

# **Stanovení celkového obsahu dusíkatých látek v potravinách**

Vendula Pachlová

---

Bakalářská práce  
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

akademický rok: 2005/2006

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vendula PACHLOVÁ**

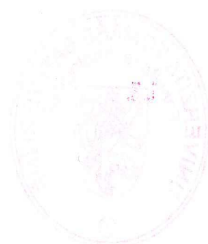
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Stanovení celkového obsahu dusíkatých látek  
v potravinách**

Zásady pro vypracování:

1. V teoretické části rozebrat význam bílkovin pro lidský organismus z hlediska výživy.
2. Zpracovat přehled metod používaných pro stanovení dusíkatých látek v potravinách.
3. V experimentální části provést stanovení obsahu celkového dusíku dvěma vybranými metodami u vybraných potravin.
4. Získané výsledky srovnat, provést diskusi možných rozdílů a vyhodnocení z hlediska časové a ekonomické náročnosti.



Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Dle doporučení vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Marta Severová**

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**10. října 2005**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. května 2006**

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006

  
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
děkan



  
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
ředitel ústavu

## **ABSTRAKT**

V teoretické části je rozebrán význam bílkovin pro lidský organismus z hlediska výživy. Dále je uveden přehled metod používaných pro stanovení bílkovin včetně způsobu mineralizace, která je pevnou součástí vlastní analýzy.

V experimentální části bylo provedeno stanovení celkového dusíku u vybraných vzorků klasickou metodou podle Kjeldahla upravenou dle Winklera a rychlou spektrofotometrickou metodou firmy HACH. Získané výsledky byly porovnány pomocí statistické metody. U obou metod byla rovněž posouzena časová a ekonomická náročnost analýzy.

Klíčová slova: Aminokyselina, bílkoviny, mineralizace, Kjeldahlova metoda, spektrofotometrická metoda, Nesslerovo činidlo

## **ABSTRACT**

There is an importance of proteins for human organism in a view of sustenance in the first part of this work. Further there is the list of the methods used for determination of proteins, involving the mineralization, which is the main part of the analyses itself.

In the practical part there was classic Kjeldahles method (improved by Winkler) and spectrophotometry ( by HACH company) used for determination of total nitrogen from the chosen samples. Further result were compared by statistical method. The time and economical consumption was also reviewed for both of the methods of analyses.

Keywords: Aminoacid, proteins, mineralization, Kjeldahles method, spectrophotometry method, Nessler reagent,

Tímto bych ráda poděkovala ing. Martě Severové, vedoucí bakalářské práce, za odborné vedení, za věnovaný čas a za cenné rady a připomínky, které mi pomohly tuto práci zpracovat.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 BÍLKOVINY</b> .....	<b>10</b>
1.1 AMINOKYSELINY .....	10
1.2 VÝSKYT A SLOŽENÍ PROTEINŮ V POTRAVINÁCH.....	12
1.2.1 Bílkoviny masa.....	12
1.2.2 Mléko a mléčné výrobky .....	15
1.2.3 Vejce.....	17
1.2.4 Cereálie a pseudocereálie .....	18
1.2.5 Luštěniny .....	20
1.2.6 Jiné druhy potravin.....	21
1.3 TRÁVENÍ BÍLKOVIN.....	22
1.4 BIOLOGICKÁ HODNOTA BÍLKOVIN.....	23
1.5 POTRAVINOVÉ ALERGIE.....	25
<b>2 METODY STANOVENÍ BÍLKOVIN</b> .....	<b>28</b>
2.1 MINERALIZACE.....	28
2.1.1 Klasifikace metod stanovení vzorků s organickou maticí .....	29
2.1.2 Mokvý rozklad .....	29
2.2 METODY STANOVENÍ HRUBÉ BÍLKOVINY .....	31
2.2.1 Metody odměrné analýzy .....	31
2.2.2 Spektrofotometrické metody .....	34
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
<b>3 METODIKA PRÁCE</b> .....	<b>37</b>
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE .....	37
3.2 MINERALIZACE VZORKŮ MOKROU CESTOU .....	38
3.3 STANOVENÍ METODOU PODLE KJELDAHLA S ÚPRAVOU PODLE WINKLERA .....	38
3.4 STANOVENÍ SPEKTROFOTOMETRICKOU METODOU S POUŽITÍM NESSLEROVA ČINIDLA .....	40
3.5 METODA STATISTICKÉHO VYHODNOCENÍ DLE WILCOXE.....	42
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>43</b>
4.1 SROVNÁNÍ ROZDÍLŮ MEZI METODAMI .....	43
4.1.1 Časová a ekonomická náročnost jednotlivých metod .....	44
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>46</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>47</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>49</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>50</b>

## ÚVOD

Bílkoviny patří vedle sacharidů a lipidů mezi tři základní složky potravy, z nichž lidský organismus získává potřebné látky a energii pro duševní i fyzickou činnost, pro zajištění všech dějů, které v organismu probíhají. Význam proteinů je nezastupitelný, neboť poskytují základní materiál pro růst a vývoj živé hmoty, pro zachování a stálou obnovu veškerých tělesných struktur; zúčastňují se tvorby hormonů, enzymů, barviv (zejména krevního barviva-hemoglobinu) a mají podíl na tvorbě složek trávicích šťáv; zvyšují látkovou výměnu organismu tím, že velkou část své energetické hodnoty spotřebují na svou vlastní přeměnu (tzv. specificko-dynamický účinek); pomáhají udržovat stálý osmotický tlak ve vnitřním prostředí a tím i rovnováhu vody v organismu; mají přepravní (transportní) funkci při přenosu některých látek (např. tuků); jsou zdrojem imunobiologických látek, které chrání organismus před infekcemi a v neposlední řadě pomáhají udržovat správnou chemickou reakci ve vnitřním prostředí [1].

Zdroje bílkovin hodnotíme především podle toho, zda obsahují všechny esenciální aminokyseliny. Tyto bílkoviny nazýváme plnohodnotnými a jejich výskyt je nejčastěji v potravinách živočišného původu a to zejména v mase, vejcích, mléce a mléčných výrobcích. Z rostlinných zdrojů jsou nejbohatší na proteiny luštěniny, které obsahují až jednu čtvrtinu bílkovin. Jejich složení je cenné i když méně, neboť ve skladbě nejsou zastoupeny všechny esenciální aminokyseliny nezbytné pro lidský organismus.

Vzhledem k zásadnímu významu proteinů ve výživě člověka ustanovilo Ministerstvo zdravotnictví vyhlášku č. 450/2004 Sb., o označování výživové hodnoty potravin, kdy jedním z údajů na etiketě potravinářských výrobků je údaj o obsahu bílkovin a to pokud na jejich obalu je uvedeno výživové tvrzení, dále v případech stanovených vyhláškou, popř. stanovených rozhodnutím Ministerstva zdravotnictví vydaném podle §11 odst.4 tohoto zákona [2]. Bílkovinou nebo bílkoviny v potravině se podle uvedené vyhlášky rozumí celkový obsah dusíku stanovený metodou podle Kjeldahla vynásobený přepočítacím faktorem 6,25 [3]. Tato klasická metoda je dostatečně přesná pro stanovení hrubé bílkoviny, avšak její nevýhodou je velká časová náročnost. Pro rychlou orientaci se využívá daleko rychlejší, ale méně přesnější spektrofotometrická Nesslerova metoda.

V experimentální části bylo cílem ověřit metodiku stanovení celkového obsahu dusíku u vybraných skupin potravin spektrofotometrickou metodou firmy HACH a výsledky porovnat s hodnotami získanými klasickou metodou podle Kjeldahla s úpravou dle Winklera.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BÍLKOVINY

Bílkoviny (proteiny) se spolu s nukleovými kyselinami, polysacharidy a lipidy řadí mezi tzv. biopolymery, které vznikly procesem proteosyntézy aminokyselin. Obsahují v molekule běžně více než 100 aminokyselin vzájemně vázaných peptidovou vazbou - CO-NH- do nezvětvených (lineárních) řetězců. Jejich relativní molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezích asi od 10 000 do milionů Da.

Kromě peptidových vazeb se na vytváření struktury proteinů podílejí ještě jiné vazby, zejména disulfidové ( - S - S - ), esterové a amidové (vazby umožňující spojení serinu, threoninu, argininu nebo lysinu prostřednictvím kyseliny fosforečné) [4].

Podle velikosti molekuly rozlišujeme dvě základní skupiny proteinů a to peptidy, které obsahují počet vázaných aminokyselin menší než 100, resp. mají menší relativní molekulovou hmotnost než 10 000 a bílkoviny nebo-li proteiny, které obsahují více než 100 vázaných aminokyselin. Podle počtu vázaných aminokyselin se peptidy dále člení na dipeptidy, tripeptidy, tetrapeptidy atd. Peptidy obsahující vázané aminokyseliny do celkového počtu deset nazýváme oligopeptidy. Peptidy mající více než 10 aminokyselin označujeme souhrnně jako polypeptidy. Hranice mezi polypeptidy a bílkoviny (tedy při počtu asi 100 vázaných aminokyselin) není ovšem ostrá a je víceméně libovolná. Rozdíly mezi peptidy a bílkoviny se objevují postupně s narůstající molekulovou hmotností [4].

### 1.1 Aminokyseliny

Každá bílkovina se skládá z jednoduchých molekul - aminokyselin. Obměnou typu, pořadí a počtu jednotlivých aminokyselin v řetězci vzniká bílkovina o jiném tvaru, hmotnosti i funkci. Přestože je aminokyselin používaných k tvorbě našich bílkovin pouze 22, vzniká jejich kombinací nespočet komplikovaných molekul s nejrozmanitějšími možnostmi uplatnění [6].

Přirozené aminokyseliny vázané v proteinech mají aminovou (někdy iminovou) skupinu vázanou na uhlíku bezprostředně sousedícím s karboxylem. Mají tedy (s výjimkou glycinu) jeden asymetrický uhlíkový atom v molekule, takže se mohou vyskytovat ve dvou prostorových modifikacích. Aminokyseliny vázané v proteinech mají vesměs

L-konfiguraci, i když se v přírodě některé D-aminokyseliny také ojediněle vyskytují, a to buď volné, nebo vázané v peptidech.

V přírodě již bylo dokázáno kolem 200 různých aminokyselin, ale jen některé z nich jsou rozšířeny. Aminokyseliny vyskytující se běžně v proteinech potravin se dělí podle charakteru řetězce na tyto skupiny:

1. neutrální alifatické aminokyseliny  
glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin
2. alifatické hydroxykyseliny  
serin, threonin
3. sírné aminokyseliny  
cystein, cystin, methionin
4. iminové kyseliny  
prolin, 4-hydroxyprolin, 3-hydroxyprolin
5. kyselé aminokyseliny  
asparagová kyselina, glutamová kyselina a jejich semiamidy asparagin a glutamin
6. bazické aminokyseliny  
lysin, arginin, histidin
7. aromatické aminokyseliny  
fenylalanin, tyrosin, tryptofan

Z 23 aminokyselin běžně přítomných v bílkovinách dovedou vyšší živočichové a člověk syntetizovat v dostatečném množství ve svém organismu pouze 15, zbývající musí být dodávány v dostatečném množství v potravě. K těmto nezbytným aminokyselinám, tzv. esenciálním, patří: lysin, leucin, isoleucin, fenylalanin, methionin, valin a tryptofan. Arginin a histidin jsou esenciálními aminokyselinami pro rostoucí organismus [7].

