

Kis koncentrációjú élelmiszer-komponensek meghatározása enzimes analitikával I.

ÉLELMISZEREK GLÜKÓZTARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA GLÜKÓZ-SZELEKTÍV ELEKTROD-SZETT ALKALMAZÁSÁVAL*

BOGDÁN JÓZSEFNÉ, GASZTONYI KÁLMÁN,
HARKAYNÉ VINKLER MARGIT, IVÁNKOVITS GERTRÚD
Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Élelmiszerkémiai Tanszéki Csoport, Budapest

Érkezett: 1988. július 15.

Az élelmiszerek bonyolult összetételű rendszerek, amelyekben a táplálkozás-élettani, a minőségi szempontból érdeklődésre számotartó komponensek csak igen kis koncentrációban vannak jelen. Kimutatásuk a klasszikus analitikai módszerekkel nem minden esetben valósítható meg.

A biológiai rendszerek összetevőinek meghatározásában nagy jelentőségű az enzimek alkalmazása, amely a következő két alapvető tulajdonságukra vezethető vissza.

- fajlagosságuk folytán speciális komponensek kimutatását is lehetővé teszik,
- környezeti tényezőkre való nagy érzékenységük folytán gátló, gyorsító stb. külső behatások nyomónkövetésére is felhasználhatók.

Az enzimes analitikával a következő típusú mérések végezhetőek el:

- metabolit analízis, amely alkalmas az élelmiszerminőség szempontjából kiemelt összetevők pl. szénhidrátok, savak, vitaminok mérésére,
- izmanalitikai mérések pl. a technológiailag káros enzimhatások vizsgálata,
- effektorok pl. növényvédőszer-maradékok mérése,
- nemkívánatos alkotórészek pl. hamisítások kimutatása (TÖRLEY, VÁMOSNÉ 1978, VÁMOSNÉ 1984).

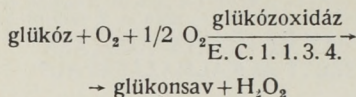
Magyarországon az enzimes analitika a hetvenes években haladt nagyobb lépésekkel előre. A jól bevált, gyors módszerek elterjedését azonban akadályozza, hogy az enzimek jelentős részét csak importból lehet beszerezni. A hazai élelmiszeripari minőségellenőrzésnek is pedig fel kellene zárkóznia a nemzetközileg elfogadott minősítési rendszerekhez, amelyekben rangos helye van az enzimes analitikának. Ezért az enzimes analitika kiszélesítéséhez kerestük azokat a lehetőségeket, amelyekhez a feltételek a hazai piacon valuta nélkül megteremthetők. Így jutottunk el a RADELKIS által gyártott elektród szetthez, a glükóz enzimes meghatározásához.

Glükóz-meghatározás enzimes módszerrel

Elterjedt módszer a szénhidrátok meghatározására az enzimes eljárás, ugyanis a klasszikus kémiai eljárások nem specifikusak és csupán egy fajta szénhidrát jelenlétében adnak kielégítő eredményt. Cukorelegyek összetétele csak gázkromatográfiával, nagynyomású folyadékromatográffal határozható meg. Ezeknél sokkal egyszerűbbek, kevésbé műszerigényesek és ugyanakkor érzékenyebbek az izmanalitikai eljárások, amelyekről PÓLACSEK – RÁCZ (1980, 1983) adott áttekintést. Az enzimes mérések között az egyik legismertebb glükóz meghatározási

* Az OKKFT G-8 kutatási program keretében készült dolgozat, melynek támogatásáért köszönetet mondunk.

eljárás a glükózoxidázzal történő vizsgálat, amelyben következő reakció elvén megy végbe a kimutatás:



A folyamat nyomkövethető a fogyott oxigén manometriás, polarográfias, elektrokémiai (oxigénelektrod) meghatározásával, vagy a keletkező glükonsav titrimetriás, potenciometrikus mérésével.

