

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav technologie potravin**

---



**Využití NIR spektroskopie ke kontrole kvality potravinářských výrobků**  
Disertační práce

*Vedoucí práce:*

prof. Ing. Květoslava Šustová, Ph.D.

*Vypracoval:*

Ing. Lukáš Dvořák

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Využití NIR spektroskopie ke kontrole kvality potravinářských výrobků“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

Disertační práce je školním dílem a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího disertační práce a děkana Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně.

V Brně dne .....

Podpis doktoranda .....

Zpracovaná disertační práce byla finančně podpořena z prostředků Národní agentury pro zemědělský výzkum a specifického vysokoškolského výzkumu prostřednictvím projektů:

- 1) **NAZV KUS QJ1230044** – Stanovení parametrů pro legislativní hodnocení kvality a zdravotní nezávadnosti syrového mléka krav, ovcí a koz.
- 2) **NAZV KUS QJ1210302** – Technologické postupy a složení mléčných výrobků umožňující prodloužení údržnosti, zvýšení bezpečnosti nebo zvýšení nutričních a zdravotních benefitů prostřednictvím bioaktivních látek přirozeně se vyskytujících v potravinách.
- 3) **IGA TP 9/2013** – Konzervace syrovátky pomocí účinných látek z rostlin za účelem jejího dalšího využití.
- 4) **IGA TP 10/2014** – Zpracování syrovátky do potravin a produktů za pomoci konzervačních metod využívající účinné látky z rostlin.
- 5) **IGA IP 9/2013** – Možnosti využití spektroskopických metod při kontrole falšování potravin.

## **Velmi rád bych poděkoval**

školitelce, paní prof. Ing. Květoslavě Šustové, Ph.D. za odborné vedení mého doktorandského studia, cenné rady a připomínky při zpracování výsledků a při tvorbě této disertační práce. Velmi si také cením její vstřícnosti a podpory v nesnázích, které mě v průběhu doktorského studia potkaly.

Ing. Táně Lužové, Ph.D. vděčím za předání zkušeností s prací na spektroskopu FT-NIR Antaris a za cenné postřehy a doporučení při práci na tomto přístroji.

Paní Ladislavě Pospíškové za výpomoc při analýzách a pomoci během celého postgraduálního studia.

Doc. Ing. Antonínu Přidalovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků medů, za pomoc a cenné rady při jejich zpracování a analýzách a také při vyhodnocení výsledků.

Svým kolegům, Ing. Janě Teplé, Ing. Janě Strnkové, Mgr. Ing. Vladimíru Sýkorovi, Ing. Miroslavu Jůzlovi, Ph.D., doc. Ing. Šárce Nedomové, Ph.D. a ostatním spolupracovníkům na Ústavu technologie potravin Agronomické fakulty MENDELU v Brně, kteří mě podporovali v průběhu studia.

V neposlední řadě také děkuji svým rodičům a sestře, bez jejichž pomoci bych nemohl studovat. Poděkování patří také celé mojí rodině a ostatním přátelům za povzbuzení a ohledy během celého mého doktorského studia.

## ABSTRAKT

Cílem doktorské práce bylo ověřit a zhodnotit možnosti využití FT-NIR spektroskopie v kontrole kvality potravinářských výrobků. Kalibrace hodnotící kvantitu byly tvořeny za účelem stanovení chemických parametrů ovčího, kozího a kravského mléka, medu, kávy a dalších potravin a surovin. Základní chemické složky jako sušina, tuk, bílkoviny, laktóza, atd., byly stanoveny referenčními metodami a některé příbuzné hodnoty např. vlhkost, byly vypočteny na základě hodnot z referenčních analýz.

Vzorky hodnocených potravin byly měřeny na spektroskopu FT-NIR Antaris ve spektrálním rozlišení  $10\,000 - 4\,000\text{ cm}^{-1}$  s možnostmi měření vzorků v režimech reflektance, transmise či interaktance. Při tvorbě kalibrací byl využit algoritmus metody částečných nejmenších čtverců (PLS) a pro ověření kvality predikce kalibrací bylo využito křížové validace. Ve většině případů byly vyvinuty velmi dobré kalibrace. Přesto, že některé kalibrace byly méně přesné, byly použitelné alespoň pro orientační stanovení sledovaných parametrů. Výsledky práce potvrzují vhodnost FT-NIR spektroskopie pro využití v potravinářském průmyslu.

Kvalitativním hodnocení výrobků pomocí diskriminační analýzy byla ověřována schopnost FT-NIR spektroskopu zařadit snímaná spektra do předem definovaných tříd a tím stanovit rozdíly mezi skupinami vzorků. U pražené kávy byly stanoveny rozdíly mezi různými stupni pražení, dále byla zjišťována schopnost přístroje detekovat přídavek kravského mléka při výrobě kozích sýrů. Ověření ovlivnitelnosti přístroje bylo realizováno na kravském mléce, které bylo proměřováno při různých teplotách. I v těchto případech bylo potvrzeno, že FT-NIR spektroskopie je použitelná pro hodnocení kvalitativních vlastností potravin.

***Klíčová slova:*** kvantitativní a kvalitativní analýza, mléčné výrobky, med

## **ABSTRACT**

The aim of this thesis was to verify and evaluate the possibility of using NIR spectroscopy usage in food products quality control. The quantitative calibrations were developed to determinate of chemical parameters of sheep, goat and cow milk, honey, coffee and another food and raw materials. Basic components e.g. dry matter, fat, protein, lactose, etc., were established with reference methods and some related values e.g. humidity, were calculated based on the values of the reference analyzes.

Food samples were evaluated by the FT-NIR Antaris spectroscope in a spectral resolution of  $10\ 000 - 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$  with the possibilities of samples measurement in reflectance, transmittance or interactance mode. Calibration models were created by using a Partial Least Square algorithm (PLS) and also the cross-validation was used for the verification of the quality prediction of calibrations. Very good calibration were developed in most cases, and though some were less accurate calibrations are applicable to at least approximate determination of values. The results confirm the suitability of NIR spectroscopy for use in the food industry.

The ability of FT-NIR spectroscopy to classify sensed spectrum into predefined classes and thereby determine the differences between groups of samples was verified with a qualitative evaluation of products using with discriminant analysis. For roasted coffee were determined differences between different degrees of roasting, also was determined the ability of the device to detect the addition of cow's milk in the production of goat cheeses. A suggestibility verification of the device was realized with cow's milk, which was measured at various temperatures. It was confirmed that the NIR spectroscopy is also useful for the food quality evaluation.

***Keywords:*** *quantitative and qualitative analysis, dairy products, honey, fat*



# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>2 CÍL</b> .....	<b>14</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>15</b>
3.1 Historie infračervené spektroskopie .....	15
3.2 Spektroskopie v infračervené oblasti .....	17
3.2.1 Teorie a principy .....	17
3.2.2 Infračervené záření .....	18
3.2.2.1 <i>Vibrace a vznik spekter</i> .....	20
3.3 Infračervené spektrum .....	22
3.3.1 Infračervená spektra v potravinách .....	23
3.3.2 Získávání spekter .....	24
3.4 Přístrojové vybavení k měření NIR spekter .....	25
3.4.1 Disperzní infračervené spektroskopy .....	26
3.4.2 Spektroskopy s Fourierovou transformací .....	27
3.4.2.1 <i>Princip měření</i> .....	27
3.4.2.2 <i>Fourierova transformace</i> .....	29
3.5 Spektroskop FT-NIR Antaris .....	31
3.6 Programové a softwarové vybavení .....	34
3.6.1 Programové vybavení FT-NIR spektroskopu Antaris .....	34
3.6.2 Nejčastější zdroje chyb při tvorbě kalibrací .....	40
3.6.3 Techniky měření NIR spekter .....	41
3.7 Lambert-Beerův zákon .....	43
3.8 Příprava vzorků pro infračervenou spektroskopii .....	44
3.9 Výhody a nevýhody FT-NIR spektroskopie .....	45
3.9.1 Výhody techniky FT-NIR spektroskopie .....	45
3.9.2 Nevýhody techniky FT-NIR spektroskopie .....	46
3.10 Možnosti aplikace FT-NIR spektroskopie .....	46
3.10.1 Aplikace v kvantitativní analýze .....	46
3.10.2 Aplikace v kvalitativní analýze .....	48
3.10.3 Aplikace ve farmaceutickém průmyslu .....	50



3.10.4 Historie využití NIR spektroskopie v potravinářském průmyslu .....	51
3.10.5 Aplikace v potravinářském průmyslu .....	52
3.10.5.1 Hodnocení hlavních složek potravin .....	52
3.10.5.2 Hodnocení vedlejší složek potravin .....	53
3.10.5.3 Sledování falšování potravin .....	54
3.10.5.4 Sledování mikrobiologických procesů .....	55
3.10.5.5 Sledování senzorických parametrů .....	56
3.11 Chyby stanovení referenčních a instrumentálních metod .....	56
3.12 Chemometrie .....	59
3.12.1 Tvorba kalibračního modelu .....	59
3.12.2 Úprava spektrálních dat .....	62
3.12.2.1 První derivace .....	63
3.12.2.2 Druhá derivace .....	64
3.12.3 Redukce na velikost částic (Standard Normal Variate – SNV) .....	64
3.12.4 Úprava standardů pomocí Merge like standards (MLS) .....	65
3.12.4.1 Vícenásobná lineární regrese .....	65
3.13 Kvantitativní analýza .....	66
3.13.1 Metoda částečných nejmenších čtverců (Partial Least Squares – PLS) .....	66
3.14 Kvalitativní analýza .....	68
3.14.1 Diskriminační analýza .....	69
3.14.1.1 Mahalanobisova vzdálenost .....	69
3.15 Kritéria pro hodnocení spolehlivosti kalibračního modelu .....	70
3.15.1 Korelační koeficient (R) .....	71
3.15.2 Směrodatná odchylka kalibrace (Standard error of calibration – SEC) .....	72
3.15.3 Validace .....	72
3.15.3.1 Křížová validace (Cross-validation) .....	73
3.15.4 Směrodatná odchylka predikce (Standard error of prediction – SEP) .....	73
3.15.5 Kalibrační a predikční variační koeficient (Calibration and prediction coefficient of variation – CCV a PCV) .....	74

3.15.6	Funkce PRESS (Predicted residual sum of squares)	75
3.16	Identifikace odlehých spekter	76
3.17	Testování parametrů kalibrace	77
3.17.1	Párový t-test rovnosti středních hodnot	77
3.17.2	Dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu	78
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b>	<b>80</b>
4.1	Materiál	80
4.1.1	Mléko	80
4.1.2	Máslo	81
4.1.3	Med	82
4.1.4	Káva	85
4.1.5	Vliv použité referenční metody na přesnost měření tuku v mléce	87
4.1.6	Vliv teploty na přesnost měření	87
4.1.7	Detekce falšování sýrů	87
4.2	Metodika	89
4.2.1	Referenční analytické metody	89
4.2.1.1	<i>Mléko</i>	89
4.2.1.2	<i>Máslo</i>	89
4.2.1.3	<i>Med</i>	90
4.2.1.4	<i>Káva</i>	91
4.2.1.5	<i>Vliv použité referenční metody na přesnost měření         tuku v mléce</i>	91
4.2.1.6	<i>Vliv teploty na přesnost měření</i>	92
4.2.1.7	<i>Detekce falšování sýrů</i>	92
4.2.2	Měření na NIR spektroskopii	93
4.2.2.1	<i>Mléko</i>	94
4.2.2.2	<i>Máslo</i>	95
4.2.2.3	<i>Med</i>	95
4.2.2.4	<i>Káva</i>	96
4.2.2.5	<i>Vliv použité referenční metody na přesnost měření         tuku v mléce</i>	97
4.2.2.6	<i>Vliv teploty na přesnost měření</i>	97
4.2.2.7	<i>Detekce falšování sýrů</i>	98

4.2.2.8 Statistické vyhodnocení výsledků .....	98
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>100</b>
5.1 Kravské mléko .....	100
5.2 Kozí mléko .....	109
5.3 Ovčí mléko .....	114
5.4 Máslo .....	117
5.5 Med .....	127
5.6 Káva .....	135
5.7 Vliv použité referenční metody na přesnost měření tuku v mléce .....	141
5.8 Vliv teploty vzorku na přesnost měření .....	146
5.9 Detekce falšování sýrů .....	156
5.9.1 Analýza metodou ELISA .....	157
5.9.2 Analýza metodou FT-NIR .....	160
5.9.2.1 Diskriminační analýza .....	160
5.9.2.2 Kalibrace metodou PLS .....	162
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>167</b>
<b>7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>171</b>
<b>8 SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>203</b>
<b>9 SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>207</b>
<b>10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A ZNAČEK .....</b>	<b>209</b>

## 1 ÚVOD

Kvalita potravin, ale i surovin a meziproduktů, se stala velmi diskutovaným tématem, což je nepochybně dobře. Neustálý tlak na ceny a zisk nutí zpracovatelské podniky ke stále větší rentabilitě. Zákazníci, obchod a kontrolní orgány požadují stále se zvyšující kvalitu, bezpečnost a pestrou nabídku potravin, což zákonitě vede zpracovatelské podniky ke zvyšování kvality výrobků a zárukám za kvalitu. Není ale vždy jednoduché zajistit rychlé a efektivní analýzy pro kontrolu požadovaných parametrů kvality. Klasické metody jsou přesné a reprodukovatelné, ale mnohdy velmi zdoluhavé. Přesto ale tyto metody nelze opominout. Používají se jako standardizační metody ke kontrole správnosti a přesnosti výsledků získaných instrumentálními metodami nebo se s nimi doplňují. Klasické metody se také používají pro zpětnou verifikaci, kdy výrobek je již vyroben, zabalen a často již odeslán k prodeji. V celém sledu výroby potravin je nutno zajišťovat kontrolu surovin, výrobních procesů a finální kvality. Na tyto faktory reaguje i vývoj v analýze potravin s cílem pomalé metody nahrazovat, v operativní kontrole včetně finální kontroly, rychlými analytickými metodami. Proto se v poslední době stále více prosazuje použití metod, které jsou dostatečně vhodné pro rutinní analýzy, avšak časově nenáročné, a proto je lze použít přímo při výrobě potravin on-line v potravinářských provozech. Mezi tyto metody můžeme řadit i infračervenou spektroskopii v blízké oblasti (Near Infra-Red spectroscopy – NIRs), která je jednoduchá a přesná, s jejíž pomocí můžeme stanovit široké spektrum organických složek potravin, krmiv, produktů a souvisejících materiálů. Jedná se o rychlou, nedestruktivní metodu, která měří bez použití nebo s použitím minima chemikálií a při jednom proměření vzorku lze zjistit současně několik parametrů najednou.

NIR spektroskopie má bohaté užití také v medicíně a v mnoha průmyslových odvětvích, včetně farmaceutického, petrochemického, kosmetického a chemického průmyslu. Díky NIR spektroskopii je umožněno na základě získaných rychlých a přesných výsledků rychle upravovat a řídit výrobní procesy k dosažení požadovaných hodnot a složení výrobků, vyšší frekvencí analýz v průběhu výroby umožňuje při nenadálých změnách složení rychle upravovat výrobu, minimalizovat časové ztráty, dodatečné přepracování výrobků, snižovat skladovací náklady, zvyšovat produktivitu práce a ekonomiku celého podniku.

Spektroskopie v blízké infračervené oblasti je instrumentální metoda, která využívá vlnových délek 800 – 2 500 nm, tj. 12 500 – 4 000  $\text{cm}^{-1}$ . Principem metody je pohlcování nebo odraz různých vlnových délek dopadajícího záření, které závisí na chemickém složení

analyzovaného vzorku. S použitím vhodného softwaru je spektrum vzorku převedeno do kalibrační rovnice, ze které se statickými postupy vyhodnotí žádané parametry. Pokud jsou získané parametry kalibračního modelu spolehlivé, lze jej použít k analýze neznámých vzorků. Prostřednictvím vhodného softwaru poskytuje FT-NIR spektroskop velmi dobré výsledky, jak v oblasti kvantitativních, tak i kvalitativních analýz.

Disertační práce byla zaměřena na využití spektroskopie v blízké infračervené oblasti při hodnocení především mléčných výrobků. Hodnoceny ale byly i další potraviny např. med a káva. Disertační práce by měla přispět svými výsledky k potvrzení předpokladu, že NIR spektroskopie je vhodnou analytickou technikou v analýze surovin, meziproductů a produktů pro stanovení základních složek a je jí možno využít v případě rozlišování originality i falšování potravin.

## 2 CÍL

Cílem disertační práce bylo rozšířit a vyhodnotit možnosti užití FT-NIR spektroskopie při kontrole kvalitativních a kvantitativních parametrů potravin a potravinářských surovin.

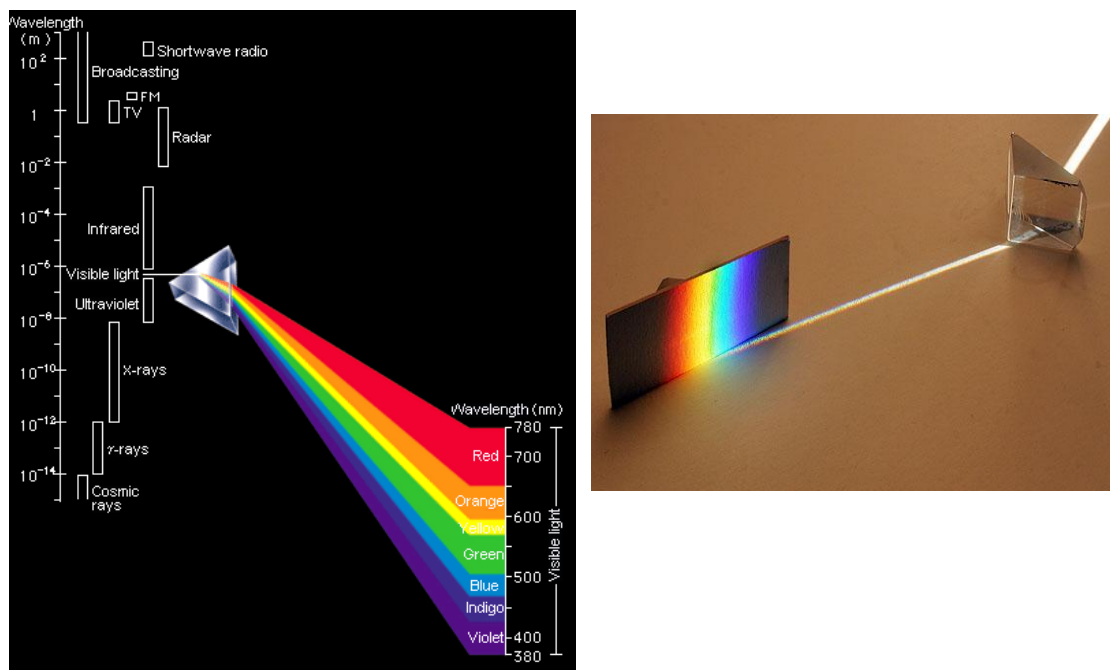
Pro disertační práci byly vytýčeny následující cíle:

- 1) Prostudovat dostupné odborné literární zdroje, které se zabývají studiem a možnostmi aplikací NIR spektroskopie.
- 2) Stanovit referenční hodnoty analyzovaných vzorků potravin (mléka a mléčných výrobků, medu, kávy) v chemické laboratoři s co nejvyšší přesností a následně vzorky podrobit analýze na NIR spektroskopu.
- 3) Otestovat ovlivnitelnost měření na NIR spektroskopu vnějšími vlivy.
- 4) Vytvořit kalibrační modely, popř. rozšířit a zdokonalit již existující modely, na základě porovnání referenčních hodnot a spektrálních charakteristik vzorků a jejich správnou funkci ověřit křížovou validací.
- 5) Výsledky statisticky vyhodnotit.
- 6) Ověřit citlivost FT-NIR spektroskopu metodou diskriminační analýzy při hodnocení předem definovaných tříd měřených vzorků stejných potravin a pomocí grafů vyhodnotit vytvořené kalibrační modely kvalitativní analýzy.
- 7) Vyhodnotit vhodnost užití metody FT-NIR v praxi.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Historie infračervené spektroskopie

Jan Marek Marci z Kronlandu (1595 – 1667) v roce 1648 popsal ve svém díle „*Thaumantias seu liber de arcu coelestipolis*“ podrobně rozklad světla. Je tedy zřejmé, že priorita tohoto objevu náležela Marcimu již 24 let před Isaacem Newtonem (VALNÍČEK, 2006). Před rokem 1800 nikdo netušil, že mohou existovat neviditelné formy světla, které jsou za hranicí viditelného spektra. Vlastní historie infračervené spektroskopie začíná v Anglii v roce 1800, pokusy astronoma Frederika Williama Herschla, známého svým objevem planety Uran (HART-DAVIS, 2011). Právě díky jeho pokusům, kdy zkoumal účinky slunečního záření rozloženého pomocí hranolu na spektrum, byl podán vůbec první důkaz o existenci části elektromagnetického spektra (Obr. 1). Za hranicí viditelné oblasti, za červenou složkou světla, ve svých pokusech naměřil nejvyšší teplotu a objevil tak novou oblast, která byla nazvána infračervená (PASQUINI, 2003).



Obr. 1: Rozložení světla na barevné spektrum pomocí optického hranolu (Konica Minolta, 2015)

Oblast NIR (Near Infra-Red) se pro spektroskopii nepovažovala za užitečnou až do začátku 2. světové války, protože pásy v NIR oblasti se překrývají a bylo obtížné a složité je interpretovat. NIR záření bylo objeveno podstatně dříve než MIR (Middle Infra-Red) záření,

navzdory tomuto faktu, druhý jmenovaný spektrální region získal po zveřejnění práce Williama Webera Coblentze v roce 1900 široký ohlas a využití. Coblentz v této práci vyvinul první infračervený spektroskop s použitím solného hranolu. Spektroskop se skládal z galvanometru napojeného na termoelektrický článek určený k detekci infračerveného záření v libovolné vlnové délce (WILLIAMS *et* NORRIS, 1990). Coblentz následně provedl mnoho studií, jejichž výsledky vedly k přesnému měření infračervených spekter pro stovky anorganických a organických látek (PASQUINI, 2003).

Prvotní studie v oblasti NIR spektroskopie se rozvíjely od roku 1938, kdy bylo popsáno stanovení obsahu vody v želatině. Jako první využil blízkou infračervenou spektroskopii k hodnocení složení pohonných hmot Paul Barchewitz. Dlouhou dobu ale tato instrumentální metoda nebyla analytickými výzkumníky používána (PASQUINI, 2003).

Zájem o analýzu v oblasti NIR vzrostl v 50. letech minulého století po zjištění, že vodíkové (X–H) vibrace jsou odpovědné téměř za všechny absorpční pásy v NIR oblasti. Tato skutečnost vedla v 60. letech k rozvoji metody monitorování obsahu vody v různých materiálech. Nejvýznamnější osobou historie NIR spektroskopie je Karl Norris, který zkoumal možnosti využití NIR spektroskopie při hledání nových analytických metod pro stanovení obsahu vody v zemědělských produktech (PASQUINI, 2003). Většina infračervených spektroskopů používaných do roku 1970 využívala jako monochromátor hranol nebo mřížku. Zásadním průlomem v infračervené technologii bylo zavedení infračervených spektroskopů s Fourierovou transformací (FT-IR). K významným osobnostem této doby tedy patří Jean Baptiste Joseph Fourier a následně i Albert Abraham Michelson, který v roce 1881 zkonstruoval interferometr. Kvůli složitosti matematické operace Fourierovy transformace se tento postup až do roku 1949 nevyužíval. Až roku 1952 francouzský fyzik Peter Fellgett zkonstruoval infračervený spektroskop s Fourierovou transformací, jehož součástí byl interferometr Michelsonova typu (VALNÍČEK, 2006). James Cooley a John Tukey objevili v roce 1964 rychlý algoritmus Fourierovy transformace, což umožnilo zkrácení času pro počítačový výpočet infračerveného spektra z hodiny na několik sekund.

Od roku 1983 byly dodávány první komerční filtrové přístroje se softwarem. Pro další rozvoj NIR techniky měl velký význam technický pokrok ve vývoji přístrojů a optických vláken, které umožnily delokalizaci měření pomocí optické sondy v pevných i kapalných materiálech. Významný vliv pro další rozvoj techniky NIR měl také pokrok ve výpočetní technice a vývoj nových matematických metod dovolujících globální zpracování obrovských datových souborů (MÍKA *et al.*, 2008).



I přes tento objev to byl stále dosti časově náročný proces. Interferogram byl zaznamenáván na papírové pásky nebo děrované karty, které bylo nutno odnášet do výpočetního střediska, kde se muselo čekat na výpočet a vykreslení spektra. Roku 1969 přišla významná změna, byl sestaven první komerční FT-IR spektrofotometr se zabudovaným speciálním minipočítačem. V infračervené spektroskopii bylo poprvé vidět vykreslené spektrum krátce poté, co byl změřen interferogram. V průběhu 2. poloviny 19. století a v první polovině 20. století byla infračervená spektroskopie natolik propracována, že se stala nepostradatelnou technikou v chemické a fyzikální laboratoři a také v řadě technologických oborů (VALNÍČEK, 2006).

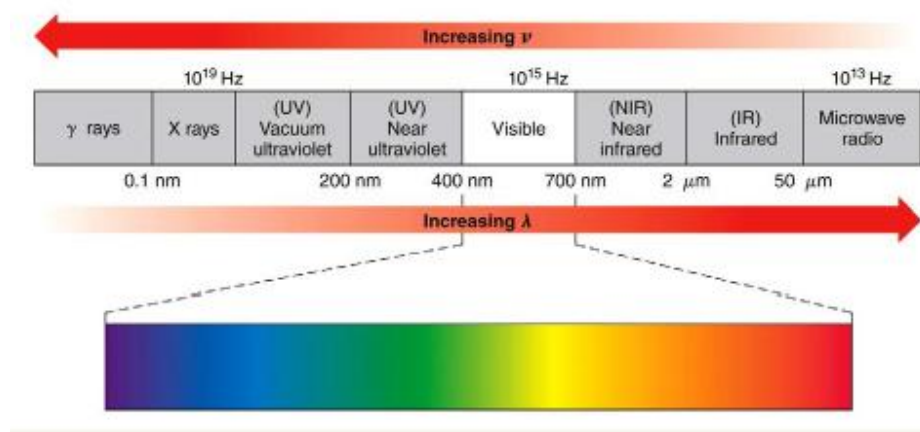
FT-IR spektroskopie se využívá v analýze potravin jak ke kvantitativnímu, tak i ke kvalitativnímu hodnocení. Spektroskopie v NIR oblasti se v potravinářství a zemědělství uplatňuje již od 60. let minulého století. Další uplatnění našla také ve farmacii, petrochemii, medicíně a při sledování kvality životního prostředí (CENTNER, 1999).

Použití NIR spektroskopie je také podmíněno současným rozvojem chemometrických metod, výkonné výpočetní techniky, která umožňuje statisticky vyhodnotit snímaná spektra v korelaci s analyticko-chemickými a fyzikálními vlastnostmi měřených vzorků (WILLIAMS *et* NORRIS, 1990).

## **3.2 Spektroskopie v infračervené oblasti**

### **3.2.1 Teorie a principy**

Metoda molekulové spektroskopie studuje, při jakých vlnových délkách dochází k pohlcení nebo vyzáření elektromagnetického vlnění molekulami (Obr. 2). Část energie tohoto elektromagnetického záření je pohlcována absorberem, což jsou dvouatomové vazby např. C–H, N–H, O–H, S–H, které jsou obsaženy v charakteristických skupinách látek, jako např. tuky, bílkoviny, sacharidy atd. Příčinou absorpce světla je změna rotačně-vibračních potenciálů těchto dvouatomových vazeb (BIEN, 2006). V uspořádání experimentu se měří závislost intenzity záření, které prošlo analyzovanou látkou na jeho vlnové délce. Výstupní záznam se označuje jako spektrum látky (KANIA, 2007).



Obr. 2: Rozdělení elektromagnetického spektra (KLEIN, 2014)

Tyto interakce jsou charakteristické změnami energetických stavů látky, tj. jsou spojeny s výměnou energie mezi látkou a zářením. Existují dva základní druhy energetické výměny. Snižuje-li se vnitřní energie látky, která současně emituje elektromagnetické záření, mluvíme o emisní spektroskopii. Zvyšuje-li látka svoji vnitřní energii a současně absorbuje záření, jedná se o absorpční spektroskopii (NOVOTNÁ, 1998).

### 3.2.2 Infračervené záření

Infračervené záření je elektromagnetické záření v rozsahu vlnočtů  $12\,500 - 20 \text{ cm}^{-1}$ , což odpovídá rozsahu vlnových délek  $800 - 0,5 \text{ nm}$  (KANIA, 2007). Nejpoužívanější jednotkou v infračervené spektroskopii je vlnočet, který je dán společně s vlnovou délkou a frekvencí vztahy:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

kde:

$\tilde{\nu}$  = vlnočet,

$\lambda$  = vlnová délka.

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

kde:

$\nu$  = frekvence,

$c$  = rychlost světla ve vakuu ( $3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ ),

$\lambda$  = vlnová délka.

Oblast infračerveného záření navazuje na jedné straně na záření viditelné a na druhé straně na záření mikrovlnné. Zažitou konvencí se, jak uvádí KANIA (2007), infračervená spektroskopie dělí z praktických důvodů podle vlnových délek záření na:

- vzdálenou infračervenou oblast (far infra-red, 50 – 1 000  $\mu\text{m}$  tj. 200 – 10  $\text{cm}^{-1}$ )
- střední infračervenou oblast (middle infra-red, 2,5 – 50  $\mu\text{m}$  tj. 4 000 – 200  $\text{cm}^{-1}$ )
- blízkou infračervenou oblast (near infra-red, 0,78 – 2,5  $\mu\text{m}$  tj. 12 800 – 4 000  $\text{cm}^{-1}$ )

Různí autoři rozdělují infračervenou oblast záření různými způsoby. V Tab. I. je uveden příklad rozdělení infračervené oblasti dle OSBORNE *et* FEAMA (1986).

Tab. I: Rozdělení infračervené oblasti dle OSBORNE *et* FEAM (1986)

Oblast	Charakteristika	Vlnová délka (nm)	Vlnčet ( $\text{cm}^{-1}$ )
<i>Blízká infračervená</i>	Overtony/kombinace	730 – 2 500	14 300 – 4 000
<i>Střední infračervená</i>	Fundamentální vibrace	2 500 – 5.10 <sup>4</sup>	4 000 – 200
<i>Daleká infračervená</i>	Rotace	5.10 <sup>4</sup> – 10 <sup>6</sup>	200 – 10

Energie fotonů infračerveného záření je dostatečná ke změně vibračního či rotačního potenciálu molekuly, ale nepostačuje pro excitaci elektronů v molekulových orbitalech. Hodnoty vibračních energií jsou dány pevností chemických vazeb a také molekulovou geometrií a hmotnostmi jader (KANIA, 2007). Příkladně u dvouatomové molekuly, např. u molekuly chlorovodíku (HCl), mohou vodíkové a chlórové atomy kmitat jen podél spojnice obou jader. Mimo tento pohyb navíc ještě rotují kolem osy procházející těžištěm molekuly kolmo na tuto spojnici. Při působení záření velmi malé energie (1 – 300  $\text{cm}^{-1}$ ) dochází k pohlcení záření, které je potřebné ke změně rotačních stavů molekul a ke vzniku rotačního absorpčního spektra. Při působení záření větší energie (300 – 4 000  $\text{cm}^{-1}$ ) dochází ke změně jak rotačních, tak i vibračních potenciálů molekul a ke vzniku vibračně rotačního infračerveného absorpčního spektra (KÖSSLER, 1960).

### 3.2.2.1 Vibrace a vznik spekter

Vibrační pohyb lze v případě dvouatomové molekuly popsat modelem harmonického oscilátoru (Obr. 3).

Stacionární stavy harmonického oscilátoru mají s vibračním kvantovým číslem  $n$  energii  $E(n)$  určenou vztahem:

$$E_{(v)} = h\nu(n + \frac{1}{2})$$

kde:

$h$  = Planckova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{31}$  J.s),

$n$  (0,1,2,3...) = vibrační kvantové číslo,

$\nu$  = frekvence.

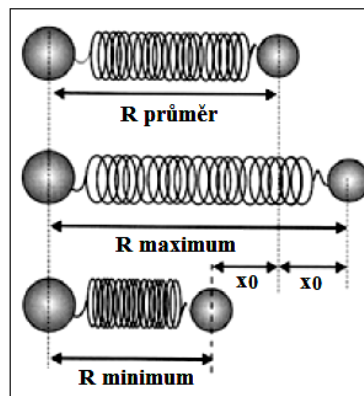
Za běžné teploty je většina molekul v tzv. základním stavu ( $n = 0$ ). Při absorpci elektromagnetického záření molekuly přecházejí do hladin s vyššími vibračními kvantovými čísly. Model harmonického oscilátoru je pouze hrubým přiblížením pro pohyb reálné dvouatomové molekuly, která se ale ve skutečnosti chová jako anharmonický oscilátor. Hladiny energie anharmonického oscilátoru jsou dány vztahem:

$$E(v) / h c = [(n + \frac{1}{2}) - x_e (n + \frac{1}{2})^2]$$

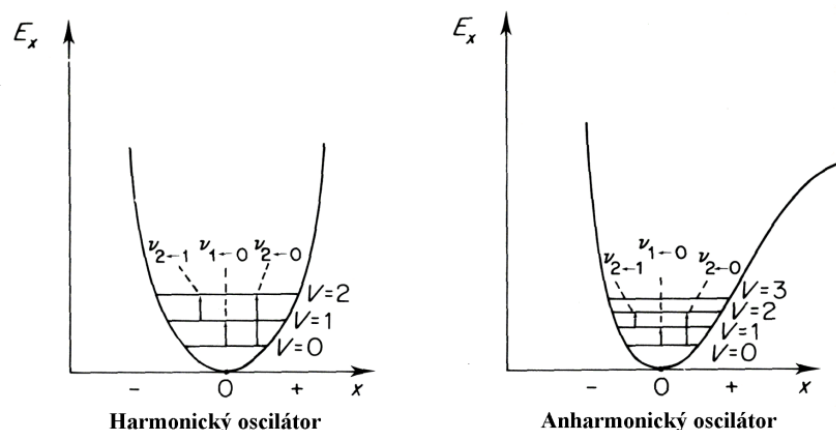
kde:

$x_e$  = konstanta anharmonicity, kdy pro jednoduché vazby leží její hodnota obvykle v intervalu 0,01 až 0,05.

Tento model vystihuje skutečnost, že rozdíly mezi sousedními hladinami nejsou konstantní, ale klesají s rostoucím kvantovým číslem (Obr. 4).

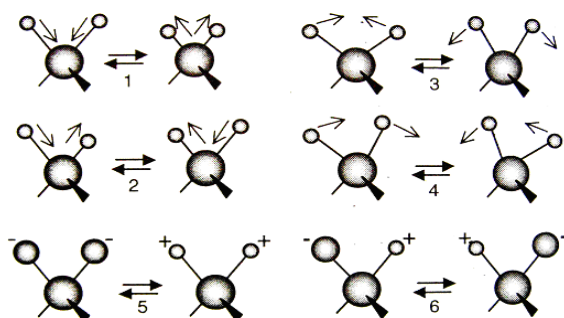


Obr. 3: Znárodnění modelu harmonického oscilátoru (MILDE, 2008a)



Obr. 4: Znárodnění křivky průběhu potenciální energie harmonického a anharmonického oscilátoru (KLOUDA, 2003)

Důležitou podmínkou, která je vázaná k absorpci, je, že během vibrace musí dojít ke změně dipólového momentu. Tato změna může vést ke zvýšení vnitřní energie molekuly díky absorpci elektromagnetického záření. Intenzita infračervených pásů je úměrná velikosti změny dipólového momentu. Dipólový moment a jeho změna úzce souvisí se symetrií molekuly, potom tedy zjišťujeme symetrii vibrací (symetrické a asymetrické vibrace). Se zvyšujícím se počtem atomů se vibrace molekuly komplikují, neboť vedle valenční vibrace, kterou u dvouatomové molekuly představuje natahování a smršťování délky vazby, může u víceatomové molekuly docházet k vibracím, kdy se mění i úhel mezi dvěma či více vazbami v molekule. Takové vibrace jsou označovány jako vibrace deformační (Obr. 5). Dvouatomové symetrické molekuly (např.  $O_2$ ), které mají ve všech vibračních stavech nulový dipólový moment, neabsorbují infračervené záření (VOLKA *et al.*, 1997).



Obr. 5: Znárodnění druhů vibrace skupiny  $-CH_2-$  (KLOUDA, 2003)

#### Rovinné vibrace:

- 1) Valenční symetrická
- 2) Valenční asymetrická
- 3) Deformační nůžková
- 4) Deformační kolébavá

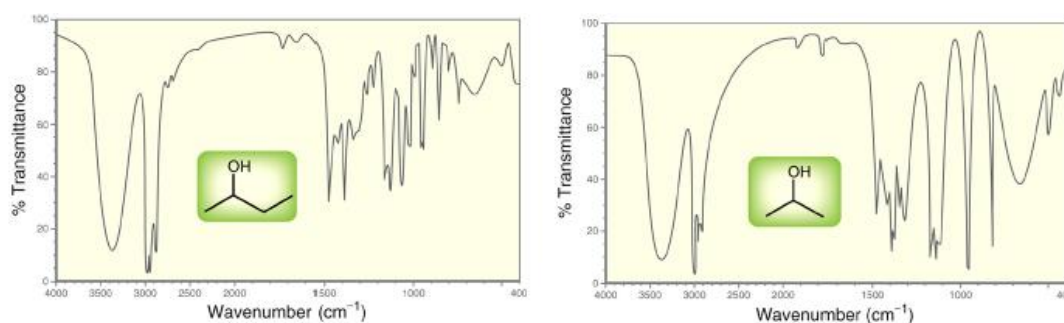
#### Mimorovinné vibrace:

- 5) Deformační křivá
- 6) Deformační kroutivá

### 3.3 Infračervené spektrum

Nejvýznamnější absorpční pásma, která se vyskytují v NIR oblasti se týkají svrchních tónů (700 – 1 800 nm) a kombinačních přechodů (1 800 – 2 700 nm) způsobených vibrací vazeb molekul, které obsahují zejména –CH, –NH, –OH a –SH funkční skupiny. Spektrum je pásové a pásy odpovídají různým typům vibračních přechodů. Rotační přechody nemají velký význam, lze je měřit v plynech. V kapalinách a tuhých látkách splývají v důsledku interakcí molekul v kontinuum. Infračervené spektrum se dělí na 2 oblasti (Obr. 6):

- oblast skupinových vibrací** tj. 4 000 – 1 000  $\text{cm}^{-1}$ . Tato oblast je využívána pro identifikaci funkčních skupin v molekule.
- oblast otisků prstů** tj. 1 000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ . Zde se nachází deformační vibrace, které jsou ovlivněné strukturou molekuly a umožňují identifikaci konkrétní organické látky (MILDE, 2008b).



Obr. 6: Změny průběhu spektra v obou oblastech při identifikaci skupiny –OH (KLEIN, 2014)

Jedná se tedy o molekulový otisk materiálu, z něhož je vzorek složený, díky čemuž známe jeho přesnou identifikaci a kvantifikaci. Z tohoto důvodu je NIR metoda jedna z prvních při volbě analýzy všech hlavních parametrů potravin tj. stanovení vlhkosti, tuku, bílkovin, škrobu, či aminokyselin (NIEMÖLLER *et* BEHMER, 2008). Ne vždy se podaří získat spektra, která jsou ihned použitelná k tvorbě kalibrací. Taková spektra je nutno upravit různými matematickými operacemi tak, aby vytvořená kalibrace z těchto spekter byla funkční a spolehlivá. Mezi nejčastější způsoby předúpravy spekter před kalibrací patří derivace spekter (MÍKA *et al.*, 2008). Derivované spektrum je vyjádřením derivovaných hodnot  $d^n A / d\lambda^n$  ( $n = 1, 2, \dots$ ), spektra  $A(\lambda)$  jako funkce vlnové délky ( $\lambda$ ). Častěji je ale využívána

druhá derivace  $d^2A / d\lambda^2$ . Po použití druhé derivace se původní pás zobrazí separovaně, zřetelněji, směřující směrem dolů. Nevýhodou derivací bývá zhoršení signálu šumu po každém rozlišování spektra (OZAKI *et al.*, 2007).

### 3.3.1 Infračervená spektra v potravinách

Spektra potravin jsou tvořena zejména absorpčními pásy skupin, které obsahují především chemické vazby, jako C–H, které jsou obsaženy v tucích, olejích či sacharidech dále vazby N–H obsažené v bílkovinách a O–H vyskytujících se ve vodě a v alkoholech (Obr. 7). Tyto skupiny jsou obzvláště důležité a užitečné pro kvantitativní analýzu (BERGLES, 2008). Potravinová spektra v NIR oblasti jsou obvykle široké pásy, které vznikají překryvem mnoha slabších absorpčních pasů, kdy difference mezi nimi jsou nepatrné a lidským okem nezaznamenané (MANLEY *et al.*, 2008).

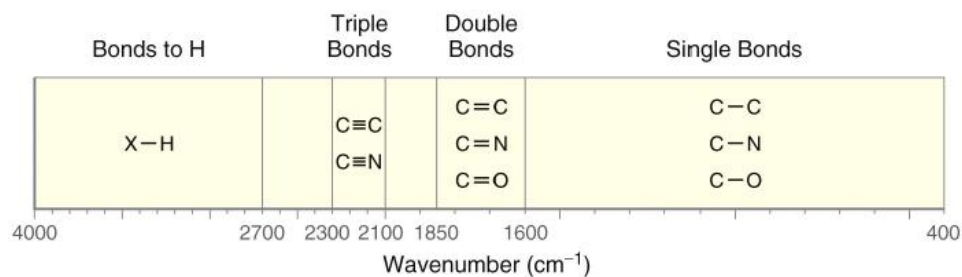
V současné době lze NIR využívat také k měření dietární vlákniny. Využívá se absorpčních pasů celulózy 2 336 nm a 1 544 nm. Dále je možné pomocí NIR zjišťovat organické kyseliny, etanol ve víně, pivu a to i během jeho výroby (MÍKA *et al.*, 2008).

V potravinách jako je mléko, maso, brambory nebo ovoce se obsah vody pohybuje v rozmezí 70 – 90 %. U těchto potravin se absorpční pásy vody objeví při vlnových délkách mezi 1 400 – 1 410 nm, což bylo pozorováno i u vzorků čisté vody. První úspěšná aplikace NIR v analýze zemědělských produktů a potravinářských surovin se týkala právě stanovení obsahu vody. Čistá voda má ve svém spektru pět absorpčních pasů (s maximy při 1 940, 1 450, 1 190, 970 a 760 nm při 20 °C). U vzorků obsahujících vysoký obsah vody (> 80 %) je přítomen dominantní absorpční pás vodíkové vazby mezi 1 440 a 1 930 nm, následkem čehož jsou komplikace při jejich analýzách (BENITO *et al.*, 2008).

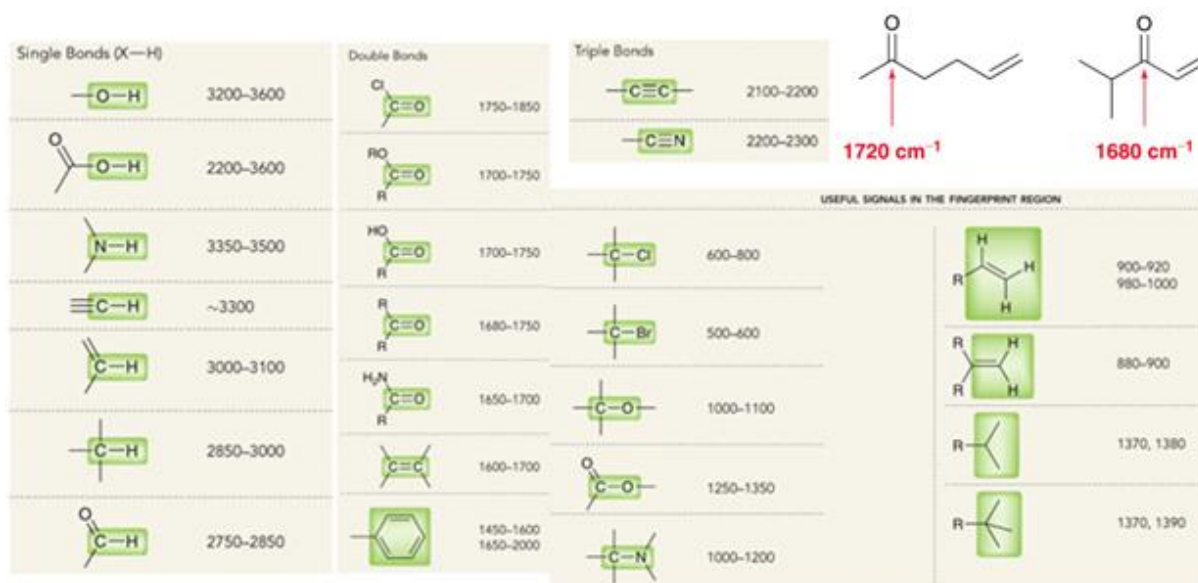
Ostré absorpční pásy, vzniklé z C–H skupin, lze pozorovat při vlnových délkách 2 310, 2 350 nm a při 1 730 nm. Vlnová délka 1 730 nm se překrývá s absorpčním pásem bílkovin (WEHLING, 2010).

Sacharidy jsou skupinou látek, která se v potravinách vyskytuje velice hojně a v nejrůznějších kombinacích. Protože všechny obsahují C–H a O–H skupiny, jejich spektra jsou si velice podobná. U přírodních ovocných šťáv se NIR spektroskopie nejčastěji využívá ke stanovení jednotlivých sacharidů. Celkový obsah sacharidů v ovocných šťávách může být měřen způsobem transmise při 2 200 nm. Sacharóza byla pomocí NIR techniky několikrát stanovena ve víně, čokoládě, v pekařském zboží a laktóza v sušeném mléce (WEHLING, 2010).

Historicky nejvýznamnější aplikací NIR spektroskopie se stalo stanovení bílkovin v pšenici. Vzorky s vysokým obsahem bílkovin absorbují více záření v regionech typických pro N–H skupiny, než vzorky s nízkým množstvím bílkovin. Absorpční pásy typické pro N–H skupiny v bílkovinách mohou být pozorovány například při vlnových délkách 2 060 a 2 180 nm ve spektru vajec. Je tedy zřejmé, že různé charakteristické skupiny se nachází v různých vlnočtech (Obr. 8).



Obr. 7: Charakteristické absorpční pásy a jejich vlnočty (KLEIN, 2014)



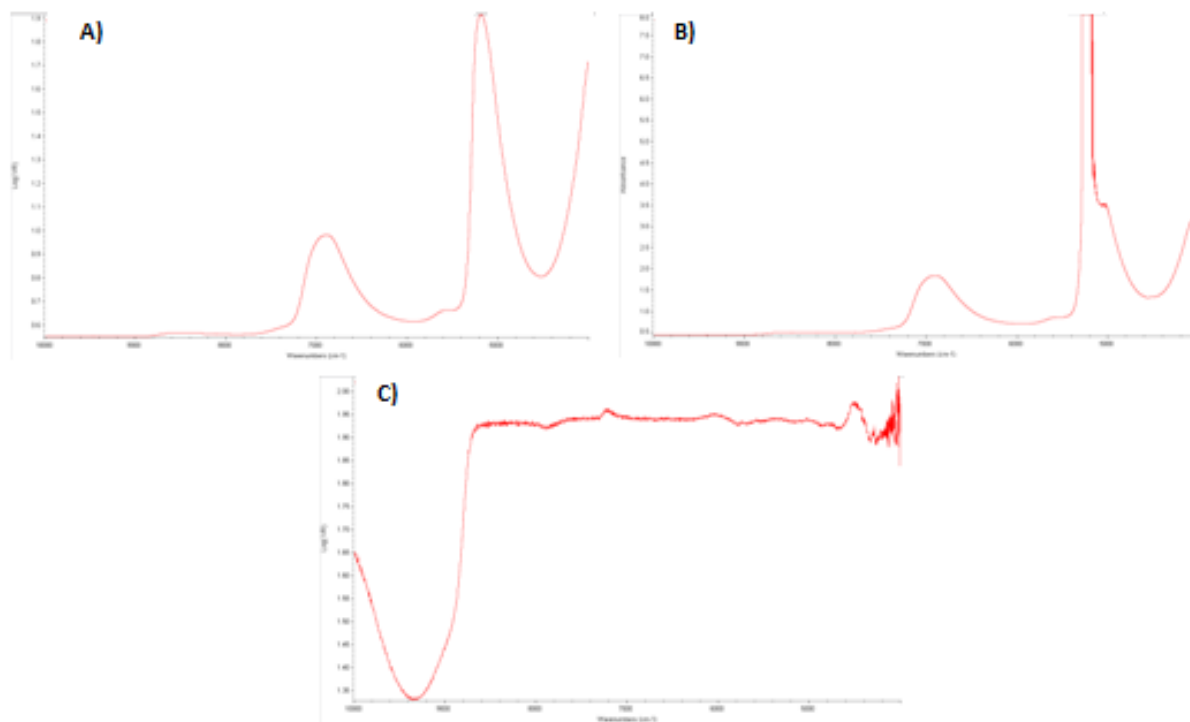
Obr. 8: Vlnočty, ve kterých se nachází dané charakteristické vazby (KLEIN, 2014)

### 3.3.2 Získávání spekter

Důležitými aspekty při získávání spekter je zacházení se vzorky a postup vlastního měření, který by měl být metodicky spíše pomalejší, aby bylo docíleno toho, že naměřené hodnoty nebudou vybočovat z řady. Teplota a vlhkost v laboratoři by neměly během měření



výrazně kolísat, pro vlastní měření je nevhodný průvan. Na konci měření je vhodné zopakovat kontrolu monochromátoru, abychom se přesvědčili o stabilitě přístroje. Při prohlížení spekter na obrazovce je třeba kriticky posoudit každou abnormalitu a získaná spektra je vhodné zálohovat (MÍKA, 1997). Průběh spektrální křivky je odvislý od zvolené metodiky měření (Obr. 9).



