

Abstrakt

Cílem práce bylo využití rychlé analytické metody FT-NIR spektrometrie (blízká infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací) pro přímé stanovení čistých svalových bílkovin ve vybraných masných výrobcích. Spektra vzorků byla měřena v kompresní kyvetě na integrační sféře v režimu reflektance při spektrálním rozlišení 8 cm^{-1} a rozsahu $10\,000 - 4\,000 \text{ cm}^{-1}$. Pro všechny masné výrobky (Poličan, Paprikáš i šunka) byly metodou PLS (částečných nejmenších čtverců) vytvořeny velmi spolehlivé kalibrace, kdy hodnoty kalibračních i predikčních variačních koeficientů (CCV a PCV) se pohybovaly pod 5 %. Hodnoty koeficientů determinace (R^2) byly pro kalibraci v rozmezí 0,942 – 0,996 a pro validaci 0,924 – 0,971. Statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn mezi predikovanými a referenčními hodnotami. FT-NIR spektrometrie představuje jednu z přímých metod stanovení čistých svalových bílkovin v masných výrobcích, kterou je možné využít pro posouzení nejen kvality, ale i z pohledu falšování masných výrobků.

Úvod

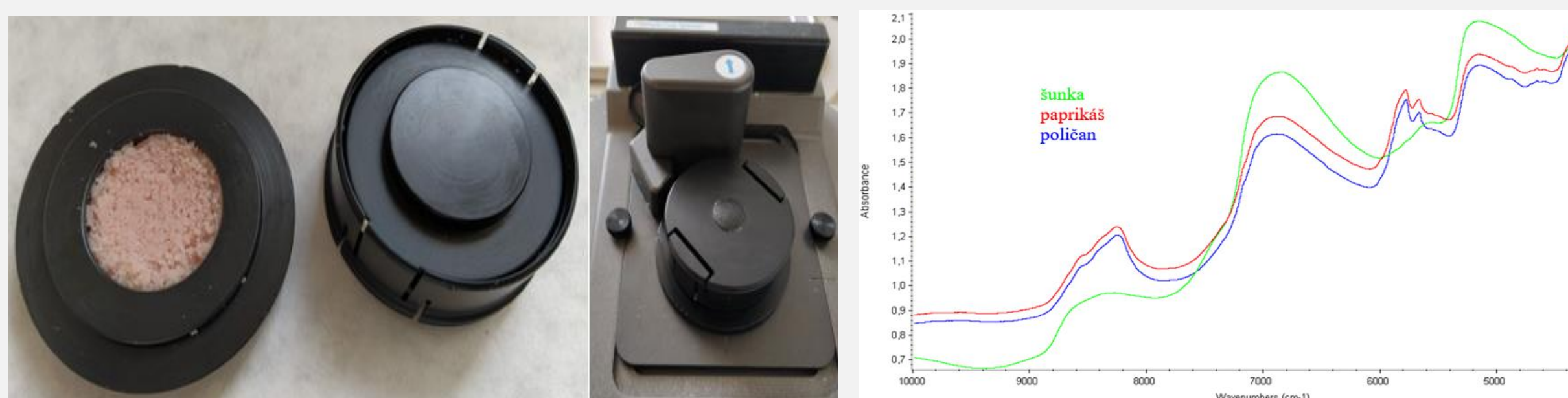
Obsah čistých svalových bílkovin (ČSB) je posuzován jak z pohledu falšování potravin, tak i klamání zákazníka (Bednář et al., 2023; Ježek et al., 2022). Čistou svalovou bílkovinou se podle vyhlášky č. 69/2016 Sb. rozumí bílkovina pocházející ze svalové tkáně zvířat bez bílkoviny pojivové tkáně a bílkovin rostlinného původu (Vyhláška 69/2016).

