

## Oznaczanie zawartości hydroksyproliny w handlowych preparatach kolagenowych metodą spektrofotometryczną

Determination of hydroxyproline content in collagen commercial formulations by spectrophotometric method

Dorota Gendaszewska\*

Instytut Przemysłu Skórzanego w Łodzi

---

### Abstrakt

W pracy zbadano zawartość hydroksyproliny w preparatach handlowych metodą spektrofotometryczną. Zastosowanie kwasowej hydrolizy w szybki i łatwy sposób pozwoliło na wyodrębnienie wolnych aminokwasów z preparatów kolagenowych. Stężenie hydroksyproliny w badanych preparatach (K2-K5) było dość wysokie i mieściło się w granicy od 594  $\mu\text{g/ml}$  do 1243  $\mu\text{g/ml}$ . Główną zaletą badanych preparatów kolagenowych jest zawartość niezhydrolizowanego kolagenu, który zawiera naturalny czynnik nawilżający.

### Abstract

The content of hydroxyproline in commercial preparations was determined by spectrophotometric method. Acidic hydrolysis in a quick and easy method for isolation of free amino acids from collagen preparations. It was found that the concentration of hydroxyproline in the tested formulations (K2-K5) was quite high and ranged from 594  $\mu\text{g/ml}$  to 1243  $\mu\text{g/ml}$ . The main advantage of the tested collagen preparations is the content of non-hydrolysed collagen, which contains a natural moisturizing agent.

*Słowa kluczowe:* kolagen, hydroliza kwasowa, hydroksyprolina, metody analityczne;

*Keywords:* collagen, acid hydrolysis, hydroxyproline, analytical methods;

---

### 1. Wstęp

Kolagen jest głównym biopolimerem organizmów żywych i stanowi około 1/3 wszystkich białek organizmu ludzkiego. Znajduje się w ścięgnach, kościach, skórze zwierząt lądowych (bydłęcej, świńskiej) oraz w organizmach morskich, szczególnie w rybach, gąbkach i meduzach [1-3]. Zawartość kolagenu w danym materiale jest uzależniona od rodzaju tkanki lub narządu, wieku tkanki oraz od gatunku, rasy i płci zwierzęcia. Co ciekawe, narządy przeznaczone do pełnienia funkcji podporowych (skóra, ścięgna) zawierają dużo kolagenu, natomiast niewielkie

---

\* autor korespondencyjny: Dorota Gendaszewska: d.gendaszewska@ips.lodz.pl

ilości kolagenu występują w narządach biorących udział w przemianie materii (np. wątroba, nerki) [2]. Wyekstrahowany i oczyszczony kolagen zwierzęcy jest wykorzystywany na szeroką skalę do produkcji kosmetyków i detergentów z uwagi na swoje szczególne właściwości. Kolagen ma działanie nawilżające, przez co wpływa na utrzymanie właściwego stopnia wilgotności skóry. Dzięki temu zapewniona jest poprawa wyglądu oraz ochrona struktury i funkcji skóry. Preparaty z kolagenem mają działanie regenerujące i wygładzające, przywracając skórze świeżość i odpowiednie nawilżenie. Stosowane są więc do produkcji kremów, balsamów, szamponów czy odżywek do włosów. Odmiany kolagenu wzbogacone o kwas borowy, mają silne działanie aseptyczne, dlatego znajdują zastosowanie m.in. w środkach myjąco-piorących [4].

Skład aminokwasowy kolagenu jest charakterystyczną cechą białka. Kolagen, niezależnie od swego pochodzenia zawiera 19 aminokwasów, w tym 4- i 3- hydroksyprolinę (Hyp) oraz 5- hydroksylizynę (Hys). Pierwszy z nich odgrywa istotną rolę stabilizującą strukturę helikalną w połączeniach międzyłańcuchowych z udziałem mostków wodorowych, drugi natomiast jest kowalencyjnie związany z oligosacharydami [5]. Występowanie hydroksyproliny jako specyficznego aminokwasu kolagenu wykorzystuje się praktycznie w metodach ilościowego oznaczania kolagenu, stosując odpowiednie przeliczniki [6-8]. Co ciekawe, zawartość Hyp w kolagenie może się zmieniać w szerokim zakresie, w zależności od rodzaju i pochodzenia materiału kolagenowego. Dodatkowo kolagen charakteryzuje się dużą zawartością proliny i glicyny, nieobecnością cysteiny oraz małym udziałem aminokwasów aromatycznych (m.in. tryptofan, fenyloalanina, tyrozyna) [2].