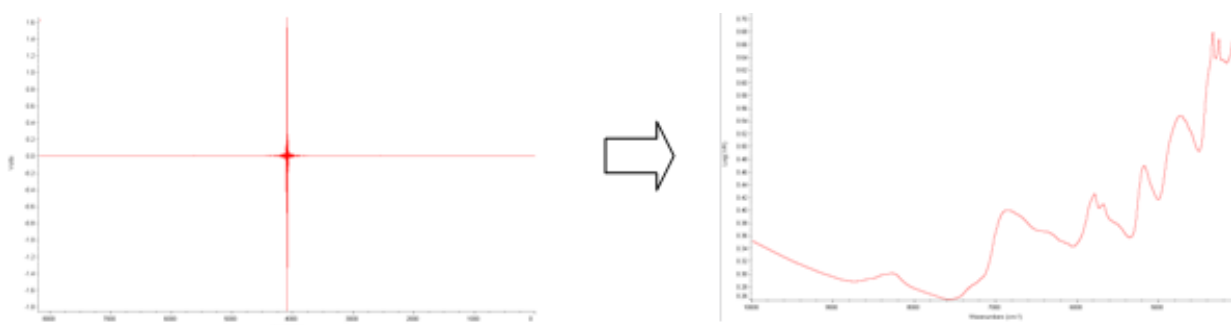
Obr. 9: *Infračervená spektra mléka získaná na A) Reflektanci; B) Transmisi; C) Interaktanci*

### 3.4 Přístrojové vybavení k měření NIR spekter

V současné době se k získávání spekter využívají spektroskopy s Fourierovou transformací, které pracují na principu interference záření, kdy se získaný signál převede na infračervené spektrum matematickou operací, která se nazývá Fourierova transformace. Tyto spektroskopy nahradily vývojově nejstarší skupinu přístrojů, což byly filtrové přístroje, které pracovaly pouze s určitými vlnovými délkami. Dále se v NIR spektroskopii používají disperzní spektroskopy, které obvykle zároveň pokrývají oblast viditelnou, případně i ultrafialovou, ale i tyto přístroje jsou nahrazovány spektroskopy s Fourierovou transformací. FT-NIR spektroskopy jsou užívány posledních 20 let. Díky interakci mezi vzorkem, referencí a optickými komponenty (zrcadla) jsou nastaveny energetické modely, vyvolávají

interferogramy, které jsou použity k výpočtu absorbance vzorku (McCLURE *et* TSUCHIKAWA, 2007).

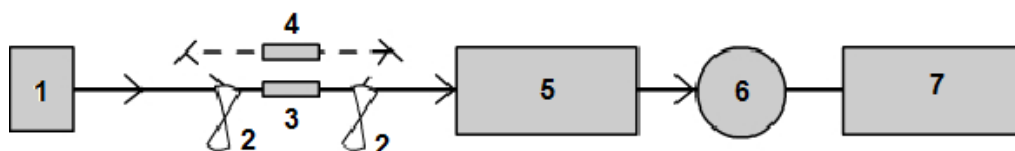
Prvotní signál tj. interferogram je složitou matematickou funkcí tzv. Fourierovou transformací převeden na infračervené spektrum (Obr. 10). Využitím Fourierovy transformace se významně zvyšuje citlivost, vlnočtová přesnost, rychlost a možnosti rozlišení (KLÍČ *et al.*, 2002).



Obr. 10: Převod interferogramu na infračervené spektrum u vzorku kávy

### 3.4.1 Disperzní infračervené spektroskopie

Tyto přístroje jsou konstrukčně starší a v dnešní době méně využívaným typem infračervených spektroskopů. Jsou konstruovány jako jednopaprskové, tj. využívaly pouze jeden vlnčet (Obr. 11) nebo dvouprskové. Zdrojem polychromatického záření bývá rozžhavená tyčinka a k rozkladu infračerveného záření dochází na odrazových kovových mřížkách. V dnešních přístrojích se používají pyroelektrické detektory, nejznámější TGS (triglycinsulfát) a DTGS (deuterovaný triglycinsulfát) nebo polovodičové detektory např. PbS a také MTC (Mercury – Cadmium – Telluride), který vyniká vysokou citlivostí a rychlou odezvou (NĚMCOVÁ *et al.*, 2004).



- |  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. Zdroj záření                          | 5. Monochromátor          |
| 2. Chopper (rotující zrcadlové segmenty) | 6. Detektor               |
| 3. Kyveta se vzorkem                     | 7. Vyhodnocovací zařízení |
| 4. Srovnávací prostředí                  |                           |

Obr. 11: Schéma jedno-paprskového disperzního infračerveného spektroskopu (KLOUDA, 2003)

### 3.4.2 Spektroskopy s Fourierovou transformací

Základem přístroje je interferometr nejčastěji Michelsonova typu. Výsledkem měření u tohoto přístroje není spektrum, ale tzv. interferogram, což je závislost odezvy detektoru na čas. Z interferogramu získáme spektrum teprve provedením tzv. Fourierovy transformace. Z hlediska měření se tudíž nejedná o spektroskopii, ale o interferometrii (VOLKA *et al.*, 1997).

#### 3.4.2.1 Princip měření

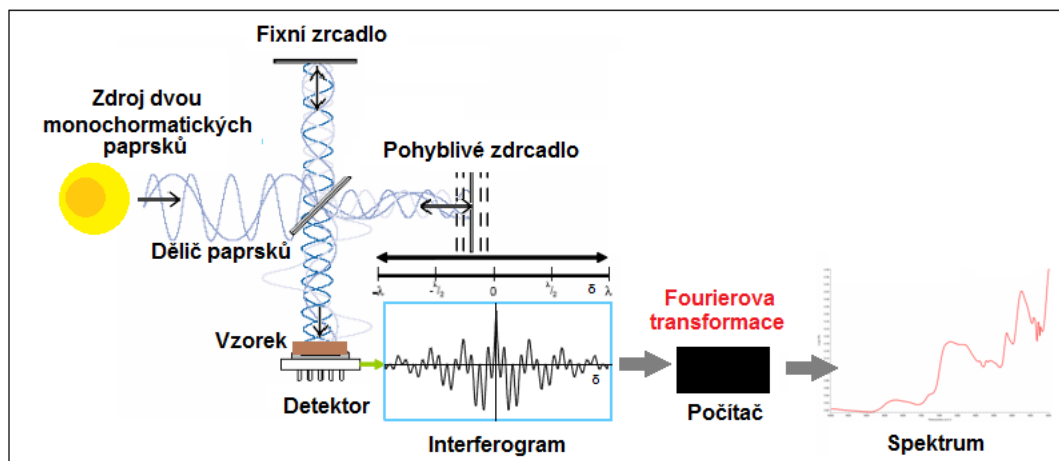
Metoda infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací je založena na spojení interferometru s citlivým detektorem a počítačem. Michelsonův interferometr zeslabuje, resp. zesiluje záření z polychromatického zdroje. Tento interferometr se skládá ze tří aktivních komponent tj. dvou na sebe kolmých zrcadel (pohyblivého a fixního) a beamsplitteru tj. polopropustný dělič svazku paprsků, který je umístěn mezi těmito zrcadly na linii  $45^\circ$  (HONNER, 2008). Jedním ze základních součástí v interferometrických spektroskopech je zdroj záření, což bývá keramická tyčinka např. z karbidu křemíku, anebo žárovka s wolframovým vláknem či halogenová žárovka, které při zahřátí emitují spojité záření v infračervené oblasti (KANIA, 2007). Nejhlavnější součástí spektroskopu je interferometr, jehož hlavními součástmi jsou, jak je psáno výše, dělič paprsků, pohyblivé a pevné zrcadlo (Obr. 12).



Obr. 12: Interferometr přístroje FT-NIR Antaris

Dělič paprsků, jímž záření prochází, musí mít vysokou propustnost i reflexi. Tuto funkci plní nejlépe tenké filmy materiálu s vysokým indexem lomu (např. oxid železitý). Takový film je nanesen na vhodný nosič, kterým je přesně vybroušený otvor nejčastěji z fluoridu vápenatého. Na velmi přesně řízeném pohybu pohyblivého zrcadla závisí správná funkce interferometru a to při rychlostech od několika  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  do stovek  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Při nepatrném výkyvu zrcadla svazky interferují a z tohoto důvodu jsou zrcadla umístěna na vzduchovém loži a správná poloha pohyblivého zrcadla je řízena helium/neonovým laserem (He-Ne laser), ten zajišťuje rychlé a přesné kmity. K detekci je používáno různých typů detektorů. Z důvodu neschopnosti infračerveného záření excitovat elektrony nejsou fotodetektory pro přímou detekci použitelné. Mezi nejčastěji používané detektory patří PbS, PbSe, InSb nebo InGaAs (KLOUDA, 2003). Do interferometru vstupuje paprsek z infračerveného zdroje. Na polopropustném zrcadle je paprsek rozdělen na dvě složky, z nichž se jedna odráží od zrcadla pohyblivého a druhá od zrcadla fixního. Geometrie interferometru je daná tak, že zrcadlo pohybující se po dráze „ $x$ “ uděluje procházejícímu paprsku tzv. dráhový rozdíl  $\delta$  a platí, že  $\delta = 2x$ . Uvnitř interferometru oba paprsky interferují. Interferencí se zesilují paprsky, které se setkají ve fázi. Postupně se mění vzdálenost pohyblivého zrcadla, a tím i vlnové délky zesíleného záření (KLOUDA, 2003).

Je-li do dráhy paprsku vložena kyveta s absorbujícím vzorkem, dochází k zeslabení záření charakteristických vlnových délek. Za komorou se vzorkem je umístěn detektor vhodný pro daný spektrální obor záření. V detektoru je umístěn fotočlánek, který mění dopadající světlo na elektrický signál (Obr. 13).



Obr. 13: Schematické znázornění interference dvou monochromatických vlnění na Michalsonově interferometru a jeho převedení na spektrum (KOZELKOVÁ, 2012)

### 3.4.2.2 Fourierova transformace

Fourierova transformace je převodem funkční závislosti intenzity signálu (snímaného detektorem) na posunu zrcadla do funkční závislosti intenzity signálu (transmitance, absorbance) na vlnočtu dle:

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\nu) \exp(i2\pi\nu\delta) d(\nu)$$

kde:

$I(\delta)$  = intenzita signálu na detektoru vzhledem k optickému dráhovému rozdílu  $\delta$ ,

$S(\nu)$  = intenzita záření v závislosti na vlnočtu  $\nu$ ,

$i$  = imaginární jednotka ( $i^2 = -1$ ).

Výpočet spektra  $S(\nu)$  je řízen dle vztahem:

$$S(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \exp(-i2\pi\nu\delta) d(\delta)$$

Zpětná Fourierova transformace vyjadřuje spektrum jako rozdíl sinu a cosinu, tedy platí

kde  $\theta$  nahrazuje výraz  $2\pi\nu$ .

Pokud zanedbáme imaginární část  $i \sin \theta \delta$ , získáme vztah:

$$S(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\nu\delta) d(\delta)$$

V praxi samozřejmě není možné zaznamenávat interferogram až do nekonečného dráhového rozdílu. Zrcadlo se pohybuje podle konstrukce spektrofotometru a určuje dráhový rozdíl až do hodnoty  $\delta_{max}$ . Rovněž interferogram je snímán jen z jedné strany, tedy od optického dráhového rozdílu  $\delta = 0$ . Předchozí rovnici lze tedy upravit do tvaru:

$$S(\nu) = \int_0^{\delta_{max}} I(\delta) \cos(2\pi\nu\delta) d(\delta)$$

Detektor neregistruje signál analogovým způsobem, ale snímá diskrétní soubor  $N$  hodnot intenzit signálu v daném časovém intervalu. Výsledný interferogram je složen z  $N$  bodů a Frouierovu transformaci interferogramu lze provést podle rovnice:

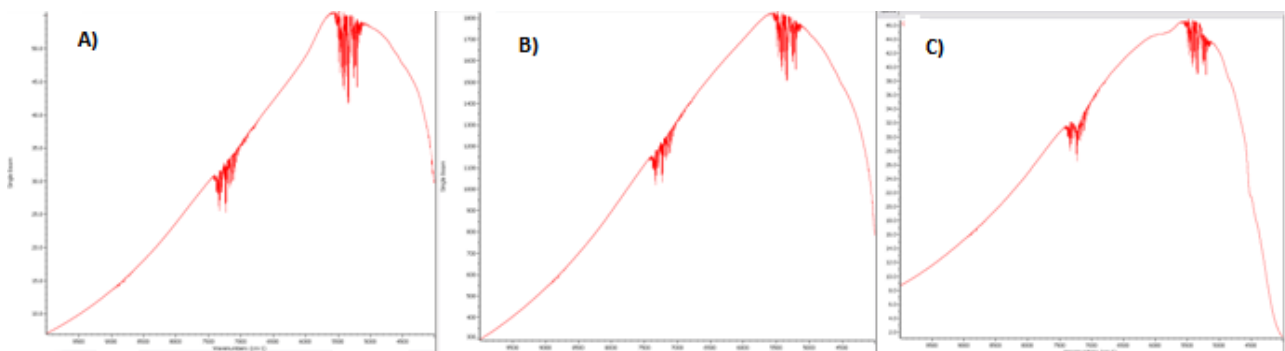
$$S(\nu) = \sum_{i=1}^m I(\delta_i) \cos(2\pi\nu_j \delta_i) \Delta\delta_i$$

kde:

$S(\nu_j)$  = intenzita záření na  $j$ -té pořadnici vlnočtu  $\nu_j$ ,

$I(\delta_i)$  = intenzita signálu z detektoru na  $i$ -té pořadnici dráhovém rozdílu  $\delta_i$ .

Výpočet vlastního spektra zahrnuje změření interferogramu bez vzorku (prázdná kyveta), čímž získáme referenční spektrum pozadí  $SB(\nu)$  které je charakterizováno spektrálními pásy vzdušné vlhkosti a oxidu uhličitého (Obr. 14).



Obr. 14: Referenční spektra pozadí přístroje: A) integrační sféra; B) transmisní kyveta; C) optická sonda

Po té je měřeno spektrum vzorku  $S_V(\nu)$ . Výsledné spektrum látky  $S_{\text{spec}}(\nu)$  je definováno vztahem:

$$S_{\text{SPEC}}(\nu) = \frac{S_V(\nu)}{S_B(\nu)}$$

Během Fourierovy transformace interferogramu na spektrum často dochází ke vzniku řady spektrálních artefaktů. Abychom obdrželi spektrum co nejlepší kvality, je nutné dodržovat přesně vymezená pravidla nastavení podmínek měření a výsledné spektrum dále upravit. Ke zhoršení kvality spektra dochází jednak vlivem instrumentace a jednak zvoleným výpočetním postupem (FERUS, 2006).

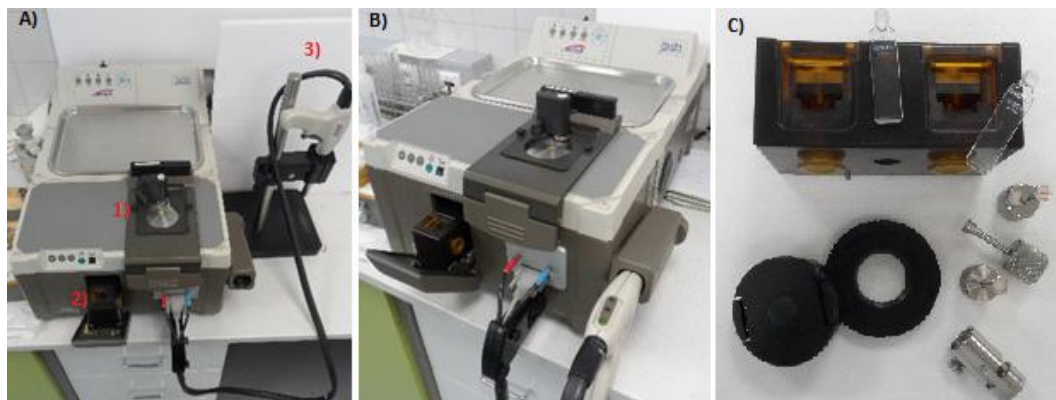
Spektroskopy s Fourierovou transformací mají několik výhod oproti klasickým disperzním nástrojům. Jejich hlavní předností je způsob získávání spektra, s čímž je spojena tzv. *Fellgettova multiplexní výhoda*. Na detektor dopadá v každém okamžiku simultánně záření v celém spektrálním rozsahu. Uvažujeme-li vysokou rychlost záznamu, získáme informaci o široké části spektra ve velmi krátké době. S přesností měření, která je závislá hlavně na kalibraci He-Ne laseru, je spojena tzv. *Connesova výhoda*. Veškeré záření po průchodu vzorkem či po odrazu od povrchu vzorku je přivedeno na detektor. Interferogram tak obsahuje veškeré spektrální informace, avšak v této formě nejsou příliš srozumitelné. Inverzní transformace provedená počítačem poskytne z interferogramu infračervené spektrum (NOVOTNÁ, 1998). Pro určení rozdílu optických drah v obou ramenech slouží laser s úzkou spektrální šířkou vyzařování. Jeho paprsek též prochází interferometrem a je snímán fotodiodou. Vysoká rozlišovací schopnost je určena technickou dosažitelností velkého dráhového rozdílu. V disperzním spektroskopu dopadá na detektor jen malá část záření. V FT-IR přístrojích toto omezení odpadá a optická průchodnost systému je limitována hlavně velikostí zrcadel a tento stav je označen jako *Jacquinotova výhoda* (McCARTHY *et* KEMENY, 2007).

### 3.5 Spektroskop FT-NIR Antaris

Tento přístroj slouží k převodu detektorem zaznamenaného interferogramu na infračervené spektrum. Spektroskop Antaris (Obr. 15) je FT-NIR analyzátor navržený speciálně pro použití v provozním prostředí potravinářského, chemického a farmaceutického průmyslu. Jeho unikátní konstrukce umožňuje jeho užívání jak v provozních,



tak laboratorních podmínkách pro kontrolu složení a uniformity produktů a meziproduktů, identifikaci vstupních surovin a verifikaci výrobků (NICOLET CZ, 2012).



Obr. 15: FT-NIR Antaris: A) Režimy přístroje 1) reflektance, 2) transmise, 3) interaktance; B) celkový pohled na přístroj; C) příslušenství přístroje

Spektroskop Antaris využívá detektoru zhotoveného z india, gallia, arsenidu (InGaAs). Tento typ detektoru poskytuje použitelná data v rozsahu  $12\ 000 - 3\ 800\ \text{cm}^{-1}$  (833 – 2 630 nm). Zdroj záření má výbornou propustnost a trvanlivost. Emituje paprsek bílého světla, který prochází přístrojem a je selektivně absorbován nebo odrážen vzorkem. Helium/neonový (He-Ne) laser je vybaven filtrem pro redukci síly a reflexe. Detektory instalované v spektroskopu Antaris jsou velmi citlivé, ale snímají-li příliš mnoho světla, mohou se nasytit nebo produkovat zkreslený signál. Zeslabovací kolo v přístroji slouží jako dva screeny pro limitování energie vysílané na vzorek. Počítač napojený na NIR spektroskop je vybaven softwarem zpracovávající změřená spektra. Měřit na FT-NIR Antaris lze s využitím těchto měřících modulů (NICOLET CZ, 2012):

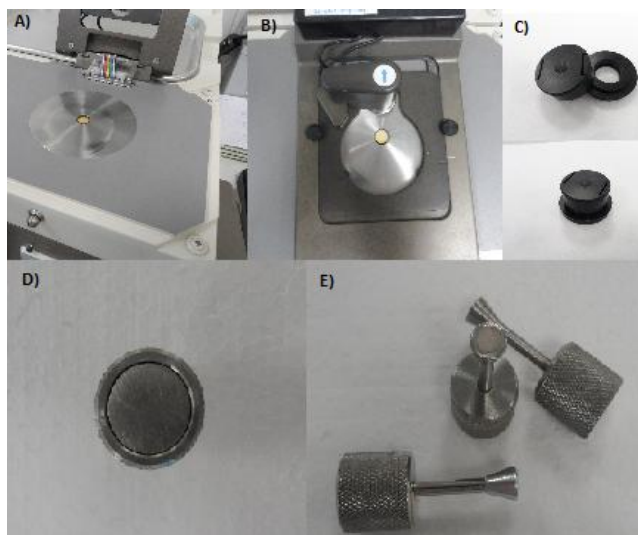
- 1) Režim transmisní – měření s využitím kyvet s různou optickou drahou (např.: 1 mm) v kyvetovém prostoru spektrofotometru (Obr. 16).



Obr. 16: Transmisní režim na FT-NIR Antaris: A) transmisní komora; B) kyvetový prostor; C) skleněná kyveta s optickou drahou paprsku 1 mm

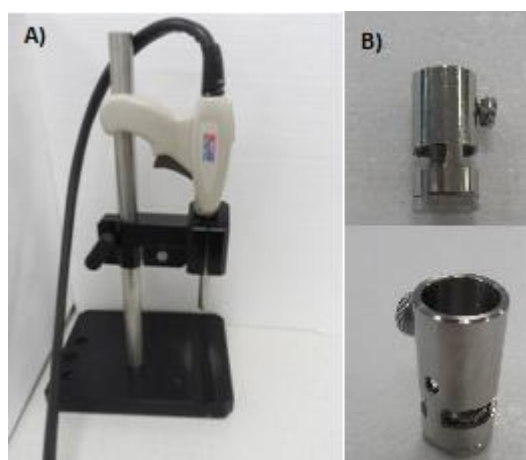


- 2) Režim reflektanční – měření na integrační sféře s využitím transflektančních kyvet disponujících kovovým zrcátkem ( $\varnothing$  1,5 cm) s různou výškou reflexní plochy ( $h = 0,2$  a  $0,3$  mm) anebo s použitím tzv. Sample Cup Spinner, což je rotující kompresní kyveta se skleněným dnem ( $\varnothing = 3$  cm) určená pro analýzu zejména nehomogenních vzorků (Obr. 17).



Obr. 17: Reflektanční režim na FT-NIR Antaris: A) integrační sféra; B) integrační sféra se spinnerem; C) kompresní kyveta; D) detail kovového zrcátka transflektanční kyvety; E) transflektanční kyvety

- 3) Režim interakтанční – využívá měření pomocí vláknové optiky v podobě optické sondy (Obr. 18).



Obr. 18: Interakтанční režim na FT-NIR Antaris: A) optická sonda; B) transflektanční nástavec na ústí sondy

### 3.6 Programové a softwarové vybavení

#### 3.6.1 Programové vybavení FT-NIR spektroskopu Antaris

K vlastnímu měření je důležité, aby počítač napojený na spektroskop disponoval jistými ovládacími softwary (Obr. 19). Tyto softwary jsou rozděleny podle toho, zda jsou schopny spektra získat a upravovat nebo naměřená spektra vyhodnotit. Hlavním softwarem při získávání spekter je program **Omnice**, který umožňuje nastavení měřicích parametrů spektroskopu, dále řídí vlastní měření a díky němu je možné provádět různé operace se spektry (NICOLET CZ, 2013). Dalším softwarem použitelným v NIR spektroskopii je **Result Integration**. Ten také slouží k nastavení měřicích parametrů a vlastnímu měření. Je použitelný i k základnímu zpracování naměřených spekter. Umožňuje integrovat kvantitativní i kvalitativní metody měření s jednoduchými datovými soubory, jejich archivaci a tvorbu uživatelských analytických podprogramů bez použití složitého programování nebo makro kódování (NICOLET CZ, 2006a).

Software **TQ Analyst** je důmyslný, snadno využitelný pro vývoj kvalitativních i kvantitativních metod NIR spektroskopie. Nastavené algoritmy (Obr. 20) umožňují výpočet koncentrace složek nebo identifikaci neznámých komponent za použití souboru kalibračních standardů (NICOLET CZ, 2011).



Obr. 19: Softwary využívané na FT-NIR Antaris: A) Omnic; B) Result; C) TQ Analyst

Pro kvantitativní analýzy jsou v TQ analyst využitelné tyto techniky (NICOLET CZ, 2006b):

- a) **jednoduchý Beerův zákon** – metoda využívá k tvorbě kalibračního modelu klasického Lambert-Beer-Bouguerova zákona, pro který platí, že za určitých předpokladů se absorbance u zvoleného spektrálního pásu zvyšuje přímo úměrně s koncentrací (NICOLET CZ, 2011). Tato technika vyžaduje měření plochy nebo výšky jediného pásu každé složky a platí, že každá složka musí mít alespoň dvě koncentrační hodnoty. Takto je pro každou složku vytvářena vlastní kalibrační závislost (NICOLET CZ,

2006b). Tímto způsobem je možno řešit jednoduché analytické problémy, které lze charakterizovat následovně (NICOLET CZ, 2011):

- pásy jednotlivých komponent se nepřekrývají,
- základní linie měření je stálá,
- závislost mezi absorbancí a koncentrací je lineární nebo téměř lineární,
- mezi komponentami není nebo je velmi malá chemická interakce,
- matrice vzorků je dobře definovaná,
- k dispozici je nejméně tolik standardů, kolik je stanovených složek směsi.

Jednoduchý kalibrační model se nazývá kalibrační křivka. Rozsah kalibrace by měl určovat i rozsah stanovení, to znamená, že koncentrace látky v neznámém vzorku by se neměla pohybovat „pod“ či „nad“ hranicemi kalibrační řady. Pokud je stanovena koncentrace mimo kalibrovaný rozsah, je nutno kalibrační metodu rozšířit o standard, který posune kalibrační rozmezí správným směrem (NICOLET CZ, 2011).

#### **VÝHODY METODY:**

- snadno pochopitelná matematická podstata,
- nevyžadují velké množství standardů.

#### **NEVÝHODY METODY:**

- metoda je nepoužitelná, pokud se pásy nebo oblasti komponent překrývají,
- je přesná pouze pro koncentrační rozpětí, pro které je kalibrační závislost lineární.

b) **CLS (Classical Least Squares** – klasické nejmenší čtverce) – tento algoritmus je podobný algoritmu pro tvorbu kalibrací podle Beerova zákona. Technika CLS však řeší alternativu možných překrývajících se pásů složek. Model kalibrace může být založen na ploše nebo výšce pásu, může být také použit soubor mnoha bodů ve spektrálním rozsahu, který je širší než konkrétní izolovaný pás. Technika je schopna pracovat s daty obsahující překrývající se pásy složek, protože kalibrační model vyjadřuje posuzované křivky jako lineární kombinaci absorbancí každé z přispívajících složek (NICOLET CZ, 2006b). Matematicky je CLS simultánní aplikace Lambert-Beerovy rovnice na vybranou oblast spektra.

Úspěch kalibrace je závislý na splnění těchto podmínek (NICOLET CZ, 2011):

- každá kalibrovaná komponenta má alespoň jednu měřenou oblast,
- každá složka přispívající k absorbanci v dané oblasti je zahrnuta jako komponenta do metody,
- počet kalibračních standardů je minimálně roven počtu komponent,
- koncentrace komponent v kalibračních standardech se musí měnit nezávisle,
- neexistují významné interakce mezi látkami ve směsi,
- vzorek je směsí známých látek, aby nedocházelo k příspěvkům neznámých komponent do spektra vzorků,
- vztah mezi koncentrací a absorbancí je lineární nebo má k linearitě blízko.

#### **VÝHODY METODY:**

- možnost využití pásů komponent, které se výnamně překrývají,
- potřeba menšího množství standardů než při použití PLS nebo PCR metody,
- přesnější výsledky než při použití Lambert-Beerova zákona, protože jsou využity všechny datové body v analytickém regionu pro výpočet a nikoliv jen např. výšky pásu.

#### **NEVÝHODY METODY:**

- nemůže řešit výskyt neočekávaných nečistot ve vzorku ovlivňujících matici,
- interference pro jednu komponentu mohou ovlivňovat i ostatní komponenty.

#### **c) SMLR (Stepwise Multiple Linear Regression – postupná vícenásobná regrese)**

- Regresní metoda slouží k modelování závislosti mezi kvantitativními znaky spojitého typu. Nejjednodušším případem je lineární závislost jedné veličiny, tzv. závisle proměnné **Y** na jiné veličině, tzv. nezávisle proměnné **X**. V praxi se ale často setkáváme se situací, že veličina **Y** může být vysvětlena lineární kombinací více proměnných tzv. regresorů **X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> ... X<sub>k</sub>** (kde  $k \geq 2$ ). V takovém případě se hovoří o mnohonásobné lineární regresi (NICOLET CZ, 2011). Tato technika vyjadřuje koncentraci jako funkci absorbance. Tímto se tato technika liší od CLS, která postupuje opačně. Tvořený kalibrační model technikou SMLR je založen buď na průměrné výšce pásů v regionu, nebo na výškách spektrálních pásů. Pro každou sledovanou složku je zvoleno více pásů nebo regionů, většinou 3. V každém regionu může být asociováno i více složek. SMLR automaticky postupně vyhledává regiony

pro první složku a pak teprve postupuje k dalším. Editace vybraných regionů není možná, je však možné vymezení oblasti vyhledávání regionů, omezení nebo zvýšení jejich počtu a určení minimální šířky a minimální vzdálenosti mezi regiony (NICOLET, 2006b).

#### **VÝHODY METODY:**

- nevyžaduje tolik standardů jako PLS nebo PCR,
- kompenzuje interkorelaci (vztahy mezi složkami směsi),
- je přesnější než Lambert-Beerův zákon,
- výhodou oproti CLS je, že každá složka směsi je kalibrována nezávisle,
- SMLR si umí poradit s nečekanými změnami ve vzorcích způsobenými například změnou výroby nebo nečekanými nečistotami ve vzorcích.

#### **NEVÝHODY METODY:**

- nevyrovná se s intenzivně se překrývajícími pásy,
- složky musí absorbovat lineárně s koncentrací.

d) **PLS (Partial Least Squares – částečně nejmenší čtverce)** – technika založená na statistickém pojetí kvantitativní analýzy. Algoritmus hodnotí zadanou část nebo části spektra komplexně. K tvorbě modelu využívá oblasti, které jsou statisticky proměnlivé jako funkce koncentrace dané složky. Při využití spektrálních a koncentračních informací v tabulce standardů je kalibrační model vyvinut v jednom kroku (NICOLET CZ, 2006b). Úspěch při vývoji kalibračního modelu je závislý na splnění těchto podmínek (NICOLET CZ, 2011):

- počet kalibračních standardů je minimálně trojnásobkem počtu hledaných komponent,
- všechny standardy by měly obsahovat všechny analyzované komponenty,
- koncentrace komponent ve standardech se musí měnit nezávisle tj. generace kalibračních standardů ředěním základního roztoku je nevhodné.

**VÝHODY METODY:**

- umožňuje kalibrace za použití pásů nebo regionů komponent, které se silně překrývají,
- řeší interference neznámých komponent,
- k výpočtům jsou použity všechny datové body v analyzovaném regionu,
- uživatel nepotřebuje specifikovat zvláštní oblast pro každou komponentu.

**NEVÝHODY METODY:**

- vyžaduje velké množství standardů,
- pochopení jejího matematického systému je složité.

e) **PCR (Principle Component Regression** – komponentní regrese) je další statistickou kvantitativní technikou, která, stejně jako PLS, zkoumá vybranou oblast nebo oblasti měřených spekter, ale probíhá ve dvou krocích. Prvně jsou spektrální informace využity k výpočtu tzv. hlavních komponent (PC - principal components). V následujícím kroku je již vytvořen kalibrační model jako závislost PC na koncentraci stanovených komponent (NICOLET CZ, 2006b). K definici vhodného experimentálního postupu při kvalitativní klasifikaci vzorků je nutné nejprve posoudit následující faktory (NICOLET CZ, 2011):

- počet materiálů, které musí zvolený algoritmus rozlišit,
- počet standardů dostupných pro definici každého známého materiálu,
- kvalita spektrální informace dostupná pro neznámé vzorky a standardy.

**VÝHODY METODY:**

- umožňuje kalibrace komponent, jejichž pásy nebo regiony se silně překrývají,
- může řešit interference neznámých komponent,
- je přesnější, protože pro výpočet jsou použity všechny datové body v regionu.

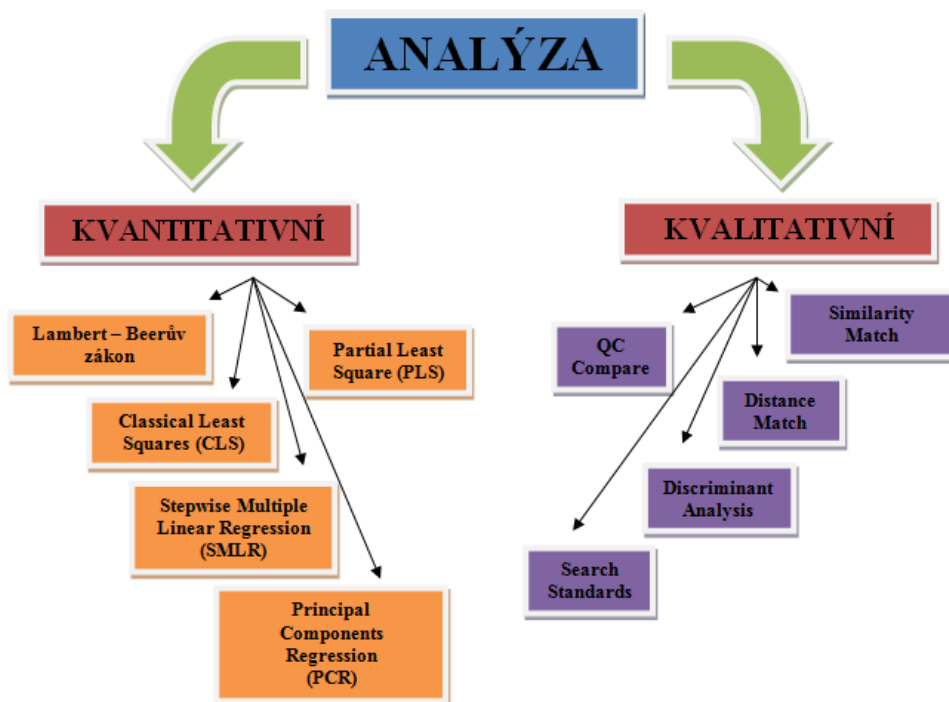
**NEVÝHODY METODY:**

- vyžaduje mnoho standardů,
- pochopení jejího matematického systému je obtížné,
- jestliže regrese není provedena po označení PC, nejsou tyto brány v úvahu při výpočtu koncentrací.

Pro tvorbu kvalitativních kalibračních modelů software TQ Analyst nabízí následující techniky:

- a) **Similarity match** (test podobnosti) je klasifikační technika, která zjišťuje, jak přesně se neznámý materiál shoduje s materiálem známým. Za použití více standardů je definována jedna třída, ale srovnání může probíhat současně ve více regionech. Výsledkem je tzv. „match value“ (hodnota ztotožnění), která se uvádí ve formátu 0 – 100, kde 100 je perfektní shoda anebo 100 – 0, kde je perfektní shodou 0. Pro výstup lze určit limitní hodnoty, a tak označovat vzorky, které jsou pod (nebo nad) limitní hodnotou (NICOLET CZ, 2011).
  
- b) **Distance match** (test odlehlosti) definuje, jak moc se hodnocený vzorek shoduje s jednou ze dvou či více tříd známých materiálů. U této metody existuje doporučení použití minimálně 5 standardů pro každou třídu. Spektra všech standardů by měla být velmi podobná a měla by se lišit jen v intenzitách pásů v několika klíčových oblastech (NICOLET CZ, 2006b). Spektrum stanoveného vzorku je porovnáváno s průměrným spektrem tříd a sleduje se, zda se neodchyluje více než jednotlivé standardy. Výsledkem je opět „match value“ v intervalu 100 – 0, kde perfektní shodou je 0 (NICOLET CZ, 2011).
  
- c) **Discriminant analysis** (rozlišovací analýza) určuje nejpodobnější třídu neznámému materiálu. Kalibrační model specifikuje více tříd, přičemž každá třída je tvořena libovolně zvoleným počtem standardů. Pro analýzu může být použito i několik oblastí posuzovaného spektra (NICOLET CZ, 2011). Výsledkem je název třídy nebo tříd, které jsou nejpodobnější posuzovanému vzorku. Součástí výsledku může být i tzv. Mahalanobisova vzdálenost tj. vzdálenost hodnoceného spektra od těžiště každé třídy, což je elegantní způsob kvantifikace kvality neznámého materiálu.
  
- d) **Search standards** (vyhledávání standardů v knihovně) hledá, který ze známých materiálů je nejpodobnější neznámému vzorku. Pro definici známých látek je použit vždy jeden standard. Knihovny do skupin nelze slučovat a pro vyhledávání může být použito několik spektrálních regionů. Výsledkem je název nejpodobnějšího standardu a jeho index s hodnotou je 0 – 100, přičemž 100 je perfektní shoda (NICOLET CZ, 2006b).

e) **QC compare search** (srovnávání s třídami standardů) je metoda, které vyhledává třídu standardů nejpodobnější analyzovanému vzorku. Hlavní je definice nejméně dvou tříd, kdy každá může obsahovat více standardů. K analýze je opět možné využít i více vybraných spektrálních regionů (NICOLET CZ, 2011). Výsledkem je jedna nebo více nejpodobnějších tříd a „match value“, což je vlastně procento shody v definovaném regionu s nejpodobnějším standardem ve třídě. Ideální shoda je 100 % (NICOLET CZ, 2006b).



Obr. 20: Algoritmy určené ke kvantitativní a kvalitativní analýze na FT-NIR

### 3.6.2 Nejčastější zdroje chyb při tvorbě kalibrací

Při vývoji kvantitativní metody se uživatel, nezávisle na typu metody, může dopustit několika základních typů pochybení. Jestliže se vyvinutá kalibrační metoda vyznačuje významnou chybou, může se jednat o jeden z následujících problémů (NICOLET CZ, 2011):

- a) **Koncentrace komponent ve standardech byla stanovena nekorektně** – přesnost kalibrační metody se přímo odvíjí od přesnosti stanovení koncentrace jednotlivých komponent standardů srovnávací metodou. Je-li např. přesnost této metody 1 %, stanovení pomocí NIR, modelem, vytvořeným na základě koncentračních dat



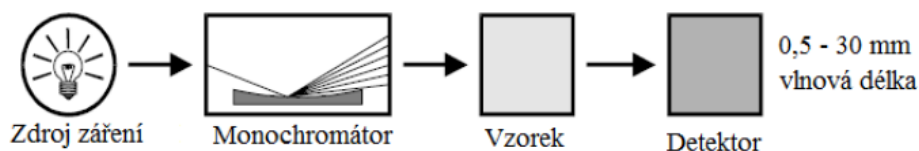
získaných s touto přesností, pak nemůže být přesnější. Před vývojem kalibrační metody je vhodné seznámení se s referenční metodou a její chybou.

- b) **Koncentrace komponent ve standardech byla chybně vložena do tabulky standardů** – nejčastějším zdrojem tohoto problému je chybné kopírování kvantitativních dat. Ochranou je zvýšená pozornost při kopírování dat a následně jejich namátková kontrola.
- c) **Standards dobře nepopisují funkci absorbance vs. koncentrace** – počet potřebných standardů je závislý na použitém typu výpočetního algoritmu.
- d) **Kalibrační spektra standardů jsou nekvalitní** (špatné vzorkování, vysoký šum, velká absorbance atd.) – tato problematika souvisí se způsobem měření spekter standardů. Pro jednotlivé techniky existují různá doporučení a různé způsoby optimalizace měření spekter s ohledem na jejich kvalitu.
- e) **Byl zvolen nevhodný typ optické vrstvy**

### 3.6.3 Techniky měření NIR spekter

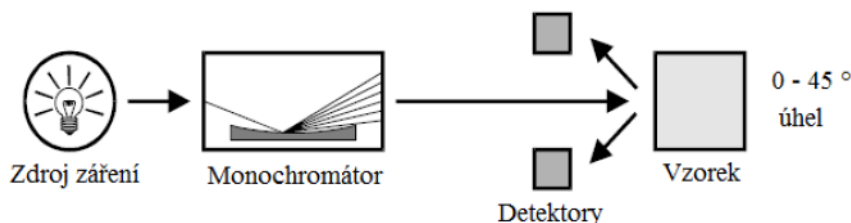
Podle využívaných fyzikálních jevů lze techniky měření NIR spekter rozdělit na dvě skupiny, od kterých se dále odvíjejí ještě další různé metody měření (Obr. 23):

A) **Transmise** - měří absorpci záření po průchodu vzorkem (Obr. 21)

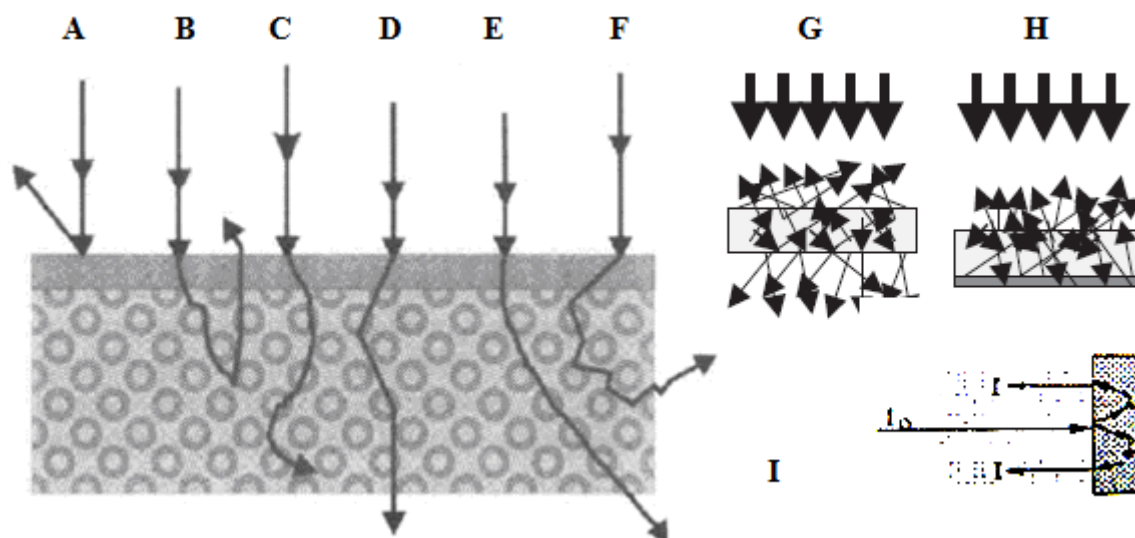


Obr. 21: Režim *transmise* (MILDE, 2008b)

B) **Reflektance** - technika měřící absorpci záření po odrazu paprsku od povrchu vzorku (Obr. 22).



Obr. 22: Režim reflektance (MILDE, 2008b)



Obr. 23: Vzájemné působení blízkého infračerveného záření s pevnými částicemi ve vzorku

A) *spekulární reflektance,*

E) *refrakce,*

B) *difúzní reflektance,*

F) *rozptyl (GIVENS et al., 1997),*

C) *absorpce,*

G, H) *transflektance (REICH, 2005),*

D) *transmitance,*

I) *interaktance (WILSON, 1994).*

**Spekulární reflektance (A)** – tato technika může být použita k měření nerovnosti povrchu.

Když úhel odrazu je stejný jako úhel dopadu záření a povrch je „dokonale“ hladký, pak vzorek absorbuje jen malou nebo žádnou energii. Nerovnosti povrchu způsobují odklon odraženého paprsku. Odchylku odklonu lze snadno změřit a získat tak informaci o povrchu vzorku. Protože tedy nedochází téměř k žádné interakci záření se vzorkem, obsahuje odražené záření velmi málo informací o složení vzorku.

**Difúzně reflektanční spektroskopie (B)** – metoda předpokládající, že měřený vzorek je nehomogenní, dochází zde k rozptylu záření a pouze část odražené energie je

zachycena na detektorech. Část odražené energie, dříve než je zachycena detektorem, projde více nebo méně vzorkem. NIR reflektanční přístroje využívají integrační koule nebo více než jeden detektor, aby zaznamenaly co největší část odraženého záření. Difúzní reflektance je nejpoužívanější technikou v NIR spektroskopii.

**Měření transmittance (D)** – metoda využívaná pro získávání spekter kapalných, případně kašovitých vzorků.

**Transflektanční technika (G, H)** - je určena pro měření transmittance s přístroji, které zpracovávají pouze reflektanční spektra. V tomto případě záření prochází vzorkem dvakrát, než dopadne na detektor. Z tohoto důvodu není tato metoda vhodná pro měření vzorků s vysokou optickou hustotou.

**Interaktance (I)** – technika představující měření, při kterém je zaznamenáváno pouze záření procházející vzorkem. Získaná spektra neobsahují ani spekulární ani difúzně odražené záření. Ideální je použití vláknové optiky, která je schopna vyzařovat energii a zároveň ji snímat přímo z povrchu vzorku. Optický kabel je svazkem křemenných světlovodných vláken, z nichž některá vedou záření ke vzorku a jiná zpět k detektoru (ČURDA *et al.*, 2002).

### 3.7 Lambert-Beerův zákon

V klasické absorpční spektroskopii platí pro vztah koncentrace látky v kapalném roztoku a absorpenci tzv. Lambert-Beerův zákon (HORÁK *et* PAPOUŠEK, 1976, Obr. 24) kdy platí vztah:

kde:

$$I_1 = I_0 \cdot 10^{-\alpha c l}$$

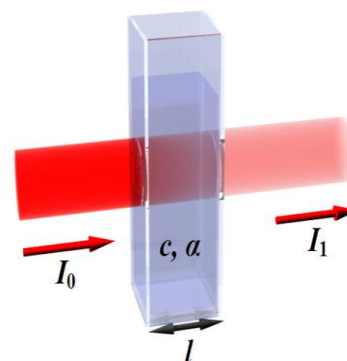
$I_1$  = energie prošlá vzorkem látky,

$I_0$  = energie dopadající na vzorek,

$\alpha$  = absorpční koeficient,

$c$  = koncentrace analytu,

$l$  = tloušťka vrstvy vzorku.



Obr. 24: Vizualizace Lambert-Beerova zákona  
([en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org))

Z rovnice je možné odvodit vztah pro transmitanci „ $T$ “ a absorbanci „ $A$ “. Klesá-li intenzita dopadajícího monochromatického záření „ $I_0$ “ po průchodu absorbujícím prostředím na hodnotu „ $I$ “, je propustnost (transmise) „ $T$ “ definována vztahem:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad T = \frac{I}{I_0} \cdot 100 (\%)$$

Hodnoty „ $T$ “ jsou vždy menší nebo rovny 1 a většinou se udávají v procentech. Množství pohlceného záření neboli absorpce „ $A$ “ se rovněž uvádí v procentech a je dána vztahem:

$$A = \frac{(I_0 - I)}{I_0} \cdot 100 (\%)$$

Množství pohlceného záření závisí na tloušťce vrstvy dané látky ( $d$ ), popř. na koncentraci ( $c$ ) látky. Podle Lambert-Beerova zákona platí:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c d$$

kde:

$E$  = optická hustota (absorbance, extinkce),

$\varepsilon$  = dekadický extinkční koeficient.

