CH – 12.14

Stanovenie obsahu hydroxiprolínu v mäse a v mäsových výrobkoch.

1. Oblasť použitia

Táto metóda popisuje postup pre stanovenie obsahu hydroxiprolínu v mäse a v mäsových výrobkoch.

2. Pojem

Pod obsahom hydroxiprolínu vo výrobkoch uvedených v bode 1 sa rozumie obsah hydroxiprolínu zisteného tu popísaným postupom. Udáva sa v g/100 g vzorky.

3. Stručný popis

Vzorka sa rozruší varením v kyseline chlorovodíkovej. Po odstránení tuku dôjde ku oxidácii hydroxiprolínu použitím chloramínu T. Oxidakčný produkt tvorí s 4-dimethylaminobenzaldehydom červeno sfarbenú zlúčeninu. Extinkcie meraných roztokov, ktoré obsahujú tieto zlúčeniny sa merajú fotometricky pri asi 558 nm. Táto hodnota je priamo úmerná obsahu hydroxiprolínu.

4. Chemikálie

Ak nie je uvedené inak, používajú sa chemikálie čistoty p.a. Voda musí byť destilovaná alebo zodpovedajúcej čistoty.
4.1 Kyselina chlorovodíková, c(HCl)= asi 6 mol/l (asi 6 N) [1)]
4.2 Petrolbenzín, bod varu 60 až 80 ^{o}C
4.3 Pufrovací roztok s pH asi 6,8
26,0 g monohydrátu kyseliny citrónovej, 14,0 g hydroxidu sodného a 78,0 g bezvodého octanu sodného sa rozpustia asi v 500 ml vody, pridá sa 100 mg sodnej soli 2-merkapto-(etylmerkurium)-benzénkarboxilovej ($C_9H_9HgNaO_2S$) (p.a.). Roztok sa prenesie kvatitatívne do 1000 ml odmernej banky. Po pridaní 250 ml 1-propanolu sa odmerka doplní po značku vodou.
Roztok sa chráni pred svetlom, skladuje sa pri 4 ^{o}C. Je stály 2 mesiace.

4.4 Porovnávacie roztoky hydroxyprolínu

4.4.1 Základný roztok hydroxiprolínu, e (HP)=600 mg/l [1)]

120 mg hydroxiprolínu (pre biochemické účely) sa rozpustí vo vode, roztok sa dá do 200 ml odmernej banky a doplní po značku vodou. [Pred doplnením sa môže

základný roztok konzervovať pridaním 50 mg sodnej soli 2-merkapto-(etylmerkurium)-benzénkarboxilovej ($C_9H_9HgNaO_2S$) (p.a.)].

4.4.2 Pracovný roztok hydroxiprolínu, e (HP)=6 mg/l
5 ml základného roztoku 4.4.1 sa napipetuje do 500 ml odmernej banky a doplní po značku vodou.

4.4.3 Štandartný roztok hydroxiprolínu
Z pracovného roztoku hydroxiprolínu 4.4.2 sa napipetuje po 10 ml, 20 ml, 30 ml popr. 40 ml do 100 ml odmerných baniek. Po pridaní asi 30 mg sodnej soli 2-merkapto-(etylmerkurium)-benzénkarboxilovej ($C_9H_9HgNaO_2S$) (p.a.) sa doplní vodou po značku. Koncentrácia štandartného roztoku je 60, 120, 180 popr. 240 µg hydroxiprolínu/100 ml.
Tieto štandartné roztoky sú pro izbovej teplote stále asi 1 týždeň, pri teplote 4 ^oC asi 2-3 mesiace.

4.5 Oxidačné činidlo
1,4 g chloramínu T (trihydrát) sa rozpustí v 100 ml pufrovacieho roztoku (4.3).
Pri ochrane pred svetlom a pri teplote 4 ^oC je činidlo stále asi 1 týždeň.

4.6 Farebné činidlo
10,0 g 4-dimetylaminobenzaldehydu (p.a.) sa rozpustí v 35 ml kyseliny perchlórovej (w = asi 60 %) [1)], hustota asi 1,53 g/ml). Potom sa pomaly pridá 65 ml 2-propanolu.
Roztok sa pripravuje v deň použitia.

