

MULTIPRVKOVÁ ANALÝZA NÁHRADNÍ MLÉČNÉ KOJENECKÉ VÝŽIVY

JANA VENCLOVÁ, LENKA HUSÁKOVÁ, TEREZA ŠÍDOVÁ, IVA URBANOVÁ

*Katedra analytické chemie, Fakulta Chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 573 HB-D, 532 10 Pardubice
jana.venclova@student.upce.cz*

Klíčová slova: prvková analýza, kojenecká výživa, statistická analýza dat, AAS, ICP-MS

Úvod

Podle údajů světové zdravotnické organizace užívá v celosvětovém měřítku náhradní mléčnou výživu více než 60 % dětí a to již ve druhém měsíci života¹. Hlavním důvodem této skutečnosti je ztráta mateřského mléka ihned po porodu nejčastěji ze stresu, který je většinou po porodu způsoben. Kojenci konzumují výrazně vyšší množství stravy na jednotku tělesné hmotnosti než dospělí lidé, proto náhradní kojenecká výživa musí splňovat požadavky nejen na dovolené množství toxických prvků a kontaminantů, ale i nutričních prvků. Za využití atomové absorpční spektrometrie (AAS) a hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS) bylo ve 21 vzorcích komerčně dostupné náhradní mléčné kojenecké výživy kvantifikováno 22 prvků (Hg, Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd a Li). Analyzovány byly vzorky ze všech 4 kategorií (0-mléčná výživa pro nedonošené děti, 1-počáteční mléčná výživa, 2-pokračovací mléčná výživa, 3-mléčná výživa batolat) do nichž je umělá výživa do jednoho roku dítěte klasifikována¹. Za využití vybraných nástrojů jednorozměrné a vícerozměrné statistické analýzy dat²⁻⁴ bylo cílem určit statistické charakteristiky analyzovaných výběrů dat a klasifikovat jednotlivé vzorky na základě podobnosti z hlediska dosažených hodnot analytických koncentrací.

Experimentální část

Stanovení Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe bylo provedeno pomocí atomového absorpčního 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)⁵. Pro potřeby stanovení Hg byly vzorky analyzovány přímo, v ostatních případech

byly vzorky před analýzou mineralizovány v mikrovlnném zařízení Speedwave™MWS-3⁺ (Berghof, Německo)⁵. Parametry nastavení pro každou z výše uvedených metod a podrobný postup přípravy vzorku jsou uvedeny v literatuře¹, 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). 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).

Výsledky a diskuze

Stanovení vybraných prvků ve vzorcích kojenecké stravy

Pro zajištění nevyčýlených a správných odhadů klasických výběrových parametrů je zapotřebí, aby data splňovala požadované vlastnosti, mezi které patří normalita, nezávislost a homogenita^{2,3}. Jelikož bylo pomocí dostupných nástrojů exploratorní analýzy dat^{2,3} zjištěno, že se rozdělení některých ze studovaných výběrů systematicky odlišují od rozdělení normálního, provedena byla matematická transformace dat^{2,3}, která vede ke stabilizaci rozptylu a zesymetričtění rozdělení. Ačkoli robustní odhady do značné míry eliminují problémy spojené s přítomností odlehlých bodů a asymetrií v datech, nemusí být tento postup vždy korektní, jelikož robustnost spočívá v přiblížení se k přijatému modelu měření bez ohledu na jeho platnost^{2,3}. Případnou asymetrii v datech není vhodné eliminovat odstraněním odlehlých bodů, jelikož jednotlivá data představují cenné informace, jejichž ztráta by v konečném důsledku mohla vést ke zcela chybné interpretaci výsledků. Statistické charakteristiky stanovení vybraných elementů ve vzorcích kojenecké výživy vypočtené programem QC-Expert shrnuje tabulka 1. V tabulce jsou rovněž uvedeny údaje týkající se počtu odlehlých bodů nalezených v každém z výběrů, které indikují vzorky se statisticky významným rozdílem v koncentraci daného analytu ve srovnání s ostatními vzorky. Všechny analyzované vzorky kojenecké výživy splňovaly hodnoty obsahu vybraných prvků deklarovaných výrobcem. Žádný z prvků nepřesáhl hodnoty stanovené evropskou legislativou¹.

Tabulka I Statistické charakteristiky stanovení obsahu Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn (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 ($n = 21$)

