
	Veterinární univerzita Brno Fakulta veterinární hygieny a ekologie Palackého 1946/1, 612 42 Brno	
	Metodika	
	Strana 1 (celkem 10)	

QK21020199


**Stanovení čistých svalových bílkovin přímou
metodou přes celkový kreatinin**

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Ing. František Ježek, Ph.D.

ISBN 978-80-7305-954-5

2023

	Veterinární univerzita Brno Fakulta veterinární hygieny a ekologie Palackého 1946/1, 612 42 Brno	
	Metodika	
	Strana 2 (celkem 10)	

1. Cíl metodiky



Cílem zaváděné metodiky je umožnit stanovení obsahu čisté svalové bílkoviny v masných výrobcích přímou metodou, která je méně náročná na čas i přístrojové vybavení laboratoře. Současná nepřímá metoda stanovení obsahu čistých svalových bílkovin odečtem obsahu kolagenu od obsahu čistých bílkovin je časově i přístrojově náročná a nedokáže odhalit použití bílkovin rostlinného původu. Navíc u trvanlivých fermentovaných masných výrobků dochází v průběhu fermentace k proteolytickým změnám, které mohou následně snižovat zjištěnou hodnotu obsahu čistých svalových bílkovin. Kreatin a kreatinin jsou charakteristické složky svalové tkáně a jejich testování jsou používána ke stanovení přítomnosti masa v potravinářských produktech. Stanovení celkového kreatinu (kreatin + 1,159 x kreatinin) by mělo umožnit odhad bílkovin svalové tkáně. Je-li jako index kvality měřen kreatinin, potom 20 mg kreatininu/100 g vzorku odpovídá 1 g svalových bílkovin/100 g vzorku. Vztah mezi obsahem čistých svalových bílkovin a kreatinem je lineární a rovněž rozsah hodnot obsahu kreatinu v 1 g kontraktilních svalových bílkovin při srovnání výsekových částí vepřového, hovězího a skopového masa je velmi úzký.

2. Vlastní popis metodiky

2.1 Princip:

Veškerý kreatin a kreatin fosfát jsou v kyselém prostředí a za působení vysoké teploty převedeny na kreatinin. Stanoví se obsah celkového kreatininu v kyselém hydrolyzátu a obsah čistých svalových bílkovin (ČSB) se vypočítá z empirického vztahu:

$$\text{ČSB} \left(\frac{g}{100g} \right) = \frac{\text{obsah kreatininu ve vzorku} \left(\frac{mg}{100g} \right)}{20}$$

	Veterinární univerzita Brno Fakulta veterinární hygieny a ekologie Palackého 1946/1, 612 42 Brno	
	Metodika	
	Strana 3 (celkem 10)	

2.2 Hydrolýza vzorku:

Do 50ml zábrusové Erlenmayerovy baňky se odváží 2 g homogenizovaného vzorku s přesností na dvě desetinná místa (n). Přidá se 30 % kyselina sírová (30 ml) a baňka se vloží do sušárny vyhřáté na 105 °C. Hydrolýza probíhá po dobu 14 hodin (nejlépe přes noc). Po ochlazení se obsah baňky převede do 50 ml odměrné baňky a doplní destilovanou vodou po značku. Obsah baňky se zfiltruje přes papírový filtr a filtrát prostý pevných částic se použije pro stanovení kreatininu.

2.3 Spektrofotometrické stanovení kreatininu:

Kreatinin tvoří červeně zbarvený komplex s alkalickým pikrátem sodným na základě tzv. Jaffého reakce. Intenzita zbarvení při 495 nm je úměrná koncentraci kreatininu.

