

STANOVENÍ CHOLESTEROLU VE ŽLOUTKU POMOCÍ FT-NIR SPEKTROMETRIE

DETERMINATION OF CHOLESTEROL IN EGG YOLK USING FT-NIR SPECTROSCOPY

Michaela Králová¹ – Eliška Dračková² – Lenka Kaniová¹
Vojtěch Anderle² – Martina Lichovnicková²

¹Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno

²Ústav chovu a šlechtění zvířat, Agronomická fakulta, MENDELU, Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-048-1-0161>



ABSTRAKT

Cílem práce bylo vytvoření kalibračního modelu pro stanovení obsahu cholesterolu ve žloutku metodou FT-NIRs. Spektra vzorků byla získána měřením v režimu reflektance na integrační sféře pomocí transflektanční kyvety v rozsahu spektra 10 000–4 000 cm⁻¹. Hodnoty pro vytvoření kalibračních modelů byly získány s pomocí referenční metody UPLC. Pomocí metody PLS byl vytvořen spolehlivý kalibrační model. Mezi referenčními a predikovanými hodnotami NIR byla nalezena těsná závislost a nebyl pomocí párového t-testu, zjištěn statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$). Zjištěné koeficienty determinace R^2 byly pro kalibraci 0,57 a validaci 0,49. Proto je tento kalibrační model vhodný spíše pro orientační stanovení.

Klíčová slova: blízká infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací, PLS metoda, vejce

ABSTRACT

The aim of this study was to create calibration models for the determination of cholesterol content in egg yolk using the FT-NIRs method. Spectra of samples were obtained by measuring in reflectance mode on an integrating sphere using a transreflectance cell in the spectral range of 10,000–4,000 cm⁻¹. Values for creating calibration models were obtained using the UPLC reference method. A reliable calibration model was created using the PLS method. A close relationship was found between the reference and predicted NIR values and no statistically significant difference was found using the paired t-test ($p > 0.05$). The coefficients of determination R^2 were found to be 0.57 for calibration and 0.49 for validation. Therefore, this calibration model is more suitable for indicative determination.

Keywords: near-infrared spectrometry with Fourier transformation, PLS method, egg

ÚVOD

NIR spektrometrie je vibrační spektroskopická metoda, která je velmi blízko viditelné oblasti, kde organické a anorganické sloučeniny vykazují dobré reflektanční nebo transmisní vlastnosti (Aenugu et al., 2011). Různé systémy, jako je spektroskopie viditelného a blízkého infračerveného záření (VIS-NIR, rozsah vlnových délek: 450–1100 nm), infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-NIR, rozsah vlnových délek: 800–2 500 nm) nebo NIR spektrometrie (rozsah vlnových délek: 2 500 nm), odrážejí absorbanci elektromagnetického záření na různých vlnových délkách (Huang et al., 2008). NIR spektrometrie se

vyznačuje získáním typického NIR spektra, které lze považovat za spektrální podpis nebo tzv. fingerprint. Je to adekvátní technika pro kvantitativní i kvalitativní analýzu produktů v zemědělství i potravinářství s minimální přípravou vzorků (Çataltaş a Tütüncü, 2021). Spektrometrická metoda je v současné době energeticky efektivní, nedestruktivní, neinvazivní, snadno použitelná a levná. Představuje ekologicky udržitelnou analytickou techniku schopnou zvládnout změřit velký počet vzorků, za krátký čas a bez použití rozpouštědel (Puertas et al., 2023). Ve spojení s vhodnou chemometrií se stala rutinním analytickým nástrojem pro stanovení řady složek (Çataltaş a Tütüncü, 2021).

Cílem práce bylo vytvoření kalibračního modelu pro stanovení obsahu celkového cholesterolu ve žloutcích pomocí moderní a stále více využívané metody blízké infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-NIR).

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky

Pro kalibraci FT-NIR spektrometru bylo použito 75 vzorků žloutků, které pocházely z experimentálního pokusu Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně, do kterého byly použity nosnice hybrida Lohmann Brown Classic v 32. týdnu věku. Nosnice byly rozděleny do 5ti skupin. Čtyřem skupinám byla podávána pokusná směs obohacená o úsušky 4 druhů píce (vojtěšky seté, jetele lučního, jetele plazivého a jílku vytrvalého). Pátá skupina byla kontrolní krmená pouze komerční krmnou směsí doplněnou aditivou luteinem a kantaxantinem (Anderle et al., 2018). Vzorky žloutků byly promíchány a podrobeny HPLC a NIR analýze.

