



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

**Fakulta potravinářské a biochemické technologie
Ústav analýzy potravin a výživy**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Metodika pro určení obsahu čisté svalové bílkoviny
v masných výrobcích**

Jana Hajšlová, Monika Jírů, Vladimír Kocourek, Milena Stránská

Praha, 2018

Dedikace:

Certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky v rámci řešení projektu NAZV č. QJ1530272 (Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba-spotřebitel) a dále byla tato práce realizována v rámci "Operačního programu Praha - Konkurenceschopnost" (CZ.2.16/3.1.00/21537 a CZ.2.16/3.1.00/24503) za podpory "Národního programu udržitelnosti I" - NPU I (LO1601 - č.: MSMT-43760/2015).

Obsah

1	Cíl metodiky.....	4
2	Teoretický úvod.....	5
3	Charakterizace metodiky	7
3.1	Použitelnost metody.....	7
3.2	Princip metody.....	12
3.3	Bezpečnost práce	12
3.4	Chemikálie, analytické standardy a spotřební materiál.....	12
3.5	Přístroje a zařízení.....	14
3.6	Pracovní postup.....	14
3.6.1	Příprava zásobních roztoků standardů	14
3.6.2	Stabilita standardů aminokyselin.....	16
3.6.3	Příprava kalibračních roztoků standardů	16
3.6.4	Příprava vzorků k analýze	19
3.7	Separace a detekce	21
3.7.1	Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie	21
3.7.2	Identifikace a kvantitativní vyhodnocení analytů.....	22
3.7.3	Kvantifikace čisté svalové bílkoviny	22
3.8	Pracovní charakteristiky metody.....	24
3.8.1	Pravdivost metody.....	24
3.8.2	Rozsah metody a linearita	24
3.8.3	Mez stanovitelnosti a nejnižší kalibrační úroveň (LCL = lowest calibration level)	25
3.8.4	Opakovatelnost metody	25
3.8.5	Nejistota kvantifikace ČSB	26
4	Srovnání novosti postupů	28
5	Popis uplatnění certifikované metodiky	29
6	Ekonomické aspekty	30
7	Seznam související použité literatury	32

1 Cíl metodiky

Jedním z dílčích cílů projektu QJ1530272 podporovaného Ministerstvem zemědělství České republiky bylo vyvinout, optimalizovat a validovat nový analytický postup pro určení obsahu čisté svalové bílkoviny (ČSB) v masných výrobcích na základě stanovení diagnostického markeru 3-methylhistidinu a dalších aminokyselin. Ke stanovení aminokyselin po kyselé hydrolyze bude využito techniky ultra-účinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s analyzátozem typu kvadrupól (U-HPLC–MS).

Vyvinutá metodika má umožnit - kromě kvantifikace ČSB - také rozlišení původu bílkoviny (svalová vs. krevní nebo rostlinná), což patří mezi hlavní limitace Kjeldahlovy metody, která je v současné době jedinou kontrolní metodou pro stanovení obsahu ČSB. Vyvinutá metodika je využitelná pro účely určení obsahu ČSB v masných výrobcích. Výsledky přitom nejsou ovlivněny přidavkem jiné bílkovinné složky, nežli je právě svalová bílkovina (bez kolagenu).

2 Teoretický úvod

Potravinové podvody spojené s falšováním potravin jsou celosvětovým problémem, který poškozuje pověst společností, narušuje trhy a důvěru spotřebitelů. Podvody týkající se falšování masa jsou velmi časté a obvykle se týkají (i) původu masa a režimu výkrmu zvířat; (ii) záměny živočišného druhu masa, tkání, tuků nebo bílkovin, (iii) modifikace výrobních postupů masných výrobků a (iv) přidání nedeklarovaných složek, zejména přídatných látek.

Navzdory existenci velkého množství právních předpisů a specifikací, falšování je globální problém, týkající se nejen masa a masných výrobků, ale prakticky všech druhů potravin.¹ Mezi nejčastější způsoby falšování masných výrobků patří přidavek „cizích“ bílkovin. Přidávání těchto složek do masných výrobků však není, v odůvodněných případech a pokud je označeno v souladu s příslušnými legislativními pravidly, zakázané. Cizí bílkoviny se do masných produktů legálně přidávají z technologických důvodů, protože pomáhají stabilizovat emulze a mají také pozitivní vliv na senzorické vlastnosti (zejména konzistenci výrobku) a jeho údržnost. Dalším důvodem je snížení výrobních nákladů, jelikož tyto bílkoviny mají zpravidla podstatně nižší cenu nežli bílkovina svalová. Nejčastěji se do masných výrobků přidává sójová bílkovina, krevní plasma, mléčné proteiny, proteiny izolované z hrachu, apod.

Závazným právním předpisem, který v České republice definuje požadavky na maso a masné výrobky je Vyhláška č. 69/2016 Sb.

Jednou ze základních metod hodnocení kvality a autenticity masných výrobků je stanovení ČSB pomocí Kjeldahlovy metody. Dosavadní postup využívaný pro úřední kontrolu uvádí podrobně Věstník Ministerstva zemědělství z r. 2014.⁸ Při stanovení ČSB je třeba nejprve provést vysrážení bílkovin taninem (v jiných zemích se využívá též srážení trichloroctovou kyselinou) a odstranit tak nebílkovinný dusík. Zjištěný celkový obsah dusíku se vynásobí empirickým faktorem 6,25 (obsah dusíku v bílkovinách cca 16 %) a od tohoto čísla se odečte kolagen vyjádřený jako obsah 4-hydroxyprolinu (stanoví se spektrofotometricky) vynásobený koeficientem $k=8$. Jakkoli je v současné době tato metoda běžně používána v kontrolní praxi, má svá úskalí a omezení. Jednou z nevýhod tohoto postupu je, že bílkoviny nemusí být kvantitativně vysráženy. Obdobně, v případě fermentovaných výrobků, je zjištěný obsah svalové bílkoviny nižší, nežli odpovídá původně přidanému množství masa před zráním masného výrobku. Touto metodou také není možné zjistit původ obsažené bílkoviny, ale pouze její celkový obsah. Pro účely autentikace je pak potřeba provádět analýzu bílkovinných složek pomocí dalších analytických postupů.^{3,4}

Jednou z možností jak kategorizovat kvalitu masných výrobků je využití přímých metod, které umožňují stanovit přímo látky specifické pro svalové bílkoviny, které se nevyskytují v jiných typech bílkovin. Typickým příkladem jsou 1- a 3-methylhistidin (1-MetHis, 3-MetHis), které jsou markerem myofibrilárních bílkovin myosinu a aktinu, vyskytující se v příčně pruhované svalovině, a zároveň se nevyskytují v jiných potravinách bohatých na bílkoviny, jako jsou vejce, sója, mléko, atd. Na základě poměru sumy 1- a 3-methylhistidinu a ostatních aminokyselin je tedy možné prokázat výskyt rostlinné bílkoviny v masném výrobku nebo i záměnu druhu masa, neboť různé druhy masa se obsahem aminokyselin i 1- a 3-methylhistidinu značně liší.⁵

Při analýze aminokyselin je nejprve nezbytné bílkoviny hydrolyzovat, čímž dojde k rozštěpení peptidových vazeb a uvolnění aminokyselin, které se následně v hydrolyzátu stanou. Hydrolyza může být kyselá, alkalická či enzymatická. Při nejčastěji používané kyselé hydrolyze se zpravidla používá 6M kyselina chlorovodíková, většinou při 110 °C po dobu 16 – 72 hodin.⁶

3 Charakterizace metodiky

3.1 Použitelnost metody

Určení obsahu čisté svalové bílkoviny (ČSB) v mase a masných výrobcích na základě stanovení diagnostického markeru 3-methylhistidinu (3-MetHis) a dalších aminokyselin se jeví jako exaktní a velmi perspektivní metoda. Poskytuje pravdivé informace o množství použité svalové bílkoviny i v případech, kdy je do výrobku použita jiná než svalová bílkovina. Je použitelná i pro fermentované masné výrobky, kdy jinak dochází k podhodnocení nálezů obsahu bílkovin z důvodu částečné proteolýzy bílkovin masa. Na základě zjištěných poznatků je tento certifikovaný analytický postup aplikovatelný pro:

1. Stanovení ČSB na základě obsahu 3-MetHis
2. Určení původu masa (kuřecí vs. vepřové) na základě poměru 1-MetHis k 3-MetHis
3. Stanovení množství přidané kolagenní bílkoviny na základě poměru 4-hydroxyprolinu k 3-MetHis

1. Stanovení ČSB na základě obsahu 3-MetHis

Na reprezentativních souborech vzorků autentických druhů mas byla provedena opakovaná měření pro zjištění obsahu 3-MetHis a ostatních aminokyselin v čistém mase. V **Tabulce 1** jsou zobrazeny výsledky stanovení obsahu aminokyselin v testovaných vzorcích kuřecího (n=10), vepřového (n=16) a hovězího (n=10) masa.