W ciągu ostatnich lat dokonano znaczących postępów w metodach stosowanych do oznaczania aminokwasów. Wraz z rozwojem nowych metod analitycznych obecnie można ustalić wszystkie aminokwasy o znaczeniu biologicznym z dokładnością wystarczającą do osiągnięcia założonych celów teoretycznych, jak i praktycznych. Obecnie znane są metody grawimetryczne, fotometryczne, chromatograficzne, enzymatyczne i mikrobiologiczne do oznaczania aminokwasów w materiałach biologicznych [9]. Badanie składu aminokwasowego różnego rodzaju białek jest wykorzystywane w podstawowych naukach biologicznych (badania nad transportem i funkcją metabolitów), w medycynie (diagnozowanie różnych schorzeń metabolicznych, badania nad odżywianiem), w naukach rolniczych (problematyka żywienia zwierząt i analiza produkcji pasz) oraz do oceny procesów technologicznych w przemyśle spożywczym i biotechnologicznym. Natomiast określanie ilości poszczególnych aminokwasów budujących konkretne białka i peptydy jest niezwykle przydatne w chemii białek, gdyż pozwala

na pomiar stężenia badanego białka lub peptydu [10].





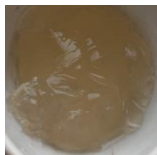
Celem pracy było oznaczenie zawartości hydroksyprowliny w handlowych preparatach kolagenowych. Do tego celu wykorzystano metodę kolorymetryczną, jako prostą i niedrogą alternatywę dla obecnie istniejących nowoczesnych metod analitycznych. Dzięki temu możliwe było określenie zawartości kolagenu w badanych próbkach.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Preparaty kolagenowe

Analizie poddano 5 preparatów kolagenowych, które wykorzystywane są jako składniki biologicznie czynne w produkcji kosmetyków do twarzy, ciała i włosów oraz wyrobów chemii gospodarczej. Pozyskane preparaty do badań to wodne dyspersje białka skóry cielęcej, które zawierają czysty i niezhydrolizowany kolagen natywny o masie cząsteczkowej około 340000 Daltonów. Odmiana czwarta i piąta (K4 i K5) zawierają elastynę. Wartość pH badanych preparatów waha się od 3,7 do 3,8. Właściwości analizowanych preparatów przedstawiono w tab. 1.

**Tab. 1.** Charakterystyka preparatów kolagenowych.

Lp.	KOD	Odmiana	Barwa	Zapach	pH	Dodatek	Wygląd
1	K2	Kolagen 2	Słomkowa	Słaby zapach	3,7	Kwas cytrynowy	
2	K3	Kolagen 3	Szara	Słaby zapach	3,7	Kwas borowy	
3	K3W	Kolagen 3W	Jasnożółta	Zapach bulionu	3,7	Kwas borowy	
4	K4	Kolagen 4	Beżowa	Zapach bulionu	3,8	Elastyna	
5	K5	Kolagen 5	Żółtawa	Słaby zapach	3,8	Kwas borowy, elastyna	

## 2.2. Odczynniki chemiczne

Do analiz wykorzystywano następujące odczynniki chemiczne: kwas siarkowy (VI) o stężeniu  $3 \text{ mol/dm}^3$ , kwas cytrynowy jednowodny, czysty wodorotlenek sodu, bezwodny octan sodu, chloramina-T, aldehyd p-dmetyloaminobenzoowy (DABA), 60% kwas chlorowy (VII), alkohol propylowy, jak również alkohol izopropylowy oraz L-hydroksyprolina jako wzorzec (kwas 4-hydroksypirolidyno- $\alpha$ -węglowy).