### 3.8 Příprava vzorků pro infračervenou spektroskopii

Přípravy vzorků zahrnují techniky fixace optických látek do transmisních cel, tvorbu vrstvených filmů na okénka, KBr tablety či filmy vytvořené za tlaku a tepla (BEATEN *et al.*, 2002). Vzorek je možno měřit v plynném, kapalném a tuhém stavu (PRAUS *et al.*, 2001). Plynné vzorky nebo látky s vysokou tenzí par se měří ve skleněných nebo kovových válečcích, které mají na obou koncích transparentní okénka (NaCl, KBr), při běžné tloušťce vrstvy cca 10 cm. Dráhu paprsku lze pomocí zrcadel a následným opakovaným odrazům paprsku prodloužit až na několik metrů (POSPÍŠIL, 2004). Z technického hlediska je měření spekter plynů poměrně jednoduché. Pouze měření spekter par málo těkavých sloučenin je poněkud složitější úlohou (HORÁK *et VÍTEK*, 1980). Vlastnosti kapalin jsou variabilnější než vlastnosti plynů. Velmi jednoduchá je práce s kapalinami, které jsou vazké a mají malou

tenzi par. Pro měření kapalin se obvykle používají křemenné kyvety s optickou drahou 1 – 10 cm v omezeném rozsahu do  $2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ . Nerozpustné tuhé látky se měří ve formě tenkých vrstev na skle nebo na hladině rtuti po odpaření rozpouštědla, případně přímo v kompaktní tuhé fázi. Pevné vzorky se nejčastěji měří technikou KBr tablet. Principem je smísení malého množství vzorku se 100násobným množstvím jemně rozetřeného KBr a následného lisování směsi pod vysokým tlakem tj. 2 GPa (POSPÍŠIL, 2004). Jinou technikou je příprava olejové suspenze ve speciálním parafínovém oleji, zvaném nijol. Nevýhodou této přípravy je přítomnost C-H pásů nijolu. Používaná je i technika měření odraženého záření od reflexní vrstvy např. olej, vrstva barvy apod., na kterou je nanesen vzorek. Záření prochází vrstvou vzorku, dopadá na reflexní plochu, od které se úplně odráží, opět prochází vzorkem a je zachyceno detektorem. Tato metoda se nazývá technika zeslabeného úplného odrazu tj. Attenuated Total Reflexion – ATR (PRAUS *et al.*, 2001). Dnes se již běžně v laboratořích používají nedisperzní přístroje s tzv. Fourierovou transformací.

### 3.9 Výhody a nevýhody FT-NIR spektroskopie

#### 3.9.1 Výhody techniky FT-NIR spektroskopie

Nespornou výhodou infračervené spektroskopie je, že se jedná o metodu nedestruktivní, tj. vzorek se neničí, ani není třeba jej upravovat přidávkem chemikálie a k analýze je vyžadováno jen malé množství vzorku. Po proměření ho lze bez problémů zkonsumovat, jedná-li se o potravinu, či jinak dále používat. Velkou výhodou je také rychlost, protože spektrum lze naměřit během několika málo minut či desetin sekund, dále mnohonásobná analýza s použitím jednoho spektra tj. že při jednom měření lze zjistit současně několik parametrů najednou (McCLURE *et* TSUCHIKAWA, 2007). Výhodou je i snadná obsluha přístroje, není třeba kvalifikovaných pracovníků. V porovnání s infračervenou spektroskopií ve střední oblasti lze pomocí NIR měřit přes transparentní obaly (ŠIKOLA, 2002), a tudíž je možno tuto metodu zařadit do on-line kontroly kvality surovin, meziproductů i finálních výrobků. Metoda se hodí k analýze vzorků s vysokou vlhkostí, ale také pro látky pevné a sypké. K referenčním metodám, podle kterých je NIR analyzátor kalibrován poskytuje NIR velmi podobné výsledky, co se týče přesnosti (MÍKA *et al.*, 2008). Vytvořená kalibrace na jednom přístroji může být přenesena k měření a získávání výsledků na jiném přístroji bez úprav.

### 3.9.2 Nevýhody techniky FT-NIR spektroskopie

Přes velké množství výhod má ale i tato technika své nevýhody. Jako velká nevýhoda, kterou je nutno uvést, je velmi vysoká pořizovací cena přístroje (CENTNER, 1999). Spektra získaná na NIR spektroskopu jsou obtížněji interpretovatelná a proto je nutné tato spektra zpracovávat příslušným softwarem. Technika NIR se nehodí pro stanovení minoritních látek ve směsích. Přesnost vytvořených metod může být ovlivněna použitou referenční metodou. Pro získávání kalibrační závislosti je potřeba použít velké množství vzorků, s čímž jsou spojeny vyšší náklady na vytvoření kalibračního modelu (BLANCO *et* VILLARROYA, 2002). Na druhé straně jsou vyšší náklady na kalibraci vyváženy skutečností, že takový model přináší dostatečnou informaci pro identifikaci odlehlých výsledků a zjištění interferujících látek ve vzorcích (ŠIKOLA, 2002).

### 3.10 Možnosti aplikace NIR spektroskopie

V mnoha průmyslových odvětvích je blízká infračervená spektroskopie již používána. Jedná se o odvětví průmyslu farmaceutického, petrochemického, kosmetického a chemického. Jediné obory, kde se NIR spektroskopie uplatňuje již od 60. let jsou potravinářský průmysl a zemědělství. Metoda má téměř všestranné použití v analýze potravin, protože potraviny se z více jak 99 % skládají z vody, bílkovin, sacharidů a tuků. Tyto obsahové složky je NIR spektroskopie schopna stanovit téměř ve všech případech. Aplikace NIR spektroskopie je však mnohem širší a mimo chemického složení zahrnuje i stanovení senzoričkových vlastností a fyzikálně-chemických parametrů jako např. pH, °SH, hustota, velikost částic atd. V současné době se NIR spektroskopie uplatňuje zejména pro hodnocení kvality a autenticity surovin, meziproductů i potravin. Metoda NIR spektroskopie ovšem nemůže být považována za univerzální metodu, protože není vhodná pro stanovení např. minoritních složek (ČURDA *et al.*, 2002).

#### 3.10.1 Aplikace v kvantitativní analýze

Na stanovení hlavních složek ve vzorku je zaměřena většina kvantitativních aplikací NIR spektroskopie. Obecně platí detekční limit okolo 0,1 % (m/m), pro některé specifické aplikace a při příznivé matici vzorku a analytů mohou být dosaženy nižší detekční hodnoty

(PASQUINI, 2003). Rovnici, která může být použita pro predikci množství komponenty přítomné v potravíně, z jeho spektrálních dat popsal WEHLING (2010) následovně:

$$\text{složka (\%)} = z + a \log (1/R\lambda 1) + b \log (1/R\lambda 2) + c \log (1/R\lambda 3) + \dots 4$$

kde:

$\log (1/R)$  = data ve spektrech při jiné vlnové délce vynásobené koeficientem, přičemž každý koeficient a úsek osy vymezený průsečíkem ( $z$ ) jsou určeny multivariační regresní analýzou.

Mnoho případů umožňuje stanovit více složek vedle sebe bez nutnosti dělit složité směsi, a to přímo ve výrobním procesu. NIR spektroskopie se tedy řadí mezi tzv. procesní analytické metody, kdy je kladen důraz ne na přesnost, ale na rychlost analýzy včetně možnosti zavedení kontinuální on-line analýzy ve výrobním procesu (MATĚJKA, 2006). Parametry, které jsou podloženy referenční hodnotou sledované komponenty (např. obsah N podle Kjeldahla) jsou nejlépe predikovatelné, zatímco predikce obsahu složek na základě vlastností v několika stupních laboratorní práce (např. vlákniny) bývá méně reprodukovatelná a při regresní analýze s cílem odvodit dobrou robustní kalibraci činí určité problémy. Obecně se ve spektroskopii, v rámci transmisních měření, vychází z platnosti Lambert-Beerova zákona, kdy pro každou jednotlivou složku platí vztah:

$$A_{\lambda,i} = \varepsilon_{\lambda,i} \mathbf{b} \mathbf{c}_i$$

kde:

$A_{\lambda,i}$  = příspěvek  $i$ -té složky k celkové absorbanci při  $A_{\lambda}$  dané vlnové délce  $\lambda$ ,

$\varepsilon_{\lambda}$  = molární absorpční koeficient  $i$ -té složky při dané vlnové délce  $\lambda$ ,

$\mathbf{b}$  = optická tloušťka absorbujícího prostředí,

$\mathbf{c}_i$  = koncentrace  $i$ -té složky ve směsi.

Celková absorbance „ $A_{\lambda}$ “ dané vlnové délce „ $\lambda$ “ je součtem příspěvků od všech „ $m$ “ nezávislých složek zkoumaného systému:

$$A_{\lambda} = \sum_{i=1}^m A_{\lambda,i}$$

### 3.10.2 Aplikace v kvalitativní analýze

Kvalitativní analýza slouží ke klasifikaci vzorků podle jejich NIR spekter, např. identifikaci a kvalifikaci surovin i konečných produktů. NIR spektroskopie je dobrým nástrojem při určování autenticity, stáří či falšování potravin, kde je cílem spíše klasifikovat, než provádět kvantitativní analýzy (JIRSA *et al.*, 2008). Falšování potravin a nesprávné označování výrobku existuje již u prvního nabízení potravin k prodeji, ale nedávno se však falšování potravin stalo sofistikovanější (KAROUI *et De* BAERDEMAEKER, 2007). Potravinu nebo jejich složky o vysoké ceně, či podstupující řadu zpracovatelských kroků, jsou nejpravděpodobnějším cílem falšování z důvodu možnosti náhrady kvalitní suroviny za levnější náhražku (KAROUI *et al.*, 2005). Hlavní myšlenka aplikace NIR spektroskopie při odhalování pravosti potravin tkví v generování spektroskopického otisku potravin, přičemž každý měřený materiál se od sebe liší v závislosti na odrůdě, ročním období, roku nebo místě výroby (MANLEY *et al.*, 2008). DOWNEY (1996) publikoval práci, ve které shrnul možnosti aplikace NIR spektroskopie pro testování autenticity kávy, ovocné dřevě, sušeného mléka, pomerančového džusu, těl jatečně opracovaných prasat, rýže, masných výrobků, rostlinných olejů, pšenice a pšeničné mouky. Jednou z možností, na které mohou být tyto aplikace založeny je např. technika diskriminační analýzy, kdy je problematika řešena srovnáváním spekter testovaných vzorků se spektrem vzorku v příslušné knihovně, kdy tato knihovna má obsahovat příklady spekter známých autentických a falšovaných vzorků. Nejjednodušší případ je otázka, zda měřený vzorek patří do některé ze dvou skupin tj. zda se podobá vzorkům v knihovně, či ne. Základem pro posuzování je výpočet spektrální vzdálenosti. Čím je tato vzdálenost blíže k nule, tím více jsou látky podobné, pokud ovšem je vzdálenost větší, potom vzorky nejsou shodné. Častou nutností při vlastní klasifikaci je použití většího množství různých tříd, identifikovat druh falšování, např. přídavek invertního řepného cukru do medu, anebo určit stupeň úpravy výrobku, např. přídavek rostlinného tuku do mléčného výrobku (OSBORNE, 2001). K vizualizaci dat automaticky probíhajících klasifikačních metod lze použít např. metodu hlavních komponent (PCA – Principal Component Analysis) s cílem snížit počet proměnných a vzorky zobrazit v malorozměrovém grafu. Je to metoda, která transformuje vícerozměrná data a vytváří z nich společné komponenty, přičemž tato metoda může být podle charakteru analýzy využita pro kvalitativní i pro kvantitativní analýzy. Klasifikační metody automaticky neprobíhající jsou založeny na korelacích nebo na měření vzdáleností, např. lineární diskriminační analýza (LDA – Linear Discriminant Analysis), dále na těch, které kladou více důrazu na podobnost vzorků uvnitř třídy tj. SIMCA



(Soft independent modelling of class analogies), diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (PLS-DA – Part Least Square – Discriminant Analysis) a umělých neuronových sítí ANN – Artificial neural network (MÍKA *et al.*, 2008).

ANN je nejmodernější metoda diskriminace, přestože jí využívané algoritmy se stále vyvíjejí. Ze všech dostupných predikčních metod poskytuje nejlepší výsledky, ale pro svou správnou funkci je nutné ke kalibraci změřit alespoň 500 vzorků. Většina předních světových výrobců NIR analyzátorů dodává s přístrojem též kalibrační rovnice, které jsou vypracované z více než 6 000 pečlivě vyselektovaných vzorků pro jeden hodnocený znak (MÍKA *et al.*, 2008).

Další využitelnou metodou je LDA, která je schopna charakterizovat anebo rozdělit dva či více různých druhů navzájem od sebe. Využít lze i metodu PLS, která vytváří základní vztahy mezi dvěma maticemi (GODULA, 2010).

Blízká infračervená spektroskopie je v poslední době hojně využívána především k testování kvality a autenticity např. džusů, ovocných šťáv, mléka a mléčných výrobků, na základě odrůd se sleduje kvalita vína, či falšování olivového oleje levnějšími náhražkami. K využití NIR spektroskopie v hodnocení kvality v potravinářském i dalších průmyslech bylo nutné vyvinutí predikčních modelů, které jsou schopny vzorky přiřazovat do různých kvalitativních skupin. K takovým způsobům predikce slouží metoda diskriminační analýzy (KAROUI *et al.*, 2003).

Diskriminační analýza řeší závislost jedné kvalitativní proměnné na několika kvantitativně proměnných. Všechny objekty jsou charakterizovány sérií parametrů a tyto parametry musí být kvantitativní. Diskriminační analýza se tedy používá k určení parametrů, které jsou diskriminující mezi dvěma nebo více skupinami (ANONYM, 2006). Matematickým hlediskem je tedy nutnost vyvinout model, který definuje průměr a směrodatnou odchylku pro každý vzorek multidimenzionálního prostoru a poté testovat, do které skupiny náleží neznámý vzorek. Tento test je založen na měření vzdálenosti tj. tzv. Mahalanobisově vzdálenosti (OSBORNE, 2000), což je vzdálenost daného vektoru pozorování od výběrového centroidu, tj. od průměru vícerozměrných hodnot v daném výběru (KÁBA *et SVATOŠOVÁ*, 1998). Aplikaci diskriminační analýzy je možné rozdělit do čtyř základních kroků:

- 1) určení základních objektů, na které bude diskriminační analýza aplikována.
- 2) přiřazení jednotlivých objektů k vybraným skupinám, které jsou nezávisle proměnné a musejí být přesně definovány před samotnou aplikací diskriminační analýzy.
- 3) určení charakteristických rysů, které jsou společné pro všechny objekty tj. nezávisle proměnných, a to tak, aby co nejlépe určovaly objekty v dané skupině.
- 4) dohledat a analyticky vyjádřit takovou funkci, která co nejlépe obě skupiny odděluje (GURNÝ *et* GURNÝ, 2009).

Velmi častým cílem je diskriminace již známé skupiny prvků na základě skupiny kvantitativních deskriptorů. Důvodem bývá přiřazení nového prvku do jedné ze skupin nebo určení vlastností zástupců jednotlivých skupin (ANONYM, 2006).

### 3.10.3 Aplikace ve farmaceutickém průmyslu

IČ spektroskopie v blízké oblasti se hojně využívá v analýzách chemického a farmaceutického průmyslu. TABASI *et al.* (2009) zjišťovali citlivost NIR techniky pro detekci uvolňování theofylinu z matrix tablet při rozpouštění. Výsledky studie ukázaly, že NIR technika spolu s multivariační tvorbou modelů dokáže úspěšně rozlišit různá množství látky Eudragitu NE 30D v lékové formě tablet a korelovat vliv rozpustnosti každé šarže odpovídající složení tablety. DOU *et al.* (2005) stanovili pomocí NIR spektroskopie a umělých neuronových sítí dvě složky (paracetamol a amantadin hydrochlorid) v tabletách a prášku, v nichž se necházely jejich kombinace. Vhodnost použití metod ANN a NIR spektroskopie při analýze pevných farmaceutických vzorků byla závěry práce potvrzena. Ve farmaceutickém průmyslu je značný rostoucí zájem o NIR-CI spektroskopii (Near Infra-Red Chemical Imaging). Tato technika je plně schopna poskytovat analytické výsledky i v oblastech průmyslu, kde je kladen důraz na vysokou jakost. Přímá analýza měřených vzorků pomocí hyperspektrální zobrazovací techniky poskytuje NIR spektra v každém pixelu obrazu, generuje značné množství informací z jednoho vzorku. NIR-CI spektroskopie byla použita pro kvantitativní analýzu různých komerčně vyráběných acetylsalicylových tablet v práci CRUZE *et al.* (2009). Následně využili techniku NIR-CI spektroskopie PUCHERT *et al.* (2010) s cílem spolehlivě identifikovat padělané tablety, které jsou velmi podobné pravým. V minulosti publikované studie o NIR-CI využívaly homogenitu jako hlavní ukazatel pro detekci padělků a právě s ohledem na to PUCHERT *et al.* (2010)

vyvinuli novou metodu s možností využití mnohem více prostorových informací pro odhad homogenity. Nejčastěji používané látky při nedovolené výrobě extáze jsou laktóza a celulóza. BAERA *et al.* (2007) využili blízké infračervené spektroskopie pro stanovení různých chemických forem těchto dvou látek. Identifikace pomocných látek nebyla vždy zřejmá, zejména byla-li přítomna více než jedna pomocná látka. Při srovnávání se nicméně objevily skupiny podobných tablet.

#### 3.10.4 Historie využití NIR spektroskopie v potravinářském průmyslu

Ačkoli bylo infračervené záření objeveno astronomem Frederikem Williamem Herschelem již v roce 1800, byla tato spektroskopie v 1. polovině minulého století ignorována. Hlavním důvodem tohoto faktu bylo přesvědčení, že postrádá analytický význam a kvůli nedostatečnému technickému vybavení a špatným znalostem spektrální analýzy byla většina výzkumů zastavena anebo omezena jen na laboratorní podmínky (BLANCO *et VILLARROYA*, 2002). Karl Norris využil NIR spektroskopii pro analýzu potravin jako první v historii. V roce 1949 využil UV/VIS a NIR spektroskopii na třídění vajec. Norris, Hart, a Golumbic roku 1962 publikovali použití NIR spektroskopie ke stanovení vlhkosti semen pšenice. V prvních fázích vývoje použití NIR spektroskopie pro analýzy v potravinářství byly tyto analýzy zaměřeny na stanovení vlhkosti a obsahu základních chemických složek tj. bílkovin, tuků a sacharidů. Až první použití difúzní reflektance dopomohlo NIR spektroskopii k jejímu širšímu využití v potravinářství, ale tento skok vyžadoval nutné úpravy analyzátorů a rozvoj chemometrických metod. První komerční NIR analyzátor koupil roku 1973 Phil Williams a využil jej pro analýzu zrn a obilí. Tím, že nahradil Kjeldahlovu metodu pro stanovení bílkovin u obilí NIR spektroskopií dosáhl mimořádného úspěchu. Williams a Norris chtěli společně sepsat souhrnnou práci o možnostech využití NIR spektroskopie pro hodnocení biologického materiálu, která vznikla v roce 1990, dříve ale vznikla publikace vydaná roku 1986 Osbornem a Feamem o možnostech užití NIR spektroskopie v potravinářském průmyslu.

Velkou komoditou, při jejíž analýzách mohly být využity NIR analyzátory, byla krmiva (WORKMAN, 2005). V průběhu roku 1970 vzrostl počet publikací o možnostech využití blízké infračervené spektroskopie v zemědělství a potravinářství (SUN, 2008). Velká produktivita publikací vedla v roce 1993 k založení časopisu „*Journal of Near Infrared spectroscopy*“ (PASQUINI, 2003). O problematice aplikace NIR spektroskopie v analýze potravin bylo sepsáno několik významných knih, které pojednávají o různých aspektech této

techniky. Mezi tyto knihy patří např. „*Near-Infrared Reflectance Analysis Food Industry Applications*”, kterou sepsali v roce 1990 WILLIAMS *et* STEVENSON, základní soupis použití NIR spektroskopie v krmivářském průmyslu sepsal HOYER v roce 1997. Další knihou, pojednávající o využití FT-NIR spektroskopie, je „*Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis*,” sepsaná roku 2001 Osbornem, v roce 2006 vznikla kniha „*Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*“, jejímž autorem je Yukihiro Ozaki, ve stejném roce byla publikována Reidem a spoluautory kniha „*Recent Technological Advances the Determination of Food Authenticity*”, která obsahuje i část věnující se možnostem využití NIR spektroskopie ke stanovení autenticity a falšování potravin. V roce 2008 sepsali autoři Cen a He knihu „*Theory and Application of Near Infrared Reflectance Spectroscopy in Determination of Food Quality*” (BENITO *et al.*, 2008).

### **3.10.5 Současné aplikace NIR spektroskopie v potravinářském průmyslu**

V současné době je blízká infračervená spektroskopie využívána při hodnocení jakosti surovin, meziproductů a finálních výrobků, kde jsou důležité údaje o obsahových látkách (obsahu vody, bílkovin, sacharidů, tuku, ale i minoritních látek), ale také o některých funkčních a sensorických vlastnostech. V potravinářství je technika FT-NIR hojně využívána díky její schopnosti proniknout hlouběji do struktury vzorku (BALABIN *et al.*, 2007).

#### **3.10.5.1 Hodnocení hlavních složek potravin**

První úspěšná aplikace NIR techniky se, při analýze zemědělských produktů a potravinářských surovin, týkala stanovení obsahu vody. Tato analýza byla provedena na matricích, jako je mléko, maso, brambory nebo ovoce, kde se obsah vody pohybuje v rozmezí 70 – 90 %. U těchto potravin se absorpční pásy vody objeví při vlnových délkách mezi 1 400 – 1 410 nm, což bylo pozorováno i u vzorků čisté vody, která má ve svém spektru pět absorpčních pasů tj. s maximy při 1 940, 1 450, 1 190, 970 a 760 nm při 20 °C (BENITO *et al.*, 2008). Ostré absorpční pásy vzniklé z C–H skupin lze pozorovat při vlnových délkách 2 310, 2 350 nm a při 1 730 nm. Vlnová délka 1 730 nm se překrývá s absorpčním pásem bílkovin (WEHLING, 2010). V současné době se v praxi běžně využívá ke stanovení obsahu vody v mléčných produktech, přičemž tuto techniku využili při své práci např. ADAM *et al.* (2009), kteří hodnotili obsah vody v jogurtech a sýrech, obsahem vody v sýrech se zabýval také BÜNING-PFAUE (2003), který techniku s dalšími výzkumníky, např. NAGARAJAN *et*

*al.* (2006), využili i k hodnocení sušeného mléka. Obsah vody technikou NIR při hodnocení obilovin a mlýnských produktů stanovovali MANLEY *et al.* (2002), ARMSTRONG *et al.* (2006) či HELL *et al.* (2016). Pro hodnocení obsahu vody v ovoci a zelenině využili techniku NIR např. CAYUELA *et al.* (2009) či BLAKEY *et van ROOYEN* (2011).

Další z hlavních složek potravin jsou sacharidy, které se v potravinách vyskytují velice hojně a v nejrůznějších kombinacích. Protože všechny obsahují vazby C–H a O–H skupiny, jejich spektra jsou si velice podobná. U přírodních ovocných šťáv se NIR spektroskopie nejčastěji využívá ke stanovení jednotlivých sacharidů. Celkový obsah sacharidů v ovocných šťávách může být měřen způsobem transmitance při 2 200 nm. Pomocí NIR techniky je možné sacharózu stanovovat ve víně, čokoládě, v pekařském zboží, velmi často je analyzován obsah laktózy v mléce (WEHLING, 2010).

NIR technika se také běžně používá i ke stanovení obsahu tuku, kdy mezi nejčastěji hodnocenými vzorky jsou maso, mléko a výrobky z nich, dále brambory a výrobky z brambor, o čemž ve svých pracích informovali SHIROMA *et RODRIGUEZ-SAONA* (2009) nebo MAZUREK *et al.* (2016).

### **3.10.5.2 Hodnocení vedlejších složek potravin**

Mimo základního složení potravin se mnoho autorů zabývalo také měřením jiných složek, které jsou v potravinách obsaženy. Po stanovení celkového obsahu tuku se FT-NIR spektroskopie začala používat také k analýze mastných kyselin v mléce různých druhů (LUŽOVÁ *et al.*, 2014; NÚÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2016), ale i v dalších potravinách, např. v olivovém oleji (LAROUSI-MEZGHANI *et al.*, 2014) či králičím maso (ZOMEÑO *et al.*, 2015). Někteří autoři NIR techniku použili k hodnocení vedlejších složek v cereáliích a jejich produktech. Těmito složkami byl např. obsah rozpustné a nerozpustné vlákniny (OSBORNE, 1996; KAYS *et BARDON*, 2002), množství škrobu (ORMAN *et SCHUMANN*, 1991; OSBORNE, 1996) či obsah  $\beta$ -glukanů (SCHMIDT *et al.* 2009). Velmi častým použitím NIR spektroskopie je sledování chemického složení masa (MLČEK *et al.*, 2006; MLČEK *et al.*, 2010; MAJA *et al.*, 2010). COLLELL *et al.* (2010) se věnovali hodnocení aktivity vody či obsahu NaCl v masných výrobcích.

GARDEN *et al.* (2002) použili NIR techniku k měření obsahu hořkých kyselin chmele, obsahem alkoholu v pivu se zabývali ENGELHARD *et al.*, (2004) či CASTRITIUS (2010), obsahem etanolu v destilátech se zabývali NORDON *et al.* (2005). Také při hodnocení vína byla NIR technika použita k hodnocení nejen obsahu alkoholu, ale také obsahu

polyfenolů (MARTELO-VIDAL *et al.* VÁZQUEZ, 2014). Mimo základního složení mléka a mléčných výrobků lze pomocí FT-NIR techniky sledovat také obsah kaseinu a jeho frakcí na čemž ve svých studiích pracovali LAPORTE *et al.* PAQUIN (1999) nebo ŠUSTOVÁ *et al.* (2007), dále lze hodnotit titrační kyselost, kolagenní částice či pH (De MARCHI *et al.*, 2009) a také obsah somatických buněk (TSENKOVA *et al.*, 2001). Přesto, že technika není vhodná pro hodnocení minoritních látek, je použitelná k sledování obsahu některých minerálních látek v sýrech o čemž informovali LUCAS *et al.*, (2008) či GONZÁLEZ-MARTÍN *et al.*, (2011). Frekventované je také sledování HMF v medu (COZZOLINO *et al.* CORBELLA, 2003; RUOFF *et al.*, 2007; PATACA *et al.*, 2007). Mimo látky, které jsou považovány jako pozitivní, lze FT-NIR spektroskopií látky, které jsou hodnoceny jako nebezpečné pro lidské zdraví. Autoři technikou NIR hodnotili v rostlinných produktech množství např. pesticidů (MOROS *et al.*, 2006; SÁNCHEZ *et al.*, 2010) a také toxinů (TRIPATHI *et al.* MISHRA, 2009; GASPARDO *et al.*, 2012). SIVAKESAVA *et al.* IRUDAYARAJ (2002) a DRAČKOVÁ *et al.*, (2009) NIR spektroskopií stanovovali obsahy antibiotik v živočišných produktech. Blízká infračervená spektroskopie je také hojně využívaným nástrojem při hodnocení obsahu alkaloidů v čaji a kávě, kdy mezi nejčastěji stanovované patří mimo kofeinu (HUCK *et al.*, 2005; PIZZARO *et al.*, 2007; SINIJA *et al.* MISHRA, 2009; ZHANG *et al.*, 2013) také teobromin a theofilin (HUCK *et al.*, 2005). V kávových zrnech se vyskytují látky, které jsou termolabilní, jsou tedy při pražení kávy degradovány. SHAN *et al.*, (2014) zjistili, že technika FT-NIR je vhodná i pro hodnocení chlorogenové kyseliny obsažené v kávových zrnech, právě před jejich pražením. Mimo zkoumání chemického složení kávy je možné FT-NIR spektroskopii využít také ke stanovení optimálního stupně pražení či složení směsi druhů káv (BERTONE *et al.*, 2015). Autoři se u hodnocení kávy zabývali i mnoha dalšími parametry, jejichž přehled ve své práci uvádí Barbin *et al.* (2014).

### **3.10.5.3 Sledování falšování potravin**

Velmi často se technika FT-NIR používá při odhalování původu, stáří či falšování potravin. Autoři se zabývali odhalováním původu, ať už sýrů (PILLONEL *et al.*, 2003; CEVOLI *et al.*, 2013), medů (LIANG *et al.*, 2012; ESCUREDO *et al.*, 2015) nebo i dalších potravin (LUYKX *et al.* van RUTH, 2008). U medů je také často hodnocen přídavek cukerných sirupů (BÁZÁR *et al.*, 2016). Velmi důležitými možnostmi využití této techniky jsou možnosti detekce náhrady dražší složky za složku levnější, což je také jedna z častých metod falšování potravin. FT-NIR technika je schopna detekovat např. přídavek kravského mléka do

kozího při výrobě kozích sýrů, kdy bylo zjištěno, že NIR technika je natolik citlivá, že dokáže odhalit i pouhé 1 % přídavku kravského mléka (DVOŘÁK *et al.*, 2016). Jiné studie hovoří např. o detekci náhrady cibulového prášku kukuřičným škrobem (LOHUMI *et al.*, 2014), nahrazování mletého hovězího masa masem krůtím (ALAMPRESE *et al.*, 2013) nebo také nahrazení mléčného tuku (SATO *et al.*, 1990; CARL, 1991), kdy první aplikace k detekci náhrady tuku v mléce byla provedena v r. 1990 (SATO *et al.*, 1990). NIR spektroskopie byla použita také při kontrole falšování sýrů rostlinnými tuky (LUŽOVÁ, 2011), kdy byly hodnoceny tzv. analogy sýrů, určené k zapékání a smažení. Výsledky studie poukázaly na vhodnost použití NIR spektroskopie pro rozpoznávání sýrů od jejich imitací. Další aplikací NIR techniky byla zkoumána možnost detekce sušené syrovátky přidané do sušeného mléka (GIANGIACOMO *et al.*, 1991).

V poslední době hrají v rozhodování se o koupi výrobku také aditiva použitá ve výrobě. I tyto látky je možné pomocí FT-NIR kontrolovat (KŘIVÁKOVÁ, 2011; HUANG *et al.*, 2014). Diskutovaným tématem byl také přídavek melaminu do sušeného mléka a i přídavek melaminu byl pomocí FT-NIR techniky velmi spolehlivě zachycen (LU *et al.*, 2009).

### **3.10.5.4 Sledování mikrobiologických procesů**

Při výrobě a skladování některých potravin hraje pro získání ideálních vlastností velmi velkou roli přítomnost mikroorganismů, které mají podíl na fermentačních procesech. Mikroorganismy se podílí na tvorbě charakteristických vlastností masných výrobků (MAJA *et al.*, 2010), je možné sledovat změnu fyzikálních vlastností jako např. aktivitu vody či pH (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2010). Mikroorganismy mají velký vliv na změny probíhající také při procesu zrání sýrů. Průběh zrání sýrů monitorovali ATANASSOVA *et al.* (2014) a SKEIE *et al.* (2006), kteří zjistili, že je možné identifikovat a selektovat volné aminokyseliny během zrání. Kvasinky se podílí se na správné fermentaci piva, čímž ovlivňují pH či tvorbu etanolu. Proces fermentace ve svých pracích hodnotili GRASSI *et al.* (2014) nebo GIOVENZANA *et al.* (2014). Sledováním tvorby etanolu a obsahu cukrů je FT-NIR spektroskopie vhodná také při kontrole správné fermentace vína (Di EDIGIO *et al.*, 2010). Mikroorganismy ovšem nepůsobí jen pro dosažení optimálních vlastností, na druhé straně působí jako hlavní faktor kažení potravin. RŮŽIČKOVÁ *et al.* (2006) použili FT-NIR techniku ke sledování napadení jablek Gloeosporiovou hnilobou.

### **3.10.5.5 Sledování senzorických parametrů**

Velmi zajímavou možností využití NIR techniky je hodnocení senzorických vlastností potravin. Tato technika je schopna predikovat některé mechanické parametry jako je v mnoha případech křehkost či tuhost (RØDBOTTEN *et al.*, 2000; VENEL *et al.*, 2001). Některé studie se také zabývají stanovením i jiných senzorických vlastností jako je např. šťavnatost (LIU *et al.*, 2003), žvýkatelnost (RØDBOTTEN *et al.*, 2000), chuť, textura a přijatelnost (BYRNE *et al.*, 1998) především u hovězího a skopového masa.

FT-NIR technika je použitelná také při hodnocení senzorických vlastností sýrů, kdy byla hodnocena konzistence a chuť a mezi texturní vlastnosti byly zařazeny pružnost, lepivost, soudržnost, měkkost a tvrdost (SØRENSEN *et JEPSEN*, 1998).

Jiné studie pracovaly se senzorickými atributy jako drobivost, rozpadavost, pevnost, gumovitost, zrnitost, vlhkost, ulpívání v ústech, mazlavost, tavitelnost či formování hmoty (DOWNEY *et al.*, 2005). Na základě senzorických vlastností měřené technikou FT-NIR je možné řadit vzorky masa do jakostních tříd (ANDRÉS *et al.*, 2007; KAMRUZZAMAN *et al.*, 2013). Autoři uvádějí, že byli schopni rozlišovat mezi nejextrémnějšími vzorky, což by mohlo mít praktické důsledky pro třídění masa do tříd kvality.

## **3.11 Chyby stanovení referenčních a instrumentálních analýz**

Velký význam matematicko-statistických metod spočívá v možnosti určení skutečné velikosti chyb vznikajících při získávání dat. Eliminovat či minimalizovat tyto chyby je ale možné pouze pokusnou cestou (ECKSCHLAGER, 1961). Experimentální data, která jsou získána analýzami, bývají v praxi v mnoha případech stanovena různými metodami, z čehož plynou rozdílné nálezy analýz, které jsou prováděny v kompetencích kontrolních orgánů, pracovníků výzkumu či praxe. Analýzami založenými na stejném principu je možné získat odlišné výsledky. Důvodem může být skutečnost, že analytičtí pracovníci modifikovali postup metody popř. použili činidla o různých čistotách.



Definice základních typů metod jsou uvedeny v Kodex Alimentarius:

- 1) **Definiční metoda** – metoda, kterou je možno stanovit určitou hodnotu, kterou nelze stanovit jiným způsobem (př. Reichert-Meisslovo číslo při stanovení obsahu těkavých mastných kyselin v mléčném tuku).
- 2) **Referenční metoda** – metoda udávající skutečné množství analyzované komponenty. Je doporučovaná k použití při řešení sporů a také pro kalibrační účely instrumentálních technik.
- 3) **Alternativní metoda** – metoda splňující kritéria, která jsou požadována Kodexovým výborem pro metody, které je možno užívat při kontrole dodržování jakostních předpisů norem.
- 4) **Prozatímní metoda** – metoda tradičně používaná nebo nově zaváděná. U metody však nebyly vypracovány obecné údaje, podle požadovaných kritérií metody.

Dle postupu, použitého při kvantifikaci analyzovaného ukazatele, je možno rozlišit následující metody:

- a) **Přímá metoda** – stanovuje analyzovanou složku na základě přímého měření koncentrace v definované navážce vzorku (stanovení titrační kyselosti mléka titračně pomocí 0,25 M NaOH na 2% FFT).
- b) **Nepřímá metoda** – metoda, která je ve většině případů založena na fyzikálním měření signálu, který je ve vztahu ke skutečné hodnotě analyzované složky nebo k hodnotě složky kvantitativně stanovené přímou metodou.

Vhodnost analytické metody by měla být hodnocena na základě daných kritérií:

- a) **Celková přesnost** – stupeň spolehlivosti měřené hodnoty,
- b) **Citlivost** – nejmenší změna koncentrace látky stanovitelná danou metodou,
- c) **Mez stanovitelnosti** – nejmenší koncentrace látky, kterou je metoda schopna stanovit s určitým stupněm spolehlivosti,
- d) **Přesnost metody** – těsnost shody mezi výsledky získanými stejným postupem metody při rozboru stejného materiálu za předepsaných podmínek,
- e) **Opakovatelnost** – hodnota umožňující očekávat s určitou pravděpodobností, že bude ležet rozdíl mezi dvěma jednotlivými výsledky, získanými identickou metodou na stejném analyzovaném vzorku za totožných podmínek, tzn. analýza vzorku jedním pracovníkem ve stejné laboratoři v krátkém časovém intervalu,
- f) **Reprodukovatelnost** – těsnost shody jednotlivých výsledných hodnot získaných analýzou stejného vzorku, ovšem za rozdílných podmínek, tzn. analýza různými analytiky, v různých laboratořích nebo v různé době,
- g) **Správnost výsledků** – shodnost mezi výsledky, které byly získány při užití metody v porovnání ke skutečné hodnotě komponenty,
- h) **Správnost – shodnost** – sumarizuje chyby metody při určité hladině ukazatele, které jsou nezávislé na náhodné chybě, ale ovlivněných určitými faktory, které brání dosažení skutečné hodnoty (ČERNÁ *et* CVAK, 1986).

Dalšími ukazateli, podle nichž je možné hodnotit danou analytickou metodu jsou:

- a) **Mez postřehu** – nejmenší změřená hodnota, která je spolehlivě rozpoznatelná od pozadí tzn., že s jistotou lze tvrdit, že látka je přítomna,
- b) **Mez stanovitelnosti** – nejnižší koncentrace analytu, kterou lze s definovanou přesností kvantitativně stanovit (KLOUDA, 2003).

### 3.12 Chemometrie

Chemometrie jako taková vznikla koncem 60. a začátkem 70. let a od té doby se stále vyvíjí. Je to chemická disciplína využívající matematické metody s cílem navrhnout optimální experimentální postupy a získat tak maximum relevantních informací z pokusných výsledků (ECKSCHLAGER, 1991). Umožňuje uspořádání velkého množství experimentálně získaných dat potřebných k určení společných vlastností a k definici funkčních vztahů a v nich skrytých zákonitostech (HOLÍK, 2007). Bez současného rozvoje chemometrických metod by nebylo rozšíření NIR spektroskopie možné. Důležitý je také vývoj výkonné počítačové techniky, která je schopna statisticky vyhodnocovat snímaná spektra v korelaci s analyticko-chemickými a fyzikálními vlastnostmi měřených vzorků (McCLURE, 2003).

Poprvé použil termín „chemometrie“ v roce 1971 Svante Wold (HEISE *et* WINZEN, 2008). Chemometrie 70. let 20. století je charakteristická zaměřením se na fyzikálně-chemické metody, oproti tomu chemometrie 2. poloviny 80. let, díky rostoucí popularitě blízké infračervené spektroskopie, vedla k velkému rozvoji vlastních chemometrických metod (ECKSCHLAGER, 1991). Kombinace chemometrických metod a dat získaných analýzou vzorků na NIR zvyšuje množství informací o spektrech hodnocené látky, což vede např. ke zvýšení schopnosti detekce rozdílů mezi podobnými materiály (HEISE *et* WINZEN, 2008). Aplikace chemometrických metod klade za cíl tvorbu modelu kalibrace a vznik propracovaného systému možností statistického zhodnocení získaných dat. Proto NIR analýza začala využívat dokonalejší moderní vyhodnocovací programy, jejichž principem je vícenásobná lineární regrese tj. metoda hlavních komponent (PCR) a metoda částečných nejmenších čtverců (PLS).

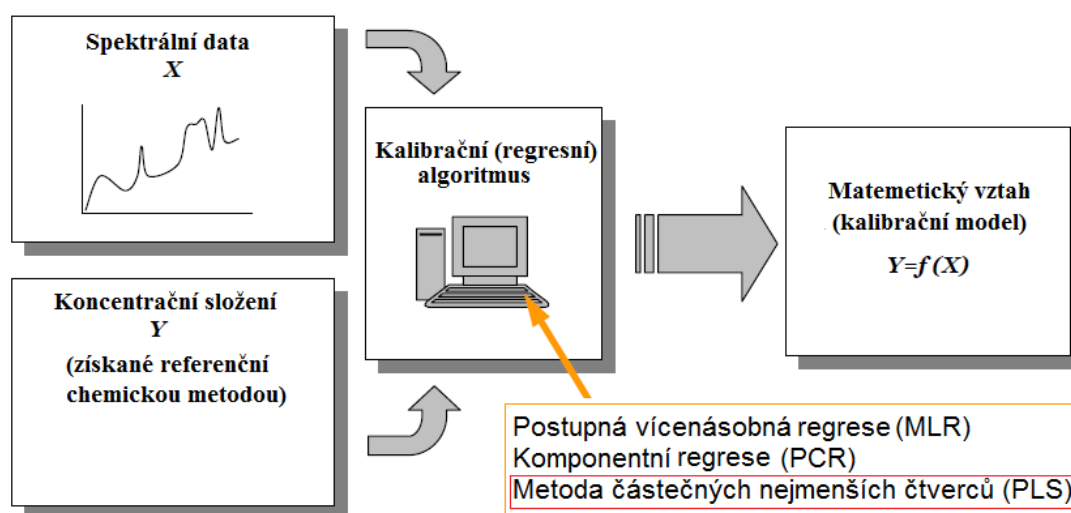
#### 3.12.1 Tvorba kalibračního modelu

U tvorby spolehlivého a funkčního kvalitativního, ale i kvantitativního modelu kalibrace platí základní požadavek, že počet analyzovaných vzorků musí být dostatečný tj. alespoň 30 (ČIŽMÁR, 2010).

Kalibrace neboli tvorba kalibračního modelu, vyžaduje práci s počítačem, který disponuje chemometrickým softwarem (např. TQ Analyst). Obvykle je počítač vybaven i programy, které jsou potřebné k ovládní přístroje a sběru naměřených spekter (např. Omnic, Result integration). Tvorba kalibrace v NIR spektroskopii zahrnuje veškeré kroky,

kteří jsou nutné pro odhad matematického vztahu mezi optickými vlastnostmi vzorku a jeho chemickým složením (HURBURGH *et* IGNE, 2010). Principem tvorby kalibrace je tedy získání závislosti mezi spektrálními informacemi a chemickým složením. Výsledky analýz pro každou analyzovanou komponentu mohou být vyjádřeny mnoha různými způsoby např. maximální výškou píku, integrálem, koncentrací, absorpční, počtem částic, jménem třídy, atd. (GELADI, 2003).

Hlavním kritériem je, že pro každou sledovanou komponentu musí být NIR spektroskop kalibrován, což představuje nutnost správného výběru tzv. souboru kalibračních standardů o známém složení, které je určeno nezávislou analytickou metodou, tzv. referenční analýzou (stanovení N dle Kjeldahla, stanovení tuku v mléce dle Röse-Gottlieba, atd.). Tento postup využívají především algoritmy kvantitativní analýzy např. PLS (Obr. 25).



Obr. 25: Kvantitativní NIR kalibrace (HURBURGH *et* IGNE, 2010)

Základem je, aby standardy charakterizovaly stejnoměrně a co nejvíce typické vlastnosti analyzovaných vzorků. Interval koncentrací složek v kalibračních modelech by měl odpovídat rozsahům, ve kterých se pravděpodobně budou pohybovat koncentrace látek v měřených vzorcích. Je důležité, aby vzorky určené ke kalibraci byly získávány z podobných souborů, které se budou měřit v budoucnosti. Je tedy nutné získat co nejširší škálu vzorků s různým chemickým složením (MÍKA *et al.*, 2008). Existují případy, kdy je, vzhledem k úzkému koncentračnímu intervalu komponent, nutné analyzovat a zařadit do kalibračního modelu nové modelové vzorky. Správná funkce kalibračního modelu je závislá na dvou faktorech. Prvním je citlivost odezvy spektroskopu na změnu parametru stanoveného analytu tj. fyzikální podstata vzniku spekter. Druhým faktorem je přesnost vstupních dat získaných referenčními postupy. Důvodem je nemožnost dosažení lepší přesnosti stanovení v kalibraci

infračervených spekter nelze, než je přesnost metody, kterou byla vstupní data získána (TENKL *et al.*, 2009). Odhad parametrů modelu metodou PLS je definován rovnicí:

$$\beta = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot c$$

(m,l) (m,n) (n,m) (m,n) (n,l)

Řešení vztahu existuje pouze v případě, je-li množství kalibračních standardů  $n$  větší než počet vlnových délek  $m$  spektra. V opačném případě nelze invertovat součin  $X^T X$  a tím není možné parametry  $\beta$  odhadnout. Dnešní NIR analyzátory umožňují snímání spekter při stovkách vlnových délek a tento předpoklad je zásadním omezením použitelnosti metody. Pro případ, že uvedená podmínka není splněna, byly vytvořeny dvě strategie postupu:

- 1) vybrat z původního spektra vhodnou metodou omezený počet vlnových délek tak, aby podmínka byla splněna.
- 2) zkomprimovat původní spektra snímaná při stovkách vlnových délek do formy latentních proměnných, které následně použít ke kalibraci namísto původních absorbancí proměnných (MELOUN *et MILITKÝ*, 2002).

V případě kvalitativní analýzy např. DA, jsou kalibračními standardy známé vzorky dobře charakterizující předem definované třídy materiálů. Je nutné věnovat zvýšenou pozornost výběru standardů, protože variabilita těchto vzorků definuje oblast, která je kalibračním modelem pro vyhodnocení neznámého materiálu považována za vyhovující. Ve vlastní kalibraci se rozhoduje, zda se neznámý vzorek v dostatečné míře shoduje se standardem a je-li správně zařazen do charakterově nejbližší třídy (CENTNER, 2002).

Nejčastější metodou, se kterou se při tvorbě kalibrace setkáváme, je vícerozměrná inverzní kalibrace. Principem této metody je popis závislosti mezi skupinou analyzovaných dat, např. spektrem  $X$ , a zvolenými veličinami kalibračního modelu, např. koncentrací  $c$  látky ve směsi. Je to aplikace umožňující získání hodnot koncentrací složek v analyzovaném vzorku ( $c^*$ ) ze spektra ( $x^*$ ) naměřeného na NIR analyzátoru. Pro analyzovaný materiál jsou vytvořena spektra absorbance  $X$  a je vytvořen kalibrační model, který popisuje vztah mezi koncentrací sledované látky  $c$  a absorbancí  $X$  následovně:

$$c = X \cdot \beta + e_c$$

$$(n,l) \quad (n,m) \quad (m,l) \quad (n,l)$$

$$\begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \dots \\ c_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_{11} & \dots & x_{1m} \\ x_{21} & \dots & x_{2m} \\ \dots & \dots & \dots \\ x_{n1} & \dots & x_{nm} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \dots \\ \beta_m \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \dots \\ e_n \end{pmatrix}$$

kde:

$c_i$  = koncentrace sledované látky v kalibračním vzorku  $i$ ,

$x_{ij}$  = absorbance tohoto vzorku při  $j$ -té vlnové délce,

$\beta_j$  = regresní koeficient čili molární absorpční koeficient pro vlnovou délku  $j$ ,

$e_i$  = koncentrační reziduum vzorku  $i$  tj. rozdíl mezi koncentrací stanovenou referenční, metodou a koncentrací vypočtenou proložením kalibračních dat modelem.

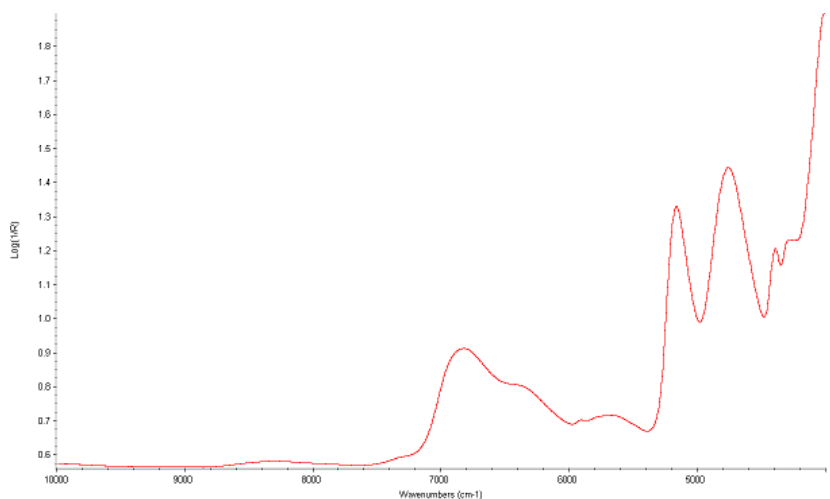
### 3.12.2 Úprava spektrálních dat

Základem vzniku NIR absorpčních pásů neboli spekter je vibrace NIR záření o specifické frekvenci na stejné frekvenci vibrace jako molekulové vazby ve vzorku. Získaná spektra analyzovaných materiálů obsahují informace o charakteristických absorpcích, které jsou spojeny se svrchními tóny ( $\Delta v > 1$ ) a kombinačními přechody valenčních a deformačních vibrací. Nedochozí tak k identifikaci látek na základě přiřazení pásů jednotlivým funkčním skupinám, ale používá se tzv. celospektrálních metod (ŠIŠKANOVÁ, 2010). V blízké infračervené oblasti se při přechodu na druhou a třetí excitovanou hladinu projevují absorpce molekuly a dále v této oblasti lze také pozorovat tzv. kombinovanou absorpci, která vzniká jako výsledek interakce dvou vibrací v molekule. Sice není možno látky přímo identifikovat přiřazováním pásů k jednotlivým funkčním skupinám, ale i přesto NIR spektra disponují charakteristickými informacemi, které jsou dány konkrétními funkčními skupinami např. –CH, –NH nebo –OH. Tyto skupiny odpovídají za vibrační stavy molekul (ESBENSEN, 1998).