Tabulka 1: Průměrný obsah a rozmezí zastoupení aminokyselin v kuřecím, vepřovém a hovězím mase stanovený technikou U-HPLC-MS po hydrolyze masa. Hodnoty jsou uvedeny v g/100 g čerstvého masa*.

Aminokyselina*	Kuřecí maso (g/100g masa)		Hovězí maso (g/100g masa)		Vepřové maso (g/100g masa)	
	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr
Ala	1,0 - 1,3	1,2	1,1 - 1,3	1,2	0,77 - 1,3	1,0
Arg	1,6 - 1,8	1,7	1,6 - 1,9	1,8	0,85 - 1,8	1,5
Asp + Asn	1,4 - 1,7	1,6	1,1 - 2,1	1,6	1,1 - 2,2	1,9
Cystin	0,25 - 0,32	0,28	0,23 - 0,34	0,27	0,10 - 0,46	0,28
Phe	0,22 - 0,62	0,35	0,25 - 0,37	0,30	0,43 - 0,90	0,73
Glu + Gln	3,2 - 3,6	3,4	3,2 - 4,1	3,6	1,8 - 5,8	3,7
Gly	0,39 - 0,46	0,42	0,44 - 0,56	0,48	0,41 - 1,1	0,76
His	0,71 - 1,1	0,97	0,68 - 1,2	1,0	1,0 - 1,2	1,1
5-hydroxylysin	0,026 - 0,032	0,030	0,051 - 0,069	0,058	0,026 - 0,051	0,040

Aminokyselina*	Kuřecí maso (g/100g masa)		Hovězí maso (g/100g masa)		Vepřové maso (g/100g masa)	
	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr
4-hydroxyprolin	0,051 - 0,055	0,053	0,080 - 0,13	0,10	0,025 - 0,094	0,068
Leu + Ile	1,6 - 1,7	1,7	1,6 - 1,9	1,7	1,3 - 1,8	1,6
Lys	2,1 - 2,3	2,3	2,2 - 2,6	2,4	1,6 - 2,4	2,4
1-MetHis	0,22 - 0,69	0,47	0,034 - 0,072	0,048	0,013 - 0,022	0,017
3-MetHis	0,059 - 0,071	0,064	0,064 - 0,070	0,066	0,064 - 0,072	0,066
Met	0,055 - 0,11	0,088	0,17 - 0,33	0,23	0,22 - 0,58	0,40
Pro	0,20 - 0,61	0,31	0,20 - 0,47	0,30	0,46 - 1,0	0,69
Ser	0,74 - 0,93	0,88	0,80 - 1,1	0,93	0,75 - 1,0	0,91
Thr	1,11 - 1,14	1,1	1,16 - 1,21	1,2	0,88 - 1,2	1,1
Tyr	0,90 - 0,95	0,93	0,97 - 1,1	1,0	0,76 - 1,0	0,92
Val	1,19 - 1,27	1,2	1,2 - 1,4	1,3	0,98 - 1,4	1,2

*Zkratky jednotlivých aminokyselin jsou vysvětleny v Tabulkách 5 a 6 na str. 13

Aminokyselina 3-MetHis, která je specifická pouze pro svalovou bílkovinu, se ve všech druzích masa vyskytovala v průměru 0,064 g/100g v kuřecím mase a 0,066 g/100g ve vepřovém a hovězím mase. Stanovené obsahy odpovídaly i hodnotám stanoveným ve studii Steinführer a kol.⁷ S ohledem na skutečnost, že 3-MetHis se ve všech druzích masa vyskytuje na konstantní hladině, je možné jeho stanovený obsah využít ke kvantifikaci ČSB. Pro přepočtení na obsah ČSB (%) byl vypočten přepočítávací faktor **F = 292** a obsah ČSB se stanoví podle výrazu:

$$\text{ČSB (\%)} = 3\text{-MetHis (\%)} \times 292$$

Pro vypočtení přepočítávacího faktoru byly použity hodnoty ČSB stanovené konvenční metodou⁸. V **Tabulce 2** je zobrazeno porovnání stanovení ČSB přes 3-MetHis a vyjádřené jako suma všech aminokyselin, která by po odečtení obsahu kolagenu měla také reflektovat obsaženou ČSB.

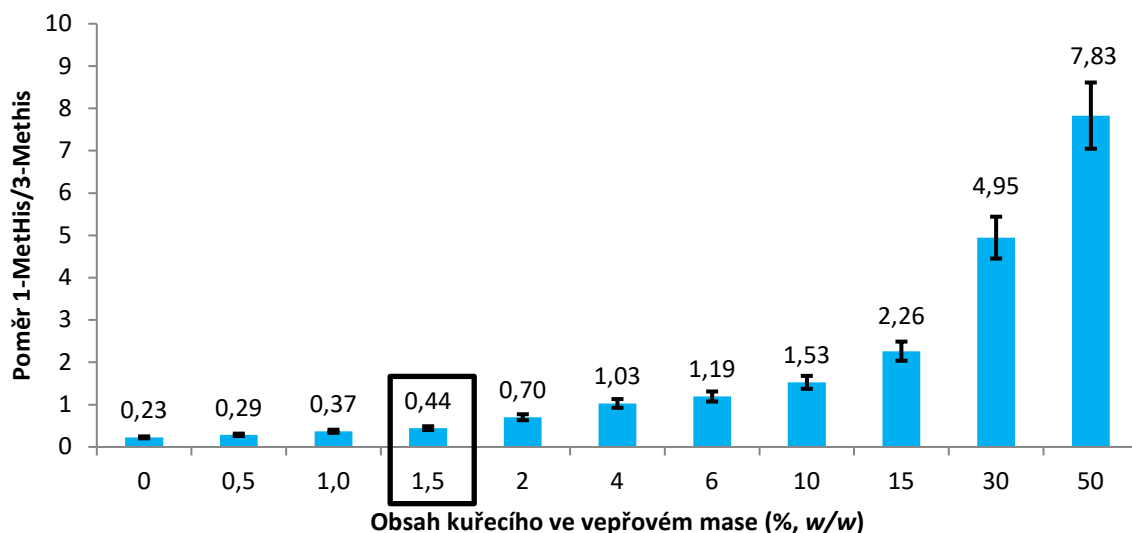
Tabulka 2: Porovnání vypočtené hodnoty ČSB z obsahu 3-MetHis se sumou všech aminokyselin po odečtení kolagenu.

	Kuřecí maso	Vepřové maso	Hovězí maso
ČSB (%) výpočtem z 3-MetHis	18,7	19,3	19,3
ČSB (%) (jako suma všech aminokyselin*)	18,6	19,8	18,8

*Suma aminokyselin po odečtení obsaženého kolagenu (jako 4-hydroxyprolin x 8)

2. Určení původu masa (kuřecí vs. vepřové) na základě poměru 1-MetHis k 3-MetHis.

V kuřecím masě byl zjištěn o řád vyšší obsah 1-methylhistidinu nežli ve vzorcích masa vepřového a hovězího. Tuto skutečnost je možné využít i pro určení nedeklarovaného přídatku kuřecího masa do vepřového či hovězího masného výrobku. Na **Obrázku 1** je graficky znázorněna změna poměrového zastoupení 1-methylhistidinu ku 3-methylhistidinu ve vepřovém masě s přidavkem masa kuřecího. Touto metodou je možné rozlišit přidavek již 1,5 % kuřecího masa do vepřového výrobku. Zjištěné rozmezí hodnot poměrů 1-methylhistidinu ku 3-methylhistidinu pro jednotlivé druhy masa je uvedeno v **Tabulce 3**.



Obrázek 1: Poměr zastoupení aminokyselin 1-methylhistidinu ku 3-methylhistidinu v analyzovaných směsích vepřového masa s rostoucím přidavkem masa kuřecího.

