### Vème REUNION DES INSTITUTS DE RECHERCHES SUR LES VIANDES Paris, 7 - 12 Septembre 1959

Nº 11

### SUR L'APPLICATION AUX MUSCLES DU VEAU DE BOUCHERIE DES METHODES DE DOSAGE DES DIFFERENTES FORMES DE FER MUSCULAIRE

J. CHARPENTIER Station de Recherches sur l'Elevage C.N.R.Z. Jouy-en-Josas - France (1)

#### INTRODUCTION -

Dosage du fer total :

- Principe

- Technique

Dosage du fer héminique :

- Principe

- Technique

Dosage du fer non héminique extrait par le pyrophosphate de sodium :

- Principe - Technique

Dosage de la myoglobine :

- Principe - Technique =

10) Extraction - Etude critique

20 Précipitation des protéines 30) Précipitation de l'hémoglobine

4°) Détermination de la quantité de myoglobine en mg./g. de tissu frais.

#### BIBLIOGRAPHIE -

<sup>(1)</sup> Ce travail a été réalisé avec l'assistance de Melle HUDZIK et M. B.L.DUMONT. et la collaboration technique de Melle HUDZIK.

Le Fer musculaire peut, comme celui des autres tissus, être divisé en deux catégories principales :

- Fer héminique
- Fer non héminique.

Le fer héminique, lié au noyau tétrapyrolique de l'hème, se trouve dans les différents composés chromoprotidiques, à savoir l'hémoglobine et les cytochromes communs à tous les tissus, et la myoglobine, composé spécifique du tissu musculaire. Cette forme de fer est responsable de la pigmentation musculaire.

Le fer non héminique musculaire, de nature encore mal précisée, n'a fait l'objet d'études systématiques que récemment (SHAPIRA & DREYFUS (12-13-14). Ces auteurs ont mis en évidence l'existence de deux fractions de fer non héminique :

- l'une extractible par les agents d'extraction habituels du fer,
- l'autre non extractible, qui apparaît être spéciale au muscle et probablement liée à la myosine.

Pour chacune de ses formes de fer musculaire, diverses méthodes de dosage ont été proposées. Elles ont été établies essentiellement pour des déterminations dans des muscles relativement riches en ces différents types de fer, et notamment en fer héminique.

Leur application dans le cas de muscles pauvres en fer, soulève de nombreuses difficultés, voire d'impossibilités, que nous avons nous-mêmes rencontrées au cours d'une étude systématique de la pigmentation du veau de boucherie. Au cours de cette étude, nous avons été amenés à passer en revue les différentes méthodes utilisables pour déterminer les diverses formes de fer musculaire, et nous avons été conduits à apporter à certaines d'entre elles, des modifications ou des compléments destinés à les rendre applicables dans le cas des muscles pauvres en fer, et spécialement dans le cas du veau de boucherie. Il nous paraît utile de présenter ici ces méthodes, qui prennent, avec le développement des recherches sur la production du veau auquel on assiste actuellement dans de nombreux pays, un intérêt tout particulier.

Nous envisagerons successivement les méthodes de dosage:

- du fer total
- du fer héminique
- du fer non héminique
- de la myoglobine.

Les difficultés auxquelles nous nous sommes heurtés, en particulier pour le dosage de la myoglobine et du fer héminique, proviennent de la faible teneur en pigment de la viande de veau.

Afin d'obtenir des résultats plus comparables, nous opérons les différents dosages sur un échantillon préparé de la façon suivante : Le tissu musculaire, coupé en petits morceaux à l'aide de ciseaux, est broyé dans un mixer type "ATOMIX" en présence de glace carbonique pilée, jusqu'à l'obtention d'une poudre rose homogène. Après sublimation du gaz carbonique, on obtient un échantillon sur lequel sont effectués les dosages.

### - FER TOTAL

Nous avons obtenu des résultats constants avec la méthode de HENRY (7) : méthode par voie sèche, dosage par le sulfocyanate d'ammonium.

- Principe :

Après dessication, minéralisation à 600°, on transforme tous les sels de fer en sels ferriques par oxydation nitrique et on apprécie la coloration du sulfocyanate ferrique en milieu nitrique et acétonique.

