

# Porovnání kalibračních modelů FT-NIRs vyvinutých podle různých metod pro stanovení čistých svalových bílkovin v šunkách

Králová, M., Ježek, F., Bednář, J., Doležalová, J., Bartáková, K., Kameník, J.

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, Veterinární univerzita Brno



## Abstrakt

Cílem práce bylo porovnání kalibračních modelů FT-NIRs vyvinutých podle různých metod stanovení pro čisté svalové bílkoviny (ČSB) u šunek. Spektra vzorků byla získána měření v režimu reflektance na integrační sféře pomocí kompresní kyvety v rozsahu spektra 10 000 – 4 000  $\text{cm}^{-1}$ . Hodnoty pro vytvoření kalibračních modelů byly získány s pomocí referenční metody a metod pro stanovení celkového kreatininu spektrofotometricky s adsorpcí a enzymaticky. Pomocí metody PLS byl vytvořen velmi spolehlivý kalibrační model pro referenční metodu, ostatní kalibrační modely byly dle zjištěných výsledků spolehlivé. Mezi referenčními a predikovanými hodnotami nebyl pomocí párového t-testu, zjištěn statisticky významný rozdíl ( $p > 0,05$ ). Blízká infračervená spektrometrie (NIR) patří mezi rychlé přímé metody pro stanovení ČSB.

