

# KLASIFIKACE VZORKŮ NÁHRADNÍ MLÉČNÉ KOJENECKÉ VÝŽIVY ZA VYUŽITÍ MULTIPRVKOVÉ A DISKRIMINAČNÍ ANALÝZY

**JANA VENCLOVÁ, LENKA HUSÁKOVÁ\*, TEREZA ŠÍDOVÁ, IVA URBANOVÁ**

*Katedra analytické chemie*

*\* Garant*

## ÚVOD

Podle údajů světové zdravotnické organizace užívá v celosvětovém měřítku náhradní mléčnou výživu více než 60 % dětí a to již ve druhém měsíci života<sup>1</sup>. Hlavním důvodem této skutečnosti je ztráta mateřského mléka krátce po porodu nejčastěji ze stresu, který je většinou po porodu způsoben. Jelikož děti konzumují výrazně vyšší množství stravy na jednotku tělesné hmotnosti než dospělí lidé, musí náhradní kojenecká výživa splňovat požadavky nejen na dovolené množství toxických, ale i nutričních prvků. V současné době jsou českou legislativou stanoveny maximální limity pouze pro některé prvky, konkrétně se jedná o Pb, Sn, Cd, As a Hg. V mléce se však nachází široká škála stopových prvků pocházejících ze vstupních surovin i z vnějšího prostředí, které nejsou běžně sledovány. Možnost získání obsáhlé multiprvkové informace, kterou současná moderní analytická instrumentace umožňuje, pak může sloužit k upozornění na přítomnost celé řady významných kontaminantů při kontrole kvality vstupních surovin a kontrole celého procesu výroby. Spojení znalosti multiprvkového profilu s nástroji vícerozměrné statistické analýzy dat pak může přinést další cenné informace týkající se vlastní kategorizace vzorků včetně nalezení příslušných autentifikačních modelů<sup>1-3</sup>.

Metodou atomové absorpční spektrometrie a hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu na spektrometru s průletovým analyzátozem s ortogonální akcelerací iontů, které byly dříve<sup>4,5</sup> pro potřeby multielementární analýzy mléka vyvinuty a validovány, bylo ve 21 vzorcích komerčně dostupného kojeneckého mléka kvantifikováno 22 prvků (Hg, Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd, Li). Analyzovány byly vzorky mléka ze 4 kategorií (1-mléčná výživa pro nedonošené děti, 2-počáteční mléčná výživa, 3-pokračovací mléčná výživa, 4-mléčná výživa batolat) do nichž je umělá výživa do jednoho roku dítěte klasifikována<sup>5</sup>. Stanoveny byly koncentrace prvků, které jsou významné z nutričního či toxikologického hlediska, ale i o koncentrace prvků, které nejsou běžně sledovány. Jelikož je v současné době prakticky nemožné v rámci zemí EU určit původ výrobku či suroviny pro jeho výrobu a obsah prvků je navíc zřejmě dodatečně upravován výrobcem v souladu s požadavky výživy kojence, není možné z výsledků analýzy usuzovat na možné souvislosti mezi obsahem vybraných analytů a zemí původu, k čemuž často spojení multi-elementární a klasifikační analýzy bývá využíváno<sup>6</sup>. Nicméně jak je patrné z výsledků této práce, pomocí diskriminační funkční analýzy lze vzorky rozčleněny do výše uvedených 4 kategorií náhradní mléčné kojenecké výživy a to s úspěšností 100 %.

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Analyzováno bylo 21 komerčně dostupných vzorků náhradní mléčné kojenecké výživy producentů: Hipp (Chorvatsko, Německo), Nutricia (ČR, Německo), Dr. Max Pharma (Francie), Nestlé (ČR, Německo, Francie, Španělsko), Hero (Velká Británie), Rossmann (Německo), DM Drogerie Markt (Německo). Naměřená data byla vyhodnocena pomocí statistického programu QC-Expert™ 2.9 (TriloByte Statistical software, s.r.o., ČR) a Statistica 12 (StatSoft, Inc., USA). Pro potřeby stanovení Hg byly vzorky analyzovány přímo, v ostatních případech byly vzorky před analýzou mineralizovány v mikrovlnném zařízení Speedwave™MWS-3<sup>+</sup> (Berghof, Německo). Stanovení Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe bylo provedeno metodou atomové absorpční spektrometrie na spektrometru GBC Avanta P (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie). Rtuť byla stanovena na spektrometru AMA 254 (Altec, Česká republika). Pro analýzu ostatních prvků byl použit TOF-ICP-MS spektrometr Optimass 8000 (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Austrálie) <sup>4</sup>. Parametry nastavení pro každou z výše uvedených metod a podrobný postup přípravy vzorku jsou uvedeny v literatuře <sup>5</sup>, podobně jako hodnoty dosažených analytických charakteristik, dokumentujících detekční schopnost zvolených metod pro stanovení vybraných elementů, či správnost, pro jejíž potvrzení bylo použito certifikovaných referenčních materiálů mléka: NCS ZC73015 Milk Powder (China National Analysis Center for Iron and Steel) a BCR 150 – Spiked Skim Milk Powder – Trace elements (Institute for Reference Materials and Measurements, Belgie).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