#### - Technique:

- 1) Dessication -La capsule est tarée. On pèse 3 à 3,5 grammes de tissu. On dessèche 24 heures à l'étuve à 100°.
- 2) Minéralisation Effectuée au four à moufle qu'on porte progressivement à 600°, elle demande 24 heures.
- 3) Dissolution Verser 3 cc de HCl 6N. Couvrir la capsule avec un verre de montre. Porter au bain-marie pendant une demi-heure. Retirer le verre de montre. Laisser évaporer et fefroidir.
- 4) Dosage au sulfocyanate Verser 3 cc de NO3H. Couvrir 10 minutes au bain-marie. Fransvaser quantitativement
  dans un ballon de 20-25 cc. Faire 3 rinçages à l'eau distillée. Refroidir. Ajouter
  10 cc. d'acétone. Compléter à 20 avec de l'eau distillée. Refroidir. Puis ajouter
  5 cc. de solution de sulfucyanate d'ammonium à 50 %. Lire au spectrophotomètre à
  476 m/A entre la 3ème et 5ème minute.
  On fait simultanément un témoin sur une capsule vide.
- 5) Remarque Les capsules en porcelaine sont à proscrire. Leur utilisation accidentelle nous a
  fourni des chiffres trop aberrants. Il est recommandé d'opérer avec des capsules en
  silice.

#### II - FER HEMINIQUE

Nous avons adapté à un extrait aqueux de tissu musculaire, la méthode de MU (17) et CASE (1) pour le dosage du fer sanguin.

L'hème des composés héminiques musculaires est libéré par acidification, puis transformé en hématine alcaline. On apprécie l'intensité de l'absorption par rapport à un standard d'hémine.

Remarque - Nous avions préalablement essayé d'adapter la méthode à l'hématine acide de YABUSOE (18), mais nous avons renoncé pour les raisons suivantes :

- instabilité de la coloration,

- impossibilité de préparer des solutions standard d'hémine dans le méthanol acidifié.

La méthode à l'hématine alcaline présente, selon nous, plusieurs avantages :

- stabilité de la coloration,
- facilité de préparation et stabilité des standards. Selon CLEGG & KING (2), les solutions standard conservées à l'obscurité dans des bouteilles avec bouchon de verre, restent stables pendant 9 mois. Nous avons pu constater que des solutions laissées depuis 2 mois en réfrigérateur ne présentaient pas de modification dans leur spectre d'absorption,
- selon CLEGG & KING, les protéines et matières grasses étrangères sont mieux dissoutes en milieu alcalin qu'en milieu acide.

Le début est identique à la technique de dosage de la myoglobine (voir plus loin). L'extrait aqueux est concentré par lyophilisation jusqu'à un volume final de 10 cc. A ces 10 cc. on ajoute 1 cc. de HCl N. Après 40 minutes à la température ambiante, on ajoute 2 cc. de NaOH N. Après de nouveau 30 minutes, la concentration d'hématine alcaline est lue au spectrophotomètre à 607 m/m, correspondant au maximum d'absorption. On compare à l'absorption d'un standard de concentration connue. Les standards sont fabriqués en dissolvant une quantité connue d'hémine dans un litre de NaOH N/10.

## III - DOSAGE DU FER NON HEMINIQUE EXTRAIT PAR LE PYROPHOSPHATE DE SODIUM

Nous avons légèrement modifié la technique proposée par SHAPIRA & DREYFUS

- Principe :

Le fer non héminique est masqué aux réactifs. Le pyrophosphate de sodium forme un pyrophosphate ferrique peu soluble qui se transforme en ferripyrophosphate de sodium soluble, extractible par l'acide trichloracétique. On dose ensuite au sulfocyanate par la technique de dosage du sérum sanguin mise au point par HENRY (7).

Technique:

10 g, de broyat de muscle sont pesés dans un tube à centrifuger. On ajoute
10 cc. de solution de pyrophosphate à 4 %. Au bout d'un quart d'heure, on ajoute 20 cc.
d'acide trichloracétique à 20 %. Le contenu du tube est agité pendant 1 minute. On abandonne
24 heures à la température ordinaire. On centrifuge alors, on décanté en ballon de 50. On
1 lave le précipité (en centrifugeant) avec une solution comprenant 1 partie de pyrophosphate
2 4 % et 2 parties d'acide trichloracétique à 20 %. On complète à 50 cc. avec le mélange.
Une partie aliquote de 10 cc. est versée dans une capsule de silice. On dessèche su bainmarie, puis on minéralise au four électrique à 600°. On laisse refroidir, puis on verse sur
1 le résidu 3 cc. de HNO3, en ayant soin de bien mouiller tous les bords de la capsule, puis
3 cc. d'eau bidistillée. La capsule est portée au bain-marie bouillant 1 à 2 minutes. On
1 transvase le contenu de la capsule dans un ballon jaugé à 20-25 cc. La capsule est rincée
2 cc. d'eau bidistillée. On ajoute 0,6 cc. de KMMO4. On porte au bain-marie bouillant
1 jusqu'à décoloration de la solution. On refroidit. On ajoute 10 cc. d'acétone. On complète
2 avec de 1'eau bidistillée. On ajoute 5 cc. de solution de sulfocyanate à 50 % et on
1 lit, dans les 5 minutes, au spectrophotomètre à 476 m/m.

