

Takarmánykeverékek szintetikus antioxidáns tartalmának vizsgálata. II.

Az „XAX” antioxidáns meghatározása

MONORI SÁNDOR, RÉKASI TIBOR ÉS BÉKÉS FERENC

Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 1974. szeptember 12.

Az „XAX” elnevezésű antioxidánszt és felhasználásának módját keveréktakarmányok esetében előző közleményünkben (1) ismertettük. Az „XAX” alkalmazását hazánkban ideiglenesen engedélyezték (2).

Tekintettel arra, hogy az „XAX” hatóanyaga kémiaiailag nem egységes, ugyanis az alapvegyület mellett az antioxidáns hatásban annak di- és trimer származékai is szerepet játszanak, olyan vizsgálati módszerre van szükség, amely ezek meghatározását is lehetővé teszi.

A hatóanyag vizsgálatokhoz – kísérleteink során – spektrofotométeres eljárást választottunk és olyan reagenst kerestünk, amely mind az alapvegyülettel, mind annak di- és trimerjével egyaránt reagálva koncentráció-arányos, reprodukálható intenzitású színt állít elő. Segítséget nyújtott ehhez azon megfigyelés, hogy az „XAX” levegő és fény hatására hosszabb idő után – valószínűleg oxidáció következtében – eredeti drapp színét intenzív türkizkékévé változtatja. Ilyen színváltozást idéz elő híg savas oldatban a PbO_2 és a FeCl_3 hozzáadása is (8).

A színreakcióval járó kémiai változás jellegére Möhlau és Heinze (3) által közölt reakcióból következtetünk: a tetrametildiamino-difenilmetán metilén csoportján PbO_2 reagens hatására – szürkés-kék szín képződése közben – hidroxil csoport keletkezik. Az „XAX” hatóanyagai és ezen vegyület között fennálló szerkezeti hasonlóság alapján feltételezhető az átalakulás azonossága. Hasonlóképpen több kutató (4, 5, 6, 7) spektrofotometriás, valamint spektrofluorometriás módszereket alkalmazott BHT és EMQ meghatározására.

Az „XAX” antioxidáns minőségi kimutatása

Az „XAX” minőségi kimutatásának kettős célja van: egyrészt fontos volt ismernünk, hogy mennyi az a legkisebb „XAX” koncentráció, amely a takarmányokban még kimutatható, másrészt olyan egyszerű módszert kívántunk adni a minőségi ellenőr kezébe, amely által a helyszínen is meggyőződhet arról, hogy a vizsgálandó takarmány tartalmaz-e „XAX” antioxidánszt.

Takarmányokban a legkisebb „XAX” mennyiség kimutatását az alábbiak szerint végeztük:

Olyan takarmányt készítettünk, amely 5 mg%-os „XAX” antioxidánszt tartalmazott. Ehhez ismert mennyiségű „XAX” mentes takarmány adagokat

kevertünk. Ezen takarmányokból kémcsövekbe kb. 1 g-os mennyiséget mér-tünk. Hozzáadtunk kb. 5 cm³ metanolt és néhány percig rázogattuk. Kb. 5 perces rázogatás után az oldatot másik kémcsőbe átöntöttük.

Ezután az oldatokhoz 1–1 cm³ 0,5%-os jégecetes FeCl₃ reagenst adagoltunk. Az oxidálószer hozzáadása után azt tapasztaltuk, hogy a tápokban levő „XAX” jelenléte ezzel a módszerrel még 40–50 µg/100 g-os koncentrációban is kimu-tatható. A reakció olyan érzékeny, hogy vele két nagyságrenddel kisebb men-yiségű „XAX”-et is kimutathatunk, mint amennyit általában a takarmányok-hoz használnak.

Az „XAX” antioxidáns mennyiségi meghatározása

A mennyiségi meghatározás elkezdése előtt több fontos kérdést kellett kísér-letileg megállapítani:

1. A vizsgálatokhoz Spektromom 204-es spektrofotométert használtunk, amely 190–1100 nm tartományban folyadékok és szilárd anyagok extinkciójá-nak (transzmissziójának) mérésére szolgál. Ezen kívül alkalmas fluoreszcenciás, illetve nefelometriás mérések elvégzésére is. Optikailag egy fényutas – egy ér-zékelős rendszerű és a kívánt hullámhosszú fényt kvarcprizmás *Littrow*-féle auto-kollimációs rendszer állítja elő. A mérés nullmódszerrel, kompenzációs elven és speciális mérőpotenciométer segítségével történik.