Fakt, že typická NIR spektra jsou charakteristická lineárně rostoucím trendem od kratších vlnových délek k delším, což je způsobeno rozptylem, který je závislý na velikosti pevných částic vzorku a vlnové délce dopadajícího záření, je, z hlediska kvantitativního hodnocení, jeden z nejdůležitějších faktorů v NIR spektrech, protože se zvětšením velikostí částic dochází i ke zvýšení hodnoty  $\log(1/R)$ , což je dáno prodlužující se délkou optické dráhy. Tento efekt je multiplikativní, protože v potravinách a zemědělských produktech je

reflektance paprsku náhodná. To je důsledek vlivu různých velikostí částic hodnoceného materiálu (MANLEY *et al.*, 1994).

Existují případy, kdy žádná další úprava spektra není nutná (Obr. 26), na druhou stranu nastávají situace, kdy získané spektrum není přímo interpretovatelné a před kalibrací je obvykle vhodné a někdy i přímo nutné jej jistými matematickými postupy upravit (ČURDA *et al.*, 2002). Příliš široké absorpční pásy lze vizuálně upravit jen derivováním.

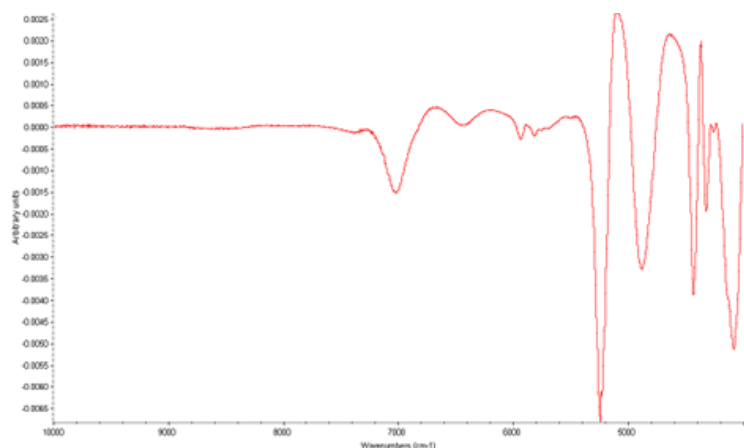


Obr. 26: NIR spektrum medu bez jakýchkoliv úprav

Nula první derivace je v místě maxima signálu, což ztěžuje odečet jeho polohy. Z tohoto důvodu se častěji využívá úprava druhou derivací, která vykazuje v místě signálu ostrý záporný pík. Tak někdy lze ve spektru odhalit přítomnost signálů, které by jinak zanikly pod obalovou křivkou. Polohy signálů v NIR spektrech jsou udávány ve vlnových délkách (nm) nebo ve vlnočtech ( $\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.12.2.1 První derivace

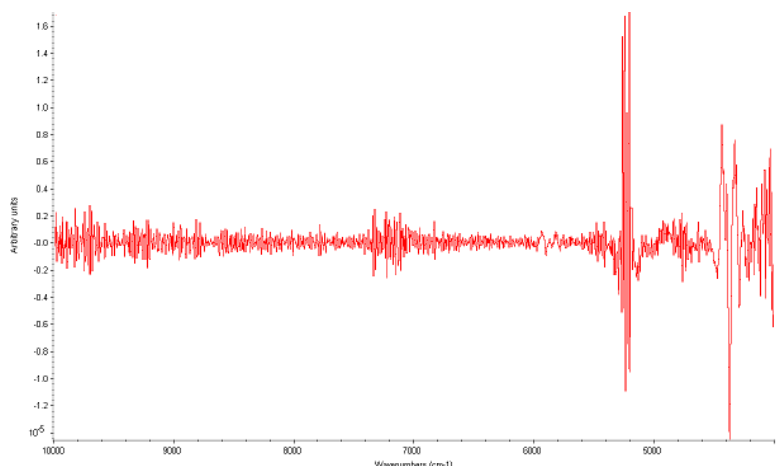
Metody derivace se používají za účelem potlačení signálu způsobeného pozadím přístroje a ke zvýšení schopnosti rozlišení. Spektrum derivované první derivací je vyjádřeno jako  $d(\log 1/R)/d\lambda$ . Výsledkem této derivace je křivka s píky korespondujícími s body inflexe na každé straně  $\log(1/R)$  píku (Obr. 27). Jak lze vidět, rostoucí lineární trend byl odstraněn.



Obr. 27: První derivace infračerveného spektra medu

### 3.12.2.2 Druhá derivace

Při úpravě spektra je častější užití druhé derivace, která zachovává intenzitu a polohu pásů a zároveň zlepšuje jejich rozlišitelnost, protože dochází k vytvoření ostrého píku v místě signálu. Je nutné sledovat intenzitu šumu v signálu, protože existuje možnost jeho negativního projevu v derivovaném spektru. Druhá derivace spektra (Obr. 28) je vyjádřena rovnicí  $d^2(\log I/R)/d\lambda^2$  (OZAKI *et al.*, 2007)



Obr. 28: Druhá derivace infračerveného spektra medu

### 3.12.3 Redukce na velikost částic (Standard Normal Variate – SNV)

Aplikace redukce velikosti částic je výraznou úpravou spekter před vlastní tvorbou kalibrace. Použitím této metody dochází k úpravě dat za účelem docílení kompenzace rozdílů vzniklých v optických drahách vzorků. Principem SNV je úprava spektra tak, aby se v



souboru směrodatná odchylka proměnných v každém bodě rovnala 1 (ČURDA *et al*, 2002). Tento algoritmus je použitelný v měřeních za účelem kompenzace rozdílů v optické tloušťce, které jsou způsobeny různým rozložením tuhých částic ve vzorku, popř. mají-li spektra hodnocených vzorků lišící se charakteristiky rozptylu než spektra látek, jež byla využita k tvorbě kalibrace. Optická dráha se tak stává pouze jedním z příspěvků v konečném signálu. Software vypočítá průměr a standardní odchylku regionu základní linie pro každý analyzovaný standard a následně tento průměr odečítá pro každý bod ve spektrálním regionu a dělí ho směrodatnou odchylkou. Takto dochází k normalizaci všech standardů a korekce SNV je aplikována i na neznámé materiály (BURNS *et CIURCZAK*, 2007).

### 3.12.4 Úprava standardů pomocí Merge like standards (MLS)

Úprava používaná především pro kalibrování souborů s vysokým počtem vzorků. Principem tohoto algoritmu je zprůměrování standardů o stejných hodnotách složky popř. standardů se stejnou třídou a vytvoření nových tzv. syntetických standardů. Ty jsou následně použity pro tvorbu kalibračního modelu.

#### 3.12.4.1 Vícenásobná lineární regrese

V NIR spektroskopii je vícenásobná lineární regrese metodou, která se používá pro vyjádření vztahu mezi spektrální informací  $\log 1/R$  a koncentrací:

$$y = k_0 + \sum_{j=1}^K k_j x_j + e,$$

kde:

$y$  = koncentrace  $i$ -té složky,

$x_j$  = absorbance  $\log 1/R$  při vlnové délce,

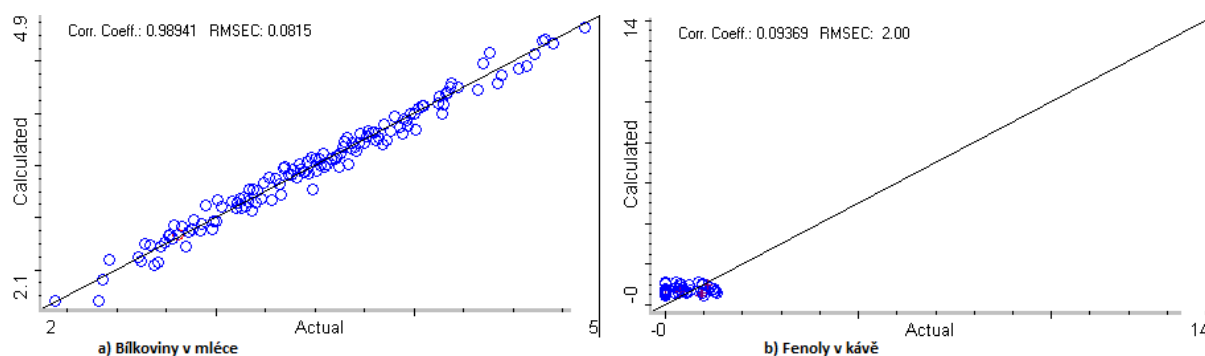
$k_0$  = úsek na ose závisle proměnné,

$k_j$  = regresní koeficient odpovídající vlnové délce,

$K$  = počet proměnných (zde vlnových délek) v rovnici a  $e$  je reziduum.

Principem kalibračního modelu je odhad koeficientů kalibrace pomocí vhodné kalibrační metody tak, aby bylo dosaženo co nejpřesnějších a nejsprávnějších hodnot předpovězených pomocí získané rovnice. Pracuje s více proměnnými, jimiž jsou například

hledaná komponenta, číslo vzorku, vlnočet, vlnová délka, a proto jsou k řešení využívány maticové vztahy. Každý kalibrační koeficient je považován za „nezávislý“ statistický parametr a je možné, že generovaná rovnice vyhovuje kalibrační sadě standardů, ale neposkytuje dostatečně přesný odhad výsledků pro neznámé vzorky, to znamená, že kalibrační model není dostatečně robustní (Obr. 29). Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena velkým počtem odhadovaných „nezávislých“ parametrů s příliš malým počtem kalibračních standardů (ESBENSEN, 1998).



Obr. 29: Ukázka robustnosti kalibračního modelu: a) robustní model; b) nedostatečně robustní model

### 3.13 Kvantitativní analýza

Platnost Lambert-Beerova zákona, tj. lineární závislosti mezi absorpční a koncentrací měřených komponent, je předpokladem pro nejjednodušší spektrální kvantitativní analýzu. Požadavkem této analýzy je, aby se v infračerveném spektru vybrané vibrační pásy nepřekrývaly a aby nebyly ovlivňovány intermolekulárními interakcemi. Proto je nutný pro kvantitativní kalibraci v NIR spektroskopii vývoj kalibračních modelů s využitím pokročilejších, sofistikovanějších chemometrických algoritmů (TENKL *et al.*, 2009).

#### 3.13.1 Metoda částečných nejmenších čtverců (Partial Least Squares – PLS)

Statistické pojetí kvantitativní analýzy je základním principem, na kterém je tato metoda založena. Algoritmus PLS (Obr. 30) byl vyvinut v 70. letech Hermanem Woldem a své hlavní využití měl zejména v sociálních vědách. Tato metoda se ve spojitosti právě s infračervenou spektroskopií objevuje velmi často, protože umožňuje komprimovat často

velmi obsáhlé matice spektrálních dat (TENKL *et al.*, 2009). V PLS algoritmu dochází ke komplexnímu hodnocení zadané části nebo částí spekter a využití oblastí, které jsou statisticky proměnlivé jako funkce koncentrace dané komponenty.

V PLS metodě je využit komplikovaný matematický aparát faktorové analýzy. Příprava kalibračních vztahů zahrnuje redukci matice dat dimenze  $(n, N)$ , kde  $n$  je počet bodů a  $N$  představuje počet kalibračních směsí na matici dimenze  $(n_f, N)$ , kde  $n_f$  značí počet faktorů. Faktor představuje kombinaci spektrálních charakteristik. S touto redukcí je spojena i redukce matice koeficientů z rozměru  $(n, n_s)$  na rozměr  $(n_f, n_s)$ , kde  $n_s$  je počet nezávisle absorbujících složek. Vztah mezi maticemi lze zapsat jako (HAALAND *et* THOMAS, 1988a,b):

$$\text{PŘED REDUKCÍ: } A(n, N) = k(n, n_s) \cdot c(n_s, N) + e(n, N)$$

$$\text{PO REDUKCI: } A(n_f, N) = k(n_f, n_s) \cdot c(n_s, N) + e(n_s, N)$$

kde:

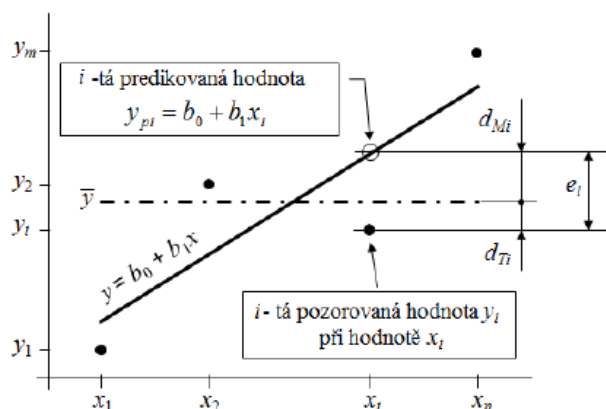
**A** = matice dat ( $N$  spekter o  $n$  bodech),

**k** = matice koeficientů ( $n$  koeficientů pro  $n_s$  složek),

**c** = matice koncentrací složek ( $n_s$  složek v  $N$  směsích),

**e** = matice odchylek (pro  $n$  bodů v  $N$  spektrech).

Hlavním cílem PLS regrese je tedy vyhledání souboru faktorů upravující současné rozložení dat a analytické koncentrace s tím předpokladem, že tyto faktory vysvětlují v maximální možné míře kovariance spektrální informace a koncentrace analyzované látky, čímž dojde k odstranění problému způsobeného vzájemnou korelací mezi různými vlnovými délkami. V průběhu tvorby kalibrace jsou všechny důležité koncentrační a spektrální informace analyzovaných kalibračních standardů kondenzovány do souborů nových proměnných, tzv. hlavních komponent. Nezávislým zdrojem proměnlivosti v kalibračních datech reprezentuje každá komponenta a zároveň popisuje odchylky v NIR spektrech, které odpovídají rozdílnostem v chemickém složení analyzovaných vzorků. Dochází k seřazení komponent podle množství reprezentované variability a jsou vyvíjeny společně s modelem kalibrace, který zajišťuje nejlepší korelaci mezi spektrálními informacemi a informacemi poskytnutými koncentrací analytu (MELOUN *et* MILITKÝ, 2002).



kde:

$y_i$  =  $i$ -tá pozorovaná hodnota při hodnotě faktoru  $x_i$ ,

$y_{pi}$  =  $i$ -tá predikovaná hodnota, přičemž platí:  $y_{pi} = b_0 + b_1 x_i$ ,

$e_i$  =  $i$ -té residuum řízené vztahem:  $e_i = y_i - y_{pi}$ ,

$d_{Mi}$  = odchylka  $i$ -té predikované hodnoty od průměru pozorovaných hodnot  $d_{Mi} = y_{pi} - \bar{y}$ ,

$d_{Ti}$  = odchylka  $i$ -té pozorované hodnoty od průměru pozorovaných hodnot  $d_{Ti} = y_i - \bar{y}$ ,

Obr. 30: Grafické znázornění metody nejmenších čtverců (KOZELKOVÁ, 2012)

Hodnota  $y_{pi} = b_0 + b_1 x_i$  se nazývá predikovaná hodnota a odchylka pozorované hodnoty od predikovaného rezidua  $e$  (ANONYM, 2012). U metody PLS je výstupem lineární regrese mezi hodnotami vypočtenými kalibračním modelem a vloženými kvantitativními hodnotami. Tato regrese má při vhodně vypracovaném kalibračním modelu jednotkovou směrnici se statisticky nevýznamným absolutním členem (NICOLET CZ, 2007b). Díky kvalitě získaného kalibračního modelu se PLS regresní algoritmus stal jedním z dominantních postupů vícerozměrné kalibrace (VENKATESAN *et al.*, 2011).

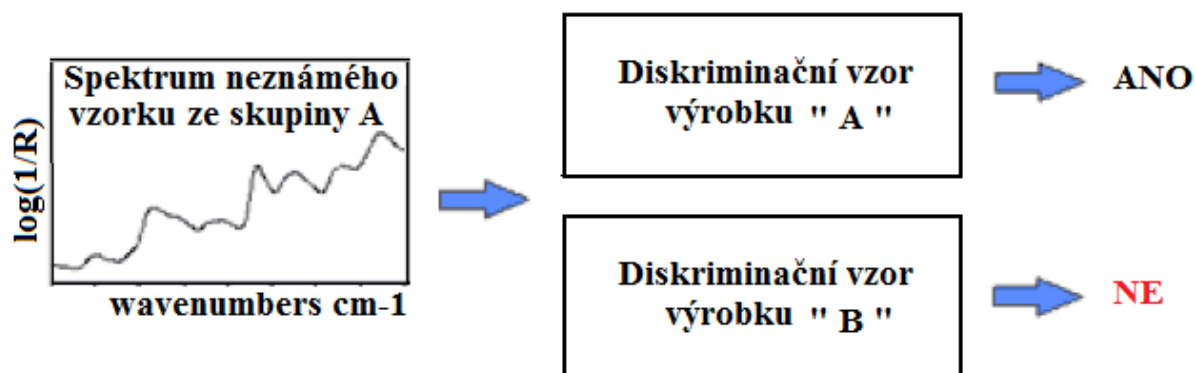
### 3.14 Kvalitativní analýza

Kvalitativní vlastnosti vzorků, na rozdíl od stanovení koncentrace při kvantitativní analýze, jsou spojeny s jejich spektrální odlišností. Mají diskrétní hodnoty a nemohou tedy být vyjádřeny jako spojitě funkce. Tyto hodnoty mohou představovat např. shodnost či totožnost výrobků nebo reprezentovat jejich dobrou kvalitu (HEISE *et* WINZEN, 2008). U takového stanovení je výsledkem potvrzení nebo zpochybnění identity vzorku nebo jeho klasifikace tj. zařazení do různých tříd (MUSELÍK, 2012). Ve studii WALCZAK *et* MASSART (1998) jsou shrnuta rozsáhlá srovnání různých možností klasifikačních metod

kvalitativní analýzy, neboť používané chemometrické metody pro tvorbu tříd nebo pro klasifikaci spekter či látek jsou rozděleny na základě použitého algoritmu. Kvalitativní metody většinou fungují při hodnocení celého spektra, ale existují případy spoléhající se na výběr konkrétních vlnových délek (HEISE *et* WINZEN, 2008).

### 3.14.1 Diskriminační analýza (Diskriminant analysis)

Ronald Fisher v roce 1936 poprvé popsal diskriminační analýzu. Je to spektrální klasifikační technika, která určuje, zda a do které z definovaných tříd známých standardů v kalibračním modelu neznámý analyzovaný vzorek patří (Obr. 31). Název třídy nebo tříd, které jsou analyzovanému spektru nejpodobnější je cílem této analýzy.



Obr. 31: Znárodnění aplikace diskriminační analýzy (KOZELKOVÁ, 2012)

Diskriminační analýza a vlastní klasifikace pomocí ní vyžaduje tvorbu kalibračního modelu, který specifikuje jednotlivé třídy, přičemž každá třída je definována libovolným počtem standardů. Klasifikační pravidla tj. matematický algoritmus využívaný k tvorbě kalibračního modelu interpretuje infračervené spektrum jako bod v dimensionálně redukovaném faktorovém prostoru. Součástí výsledku může být i tzv. Mahalanobisova vzdálenost, která určuje vzdálenost hodnoceného spektra od těžiště každé třídy.

#### 3.14.1.1 Mahalanobisova vzdálenost

Jedná se o jakési obecné měřítko vzdálenosti, které bere v úvahu korelaci mezi jednotlivými parametry a zároveň je nezávislá na rozsahu jejich hodnot. V systému souřadnic, jehož osy na sebe nemusí být kolmé, počítá vzdálenosti mezi jednotlivými objekty.

Jsou-li dány dvě skupiny objektů  $w_1$  a  $w_2$  o počtu objektů  $n_1$  a  $n_2$  a popsané parametry  $p$ , pak platí vztah:

$$D_5^2(w_1, w_2) = \overline{d}_{12} V^{-1} \overline{d}'_{12}$$

Kdy vektor  $d_{12}$  vyjadřuje rozdíly mezi průměry parametrů  $p$  v obou skupinách a  $V$  vyjadřuje váženou disperzní matici, tj. do rovnice vkládá kovarianci mezi parametry, která je uvnitř skupin objektů a kde  $S_1$  a  $S_2$  jsou disperzní matice jednotlivých skupin.

$$V = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} [(n_1 - 1)S_1 + (n_2 - 1)S_2]$$

Při tvorbě modelu kalibrace jsou všechny informace ve spektru kondenzovány do souborů proměnných tzv. hlavních komponent (PC). Zdroj proměnlivosti v datech určených ke kalibraci, který je nezávislý, je reprezentován každým faktorem. První tři hlavní komponenty např. po vynesení do 3D grafu, zobrazují všechna kalibrační spektra jako bod v trojrozměrném prostoru. Použitím většího množství standardů v kalibraci, po definici třídy, vzniká v kalibračním modelu tzv. klastr (shluk bodů). Spektrum hodnoceného materiálu je vloženo do prostoru a následně je přiřazeno k charakterově nejpodobnější definované třídě. Kromě názvu třídy lze získat i vzdálenost hodnoceného spektra od těžiště klastru (MUSELÍK, 2012).

### 3.15 Kritéria pro posuzování spolehlivosti kalibračního modelu

Do programového vybavení NIR spektroskopů jsou dnes kalibrační metody běžně zahrnuty, ale správná volba kalibrační metody, popř. vhodné oblasti vlnových délek vhodných pro kalibraci měřených složek, je úkolem analytika, který musí následně zhodnotit spolehlivost a použitelnost zkonstruovaného modelu kalibrace. Použitelnost kalibrace je závislá na schopnosti správné předpovědi hodnoty parametrů analyzovaného vzorku s podobnými vlastnostmi, které vykazuje soubor kalibračních vzorků. Kvalitu vytvořeného modelu kalibrace charakterizují tyto hlavní parametry:

- a) korelační koeficient zmiňované lineární regrese,
- b) směrodatná odchylka kalibrace (*Standard Error of Calibration – SEC*),
- c) křížová validace (*cross – validation*),
- d) směrodatná odchylka predikce (*Standard Error of Prediction – SEP*),
- e) kalibrační variační koeficient (*Calibration Coefficient of Variation – CCV*),
- f) predikční variační koeficient (*Prediction Coefficient of Variation – PCV*).

Dále mezi parametry hodnocení spolehlivosti kalibračního modelu patří určení optimálního počtu PLS faktorů (funkce *PRESS*) a identifikace odlehlých standardů zabezpečované funkcemi:

- a) *spectrum Outlier*,
- b) *principal component Score (PC Score)*,
- c) *leverage*.

K ověření predikce modelu kalibrace a její správnosti lze použít statistickou metodu dvoupárového T-testu na střední hodnotu, jejímž principem je posouzení, zda se hodnoty, získané referenční analýzou a hodnoty predikované, průkazně na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  neliší.

### 3.15.1 Korelační koeficient (R)

Koeficient korelace je mírou lineární závislosti mezi referenčními hodnotami a snímanými spektry. Pohybuje se v intervalu hodnot od -1, tj. dokonalá negativní závislost, do +1 tj. dokonalá pozitivní závislost. Existují případy, kdy je, namísto korelačního koeficientu, uvedena jeho druhá mocnina tzv. koeficient determinace ( $R^2$ ).

Výpočet korelačního koeficientu je řízen vztahem:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - x_{prum})(y_{i,NIR} - y_{NIR,prum})]}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - x_{prum})^2 \sum_{i=1}^N (y_{i,NIR} - y_{NIR,prum})^2}},$$

kde:

$y_{NIR}$  = hodnota předpověděná z NIR spektra,

$x_i$  = referenční hodnota  $i$ -tého kalibračního vzorku,

$y_{NIR,prum}$  = průměrná hodnota  $y_{NIR}$ ,

$x_{prum}$  = průměrná hodnota  $x_i$ ,

$N$  = počet kalibračních vzorků.

CHRÁSKA (1998) uvádí, že prakticky použitelná závislost je minimálně  $R = \pm 0,40$ . V Tab. II jsou uvedeny intervaly koeficientů korelace, které slouží k jejich orientační interpretaci.

Tab. II: Hodnoty koeficientů korelace (r) jak uvádí CHRÁSKA (1998)

Koeficient korelace	Interpretace
$ r  = 1$	naprostá závislost (funkční závislost)
$1,00 >  r  \geq 0,90$	velmi vysoká závislost
$0,90 >  r  \geq 0,70$	vysoká závislost
$0,70 >  r  \geq 0,40$	střední závislost
$0,40 >  r  \geq 0,20$	nízká závislost
$0,20 >  r  \geq 0,00$	slabá (nepoužitelná) závislost
$ r  = 0$	naprostá nezávislost

### 3.15.2 Směrodatná odchylka kalibrace (Standard Error of Calibration – SEC)

Kvalitu zkonstruovaného modelu lze posoudit také dle směrodatné odchylky kalibrace *SEC* (*Standard Error of Calibration*), která je podle ESBENSEN (1998) definována vztahem:

$$SEC = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (y_{NIR} - x_i)^2},$$

kde:

$y_{NIR}$  = hodnota předpověděná z NIR spektra,

$x_i$  = referenční laboratorní hodnota *i*-tého kalibračního vzorku,

$N$  = počet kalibračních vzorků.

### 3.15.3 Validace

K posouzení spolehlivosti kalibračního modelu slouží validace. Např. pro metodu PLS existuje hned několik metod validace, přičemž tou nejjednodušší pro statistické posouzení odchylek vypočtených hodnot skutečných koncentrací v kalibračních spektrech je křížová validace. Dalším krokem při kalibraci je určení koncentrací složek a výsledky jsou následně porovnány s referenčními hodnotami a statisticky vyhodnoceny. Pro diskriminační analýzu je nejjednodušší validace provedena již během výpočtu kalibračního modelu. Při testování spolehlivosti modelu kalibrace je kvalitnějším hodnocením metoda vnitřní kalibrace. Principem této metody je určení jednoho nebo několika spekter jako validační. Další možností jak ověřit spolehlivost kalibrace je externí validace. Zde je využit soubor validačních standardů, které jsou definovány mimo kalibrační model jako textový soubor daného formátu.



### 3.15.3.1 Křížová validace (Cross-validation)

Principem postupu je vypuštění jednoho ze standardů a tvorba nového modelu ze zbylých kalibračních dat. Tento vzniklý model je následně použit k výpočtu vektoru koncentrací standardu, který byl vypuštěn. U vypuštěného standardu jsou pak statisticky vyhodnoceny vypočtené odchylky od deklarovaného obsahu komponent. Jde tedy o vynechání jednoho páru proměnných a nový výpočet parametrů  $b_0$  a  $b_1$  do kalibrační rovnice metodou PLS ze zbylých hodnot  $x_{exp}$  a  $y_{exp}$  vztahy:

$$y_{exp} = b_0 + b_1 x_{exp} + \varepsilon \qquad y_{vypoč} = b_0 + b_1 x_{vynech}$$

Z vynechané nezávisle proměnné  $x_{vynech}$  a parametrů  $b_0$  a  $b_1$  je vypočítaná předpokládaná hodnota závisle proměnné  $y_{vypoč}$ , která je použita spolu s vynechanou hodnotou  $y_{vynech}$  pro výpočet tzv. **čtverce reziduálu** (*SR – Square residual*)

$$SR = (y_{vypoč} - y_{vynech})^2$$

Vynechání páru proměnných a následné další výpočty, se opakují pro všechny páry  $x$  a  $y$ . Ze všech nově získaných hodnot SR je vypočítaná směrodatná odchylka predikce (*SEP – Standard Error of Prediction*) pro celou funkci kalibrace (HAALAND *et* THOMAS, 1988b). Shoduje-li se vypočítaná hodnota analyzované složky s hodnotou, která je přidělena ke standardu jako referenční, pak metoda funguje dobře a datové body, které jsou vyobrazené na vygenerovaném grafu, jsou rozmístěny na úhlopříčce zobrazující pole. Informace získané touto diagnostikou může být využita k vyhledání odlehlých standardů (NICOLET CZ, 2007a).

### 3.15.4 Směrodatná odchylka predikce (Standard error of prediction – SEP)

Predikce tj. předpověď, je stanovení koncentrace komponenty ze spektra na základě vytvořené kalibrační rovnice. Vytvořený kalibrační model je testován nezávislým souborem vzorků o známém složení.

SEP je řízena vztahem:

$$SEP = \sqrt{\frac{1}{M-1} \sum_{i=1}^M (y_{NIR} - x_i - bias)^2},$$

kde:

$y_{NIR}$  = hodnota předpověděná z NIR spektra,

$x_i$  = referenční laboratorní hodnota  $i$ -tého validačního vzorku,

$M$  = počet validačních vzorků.

Hodnota *bias* (průměrný rozdíl mezi referenčními hodnotami  $x_i$  pro vzorky validačního souboru s předpověděnými hodnotami z NIR spekter  $y_{NIR}$ ) je vyjádřena vztahem:

$$bias = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (y_{NIR} - x_i)$$

Na minimální SEP je kladen důraz. Jedná se totiž o odchylku očekávanou v budoucích předpovědích. SEP úspěšné NIR kalibrace bývá, v porovnání se směrodatnou odchylkou při laboratorním stanovení, přibližně dvojnásobná (ESBENSEN, 1998).

### 3.15.5 Kalibrační a predikční variační koeficient (Calibration and prediction coefficient of variation – CCV a PCV)

Výpočtem kalibračního variačního koeficientu *CCV* a predikčního variačního koeficientu *PCV* lze spolehlivost vytvořeného kalibračního modelu pro různé složky ověřit také. Získaná hodnota je udána v procentech a pro výpočet platí vztahy:

$$CCV = \frac{SEC}{X_{prum}} \cdot 100, \quad PCV = \frac{SEP}{X_{prum}} \cdot 100,$$

kde:

**SEC** = směrodatná odchylka kalibrace,

**SEP** = směrodatná odchylka predikce,

**X<sub>prum</sub>** = průměr laboratorních hodnot složky.

Nezávislost na použitých jednotkách je pro *CCV*, ve srovnání s *SEC*, výhodou. Velmi spolehlivá kalibrace dosahuje hodnoty *CCV* pod 5 %, při hodnotě do 10 % je model ještě použitelný (MÍKA *et al.*, 2008).

### 3.15.6 Funkce PRESS (predicted residual sum of squares)

MATĚJKA (2006) uvádí, že je-li kalibrační model vyvíjen regresní metodou *PLS*, je důležité věnovat pozornost diagnostickému nástroji funkce *PRESS* (Predicted residual sum of squares). Tato diagnostika zobrazuje změnu hodnoty sumy čtverců predikované zbytkové chyby v závislosti na čísle hlavních komponent použitých ke kalibraci každé komponenty analyzované aktivní metodou. Výpočet funkce *PRESS* je dán vztahem (HAALAND *et THOMAS*, 1988b):

$$PRESS = \sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2$$

kde:

**m** = celkový počet kalibrovaných vzorků,

$\hat{c}_i$  = odhadovaná hodnota koncentrace,

$c_i$  = referenční hodnota koncentrace *i* – tého vzorku vynechaného z kalibrace při křížové validaci.

Závislost funkce *PRESS* na počtu faktorů, které jsou použité při tvorbě kalibračního modelu složek pomocí *PLS* metody, umožňuje odhadnout optimální počet faktorů a je zřejmé, že optimální počet *PLS* faktorů odpovídá oblasti okolo minima na zmíněné křivce *PRESS*. V rámci této oblasti je vhodné zvolit raději nižší počet faktorů, protože jejich vysoký počet vede ke snížení kvality predikce pro jiná než kalibrační měření. Dochází tím k zahrnutí stále většího podílu šumové složky v analyzovaných kalibračních datech, tzn., že metoda popisuje kalibrační data včetně chyb a nahodilých jevů, které jsou v nich obsažené. Stejně tak je nevhodný i model s malým počtem *PLS* faktorů. Nejsou totiž dostatečně využity všechny relevantní informace. Množství faktorů je ovlivněn i počtem měření v kalibraci. Čím více je v kalibraci vzorků a spekter, tím je možné využít vyšší počet *PLS* faktorů (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2010). *PLS* faktory zahrnují spektrální a současně koncentrační informaci, přičemž tyto faktory jsou řazeny podle množství reprezentované variability. Nejvíce variability standardů použitých ke kalibraci popisuje první faktor. Každý následující faktor reprezentuje většinu ze zbývajících variability. První faktor, mimo variabilitu, obsahuje většinu společné informace,

kteřá je obsažena v datech. Zbývající faktory obsahují specifickéjší informace popisující malé změny v datech, které jsou často pro analýzu důležité. Hodnota *PRESS* je indikátorem chyby kalibrace PLS metody (THERMONICOLET, 2004).

### 3.16 Identifikace odlehlých standardů

Diagnostické algoritmy umožňující hodnocení zadávaných dat dle různých statistických kritérií jsou v NIR spektroskopii k dispozici pro každý typ analýzy. K identifikaci odlehlých standardů se využívají diagnostické nástroje vylučující ze souboru standardy na základě spektrálních nebo koncentračních odlišností.

- a) **Spectrum Outlier** – diagnostika počítající Mahalanobisovu vzdálenost od průměrného spektra pro každé spektrum kalibračního standardu analyzovaného aktivní metodou, kdy jsou využívány koncentrační a spektrální data pro každý standard a hodnocenou komponentu. Vyhledává nejvíce odlišná spektra standardů a k posouzení, zda jde o signifikantní rozdíl, využívá Dixonův nebo Chauvenetův test. Základem diagnostiky je spektrální informace všech standardů.
- b) **Principal Component Scores (PC Scores)** – graficky zobrazuje, jak jsou v metodách PLS, PCR, DA nebo Distance Match reprezentovány jednotlivé použité standardy pomocí PC, které jsou vypočítány pro metodu kalibrace. PC reprezentuje nezávislý zdroj spektrální proměnlivosti z kalibračních dat, přičemž PC jsou řazeny na základě množství reprezentované variability. Jedná se o diagnostiku určující, zda vypočtené PC spektrální data každého standardu správně reprezentují. Body, které jsou izolované od ostatních, indikují diferencii korespondujícího standardu od ostatních standardů v metodě. Metoda musí být před použitím diagnostiky kalibrována (BOYSWORTH *et* BOOKSH, 2007).
- c) **Leverage** – diagnostika informující o vlivu každého standardu na kalibrační model a o přesném popisu kalibračního modelu každým standardem. Po celém rozsahu generovaného grafu by datové body měly být distribuovány souměrně. Jestliže hodnota „Leverage“, tj. vzdálenost bodu od těžiště modelu, je vysoká, pak má standard

na kalibrační model pro vybranou složku významný vliv. Diagnostiku je možno použít pouze pro algoritmus PLS a až po provedení kalibrace (HEISE *et* WINZEN, 2008).

### 3.17 Testování parametrů kalibrace

#### 3.17.1 Párový t-test rovnosti středních hodnot

Tato statistická metoda se užívá v případě, je-li k měření obsahu jisté komponenty využito dvou a různých metod. V takovém případě je nutné rozhodnout, zda tyto metody v průměru poskytují stejné výsledky nebo zda je ve stanovených množstvích komponenty systematický rozdíl. Nejedná se o posouzení rozptylu (přesnosti) metod, stejně tak není důležitý ani skutečný obsah komponenty. Cílem je zjistit, zda obsahy komponenty jsou stejné podle zjištění obou metod.

K analýzám bývá použito náhodně vybraných vzorků, ve kterých dochází ke kolísání obsahu komponent. Za účelem eliminace vlivu tohoto kolísání na srovnávání metod dochází k měření každého vzorku oběma metodami. Rozhodnutí o shodnosti nebo rozdílnosti výsledků metod je založeno na jednotlivých rozdílech změřených obsahů komponenty v každém vzorku. Na výsledky měření 1. a 2. metodou je možné nahlížet jako na realizace dvou náhodných veličin  $\mathbf{X}_1$  a  $\mathbf{X}_2$ , přičemž obě jsou měřené na stejných vzorcích. Přesto, že jednotlivé vzorky jsou nezávislé, výsledky měření metodami  $\mathbf{X}_1$ ,  $\mathbf{X}_2$  nelze za nezávislé považovat, tj. čím bude hodnota veličiny  $\mathbf{X}_1$  větší, tím bude zhruba větší i hodnota veličiny  $\mathbf{X}_2$ .

Obecně jde o situaci, kdy existuje základní soubor s dvěma měřenými náhodnými veličinami  $\mathbf{X}_1$ ,  $\mathbf{X}_2$  s dvourozměrným rozdělením pravděpodobnosti s neznámými středními hodnotami  $\mu_1$ ,  $\mu_2$  a rozptyly  $\sigma_1^2$ ,  $\sigma_2^2$ . Testují se hypotézy o vztahu mezi středními hodnotami  $\mu_1$ ,  $\mu_2$  veličin  $\mathbf{X}_1$ ,  $\mathbf{X}_2$  na základě dvourozměrného náhodného výběru  $(\mathbf{X}_{11}, \mathbf{X}_{21})$ ,  $(\mathbf{X}_{12}, \mathbf{X}_{22})$ , . . . ,  $(\mathbf{X}_{1n}, \mathbf{X}_{2n})$ .

Dochází ke spárování hodnot náhodného výběru. Z předpokladu normality dvourozměrného rozdělení plyne, že rozdíl veličin  $\mathbf{X}_1$ ,  $\mathbf{X}_2$ , tj. náhodná veličina  $\mathbf{Z} = \mathbf{X}_1 - \mathbf{X}_2$ , má normální rozdělení  $\mathbf{N}(\boldsymbol{\mu}, \boldsymbol{\sigma}^2)$ , kde zřejmě  $\boldsymbol{\mu} = \mu_1 - \mu_2$ , ale zároveň  $\boldsymbol{\sigma}^2 \neq \sigma_1^2 + \sigma_2^2$ , z důvodu nezávislosti veličin  $\mathbf{X}_1$ ,  $\mathbf{X}_2$ . V metodách testujících vztah mezi  $\mu_1$  a  $\mu_2$  jde tedy o testy o střední hodnotě  $\mu_{\mathbf{Z}} = \mu_1 - \mu_2$  náhodné veličiny  $\mathbf{Z} = \mathbf{X}_1 - \mathbf{X}_2$ , jedná se tedy o jednovýběrové testy o střední hodnotě aplikované na náhodnou veličinu  $\mathbf{Z}$ .

Tuto situace je možné chápat i tak, že se jedná o dva různé základní soubory s rozděleními  $N(\mu_1, \sigma_{21})$  a  $N(\mu_2, \sigma_{22})$  a dva logicky spárované náhodné výběry z nich, tj.  $X_{11}, \dots, X_{1n}, X_{21}, \dots, X_{2n}$ . Nastává situace, pro kterou se užívá dvouvýběrový t-test. Rozdíl tkví nezávislosti dvou náhodných výběrů, a protože jejich nezávislost je podstatnou podmínkou užití dvouvýběrových t-testů, nelze nyní použít dvouvýběrových t-testů. Popis párového t-testu je popsán v Tab. III

Tab. III: Párový t-test o středních hodnotách

H0	H1	Testovací statistika R	Kritický obor $W_\alpha$
$\mu_1 = \mu_2$	$\mu_1 = \mu_2$		$ R  > t_\alpha(n-1)$
$\mu_1 \leq \mu_2$	$\mu_1 > \mu_2$	$R = Z_i / SZ\sqrt{n}$	$R > t_{2\alpha}(n-1)$
$\mu_1 \geq \mu_2$	$\mu_1 < \mu_2$		$R < -t_{2\alpha}(n-1)$

kde:

$$Z_i = X_{1i} - X_{2i}$$

$SZ$  = směrodatná odchylka veličiny  $Z = X_1 - X_2$ , tj.

$$S_Z = \sqrt{\frac{1}{n-1}(\sum_{i=1}^n Z_i^2 - nZ^2)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Z_i - nZ)^2}$$

$t_\alpha(n-1)$  = kritická hodnota Studentova t-rozdělení.

Při platnosti  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  má testovací statistika t-rozdělení s  $(n-1)$  stupni volnosti. Naprostou formální shodu párových t-testů s jednovýběrovými testy o střední hodnotě zjistíme ihned jejich srovnáním (PAVLÍK, 2005).

### 3.17.2 Dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu

Princip dvouvýběrového párového t-testu na střední hodnotu je založen na Studentově rozdělení pravděpodobnosti. Test se používá v případě, že se pro každou z  $n$  vybraných statistických jednotek stanoví dva statistické znaky v nezávislých měřeních. Ověřuje se tedy rozdíl spárovaných hodnot, nikoliv jejich shoda. Toto ověření probíhá v souladu s volbou hladiny pravděpodobnosti (většinou 0,05), jejímž důsledkem je velká pravděpodobnost při

potvrzení odlišnosti (95 %). Existují-li dva soubory hodnot (referenční a predikované), které je nutné srovnat, je nutné použít následující předpoklady:

- a)  $H_0$ : střední hodnoty obou výběrů se neliší
- b)  $H_1$ : střední hodnoty obou výběrů se liší

Zápisem lze testované hypotézy vyjádřit ve tvaru  $H_0: Ed = 0$  s alternativní hypotézou  $H_1: Ed \neq 0$ , přičemž  $D = X - Y$ . Kritická hodnota se vyjadřuje pro  $n - 1$  stupňů volnosti, kde  $n$  představuje počet dvojic v souboru. Funkce je dána matematickým zápisem:

$$T = \frac{\bar{D} - k}{S_D} \cdot \sqrt{n - 1}$$

kde:

$D$  = rozdíl hodnot dvou souborů,

$SD$  = výběrové variační rozpětí dvojic a je aritmetický průměr rozdílů.

Je-li vypočítaná **t krit (2)** < **|t stat|**, pak výsledek t testu spadá do oblasti kritických hodnot tzn. hypotézu  $H_0$  zamítáme a porovnávané hodnoty se statisticky na hladině významnosti 0,05 průkazně liší. Naproti tomu, je-li vypočítaná **t krit (1)** a **t krit (2)** > **|t stat|**, tak hypotézu  $H_0$  potvrzujeme (KUBANOVÁ *et* LINDA, 2007).

## 4 MATERIÁL A METODIKA

Tato disertační práce je zaměřena na možnosti využití blízké infračervené spektroskopie při kontrole kvality potravin a potravinářských výrobků a na jejich hodnocení z hlediska kvantitativních a kvalitativních parametrů. Byla sepsána s přispěním projektů získaných od Interní grantové Agentury AF Mendelovy univerzity v Brně (IGA) a Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) a jsou zde shrnuty charakteristiky základního složení hodnocených vzorků, jejich úprava před analýzami a přehled provedených referenčních analýz. V disertační práci byly hodnoceny různé potraviny a potravinářské suroviny, přičemž největší část práce se věnuje hodnocení mléka a mléčných výrobků. Dalšími materiály, které byly v rámci práce hodnoceny, byl med, káva a máslo. Část práce se zabývá zkoumáním vlivu teploty vzorku na přesnost měření na FT-NIR spektroskopu popř. porovnáním přesnosti kalibrací zkonstruovaných na základě využití různých referenčních metod.

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Mléko

V rámci experimentů k této práci byly zpracovávány především bazénové vzorky nehomogenizovaného syrového kravského, koziho a ovčího mléka. Vzorky kravského mléka byly odebírány na farmách Pardubického (Vysoké Mýto), Jihomoravského (Žabčice u Brna), Olomouckého (Senice na Hané), Zlínského (Valašská Bystřice) a Moravskoslezského kraje (Kunčice pod Ondřejníkem). Jedna z farem v Kunčicích pod Ondřejníkem hospodařila v ekologickém režimu, ostatní farmy využívají konvenční typ hospodaření. Odběry vzorků mlék probíhaly po dobu 36 měsíců (2012 – 2015) a to během celé laktace ve zhruba dvouměsíčních intervalech. Celkem bylo odebráno a následně analyzováno 72 vzorků.

Vzorky koziho mléka byly získávány na kozích farmách v Jihomoravském (Šošůvka, Račice) a Olomouckém kraji (Čelechovice na Hané). Farmy v Šošůvce a Čelechovicích na Hané hospodaří konvenčním typem chovu, farma v Račicích využívá ekologický způsob chovu. Stejně jako u kravského mléka probíhaly odběry po dobu tří let (2012 – 2015) v průběhu celé laktace opět v asi dvouměsíčním intervalu, přičemž bylo odebráno a analyzováno 55 vzorků mléka.



Vzorky ovčího mléka byly odebírány na ovčích farmách ve Zlínském (Valašská Bystřice) a Olomouckém kraji (Brníčko u Zábřehu). Farma v Brníčku u Zábřehu využívá konvenční způsob chovu ovcí, kdežto farma ve Valašské Bystřici využívala ekologický způsob hospodaření. Celkem bylo odebráno 40 vzorků mléka, přičemž odběry probíhaly opět v dvouměsíčních intervalech po dobu 36 měsíců (2012 – 2015) po celou dobu laktace.

Po odběru vzorků byly tyto zchlazeny na teplotu 6 – 8 °C, vloženy do chladicích boxů, z důvodu zachování teplotního řetězce, a převezeny na Ústav technologie potravin (ÚTP), Agronomické fakulty (AF) Mendelovy univerzity (MENDELU) v Brně, kde byly uloženy do chladicí komory S 300 S INOX (LEDO F-M s.r.o., Česká republika) při teplotě 8 °C a následující den zpracovány. Vzorky byly dodány bez použití jakýchkoliv konzervačních prostředků a byly analyzovány přímo v laboratoři na ÚTP AF MENDELU v Brně za účelem stanovení obsahu (%) bílkovin, tuku, laktózy a sušiny v případě kravského a ovčího mléka a tuku, bílkovin a laktózy v případě kozího mléka. Totožné vzorky byly také podrobeny analýze na spektroskopu FT-NIR Antaris a použity pro tvorbu nových kalibrací a rekalibraci již dříve vytvořených kalibrací (JANKOVSKÁ, 2004; RŮŽIČKOVÁ, 2007; KOZELKOVÁ, 2012). Rekalibrace byla provedena za účelem udržení funkčnosti a robustnosti dřívějších kalibrací. V této práci byly pro rozšíření kalibrací použity hodnoty získané referenčními popř. provozními metodami v souladu s Českými státními normami (ČSN). Pro tvorbu diskriminačních analýz popř. rekalibraci kalibrací byly také využity vzorky kravského, kozího a ovčího mléka z různých zdrojů bez participace na konkrétním výzkumu tj. od chovatelů, z tržní sítě popř. vzorky sloužící jako materiál při zpracovávání diplomových prací studentů ÚTP AF MENDELU popř. Ústavu chovu a šlechtění zvířat (ÚCHHZ) AF MENDELU, přičemž i tyto vzorky byly do laboratoří na ÚTP AF MENDELU dodávány a byly zpracovány výše popsaným způsobem.

#### **4.1.2 Máslo**

Vzorky analyzovaných másel o hmotnosti 250 g byly zakoupeny v tržní síti Jihomoravského a Olomouckého kraje. Másla byla po zakoupení vložena do chladicího boxu, vytemperovaného na teplotu 8 °C, a přepravena na ÚTP AF MENDELU. Celkem bylo analyzováno 26 vzorků různých stolních, čerstvých a nesolených másel. Jednalo se o 13 másel vyrobených v České republice a 13 zahraničních másel, která jsou dostupná na českém trhu.

Analyzovaná másla ze zahraniční produkce pocházela z Německa, Francie, Belgie, Polska a Irska. Vzorky másel byly zpracovány do 12 hodin po předání do laboratoře. Ihned po zakoupení byly u vzorků stanoveny procentuální obsahy vlhkosti a tuku a číslo kyselosti. Po uplynutí expirace bylo u vzorků opět změřeno číslo kyselosti, pro porovnání, zda vzorky másel podléhají výraznějším hydrolytickým změnám tuku během skladování. Vzorky byly zpracovány nejprve referenčními metodami a následně i pomocí spektroskopu FT-NIR Antaris.

#### 4.1.3 Med

Při zjišťování jakostních parametrů medu byly k analýzám použity vzorky medů, které byly zakoupeny v tržní síti, dále vzorky pocházející přímo od včelařů a poslední skupinou byly vzorky medů (autentické  $n = 19$ , falšované  $n = 6$ ) ze sbírky medů uložené na Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství (ÚZRHV) AF MENDELU. Vzorky byly zastoupeny medy květovými, medovicovými a smíšenými. Zvláštní skupinou byly medy, které byly výrobci označeny jako medy „pekařské“ ( $n = 10$ ). Do souboru vzorků byly také zařazeny sirupy, které jsou užívány k porušování medů ( $n = 7$ ). Sirupy byly taktéž poskytnuty pracovníky ÚZRHV AF MENDELU. Celkem bylo analyzováno 68 vzorků medů, přičemž část vzorků byla skladována při teplotě 22 °C na ÚTP AF MENDELU a zbytek vzorků byl skladován při stejné teplotě v prostorách včelína, který se nachází v areálu MENDELU. Charakteristiky jednotlivých vzorků medů jsou uvedeny v Tab. IV.

