

# STANOVENÍ ČISTÉ SVALOVÉ BÍLKOVINY V MASE A VÝROBCÍCH Z MASA

## 1. Předmět metody

Tato metoda udává stanovení čisté svalové bílkoviny v mase a masných výrobcích. Čistá svalová bílkovina je specifikována jako tzv. čistá bílkovina, tzn. bílkovina pocházející z masa bez nízkomolekulárních nebílkovinných dusíkatých látek po odečtení obsah kolagenu.

Poznámka: Některé vzorky mohou obsahovat i jiné zdroje bílkovin (než ty, které pocházejí z masa), např. sóju, kasein, krevní plazmu atd. Tyto nemasné bílkoviny uměle navyšují hodnotu čisté svalové bílkoviny. Pokud je možné tyto zdroje bílkovin identifikovat a kvantifikovat, je nutné čistou svalovou bílkovinu vypočtenou podle této metodiky korigovat, tzn. množství těchto bílkovin nepocházejících z masa odečíst.

## 2. Podstata zkoušky

Obsah čistých svalových bílkovin je vypočítán jako rozdíl mezi obsahem čisté bílkoviny a obsahem kolagenu.

Čistá bílkovina je stanovena metodou podle Kjeldahla ve vzorku, ve kterém jsou předem vysráženy bílkoviny taninem.

Kolagen je stanoven dle postupu uvedeného v této metodice, tzn. na základě následujícího principu: Nejprve se provede kyselá hydrolyza. Uvolněný 4-hydroxyprolin v hydrolyzátu se poté oxiduje chloraminem B. Oxidovaný produkt se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 558 nm po reakci s p-dimethylaminobenzaldehydem a po vynásobení zjištěného obsahu faktorem 8 se získá obsah kolagenu. Pro stanovení kolagenu je možné použít také alternativní postup, který poskytuje srovnatelné výsledky, např. postup dle AOAC *Official Methods of Analysis* 990.26.

## 3. Chemikálie

Pokud není specifikováno jinak, veškeré chemikálie se používají čistoty p.a., a pro přípravu roztoků se používá destilovaná voda nebo voda srovnatelné čistoty.

### 3.1 Stanovení čisté bílkoviny (příprava vzorku srážením taninem)

- tanin
- kyselina sírová, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 3.2 Stanovení kolagenu

- kyselina sírová, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30% roztok
- hydroxid sodný, NaOH, roztok 10 mol/l
- kyselina chloristá, HClO<sub>4</sub>, roztok 3 mol/l
- kyselina octová, CH<sub>3</sub>COOH
- 1-propanol (propylalkohol) CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH

- 2-propanol (isopropylalkohol)  $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$
- kyselina citronová monohydrát,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- octan sodný trihydrát,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 4-dimethylaminobenzaldehyd  $(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CHO}$
- chloramin B
- chloroform nebo toluen
- citrát-acetátový pufr: 50 g monohydrátu kyseliny citronové, 12 ml koncentrované kyseliny octové, 120 g trihydrátu octanu sodného a 34 g hydroxidu sodného se smísí, rozpustí ve vodě a doplní do objemu 1000 ml. Výsledné pH pufru je 6. Pufr je vhodné konzervovat několika kapkami toluenu či chloroformu. Roztok se uchovává v tmavé lahvi při 4 °C max. dva měsíce.
- oxidační činidlo: 1 g chloraminu B se rozpustí ve 20 ml vody a přidá se 50 ml citrát-acetátového pufru a 30 ml 1-propanolu. Činidlo se musí připravit vždy čerstvé v den analýzy.
- vybarvovací činidlo: 5 g 4-dimethylaminobenzaldehydu se rozpustí v 100 ml isopropylalkoholu. Činidlo se musí připravit vždy čerstvé v den analýzy.

### 3.3 Referenční materiály a roztoky

- 4-hydroxyprolin (trans-4-hydroxy-L-prolin) - základní roztok o koncentraci 1000 mg/l (doporučuje se připravit 100 ml základního roztoku). Roztok se uchovává při 4 °C a je použitelný po dobu jednoho měsíce.
- Pro kalibraci se připraví ze základního roztoku pracovní roztok 4-hydroxyprolinu o koncentraci 50 mg/l. Napipetováním 2, 4, 6, 10 a 20 ml pracovního roztoku do 100 ml odměrných baněk a doplněním destilovanou vodou po značku se připraví kalibrační řada o koncentracích 1, 2, 3, 5 a 10 mg/l.

