

## CHARAKTERYSTYKA METODY OZNACZANIA AMINOKWASÓW SIARKOWYCH W PASZACH I ŻÓŁTKACH JAJ\*

Robert Gąsior, Krystyna Ślusarczyk

Instytut Zootechniki — Państwowy Instytut Badawczy, Centralne Laboratorium,  
32-083 Balice k. Krakowa

*Scharakteryzowano metodę oznaczania cysteiny/cystyny (Cys) i metioniny (Met). Badania przeprowadzono na próbkach 5 pasz i 10 liofilizowanych żółtek jaj. Przeprowadzone analizy prób ślepych nie wskazywały na konieczność korygowania o ich wyniki zawartości aminokwasów w analizowanych próbkach. Stwierdzono trwałość aminokwasów w roztworach wzorcowych przez co najmniej 110 dni i hydrolizatach próbek przez co najmniej 30 dni (współczynniki zmienności między terminami przechowywania od 0,50% do 4,03%). Powtarzalność i odtwarzalność metody oznaczania aminokwasów siarkowych nie przekraczały 5% (pasje) i 8,5% (żółtka). Niepewności ( $P \leq 0,05$ ) bez uwzględnienia czynnika pochodzącego od analiz materiału referencyjnego wynosiły dla obu aminokwasów 8,98% (pasje) i 13,26% (żółtka). Niepewności ( $P \leq 0,05$ ) z uwzględnieniem powyższego czynnika wynosiły 12,02% i 15,49% (Cys) oraz 22,11% i 24,16% (Met), odpowiednio dla pasz i żółtek. Średnie odzyski wynosiły 96,4% (Cys) i 96,1% (Met). Współczynnik korelacji  $r^2$  prostoliniowej krzywej kalibracyjnej, w zakresie 3–100 mg/L (Cys) i 6–200 mg/L (Met) wynosił co najmniej 0,999. Granice oznaczenia ilościowego wynosiły odpowiednio 3 mg/L i 6 mg/L. Podczas wykonywania rutynowych analiz powinny być sprawdzane: powtarzalność oraz zawartości aminokwasów w próbce kontrolnej.*

Do grupy aminokwasów siarkowych należą cysteina i cystyna oraz metionina. Ze względu na ich duże znaczenie w żywieniu człowieka i zwierząt, niezwykle ważne jest wykorzystywanie zwalidowanych metod oznaczania tych aminokwasów w hydrolizatach pasz i żółtkach jaj. Jedną z technik oznaczania aminokwasów siarkowych jest technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej na odwróconych fazach (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography czyli RP HPLC), przy czym, o ile uzyskano zadowalające wyniki dotyczące zawartości metioniny w hydrolizatach próbek badanych materiałów, o tyle nie udało się w nich poprawnie ilościowo oznaczyć cysteiny/cystyny (Bütikofer i in., 1991). Z tego

---

\* Praca wykonana w ramach działalności statutowej IZ — PIB, temat nr 2103.1.

względu stosowana do oznaczania aminokwasów siarkowych, (choć także innych aminokwasów) technika chromatografii jonowymiennej (Ion-Exchange Chromatography czyli IEC) jest nadal techniką podstawową (Zumwalt i in., 1987; Rayner, 1985). Cysteinę/cystynę (Cys) i metioninę (Met) oznacza się w postaci kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny (*methionine sulphone*) po utlenieniu i kwaśnej hydrolizie białka zawartego w próbce (Rayner, 1985). Uzyskanie wyników możliwie najbardziej wiarygodnych umożliwia wykonywanie analiz po uprzednim zwalidowaniu danej metody analitycznej (PN-EN ISO/IEC 17025:2005). Może temu służyć scharakteryzowanie metody poprzez określenie takich parametrów, jak jej powtarzalność, odtwarzalność, niepewność, odzysk, liniowość, granica oznaczenia ilościowego (Arendarski, 2003; Dobecki, 1998; Ellison i in., 2000), granica powtarzalności oraz trwałość roztworów wzorcowych i hydrolizatów pasz i żółtek jaj. Na podstawie badań walidacyjnych można określić sposoby kontrolowania jakości wyników badań podczas wykonywania rutynowych analiz. Dotychczasowe publikacje dotyczące oznaczania aminokwasów siarkowych nie zawierają niektórych spośród w/w parametrów walidacyjnych, dlatego niniejsza praca jest próbą uzupełnienia tej luki. Jest ona również kontynuacją wcześniejszej pracy, dotyczącej walidacji metody oznaczania aminokwasów w kwaśnych hydrolizatach pasz (Gąsior i in., 2005).

