

HENRYK MŁODECKI

## BIOCHEMICZNA METODA OZNACZANIA ZANIECZYSZCZENIA ARTYKUŁÓW ŻYWNOSCI PRZEZ OWADY \*

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH

Opracowano biochemiczną metodą oznaczania stopnia zanieczyszczenia żywności przez owady oraz podano sposób postępowania analitycznego.

Badając wydaliny rozkruszka mącznego (*Tyroglyphus farinae*) ustaliłem chromatograficznie, że końcowym produktem jego azotowej przemiany materii jest guanina (1). Opracowując zagadnienie wpływu roztoczy na porażoną żywność, a w szczególności zmiany w części azotowej mąki, doszedłem do wniosku, że nie można na podstawie oznaczeń azotu ogólnego określić zawartości białka i wartości odżywczej mąki porażonej, ponieważ niecały azot w tej mące jest pochodzenia białkowego; część jego jest związana w bezwartościowej dla odżywiania guaninie albo w organizmach roztoczy, których okrywy nie są trawione w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt. Koniecznością zatem było opracowanie metody postępowania, umożliwiającej oznaczenie azotu w związkach odżywczo bezwartościowych. Metoda analitycznego postępowania została opracowana i ogłoszona w Rocznikach PZH (2). Polega ona na wyekstrahowaniu wolnej guaniny z mąki za pomocą 2% kwasu solnego, chromatograficznym wydzieleniu jej na bibule (Whatman nr 1) techniką chromatografii wstępującej przy użyciu symkolidyny nasyconej wodą oraz wywołaniu plam za pomocą 0,2% roztworu eozyny rozpuszczonej w etanolowym nasyconym roztworze  $HgCl_2$  i porównaniu z plamami wzorca guaniny. Współczynnik  $R_f$  w opisanym sposobie postępowania wynosi 0,46—0,52.

Sprawa wygląda nieco inaczej, gdy trzeba określić zanieczyszczenie produktu kałem owadów lub zniszczenie białka przez owady. Z reguły nie wchodzi tu w rachubę ilość azotu związanego w organizmach owadów. W przypadku zbóż, wyjątkiem w naszych warunkach klimatycznych jest wołek (*Calandra granaria*), którego larwy i poczwarki rozwijają się w ziarnach (tzw. porażenie ukryte). Owady, zwierzęta o większych od roztoczy rozmiarach, są oddzielane od mąki przez przesianie; pozostają jednak w artykułach żywności produkty ich przemiany materii.

Tak jak końcowym produktem azotowej przemiany materii z roztoczy jest guanina, tak u owadów głównym produktem jest kwas moczowy, wydalany w postaci wolnej lub kwaśnych moczanów (3, 4). Inne związki azotowe wydalane przez niektóre owady jak allantoina (produkt

\* Praca referowana na V Zjeździe Naukowym Pol. Tow. Farmaceutycznego w Poznaniu 22—24.IX.1960.

utlenienia kwasu moczowego przy pomocy urikazy występującej w niektórych dwuskrzydłowych), nieznaczne ilości amoniaku, soli amonowych, mocznika, śladowe ilości kreatyny i kreatyniny, które są prawdopodobnie składnikami pożywienia niektórych gatunków, jak również przypuszczalna obecność w wydalinach aminokwasów oraz innych związków aminowych, mogą nie być brane pod uwagę. Głównym bowiem katabolitem owadów jest zawsze kwas moczowy, substancja nierozpuszczalna w wodzie, co wg Needhama (4) jest charakterystyczne i posiada szczególne znaczenie u zwierząt w okresie embrionalnego rozwoju osobników typu lądowego.

*Subrahmanyam* i współpracownicy (5) zwrócili uwagę na zwiększające się ilości kwasu moczowego w produktach atakowanych przez różne szkodniki — owady. W celu wykazania kwasu moczowego w porażonych produktach zastosowali oni oznaczenia kolorymetryczne, wykorzystując jego zdolności redukcyjne; posłużyli się oni powszechnie stosowanym w tym celu odczynnikiem Benedicta, składającym się z mieszaniny  $As_2O_5$ ,  $H_3PO_4$  i  $Na_2WO_4$ . Wyniki te jednak nie mogły być dokładne, ponieważ do wyciągu przechodzą również inne substancje redukujące, dające niebieskie zabarwienie z odczynnikiem. Lepsze wyniki otrzymali Venkatrao i współpracownicy (6, 7), gdy posłużyli się w tym celu chromatografią. Zastosowali oni odbiałczanie i zagęszczanie wodnego wyciągu, nanoszenie go w dwóch punktach na bibułę (Whatman nr 1) i rozwinięcie chromatograficzne techniką spływową w układzie n-butanol, kwas octowy, woda (4 + 1 + 5). W omawianej metodzie po 48 godzinnym procesie chromatograficznym rozcinano bibułę, pierwszy pasek wywoływano odczynnikiem Benedicta, następnie z drugiego paska wycinano to miejsce, w którym na pierwszym pasku otrzymano plamę kwasu moczowego, eluowano substancję oznaczaną i w eluacie oznaczano kwas moczowy za pomocą odczynnika Benedicta. Metoda ta jest jednak pracochłonna, trudna do zastosowania w oznaczeniach seryjnych.