	Počet OB	Minimum	Maximum	Průměr	Spodní mez IS	Horní mez IS	Průměr ^a	Spodní mez IS ^a	Horní mez IS ^a	Rozptyl	Směrodatná odchylka	Medián	Šikmost	Špičatost	p (test normality) ^b
Hg	1	0.35	4.33	1.48	0.92	2.03	1.00	0.71	1.44	1.47	1.21	1.12	0.97	2.87	0.132
Mg	0	309.1	607.3	447	413.6	480.3	445.6	412.6	479.2	5372	73.3	451	0.09	2.67	0.946
Fe	0	15.4	70.6	42.7	36.9	48.5	42.4	36.7	48.3	161.7	12.7	40.9	0,13	2.89	0.923
Na	3	141.4	2498	1408	1184	1631	1410	1186	1633	241667	491.6	1398	-0.06	4.55	0.962
Ca	1	2199	8641	4853	4235	5470	4736	4167	5356	1.84E+06	1357	4788	0.73	4.37	0.253
K	3	700	5977	4465	3993	4937	4645	4250	4968	1.08E+06	1037	4578	-2.31	9.61	0.004
Zn	1	9.42	53.6	38.4	33.3	43.5	39.9	34.8	44.4	125.7	11.2	38.02	-0.69	3.44	0.284
Mo	1	59.1	462.3	164.3	122.7	206	139.6	114.7	173.4	8368.5	91.5	130.6	1.72	6.34	0.018
Co	0	14.9	33	22.9	20.6	25.3	22.5	20.2	24.9	27.2	5.21	23.4	0.18	1.78	0.866
Cu	2	853.2	5422	2983	2550	3415	2977	2546	3411	9.03E+05	950.5	3116	0.06	4.22	0.961
Cs	0	4.2	22.3	10.4	8.0	12.8	8.90	7.24	11.1	28	5.3	8.4	0.82	2.58	0.200
Sr	0	1054	4095	2187	1819	2554	2001	1726	2351	6.52E+05	807.2	1869	0.8	2.66	0.213
Rb	0	269.6	6237	2263	1585	2940	2043	1459	2722	2.22E+06	1489	1987	0.72	3.48	0.261
U	0	1.02	13.23	5.56	3.74	7.38	4.38	3.16	6.04	15.96	4.0	4.61	0.77	2.31	0.229
As	2	2.11	39.96	12.76	7.62	17.89	9.26	6.92	12.6	127.1	11.27	9.19	1.99	6.34	0.009
Se	0	15.85	176.4	112.2	94.6	129.7	116.1	98.3	132.2	1490	38.6	118.8	-0.53	3.07	0.435
Pb	0	19.76	49.4	33.83	29.2	38.44	32.9	28.6	37.7	102.4	10.12	34.94	0.132	1.5	0.917
Sb	0	9.21	21.9	12.54	10.94	14.15	11.2	10.4	12.4	12.36	3.52	11.18	1.07	3.35	0.100
La	2	2.5	22.7	6.59	4.32	8.87	4.86	3.87	6.33	24.92	4.99	5.65	1.91	6.44	0.011
Ba	1	119.5	1029	373.2	273.6	472.9	312.8	248.8	399.1	47919	218.9	311.4	1.33	4.78	0.048
Cd	1	2.99	10.4	7.81	5.91	9.71	6.91	5.66	8.51	17.4	4.17	8.13	2.14	9.05	0.007
Li	0	0.81	39	15.61	10.86	20.4	14.06	9.91	18.88	108.7	10.43	12.76	0.48	2.35	0.490

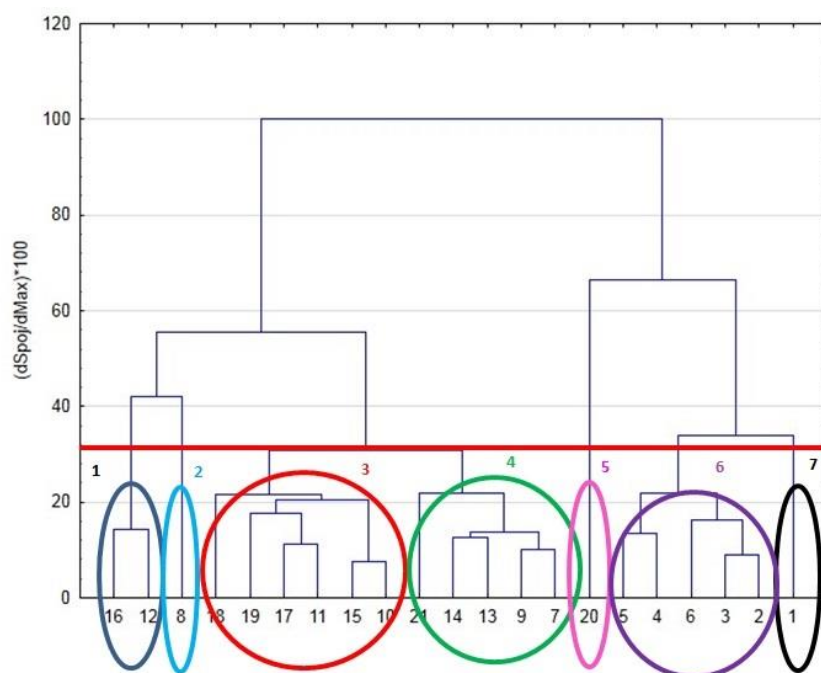
^a Odhad parametru získaný po exponencionální transformaci dat.

