

Eiwitbepaling in melk met de biureetmethode

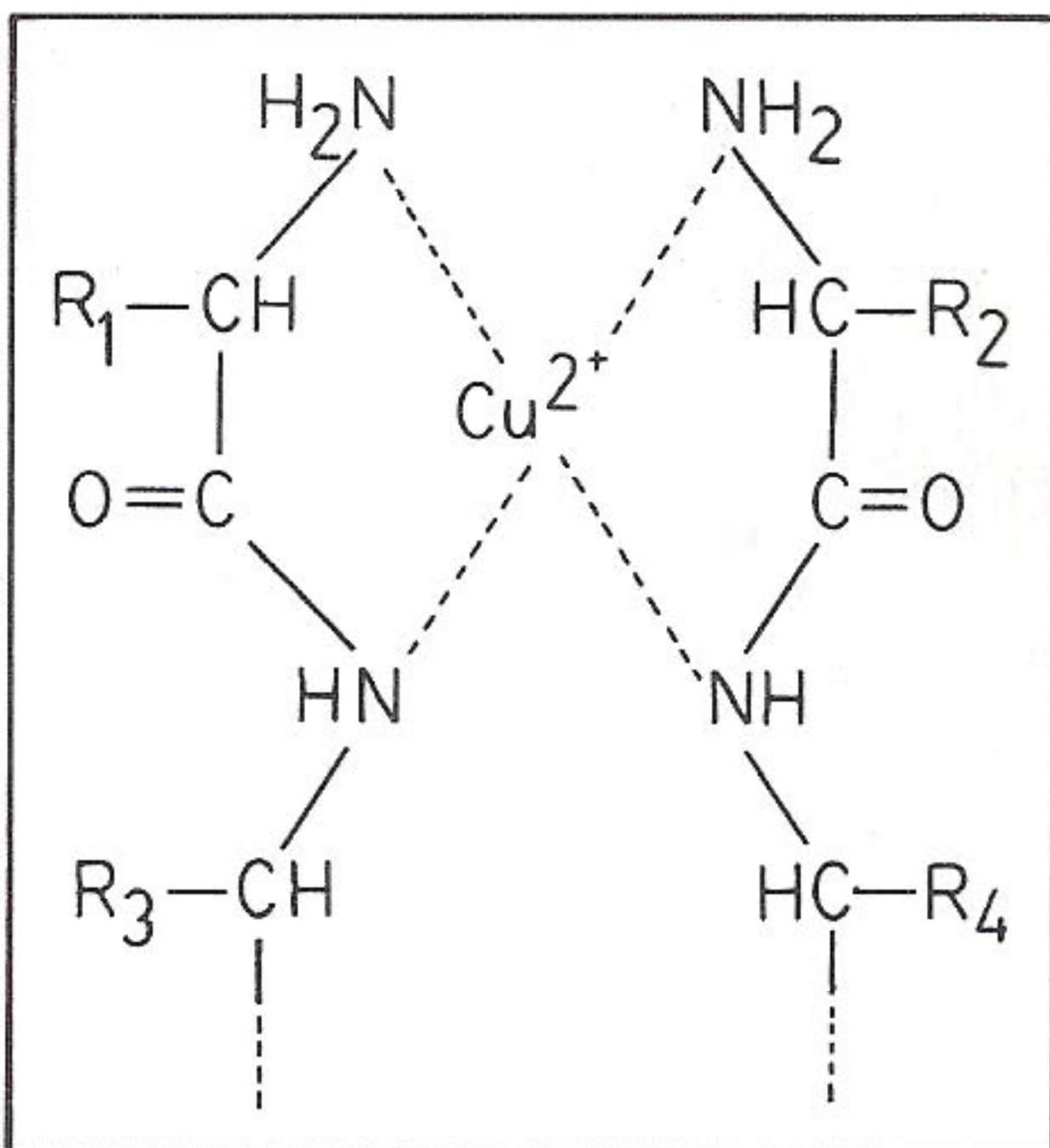
Een eenvoudige en snelle manier om fotometrisch het eiwitgehalte in diverse onderzoeksmaterialen te bepalen is de biureetmethode.¹ Als onderzoeksmateriaal lijkt melk hiervoor ongeschikt omdat dit, waarschijnlijk als gevolg van het hierin aanwezige vet, een sterke troebeling in het biureetreagens veroorzaakt en daardoor te hoge waarden geeft.

