

Fotometrické stanovenie bielkovín v pekárskych výrobkoch

MICHAL GRODOVSKÝ

Jednou z najčastejšie vykonávaných analýz v potravinách a krmovinách je stanovenie bielkovín. Mnoho vedeckých článkov, ako aj nových prístrojov na odbornom trhu svedčí o tom, že napriek tomu, že Kjeldahlova metóda oslávila nedávno storočnicu svojho zavedenia, záujem o nové metódy na stanovenie bielkovín neustáva.

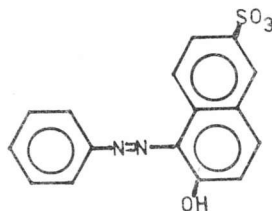
Príčiny tohto javu sú viaceré. Klasická metóda podľa Kjeldahla stanovuje dusík prevediteľný za podmienok reakcie na amoniak. Množstvo bielkovín, ktoré sa potom zo stanovenia vypočíta násobením špecifickým faktorom, pohybujúcim sa v medziach 5,3—6,4 pre jednotlivé druhy analyzovaných vzoriek, sa preto zvyčajne nazýva hrubý proteín. Metóda, hoci viackrát modifikovaná a dnes už automatizovaná, má viacero nevýhod. Predovšetkým je to nevyhnutnosť pracovať s koncentrovanou kyselinou sírovou (vznik nepríjemných plynov kyslíčnika siričitého a sírového), ďalej zdĺhavosť stanovenia a iné.

Pozornosť analytických chemikov sa preto zamerala na iné, rýchlejšie metódy, ktoré sú zároveň aj špecifickejšie. Prehľad o týchto metódach prináša z času na čas odborná tlač. V ostatnom čase je to u nás napr. Příbelova analýza prírodných látok [1] alebo Davídková rukoväť [2].

Jedným z nových smerov pri stanovení bielkovín je použitie fotometrických metód. Boli to napr. Udy [3] a Schober a Hetzel [4], ktorí použili farbivá oranžovú G a amidovú čiernu 10B na stanovenie proteínov v pokrutinách, resp. v krvnej plazme. Hurrell a Carpenter [5] preskúšali a zhodnotili tri farbivá, oranžovú 12, krezolovú červenú a remazolovú modrú na stanovenie výšky tepelného poškodenia potravinárskych bielkovín. Kasprovicz a Gruszka [6] vyskúšali amidovú čiernu 10B a azokarmín B na stanovenie bielkovín v potravinách a poľnohospodárskych surovinách s dobrým výsledkom.

My sme sa v rámci riešenia štátnej úlohy venovali preskúšaniu a zavedeniu fotometrickej metódy na stanovenie bielkovín v pekárskych výrobkoch. Ako farbivo sme zvolili kyslú oranžovú G, alebo ako sa dnes bežne v literatúre označuje, oranžovú 12. Dostupnosť farbiva — jednoduchá syntéza, získanie po krátkom prečistení v definovanom stave, ako aj autorovo osvojenie si techniky počas krátkej zahraničnej stáže, rozhodli o jeho voľbe.

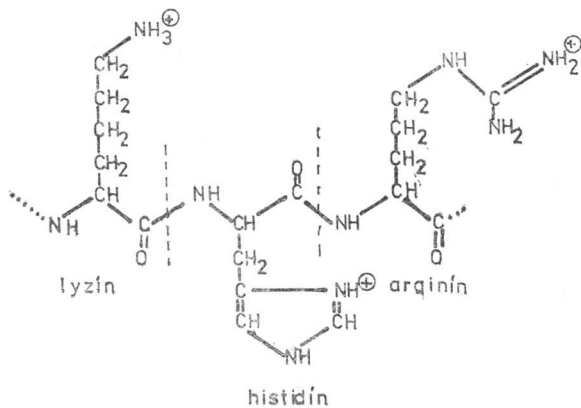
Oranžová 12 je azofarbivo, ktoré sa pripravuje diazotáciou anilínu a následnou kopuláciou s 2-hydroxy-6-naftalénsulfónovou kyselinou. Má takýto štruktúrny vzorec:



Oranžová 12

Podstatou stanovenia bielkovín pomocou oranžovej 12 je jej reakcia s bá-
zickými aminoskupinami bielkovín. Sú to najmä aminokyseliny lyzín, histidín
a arginín, ktoré reagujú so sulfoskupinou oranžovej 12. Ždá sa, že malé množ-
stvo farbiva viaže aj škrob prítomný vo vzorke. Podstata tejto reakcie nie je
presne známa, možno sú to nejaké proteínové mostíky v škrobe, ktoré sú
zodpovedné za túto vedľajšiu reakciu a spotrebu farbiva. Preto treba stanoviť
pre jednotlivé druhy krmív, prípadne potravín, regresnú rovnicu, resp. kalib-
račnú priamku alebo stanoviť faktor.

