

## NOVÉ MOŽNOSTI SLEDOVÁNÍ ČERSTVOSTI MASA

TEREZA ŠKORPILOVÁ, PETR PIPEK a ALEŠ  
RAJCHL

Ústav konzervace potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
skorpilt@vscht.cz

Došlo 28.8.14, přijato 5.10.14.

Klíčová slova: stáří masa, čerstvost, DART, hmotnostní spektrometrie, metabolomický profil

### Úvod

Čerstvost masa je vlastnost, kterou nejvíce hodnotí spotřebitel, je však důležitá i pro produkci masných výrobků. Proto roste poptávka jak zákazníků, tak i průmyslu po rychlých a spolehlivých metodách jejího posouzení. Tradičními metodami hodnocení čerstvosti masa jsou mikrobiologické rozborů<sup>1</sup>, stanovení degradačních produktů ATP<sup>2</sup>, thiobarbiturového čísla<sup>3</sup> a biogenních aminů<sup>4</sup>. Klasický přístup těchto metod spočívající ve stanovení jednotlivých markerů je však značně pracný, ekonomicky nákladný a časově náročný.

Při stárnutí a posléze kažení masa dochází k mnoha chemickým a biochemickým změnám, je proto jednou z možností posouzení čerstvosti sledování změn metabolomu (soubor všech nízkomolekulárních složek přítomných v buňce či biologickém systému). Pro získání obrazu metabolomu je možné využít celou řadu instrumentálních metod, např.: GC-HRMS<sup>5</sup> (gas chromatography-high resolution mass spectrometry), 1H NMR<sup>6</sup> (nuclear magnetic resonance), CE-TOF MS<sup>7</sup> (capillary electrophoresis-time of flight mass spectrometry) a HRMAS-NMR<sup>8</sup> (high resolution magic angle spinning-nuclear magnetic resonance).

DART (direct analysis in real time – přímá analýza v reálném čase) je moderní ionizační technika, která se používá ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií, např. TOF, orbitrap apod. Složky vzorku jsou v případě této techniky ionizovány nejčastěji metastabilními ionty helia. Jsou získána hmotnostní spektra, kde je možné nejčastěji nalézt hmoty  $[M]^+$  a  $[M+H]^+$  v pozitivním módu, nebo  $[M]^-$  a  $[M-H]^-$  v negativním módu, v případě použití dopantů např.  $[M+NH_4]^+$  apod. (cit.<sup>9</sup>). Jelikož je během analýzy získáno velké množství dat, využívá se nejčastěji pro vyhodnocení statistických postupů.

Od roku 2005, kdy byla metoda DART patentována, bylo publikováno několik tisíc prací využívajících tuto

techniku z různých oborů. Např. ve stavebním průmyslu zjišťovali, zda je možné stanovit estery kyseliny ftalové v PVC<sup>10</sup>, v lesnictví rozlišovali různé druhy dubů<sup>9</sup>, v medicíně byla kontrolována kvalita tradiční čínské medicíny<sup>11</sup>, v chemickém průmyslu<sup>12</sup>, v potravinářství byl sledován obsah 5-HMF v medech<sup>13</sup>, nebo byly charakterizovány složky česneku<sup>14</sup> a další. Využitím DART pro maso a masné výrobky se zabývá jen malý podíl prací, např. Václavík a spol.<sup>15</sup> použili DART pro autentizaci tuku z různých živočišných druhů; Čajka a spol.<sup>16</sup> využili DART pro studium metabolomu kuřecího masa a dále byla tato technika použita pro rozlišení ryb v závislosti na způsobu krmení<sup>17</sup>.

### Experimentální část

Cílem práce bylo zjistit, zda je možné technikou DART hodnotit čerstvost masa na základě metabolomického profilu, který bude vyhodnocen pomocí statistických metod.