Om deze bepaling toch te kunnen uitvoeren is gebruik gemaakt van een methode die in de klinische chemie wordt toegepast om het totaal eiwitgehalte in bepaalde troebele sera te bepalen.²

Om het gevonden eiwitgehalte in melk te kunnen vergelijken met de waarde zoals die op een pak wordt vermeld, is het nodig om de dichtheid van de melk te weten. Gecombineerd met de dichtheidsmeting van melk is dit een instructieve analyse.

De biureetreactie

In alkalisch milieu vormen Cu^{2+} ionen met peptidebindingen een paars gekleurd complex (figuur 1) waarvan de extinctie



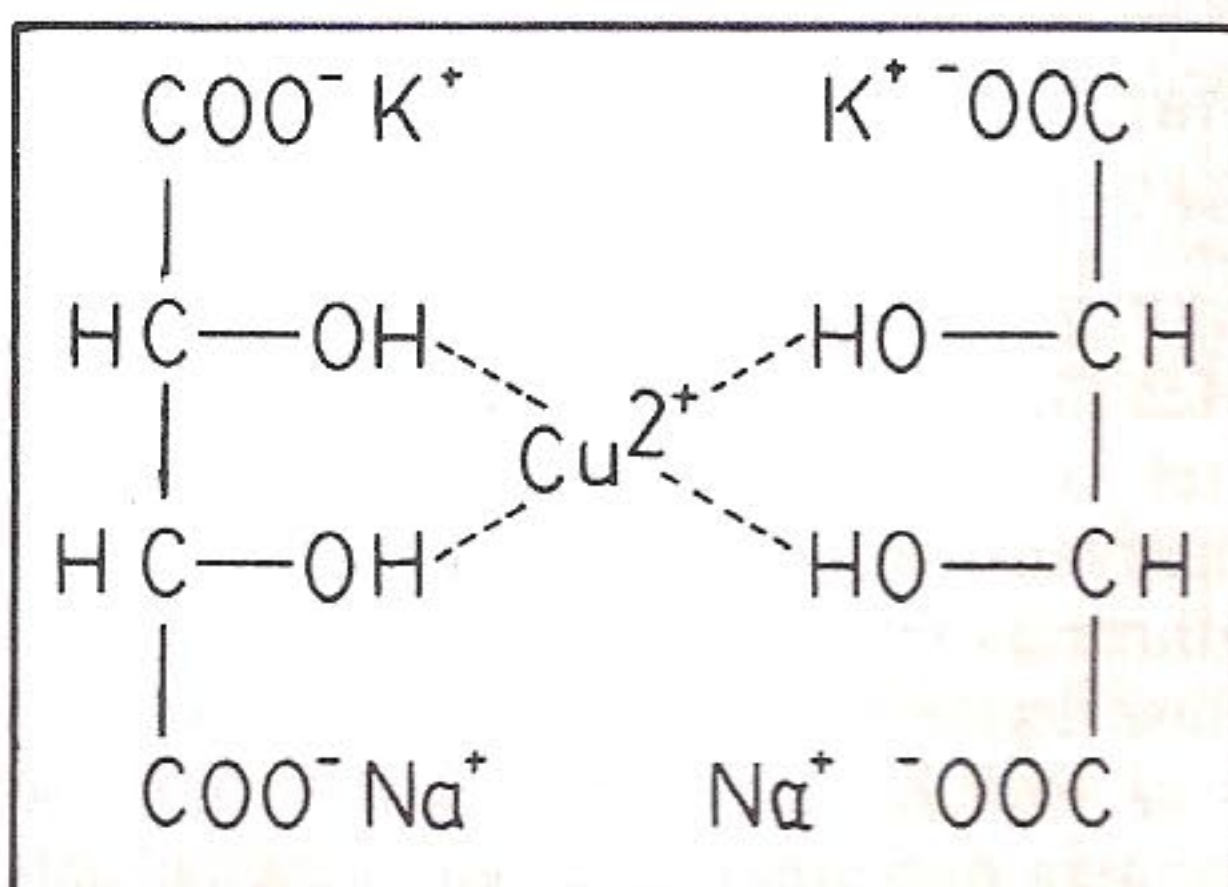
figuur 1. Het peptide - Cu^{2+} complex

bij een golflengte van 546 nm kan worden gemeten.

Deze methode dankt zijn naam aan het feit dat de eenvoudigste verbinding die deze reactie vertoont het condensatieproduct van ureum is en biureet (bi = twee en ureet = ureum) wordt genoemd (figuur 2). Gebleken is dat alle verbindingen die tenminste twee peptidebindingen bezitten, deze reactie vertonen.

Om te voorkomen dat het Cu^{2+} ion in alkalisch milieu neerslaat, wordt KNa-tartraat aan het reagens toegevoegd waar-

mee het Cu^{2+} ion een complex vormt dat in oplossing blijft (figuur 3).