Některé aminokyseliny mohou být pro člověka vzácně nebezpečné. Nejznámějším příkladem je tzv. fenylketonurie. Je to vrozená nemoc, při které dochází k hromadění aminokyseliny fenylalaninu. Jeho zvýšená hladina může u takto nemocných vážně poškodit centrální nervový systém - mozek. Ohrožen je zejména plod matky postižené touto nemocí. Sledování a záchyt této nemoci v populaci patří v současné době k rutinní lékařské praxi.

Není tedy třeba obávat se jejího přehlédnutí nebo zanedbání. Léčba spočívá ve speciální dietě omezené často jen na období těhotenství a kojení [6].

## 1.2 Výskyt a složení proteinů v potravinách

Různé druhy potravin se navzájem značně liší obsahem proteinů, složením jejich aminokyselin a biologickou hodnotou. Obsah bílkovin se pohybuje prakticky v mezích 0 - 100% v sušině. Bohatým zdrojem proteinů jsou hlavně potraviny živočišného původu ( např. maso, sýry, vejce ), z rostlinných produktů zvláště luštěniny (hrách, fazole, čočka) a olejniný (arašídý, mák, ořechy). Střední obsah mají obiloviny a výrobky z nich. Velmi nízký je obsah proteinů v ovoci, zelenině a bramborách, i když jde o proteiny hodnotné. Bílkoviny neobsahují rostlinné oleje, ocet a cukr [4].

Potravinářské suroviny a výrobky se mohou velice lišit také složením přítomných proteinů. Obvykle ovšem není zastoupen pouze jeden typ proteinů, ale směs komponent často velmi odlišného složení [7].

### 1.2.1 Bílkoviny masa

Složení masa kolísá v závislosti na druhu zvířete, plemenu, pohlaví, věku, způsobu výživy a liší se i jednotlivé svaly u téhož jedince. Struktura a složení svaloviny (svalové tkáně) závisí dále na způsobu zpracování masa, které ovlivňuje chemické, organoleptické a technologické vlastnosti masa [5].

Svalové proteiny v typické svalové tkáni savců tvoří okolo 20% hmotnosti svalů. Hlavní podíl představují proteiny svalových vláken, tzv. myofibrilární proteiny (aktin, myosin), menší podíl představují rozpustné proteiny sarkoplasmy zvané sarkoplasmatické proteiny (myogen, myoglobin) a nerozpustné strukturní proteiny pojivové tkáně tzv. stromatické bílkoviny (kolageny, elastiny, keratiny) [4].

Téměř všechny pojivové tkáně obsahují kolageny. Kolagenní vlákna jsou tvořena vlákný tropokolagenu (asi 30 kDa), která jsou po třech stočena do šroubovic (převážně  $\alpha$ -helixu). U savců se rozeznává 10 různých variant, složených z mnoha odlišných polypeptidových řetězců [8].

Z hlediska průměrného obsahu bílkovin se liší i jednotlivé části těl velkých jatečných zvířat což dokumentuje tab. 1. Krev je tvořena asi ze 40% krevními elementy jako jsou

erythrocyty (červené krvinky) obsahující krevní barvivo hemoglobin, trombocyty a leukocyty (bílé krvinky). Zbývající zhruba 60% tvoří plazma, která má asi 10% sušiny tvořenou albuminy, globuliny a fibrinogenem.

Tab. 1. Průměrné hodnoty obsahu bílkovin dle druhu masa [g/100g] [9]

<b>Druh masa</b>	<b>Obsah bílkovin [g/100g]</b>	<b>Druh masa</b>	<b>Obsah bílkovin [g/100g]</b>
<i>Hovězí maso</i>		<i>Vepřové maso</i>	
výsekové přední	17,9	výsekové	12,6
výsekové zadní	21,2	libové	16,4
libové	15,9	středně tučné	12,9
středně tučné	13,4	tučné	10,7
tučné	14,3	plec	14,7
roštěná vysoká	15,7	bok	11,8
roštěná nízká	17,9	krkovice	13,1
svíčková	20,2	slanina	3,4
bok	17,5	jazyk	15,4
plec	16,8	játra	20,0
jazyk	15,2	plíce	15,4
játra	18,5	srdce	15,6
srdce	15,6	slezina	17,6
mozeček	10,3	mozeček	10,0

V tab. 2. jsou uvedeny rozmezí mezi nejnižšími a nejvyššími hodnotami proteinového zastoupení u vybraných druhů masa a masných výrobků.

Tab. 2. Obsah proteinů v masných produktech [7]

Skupina potravin	Druh potravin	Obsah proteinů v materiálu (%)		
		nejnižší	nejvyšší	průměrný
<i>Maso, masné výrobky</i>	Maso hovězí	13,1	25,2	20,8
	Maso vepřové	9,1	20,2	15,5
	Maso telecí	18,3	27,0	21,8
	Vnitřnosti	10,4	22,0	17,2
	Klobásy, párky, jaternice	11,3	16,5	13,0
	Salámy	12,8	28,0	15,5
<i>Drůbež</i>	Drůbež ( vodní, hrabavá )	12,8	23,7	21,1
<i>Ryby</i>	Ryby	16,0	24,1	18,7
<i>Zvěřina</i>	Zvěřina	20,8	24,3	22,8

Krev hospodářských zvířat je surovinou pro potravinářský průmysl. Můžeme zde zmínit například výrobu jelit, sušená krevní plasma se může použít k náhradě vaječného bílku v pekařském průmyslu nebo protein fibrin jako surovina pro výrobu polévkových kořenících přípravků.

V níže uvedené tab.3. je znázorněn obsah proteinů v krvi některých hospodářských zvířat.

Tab. 3. Obsah bílkovin v krvi hospodářských zvířat [9]

<b>Krev</b>	<i>hovězí</i>	<i>vepřová</i>	<i>telecí</i>	<i>husí</i>	<i>kachní</i>	<i>slepičí</i>
Obsah bílkovin [g/100g]	18,0	19,7	16,6	17,8	17,9	16,6

### 1.2.2 Mléko a mléčné výrobky

Bílkoviny tvoří velmi významnou součást sušiny mléka. Podle chemických a fyzikálních vlastností bílkoviny mléka dělíme na kasein (lépe kaseiny, protože i vlastní kasein mléka má několik modifikací), albuminy a globuliny. Všechny tyto bílkoviny jsou v mléce jemně rozptýlené, tvoří pravý koloidní roztok.

Obsah bílkovin v mléce kolísá v menším rozpětí, než obsah tuku. Může se pohybovat v rozmezí 2,8 - 3,5%, většinou však kolísá od 3,1 do 3,4%. Závisí zejména na plemenu dojnic a jejím zdravotním stavu. V mléčných výrobcích není obsah bílkovin standardizován.

U tekutých a kysaných mléčných výrobků je dán obsahem bílkovin v použitém syrovém mléce, u ostatních výrobků je obsah bílkovin závislý na obsahu sušiny, kde je zachováván relativně stabilní poměr bílkovin podle použité technologie.

U kravského mléka je největší podíl bílkovin tvořen kaseinem. Kasein představuje 80 - 90% bílkovin mléka. Je charakterizován tím, že je ho možno z mléka vysrážet zvýšením kyselosti při nízkých teplotách, nebo za použití syřidlových enzymů, kdy ostatní bílkoviny mléka se tímto způsobem vysrážet nedají. Kasein tvoří základ sýrů a tvarohů [10].

Kaseiny se v mléce nenacházejí ve formě monomerů, ale jsou agregovány do micel a kaseinových komplexů. Polární části molekul kaseinů, tzn. fosfoserinové zbytky molekul  $\alpha_s$ -kaseinů a  $\beta$ -kaseinů a threoninový zbytek s vázanými oligosacharidy v molekule  $\kappa$ -kaseinů, integrují s vápenatými ionty a vodou. Micela kravského mléka obsahuje asi 20 000 molekul kaseinů z toho kaseiny tvoří asi 93%, vápenaté ionty asi 3%, anorganický (volný) fosfát také asi 3%, 2% fosfátu je vázáno jako fosfoserin, 0,4% citrátu a do 0,5% je sodných, draselných a hořečnatých iontů [11].

Ostatní bílkoviny mléka často souborně označujeme jako syrovátkové bílkoviny. Jedná se o albuminy a globuliny. Globuliny mají oproti albuminům menší molekulu, mohou tedy snadněji procházet různými membránovými systémy bez nutnosti předchozího rozložení, velmi často mají charakter protilátek a tvoří součást imunitních systémů [10]. Z Tab. 4 je zřejmé, že největší zastoupení z proteinů mléka má  $\alpha_s$ -kasein a dále  $\beta$ -kasein. Ze syrovátkových bílkovin se nejvíce vyskytuje  $\beta$ -laktoglobulin.

Samotné mléko je výrazně chudší na bílkoviny než mléčné výrobky. To je hlavně dáno vysokým podílem vody v mléce. Vysoký obsah bílkovin v sýrech je také způsoben základní surovinou na výrobu sýru - vysráženým kaseinem. Sýr se vyrábí odpovídajícím odvodněním sraženiny mléka, smetany, odtučněného mléka, částečně odtučněného mléka, nebo směsi některých, případně všech těchto surovin. Z nutričního hlediska jsou sýry plnohodnotnými výrobky obsahující všechny esenciální aminokyseliny. Zdrojem využitelné energie jsou bílkoviny a tuk [12].

Tab. 4. Proteiny mléka [11]

Proteiny	Zastoupení [%]
<i><b>Kaseiny (celkem 80%)</b></i>	
$\alpha_s$ -kasein	42
$\beta$ -kasein	25
$\gamma$ -kasein	4
$\kappa$ -kasein	9
<i><b>Syrovátkové proteiny (celkem 20%)</b></i>	
$\alpha$ -laktalbumin	4
sérový albumin	1
$\beta$ -laktoglobulin	9
imunoglobuliny	2
peptony apod.	4

Syřitelnost mléka je schopnost srážet se se sýřidlem a tvořit sýřeninu požadovaných vlastností. Syřitelnost mléka závisí na jeho neporušeném složení. Důležitý je obsah kaseinových bílkovin, minerálních látek a jejich rovnováha s bílkoviny a také forma, ve které se nacházejí (rozpuštěná, ionizovaná, koloidní) a dále pH mléka [12].



V tab. 5 jsou pro porovnání uvedeny jednotlivé mléčné potraviny a zastoupení jejich proteinů.