Tab. IV: Charakteristika medů použitých k analýzám

Typ medu	Označení vzorku	Název medu (dle etikety)	Země původu	Hmotnost balení (kg)	Rok obstarání
<i>Medy ze sbírky ÚZRHV</i>					
Květový	PA/67	Bez etikety	ČR	1	2006
Květový	PA/75	Květový	ČR	1	2006
Květový	PA/83	Květový – letní	ČR	1	2006
Květový	PA/84	Bez etikety	ČR	1	2006
Květový	PA/89	Květový – ovocné stromy	ČR	0,75	2006
Květový	PA/90	Akátový	ČR	0,75	2006
Květový	PA/91	Slunečnicový	ČR	0,75	2006

Květový	PA/146	Akátový	ČR	1	2010
Květový	PA/162	Krétský med	Řecko	0,4	2011
Květový	PA/164	Bez etikety	Maďarsko	1	2011
Květový	PA/165	Bez etikety	Maďarsko	1	2011
Květový	PA/195	Bez etikety	ČR	1	2013
Květový	PA/196	Kaštanovníkový	Itálie	0,1	2013
Smíšený	PA/63	Bez etikety	ČR	0,75	2005
Smíšený	PA/64	Javorový	ČR	0,75	2005
Smíšený	PA/65	Horský	ČR	0,75	2005
Smíšený	PA/66	Květový	ČR	1	2005
Smíšený	PA/73	Pohankový	ČR	1	2006
Smíšený	PA/74	Bez etikety	ČR	1	2006
Smíšený	PA/86	Květový – lesní	ČR	Sp. balení	2006
Smíšený	PA/87	Javorový	ČR	Sp. balení	2006
Smíšený	PA/105	Bez etikety	ČR	1	2007
Medovicový	PA/01	Bez etikety	ČR	Sp. balení	2001
Medovicový	PA/71	Bez etikety	Polsko	0,5	2005
Medovicový	PA/88	Lesní	ČR	0,75	2006
Pekařský	PA/200	Pekařský	Směs ze zemí ES a mimo EU	1	2013
Pekařský	VKL+1P	Pekařský	Směs ze zemí ES a mimo EU	1	2013
Pekařský	VKL+2P	Pekařský	Směs ze zemí ES a mimo EU	1	2013
Pekařský	VKL+3P	Pekařský	Směs ze zemí ES a mimo EU	1	2013
Pekařský	VKL+4P	Pekařský	Směs ze zemí ES a mimo EU	1	2013
Pekařský	VKL+5P	Pekařský	Směs ze zemí ES a mimo EU	1	2013
Pekařský	VKL+6P	Pekařský	Směs ze zemí ES a mimo EU	1	2013

Pekařský	VKL+7P	Pekařský	Směs ze zemí ES a mimo EU	1	2013
Pekařský	VKL+8P	Pekařský	Směs ze zemí ES a mimo EU	1	2013
<i>Medy zakoupené u včelařů</i>					
Kvěťový	27-M-011	Kvěťový lipový	ČR	0,9	2013
Kvěťový	28-M-011	Pastový	ČR	0,5	2013
Kvěťový	29-M-011	Kvěťový	ČR	0,5	2013
Kvěťový	30-M-011	Kvěťový lipový	ČR	0,5	2013
Kvěťový	31-M-011	Kvěťový pastovaný	ČR	0,5	2013
Kvěťový	33-M-011	Lipový	ČR	0,95	2013
Kvěťový	34-M-011	Luční	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,25	2013
Smíšený	25-M-011	Včelí lesní	ČR	0,5	2013
Medovicový	26-M-011	Medovicový	ČR	0,5	2013
Medovicový	32-M-011	Medovicový	ČR	0,5	2013
<i>Medy zakoupené v tržní síti</i>					
Kvěťový	1-L-001	Kvěťový	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,5	2013
Kvěťový	2-A-002	Kvěťový lesní	ČR	0,65	2013
Kvěťový	3-A-003	Kvěťový	ČR	0,5	2013
Kvěťový	6-A-004	Kvěťový	ČR	0,25	2013
Kvěťový	7-A-003	Luční	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,5	2013
Kvěťový	9-K-005	Z bylin	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,2	2013
Kvěťový	10-K-005	Kvěťový z divokých květů	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,25	2013
Kvěťový	11-K-005	Kvěťový z ovocných stromů	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,25	2013

Kvěťový	12-K-006	Kvěťový	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,25	2013
Kvěťový	13-K-006	Kvěťový	Směs ze zemí ES a mimo EU	1	2013
Kvěťový	15-K-007	Blüten Hönig, Füssig, BIO Langnese	Kuba, Bulharsko, Itálie, Rumunsko	0,45	2013
Kvěťový	18-K-005	Sommer-blüte goldklar	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,125	2013
Kvěťový	20-T-009	Kvěťový	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,25	2013
Kvěťový	21-T-003	Lipový	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,5	2013
Kvěťový	24-T-010	Kvěťový	ČR	0,4	2013
Smíšený	4-A-002	Kvěťový lesní	ČR	0,65	2013
Smíšený	5-A-003	Lesní	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,5	2013
Smíšený	8-A-002	Kvěťový	ČR	0,65	2013
Smíšený	17-K-008	Kvěťový lesní	ČR	0,25	2013
Smíšený	19-T-009	Lesní	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,25	2013
Smíšený	22-T-009	Smíšený	ČR	0,4	2013
Medovicový	14-K-007	Medovicový z Toskánska	Toskánsko, Itálie	0,5	2013
Medovicový	16-K-007	Egejský	Turecko	0,5	2013
Pekařský	23-T-009	Pekařský	Směs ze zemí ES a mimo EU	0,9	2013

#### 4.1.4 Káva

Pro tvorbu kalibrací byla použita káva Arabica Costa Rica finca San Luis. Tato káva byla pěstována v regionu Alajuela, ve městě San Luis de Sabanilla de Alajuela na úpatí pohoří Cordiller Central, která poskytuje pro pěstování kávy ideální podmínky. Finca San Luis je součástí panství Cafetalera Zamorana, zabírá plochu pouhých 5 hektarů. Dalšími druhy káv použitými ke konstrukci kalibrací byly vzorky káv El Salvador La Divina Providencia a India

Monsooned Malaba, která je unikátní tím, že se zrna po sklizni suší a následně jsou po dobu několika týdnů vystaveny větrům a monzunovým dešťům.

K experimentu hodnocení kvality byly využity dva vzorky kávy tj. Arabica – Costa Rica Fancy SHB Miralinda Especial a Ethiopia Yirgachffe washed Gr. 2. Káva Costa Rica SHB (Strictly Hard Bean) byla vypěstována ve vysokých nadmořských výškách, zrna se vyznačují vrásčitou texturou a mají kompaktní velikost. Káva Ethiopia byla vypěstovaná v oblasti Yirgachffe nacházející se v kopcovitém terénu na jihozápadu Etiopie a byla zpracována mokrou metodou. Oba druhy byly praženy na tři různé pražicí profily (Tab. V). Tyto pražicí profily byly využity jen k vytvoření diskriminační analýzy za účelem detekce odchylek v pražicím procesu.

Tab. V: Charakteristika profilů použitých při pražení káv použitých pro diskriminační analýzy

Profil pražení	Teplota vzduchu (°C)	Teplota zrna (°C)	Doba pražení (min:s)
Costa Rica	235	229	8:34
Ethiopia	235	227	12:16
Filtrace	228	220	9:00



Všechny druhy káv byly na ÚTP AF MENDELU dodány ve spolupráci se zakázkovou pražírnu prémiové arabiky Gill's Coffee se sídlem v Brně. Vzorky byly praženy na pražičce kávy vyrobené firmou Neuhaus Neotec, Německo (Obr. 32). Po upražení byla káva zabalena třemi různými způsoby, do papírových sáčků, aluminiových obalů a do obalů potahovaných plastovou vrstvou s jednocestným ventilem při normální atmosféře a při vakuu. Každé balení bylo dodáno třikrát (vzorky pro diskriminační analýzu) resp. dvakrát (vzorky pro kalibrace) ve dvou dobách výroby.

Obr. 32: Pražička kávy  
(MÜLLEROVÁ, 2015)

Celkem bylo analyzováno 162 vzorků kávy pro kvalitativní analýzu a 108 vzorků pro kvantitativní analýzu. Vzorky byly skladovány na třech různých místech, aby bylo dosaženo většího projevu změn v obsahu kofeinu a fenolů. Skladování probíhalo v chladničce při

teplotě 8 °C (LIEBHERR, Německo), v ideálních podmínkách (20 °C, temno) a v extrémních podmínkách s častými změnami vlhkosti, teploty popř. střídáním světla a tmy.

#### **4.1.5 Vliv použité referenční metody na přesnost měření tuku v mléce**

Obstarání vzorků pro srovnání kalibrací na obsah (%) tuku získaných metodami dle Gerbera a Röse-Gottlieba je popsáno v kapitole 4.1.6. Pro následné ověření přesnosti kalibrací bylo použito mléko zakoupené v mléčném automatu provozovaném společností TOKO agri, a.s., které bylo odstředěno. Získaná smetana byla následně do odstředěného mléka zpětně přidávána v různých nedefinovaných množstvích. Vzniklé vzorky mléka byly hodnoceny na obsah tuku acidobutyrometrickou metodou dle Gerbera, dále byly vzorky proměřeny na spektroskopu Antaris. Spektrální informace byly v konečném hodnocení vloženy do kalibrací vytvořených analýzou individuálních vzorků jak pro stanovení tuku dle Röse-Gottlieba, tak pro stanovení dle Gerbera.

#### **4.1.6 Vliv teploty vzorku na přesnost měření**

Vzorky mléka za účelem zjištění ovlivnitelnosti měření na spektroskopu teplotou vzorku byly získány na farmě v Jihomoravském kraji. Jednalo se o 30 individuálních vzorků kravského mléka, které byly ihned po odebrání zchlazeny na 6 °C a přepraveny do laboratoře na ÚTP AF MENDELU. Všechny vzorky dodané do laboratoře bez konzervačního činidla a v syrovém stavu byly uloženy do chladicí komory (LEDO F-M s.r.o., Česká republika) při 8 °C a následující den zpracovány a analyzovány.

#### **4.1.7 Detekce falšování sýrů**

K výrobě kozích sýrů bylo použito kozí mléko z kozí biofarmy DoRa s.r.o. v Ratibořicích a k simulaci falšování bylo použito kravské mléko získané z mléčného automatu provozovaného společností TOKO agri, a.s. Mléko bylo do laboratoře ÚTP AF MENDELU dopraveno v přenosném chladicím boxu při teplotě 8 °C tak, aby byl zajištěn správný teplotní řetězec. K výrobě sýrů bylo dále použito tekuté chymozinové syřidlo „Laktochym“ o garantované síle 1 : 5000 (Milcom a.s., Česká republika) a sušená smetanová kultura s označením „XI“ pro zakysání 30-50 l mléka (Milcom a.s., Česká republika)

o následujícím složení: mléko, sušené mléko, laktóza, bakteriální kmeny: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Vzorky byly po 24 hodinovém odkapání proměřeny na spektroskopu FT-NIR Antaris.



## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Referenční analytické metody

#### 4.2.1.1 Mléko

Na ÚTP AF MENDELU byly u vzorků kravského, kozího a ovčího mléka stanoveny obsahy (%) tuku, bílkovin, laktózy a s výjimkou kozího mléka i obsahy (%) sušiny. Uvedené komponenty byly stanoveny referenčními popř. provozními metodami v souladu s ČSN následujícím způsobem.

**Tuk** – obsah tuku byl stanoven provozní acidobutyrometrickou metodou dle Gerbera podle ČSN ISO 2446, kdy objem vzorku mléka byl 11 ml.

**Laktóza** – obsah laktózy byl stanoven v souladu s ČSN 57 0530 a to polatrimetricky (KRÜSS P 1000, KRÜSS GmbH, Německo) ve filtrátu za podmínek metody s vyjádřením jako množství monohydrátu laktózy v g na 100 g mléka.

**Bílkoviny** – obsah bílkovin byl stanoven podle Kjeldahlovy metody s přepočítávacím faktorem 6,38. K analýze byl použit přístroj Kjeltec™ 88100/200 (FOSS Analytical AB, Sweden). Stanovení bylo řízeno ČSN EN ISO 8968-1.

**Sušina** – obsah sušiny byl stanoven podle ČSN ISO 6731 vázkovou metodou na váze KERN 77 (Kern & Sohn GmbH, Německo) při  $102 \pm 2$  °C s využitím horkovzdušné sušárny (BINDER GmbH, Německo), navážka vzorku byla 10 g.

Před vlastními analýzami byly vzorky mléka vždy vytemperovány na teplotu 40 °C, promíchány a následně zchlazeny na 20 °C. Při chlazení docházelo k vyvstávání tuku na povrch a při analýzách bylo nutné převést tuk zpět do kapalné formy a rovnoměrně jej rozptýlit v celém objemu vzorku. Tato metodika byla zvolena na základě doporučení CHEN *et al.* (1999).

#### 4.2.1.2 Máslo

Vzorky másla byly po vyjmutí z chladicí komory ponechány 1 hodinu při pokojové teplotě, aby bylo dosaženo měkčí konzistence k usnadnění jejich analýz. U všech vzorků byl

v souladu s ČSN EN ISO 3727-1 stanoven procentuální obsah vody, stanovení obsahu tuku bylo provedeno metodou dle Gerbera metodikou podle DOLEŽÁLKA *et al.* (1963), číslo kyselosti bylo stanoveno podle ČSN EN ISO 660 a dle ZAJÍCE (1959). Po provedení analýz byly vzorky opět zabaleny do původních obalů a uloženy do chladicí komory při teplotě 8 °C až do uplynutí doby minimální trvanlivosti. Po jejím uplynutí bylo opět stanoveno číslo kyselosti. Vzorky pro analýzy byly odebírány ze středních částí kostek másla.

#### 4.2.1.3 Med

Vzorky medů byly zpracovány v laboratořích na ÚZRHV a ÚTP AF MENDELU. Medy byly hodnoceny na obsah pylových zrn mikroskopickou metodou, byl stanoven obsah vody, elektrolytická vodivost a také byla stanovena rotace sacharidů před a po jejich inverzi. Tyto analýzy měly prokázat pravdivost údajů uváděných výrobcí. Na základě získaných výsledků byly medy rozděleny do 4 skupin: autentické, nejspíše neporušené, pravděpodobně porušené a porušené.

**Stanovení počtu pylových zrn** - pylová analýza byla provedena podle Harmonizovaných melisopalynologických metod (OHE *et al.* 2004) na mikroskopu Intraco Micro LM 666 PC/oo. Identifikace pylových zrn byla realizována podle obrazové databáze ÚZRHV AF MENDELU a dle práce OHE *et al.* (2007).

**Obsah vody a elektrolytická vodivost** byly stanoveny podle zásad Harmonizovaných metod Evropské komise pro med (BOGDANOV *et al.*, 1997). Interpretace byla aplikována podle přístupů dle MAURIZIO *et al.* LOUVEAUX (1965), SAWYER (1988) a RICCIARDELI d'ALBORE (1997).

**Rotace sacharidů před a po inverzi** – jedná se o metody hodnotící, nikoliv zkoušející. Zejména rotace po inverzi (pomocí HCl na jednoduché sacharidy) je důležitá pro klasifikaci medu. Tyto zkoušky nejsou schopny rozeznat medy porušené a neporušené, ale např. tmavý med deklarovaný jako lesní, protože obsahuje např. potravinářské barvivo, nevykáže v testu kladnou, ale zápornou polarizaci, což je důkaz, že se jedná o podvrh. Referenční analýzy rotace před a po inverzi byly realizovány metodikou dle BOGDANOVA *et al.* (1997).

#### 4.2.1.4 Káva

Referenční analýzy vzorků kávy pro tvorbu kalibrací na obsah kofeinu a fenolů probíhaly na Ústavu chemie a biochemie (ÚCB) AF MENDELU a ÚTP AF MENDELU.

##### **Stanovení fenolů:**

Fenoly byly stanovovány pomocí UHPLC-PDA (Ultra High Performance Liquid Chromatography – Photodiode Array) po předchozí extrakci, na extrakčním zařízení Behr ED (Behr Labor-Technik, Německo) metodou dle Randalla a následné extrakci na pevném sorbentu (SPE – Solid Phase Extraction) v extrakční kolonce Chromabond HR-X. Analýza na UHPLC probíhala v koloně Kynetex C18. Mobilní fáze byla tvořena směsí 90 % kyseliny octové o koncentraci 0,8 % a 10 % acetonitrilu.

##### **Stanovení kofeinu:**

Před stanovením kofeinu byla provedena extrakce vzorků kávy do vody o teplotě 100 °C po dobu 5 minut. Analýza probíhala metodou HPLC na přístroji Agilent 1100 (Agilent Technologies, USA) v koloně WATREX Nucleosil 120-5 C18 při teplotě 35 °C v mobilní fázi se složením 20 % acetonitrilu a 80 % vody.

#### 4.2.1.5 Vliv použité referenční metody na přesnost měření tuku v mléce

Laboratorní metody se řídí prostřednictvím norem pro stanovení obsahu tuku. Za tímto účelem jsou využívány dvě metody. Metoda vážková, jinak nazývaná metodou dle Röse-Gottlieba je metodou referenční a metoda butyrometrická dle Gerbera, která je považována za metodu provozní a je řízena ČSN ISO 2446. Stanovení tuku podle Röse-Gottlieba se řídí dle ČSN EN ISO 1211. Dodané mléko bylo před analýzami temperováno na 40 °C a zchlazeno na 20 °C.

**Metoda dle Gerbera** - podstatou metody je stanovení podílu tuku, který se oddělí v butyrometru po rozpuštění fosfolipidického obalu tukových kuliček působením kyseliny sírové (dle Gerbera tj. 91% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o hustotě  $\rho = 1,817 \pm 0,003 \text{ g/cm}^3$  při 20 °C) za podmínek metody (VORLOVÁ *et al.*, 2012).

**Metoda dle Röse-Gottlieba** - podstatou zkoušky je extrakce amoniakálního ethanolového roztoku zkušební vzorku diethyletherem a petroletherem a následné odstranění rozpouštědla destilací nebo odpařením a následné stanovení hmotnosti vyextrahovaných látek v g na 100 g (VORLOVÁ *et al.*, 2012).

Ve cvičných mlékařských poloprovozech na ÚTP AF MENDELU bylo mléko zahřáto na 40 °C a odstředěno na separátoru mléka SCM 80 (LKL-7, private company, Ukrajina). Zpětným přídavkem odstředěné smetany do odstředěného mléka bylo vytvořeno 30 vzorků o objemu 100 ml tak, aby bylo dosaženo různé tučnosti. Před směšováním byly obě složky zahřáty na 40 °C, aby bylo dosaženo zpětného rozptýlení tuku v mléce.

#### ***4.2.1.6 Vliv teploty vzorku na přesnost měření***

Vzorky mléka pro tento experiment byly před hodnocením temperovány na teplotu 40 °C, promíchány a zchlazeny na 20 °C. Následně byly analyzovány referenčními metodami (viz kap. 4.2.1.1) ve dvou opakováních. K vyhodnocení byly použity průměrné hodnoty referenčních analýz. Pro referenční stanovení tuku metodou podle Röse-Gottlieba bylo využito služeb soukromé nezávislé akreditované laboratoře pro vyšetřování potravin se sídlem v Brně. Vzorky byly převáženy do laboratoře v chladicím boxu při teplotě 8 °C. Souběžně byly vzorky analyzovány na FT-NIR Antaris. Všechny ostatní analýzy probíhaly na ÚTP AF MENDELU.

#### ***4.2.1.7 Detekce falšování sýrů***

V cvičných mlékařských poloprovozech ÚT AF MENDELU v Brně byly vyrobeny čerstvé sýry jen z kravského a koziho mléka a dále kozí sýry s přídavkem 100 %, 50 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 % a 0 % kravského mléka a to i přes to, že velmi nízký přídavek většinou nemá pro případného falzifikátora ekonomický přínos. Vlastní výrobě sýrů předcházela pasterace mléka při 72 °C s výdrží 15 s. Následně bylo mléko zchlazeno na 30 °C, byl přidán 1% smetanový zákys vyrobený ze sušené smetanové kultury s označením „XI“ (MILCOM a.s., Česká republika). Prokysání v termostatu Friocell (BMT Medical Technology s.r.o, Česká republika) trvalo 40 minut při teplotě 30 °C. Důležitým krokem při výrobě sýrů je výpočet síly syřidla dle Soxhleta a dávky syřidla. Tyto hodnoty byly vypočítány podle následujících vzorců (ŠUSTOVÁ *et SÝKORA*, 2013):

$$Síla (S) = \frac{\text{Objem mléka (ml)} * 2400}{\text{Čas koagulace mléka (s)}}$$

$$Dávka (D) = \frac{\text{Množství sýřeného mléka v ml (M)}}{\text{Síla použitého syřidla (S)}} * \frac{35}{\text{teplota sýření (t)}} * \frac{40}{\text{doba sýření (T)}}$$

Po uplynutí doby prokysání bylo aplikováno vypočítané množství tekutého chymozinového syřidla „Laktochym“ s garantovanou silou 1:5000 (MILCOM a.s., Česká republika). Sýření probíhalo v termostatu Friocell (BMT Medical Technology s.r.o, Česká republika) 40 minut při 30 °C. Po vytvoření sraženiny byla tato ve třech tříminutových intervalech pokrájena, vložena do forem a v pěti patnáctiminutových intervalech obracena za účelem zvýšení synereze (vypuzování syrovátky). Syrovátka následně odkapávala 18 hodin při pokojové teplotě. Všechny vzorky sýrů byly vyrobeny za stejných podmínek. Následující den byly vzorky měřeny na infračerveném spektroskopu FT-NIR Antaris.

#### 4.2.2 Měření na NIR spektroskopu

Spektroskopické analýzy byly realizovány pomocí spektroskopu FT-NIR Antaris (ThermoNicolet Corp., USA). Zdrojem emitujícího záření spektroskopu je wolfram-halogenová žárovka. Dělení paprsku záření je zabezpečeno přesně zbroušeným okénkem, které je vyrobeno z fluoridu vápenatého (CaF<sub>2</sub>) a výsledný signál je zaznamenán na detektoru z InGaAs. Všechny vzorky byly snímány ve spektrálním rozsahu 10 000 – 4 000 cm<sup>-1</sup>. Doba snímání spektra se pohybovala okolo 1,5 minuty. Na přístroji je možné nastavení počtu scanů spekter i spektrálního rozlišení. Spektroskop dále nabízí tři různé režimy k analýze vzorků (viz kap. 3.5).

Správná komunikace mezi počítačovou jednotkou a spektroskopem byla zabezpečena softwarem Result Integration (viz kap. 3.6.1). Kalibrační modely pro kvalitativní a kvantitativní analýzy byly konstruovány softwarem TQ Analyst (viz kap. 3.6.1) využitím metody diskriminační analýzy (viz kap. 3.14.1) a metodou částečných nejmenších čtverců PLS (viz kap. 3.13.1). K instrumentálně získaným spektrům byly přiřazovány jejich referenčně analyzované hodnoty, popř. byla eliminována spektra, která byla využitím diagnostiky Spectrum Outlier (viz kap. 3.16) vyhodnocena jako neodpovídající analyzovanému souboru. Správnost vytvořených kalibračních modelů byla ověřena křížovou

validací (viz kap. 3.15.3.1), s cílem určení schopnosti kalibračního modelu co nejpřesněji předpovědět obsah stanovované komponenty. V následujících kapitolách jsou blíže specifikovány metodiky použité k analýze vzorků.

#### 4.2.2.1 Mléko

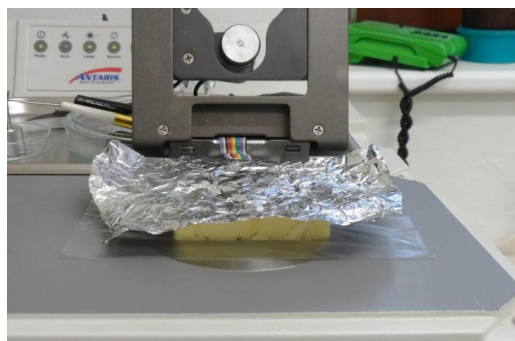
Před spektroskopickou analýzou bylo mléko vytemperováno na 40 °C, promícháno a následně zchlazeno na 20 °C. Tento postup byl zvolen dle doporučení, které uvádí CHEN *et al.* (1999), neboť je nutné převést tuk do kapalné formy a rovnoměrně jej rozptýlit v celém objemu vzorku. Vzorky byly proměřeny na Petriho misce ( $\varnothing = 5$  cm) v režimu reflektance na integrační sféře přístroje (Obr. 33). Odraz paprsku byl zajištěn transflektanční kyvetou s kovovým zrcátkem ( $\varnothing$  1,5 cm) s výškou reflexní plochy (h) 0,2 mm v případě kravského a ovčího mléka a (h) 0,3 mm v případě kozího mléka. Počet scanů ke snímání jednoho spektra byl 100 s nastavením spektrálního rozlišení 8  $\text{cm}^{-1}$  u kravského a ovčího mléka a 150 scanů v rozlišení 16  $\text{cm}^{-1}$  u kozího mléka. Spektra mléka byla měřena ve spektrálním rozsahu 10 000 – 4 000  $\text{cm}^{-1}$ . Každý vzorek mléka byl proměřen 2krát a k tvorbě či následnému rozšíření kalibračních modelů byla softwarem vytvořena průměrná spektra, která byla následně v případě kravského a ovčího mléka zpracovávána algoritmem MLS. Kalibrační modely byly tvořeny metodou PLS a před rekalibrací byla nasnímaná spektra upravena na jejich 1. derivaci. K odlišení jednotlivých druhů mléka navzájem od sebe byla využita diskriminační analýza. Ke kvalitativním analýzám byla využita stejná metodika jako pro tvorbu rekalibrací, dále metodika s využitím kompresní kyvety a nakonec metoda s využitím optické sondy. Kvalitativní analýzy byly směřovány ke schopnosti přístroje reagovat na změny podmínek při snímání spekter, schopnosti rozlišení jednotlivých druhů mléka a také schopnosti přístroje reagovat na různé tučnosti mléka.



Obr. 33: Měření mléka na integrační sféře

#### 4.2.2.2 Máslo

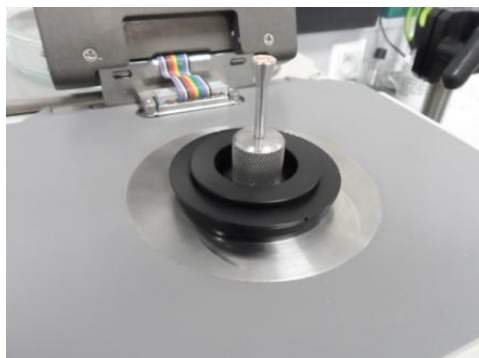
Vzorky másel byly posuzovány při pokojové teplotě následující den po zakoupení. Vlastnímu měření nepředcházela žádná další úprava vzorků. Vzorky k měření byly odebírány odřezáním plátku o tloušťce 1 cm ze středu celé kostky, které spektroskop snímal v režimu reflektance na integrační sféře přes polyethylenové sáčky při 80 scanech s rozlišením  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Měření probíhalo 1 minutu ve spektrálním rozsahu  $10\,000 - 4\,000 \text{ cm}^{-1}$ . Před započítím měření jsme vzorek překryli alobalem (Obr. 34). Podobná metodika byla užita i v práci HRNČÍŘOVÉ (2009). Následně byla másla zpětně zabalena, uložena do chladicí komory při teplotě  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  a po uplynutí garantované expirace byla másla znovu měřena pro zjištění čísla kyselosti.



Obr. 34: Metodika měření vzorků másla

#### 4.2.2.3 Med

Vzorky byly posuzovány při teplotě  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  a vlastnímu měření předcházela dekrystalizace vykrytalizovaného medu při  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  ve vodní lázni (Julabo GmbH, EcoTemp TW 20, Německo). Vzorky medu byly odebírány přímo ze spotřebitelského balení. Při měření snímal spektroskop vzorky v režimu reflektance na integrační sféře přes kompresní kyvetu se skleněným dnem ( $\varnothing = 3 \text{ cm}$ ) s použitím transflektanční kyvety s kovovým zrcátkem ( $\varnothing = 1,5 \text{ cm}$ ) o optické dráze ( $h$ )  $0,2 \text{ mm}$  (Obr. 35). Jako parametr měření byl zvolen počet scanů ( $n = 64$ ) při rozlišení  $8 \text{ cm}^{-1}$  při celkovém spektrálním rozsahu  $10\,000 - 4\,000 \text{ cm}^{-1}$ . Pro otestování volitelnosti metody byly stejné vzorky následně snímány v režimu interaktance s použitím optické sondy opět při rozlišení  $8 \text{ cm}^{-1}$ , ale počet scanů byl zvýšen na 100 (Obr. 36).



Obr. 35: Měření medu na integrační sféře



Obr. 36: Měření medu pomocí optické sondy

#### 4.2.2.4 Káva

Vzorky kávy byly měřeny, pro zjištění rozdílů ve spektrech, nejprve ve formě zrn a následně i v pomletém stavu. Zrna byla mleta na elektrickém mlýnku ETA 0010 (ETA, Česká republika) na 2. rychlostní stupeň po dobu 15 s. Analýza probíhala v 5 opakováních, přičemž k vyhodnocení výsledků využil software průměrné spektrum. Spektra kávy byla snímána režimem interaktance optickou sondou, kdy tato byla upevněna ve stojanu a následně ponořena do skleněné baňky naplněné vzorkem a obalené alobalovou fólií. Sonda byla ponořena kolmo do hloubky 2 cm, aby bylo zajištěno dostatečného odrazu paprsku od vzorku (Obr. 37). Byla zvolena metodika s využitím snímání spekter v počtu 100 scanů při rozlišení  $8 \text{ cm}^{-1}$ . Diskriminační analýzy byly použity k vytvoření srovnání mezi jednotlivými styly pražení, zeměmi původu, ale i mezi měřeními vzorků v zrnkové podobě a po pomletí. Stanovení obsahu kofeinu a fenolů bylo zjišťováno na základě algoritmu PLS a jeho následné ověření pomocí křížové validace. Před tvorbou kalibrací byly využity diagnostické nástroje Spectrum Outlier, PC Scores a Leverage, pomocí nichž byla odstraněna spektra, která svými hodnotami nevyhovovala kalibračnímu setu.



Obr. 37: Měření vzorků kávy režimem interaktance



#### ***4.2.2.5 Vliv použité referenční metody na přesnost měření tuku v mléce***

Před vlastními analýzami byly vzorky zahřáty na 40 °C a zchlazeny na 20 °C. Analýza pomocí FT-NIR probíhala ve třech opakováních a k vyhodnocení bylo programem použito průměrné spektrum. Všechny vzorky mléka byly snímány metodikou popsanou v kap. 4.2.2.1. s rozdílem, že místo Petriho misky byly vzorky měřeny v kompresní kyvetě se skleněným dnem ( $\varnothing = 3$  cm). K ověření rozdílů v hodnotách obsahu tuku v mléce měřeného metodou dle Gerbera a Röse-Gottlieba byla použita diskriminační analýza. K tvorbě kalibrací bylo využito algoritmu PLS. Statistické rozdíly mezi jednotlivými metodami byly hodnoceny párovým t-testem na střední hodnotu.

#### ***4.2.2.6 Vliv teploty vzorku na přesnost měření***

Všechny vzorky mléka byly nejprve temperovány na teplotu 40 °C a zchlazeny na 18 °C. Po dosažení 18 °C byly vzorky změřeny a poté byly vloženy do vodní lázně (Julabo GmbH, EcoTemp TW 20, Německo) s udržováním konstantních teplot, které se podle potřeb experimentu měnily. Ve vodní lázni byly vzorky temperované na teploty dalších měření, tj. 20, 22, 24 a 40 °C. Všechny vzorky byly měřeny ve třech opakováních, přičemž k vyhodnocení hodnot analyzovaných parametrů bylo využito průměrné spektrum každého vzorku zvlášť. Mléko bylo snímáno podle metodiky, které je popsána v kap. 4.2.2.1 pro kravské mléko. U každé testované teploty měření byly odečteny algoritmem PLS zkoumané charakteristiky tj. obsah (%) sušiny, tuku, laktózy a bílkovin dle kalibračních modelů pro kravské mléko vytvořený pro teplotu 20 °C. Charakteristiky kalibračních modelů jsou uvedeny v Tab. VI.

Tab. VI: Charakteristiky kalibračních modelů složek pro kravské mléko měřené při 20 °C

Kalibrační model	n	R	R <sub>v</sub>	SEC (%)	SEP (%)	CCV(%)	f <sub>PLS</sub>
<i>Sušina</i>	152	0,998	0,996	1,73	2,29	6,26	10
<i>Tuk</i>	138	0,974	0,967	0,153	0,173	2,34	10
<i>Bílkoviny</i>	130	0,989	0,976	0,082	0,122	3,49	15
<i>Laktóza</i>	130	0,975	0,898	0,039	0,079	0,78	15

**n** – počet vzorků v kalibraci; **Rc** – korelační koeficient kalibrace; **Rv** - korelační koeficient validace; **SEC** – směrodatná chyba kalibrace; **SEP** – směrodatná chyba predikce, **CCV (%)** – kalibrační variační koeficient; **f<sub>PLS</sub>** – počet PLS faktorů použitých pro kalibraci

Pro zjištění reakce spektroskopu na změny teplot měřených vzorků byla použita diskriminační analýza. Referenční hodnoty a hodnoty výsledků měřených teplot odečtené v kalibračním modelu vytvořeném pro teplotu vzorku 20 °C byly statisticky zpracovány s využitím statistického programu Statistica verze 12.

#### 4.2.2.7 Detekce falšování sýrů

Hotové sýry (viz kap. 4.2.1.7) byly následný den analyzovány na spektroskopu. Před analýzou na FT-NIR byly vzorky nastrohány na laboratorním struhadle do kompresní kyvety se skleněným dnem ( $\varnothing = 3$  cm) a měřeny v otočném spineru v režimu reflektance na integrační sféře (MLČEK *et al.*, 2011). Měření každého vzorku proběhlo třikrát ve dvou opakováních. K vyhodnocení bylo použito diskriminační analýzy za účelem zjištění množství kravského mléka, které bylo přidáno do kozího sýru. Doba snímání jednoho vzorku byla asi 1 minutu. Spektra byla snímána při 80 scanech v rozlišení  $4 \text{ cm}^{-1}$  ve spektrálním rozsahu  $10\,000 - 4\,000 \text{ cm}^{-1}$  bez následných úprav spekter (LUŽOVÁ *et al.*, 2014).

#### 4.2.2.8 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky analýz byly vyhodnocovány statistickými algoritmy, kterými disponuje vyhodnocovací software TQ Analyst verze 7 spjatý s FT-NIR spektroskopem. Tento program zajišťoval také 2D vizualizace diskriminačních analýz. Diskriminační analýzy s 3D

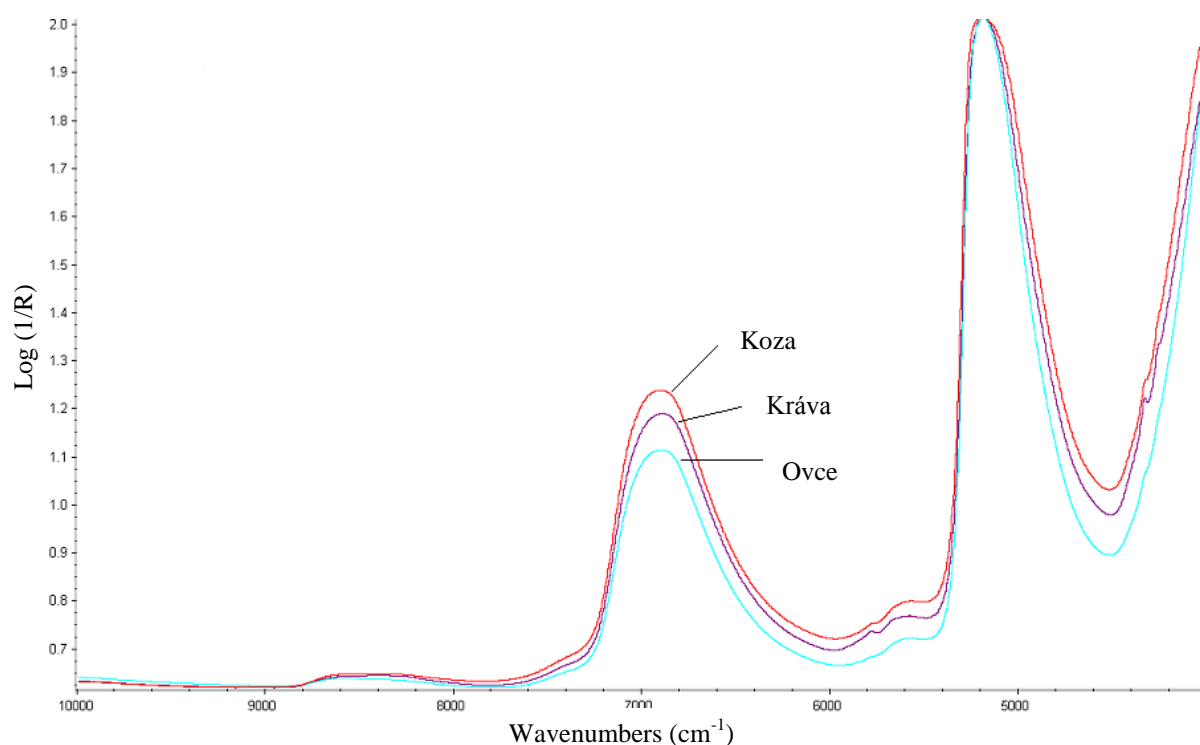
vizualizací byly tvořeny v softwaru TQ Analyst verze 8. Část statistických analýz byla realizována programem Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, USA), kterým byly u referenčních hodnot vypočteny souhrnné charakteristiky, tj. průměr, maximální a minimální hodnota, směrodatná odchylka a lineární regresní křivka. Microsoft Office excel 2007 byl použit při zhodnocení rozdílů mezi referenčními a predikovanými hodnotami, kdy jako doplňkového statistického testu bylo využito Studentova testu (t-test), který srovnává shodnost výsledků středních hodnot mezi prvními a druhými prvky uspořádaných dvojic. KUBANOVÁ *et* LINDA (2007) uvádí, že jsou-li  $t_1$  a  $t_2 \geq t_{\text{stat}}$  pro celý počet stanovení při zvolené hladině pravděpodobnosti, pak je rozdíl mezi naměřenými hodnotami neprůkazný. Další statistické analýzy byly prováděny v programu Statistica verze 12. PLS algoritmem byly při konstrukci kalibrací vypočítány koeficienty korelace pro kalibrace a validace s jejich směrodatnými odchylkami. Tyto odchylky informují o kvalitě regresní závislosti mezi referenčními hodnotami a hodnotami získanými pomocí NIR spektroskopie. Korelační koeficient v intervalu 0,95 – 0,99 je považován za velmi silnou závislost, interval 0,80 – 0,94 za dosti silnou závislost a interval 0,50 – 0,79 informuje o středně silné závislosti (TRILČOVÁ *et al.*, 2005). K hodnocení spolehlivosti kalibračních modelů získaných pomocí FT-NIR analyzátoru je používán tzv. kalibrační variační koeficient (CCV) a pro validaci predikční validační koeficient (PCV). MÍKA *et al.* (2008) uvádí, že za dobrý kalibrační model je považován ten s hodnotami CCV do 10 % (PCV 15 %) a za velmi spolehlivý model s hodnotami CCV do 5 % (PCV 10 %).

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Kravské mléko

Tato část disertační práce se zabývala rozšířením stávajících kalibrací na základní obsahové složky kravského mléka a schopnosti NIR spektroskopu rozeznat na základě rozdílného složení mléka různých druhů.

Ovčí mléko obsahuje ve srovnání s mlékem kravským dvojnásobný obsah tuku, bílkovin a přirozeně s těmito hodnotami stoupá i obsah sušiny (DRAGOUNOVÁ *et al.*, 2007). Kozí má oproti mléku kravskému odlišné složení kaseinových bílkovin (NAVRÁTILOVÁ *et al.*, 2012) a vlivem různého složení jednotlivých druhů mlék se liší i jednotlivá infračervená spektra těchto mlék (Obr. 38). Složení jednotlivých druhů mlék je uvedeno dle PARK *et al.* (2007) v Tab. VII.



Obr. 38: Infačervená spektra kravského, kozího a ovčího mléka

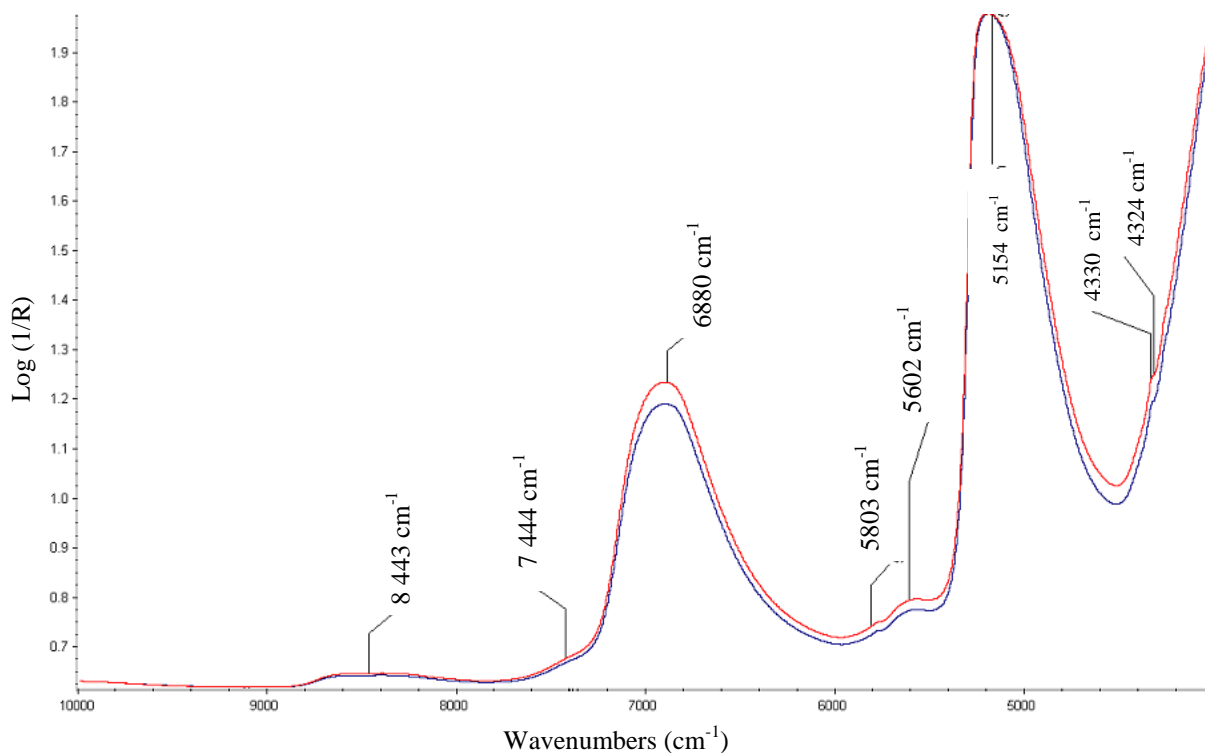
Tab. VII: Složení jednotlivých druhů mlék dle PARK *et al.* (2007)

Obsahové složky (%)	Kozí mléko	Ovčí mléko	Kravské mléko
<i>Voda</i>	87,8	80,1	87,7
<i>Sušina</i>	12,2	19,9	12,3
<i>Tuk</i>	3,8	7,9	3,6
<i>Bílkoviny</i>	3,5	6,2	3,3
<i>Laktóza</i>	4,1	4,9	4,6
<i>Min. látky</i>	0,8	0,9	0,7

V práci jsme se zabývali stanovením obsahu (%) hlavních chemických komponent tj. sušiny, tuku, bílkovin a laktózy v syrovém kravském, kozím a ovčím mléce. Pro velké množství výsledků byly analýzy jednotlivých druhů mléka rozděleny do samostatných kapitol. Tato kapitola se zabývá výsledky získanými analýzami kravského mléka. Výsledky analýz kozího mléka jsou uvedeny v kap. 5.2, v kap. 5.3 jsou uvedeny výsledky analýz ovčího mléka.

V rámci experimentů bylo odebráno 72 vzorků, které byly analyzovány referenčními metodami (viz kap. 4.2.1.1) a následně byly použity pro recalibraci již dříve vytvořených kalibrací. Technika snímání spekter kravského mléka byla nastavena shodně s metodikou RŮŽIČKOVÉ (2007) (viz kap. 4.2.2.1), aby bylo možné získaná spektra použít pro další rozšíření a upravení již recalibrovaných kalibrací.

Výsledkem průchodu infračerveného záření vzorkem syrového kravského mléka je spektrum, ve kterém je možné pozorovat výrazné absorpční pásy, které odpovídají absorpci vody ( $8443$ ,  $6880$  a  $5154$   $\text{cm}^{-1}$ ) a dále také výrazně menší pásy odpovídající absorpci tuku ( $7444$ ,  $5803$ ,  $5602$ ,  $4324$  a  $4330$   $\text{cm}^{-1}$ ). Absorpční pásy vody a tuku jsou na spektru mléka znázorněny na Obr. 39. Velmi podobně se chová i absorpce vody a tuku v mléce kozím a ovčím.



Obr. 39: NIR spektra syrového kravského mléka - pásy 8443, 6880, 5154  $\text{cm}^{-1}$  = absorpce vody, pásy 7444, 5803, 5602, 4324 a 4330  $\text{cm}^{-1}$  = absorpce tuku

Po vytvoření kalibračních modelů byly využitím diagnostického nástroje Spectrum Outlier (viz kap. 3.16) identifikovány standardy, které byly softwarem vyhodnoceny jako odlehlé, tj. standardy, které na základě spektrálních (objevila se spektrální odchylka v měřeném spektru) nebo koncentračních (nepřesné stanovení komponenty referenční hodnotou) odlišností nevyhovovaly souboru kalibračních dat a z tohoto důvodu byly z kalibračního setu odstraněny.

Vzhledem k vysokému počtu vzorků v kalibracích byly kalibrace tvořeny využitím algoritmu MLS (viz kap. 3.12.4). Výhodou tohoto algoritmu je možnost vytvořit průměr standardů se stejnými hodnotami kalibrované složky, čímž dojde k vytvoření nových, tzv. syntetických standardů. Po vytvoření rekalibrací byly tyto podrobeny diagnostickým nástrojům křížové validace (viz kap. 3.15.3.1) a následně i funkci PRESS (viz kap. 3.15.6). V Tab. VIII jsou uvedeny statistické parametry referenčních hodnot složek, které byly použity ke kalibracím. Rekalibrační a revalidační výsledky pro obsahové složky kravského mléka a porovnání výsledků našich experimentů a práce RŮŽIČKOVÉ (2007) uvádí Tab. IX.

Tab. VIII: Statistické parametry referenčních hodnot analyzovaných složek v kravském mléce

Obsahové složky (%)	n	$x_p$ (%)	$S_x$ (%)	Min (%)	Max (%)
<i>Sušina</i>	178	27,63	26,46	11,79	77,64
<i>Tuk</i>	198	4,92	0,72	2,65	6,32
<i>Bílkoviny</i>	190	3,16	0,55	2,05	4,86
<i>Laktóza</i>	111	5,62	0,24	4,26	6,18

**n** – počet vzorků;  **$x_p$**  – průměr naměřených hodnot;  **$S_x$**  – směrodatná odchylka; **Min** – minimální neměřená hodnota; **Max** – maximální naměřená hodnota

Tab. IX: Srovnání rekalibrovaných charakteristik modelů pro kravské mléko

Složka (%)	Růžičková (2007)					Výsledky analýz				
	n	R	SEC (%)	CCV (%)	$f_{PLS}$	n	R	SEC (%)	CCV (%)	$f_{PLS}$
<i>Sušina</i>	118	0,953	0,277	2,06	8	178	0,998	1,73	7,02	10
<i>Tuk</i>	138	0,974	0,153	3,48	9	198	0,986	0,096	1,95	10
<i>Bílkoviny</i>	130	0,989	0,082	2,32	15	190	0,981	0,075	2,37	15
<i>Laktóza</i>	51	0,975	0,039	0,79	11	111	0,988	0,061	1,08	15
	$y = a \pm bx_i$					$y = a \pm bx_i$				
<i>Sušina</i>	1,2463 $\pm$ 0,9076x					1,5684 $\pm$ 0,9523x				
<i>Tuk</i>	0,2202 $\pm$ 0,9499x					0,3654 $\pm$ 0,9362x				
<i>Bílkoviny</i>	0,0740 $\pm$ 0,9789x					0,0934 $\pm$ 0,9772x				
<i>Laktóza</i>	0,2610 $\pm$ 0,9478x					0,2850 $\pm$ 0,9568x				

**n** – počet vzorků v kalibraci; **R** – korelační koeficient kalibrace; **SEC** – směrodatná odchylka kalibrace; **CCV** – kalibrační variační koeficient;  **$f_{PLS}$**  – PLS faktory použité pro kalibraci;  **$a \pm bx_i$**  – parametry regresní přímky predikce

Párovým t-testem na střední hodnotu byla otestována nulová hypotéza  $H_0: \mu d = 0$  při hladině pravděpodobnosti  $\alpha = 0,05$ . Výpočtem z rovnice uvedené v kap. 3.17.2 byly získány hodnoty, ze kterých plyne, že mezi hodnotami referenčními a predikovanými je statisticky neprůkazný rozdíl (Tab. X).