Materiál a vybavení pro vlastní spektrofotometrické stanovení

- 5 % vodný roztok kyseliny trichloroctové (TCA)
- 10 % NaOH
- 10 mol/l NaOH
- zásobní standardní roztok kreatininu (500 µg/ml) v 5 % TCA
- 0,5 % vodný roztok kyseliny pikrové
- alkalický pikrát sodný (100 ml 0,5 % vodného roztoku kyseliny pikrové se smíchá s 10 ml 10 % roztoku hydroxidu sodného)
- 20 % suspenze halloysitu
- filtrační papír
- laboratorní míchačka hřídelová
- třepačka vortex (vírový mixér)
- centrifuga s regulací otáček a teploty
- spektrofotometr umožňující měření na vlnové délce 495 nm

Poznámka:

	Veterinární univerzita Brno Fakulta veterinární hygieny a ekologie Palackého 1946/1, 612 42 Brno	
	Metodika	
	Strana 4 (celkem 10)	


Doba použitelnosti zásobního roztoku kreatininu (500 µg/ml 5 % TCA) skladovaného v chladničce je minimálně 1 měsíc. Doba použitelnosti 0,5 % kyseliny pikrové je minimálně 3 měsíce. Alkalický roztok pikrátu sodného a 20 % suspenze halloysitu se připravuje vždy čerstvý před měřením. Všechny chemikálie jsou čistoty p.a.

Kalibrace

Ze zásobního standardního roztoku kreatininu (500 µg/ml) se pro kalibraci připraví (ředění destilovanou vodou) pracovní roztok o koncentraci 50 µg kreatininu/ml a z něho se do šesti 50 ml centrifugačních zkumavek (podle možností centrifugy lze použít i menší objem) odpipetuje: 0, 1, 2, 3, 4 a 5 ml. Připraví se tak kalibrační řada roztoků o koncentracích 0, 2, 4, 6, 8 a 10 µg kreatininu/ml. K obsahu zkumavek se přidá tolik 5 % TCA, aby objem v každé zkumavce byl 5 ml. Do centrifugační zkumavky se přidají 4 ml suspenze halloysitu a zkumavky se uzavřou. Po dobu 10 minut se vzorky protřepávají na vortexu a potom jsou centrifugovány po dobu 10 minut při teplotě 20 °C a otáčkách 3000 za minutu. Po odstředění slejeme ze zkumavek supernatant. Ke vzniklému sedimentu se přidá 0,5 ml 10 % vodného roztoku hydroxidu sodného, 5 ml alkalického pikrátu sodného a několik skleněných kuliček. Zkumavky se opět protřepávají 10 minut na laboratorním vortexu a následně jsou opět centrifugovány po dobu 10 minut při teplotě 20 °C a otáčkách 3000 za minutu. Po odstředění se supernatant převede do 25 ml skleněných zkumavek, doplní destilovanou vodou po značku a nechá stát 120 minut při laboratorní teplotě za nepřístupu světla. Poté se změří absorbance při vlnové délce 495 nm. Při běžném měření se s kalibračními roztoky současně proměřují i vzorky. Vzhledem k tomu, že zbarvení není stálé ani po 120 minutách, je třeba měření absorbancí kalibračních roztoků a vzorků provést nejpozději do 5 minut od vyjmutí z temna.

Vzorek

Do 50 ml centrifugační zkumavky se odpipetuje 1 ml kyselého hydrolyzátu vzorku a zneutralizuje se 10 mol/l NaOH na pH 5 až 8 (kontrola pomocí indikátorového papírku). Pokud se vzorek zahřeje, ochladí se pod tekoucí vodou. Poté se přidá tolik 5 % TCA, aby součet objemu vzorku, 10 mol/l NaOH použitého na neutralizaci a 5 % TCA byl 5 ml. Přidá

	Veterinární univerzita Brno Fakulta veterinární hygieny a ekologie Palackého 1946/1, 612 42 Brno	
	Metodika	
	Strana 5 (celkem 10)	

se 4 ml suspenze halloysitu a po dobu 10 minut protřepává na vortexu. Po protřepání se zkumavka vloží do centrifugy a odstředí se po dobu 10 minut při teplotě 20 °C a otáčkách 3000 za minutu. Po odstředění slejeme ze zkumavky supernatant. Ke vzniklému sedimentu se přidá 0,5 ml 10 % vodného roztoku hydroxidu sodného, 5 ml alkalického pikrátu sodného a několik skleněných kuliček. Zkumavka se opět protřepává 10 minut na laboratorním vortexu a následně je opět centrifugována po dobu 10 minut při teplotě 20 °C a otáčkách 3000 za minutu. Po odstředění se supernatant převede do 25 ml skleněné zkumavky, doplní destilovanou vodou po značku a nechá stát 120 minut při laboratorní teplotě za nepřístupu světla. Poté se změří absorbance při vlnové délce 495 nm. Při měření vzorku pracujeme vždy v duplikátu.