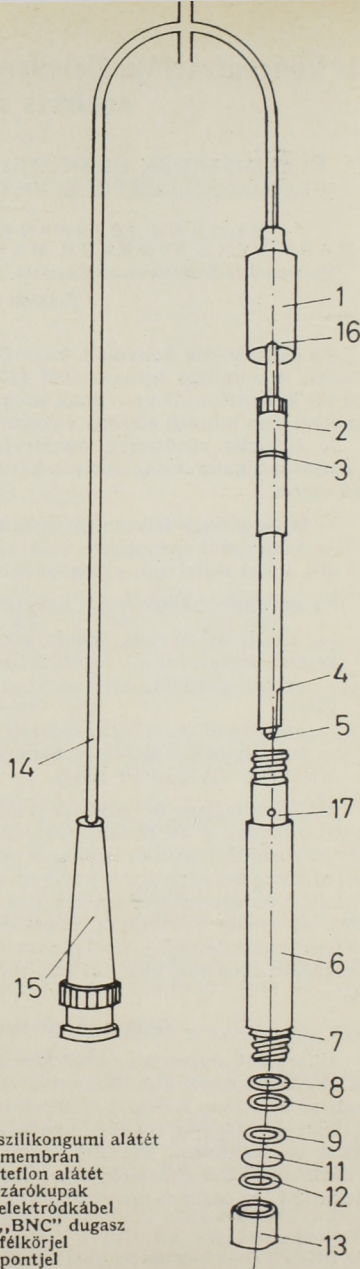
Az oxigénkoncentráció változásának elektrokémiai mérésén alapul a RADELKIS által forgalmazott OP-G1-7113 típusú glükóz-szelektív elektród-szett.

A glükóz-szelektív elektród-szett alkalmazása

OP-G1-7113 típusú glükóz-szelektív elektród-szett alkalmas oldatok β -D-glükóz koncentrációjának közvetlen mérésére.

A szett két fő részből áll, egy érzékelőből és egy glükóz adapterből. Az érzékelő (1. ábra) egy olyan Clark típusú oxigénérzékeny elektród, amelynek a vizsgálandó oldatba benyúló végén el van helyezve az immobilizált glükózoxidáz enzimet tartalmazó membrán. Az előzőekben már ismertetett alapreakció-egyenletben részt vevő oxigén koncentráció változása arányos a glükóztartalommal.

Az oxigén koncentráció amperometriás méréssel nyomkövethető. Ehhez segédletként tartozik az OP-960 típusú adapter, amely az elektród működtetéséhez szükséges polarizáló feszültséget szolgáltatja és a kimenő jelet úgy állítja át, hogy a szubsztrát koncentrációval arányos áram bármilyen RADELKIS gyártmányú digitális pH mérőn mérhető.



- | | |
|---------------------------|------------------------|
| 1. felső kupak | 10. szilikonumi alátét |
| 2. belső elektródszár | 11. membrán |
| 3. belső tömítő „O” gyűrű | 12. teflon alátét |
| 4. közlekedő hasíték | 13. záró kupak |
| 5. platina katód | 14. elektródkábel |
| 6. elektródszár | 15. „BNC” dugasz |
| 7. alsó tömítő „O” gyűrű | 16. félkörjel |
| 8. lágygumi alátét | 17. pontjel |
| 9. plexi üveg alátét | |

Az érzékelővel bármilyen folyamatot kísérő oxigénkoncentráció változás nyomonkövethető. A szelektivitást az immobilizált enzim határozza meg. A membránok könnyen cserélhetők.

A minta glükóztartalma közvetlenül – fehérjementesítés nélkül – mérhető. A szükséges minta térfogata – 2–20 mmol dm⁻³ koncentráció tartományban – 100 µl. Előkészített műszer esetén egy mérés időtartama, a minta glükózkonzentrációjától függően 1–3 perc.

A műszert az élelmiszeripari termékek vizsgálatára történő bevonása előtt modell oldatokkal teszteltük, tanulmányoztuk a hibaforrásokat.

A szubsztrátum átalakulás időben lejátszódó reakció. A pH mérő mV értékének előbb gyors, majd lassú változása figyelhető meg. A reakció befejeződését az jelenti, ha a változás 5 s alatt nem több, mint 1 mV. A pH mérő minőségétől függően a műszer mutatójának lassú „mászása”, „ugrálása” tapasztalható. Méréseink szerint az ebből adódó hiba 2% alatt van. Kis gyakorlással a pontos leolvasás könnyen elsajátítható.

A reakció lejátszódásához az enzim aktivitása adott érték, várható, hogy ha a szubsztrát koncentrációja széles határok között változik, ez befolyásolja a meghatározás pontosságát. Azonosan 100 µl mintatérfogat esetén az oldat koncentrációját 4,6–4,0 mmol dm⁻³ határok között választottuk. A vizsgált 10 koncentráció értékre kapott eredményeket az 1. táblázatban és a 2. ábrán közöljük. Az adatokból látható, hogy alacsonyabb koncentrációnál nagyobb értékeket mértünk, 7–17,5 mmol tartományban század százaléknyi sőt ezred százaléknyi volt a relatív hiba, 20–21 mmol-tól kezdve a hiba újra növekedett, 28,5 mmol-nál 2,1%, a 40,38 mmol-nál már 14,26% volt a relatív hiba.