Problematikou stanovení ČSB časově náročnými a pracnými nepřímými metodami, které jsou založeny na stanovení čistých bílkovin s následným odečtem obsahu kolagenu, se zabývala řada autorů (Bartáková et al., 2023; Ježek et al., 2021; Procházková et al., 2010). Navíc tyto metody mohou být ovlivněny chybou z důvodu přítomnosti bílkovin nepocházejících z masa (Ježek et al., 2022). Problematikou stanovení ČSB, které lze využít u masa a masných výrobků se zabývali Ježek et al. (2022). Mezi tyto metody patří stanovení obsahu aminokyselin, metody stanovení ČSB přes celkový kreatinin (spektrofotometricky, enzymaticky a chromatograficky) a stanovení přes vázaný 3-methylhistidin (Ježek et al., 2021; Ježek et al., 2022; Bednář et al., 2023; Ježek et al., 2023). Z dalších přímých metod je možné zmínit metodu blízké infračervené spektrometrie (Procházková et al., 2010; Králová et al., 2023).

Cílem této studie bylo využít rychlou analytickou metodu FT-NIR spektrometrii pro stanovení legislativou daného parametru čistých svalových bílkovin u vybraných masných výrobků.

Materiál a metodika

- Vzorky masných výrobků salámu Poličan (n = 175), salámu Paprikáš (n = 48) a šunka (n = 41) byly zakoupeny od různých výrobců a z tržní sítě v České republice. Vzorky salámu Poličan zahrnovaly dílo až 7. týden zrání, vzorky salámu Paprikáš dílo až 5. týden zrání.
- Referenční hodnoty použité pro kalibrace byly zjištěny stanovením čistých bílkovin podle Kjeldahla a odečtením obsahu kolagenu stanoveného spektrofotometricky (Bartáková et al., 2023; Saláková a Bořilová, 2014).
- Po homogenizaci byly vzorky naplněny do kompresní kyvety (obrázek 1). Spektra byla změřena za použití spinneru na integrační sféře v režimu reflektance ve spektrálním rozsahu $10\,000 - 4\,000 \text{ cm}^{-1}$, 100 scanů a spektrálním rozlišení 8 cm^{-1} . Měření probíhalo na spektrometru Nicolet Antaris Near-IR Analyzer pomocí programu Result Integration Version 1.3 (Thermo Electron Corporation, Madison, USA).
- Kalibrační modely byly vytvořeny metodou částečných nejmenších čtverců (PLS) v programu TQ Analyst verze 6.2.1.509 (Thermo Electron Corporation, Madison, USA). Ukázka spekter masných výrobků je uvedena na obrázku 2.



Obr. 1. Kompresní kyveta naplněná homogenním vzorkem šunka, uzavřená kompresní kyveta na spinneru

Obr. 2. Spektra masných výrobků

Výsledky a diskuse

- V tabulce 1 jsou uvedeny referenční hodnoty ČSB vyjádřené jako směrodatná odchylka průměru. Standardy, u kterých se objevila spektrální odchylka ve změněném spektru nebo byla nepřesně stanovena referenční hodnota byly při kalibraci odstraněny za pomoci diagnostik *Leverage* a *Spectrum Outlier*.
- Všechny kalibrační modely byly vytvořeny bez matematické úpravy spekter. Srovnání kalibračních a validačních výsledků získaných metodou PLS, jsou uvedeny v tabulkách 2 - 3 a obrázku 3. Optimální počet PLS faktorů pro kalibraci (PRESS – *Predicted Residual Error Sum of Squares*) je uveden v tabulce 2. Příklad průběhu křivky PRESS viz obrázek 3b.
- U všech kalibračních modelů byla nalezena těsná závislost mezi hodnotami referenčními a predikovanými NIR. Výsledky poukazují na robustnost kalibračních modelů.
- Spolehlivost kalibrace byla posouzena z výpočtů kalibračního variačního koeficientu (CCV) a predikčního variačního koeficientu (PCV), které popisují velmi spolehlivé kalibrace. Za velmi spolehlivou kalibraci se podle literatury uvádějí hodnoty CCV pod 5 % a PCV pod 10 % (Míka et al., 2008).
- Obdobné výsledky pro salám Vysočina získali Procházková et al. (2010). Mezi referenčními a predikovanými hodnotami nebyl pomocí párového t-testu u žádného kalibračního modelu zjištěn statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$) viz tabulka 4.