Tab. 5. Obsah proteinů v mléčných produktech [7]

Skupina potravin	Druh potraviny	Obsah proteinů v materiálu [ % ]		
		nejnižší	nejvyšší	průměrný
<i>Mléko, mléčné výrobky</i>	Mléko kravské plnotučné	3,1	3,4	3,3
	Smetana	3,0	3,3	3,2
	Podmáslí	3,2	3,5	3,4
	Olomoucké tvarůžky	23,6	37,8	29,9
	Tvaroh měkký	18,0	20,6	19,4
	Sýry měkké	12,5	20,2	15,0
	Sýry tvrdé	23,8	40,6	24,8
	Sýry tavené	15,7	22,6	20,5

### 1.2.3 Vejce

Vejce obsahují značné množství proteinů v koncentrované formě (kolem 13% v jedlém podílu), které mají vysokou nutriční hodnotu. Vaječný bílek obsahuje asi 40 různých proteinů, které se řadí mezi globuliny, glykoproteiny a fosfoproteiny. Hlavní protein bílku představuje skupina příbuzných sloučenin označovaná jako ovoalbumin A. Při skladování vajec vzniká reakcí thiolových a disulfidových skupin z ovoalbuminu A termorezistentnější ovoalbumin S.

Dalšími zástupci proteinů vaječného bílku jsou:

- Konalbumin - vykazuje antimikrobiální účinky
- ovomukoid a ovomucin - jsou zodpovědné za viskozitu a gelovitou konzistenci bílku [4]
- lysozym - má schopnost lyzovat buněčné stěny Gram pozitivních a Gram negativních bakterií, díky této enzymové aktivitě působí jako ochranný faktor bránící průniku mikroorganismů od skořápky ke žloutku [12].

Většina proteinů se ve žloutku nenachází v čisté formě, ale tvoří komplexy s lipidy a sacharidy. Mezi čisté proteiny patří livetiny, které se nacházejí v plazmě a jsou tvořeny několika frakcemi o různé molekulové hmotnosti.

Fosfovitin patří mezi glykoproteiny. Obsahuje 10% kyseliny fosforečné vázané na serin. Fosfovitin je vysoce tepelně rezistentní, denaturuje až nad 110°C a váže železo. Viteliny a vitelenin jsou rovněž glykoproteiny, které obsahují fosfor. Viteliny a vitelenin tvoří komplexy s fofolipidy a řadí se mezi lipoproteiny.

Lipoproteiny tvoří asi 63% proteinů žloutku. Snadno podléhají denuraci. Jsou tvořeny frakcemi o různé hustotě (VLDL, LDL, HDL) [12]. Průměrné proteinové složení vejce je uvedeno v tab. 6.

Tab. 6. Obsah proteinů ve vejcích [7]

Skupina potravin	Druh potravin	Obsah proteinů v materiálu [ %]
<i>Vejce slepičí</i>	Bílek	11,0
	Žloutek	16,0
	Celá vejce	13

#### 1.2.4 Cereálie a pseudocereálie

Z rostlinných materiálů jsou nejvýznamnějším zdrojem proteinů pro výživu člověka obiloviny, v první řadě pšenice. Obsah proteinů vnějších (subaleuronových) částí obilného

zrna je výrazně vyšší než u vnitřních částí. Proto obsah proteinů v mouce značně závisí na stupni jejího vymletí a samozřejmě také na druhu, odrůdě rostliny a dalších faktorech. Tmavé celozrnné mouky mají vyšší obsah proteinů než bílé, rozdíl bývá až 4%. Základními bílkovinami všech obilovin jsou albuminy, globuliny, gliadiny a gluteliny.

Nejvýznamnější proteiny pšenice jsou rezervní, ve vodě nerozpustné gliadiny a gluteniny. Po smíchání s vodou tvoří tuhou hmotu lepek.

Žitné albuminy a globuliny, představující asi 55% proteinů žita, mají podobné vlastnosti jako albuminy a globuliny pšenice. Asi z 45% jsou přítomny gliadiny a gluteliny. Žitný lepek se od pšeničného liší obsahem některých aminokyselin a především viskoelastickými vlastnostmi.

Kukuřičné proteiny tvoří asi 50% zein, který patří mezi gliadiny, 20 - 45% proteinů tvoří gluteliny.

Proteiny rýže tvoří asi z 80% gluteliny (oryzenin), gliadiny a další proteiny jsou zde minoritní složkou [4]. Proteinové složení základních potravin z obilovin je uvedeno v tab. 7.

Tab. 7: Obsah proteinů v cereálních produktech [7]

Skupina potravin	Druh potravin	Obsah proteinů v materiálu (%)		
		nejnižší	nejvyšší	průměrný
<i>Mouka, chléb, pečivo</i>	Mouka pšeničná hladká	8,2	12,8	10,4
	Mouka pšeničná hrubá	8,1	10,8	9,7
	Mouka žitná	5,1	8,3	7,6
	Rýže	-	-	6,7
	Chléb žitnopšeničný	4,7	11,6	6,7
	Bílé pečivo	7,3	9,7	8,5
	Těstoviny	9,8	12,5	11,8

### 1.2.5 Luštěniny

Bílkoviny luštěnin nejsou z biologického hlediska plnohodnotné (chybí především sирné aminokyseliny a tryptofan). Vhodnou kombinací s živočišnými bílkovinami a vzhledem k vyššímu obsahu minerálních látek jsou považovány za výrobky nutričně žádoucí. Patří rovněž k potravinám, které jsou pro svoje organoleptické vlastnosti oblíbeny. V bílkovinách luštěnin jsou zastoupeny především globuliny: legumin, fazeolin, vicinin, konglutin, glycinin. Obsah bílkovin je u některých nově geneticky vyšlechtěných druhů sóji udáván až 45% [13].

Obsah proteinů v luštěninách se obecně pohybuje v rozmezích 21,4 až 44,7%, přičemž průměrný obsah je 24,2%. [7] Podrobnější zastoupení bílkovin v jednotlivých druzích luštěnin je uvedeno v tab. 8.

Tab. 8. Průměrné hodnoty obsahu bílkovin podle druhu luštěnin [v %] [13]

<b>Luštěnina</b>	<i>hrách</i>	<i>fazole</i>	<i>čočka</i>	<i>sója</i>
<b>Bílkoviny</b>	22,4	23,1	23,8	33,0 až 45,0

V následující tab. 9. je znázorněno rozmezí, ve kterém se může pohybovat obsah bílkovin u jednotlivých druhů luskovin. Tyto hodnoty byly získány z jiného zdroje, a proto se mírně liší od předchozí tabulky.

Tab.9. Obsah bílkovin v luskovinách [9]

<b>Druh</b>	<b>Bílkoviny [%]</b>	<b>Druh</b>	<b>Bílkoviny [%]</b>
<i>hrách</i>	22,0-28,0	<i>cizrna</i>	17,5
<i>fazole</i>	21,0-28,0	<i>hrachor setý</i>	25,0
<i>čočka</i>	25,0-30,0	<i>lupina</i>	32,0-39,0

### 1.2.6 Jiné druhy potravin

Omezeným zdrojem rostlinných proteinů v potravě člověka mohou sloužit plody, listy, hlízy a bulvy. Jejich výživová hodnota bývá poměrně nízká, protože u všech schází některá esenciální aminokyselina [11].

V následující tab. 10. jsou uvedeny další skupiny potravin jako je zelenina a ovoce, jejíž podíl bílkovin je nízký, ale jsou důležité z jiného výživového hlediska. Poměrně vysoký obsah bílkovin mají i některé potraviny ze skupiny tuků jako jsou kakaový prášek, mandle, mák a ořechy.

Tab. 10. Obsah proteinů v dalších potravinách [7]

Skupina potravin	Druh potravin	Obsah proteinů v materiálu (%)		
		nejnižší	nejvyšší	průměrný
<i>Zelenina, brambory</i>	Brambory	-	-	2,0
	Okurky, rajčata, květák	0,7	1,7	1,2
	Zelenina listová	1,3	3,9	2,6
	Zelenina kořenová	1,0	3,3	2,0
	Zelí kyselé	1,3	1,8	1,5
	Houby	-	-	2,6
<i>Ovoce</i>	Ovoce syrové	0,3	1,5	1,0
	Ovoce sušené	1,4	4,0	2,3
<i>Přípravky do pokrmů</i>	Droždí	-	-	10,6
	Polévková kostka	12,2	27,6	18,2
<i>Tuky</i>	Kakaový prášek	-	-	18,0
	Mák	-	-	19,5
	Mandle	-	-	18,6
	Ořechy	-	-	15,0

### 1.3 Trávení bílkovin

Organismus není schopen využít proteiny v jejich původní formě stejně tak jako jiné vysokomolekulární sloučeniny a musí je nejprve procesem trávení rozložit na základní jednotky (aminokyseliny).

Vlastní trávení (většinou denaturovaných bílkovin) je enzymová hydrolýza (proteolýza) katalyzovaná proteolytickými enzymy (proteasami). Proteasy katalyzují buď hydrolýzu peptidové vazby uvnitř polypeptidového řetězce za vzniku peptidů různé velikosti (endopeptidasy) nebo odštěpují jen koncové aminokyseliny (exo-peptidasy). Hydrolýzu N-koncové aminokyseliny katalyzují aminopeptidázy, hydrolýzu C-koncové aminokyseliny karboxypeptidázy.

Proteasy jsou součástí trávicích šťáv a to:

- Žaludeční šťávy, která obsahuje endopeptidasu pepsin (u dospělých savců se vyskytuje pepsin A a pepsin C zvaný též gastrici, u jejich mlád'at rennin neboli chymosin)
- Pankreatické šťávy obsahují 7 odlišných proteas (trypsin, chymotrypsin A, B a C, elastasu a karboxypeptidázu A a B)
- Střevní šťávy (šťávy tenkého střeva) vykazují aktivitu aminopeptidas a dipeptidas.

Hydrolýza proteinů probíhá v několika stupních. Nejprve vznikají polypeptidy, z nich oligopeptidy a konečnými produkty jsou aminokyseliny. Každý stupeň hydrolýzy katalyzuje jiný enzym. Vznikající aminokyseliny jsou následně v tenkém střevě vstřebávány a transportovány lymfatickým oběhem do tkání nebo krevním oběhem do jater, kde jsou dále metabolizovány [4].

Potravou přijímáme i další dusíkaté látky, zejména nukleové kyseliny. Jejich základem jsou nukleové báse, odvozené buď od purinu nebo pyrimidinu. Připojením ribosy či deoxyribosy k nukleovým basím vznikají nukleosidy. Z nich vznikají fosforylací nukleotidy. Nukleové kyseliny jsou vysokomolekulárními řetězci nukleotidů. Enzymy štěpící nukleové kyseliny jsou v pankreatické šťávě. Produktem je nukleová báse, fosfát a ribosa či deoxyribosa [14].