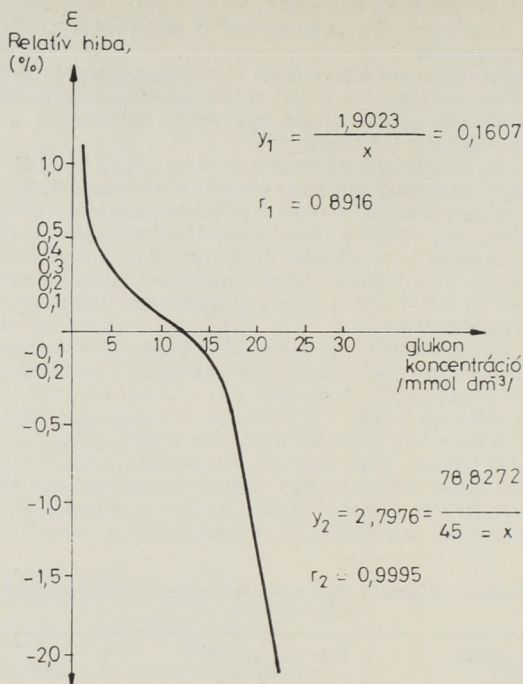
1. táblázat

Az oldat koncentrációjának hatása a glükóztartalom meghatározás pontosságára (mintatérfogat 100 µl)

Bemért glükózoldat töménysége mmol. dm ⁻³	Mért glükózoldat töménysége mmol. dm ⁻³	Relatív hiba (%)
4,634	4,650	+ 0,3440
5,022	5,030	+ 0,1590
7,246	7,248	+ 0,0276
10,162	10,162	+ 0,0059
13,835	13,835	- 0,0036
17,353	17,343	- 0,0107
19,938	19,928	- 0,0546
23,106	22,930	- 0,7617
28,583	27,980	- 2,1096
40,380	34,620	- 14,2645

A glükózkonzentráció és a relatív hiba között megpróbáltunk matematikai összefüggést találni függvényillesztéssel. Két hiperbola illesztéssel sikerült megfelelő kapcsolatot találni. A két hiperbola egyenlete és a korrelációs együtthatók (r) a 2. ábrán láthatók. A nagy R az illesztett függvényre vonatkozik. A függvény kétféle választását az is indokolja, hogy a két tartományban más a hiba oka. Kisebb koncentrációnál a relatív hibát szubjektív tényező okozza, az ún. várakozási hiba. A kis koncentráció miatt a pH mérő kijelzője nagyon hamar „megáll” s már lassú drift jelentkezik a leolvasásnál, vagyis többet olvasunk le.

A nagy koncentrációtartományban jelen levő rögzített enzim aktivitása kevés a teljes szubsztrátum mennyiségének gyors átalakítására, ezért mérünk a ténylegesen kevesebb glükózt. Méréseink szerint – 100 µl minta bemérése esetén – 5–22 mmol dm⁻³ koncentrációtartományban a meghatározás relatív hibája 0,5% alatt van.



Az eredményeket befolyásolja az immobilizált enzim aktivitása. Ez ismert glükózkoncentrációjú oldat mérésével ellenőrizhető. Előnyös, ha 100 μ l kb. 6 mmol dm^{-3} glükóz oldat mérésénél 100 mV körüli változást mérünk. Amennyiben ez az érték jelentősen 100 mV alá csökken, a membránt ki kell cserélni. Tapasztalataink szerint 5–22 mmol dm^{-3} tartományban egy membránnal 200–250 mérés végezhető el megbízhatóan.

A módszerrel az élelmiszeripari termékek széles körét – több, mint 100 mintát – vizsgáltunk. Így mértük mustok, borok, gyümölcslevek és sűrítvények, diabetikus befőttek (alma, körte, cseresznye, meggy), valamint méz, mézes sütemények, sütőipari termékek glükóz tartalmát (IVÁNKOVITS 1985, GAZUROVA 1985). Az eredményeket klasszikus módszerrel végzett meghatározások eredményeivel vetettük össze. Ezekkel a korreláció igen jó volt ($r = 0,98$). A módszer hibája nem érte el az 5%-ot.