## Materiał i metody

### Odczynniki, aparatura i warunki analizy chromatograficznej

Użyto następujących odczynników: kwasu cytrynowego — monohydratu cz.d.a., stężonego (36%) kwasu solnego (HCl) cz.d.a., kwasu mrówkowego 80% cz.d.a. (POCH, Polska); nadtlenku wodoru 30% cz.d.a., firmy CHEMPUR (Piekary Śl., Polska); wodorotlenku sodowego cz., (STANDARD, Polska); kwasu kaprylowego 98% cz. (SERVA, Niemcy); cytrynianu sodowego — dwuhydratu cz.d.a. i 1-oktanolu 99% cz. (SIGMA, USA); kwasu bromowodorowego 47% cz. (Merck, Niemcy); wody dejonizowanej (H<sub>2</sub>O, z dejonizatora MilliQ-Plus); roztworu ninhydryny — Beckman, USA (nr. kat. 338069); eluent: bufor pH 2,7 (17 g cytrynianu sodowego-dwuhydrat, 10 ml stężonego HCl, woda dejonizowana do 1 L; pH ustalono za pomocą roztworu HCl). Do hydrolizy przygotowywano roztwór kwasu solnego (6 mol/L), rozpuszczając stężony HCl w wodzie w proporcji 1:1 (v/v). Do rozpuszczania próbek po hydrolizie używano buforu, pH 2,2, który otrzymano po rozpuszczeniu w 1,8 L H<sub>2</sub>O: 42 g monohydratu kwasu cytrynowego, 16,8 g NaOH, 32 ml stężonego HCl i 0,2 ml kwasu kaprylowego, ustaleniu pH buforu roztworem HCl i uzupełnieniu H<sub>2</sub>O do objętości 2 l. Mieszaninę utleniającą sporządzano na bieżąco mieszając w stosunku 1:9 (v/v): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) i kwas mrówkowy (80%), po czym schładzano ją przez około 0,5 godziny w lodówce. Roztwór NaOH (10 mol/L) otrzymano po rozpuszczeniu 40 g NaOH w 100 ml H<sub>2</sub>O.

Wykorzystano standardy aminokwasów (Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, USA): kwas asparaginowy, treoninę, serynę, kwas cysteinowy lub uwodniony kwas cysteinowy, sulfon metioniny.

Wykorzystano chromatograf-analizator aminokwasów System Gold AA firmy Beckman, wyposażony w pompę modułową 126 AA, autosampler 502E, detektor UV-VIS 166, kolumnę jonowymienną Spherogel IEX High Performance Sodium Column, reaktor postkolumnowy 232. Dane integrowano przy użyciu programu Gold Nouveau (Beckman). Przeliczeń dokonywano na komputerze w programie Excel. Do przygotowywania próbek użyto liofilizatora Christ Beta, wyparki, kolb do wyparki (100 ml), płaszczy grzejnych i chłodnic zwrotnych, sączków średnich Filtrak 389, sączków strzykawkowych 0,22  $\mu\text{m}$  oraz młynka do mielenia pasz z sitem o średnicy oczek 1 mm.

Cysteinę/cysteinę i metioninę oznaczano w postaci ich form utlenionych (kwas cysteinowy i methionine sulphone). Analizę chromatograficzną przeprowadzono w następujących warunkach:

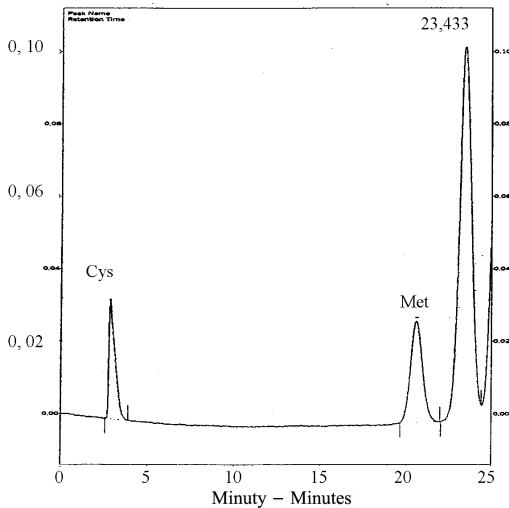
detekcja UV-VIS, długość fali  $\lambda$ : 570 nm, nastrzyk 20  $\mu\text{l}$ , temperatura kolumny 50°C, temperatura reaktora 130°C. Parametry początkowe przepływu eluenta 0,67 ml/min, bufor pH 2,7 (67%), ninhydryna (33%). Czas analizy wraz z regeneracją i stabilizacją kolumny wynosił około 45 minut.

#### **Przygotowanie roztworów wzorcowych, próbek badanego materiału i próbek ślepych oraz obliczanie wyników**

Podstawowy roztwór wzorcowy przygotowywano rozpuszczając w 500 ml buforu pH 2,2 w kolbie miarowej (500 ml) następujące orientacyjne ilości aminokwasów (GM-masa molowa substancji wzorcowej): 0,0105 g kwasu cysteinowego (GM = 169,2) lub 0,0115 g uwodnionego kwasu cysteinowego (kwas cysteinowy  $\times$  H<sub>2</sub>O; GM = 187,2) i 0,023 g sulfonu metioniny (GM = 181,2) oraz 0,033 g kwasu asparaginowego (GM = 133,1); 0,030 g treoniny (GM = 119,1); 0,026 g seryny (GM = 105,1). Wielkość naważki odnotowywano z dokładnością odczytu wagi wynoszącą 0,0001 g. Kwas asparaginowy, treonina, seryna nie były oznaczane według niniejszej metody, ale były dodawane do wzorca w celu ułatwienia interpretacji chromatogramów. Przykładowy chromatogram analizy roztworu wzorcowego przedstawia rys. 1. Powyższy roztwór wraz z roztworem 4-krotnie rozcieńczonym analizowano razem z próbkami. Obliczenia zawartości aminokwasów w próbkach przeprowadzono w oparciu o krzywą kalibracji wykreśloną w programie chromatograficznym Gold Nouveau.