Remarque - Dans des essais préliminaire, nous avions tenté de minéraliser au four électrique, puis d'opérer comme pour le fer total, mais la présence de pyrophosphate rend alors la coloration très instable. Comme le font remarquer SHAPIRA & DREYFUS (14), l'action inhibitrice sur le développement de la réaction colorée du pyrophosphate est éliminée par l'action du mélange nitripermanganique.

## IV - DOSAGE DE LA MYOGLOBINE

Pour doser la myoglobine dans un extrait musculaire, il faut :

- soit éliminer préalablement l'hémoglobine,
- soit utiliser les légères différences spectrales de l'hémoglobine et de la myoglobine pour calculer les quantités relatives de ces deux pigments à partir de données établies pour des solutions pures et des mélanges de référence.

Les méthodes de GINGER (5), ROSSI-FANELLI (11), sont basées sur le premier principe. Celles de DE DUVE (3), SHENK-HALL-KING (15), LAWRIE (9), sur le second.

Pour des raisons de commodité technique, nous avons choisi la méthode de GINGER en l'adaptant au cas spécial des muscles pauvres en pigment.

- Principe :

Le principe de cette méthode consiste à doser la myoglobine sous une forme stable, la cyanmetmyoglobine, après s'être débarrassé successivement des protéines étrangères et de l'hémoglobine.

Les protéines étrangères sont précipitées par l'acétate de plomb, comme le préconise THEORELL (16).

La séparation de l'hémoglobine et de la myoglobine est basée sur la grande différence de solubilité de ces deux pigments dans des solutions concentrées de phosphate (MORGAN (10).

La myoglobine est en effet soluble dans des solutions de phosphates de concentration 3 M à pH 6,6, alors que, dans les mêmes conditions, l'équation de GREEN (6) montre que seulement 9.10-4 mg par litre d'hémoglobine se trouve en solution.

La myoglobine en solution est ensuite transformée en cyanmetmyoglobine.

Le choix de ce dérivé est motivé par les nombreux avantages présentés par son homologue, la cyanmethemoglobine (DRABKIN (4), à savoir :

- stabilité du pigment,

- transformation rapide des différentes formes d'hémoglobine en cyanmethémoglobine,

- spectre d'absorption non modifié dans des limites assez larges de pH.

Les caractéristiques des dérivés CN de l'hémoglobine et de la myoglobine sont supposées identiques.

La transformation de la myoglobine en cyanmetmyoglobine est effectuée par addition de KzFe (CN)6 et de NaCN, afin d'obtenir des concentrations finales respectives de 0,6 mM et 0,8 mM/litre. Les lectures sont faites à 540 m µ en prenant comme coefficient d'extinction millimoléculaire 11,5, le même que celui de la cyanmethémoglobine.

#### - Technique :

### 1º) Extraction - étude critique

GINGER & SCHWEIGERT considèrent qu'une macération de 12 heures d'un poids donné de viande broyée en présence d'un poids égal d'eau extrait 50 % du pigment. Pour juger de la validité de cette méthode, nous avons adopté la technique rapide suivante :

Après macération de 12 heures, le broyat est centrifugé et le surmageant filtré sur verre frité. Le culot est soumis à des extractions successives par broyage au mixer suivi de centrifugations. 4 extractions suffisaient à obtenir la totalité du pigment. Le surmageant de la première extraction et la totalité des surmageants des extractions ultérieures étaient ajustés au même volume V. Les densités optiques respectives étaient lues au spectrophotomètre à 540 m m. Soient d1 et d2. Le pourcentage K de pigment obtenu à la première extraction est égal à

$$\frac{d1}{d_1 + d_2}$$

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Viande de boeuf K = 56,67 59,77 56,70 54,43 Viande de porc K = 61,06 60,73 63,92