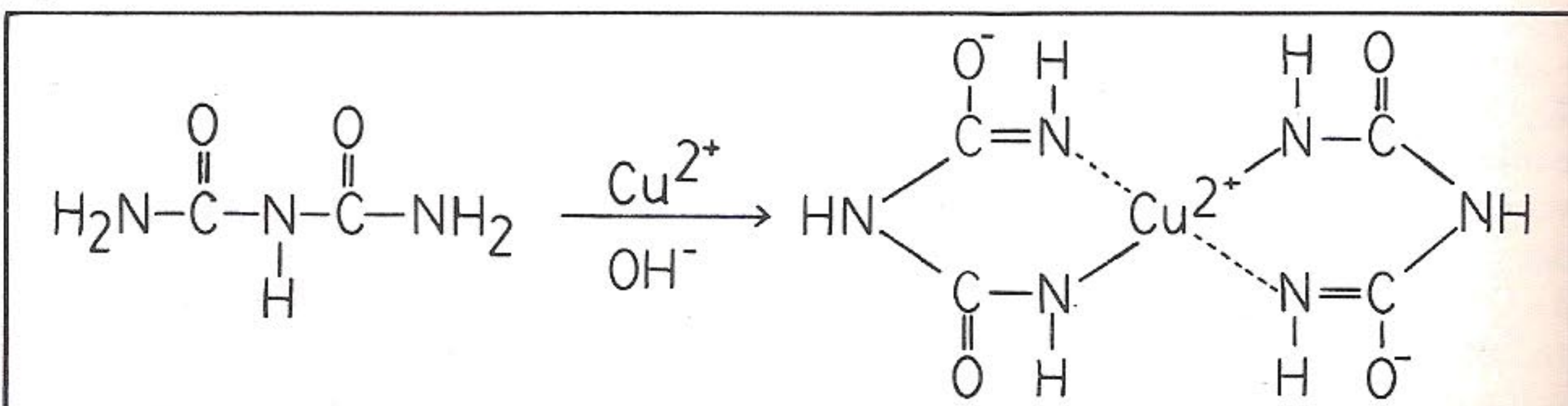


figuur 3. Het KNa-tartraat - Cu^{2+} complex

Blancobepalingen

Bij fotometrische bepalingen die in het zichtbare deel van het spectrum worden gemeten, wordt de te bepalen stof omgezet in een gekleurde verbinding. Niet alleen deze gekleurde verbinding heeft invloed op de hoogte van de extinctie maar ook het reagens zal gemeten tegen water

figuur 2. De biureetreactie



een niet te verwaarlozen bijdrage aan de extinctie leveren. Hiervoor kan worden gecorrigeerd door met deze reagensblanco de fotometer op $E=0$ in te stellen en vervolgens de bepalingen hier tegen af te lezen.

Een andere bijdrage aan de extinctie kan door een gekleurd of troebel monster worden veroorzaakt. Hiervoor wordt gecorrigeerd door middel van een zogenaamde monsterblanco, waarbij uit het reagens meestal een component wordt weggelaten zodat er geen kleurreactie plaatsvindt, terwijl de overige meet-omstandigheden zoveel mogelijk identiek zijn aan die bij de bepaling.

Bij de biureetmethode wordt in een dergelijk geval het Cu^{2+} ion uit het reagens weggelaten zodat het eiwit geen kleurreactie vertoont maar eventuele troebeling of kleur van het monster wel gemeten kan worden.

Apparatuur en reagentia

- pyknometer van 100 ml
- densimeter met een bereik van 1,000-1,060 g.ml⁻¹
- micro-, plunjer- of zuigerpipetten³ van 0,05 ml
- dispenser of glazen pipetten van 5,0 ml met pipetteerbalk
- fotometer, geschikt voor het meten van extincties bij een golflengte tussen 530-565 nm
- 1 pak halfvolle melk
- biureetreagens: Los 9,0 g KNa-tartraat, 4H₂O, 5,0 g KI en 3,0 g CuSO₄.5H₂O op in ongeveer 400 ml water. Voeg hieraan, onder goed mengen, een oplossing van 8,0 g NaOH in ongeveer 200 ml water toe en vul aan tot 1 liter met water. Bewaar in een goed afgesloten donkere fles.

- blanco biureetreagens: Bereid biureetreagens, zonder CuSO₄! Bereid biureet- en blanco biureetreagens met uitgekookt gedestilleerd water.
- eiwitstandaardoplossing: Hiervoor werd serum bereid uit runderbloed gebruikt.⁴ Het eiwitgehalte werd bepaald met de biureetmethode en uitgerekend op een commercieel verkrijgbare eiwitstandaardoplossing.