#### Vzorky

Pro analýzy byly použity vzorky hovězího masa (kýta – vrchní šál, mladý býk), které byly pořízeny v masném podniku 4 dny *post mortem*. Vzorky byly z jednoho kusu skotu. Šál byl rozporcován na plátky (50 g), které byly zabaleny do modifikované atmosféry (80 % kyslík, 20 % oxid uhličitý). Měření se uskutečnilo v den pořízení a dále po 1, 2, 3, 4, 7, 11 a 14 dnech skladování.

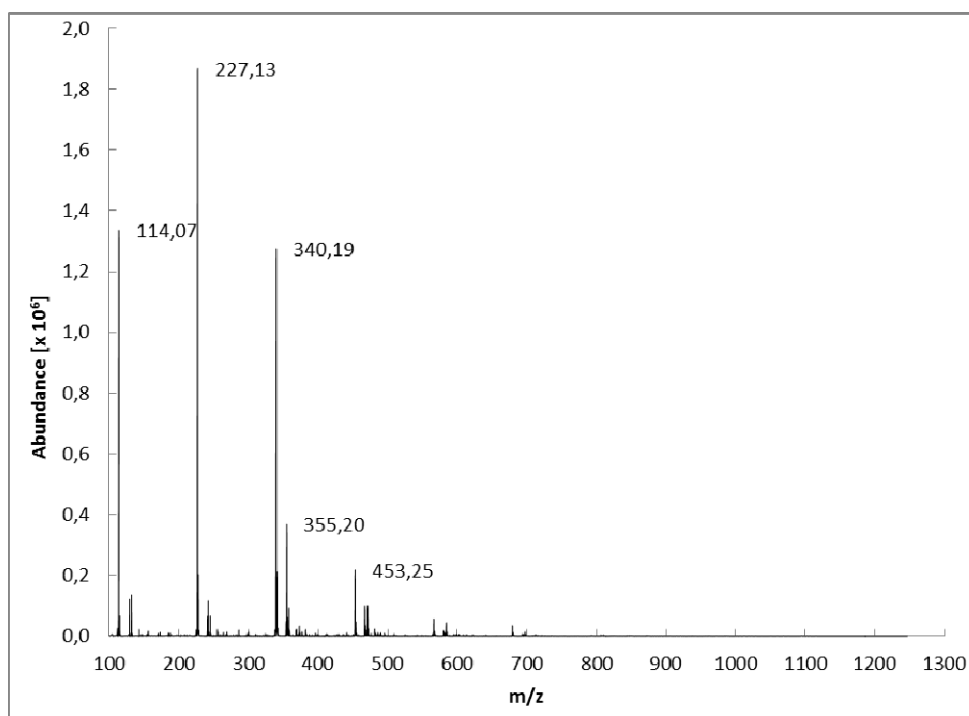
#### Úprava vzorků

Výběr extrakčních činidel (methanol, destilovaná voda, toluen, chloroform-methanol (2:1) a isopropanol-hexan (2:1)) a příprava vzorků se uskutečnily na základě údajů publikovaných v literatuře<sup>15,18–21</sup>.