## 1.4 Biologická hodnota bílkovin

Člověk přijímá potravou rostlinné i živočišné bílkoviny. Živočišné bílkoviny mají vyváženou skladbu aminokyselin, naopak rostlinným bílkovinám chybí některé esenciální aminokyseliny. Energetická vydatnost bílkovin je stejná jako u sacharidů, cca 17 kJ/g. Bílkoviny jsou nezastupitelnou složkou stravy. Běžný denní příjem bílkovin bývá kolem 100g. Toto množství převyšuje fyziologickou potřebu. Uvedenému příjmu odpovídá vyloučení 17g dusíku, jednak močí, jednak stolicí. Většina vyloučeného dusíku je v podobě močoviny  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , jejíž syntéza je energeticky náročná. Z toho plyne, že nadměrný příjem bílkovin potravou není prospěšný. Při velkém příjmu bílkovin se vstřebané aminokyseliny ve zvýšené míře využívají k produkci energie (tedy nejen ke stavebním účelům), což je nevhodné.

Bílkovina není plnohodnotná, pokud se buď i jediné esenciální aminokyseliny nedostává. Tato aminokyselina se pak nazývá limitující, neboť hodnotu bílkoviny omezuje. Navíc, při nevyváženém zastoupení aminokyselin v potravě, ty aminokyseliny, kterých je výrazný přebytek, omezují využití aminokyselin zastoupených nedostatečně (např. soutěží o přenašeče ve střevní stěně). Biologická hodnota bílkovin živočišného původu je všeobecně vyšší než hodnota bílkovin původu rostlinného. Neplnohodnotné však mohou být i některé živočišné bílkoviny, např. kolagen. Optimální aminokyselinové složení má např. laktalbumin a ovoalbumin. Biologická hodnota bílkovin může být i jiná v čistém stavu a jiná ve směsi s ostatními složkami potravin, které její využití ovlivňují. Zejména v rostlinách je velké množství látek, které s bílkovinami tvoří špatně stravitelné komplexy (tanniny, kyselina fytoová), nebo brzdí jejich štěpení v trávicím traktu (inhibitory proteas). Zjištění aminokyselinové skladby určité bílkoviny ke stanovení její biologické hodnoty samo o sobě nestačí. Rozhodující jsou výsledky testů na zvířatech (myších, potkanech), které umožní posoudit stravitelnost bílkovin a využití vstřebaných aminokyselin v tkáních. Rovněž umožňují odhadnout poškození bílkovin během výroby a skladování potravin jakož i srovnat různé potraviny podle kvality bílkovin v nich obsažených.

Biologickou hodnotu rostlinných bílkovin lze zvýšit šlechtěním kulturních rostlin, včetně využití molekulárně-genetických metod; fortifikací limitujícími aminokyselinami a samozřejmě kombinací různých zdrojů bílkovin [14].

Důležitým aspektem je také využitelnost proteinů v lidském organismu, která stanoví kolik a jakých bílkovin se do organismu vstřebá a aktuálně využije. Existuje celá řada faktorů, které ovlivňují biologickou využitelnost a vstřebatelnost jednotlivých aminokyselin. Jestliže je bílkovina provázena velkým množstvím pojivové tkáně - kolagenu, žaludeční a střevní enzymy ji stráví jen s obtížemi a větší část může opustit tělo dokonce úplně nestrávená.

Proto vědci měří biologickou využitelnost různými způsoby:

- *Biologická hodnota* vyjadřuje procento dusíku, které se vstřebalo do organismu. Potraviny s vysokou biologickou hodnotou nejsou obvykle snadno stravitelné, avšak co se z nich stráví, je pro organismus velice prospěšné.
- *Čistá využitelnost bílkovin* vyjadřuje celkovou kvalitu bílkovin. Zahrnuje v sobě jak vstřebatelnost, tak stupeň využití organismem.
- *Proteinová účinnost* je poměr mezi přírůstkem svalové hmoty dosaženým za 10 dnů a množstvím zkonsumovaných bílkovin. Pokud dosáhneme velkého přírůstku s použitím relativně malého množství bílkovin, kvalita těchto bílkovin je vynikající. Pokud dosáhneme jen malý přírůstek svalové hmoty a spotřebujeme k tomu velké množství bílkovin, jsou tyto bílkoviny z hlediska proteinové účinnosti méně kvalitní. Touto metodou se nejspíše stanoví nutriční hodnoty bílkovin, pocházejících z různých zdrojů.
- *Stravitelnost bílkovin vztažená na aminokyseliny* byla zavedena v roce 1985. Protože proteinová účinnost se zjišťuje na krysách, má například sójová bílkovina podle tohoto měření jen velmi nízkou kvalitu. Sója je totiž chudá na methionin a krysy jej potřebují ve větším množství než lidé. Aby se získaly odpovídající hodnoty využitelné pro lidi, zavedlo se měření stravitelnosti bílkovin vztažené na aminokyseliny. Tato hodnota stanoví „lidskou“ využitelnost bílkovin a bere ohled na obsah jednotlivých aminokyselin, jejich poměr a biologickou využitelnost. Podle definice FDA (U.S. Food and Drug Administration) nemůže mít vyšší hodnotu než 1. Podle této stupnice dosahují nejvyšší hodnoty vaječný bílek, sójová a syrovátková bílkovina [15].



## 1.5 Potravinové alergie

Někteří jedinci mohou být vysoce citliví na různé alergeny v potravě. Mezi rizikové potraviny patří především bílkovina kravského mléka a vaječný bílek. V rámci prevence se proto doporučuje kojení rizikových dětí minimálně 6 měsíců. Doporučuje se, aby se těmto bílkovinám vyhýbala již těhotná žena v druhé polovině těhotenství. I v dalším průběhu života mají potravinové alergeny význam. Mezi ostatní potraviny, které působí alergické projevy, patří ryby, vlašské ořechy, celer, ovoce, mouka, maso, kakao a řada dalších potravin nebo koření. Na vzniku potravinové alergie se podílí i konzervační látky (kyselina benzoová, chinin, bifenyly, nitrit sodný).

Prevalence výskytu alergie u kojenců na složky kravského mléka je přibližně 2,5 %. Většina dětí ale svoji přecitlivělost do 2 až 3 roku života ztratí. Pravděpodobnost, že dojde k rozvoji přecitlivělosti na antigen je determinovaná interakcí genetických faktorů a faktorů životního prostředí. Při alergii na kravské mléko je rovněž důležitým parametrem období, kdy se u kojence začne kravské mléko, resp. výrobky z něj používat jako doplněk, nebo náhrada mateřského mléka. Mateřské mléko obsahuje výživné a bioaktivní látky ve vyvážené koncentraci a novorozenci poskytuje komplexní výživu. Náhražky, jako kravské mléko, které je obvykle první volbou, některé složky neobsahují, resp. v nedostačující formě a některé mají v přebytku. V tab. 11. je porovnání složení proteinů mateřského a kravského mléka.

Kravské mléko obsahuje minimálně 20 proteinů, které mohou vyvolat protilátkovou odpověď. Rozdělují se do dvou frakcí, kaseinové a syrovátkové. Procentuální zastoupení jednotlivých proteinů, izoelektrický bod a jejich molekulová hmotnost jsou uvedené v tab. 12.

Každý protein je potenciálním alergenem a obsahuje řadu epitopů, které mohou být rozpoznávané specifickým IgE. Za nejsilnější alergen byl dlouhou dobu považován  $\beta$ -laktoglobulín, který není obsažen v mateřském mléce, ale zato je v poměrně vysokém množství v mléce kravském. V současné době jsou ale za problematické molekuly považovány rovněž kasein a  $\alpha$ -laktoalbumín. Přecitlivělost na více molekul zároveň se vyskytuje u 75 % alergických pacientů a zahrnuje i molekuly, které jsou v mléku obsaženy v stopových množstvích, např. laktoferin.

Tab. 11. Srovnání obsahu proteinů v mateřském a kravském mléce

Protein (g / 100ml)	Mateřské mléko	Kravské mléko
Kasein	0,3	2,5
$\alpha$ -laktoalbumín	0,3	0,1
Laktoferin	0,2	Stopové množství
IgA	0,1	0,003
IgG	0,001	0,06
Lyzozym	0,05	Stopové množství
Sérový albumin	0,05	0,03
$\beta$ -laktoglobulín	-	0,3
Proteiny celkem	1,1	3,3

Většina proteinů mléka částečně ztrácí tepelnou úpravou svůj alergický potenciál (sérový albumín (BSA), imunoglobulíny,  $\beta$ -laktoglobulín). Tato tepelná úprava představuje minimálně 10 minutový var při 100 °C (kratší tepelná denaturace se ukázala být neúčinná). Lineární epitopy se ale i při vysokých teplotách uchovávají. Řešení pak poskytuje chemická úprava proteinů.

Další závažnou potravinovou chorobou je celiakie (celiakální sprue, glutensenzitivní enteropatie, glutenová enteropatie), která je způsobená nesnášenlivostí lepku. Lepek je rostlinná bílkovina, která se nachází v zrnech pšenice, žita, ječmene, ova a výrobci z těchto obilovin, naopak se nenachází v kukuřici, rýži, sóji, prosu a pohance. Podstatou celiakie je abnormální imunitní reakce na lepek. U vnímavého jedince způsobí tato bílkovina chronický zánět sliznice tenkého střeva, které pak nefunguje normálně. Objevují se poruchy trávení složených cukrů, nedostatečné vstřebávání bílkovin, tuků, železa i některých vitamínů. Typickým projevem je změna stolice – objemná, zapáchající, s velkým množstvím nestrávených zbytků, vícekrát denně, bolesti břicha, nadýmání, nechutenství, úbytek tělesné hmotnosti a chudokrevnost. Zvláštním projevem přecitlivělosti na lepek jsou kožní změny. Toto onemocnění se nazývá dermatitis herpetiformis [16].

Tab. 12. Zastoupení jednotlivých proteinů a jejich vlastnosti v kravském mléce

<b>Protein</b>	<b>Zastoupení v mléku [%]</b>	<b>Celková koncentrace v mléku [mg/ml]</b>	<b>Izoelektrický bod</b>	<b>Molekulová hmotnost [kDa]</b>
<i>Kaseinová frakce</i>	~80	30		
$\alpha$ -kasein	45-55	15	4,1	23
$\kappa$ -kasein	8-15	10	4,1	19
$\beta$ -kasein	25-35	3,5	4,5	24
$\gamma$ -kasein	3-7	1,2	5,8-6,0	--
<i>Syrovátková frakce</i>	~20	6-7		
$\alpha$ -laktoalbumín	2-5	1,2	5,1	14
$\beta$ -laktoglobulín	7-12	3,2	5,3	18
Sérový albumín	0,7-1,3	0,4	4,7	68
Laktoferin	0,2-0,8	0,2	7,8	80
<i>Immunoglobulíny</i>				
IgG1	1-2	0,6	--	160
IgG2	0,2-0,5	0,12	--	160
IgM	0,1-0,2	0,04	--	~1 000
IgA	0,05-0,10	0,13	--	~ 400

## 2 METODY STANOVENÍ BÍLKOVIN

Metody stanovení bílkovin lze rozdělit do dvou základních skupin. První skupina je vhodná pro stanovení bílkovin ve směsi s jinými složkami potravin, druhá skupina metod je vhodná pro stanovení bílkovin v čistých bílkovinných preparátech. V analýze potravin jsou častější metody první skupiny, které mají být rychlé, spolehlivé a mají zaručovat dostatečnou reprodukovatelnost výsledků. Druhá skupina metod je ve většině případů časově náročnější a vyžaduje speciální zařízení.