Na simulovanom proteínovom reťazci zloženom zo spomenutých bá-
zických aminokyselín, sú znamienkom + vyznačené miesta, na ktoré sa viaže farbivo.



Simulovaný proteínový reťazec

Udy, autor metódy, vyvinul špeciálny prístroj, ktorý sa skladá z reaktora,
dávkača a spektrofotometra. Spektrofotometer má prietokovú kyvetu,
ktorá umožňuje priame meranie absorbancie vzorky bez riedenia pri štandardnej
vlnovej dĺžke. Aj v Európe sú odborné firmy (Tecator, Foss Electric a iné),
ktoré ponúkajú zariadenia na priame meranie. Kvôli rozšíreniu tejto rýchlej

metódy aj v laboratóriách, ktoré nevlastnia potrebné zahraničné prístroje, prepracovali sme metodiku bez použitia týchto prístrojov.

Metodická časť

Prístroje a pomôcky. Fotometer (napr. Spekol), homogenizátor (mixér, mlynček na kávu, príp. porcelánová trecia miska), stolová centrifúga.

Reagencie. 1. Roztok farbiva: Návažok 3,9 mmolu oranžovej 12 (1,3 g) sa rozpustí v 1 litri fosfátového tlmivého roztoku. Návažok sa najprv rozpustí za tepla v 100 ml tlmivého roztoku, po ochladení sa doplní do litra.

2. Fosfátový tlmivý roztok: Pripraví sa rozpustením 3,4 g fosforečnanu dihydrogéndraselného (KH_2PO_4), 1,7 ml 85 % kyseliny fosforečnej (alebo alikvotné množstvo inej koncentrácie), 60 ml ľadovej kyseliny octovej (98—100 %), 1 ml kyseliny propiónovej a 1 g kyseliny šťaveľovej. Najprv sa oddelene rozpustia v malom množstve vody fosforečnan dihydrogéndraselný a kyselina šťaveľová, vlejú sa do 800 ml vody, do ktorej sa postupne pridávajú ostatné chemikálie. Po vytemperovaní sa banka doplní po značku. Roztok sa použije na prípravu roztoku farbiva.

Pracovný postup. Návažok vzorky volíme taký, aby obsahoval okolo 15 mg dusíka. V prípade pekárskeho výrobku a múky je to okolo 0,8 g. Pekárske výrobky pred navážením opatrne vysušíme pri max. 60 °C (333 K), osejeme napr. sitom (očko 0,63 mm, drôt 0,4 mm). Ak použijeme spôsob v trecej miske na reakciu farbiva so vzorkou, nemusí byť natolko jemno preosiata. K vzorke pridáme 40,0 ml roztoku farbiva a miešame, najlepšie elektromagnetickou miešačkou 3 minúty. Po skončení vzorku centrifugujeme alebo presajeme cez fritu G-4. Z číreho filtrátu pipetujeme 1,00 ml do 100 ml odmernej banky a doplníme po značku. Takisto zriedime aj základný roztok farbiva. Absorbanciu vzoriek, ako aj zriedeného farbiva meriame pri 480 nm. Absorbancia zriedeného základného roztoku farbiva má byť blízka 0,6, absorbancia vzorky blízka 0,3.

Filtrovať pracovné roztoky farbiva pred meraním cez filtračný papier sa neodporúča, pretože absorbuje premenlivé množstvá farbiva a skresľuje tak výsledok.

Výpočet. Udy na výpočet bielkovín uvádza vzorec

$$P = \frac{VC' - (V + v)C}{kn},$$

kde P je % bielkovín vo vzorke, V — ml pridaného farbiva (40 ml), C' — koncentrácia farbiva v základnom roztoku (1,3 g v 1 litri), v — objem vzorky, zvyčajne zanedbateľne malý, C — koncentrácia farbiva v rovnovážnom stave, k — špecifický faktor pre jednotlivé druhy vzoriek (sú to vlastne deg farbiva viazané 1 g proteínu vzorky), n — návažok vzorky v g.

V našom laboratóriu sme upravili vzorec takto

$$P = \frac{A' - A}{nk},$$

kde A' je absorbancia základného farbiva zriedeného v pomere 1 : 99 (zvyčajne okolo 0,6), A — absorbancia roztoku farbiva v rovnováhe so vzorkou po zriedení 1 : 99.