### Popisné statistiky

Základním předpokladem diskriminační analýzy je platnost vícerozměrné normality, tj. pro jednotlivé znaky normální rozdělení v rámci jednotlivých tříd <sup>1-3</sup>. Souhrnné statistické charakteristiky analyzovaných dat jsou pro jednotlivé proměnné uvedeny v tabulce 1. Popisné statistiky diskriminátorů v rámci jednotlivých tříd zde nejsou uváděny. Předpoklad normality nebyl splněn pouze v případě výběru koncentrace Ba v druhé skupině analyzovaných vzorků. Nicméně Ba nebylo indikováno jako vhodný diskriminátor a bylo v rámci diskriminační analýzy pro potřeby klasifikace vyloučeno.

### Výběr diskriminátorů

Ve 4 krocích při použití diskriminační dopředné krokové analýzy byly nalezeny znaky s dostatečnou diskriminační silou. Znaky, které nebyly pro klasifikační analýzu významné, byly vyřazeny s využitím několika kritérií: Wilkova kritéria  $\lambda$ , které nabývá hodnot od 0 do 1 značící výbornou, resp. nevýznamnou diskriminační sílu; kritéria F, kdy nejlepší znaky dosahují nejvyšších hodnot F; kritéria síly testu, které dokumentuje vypočtená hladina významnosti. Dalším kritériem je tolerance  $1-R^2$ , která je mírou redundance, tj. nadbytečnosti znaku. Nejlepší znaky pro klasifikaci dosahují nejvyšších hodnot tolerancí <sup>1-3</sup>. Pomocí výše uvedených kritérií byly jako nejlepší znaky pro klasifikaci určeny: Li, Na, Sr, Co, Mg, Zn, Cu.

**Tabulka 1:** Statistické charakteristiky stanovení obsahu Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), Hg, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd, Li ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ve vzorcích náhradní mléčné kojenecké stravy ( $n = 21$ )

Analyt	Průměr	Spodní mez	Horní mez	Průměr <sup>a</sup>	Spodní IS <sup>a</sup>	Horní IS <sup>a</sup>	Rozptyl	Sm. odch.	Šikmost	Špičatost	$\rho^b$	Medián	IS spodní	IS horní	OB
Hg	1.39	0.90	1.87	0.98	0.70	1.39	1.14	1.07	0.73	2.21	0.254	1.02	0.23	1.81	0
Mg	455.9	424.5	487.3	453.4	422.7	485.3	4760.2	69.0	0.2	2.5	0.898	452.2	397.9	506.5	0
Fe	46.1	39.7	52.6	42.7	38.0	48.8	200.7	14.2	1.0	3.6	0.126	44.8	35.2	54.4	0
Na	1583	1327	1840	1422	1294	1601	317820	564	2	7	0.009	1414	1221	1607	2
Ca	4950	4373	5527	4728	4261	5290	1606913	1268	1	4	0.108	4946	4064	5828	0
K	4685	4468	4903	4550	4409	4741	228010	478	1	4	0.091	4578	4265	4891	1
Zn	40.7	36.7	44.7	40.3	36.4	44.3	76.8	8.8	0.1	1.7	0.934	39.4	31.0	47.7	0
Mo	154.9	124.0	185.7	141.2	116.6	171.5	4598.2	67.8	0.7	2.8	0.255	130.6	78.6	182.7	0
Co	23.0	20.6	25.3	22.5	20.3	24.9	26.8	5.2	0.2	1.8	0.847	23.4	18.5	28.2	0
Cu	3184	2833	3534	3058	2768	3401	592701	770	1	4	0.120	3142	2547	3738	0
Cs	9.9	7.7	12.1	8.6	7.2	10.6	22.9	4.8	1.0	3.3	0.116	8.4	5.0	11.7	1
Sr	2213	1846	2580	2044	1755	2404	650235	806	1	3	0.276	2051	1411	2692	0
Rb	2334	1636	3032	2080	1490	2779	2351157	1533	1	3	0.295	1987	712	3263	0
U	5.7	3.9	7.5	4.7	3.4	6.4	15.7	4.0	0.7	2.3	0.267	4.6	1.8	7.4	0
As	9.9	7.7	12.2	9.7	7.5	12.0	23.9	4.9	0.1	1.8	0.932	9.2	5.0	13.4	0
Se	118.8	103.8	133.8	119.6	104.4	134.4	1089.7	33.0	-0.1	1.9	0.956	122.4	93.6	151.2	0
Pb	31.6	26.4	36.8	31.7	26.4	36.8	130.8	11.4	0.0	1.9	0.972	27.1	17.9	36.2	0
Sb	12.2	10.6	13.7	11.2	10.2	12.4	11.2	3.4	1.3	4.3	0.055	11.2	8.7	13.7	1
La	6.5	4.3	8.8	4.9	3.9	6.4	24.1	4.9	2.0	6.9	0.009	5.9	3.8	8.0	2
Ba	410.4	303.9	516.9	342.0	273.8	435.3	54744.2	234.0	1.1	3.7	0.087	355.5	201.2	509.8	0
Cd	7.3	6.2	8.4	8.0	6.9	8.8	6.1	2.5	-0.5	1.6	0.517	8.3	6.1	10.5	0
Li	14.3	9.6	19.1	12.0	8.4	16.5	108.8	10.4	0.8	2.6	0.237	10.8	2.7	18.9	0