Kísérleteink szerint a módszer alkalmazható minden olyan oligoszacharid meghatározására is, amelyeknek hidrolizise során glükóz keletkezik. Ilyen minták, pl. szacharóz vizsgálatához előzetesen el kell hidrolizálni az oligoszacharidot.

Eredményeink alapján a módszer alkalmazását javasoljuk alternatív eljárás-ként a glükóztartalom mérésére. A meghatározást részletesen a következőkben ismertetjük.

Vegyszerek

Az elektród-szett tartozékeként szállított oldatok,
 „0-107” elektród oldat,
 „K-71” koncentrált pufferoldat, amelyből 10 cm³-t 250 cm³-re hígítva
 7,1 pH-jú pufferoldatot állítunk elő,
 glükóz oldat 6 mmol dm⁻³ desztillált vízben.

Eszközök

1 db OP-G1-7113 típusú Glükóz-szelektív elektród-szett (RADELKIS),
 a szett tartozékai közül a vizsgálatokhoz szükséges:

- 1 db glükóz-érzékeny elektród,
- 1 db glükóz-érzékeny membrán (az enzimet tartalmazó felület a nem fényes oldal)
- 1 db alátétkészlet (teflon, szilikongumi, plexiüveg, lágygumi alátét)
- 1 db elektronbefogó
- 1 db termosztálható mérőcella
- 1 db pohárközpontosító
- 1 db keverőpálca, 20 mm-es
- 1 db glükóz adapter
- 2 db 9 V-os telep
- 1 db laboratóriumi digitális pH mérő (pl. RADELKIS OP-211/1 típ.)
- 1 db mágneses keverő
- 1 db állvány a termosztát befogására
- 1 db termosztát

Előkészítés módja

2. táblázat

Élelmiszertípus	Előkészítési mód
Lebegő részecskéket nem tartalmazó jól pipettázható folyadékok 20 mmol dm ⁻³ -nál kisebb glükóztartalommal	nem szükséges
Ugyanaz 20 mmol dm ⁻³ -nál nagyobb glükóztartalommal	hígítás szükség szerint
Durva lebegő részecskéket tartalmazó folyadékok 20 mmol dm ⁻³ glükóztartalommal	szűrés vagy centrifugálás
Ugyanaz 20 mmol dm ⁻³ -nál nagyobb glükóztartalommal	szűrés vagy centrifugálás és hígítás szükség szerint
Őrlemények, porok	vízzel diszpergálni, 3 percen át turmixolni. A lebegő részecskéket szűrővel vagy centrifugálással eltávolítani és a várható glükóztartalom függvényében mérőlombikban törzsoldatot készíteni.
Nagy viszkozitású sűrítmenyek, méz	A várható glükóztartalom függvényében hígítani. Méz esetében javasolt hígítás 100-szoros. Fruktóz szörpre javasolt hígítás 10-szeres.
Gélek, gélszerű anyagok (gyümölcsök, zöldségek, kompótok, sütő-, cukrász- ipari készítmények stb.)	Előbb durván aprítani, majd vízzel hígítva turmixolni. A diszperz részecskéket szűrővel vagy centrifugálással eltávolítani.

Mintaelőkészítés

A vizsgálathoz lebegő részecskéket nem tartalmazó oldat alkalmas, amelynek glükóztartalma $0-20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ($0-360 \text{ mg/100 cm}^3$) között van. Az élelmiszer eredeti fizikai tulajdonságának, glükóztartalmának függvényében kell az élelmiszert a vizsgálathoz előkészíteni. Ennek javasolt módját a főbb élelmiszercsoportokra a 2. táblázatban foglaltuk össze. A tiszta oldat vizsgálatát lehetőleg haladék-talanul meg kell kezdeni.

A vizsgálat végrehajtása

A mérések előkészítése: Az érzékelőt, a glükózadapert és a pH mérőt a műszerkönyv előírása szerint csatlakoztatjuk illetve beállítjuk.

A glükóz-koncentráció mérése

A mágneses keverőn elhelyezzük a pohárközpontosítót, amelybe a termosztálható mérőcellát tesszük. A mérőcellába 7 cm^3 $\text{pH} = 7,0$ pufferoldatot öntünk (RADELKIS K-71 előírás szerint hígítva) és ide helyezzük a keverőpálcát is.

Az összeszerelt érzékelőt úgy merítjük a pufferoldatba, hogy az érzékelő vége kb. 5 mm-rel a keverőpálca felett legyen. A keverő sebességét úgy választjuk meg, hogy örvény ne alakuljon ki, mert ilyen esetben előfordul, hogy a membránon légbuborék jön létre, vagy nem merül az érzékelő az oldatba. Mindkettő meg-hamisítja az eredményt.