Ces résultats sont notablement différents de la valeur de 50 % annoncée par GINGER. Par suite, il ne peut être question, comme l'ont proposé ces auteurs, de retenir un coefficient d'extraction forfaitaire, à la suite d'une seule extraction aqueuse. Une centrifugation suivant l'extraction aqueuse ne permet pas non plus de retenir un coefficient d'extraction constant, comme le montrent les valeurs suivantes de K obtenues après macération de 12 heures et centrifugation :

Tissu		Valour do K
Boeuf	diaphragme	84,86 84,71 84,03
<u>Vache</u>	diaphragme	84,80 83,80 86,29 85,63 84,28 84,36 85,22 83,79
Porc	diaphragme	83,52 83,68 83,64
Agneau	demi-tendineux	73,13 76,72 76,10
<u>Veau</u>	Long vaste	71,51 : 69,84 : 69,08

Il apparaît nettement que les valeurs de K diffèrent selon les espèces, ou plus exactement selon la richesse en pigment du muscle considéré, les viandes riches libérant relativement plus de pigment à la première extraction.

Il apparaît donc nécessaire, pour doser la myoglobine, d'extraire la totalité du pigment en plusieurs temps : nous avons trouvé que 3 extractions par broyage au mixer suivi de centrifugation, permettaient d'obtenir pratiquement toute la myoglobine présente dans l'échantillon.

L'extraction nécessite un poids d'éau égal environ à 5 fois le poids de muscle. Cette importante dilution conduit, dans le cas de viandes claires comme celle du veau, à l'obtention à la fin du dosage de solution de cyanmetmyoglobine très diluée dont il est difficile d'apprécier avec précision la concentration. Il est donc indispensable, pour avoir une détermination précise de la myoglobine du muscle de veau, de concentrer l'extrait aqueux et de le ramener à un volume tel que la concentration en myoglobine soit suffisamment importante pour permettre un dosage précis au spectrophotomètre.

Pour réaliser cette concentration de l'extrait aqueux, nous avons essayé sans succès le procédé de concentration par dialyse contre du polyvinylpyrrolidone à travers des membranes de cellophane ou de collodion (KOHN (8).

Les quantités de produits utilisées étaient les suivantes :

50 cc. d'extrait musculaire 10 cc. de PVP

Une dialyse pendant 24 heures à 3° nous permettait de réduire le volume initial d'extrait à 10 cc. soit une concentration de 1/5, mais dans tous les cas, nous avons observé une dénaturation de la solution de pigment.

Aussi avons-nous finalement adopté la concentration par lyophilisation. En opérant sur des quantités d'extrait de l'ordre de 100 cc. avec des fioles à lyophiliser de 1.000 cc. l'élimination de la quasi totalité de l'eau demande 3 heures.

## En résumé, la technique d'extraction adoptée est la suivante :

- Peser 20 g. environ de tissu

- broyer au mixer-homogénéiseur SERVALL ou MSE pendant 1 minute en présence de 40 cc. d'eau distillée
- rincer le pot du mixer avec 20 cc. d'eau
- centrifuger pendant 10 minutes à 4.000 t/m

- recueillir le surnageant

- agiter le culot avec 20 cc. d'eau

- recentrifuger

- refaire cette dernière opération
- filtrer les surnageants sur verre frité sous vide pour éliminer les matières grasses

- lyophiliser dans des fioles de 1.000 cc. pendant 3 heures

- laver la fiole avec quelques cc d'eau. Filtrer

- recueillir le filtrat dans une fiole jaugée de 20-25 cc. Ajouter 20 mg de C03Na2. Ajuster à 20 cc.

....

### 2º) Précipitation des protéines

Elle est produite par addition d'un volume d'acétate basique de plomb saturé égal au quart du volume de la solution de pigment. Il suffit donc de compléter à 25 cc. avec de l'acétate de Pb. Le contenu de la fiole est centrifugé à 30.000 t/m pendant 10 minutes. Pour éviter des risques de précipitation de la myoglobine par élévation de température, il est recommandé, si possible, d'utiliser une centrifugeuse refroidie.

## 3º) Précipitation de l'hémoglobine :

Les proportions de phosphates bi et mono sont calculées d'après l'équation de GREEN, en prenant comme solubilité de l'hémoglobine 9.10-4 g/litre.