Tabulka 3: Hodnoty poměrů zastoupení aminokyselin 1-methylhistidin/3-methylhistidin v analyzovaných druzích vepřového masa

Druh masa	rozmezí	průměr
Kuřecí maso	7,6 - 10	8,0
Hovězí maso	0,62 - 0,73	0,66
Vepřové maso	0,068 - 0,29	0,24

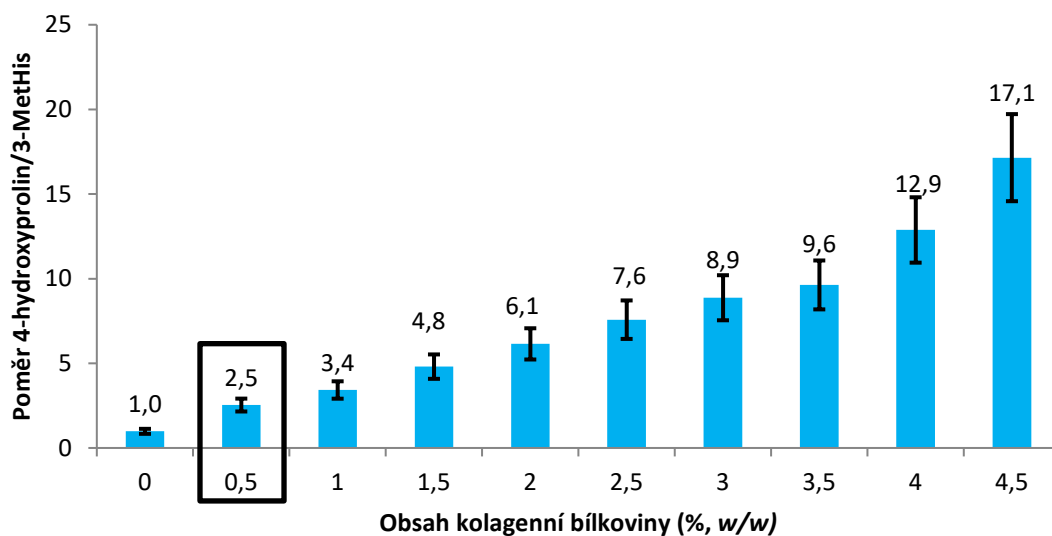
3. Stanovení množství přidané kolagenní bílkoviny na základě poměru 4-hydroxyprolin k 3-MetHis.

Další možností, jak je možné definovat čistou svalovou bílkovinu masa je na základě specifických poměrů aminokyselin k 3-methylhistidinu v jednotlivých druzích mas (**Tabulka 4**). Tyto poměry jsou specifické pro čistou svalovou bílkovinu v jednotlivých typech masa a je možné je využít jako identifikátor čisté svalové bílkoviny.

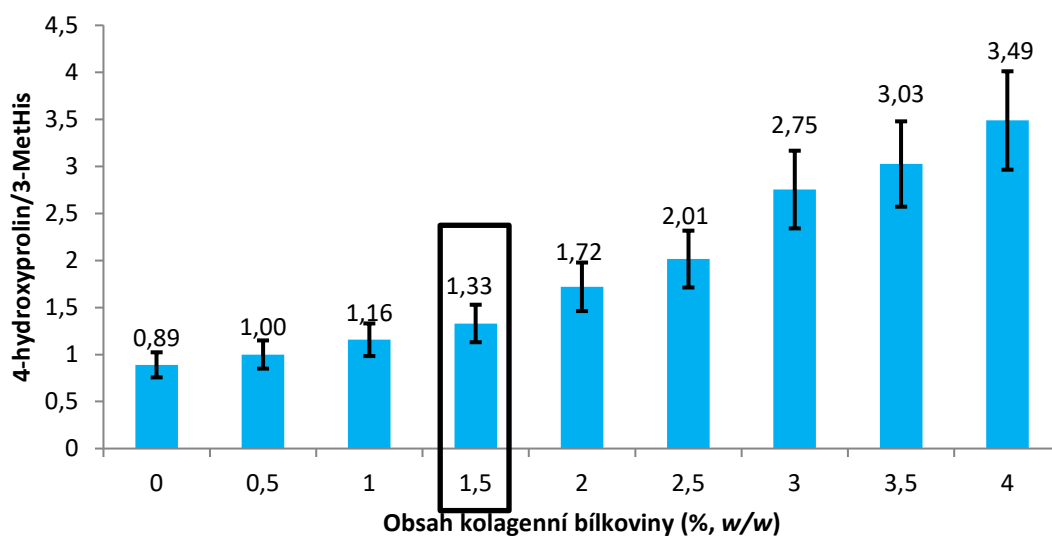
Tabulka 4: Hodnoty poměrů zastoupení aminokyseliny/3-MetHis v analyzovaných vzorcích kuřecího, vepřového a hovězího masa

Aminokyselina/ 3-MetHis	Kuřecí maso		Hovězí maso		Vepřové maso	
	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr
Ala	13 - 22	18	16 - 20	17	11 - 21	17
Arg	20 - 30	27	26 - 27	27	17 - 29	23
Asp + Asn	19 - 28	24	17 - 30	25	16 - 29	23
Cystin	2,9 - 5,4	4,4	3,5 - 4,9	4,1	2,1 - 5,1	3,5
Phe	3,2 - 4,3	3,7	3,8 - 5,7	4,6	11 - 16	12
Glu + Gln	54 - 60	56	48 - 64	55	34 - 77	53
Gly	4,5 - 7,7	6,4	6,6 - 8,7	7,3	8 - 16	11
His	12 - 18	15	11 - 18	16	11 - 18	14
5-hydroxylysin	0,30 - 0,54	0,46	0,77 - 0,98	0,56	0,35 - 0,71	0,6
4-hydroxyprolin	0,92 - 2,5	1,5	1,2 - 1,9	1,6	0,48 - 1,3	1,0
Leu + Ile	20 - 28	26	25 - 27	26	23 - 33	27
Lys	26 - 39	35	34 - 38	36	22 - 37	31
Met	1,2 - 1,9	1,7	2,5 - 4,9	3,5	2,9 - 5,1	4,2
Pro	2,5 - 3,5	3,1	3,0 - 6,9	4,5	6,0 - 13	9,2
Ser	11 - 14	14	13 - 17	14	12 - 19	15
Thr	13 - 19	17	18 - 19	18	16 - 21	18
Tyr	11,16	14	15 - 16	15	16 - 17	15
Val	15 - 21	19	18 - 20	19	13 - 17	15

Pro ověření praktického využití specifických poměrů byly pro vepřové a kuřecí maso následně vytvořeny modelové směsi masa a kolagenní bílkoviny. Obsah 4-hydroxyprolinu vykazoval rostoucí trend se zvyšujícím se přidavkem kolagenní bílkoviny, jak je znázorněno na **Obrázcích 2 a 3**. Jelikož 4-hydroxyprolin je hojně zastoupen v kolagenní bílkovině, může být poměr zastoupení této aminokyseliny vůči 3-MetHis indikátorem přidavku kolagenní bílkoviny do masného výrobku. V případě vepřového masa je možné zjistit přidavek 0,5 % kolagenní bílkoviny a v případě kuřecího masa přidavek 1,5 % kolagenní bílkoviny.



Obrázek 2: Poměr aminokyselin 4-hydroxyprolin/3-MetHis ve vzorcích vepřového masa s různým přídatkem kolagenní bílkoviny.



Obrázek 3: Poměr aminokyselin 4-hydroxyprolin/3-MetHis ve vzorcích kuřecího masa s různým přídatkem kolagenní bílkoviny.

3.2 Princip metody

Metoda je založena na přímém stanovení volných aminokyselin (všech 20 kódovaných aminokyselin a dále 4-hydroxyprolinu, 5-hydroxylysinu, cystinu, 1-methylhistidinu a 3-methylhistidinu) ve vzorku masa či masného výrobku po kyselé hydrolýze v systému ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostně-spektrometrickou detekcí typu kvadrupól (U-HPLC–MS). Jednotlivé analyty jsou kvantifikovány pomocí metody externí kalibrace (kalibrační přímka). Obsah ČSB může být následně definován na základě stanoveného obsahu 3-MetHis a charakterizován na základě specifických poměrů aminokyselina/3-MetHis.

3.3 Bezpečnost práce

Během přípravy hydrolyzátů je třeba dodržovat základní pravidla bezpečnosti práce v laboratoři. Zvláštní opatření je třeba pro práci pod tlakem (hydrolýza v uzavřeném systému). Při manipulaci s kyselinami a zásadami je třeba pracovat v digestoři a při kontaktu s pokožkou či očima postižené místo okamžitě důkladně opláchnout vodou. Roztoky aminokyselin mohou v případě kontaktu s pokožkou či očima způsobit podráždění, proto je nezbytné pracovat v rukavicích.