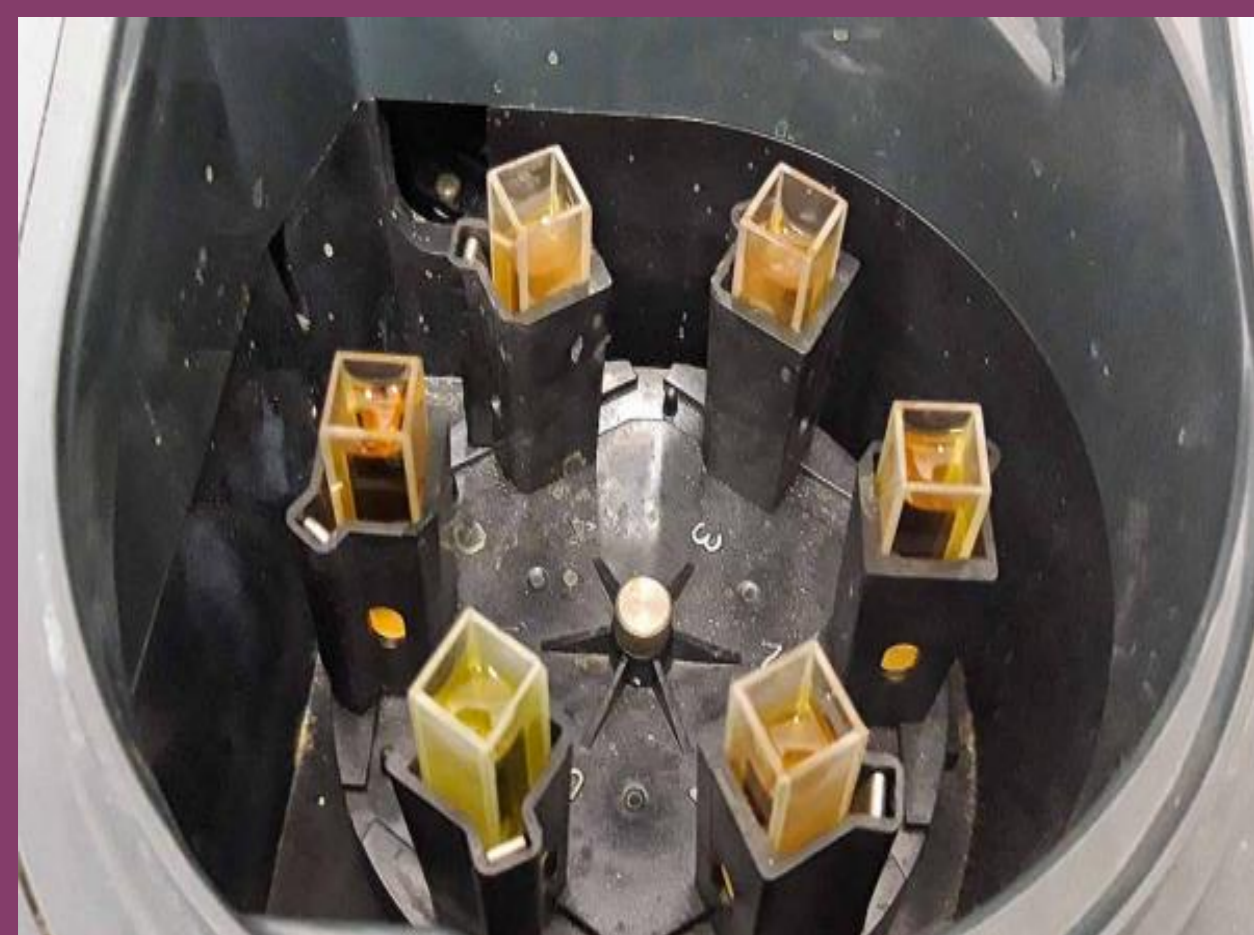
## Úvod

Informace o obsahu čistých svalových bílkovin (ČSB) v masných výrobcích je důležitá z hlediska kontroly kvality výrobků, falšování a zamezení klamání spotřebitele (Bednář et al., 2023). Pro stanovení ČSB lze využít metod přímých i nepřímých (Ježek et al., 2022). Referenční metoda je uvedena ve Věstníku MZe (2014). Tato metoda je založena na výpočtu ČSB jako rozdílu mezi obsahem čisté bílkoviny, stanovené podle Kjeldahla ve vzorku, kde byly bílkoviny předem vysráženy taninem, a obsahem kolagenu (Věstník MZe, 2014, Králová et al., 2024). Stanovení čistých svalových bílkovin přímou metodou přes celkový kreatinin spektrofotometricky (495 nm) s adsorpcí popisuje Ježek et al. (2023a a 2023b). Principem je převedení veškerého kreatinu a kreatin fosfátu v kyselém prostředí a za působení vysoké teploty na kreatinin. Stanoví se obsah celkového kreatininu v kyselém hydrolyzátu a obsah ČSB se vypočítá z empirického vztahu ( $\text{ČSB } g.100 \text{ } g^{-1} = \text{obsah kreatininu ve vzorku } mg.100 \text{ } g^{-1} / 20$ ) (Ježek et al., 2023a). Při enzymatickém stanovení kreatininu je v prvním kroku reakce odstranění endogenní kreatin hydrolyzou pomocí kreatinasy a sarkosinoxidasy za vzniku peroxidu vodíku, který je eliminován katalasou. Po přidání kreatininy a 4-aminoantipyrinu, pouze kreatin vytvořený z kreatininu účinkem kreatininy je následně hydrolyzován kreatinasou a sarkosinoxidasou za vzniku peroxidu vodíku. Tento nově vzniklý peroxid vodíku reaguje s N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidinem za katalýzy peroxidasou. Absorbance vzniklého komplexu při 546 nm je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku (Crea Enz 204, 2022).

Cílem této práce bylo vytvoření a porovnání kalibračních modelů pro stanovení čistých svalových bílkovin na FT-NIRs s využitím hodnot získaných pro kalibrace pomocí různých metod stanovení (referenční metoda a metody přes stanovení celkového kreatininu adsorpcí a enzymaticky).