5. Prístroje a pomocný materiál

5.1 Hliníková alebo umelá fólia
5.2 Guľaté alebo Erlenmayerove banky 100 ml, NS 29, s vzdušným alebo vodným spätným chladičom
5.3 elektrický zohrievač, napr. termoblok, termočapica, termoplatňa alebo pieskový kúpeľ, prednostne s časovým spínačom
5.4 sklenený lievik, priemer asi 100 mm
5.5 skladaný filter, priemer 18,5 cm
5.6 Erlenmayerove banky, 500 ml, úzke hrdlá
5,7 Vodný kúpeľ s termostatom, s možnosťou nastavenia teploty 60 $^oC \pm 0,5$ ^oC
5.8 Sklenené kyvety, hrúbka 1 cm
5.9 spektrálny fotometer alebo fotoelektrický kolorimeter s interferenčným filtrom, ktorého absorbčné maximum je asi pri 558 nm.

---

[1]) w = hmotnostný zlomok
c = mólová koncentrácia
e = hmotnostná koncentrácia

6. Odber vzoriek

Odber vzoriek nie je súčasťou metódy špecifikovanej v tomto metodickom pokyne. Ak neexistuje špecifická medzinárodná norma na odber vzoriek skúšaného výrobku, odporúča sa, aby sa zúčastnené strany na tomto postupe dohodli.

7. Postup skúšky

7.1 Príprava vzorky
Pozri STN 57 0185 Skúšanie mäsa, mäsových výrobkov a mäsových konzerv a hotových jedál v konzevách. Chemické a fyzikálne metódy.

7.2 Stanovenie
7.2.1 Asi 4 g dobre zhomogenizovanej vzorky sa bezprostredne alebo pomocou navažovačky odváži z hliníkovej alebo umelej fólie s presnosťou 1 mg do 100 ml guľatej alebo Erlenmayerovej banky. Pridá sa 30 ml kyseliny chlorovodíkovej a pár sklenených guličiek. Roztok sa uvedie do varu a varí pod spätným chladičom 8 hodín.
7.2.2 Hydrolyzát sa kvantitatívne prenesie pomocou vody do 500 ml odmernej banky, pridá sa asi 5 ml petrolbenzínu a doplní sa vodou po značku tak, aby vrstva petrolbenzínu s rozpusteným tukom bola nad značkou. Po dôkladnom premiešaní sa odsaje vrstva petrolbenzínu s tukom a vodná fáza sa cez skladaný filter zfiltruje do 500 ml Erlenmayerovej banky.
Hydrolyzát sa môže pri izbovej teplote uchovať asi týždeň, v chladničke 4 týždne.
7.2.3 Z hydrolyzátu sa pripraví vhodné riedenie tak, aby očakávaná koncentrácia bola v rozmedzí 0,6 – 2,4 mikrog/ml. To sa pripraví zriedením vhodného objemu (V) hydrolyzátu podľa 7.2.2. (spravidla 10 ml) s vodou v 250 ml odmernej banke.
7.2.4 4 ml zriedeného hydrolyzátu podľa 7.2.3 sa napipetuje do banky (do skúmavky), pridá sa 2 ml oxidačného činidla, zamieša sa a nechá stáť pri izbovej teplote 20 min±1 min. Potom sa pridá 2 ml farebného činidla. Po dôkladnom zamiešaní sa banka (skúmavka) vloží do vodného kúpeľa pri 60 ^{o}C ± 0,5 ^{o}C na dobu 15 min. Potom sa banka (skúmavka) ochladí pod prúdom tečúcej vody na laboratórnu teplotu a nechá sa stáť pri laboratórnej teplote pol hodiny. Extikcia roztoku sa meria pri asi 558 nm v 1 cm sklenených kyvetách.
7.2.5 Slepý pokus sa pripraví podľa 7.2.4. Avšak 4 ml zriedeného hydrolyzátu sa nahradia 4 ml vody. Nameraná extinkcia slepého pokusu sa odčíta od nameraných extikcií vzoriek.

7.3 Kalibračná priamka

Pre zostrojenie kalibračnej priamky sa opakuje meranie podľa 7.2.4 s 4 ml štandartného roztoku hydroxiprolínu podľa 4.4.3 (zodpovedajúce 2,4; 4,8; 7,2; popr. 9,6 μg hydroxiprolínu) namiesto zriedeného hydrolyzátu.
Od nameraných extinkcií štandardov sa odčíta podľa 7.2.5 hodnota slepého pokusu.

Poznámky ku bodom 7.2.5 a 7.3:
Stanovenia slepých hodnôt ako aj kalibračné hodnoty hydroxiprolínu sa vykonávajú dvakrát.