Az összekötő kábeleket a kezelési útmutató szerint csatlakoztatjuk, majd megmérjük az érzékelő áramjelével arányos feszültségjelet a pH mérő készüléket „mV” üzemmódba téve, 30–35 perc múlva a kijelzett érték közel állandóvá válik (lassú drift minden mérésnél tapasztalható). A kijelzett értéket feljegyezzük, majd a pufferoldathoz hozzáadunk $100 \mu\text{l}$ kb. 6 mmol dm^{-3} – pontosan ismert – glükózkoncentrációjú standard oldatot. Megvárjuk, míg a kijelzett érték stabilizálódik (5 s alatt nem változik többet 1 mV-nál). Feljegyezzük a változást (ΔmV_{st}). Ezután adjunk az oldathoz $100 \mu\text{l}$ mérendő mintát, majd ismét jegyezzük fel a változást a standard minta hozzáadása után mért mV értékhez képest (ΔmV_x).

Az eredmények számítása

A mérési adatokból és a standard oldat glükózkoncentrációjának ismeretében a következő módon számítható ki a minta glükózkoncentrációja:

$$C_x = \frac{mV_x}{mV_{\text{st}}} \frac{V}{v} H C_{\text{st}}$$

ahol

C_x = a minta glükóztartalma a C_{st} dimenziójától függően mmol dm^{-3} vagy %

mV_x = az ismeretlen mintára talált mV változás

mV_{st} = a standard glükózoldatra mért mV változás

V = a standard oldat térfogata μl -ben (javasolt $100 \mu\text{l}$)

v = a vizsgálatra bemért ismeretlen minta mennyisége μl -ben

H = a minta esetleges hígításának mértéke

C_{st} = a standard oldat koncentrációja mmol dm^{-3} -ben.

A vizsgálat eredménye két párhuzamos meghatározás eredményének számtani középértéke.

A vizsgálat eredményét kéttizedes pontossággal adjuk meg.

Ismételhetőség

A módszerrel az ismételhetőség $\pm 5\%$.

A szórás mértéke azonban függ a vizsgálandó minta glükóztartalmától. 100 μl mintatérfogat esetén 5–22 mmol dm^{-3} koncentrációtartományon belül az ismételhetőség 0,5. A jó ismételhetőség érdekében 5 mmol dm^{-3} glükózkoncentráció esetén a minta térfogatát szükség szerint növelni kell. A 22 mmol dm^{-3} -nél több glükózt tartalmazó mintákat pedig a kívánt értékekre kell higitani.

Megjegyzés

A mérés megbízható elvégzésének egyik alapfeltétele a megfelelő aktivitású enzimet tartalmazó membrán.

Az aktivitás a mV_{st} érték alapján ellenőrizhető. Előnyös, ha ez 100 mV fölé van, amennyiben 50 mV alá csökken, az enzimentartalmú membránt ki kell cserélni. Egy membránnal kb. 200–250 mérés végezhető el. A kimerülés mértékét befolyásolja a vizsgált minták glükóztartalma, egyéb, a membránt, elektródot szennyező anyagok jelenléte, a mérés gyakorisága.

I R O D A L O M

- (1) Bergmeyer, H. U., Berndt, E., Schmidt, F. és Stork, H.: (1970). Methoden der enzymatischen Analyse. Bergmeyer H. U. (Hrsg) Bd. II. Akademie Verlag, Berlin.
- (2) Ivánkovits G.: (1985). Glükóz meghatározása gyors módszerrel. Szakdolgozat, Budapest.
- (3) Gazurová, É.: (1985). Must glükóztartalmának mérése glükóz szelektív elektróddal. Szakdolgozat, Budapest.
- (4) Polacsek-Rácz, M.: (1980). Development of a method for glucose determination using an immobilized enzyme preparation. Proc. 20th Hung. Annu. Meet. Biochem. Siofok 293–294.
- (5) Polacsek-Rácz, M.: (1983). A szénhidrátok meghatározása enzimes analitikai módszerekkel. Élelmiszeripar, 37 168–176.
- (6) Törley, D., Vámos-Vigyázó, L.: (1978). Az enzimes analitika helye és perspektívái a korszerű élelmiszeranalitikában. Élelmiszervizsgálati Közlemények, 25, 157–172, 26, 9–19.
- (7) Vámosné: (1984). Enzimes analitikai módszerek alkalmazása élelmiszervizsgálatokban (Praktikum). Budapesti Műszaki Egyetem Mérnöki Továbbképző Intézet.