Wykonano analizy 5 pasz: mieszanki dla drobiu i trzody chlewnej, pszenicy, soi, bobiku oraz 10 żółtek jaj liofilizowanych. Pasze mieszano i mielono młynkiem z sitem 1 mm. Przed pobraniem do analizy ponownie mieszano i odważano pobraną z kilku miejsc próbkę reprezentatywną do kolbki wyparkowej (100 ml) w takiej ilości, aby zawierała około 50–75 mg białka ogólnego oznaczonego metodą Kjeldahla, notując wielkość naważki z dokładnością odczytu wagi wynoszącą 0,0001 g, a następnie dodawano 10 ml mieszaniny utleniającej. Żółtka jaj liofilizowano 24 godz., a następnie naważano i dodawano mieszaninę utleniającą analogicznie jak w przypadku pasz. Kolbkę z próbką i mieszaniną utleniającą, zamkniętą korkiem, przetrzymywano w lodówce 16–18 godzin. Następnie dodawano 3 ml 47% HBr, 3 krople 1-oktanolu, po czym przetrzymywano przez około

0,5 godziny w lodówce i odparowywano na wyparce w temp. 37°C. Po 2-krotnym przepłukaniu za pomocą H<sub>2</sub>O, którą za każdym razem odparowywano, zawartość kolbki hydrolizowano z 15 ml HCl (6 mol/L) pod chłodnicą zwrotną przez około 18 godzin. Po schłodzeniu, przepłukaniu H<sub>2</sub>O chłodnic i dodaniu 3 kropeł 1-oktanolu, mieszaninę po hydrolizie odparowywano na wyparce (< 50°C). Osad rozpuszczano w 15 ml buforu pH 2,2 i ustalano pH roztworu do wartości 2,2 za pomocą NaOH (10 mol/L). Następnie roztwór sączono przez sączek średni do kolby miarowej (100 ml), przepłukując buforem pH 2,2 i uzupełniano do 100 ml. Roztwór w ilości około 2 ml przenoszono następnie do fiolki chromatograficznej, filtrując go przez sączek strzykawkowy 0,22 μm. Tak przygotowany roztwór próbki наносono w ilości 20 μl za pomocą autosamplera na kolumnę chromatograficzną. Zawartość aminokwasów w próbce określano w oparciu o krzywą wzorcową (program Gold Nouveau), a ostateczne wyniki uzyskiwano po przeliczeniach w arkuszu kalkulacyjnym programu Excel. W celu stwierdzenia czystości odczynników, wyposażenia i sprawności układu chromatograficznego oraz ich wpływu na wyniki analiz, przeprowadzono badania 4 prób ślepych. Przygotowano je według opisu procedury przygotowania do analiz pasz i jaj, ale z pominięciem dodatku próbki badanego materiału. Przygotowany roztwór próbki ślepej наносono w ilości 20 μl za pomocą autosamplera na kolumnę chromatograficzną.



Rys. 1. Chromatogram analizy roztworu wzorcowego aminokwasów. Analizator aminokwasów Beckman System Gold. Warunki analizy określono w tekście: Analiza chromatograficzna  
 Fig. 1. Chromatogram for analysis of amino acid standard solution. Beckman System Gold amino acid analyser. Analysis conditions are given in the text: Chromatographic analysis

### Badania trwałości roztworów wzorcowych i hydrolizatów

W kolejnych 5 terminach, obejmujących okres łącznie 110 dni, przygotowywano podstawowe roztwory wzorcowe aminokwasów, uzyskując stężenia około 0,065 mmol/L kwasu cysteinowego i około 0,125 mmol/L sulfonu metioniny.

Dokładne stężenia były wyliczane z naważeń każdej substancji wzorcowej, wykonywanych na wadze z dokładnością odczytu wynoszącą 0,0001 g. Roztwory umieszczano w lodówce w temperaturze 2–8°C. Wszystkie roztwory jednocześnie przeanalizowano w powtórzeniu po 110 dniach względem bieżącego roztworu wzorcowego i porównano oznaczone z oczekiwanymi zawartościami aminokwasów w badanych roztworach. Stosunek stężenia oznaczonego do oczekiwanego wyrażono w ujęciu % ( $p\%$ ) dla każdego roztworu wzorcowego przechowywanego przez dany okres (8, 21, 49 i 110 dni). Wartości  $p\%$  wystandaryzowano względem roztworu wzorcowego przechowywanego 1 dzień (100%). Zmienności średnich wystandaryzowanych wartości  $p\%$ , pomiędzy terminami przechowywania roztworu wzorcowego, wyrażono poprzez międzygrupowe współczynniki zmienności  $CV_m$ . Obliczano je według wzoru:

$$CV_m = \frac{100 \cdot SD}{x_{sr}}$$

gdzie:

$SD$  — odchylenie standardowe wystandaryzowanych wartości  $p\%$  pomiędzy terminami przechowywania roztworu wzorcowego.