Nous avons alors les équations suivantes :

$$Log Sgm/litre = 3,01 - 1,00 \times \frac{F}{2}$$

S = solubilité de l'hémoglobine en grammes par litre  $\frac{F}{2} = \text{force ionique}$  de la solution de phosphates

$$x + y = 3$$

x = nombre de moles de mono y = " bi

$$\frac{F}{2} = \frac{1}{2} (1 + 1 + 4y + 2y)$$

$$= \frac{1}{2} (2x + 6y) = x + 3y$$

$$\frac{F}{2} = 9 - 2x$$

Log S = 3,01 - 1,00 (9 - 2 x)

 $si S = 9.10^{-4} g/litre$ 

$$Log S = 4,95 = -3,05 = 3,01 - (9 - 2 x)$$

D'où 
$$x = 1,47 \text{ M}$$
  
 $y = 1,53 \text{ M}$ 

ce qui donne, pour un volume de 50 cc : 10,002 grammes de mono 13,325 grammes de bi

Ces quantités de phosphates bi et mono sont versées dans une fiole de 50 cc. Le surhageant précédent est versé dans cette fiole et le volume est ajusté à 50 cc. avec de l'eau bidistillée. La dissolution à l'aide d'un agitateur magnétique demande 3/4 d'heure. Le contenu de la fiole est ensuite centrifugé à 3.000 t/m pendant 10 minutes puis filtré.

# - Détermination de la quantité de myoglobine en mg par gramme de tissu frais :

0,5 cc. d'une solution de ferricyanure de K (987 mg/100 cc) et 0,5 cc. d'une solution de cyanure de Na (196 mg/100 cc) sont versés dans une fiole jaugée de 25 cc. On complète au niveau avec le filtrat précédent. Un témoin est fait en complétant au niveau avec de l'eau distillée. On lit à 540 m/4

La quantité de myoglobine en mg/gramme de tissu frais est donnée par l'équation:

QMB = 
$$\frac{16.500 \times 25 \times 50 \text{ d.o.}}{11,5 \times 24 \times 1000 \times \text{M}}$$
  
QMB =  $\frac{\text{d.o.}}{\text{M en grammes}}$ 

BIBLIOGRAPHIE -CASE R.A.M. - Spec.Rep.Food Invest.Bd.Lond. cité par LAWRIE 1)

CLEGG J.N. KING E.J. - British Med.J. 2, 329. 1942 2) DE DUVE C. - Acta Chemica Scandinavica, 2, 264. 1948

DRARKIN D.L. AUSTIN J.H. - Journ. Biol. Chem. 112, 51. 1935-36

GINGER I. WILSON G.D. SCHWEIGERT B.S. - Journ. Agr. and Food Chem. 2(20), 1037.1954

(4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) GREEN A.A. - Journ. Biol. Chem. 93, 495. 1931 HENRY R. - Ann. de Biol.Chim. 3, 101. 1945 KOHN J. - Nature, 183 (4667), 1055. 1959

LAWRIE R.A. - Journ. Agric. Sci. 40, 356-66. 1950 MORGAN V.E. - Journ. Biol. Chem. 112, 557. 1936 ROSSI A. - Bull. Soc. Chim. Biol. 31, 457, 460. 1949 (11)

(12)SHAPIRA G. DREYFUS J.C. - C.R. Soc. Biol. 141

SHAPIRA G. DREYAUS J.C. - Bull. Soc. Chim. Bio. 33, 265. 1951 (13)

SHAPIRA G. DREYFUS J.C. SHAPIRA F. - Bull. Soc. Chim. Bio. 30, 82-93. 1948 14)

SHENK J.H. HALL J.L. KING H.H. - Journ. Biol. Chem. 105, 741. 1934 (15)

THEORELL H. - Biochem. Z. 252, 1. 1932 (16)WU H. - J.Biochem. Tokio, 1932 (17)

YABUSOË M. - Biochem. Z. 175, 388. 1925 (18)

Summary: Determination of the different kinds of iron-components in veal.

This paper deals with the application to veal of methods used to estimate the different kinds of iron-components of meat. A special reference is given to myoglobin, for which an extractive procedure is proposed. The detailed procedure which has been used for the author's study of veal pigment is given for each method:

- total iron
- non-heminic iron
- heminic iron
- myoglobin