## Materiál a metodika

- Vzorky ( $n = 31$ ) šunek byly zakoupeny od různých výrobců v tržní síti České republiky v roce 2023.
- Čisté svalové bílkoviny (ČSB) byly stanoveny referenční metodou jako rozdíl mezi čistou bílkovinou a kolagenem (Věstník MZe, 2014).
- Pro zjištění ČSB byly dále použity metody stanovení přes obsah celkového kreatininu s adsorpcí (Ježek, 2023a, Ježek et al., 2023b) (obr. 1a) a enzymaticky pomocí enzymatického setu Crea Enz 204 (Erba®Mannheim, ČR) (Bednář et al., 2023) (obr. 1b).
- Po homogenizaci pomletím byly vzorky naplněny do kompresní kyvety, vloženy na spinner a proměřeny v režimu reflektance na integrační sféře, v rozsahu spektra 10 000 – 4 000  $\text{cm}^{-1}$ , při spektrálním rozlišení 8  $\text{cm}^{-1}$  a 100 skenech na spektrometru Nicolet Antaris Near-IR Analyzer pomocí programu Result Integration Version 1.3 (Thermo electron Corporation, Madison, USA) (obr. 1c).
- Kalibrační modely byly vytvořeny metodou částečných nejmenších čtverců (PLS) v programu TQ Analyst verze 6.2.1.509 (Thermo Electron Corporation, Madison, USA).



Obr. 1. a) Měření intenzity vzniklého zbarvení na základě Jaffého reakce na Spektrofotometr GENESYSTEM 6 (Thermo Electron Corporation, USA) (autor Ježek)  
b) UV-VIS Spektrofotometr NEO 1000 series (Cecil Instruments, Anglie)  
c) Nicolet Antaris Near-IR Analyzer (Thermo Electron Corporation, USA)

## Výsledky a diskuse

- Referenční hodnoty pro vytvoření kalibračních modelů jsou vyjádřené pomocí směrodatných odchylek průměrů (tab. 1)
- Všechny kalibrační modely byly vytvořeny metodou PLS bez matematické úpravy spektra. Pro vyloučení odlehlých standardů, kde nebyly přesně stanoveny referenční hodnoty, nebo se objevila spektrální odchylka, byly použity diagnostiky *Spectrum Outlier* a *Leverage* (Králová et al., 2015).
- Kalibrační a validační výsledky jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3. Mezi hodnotami referenčními a predikovanými NIR byla nalezena těsná závislost (obr. 2-4). Mezi referenčními a predikovanými hodnotami nebyl pomocí párového t-testu, zjištěn statisticky významný rozdíl ( $p > 0,05$ ) viz tabulka 4.
- Králová et al. (2024) použila pro vytvoření kalibračních modelů, na základě hodnot zjištěných referenční metodou, větší počet vzorků. Uvedený autorský kolektiv uvádí pro všechny sledované masné výrobky (poličan, paprikáš a šunka) modely, které byly velmi spolehlivé. V této práci byl velmi spolehlivý model vytvořen také s využitím hodnot získaných referenční metodou. Pro metody stanovení celkového kreatininu spektrofotometricky s adsorpcí a enzymatickou metodou byly modely vyhodnoceny jako spolehlivé.

## Závěr

Pro vytvoření kalibračních modelů metodou PLS byly použity hodnoty získané pomocí různých metod stanovení. Dle hodnot CCV a PCV byl získán velmi spolehlivý kalibrační model pro referenční metodu. Pro metody stanovení celkového kreatininu spektrofotometricky s adsorpcí a enzymatickou metodou byly nalezeny spolehlivé modely.

Příspěvek 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.

Literatura: kralovam@vfu.cz

Tab. 1: Referenční hodnoty (%)

Metody	n	x	s	min	max	medián
Referenční	31	13,80	2,38	10,14	17,03	14,74
Adsorpce	31	13,95	2,67	9,08	19,01	13,93
Enzymaticky	31	14,88	3,82	6,85	20,31	15,32

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

Tab. 2: Kalibrační a validační výsledky 1

Metody	n	F	Spektrální rozsah [ $\text{cm}^{-1}$ ]
Referenční	30	8	8 986,70 – 4 439,30
			Dvoubodová základní linie s fixní lokací 7 737,01 a 4 481,76
Adsorpce	28	4	8 986,70 – 4 387,97
			Dvoubodová základní linie s fixní lokací 7 775,58 a 4 481,76
Enzymaticky	27	4	7 468,09 – 5 941,27
			Dvoubodová základní linie s fixní lokací 7 405,31 a 5 978,25
			4 111,49 – 5 226,15
			Jednobodová základní linie s fixní lokací 4 489,47

n – počet vzorků použitých pro kalibraci po odstranění odlehlých standardů diagnostikami *Spectrum Outlier* a *Leverage*, F - PLS faktory PRESS (hodnota sumy čtverců predikované reziduální chyby)

