

Hidroxirolin meghatározására alkalmazott módszerek összehasonlító vizsgálata

BÁLINT MIHÁLY

Megyei Élelmiszerellenőrző és Vegyvizsgáló Intézet, Zalaegerszeg

Érkezett: 1977. szeptember 7.

A húsipar által előállított készítmények különböző minőségű alapanyagok meghatározott – az anyagnorma szerinti – arányú keverékből készülnek.

A szokásos minősítő jellemzőket a kötőszövet-tartalom meghatározása kiegészíti, és a készítmény átfogóbb bírálatára nyit módot.

A kötőszövet-tartalom meghatározására két, elméletileg is különböző módszer alkalmazható:

A *hisztometriai módszer* alkalmazásánál a termék metszéspapjain rásztermikroszkóppal meghatározzák az egyes szövetfélésekkel fedett felszíni pontokat, majd a több (legkevesebb 10) metszéspapra elvégzett számlálást felhasználva minősítik a terméket. Összehasonlításként ellenőrzött körülmények között készült termék értékelése szolgál (1).

A módszer rendkívül időigényes. A felszíni adatok térfogatra, illetve súlyra való átszámítása nehézkes.

A másik meghatározási mód analitikai-kémiai, a kollagén egy speciális aminosav alkotórészéhez kötődik. A kollagén mintegy 13%-ban tartalmaz hidroxiprolint. A hidroxiprolin meghatározott körülmények között oxidálva pirrollá alakul. A képződött pirrol savas közegben p-dimetilamino-benzaldehiddel (p-DABA) vörös színezéket alkot, amelynek intenzitása követi Beer – Lambert törvényét, és így a mennyiségi meghatározást lehetővé teszi (2).

A reakciókörülményekben a különféle meghatározási leírások eltérő kezelési módokat írnak le. Vizsgálataink során a rutinfeladatok elvégzésére való alkalmasságot tekintettük a legfontosabb szempontnak; és az 5 különféle meghatározási módot e szempontból vizsgáltuk (3, 4).

A rutinméréssel kapcsolatosan a következőket tartottuk szem előtt:

1. A reakció a normál ipari laboratórium körülményei, illetve megszokott módszerei alkalmazásával kivitelezhető legyen.
2. A reakció végrehajtásához minél kevesebb részfolyamatra legyen szükség.
3. A reakció-egybebe minél kevesebb egymás utáni bemerést legyen szükséges elvégezni.
4. Végül a fotometrálskor kialakuló szín minél hosszabb ideig őrizze meg maximális intenzitását, és 1 órán belül ne csökkenjen az eredeti intenzitás 90%-ára.

Az említett módszerek összehasonlító elemzése után alakítottuk ki a szempontjainknak legjobban megfelelő meghatározási módot.

A különféle hidrolizismódok összehasonlítása

A szinképzésben igen jónak bizonyult a korábról ismert módosított *Stege-man*, ill. az ISO/DIS (6, 7) eljárás. A hidrolízis ezen két eljárásnál 6 n sósavval refluxon, illetve 6 n sósavval cinkoxid mellett történt. A sósavas hidrolízis helyett a kénsavas-szárítószekrényes hidrolizismódot tartottuk a szempontjainknak legmegfelelőbbnek, kisebb eszköz- és csökkent felügyeleti igénye miatt.

A következő hidrolizismódokat hasonlítottuk össze: I. 6 n kénsavas, II. 6 n kénsavas 1 g ón(II) klorid mellett, III. 6 n sósavas refluxon és IV. 3 n nátrium-hidroxidos.

Modellanyagként párizsit (A), olasz felvágottat (B) és nyári turista felvágottat (C) alkalmaztunk; 2–2 párhuzamos hidrolizátumot készítettünk, majd minden hidrolizátumból 2–2 szinképzés készült. A mért extinkciókat táblázatban adtuk meg. A mért értékek mellett feltüntettük azokat a II. hidrolízissel nyert extinkció százalékában is (1. táblázat).