Pro prvou analytickou orientaci o obsahu bílkovin v potravinách je postačující stanovení celkového obsahu dusíku, vyjádřeného tzv. hrubou bílkovinou. Hodnoty hrubé bílkoviny v sobě zahrnují i jiné dusíkaté látky nebílkovinné povahy a neříkají nic o nutriční hodnotě analyzovaného vzorku. Určitým zpřesněním je stanovení tzv. čisté bílkoviny. Tyto metody eliminují přítomnost nízkomolekulárních nebílkovinných dusíkatých látek ve vzorku.

Zjišťování obsahu bílkovin stanovením dusíku je založeno na skutečnosti, že bílkoviny obsahují asi 16% dusíku. Množství nalezeného dusíku násobené přepočítacím faktorem 6,25 ( $100 : 16 = 6,25$ ) udává množství hrubé bílkoviny [17].

### 2.1 Mineralizace

Při stanovení prvků v biologických i jiných materiálech destruktivními technikami je rozklad vzorku významnou součástí bloku analytických operací, kterému souhrnně říkáme příprava vzorku k měření ("sample preparation"). Mnoho dnes používaných analytických měřicích technik vyžaduje vzorek v tekuté formě a pokud možno s dokonale odstraněnou organickou osnovou. Smyslem takové úpravy vzorku je dosažení jeho vhodnější konzistence, snížení viskozity a zvýšení homogenity (fyzikální hlediska). Ještě důležitější jsou hlediska chemická, především uvolnění analytu z různých vazeb a forem a odstranění složek, které mohou při měření interferovat. Požadavky na stupeň odstranění organické osnovy vzorku se přitom u jednotlivých měřicích technik značně liší.

Volba konkrétního postupu při rozkladu biologických vzorků je závislá na řadě významných faktorů. Kromě toho, jakou měřicí techniku máme k dispozici, je třeba vzít v úvahu, jaké konkrétní analyty budeme stanovovat, v jaké matrici a na jaké koncentrační úrovni. Různé metody se liší také velikostí navážky, možností potlačení úrovně a variability slepého pokusu, což ovlivňuje mez detekce celého stanovení. Dále je třeba

uvážit, k jakému účelu bude analytický výsledek sloužit. Není tedy možné jednotlivé dnes používané metody rozkladu biologických materiálů sestavit do jednoduché řady podle jejich kvality. Při uvážení výše uvedených faktorů se totiž umístění jednotlivých metod v této řadě může významně měnit. Konečná strategie analýzy by proto měla být výsledkem společné úvahy analytického chemika a uživatele vyprodukovaných analytických dat tak, aby konkrétní zvolený postup byl optimální a poskytl požadovanou informaci v požadované kvalitě, termínu a ceně [18].

### 2.1.1 Klasifikace metod stanovení vzorků s organickou maticí

K tomu, aby mohl proběhnout rozklad organické hmoty, je nutné překonání vysoké aktivační energie při její destrukci.

Podle použitého postupu se metody rozkladu biologických vzorků dnes dělí na tři základní skupiny: a) Metody rozkladu na suché cestě,

b) Metody rozkladu na mokré cestě,

c) Ostatní metody rozkladu

### 2.1.2 Mokrý rozklad

Klasický mokrý rozklad je prvním krokem stanovení bílkovin v potravinových materiálech. Provádí se ve směsi koncentrovaných minerálních kyselin za zvýšené teploty a při atmosférickém tlaku. Biologická matrice je oxidována příslušnými činidly a probíhající chemické reakce lze popsat dvěma kroky. Nejprve je rozrušena struktura matrice kyselou hydrolyzou a její meziprodukty jsou následně oxidovány. Rychlost reakce je závislá na reakční teplotě a na eventuálně přidaných katalyzátorech. Rozklad probíhá za nižších teplot nežli u suchého rozkladu, neboť maximální teplota je určena bodem varu oxidačních činidel či jejich směsí. Jako oxidační činidla jsou nejčastěji používána především samotná  $\text{HNO}_3$  a reakční směsi:  $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3 / \text{HClO}_4$ ,  $\text{HNO}_3 / \text{HClO}_4 / \text{H}_2\text{SO}_4$ . Zdaleka nejúčinnější jsou směsi obsahující  $\text{HClO}_4$  při vyšších teplotách. Bohužel práce s kyselinou chloristou vyžaduje přísné respektování všech pravidel bezpečné práce s touto kyselinou, což je na většině našich pracovišť jen obtížně splnitelné. Tvrzení, že exploze nehrozí, pokud pracujeme s malým množstvím  $\text{HClO}_4$

(0,2 ml na 100-150 mg vzorku) je diskutabilní, neboť páry se mohou usazovat v odtahu a na stěnách digestoře a k explozi může dojít po čase i při běžné práci v laboratoři.

Mokrý rozklad může probíhat:

- a) v otevřeném systému s konvenčním ohřevem (např. kovový blok, topná deska) nebo s mikrovlnným ohřevem (např. STAR System 2).
- b) v uzavřeném systému s konvenčním ohřevem nebo s mikrovlnným ohřevem.

Mokrý rozklad v otevřeném systému pro mineralizaci biologického materiálu používá klasické nádoby (kádinky, Erlenmeyerovy a Kjeldahlovy baňky s kulatým dnem). Konvenčním ohřevem jsou označovány zdroje tepla s termostatem elektricky vyhřívané, např. písková lázeň, kovový vyhřívaný blok, horkovzdušná sušárna, topná deska, topné hnízdo, IČ lampa, Ohřev reakční směsi je zajištěn konvencí nebo radiací. Tento způsob přímého ohřevu je energeticky i časově náročný, neboť než začne probíhat vlastní rozkladný proces, musí se zahřát rozkladná aparatura. Po ukončení rozkladu je nutno počítat s časovou prodlevou pro chlazení celého rozkladného systému. Mokrý rozklad v otevřeném systému prováděný pod zpětným chladičem podstatně snižuje spotřebu reakčních činidel a snižuje možnost ztrát analytu.

Mokrý rozklad v otevřených nádobkách pod zpětným chladičem využívá moderního způsobu ohřevu a to mikrovlnného zařízení. Předností tohoto automatického rozkladného systému je možnost samostatného programování postupu rozkladu pro každou rozkladnou nádobku zvlášť, nezávisle na ostatních. Nevýhodou, jako ostatně u všech postupů, mokrého rozkladu je velká spotřeba reakčních činidel. Předností je možnost vyšší navážky vzorku a to až několika gramů.

Rozklad v uzavřeném systému je obecně mnohem výhodnější než konvenční mokrý rozklad v otevřeném systému, neboť umožňuje zabránit ztrátám těkavých prvků, téměř zamezit kontaminaci z vnějších zdrojů (dosahuje se nízkých hodnot slepých vzorků) a v neposlední řadě se u těchto postupů snižuje spotřeba reakčních činidel. Důležitým kritériem pro rozklad vzorku v uzavřeném systému s  $\text{HNO}_3$  je úplnost oxidačního procesu.

Nevýhody přímého vyhřívání odstraňuje mikrovlnný způsob ohřevu reakční směsi v otevřeném i v uzavřeném systému. Mikrovlnné elektromagnetické záření (v oblasti frekvence 300MHz až 300 GHz vyvolává vibraci molekul díky pohybu iontů a rotaci dipólů , ale beze změn struktury molekul. Mikrovlnné záření se generuje magnetronem a v analytické chemii se používá povolená frekvence 2450 MHz, což odpovídá délce vlny okolo 12 cm a výstupnímu výkonu rezonátoru mezi 600 až 700 W. Tento výběr pracovní frekvence se ukázal jako optimální z hlediska absorpce energie v materiálech o různém chemickém složení. Efektem absorpce mikrovlnné energie v objemu látky je především vzrůst teploty vzorku. Díky specifickým vlastnostem mikrovlnného záření dochází k ohřevu rozkladné směsi kyselin a vzorku mnohem rychleji a účinněji. Stěny nádobek se primárně nezahřívají, ale ohřev nastává přímo ve směsi rozkládaného materiálu interakcí mikrovlnného záření a absorbujícího prostředí (molekulami vzorku).

Výhody mikrovlnného rozkladu lze shrnout do těchto bodů:

- zvýšení ekonomické efektivity díky výraznému zkrácení doby rozkladu vzorků, úspoře kyselin a energie potřebné na rozklad, v důsledku toho je dosaženo i vyšší denní kapacity laboratoře,
- snížení kontaminace slepého vzorku v důsledku nižší spotřeby činidel a zkrácení doby působení okolního prostředí na vzorek [18].

## 2.2 Metody stanovení hrubé bílkoviny

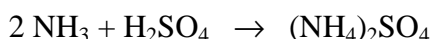
Metody stanovení hrubé bílkoviny lze zjednodušeně rozdělit na dvě skupiny a to na metody odměrné analýzy a metody spektrofotometrické.

### 2.2.1 Metody odměrné analýzy

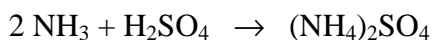
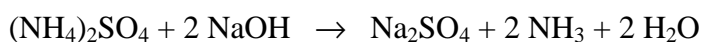
#### *a) Metoda podle Kjeldahla*

Ke stanovení bílkovin v potravinách a potravinářských surovinách se nejčastěji používá metody založené na stanovení množství přítomného dusíku podle Kjeldahla. Organická látka se mineralizuje koncentrovanou kyselinou sírovou při teplotě varu kyseliny. Rozklad

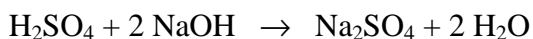
se urychluje zvýšením teploty varu (např. síranem draselným) a vhodným katalyzátorem, např. oxidem mědnatým, síranem mědnatým, rtutí, peroxidem vodíku, selenem. Dusík, který byl v bílkovinách nebo aminokyselinách ve formě aminoskupiny i iminoskupiny, se mineralizací převede na síran amonný.



Ze síranu amonného se potom uvolní amoniak 30% roztokem NaOH a přehání se vodní párou v Parnas-Wagnerově destilačním přístroji do předlohy se známým nadbytečným množstvím odměrného roztoku kyseliny sírové.



Přebytek této kyseliny se pak titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného na indikátor methylčerveň nebo Tashiro.