Tab. 3: Kalibrační a validační výsledky 2

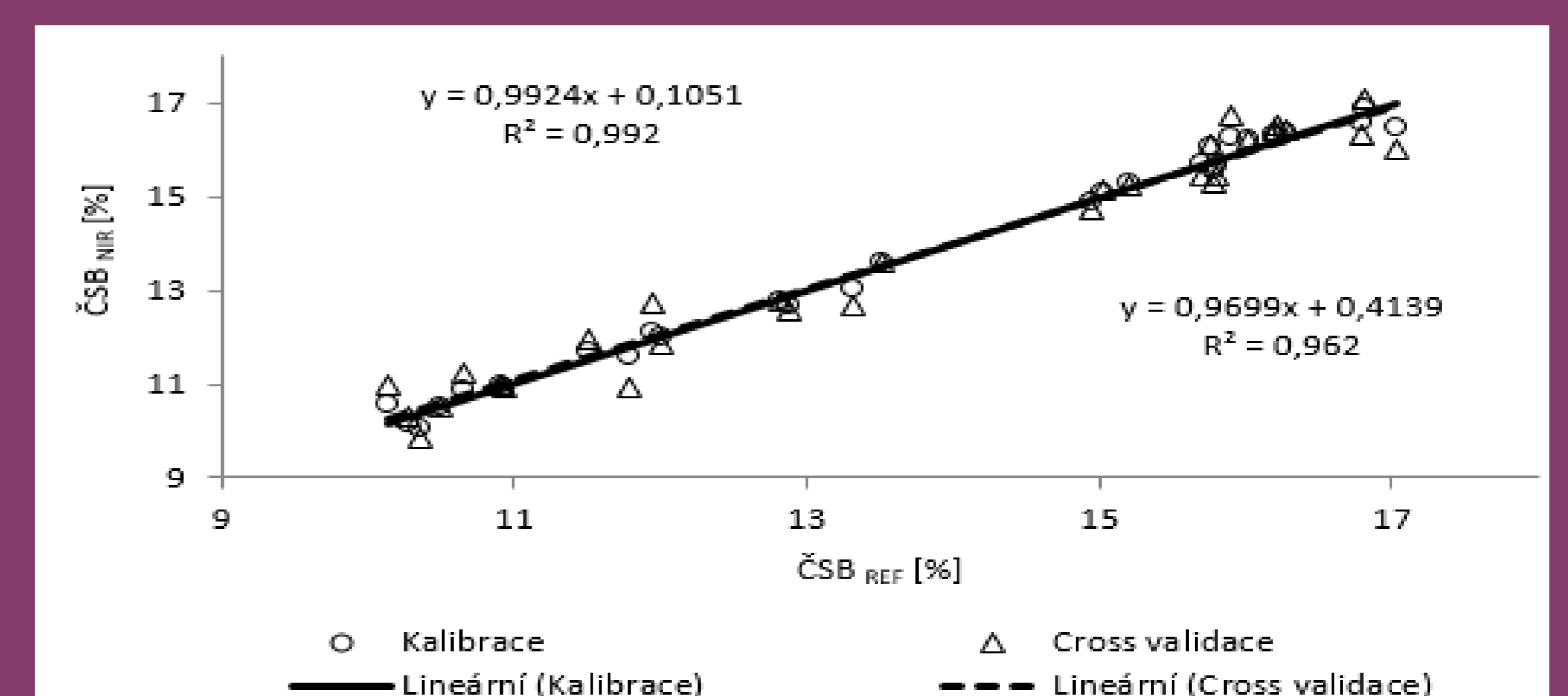
Metody	kalibrace				cross validace			
	R	R <sup>2</sup>	RMSEC	CCV	R	R <sup>2</sup>	RMSECV	PCV
Referenční	0,996	0,992	0,212	1,54	0,981	0,962	0,462	3,36
Adsorpce	0,959	0,920	0,723	5,28	0,932	0,868	0,932	6,80
Enzymaticky	0,967	0,935	0,933	6,11	0,943	0,889	1,24	8,12

n – počet vzorků, R - korelační koeficient kalibrace/cross validace, R<sup>2</sup> – koeficient determinace kalibrace/cross validace, RMSEC/RMSECV - průměrná chyba kalibrace/cross validace v %, CCV/PCV – kalibrační a predikční variační koeficient v %