Trwałość hydrolizatów przebadano w odniesieniu do 5 pasz (mieszanki dla drobiu i trzody chlewnej, soja, pszenica, bobik). Przygotowane w powtórzeniu hydrolizaty rozlano do fiolek chromatograficznych i umieszczono w lodówce w temperaturze 2–8°C. Wykonano analizy na analizatorze aminokwasów, kolejno w 1., 9., 17., 23. i 30. dniu przechowywania hydrolizatów. Określono międzygrupowe współczynniki zmienności  $CV_m$  pomiędzy średnimi zawartościami aminokwasów w hydrolizatach z 5 terminów przechowywania. Przy obliczaniu  $CV_m$  korzystano z analogicznego wzoru, jak w przypadku badań trwałości roztworów wzorcowych.

#### **Badania liniowości kalibracji, granicy oznaczenia ilościowego, powtarzalności i odtwarzalności oraz granicy powtarzalności**

Przygotowywano wyjściowy stężony roztwór wzorcowy mieszaniny aminokwasów, rozpuszczając w 500 ml buforu pH 2,2 w kolbie miarowej (500 ml) ilości substancji wzorcowych, wynoszących około 0,05 g (kwas cysteinowy) i około 0,1 g (sulfon metioniny). Stężony wyjściowy roztwór wzorcowy aminokwasów rozcieńczano 2-, 4-, 8-, 16-, i 32-krotnie. Wszystkie roztwory przeanalizowano w powtórzeniu. Sporządzono krzywe kalibracyjne dla każdego z aminokwasów i obliczono resztowe współczynniki zmienności oraz współczynniki korelacji  $r^2$  równania regresji  $y = ax + b$ . Dolny punkt krzywej kalibracji wykreślonej dla danego aminokwasu wyznaczał granicę jego oznaczenia ilościowego.

Powtarzalność i odtwarzalność (powtórzone analizy tych samych próbek w około tygodniowym odstępie czasu) wyrażono jako skumulowane współczynniki zmienności ( $CV_{kn}$ ) oznaczeń każdego z aminokwasów, liczone z wzoru ( $CV_n^2$  —

współczynnik zmienności analizy  $k$ -tej próbki, każda w powtórzeniu ( $n = 2$ ),  $k$  — liczba przebadanych próbek):

$$CV_{kn} = \sqrt{\frac{\sum_k CV_{n2}}{k}}$$

Skumulowane współczynniki zmienności dotyczące powtarzalności i odtwarzalności oznaczono odpowiednio jako  $CVp$  i  $CVo$ . Granicę powtarzalności zdefiniowano jako podwojoną wartość powtarzalności.

### Badania odzysku i materiału referencyjnego oraz niepewność

Przygotowano 5 różnych roztworów wzorcowych zewnętrznych mieszaniny utlenionych form Cys i Met, w buforze pH 2,2, o stężeniach odpowiednio około 0,06 mmol/L i 0,13 mmol/L. Dokładne stężenia były wyliczane z naważen każdej substancji wzorcowej, wykonywanych na wadze z dokładnością odczytu wynoszącą 0,0001 g. Przygotowano również 5 różnych roztworów wzorcowych o stężeniach odpowiednio około 0,18 mmol/L i 0,39 mmol/L, które przeprowadzono przez procedurę hydrolizy. Odzysk oznaczono przez porównanie pól powierzchni pików aminokwasów pochodzących z obu rodzajów roztworów. Współczynniki zmienności odzysków wyznaczono analogicznie jak w przypadku badań trwałości roztworów wzorcowych i hydrolizatów. Poprawność metody analitycznej, w tym wyznaczonego odzysku, sprawdzono wykonując analizę materiału referencyjnego (masło orzechowe, NIST\*\* SRM 2387). Niepewności były liczone w oparciu o zasady określone w przewodniku Eurachem (Ellison i in., 2000) i przedstawione w postaci względnej % (współczynnika zmienności), przy czym niepewność ( $P \leq 0,05$ ) obliczano z niepewności standardowych ( $P \leq 0,32$ ), korzystając ze współczynnika rozszerzenia  $k = 2$ . Niepewność metody liczone składając niepewności cząstkowe zgodnie z zasadą propagacji Gaussa.

## Wyniki

Piki aminokwasów występujące na chromatogramach prób ślepych były na poziomie szumów pochodzących z detektora, nie było więc konieczności korygowania zawartości aminokwasów w analizowanych próbkach. Wartości międzygrupowych współczynników zmienności  $CVm$  uzyskanych w badaniach trwałości roztworów wzorcowych i hydrolizatów pasz (tab. 1 i 2) wahały się od 0,51% do 1,75% (Cys) i od 0,50% do 4,03% (Met). Kalibracja wykonana na podstawie sporządzonych wzorców aminokwasów wykazuje się liniowością co najmniej w zakresie 3–100 mg/L (kwas cysteinowy) i 6–200 mg/L (sulfon metioniny). Współczynniki korelacji  $r^2$  przekraczały wartość 0,999, a resztowe współczynniki

\*\* — National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, USA.