Výpočty

Z hodnot měření kalibračních roztoků se vypočítají regresní koeficienty (a, b) kalibrační přímky (závislost absorbance při 495 nm A_{495} na koncentraci kreatininu v $\mu\text{g/ml}$) a korelační koeficient. Hodnota korelačního koeficientu musí být rovna nebo vyšší než 0,99, v opačném případě je nutné kalibraci opakovat.


Regresní tvar přímky je

$$A_{495} = a \times \text{kreatinin} + b$$

kde A_{495} je změřená absorbance příslušného kalibračního roztoku o koncentraci v $\mu\text{g/ml}$ (kreatinin). Dosazením změřené absorbance vzorku do výše uvedené rovnice vypočítáme koncentraci kreatininu ($\text{kreatinin} = (A_{495} - b)/a$) a dosazením do vztahu

$$\text{mg kreatininu}/100 \text{ g} = \text{kreatinin} (\mu\text{g/ml}) \times 5 \times R/n$$

vypočítáme množství kreatininu ve 100 gramech vzorku (R je ředění hydrolyzátu, n je navážka vzorku v gramech na hydrolyzu). Vydělením nalezené hodnoty číslem 20 (viz rovnice 1) dostaneme obsah čistých svalových bílkovin ve 100 g vzorku. Výsledek se uvádí na jedno desetinné místo.

	Veterinární univerzita Brno Fakulta veterinární hygieny a ekologie Palackého 1946/1, 612 42 Brno	
	Metodika	
	Strana 6 (celkem 10)	

3. Srovnání novosti postupů


Stanovení svalových bílkovin na základě spektrofotometrického stanovení obsahu celkového kreatininu bylo popsáno již dříve. Při ověřování této popsané metodiky byly však získávány hodnoty obsahu čistých svalových bílkovin (ČSB), které nebyly reálné a mnohdy vyšší, než obsah celkového dusíku (hrubých bílkovin). Problémem je zřejmě nespecifita Jaffého reakce, kdy řada interferujících látek může stanovení obsahu kreatininu rušit a navyšovat výslednou hodnotu. Inovace předkládaného postupu spočívá v zařazení adsorpce kreatininu na halloysit, čímž dochází k odstranění těchto interferujících látek. Ve srovnání s dosud používanou nepřímou metodou stanovení obsahu ČSB, kdy je odečítán obsah kolagenu od obsahu čistých bílkovin, je stanovení ČSB přes celkový kreatinin ukazatelem množství použitého masa a výsledek nezahrnuje možný obsah bílkovin (dusíku) z rostlinných zdrojů.

4. Popis uplatnění metodiky

Metodika je určena především kontrolním orgánů státní správy v oblasti kontroly potravin živočišného původu. Pokud bude rozhodnuto o vhodnosti metody stanovení obsahu čistých svalových bílkovin ve vybraných masných výrobcích, bude metoda zveřejněna v souvislosti s limity uvedenými ve Vyhlášce č. 69/2016 Sb. Podle rozhodnutí příslušného poskytovatele budou výsledky promítnuté do předpisů nelegislativní povahy formou věstníku, příp. metodického pokynu.