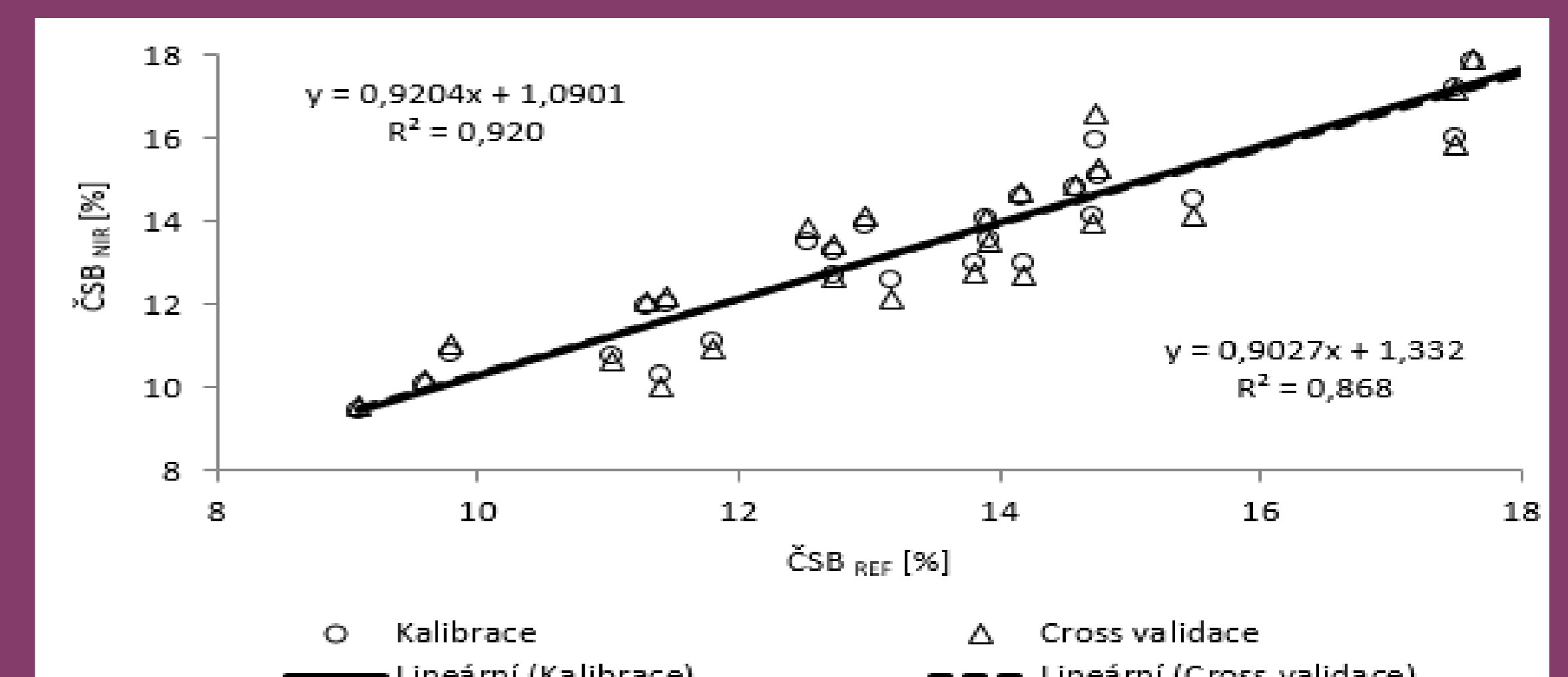
Tab. 4: Výsledky statistického testování

	xREF	xNIR	xREF-xNIR	p
Referenční	13,77	13,77	0,001	0,99
Adsorpce	13,70	13,70	0,001	0,99
Enzymaticky	15,28	15,26	0,010	0,95