Stanovení cholesterolu metodou UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)

Referenční hodnoty obsahu celkového cholesterolu byly stanoveny po uvolnění z esterových vazeb alkalickou hydrolýzou (saponifikací) a následnou extrakcí do nepolárního rozpouštědla metodou kapalinové chromatografie na reverzní fázi. Měření bylo provedeno na chromatografu Acquity UPLC (Waters, Irsko) za použití kolony s reverzní fází Acquity BEH C8, 100 x 2,1 mm, 1,7 μm (Waters, Irsko). Mobilní fází byla směs methanolu a vody (93 : 7), průtok 0,4 ml.min⁻¹, teplota 35 °C. Detekce cholesterolu byla prováděna v UV oblasti při 205 nm. Vyhodnocení bylo provedeno metodou kalibrační přímky za použití programu Empower 2 (Waters, Irsko) (Anderle, 2018).

FT-NIR spektrometrie

Vzorky byly vytemperovány na 20 °C a proměřeny s transflektanční kyvetou o tloušťce vrstvy $h = 2$ mm na spektrometru Nicolet Antaris Near-IR Analyzer (Thermo Electron Corporation, USA). Měření spekter probíhalo v programu Result – Integration Version 1.3 (Thermo Electron Corporation, USA). Každý vzorek byl měřen ve třech paralelních stanoveních, kdy pro tvorbu kalibračního modelu bylo použito průměrné spektrum. Spektra (Obrázek 1a) byla naměřena na integrační sféře v režimu reflektance, 100 skeny o spektrálním rozlišení 8 cm⁻¹ v rozsah vlnočtu 10 000–4 000 cm⁻¹. K vytvoření kalibračních modelů byla

použita metoda částečných nejmenších čtverců (PLS) v programu TQ Analyst (Thermo Electron Corporation, USA).

Statistické zpracování

Pro zjištění statisticky průkazných rozdílů v obsahu cholesterolu mezi průměry skupin, naměřených metodou UPLC, byla použita jednofaktorová analýza variance (ANOVA) s následným testováním průkaznosti rozdílů Tukey-HSD testem. Pro posouzení statisticky průkazných rozdílů mezi referenčními a predikovanými hodnotami NIR spektrometrie byl použit párový t-test. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí softwaru Unistat 5.1 (Unistat Ltd, Anglie).

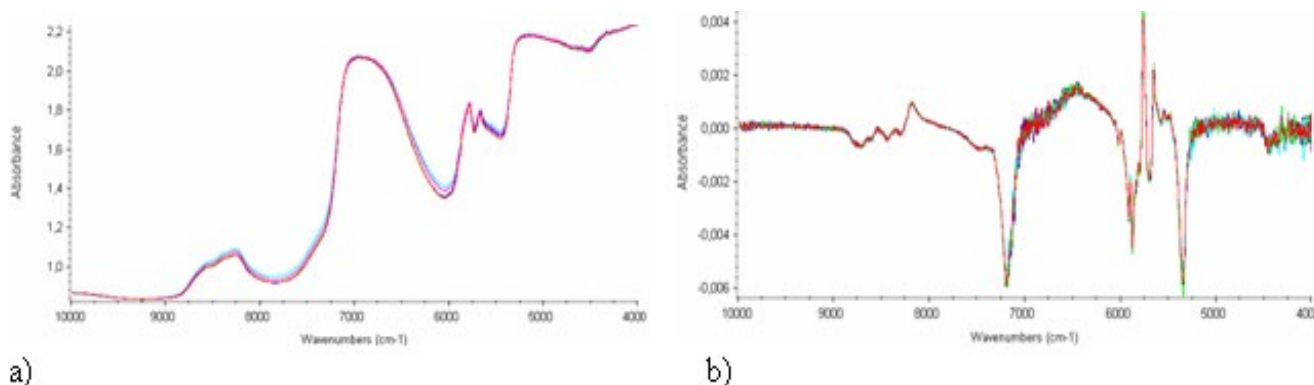
VÝSLEDKY A DISKUZE

Naměřené hodnoty obsahu cholesterolu metodou UPLC byly již publikovány v práci Anderle (2018), který uvádí nejvyšší obsah cholesterolu u pokusné skupiny (218,7 mg/vejce), mírně snížený obsah cholesterolu byl zjištěn u skupin krmených oběma druhy jetele. Výraznější snížení obsahu cholesterolu dosáhla skupina nosnic krmená směsí s jíllem vytrvalým (196,7 mg/vejce) a nejnižší hodnoty dosáhla skupina nosnic, které byla do směsi zařazena vojtěška setá (192,9 mg/vejce), což představovalo snížení o více než 25 mg cholesterolu na jedno vejce. Obsah cholesterolu nebyl ve vejcích zkrmováním úsušků statisticky průkazně ovlivněn ($p > 0,05$). Spektra vzorků naměřená pomocí FT-NIR spektrometrie byla využita pro vytvoření kalibračního modelu pro obsah cholesterolu pomocí PLS metody. Referenční hodnoty pro vytvoření kalibračních modelů jsou vyjádřené pomocí směrodatných odchylek průměrů (Tabulka 1).