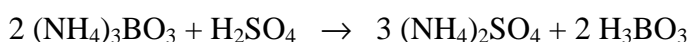
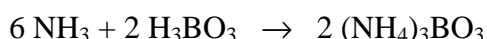


Z množství spotřebované kyseliny sírové se vypočte obsah dusíku (1ml 0,05 mol.l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> odpovídá 1,4 mg dusíku) a výsledek se vyjádří na 100g vzorku. Obsah dusíku se přepočte na obsah tzv. hrubé bílkoviny vynásobením faktorem 6,25. Jelikož je obsah dusíku v bílkovinách podle původu různý, byly vedle uvedeného univerzálního faktoru navrženy pro některé další potraviny odlišné faktory (obiloviny, mouka, chléb a těstoviny 5,70; sušené mléko 6,38; ořechy 5,30). Pokud není obsah dusíku příliš nízký, má metoda univerzální použití pro běžné potraviny a potravinářské suroviny.



*b) Metoda podle Winklera*

Z mineralizátu bílkovinného materiálu, připraveného podle Kjeldahla, se amoniak, uvolněný se síranu amonného koncentrovaným roztokem NaOH, predestiluje s vodní parou v destilačním přístroji do roztoku kyseliny trihydrogenborité. Vzniklý boritan amonný se stanoví titračně odměrným roztokem kyseliny sírové nebo chlorovodíkové na indikátor methylčerveň.



Z množství spotřebované kyseliny se vypočítá obsah dusíku (např. 1ml 0,01 mol.l<sup>-1</sup> HCl odpovídá 0,14mg dusíku). Výsledek se přepočítá na navážku a vynásobením faktorem 6,25 se určí % hrubé bílkoviny v analyzovaném materiálu. Metoda se využívá při stanovení bílkovin v mase a masných výrobcích.

*c) Metoda podle Conwaye*

Vzorek se zmineralizuje podle Kjeldahla. Roztok amonné soli ve vnějším prostoru Conwayovy nádoby se zalkalizuje nasyceným roztokem K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nebo 50% KOH. Uvolněný amoniak se absorbuje v roztoku kyseliny borité umístěné ve vnitřním prostoru nádoby. Obsah dusíku se vypočítá podle spotřeby 0,01 mol.l<sup>-1</sup> HCl při titraci do červeného zbarvení (1ml 0,01 mol.l<sup>-1</sup> roztoku HCl odpovídá 0,14mg dusíku). Metoda je vhodná pro stanovení malých množství bílkovin v potravinářském materiálu.

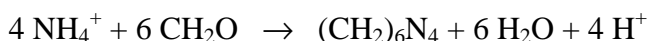
*d) Steineggerova metoda*

Po neutralizaci vzorku odměrným roztokem NaOH na fenolftalein se přidávkem formaldehydu blokuje působnost volných skupin -NH<sub>2</sub>. Po promíchání se provede opakovaná titrace odměrným roztokem 0,25 mol.l<sup>-1</sup> NaOH. Druhá spotřeba je tzv. aldehydové číslo (1ml roztoku NaOH = 1 aldehydové číslo = 0,0758g bílkovinného dusíku). Metoda se například používá pro stanovení bílkovin v mléce. Pro přepočet

na obsah bílkovin se použije korekční součinitel 6,38. Výsledek dělený hustotou mléka udává obsah bílkovin v %.

*e) Hanušova metoda*

Metoda je založena na reakci amonných iontů, vzniklých po mineralizaci podle Kjeldahla, s přebytkem formaldehydu za vzniku vodíkových iontů.

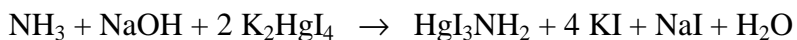


Uvolněné vodíkové ionty se titrují odměrným roztokem NaOH na indikátor fenolftalein. Hexamethylentetramin, který při reakci vzniká, je velmi slabou zásadou a nemá vliv na barevnou změnu indikátoru.

### 2.2.2 Spektrofotometrické metody

*a) Stanovení Nesslerovým činidlem*

Dusík vázaný v bílkovinách se mineralizací s kyselinou sírovou (katalyzátor  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) převede na amonnou sůl, která se stanoví spektrofotometricky po reakce s Nesslerovým činidlem v alkalickém prostředí.



Intenzita zbarvení se měří na spektrofotometru při vlnové délce 450nm proti vodě. Obsah dusíku se odečte z kalibrační křivky a přepočte na navážku. Vynásobením faktorem 6,25 se získá obsah hrubé bílkoviny. Metoda je použitelná pro stanovení bílkovin v potravinářských materiálech s menším obsahem dusíku.

*b) Stanovení biuretovou reakcí*

Po odstranění nízkomolekulárních sloučenin odstředěním s kyselinou trichloroctovou se k sedimentu přidá biuretovo činidlo. V alkalickém prostředí vznikají modré komplexní sloučeniny mědi, jejichž barevná intenzita je úměrná koncentraci bílkovin (absorbance vynásobená faktorem 17 udává miligramy bílkoviny ve vzorku). Zbarvení se proměňuje při 546nm proti slepému vzorku. Metoda je méně citlivá. Je však rychlá (není nutná mineralizace), proto se jí používá k orientačnímu stanovení bílkovin.

*c) Stanovení oranží G*

Bílkoviny vážou z purpurového roztoku barvivo oranž G, z jehož úbytku zjištěného spektrofotometricky proměřením intenzity zbarvení roztoku při 480nm se na základě empiricky zjištěného vztahu určí jejich množství ve vzorku. Metoda je vhodná pro rychlé stanovení bílkovin v některých rostlinných materiálech (obiloviny, luštěniny, olejniny, mouka), z živočišných materiálů nalezla uplatnění pro stanovení bílkovin v mléce.

*d) Stanovení v UV oblasti*

Ke stanovení bílkovin se využívá absorbance některých aminokyselin (tryptofan, tyrosin, fenylalanin) v ultrafialovém světle. Roztok bílkovin se zředí fyziologickým roztokem a peptidové vazby se proměří při 180-220nm; aromatické a heterocyklické aminokyseliny při 280nm. Metoda je rychlá, snadno proveditelná a vhodná pro sledování průběhu separace bílkovin technikou sloupcové chromatografie. Není však univerzální a pro některé bílkoviny je nelze použít [19].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 METODIKA PRÁCE

Obsah celkového dusíku byl analyzován u šesti vzorků potravin. Stanovení bylo provedeno Kjeldahlovou metodou s úpravou podle Winklera a spektrofotometrickou metodou firmy HACH založené na reakci s Nesslerovým činidlem. Získané výsledky byly vzájemně porovnány a zhodnoceny s literárními údaji.

#### 3.1 Použité chemikálie a přístroje

Pro mineralizaci mokrou cestou se používaly:

96 hmot.%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  p.a

30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$

Při destilaci v Parnas-Wagnerově aparatuře bylo zapotřebí:

NaOH p.a

$\text{H}_3\text{BO}_3$

Tashiro indikátor (0,2 g methylčerveně ve 100ml ethanolu, 0,1 g methylenové modře rozpuštěné ve 100 ml vody)

Použití spektrofotometrického přístroje firmy HACH vyžadovalo:

KOH p.a

Sadu chemikálií dodávanou firmou HACH pro jejich metodu obsahující:

TKN indikátor skládající se z - kyseliny propionové, demineralizované  $\text{H}_2\text{O}$ ;

Mineralní stabilizátor;

Polyvinyl alkohol;

Nesslerovo činidlo;

standardní roztok  $1,00 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$

Dále byly použity přístroje:

Mineralizátor Digesdahl model 23130-20, HACH (U.S.A.)

Analytické váhy Explorer Pro model EP 214CM, OHAUS

Laboratorní spektrofotometr model DR/2500, HACH (U.S.A.)

Topné hnízdo LTHS 2000

Sušárna Venticell, BMT Brněnská medicínská technika a.s.

### 3.2 Mineralizace vzorků mokrou cestou

Mineralizace vzorku byla první část stanovení u každého druhu potravin, neboť obě metody si vyžadovaly převést organický dusík na formu anorganickou včetně kapalné podoby. Pro obě metody pak byl použit stejný zmineralizovaný vzorek ve dvou řadách.

Do mineralizační baňky bylo na analytických vahách naváženo 0,5g vzorku potravin s přesností na čtyři desetinná místa. Ke vzorku bylo v digestoři přidáno 5 ml koncentrované  $H_2SO_4$  a baňka vložena na topnou desku mineralizátoru. Teplota ohřevu byla nastavena na 430°C. Po vyhřátí topné desky na nastavenou teplotu bylo na mineralizační baňku nasazeno ocelové závaží a chladič, jehož zábrus byl předem namazán. Obsah mineralizační baňky se nechal vřít (cca 20 – 30 minut podle typu vzorku). Po této době bylo přes chladič pomocí nálevky s úzkou kapilárou přilito 5 ml  $H_2O_2$ . Obsah mineralizační baňky se nechal opět vřít tak dlouho, dokud neskončila bouřlivá reakce a mineralizát nebyl čirý. Poté byl opatrně odstraněn chladič a mineralizační baňka byla položena na termoizolační podložku aby zchladla. Mineralizát musel zůstat po zchladnutí čirý. V případě zakalení bylo nutno přidat dalších 5 ml  $H_2O_2$  a opakovat výše uvedený postup.

Čirý a zchladlý mineralizát byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a postupně za stálého chlazení doplněn po rysku destilovanou vodou a důkladně promíchán.

### 3.3 Stanovení metodou podle Kjeldahla s úpravou podle Winklera

Pro stanovení byla použita Parnas-Wagnerova aparatura. Do destilační baňky přístroje bylo pipetováno 10 ml mineralizátu. Přídavkem 20 ml 30 hmot.% roztoku hydroxidu

sodného uvolněný amoniak byl predestilován destilací s vodní parou a jímán do titrační baňky s 50 ml 2 hmot.% roztoku kyseliny borité. Ústí chladiče muselo být ponořeno pod hladinou kyseliny. Destilace trvala 20 minut od počátku varu v destilační baňce. Po skončení destilace se konec chladiče opláchnul destilovanou vodou do předlohy, titrační baňka se odstranila a přidaly se do ní 3-4 kapky Tashiro indikátoru. Destilát se titroval roztokem  $0,025 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  do stálého červenofialového zbarvení. Z množství spotřebované kyseliny sírové se vypočetl obsah dusíku a ten se přepočítal na obsah „hrubé bílkoviny“ vynásobením přepočítacím faktorem.