## 2.3. Metody badawcze

Badania fizyko-chemiczne preparatów K2-K5 oraz zawartość hydroksyproliny wykonano zgodnie z normą BN-85 6149-03 [11]. Oznaczenie zawartości suchej masy dla poszczególnych preparatów zostało wykonane metodą suszarkową w temp.  $105 \pm 2^\circ\text{C}$ . Oznaczano również masę popiołu. Dodatkowo oznaczano odczyn pH za pomocą pH-metru o dokładności 0,1 mV (pH-meter CP-411 Elmetron). Zawartość hydroksyproliny oznaczano kolorymetrycznie, dokonując pomiaru współczynnika absorpcji przy długości fali  $555 \pm 3 \text{ nm}$ , za pomocą jednowiązkowego spektrofotometru UV-9200 firmy RayLeigh (rys. 1). Hydroksyprolinę przeliczano na kolagen ogólny, stosując mnożnik 7,25 [12].



Rys. 1. B-Spektrofotometr UV-9200 firmy RayLeigh.

### 2.3.1. Hydroliza kolagenu

Aby oznaczyć zawartość hydroksyproliny w próbach kolagenu w pierwszej kolejności wykonano reakcję kwaśnej hydrolizy. W tym celu do próbki odmierzone 4 g próbki z dokładnością do 0,001 g. Następnie dodano 30 ml roztworu kwasu siarkowego, zakręcono próbkę i umieszczono ją w suszarce w temperaturze  $105^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  na około 16 godzin. Gorący

hydrolizat przesączono przez karbowany sącdek o średnicy 110 mm do 100 ml kolby miarowej i dopełniono roztwór objętościowo do kreski. Procedura została przeprowadzana tak samo dla wszystkich preparatów kolagenowych (K2, K3, K3W, K4, K5). Po procesie kwaśnej hydrolizy zneutralizowano kwaśne pH hydrolizatów za pomocą roztworu NaOH.

### **2.3.2. Oznaczenie hydroksyproliny**

Na początku przygotowano roztwór buforowy o pH 6,8, roztwór chloraminy-T, odczynnik barwiący DABA oraz standardowy roztwór hydroksyproliny o stężeniu 0,5 g/l [11]. W dniu sporządzenia krzywej standardowej wykonano serię 5 rozcieńczeń tego roztworu tak, aby końcowe stężenie hydroksyproliny wynosiło odpowiednio: 0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1,0 µg/ml i 1,5 µg/ml. Następnie przeniesiono po 2 ml każdego rozcieńczenia do probówki i dodano po 1 ml roztworu chloraminy-T, często wstrząsając. Po 20 min. dodano 1 ml odczynnika DABA. Po dokładnym wymieszaniu, próbki umieszczono w łaźni wodnej o temp. 60°C. Po upływie 20 min. próbki wyjęto i schłodzono. Następnie zmierzono absorbancję dla każdego rozcieńczenia (długość fali 555±3 nm) i wykreślono krzywą wzorcową absorbancji w zależności od stężenia.

Celem oznaczenia hydroksyproliny w hydrolizatach K2-K5, przygotowano 10, 50 i 100-krotne rozcieńczenia wszystkich roztworów. Następnie przeniesiono po 2 ml każdego rozcieńczenia do probówek i dodano po 1 ml roztworu chloraminy-T, często wstrząsając. Po 20 minutach dodano do każdej probówki po 1 ml odczynnika DABA. Po wymieszaniu, wszystkie próbki umieszczono w łaźni wodnej (temp. 60±2°C). Po 20 minutach próbki wyjęto i schłodzono. Następnie zmierzono absorbancję dla każdego rozcieńczenia. Zawartość hydroksyproliny w próbkach odczytano z krzywej wzorcowej sporządzonej dla roztworu wzorcowego hydroksyproliny. Równocześnie wykonano procedurę dla wody destylowanej (próba ślepa).

## **3. Wyniki badań i ich dyskusja**

Otrzymane hydrolizaty charakteryzowały się przejrzystością, dużą rozpuszczalnością w wodzie i słabym zapachem. Odczyn hydrolizatów mieścił się w granicy 2,1-3,0, dlatego zneutralizowano go do pH=7. Udowodniono, że zmiana pH nie wpływa na końcową zawartość hydroksyproliny [3]. Do oznaczenia spektrofotometrycznego wykorzystano technikę krzywej wzorcowej. Metoda ta jest znaną i często stosowaną metodą pośrednią. Przed wykonaniem

właściwej analizy przygotowano pięć rozcieńczeń roztworów wzorcowych hydroksyproliny. Wyniki pomiarów przedstawiono w tab. 2.