5. Ekonomické aspekty

Odhadované náklady za předpokladu, že laboratoř vybavení nemá, souvisí s pořízením přístrojového vybavení, laboratorního skla a pomůcek, chemikálií a ochranných pracovních pomůcek. Největší část, přibližně 250 tis. Kč jsou náklady na pořízení přístrojů (analytické váhy, sušárna, centrifuga, spektrofotometr, vortex), dalších asi 50 tis. Kč představuje laboratorní sklo a potřeby (pipety, indikátorové papírky, centrifugační

	Veterinární univerzita Brno Fakulta veterinární hygieny a ekologie Palackého 1946/1, 612 42 Brno	
	Metodika	
	Strana 7 (celkem 10)	

zkumavky....). Odhadované celkové náklady na zavedení metodiky by byly asi 300 tis. Kč. Ekonomický přínos lze spatřovat ve zjednodušení metody stanovení obsahu čistých svalových bílkovin, jelikož proces a vybavení pro stanovení nepřímou metodou je mnohem složitější a nákladnější, jedná se zejména o drahé přístrojové vybavení (analyzátor bílkovin, spalovací jednotka), nutnost použití digestoře a časová náročnost.

6. Seznam použité související literatury

ADAMCZYK, B., SIMON, J., KITUNEN, V., ADAMCZYK, S., SMOLANDER, A. (2017): Tannins and Their Complex Interaction with Different Organic Nitrogen Compounds and Enzymes: Old Paradigms versus Recent Advances. *ChemistryOpen* 6, 610-614.

ARO ARO, J. M., NYAM-OSOR, P., TSUJI, K., SHIMADA, K., FUKUSHIMA, M., SEKIKAWA, M. (2010): The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry* 119, 279-285.

ČÍŽKOVÁ, S. (2011): Drůbeží strojně oddělené maso vyrobené různými způsoby: stanovení bílkovin tuku a kostních úlomků. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, 76 s.

DEL CAMPO, G., GALLEGO, B., BERREGI, I., CASADO, A. (1998). Creatinine, creatine and protein in cooked meat products. *Food Chemistry* 63(2), 187-190.

DVOŘÁK, Z. (1981): Creatine as an indicator of net muscle proteins. *Science of Food and Agriculture* 32, 1033-1036.

HAJŠLOVÁ, J., JÍRŮ, M., KOCOUREK, V., STRÁNSKÁ, M. (2018): Metodika pro určení obsahu čisté svalové bílkoviny v masných výrobcích. Certifikovaná metodika. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 34 s.

IKONIĆ, P., TASIĆ, T., PETROVIĆ, L., ŠKALJAC, S., JOKANOVIĆ, M., MANDIĆ, A., IKONIĆ, B. (2013): Proteolysis and biogenic amines formation during the ripening of

	Veterinární univerzita Brno Fakulta veterinární hygieny a ekologie Palackého 1946/1, 612 42 Brno	
	Metodika	
	Strana 8 (celkem 10)	

Petrovská klobása, traditional dry-fermented sausage from Northern Serbia. Food Control 30; 69-75.

KOTAŠKA, K., JEDLIČKOVÁ, B., PRŮŠA, R. (2008): Je stanovení sérového kreatininu vždy věrohodné? Úskalí preanalytické fáze. Časopis lékařů českých, 147, 392-395.

KVASNIČKA, F. (2003): Sborník metodik vypracovaný v rámci řešení projektu č. EP9179 Metody pro posuzování shody a detekci falšování potravin. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 18 s.

KVASNIČKA, F., VOLDŘICH, M. (2000): Isotachophoretic determination of creatinine in meat and meat products. Electrophoresis 21, 2848-2850.

MOHABBATI-KALEJAH, E., AZIMIRAD, V., BAHRAMI, M., GANBARI, A. (2012): A review on creatinine measurement techniques. Talanta 97, 1-8.

RALSTON, M. (1955): Plasma creatinine. Journal of Clinical Pathology 8, 160-162.

SPENCER, K. (1986): Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine. Annals of Clinical Biochemistry 23, 1-25.


Věstník Ministerstva zemědělství, Ročník 2014, Částka 1, 25-29.

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 69/2016 Sb. o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. Částka 26, 714-759.