KIS KONCENTRÁCIÓJÚ ÉLELMISZER-KOMPONENSEK MEGHATÁROZÁSA ENZIMES ANALITIKÁVAL I. ÉLELMISZEREK GLÜKÓZTARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA GLÜKÓZ – SZELEKTÍV ELEKTÓD-SZETT ALKALMAZÁSÁVAL

Bogdán Józsefné – Gasztonyi Kálmán – Harkayné Vinkler Margit – Ivánkovits Gertrúd

A magyar gyártású RADELKIS glükóz-szelektív elektród-szett alkalmas biológiai rendszerekben az oxigén koncentráció változásának mérése alapján a glükóztartalom meghatározására, nem több mint 5% relatív hibával. A vizsgálathoz nincs szükség bonyolult mintaelőkészítésre és a mérés 3–5 perc alatt kivitelezhető. Egy immobilizált enzimet tartalmazó membránnal 200–250 vizsgálat elvégezhető. Gyártásközi ellenőrző mérésekre is javasolható. A glükóz meghatározása mellett alkalmazható olyan oligoszacharidok mérése is, amelyekből hidrolizissal glükóz is keletkezik.

DETERMINATION OF COMPONENTS IN FOODSTUFFS AT LOW
CONCENTRATION BY ENZYMATIC METHOD. I.
DETERMINATION OF GLUCOSE CONTENT IN FOODSTUFFS BY
APPLICATION OF GLUCOSE SELECTIVE ELECTRODE SET

Bogdán, J., Gasztonyi, K., Harkay-Vinkler, M. and Ivankovits, G.

The RADELKIS Glucose selective electrode set — which is made in Hungary — is suitable for determination of glucose content. The electrode can measure the change of oxygen content in biological systems not more as with 5% relatively error. The analysis hasn't complicate sample preparation and it can be made under 3–5 minutes. It can be made 200–250 analysis by means of a membrane which has an immobilized enzyme. It is proposable for in-process control. The method is available for determination of oligosaccharides from which can be occur glucose by means of hydrolysis.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КОМПОНЕНТОВ
ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ С ПОМОЩЬЮ ЭНЗИМНОЙ АНАЛИТИКИ I.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ПИЩЕВЫХ ПРО-
ДУКТАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЛЮКОЗО-СЕЛЕКТИВНОГО
СЭТТ-ЭЛЕКТРОДА

Й. Богдан, К. Гастони, М. Харкайнэ-Винклер, Г. Иванович

Для определения содержания глюкозы — с относительной ошибкой измерений не более 5%-в — является пригодным глюкозо — селективный сэтт-электрод венгерского производства Раделкис, работающий на основе измерения изменения концентрации кислорода в биологических системах. Для проведения испытания нет необходимости в сложной подготовке проб и измерение можно провести в течение 3–5 минут. С помощью мембраны, содержащей один иммобилизованный энзим, можно провести 200–250 испытаний. Этот метод можно предложить также и для контрольных измерений на отдельных производственных этапах. Наряду с определением глюкозы можно применять также измерение таких олигосахаридов, из которых в результате гидролиза образуется также и глюкоза.

BESTIMMUNG VON LEBENSMITTELKOMPONENTEN GERINGERER
KONZENTRATION MIT DER ENZYMATISCHEN ANALYSE I. BESTIM-
MUNG DES GLUCOSEGEHALTES MIT EINEM GLUCOSE-
SELEKTIVEN ELEKTRODEN-SATZ

Bogdán, J.-né und Mitarb.

Der ungarische RADELKIS Glucose-selektive Elektroden-Satz ist geeignet, den Glucosegehalt in biologischen Systemen auf der Grundlage der Änderung der Sauerstoffkonzentration mit nicht mehr als 5% relativem Fehler zu bestimmen. Für die Untersuchung braucht man keine komplizierte Probenvorbereitung, und die Messung kann in 3 bis 5 Minuten durchgeführt werden. Mit einer immobilisiertes Enzym enthaltenden Membran können 200–250 Untersuchungen realisiert werden. Die Methode kann auch für die Produktionskontrolle empfohlen werden. Neben der Glucosebestimmung kann man sie auch für die Messung von solchen Oligosacchariden einsetzen, von denen durch Hydrolyse Glucose entsteht.