8. Vyhodnotenie

8.1 Grafické vyhodnotenie

Extinkčné hodnoty štandartných roztokov podľa 7.3 sa nanesú oproti obsahom hydroxiprolínu v μg/ml na milimetrový papier.
Pri zriedených hydrolyzátoch s neznámou koncentráciou hydroxiprolínu sa z kalibračnej priamky priradí zmeranej extinkcii koncentrácia x v μg/ml .
Koncentrácie pod 0,6 μg/ml sa nemôžu hodnotiť, lebo v tejto oblasti nie sú kalibračné hodnoty vyjadrené priamkou. V tomto prípade sa musí stanovenie opakovať riedením o vyššej koncentrácii.

8.2 Vyhodnotenie výpočtom kalibračnej priamky
Výpočet kalibračnej priamky sa urobí pomocou 4 meracích párov zo štandartných hydroxiprolínových roztokov (7.3).

Koncentrácia hydroxiprolínu v μg/ml	Extinkcia
$x_1 = 0,6$	y_1
$x_2 = 1,2$	y_2
$x_3 = 1,8$	y_3
$x_4 = 2,4$	y_4

8.2.1 Výpočet parametrov kalibračnej priamky

Vypočíta sa lineárna funkcia y= a + bx. Parametre a (nenulový úsek – približne hodnota slepého pokusu) a b (smernica) sa vypočíta podľa metódy minimálneho súčtu štvorcov odchýlok.

$$a = \frac{\sum x.\sum y - \sum x^2.\sum y}{\left(\sum x\right)^2 - n.\sum x^2} \qquad (1)$$

$$b = \frac{\sum x.\sum y - n.\sum xy.}{\left(\sum x\right)^2 - n.\sum x^2} \qquad (2)$$

Po dosadení horeuvedených koncentrácií hydroxiprolínu štyroch štandartných roztokov za x, rovnice (1) a (2) prejdú do nasledovných vzorcov

$$a = y_1 + 0,5\ y_2 - 0,5\ y_4 \qquad (3)$$
$$b = -0,5\ y_1 - 0,17\ y_2 + 0,17\ y_3 + 0,5\ y_4 \qquad (4)$$

8.2.2 Kontrola kalibračnej priamky

Po výpočte parametrov a a b kalibračnej priamky sa po sebe zmerané extikcie y_1 až y_4 štandartných roztokov dosadia do jednej z nasledujúcich rovníc

$$y = a + bx \qquad (5)$$

$$x = \frac{y - a}{b} \qquad (6)$$

pre x sa potom musi získať najväčšie možné priblíženie k teoretickým hodnotám 0,6; 1,2; 1,8; a 2,4 μg/ml.

8.2.3 Výpočet koncentrácie hydroxiprolínu v zriedenom hydrolyzáte

Koncentrácia hydroxiprolínu x v μg/ml v zriedenom hydrolyzáte (7.2.3) sa vypočíta z nameranej extinkcie y podľa rovnice (6).
Koncentrácie pod 0,6 μg/ml a nad 2,4 μg/ml. sa nemôžu hodnotiť (Pozri odsek 8.1).

8.3 Výpočet

Obsah hydroxiprolínu w v g/100 g vzorky sa vypočíta podľa nasledovnej rovnice

$$w = \frac{12{,}5.x}{m.V}$$

V je objem hydrolyzátu v ml, ktorý bol použitý pre zriedenie na 250 ml (7.2.3)
x je koncentrácia hydroxiprolínu v μg/ml stanovenej podľa 8.1 alebo 8.2
m je navážka vzorky v g

Ako výsledok sa udáva aritmetický priemer z 2 stanovení z oddelených navážok zaokrúhlený na dve desatinné miesta, ak sú splnené podmienky opakovateľnosti podľa 8.4.

8.4 Spoľahlivosť metódy

8.4.1 Opakovateľnosť (r)

r = 0,014 g/100 g $\qquad$ $s_r = \pm$ 0,0048 g/100 g

8.4.2 Reprodukovateľnosť (R)

R = 0,05 g/100 g $\qquad$ $s_R = \pm$ 0,0153 g/100 g

9. Protokol o skúške

Protokol musí najmenej obsahovať:

- typ a pôvod vzorky
- dátum odobratia vzorky
- dátum príjmu a skúšania vzorky
- použitá metóda
- výsledok skúšania

Protokol o skúške musí obsahovať všetky informácie potrebné na úplnú identifikáciu vzorky.

Literatúra

Úradná zbierka vyšetrovacích metód podľa § 35 Zákona o potravinách Spolkovej republiky Nemecka. Metóda 06.00-8 Vyšetrovanie potravín. Stanovenie obsahu hydroxiprolínu v mäse a v mäsových výrobkoch.