1. táblázat

Különböző modellanyagok extinkciója és a II. hidrolízissel nyert extinkció százalékában feltüntetett értékek

	A		B		C	
I.	0,401	86,2	0,440	91,1	0,636	90,9
II.	0,465	100	0,487	100	0,700	100
III.	0,473	101,7	0,483	99,2	0,707	101,0
IV.	0,512	110,1	0,625	128,3	0,814	116,3

A = párizsi

B = olasz felvágott

C = nyári turista felvágott

I. = 6 n kénsavas hidrolízis

II. = 6 n kénsavas hidrolízis 1 g ón(II)klorid mellett

III. = 6 n sósavas hidrolízis refluxon

IV. = 3 n nátrium-hidroxidos hidrolízis

A mérési eredményekből látható, hogy a kénsavas ónklorid melletti és a sósavas refluxon történő hidrolízissel közelítően egyező eredmények nyerhetők, az eltérés 2%-on belüli. A kénsavas üres hidrolizátum lényegesen kisebb értékeket eredményezett, bár az eltérés nagysága az ISO-szabvány előírásait még így is kielégítené.

A lúgos hidrolizálással lényegesen magasabb extinkcióértékek nyerhetők a szinképzésnél. Ennek magyarázatául kínálkozik, hogy a lúgos hidrolízisnél kevésbé károsodó kéntartalmú aminosavak zavarják a meghatározást.

Az üres kénsavas hidrolizátumból kiszűrésre kerülő anyagrészeket – feltételezve, hogy nem volt teljes a hidrolízis – ismételt hidrolízisnek vetettük alá sósavas refluxon. Az ismételt hidrolizálás szűrletéből azonban a hígítási viszonyokat figyelembe véve sem volt kimutatható a hidroxiprolin, a színreakció nem jelentkezett.

A hidrolizátumokat szűrés után szobahőmérsékleten tároltuk, a többi reakciólépcső oldataival együtt.

A hígított és semlegesített oldatok általában megromlottak. A törzsoldatok hosszú ideig károsodás nélkül tárolhatók, a színük megsötétedik, de még két hónap után is azonos hidroxiprolinértékek mérhetők az oldatokból.

A húsipari gyakorlatban alkalmazott mérési módszerek és a kötőszövet-tartalom meghatározására ajánlott módszerek pontosságának összehasonlítása

Matematikai-statisztikai megfontolások miatt (8, 9, 10) a mérések összehasonlíthatóságához minden mérési típusnál 12 – 12 értékelhető adatot nyertünk.

A víz, zsír és számított fehérje szokásos, százalékos megadási módjait, míg a kötőszövet-tartalomnál a közvetlenül mérhető extinkcióértékeket hasonlítottuk össze. A kötőszövet-tartalomnál 6 – 6 párhuzamos hidrolízis készült, és ezek kerültek a szinképzéshez kétszerezésre. A számolással nyerhető adatokat táblázatosan adtuk meg (2. táblázat).

2. táblázat

Kötőszövet-tartalom meghatározási módszerek pontosságának összehasonlítása

	A	B	C	D	E
Vörösáru (párizsi)					
Víz I.	67,02	0,33	0,49	0,120	0,179
Víz II.	61,81	0,88	1,424	0,259	0,419
Zsír I.	17,5	2,0	11,44	0,670	3,84
Zsír II.	24,0	2,0	8,33	0,732	3,05
Szám. fehérje I.	12,48	1,89	15,14	0,589	4,72
Szám. fehérje II.	11,19	1,62	14,47	0,511	4,57
Kötőszövet A.	0,208	0,036	17,3	0,0113	5,43
B.	0,303	0,039	12,87	0,0127	4,19
C.	0,286	0,035	12,2	0,0112	3,92
Nyári turista felvágott					
Víz I.	34,55	1,47	4,25	0,435	1,26
Víz II.	32,05	1,58	4,92	0,491	1,53
Zsír I.	43,40	3,0	6,91	0,995	2,29
Zsír II.	46,17	2,0	4,33	0,577	1,25
Szám. fehérje I.	18,04	1,94	10,75	0,671	3,72
Szám. fehérje II.	17,78	0,97	5,46	0,338	1,90
Kötőszövet A.	0,556	0,073	12,12	0,025	4,51
B I.	0,524	0,064	12,21	0,021	4,01
B II.	0,445	0,056	12,56	0,016	3,59
C.	0,467	0,052	11,13	0,015	3,14

A = a mérések átlaga (12 párhuzamos)

B = a terjedelem (a sorozat legnagyobb és legkisebb tagjának különbsége)

C = a terjedelem az átlagértékek százalékában

D = a mérések szórása

E = a variációs együttható (a szórás az átlagérték százalékában)

A kötőszövet-tartalom módszerei:

A = a módosított *Stegeman* módszer

B = az általunk ajánlott módszer

C = az ISO/DIS módszere

Az eredményekből látható, hogy a fehérjetartalom és esetenként a zsírtartalom meghatározásánál mind a terjedelem, mind a variációs együttható nagyobb értékeket ad, mint a kötőszövet-tartalmat reprezentáló extinkció érték. A mennyiségi arányokat is figyelembe véve megállapítható, hogy a kötőszövet-tartalom meghatározására szolgáló módszerek mindegyike jobb, mint a klasszikus meghatározási módok egy része.