<sup>a</sup> Odhad parametru získaný po exponenciální transformaci dat.

<sup>b</sup> Kombinovaný test normality: Jestliže je  $\rho$  větší než 0.05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota  $\rho$  nižší než 0.05 data nevykazují normální rozložení. OB odlehlý bod; IS interval spolehlivosti

## Klasifikace objektů kanonickou korelační analýzou

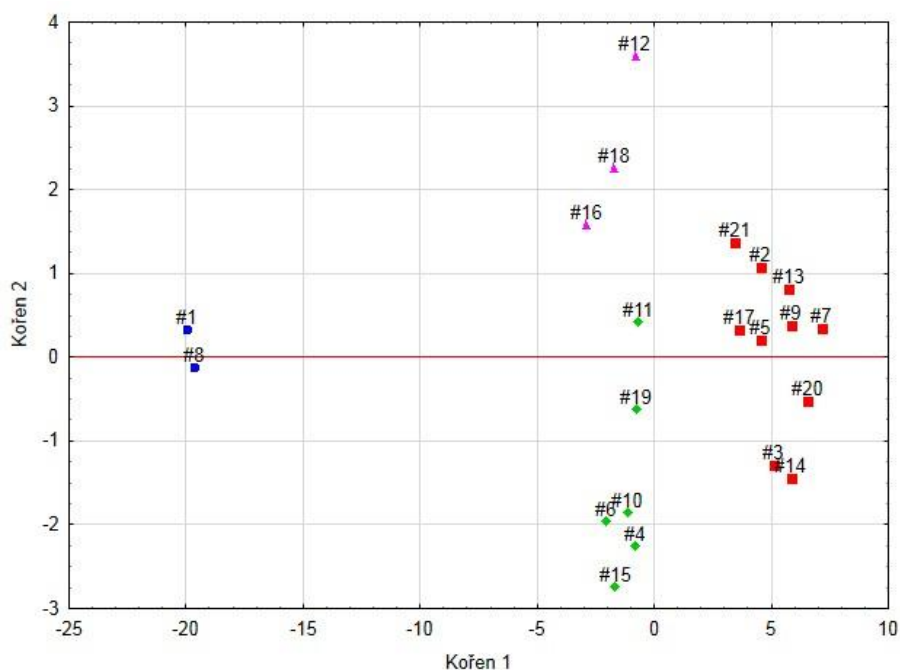
Vyčísleny byly 3 diskriminační funkce, jejich počet je v daném případě o jednotku menší než počet tříd. Výsledky testu Chí-kvadrát<sup>1-3</sup>, který testuje statistickou významnost všech kořenů při jejich postupném odstraňování, jsou uvedeny v tabulce 2. Z hodnot uvedených v tabulce je zřejmé, že statisticky významné jsou pouze první dva kořeny.