Tab. 1: Referenční hodnoty

	n	x	s	min	max	median
Poličan	175	15,88	2,94	10,83	22,42	16,01
Paprikáš	48	15,57	2,14	11,15	19,55	15,92
Šunka	41	14,07	2,13	10,14	17,03	14,95

n – počet vzorků, x - průměr, min a max – minimální a maximální hodnota, s – směrodatná odchylka

Tab. 2: Kalibrační a validační výsledky 1

	n	F	Spektrální rozsah [cm^{-1}]
Poličan	10	7	8 346,40 – 4 288,90 Dvoubodová základní linie s fixní lokací 7 740,87 a 4 493,33
Paprikáš*	2	5	4 692,50 – 4 359,44 a 8 867,09 – 5 350,90
Šunka	4	9	8 986,09 – 4 440,92 Dvoubodová základní linie s fixní lokací 7 737,01 a 4 481,76

n – počet vzorků použitých pro kalibraci po odstranění odlehlých standardů, F - PLS faktory (PRESS), *Králová et al. (2023)

Tab. 3: Kalibrační a validační výsledky 2

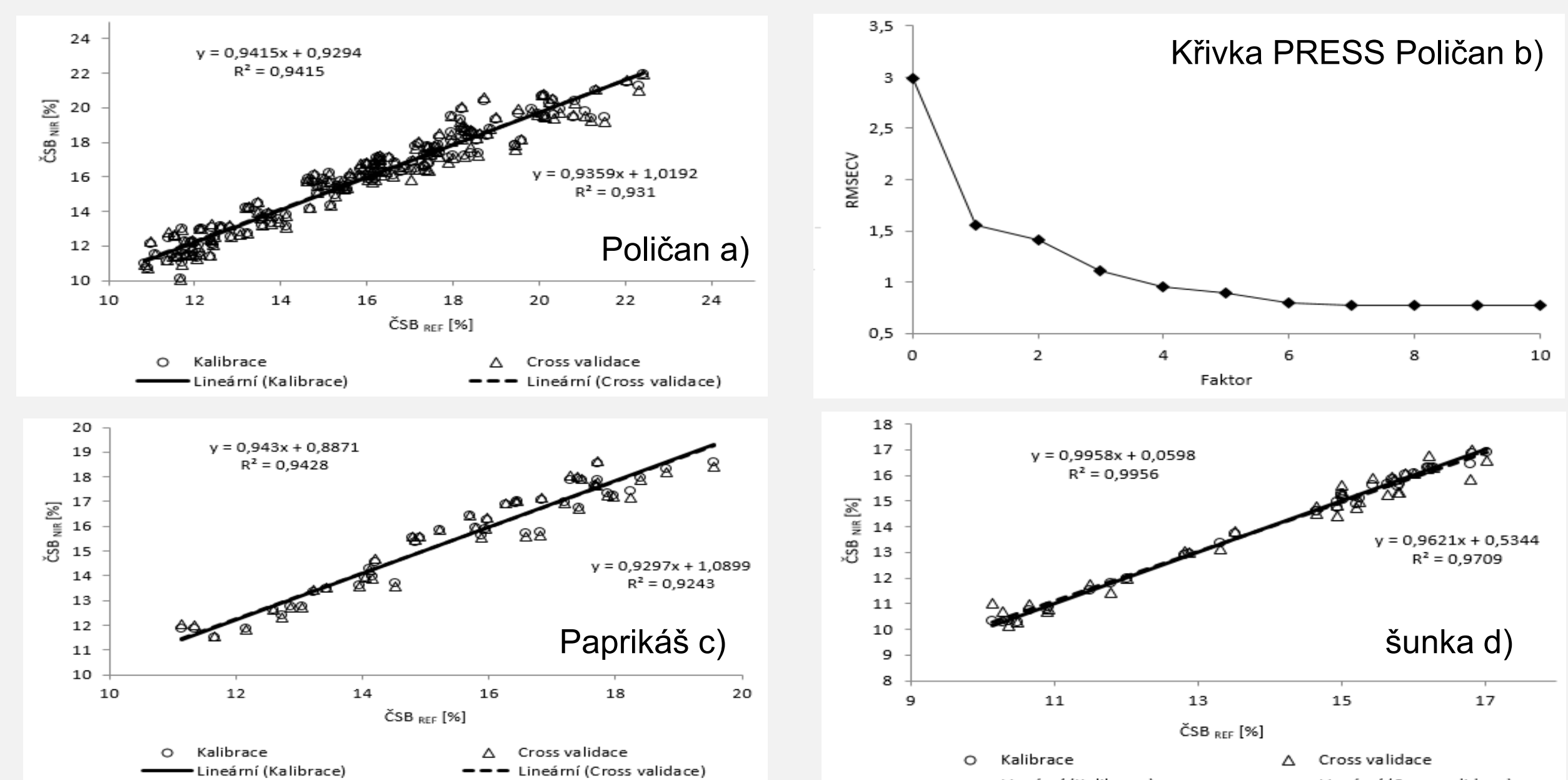
	kalibrace				cross validace			
	R	R^2	RMSEC	CCV	R	R^2	RMSECV	PCV
Poličan	0,970	0,942	0,71	4,47	0,965	0,931	0,77	4,85
Paprikáš*	0,971	0,943	0,51	3,29	0,961	0,924	0,59	3,79
Šunka	0,998	0,996	0,15	1,03	0,985	0,971	0,37	2,64