Ostatné symboly majú význam ako v prvom vzorci. Pri vynesení hodnôt A oproti P (stanoveného napr. Kjeldahlovou metódou) získame priamku závis-

Tabuľka 1. Stanovenie bielkovín v pečive

Vzorka	n	A	P	k	DBC	Relatívna chyba %
1	0,7023	0,330	10,83	0,0355	10,98	+ 1,43
2	0,6994	0,335	10,83	0,0350	10,83	0,00
3	0,7016	0,340	10,54	0,0352	10,59	+ 0,46
4	0,7021	0,345	10,54	0,0345	10,38	— 1,55
5	0,7007	0,350	10,26	0,0349	10,19	— 0,65
6	0,7005	0,342	10,26	0,359	10,52	+ 2,56
7	0,7015	0,335	10,83	0,349	10,79	— 0,34
8	0,7015	0,340	10,83	0,342	10,59	— 2,22
$\bar{k} = 0,0350$ $S_{n-1} = 5,4 \cdot 10^{-4}$						$S = -0,31$

n — návažok vzorky v g, A — absorbancia vzorky pri 480 nm, P — bielkoviny stanovené na prístroji Kjel-Foss Automatic, k — faktor vypočítaný podľa vzorca $k = \frac{0,6 - A}{n P}$, kde 0,6 je A' , DBC — bielkoviny vypočítané podľa vzorca $DBC = \frac{0,6 - A}{n k}$, relatívna chyba = $\frac{(DBC - P)}{P} \cdot 100$.

Tabuľka 2. Stanovenie bielkovín v bielom chlebe (slovenský výberový)

Vzorka	n	A	P	k	DBC	Relatívna chyba %
1	0,8003	0,320	10,83	0,0323	10,47	— 3,28
2	8008	325	10,83	317	10,28	— 5,06
3	8040	325	10,26	333	10,25	— 0,18
4	8012	330	10,26	328	10,08	— 1,66
5	7998	305	10,83	341	11,04	+ 1,97
6	8021	300	10,83	345	11,20	+ 3,39
7	8012	310	10,83	334	10,84	+ 0,06
8	8006	315	10,83	329	10,66	— 1,59
9	8013	300	10,83	346	11,21	+ 3,51
10	8025	302	10,83	343	11,12	+ 2,66
11	8019	297	11,12	340	11,32	+ 1,74
12	8016	300	11,12	337	11,21	+ 0,77
$k = 0,0334$ $S_{n-1} = 1,106 \cdot 10^{-3}$						$S = + 2,33$

Vysvetlivky ako pod tab. 1.

losti, ktorá pre mlieko a sóju prebieha začiatkom sústavnej osi — za predpokladu rovnakého návažku. Látky obsahujúce väčšie percento škrobu viažu určité množstvo farbiva na škrob, takže priamka pretína os y (os absorbancie) v určitej výške. Závislosť je však aj tu priamková. Vhodnou metódou na zistenie hodnoty k je vybrať reprezentatívny súbor vzoriek skúmaného tovaru, kde súčasne stanovíme percentuálny obsah proteínov niektorou klasickou metódou a spektrofotometricky pomocou farbiva. Z grafu, prípadne výpočtom (príklady pozri v tab. 1—3) stanovíme hodnotu k , ktorú potom použijeme pri ďalších analýzách neznámych vzoriek tohto druhu. V tabuľkách používame symbol DBC, ktorý sa používa na stanovenie bielkovín v anglosaskej literatúre (dye binding capacity — kapacita na viazanie farbiva).

Tabuľka 3. Stanovenie bielkovín v tmavom chlebe

Vzorka	n	A	P	k	DBC	Relatívna chyba %
1	0,8036	0,280	10,83	0,0368	11,12	+ 2,71
2	8004	285	10,83	363	10,99	+ 1,51
3	8000	295	10,83	352	10,65	— 1,67
4	8002	292	10,83	355	10,75	— 0,73
5	8007	275	11,40	356	11,34	— 0,55
6	8007	277	11,40	354	11,27	— 1,16
7	8023	295	10,83	351	10,62	— 1,95
8	8003	297	10,83	349	10,58	— 2,35
9	8022	287	10,83	360	10,90	+ 0,64
10	8023	290	10,83	357	10,79	— 0,34
11	8001	280	10,83	369	11,17	+ 3,16
12	8007	280	10,83	369	11,16	+ 3,08
13	8003	292	10,83	355	10,75	— 0,74
14	8003	295	10,83	352	10,65	— 1,70
$k = 0,0358$ $s_{n-1} = 6,86 \cdot 10^{-4}$						$S = -2,19$

Vysvetlivky ako pod tab. 1.