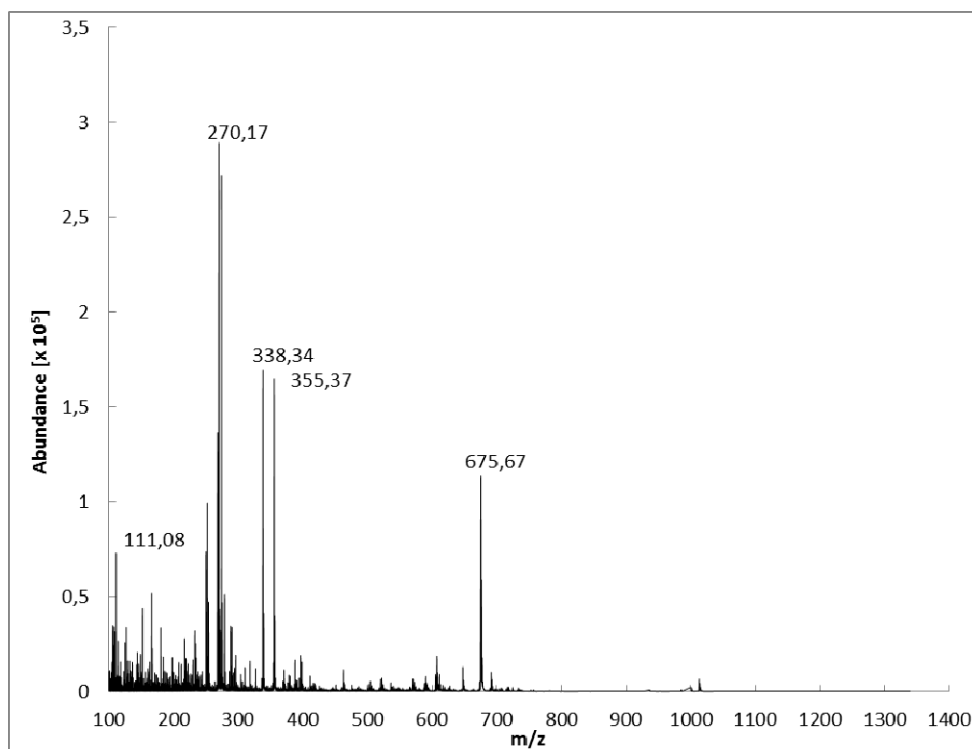
2,5 g vzorku bylo odváženo do 50ml PP kyvety. Ke vzorku bylo přidáno 25 ml extrakčního činidla a směs byla homogenizována 1 min pomocí Ultra Turraxu při rychlosti 2 (8000 otáček za minutu). V případě extrakce methanolem byl vzorek po homogenizaci udržován při 60 °C po dobu 15 min. Směs byla poté odstředována po dobu 10 min při teplotě 20 °C a 7380 otáčkách za minutu. Vrchní vrstva byla převedena do vialky a analyzována pomocí DART TOF-MS v pozitivním módu.

#### DART TOF-MS analýza

Podmínky měření DART: rychlost zásobníku s tyčinkami byla 1 mm s<sup>-1</sup>, jako ionizační plyn helium, rychlost jeho průtoku byla 3 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> a teplota 300 °C. Napětí na fragmentoru bylo 175 V a na skimmeru 65 V. Měřicí rozsah *m/z* na TOF-MS byl 100–1500 a rychlost snímání spekter byla 1 spektrum/s.



Obr. 1. Hmotnostní spektrum (DART TOF-MS) metabolomu hovězího masa, pozitivní mód ionizace; methanolvý extrakt



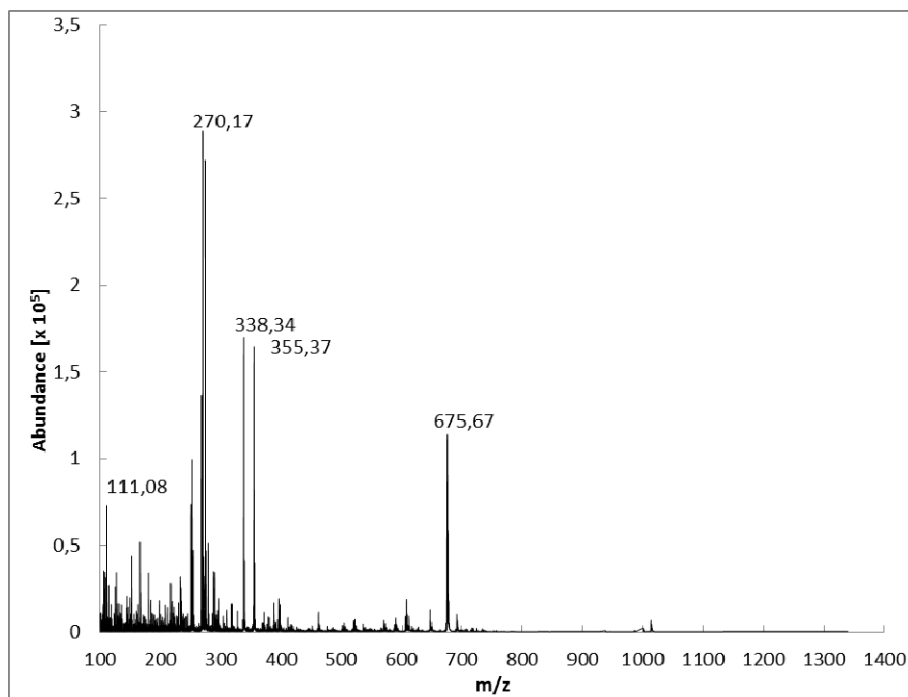
Obr. 2. Hmotnostní spektrum (DART TOF-MS) metabolomu hovězího masa, pozitivní mód ionizace; toluenový extrakt