2. Szükséges volt a megfelelő hullámhossz kiválasztása, ahol a mérendő színnek abszorpciós maximuma van. Megállapítottuk, hogy a metanolos XAX oldatnak 0,5%-os jégecetes FeCl₃-os kezelés után keletkezett kék színe 590 nm hullámhosszon ad abszorpciós maximumot. Így méréseinket a továbbiakban is ezen a hullámhosszon végeztük.

3. A vizsgálattal egyidőben tanulmányoztuk az XAX nélküli metanolos takarmánykivonat viselkedését is. Megállapítottuk, hogy az antioxidáns nélküli takarmánykeverékekben levő színezőanyagok (pl. természetes antioxidánsok, vitaminok stb.) az XAX vizsgálatát nem zavarják, mert ezek 670 nm-es hullám-hossznál mutattak csekély abszorpciós maximumot.

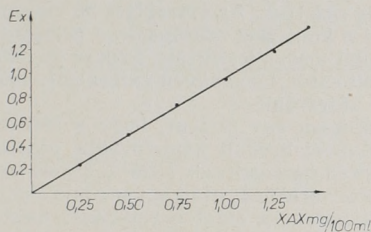
4. Méréseket végeztünk a színváltozások mértékének megállapítására, mert azt tapasztaltuk, hogy a reagens hozzáadása után az extinkció értékek az idő függvényében változnak. Megállapítottuk, hogy a metanolban oldott XAX színintenzitása 1 cm³ 0,5%-os jégecetes FeCl₃ hozzáadása után 15 perc alatt maxi-mumot ér el. Ezután kb. 4–5 percig gyakorlatilag nem változik. Ebből tehát az következett, hogy a mennyiségi meghatározáshoz a méréseket az oxidálószer hozzáadása után *pontosan 15 perc elteltével* kell elkezdeni és 5 perc alatt be kell fejezni.

5. Az antioxidáns fényérzékenysége oldás után fokozott mértékű, ezért oldás, hígítás és mérés előtt az oldatokat *napfénytől gondosan óvni kell*. Ezt a problémát gyakorlatilag úgy oldottuk meg, hogy az oldáshoz és szűréshez, vala-mint az extraháláshoz használt edényeket (mérőlabdikok, rázóedények, szívó-palackok, kémcsövek stb.) alumínium fóliával burkoltuk. A fotométer megtöl-tött küvettaát a várakozási idő alatt (15 perc) a küvettatartóban szintén sötét helyen tartottuk és csak közvetlen mérés előtt tettük a mérőhelyre.

6. A kalibrációs görbe felvételéhez a törzsoldatokat úgy készítettük, hogy azok megfelelő bemérés esetén a takarmánytápokban levő XAX mennyiségek meghatározására is alkalmasak legyenek.

Először olyan törzsoldatot készítettünk, melynek 100 cm³-ében 25 mg XAX volt feloldva. Ebből a törzsoldatból kivettünk 5 cm³-t, melyet 100 cm³-re feltöltve az oldat töménysége 1,25 mg/100 cm³ volt. Ez utóbbit törzsoldatból hígítási-sort készítettünk 10 cm³-es mennyiségben, hozzáadtunk 1 cm³ 0,5%-os jégecethen

oldott FeCl_3 -ot és 15 perces várakozás után mértük a 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 és 1,25 $[\text{mg}/100 \text{ cm}^3]$ töménységű oldatok extinkció értékeit. A méréseket új törzsoldatokkal és hígítási sorokkal még kétszer megismételtük és az így kapott extinkció átlagértékeket a koncentráció függvényében ábrázoltuk. A kalibrációs görbét az 1. ábrán közöljük.



1. ábra

Amint az ábrán láthatjuk a kalibrációs görbe igen jó közelítéssel egyenes. Szükségesnek tartottuk viszont a kalibrációs görbe egyenletét a legkisebb négyzetek módszerével is kiszámítani és így a linearitást ellenőrizni. A számításainknak – terjedelmessége miatt – csupán a végeredményét közöljük, mely szerint a megfelelő számértékek behelyettesítése után a regressziós egyenes egyenletére az alábbi összefüggést kaptuk:

$$y = 0,0078 + 0,9244$$

Az összefüggés szorosságára a tapasztalati korrelációs együttható ad felvilágosítást, amelynek nagyságára

$$r = 0,9969$$

értéket kaptunk.

A végeredményből láthatjuk, hogy két változó szorosan függ egymástól, tehát azon a szakaszon, ahol a mérést végeztük a Lambert – Beer törvény pontosan érvényesül.