Hús és húskészítmények kötőszóvetartalmának meghatározása hidroxiprolin tartalmuk alapján

Szükséges vegyszerek

Kénsavoldat 30%-os: 375 cm³ analitikai tisztaságú tömény kénsavat hígítunk mérőlombikban 2 literre.

Hidroxiprolin törzsoldat: 50 mg analitikai tisztaságú hidroxiprolint analitikai mérleg 0,1 mg pontossággal lemérünk, vízben feloldjuk, 1 cm³ 0,1 n sósavat adunk hozzá, és 100 cm³-es mérőlombikban vízzel jelig töltjük. Hűtőszekrényben mintegy két hétig eltartható.

Citrát-acetát puffer: 50 g 1 kristályvizes citromsavat, 12 cm³ jégecetet, 120 g nátriumacetátot oldunk 800 cm³ vízben 1 l-es mérőlombikban. A pH-értéket ecetsavval, illetve nátriumhidroxiddal 6-ra állítjuk, majd jelig töltjük. Néhány csepp toluóllal konzerváljuk. Hűtőszekrényben néhány hónapig eltartható. A pufferoldat készítéséhez analitikai tisztaságú vegyszereket használunk fel.

Kristályos ón-II-klorid, analitikai tisztaságú. Nátriumhidroxid oldat 25%-os, analitikai tisztaságú vegyszerből.

Klóramin-T oldat: 1,40 g klóramin-T-t 25 cm³ víz és 25 cm³ n-propanol elegyében oldunk. Az oldatot citrát-acetát pufferrel 100 cm³-re egészítjük ki.

Színképző reagens: 10 g p-dimetilamino-benzaldehydet oldunk 35 cm³ 60%-os perklorosavban, és röviddel a felhasználás előtt 65 cm³ i-propanollal elkeverjük. A színképző reagenst naponta frissen kell készíteni.

Eszközök és készülékek

Erlenmeyer lombik 250 cm³-es; mérőlombik 100, 200, 500, 1000 és 2000 cm³-es; pipetták; vízfürdő; aprítóberendezés (tárcsás húsdaráló vagy ezzel azonos aprítást biztosító forgókéses készülék, pl. elektromos kávéörlő); mikrobüretták; fotométer vagy spektrofotométer; tölcsér; szűrőpapír; csiszolt dugós kémcső; szárítószekrény; analitikai mérleg; indikátorpapír.

A minta előkészítése

A vizsgálandó mintát 3 mm-es lyukbőségű tárcsás húsdarálón kétszer ledaráljuk, majd összekeverve jól záródó üveg vagy műanyag edénybe tesszük.

Eljárás

5 g 10 mg-nyi pontossággal bemért homogenizált mintát 250 cm³-es Erlenmeyer lombikba helyezünk. 1 g kristályos ónkloridot és 50 cm³ 30%-os kénsavoldatot mérünk rá. A lombikot óraüveggel lefedjük, majd 16 órára 105 °C-ú szárítószekrénybe helyezzük hidrolizálás céljából. A lehűtött hidrolizátumot 200 cm³-es mérőlombikba mossuk, jelig öntjük, analitikai szűrőpapíron szűrjük. A szűrlet 10 cm³-ét 200 cm³-es mérőlombikba pipettázzuk, majd 25%-os nátriumhidroxiddal pH = 8-ra állítjuk be indikátorpapír segítségével. Jelig öntjük, a leváló ónhidroxid csapadékot legkevesebb 1 óráig, de célszerűen egy éjjel állni hagyjuk, majd szűrjük. A szűrletet szükséghez képest tovább hígítjuk.

2 cm³-t a hígított hidrolizátumból kémcsőbe mérünk, hozzáadunk 1 cm³ klóramin-T oldatot, összekeverjük és 20 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd 1 cm³ színképzőt adunk hozzá. Kevés csapadék képződik, ami aldehidkiválás. Sorozatvizsgálatok kivitelezésénél először minden kémcsőbe bemérjük a színképzőt, majd ezután jól összerázzuk, a csapadék ekkor feloldódik. A reagensek adagolásához jól alkalmazható félautomata pipettázóberendezés vagy mikrobüretta. A kémcsőveket lazán bedugjuk, majd 30'-re 60 ± 1 °C-ú vízfürdőbe helyezzük. Folyóvízben lehűtjük. 10' múlva a képződött színezéket a reakció-vakpróbával szemben 560 nm-nél mérjük. A színezék mintegy 90'-ig színálló.