## Statistická analýza

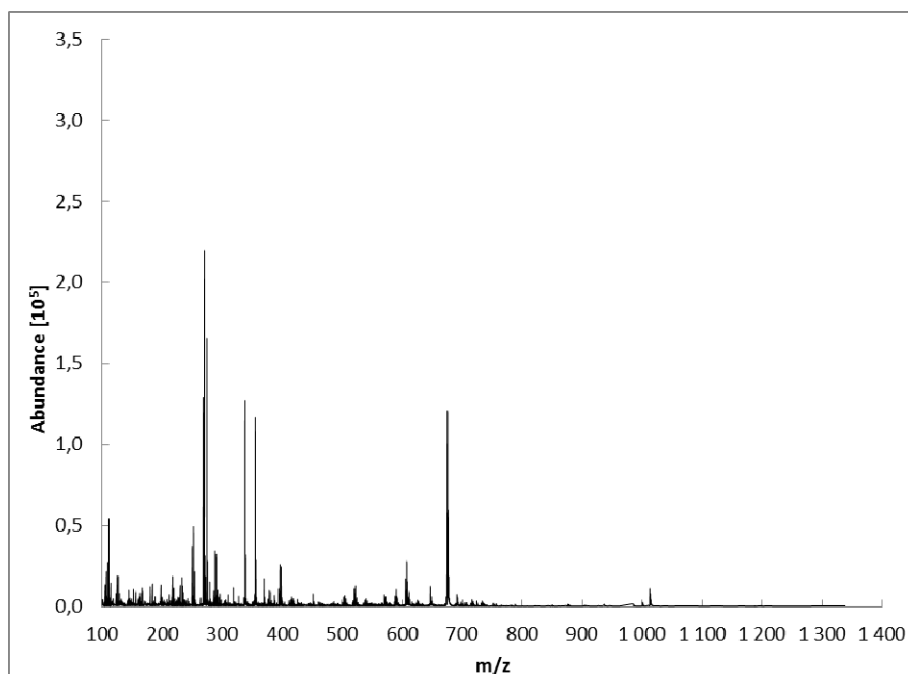
Chemometrická analýza zahrnovala analýzu hlavních komponent (PCA) a úpravu dat z hmotnostních spekter. Úprava dat spočívala ve sjednocení  $m/z$  hodnot pro jednot-

livé vzorky pomocí makra v programu MS-Excel 2007. V programu Statistica 10.0 byly poté data standardizována a podrobena vícerozměrné analýze hlavních komponent.

a



b



Obr. 3. Hmotnostní spektra (DART TOF-MS) metabolomu hovězího masa, pozitivní mód ionizace; analýza toluenového extraktu. a) horní – čerstvý, b) spodní – starý

## Výsledky a diskuse

Při vývoji metodiky pro sledování čerstvosti masa technikou DART bylo vyzkoušeno pět různých extrakčních činidel či jejich směsí a následně získána hmotnostní spektra těchto vzorků, která byla dále zpracovávána programem Statistica 10.0. Pro hodnocení byla použita více-rozměrná statistická analýza hlavních komponent. Ze zkoušených extrakčních činidel poskytly úplně rozdělení jednotlivých bodů v rozptylovém diagramu pro čerstvé a staré vzorky pouze methanol a toluen, zatímco u ostatních extrakčních činidel (destilovaná voda, chloroform-methanol (2:1) a isopropanol-hexan (2:1)) docházelo k prolínání bodů pro tyto vzorky.