WYSS, M., KADDURAH-DAOUK, R. (2000): Creatine and creatinine metabolism. Physiological Reviews 80(3), 1107-1213.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

JEŽEK, F., DOLEŽALOVÁ, J., BEDNÁŘ, J., KAMENÍK, J. 2021: Kreatin a kreatinin v mase a masných výrobcích. Maso 32(4): 33-36. (QK21020199)

	Veterinární univerzita Brno Fakulta veterinární hygieny a ekologie Palackého 1946/1, 612 42 Brno	
	Metodika	
	Strana 9 (celkem 10)	

JEŽEK, F., BEDNÁŘ, J., DOLEŽALOVÁ, J., KAMENÍK, J. Stanovení obsahu kreatininu a čistých svalových bílkovin v masných výrobcích. (Determination of creatinine and pure muscle protein content in meat products). In Zborník prednášok a posterov z mezinárodnej vedeckej konferencie Hygiena Alimentorum XLI. Nové trendy zvyšovania kvality a zdravotnej bezpečnosti mäsa a mäsových výrobkov. Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmacie v Košiciach, 2021, s. 224-230. (QK21020199)

KAMENÍK, J., JEŽEK, F., BEDNÁŘ, J., DOLEŽALOVÁ, J., BARTÁKOVÁ, K. 2022: K čemu je srážení bílkovin taninem? Proteolýza během zrání trvanlivých fermentovaných salámů a její vliv (nejen) na obsah „čistých“ bílkovin. Maso 33(3): 14-20. (QK21020199)



JEŽEK, F., BARTÁKOVÁ, K., BEDNÁŘ, J., DOLEŽALOVÁ, J., KAMENÍK, J. 2022: Možnosti stanovení obsahu čistých svalových bílkovin v masných výrobcích. Maso 33(5): 16-21. (QK21020199)

BARTÁKOVÁ, K., KRÁLOVÁ, M., KAMENÍK, J., JEŽEK, F., ZOUHAROVÁ, A., SILLINGOVÁ, S. 2023: NIR spektroskopie = metoda spořicí čas při stanovení chemických parametrů masa. Maso 34(1): 26-29. (QK21020199)

KAMENÍK, J., MACHARÁČKOVÁ, B., JEŽEK, F., BEDNÁŘ, J., DOLEŽALOVÁ, J. 2023: A mini review of proteolysis in dry fermented sausages. Fleischwirtschaft 103 (2): 62-67. (QK21020199)

KRÁLOVÁ, M., BARTÁKOVÁ, K., JEŽEK, F., ZOUHAROVÁ, A., KAMENÍK, J. 2023: Využití blízké infračervené spektrometrie pro studium průběhu zrání salámů Poličan. Maso 34(3): 11-15. (QK21020199)

KRÁLOVÁ, M., BARTÁKOVÁ, K., JEŽEK, F., ZOUHAROVÁ, A., KAMENÍK, J. 2023: Diskriminační analýza salámů poličan pomocí blízké infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací. (Discriminant analysis of Poličan sausages by Fourier transform near infrared spectroscopy). In Sborník XLIX. Konference o jakosti potravin a potravinových surovin. Brno: MENDELU Brno, 348-355. (QK21020199)

	Veterinární univerzita Brno Fakulta veterinární hygieny a ekologie Palackého 1946/1, 612 42 Brno	
	Metodika	
	Strana 10 (celkem 10)	

JEŽEK, F., BEDNÁŘ, J., DOLEŽALOVÁ, J., KAMENÍK, J., BARTÁKOVÁ, K., KRÁLOVÁ, M. 2023: Stanovení čistých svalových bílkovin u trvanlivého fermentovaného salámu přes celkový kreatinin spektrofotometricky s adsorpcí – předběžná studie. *Maso* 34(3): 16-22. (QK21020199)

8. Jména oponentů

- a) Odborník z daného oboru: prof. Ing. Jiří Mlček, Ph.D. - Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- b) Odborník z daného oboru: doc. Ing. Pavel Smetana, Ph.D. - Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
- c) Pracovník státní správy: MVDr. Lenka Sedláčková – Státní veterinární správa

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu QK21020199 Možnosti stanovení čistých svalových bílkovin přímou metodou v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025, ZEMĚ.

Vydavatel:

Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Palackého tř. 1946/1, Brno, 612 42

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF

1. Vydání 2023

ISBN 978-80-7305-954-5