

HYPOXANTHIN I FISK

Prinsipp

Adenosin-5-trifosfat (ATP) i fiskemuskelen nedbrytes etter fiskens død. Nedbrytningen resulterer i frigjøring av inosin-5-monofosfat (IMP) og dannelselse av inosin og hypoxanthin (Hy). Hypoxanthinet oksyderes først til xanthin og deretter urinsyre av xanthinoksydase. Urinsyremengden bestemmes spektrofotometrisk ved 290 nm, og blir brukt som et mål for fiskens ferskhet.

Reagenser og løsninger

1. Xanthinoksydase ex milk, Koch Light Lab. Ltd., art.nr. 5681-01.
2. Hypoxanthin standardløsning. 0,375 g hypoxanthin p.a., Koch-Light Lab. Ltd., art.nr. 3286-00, løses til 500 ml med 0,6 N HClO₄. Dette gir en konsentrasjon på 750 µg/ml. Løsningen kan lagres 3 uker ved 0°C.
3. Perklorsyre, 0,6 N. 86,14 g 70 %-ig HClO₄ fortynnes med aq. dest. til 1 liter.
4. Fosfatpuffer, 0,25 N, pH = 7,6.
 - a. 44,5 g p.a. Na₂HPO₄·2H₂O løses i aq.dest. til 1 liter.
 - b. 34,0 g p.a. KH₂PO₄ løses i aq.dest. til 1 liter.Komponentene a og b blandes i et forhold som gir pH = 7,6.
5. KOH, 30 %. 150 g p.a. KOH løses i aq.dest. til 500 ml.

Utstyr

- a. U.V.-spektrofotometer med 10 mm kvartskvvetter
- b. pH-meter med titrator
- c. Ismaskin
- d. Vakuum-filtreringsutstyr
- e. Hamilton-sprøyte, 10 µl
- f. Injeksjonssprøyte, 0,5 ml
- g. Filtrerpapir, sortbånd
- h. Pipetter, 2, 50, og 100 ml
- i. Avtrekksskap
- j. Homogenisator
- k. Målekolber, 100 ml
- l. Erlenmeyerkolber, 25 ml

Utførelse

HClO₄-reagenset (3) og vakuumfiltreringsutstyret tempereres til 0°C i isbad, som plasseres i avtrekksskap sammen med homogenisator.

50 g prøve og 100 ml HClO₄ homogeniseres i 2 minutter og vakuumfiltreres raskt ved 0°C.

50 ml serum (filtrat) av 0°C tilsettes KOH-reagens (5), ved hjelp av titrator til pH = 6,5-7,0. Volumet reguleres til 75 ml med aq. dest., og blandingen filtreres ved 0°C for fjerning av kaliumperklorat (KClO₄). Filtratet må oppbevares ved 0°C, og det foretas registrering innen 30 minutter, eller det kan oppbevares ved -30°C.

0,5 ml filtrat, 2 ml aq. dest. og 2 ml fosfatpuffer, utmåles og blandes i 25 ml erlenmeyerkolbe og overføres deretter til kyvette.

Absorbansen (A₁) avleses umiddelbart ved bølgelengden 290 nm mot vann som blindprøve. Deretter injiseres 10 µl xanthinoksydase, og kyvette med innhold hensettes 1 time ved romtemperatur, og absorbansen (A₂) avleses påny mot aq. dest. ved samme bølgelengde.

På analog måte som angitt for prøven opparbeides og avleses samtidig en korreksjonsprøve som består av 2,5 ml aq. dest. og 2 ml fosfatpuffer.

Merknad. Dersom ikke prøven kan opparbeides umiddelbart, må den fryses ved -30°C. Alle løsninger må holdes ved 0°C.

Standardkurve

Henholdsvis 0-2-5-10-15 og 20 ml hypoxanthin standardløsning (2) utpipetteres i 100 ml målekolber, som fylles til merket med 0,5 N HClO₄ (3). Fra hver fortykning uttas 50 ml som nøytraliseres med 30 % KOH (5) til pH = 6,5-7,0. Volumet reguleres til 75 ml med aq. dest. Blandingene filtreres ved 0°C for fjerning av kaliumperklorat. 0,5 ml filtrat opparbeides og absorbansen avleses som angitt under Utførelse.

Nettoabsorbansen (A) for hver av de målte standardløsningene beregnes etter formelen:

$$A = (A_{2P} - A_{1P}) - (A_{2K} - A_{1K}), \text{ der}$$

A_{2P} = Prøvens absorbans ved 2. gangs avlesning

A_{1P} = Prøvens absorbans ved 1. gangs avlesning

A_{2K} = Korreksjonsprøvens absorbans ved 2. gangs avlesning. (Korreksjonsprøven er den prøven som ikke er tilsatt noe hypoxanthin).

A_{1K} = Korreksjonsprøvens absorbans ved 1. gangs avlesning.

De funne nettoabsorbansene settes av på mm-papir langs y-aksen, mot sluttprøvens innhold hypoxanthin i μg langs x-aksen.

Beregning

Hypoxanthininnholdet i en analysert prøve beregnes ut fra formelen:

$$\text{Hypoxanthin, mg/100g} = \frac{M_A \cdot f_1}{W \cdot f_2}, \text{ der}$$

M_A = Mengde hypoxanthin i μg som avleses av standardkurven, og som svarer til prøvens nettoabsorbans A (kfr. definisjon under "Standardkurve")

W = Utveid mengde farse for ekstraksjon, g

$f_1 = \frac{100}{1000} =$ Omregningsfaktor fra $\mu\text{g/g}$ til mg/100g

$f_2 = \frac{50 \cdot 0,5}{140 \cdot 75} =$ Fortynningsfaktor. (Faktoren forutsetter at 50 g farse inneholder 40 ml vann).

Henvisning

Jones, N.R., Murray, J. et al.: Rapid estimation of hypoxanthine concentrations as indices of the freshness of chill-stored fish. J. Sci. Fd. Agric. 15 (11), 763-774, 1964.