zmienności równania regresji nie były większe niż 2%. Granice oznaczenia ilościowego wynosiły odpowiednio 3 mg/L i 6 mg/L. Skumulowane współczynniki zmienności dotyczące powtarzalności i odtwarzalności analiz pasz nie przekraczały 5%, a analiz liofilizowanych żółtek jaj 8,5% (granice powtarzalności odpowiednio 10% i 17%). Zawartości aminokwasów w badanych próbkach wraz ze współczynnikami zmienności dla powtarzalności i odtwarzalności podano w tabeli 3. Przykładowy chromatogram analizy próbki liofilizowanego żółtka jaja przedstawia rys. 2. Odzyski obu aminokwasów w przebadanych roztworach, ich średnie wartości oraz współczynniki zmienności przedstawiono w tabeli 4. Porównanie zawartości aminokwasów w materiale referencyjnym, oznaczonych z uwzględnieniem odzysku, z określonymi dla tego materiału wartościami referencyjnymi, przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 1. Wartości międzygrupowych współczynników zmienności  $CV_m$  uzyskanych w badaniach trwałości roztworów wzorcowych

Table 1. Between-group coefficients of variation ( $CV_m$ ) obtained in the standard solution stability tests

Aminokwas Amino acid	Terminy przechowywania (dni) Days of storage (days)					$CV_m$
	1	8	22	49	110	
Cys	100	99,51	99,19	96,60	99,64	1,38
Met	100	99,23	99,28	98,67	98,96	0,50

Tabela 2. Wartości międzygrupowych współczynników zmienności  $CV_m$  uzyskanych w badaniach trwałości hydrolizatów pasz

Table 2. Between-group coefficients of variation ( $CV_m$ ) obtained in the feed hydrolysate stability tests

Aminokwas Amino acid	Mieszanka dla drobiu Poultry feed	Mieszanka dla trzody chlewnej Pig feed	Soja Soybean	Pszenica Wheat	Bobik Field bean
Cys	0,51	0,65	0,98	1,75	0,62
Met	4,03	1,75	1,96	2,18	2,93

Tabela 3. Zawartość Cys i Met w przykładowych paszach i liofilizowanych żółtkach jaj (g/kg) i współczynniki zmienności powtarzalności ( $CV_p$ ) i odtwarzalności ( $CV_o$ )

Table 3. Cys and Met content of sample feeds and lyophilized egg yolks (g/kg) and coefficients of variation for repeatability ( $CV_p$ ) and reproducibility ( $CV_o$ )

Amino-kwas Amino acid	Mieszanka dla drobiu Poultry feed	Mieszanka dla trzody chlewnej Pig feed	Soja Soybean	Pszenica Wheat	Bobik Field bean	$CV_p/CV_o$ pasze $CV_p/CV_o$ for feeds	Żółtka jaj Egg yolks	$CV_p/CV_o$ żółtka jaj $CV_p/CV_o$ for egg yolk
Cys	3,86	2,89	7,63	2,60	3,29	1,70/3,54	5,89	6,20/8,46
Met	5,08	1,98	7,00	1,94	1,87	4,98/5,00	7,22	7,56/7,84

Tabela 4. Wartości odzysków (roztwory wzorcowe przeprowadzone przez procedurę hydrolizy) Cys i Met i współczynniki zmienności (CV)

Table 4. Recovery rates (standard solutions subjected to hydrolysis procedure) of Cys and Met and coefficients of variation (CV)

Aminokwas Amino acid	Odzysk — Recovery (%)					Średni odzysk Mean recovery (%)	CV
Cys	99,4	102,8	94,8	93,6	91,6	96,4	4,7
Met	99,9	102,3	93,6	93,0	91,8	96,1	4,9

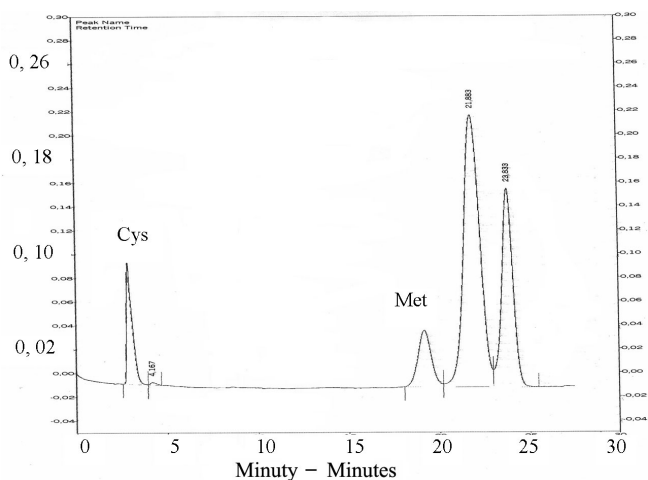
Tabela 5. Porównanie wartości referencyjnych z oznaczonymi w tej pracy zawartościami Cys i Met w materiale NIST SRM 2387

Table 5. Comparison of reference values with Cys and Met values obtained in the present study in NIST SRM 2387 material

Aminokwas Amino acid	Materiał referencyjny NIST SRM 2387 Reference material NIST SRM 2387		Różnica Difference (%)
	wartości referencyjne reference value (g/kg)*	wartości oznaczone values determined (g/kg)*	
Cys	2,7 ± 0,1	2,66 ± 0,19	1,5
Met	2,1 ± 0,4	2,20 ± 0,16	4,8

\* Oprócz wartości (g/kg) podano niepewności dla wartości referencyjnych i wartości oznaczonych.