#### USTALANIE ANALITYCZNEGO SPOSOBU POSTĘPOWANIA

Sposoby analityczne, które opracowałem już poprzednio w 1958 r. w związku z badaniem wydalin rozkruszonka mącznego są szybsze i dawały dobre wyniki (1, 2). Pozostała jedynie sprawa przystosowania metody do ilościowego oznaczania kwasu moczowego w materiale biologicznym, a właściwie ekstrakcja jego z materiału biologicznego. Kwasu moczowego nie wyekstrahowuje się za pomocą 2% kwasu solnego, jak ekstrahuje się guaninę. Wynika to z charakteru samych substancji; guanina jest zasadą, a kwas moczowy posiada cechy kwasu dwuzasadowego. W celu ekstrakcji kwasu moczowego wykorzystałem zdolność tworzenia łatwo rozpuszczalnej jego soli sodowej. Ekstrakcję przeprowadzałem za pomocą 0,5%  $Na_2CO_3$  w ciągu 30 minut w temperaturze 65° w łaźni wodnej. Odwirowany ekstrakt nanoszono na linię startową bibuły Whatman nr 1 i rozwijano chromatogram za pomocą symkolidyny nasyconej wodą. Czas rozwijania chromatogramu techniką chromatografii wstępującej trwał 17—18 godzin. Wywołanie następowało po wysuszeniu rozwiniętego chromatogramu i odbywało się jak w przypadku guaniny 0,2% roztworem eożyny w etanolowym nasyconym roztworze sublimatu, po czym następowało wypłukanie alkoholem nadmiaru roztworu wywołującego. Po wywołaniu otrzymywano plamy

barwy różowofioletowej. Intensywność zabarwionych plam porównywaną z plamami wzorcowymi kwasu moczowego. Rf kwasu moczowego wynosi 0,22—0,28. Najdogodniejsze do odczytania i najdokładniejsze w porównaniu są plamy odpowiadające 2 do 10  $\mu\text{g}$  kwasu moczowego. Przeprowadzone badania prawidłowej mąki pszennej i żytniej na obecność kwasu moczowego w ilości odpowiadającej 40 mg badanego produktu dały wynik ujemny.

Obliczenie azotu związanego przez kwas moczowy. Ze wzoru sumarycznego  $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_3\text{N}_4$  i ciężaru cząsteczkowego wynoszącego 168,12 wynika, że zawartość azotu w cząsteczce wynosi 33,03%. Znając zatem zawartość kwasu moczowego w badanej próbce obliczyć można azot należący do związku odżywczo bezwartościowego i odjąć go od ilości azotu ogólnego. Zawartość procentową azotu związanego w znalezionym kwasie moczowym

$$X = \frac{a \cdot 33,03}{100}$$

gdzie: a = liczbie  $\mu\text{g}$  znalezionej kwasu moczowego.

#### DOŚWIADCZENIA NA MATERIALE BIOLOGICZNYM

Po opracowaniu sposobu postępowania na czystym kwasie moczowym przystąpiono do sprawdzenia metody na materiale biologicznym. W tym celu ekstrahowano okruszki pozostałe na skutek żerowania wołka zbożowego (*Calandra granaria*) w ziarnie pszenicy i wysuszone owady uprzednio oczyszczone strumieniem powietrza. Wyniki stanowiące średnią oznaczeń podano w tabeli I.

Tabela I

Materiał biologiczny	Zawartość procentowa N ogólnego	Zawartość procentowa kwasu moczowego	Zawartość procentowa N przypadająca na kwas moczowy
Okruszki po żerowaniu wołka zbożowego	4,15	1,5	0,50
Wołek zbożowy (imago)	8,89	0,05	0,017

#### WYKRYWANIE I OZNACZANIE KWASU MOCZOWEGO I GUANINY

Pozytywny wynik dały próby połączenia tych dwóch metod w celu jednoczesnego wykrywania i oznaczania kwasu moczowego i guaniny. W tym celu na ten sam punkt linii startowej po nałożeniu wyciągu zawierającego kwas moczowy nakłada się wyciąg guaniny w kwasie solnym; na dalsze punkty nakładano wzorce tych substancji. Dalszy ciąg analizy jest wspólny dla obydwu poszukiwanych substancji. Rozdzielenie obydwu substancji jest całkowite. Od liczby  $\mu\text{l}$  wyciągów naniesionych na bibułę zależy jedynie wykrywalność tych katabolitów szkodników. Można więc tę wykrywalność regulować w zależności od potrzeb.

## WNIOSKI

Otrzymane w doświadczeniach wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Podaną metodą chromatograficzną można wykrywać zanieczyszczenia mąki kałem owadów i oznaczyć odsetek zniszczonych przez owady substancji azotowych.

2. Po zastosowaniu odpowiedniego sposobu ekstrakcji można chromatograficznie jednocześnie wykrywać kał owadów i roztoczy.