Vakpróba: 2 cm³ desztillált vízzel végezzük el a fent leírt eljárást.

A kalibrációs görbe elkészítése:

A hidroxiprolin törzsoldatból 5 cm³-t 500 cm³-re hígítunk. Ebből 5, 10, 20, 30, 40, 50 cm³-t veszünk ki és 100 cm³-re hígítjuk. Az így nyert oldatok rendre 2 cm³-ben 0,5 . . . 5 μg/2 cm³ hidroxiprolint tartalmaznak. Az oldatokat a meghatározásnál leírtak szerint kezeljük és a képződött színezéket fotométerrel mérjük. A mért eredmények alapján elkészítjük a kalibrációs egyenest. A koordináta rendszerben független változóként a bemért hidroxiprolin mennyiségeket, míg függő változóként a megfelelő extinkció értékeket vesszük fel.

A nyert egyenes felhasználásával a hidrolizátum hidroxiprolin-tartalma megadható.

Az extinkció optimuma 0,1–0,6 között tekinthető.

Az eredmény kifejezése:

$$K\% = \frac{P \cdot V \cdot 8}{G} \cdot 100$$

Ahol K = a kollagén kötőszövet mint a bemért anyagmennyiség hányada

P = a mért hidroxiprolin mennyisége μg-ban

G = a vizsgálatra bemért anyag súlya g-ban

V = a hígítás mértéke (a leírt esetben 4000)

8 = a kollagén kötőszövet és a talált hidroxiprolin mennyisége közötti átszámítási faktor

A fehérjére vonatkoztatott kollagén kötőszövet-tartalom (Q) százalékban:

$$Q\% = \frac{K\%}{F\%} \cdot 100$$

ahol K% = az előző számítással nyert érték

F% = a Kjeldahl-fehérjetartalom %-ban (N.6,25)

IRODALOM

- (1) Weiss, H., Hildebrandt, G.: D. L. R. 70, 237, 1974.
- (2) Möhler, K., Niemann, F.: Z. U. L. 156, 1, 1974.
- (3) Möhler, K., Antonopoulos, N.: Z. U. L. 106, 25, 1957.
- (4) Szeredy, I.: ÉVIKE 16, 43, 1970.
- (5) Wylér, O. D.: Fleischwirtschaft 52, 42, 1972.
- (6) Arneht, W., Hamm, R.: Z. U. L. 145, 85, 1971.
- (7) DRAFT INTERNATIONAL STANDARD ISO/DIS 3496/UDC. 637,5:547 747)
- (8) Zukal E. és Kórmendy, L.: Minőségi és technológiai jellemzők értékelésének matematikai-statisztikai módszerei az élelmiszeriparban. MEM Mernök- és Vezetőképző Intézet Bp. 1974.
- (9) Bronstein, I. N., Szemengyaljev K. A.: Matematikai zsebkönyv. Műszaki Könyvkiadó Bp. 1974.
- (10) MSZ 256–56. R. 1.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОКСИПРОЛИНА

М. Балитт

Автор сравнивает пять разных методов определения известных из литературы; на основании результатов автор разработал метод рутинного измерения применяемого и в промышленных условиях. Сравнивает репродуцируемость методов определения гидроксипролина с остальными химическими методами применяемых при контроле качества в мясной промышленности.

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER ZUR BESTIMMUNG VON HYDROXYPROLIN VERWENDETEN VERFAHREN

M. Bálint

Fünf verschiedene, in der Literatur beschriebene Bestimmungsverfahren wurden miteinander verglichen. Auf Grund der Ergebnisse wurde eine auch unter den industriellen Verhältnissen anwendbare routinmässige Messmethode entwickelt. Die Reproduzierbarkeit der Bestimmungsmethoden des Hydroxyprolins wurde mit der der anderen in der Fleischindustrie zur Qualitätskontrolle verwendeten chemischen Verfahren verglichen.

COMPARATIVE INVESTIGATION OF METHODS APPLIED FOR THE DETERMINATION OF HYDROXYPROLINE

M. Bálint

Five different methods described in literature were compared with each other. On the basis of the results a routine method applicable also under industrial conditions was developed. The reproducibility of the methods for the determination of hydroxyproline was compared with that of other chemical methods used in the quality control of products of the meat industry.