Tabulka 4: Obsah cholesterolu ve žloutku (mg.g^{-1})

	Referenční hodnoty	Hodnoty použité pro kalibraci po odstranění odlehlých standardů
Počet vzorků	75	68
Průměr	12,63	12,65
Minimální hodnota	9,56	9,56
Maximální hodnota	15,85	15,48
Směrodatná odchylka	1,42	1,33

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 model byl vytvořen s matematickou úpravou spektra 1. derivací a s použitím Savitzky-Golay filtru (*data points 7, polynomial orde 3*) (Obrázek 1b), ve spektrálním rozsahu 4908,46–4929,34 a 5694,15–5650,02 cm^{-1} a počtem 2 PLS faktorů PRESS (hodnota sumy čtverců predikované reziduální chyby). Pro ověření kalibračního modelu byla použita metoda křížové (*cross*) validace. Křivka PRESS je uvedena na Obrázku 2a a kalibrační a validační výsledky v tabulce 2. Mezi hodnotami referenčními a predikovanými NIR byla nalezena těsná závislost (Obrázek 2b). Spolehlivost kalibrace byla posouzena z výpočtů kalibračního variačního koeficientu (CCV) a predikčního variačního koeficientu (PCV), které popisují spolehlivé kalibrace. Za velmi spolehlivou kalibraci se podle literatury uvádějí hodnoty CCV pod 5 % a PCV pod 10 %, za spolehlivou hodnoty CCV pod 10 % a PCV pod 15 % (Míka *et al.*, 2008).

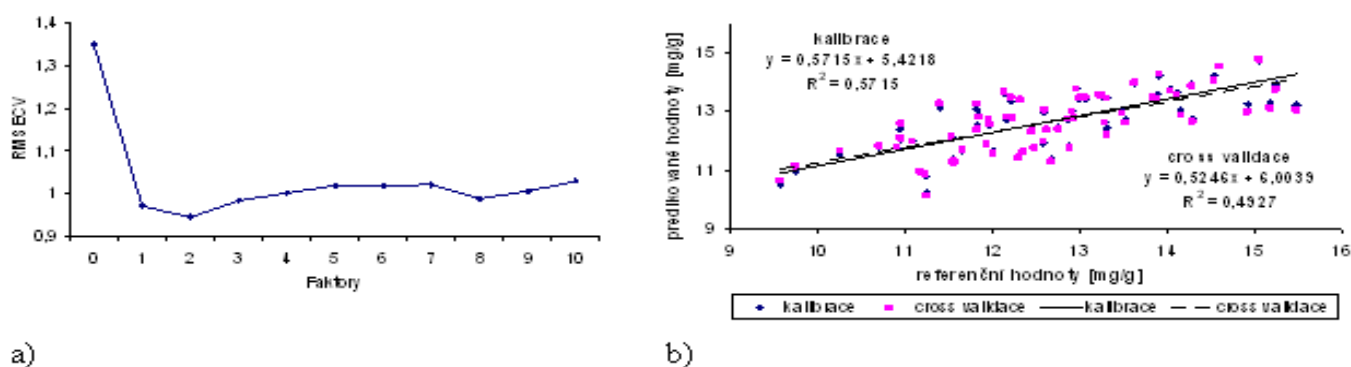


Obrázek 2: Spektra bez matematické úpravy (a), úprava první derivací (b)

Tabulka 5: Kalibrační a validační výsledky

	Kalibrace	Cross validate
Korelační koeficient (R)	0,76	0,70
Koeficient determinace (R^2)	0,57	0,49
Průměrná chyba (RMSEC/RMSECV)	0,86	0,94
Kalibrační (CCV)/predikční (PCV) variační koeficient ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	6,83	7,45

Výsledkem statistického testování byly stanoveny: průměr referenčních hodnot $12,56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, průměr predikovaných hodnot $12,64 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, rozdíl mezi hodnotami referenčními a predikovanými $0,01 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ a pravděpodobnost vypočítaná párovým t-testem $P = 0,92$. Z uvedených výsledků vyplývá, že mezi referenčními a predikovanými hodnotami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$).