Takarmánytápok XAX tartalmának vizsgálata

Tápok előkészítése

A házilag előállított borjú-, csirke- és malac takarmánytápokból külön-külön golyósmalomban történt egyenletes összekeverés után 6-szor 50 g-os mennyiségeket mértünk le.

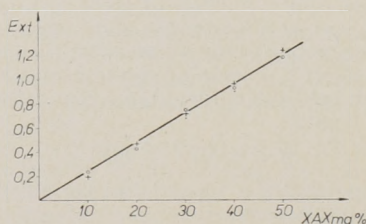
Az antioxidáns egyenletes bekeverését úgy oldottuk meg, hogy 250 mg XAX-et acetonban feloldottunk és 100 cm^3 -re feltöltöttük. Ebből a törzsoldatból olyan hígítási sort készítettünk, amelynek hígításai 50 g takarmányra átszámítva 10, 30, 40 és 50 mg% koncentrációknak feleltek meg.

Az antioxidáns bekeverése a tápokba úgy történt, hogy a tápok egyenletes rétegben tálcára terítettük és az ismert töménységű hígítási sorból pipettával $10 - 10 \text{ cm}^3$ -t egyenletesen a tápokra csepegtettünk. Az aceton rövid idő alatt elpárolgott és ezután a tápok jól összekeverték.

A meghatározás módjának leírása

Az egyenletes, összekevert tápokból táramérlegesen $\pm 0,01$ g pontossággal 2,5–2,5 g-os mennyiségeket lemértünk. A lemért mennyiségek számítás szerint 0,25–1,25 mg XAX-et tartalmaztak. Maradék nélkül 200 cm³-es alumínium fóliával burkolt Erlenmeyer lombikba vittük és rázógépen kétszer 30–30 cm³ metanollal kb. 10 percig ráztattuk. Az extrakciót 30 cm³ metanollal harmadszor is megismételtük, majd a keveréket szűrőpapíron porcelán szűrőn enyhe szivattással és kevés metanollal mosva leszűrűtük. Ezután az oldatot 100 cm³-es lombikba vittük és jelig töltöttük. Ugyanilyen extrakciós műveletet XAX nélküli takarmánytápokkal is végeztünk.

Az XAX meghatározása úgy történt, hogy a 100 cm³-es mérőlombikból 10 cm³-t alumínium fóliával burkolt kémcsövekbe pipettáztunk. A spektrofotométer előkészítése után hozzáadtunk 1 cm³ 0,5%-os jégcetetes FeCl₃-oldatot, összeráztuk, majd 15 perc várakozás után ugyanennyi FeCl₃-os metanollal szemben 590 nm-es hullámhosszon az oldat extinkcióját meghatároztuk. Az XAX nélküli tápok extinkciói 0,05-ös értékeket adtak, melyeket az XAX-es tápok, extinkciói értékeiből levontunk. Méréseink eredményeit a 2. ábrán ismertetjük.



2. ábra

Mérési eredményeink értékelése

A 2. ábrán a görbe lefutásából látható, hogy az jó közelítéssel egyezik a kalibrációs görbével. Az egyes takarmánytápok vizsgálati értékei között (○ = borjútáp; . = csirketáp; + = malactáp) azonban eltérések mutatkoznak. Elsősorban tehát azt kellett megnéznünk, hogy ezen eltéréseknek milyenek a szórásai. Az alábbiakban a legkevesebb és a legtöbb XAX-antioxidánsot tartalmazó tápok vizsgálati szórásának számítási menetét az 1. táblázatban ismertetjük.

Amint a diagram és a számítási adatok mutatják, az alkalmazott módszer pontos betartásával a takarmányokban egyenletesen elkevert XAX antioxidáns mennyiségét jó pontossággal meg lehet határozni. A szórási értékeket figyelembe véve azt láthatjuk, hogy nagyobb mennyiségű XAX kimutatásánál a szórás-érték nagyobb, mint kisebb koncentráció esetén.

A kisebb koncentrációkban mért értékek között 20 mg%-nál $\pm 0,98$; 30 mg%-nál $\pm 1,04$ mg%-os eltéréseket kaptunk. Ilyen eltérések természetesen nem a módszer hibájából, hanem az eloszlási egyenetlenségekből, az egyes bemérések, hígítások, műszerleolvasások stb. hibáiból is adódhatnak.