Tab. X: Výsledky párového t-testu na střední hodnotu pro recalibrované modely hlavních složek kravského mléka

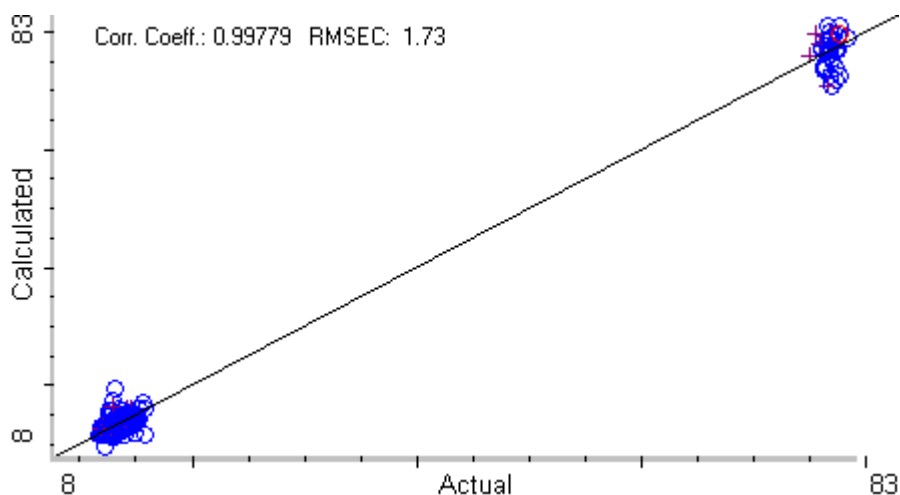
Obsahové složky (%)	n	$X_{REF}$ (%)	$X_{NIR}$ (%)	SD	$t_{stat}$	$t_{krit} (1)$	$t_{krit} (2)$
<i>Sušina</i>	178	27,63	27,71	1,983	-0,529	1,655	1,976
<i>Tuk</i>	198	4,92	4,92	0,051	$-2,36 \cdot 10^{-2}$	1,78	2,01
<i>Bílkoviny</i>	190	3,16	3,16	0,04	$-1,12 \cdot 10^{-2}$	1,66	1,99
<i>Laktóza</i>	111	5,62	5,78	0,023	0,07	1,82	2,01

**n** – počet vzorků;  **$X_{REF}$**  – průměr referenčních hodnot;  **$X_{NIR}$**  – průměr predikovaných hodnot; **SD** – směrodatná odchylka difference;  **$t_{stat}$**  – hodnota t-testu;  **$t_{krit} (1)$**  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ;  **$t_{krit} (2)$**  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ .

U všech stanovených komponent recalibrovaných modelů bylo dosaženo koeficientů korelace, které lze charakterizovat velmi vysokou závislostí ( $1 > R \geq 0,90$ ). Nejvyšší korelační závislost byla dosažena pro model obsahu sušiny ( $R = 0,998$ ). Tento model byl charakterizován i nejvyšší směrodatnou chybou ( $SEC = 1,73 \%$ ). Ostatní recalibrované modely se vyznačovaly výrazně nižšími směrodatnými odchylkami ( $SEC < 0,1 \%$ ). Jedním z ukazatelů spolehlivosti kalibračního modelu je hodnota CCV (%) popsána v kap. 3.15.5. U všech recalibrovaných modelů se hodnota CCV (%) pohybuje pod hranicí 5 %, což znamená, že nově vytvořené modely lze definovat jako velmi spolehlivé. Výjimku tvoří model pro stanovení obsahu sušiny, kdy hodnota CCV překročila hranici 5 %, ale nepřekročila hranici 10 %, díky čemuž model stále lze považovat za spolehlivý.

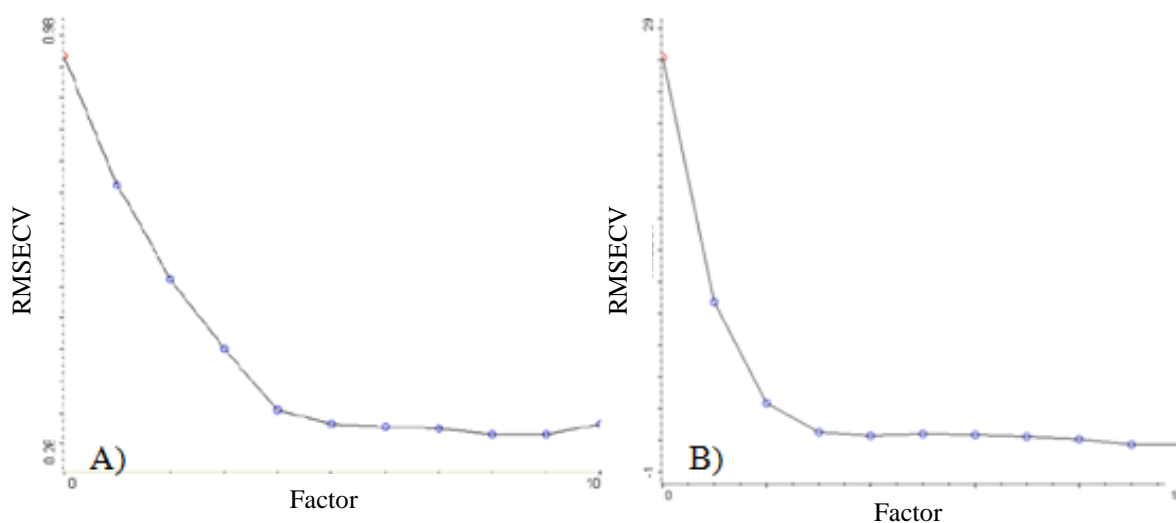
Pro ověření spolehlivosti recalibrovaných kalibrací bylo využito také diagnostiky PRESS. Nejvyšší množství PLS faktorů bylo definováno pro model obsahu laktózy, což svědčí o vyšší chybě stanovitelnosti modelu pro tuto komponentu. Vyšší chyba souvisí zřejmě také s úzkým koncentračním rozpětím kalibračních hodnot. Funkce PRESS pro stanovení obsahu tuku a bílkovin vykazují lepší trend a PRESS pro stanovení sušiny definovala nejprudčeji pokles chyby stanovitelnosti. Tato skutečnost je naopak způsobena pravděpodobně velkým rozpětím koncentračních hodnot v kalibračním setu (Obr. 40).





Obr. 40: Rekalibrovaný model pro stanovení sušiny v syrovém kravském mléce

Důležitým aspektem je dosažení klesajícího charakteru křivky PRESS, čehož bylo dosaženo pro všechny rekalibrované kalibrace. Obr. 41 pro názornost uvádí diagnostickou PRESS křivku pro námi vytvořený model stanovení obsahu sušiny mléka se srovnáním téhož modelu vytvořeným RŮŽIČKOVOU (2007).



RMSECV – Root-Mean-Square Error of Cross-Validation (Střední kvadratická chyba křížové validace)

Obr. 41: Srovnání křivek PRESS rekalibrovaného modelu pro stanovení obsahu sušiny v syrovém kravském mléce – A) PRESS v práci RŮŽIČKOVÉ (2007), B) PRESS v naší práci

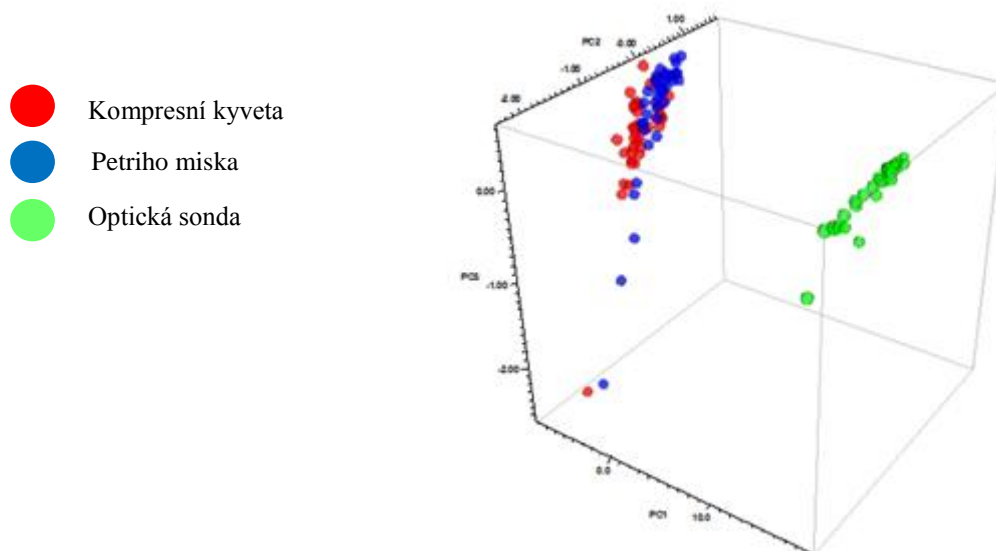
Hodnocení majoritních obsahových složek kravského mléka se zabývalo již mnoho autorů. V práci TSENKOVA *et al.* (1999) bylo analyzováno 258 vzorků mléka, které bylo určeno pro stanovení obsahu tuku, laktózy a bílkovin. Vzorky byly analyzovány v režimu transmitance na přístroji NIRSystems 6500 (NIR Systems, INC.). Ke konstrukci kalibračních modelů použili algoritmus PLS a vytvořené modely byly ověřeny křížovou validací. Nejlepší výsledky byly zaznamenány při hodnocení vzorků v regionu spektrálního rozlišení v intervalu 1100 – 2400 nm s použitím kyvety o tloušťce 1 mm, kdy bylo ještě nutné upravit spektra 1. derivací. Korelační koeficient kalibrace byl charakterizován téměř absolutní závislostí ( $R = 0,999$ ). Směrodatné odchylky kalibrace se pohybovaly na nízkých hodnotách tj. SEC = 0,886 % pro stanovení obsahu bílkovin resp. SEC = 0,857 % pro stanovení obsahu laktózy.

Dalším autorem zabývajícím se možnostmi použití techniky FT-NIR byli KUKAČKOVÁ *et al.* (2000), kteří rovněž využívali přístroj NIRSystems 6500 (NIR Systems, Inc.) a ověřovali možnost využití jeho vláknové optiky při stanovení základních složek mléka. U kalibračního modelu zkonstruovaného pro stanovení obsahu sušiny byl dosažen korelační koeficient  $R = 0,975$  a standardní odchylka predikce SEP = 0,160 %. Modely pro hodnocení obsahu tuku a bílkovin byly rovněž charakterizovány příznivými hodnotami korelačních koeficientů ( $R = 0,967$  resp.  $R = 0,965$ ) a standardních odchylek predikce (SEP = 0,179 % resp. 0,049 %). Analýzami chemických komponent se zabývali také JANKOVSKÁ *et ŠUSTOVÁ* (2003). Ve své studii analyzovali 50 vzorků nehomogenizovaného kravského mléka. Na přístroji FT-NIR Antaris ve spektrálním rozsahu 10 000 – 4 000  $\text{cm}^{-1}$  metodou reflektance na integrační sféře hodnotili obsah sušiny, tuku, celkových bílkovin, kaseinu, laktózy, močovinnového dusíku a počet somatických buněk. Výsledky jejich práce byly podobné závěrům, ke kterým dospěla KUKAČKOVÁ *et al.* (2000). Obsah tuku, bílkovin a laktózy v mléce hodnotili i ŠAŠIĆ *et OZAKI* (2001), kteří v kalibračních modelech pro zmíněné komponenty dosáhli uspokojivých výsledků pro obsah tuku a bílkovin. Kalibrační model pro obsah laktózy se vyznačoval nižší schopností predikce, což autoři odůvodnili menším rozpětím kalibračních hodnot.

Srovnání techniky NIR při stanovení obsahu tuku, bílkovin, laktózy a obsah somatických buněk s technikou VIS spektroskopie v režimu transmitance provedli SPITZER *et al.* (2005). Kalibrační modely pro obsahové složky byly vytvořeny algoritmem PLS. Bylo zjištěno, že lepší výsledky pro stanovení obsahu tuku, laktózy a somatických buněk poskytují kalibrační modely vytvořené technikou NIR. Metoda VIS spektroskopie vykazovala lepší výsledky při stanovení obsahu bílkovin.

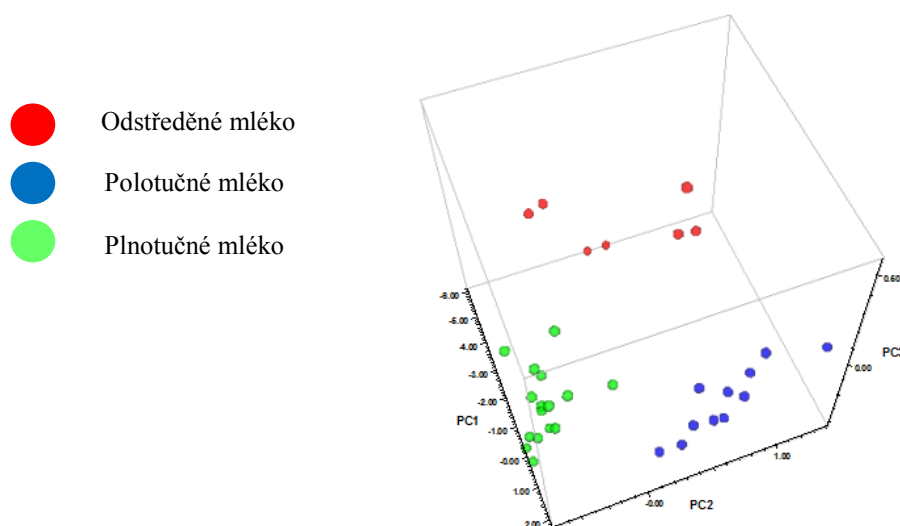
Měřením chemických komponent se ve své práci zabývali také WOO *et al.* (2002). Ti vyvinuli novou měřicí techniku k hodnocení obsahu laktózy, tuku a bílkovin v syrovém mléce pomocí transmitanční NIR spektroskopie. Metoda je založena na analýze vzorků syrového nehomogenizovaného mléka ve skleněných 12mm zkumavkách ( $V = 10$  ml) při vlnových délkách 700 – 1100 nm. Metodou PLS byly vytvořeny kalibrační modely, u kterých bylo dosaženo standardních odchylek predikce SEP = 0,06 % pro stanovení obsahu tuku resp. 0,10 % a 0,10 % pro stanovení obsahu bílkovin a laktózy.

Základním požadavkem při tvorbě kalibrací popř. rozšiřování a upravování kalibrací, je zachování stejných podmínek získávání dat tj. použití stejných referenčních metod a stejného nastavení instrumentální techniky. Změna podmínek při analýze dat může, ale nemusí ovlivnit výslednou kvalitu kalibrace. Pro ověření, zda přístroj FT-NIR Antaris reaguje na změny podmínek při snímání spekter, byla v práci použita kvalitativní analýza metodou diskriminační analýzy. Z kalibračního setu 72 vzorků syrového kravského mléka bylo namátkově vybráno 30 vzorků, jejichž spektra za účelem ověření reakce přístroje na způsob měření byla snímána spektroskopem v režimu reflektance na integrační sféře s použitím Petriho misky ( $\varnothing = 5$  cm) a kompresní kyvety ( $\varnothing = 3$  cm), u obou metod s využitím transflektanční kyvety s kovovým zrcátkem o délce dráhy paprsku ( $h$ ) 0,2 mm, a vzorků měřených optickou sondou v režimu interaktance. Bylo prokázáno, že přístroj reaguje na změny podmínek při měření. Při analýze došlo k přesvědčivé diferenciaci vzorků měřených pomocí optické sondy od vzorků měřených na integrační sféře, zároveň ale nedošlo k přesvědčivé selekci vzorků umístěných na Petriho misce a kompresní kyvetě (Obr. 42). Důležitým parametrem při snímání spekter vzorků je teplota aktuálně měřeného vzorku. Kvalitu a přesnost kalibračních modelů je teoreticky možné ovlivnit také hodnotami chemických komponent získanými různými referenčními analýzami. Vliv použité referenční metody na kvalitu kalibrace je řešen v kap. 5.7, o vlivu teploty na přesnost měření přístroje je pojednáváno v kap. 5.8.



Obr. 42: 3D grafické znázornění diference vzorků mléka měřených různými metodami

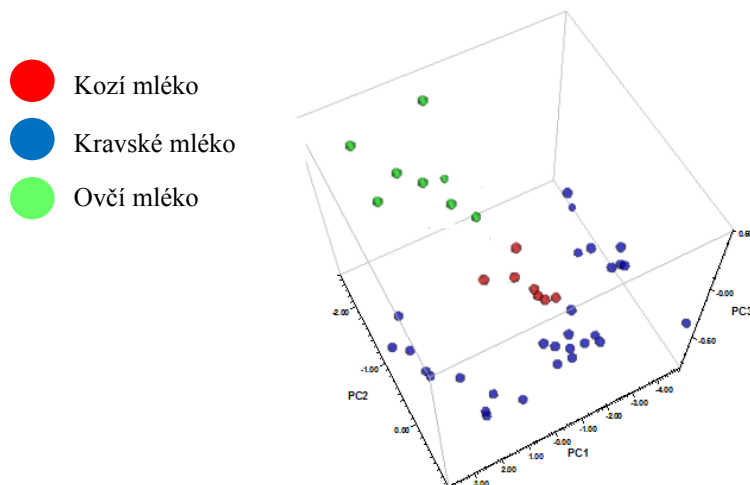
Další nutnou schopností přístroje je rozeznání vzorků mléka na základě jejich tučnosti či druhu. Tučnost mléka je jedním z parametrů, který vypovídá o technologické kvalitě mléka a o možnostech jeho dalšího zpracování a je jedním z hlavních ukazatelů při falsifikaci mléka tzv. odsmetaněním. Kvalitativní analýza byla také využita ke schopnosti diference vzorků mléka o definované tučnosti do 3 tříd (plnotučné, polotučné a odstředěné). Po provedení diskriminační analýzy bylo zjištěno, že přístroj FT-NIR Antaris dokáže rozlišit vzorky na základě definovaných tříd bez jakýchkoliv potíží (Obr. 43).



Obr. 43: 3D grafické znázornění diference vzorků mléka na základě jejich tučnosti

Velmi častým případem falšování mléčných výrobků je nahrazení dražších druhů mléka (kozí, buvolí) za mléko kravské, které je levnější. Významnou schopností přístroje

FT-NIR Antaris je jeho schopnost při rozlišení druhů mléka (Obr. 44). Přístroj byl schopen rozpoznat druhy mléka a zařadit je do předem definovaných tříd. Schopnost detekce falšování mléčných výrobků záměnou různých druhů mléka se v této práci zabývá kap. 5.9.



Obr. 44: 3D grafické znázornění diference vzorků mléka v závislosti na druhu mléka

## 5.2 Kozí mléko

Tato kapitola řeší hodnocení obsahů (%) hlavních komponent v syrovém kozím mléce a rozšíření již existujících kalibrací.

Pro rozdílné složení různých druhů mléka (viz Tab. VII, kap. 5.1) je nutné vytvoření kalibračního modelu pro každý druh mléka. Bylo analyzováno 55 vzorků mléka a získané hodnoty byly následně použity pro druhou recalibraci kalibračních modelů pro stanovení obsahu tuku, bílkovin a laktózy. Původní kalibrace vytvořila v roce 2004 Ing. Renáta Jankovská, Ph.D. a první recalibraci provedla Ing. Monika Kozelková, Ph.D. v roce 2012. Přístroj FT-NIR Antaris byl kalibrován hodnotami získanými referenčními metodami uvedenými pro tuk a laktózu (viz kap. 4.2.1.1). Referenční metody pro obsah bílkovin se lišili při konstrukci i v obou recalibracích, kdy JANKOVSKÁ (2004) použila jako referenční hodnoty pro stanovení bílkovin výsledky získané na přístroji Pro-Milk (Eon Trading Inc., Bulharsko), KOZELKOVÁ (2012) použila k rozšíření kalibrace výsledky získané na infračerveném absorpčním analyzátoru Bentley 2000 (Bentley Instruments, Chaska, USA). V našich experimentech byl obsah bílkovin stanoven klasickou referenční metodou dle Kjeldahla (viz kap. 4.2.1.1). Různé užití referenčních metod při tvorbě kalibrací může ovlivnit následné výsledky kalibračních modelů (DRAČKOVÁ *et al.*, 2008). Metoda a podmínky

měření (viz kap. 4.2.2.1) byly nastaveny tak, aby se shodovaly s metodikami JANKOVSKÉ (2004) a KOZELKOVÉ (2012), čímž bylo dosaženo možnosti implementace snímaných spekter do kalibračních modelů za účelem jejich rozšíření a upravení.

Po konstrukci kalibračních modelů byly opět využitím diagnostického nástroje Spectrum Outlier (viz kap. 3.16) identifikovány a odstraněny odlehlé standardy. Funkčnost nově rekalibrovaných modelů byla ověřena křížovou validací (viz kap. 3.15.3.1) a diagnostickým nástrojem PRESS (viz kap. 3.15.6). Tab. XI uvádí parametry hodnot složek získaných referenčními metodami. Ze všech hodnot byly vypočteny základní statistické charakteristiky (průměr a směrodatná odchylka). Výsledky rekalibrací pro obsahové složky kozího mléka a porovnání výsledků naší práce a práce KOZELKOVÉ (2012) uvádí Tab. XII a je zřejmé, že bylo dosaženo podobných charakteristik. Srovnání parametrů hodnot původních kalibračních modelů a jejich prvních rekalibrací uvádí ve své práci KOZELKOVÁ (2012).

Tab. XI: Referenční hodnoty analýz kozího mléka

<b>Obsahové složky (%)</b>	<b>n</b>	<b><math>x_p</math> (%)</b>	<b><math>S_x</math> (%)</b>	<b>Min (%)</b>	<b>Max (%)</b>
<i>Tuk</i>	146	3,31	0,52	1,49	5,54
<i>Bílkoviny</i>	145	2,79	0,39	1,87	3,34
<i>Laktóza</i>	145	4,28	0,32	3,55	4,98

**n** – počet vzorků;  **$x_p$**  – průměr naměřených hodnot;  **$S_x$**  – směrodatná odchylka; **Min** – minimální hodnota; **Max** – maximální hodnota

Tab. XII: Srovnání rekalibrovaných charakteristik modelů pro kozí mléko

Složka (%)	Kozelková (2007)					Výsledky analýz					
	n	R	SEC (%)	CCV (%)	f <sub>PLS</sub>	n	R	SEC (%)	CCV (%)	f <sub>PLS</sub>	
<i>Tuk</i>	119	0,950	0,233	7,138	10	174	0,978	0,193	5,83	10	
<i>Bílkoviny</i>	118	0,995	0,03	1,120	14	173	0,990	0,068	2,44	15	
<i>Laktóza</i>	118	0,954	0,092	2,079	15	173	0,968	0,123	2,87	15	
$y = a \pm bx_i$						$y = a \pm bx_i$					
<i>Tuk</i>	0,3166 ± 0,903x					0,3224 ± 0,9211x					
<i>Bílkoviny</i>	0,0292 ± 0,989x					0,0301 ± 0,9801x					
<i>Laktóza</i>	0,3981 ± 0,910x					0,3924 ± 0,9123x					

**n** – počet vzorků v kalibraci; **R** – korelační koeficient kalibrace; **SEC** – směrodatná odchylka kalibrace; **CCV** – kalibrační variační koeficient; **f<sub>PLS</sub>** – PLS faktory použité pro kalibraci; **a ± bx<sub>i</sub>** – parametry regresní přímky predikce

Získané hodnoty po analýzách byly podrobeny statistické analýze párovým t-testem na střední hodnotu, kdy byla testována nulová hypotéza  $H_0: \mu d = 0$  na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Výpočtem z rovnice uvedené v kap. 3.17.2 byly získány hodnoty, ze kterých plyne, že mezi hodnotami referenčními a predikovanými není, jako v případě kravského mléka, statisticky průkazný rozdíl (Tab. XIII).

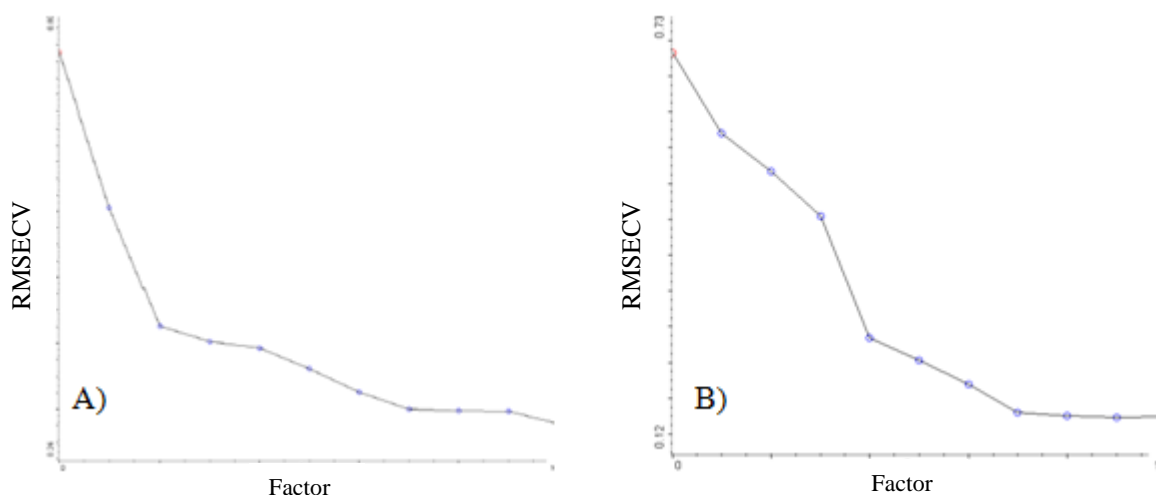
Tab. XIII: Hodnoty t-testu analýz kozího mléka

Obsahové složky (%)	n	X <sub>REF</sub> (%)	X <sub>NIR</sub> (%)	SD	t <sub>stat</sub>	t <sub>krit</sub> (1)	t <sub>krit</sub> (2)
<i>Tuk</i>	146	3,31	3,31	0,043	-0,8 · 10 <sup>-2</sup>	1,695	2,040
<i>Bílkoviny</i>	145	2,79	2,75	0,032	-4,1 · 10 <sup>-2</sup>	1,669	1,998
<i>Laktóza</i>	145	4,28	4,32	0,027	-9,35 · 10 <sup>-15</sup>	1,697	2,042

**n** – počet vzorků; **X<sub>REF</sub>** – průměr referenčních hodnot; **X<sub>NIR</sub>** – průměr predikovaných hodnot; **SD** – směrodatná odchylka difference; **t<sub>stat</sub>** – hodnota t-testu; **t<sub>krit</sub> (1)** – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; **t<sub>krit</sub> (2)** – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ .

Rekalibrované modely pro obsah (%) tuku, bílkovin a laktózy v kozím mléce dosahovaly koeficientů korelace udávajících velmi vysokou závislost ( $1 > R \geq 0,90$ ). Nejsilnější závislost byla dosažena pro model stanovení obsahu tuku ( $R = 0,978$ ). Tento model byl charakterizován nejvyšší směrodatnou chybou ( $SEC = 0,193 \%$ ). Rekalibrované modely pro obsahy bílkovin a laktózy se vyznačovaly nižšími směrodatnými chybami. Spolehlivost rekalibrovaných kalibračních modelů byla hodnocena na základě různých ukazatelů, kdy jedním z nich byla i hodnota CCV (%) (viz kap. 3.15.5). Modely stanovení obsahu bílkovin a laktózy byly charakterizovány hodnotami CCV do 5 %. Modely tedy byly definovány jako velmi spolehlivé. Model pro stanovení obsahu tuku nabyl hodnoty CCV těsně za hranicí 5 %, což ale znamená, že model je stále spolehlivý a použitelný.

Dalším faktorem ověření funkčnosti rekalibrovaných modelů je diagnostika PRESS. Nejnižší počet PLS faktorů byl vypočítán pro stanovení obsahu tuku. Tento fakt svědčí o nižší chybě stanovitelnosti modelu pro tuto komponentu. Pro modely stanovení obsahu bílkovin a laktózy byl vypočten vyšší počet PLS faktorů. Vyšší chyba souvisí zřejmě s užším koncentračním rozpětím kalibračních hodnot, přesto u všech komponent vykazovala křivka PRESS klesající charakter. Příklad srovnání křivek funkce PRESS rekalibrovaného modelu pro stanovení obsahu tuku dle KOZELKOVÉ (2012) a modelu získaného v rámci experimentů je znázorněn na Obr. 45.



RMSECV – Root-Mean-Square Error of Cross-Validation (Střední kvadratická chyba křížové validace)

Obr. 45: – Srovnání křivek PRESS rekalibrovaného modelu pro stanovení obsahu sušiny v syrovém kozím mléce – A) PRESS v práci KOZELKOVÉ (2012); B) PRESS v analýzách



Hodnocením koziho mléka pomocí NIR spektroskopie se v minulosti zabývalo mnoho výzkumníků. Důležitým výzkumem se zabývali ALBANELL *et al.* (2003), kteří řešili identifikaci vlnových délek s nejvyšší absorpcí záření při stanovení základních složek koziho mléka. Znalost regionů, ve kterých dochází k překryvům pásů na základě koncentrací daných složek mléka, je důležitá z důvodu správnosti vyhodnocení spekter při tvorbě kalibračních modelů bez použití celého rozsahu měření vzorku, protože k tvorbě kalibrace lze použít i jen určitá část spektra.

Stanovením obsahu sušiny, tuku, bílkovin, laktózy, tukuprosté sušiny a titrační kyselosti v pasterovaném kozím mléce se zabývali HADRA *et al.* (2006). K analýzám využili přístroje FT-NIR Antaris. Měření vzorků probíhalo v regionu měření  $10\ 000 - 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$ . Získaná spektra komponovali do kalibračních modelů algoritmem metody nejmenších čtverců (PLS). Vytvořením kalibračního modelu bylo dosaženo pro všechny hodnocené komponenty vysokých koeficientů korelace (R) tj. 0,968 pro stanovení obsahu tuku; 0,984 pro obsah laktózy; 0,985 pro obsah bílkovin; 0,966 pro obsah sušiny; 0,897 pro obsah TPS a 0,989 pro titrační kyselost. V experimentech bylo v kalibračních modelech pro stanovení obsahu tuku a bílkovin dosaženo hodnot  $R = 0,978$  resp.  $0,990$ . HADRA *et al.* (2006) získali vyšší korelační koeficient pro model stanovení obsahu laktózy. Na závěr své práce autoři uvedli, že metoda NIR spektroskopie je použitelnou technikou pro analýzu a hodnocení koziho mléka.

Problematikou stanovení chemických komponent v kozím mléce řešili také ŠUSTOVÁ *et* KUCHTÍK (2007). Mimo majoritních komponent složení koziho mléka analyzovali navíc také počet somatických buněk. Z důvodu dosažení nízkých koeficientů korelace kalibrace a vysoké chyby predikce poukazují závěry jejich práce na nevhodnost NIR spektroskopie pro stanovení tohoto parametru mléka. Dalšími autory, kteří se ve svém výzkumu zabývali aplikací NIR spektroskopie při hodnocení obsahových složek koziho mléka byli DRAČKOVÁ *et al.* (2008). Výzkum autoři realizovali rovněž pomocí FT-NIR Antaris při stejných měřicích parametrech jako tomu bylo v naší práci a mimo základního chemického složení autoři hodnotili i některé fyzikálně-chemické parametry např. bod mrznutí či hodnotu pH. Kalibrační modely byly vytvořeny metodou PLS a pro kalibrační model pro stanovení laktózy bylo dosaženo lepších výsledků, než tomu bylo v našich analýzách, naopak kalibrační modely pro stanovení obsahu bílkovin a tuku vykazovaly lepší hodnoty v našich experimentech. Mimo hlavní obsahové složky někteří autoři využívali techniku NIR spektroskopie i k dalším výzkumům. Příkladem jsou NÚÑEZ-SÁNCHEZ *et al.* (2015), kteří zkoumali použitelnost NIR spektroskopie při hodnocení složení a obsahu

mastných kyselin v individuálních vzorcích kozího mléka. Autoři analyzovali režimem reflektance vzorky, které před analýzou usušili a režimem transflektance analyzovali vzorky bez úprav tj. v tekutém stavu. Bylo zjištěno, že analýzy v režimu transflektance vykazovaly lepší výsledky než analýzy v režimu reflektance. Autoři závěrem vyhodnotili NIR metodu jako rychlou, spolehlivou a účinnou analytickou metodu pro poskytování nutričních informací ve vzorcích kozího mléka.

### 5.3 Ovčí mléko

V této části disertační práce se zabývá analýzou vzorků ovčího mléka a hodnocením jejich chemického složení. Stejně jako u mléka kravského (viz kap. 5.1) resp. kozího (viz kap. 5.2) byly nové vzorky zabudovány do již existujících kalibračních setů, čímž bylo docíleno rozšíření a upravení již existujících kalibrací pro stanovení obsahu (%) sušiny, bílkovin, tuku a laktózy v syrovém ovčím mléce. Pro ovčí mléko, stejně jako pro kravské a kozí, je nutná, z důvodu různého složení hlavních chemických komponent (viz Tab. VII, kap. 5.1), konstrukce vlastních kalibračních modelů. K další recalibraci kalibračních modelů původně vytvořených Ing. Renátou Jankovskou, Ph.D. bylo použito 40 nových vzorků syrového ovčího mléka. První recalibraci modelů provedla v roce 2007 Ing. Jana Růžičková, Ph.D. Referenční hodnoty použité pro recalibraci byly získané na základě referenčních metod popsanych v kap. 4.2.1.1. Přístroj FT-NIR Antaris a podmínky měření ovčího mléka (viz kap. 4.2.2.1) byly nastavené stejně jako v metodikách JANKOVSKÉ (2004) a RŮŽIČKOVÉ (2007). Z důvodu vysokého počtu vzorků byla nasnímaná spektra zpracována nejprve algoritmem MLS. Kalibrace modelů byla realizována algoritmem PLS. Před vlastními recalibracemi byly nástrojem Spectrum Outlier (viz kap. 3.16) eliminovány vzorky, které nevyhovovaly kalibračnímu setu. Křížovou validací (viz kap. 3.15.3.1) byla ověřena správná funkce nově recalibrovaných modelů a diagnostickým nástrojem PRESS (viz kap. 3.15.6) byla ověřena jejich použitelnost. Tab. XIV uvádí základní statistické charakteristiky vypočtené pro hodnoty získané referenčními metodami. Charakteristiky recalibrací kalibračních modelů složek kozího mléka s porovnáním výsledků s prací RŮŽIČKOVÉ (2007) uvádí Tab. XV.

Tab. XIV: Základní statistické charakteristiky referenčních hodnot analýz ovčího mléka

Obsahové složky (%)	n	$\bar{x}_p$ (%)	$S_x$ (%)	Min (%)	Max (%)
<i>Sušina</i>	89	17,92	0,43	17,06	21,36
<i>Tuk</i>	145	7,21	0,77	5,36	10,07
<i>Bílkoviny</i>	138	5,81	0,39	4,52	6,02
<i>Laktóza</i>	160	4,64	0,82	4,34	7,73

**n** – počet vzorků;  **$\bar{x}_p$**  – průměr;  **$S_x$**  – směrodatná odchylka; **Min** – minimální hodnota; **Max** – maximální hodnota kampašala

Tab. XV: Srovnání rekalibrovaných charakteristik modelů pro ovčí mléko

Složka (%)	Růžičková (2007)					Výsledky analýz				
	n	R	SEC (%)	CCV (%)	$f_{PLS}$	n	R	SEC (%)	CCV (%)	$f_{PLS}$
<i>Sušina</i>	53	0,992	0,401	2,74	10	90	0,995	0,392	2,19	9
<i>Tuk</i>	108	0,953	0,573	7,50	9	145	0,967	0,528	7,32	9
<i>Bílkoviny</i>	101	0,993	0,117	1,86	12	138	0,995	0,092	1,58	14
<i>Laktóza</i>	123	0,949	0,106	2,21	14	160	0,958	0,143	3,08	14
	$y = a \pm bx_i$					$y = a \pm bx_i$				
<i>Sušina</i>	0,2496 ± 0,9831x					0,2557 ± 0,9765x				
<i>Tuk</i>	0,7036 ± 0,9079x					0,7056 ± 0,9675x				
<i>Bílkoviny</i>	0,0899 ± 0,9856x					0,0920 ± 0,9756x				
<i>Laktóza</i>	0,4741 ± 0,9010x					0,4686 ± 0,9125x				

**n** – počet vzorků v kalibraci; **R** – korelační koeficient kalibrace; **SEC** – směrodatná odchylka kalibrace; **CCV** – kalibrační variační koeficient;  **$f_{PLS}$**  – PLS faktory použité pro kalibraci;  **$a \pm bx_i$**  – parametry regresní přímky predikce

Statistickým t-testem rozdílnosti referenčních a predikovaných hodnot byla testována nulová hypotéza  $H_0: \mu d = 0$  na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  a bylo potvrzeno, že mezi metodami stanovení opět nejsou žádné statisticky průkazné rozdíly. Hodnoty t-testu jsou zapsány v Tab. XVI.

Tab. XVI: t-test rekalibrovaných modelů pro syrové ovčí mléko

Obsahové složky (%)	n	$X_{REF}$ (%)	$X_{NIR}$ (%)	SD	$t_{stat}$	$t_{krit} (1)$	$t_{krit} (2)$
<i>Sušina</i>	89	17,92	17,93	0,046	$-3,5 \cdot 10^{-2}$	1,785	2,071
<i>Tuk</i>	145	7,21	7,21	0,064	$4,62 \cdot 10^{-3}$	1,699	2,030
<i>Bílkoviny</i>	138	5,81	5,80	0,033	0,019	1,665	1,992
<i>Laktóza</i>	160	4,64	4,66	0,065	$1,88 \cdot 10^{-2}$	1,669	2,003

**n** – počet vzorků;  **$X_{REF}$**  – průměr referenčních hodnot;  **$X_{NIR}$**  – průměr predikovaných hodnot; **SD** – směrodatná odchylka difference;  **$t_{stat}$**  – hodnota t-testu;  **$t_{krit} (1)$**  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ;  **$t_{krit} (2)$**  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ .

Stejně jako u mléka kravského a kozího byly všechny rekalibrované modely popsány korelačními koeficienty v intervalu popisujícím velmi silnou závislost ( $1 > R \geq 0,90$ ). Rekalibrované modely pro stanovení obsahu sušiny a bílkovin byly popsány nejvyššími koeficienty korelace ( $R = 0,995$ ). Nejnižším koeficientem korelace byl popsán model pro stanovení obsahu laktózy ( $R = 0,958$ ). Model pro obsah bílkovin byl charakterizován nejnižší směrodatnou chybou ( $SEC = 0,092 \%$ ). Nejvyšší směrodatná chyba byla dosažena u rekalibrovaného modelu pro stanovení obsahu tuku ( $SEC = 0,528 \%$ ). Na základě vypočtených kalibračních variačních koeficientů ( $CCV \%$ ) je možné označit modely pro stanovení sušiny, bílkovin a laktózy za nejspolehlivější. V případě kalibračního modelu tuku došlo k překročení 5% hranice u  $CCV$ , přesto je koeficient opět v limitu určujícím spolehlivost modelu.

Využitím stejné metodiky, jaká byla použita v naší práci, se zabývali při hodnocení obsahových složek v ovčím mléce také ŠUSTOVÁ *et al.* (2006). Ani oni nenašli mezi referenčními a instrumentálními hodnotami pro stanovení sušiny, tuku, bílkovin, kaseinu, laktózy a močoviny žádné statisticky průkazné rozdíly. Všechny jimi získané koeficienty korelace se pohybovaly nad hranicí  $R = 0,97$ . Autoři potvrzují, že využití techniky FT-NIR metodou měření vzorků v Petriho misce v režimu reflektance je použitelné pro hodnocení obsahů zmíněných komponent. Již dříve se stanovením základních složek v ovčím mléce zabývala také JANKOVSKÁ (2004). ALBANELL *et al.* (1999) při hodnocení základního chemického složení ovčího mléka získali korelační koeficienty ( $R$ ) v intervalu  $0,92 - 0,99$  pro stanovení bílkovin, tuku a sušiny. Na základě výsledků ostatních autorů a výsledků naší práce

Ize konstatovat, že technika FT-NIR pro stanovení základního složení ovčího mléka v použitelná běžné provozní praxi.

Mimo hodnocení ovčího mléka mnozí autoři jako například ŠUSTOVÁ *et al.* (2006) využívali techniku FT-NIR pro hodnocení ovčího mleziva. Aminokyselinovým zastoupením v ovčím mlezivu se ve své práci zabývali KRÁČMAR *et al.* (2004). Mezi referenčními a predikovanými hodnotami neshledali statisticky průkazné rozdíly a ze získaných výsledků vyvodili závěr, že NIR spektroskopie je také použitelná a rychlá metoda pro stanovení obsahu a zastoupení aminokyselin v ovčím mlezivu.

## 5.4 Máslo

Cílem této části disertační práce bylo vytvořit kalibrační modely pro hodnocení základního složení másla a také ověření schopnosti techniky FT-NIR rozlišit másla dle hydrolytických změn tuku na základě čísla kyselosti. Vzorčky másel byly hodnoceny na obsah (%) tuku, sušiny a čísla kyselosti referenčními metodami (viz kap. 4.2.1.2) a instrumentální metodou na FT-NIR (viz kap. 4.2.2.2). Celkový obraz o množství obsahových složek v celé skupině másel, bez ohledu na jejich zemi původu a v závislosti na typu použité analýzy udává Tab. XVII.

Tab. XVII: Celkový přehled naměřených hodnot referenční analýzou

Parametr	n	$\bar{x}_p$ (%)	$S_x$ (%)	Max (%)	Min (%)
<i>Tuk (%)</i>	26	83,06	1,66	88,88	80,63
<i>Sušina (%)</i>	26	85,05	0,69	87,15	83,34
<i>Číslo kyselosti</i>	26	0,835	0,32	1,12	0,51

**n** – počet vzorků;  **$\bar{x}_p$**  – průměrná hodnota referenční;  **$S_x$**  – směrodatná odchylka; **Max** – nejvyšší naměřená hodnota; **Min** – nejnižší naměřená hodnota

Mezi referenčními a predikovanými hodnotami byly shledány velmi malé rozdíly, dokonce i rozdíly mezi maximálními a minimálními hodnotami těchto ukazatelů nejsou nijak vysoké, což dokazuje, že se jedná o přesnou metodu.

Pomocí programu Microsoft Office Excel 2007 byly vytvořeny kalibrační grafy, ze kterých byly získány kalibrační (Tab. XVIII) a validační (Tab. XIX) hodnoty regresních přímek a korelačních koeficientů.

Tab. XVIII: Kalibrační hodnoty pro obsahové složky másla

Parametr	$a \pm bx_i$	SEC (%)	CCV(%)	R	$f_{PLS}$
<i>Tuk (%)</i>	0,946x + 4,375	0,859	1,034	0,973	5
<i>Sušina (%)</i>	0,957x + 3,569	1,34	1,576	0,978	10
<i>Číslo kyselosti</i>	1,001x + 0,002	0,14	16,766	0,889	5

$a \pm bx_i$  – parametry regresní přímky kalibrace; **R** – korelační koeficient kalibrace; **SEC** – směrodatná odchylka kalibrace; **CCV** – kalibrační variační koeficient;  $f_{PLS}$  – PLS faktory použité pro kalibraci

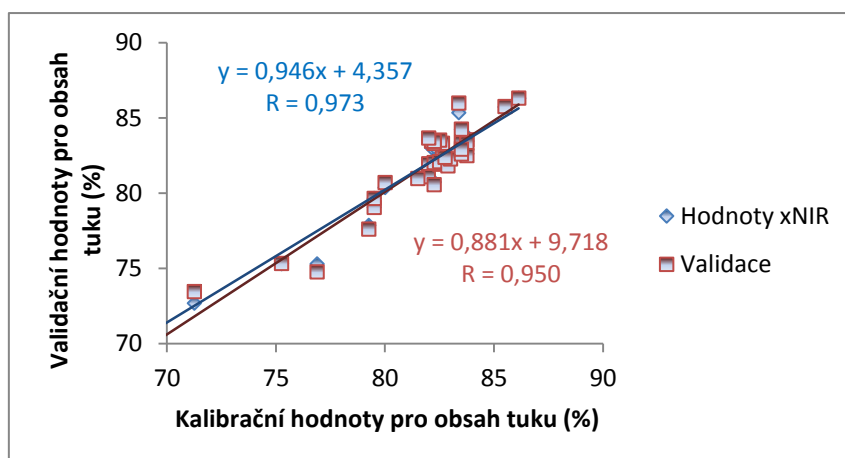
Tab. XIX: Validační výsledky pro obsahové složky másla

Parametr	$a \pm bx_i$	SEP (%)	PCV(%)	$R_v$	$f_{PLS}$
<i>Tuk (%)</i>	0,881x + 9,718	1,16	1,397	0,950	5
<i>Sušina (%)</i>	0,802x + 16,54	2,08	2,446	0,953	10
<i>Číslo kyselosti</i>	0,475x + 0,444	0,299	35,808	0,529	5

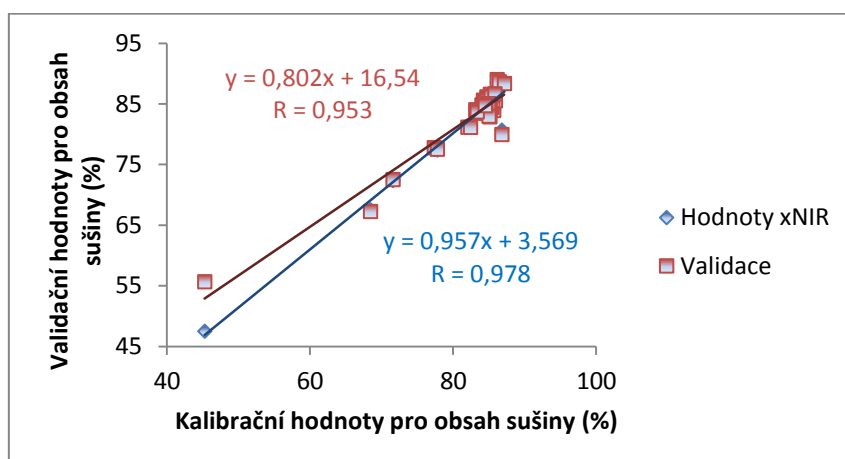
$a \pm bx_i$  – parametry regresní přímky predikce; **R** – korelační koeficient predikce; **SEP** – směrodatná odchylka predikce; **PCV** – predikční variační koeficient;  $f_{PLS}$  - PLS faktory použité pro kalibraci

Kalibrační model pro stanovení obsahu tuku v másle se vyznačoval různými hodnotami korelačních koeficientů kalibrace a validace ( $R = 0,973$  a  $0,950$ ), ale jeho směrodatné odchylky (SEC a SEP) dosahovaly nízkých hodnot ( $0,859\%$  a  $1,16\%$ ). V tomto důsledku byl tento model popsán vysokou spolehlivostí (CCV  $1,034\%$ , PCV  $1,397\%$ ). Korelační koeficienty modelu pro stanovení sušiny dosahovaly hodnot  $R = 0,978$  a  $0,953$ . Směrodatné odchylky (SEC a SEP) měly hodnoty  $1,34\%$  a  $2,08\%$ , což znamená, že jako u modelu pro stanovení tuku, dosahovaly nízkých hodnot a stejně tak i tento kalibrační model byl charakterizován vysokou spolehlivostí (CCV  $1,576\%$ , PCV  $2,446\%$ ). Největší diference v koeficientech korelací (R) byly zaznamenány pro kalibrační model stanovení

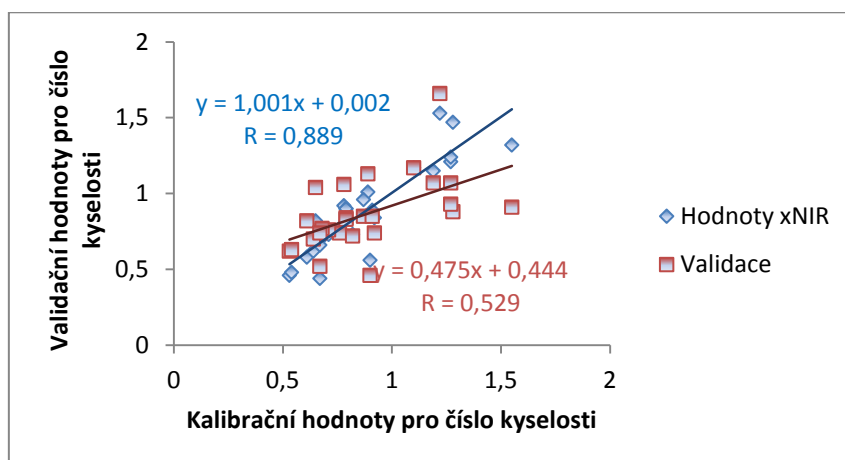
čísla kyselosti (0,889 a 0,529). Na Obr. 46 – 48 je znázorněno grafické vyjádření závislosti korelačních koeficientů kalibrací a k nim sdružených validací.