Diskusia

Ako porovnanie výsledkov získaných pomocou fotometrickej metódy a klasickou Kjeldahlovou metódou na automatickom prístroji ukazuje, je táto metóda stanovenia bielkovín je dostatočne presná. Relatívne chyby sa pohybujú v rozmedzí ± 3 %, iba jeden prípad sa vyskytol, kde dosiahla relatívna chyba 5 %. Priemerná relatívna chyba pri stanovení bielkovín v pečive bola $1,15 \pm 0,93$ %, v bielom chlebe $2,16 \pm 1,49$ %, v čiernom chlebe $1,59 \pm 0,96$ %. Pritom má pred Kjeldahlovou metódou niekoľko výhod. Predovšetkým je rýchlejšia, v priemere možno získať výsledok za 5 minút, kým aj automatickou Kjeldahlovou metódou to trvá 15 minút. Nedávno uverejnil Sepp [7] obsiahle porovnanie metód na stanovenie bielkovín. Vo svojom porovnaní uvažoval s prístrojom Udytec, ktorý sme nemali k dispozícii, ale ani naša modifikácia metódy, ako sme v našich pokusoch dokázali, netrvá oveľa dlhšie,

a nie sú náklady na dovoz. Podľa jeho úvah sa vyplatí prístroj Udytec za predpokladu 2000 pracovných hodín za rok a zisku 10 centov za jednu analýzu už za pol roka, automatický prístroj Kjell-Foss Automatic až za sedem rokov. Náklady na jeden rozbor sme nemohli vypočítať, lebo niektoré chemikálie (oranžová 12) sme pripravovali laboratórne. Sepp v svojom prehľade uvádza cenu pre Udytec 0,15 centov, pre Kjell-Foss Automatic 1,45 centov.

Určitým nedostatkom fotometrickej metódy je, že je porovnávajúca. Ako sme už uviedli, treba pre rozličné druhy vzoriek používať rozličné faktory. Nehodí sa na stanovenie bielkovín v rozličných zmesiach s kolísavým zložením. Naopak, je veľmi vhodná na sériové analýzy, napr. pri šľachtiteľskom výbere najvhodnejších odrôd alebo v závodných laboratóriách. Možno ju použiť aj na sledovanie nutričnej hodnoty potravinárskych výrobkov. Pomocou tejto metódy možno zachytiť aj zmeny využiteľného lyzínu spôsobené napr. nevhodným tepelným ošetrovaním alebo dlhým skladovaním.

Súhrn

Opisuje sa spektrofotometrická metóda využívajúca reakciu oranžovej 12 s aminokyselinami na stanovenie bielkovín v pekárenských výrobkoch. Porovnanie metódy s klasickou Kjeldahlovou metódou ukázalo, že navrhovaná metóda je dostatočne presná a oproti Kjeldahlovej metóde rýchlejšia a lacnejšia. Je vhodná najmä na sériové analýzy v závodných laboratóriách.

Autor ďakuje spolupracovníkom A. Štangovej a L. Kompaníkovi za technickú pomoc pri experimentálnej práci.

Literatúra

1. PRÍBELA, A.: Analýza prírodných látok v požívatinách. Bratislava, Alfa 1978, s. 78—83.
2. DAVIDEK, J. a spol.: Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, SNTL 1977, s. 181—182.
3. UDY, D. C.: Improved dye method for estimating protein. J. Amer. Oil Chem. Soc., 48, 1971, č. 1, s. 29A—33A.
4. SCHÖBER, R. — HETZEL, H. F.: Milchwissenschaft, 11, 1956, s. 123.
5. HURRELL, R. — CARPENTER, K. J.: The use of three dye-binding procedures for the assessment of heat damage to the food proteins. Brit. J. Nutr., 33, 1975, s. 101—115.
6. KASPROWICZ, A. — GRUSZKA, M.: Kolorymetryczne oznaczenie białka w żywności. Przem. spoż., 26, 1972, s. 264—266.
7. SEPP, R.: Rapid protein determination. Stärke, 31, 1979, s. 57—63.

Гродовски, М.

Фотометрическое определение белков в пищевых продуктах

Выводы

Описание спектрофотометрического метода использующего реакцию оранжевого 12 с аминокислотами для определения белков в пищевых продуктах. Сравнение метода с классическим методом Кьельдаля показало, что предлагаемый метод является доста-

точно точным и в разницу от метода Къельдаля более интенсивным и более дешевым. Вышеприведенный метод годный для серийных анализов в заводных лабораториях.

Grodovský, M.

Photometric determination of proteins in bakery products

Summary

Description of spectrophotometric method, utilizing the reaction of orange — 12 to amino acids for proteins determination in bakery products. Comparison with classical Kjeldahl method has demonstrated, that proposed method is sufficient precise and compared to Kjeldahl method faster and cheaper. It is suitable especially for serial analyses in works laboratories.