3.4 Chemikálie, analytické standardy a spotřební materiál

- Peroxid vodíku p.a., w (w/w) = 30 %, Lach-Ner
- Fenol p.a., Merck (77610)
- Disiřičitan sodný p.a., Lach-Ner
- Hydroxid sodný p.a., Merck (30620-1KG-R)
- Kyselina chlorovodíková p.a., Merck (30721)
- Methanol, p.a. Penta
- Acetonitril, HPLC gradient, Merck (USA)
- Deionizovaná voda (přečištěná z destilované vody pomocí zařízení Milli-Q, Millipore, Německo)
- Octan amonný, Merck (USA)
- Kyselina octová p.a., Merck (USA)
- Kyselina mravenčí p.a., Fluka Merck (USA)
- Dusík (99,994 %) - Technoplyn (ČR)
- L-Cystein, L-Asparagin, L-Glutamin, L-Tryptofan, DL-5-hydroxylysin, L-4-hydroxyprolin, 3-Methyl-L-histidin, 1-Methyl-L-histidin, L-cysteová kyselina, methioninsulfon, Merck, Německo (viz **Tabulka 5**)

- Standardní roztok směsi aminokyselin („Amino Acid Standard“, AAS18-5X5ML, Merck, Německo (viz **Tabulka 6**)
- Hydrolyzační zkumavka uzavřená, Ingos, (Česká republika)
- Mikrofiltry (0,2 µm), Alltech (USA)
- Plastové (PTFE) kyvety (50 ml; 15 ml)

Tabulka 5: Seznam použitých standardů dodaných v pevné formě

Aminokyselina	Výrobce	Čistota (%); CAS
L-Cystein (Cys)	Merck	≥98%; 7048-04-6
L-Asparagin (Asn)	Merck	≥98%; 5794-13-8
L-Glutamin (Gln)	Merck	≥98%; 8063-07-8
L-Tryptofan (Trp)	Merck	≥98%; 73-22-3
DL-5-hydroxylysin	Merck	≥98%; 28902-93-4
L-4-hydroxyprolin	Merck	≥98%; 51-35-4
3-methyl-L-histidin (3-MetHis)	Merck	≥98%; 368-16-1
1-methyl-L-histidin (1-MetHis)	Merck	≥98%; 332-80-9
L-Cysteová kyselina	Merck	≥99%; 23537-25-9
Methioninsulfon	Merck	není uvedena 7314-32-1

Tabulka 6: Složení standardního roztoku směsi aminokyselin (v 0,1M kyselině chlorovodíkové)

Aminokyselina	M (g/mol)	Molární koncentrace
L-Alanin (Ala)	89,1	2,50
L-Arginin (Arg)	174,2	2,50
L-Asparagová (Asp)	133,1	2,50
L-Cystin	240,3	1,25
L-Glutamová kyselina (Glu)	147,1	2,50
Glycin (Gly)	75,1	2,50
L-Histidin (His)	155,2	2,50
L-Isoleucin (Ile)	131,2	2,50
L-Leucin (Leu)	131,2	2,50
L-Lysin (Lys)	146,2	2,50
L-Methionin (Met)	149,2	2,50
L-Fenylalanin (Phe)	165,2	2,50
L-Prolin (Pro)	115,1	2,50
L-Serin (Ser)	105,1	2,50
L-Threonin (Thr)	119,1	2,50
L-Tyrosin (Tyr)	181,2	2,50
L-Valin (Val)	117,2	2,50

3.5 Přístroje a zařízení

- Centrifuga Rotina 35R, Hettich (Německo)
- Centrifuga Eppendorf 5430, Eppendorf (Německo)
- Přístroj pro přípravu deionizované vody Milli-Q, Millipore (Německo)
- Sušárna ULE 500 Memmert, AtmoSAFE (Německo)
- pH metr Cyberscan 510, Thermo Scientific (USA)
- Homogenizátor CHS Vortex, Chromservis (Česká republika)
- Automatické pipety 0,5 - 5 ml a 10 ml, TreffLab (Švýcarsko)
- Automatické mikropipety 100 - 1000 μ l a 20 - 200 μ l, Biohit (Finsko)
- Hydrolyzační blok HB 016, Ingos, (Česká republika)
- LC-MS instrumentace:
 - o Ultra-účinný kapalinový chromatograf ACQUITY UPLC SYSTEM, Waters (USA)
 - o LC kolona Acquity UPLC BEH Amide (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m), Waters (USA)
 - o Hmotnostní spektrometr ACQUITY QDa, Waters (USA)

3.6 Pracovní postup

3.6.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Roztok 17-ti základních aminokyselin (zásobní roztok I) je dodáván od výrobce v kapalné formě ve zředěné HCl. (**Tabulka 7**)

Aminokyseliny L-cystein, L-asparagin, glutamin, 4-hydroxyprolin, 5-hydroxylysin, 3-methyl-L-histidin, 1-methyl-L-histidin, L-cysteová kyselina a methioninsulfon, které jako standardy existují v pevné formě, se rozpustí zvlášť v destilované vodě (20 mg* do 10 ml), čímž vznikne základní roztok o koncentraci 2 mg/ml*. Odebráním 1 ml z každého z těchto základních roztoků do 10 ml odměrné baňky a doplněním vodou po rysku vznikne zásobní roztok II aminokyselin o koncentraci 200 mg/l*. (**Tabulka 8**)

Tabulka 7 – Zásobní roztok I – složení aminokyselin, molekulární ionty a přepočet molární koncentrace na hmotnostní (2,5 µmol/ml in 0.1 N HCl (s výjimkou L-cysteinu – jen 1,25 µmol/ml)).

	M	m/z (M+H)+	Hmotnostní koncentrace (mg/l)
Ala	C ₃ H ₇ NO ₂	90,05496	223
Arg	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175,11895	435
Asp	C ₄ H ₇ NO ₄	134,04478	333
Cystin	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	241,03112	300
Glu	C ₅ H ₉ NO ₄	148,06043	368
Gly	C ₂ H ₅ NO ₂	76,0393	188
His	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	156,07675	388
Leu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132,10191	328
Ile	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132,10191	328
Lys	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	147,1128	365
Met	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	150,05833	373
Phe	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166,08626	413
Pro	C ₅ H ₉ NO ₂	116,07061	288
Ser	C ₃ H ₇ NO ₃	106,04987	263
Thr	C ₄ H ₉ NO ₃	120,06552	298
Tyr	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182,08117	453
Val	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	118,08626	293

Tabulka 8 – Zásobní roztok II - složení aminokyselin, molekulární ionty, hmotnostní koncentrace.

	Sumární vzorec	m/z (M+H)+	Hmotnostní koncentrace (mg/l)*
Cys	C ₃ H ₇ NO ₂ S	122,02703	200
Asn	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	133,06077	200
Gln	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	147,07642	200
Trp	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205,09720	200
4-hydroxyprolin	C ₅ H ₉ NO ₃	132,06552	200
5-hydroxylysin	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	163,10772	200
3-MetHis	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	170,09240	200
1-MetHis	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	170,09240	200
Cysteová kyselina	C ₃ H ₇ NO ₅ S	169,00394	200
Methioninsulfon	C ₅ H ₁₁ NO ₄ S	181,04033	200

* hmotnostní koncentrace jednotlivých aminokyselin v zásobním roztoku II se může mírně lišit v závislosti na navážce aminokyselin při přípravě základních roztoků aminokyselin. Např. pokud je naváženo 20,5 mg Cys, pak je jeho koncentrace v základním roztoku 2,05 mg/ml a koncentrace v zásobním roztoku II pak 205 mg/L. Přesné koncentrace aminokyselin v aktuálně používaném zásobním roztoku II jsou uvedeny v laboratorním deníku a v popisku zásobní odměrné baňky.

3.6.2 Stabilita standardů aminokyselin

Zásobní roztoky standardů cysteinu a tryptofanu je nutné připravovat vždy nejdéle jednou za měsíc, ostatní roztoky aminokyselin připravujeme nejdéle po 6 měsících. Kalibrační řada se připravuje také vždy jednou za měsíc. Zásobí roztoky a roztoky kalibrační řady se skladují při teplotě nižší než -4°C.