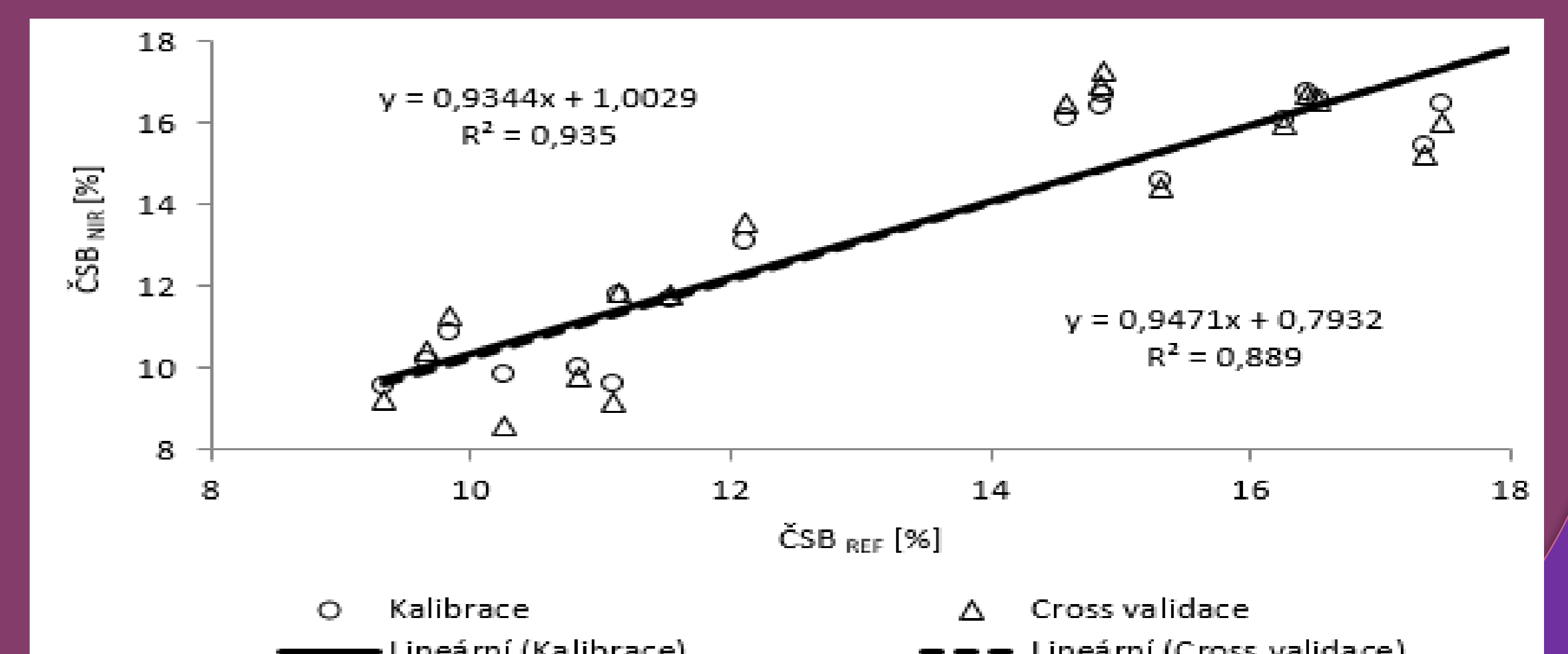
xREF – průměr referenčních hodnot, xNIR – průměr predikovaných hodnot, |xREF-xNIR| - rozdíl mezi hodnotami referenčními a predikovanými, p – pravděpodobnost vypočítaná párovým t-testem



Obr. 2. Kalibrační a validační výsledky pro referenční metodu



Obr. 3. Kalibrační a validační výsledky pro metodu spektrofotometrickou s adsorpcí



Obr. 4. Kalibrační a validační výsledky pro enzymatickou metodu