Na obrázcích jsou zobrazeny metabolomické profily získané pomocí DART TOF-MS analýzy methanolového extraktu (obr. 1) a toluenového extraktu (obr. 2) hovězího masa v pozitivním módu DART ionizace. Z hlavních hmot je patrné, že došlo k extrakci různých složek vzorku, což koreluje s výsledky, které publikoval Václavík a spol.<sup>15</sup>

Metabolomické profily pro toluenové extrakty po 0 a 14 dnech skladování jsou znázorněny na obr. 3. Jsou patrné rozdíly především v odezvě jednotlivých hmot, ale také v přítomnosti nových hmot, na základě čehož došlo k rozdělení čerstvých a starých vzorků pomocí analýzy hlavních komponent (PCA).

V případě extrakce methanolem (obr. 4) a stejně tak toluenem (obr. 5) jsou patrné úplně oddělené oblasti pro čerstvé (vpravo dole u methanolu a vpravo nahoře u toluenu) a staré maso (vlevo nahoře u methanolu a vlevo dole u toluenu). Ostatní extrakční činidla takovéto rozlišení neumožnila; vzorky nebyly na základě čerstvosti rozděle-

ny.

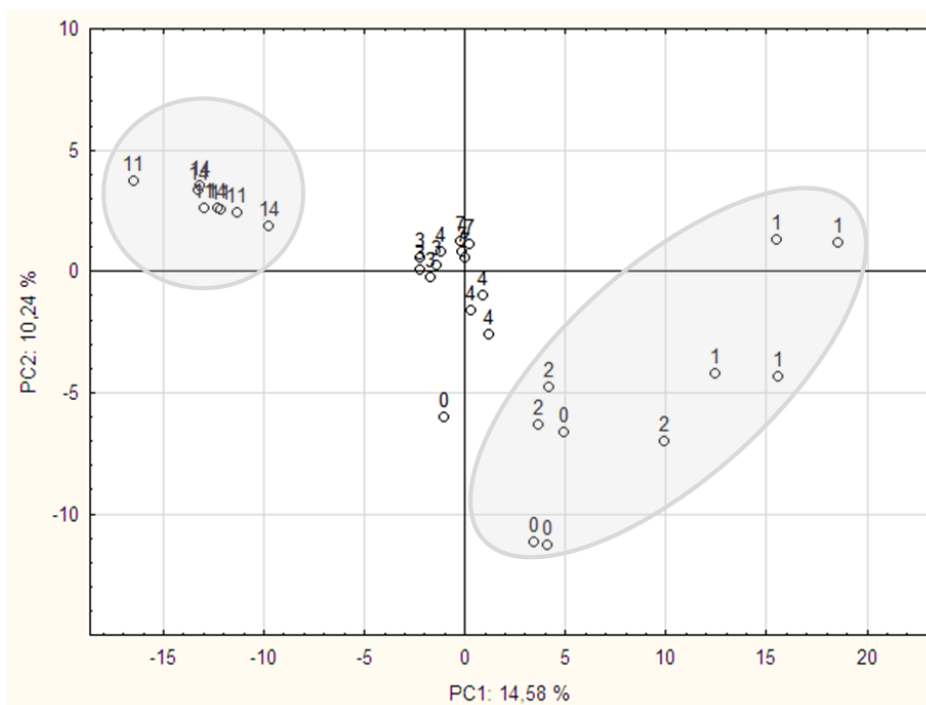
## Závěr

K rozlišení stáří hovězího masa byla použita nová technika DART ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (TOF-MS). Pro přípravu vzorků byly navrženy jednoduché, rychlé a ekonomicky nenáročné postupy. Bylo vybráno několik různých extrakčních činidel, z nichž neúčinnější se ukázaly methanol s toluenem. Parametry měření (teplota, mód) technikou DART byly před samotným testem optimalizovány. Ze získaných dat je patrné, že pomocí techniky DART je možné rozlišit vzorky na základě jejich stáří.

