

| | |
|------------------------------|---|
| Stofnaam | Pepsine |
| Type methode | Enzymatisch |
| Te onderzoeken in | Mengvoeders; diervoedergrondstoffen en enkelvoudige diervoeders |
| Minimum bepaalbaarheidsgrens | - |
| Herhaalbaarheid | |
| Reproduceerbaarheid | |
| Categorie | A |
| Titel | Bepaling van de pepsine-activiteit. Bijlage I. Derde richtlijn van de Commissie van 27 april 1972 betreffende de vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van veevoeders (72/199/EEG). Publicatieblad van de EG 29-5-1972; Nr L 123/12-14 |

BEPALING VAN DE PEPSINE-ACTIVITEIT

1. Doel en toepasbaarheid

Dit voorschrift beschrijft de methode voor de controle van de activiteit van de pepsine, die wordt gebruikt voor de bepaling van ruw eiwit, oplosbaar in pepsine en zoutzuur.

2. Beginsel

Hemoglobine wordt onder vastgestelde omstandigheden behandeld met pepsine en verdund zoutzuur. Het niet gehydrolyseerde gedeelte van de eiwitten wordt met trichloorazijnzuur geprecipiteerd. Aan het filtraat wordt natronloog en het reagens volgens Folin-Ciocalteu toegevoegd. De extinctie van deze oplossing wordt gemeten bij 750 nm en de hiermee corresponderende hoeveelheid tyrosine wordt afgelezen van een ijkgrafiek.

Definitie: De pepsine-eenheid (E) wordt gedefinieerd als die hoeveelheid enzym, die onder de omstandigheden van de methode zoveel hydroxyarylverbindingen vrijmaakt, dat na kleuring met het Folin-Ciocalteu-reagens een extinctie verkregen wordt, die overeenkomt met die van 1 μmol tyrosine onder dezelfde omstandigheden.

3. Reagentia

3.1 Zoutzuur 0,2 N.

3.2 Zoutzuur 0,06 N.

3.3 Zoutzuur 0,025 N.

3.4 Trichloorazijnzuuroplossing 50 g/l.

3.5 Natronloog 0,5 N.

3.6 Reagens volgens Folin-Ciocalteu: breng 100 g natriumwolframaat, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25g natriummolybdaat, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 700 ml water in een rondbodempol van 2 l met ingeslepen stop. Voeg toe 50 ml fosforzuur ($d = 1,71$) en 100 ml geconcentreerd zoutzuur ($d = 1,19$). Verbind de kolf met een terugvloeiakoeler, verhit de oplossing tot koken en houdt deze gedurende 10 h zachtjes aan de kook. Laat afkoelen, verwijder de terugvloeiakoeler en voeg toe 175 g lithiumsulfaat, $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 ml water en 1 ml broom. Laat gedurende 15 minuten koken, om de overmaat broom te verwijderen.

Laat afkoelen, breng de oplossing over in een maatkolf van 1 l, vul aan met water tot de streep, meng en filtreer. De oplossing mag geen groene kleur vertonen. Verdun vóór gebruik 1 volumedeel reagens met 2 volumedelen water.

- 3.7 Hemoglobine-oplossing: weeg af een hoeveelheid van (ca. 2 g) hemoglobine, protease-substraat volgens Anson, die overeenkomt met 354 mg stikstof (¹¹) en breng deze in een kolf van 200 ml met ingeslepen stop. Voeg enkele ml zoutzuur (3.2) toe, sluit de kolf aan op de vacuümpomp en schud tot de hemoglobine volledig opgelost is. Hef het vacuüm op en voeg onder omzwenken zoveel zoutzuur (3.2) toe als nodig is om de hoeveelheid zoutzuur aan te vullen tot 100 ml. *Vóór gebruik vers bereiden.*
- 3.8 Standaardtyrosine-oplossing: los op 181,2 mg tyrosine in zoutzuur (3.1) en vul aan met hetzelfde zuur tot 1 l (stamoplossing). Verdun 20,0 ml van deze oplossing met zoutzuur (3.1) tot 100 ml. 1 ml van deze oplossing bevat 0,2 µmol tyrosine.

4. Apparatuur

- 4.1 Waterbad met ultrathermostaat, ingesteld op 25°C ± 0,1°C.
- 4.2 Spectrofotometer.
- 4.3 Chronometer, nauwkeurigheid: 1 sec.
- 4.4 pH-meter.