Obr. 46: Závislost kalibračního modelu měření obsahu tuku v másle

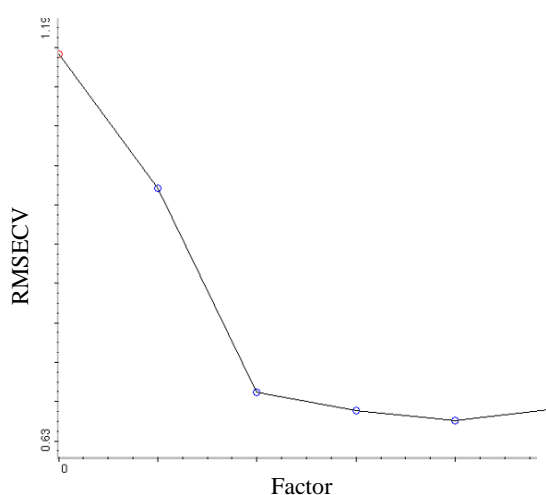


Obr. 47: Závislost kalibračního modelu měření obsahu sušiny másla



Obr. 48: Závislost kalibračního modelu měření čísla kyselosti másla

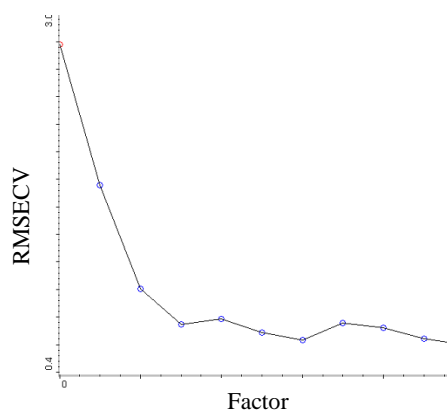
I v případě těchto kalibrací je důležitým diagnostickým nástrojem závislost PRESS (viz kap. 3.15.6), která je indikátorem chyby kalibrace vytvořené PLS metodou. Optimální průběh křivky PRESS začíná prudkým poklesem, který vypovídá o robustnosti kalibračního modelu, a následný další pokles bývá pozvolný. Optimální počet PLS faktorů použitých ke kalibraci se pohybuje v intervalu 5 – 15, příliš vysoký počet PLS faktorů ale snižuje schopnost predikce, protože v křivce PRESS je zahrnut i spektrální šum (HAALAND *et* THOMAS 1988b; MATĚJKA, 2006). Pro tvorbu kalibračního modelu ke zjištění obsahu tuku a pro zjištění čísla kyselosti bylo použito 5 PLS faktorů. Pro obsah sušiny bylo použito 10 PLS faktorů (viz Tab. XVIII), přičemž tento vyšší počet je pravděpodobně spjat s užším rozpětím koncentrací hledaných komponent a větší směrodatnou odchylkou hodnot. Klesající charakter funkce PRESS byl dosažen při hodnocení kalibračního modelu pro stanovení obsahu (%) tuku a sušiny. Pro kalibrační model stanovení čísla kyselosti nedosahovala křivka PRESS klesajícího charakteru, což spolu s hodnotami CCV (16,766 %) a PCV (35,808 %) ukazuje, že se jedná o model nespolehlivý a tudíž nepoužitelný. Tento fakt byl zapříčiněn velmi nízkou variabilitou mezi naměřenými hodnotami, které se následně soustředily do shluku hodnot na kalibrační přímce, což vedlo k vysoké chybě kalibrace. Stanovením čísla kyselosti se ve své práci zabývala také HRNČÍŘOVÁ (2009), která uvádí velmi podobné závěry, když zjistila pro kalibrační model čísla kyselosti hodnotu koeficientu korelace  $R = 0,961$ , ale hodnota SEC (0,355 %) a z ní vypočítaný ukazatel CCV dosahoval hodnoty neodpovídající spolehlivosti funkce kalibračnímu modelu ( $CCV > 10 \%$ ). Průběhy námi dosažených křivek funkcí PRESS jsou znázorněny na Obr. 49 – 51.



RMSECV – Root-Mean-Square Error of Cross-Validation (Střední kvadratická chyba křížové validace)

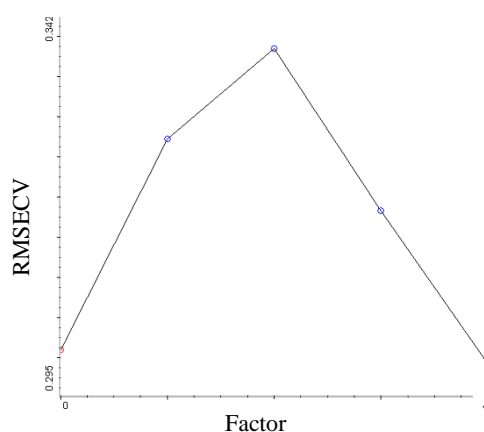
Obr. 49: Diagnostika funkce PRESS pro kalibrační model obsahu tuku v másle





RMSECV – Root-Mean-Square Error of Cross-Validation (Střední kvadratická chyba křížové validace)

Obr. 50: Diagnostika funkce PRESS pro kalibrační model obsahu sušiny másla



RMSECV – Root-Mean-Square Error of Cross-Validation (Střední kvadratická chyba křížové validace)

Obr. 51: Diagnostika funkce PRESS pro kalibrační model stanovení čísla kyselosti másla

Hodnoty získané referenční a instrumentální analýzou byly podrobeny dvouvýběrovému párovému Studentovu t-testu na střední hodnotu při hladině pravděpodobnosti  $\alpha = 0,05$ . T-test byl proveden analýzou dat v program Microsoft Office Excel 2007. Získané hodnoty t-testu jsou zapsány v Tab. XX.

Tab. XX: Hodnoty t-testu ( $\alpha = 0,05$ ) pro kalibrační modely měření vzorků másla

Kalibrační složky	n	SD	t <sub>stat</sub>	t <sub>krit</sub> (1)	t <sub>krit</sub> (2)
<i>Tuk</i>	26	0,728	-0,004	1,690	2,030
<i>Sušina</i>	26	1,267	0	1,678	2,012
<i>Kyselost</i>	26	0,051	-0,010	1,678	2,012

**n** – počet vzorků; **SD** – směrodatná odchylka difference; **t<sub>stat</sub>** – hodnota t-testu; **t<sub>krit</sub> (1)** – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; **t<sub>krit</sub> (2)** – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ .

Metodou dle Gerbera bylo zjištěno, že průměrný obsah tuku u másel vyrobených na území ČR byl 83,42 %, zatímco u másel vyrobených v zahraničí se obsah tuku pohyboval na hodnotě 82,7 %. Důvodem toho minimálního rozdílu může být různá tučnost mléka zpracovaného na máslo. Ve statistickém testování se tento rozdíl vyjevil jako neprůkazný, což se následně potvrdilo i u analýz provedených na FT-NIR. Nařízení rady (ES), č. 1234/2007 ve znění pozdějších předpisů, kterým se stanoví společná organizace zemědělských trhů a zvláštní ustanovení pro některé zemědělské produkty („jednotné nařízení o společné organizaci trhů“) udává, že minimální obsah tuku v másle je 80 %. Samotní producenti na obalech deklarovali obsah tuku buď min. 80 % nebo interval 80 – 82 % tuku. Farmářské máslo, jehož obal deklaroval minimální obsah tuku 85 %, vyhovělo v obou způsobech zjišťování obsahu tuku. Obě skupiny analyzovaných vzorků másla vykazovaly obsah sušiny okolo 85 % v chemické analýze i při analýze na FT-NIR. Ani v tomto případě však neexistují statisticky průkazné rozdíly v hodnotách obsahu sušiny.

Využitím FT-NIR spektroskopie při hodnocení másla se zabývali také HERMIDA *et al.* (2001), kteří využili NIR spektroskopii k analýze 102 vzorků másla a následně vytvářeli kalibrační modely pro obsahy vlhkosti, tuku a tukuprosté sušiny. Ve své práci použili více vzorků a hodnocení kalibračního modelu získali kalibraci s nižší směrodatnou chybou (SEC = 0,192 %) pro stanovení obsahu sušiny, přičemž jimi bylo současně dosaženo nižšího koeficientu korelace ( $R = 0,90$ ), než bylo dosaženo v naší práci. Nižší chyba kalibrace byla v práci HERMIDA *et al.* (2001) získána i při kalibraci určené pro stanovení obsahu tuku (SEC = 0,168 %), ale i v tomto případě bylo dosaženo nižšího koeficientu korelace ( $R = 0,94$ ).

Infračervenou spektroskopii ve své práci využívali také HEUSSEN *et al.* (2007). Jejich cílem bylo využít vícerozměrného modelování infračervených spekter za účelem vyvinutí metody, která dokáže odhalit falšování másla z hlediska obsahu a složení tuku levnějšími rostlinnými tuky. V práci využili velmi rozsáhlý kalibrační set vzorků, který se skládal ze 152 vzorků másla, 42 vzorků olejů a 200 vzorků jejich směsí. Pro vyhodnocení bylo využito logaritmu PCA a PLS. Jako referenční stanovení tuku a kyseliny máselné (C 4:0) bylo využito metody plynové chromatografie (GC). V práci bylo zjištěno, že FT-NIR technika je schopna posoudit celkovou úroveň máselného tuku.

Stanovení čísla kyselosti je důležité z hlediska zjištění kvality másla na základě oxidace tuku. Čím je toto číslo vyšší, tím je nižší jakost, resp. vyšší oxidace másla (KRATOCHVÍL *et VEDLICH*, 1974). ČSN 46 7092-8 definuje číslo kyselosti jako množství extrahovatelných látek kyselé povahy, převážně volných karboxylových (mastných) kyselin, v 1 g tuku, získaného příslušným extrakčním činidlem, popř. tuku samotného, vyjádřené v mg hydroxidu draselného (KOH) nebo v mmol, kterých je potřeba k jejich neutralizaci. Námi hodnocená másla nepodléhala výraznější hydrolyze tuku během výrobcem garantované doby spotřeby za dodržení standardních skladovacích podmínek, což se ukázalo i na rozdílech mezi stanovením čísla kyselosti ihned po jejich zakoupení a následně i po uplynutí expirace (Tab. XXI). Původní počet vzorků v práci byl 26, před stanovením čísla kyselosti po expiraci byly z analýz vyloučeny 3 vzorky (2 zahraniční a 1 tuzemský) z důvodu zplsnivění vzorků.

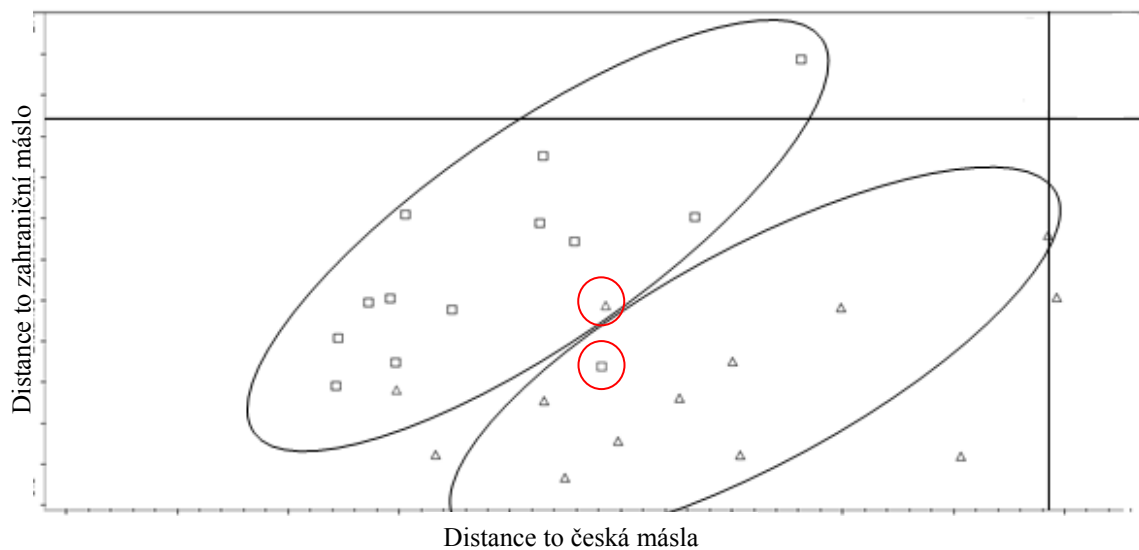
Tab. XXI: Hodnoty čísel kyselosti másel po jejich zakoupení a po expiraci

Produkce	Číslo kyselosti (po nákupu)	Číslo kyselosti (konec expirace)	Rozdíl	Průměr
CZ	0,81	0,83	+0,02	
CZ	0,63	0,65	+0,02	
CZ	0,6	0,63	+0,03	
CZ	0,51	0,53	+0,02	
CZ	0,45	0,5	+0,05	
CZ	0,54	0,59	+0,05	<b>0,663</b>
CZ	0,69	0,70	+0,01	
CZ	0,63	0,65	+0,02	
CZ	0,75	0,77	+0,02	
CZ	0,63	0,64	+0,01	

CZ	0,69	0,7	+0,01	
CZ	0,75	0,76	+0,01	
Z	0,91	0,94	+0,03	
Z	1,24	1,27	+0,03	
Z	1,27	1,32	+0,05	
Z	0,54	0,55	+0,01	
Z	1,18	1,2	+0,02	<b>1,04</b>
Z	1,12	1,14	+0,02	
Z	1,51	1,53	+0,02	
Z	0,33	0,34	+0,01	
Z	1,39	1,41	+0,02	
Z	0,63	0,67	+0,04	
Z	1,06	1,1	+0,04	

**CZ** – másla vyrobená na území ČR, **Z** – másla vyrobená na území mimo ČR

GONÇALVES a BAGGIO (2012) se zabývali ve svém výzkumu stanovením čísla kyselosti evropských a jihoamerických másel, které nakupovali v brazilské tržní síti, přičemž se jednalo o másla solená i nesolená. Jimi zjištěné hodnoty čísla kyselosti se pohybovaly v rozmezí od 1,6 do 4,6 mg KOH.g<sup>-1</sup> másla. Tomuto výsledku se více přibližovali v naměřených hodnotách másla zahraniční ( $\bar{O} = 1,04$  mg KOH.g<sup>-1</sup> másla), kdežto másla česká vykazovala nižší hodnoty kyselosti ( $\bar{O} = 0,663$  mg KOH.g<sup>-1</sup> másla). Zvýšená hodnota čísla kyselosti je pravděpodobně u zahraničních másel způsobena rozdílným způsobem zpracování mléka na máslo v zahraničních podmínkách a následnou další manipulací s ním tj. skladování či distribucí. Kvalitativní analýza byla využita jednak k odlišení másel tuzemské a zahraniční provenience (Obr. 52), ale také ke zhodnocení másel na základě hodnot čísla kyselosti měřených po jejich zakoupení a po uplynutí doby expirace. K hodnocení byla využita metoda diskriminační analýzy (viz kap. 3.14.1). Cílem analýzy byla separace vzorků do klastrů předem definovaných tříd.

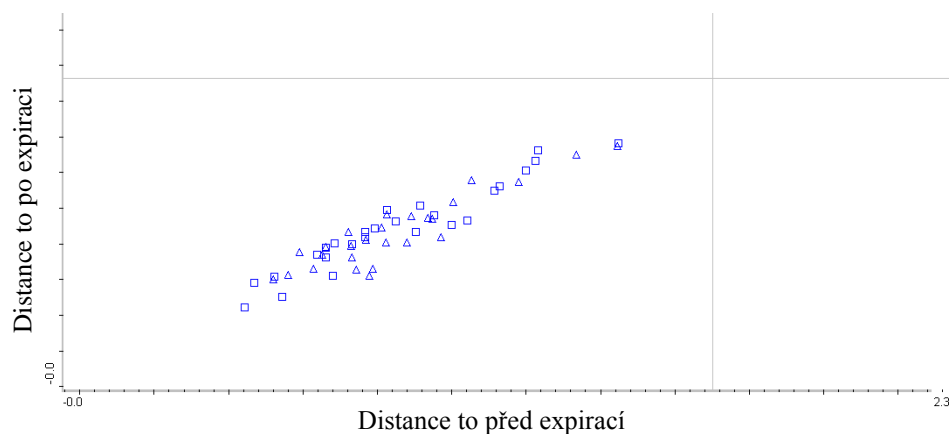


□ - česká másla    Δ - zahraniční másla

Obr. 52: Vyhodnocení skupin másel po vyšetření na FT-NIR

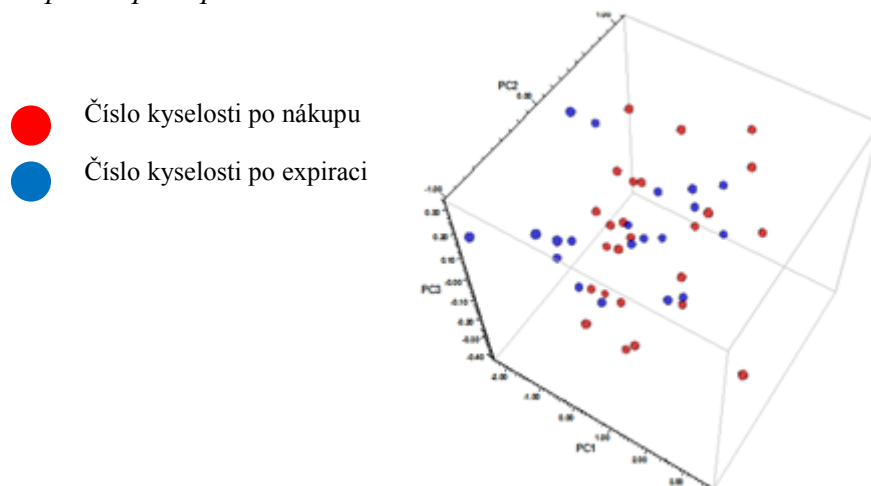
Grafické znázornění diskriminační analýzy zobrazuje spektra zjištění u tuzemského másla a másla zahraniční produkce. Je patrné, že vzorky másla se diferencovaly podle původu. Nedošlo však k absolutní diferenciaci, neboť dva vzorky (znázornění červeným kroužkem) svým složením spadaly spíše do skupiny tuzemských resp. zahraničních másel. Tato skutečnost může být způsobena rozdílným způsobem výroby másla, stravou či chemickým zastoupením mastných kyselin v tuku smetany.

Metoda diskriminační analýzy byla tedy dále využita také ke zjištění změny v chemickém složení másla během skladování. Diskriminační analýza čísla kyselosti potvrdila výsledky získané kvantitativní analýzou metodou PLS pro hodnocení čísla kyselosti, která neprokázala statistickou závislost v rozdílu hodnot získaných po nákupu a po expiraci vzorků. Grafické znázornění diskriminační analýzy uvádí v 2D vizualizaci Obr. 53. Na 3D vizualizaci (Obr. 54) jsou pohyby v hodnotě čísla kyselosti patrnější, přesto mezi nimi ale není statisticky průkazný rozdíl. Kvalita a hygiena mléka na českém trhu je na velmi dobré úrovni, stejně tak technologie zpracování smetany na máslo, z čehož plyne eliminace škodlivých mikroorganismů a jimi produkovaných enzymů jako hlavních kontaminantů majících za následek hydrolýzu tuku.



- hodnoty čísla kyselosti získané analýzou vzorků po nákupu
- △ hodnoty čísla kyselosti získané analýzou vzorků po expiraci

Obr. 53: 2D grafické znázornění diskriminační analýzy čísel kyselosti másel měřeného po zakoupení a po expiraci



Obr. 54: 3D grafické znázornění diskriminační analýzy čísel kyselosti másel měřeného po zakoupení a po expiraci

Jak vyplývá z námi zjištěných výsledků a výsledků výše zmíněných prací, je metoda FT-NIR spektroskopie vhodnou technikou pro hodnocení kvality másla z hlediska obsahu hlavních komponent tj. obsahu (%) tuku a sušiny. Kontrola těchto komponent je důležitá z důvodu zapracování požadavků na obsahy tuku a vody v másle do legislativních předpisů.

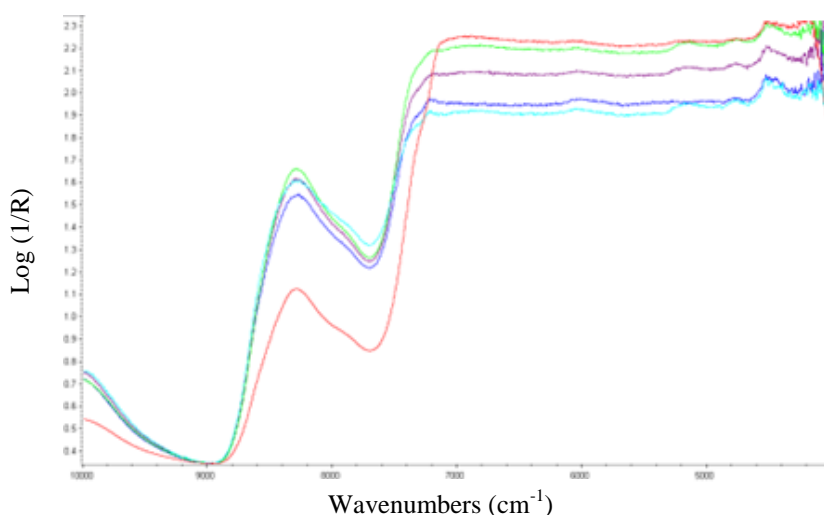
Výsledky této části disertační práce byly publikovány v časopisu *Mljekarstvo* (DVOŘÁK, L. -- LUŽOVÁ, T. – ŠUSTOVÁ, K. Comparison of butter quality parameters available on the Czech market with the use of FT NIR technology, *Mljekarstvo*, 66 (1): 73-80, 2016).

## 5.5 Med

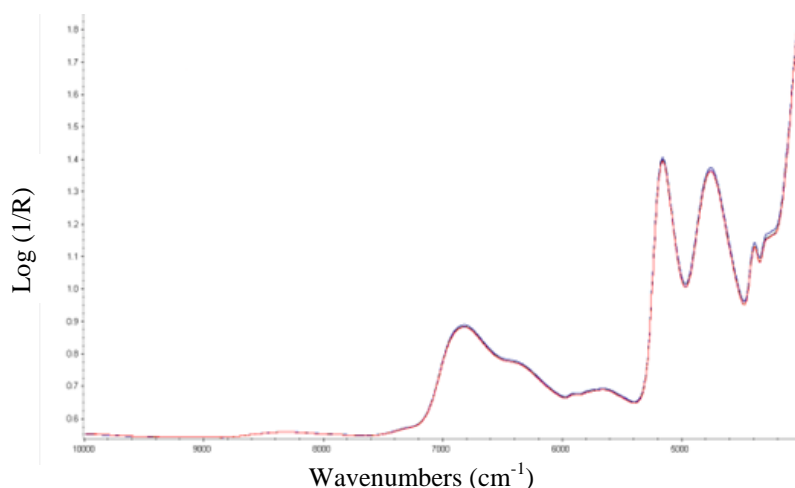
Tato část disertační práce se zabývá tvorbou a hodnocením kalibračních modelů pro analýzy medu a dále také schopností FT-NIR spektroskopu oddělovat jednotlivé vzorky přes diskriminační analýzu na základě jejich chemického složení.

Mnozí výrobci se snaží ovlivnit jeho cenu na trhu mnohdy nekalými praktikami. Nejčastější způsob falšování medu spočívá v přidavku cukerného sirupu vyrobeného z cukrové řepy, používají se ale i jiné druhy sirupů. Dalším způsobem ovlivňování jakosti medu je přibarvování nedostatečně tmavých medů karamellem nebo potravinářskými barvivy. Častým způsobem falšování medu je také přidavek vody nebo vydávání náhražek medů za medy včelí (ČERNÁ, 2015).

Při analýzách na FT-NIR bylo zjištěno, že měřicí metoda režimem interaktance s využitím optické sondy je pro měření vzorků medů nevyhovující. Získaná spektra vykazovala velké odchylky v rámci měření jednoho vzorku (Obr. 55). Důvodem je pravděpodobně příliš vysoká viskozita medu, na kterou nebyla optická sonda schopna reagovat správnou odezvou. Měření v režimu reflektance na integrační sféře udávalo přijatelnější výsledky (Obr. 56).



Obr. 55: Infráčervená spektra medu naměřená optickou sondou



Obr. 56: Infračervená spektra medu naměřená na integrační sféře

Na základě výsledků získaných referenčními analýzami byly získány hodnoty, které byly použity pro tvorbu kalibrací pro stanovení obsahu vody, hodnoty rotace sacharidů před a po inverzi a také pro stanovení vodivosti či hodnocení obsahu pylových zrn. Základní statistické ukazatele jsou zapsány v Tab. XXII.

Tab. XXII: Základní statistické ukazatele referenčních analýz vzorků medu

Kalibrace	n	$\bar{x}_p$	$S_x$	Min	Max
<i>Voda (%)</i>	56	14,175	6,919	15,2	62,6
<i>Vodivost</i>	56	36,951	29,817	10,78	110,23
<i>Rotace před inverzí</i>	68	10,260	6,760	-17,5	12,1
<i>Rotace po inverzi</i>	68	11,236	6,354	-19	9,1
<i>Obsah pylových zrn</i>	31	4637,06	3172,89	149	13166

**n** – počet vzorků;  **$\bar{x}_p$**  – průměr;  **$S_x$**  – směrodatná odchylka; **Min** – minimální hodnota; **Max** – maximální hodnota

Před kalibracemi byla diagnostickými nástroji Spectrum Outlier a Leverage odstraněna spektra, která nevyhovovala kalibračnímu setu hodnot, a po této korekci byly metodou PLS vytvořeny kalibrační modely pro hodnocení zmíněných parametrů. Základní charakteristiky kalibrací udává Tab. XXIII.



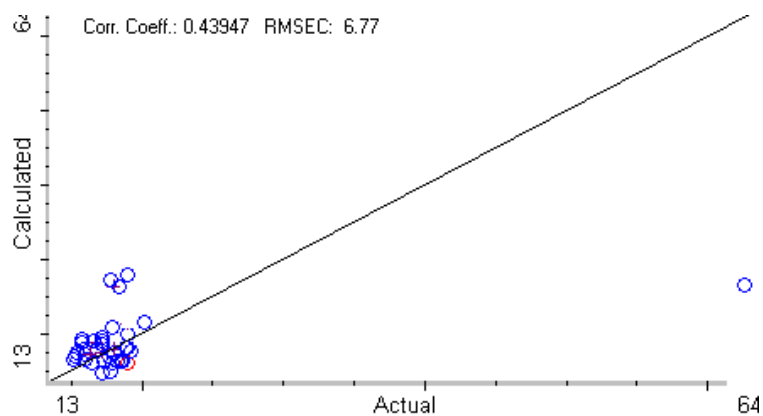
Tab. XXIII: Data získaná při tvorbě kalibračních modelů pro hodnocení medu

Kalibrace	n	R	SEC (%)	CCV(%)	$a \pm bx_i$	$f_{PLS}$
<i>Voda (%)</i>	56	0,439	6,77	47,76	$15,1990 \pm 0,1945x$	10
<i>Vodivost</i>	56	0,950	3,26	8,822	$2,9226 \pm 0,8856x$	10
<i>Rotace před inverzí</i>	68	0,991	0,977	9,522	$0,2871 \pm 0,9495x$	10
<i>Rotace po inverzi</i>	68	0,980	0,969	8,624	$0,1243 \pm 0,9101x$	10
<i>Obsah pylových zrn</i>	31	0,415	$0,339 \times 10^4$	73,11	$56,2684 \pm 0,0652x$	8

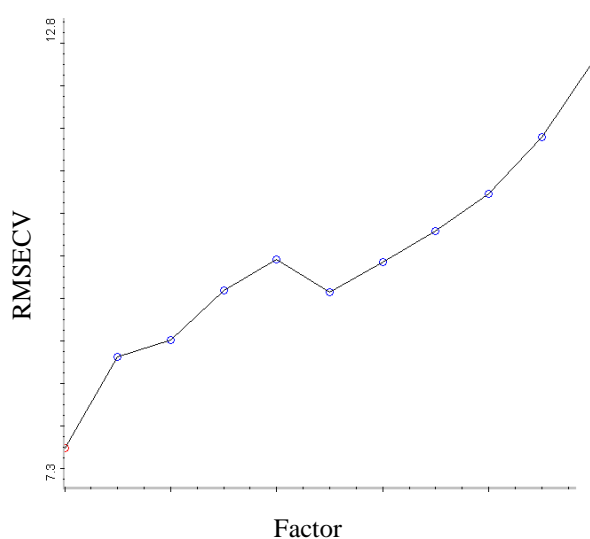
**n** – počet vzorků, **R** – korelační koeficient kalibrace, **SEC** – směrodatná odchylka kalibrace, **CCV** – kalibrační variační koeficient,  **$f_{PLS}$**  – počet PLS faktorů použitých při tvorbě kalibrace;  **$a \pm bx_i$**  – parametry regresní přímky predikce

Kalibrační modely pro stanovení obsahu pylových zrn a vody měly nejnižší hodnoty korelačních koeficientů. Kalibrační variační koeficienty těchto kalibračních modelů dosahovaly příliš vysokých hodnot, které přesahují hranici spolehlivosti  $CCV = 10\%$ . Modely jsou tedy pro hodnocení daných parametrů medu nepoužitelné. Tato skutečnost je, u modelu pro obsah vody, způsobena jeho malou robustností, tj. hodnoty obsahu vody ve vzorcích nedosahovaly potřebné variability (Obr. 57). Model pro hodnocení obsahu pylových zrn je nepoužitelný pravděpodobně z důvodu špatného počítání pylových zrn ve vzorcích při referenční metodě popř. také jeho malou robustností.

Modely pro vodivost a pro rotaci sacharidů před inverzí a po inverzi vykazovaly korelační koeficienty popisující velmi silnou závislost ( $R > 0,90$ ). Všechny modely byly charakterizovány hodnotou  $CCV$  (%) jako spolehlivé. Spolehlivost těchto kalibračních modelů byla potvrzena i diagnostickým nástrojem PRESS, kdy křivka měla klesající charakter. Přesto je ale nutné všechny kalibrační modely v dalších měřeních zdokonalovat a rekalibrovat. V případě kalibračního modelu pro stanovení obsahu vody byla i touto diagnostikou potvrzena nespolehlivost modelu (Obr. 58), stejně tak se zde ukázal i model pro stanovení počtu pylových zrn jako velmi nespolehlivý, jelikož křivka PRESS vykazovala podobný charakter jako u hodnocení obsahu vody.



Obr. 57: Znáznornění nedostatečné robustnosti kalibračního modelu pro obsah vody v medu



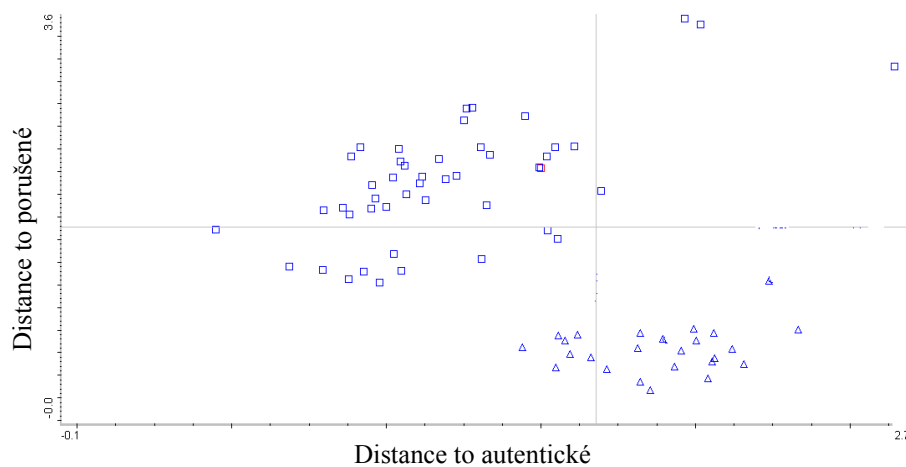
RMSECV – Root-Mean-Square Error of Cross-Validation (Střední kvadratická chyba křížové validace)

Obr. 58: Křivka diagnostiky PRESS pro hodnocení obsahu vody v medu

Hodnocení obsahů hlavních komponentů medu řešili GARCÍA-ALVAREZ *et al.* (2000). Pomocí NIR spektroskopie hodnotili obsahy glukózy, fruktózy a vody v celkem 161 vzorcích medů. Metodou PLS dosáhli podstatně lepších výsledků pro kalibrační model stanovení obsahu vody, než bylo dosaženo v naší práci. V roce 2002 se zabývali také hodnocením rotace (polarizace) sacharidů před a po inverzi kyselinou chlorovodíkovou (HCl). Bylo analyzováno 156 vzorků medů a metodou PLS byly vytvořeny kalibrace dosahující koeficientů korelace 0,997 pro rotaci před inverzí a 0,992 pro rotaci po inverzi. Směrodatné chyby kalibrací dosahovaly hodnot nižších, než v naší práci, a sice 0,037 % resp. 0,059 %. Hodnocením jakosti medů pomocí NIR spektroskopie se ve svém výzkumu zabývali již

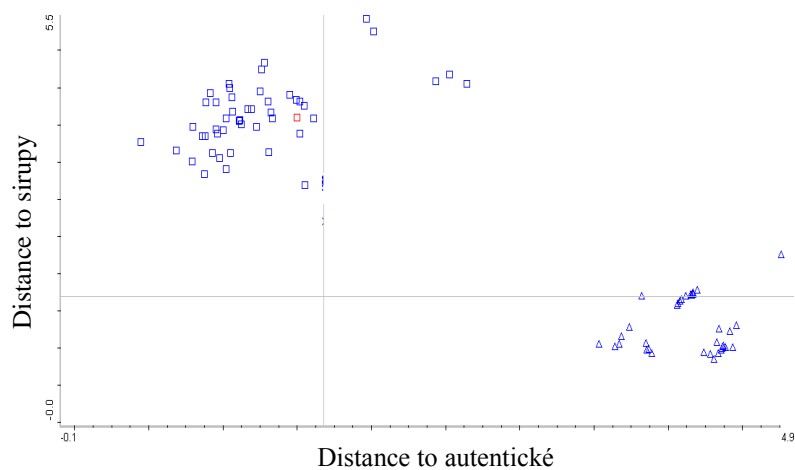
i ZHU *et al.* (2010), kteří zjišťovali přídavek nežádoucích příměsí, především sladidel, ve 135 vzorcích medů, z nichž 68 bylo autentických a 67 porušených. K tvorbě kalibrací využili různé algoritmy (WT, PCA a PLS). Metoda WT (wavelet transformation) se ukázala jako přesnější ve srovnání s PCA, ale nejlepší výsledky byly získány metodou PLS, kdy bylo dosaženo korelačního koeficientu  $R = 0,952$  při celkové přesnosti metody 95,1 %. RUOFF (2006) také hodnotil obsah vody a vodivost u vzorků medů. Pomocí NIR spektroskopie analyzoval 364 vzorků medů v režimu transflektance při 64 scanech v rozlišení  $8 \text{ cm}^{-1}$ . Při hodnocení vody došel k lepším výsledkům, než byly dosaženy v naší práci, kdy hodnota  $R = 0,978$  a  $\text{SEC} = 0,3 \%$ . Pro hodnocení vodivosti byly dosaženy hodnoty  $R = 0,891$  a  $\text{SEC} = 0,17 \%$ . Mimo tyto parametry dále hodnotil obsahy různých sacharidů např. glukózy, nigerózy či melibiózy, dále obsah HMF, prolinu či hodnoty pH. NIR spektroskopii vyhodnotil jako spolehlivou a rychlou alternativní metodu při hodnocení autenticity a kvality medů. Hodnocení parametrů medu, mj. i vodivosti řešili také LICHTENBERG-KRAAG *et al.* (2002). Analýzou 1600 vzorků medů vytvořili metodou PLS kalibrační modely, které se vyznačovaly hodnotami  $R = 0,92 - 0,99$ , přičemž model pro vodivost dosahoval hodnoty  $R = 0,97$ . Standardní chyba kalibrace dosáhla hodnoty  $\text{SEC} = 0,02 \%$ . I v této práci autoři považují NIR techniku za spolehlivou a použitelnou při hodnocení jakostních parametrů medu.

Kvalitativní diskriminační analýzou, na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ , byly vzorky medů hodnoceny na základě jejich autenticity či místa pořízení. Medy byly také srovnány s cukernými sirupy. Diferenciace medů autentických a porušených do klastrů definovaných tříd demonstruje Obr. 59.

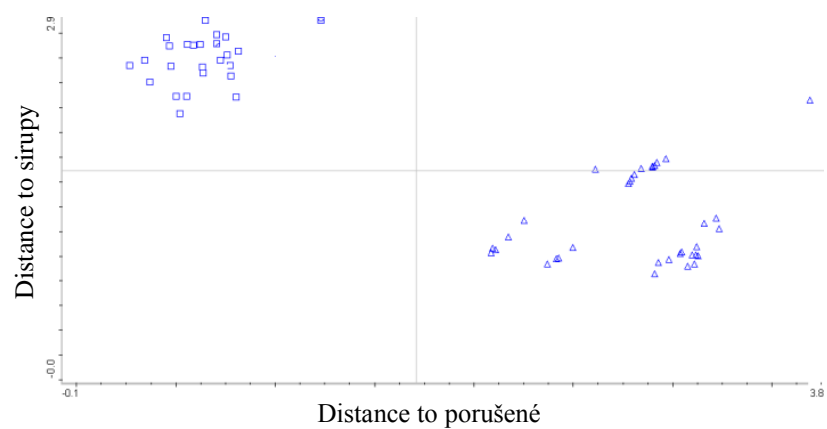


Obr. 59: Diskriminační kříž medů autentických (  $\square$  ) a porušených (  $\Delta$  )

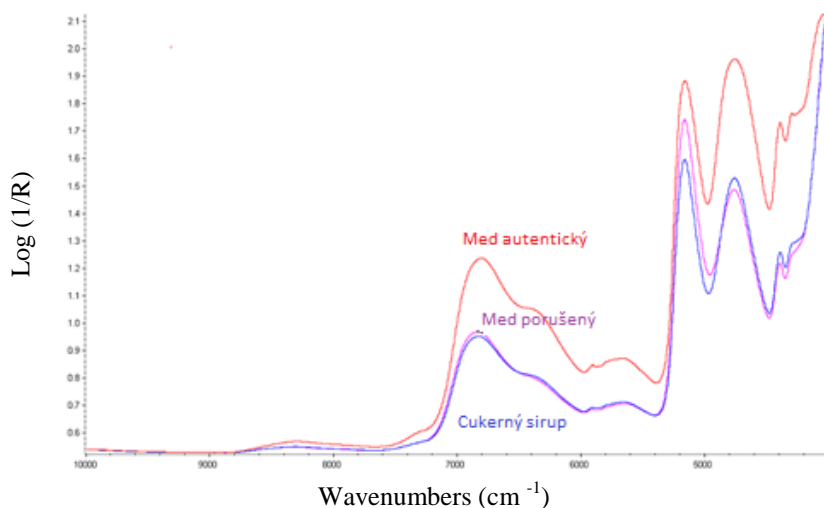
Diskriminační analýzou byl taktéž vytvořen diskriminační kříž pro porovnání cukerných sirupů s medy autentickými (Obr. 60) i porušenými (Obr. 61). Došlo k absolutní diferenciaci jednotlivých tříd, což potvrzuje předpoklad, že chemické složení obou testovaných složek je rozdílné. Tuto domněnku je možné potvrdit i na průběhu měřených spekter v jejich maximech (Obr. 62).



Obr. 60: Diskriminační kříž medů autentických (  $\square$  ) a cukerných sirupů (  $\Delta$  )

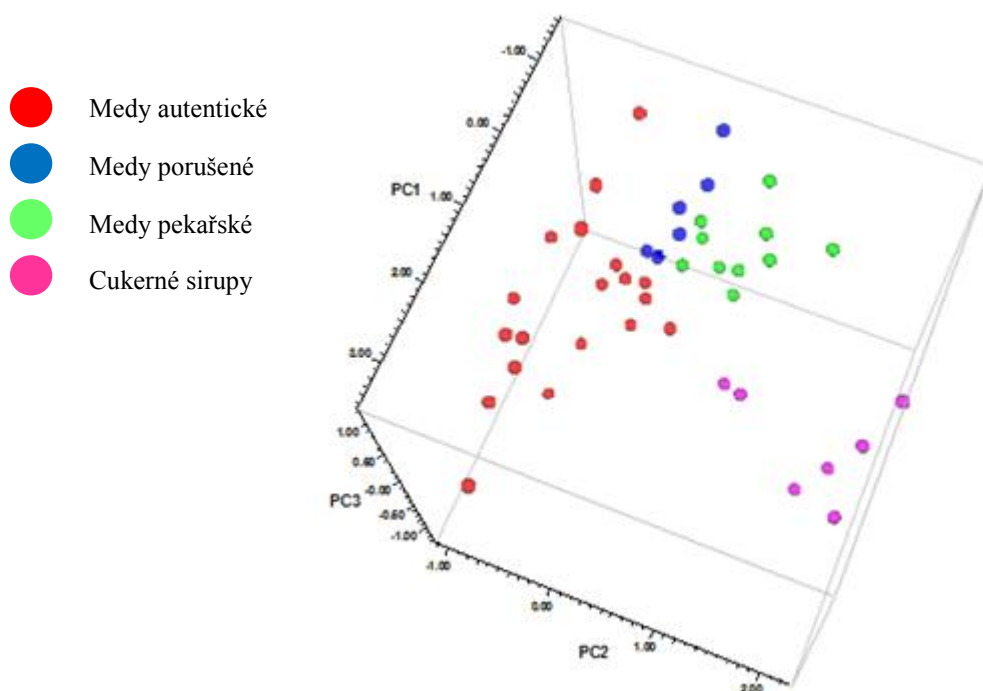


Obr. 61: Diskriminační kříž medů porušených (  $\square$  ) a cukerných sirupů (  $\Delta$  )



Obr. 62: Rozdílnost spekter medů a sirupu získaných režimem reflektance

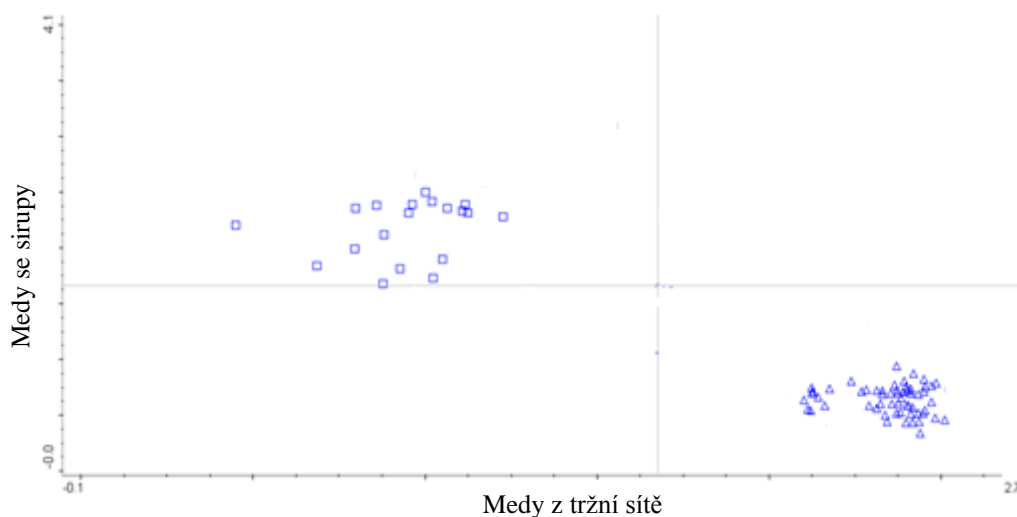
Byla vytvořena i souhrnná 3D diskriminační analýza, která ukazuje postavení skupiny medů pekařských vůči ostatním definovaným třídám (Obr. 63).



Obr. 63: 3D diskriminační analýza postavení skupiny medů pekařských vůči ostatním definovaným třídám

Poslední diskriminační analýza byla provedena na základě místa pořízení medů. Definovanými třídami byly vzorky selektovány do klastrů v třídách medů získaných ze sbírky

na ÚZRHV na AF MENDELU a medů pořízených v tržní síti (Obr. 64). Grafické znázornění diskriminační analýzy ukazuje na průkazný rozdíl v kvalitativním složení diskriminovaných medů, což může úzce souviset s nesprávnou tvorbou kalibrací v důsledku možného odparu vody, krystalizací sacharidů popř. vlivem podmínek skladování na degradaci či tvorbu určitých látek.



Obr. 64: 2D diskriminační analýza vzorků medů získaných ze sbírky ( □ ) a vzorků pořízených v tržní síti ( Δ )

NIR spektroskopii k diferenciaci vzorků medů na základě botanického původu využili i CHEN *et al.* (2012), kteří pomocí optické sondy analyzovali 5 čínských druhů medu a ke kvalitativní analýze použili metodu MD-DA (diskriminační analýza s výpočtem Mahalanobisovy vzdálenosti) a ANN. Správnost metody MD-DA se pohybovala kolem 85 %, zatím co u metody ANN byla správnost 90%. Autoři hodnotili techniku NIR spektroskopie jako vhodnou pro klasifikaci medů na základě jejich botanického původu. LATORRE *et al.* (2013), testovali různé měřicí a chemometrické techniky k ověřování autenticity medů opatřené chráněným zeměpisným označením. 30 vzorků bylo hodnoceno na přístroji NIR-Systems 6500 v režimu reflektance při 32 scanech. Získaná spektra byla zpracována chemometrickými metodami PCA, PLS-DA, SIMCA a kNN. Nejlepší výsledky byly získány ve spolupráci technik NIR a SIMCA, která se vyznačovala 93,3% citlivostí a 100% specifícností. Dalšími autory, kteří využili kvalitativní hodnocení spekter naměřených na NIR technice byli CHEN *et al.* (2011). Použitím optické sondy v kombinaci s chemometrickými postupy byla zkoumána autenticita medů na základě jeho porušením vysokým obsahem fruktóзовého kukuřičného sirupu. Diskriminační třídy byly definovány jako medy autentické

a medy falšované. Byla dosažena správnost diferenciacie vyšší než 90 %. Autoři tvrdí, že NIR spektroskopii lze použít k rychlé detekci medu falšovaného vysokým obsahem kukuřičného sirupu.

## 5.6 Káva

Tato část práce byla zaměřena na tvorbu kalibračních modelů pro hodnocení obsahových složek kávy a na hodnocení schopnosti techniky FT-NIR rozlišovat vzorky na základě různého složení vzorků, podmínek jejich skladování a zpracování.

Důležitými faktory při hodnocení kvality kávy jsou přesnost a snadnost měření (BOGDANESCU *et al.*, 2005). Při určování druhu kávy a stupně jejího pražení je, dle BICHA *et al.* (2013), použitelnou metodou senzorický profil. I přes toto tvrzení existuje snaha vyvíjet a využívat rychlé a opakovatelné metody v hodnocení kvality potravin (McCAIG, 2002).

Podle metodiky uvedené v kap. 4.2.1.4 pro referenční analýzy a v kap. 4.2.2.4 pro analýzu na FT-NIR Antaris byly vytvořeny kalibrační modely pro stanovení obsahu fenolů a kofeinu. Před vlastní tvorbou byla spektra hodnocena nástrojem Spectrum outlier a došlo tak ke zkonkretizování kalibračního setu. Základní statistické hodnoty použité v kalibracích uvádí Tab. XXIV. Charakteristické hodnoty vytvořených kalibrací jsou zapsány v Tab. XXV.