Výpočet obsahu hrubé bílkoviny byl proveden podle následujícího vzorce:

$$\% \text{ hrubé bílkoviny} = \frac{a \cdot 10^{-3} \cdot c \cdot M_N \cdot f_t \cdot f_z \cdot f_{př} \cdot 100}{n}$$

a ..... spotřeba odměrného roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$  při titraci [ ml ]

c ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ..... koncentrace odměrného roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (  $0,025 \text{ mol.l}^{-1}$  )

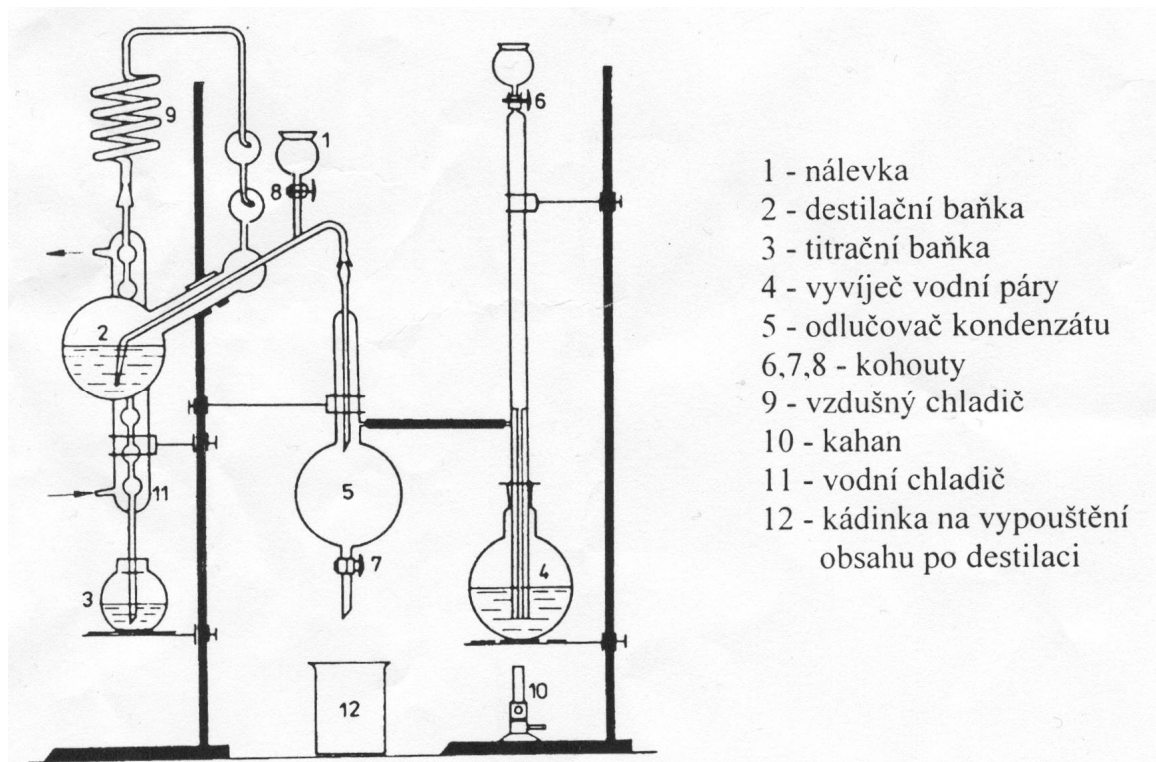
$M_N$  ..... molární hmotnost dusíku ( $M_N = 14,01 \text{ g.mol}^{-1}$ )

$f_t$  ..... titrační faktor ( $f_t = 2$ )

$f_z$  ..... zřed'ovací faktor ( $f_z = 5$ )

$f_{př}$  ..... přepočítací faktor podle druhu potraviny (univerzální 6,25)

n ..... navážka vzorku, která byla zmineralizována [ g ]



Obr. 1. Parnas-Wagnerova aparatura

### 3.4 Stanovení spektrofotometrickou metodou s použitím Nesslerova činidla

Spektrofotometrická metoda firmy HACH založená na reakci vzorku s Nesslerovým činidlem využívá spektrofotometr model DR/2500, který pracuje s již vloženou kalibrační křivkou o rozsahu 1 až 150  $\text{mg.l}^{-1}$ , platící pro stanovený pracovní postup a využívá chemikálie patřící do dodávané sady. Nastavení nulové hodnoty bylo provedeno na destilovanou vodu podle stejné metodiky jako u vlastního vzorku.

Do 25 ml odměrného válce se zábrusem a skleněnou zátkou bylo napipetováno 0,5 ml mineralizátu analyzovaného vzorku, přidána kapka TKN indikátoru a upraveno pH přikapáváním roztoku  $1\text{mol.l}^{-1}$  KOH do prvního modrého zbarvení. Destilovanou vodou byl objem reakční směsi v odměrném válci doplněn na 20 ml a bylo provedeno důkladné promíchání. Poté byly přidány 3 kapky minerálního stabilizátoru, objem byl znovu promíchán a přidány 3 kapky polyvinylalkoholu. Reakční směs byla opatrně zhomogenizována tak, aby nedošlo k zpěnění na hladině, což by vedlo k nepřesnému



doplnění destilovanou vodou na 25ml. Po doplnění destilovanou vodou na 25 ml byl přidán 1 ml Nesslerova činidla a celý objem byl opět opatrně důkladně promíchán. Na dotekové obrazovce přístroje byla zapnuta časomíra, která odpočítala reakční dobu 2 minut. Po uplynulé době byla část objemu nalita do 10 ml kyvety, která byla předem vyčištěna od všech nečistot. Kyveta byla vložena do přístroje a odečtena naměřená hodnota v mg/l TKN. Z odečtené hodnoty na displeji byl vypočten obsah dusíku ve vzorku a ten byl převeden přepočítacím faktorem na obsah „hrubé bílkoviny“.

Obsah hrubé bílkoviny byl vypočítán podle vzorce uvedeného v metodice firmy HACH:

$$\% \text{ hrubé bílkoviny} = \frac{75 \cdot A \cdot f_{\text{př}}}{B \cdot C \cdot 2 \cdot 10^4}$$

A ..... hodnota zobrazená na displeji v mg/l

B ..... hmotnost vzorku, která byla zmineralizována v g

C ..... objem mineralizátu, který byl pipetován do válce v ml

$f_{\text{př}}$  ..... přepočítací faktor podle druhu potraviny (univerzální 6,25)

Pro ověření přesnosti měření pomocí spektrofotometru firmy HACH byl použit dodaný standard. Do 25 ml odměrného válce byla kápnuta 1 kapka TKN indikátoru a válec byl doplněn na objem 20ml roztokem standardu 1,0 mg/l roztoku  $\text{NH}_3\text{-N}$ . Poté byly přidány 3 kapky minerálního stabilizátoru a objem byl důkladně promíchán. Byly přidány 3 kapky polyvinylalkoholu a opět provedeno opatrné zamíchání tak, aby nevznikla pěna. Dále byl použit výše popsany postup měření. Požadovaná přesnost byla potvrzena hodnotou v rozmezí 26-27 mg/l TKN.

### 3.5 Metoda statistického vyhodnocení dle Wilcoxe

Dvouvýběrový Wilcoxonův test patří k nejsilnějším parametrickým testům.

Dvouvýběrovým testem založeným na Wilcoxonově testové statistice obecně testuje hypotézu  $H_0: F(x) = G(y)$ , tedy předpoklad, že oba výběry pocházejí z téhož základního souboru nebo ze souboru s tímž rozdělením.

Ačkoliv je dvouvýběrový test formulován jako test proti obecné alternativě, je citlivý zejména na tzv. alternativní posunutí  $H: F(x) = G(y - \delta)$ ,  $\delta$  různé od nuly, proto se sním v praxi nejčastěji setkáváme jako s testem ověřujícím, zda dvě závislé náhodné výběry pocházejí z téhož základního souboru se spojitou distribuční funkcí, tedy mají i stejnou střední hodnotu. Proto je test často formulován jako ověření shody úrovně zkoumaného znaku ve dvou souborech, z nichž byly tyto nezávislé výběry pořizeny. Výběry obvykle volíme tak, aby rozsah I. výběru  $m$  byl menší nebo roven než je rozsah II. výběru  $(n-m)$ .

Postup testu spočívá v tomto: ze všech jednotek  $X_1, \dots, X_m, X_{m+1}, \dots, X_n$  vytvoříme sdružený výběr s rozsahem  $n$  uspořádaný vzestupně podle velikosti. Jednotlivým hodnotám se přiřadí pořadová čísla  $R_i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ). Součet pořadí hodnot prvního výběru, tj. hodnot  $X_1, \dots, X_m$  označíme  $T_1$  a analogicky součet pořadí hodnot druhého výběru  $X_{m+1}, \dots, X_n$  označíme  $T_2$ . Je zřejmé že

$$T_1 + T_2 = \frac{n(n+1)}{2}$$

Testovým kritériem dvouvýběrového Wilcoxonova testu je Wilcoxonova statistika

$$S_W = T_1,$$

tj. součet všech pořadových čísel odpovídajících I. výběru, což je ovšem testovací statistice  $S_W$  získané z obecné testovací statistiky  $S'$ , položíme-li skóry  $a(i) = i$ :

$$S_W = \sum_{i=1}^n R_i$$

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro ověření vhodnosti spektrofotometrické metody firmy HACH ke stanovení celkového dusíku pomocí Nesslerova činidla bylo vybráno šest vzorků potravin převážně živočišného původu.

Všechny vzorky byly stanoveny klasickou referenční metodou dle Kjeldahla s úpravou podle Winklera a paralelně proběhlo také stanovení na spektrofotometru firmy HACH. Výsledky shrnuje následující tabulka č. 13.

Tab. 13. Srovnání obsahu celkového dusíku v % u vybraných vzorků potravin

Druh potravin	Obsah celkového dusíku [%]	
	Metoda dle Kjeldahla s úpravou podle Winklera	Metoda s použitím Nesslerova činidla podle firmy HACH
Mléko polotučné	<b>3,58</b> ± 0,14	<b>3,43</b> ± 0,16
Tavený sýr	<b>10,32</b> ± 0,36	<b>9,56</b> ± 0,21
Tvrdý sýr	<b>27,14</b> ± 0,35	<b>24,33</b> ± 0,27
Hovězí maso	<b>22,21</b> ± 0,40	<b>18,20</b> ± 0,43
Vepřové maso	<b>19,28</b> ± 0,51	<b>15,37</b> ± 0,63
Cereální pečivo	<b>12,8</b> ± 0,22	<b>10,99</b> ± 0,25

### 4.1 Srovnání rozdílů mezi metodami

Rozdíly hodnot mezi jednotlivými metodami jsou podle výsledků Wilcoxonova testu neporovnatelné. Celá analýza byla provedena z 95% spolehlivostí, tzn. na hladině významnosti 5%. Maximální pravděpodobnost zamítnutí správné hypotézy je proto 5%.

Z předešlé tabulky je tedy zřejmé, že vyšší hodnoty výsledků jsou získány klasickou metodou dle Kjeldahla s úpravou podle Winklera. Metoda je sice referenční, ale také je

zatížena subjektivní chybou, která spočívá ve vizuálním stanovení konce titrace. Tím lze odůvodnit rozdíly získaných hodnot jednotlivých metod. Tento aspekt lze vyloučit jiným typem indikace, který následuje po destilaci.