**Tab. 2.** Wyniki pomiaru absorbancji dla wzorca hydroksyproliny.

Stężenie [ $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ]	Ekstynkcja	Transmitancja [%]
0,05	0,010	97,5
0,25	0,061	86,8
0,50	0,119	76,0
1,00	0,234	58,4
1,50	0,356	44,0

Na podstawie wyników wykreślono zależność  $A = f(c)$ , gdzie  $A$  - absorbancja,  $c$  - stężenie wzorca. Wyznaczono w ten sposób równanie prostej oraz współczynnik korelacji  $R^2$ . Dzięki wyznaczeniu krzywej wzorcowej możliwe było wyznaczenie stężenia hydroksyproliny w badanych próbach hydrolizatów kolagenowych (K2-K5). Wyniki pomiaru stężenia hydroksyproliny, odpowiednio dla 3 rozcieńczeń (10x, 50x, 100x) dla każdego preparatu przedstawiono w tab. 3.

**Tab. 3.** Stężenie hydroksyproliny preparatów wyznaczone z krzywej wzorcowej.

Rozcieńczenie	Stężenie hydroksyproliny wg krzywej wzorcowej [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]				
	K2	K3	K3W	K4	K5
10x	2,49	4,03	4,57	2,24	4,38
50x	0,63	0,93	1,06	0,55	1,07
100x	0,23	0,41	0,51	0,22	0,49

Tab. 4 przedstawia wszystkie wyznaczone parametry, tj. suchą masę i zawartość popiołu dla preparatów kolagenowych, stężenie hydroksyproliny wyznaczone spektrofotometrycznie oraz zawartość kolagenu w badanych preparatach kolagenowych (K2, K3, K3W, K4, K5).

**Tab. 4.** Zestawienie wyników z analiz grawimetrycznych i kolorymetrycznych.

Parametr	Jedn.	K2	K3	K3W	K4	K5
Sucha masa	[%]	3,49	2,85	2,78	3,81	3,28
Zawartość popiołu	[%]	1,23	1,69	1,62	1,33	1,57
Stężenie hydroksyproliny	[ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	662 $\pm$ 94	1063 $\pm$ 73	1243 $\pm$ 75	594 $\pm$ 62	1221 $\pm$ 96
Stężenie kolagenu	[%]	13,72	27,05	32,41	11,31	26,99

Sucha masa preparatów kolagenowych wahała się w granicach od 2,78 do 3,81%, natomiast zawartość popiołu od 1,23 do 1,69%. Dzięki hydrolizie kwasowej badanych roztworów kolagenu uwolnione zostały pojedyncze aminokwasy, m.in. hydroksyprolina, którą należało w pracy wyznaczyć. Najwyższe stężenie hydroksyproliny odnotowano dla preparatów odmiany 3

(K3W, K3) i odmiany 5 (K5) w zakresie od 1063 do 1243  $\mu\text{g/ml}$ . Nieco niższe wartości posiadają preparaty odmiany 2 i 4, gdyż zawierają  $662\pm 94$  i  $594\pm 62$   $\mu\text{g/ml}$ , odpowiednio dla preparatów K2 i K4. Tym samym, zawartość kolagenu w preparatach kolagenowych wynosi 13,72%, 27,05%, 32,41%, 11,31%, 26,99%, odpowiednio dla preparatów: K2, K3, K3W, K4 i K5.

W pracy Myjak i Mendryckiej [3] stężenie hydroksyprowiny dla kolagenu wyodrębnionego ze skóry cielęcej, w zależności od zastosowanej metodyki, wahało się w granicach od 1300 do 22000  $\mu\text{g/ml}$ . Stężenie hydroksyprowiny w preparatach dostępnych na rynku wynosi średnio 1000  $\mu\text{g/ml}$  [3]. Uwzględniając powyższe dane można stwierdzić, że badane w pracy preparaty K3W, K5 i K3 cechują się dość wysoką zawartością hydroksyprowiny, a więc zawartość kolagenu jest w nich również wysoka (nawet 32%). Warto również zauważyć, że popularne na rynku preparaty handlowe są najczęściej sprzedawane w formie zhydrolizowanej, a więc zawierają niepełnowartościowy i mniej przydatny kolagen [13]. Dlatego główną zaletą badanych preparatów jest zawartość niezhydrolizowanego kolagenu, który zawiera naturalny czynnik nawilżający, wpływający na utrzymanie właściwego stopnia wilgotności skóry, chroniąc ją jednocześnie przed utratą wody transepidermalnej TEWL (Transepidermal Water Loss).