3. Wykrycie i oznaczenie kwasu moczowego może być wskaźnikiem niehigienicznego przechowywania produktów zbożowych; metoda może zostać wykorzystana do ustalenia wymagań higienicznych dla mąki w odniesieniu do zanieczyszczeń kałem owadów, a w połączeniu z poprzednio opracowaną metodą wykrywania i oznaczania guaniny w odniesieniu do zanieczyszczeń spowodowanych przez szkodniki-stawonogi (owady i roztocze).

X. М л о д е ц к и

БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ  
В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ ВЫЗВАННЫХ НАСЕКОМЫМИ

Содержание

Разработан метод аналитического анализа для определения, в какой мере пищевой продукт загрязнен экскрементами насекомых. Метод основан на обнаружении мочевой кислоты находящейся в экскрементах насекомых как метаболит азотистых перемен у этих животных. Извлечение мочевой кислоты основано на вымачивании исследуемого материала 0,5%-ым раствором углекислого натрия в продолжении 30 минут, в температуре 65°. После этого материал переносят на центрифугу и так очищенный наносят на бумагу Whatman'a № 1 и развивают хроматограм при помощи симколидина насыщенного водой. Хроматограм проявляют 0,2%-ым раствором эозина в насыщенном алкогольном растворе двухлорной ртути, освобождаясь от избытка реактива промыванием хроматограмма в алкоголе.

Интенсивность окраски полученных пятен сравнивают с приготовленными образцами мочевой кислоты.

Отчетливо выступают пятна содержащие 2 — 10 мг метаболита.  $R_f = 0,22 — 0,28$  этот метод в связи с уже разработанным методом (2) определяющим гуанин-мтаболит амбарных клещей — может служить для гигиенической оценки муки.

H. M ł o d e c k i

BIOCHEMICAL METHOD FOR DETERMINATION OF FOOD CONTAMINATION  
WITH INSECTS

Summary

New analytical procedure was elaborated for determination of the degree of contamination of foods with excrements of insects. The method is based on the presence of uric acid in excrements of insects. Uric acid is extracted by maceration of material with 0,5%  $Na_2CO_3$  solution during 30 minutes at 65°C and sepa-

ration of the extract on centrifuge. The extract is dropped on Whatman paper No. 1, and chromatogram is run with symm-collidine. Chromatogram is developed with 0.2% eosine in saturated  $HgCl_2$  alcoholic solution and the excess of reagent removed with alcohol. Colour is compared with standards or uric acid, run paralelly at the level of 2—10 ug on spot. Rf amounts 0.22 to 0.28.

Above method in addition to previously published (2) method for guanine (catabolite of mites) determination may serve in hygienic control of flours.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Młodecki H.*: Roczniki PZH, 9, 515, 1958. — 2. *Młodecki H.*: Roczniki PZH, 11, 1, 1960. — 3. *Chauvin R.*: Physiologie de l'insecte, 1949 — tłum. rosyjskie Moskwa — 1953, str. 136. — 4. *Kosztójanc Ch. S.*: Osnovy sravnitelnoj fizjologii Moskwa — Leningrad 1951 — tłum. polskie Warszawa 1955. — 5. *Subrahmanyam V., Swaminathan M., Pingale S. V., Kadkol S. B.*: Bull. CFTRI (Mysore), 4, 86, 1955 wg Z. Lebensmittel Untersuch. u. Forsch., 104, 93, 1956. — 6. *Venkatrao S., Krishnamurty K., Swaminathan M., Subrahmanyam F.*: Cereal Chem., 37, 93, 1960. — 7. *Venkatrao S., Nuggehalli R. N., Pingale S. V., Swaminathan M., Subrahmanyam V.*: Cereal Chem., 37, 97, 1960.

# STERINOL — „Polfa“

energiczny, niedrażniący środek dezynfekcyjny, o dużej sile bakteriobójczej.

**STERINOL** jest roztworem bromku dwumetylo-laurylobenzyloamonowego. Światło, temperatura i dopływ powietrza nie zmniejszają siły bakteriobójczej preparatu.

**STERINOL** jest bezbarwny, posiada słaby, przyjemny zapach. Nie powoduje żadnych podrażnień skóry.

**STERINOL** stosuje się w zalecanych rozcieńczeniach do: dezynfekcji rąk, sterylizacji i przechowywania odkażonych narzędzi chirurgicznych oraz strzykawek lekarskich, w chorobach skórnych pochodzenia bakteryjnego i grzybicach, do przemywania zakażonych ran, do przepłukiwań w ginekologii i położnictwie.

**STERINOL** jest związkiem chemicznym o własnościach obniżających napięcia powierzchniowe, zapewnia szeroką skalę zastosowań: do dezynfekcji, oczyszczania naczyń, sprzętów i bielizny szpitalnej.

**STERINOL** jest środkiem nietoksycznym, nie zawiera fenolu, kresolu, jodu, ani metali ciężkich.

Szczegółowy sposób użycia w ulotkach, załączonych do każdego opakowania.

Producent:

ZAKŁADY PRZEMYSŁU CHEMICZNEGO

PABIANICE

Pabianice, Żymierskiego 5