^b Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0.05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0.05 data nevykazují normální rozložení. OB odlehlý bod; IS interval spolehlivosti

Stanovení vybraných prvků ve vzorcích kojenecké stravy

Pro potřeby klasifikační analýzy vzorků byla použita metoda hlavních komponent, faktorová analýza a metoda shlukování¹⁻⁴. Data byla před vlastní analýzou standardizována. Standardizací jsou odstraněny veškeré případné vlivy rozměru sledovaných znaků jednotlivých objektů. Zdrojová matice dat obsahovala 22 sloupců (znaků) a 21 řádků (objektů). V daném experimentálním uspořádání byly výsledky statistické analýzy zatíženy do značné míry šumem¹. Bylo nejprve nutné identifikovat tzv. diskriminující znaky, tj. proměnné, které vykazují nejvyšší variabilitu a pro klasifikaci přispívají nejvyšší vahou. Za využití nástrojů faktorové analýzy, bylo určeno, že pro tento účel jsou vhodné zejména následující proměnné: Mg, Na, Ca, K, Zn, Mo, Co, Cs a Sb a La. Po redukci proměnných, bylo s použitím 3 faktorů objasněno více než 80% variability v datech. Podrobné výsledky analýzy jsou uvedeny v literatuře¹.

Pro klasifikaci objektů bylo dále použito metody hierarchického shlukování. Pro vlastní shlukování byla použita Wardova metoda^{2,3,4}. Dendrogram podobnosti objektů je uveden na obrázku 1. Z obrázku je zřejmé, že odlišné vlastnosti od skupiny analyzovaných vzorků vykazovaly zejména vzorky číslo 20, 21, 8 a 1. Vzorky číslo 20 a 1 (5. a 7. shluk) jsou vzorky kaší. Pro vzorek číslo 20 byly nalezeny výrazně vyšší koncentrace As a naopak významně nižší koncentrace Zn, Na či K. Vzorek číslo 1 rovněž vykazoval významně nižší koncentraci K (3100 mg kg⁻¹) oproti ostatním testovaným vzorkům (medián 4578 mg kg⁻¹).



Obr. 1 Dendrogram podobnosti vzorků náhradní mléčné kojenecké výživy

Podobně jako u vzorku číslo 20, byla i ve vzorku číslo 1 nalezena výrazně vyšší koncentrace As ($47 \mu\text{g kg}^{-1}$) oproti hodnotě mediánu testované skupiny vzorků ($9.19 \mu\text{g kg}^{-1}$). V prvním shluku byly obsaženy vzorky, které spadají do 3. kategorie kojenecké výživy. Čtvrtý shluk obsahoval vzorky č. 21, 14, 13, 9, a 7, které patří do kategorie 1. Objekty ve 3. a 6. shluku, obsahují vzorky spadající do 1. i 2. kategorie náhradní mléčné výživy.

Závěr

Z výsledků statistické analýzy souboru dat koncentrací vybraných elementů v náhradní mléčné kojenecké výživě vyplývá, že z analyzovaných prvků jsou pro klasifikaci vzorků nejvýznamnější Mg, Na, Ca, K, Zn, Mo, Co, Cs, La a Sb. Pro analýzu 21 vzorků spadajících do všech čtyř komerčně dostupných kategorií, za využití těchto diskriminujících proměnných, bylo s použitím faktorové analýzy vysvětleno více než 80 % variability v datech. Ačkoli vzorky mléčné výživy pro nedonošené děti (kategorie 0) byly od ostatních vzorků významně odlišeny, u ostatních kategorií tento trend nebyl již tak výrazný. Z hlediska obsahu analyzovaných prvků tak nelze jednoznačně prokázat rozdíly mezi danými kategoriemi. Tyto jsou pak spíše individuální, tedy závislé na konkrétním výrobku. Jelikož je v současné době prakticky nemožné v rámci zemí EU určit původ výrobku či suroviny pro jeho výrobu, není možné z výsledků analýzy usuzovat na možné souvislosti mezi obsahem vybraných analytů a zemí původu. Obsah prvků je navíc zřejmě dodatečně upravován výrobcí v souladu s požadavky výživy kojence.

Práce byla realizována díky finanční podpoře projektu SGSFChT 2016001 Univerzity Pardubice a projektu SVOČ-FChT 2016/2017 Univerzity Pardubice.

LITERATURA

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

J. Venclová, L. Husáková, T. Šídová, I. Urbanová (University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry): **Elemental analysis of infant formula**

A statistical study of factorial, principal component and cluster analysis on the element composition of four different types of commercially available infant formula was carried out to establish the relationships between the element concentrations and, therefore, differentiate the samples according to the type of milk. For this purpose the concentrations of 22 elements (Hg, Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd and Li) in 21 infant formula samples were determined by AAS and ICP-MS. The correctness of the determination was verified on the basis of an analysis of two certified reference materials (NCS ZC73015 Milk Powder and BCR 150 – Spiked Skim Milk Powder – Trace elements). After the factorial analysis, the dimension space was reduced from 22 variables to three factors, accounting for ~ 80 % of the total variance. The representation of the dendrogram or scores makes it possible to separate samples from category 0, however for other categories this effect is less pronounced.

Keywords: elemental analysis, infant formula, statistical data analysis, AAS, ICP-MS,