Poznámka: Pracovní roztok i kalibrační řada se připravují vždy čerstvé v den použití!

## 4. Přístroje a zařízení

Běžné laboratorní přístroje a vybavení především následující

- pH metr
- spektrofotometr
- vodní lázeň (60 °C)

## 5. Pracovní postup

Všechny činnosti musí být prováděny v souladu s obecně platnými předpisy pro bezpečnost a ochranu zdraví při práci.

### 5.1 Příprava laboratorního vzorku

Pokud je vzorek v obalu, kvantitativně se vyjme z obalu společně s tekutinou, rosolem, tukem či jakoukoli jinou složkou, která se vydělila ze vzorku během skladování, a dokonale se zhomogenizuje. Nebalené vzorky se dokonale zhomogenizují.

Pokud jde o zmrazený materiál, ponechá se cca 2 hodiny v chladničce při teplotě 4 °C. Po vyjmutí z chladničky se vzorek zhomogenizuje.

V případě, že výrobek obsahuje povrchové dekorativní krytí (aspik a pod.), tyto části se před homogenizací odstraní; případně se postupuje podle konkrétní specifikace výrobku.

Skutečnost, že některé části výrobku byly před homogenizací odstraněny, je nutné uvést do protokolu o zkoušce.

## 5.2 Příprava vzorku pro stanovení čisté bílkoviny (sražení taninem)

Do kádinky se naváží cca 1,5 g s přesností 0,001 g zhomogenizovaného vzorku a přidá se 50 ml horkého roztoku taninu (10 g taninu se rozpustí v 500 ml destilované vody, přidá se 1 ml koncentrované kyseliny sírové a doplní destilovanou vodou do 1000 ml). Kádinka se asi na 5 minut umístí do ultrazvukové lázně a po dalších 30 minutách stání se suspenze zfiltruje přes červený filtr č. 392. Ve sraženině na filtru se stanoví bílkoviny metodou podle Kjeldahla. Vždy se provádí slepé stanovení.

## 5.3 Příprava vzorku pro stanovení kolagenu (hydrolýza)

Do 100ml infuzní láhve se odváží asi 3 g zhomogenizovaného vzorku s přesností 0,001 g. Přidá se 30 ml 30% kyseliny sírové a přidají se varné keramické střepy. Láhev se uzavře zátkou a vloží do sušárny vyhřáté na 105 °C. Hydrolýza probíhá po dobu 14 hodin (nejlépe přes noc). Po vyjmutí ze sušárny a ochlazení se obsah lahve převede do 50ml odměrné baňky ( $V_1$ ). Objem se po vytemperování doplní destilovanou vodou po značku, promíchá a zfiltruje. Alikvotní podíl 5 ml ( $V_2$ ) se převede do kádinky, přidá se asi 20 ml vody a použitím asi 3 – 5 ml 10mol/l NaOH se upraví pH na hodnotu 5 - 8. Takto upravený roztok zneutralizovaného hydrolyzátu se kvantitativně převede do 50ml odměrné baňky ( $V_3$ ). Objem se doplní destilovanou vodou po značku. Připravený vzorek se použije pro spektrofotometrické stanovení.

## 5.4 Vlastní stanovení

### 5.4.1 Stanovení bílkovin

Obsah čistých bílkovin se stanoví ve vzorku připraveném dle 5.2 metodou podle ČSN ISO 1871 Potraviny a krmiva - Obecné pokyny pro stanovení dusíku metodou podle Kjeldahla. Pro přepočítání obsahu dusíku na obsah bílkovin se použije faktor 6,25.

### 5.4.2 Stanovení kolagenu

#### 5.4.2.1 Kalibrace

Do zkumavek se odměří po 1 ml roztoku z kalibrační řady a přidá se po 1 ml oxidačního činidla. Směs se promíchá a nechá stát 20 minut při laboratorní teplotě. Poté se přidá 1 ml 3mol/l  $\text{HClO}_4$  a po promíchání ještě 1 ml vybarvovacího činidla. Směs se opět promíchá a vloží do vodní lázně předem vyhřáté na 60 °C. Temperování probíhá po dobu 20 minut od dosažení této teploty (teploměr se vloží do kontrolní zkumavky se stejným objemem vody).