5. Uitvoering

- 5.1 Bereiding van de oplossing (zie opmerking 7.1)

Los 150 mg pepsine op in 100 ml zoutzuur (3.2). Pipetteer 2 ml van de oplossing in een maatkolf van 50 ml en vul aan met zoutzuur (3.3) tot de streep. De met de pH-meter gemeten pH moet 1,6 ± 0,1 bedragen. Plaats de kolf in het waterbad (4.1).

- 5.2 Hydrolyse

Pipetteer 5,0 ml hemoglobineoplossing (3.7) in een reageerbuis en breng in het waterbad (4.1) op een temperatuur van 25°C. Voeg daarna toe 1,0 ml van de in punt 5.1 verkregen pepsine-oplossing en meng door ongeveer 10 maal op en neer bewegen met een glasstaaf, die aan het uiteinde is afgeplat.

Plaats de buis gedurende precies 10 minuten in het waterbad (4.1) van 25°C, gerekend vanaf de toevoeging van de pepsine-oplossing (tijd en temperatuur moeten nauwkeurig worden aangehouden). Voeg vervolgens toe 10,0 ml trichloorazijnzuuroplossing (3.4), die van tevoren op een temperatuur van 25°C is aangebracht, meng en filtreer door een droog filter.

- 5.3 Ontwikkeling van de kleur en meting van de extinctie

Pipetteer 5,0 ml van het filtraat in een conische kolf van 50 ml, voeg toe 10,0 ml natronloog (3.5) en onder voortdurend omzwenken 3,0 ml verdund reagens volgens Folin-Ciocalteu (3.6). Meet na 5 à 10 minuten de extinctie van de oplossing tegen water in cuvetten van 1 cm, met behulp van de spectrofotometer bij 750 nm.

¹ Bepaal het gehalte aan stikstof volgens een semi-microkjeldahlmethode (theoretisch gehalte: 17,7% N).

5.4 Blancobepaling

Verricht bij iedere bepaling een blancoproef zoals hieronder beschreven. Pipetteer 5,0 ml hemoglobine-oplossing (3.7) in een reageerbuis, verwarm dit in een waterbad (4.1) op 25°C. Voeg dan hieraan toe 10.0 ml trichloorazijnzuuroplossing (3.4), die vantevoren op een temperatuur van 25°C is gebracht, meng en voeg vervolgens 1,0 ml van de in punt 5.1 verkregen pepsine-oplossing toe. Meng met behulp van de glasstaaf en plaats de reageerbuis gedurende precies 10 minuten in het waterbad (4.1) bij 25°C. Meng en filtreer door een droogfilter. Handel verder zoals beschreven onder punt 5.3.

5.5 IJkgrafiek

Breng in conische kolven van 50 ml hoeveelheden van 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 en 50 ml standaardtyrosine-oplossing (3.8), overeenkomend met respectievelijk 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 en 1,0 µmol tyrosine. Voeg aan de reeks nog een kolf toe zonder tyrosine. Breng met zoutzuur (3.1) op een volume van 5,0 ml. Voeg toe 10,0 ml natronloog (3.5), alsmede onder voortdurend omzwenken 3,0 ml verdund reagens volgens Folin-Ciocalteu (3.6). Bepaal de extinctie zoals aangegeven in de laatste zin van punt 5.3. Stel de ijkgrafiek op door de extincties uit te zetten tegen de toegevoegde hoeveelheden tyrosine.

6 Berekening van de resultaten

Lees uit de ijkgrafiek af de hoeveelheid tyrosine in µmol, die overeenkomt met de extinctie van de gekleurde oplossing, gecorrigeerd met de blanco.

De pepsine-activiteit in µmol tyrosine mg en per minuut, bij 25°C, wordt berekend uit de volgende formule:

$$\text{Eenheden per mg (E/mg)} = 0,32 \cdot \frac{a}{g}$$

waarin:

a = hoeveelheid tyrosine in µmol, afgelezen uit de ijkgrafiek

g = gewicht in mg van de hoeveelheid pepsine, toegevoegd onder 5.2

7. Opmerkingen

7.1 De op te lossen hoeveelheid pepsine moet zodanig worden gekozen, dat bij de uiteindelijke fotometrische meting een extinctie wordt verkregen van $0,35 \pm 0,035$.

7.2 2 E/mg, bepaald volgens deze methode, komen overeen met 3,64 milli-eenheden Anson/mg (µmol tyrosine/mg; min bij 35,5°C) of met 36400 handelseenheden/g (µmol tyrosine/g; 10 minuten bij 35,5°C).