N	10 mg %			50 mg %		
	x	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$	x	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
1	23,1	-1,7	2,89	117,8	-1,7	2,89
2	23,9	-0,9	0,81	115,3	-4,2	17,64
3	27,9	+3,1	9,61	121,4	+1,9	3,61
4	24,5	-0,3	0,09	123,6	+4,1	16,81

$$\Sigma x = 99,4$$

$$\Sigma (x - \bar{x})^2 = 13,40$$

$$\bar{x} = 24,8$$

$$S = \frac{\sqrt{\Sigma (x - \bar{x})^2}}{N - 1},$$

$$S = 2,11$$

$$\Delta = \frac{t \cdot S}{\sqrt{N}}$$

$$\Delta = 2,92$$

$$E = \pm K \cdot \Delta$$

$$E = \pm 1,21 \text{ mg\%}$$

$$\Sigma x = 478,1$$

$$\Sigma (x - \bar{x})^2 = 40,95$$

$$\bar{x} = 119,5$$

$$S = 3,67$$

$$\Delta = 5,09$$

$$E = \pm 2,1 \text{ mg\%}$$

A táblázatban használt jelölések:

N = vizsgálatok száma

x = mm-ben ábrázolt extinkció értékek

S = a vizsgálat szórása

Δ = konfidencia intervallum 95%-os biztonsággal

t = Student féle t elosztás kritikus számértéke (2,776)

E = eltérés a pontos értéktől $\pm$ mg%-ban

K = egységre vonatkoztatott arányosági tényező ($\pm 0,417$)

1. = a kalibrációs görbe-

2. = a borjútáp-

3. = a csirketáp-

4. = a malactáp mm-ben ábrázolt extinkciók értékei

IRODALOM

- (1) Monori S. – Drucker T.: ÉVIKE. 20, 149, 1974.
- (2) O.T.E.F.: 541/1972. sz. ideiglenes forg. engedély
- (3) Mohlau, R. – Heinze, M.: Berichte 35, 358, 1902.
- (4) Alicino, N. J. – Klein, H. C. – Quattrone, J. J. – Choy, T. K.: J. Agric. and Food Chem 11, 496, 1963.
- (5) Szalkowski, C. R. – Graber, J. B.: J. Agric. and Food Chem. 10, 490, 1962.
- (6) Johson, D. P.: J. of the A.O.A.C. 50, 1298, 1967.
- (7) Gordon, R. S. – Conkin, R. A. – Machlin, C. J.: J. of the A.O.A.C 47, 512, 1964.
- (8) Drucker T.: Diplomamunka 1973.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИОКИСЛИТЕЛЕЙ В КОМБИКОРМАХ. II.

„Определение антиокислителя — XAX”.

III. Monori — T. Rekaši — Ф. Бекеши

Авторы знакомят количественный и качественный метод определения синтетического антиокислителя „XAX” в трех видах комбикормов.

Испытания проводили фотометрическим методом после добавки раствора FeCl_3 полученного из вещества метанольной экстракцией. Полученные результаты исследований оценивали математическо — статистическим методом

UNTERSUCHUNG DES GEHALTES AN SYNTHETISCHEN ANTIOXIDANTEN IN FUTTERMISCHUNGEN. II. BESTIMMUNG DES ANTIOXIDANTS „XAX”

S. Monori, T. Rékasi und F. Békés

Zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung des synthetischen Antioxidants „XAX” in drei verschiedenen Futtermischungen wird eine Methode beschrieben. Die Untersuchungen wurden in einer durch Extraktion mit Methanol erhaltenen Lösung nach Zugabe einer FeCl_3 -Lösung durchgeführt, wobei eine photometrische Methode angewendet wurde. Die Untersuchungsergebnisse wurden mittels einer mathematisch-statistischen Methode ausgewertet.

INVESTIGATION OF THE CONTENT OF SYNTHETIC ANTIOXIDANTS IN FEED MIXTURES. II. DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT „XAX”

S. Monori, T. Rékasi and F. Békés

A method is described for the qualitative detection and quantitative determination of the synthetic antioxidant „XAX” in three different types of feed mixtures. The investigations were carried out in a solution obtained by extracting the sample with methanol and adding a solution of FeCl_3 to the extract. Analysis was made by a photometric method. The results of investigations were evaluated by a mathematical-statistical method.

ETUDE DE LA TENEUR EN ANTIOXYDANTS SYNTHETIQUES DES FOURRAGES COMPLEXES. II. DOSAGE DE L'ANTIOXYDANT «XAX»

S. Monori, T. Rékasi et F. Békés

Les auteurs décrivent 3 méthodes d'analyse qualitative et quantitative pour déceler l'antioxydant synthétique «XAX». Les examens s'effectuaient à partir de la matière extraite à l'alcool méthylique, après ajoutement d'une solution de FeCl_3 , par voie photométrique. On a évalué les résultats avec les méthodes de la mathématique statistique.