Nižší hodnoty obsahu bílkovin spektrofotometrickou metodou podle firmy HACH s použitím Nesslerova činidla lze též vysvětlit subjektivní chybou, i když riziko vzniku této chyby bylo minimalizováno používáním automatických dávkovacích zařízení. Přesto za zdroj možné odchylky lze považovat doplňování destilované vody do používaného odměrného válce, který se využívá jako reakční nádoba při této metodě. Tímto krokem může dojít k subjektivní chybě. Jiné vlivy nebyly prokázány, což potvrdilo i ověření získaných výsledků metodou standardního přídatku. Měření bylo provedeno šestkrát a v níže uvedené tabulce jsou vyjádřeny získané hodnoty v mg/l.

Tab. 14. Metoda standardního přídatku

	<b>čistý vzorek</b> ( A )	<b>vzorek s přídatkem</b> <b>standardu</b> ( B )	<b>rozdíl</b> ( A-B )	<b>standard</b>
<b>Obsah celkového dusíku [mg/l]</b>	<b>127,67 ± 2,05</b>	<b>137,86 ± 1,2</b>	<b>10,19</b>	<b>8,25 ± 1,09</b>

Z tabulky je zřejmé, že rozdíl hodnot mezi vzorkem s přídatkem standardu a čistým vzorkem je vyšší než je naměřená hodnota samostatného standardu, ale v toleranci chyby. Doporučení tedy zní, vyměnit reakční nádobu (tedy 25ml válec) za kalibrovanou odměrnou baňku požadovaného objemu, u které je doplňování destilovanou vodou daleko přesnější díky zúženému hrdlu a přesně stanovené rysce.

#### 4.1.1 Časová a ekonomická náročnost jednotlivých metod

Časově náročnější je nepochybně metoda dle Kjeldahla s úpravou podle Winklera, neboť stanovení jednoho vzorku potravin trvá přibližně dvě hodiny a 40 minut. V tomto čase je

zahrnut ohřev vody pro vyvíjení vodní páry, čtyři destilace jednotlivých mineralizátů (dvě destilace pro jeden mineralizát), vymývání Parnas-Wagnerovy aparatury a titrace destilátů.

Spektrofotometrická metoda firmy HACH s použitím Nesslerova činidla je naopak velmi rychlá. Pro stanovení jednoho vzorku potravin je třeba přibližně 30 minut, počítáme-li do této doby šest měření (na jeden mineralizát spadají tři měření). Rychlost metody spočívá v tom, že se paralelně vedle sebe provádí dvě měření, čímž se čas stanovení zkrátí na polovinu.

Vyjádříme-li průměrnou časovou náročnost jednotlivých metod, tak na jedno měření metodou dle Kjeldahla s úpravou podle Winklera je potřeba cca 40 minut. Zatímco jedno měření spektrofotometrickou metodou podle firmy HACH trvá přibližně 5 minut.

Ekonomická náročnost je větší u spektrofotometrické metody firmy HACH, protože pořizovací cena setu činidel je 5000,- Kč a tedy 20,- Kč spadá na jedno měření. Při předpokládaných šesti měření vzorku činí cena jednoho stanovení 120,- Kč.

Celková cena stanovení vzorku potravin metodou dle Kjeldahla s úpravou podle Winklera je cca 10,- Kč. V ceně je zahrnuta spotřeba elektrického proudu topným hnízdem, vody pro chlazení a chemikálií na přípravu odměrného roztoku kyseliny sírové, roztoku kyseliny borité a roztoku hydroxidu sodného, který byl použit jako reakční prostředí.

Mineralizace vzorku potravin nebyla zahrnuta ani do časové ani do ekonomické náročnosti, protože obě metody vyžadují zmineralizovaný vzorek a tudíž jsou tyto náklady stejné.

## ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověření metodiky spektrofotometrické metody firmy HACH s použitím Nesslerova činidla pro stanovení obsahu celkového dusíku a porovnání výsledků s klasickou referenční metodou dle Kjeldahla s úpravou podle Winklera, která využívá Parnas-Wagnerovu aparaturu.

Zjištěné výsledky lze shrnout do několika bodů:

1. spektrofotometrická metoda je velmi citlivá, což vede k maximální přesnosti při práci. Subjektivní chyby byly minimalizovány použitím automatických dávkovacích zařízení, ale přesto získané hodnoty měly poměrně velký rozptyl. Tuto příčinu lze eliminovat použitím přesnějšího laboratorního vybavení při doplňování na požadovaný objem.
2. rozdíl v časové náročnosti jednotlivých metod je evidentní, proto spektrofotometrické stanovení může sloužit jako rychlá analýza pro zjištění celkového obsahu dusíku s podloženými výsledky u vzorků, které obsahují nižší procento bílkovin.
3. ekonomická náročnost spektrofotometrické metody je sice mnohonásobně vyšší, než je tomu u klasického stanovení s použitím Parnas-Wagnerovy aparatury, ale tento aspekt lze snížit vlastní přípravou některých činidel. Poté by se cena stanovení výrazně snížila.
4. srovnáním výsledků pomocí statistického Wilcoxonova testu bylo zjištěno, že subjektivní chyby, jenž se vyskytují u obou metod, jsou dosti velké, a proto zapříčiňují neporovnatelné výsledky. Z tohoto důvodu jsou navržena zlepšení, která umožňují minimalizovat zjištěné subjektivní chyby.

Vzhledem k výhodám i nevýhodám testované spektrofotometrické metody firmy HACH lze konstatovat, že je použitelná pro stanovení celkového dusíku ve vzorcích potravin. Bylo sice dosaženo nižších výsledků než u klasické metody dle Kjeldahla s úpravou podle Winklera, ale časová náročnost je výrazně nižší. Po eliminaci subjektivních chyb a snížení pořizovacích nákladů na chemikálie bude možno tuto metodu využívat pro rychlou a přesnou analýzu vzorků s nižším obsahem bílkovin.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] ŠIMONČIČ, R., KRUŽLIAK, P. *Výživa odborná učebnice pro kuchaře a číšníky*. 5. vydání. Praha: Merkur, 1995. 132s. ISBN 80-7032-710-3
- [2] HRABĚ, J., BUŇKA, F., ROP, O. *Legislativa a řízení jakosti v potravinářství*. 1. vydání. Zlín: UTB ve Zlíně, 2005. 173s. ISBN 80-7318-314-5
- [3] Vyhláška č. 450/2004 Sb., o označování výživové hodnoty potravin [online]. [cit. 2006-2-21]. Dostupný z WWW:  
<[http://www.jidelny.cz/zakony\\_show.asp?id=89](http://www.jidelny.cz/zakony_show.asp?id=89)>
- [4] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin I*. 1. vydání. Tábor: OSSIS, 1999. 328s. ISBN 80-902391-3-7
- [5] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*. 2. vydání. Praha: SNTL/ALFA, 1981. 360s.
- [6] Zdraví bloguje [online]. [cit. 2006-4-5]. Dostupný z WWW:  
<<http://bytzdravý.blog.cz/rubriky/fakta-o-potravinovych-doplncich>>
- [7] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. 1. vydání. Praha: SNTL/ALFA, 1983. 632s.
- [8] STRAKA, I., MALOTA, L. *Chemické vyšetření masa*. 1. vydání. Tábor: OSSIS, 2006. 104s. ISBN 80-86659-09-7
- [9] ŽÁČEK, Z., ŽÁČEK, A. *Potravinářské tabulky*. 1. vydání. Praha: SPN, 1994. 484s. ISBN 80-04-24474-2
- [10] PAVELKA, A. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. 1. vydání. Brno: Littera, 1996. 105s. ISBN 80-85763-09-5
- [11] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I*. 1. vydání. Zlín: UTB ve Zlíně, 2005. 168s. ISBN 80-7318-295-5
- [12] BŘEZINA, P., KOMÁR, A., HRABĚ, J. *Technologie, zbožížnalství a hygiena potravin 2. část*. 1. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 2001. 177s. ISBN 80-7231-079-8
- [13] HRABĚ, J., KOMÁR, A. *Technologie, zbožížnalství a hygiena potravin 3. část*. 1. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 2003. 168s.

- [14] MAROUNEK, M., BŘEZINA, P., ŠIMŮNEK, J. *Fyziologie a hygiena výživy*. 2. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 2003. 148s. ISBN 80-7231-106-9
- [15] Význam bílkovin [online]. [cit. 2006-4-2]. Dostupný z WWW:  
<<http://www.muscle-fitness.cz/index.phtml?go=clanek&tb=vyziva&id=21>>
- [16] Potravinové alergie [online]. [cit. 2006-4-5]. Dostupný z WWW:  
<<http://www.pyly.cz/pyly/pages/lekari/potravinove/>>
- [17] DAVÍDEK, J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 1. vydání. Praha: SNTL/ALFA, 1981. 718s.
- [18] Metody rozkladu biologických materiálů pro stanovení stopových prvků [online]. [cit. 2004-9-8]. Dostupný z WWW:  
<[http://mujweb.cz/www/polavolt/anorg/priprava\\_vzorku/mader\\_curdova.htm](http://mujweb.cz/www/polavolt/anorg/priprava_vzorku/mader_curdova.htm)>
- [19] HÁLKOVÁ, J., RUMÍŠKOVÁ, M., RIEGLOVÁ, J. *Analýzy potravin*. 1. vydání. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 2000. 102s.
- [20] BLATNÁ, D. *Neparametrické metody, testy založené na pořádkových a pořadových statistikách*. 1. vydání. Praha: Vysoká škola ekonomická v Praze, 1996. 217s. ISBN 80-7079-607-3.



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Parnas-Wagnerova aparatura .....	41
--	----

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1. Průměrné hodnoty obsahu bílkovin dle druhu masa [g/100g] .....	14
Tab. 2. Obsah proteinů v masných produktech .....	15
Tab. 3. Obsah bílkovin v krvi hospodářských zvířat .....	15
Tab. 4. Proteiny mléka .....	17
Tab. 5. Obsah proteinů v mléčných produktech .....	18
Tab. 6. Obsah proteinů ve vejcích .....	19
Tab. 7. Obsah proteinů v cereálních produktech .....	20
Tab. 8. Průměrné hodnoty obsahu bílkovin podle druhu luštěnin [v %] .....	21
Tab. 9. Obsah bílkovin v luskovinách .....	21
Tab. 10. Obsah proteinů v dalších potravinách .....	22
Tab. 11. Srovnání obsahu proteinů v mateřském a kravském mléce .....	27
Tab. 12. Zastoupení jednotlivých proteinů a jejich vlastnosti v kravském mléce .....	28
Tab. 13. Srovnání obsahu celkového dusíku v % u vybraných vzorků potravin .....	44
Tab. 14. Metoda standardního přídatku .....	45