\* Values (g/kg) are given in addition to uncertainties for reference values and values determined.



Rys. 2. Chromatogram analizy próbki liofilizowanego żółtka jaja. Analizator aminokwasów Beckman System Gold. Warunki analizy określono w tekście: Analiza chromatograficzna

Fig. 2. Chromatogram for analysis of lyophilized egg yolk sample. Beckman System Gold amino acid analyser. Analysis conditions are given in the text: Chromatographic analysis



Autorzy niniejszej pracy określili niepewności metody ( $P \leq 0,05$ ) bez uwzględnienia czynnika niepewności pochodzącego od analiz materiału referencyjnego i z jego uwzględnieniem. W pierwszym przypadku niepewności metody oznaczeń obu aminokwasów wynosiły 8,98% dla analiz pasz i 13,26% dla analiz żółtek jaj liofilizowanych. W drugim przypadku niepewności metody oznaczeń Cys wynosiły 12,02% i 15,49% oraz Met 22,11% i 24,16%, odpowiednio dla analiz pasz i żółtek jaj liofilizowanych.

### Omówienie wyników

Wyniki analiz prób ślepych wskazują na brak czynników zakłócających, istotnie wpływających na zawartość oznaczanych aminokwasów, a pochodzących od użytych do analiz odczynników i wyposażenia. Dlatego też wyniki analiz nie wymagają korygowania o wartości prób ślepych.

Na podstawie niskiej zmienności wyników oznaczeń aminokwasów pomiędzy ich roztworami wzorcowymi przechowywanymi w różnym czasie w temperaturze 2–8°C, stwierdzono, że roztwory te są trwałe przez co najmniej 110 dni od momentu ich sporządzenia. Na podstawie podobnych obserwacji stwierdzono, że roztwory hydrolizatów pasz również przechowywanych w temperaturze 2–8°C są trwałe przez co najmniej 30 dni od czasu ich sporządzenia. Trwałość hydrolizatów jaj liofilizowanych nie była badana. Hydrolizaty te (używane do rutynowych oznaczeń i do wyznaczenia powtarzalności) były jednak przechowywane w takich samych warunkach, jak hydrolizaty pasz. Były również dobrze oczyszczone w trakcie procedury ich przygotowania i do czasu wykonania pełnej analizy (do 30 dni) zachowywały klarowność. Tak więc wnioski dotyczące trwałości hydrolizatów pasz można, chociaż z mniejszym prawdopodobieństwem, rozszerzyć na hydrolizaty jaj liofilizowanych.

Roztwory mieszaniny kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny charakteryzowały się dobrą liniowością, z wysokimi współczynnikami korelacji i niewielkimi odchyleniami wyznaczonych punktów kalibracji względem wykreślonej krzywej regresji  $y = ax + b$ .

Granice oznaczenia ilościowego, określone jako dolne granice liniowości, wynoszące odpowiednio 3 mg/L i 6 mg/L, są wystarczające na potrzeby analiz hydrolizatów próbek pasz i żółtek jaj na zawartość Cys i Met. Można je również odnieść bezpośrednio do ilości oznaczanego materiału. Przykładowo, jeżeli analizę wykonano przy naważce 1 g badanej próbki, to granice oznaczenia ilościowego wynoszą odpowiednio 0,3 g/kg i 0,6 g/kg. Granice te można obniżyć, stosując większe naważki analityczne. Granice oznaczenia ilościowego opisane w niniejszej pracy są podobne do podanych (jako wartości przykładowe) w normie PN-EN ISO 13903:2006.

Za pomocą błędu wyrażonego w oznaczanych jednostkach (odchylenie standardowe *SD*) lub błędu wyrażonego w % (współczynnik zmienności *CV*) można

scharakteryzować powtarzalność i odtwarzalność metody. Z przeprowadzonych badań wynika, że analizy żółtek jaj na zawartość aminokwasów siarkowych obarczone były nieco większą zmiennością niż analogiczne analizy pasz, co jest wynikiem dosyć zaskakującym, biorąc pod uwagę fakt, że próbki jaj powinny być bardziej jednorodne (drobniejszy materiał) niż próbki pasz. Wartości CV dla warunków powtarzalności uzyskane w niniejszych badaniach dla oznaczeń Cys (1,70%) i Met (4,98%) w paszach są podobne do podanych w normie PN-EN ISO 13903:2006 (zał. A, p. A2, wyniki uzyskane w różnych badaniach, od 1,71% do 4,57% dla Cys i od 1,13% do 5,56% dla Met). Wartości CV dla warunków odtwarzalności uzyskane w niniejszych badaniach (3,54% i 5,00% dla Cys i Met, odpowiednio) są niższe od podanych w w/w normie (odpowiednio do 18,96% i do 11,97%). Wynika to z faktu, że warunki, dla których była liczona w niniejszej pracy odtwarzalność, obejmują mniej czynników będących potencjalnymi źródłami błędów (odtworzalność liczona w oparciu o analizy wykonane w jednym laboratorium, ale w różnym czasie) niż warunki odtwarzalności określone w w/w normie (odtworzalność liczona w oparciu o badania międzylaboratoryjne).