Podsumowując, odmiany 3 i 5 zawierają wyższe stężenie kolagenu w porównaniu z odmianami 2 i 4. Z tego względu przeznaczone są do produkcji mydeł w płynie czy płynów do kąpieli celem regeneracji skóry i zabezpieczenia jej przed wnikaniem szkodliwych substancji chemicznych zawartych w środkach myjąco-piorących. Dodatek kwasu borowego zapewnia silne działanie aseptyczne, które jest pożądane w tego rodzaju środkach. Natomiast odmiany 2 i 4 przeznaczone są do produkcji środków dedykowanych pielęgnacji skóry.

#### **4. Podsumowanie**

Po przeprowadzonych badaniach wyciągnięto następujące wnioski:

- Zastosowanie kwaśnej hydrolizy w szybki i łatwy sposób pozwoliło na wyodrębnienie wolnych aminokwasów z preparatów kolagenowych, dzięki czemu możliwe było oznaczenie w nich stężenia hydroksyprowiny.
- Badane preparaty handlowe charakteryzują się dość wysokim stężeniem niezhydrolizowanego kolagenu, co jest korzystne z punktu widzenia zastosowania tych preparatów przy produkcji kosmetyków do ciała, skóry i włosów.

- Metoda spektrofotometryczna jest szybkim i niedrogim sposobem oznaczania hydroksyproliny w białkach, dzięki czemu stanowi dobrą alternatywę dla droższych, nowoczesnych metod analitycznych.

## Literatura

- [1] Sionkowska A., Kamińska A., Miles Ch.A., Bailey A.J.: *Wpływ promieniowania UV na strukturę i właściwości kolagenu*, Polimery, 46, 2001, str. 379 – 452.
- [2] Reich G.: *Kolagen. Zarys metod, wyniki i kierunki badania*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1966.
- [3] Myjak M., Mendrycka M.: *Otrzymywanie kolagenu ze skór cielęcych*, Przemysł Chemiczny, 94/2, 2015, str. 169 – 173.
- [4] Li G.Y., Fukunaga S., Takenouchi K., Nakamura F.: *Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials*. International Journal of Cosmetic Science, 27, 2005, str. 101–106.
- [5] Jenkins C.L., Bretscher L.E., Guzei I.A., Raines R.T.: *Effect of 3-hydroxyproline residues on collagen stability*, Journal of the American Chemical Society, 125, 2003, str. 6422 – 6427.
- [6] Maiorano G., Elminowska-Wenda G., Mika A., Rutkowski A., Bednarczyk M.: *Effects of selection for yolk cholesterol on growth and meat quality in Japanese quail (Coturnix coturnix japonica)*, Italian Journal of Animal Science, 8, 2009, str. 457 – 466.
- [7] Monson F., Sanudo C., Sierra I.: *Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality*, Meat Science, 68, 2004, str. 595 – 602.
- [8] Pascual M., Pla M.: *Changes in collagen, texture and sensory properties of meat when selecting rabbits for growth rate*, Meat Science, 78, 2008, str. 375 – 380.
- [9] Fountoulakis M., Hans-Werner L.: *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*, Journal of Chromatography A, 826, 1998, str. 109 – 134.
- [10] Mak P.: *Rozdział 7 Analiza składu aminokwasowego białek i peptydów*, [w:] *Wprowadzenie do chemii białek*, A. Dubin (red.), Wydział Biotechnologii UJ. Kraków, 2003.
- [11] BN-85 6149-03. Norma Branżowa. Surowce do wyrobów kosmetycznych. Kolagen rozpuszczalny. Wymagania i badania.
- [12] Zając M., Midura A., Palka K., Węsierska E., Krzysztoforski K.: *Skład chemiczny, rozpuszczalność kolagenu śródmięśniowego i tekstura wybranych mięśni wołowych*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 4 (77), 2011, str. 103 – 116.
- [13] <http://www.kolagen.pl> – dostęp 20.X.2017 r.