n – počet vzorků, R - korelační koeficient kalibrace/cross validace, R^2 – koeficient determinace kalibrace/cross validace, RMSEC/RMSECV - průměrná chyba kalibrace/cross validace v %, CCV/PCV – kalibrační a predikční variační koeficient v %, *Králová et al. (2023)

Tab. 4: Výsledky statistického testování

	xREF	xNIR	xREF - xNIR	p
Poličan	15,891	15,916	0,011	0,998
Paprikáš	15,572	15,566	0,004	0,965
Šunka	14,098	14,098	0,0003	0,997

xREF – průměr referenčních hodnot, xNIR – průměr predikovaných hodnot, |xREF|-|xNIR| - rozdíl mezi hodnotami referenčními a predikovanými, p – pravděpodobnost vypočítaná párovým t-testem



Obr. 3. Kalibrační a validační výsledky pro a) Poličan, c) Paprikáš (Králová et al., 2023), d) šunka. Charakteristická křivka PRESS pro Poličan b)

Závěr

Rychlá analytická metoda FT-NIR spektrometrie představuje jednu z přímých metod pro stanovení obsahu čistých svalových bílkovin, které jsou legislativně zakotveny ve Vyhlášce č. 69/2016 Sb., v platném znění pro šunka a vybrané masné výrobky. Kalibrační a validační modely, které byly vytvořeny metodou částečných nejmenších čtverců (PLS), současně se zjištěnými kalibračními a validačními variačními koeficienty s hodnotami pro všechny masné výrobky pod 5 %, popsaly kalibrace jako velmi spolehlivé. Mezi naměřenými referenčními a predikovanými hodnotami FT-NIR byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl ($p > 0,05$). Použitá metoda je vhodná nejen pro hodnocení kvality masných výrobků, ale také při odhalení falšování potravin.

Príspevek byl zpracován s podporou projektu QK21020199 Možnosti stanovení čistých svalových bílkovin přímou metodou v rámci programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025, ZEMĚ.