3.6.3 Příprava kalibračních roztoků standardů

Ředění se provádí 80% roztokem methanolu. Ve vialce se smísí 100 µl zásobního roztoku I, 100 µl zásobního roztoku II a 800 µl methanolu, což odpovídá kalibračnímu bodu A. Dále se odebere 100 µl z kalibračního roztoku A a zředí 100 µl 80% methanolu, čímž vzniká kalibrační bod B. Následně se odebere 50 µl kalibračního roztoku A a zředí 150 µl 80% methanolu, což odpovídá kalibračnímu bodu C. Dalším „desítkovým“ ředěním z bodu A se připraví kalibrační bod D. Z tohoto kalibračního bodu se odebere 100 µl a zředí 100 µl 80% methanolu (kalibrační bod E). Odebráním 50 µl kalibračního roztoku D a jeho zředěním 150 µl 80% methanolu se připraví kalibrační roztok F. Stejným způsobem se připraví kalibrační standardy G, H, I, J, K, L a M. Koncentrace aminokyselin v jednotlivých bodech kalibrační řady jsou uvedeny v **Tabulce 9**.

Tabulka 9: Koncentrace aminokyselin v bodech kalibrační řady

	Zředěný roztok A (mg/l)	Zředěný roztok B (mg/l)	Zředěný roztok C (mg/l)	Zředěný roztok D (mg/l)	Zředěný roztok E (mg/l)	Zředěný roztok F (mg/l)	Zředěný roztok G (mg/l)	Zředěný roztok H (mg/l)	Zředěný roztok I (mg/l)	Zředěný roztok J (mg/l)	Zředěný roztok K (mg/l)	Zředěný roztok L (mg/l)	Zředěný roztok M (mg/l)
Ala	22,3	11,15	5,575	2,230	1,115	0,558	0,223	0,1115	0,05575	0,0223	0,01115	0,00558	0,00223
Arg	43,5	21,75	10,875	4,350	2,175	1,088	0,435	0,2175	0,10875	0,0435	0,02175	0,01088	0,00435
Asp	33,3	16,65	8,325	3,330	1,665	0,833	0,333	0,1665	0,08325	0,0333	0,01665	0,00833	0,00333
Cystine	30,0	15,00	7,500	3,000	1,500	0,750	0,300	0,1500	0,07500	0,0300	0,01500	0,00750	0,00300
Glu	36,8	18,40	9,200	3,680	1,840	0,920	0,368	0,1840	0,09200	0,0368	0,01840	0,00920	0,00368
Gly	18,8	9,40	4,700	1,880	0,940	0,470	0,188	0,0940	0,04700	0,0188	0,00940	0,00470	0,00188
His	38,8	19,40	9,700	3,880	1,940	0,970	0,388	0,1940	0,09700	0,0388	0,01940	0,00970	0,00388
Leu	32,8	16,40	8,200	3,280	1,640	0,820	0,328	0,1640	0,08200	0,0328	0,01640	0,00820	0,00328
Ile	32,8	16,40	8,200	3,280	1,640	0,820	0,328	0,1640	0,08200	0,0328	0,01640	0,00820	0,00328
Lys	36,5	18,25	9,125	3,650	1,825	0,913	0,365	0,1825	0,09125	0,0365	0,01825	0,00913	0,00365
Met	37,3	18,65	9,325	3,730	1,865	0,933	0,373	0,1865	0,09325	0,0373	0,01865	0,00933	0,00373
Phe	41,3	20,65	10,325	4,130	2,065	1,033	0,413	0,2065	0,10325	0,0413	0,02065	0,01033	0,00413
Pro	28,8	14,40	7,200	2,880	1,440	0,720	0,288	0,1440	0,07200	0,0288	0,01440	0,00720	0,00288
Ser	26,3	13,15	6,575	2,630	1,315	0,658	0,263	0,1315	0,06575	0,0263	0,01315	0,00658	0,00263
Thr	29,8	14,90	7,450	2,980	1,490	0,745	0,298	0,1490	0,07450	0,0298	0,01490	0,00745	0,00298
Tyr	45,3	22,65	11,325	4,530	2,265	1,133	0,453	0,2265	0,11325	0,0453	0,02265	0,01133	0,00453
Val	29,3	14,65	7,325	2,930	1,465	0,733	0,293	0,1465	0,07325	0,0293	0,01465	0,00733	0,00293
Cys*	20,0	10,00	5,000	2,000	1,000	0,500	0,200	0,1000	0,05000	0,0200	0,01000	0,00500	0,00200
Asn*	20,0	10,00	5,000	2,000	1,000	0,500	0,200	0,1000	0,05000	0,0200	0,01000	0,00500	0,00200
Gln*	20,0	10,00	5,000	2,000	1,000	0,500	0,200	0,1000	0,05000	0,0200	0,01000	0,00500	0,00200

	Zředěný roztok A (mg/l)	Zředěný roztok B (mg/l)	Zředěný roztok C (mg/l)	Zředěný roztok D (mg/l)	Zředěný roztok E (mg/l)	Zředěný roztok F (mg/l)	Zředěný roztok G (mg/l)	Zředěný roztok H (mg/l)	Zředěný roztok I (mg/l)	Zředěný roztok J (mg/l)	Zředěný roztok K (mg/l)	Zředěný roztok L (mg/l)	Zředěný roztok M (mg/l)
Trp*	20,0	10,00	5,000	2,000	1,000	0,500	0,200	0,1000	0,05000	0,0200	0,01000	0,00500	0,00200
4-hydroxyprolin*	20,0	10,00	5,000	2,000	1,000	0,500	0,200	0,1000	0,05000	0,0200	0,01000	0,00500	0,00200
5-hydroxylysin*	20,0	10,00	5,000	2,000	1,000	0,500	0,200	0,1000	0,05000	0,0200	0,01000	0,00500	0,00200
3-MetHis*	20,0	10,00	5,000	2,000	1,000	0,500	0,200	0,1000	0,05000	0,0200	0,01000	0,00500	0,00200
1-MetHis*	20,0	10,00	5,000	2,000	1,000	0,500	0,200	0,1000	0,05000	0,0200	0,01000	0,00500	0,00200
Cysteová kyselina *	20,0	10,00	5,000	2,000	1,000	0,500	0,200	0,1000	0,05000	0,0200	0,0100	0,00500	0,00200
Methioninsulfon*	20,0	10,00	5,000	2,000	1,000	0,500	0,200	0,1000	0,05000	0,0200	0,0100	0,00500	0,00200

* hmotnostní koncentrace jednotlivých aminokyselin v bodech kalibrační křivky se mohou mírně lišit v závislosti na navážce aminokyselin při přípravě základních roztoků aminokyselin, viz poznámka (*). Přesné koncentrace aminokyselin v aktuálně používané kalibrační řadě jsou uvedeny v laboratorním deníku.

3.6.4 Příprava vzorků k analýze

3.6.4.1 Příprava pracovních roztoků

3.6.4.1.1 Roztok kyseliny mravenčí a fenolu

Roztok mravenčí kyseliny a fenolu se připraví smícháním 889 g mravenčí kyseliny se 111 g vody a 4,73 g fenolu.

3.6.4.1.2 Oxidační směs (peroxymetanová kyselina – fenol)

Tuto směs je třeba připravit bezprostředně před použitím. V poměru 1:9 se smíchá peroxid vodíku s roztokem mravenčí kyseliny a fenolu (6.1.2). Vzniklá směs se ponechá 60 minut při laboratorní teplotě, aby se vytvořila permravenčí kyselina. Před přidáním oxidační směsi ke vzorku je třeba ji ochladit (15 min v ledové vodní lázni).

3.6.4.1.3 Hydrolyzační směs

Hydrolyzační směs tvoří roztok 6 M HCl s přidavkem fenolu. Do 492 ml koncentrované HCl se přidá 1 g fenolu a směs se doplní deionizovanou vodou na 1 litr do odměrné baňky.

3.6.4.2 Hydrolýza vzorku

Před samotnou analýzou musí být bílkovina masa hydrolyzována na volné aminokyseliny. Příprava hydrolyzátu masa se skládá ze tří kroků: extrakce dipeptidů anserinu a baleninu, oxidace a kyselá hydrolýza v uzavřeném systému.