Slepý pokus zahrnuje stejný postup, avšak místo kalibračního roztoku se použije destilovaná voda. Po vyjmutí z lázně a rychlém ochlazení pod tekoucí vodou a následném vytemperování na laboratorní teplotu se změří absorbance při vlnové délce 558 nm v 1cm kyvetě proti destilované vodě. Zbarvení je stálé po dobu 60 minut.

Poznámka: Hodnoty absorbancí kalibrace jsou použitelné pro výpočet korigovaných absorbancí a pro sestavení grafu po dobu 1 měsíce. V případě odlišné hodnoty (od běžné hodnoty) absorbance slepého pokusu, je nutné provést novou kalibraci ihned.

#### 5.4.2.2 Měření vzorku

Do zkumavky se odměří 1 ml zneutralizovaného hydrolyzátu roztoku vzorku ( $V_4$ ) a přidá se 1 ml oxidačního činidla. Směs se promíchá a nechá stát 20 minut při laboratorní teplotě. Poté se přidá 1

ml 3mol/l HClO<sub>4</sub> a po promíchání ještě 1 ml vybarvovacího činidla. Směs se opět promíchá a vloží do vodní lázně předem vyhřáté na 60 °C. Temperování probíhá po dobu 20 minut od dosažení této teploty (teploměr se vloží do kontrolní zkumavky se stejným objemem vody).

Po vyjmutí z lázně a rychlém ochlazení pod tekoucí vodou a následném vytemperování na laboratorní teplotu se změří absorbance při vlnové délce 558 nm v 1cm kyvetě proti destilované vodě. Zbarvení je stále po dobu 60 minut. Je-li zjištěná koncentrace mimo kalibrační rozmezí, je nutné vzorek (V<sub>3</sub>) zředit a celý postup přípravy a měření zopakovat.

Slepý pokus se stanovuje stejným postupem jako vlastní vzorek. Místo 1 ml hydrolyzátu se použije 1 ml destilované vody.

## 5.5 Výpočty

Korigované absorbance (A<sub>K</sub>) se získávají odečtením hodnoty absorbance slepého pokusu (A<sub>S</sub>) od naměřených hodnot absorbancí jednotlivých vzorků nebo kalibrační řady (A<sub>558</sub>).

$$A_K = A_{558} - A_S$$

### 5.5.1 Kalibrační graf

Z korigovaných absorbancí kalibrační řady se vypočítají regresní koeficienty (a, b) kalibrační přímky (závislost absorbance při 558 nm (A<sub>K</sub>) na koncentraci 4-hydroxyprolinu v mg/l) a korelační koeficient. Hodnota korelačního koeficientu musí být ≥ 0,99. V opačném případě je nutné kalibraci opakovat.

Z korigovaných absorbancí kalibrační řady se poté sestrojí kalibrační graf, který je použitelný po dobu 1 měsíce.

### 5.5.2 Kvantitativní vyhodnocení

a) Koncentrace 4-hydroxyprolinu (A) v mg/l ve vzorku se vyhodnotí přímým porovnáním korigovaných hodnot absorbance vzorku (A<sub>K</sub>) s kalibračním grafem nebo se koncentrace 4-hydroxyprolinu (A) v mg/l vypočítá dosazením zjištěné korigované absorbance do rovnice kalibrační přímky dle vzorce

$$A = (A_K - b)/a$$

kde

- A je obsah 4-hydroxyprolinu [mg/l]
- A<sub>K</sub> je korigovaná absorbance
- a je parametr kalibrační přímky - směrnice přímky
- b je parametr kalibrační přímky - úsek na ose y

Za výsledek se považuje průměrná hodnota získaná ze dvou paralelních stanovení.

b) Koncentrace 4-hydroxyprolinu (X) v g/100 g se vypočítá s ohledem na navážku vzorku podle vzorce:

$$X = \frac{A \cdot V_1 \cdot V_3}{n \cdot V_2 \cdot V_4 \cdot 10000}$$

kde

- X je výsledná koncentrace 4-hydroxyprolinu [g/100 g]
- A je obsah 4-hydroxyprolinu [mg/l]
- n je navážka vzorku [g]

- $V_1$  je objem hydrolyzátu po doplnění v odměrné baňce [ml]
- $V_2$  je objem pipetovaného hydrolyzátu [ml]
- $V_3$  je objem roztoku s upraveným pH, po doplnění v odměrné baňce [ml]
- $V_4$  je objem pipetovaného roztoku do zkumavky [ml]
- 10000 je přepočet na g/100 g