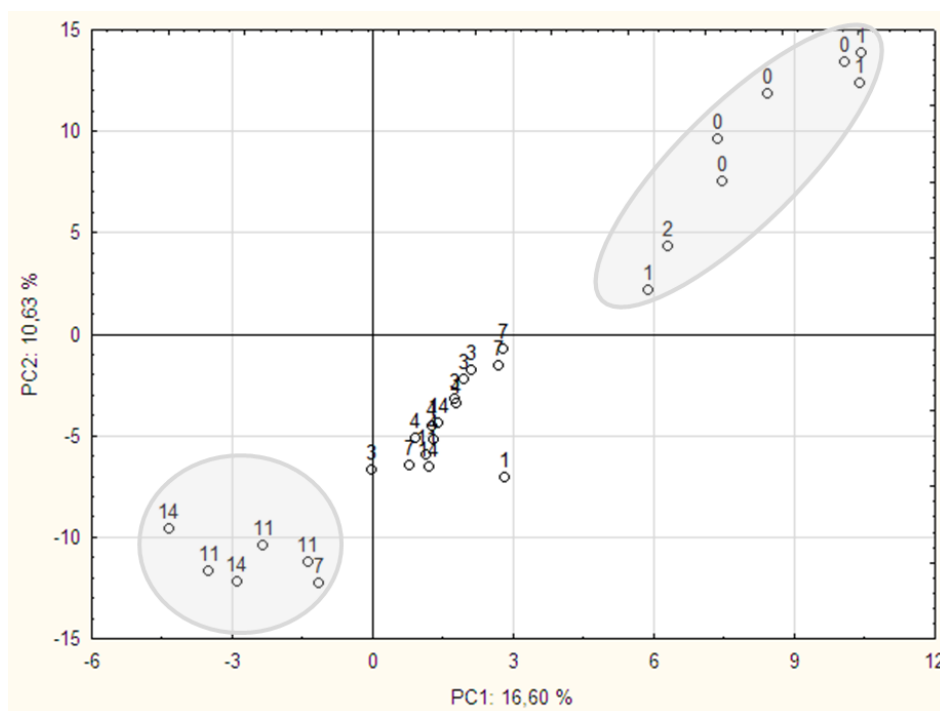
*Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014): A1\_FPBT\_2014\_006.*

## LITERATURA

1. Galgano F., Favati F., Bonadio M., Lorusso V., Romano P.: Food Res. Int. 42, 1147 (2009).
2. Park I.-S., Cho Y.-J., Kim N.: Anal. Chim. Acta. 404, 75 (2000).
3. Noh D. H., Chung S. J., Choi S. J., Hur S. J.: Food



Obr. 4. PCA analýza hmotnostních spekter methanolových extraktů; dole vpravo – čerstvé maso, nahoře vlevo – staré/zkažené maso; hodnoty bodů udávají dobu skladování (dny)



Obr. 5. PCA analýza hmotnostních spekter toluenových extraktů; nahoře vpravo – čerstvé maso, dole vlevo – staré/zkažené maso; hodnoty bodů udávají dobu skladování (dny)

