realització d'aquest treball.

## BIBLIOGRAFIA

1. FRIEDMAN, M.; Diabetes, 31, 5 (1982).
2. HARESING, W. i LEWIS, D.; "Recent advances in animal nutrition 1979". Studies in the agricultural and food sciences, Butherworths Ed. 1979.
3. SANGER, F.; Biochem. J., 39, 507 (1945).



4. CARPENTER, K.J. : *Biochem. J.*, 77, 604 (1960).
5. BOOTH, V.H.; *J. Sci. Fd. Agric.*, 22, 658 (1971).
6. HALL, R.J. i HENDERSON, K.; *Analyst*, 104, 1097, (1979).
7. LYMAN, C. i THOMAS, M.C.; *Journal of A.O.A.C.* 48, 858 (1965).
8. BLOM, L., HENDRICKS, P. i CARIS, J.; *Anal. Biochem.*, 21, 382 (1967).
9. MATHESON, N.A.; *J. Sci. Fd. Agric.* 19, 492 (1968).
10. RAO, S.R., CARTER, F.L. i FRAMPTON, V. L.; *Anal. Chem.*, 35, 1927 (1963).
11. ROACH, A.G., SANDERSON, P. i WILLIAMS, D.R.; *J. Sci. Fd. Agric.* 18, 274 (1967).
12. DATTA, S. i DATTA, S.C.; *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 54, 117, (1976).
13. MATHENSON, N.A.; *J. Sci. Fd. Agric.*, 19, 492 (1968).
14. WARTHESEN, J.J., KRAMER, P.L.; *Cereal Chem.* 55, 481 (1978).
15. PETERSON, W.R. i WARTHESEN, J.J.; *J. Food Sci.*, 44, 994 (1979).
16. KOZUKUE, N., KOZUKUE, E., TERAI, H., MIZENO, S.; *J. Food Sci.*, 47, 1584 (1982).
17. CARPENTER, K.J. i BOOTH, V.H.; *Nutr. Abstr. Rev.*, 43, 424 (1973).
18. NELDER, J.A. i MEAD, R.; *Computer*, 7, 308 (1965).
19. HALL, R.J., TRINDER, N. i GUIVENS, D.I.; *Analyst*, 98, 673 (1973).
20. LONG, D.E.; *Anal. Chim. Acta*, 46, 193 (1969).
21. MORGAN, L. i DEMING, S.N.; *Anal. Chem.* 46, 1170 (1974).
22. ROURA, M., RAURET, G., IVERN, J.R., i SÁNCHEZ, P.; *Química Analítica*, 3, 299 (1984).