W celu oznaczenia cystyny/cysteiny i metioniny w kwaśnych hydrolizatach konieczne jest przeprowadzenie hydrolizy białka w kwaśnym środowisku (6 mol/L kwas solny) po uprzednim utlenieniu aminokwasów (Rayner, 1985). Przyczynia się to do znacznie mniejszych strat tych aminokwasów niż wówczas, gdyby próbki poddawano samej tylko kwaśnej hydrolizie. W tym drugim przypadku straty aminokwasów siarkowych mogą nawet przekraczać 50% (Gehrke i in., 1985). W niniejszej pracy, w której badane próbki przygotowywano przeprowadzając kwaśną hydrolizę białka po uprzednim utlenieniu, straty aminokwasów siarkowych były niewielkie, sięgały średnio około 4% i były podobne do podanych w pracy Sarwara i Bottinga (1993).

W celu stwierdzenia poprawności opisanej metody analitycznej wykonano analizę dostępnego w handlu materiału z określonymi dla niego wartościami referencyjnymi, dotyczącymi zawartości obu aminokwasów. Brak takiego materiału w postaci paszy i jaja liofilizowanego spowodował, że jako materiał referencyjny wybrano masło orzechowe, NIST SRM 2387. Wartości oznaczone niniejszą metodą mieszczą się w przedziałach ufności określonych dla wartości referencyjnych, a różnice procentowe między tymi wartościami są niskie i nie przekraczają 5%. Wyniki analiz materiału referencyjnego dodatkowo potwierdzają poprawność metody analitycznej, w tym dokładność przygotowania próbki i wysokie odzyski obu aminokwasów.

Rozpatrzono dwa przypadki obliczenia niepewności metody:

### **I przypadek**

W niepewności uwzględniono błędy powtarzalności i odtwarzalności, związane z błędami naważania, hydrolizy, pipetowania i przenoszenia w trakcie wykonywania procedury przygotowania próbki oraz związane z błędami oznaczenia chromatograficznego. Niepewności standardowe wartości średniej z 2 pomiarów każdej próbki, a dotyczące powtarzalności i odtwarzalności, wynoszą 3,5% oraz 6,0%, odpowiednio dla analiz pasz i żółtek jaj liofilizowanych. Dodatkowo uwzględniono inne czynniki niepewności (wyrażone jako niepewności standardowe) nie ujęte

w powtarzalności i odtwarzalności, a dotyczące dokładności używanych wag (0,02%) i naczyń miarowych (0,3% dla kolb miarowych i 0,5% dla pipet), a także dotyczące wzorcowania (1,68%). W niepewności wzorcowania wzięto pod uwagę: dokładność i powtarzalność ważenia wzorców i odmierzania roztworów wzorcowych, niepewności czystości wzorca, niepewność dopasowania punktów pomiarowych do krzywej kalibracji oraz niepewność masy cząsteczkowej. Oprócz wyżej wymienionych czynników w niepewności metody uwzględniono także niepewność odzysku (niepewność standardowa 2,19%). Obliczona z zasady propagacji Gaussa, na podstawie w/w niepewności standardowych i przy współczynniku rozszerzenia  $k = 2$ , niepewność metody ( $P \leq 0,05$ ) wyniosła 8,98% dla analiz pasz i 13,26% dla analiz liofilizowanych żółtek jaj.

## II przypadek

Według zaleceń przewodnika Eurchem (Ellison i in., 2000) do niepewności całkowitej metody powinno się włączyć wszelkie zidentyfikowane czynniki niepewności. Do takich czynników należą np. błędy związane z biasem, które mogą być określone na podstawie badań porównawczych z materiałem referencyjnym (jeżeli bias jest nieistotny, to co prawda nie włącza się go do niepewności metody, ale pozostałe czynniki związane z biasem, takie jak np. niepewność materiału referencyjnego, do tej niepewności należy włączyć). Jednak materiał referencyjny powinien być wiarygodny, z określonymi dla niego wartościami referencyjnymi, najlepiej certyfikowanymi i odpowiadać rodzajem matrycy materiałom badanim. Niestety nie zawsze jest to możliwe. Poza tym, o ile dostępne są materiały, które zostały przebadane na zawartości danych substancji, to zawartości te często posiadają status nie certyfikowanych wartości odniesienia, o charakterze informacyjnym. Tak jest właśnie w przypadku opisanym w niniejszej pracy. W związku z tym nie jest do końca jasne, czy w niepewności metody oznaczania Cys i Met należy uwzględnić niepewność związaną z zastosowanym materiałem referencyjnym (dane NIST — niepewności standardowe: 4% dla oznaczeń Cys i 10,1% dla oznaczeń Met). Jeśli tak, to niepewności metody ( $P \leq 0,05$ ) wynoszą dla oznaczeń Cys 12,02% i 15,49%, a dla oznaczeń Met 22,11% i 24,16% (odpowiednio dla analiz pasz i żółtek jaj liofilizowanych). Duży wzrost niepewności (po uwzględnieniu czynnika pochodzącego od analiz materiału referencyjnego) oznaczeń Met, (22,11% vs. 8,98% i 24,16% vs. 13,26%) wynika, w przeciwieństwie do oznaczeń Cys (12,02% vs. 8,98% i 15,49% vs. 13,26%), z dużej wartości niepewności materiału referencyjnego, określonej dla pierwszego z wymienionych aminokwasów. Niepewność, wraz z wynikiem traktowanym jako średnia z pomiarów, ma znaczenie praktyczne przy jego interpretacji i określa przedział tolerancji, w jakim powinna się znaleźć z prawdopodobieństwem 95% rzeczywista wartość wyniku oznaczenia. Niepewności metody bez czynnika pochodzącego od analiz materiału referencyjnego należy traktować jako niepewności oznaczeń w jednym laboratorium. Niepewności metody, w których uwzględniono udział czynnika pochodzącego od analiz materiału referencyjnego są parametrami poszerzonymi o oznaczenia w innych laboratoriach (np. w badaniach NIST). Wobec powyższych uwag wartości obliczone dla tego drugiego przypadku mają charakter informacyjny. Niepewność