Eiwitbepaling

Pipetteer alle reagentia in centrifuge- of reageerbuizen en gebruik voor de toevoeging van het biureet- en blanco biureetreagens een dispenser of pipetten van 5,0 ml met pipetteerballon. Zie het pipetteerschema onderaan deze pagina.

Meng de inhoud van de buizen zorgvuldig en plaats ze gedurende 30 minuten in een waterbad met een temperatuur van 25 °C.

Stel de fotometer in op E=0 met behulp van de reagensblanco en meet vervolgens de extincties van de bepaling en de standaardbepaling bij een golflengte van 546 nm. Stel vervolgens de fotometer met behulp van water of blanco biureetreagens⁵ in op E=0 en meet de extincties van de blancobepaling en de blanco standaardbepaling bij dezelfde golflengte.

Berekening

De standaardcurve bij de biureetmethode is lineair tot een eiwitconcentratie van on-

geveer 150 g.l⁻¹. De berekening van de eiwitconcentratie in melk kan geschieden op grond van een gemeten eiwitstandaard met behulp van de formule:

$$\frac{E_{bep.} - E_{bl.bep.}}{E_{st.bep.} - E_{bl.st.bep.}} \cdot C_{eiwitst.} \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$$

Dichtheidsmeting

De eiwitconcentratie op een pak melk wordt aangegeven in g per 100 g melk. Om dit te kunnen omrekenen in g.l⁻¹ en zo een vergelijking met de gemeten eiwitconcentratie mogelijk te maken werd de dichtheid van de melk bepaald met behulp van een pyknometer en een densimeter. Indien nodig werd er voor de temperatuur gecorrigeerd.

Resultaten en conclusies

De dichtheid van de melk, gemeten met de pyknometer en de densimeter, bedroeg in beide gevallen 1,033 g.ml⁻¹. Omrekening van de opgegeven eiwitconcentratie (g/100 g melk) leverde 36,2 g.l⁻¹ op. De gemeten eiwitconcentratie met behulp van deze methode bedroeg 36,0 g.l⁻¹ (+/- 0,9 g).⁷

De bepaling werd uitgevoerd in het kader van een geïntegreerd praktikum scheidingsnatuurkunde en biologie in het KMLO. Deze eiwitbepaling in melk biedt de mogelijkheid om zowel chemische aspecten, met name het gebruik en de functie van verschillende blanco's (reagens- en monsterblanco) bij fotometrische bepalingen

te belichten, als natuurkundige aspecten, onder andere het meten van de dichtheid van een vloeistof met grote nauwkeurigheid.

Een vergelijking van de eiwitconcentratie in een pak vol halfvolle melk en een pak halfvol volle melk is door ons niet uitgevoerd. Mochten u en uw leerlingen hierin geïnteresseerd zijn dan kunt u bij ons een flesje eiwitstandaardoplossing bestellen.⁴

Literatuur en voetnoten

1. Weichselbaum, T. E., Am. J. Clin. Pathol. 16 (1946), 40.
2. Analysevoorschriften NVKC-RIV, februari 1982.
3. Deze pipetten zijn o.a. verkrijgbaar bij de firma's: Rofa Mavi/Beverwijk en Lancer/'s-Hertogenbosch.
4. Met dank aan Dien Kuypers en Marja v.d. Kieboom. Een flesje eiwitstandaardoplossing (voor 400 bepalingen) is te bestellen door overmaking van f 6,— op rek. 128280123 van de Rabobank Leur (gironr.bank 1102015) t.n.v. Dr. Struycken-Instituut, o.v.v. „EIWIT”.
5. Het blanco biureetreagens geeft tegen water gemeten, een extinctie van 0.
6. J. A. Tijmenssen, B. Taken, „Natuurkunde voor het MLO 1”, Elsevier, 1983, blz. 53 en 138.
7. Verder gaat onze dank uit naar Irene Vlendre en klas KM2 van het studiejaar 1985/1986.

Pipetteerschema:

	bepaling	st.bep.	bl.bep.	bl.st.bep.	reagensblanco
halfvolle melk	0,05 ml	—	0,05 ml	—	—
eiwitstandaard	—	0,05 ml	—	0,05 ml	—
water	—	—	—	—	0,05 ml
biureetreagens	5,0 ml	5,0 ml	—	—	5,0 ml
bl.biureetreagens	—	—	5,0 ml	5,0 ml	—

st.bep. = standaardbepaling
 bl.bep. = blancobepaling
 bl.st.bep. = blanco standaardbepaling
 bl.biureetreagens = blanco biureetreagens