3.6.4.2.1 Extrakce dipeptidů anserinu a baleninu

Z důvodu možného navýšení obsahu 1- a 3-methylhistidinu v čisté svalové bílkovině je potřeba odstranit β -alanylhistidinové dipeptidy balenin (β -Alanyl-3-methylhistidin) a anserin (β -Alanyl-1-methylhistidin). Do 50 ml centrifugační kyvety se naváží 1 g dokonale homogenizovaného vzorku, ke kterému se přidá 30 ml 80% ethanolu. Kyveta se následně intenzivně třepe 1 minutu na třepačce vortex a po odstředění (5 min, 10 000 min⁻¹) se etanolový extrakt odebere. Vzorek je tímto postupem extrahován celkem 3x. Následuje vysušení vzorku v sušárně (100 °C, 2 hod), tak aby obsahoval méně než asi 10% vody. Po vysušení je veškerý vzorek převeden do nádoby, ve které bude probíhat oxidace a hydrolýza (hydrolyzační zkumavka uzavřená). V případě stanovení ČSB ve fermentovaných mastných

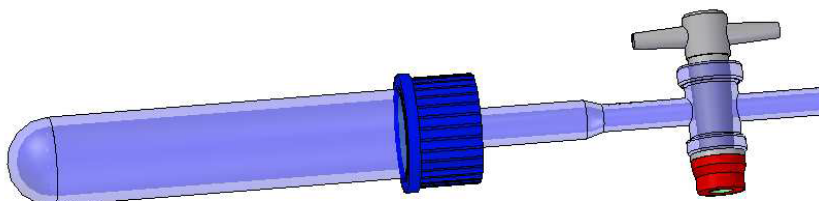
výrobci se stejným způsobem jako v případě hydrolyzátů stanoví obsah volných aminokyselin v extraktu a ten se poté přičte k obsahu aminokyselin obsažených v proteinech.

3.6.4.2.2 Oxidace vzorku

Před hydrolyzou vzorku je třeba z důvodu snížení ztrát některých aminokyselin (cystein, methionin) zařadit krok oxidace vzorku (0°C , směs kyseliny permravenčí a fenolu). Cystein se oxiduje na cysteovou kyselinu a methionin na methionin sulfoxid. Baňka se vzorkem se umístí do ledové lázně, přidá se 5 ml oxidační směsi (3.6.4.1.2), uzavřená se vloží do ledové lázně a v lednici se ponechá oxidovat 16 hodin. Po ukončení oxidace se přebytečné oxidační činidlo odstraní přidáním 0,84 g disiřičitanu sodného. Oxidaci vzorku lze v případě, že není třeba zjistit přesný obsah methioninu a cysteinu, z postupu vynechat. Vzorek masa je v tomto případě po extrakci a vysušení přímo převeden do hydrolyzační baňky.

3.6.4.2.3 Uzavřená hydrolyza

Po oxidaci se ke vzorku přidá 30 ml hydrolyzační směsi (3.6.4.1.3). Doporučovaný poměr HCl k množství vzorku je 2 ml/mg dusíku. Předpokládá se, že bílkoviny obsahují zhruba 16 % dusíku, poměr pro bílkoviny potom bude 0,32 ml/g bílkoviny. Přes otevřený ventil uzavřené hydrolyzační zkumavky (**Obrázek 4**) se prostrčí kapilára pod hladinu směsi pro hydrolyzaci. Kapilárou se přivede inertní plyn (N_2) otevřeným kohoutkem a nechá se 20 - 40 s probublat (v závislosti na rychlosti průtoku plynu). Za stálého přívodu inertního plynu se kapilára vysune z hydrolyzační zkumavky a ventil zkumavky se uzavře co nejrychleji tak, aby se zabránilo zpětnému vniknutí vzduchu. Zkumavka se následně vloží do hydrolyzačního bloku, kde se nastaví pracovní program na teplotu 110°C a doba hydrolyzy na 23 hod. Po ukončení hydrolyzy se obsah hydrolyzační baňky převede kvantitativně vodou přes filtr do 100 ml odměrné baňky, která je poté doplněna deionizovanou vodou. Následně se 6 ml filtrátu převede do 10ml odměrné baňky a provede se neutralizace pomocí 1,5M roztoku uhličitanu sodného na pH 6-8 (ověří se pomocí indikátorového pH papírku) a baňka je poté doplněna deionizovanou vodou.



Obrázek 4: Hydrolyzační zkumavka uzavřená

3.6.4.2.4 Příprava hydrolyzátů pro stanovení aminokyselin

Neutralizované hydrolyzáty se naředí roztokem methanol - voda (80 : 20, v/v). Vzorky jsou postupně ředěny v poměru 1:9, tj. 10x, 100x a 1 000x. Z důvodu rozdílných koncentrací jednotlivých aminokyselin jsou k U-HPLC–MS analýze podrobeny všechny zředěné vzorky. Pro výpočet koncentrace bude použit vzorek, který plochami analytů nejlépe odpovídá lineárnímu rozsahu kalibrační křivky.

3.7 Separace a detekce

3.7.1 Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Pro kvantitativní stanovení cílových analytů je využito instrumentace sestávající z ultra-účinného kapalinového chromatografu s hmotnostním analyzátozem typu kvadrupól (U-HPLC-MS). Hmotnostně spektrometrická detekce je prováděna s ionizací elektrosprejem v pozitivním modu (ESI+). Charakteristiky kapalinové chromatografie, gradient mobilní fáze a hmotnostně-spektrometrické podmínky měření jsou shrnuty v **Tabulkách 10-12**.

Tabulka 10: Parametry kapalinové chromatografie (U-HPLC)

Systém	ACQUITY UPLCTM SYSTEM, Waters (USA)
Kolona	Acquity UPLC BEH Amide (100 x 2,1 mm; 1,7 µm), Waters
Teplota kolony	40 °C
Teplota	10 °C
Průtok mobilní fáze	0,35 ml/min
Objem nástřiku	3 µl
Mobilní fáze	A: 0,2% octová kyselina + 5mM octan amonný ve vodě B: acetonitril
Délka metody	11 min
Gradient mobilní	viz. Tab. 10

Tabulka 11: Gradient mobilní fáze pro U-HPLC-(ESI+)-MS

t [min]	A [%]	B [%]
0	25	75
0,5	25	75
5	40	60
7	50	50
7,1	25	75
11	25	75

Tabulka 12: Hmotnostně-spektrometrické podmínky analýz

Hmotnostní spektrometr	ACQUITY QDa, Waters (USA)
Ionizace	ESI +
Akviziční mód	SIR
Vypařovací teplota	600 °C
Napětí na elektrospreji	0,8 kV
Napětí na vstupním kuželu	15 V

3.7.2 Identifikace a kvantitativní vyhodnocení analytů

Stanovované analyty jsou identifikovány na základě naměřených hmot (m/z) a porovnáním retenčních časů s příslušnými standardy. Ke zpracování primárních dat se používá program MassLynx (Waters, USA). Aminokyseliny leucin a isoleucin se chromatograficky neseperují, jejich stanovení je prováděno v sumě (pro výpočet se uvažuje suma jejich koncentrací). Cystin a cystein jsou před hydrolýzou oxidovány a stanovují se jako cysteová kyselina, která je zpětně stechiometricky přepočítávána na cystein. Stejně tak je oxidován methionin, který se stanovuje jako methioninsulfon a zpětným stechiometrickým přepočtem je určen obsah methioninu. Asparagin je během hydrolýzy převeden na asparagovou kyselinu, stanovuje se tedy pouze suma asparaginu a asparagové kyseliny. Stejně tak je hydrolyzován glutamin na glutamovou kyselinu a jejich stanovení je prováděno v sumě. Aminokyselina tryptofan během kyselé hydrolýzy zcela degraduje. Soubor stanovovaných analytů je uveden v **Tabulce 13**.

3.7.3 Kvantifikace čisté svalové bílkoviny

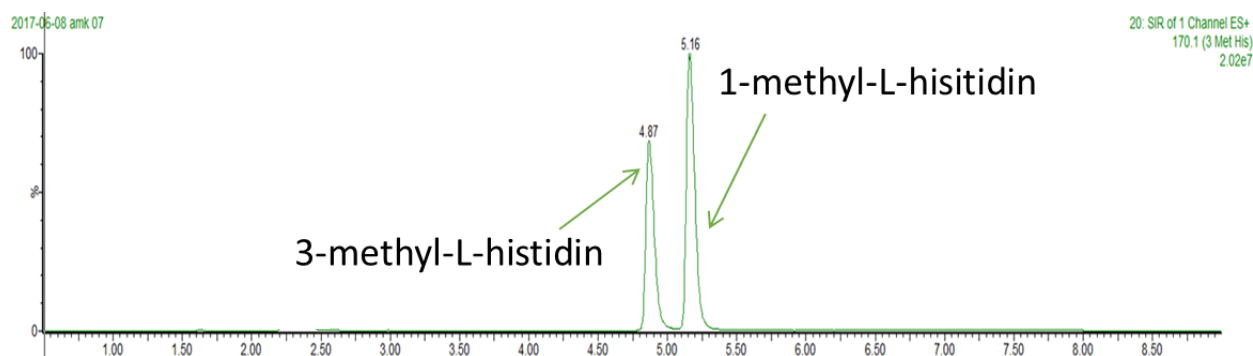
Obsah čisté svalové bílkoviny v analyzovaném vzorku se vypočte pomocí vzorce:

$$\text{ČSB (\%)} = 3\text{-MetHis (\%)} \times 292$$

Rozšířená nejistota se pak vyjádří jako 14 % z hodnoty výsledku.