Obrázek 2: Funkce PRESS (a), Kalibrační a validační výsledky (b)

V této práci byly naměřeny nižší determinační koeficienty ve srovnání s výsledky jiných autorů např. Puertas a Vázquez (2019), kteří uvádí R^2 nad 0,73 pro metodu PCR (regrese hlavních komponent). Uvedení autoři se zabývali problematikou stanovení cholesterolu ve žloutcích pomocí metody transmitance UV-VIS-NIR spektrometrie, kdy touto metodou vybrali jiný rozsah spektra. Nejlepší kalibrační model vytvořili pomocí PLS metody, s matematickou úpravou spektra první derivací, použitím Savitzky-Golay filtru v kombinaci s korekcí základní linie a zajištěnou hodnotou R^2 pro kalibraci 0,93. Matematická úprava spektra první derivací a Savitzky-Golay filtr byly použity i v naší studii. PLS metodu s matematickou úpravou spektra druhou derivací pro stanovení cholesterolu ve vejcích použili ve své práci Kuroki et al. (2020). Pro validační

model získali $R^2 = 0,75$. Podobné výsledky R^2 0,79–0,83 naměřili Sriratana et al. (2023) metodou IR spektrometrie v oblasti spektra 610–880 nm. Cendron et al. (2023) použili pro stanovení cholesterolu metodu VIS-NIR spektrometrii. Kalibrace byly vytvořeny modifikovanou metodou částečných nejmenších čtverců s matematickou úpravou spektra 1. derivací. U čerstvého žloutku získali pro kalibraci hodnoty $R^2 = 0,67$ a pro validaci $R^2 = 0,48$. Obdobný výsledek pro validaci jsme získali v naší práci. Cendron et al. (2023) vytvořili kalibrační model i pro žloutek sušený mrazem s výsledky $R^2 = 0,23$ pro kalibraci a $R^2 = 0,16$ pro validaci.

ZÁVĚR

Pro vytvoření kalibračních modelů metodou PLS byly použity referenční hodnoty získané metodou UPLC. Dle hodnot CCV a PCV byl získán spolehlivý kalibrační model pro stanovení celkového obsahu cholesterolu ve žloutcích. Mezi hodnotami referenčními a predikovanými NIR byla nalezena těsná závislost, ale s nižšími koeficienty determinace R^2 . Proto je tento kalibrační model vhodný spíše pro orientační stanovení.

LITERATURA

Aenugu, H. P. R., Kumar, D. S., Srisudharson, Parthiban, N., Ghosh, S. S., Banji, D. (2011): Near Infra Red Spectroscopy – An Overview. International Journal of ChemTech Research [online]. 3, 825–836. ISSN 0974-4290. Dostupné z: [https://sphinxsai.com/vol3.no2/chem/chempdf/CT=52\(825-836\)AJ11.pdf](https://sphinxsai.com/vol3.no2/chem/chempdf/CT=52(825-836)AJ11.pdf)

Anderle, V. (2018): Využití pícnin ve výživě kura domácího. Doktorská disertační práce. Brno: MENDELU Brno, 153 s.

Çataltaş, Ö., Tütüncü, K. (2021): A review of data analysis techniques used in near-infrared spectroscopy. European Journal of Science and Technology, 25, 475–484. ISSN 2148-2683. Dostupné z: doi: 10.31590/ejosat.882749

Cendron, F., Curró, S., Rizzi, C., Penasa, M., Cassandro, M. (2023): Egg quality of Italian local chicken breeds: II. Composition and predictive ability of VIS-Near-Infrared spectroscopy. Animals [online]. 13, 77. ISSN 2076-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ani13010077>

Huang, H., Yu, H., Xu, H., Ying, Y. (2008): Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. Journal of Food Engineering [online]. 87, 303–313. ISSN 1873-5770. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.12.022>

Králová, M., Procházková, Z., Saláková, A., Kameník, J., Vorlová, L. (2015). Využití blízké infračervené spektrometrie pro stanovení kvality masa. Maso, 26, 20–23. ISSN 1210-4086.

Kuroki, S., Kanoo, T., Kamisoyama, H. (2020): Nondestructive VIS/NIR spectroscopy estimation of intravitelline vitamin E and cholesterol concentration in hen shell eggs. Journal of Food Measurement and Characterization [online]. 14, 1116–1124. ISSN 2193-4134. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00361-8>

Míka, V., Kohoutek, A., Nerušil, P. (2008): Spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR). Výběr praktických aplikací v zemědělství. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 44 s. ISBN 978-80-87011-53-9.

Puertas, G., Cazón, P., Vázquez, M. (2023): Application of UV-VIS-NIR spectroscopy in membrane separation processes for fast quantitative compositional analysis: A case study of egg products. LWT – Food Science and Technology [online]. 174, 114429. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114429>

Puertas, G., Vázquez, M. (2019): Cholesterol determination in egg yolk by UV-VIS-NIR spectroscopy. Food Control [online]. 100, 262–268. ISSN 0956-7135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.031>

Sriratana, W., Iamyang W., Sriratana, L. (2023): Analysis of eggs quality by using the NIR. ICIT, December 14–17, Kyoto, Japan. Dostupné z: <https://doi.org/10.1145/3638985.363900>

Kontaktní adresa: Ing. Eliška Dračková, Ph.D., Ústav chovu a šlechtění zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno, e-mail: eliska.drackova@mendelu.cz