**Tabulka 2:** Test chí-kvadrát po odstranění postupných kořenů

Kořeny odstraněny	Vlastní číslo	Kan. (R)	Wilk. $\lambda$	Chi-kv.	sv	$p$
0	63.28586	0.992192	0.002857	84.94279	21	0.000000*
1	1.89365	0.808959	0.183639	24.57436	12	0.016974*
2	0.88187	0.684554	0.531386	9.16786	5	0.102553

\* parametr statisticky významný

Grafickou interpretaci hodnot nestandardizovaných kanonických skóre<sup>1-3</sup>, které ukazují na diskriminaci 21 vzorků náhradní mléčné kojenecké výživy, shrnuje obrázek 1. Kořen 1, čili první diskriminační funkce silně diskriminuje první třídu od skupin ostatních vzorků. Druhá diskriminační funkce pak zejména odlišuje skupinu 4 od ostatních tříd. Diskriminace již však není tak výrazná. Z grafu je však zřejmé, že získaný model je vhodný ke klasifikaci vzorků do jednotlivých tříd.



**Obrázek 1:** Graf kanonických skóre: (●) třída 1, (■) třída 2, (◆) třída 3, (▲) třída 4

Hodnoty vypočtených aposteriorních pravděpodobností zařazení objektů do každé z tříd jsou uvedeny v tabulce 3. Nejvyšší hodnota pravděpodobnosti značí příslušnost objektu do dané třídy. Z hodnot uvedených v tabulce je zřejmé, že všechny objekty testovacího souboru byly zařazeny správně do příslušných tříd.

**Tabulka 3:** *Aposteriovní pravděpodobnosti*

Vzorek	Klasifikace	Třída 1 ( $p=0.09524$ )	Třída 2 ( $p=0.47619$ )	Třída 3 ( $p=0.28571$ )	Třída 4 ( $p=0.14286$ )
1	Třída 1	1.000000	0.000000	0.000000	0.000000
2	Třída 2	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000
3	Třída 2	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000
4	Třída 3	0.000000	0.000000	0.999995	0.000005
5	Třída 2	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000
6	Třída 3	0.000000	0.000000	0.999975	0.000025
7	Třída 2	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000
8	Třída 1	1.000000	0.000000	0.000000	0.000000
9	Třída 2	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000
10	Třída 3	0.000000	0.000000	0.999962	0.000038
11	Třída 3	0.000000	0.000000	0.832132	0.167868
12	Třída 4	0.000000	0.000000	0.000008	0.999992
13	Třída 2	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000
14	Třída 2	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000
15	Třída 3	0.000000	0.000000	0.999998	0.000002
16	Třída 4	0.000000	0.000000	0.012775	0.987225
17	Třída 2	0.000000	0.999993	0.000006	0.000000
18	Třída 4	0.000000	0.000000	0.001830	0.998170
19	Třída 3	0.000000	0.000000	0.995464	0.004536
20	Třída 2	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000
21	Třída 2	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000

Nesprávná klasifikace je označena \*

## ZÁVĚR

Pomocí diskriminační funkční analýzy bylo z celkového počtu 22 znaků, které byly reprezentovány koncentrací nutričních, stopových prvků a kontaminantů, nalezeny proměnné umožňující klasifikovat vzorky náhradní mléčné kojenecké stravy do 4 kategorií, do kterých jsou v reálné praxi rozděleny. Nalezeny byly funkce zařazení objektů do daných kategorií. Úspěšnost zařazení objektů do tříd byla 100 %.

*Práce byla realizována díky finanční podpoře projektu SGSFChT 2016001 Univerzity Pardubice.*

## LITERATURA

1. Meloun M., Militký J.: *Kompendium statistického zpracování dat*, Vyd. 3., nakl. Karolinum, Praha 2012. ISBN: 978-80-246-2196-8.
2. Meloun M., Militký J.: *Interaktivní statistická analýza dat*, Vyd. 3., nakl. Karolinum, Praha 2012. ISBN: 978-80-246-2173-9.
3. Meloun M., Militký J.: *Statistická analýza vícerozměrných dat v příkladech*, Učebnice s CD, Vyd. 2., Academia, Praha 2012.
4. Husáková L., Urbanová I., Šrámková J., Černožorský T., Krejčová A., Bednaříková M., Frýdová E., Nedělková I., Pilařová L.: *Food Chem.* 129, 1287 (2011).
5. Venclová J.: *Bakalářská práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 2016.
6. Zain S.M, Behkami S., Bakirdere S., Koki I.B.: *Food Control* 66, 306 (2016).