Tabulka 13: Sledované ionty aminokyselin

Aminokyselina	Sumární	M (g/mol)	m/z	Retenční čas (min)
Ala	C ₃ H ₇ NO ₂	89,1	90,1	2,20
Arg	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,1	175,1	5,03
Asp	C ₄ H ₇ NO ₄	133,0	134,1	2,50
Cystin	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	240,0	241,0	4,79
Glu	C ₅ H ₉ NO ₄	147,1	148,1	2,38
Gly	C ₂ H ₅ NO ₂	75,0	76,0	2,45
His	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155,1	156,1	4,91
Leu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,1	132,1	1,55
Ile	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,1	132,1	1,55
Lys	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146,1	147,1	5,19
Met	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149,1	150,1	1,68
Phe	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,1	166,1	1,44
Pro	C ₅ H ₉ NO ₂	115,1	116,1	1,80
Ser	C ₃ H ₇ NO ₃	105,0	106,1	2,75
Thr	C ₄ H ₉ NO ₃	119,1	120,1	2,42
Tyr	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,1	182,1	1,82
Val	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	117,1	118,1	1,76
Cys	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121,0	122,0	2,01
Asn	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132,1	133,1	2,87
Gln	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146,1	147,1	2,71
Trp	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,1	205,1	1,45
H-Pro	C ₅ H ₉ NO ₃	131,1	132,1	2,35
H-Lys	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	162,1	163,1	5,73
3-Met-His	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	169,1	170,1	4,50
1-Me-His	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	169,1	170,1	4,78
Cysteová	C ₃ H ₇ NO ₅ S	169,0	170,1	1,05
Methioninsulfo	C ₅ H ₁₁ NO ₄ S	181,0	182,1	1,62

**Obrázek 5:** Příklad chromatografické separace isobarických analytů 1- a 3- methyl-L-histidinu ve směsném standardu na hladině 2 mg/l.

3.8 Pracovní charakteristiky metody

3.8.1 Pravdivost metody

V současné době není komerčně dostupný certifikovaný referenční materiál obsahující celé spektrum sledovaných aminokyselin. Pravdivost metody (zejména účinnost hydrolýzy) je tedy pravidelně ověřována analýzou vhodně zvoleného referenčního materiálu (BioCell collagen), kde deklarované hodnoty jsou uvažovány jako 100 %. Průměrné výtěžnosti metody jsou uvedeny v **Tabulce 14**. Při následné analýze bílkovinných hydrolyzátů by k ovlivnění výtěžnosti (ztrátám analytů během přípravy vzorku) mohlo docházet pouze nesprávnou manipulací při ředění vzorků.

Tabulka 14: Výtěžnost metody stanovená pomocí interního referenčního materiálu

Aminokyseliny	Výtěžnost (%)
Ala	116
Arg	79
Asp+Asn	116
Cys	n.d.
Glu+Gln	108
Gly	87
His	117
Ile+Leu	81
Lys	85
Met	86
Phe	93
Pro	114
Ser	103
Thr	82
Trp	101
Tyr	110
Val	94
4-hydroxyprolin	88
5-hydroxylysin	89

3.8.2 Rozsah metody a linearita

Vzhledem k tomu, že se sledované analyty mohou vyskytovat v reálných vzorcích hydrolyzátu masných výrobků v širokém rozsahu hladin, je nutné volit pro kalibraci rozsah koncentrací standardů v dostatečně širokém rozmezí, odpovídajícím reálným nálezům. Jestliže jsou nálezy hladin analytů vyšší než odpovídající kalibrační rozsah, je nutné vzorky před samotnou U-HPLC-MS analýzou naředit v příslušném poměru.

V používaném kalibračním rozsahu A – E je odezva detektoru za podmínek metody pro většinu analytů lineární. Linearita kalibrace se kontroluje vynesáním odezev jednotlivých analytů do grafu vůči koncentraci a pomocí koeficientu determinace (R^2), který je uveden v Tabulce 15.

3.8.3 Mez stanovitelnosti a nejnižší kalibrační úroveň (LCL = lowest calibration level)

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejmenší množství stanovované látky (analytu) ve vzorku (čerstvé maso), které může být kvantitativně stanoveno s předem definovanou přesností. Většinou se stanovuje jako trojnásobek meze detekce. Pro uvažované aplikace je mez stanovitelnosti zpravidla brána jako nejnižší hladina kalibrační křivky (použitého standardu o nejnižší koncentraci). LCL všech analyzovaných aminokyselin vyjádřené v mg/g matrice (čerstvé maso) jsou uvedeny v **Tabulce 15**.

3.8.4 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody lze charakterizovat relativní směrodatnou odchylkou (RSD_r , CV_r), která se získá z nejméně šesti opakovaných analýz téhož vzorku. Pro koncentrace okolo 0,001 mg/g by hodnota RSD_r neměla překročit 15 % a při koncentracích okolo 1 mg/g by měla být hodnota $RSD_r < 7$ %; Uvedené porovnávací hodnoty jsou odvozeny z modifikované (zprísněné) Horwitzovy rovnice. Hodnoty RSD_r (%) získané opakovanou hydrolýzou vzorku vepřového masa ($n=7$) jsou uvedeny v **Tabulce 15**.

Tabulka 15: Pracovní charakteristiky metody U-HPLC-MS pro stanovení aminokyselin v mase. Hodnoty opakovatelnosti jako RSD byly vypočteny po opakované hydrolýze vzorku veprového masa.

Aminokyselina	LCL (mg/g)	lin. rozsah (mg/g)	koeficient det. R ²	RSD (%)
Ala	0,0037	0,0037 - 0,1858	0,9994	4,5
Arg	0,0182	0,0182 - 0,7250	0,9882	12,3
Asp*	0,0013	0,0013 - 1,3875	0,9989	7,9
Asn*	0,0005	0,0005 - 0,5000	0,9989	-
Cys**	0,0015	0,0015 - 0,1533	0,9987	14,6
Cystine**	0,0032	0,0032 - 0,0783	0,9882	-
Glu*	0,0065	0,0065 - 0,6467	0,9945	6,0
Gln*	0,0013	0,0013 - 0,0547	0,9972	-
Gly	0,0152	0,0152 - 0,6083	0,9938	7,9
His	0,0007	0,0007 - 0,1555	0,9929	6,5
Leu + Ile	0,0007	0,0007 - 0,0688	0,9962	5,5
Lys	0,0005	0,0005 - 0,0480	0,988	8,4
Met**	0,0043	0,0043 - 0,2192	0,9953	5,9
Phe	0,0012	0,0012 - 0,1242	0,9922	8,0
Pro	0,0008	0,0008 - 0,1888	0,9971	5,5
Ser	0,0012	0,0012 - 0,0488	0,9989	5,8
Thr	0,0003	0,0003 - 0,3333	0,9956	6,8
Tyr	0,0167	0,0167 - 0,8333	0,996	9,0
Val	0,0017	0,0017 - 0,8333	0,9963	4,5
Trp***	0,0017	0,0017 - 0,3333	0,9961	-
4-hydroxyprolin	0,0037	0,0037 - 0,1858	0,9986	13,5
5-hydroxylysin	0,0182	0,0182 - 0,7250	0,9966	14,2
3-MetHis	0,0013	0,0013 - 1,3875	0,9915	6,9
1-MetHis	0,0005	0,0005 - 0,5000	0,9923	8,9

* Asparagin je během hydrolýzy převeden na asparagovou kyselinu, stejně tak je hydrolyzován glutamin na glutamovou kyselinu, jejich hodnoty RSD byly stanoveny pro sumu Asp+Asn a Glu+Gln.

** Cystin a cystein jsou před hydrolýzou oxidovány a stanoví se jako cysteová kyselina, která je zpětně stechiometricky přepočítávána na cystein. Methionin se po oxidaci stanovuje jako methioninsulfon a zpětným stechiometrickým přepočtem je určen obsah methioninu.

*** Tryptofan během se kyselé hydrolýzy rozkládá

3.8.5 Nejistota kvantifikace ČSB

Relativní standardní nejistota určení faktoru byla vypočtena z přirozené variability obsahu 3-MetHis v mase (jako relativní směrodatná odchylka průměrné koncentrace analytu v testovacím souboru a pro všechny tři druhy masa) a z mezilehlé preciznosti analytického stanovení 3-MetHis.