- Control. 22, 133 (2011).
- Vinci G., Antonelli M. L.: *Food Control*. 13, 519 (2002).
  - Wolfgang J., Schwägele F., Hübschmann H.-J., Mehlmann H.: *6<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, 5. – 8. November 2013*, Book of Abstracts (Pulkrabová J., Tomaniová M., Nielen M., Hajšlová J., ed.), str. 404.
  - Jung Y., Lee J., Kwon J., Lee K.-S., Ryu D. H., Hwang G.-S.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 10458 (2010).
  - Muroya S., Oe M., Nakajima I., Ojima K., Chikuni K.: *Meat Sci.* 98, 726, (2014).
  - Ritota M., Casciani L., Failla S., Valentini M.: *Meat Sci.* 92, 754, (2012).
  - Cody R. B., Dane A. J., Dawson-Andoh B., Adedipe E. O., Nkansah K. J.: *Anal. Appl. Pyrolysis*. 95, 134 (2012).
  - Kuki Á., Nagy L., Zsuga M., Kéki S.: *Int. J. Mass Spectrom.* 303, 225 (2011).
  - Zeng S., Wang L., Chen T., Wang Y., Mo H., Qu H.: *Anal. Chim. Acta*. 733, 38 (2012).
  - Clemons K., Dake J., Sisco E., Verbeck IV G. F.: *Forensic Sci. Int.* 231, 98 (2013).
  - Rajchl A., Drgová L., Grégrová A., Čížková H., Ševčík R., Voldřich M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 4737 (2013).
  - Vodrážka P., Hajšlová J., Hrbek V.: *Chem. Listy*. 107, 277 (2013).
  - Václavík L., Hrbek V., Čajka T., Rohlík B.-A., Pipek P., Hajšlová J.: *J. Agric. Food Chem.* 59, 5919 (2011).
  - Čajka T., Daňhelová H., Zachariášová M., Riddelová K., Hajšlová J.: *Metabolomics* 9, 545 (2013).
  - Čajka T., Daňhelová H., Vavrečka A., Riddelová K., Kocourek V., Vácha F., Hajšlová J.: *Talanta* 115, 263 (2013a).
  - Folch J., Lees M., Stanley S. G. H.: *J. Biol. Chem.* 226, 497 (1957).
  - Ferraz T. P. L., Fiúza M. C., dos Santos M. L. A., Pontes de Carvalho L., Soares N. M. J.: *Biochem. Biophys. Methods* 58, 187 (2004).
  - Custódio F. B., Tavares É., Glória M. B. A.: *J. Food Compos. Anal.* 20, 280 (2007).
  - Václavík L., Bělková B., Réblová Z., Riddelová K., Hajšlová J.: *Food Chem.* 138, 2312 (2013).

**T. Škorpilová, P. Pipek, and A. Rajchl** (*Department of Food Preservation, University of Chemistry and Technology Prague*): **New Possibilities of Monitoring the Meat Freshness**

Meat freshness is an important property and so new methods for freshness evaluation are sought. Unfortunately, the known methods are restricted and so we tried to use quite a new technique – direct analysis in real time (DART) coupled with time-of-flight mass spectroscopy

(TOF-MS). This technique using plasma-excited He atoms and atmosphere components can follow up countless changes in meat composition. For extraction of low-molecular-weight compounds, we used demineralized water, methanol, toluene, chloroform-methanol (2:1) and isopropyl alcohol-hexane (2:1). DART coupled with TOF-MS was used for analysis of extracts. The obtained

mass spectra were processed by the principal component analysis (PCA) in order to assess the compositional differences between fresh and spoiled meat. Based on the processed data, it can be concluded that DART coupled with TOF-MS is applicable for evaluation of meat freshness as the values for fresh and stale meat are well separated in scatter plot.

VŠCHT Praha představuje nový elektronický

**„Slovník chemických pojmů aneb Chemické pomněnky“**,

který vznikl pod vedením prof. Milana Kodíčka v rámci projektu „Zvýšení úspěšnosti studia v bakalářských studijních programech na VŠCHT Praha“. Na vzniku Slovníku se podíleli pracovníci z Ústavu biochemie a mikrobiologie, Ústavu fyzikální chemie, Ústavu anorganické chemie, Ústavu organické chemie a Ústavu analytické chemie.

Slovník je určen především studentům bakalářských a magisterských studijních programů, pro něž by měl sloužit jako soubor definic v přívalu pojmů, jemuž jsou každodenně vystaveni. Pomůže studentům nejen při přípravě na jednotlivé zkoušky, ale i těm, kteří se připravují se na bakalářské a magisterské státní zkoušky, příp. chemikům, kteří chtějí osvěžit či nechat vysvětlit některé pojmy ze světa chemie.

Adresa slovníku: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-007/#p\\_title](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-007/#p_title)