powinna być kontrolowana przy każdej analizie próbek przez sprawdzanie powtarzalności i może być większa w przypadku tych analiz, które mimo wykonania powtórnych badań nie spełniają kryterium powtarzalności.

Ustalono, że podczas wykonywania analiz sprawdzane będą: powtarzalność oraz zawartości aminokwasów w próbce kontrolnej. W tym celu określono granice powtarzalności (odpowiednio 10% i 17% dla analiz pasz i żółtek jaj), których nie powinno się przekraczać w więcej niż 5% przypadków podwójnie wykonywanych analiz każdej próbki. Na próbkę kontrolną wybrano wcześniej przebadaną pod kątem zawartości aminokwasów soję.

### Piśmiennictwo

- Arendarski J. (2003). Niepewność pomiarów. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej. Warszawa.
- Bütikofer U., Fuchs D., Bosset J.O., Gmür W. (1991). Automated HPLC-amino acid determination of protein hydrolysates by precolumn derivatization with OPA and FMOC and comparison with classical ion exchange chromatography. *Chromatographia*, 31, 9/10: 441–447.
- Dobecki M. (1998). Zapewnienie jakości analiz chemicznych. Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera Press, Łódź.
- Ellison S.L.R., Rosslein M., Williams A. (Ed). (2000). Quantifying uncertainty in analytical measurement. Eurachem/Citac Guide 2000.
- Gašior R., Ślusarczyk K., Szczypuła M. (2005). Validation of a method for determining amino acids in acid hydrolysates of feeds. *Ann. Anim. Sci.*, 5, 1: 181–197.
- Gehrke Charles W., Wall Larry L.Sr, Absheer Joseph S., Kaiser Floyd E., Zumwalt Robert W. (1985). Sample preparation for chromatography of amino acids : acid hydrolysis of proteins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68, 5: 811–821.
- Rayner Carl J. (1985). Protein hydrolysis of animal feeds for amino acid content. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 4: 722–725.
- Sarwar G., Botting H.G. (1993). Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. *J. Chrom.*, 615: 1–22.
- Zumwalt R.W., Absheer J.S., Kaiser F.E., Gehrke C.W. (1987). Acid hydrolysis of proteins for chromatographic analysis of amino acids. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70, 1: 147–151.

Zatwierdzono do druku 21 IX 2006

ROBERT GAŠIOR, KRYSZYNA ŚLUSARCZYK

**Characteristics of the method for determination of sulphur amino acids in feeds and egg yolks**

### SUMMARY

This paper describes a method for determination of cysteine/cystine (Cys) and methionine (Met). The study was carried out using samples of 5 feeds and 10 lyophilized egg yolks. Analysis of blind tests showed that they did not have to be adjusted for the amino acid content of the samples analysed. Amino acids were found to be stable in standard solutions for at least 110 days and in sample hydrolysates for at least 30 days (variation coefficients between storage times ranging from 0.50 to 4.03%). The repeatability and reproducibility of the sulphur amino acid determination method did not exceed 5% for

feeds and 8.5% for yolks. Uncertainties ( $P \leq 0.05$ ) without including the factor obtained from the analysis of the reference material were 8.98% (feeds) and 13.26% (yolks) for both amino acids. Uncertainties ( $P \leq 0.05$ ) with the above factor included were 12.02 and 15.49% (Cys) and 22.11 and 24.16% (Met) for feeds and yolks, respectively. Mean recovery was 96.4% (Cys) and 96.1% (Met). The coefficient of linear regression  $r^2$  for the calibration curve of 3–100 mg/L (Cys) and 6–200 mg/L (Met), was at least 0.999. The limit of quantitation was 3 and 6 mg/L, respectively. During routine analyses, repeatability and amino acid content of the control sample should be validated.

**Key words:** amino acids, cysteine, methionine, validation, uncertainty