Kombinovaná relativní standardní nejistota $u_c = 7,2 \%$ z hodnoty výsledku, což odpovídá rozšířené nejistotě $U = 14 \%$.

Příklad vyjádření výsledku: $\dot{C}SB = 15,0 \pm 1,1 \%$

4 Srovnání novosti postupů

Předkládaná metodika umožňuje přímé stanovení volných aminokyselin ve vzorku po kyselé oxidativní hydrolýze v systému ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostně-spektrometrickou detekcí typu kvadrupól (U-HPLC–MS). Na základě obsahu 3-Methis či poměrů specifických aminokyselin vůči 3-MetHis je následně určen obsah ČSB popřípadě přídavek kolagenní bílkoviny.

V běžné praxi se k hodnocení kvality a autenticity masných výrobků využívá pro stanovení čisté svalové bílkoviny Kjeldahlova metoda. Jedná se o nepřímou metodu stanovující obsah dusíku. Při stanovení čisté svalové bílkoviny je třeba nejprve provést vysrážení bílkovin (zpravidla taninem nebo trichloroctovou kyselinou) a odstranit tak nebílkovinný dusík. Nevýhodou srážení je, že bílkoviny nemusí být kvantitativně vysráženy, což může negativně ovlivnit výsledky. Od zjištěného celkového obsahu bílkovin se odečte kolagen stanovený jako 4-hydroxyprolin (stanoví se spektrofotometricky). Značnou limitací této metody je však nespecifičnost zmíněné Kjeldalovy metody, tj. nemožnost rozlišení původu bílkoviny (svalová, krevní nebo rostlinná).

Popsaná metodika představuje druhou možnost, a to je využití přímých metod, které jsou schopny stanovit přímo látky typické a specifické pro svalové bílkoviny, nevyskytující se v jiných typech bílkovin, jako jsou například aminokyseliny 1- a 3-methylhistidin. Jelikož jsou aminokyseliny polární látky, při separaci na reverzní fázi nevykazují dostatečnou retenci, a proto pro ně není tento způsob separace příliš vhodný. Popsaná U-HPLC–MS metodika využívá typ analytické kolony HILIC, která v tomto případě separuje aminokyseliny na polární stacionární fázi na bázi amidu. Použití MS detekce umožňuje analyzovat volné aminokyseliny přímo bez nutnosti derivatizace analytů, která je při využití konvenčních detektorů (UV/VIS/FLD) jinak nutná.

5 Popis uplatnění certifikované metodiky

Uvedená metoda umožňuje stanovení obsahu čisté svalové bílkoviny (ČSB) v masných výrobcích na základě diagnostického markeru 1- a 3-methylhistidinu a dalších aminokyselin. Metodika byla primárně vyvinuta pro účely projektu **QJ1530272 – Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba – spotřebitel (2015-2018, MZE/QJ)**. Aplikace metody v rámci tohoto projektu významně přispěje ke zmapování falšovaných masných výrobků, které jsou dostupné na českém trhu. Vyvinutá metodika umožní kromě kvantifikace ČSB také rozlišení původu bílkoviny (svalová vs. krevní nebo rostlinná), což patří mezi hlavní limitace Kjehldalovy metody, která je v současné době jedinou kontrolní metodou pro stanovení obsahu ČSB. Metodiku je možné využívat jak ve státních, tak v soukromých laboratořích a výzkumných centrech.

Smluvním uživatelem metodiky je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) a certifikovanou metodiku bude využívat při stanovení obsahu čisté svalové bílkoviny.

6 Ekonomické aspekty

Při bilanci ekonomických aspektů bylo předpokládáno, že laboratoř, která chce uvedenou metodu zavést, již má zkušenosti s analýzou na systémech LC-MS a vlastní tak kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem. Ultra-účinný kapalinový chromatograf (UHPLC) umožní laboratoři úsporu jak času, tak i použitých chemikálií a rozpouštědel. To je výhodné jak z ekonomického (cena za 1 litr acetonitrilu se pohybuje kolem 4 000 Kč), tak i z ekologického hlediska snížením množství odpadů. Dále je k samotnému provedení analýzy potřebné běžné vybavení laboratoře, viz kapitola 3.4 a 3.5, další investice do vybavení nejsou zapotřebí.

Využití hmotnostně spektrometrické detekce umožňuje přímé stanovení aminokyselin bez nutnosti použití zdlouhavých postupů, jako např. derivatizace v případě stanovení pomocí HPLC–UV nebo GC–MS (náklady na nákup a použití derivatizačních činidel se pohybují řádově ve stovkách Kč/vzorek).

Implementace metody zahrnuje zjištění analytických standardů aminokyselin a dále pak zjištění aktuálních pracovních charakteristik, zejména zjištění limitů kvantifikace, linearitu, ale také verifikaci metody pomocí opakované analýzy vhodně zvoleného referenčního materiálu (např. $n=6$). Seznam standardů je uveden v **Tabulkách 5 a 6** a pořizovací ceny jsou uvedeny v **Tabulce 16**. Za předpokladu, že by bylo provedeno 20 verifikačních a kontrolních analýz, přičemž provozní náklady na jednu analýzu by byly 3 505 Kč, celkové náklady na implementaci by se rovnaly 70,1 tis. Kč. Pokud laboratoř UHPLC-MS zařízení nevlastní pohybují se celkové náklady na zavedení výše uvedené metody ve výši 3,1 mil Kč.

Tabulka 15: Cena jednotlivých standardů aminokyselin

Analyt	Cena (Kč)	Množství
Standardní roztok směsi aminokyselin	2 033	5 ml
L-Asparagin	753	25 g
L-Glutamin	2 033	100 g
L-Tryptofan	572	5 g
L-Cystein	698	25 g
DL-5-hydroxylysin	1 663	100 mg
L-4-hydroxyprolin	3 478	100 mg
3-methyl-L-histidin	4 358	100 mg
1-methyl-L-histidin	2 942	50 mg
L-Cysteová kyselina	3 052	10 g
Methioninsulfon	1 564	1 g

7 Seznam související použité literatury

- (1) Food Integrity Handbook: A Guide to Food Authenticity Issues and Analytical Solutions. Morin JF (Ed.), Eurofins Analytics France, 2018. ISBN 978-2-9566303-0-2.
- (2) Frick, G., Dubois, S., Chaubert, C., & Ampuero, S. Identification by microscopy and MS-based electronic nose of a fraudulent addition to maize gluten. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 2009, 13(S), 45–50.
- (3) Ballin, N.Z. Authentication of meat and meat products. *Meat Science* 2010, 86, 557-587.
- (4) Benedict, R. C. Determination of nitrogen and protein content of meat and meat products. *Journal—Association of Official Analytical Chemists* 1987, 70(1), 69–74.
- (5) Kvasnička, F., Isotachophoretic determination of 3-methylhistidine. *Journal of Chromatography A*, 1999, 838, 191–195.
- (6) *Chemie potravin I.*: Velíšek J., Hajšlová J (Eds). 2. uprav. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, ISBN 978-80-86659-15-2.
- (7) Steinführer, W, Arneth, W., Speer, K. Entwicklung einer Methode zur direkten Bestimmung des Gehaltes an bindegewebsweißfreiem Fleischiweiß in Kochschinken über actingebundenes 3-Methylhistidin, *Mitteilungsblatt BAFF* 2003, 42 (161), 217 – 224
- (8) Stanovení čisté svalové bílkoviny v mase a výrobcích z masa. *Věstník Ministerstva zemědělství* čj.58936/2014-MZE-17421 ze dne 16.9.2014.

Metodu zpracovali:

prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.¹, Ing. Monika Jírů¹, prof. Ing. Vladimír Kocourek¹, doc. Ing. Milena Stránská, Ph.D.¹,

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Ústav analýzy potravin a výživy, FPBT
Technická 1903/3, 166 28 Praha 6 - Dejvice

Oponenti:

- 1) Ing. Martin Kubík, Inspektorát SZPI v Praze, NRL, Za Opravnou 300/6, 150 00 Praha 5
- 2) doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D., ČZU Praha, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, 65 00 Praha 6 - Suchbát

Jana Hajšlová, Monika Jírů, Vladimír Kocourek, Milena Stránská

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika pro určení obsahu čisté svalové bílkoviny v masných výrobcích

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 1905/5, 166 28 Praha 6

Rok vydání: 2018

Počet stran: 34