Při dodržení všech uvedených ředění objemů a pipetování (tj.  $V_1=50$ ,  $V_2=5$ ,  $V_3=50$  a  $V_4=1$  ml) lze použít zkrácený vzorec:

$$X = \frac{A - 0,05}{n}$$

Výsledek se zaokrouhluje na 2 desetinná místa.

c) Obsah kolagenu (K) v g/100 g

$$K = X \cdot 8$$

kde

- K je obsah kolagenu [g/100 g]
- X je koncentrace 4-hydroxyprolinu [g/100 g]
- 8 faktor přepočtu hydroxyprolinu na kolagen

Poznámka: Kolagenová pojivová tkáň obsahuje 12,5 % hydroxyprolinu, za předpokladu, že se pro výpočet bílkovin použije hodnota faktoru 6,25.

Výsledek se zaokrouhluje na 2 desetinná místa.

d) Obsah čisté svalové bílkoviny (ČSB) v g/100 g

$$\check{C}SB = B - K$$

kde

- ČSB je obsah čisté svalové bílkoviny [g/100 g]
- B je obsah čisté bílkoviny [g/100 g]
- K je obsah kolagenu [g/100 g]

Výsledek se zaokrouhluje na 1 desetinné místo.

## 6. Parametry metody

Parametry metody byly získány v mezilaboratorním testu pořádaném Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí ve spolupráci se Státní veterinární správou v roce 2014.

Laboratoř/název parametru	šunka	maso
	ČSB (po srážení taninem)	ČSB (po srážení taninem)
	g/100 g	g/100 g
1	9,60	19,8
	9,36	20,2
2	10,18	20,75
	10,13	20,95
3	9,74	20,60
	9,53	20,47
4	10,43	20,95
	10,32	20,83
5	9,47	20,25
	9,14	20,19
6	9,52	19,87
	10,17	20,74
Průměrná hodnota	9,80	20,5
Počet laboratoří po vyloučení odlehlých	6	6
Počet odlehlých laboratoří	0	0
Směrodatná odchylka opakovatelnosti	0,234	0,30
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (%)	2,4	1,5
<b>Mez opakovatelnosti</b>	<b>0,65</b>	<b>0,83</b>
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti	0,440	0,42
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (%)	4,5	2,0
<b>Mez reprodukovatelnosti</b>	<b>1,23</b>	<b>1,17</b>

### 6.1 Nejistota stanovení

Z validačních dat byla stanovena hodnota rozšířené nejistoty stanovení ve výši 0,6 g/100 g. Po zohlednění předpokládané přirozené heterogenity reálných vzorků byla tato nejistota rozšířena na hodnotu 0,8 g/100 g.

### 6.1.1 Příklad použití rozšířené nejistoty v rámci úředního dozoru

Požadavek vyhlášky č. 326/2001 Sb. ve znění pozdějších předpisů pro šunku výběrovou je nejméně 13,0 % hmotnostních (tj. g/100 g).

U vzorku šunky výběrové byl zjištěn obsah čisté svalové bílkoviny 12,2 g/100 g. Rozšířená nejistota stanovení činí 0,8 g/100 g. tzn. interval, v němž by se měla s pravděpodobností 95% pohybovat skutečná (správná) hodnota čisté svalové bílkoviny ve vzorku, je  $12,2 \pm 0,8 = <11,4 - 13,0>$  g/100 g.

Výrobek tedy v tomto případě ještě vyhovuje, byť s přihlédnutím k rozšířené nejistotě stanovení, požadavkům vyhlášky č. 326/2001 Sb.

Pokud by byl zjištěn obsah čisté svalové bílkoviny 12,1 g/100 g, horní okraj intervalu výsledku by byl i po zohlednění nejistoty ve výši 0,8 g/100 g pouze 12,9 g/100 g a výrobek by tak již nevyhověl požadavku vyhlášky č. 326/2001 Sb. Stejně tak by byly vyhodnoceny všechny výsledky menší než 12,1 g/100 g. Naopak všechny výsledky větší než 12,2 g/100 g by byly považovány za vyhovující.

MUDr. Viera Šedivá, v.r.

Vrchní ředitelka sekce potravinářských výrob