Tab. XXIV: Základní statistické hodnoty použité pro tvorbu kalibrací na vzorky kávy

Obsahové složky (%)	n	$\bar{x}_p$ (%)	$S_x$ (%)	Min (%)	Max (%)
<i>Kofein</i>	78	11,44	1,11	9,63	13,99
<i>Fenoly</i>	78	1,12	1,72	0,26	12,00

**n** – počet vzorků;  **$\bar{x}_p$**  – průměr;  **$S_x$**  – směrodatná odchylka; **Min** – minimální hodnota; **Max** – maximální hodnota

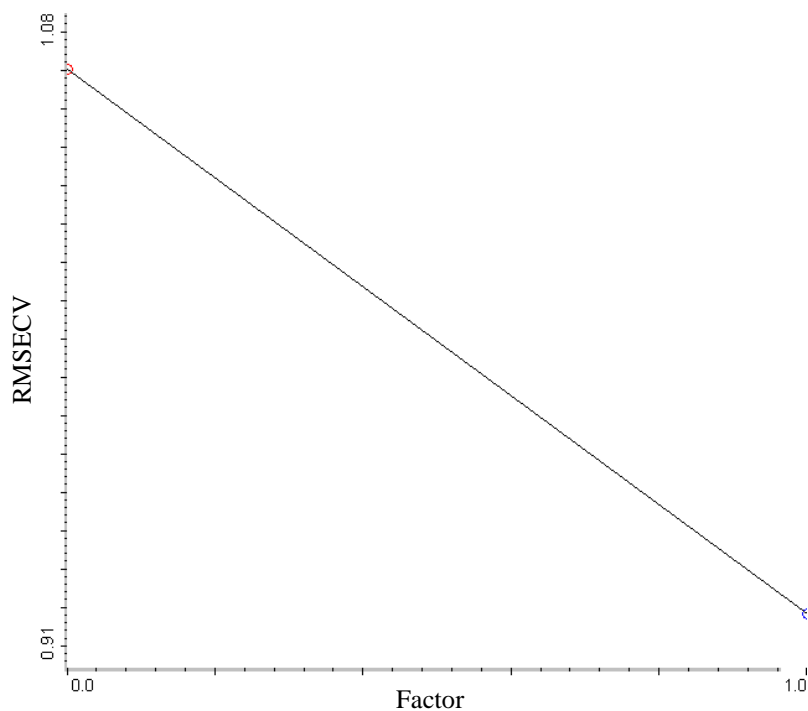
Tab. XXV: Charakteristické hodnoty vytvořených kalibrací pro vzorky kávy

Obsahové složky (%)	R	SEC (%)	CCV (%)	R <sub>v</sub>	SEP (%)	PCV (%)	f <sub>PLS</sub>
<i>Kofein</i>	0,528	0,870	7,60	0,431	0,928	8,11	2
<i>Fenoly</i>	0,377	0,379	33,84	0,187	0,409	36,52	2
$y = a \pm bx_i$							
<i>Kofein</i>	9,1664 ± 0,1907x						
<i>Fenoly</i>	0,8902 ± 0,0091x						

**R** – koeficient korelace kalibrace; **SEC** standardní chyba kalibrace; **CCV** – kalibrační variační koeficient; **R<sub>v</sub>** – koeficient korelace validace, **SEP** – standardní chyba predikce; **PCV** – predikční variační koeficient; **f<sub>PLS</sub>** – počet PLS faktorů; **a ± bx<sub>i</sub>** – parametry regresní přímky predikce

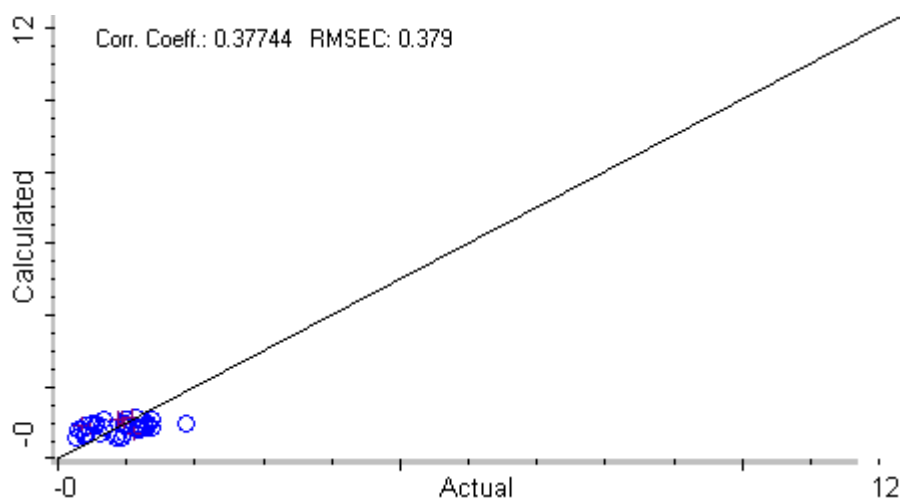
Vytvořené kalibrace se vyznačovaly nízkými korelačními koeficienty. Kalibrace ke stanovení obsahu kofeinu dosahovala hodnot koeficientu korelace  $R = 0,528$  a  $SEC = 0,870$  %. Pro stanovení fenolů bylo dosaženo hodnot  $R = 0,377$  a  $SEC = 0,379$  %. Dle CHRÁSKY (2000) je prakticky použitelná hodnota koeficientu korelace  $R \geq 0,40$ . Korelační koeficient pro kalibraci obsahu kofeinu je tedy popsán střední závislostí, ale pro stanovení fenolů byl koeficient korelace popsán nízkou závislostí (viz Tab. II v kap. 3.15.1). Z hodnot SEC byly vypočteny ukazatele spolehlivosti kalibrací. V případě obsahu kofeinu byla přesažena hodnota spolehlivosti 5 %, zároveň ale nebyla přesažena hodnota 10 %, což z kalibračního modelu činí model spolehlivý, je ale nutné jej nadále rozvíjet. Oba kalibrační modely byly popsány 2 PLS faktory, přičemž nejnižší optimum je 5 faktorů, přesto křivka PRESS měla klesající charakter (Obr. 65). Model pro stanovení obsahu fenolů překročil hranici spolehlivosti 10 % ( $CCV = 33,84$  %). Model je tedy nespolehlivý a nepoužitelný. Tento fakt je pravděpodobně způsoben velmi nízkou variabilitou hodnot obsahu fenolů ve vzorcích kávy (Obr. 66) a také skutečností, že ve skupině fenolů je velké množství látek (guajakol, kyselina kávová atd.), jejichž množství vlivem skladování kolísá, přičemž není v moci techniky FT-NIR reagovat na jednotlivé fenolické složky, ani na jejich množství.





RMSECV – Root-Mean-Square Error of Cross-Validation (Střední kvadratická chyba křížové validace)

Obr. 65: Křivka PRESS pro hodnocení obsahu kofeinu v kávě



Obr. 66: Kalibrační model pro stanovení obsahu fenolů v kávě

Pro hodnocení kávy byla NIR spektroskopie použita ve studii HUCKA *et al.* (2005), v níž bylo zjišťováno množství tří alkaloidů – kofeinu, teobrominu a teofylinu. Metodu NIR srovnávali autoři s výsledky analýz stejných vzorků na kapalinové chromatografii připojené na UV a hmotnostní detektor. Analýzou 83 vzorků kávových extraktů autoři dosáhli

korelačních koeficientů pro kofein a teobromin  $R = 0,86$  a  $0,85$  při hodnotách  $SEC = 0,34 \%$  a  $0,4 \%$ . Autoři vyhodnotili NIR techniku jako použitelnou pro hodnocení kávy na obsah kofeinu a theobrominu, k hodnocení obsahu teofylinu, vzhledem k nízké odezvě, techniku NIR nedoporučují. Dalšími autory zabývajícími se obsahem kofeinu v kávě byli PIZZARO *et al.* (2007) či ZHANG *et al.* (2013). Jako referenční metodu pro tvorbu kalibrací použili techniku HPLC-UV a kalibrace byly tvořeny algoritmem PLS. Pro hodnocení obsahu kofeinu bylo dosaženo hodnoty korelačního koeficientu  $R = 0,918$  a SEC hodnota byla  $0,037 \%$ . ZHANG *et al.* (2013) v práci označili metodu NIR jako spolehlivou k předpovědi hodnot obsahu kofeinu u neznámých vzorků pražené kávy. Přehled studií, ve kterých se autoři zabývali hodnocením různých obsahových složek ve vzorcích kávy, vytvořili BARBIN *et al.* (2014).

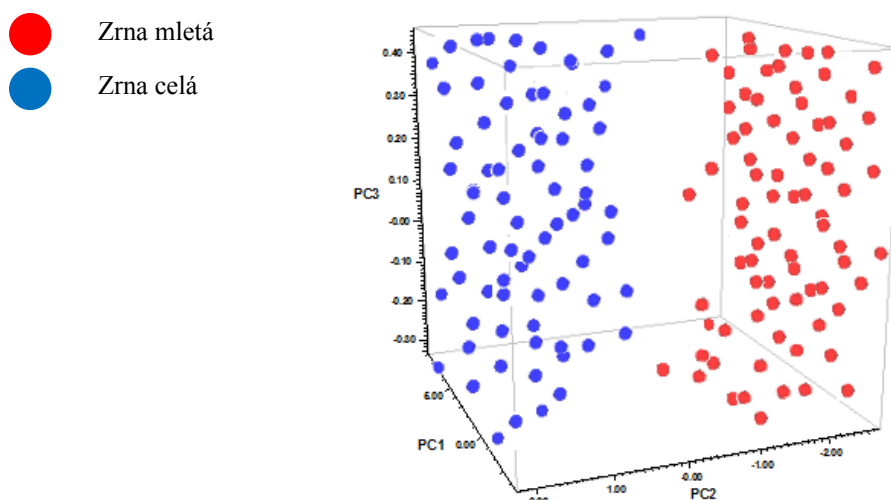
Statistickým t-testem byla testována nulová hypotéza opět na hranici významnosti  $\alpha = 0,05$ , přičemž bylo zjištěno, že hodnoty pro stanovení kofeinu nejsou statisticky rozdílné, ovšem průkazný rozdíl byl shledán při hodnocení modelu stanovení fenolů (Tab. XXVI).

Tab. XXVI: Statistické hodnoty získané t-testem při hodnocení kalibračních modelů vytvořených pro vzorky kávy

Obsahové složky (%)	n	$X_{REF}$ (%)	$X_{NIR}$ (%)	SD	$t_{stat}$	$t_{krit} (1)$	$t_{krit} (2)$
<i>Kofein</i>	65	11,44	11,30	0,138	0,917	1,682	2,018
<i>Fenoly</i>	65	1,12	0,88	0,213	2,16	1,657	2,021

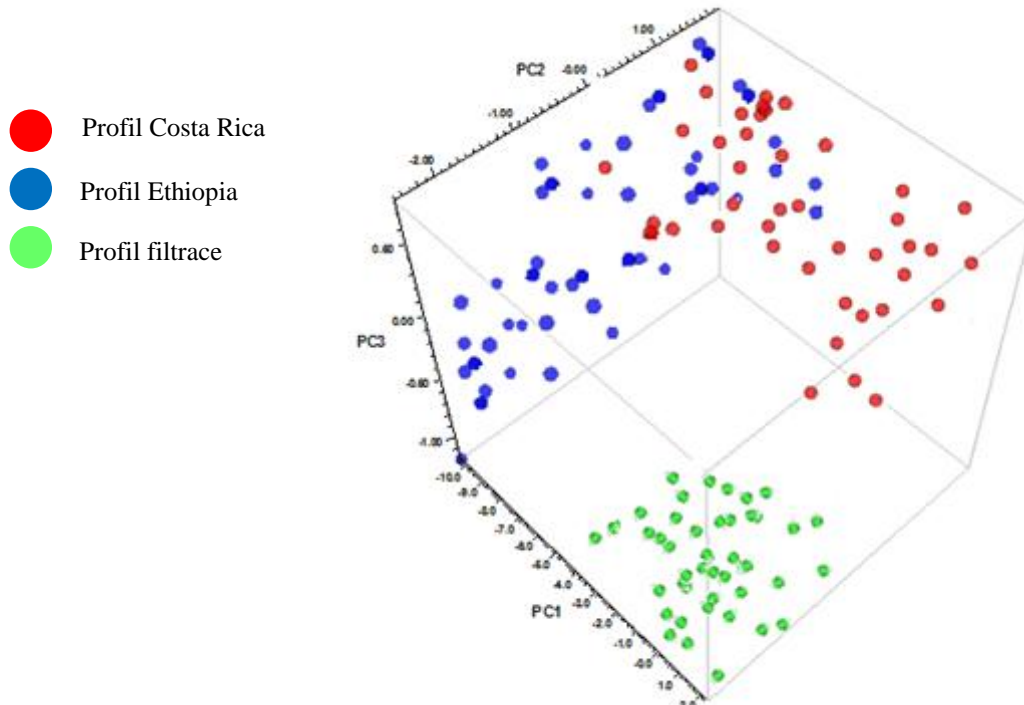
**n** – počet vzorků;  **$X_{REF}$**  – průměr referenčních hodnot;  **$X_{NIR}$**  – průměr predikovaných hodnot; **SD** – směrodatná odchylka difference;  **$t_{stat}$**  – hodnota t-testu;  **$t_{krit} (1)$**  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ;  **$t_{krit} (2)$**  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ .

Kvalitativní analýzou byly testovány vzorky kávy na základě celistvosti zrn, tj. zda byla zrna kávy celá či pomletá. NIR metoda úspěšně identifikovala vzorky mleté a nemleté kávy, přestože se jedná o zrna stejných káv (Obr. 67). Tato skutečnost může být způsobena změnami chemického složení a struktury kávy po mletí.



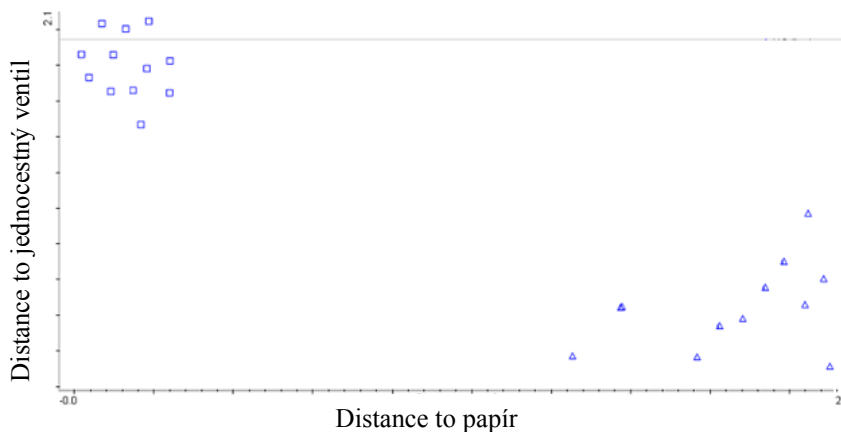
Obr. 67: 3D diskriminace vzorků kávy na základě celistvosti zrn

Přístrojem byl signifikantně rozeznán třetí pražicí profil filtrace od profilů Costa Rica a Ethiopia, hodnocením základních profilů navzájem (Costa Rica a Ethiopia) nedošlo k tak přesvědčivé diferenciaci naměřených spekter, přesto je rozdíl, dle ESTEAN-DIEZ *et al.* (2004), dostačující pro následnou kontrolu jakosti během výroby (Obr. 68).

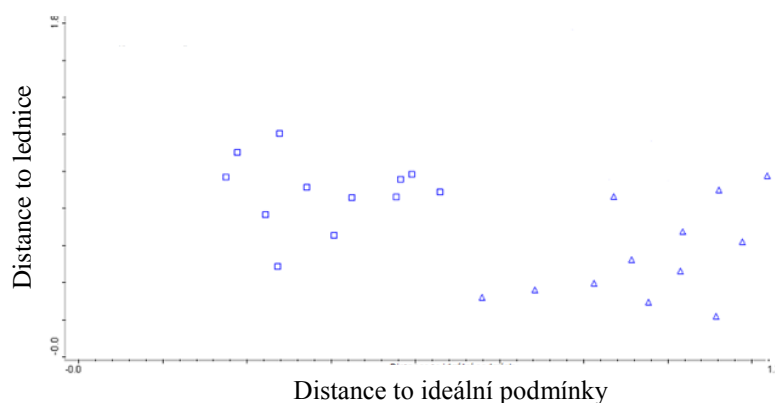


Obr. 68: 3D diskriminační analýza pražicích profilů kávy

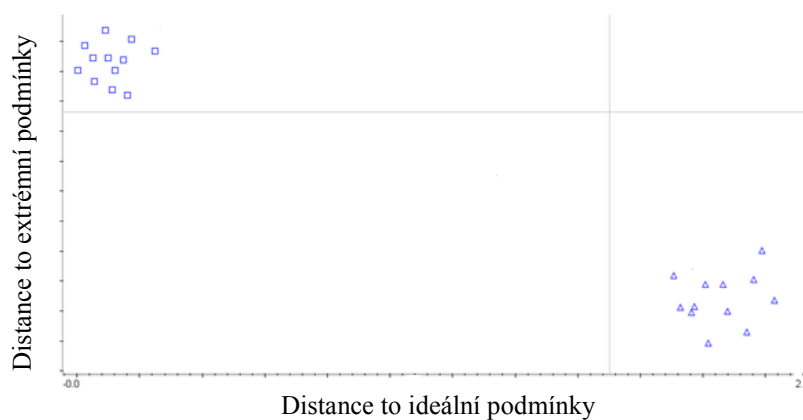
Dalšími testy, jež byly diskriminační analýzou provedeny, byly diference naměřených spekter na základě použitých obalů či podmínek skladování, kdy byl přístroj ve všech případech schopen rozlišit vzorky dle zvolených parametrů. Jako příklad těchto diferenciací lze uvést Obr. 69 – 71 znázorňující grafické vyjádření některých kvalitativních analýz.



Obr. 69: Diskriminační analýza vzorků kávy zabalených v papíru (  $\square$  ) a v obalu s jednocestným ventilem (  $\Delta$  )



Obr. 70: Diskriminační analýza vzorků kávy skladovaných v ideálních podmínkách (  $\square$  ) a v lednici (  $\Delta$  )



Obr. 71: Diskriminační analýza vzorků skladovaných v ideálních podmínkách (  $\square$  ) a v extrémních podmínkách (  $\Delta$  )

## 5.7 Vliv použité referenční metody na přesnost měření tuku v mléce

V této části je řešena nutnost dodržení stejné referenční metody při tvorbě a rozšiřování kalibračního modelu pro hodnocení obsahu tuku v mléce technikou FT-NIR.

Stanovení obsahu tuku dle Röse-Gottlieba zajistila nezávislá akreditovaná laboratoř pro vyšetřování potravin se sídlem v Brně pod vedením MVDr. Pavla Mikuláše. VORLOVÁ *et al.* (2012) uvádí pro spolehlivost zkoušky přesnost 0,03 % (pro odtučněné mléko 0,01 %). Dále uvádí shodnost 0,05 % (u odtučněného mléka 0,015 %). Obsah tuku metodou dle Gerbera byl zjišťován v laboratořích ÚTP AF MENDELU. I pro tuto metodu uvádí VORLOVÁ *et al.* (2012) parametry spolehlivosti zkoušky, a sice pro přesnost 0,05 % a shodnost 0,01 %. Hodnoty získané oběma analýzami jsou zapsané v Tab. XXVII.

Tab. XXVII: Referenční hodnoty stanovení obsahu tuku v individuálních vzorcích mléka

Vzorek	Obsah tuku (%)	
	Dle Gerbera	Dle Röse-Gottlieba
1	1,38	1,31
2	1,24	1,60
3	2,39	2,33
4	2,63	2,56
5	1,73	1,69
6	1,00	0,94
7	2,83	2,68
8	3,36	3,24
9	1,10	1,03
10	1,10	1,05
11	1,67	1,62
12	4,27	4,59
13	2,3	2,19
14	1,18	1,69
15	1,53	1,47
16	5,90	5,63
17	3,79	3,65
18	2,06	1,95
19	1,29	1,24
20	4,99	5,49
21	3,21	3,14
22	1,29	1,24
23	3,12	3,03

<b>24</b>	1,58	1,44
<b>25</b>	1,48	1,42
<b>26</b>	2,38	2,12
<b>27</b>	2,49	2,34
<b>28</b>	3,11	3,00
<b>29</b>	4,75	4,74
<b>30</b>	1,87	1,80
<b><math>\bar{O} \pm S_x</math> (%)</b>	2,434 $\pm$ 1,265	2,407 $\pm$ 1,282
<b>Min / Max (%)</b>	1,00 / 4,99	0,94 / 5,49
<b><math>a \pm bx_i</math></b>	-0,0092 $\pm$ 1,0065x	0,0487 $\pm$ 1,0065x

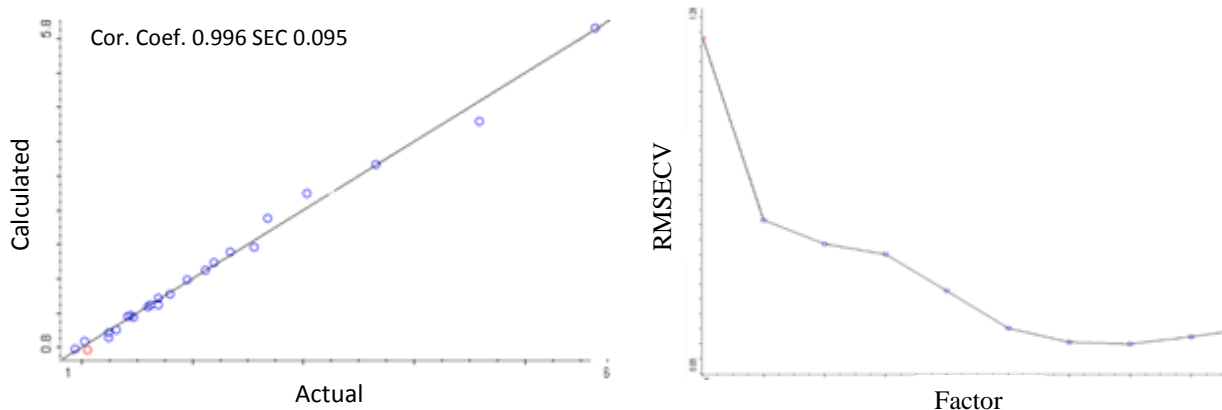
**S<sub>x</sub>** – směrodatná odchylka; **Min** – minimální naměřená hodnota; **Max** – maximální naměřená hodnota; **a ± bx<sub>i</sub>** – parametry regresní přímky predikce

Po proměření všech vzorků mléka byly vytvořeny kalibrace na obsah tuku dle Röse-Gottlieba a obsah tuku dle Gerbera. Hodnoty ukazatelů spolehlivosti kalibrace jsou uvedeny v Tab. XXVIII. Kalibrace pro obě techniky stanovení byly následně podrobeny také diagnostice PRESS, přičemž bylo zjištěno, že obě kalibrace vykazují klesající charakter křivky (Obr. 72, Obr. 73).

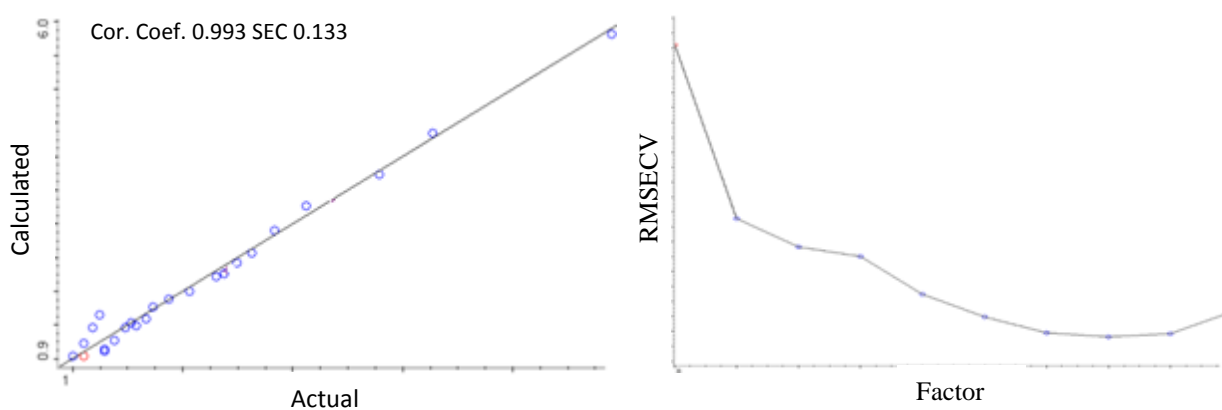
Tab. XXVIII: Kalibrační charakteristiky modelů pro obsah tuku v mléce

<b>Parametr</b>	<b>Gerber</b>	<b>Röse-Gottlieb</b>
<b>n</b>	30	30
<b>SEC</b>	0,133	0,095
<b>R</b>	0,993	0,996
<b>SEP</b>	0,232	0,148
<b>Rv</b>	0,980	0,992
<b>f<sub>PLS</sub></b>	7	7
<b>CCV (%)</b>	5,47	3,94
<b>PCV (%)</b>	9,54	6,14

**n** = počet vzorků; **SEC** = standardní chyba kalibrace; **R** = koeficient korelace kalibrace; **SEP** = standardní chyba predikce; **Rv** = koeficient korelace validace; **CCV** = kalibrační variační koeficient; **PCV** = predikční variační koeficient



Obr. 72: Kalibrace a funkce PRESS pro stanovení obsahu tuku v mléce dle Röse-Gottlieba



Obr. 73: Kalibrace a funkce PRESS pro stanovení obsahu tuku v mléce dle Gerbera

Správná funkce kalibrací byla následně otestována sadou vzorků mléka o nedefinovaných tučnostech a tyto vzorky byly vyhodnoceny kalibracemi vytvořenými na základě obou referenčních metod (Tab. XXIX). Výsledky byly následně statisticky zpracovány testováním nulové analýzy  $H_0$  na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Hodnoty statistické analýzy udává Tab. XXX.

Tab. XXIX: Hodnoty obsahu tuku v nově vytvořených vzorcích mléka

Vzorek	Obsah tuku (%)			
	Reference (Gerber)	Kalibrace (Gerber)	Reference (Röse-Gottlieb)	Kalibrace (Röse-Gottlieb)
1	0,12	0,14	0,13	0,13
2	0,56	0,57	0,57	0,57
3	5,35	5,40	5,38	5,37
4	6,29	6,31	6,33	6,29
5	3,48	6,51	3,52	3,47
6	2,17	2,19	2,12	2,19
7	0,62	0,65	0,63	0,60
8	6,34	6,35	6,38	6,35
9	2,26	2,28	2,26	2,27
10	1,65	1,65	1,63	1,66
11	3,62	3,6	3,60	3,59
12	3,13	3,09	3,15	3,10
13	3,09	3,12	3,05	3,08
14	6,38	6,41	6,42	6,43
15	5,41	5,45	5,38	5,41
16	2,60	2,63	2,65	2,63
17	3,06	3,10	3,02	3,10
18	1,15	1,16	1,18	1,16
19	0,49	0,51	0,53	0,50
20	2,75	2,78	2,78	2,75
21	5,97	6,00	6,03	5,99
22	7,18	7,18	7,22	7,19
23	3,69	3,72	3,61	3,70
24	4,54	4,5	4,59	4,55
25	5,01	5,10	5,00	5,00
26	6,62	6,65	6,66	6,66
27	4,00	4,03	4,08	4,01
28	1,06	1,10	1,00	1,10
29	0,93	0,99	0,99	0,93
30	7,23	7,25	7,30	7,25
<b><math>\bar{O} \pm S_x</math> (%)</b>	3,558 ± 2,177	3,681 ± 2,240	3,580 ± 2,196	3,568 ± 2,181
<b>Min/Max (%)</b>	0,12 / 7,23	0,14 / 7,25	0,13 / 7,30	0,13 / 7,25

**S<sub>x</sub>** – směrodatná odchylka; **Min** – minimální naměřená hodnota; **Max** – maximální naměřená hodnota



Tab. XXX: Statistická analýza kalibračních modelů v rámci jednotlivých metod

Metoda	n	$\bar{X}_{REF}$ (%)	$\bar{X}_{NIR}$ (%)	SD	$t_{stat}$	$t_{krit} (1)$	$t_{krit} (2)$
<i>Gerber (G)</i>	30	3,558	3,681	0,397	-1,218	1,699	2,045
<i>Röse-Gottlieb (RG)</i>	30	3,580	3,568	0,400	0,482	1,699	2,045

$n$  – počet vzorků;  $\bar{X}_{REF}$  – průměr referenčních hodnot;  $\bar{X}_{NIR}$  – průměr predikovaných hodnot;  $SD$  – směrodatná odchylka difference;  $t_{stat}$  – hodnota T-testu;  $t_{krit} (1)$  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ;  $t_{krit} (2)$  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ .

Z tabulky je patrné, že obě kalibrace fungují velmi dobře, když hodnoty získané z kalibrací se od hodnot tučností definovaných směsí liší v řádu setin, přičemž mezi těmito hodnotami není statisticky průkazný rozdíl. Tab. XXXI zobrazuje statistické hodnocení obou metod navzájem proti sobě.

Tab. XXXI: Statistická analýza kalibrací pro metody dle Röse-Gottlieba a Gerbera

Metoda	n	$\bar{X}_{NIR(G)}$ (%)	$\bar{X}_{NIR(RG)}$ (%)	SD	$t_{stat}$	$t_{krit} (1)$	$t_{krit} (2)$
<i>G x RG</i>	30	3,681	3,581	0,398	1,118	1,699	2,045

$n$  – počet vzorků;  $\bar{X}_{REF}$  – průměr referenčních hodnot;  $\bar{X}_{NIR}$  – průměr predikovaných hodnot;  $SD$  – směrodatná odchylka difference;  $t_{stat}$  – hodnota T-testu;  $t_{krit} (1)$  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ;  $t_{krit} (2)$  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ .

Z tabulky je patrné, že mezi hodnotami získanými na spektroskopu dosazením spekter do obou kalibrací není statisticky průkazný rozdíl, což znamená, že není nutné při rutinním stanovení obsahu tuku v syrovém kravském mléce dbát na dodržování referenční metody stanovení obsahu tuku.

Srovnání metod určených ke stanovení tuku v mléce provedli také PINTO *et al.* (2000). Pro testování platnosti metody stanovení tuku dle Gerbera ve srovnání s referenční metodou dle Röse-Gottlieba hodnotili 100 vzorků mléka s rozsahem tučnosti 1,80 – 5,50 % podle oficiálních norem pro stanovení tuku dle každé metody (FIL-IDF 152: 1997 a FIL-IDF 1D: 1996). Po srovnání výsledků metod získali koeficient korelace  $R = 0,997$ . Závěrem jejich

práce bylo konstatováno, že výsledky získané oběma metodami se statisticky průkazně neliší, což potvrzuje i naše závěry. K podobným výsledkům ve svém výzkumu došli i CROCKER *et al.* (2009), kteří hodnotili 208 vzorků mléka o tučnostech v rozmezí 2,5 – 6,0 % tuku. Metoda dle Gerbera poskytovala u mléka s vyšším obsahem tuku (> 3,0 %) až o 0,12 % vyšší hodnoty. Rozdílné výsledky při hodnocení obsahu tuku různými metodami zjistili DOREAU *et al.* (1985). Ke zjištění obsahu tuku v 750 vzorcích kobyliho mléka používali metody dle Gerbera, Röse-Gottlieba, turbidimetrickou metodu a metodu IČ spektroskopie. IČ spektroskopie byla nakalibrována na obsahy tuku kravského mléka, což mělo za následek nález průkazných rozdílů mezi metodami dle Gerbera, Röse-Gottlieba a IČ spektroskopie. Závěrem autoři logicky připouští, že je nutné přístroj kalibrovat na tuk kobyliho mléka a zlepšit podmínky měření.

Výsledky této části disertační práce byly přijaty do tisku časopisem *Journal of AOAC International*.

## 5.8 Vliv teploty vzorku na přesnost měření

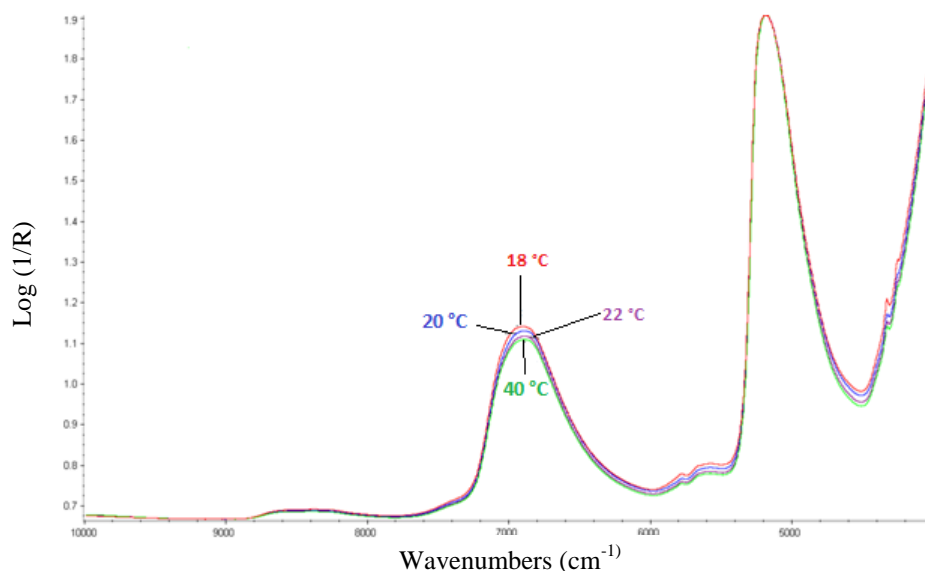
Tato část disertační práce se zabývá hodnocením schopnosti techniky FT-NIR reagovat na změny teploty aktuálně měřeného vzorku a promítnutím těchto teplotních změn v konečném hodnocení obsahových složek kalibračním modelem.

Obsah jednotlivých složek mléka je sledovatelný pomocí různých metod, přičemž jedním z hlavních vlivů na přesnost stanovení množství dané složky může být teplota měřeného vzorku. Obecně platí, že při stanovení složek mléka je optimální zahřátí mléka na 40 °C a následné zchlazení na teplotu kolem 20 °C, kdy dochází k dosažení nejvyšší homogenity vzorku. Následující experiment byl zaměřen na hodnocení závislosti přesnosti měření na teplotě vzorku a na následné posouzení rozdílů naměřených výsledků pomocí diskriminační analýzy. Současně byly hodnoty získané měřením na FT-NIR analyzátoru vloženy do kalibrace vytvořené na základě referenčních metod prováděných při 20 °C. Charakteristiky kalibrací jsou uvedeny v kap. 4.2.2.6 Tab. VI.

Pro ověření výsledků získaných pomocí diskriminační analýzy byly všechny výsledky statisticky zpracovány s využitím statistického programu Statistica (version 12, StatSoft, Inc.). Statistické rozdíly byly vyhodnoceny párovým t-testem na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (\*) i  $\alpha = 0,01$  (\*\*). Předpoklad homogenity rozptylů jednotlivých skupin byl ověřen pomocí

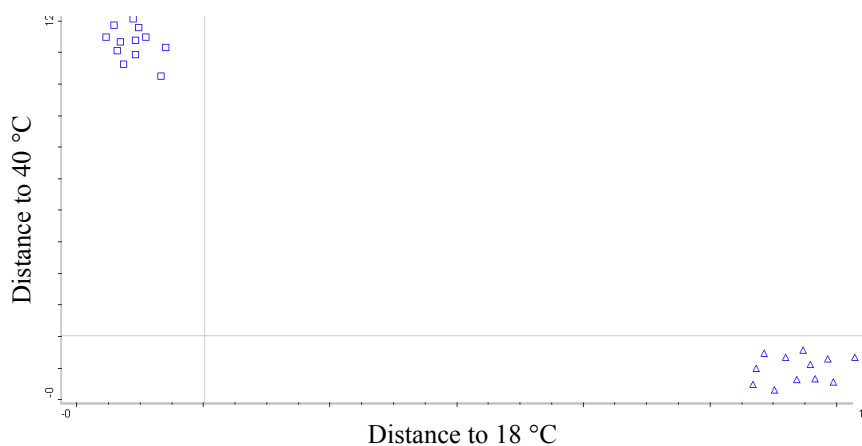
Leveneova testu. Normalita rozdělení v dílčích skupinách byla ověřována pomocí testu Kolmogorov-Smirnova i Shapiro-Wilkovým testem.

Při získávání spekter vzorků o různých teplotách bylo zjištěno, že se spektra nepřekrývají (Obr. 74), což naznačuje, že by teplota vzorku mohla ovlivňovat měření.



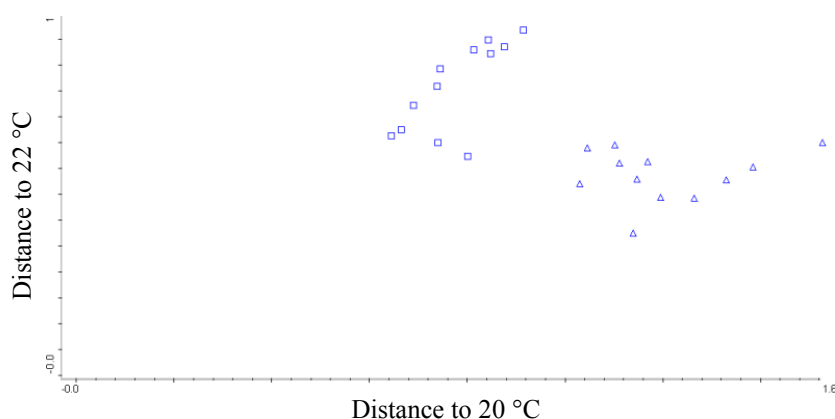
Obr. 74: Infračervená spektra kravského mléka měřeného při teplotách 18, 20, 22 a 40 °C

K ověření vlivu teplot na přesnost měření byla provedena, zvláště pro všechny teploty, diskriminační analýza. U všech analýz došlo, na základě teploty měřeného vzorku, k rozdělení skupin vzorků do klastrů. Největší vzdálenost, v rámci diskriminačních křížů byla pozorována při srovnání teplot 18 a 40 °C (Obr. 75)



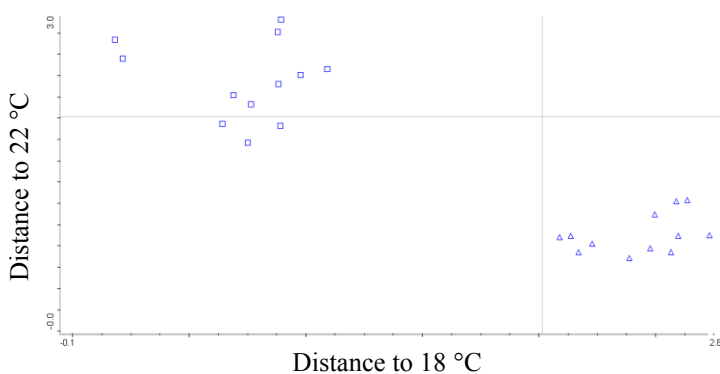
Obr. 75: Diskriminační analýza rozlišení kravského mléka měřeného při teplotách 18 (□) a 40 °C (Δ)

Nejmenší vzdálenosti byly zjištěny při srovnání teploty 20 a 22 °C (Obr. 76), přesto ale došlo k výraznému rozdělení skupin vzorků, jak je na obrázku patrné.



Obr. 76: Diskriminační analýza rozlišení kravského mléka měřeného při teplotách 20 (□) a 22 °C (△)

U srovnání ostatních teplotních režimů taktéž docházelo k separaci vzorků do jednotlivých klastrů (Obr. 77). Všechny diskriminační analýzy byly prováděny na hladině pravděpodobnosti  $\alpha = 0,05$ .



Obr. 77: Diskriminační analýza rozlišení kravského mléka měřeného při teplotách 18 (□) a 22 °C (△)

U všech vzorků byly provedeny referenční analýzy. Získaná spektra byla zapracována do kalibračních rovnic vytvořených pro 20 °C pro obsah tuku, laktózy, bílkovin a sušiny. Vzhledem k tomu, že v práci bylo analyzováno 30 individuálních vzorků kravského mléka, byla konstrukce statistických testů založena na porovnávání závislých vzorků měřených pomocí metody FT-NIR spektroskopie při teplotách 18, 20, 22, 24 a 40 °C s hodnotami referenčních analýz prováděných při 20 °C. Kombinace měření různými metodami

a rozdílnými úrovněmi teplot lze považovat za faktory, které mohou ovlivnit výsledek získaný pro sledované parametry v rámci jednoho původního vzorku. Teoreticky by měřením specifického parametru měly všechny výsledné hodnoty dosáhnout stejné hodnoty nezávisle na úrovni proměnných faktorů, protože všechny proměnné jsou použity pro stejné testované vzorky. Nicméně je možné, že u techniky FT-NIR může skutečná teplota měřeného vzorku ovlivnit získané výsledky. Cílem statistického zpracování bylo zjistit, zda kombinace použité metody a teploty ovlivňuje skutečnou výslednou hodnotu. Pro tento účel byla nulová hypotéza ( $H_0$ ) definována, jako neexistence žádného významného vlivu teploty vzorku na hodnoty obsahů (%) sušiny, bílkovin, laktózy a tuku téhož počátečního vzorku. Alternativní hypotéza ( $H_1$ ), která odmítá nulovou hypotézu u mnoha provedených zkoušek, byla definována, jako existence výrazných kontrastů mezi získanými výsledky analýz obsahových složek provedených při různých teplotách pro stejný testovaný vzorek.

Získaná data byla zpočátku studována v obecných analýzách seskupených do šesti jednotlivých hladin faktorů označených podle hodnoty teploty (např. T(18-40)NIR či T20R). Vzorek č. 13 byl v průběhu testování vyloučen z dalších analýz z důvodu přítomnosti odchylek v každé z testovaných skupin pro všechny sledované parametry. Výsledné statistické analýzy tedy byly prováděny na 29 zbývajících vzorcích. Popisné charakteristiky statistiky pro jednotlivé sledované parametry pro každou skupinu podle teploty jsou uvedeny v Tab. XXXII

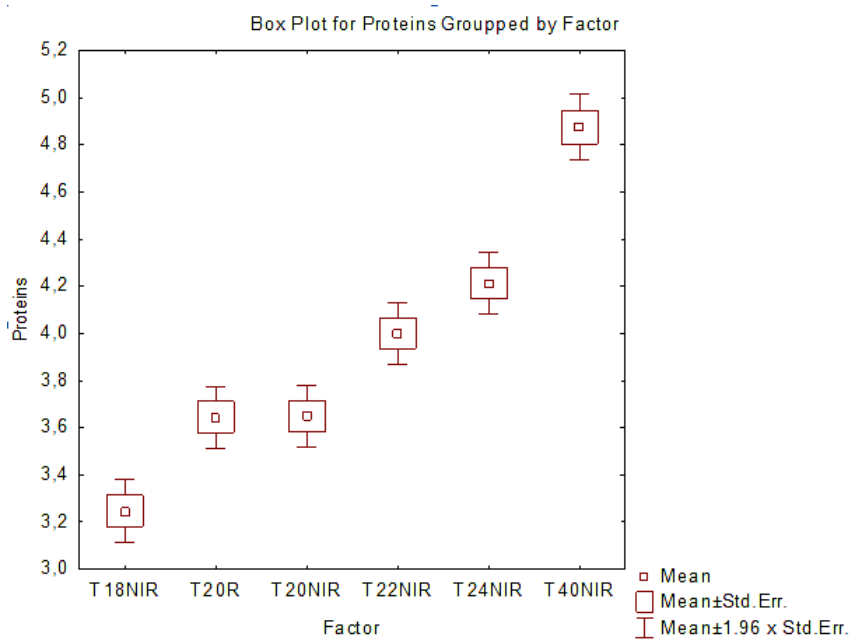
Tab. XXXII: Popisné charakteristiky statistiky pro jednotlivé sledované parametry dle teploty

Parametr (%)	Faktor (Teplota °C)	n	Průměr	Průměr	Průměr	Medián	Sm. odchylka (%)
				konf. intervalu (-95,000%)	konf. intervalu (95,000%)		
<i>Bílkoviny</i>	T18NIR	29	3,247	3,109	3,385	3,240	0,3635
	T20R	29	3,645	3,508	3,781	3,610	0,3588
	T20NIR	29	3,648	3,513	3,783	3,640	0,3558
	T22NIR	29	4,001	3,865	4,137	3,980	0,3572
	T24NIR	29	4,213	4,075	4,351	4,210	0,3624
	T40NIR	29	4,875	4,730	5,020	4,930	0,3809
<i>Laktóza</i>	T18NIR	29	4,507	4,375	4,639	4,320	0,3475
	T20R	29	4,914	4,809	5,019	4,930	0,2769
	T20NIR	29	4,923	4,819	5,028	4,930	0,2747

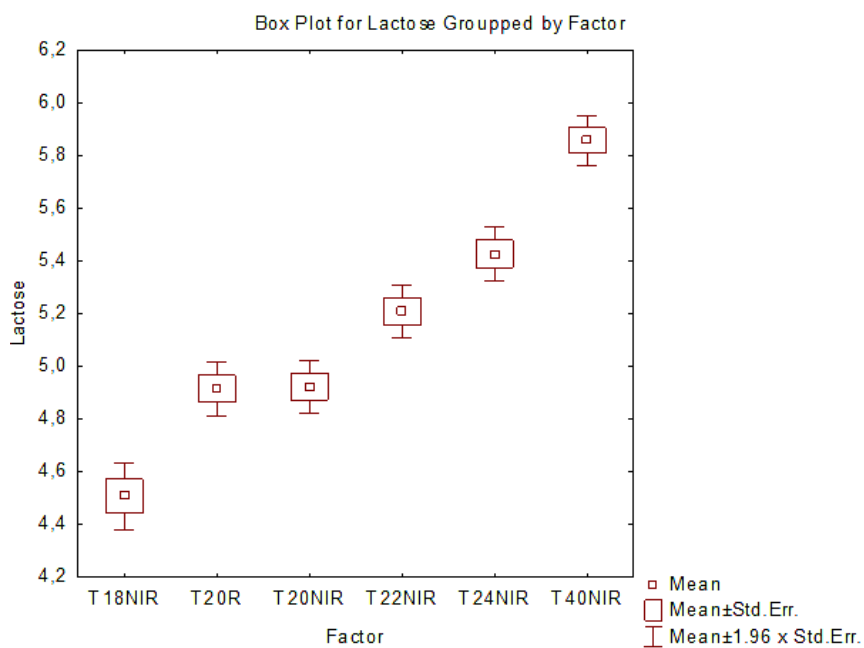
<b>Tuk</b>	T22NIR	29	5,209	5,103	5,315	5,210	0,2795
	T24NIR	29	5,428	5,320	5,536	5,420	0,2834
	T40NIR	29	5,857	5,759	5,955	5,890	0,2573
	T18NIR	29	2,079	1,581	2,576	1,840	1,3072
	T20R	29	2,415	1,910	2,919	1,950	1,3267
	T20NIR	29	2,420	1,914	2,925	1,960	1,3292
	T22NIR	29	2,663	2,157	3,170	2,240	1,3309
<b>Sušina</b>	T24NIR	29	2,981	2,484	3,478	2,690	1,3064
	T40NIR	29	3,597	3,075	4,120	3,150	1,3732
	T18NIR	29	11,458	10,986	11,929	11,113	1,2403
	T20R	29	11,935	11,453	12,417	11,544	1,2668
	T20NIR	29	11,935	11,453	12,417	11,544	1,2668
	T22NIR	29	12,204	11,728	12,679	11,855	1,2497
	T24NIR	29	12,441	11,962	12,920	12,100	1,2589
T40NIR	29	13,062	12,591	13,533	12,805	1,2379	

**n** = počet vzorků; **T18-40NIR** = predikované hodnoty měřené při dané teplotě; **T20R** = referenční hodnota získaná při 20 °C

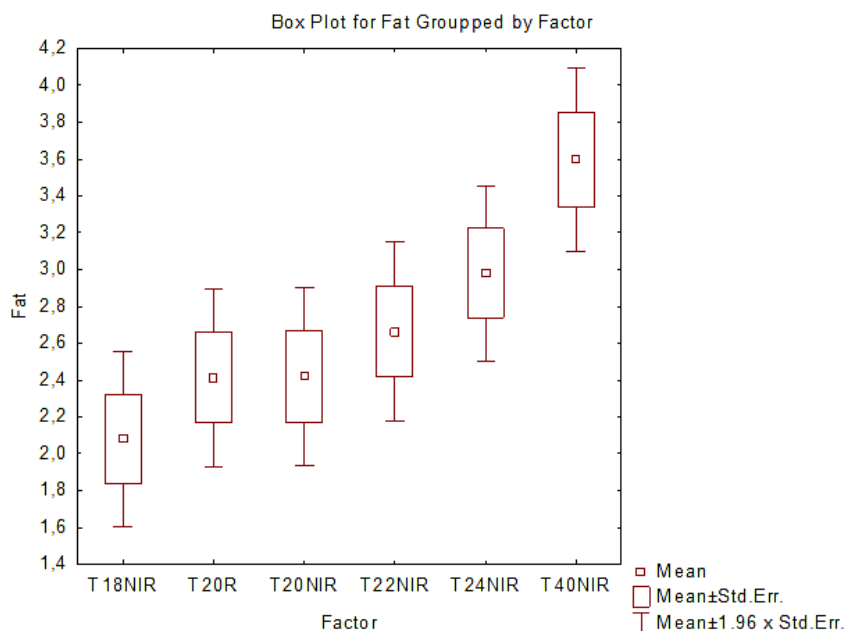
Obr. 78 – 81 představují průměrné hodnoty a intervaly spolehlivosti ( $1-\alpha = 95\%$ ) u každé skupiny pro jednotlivé parametry.



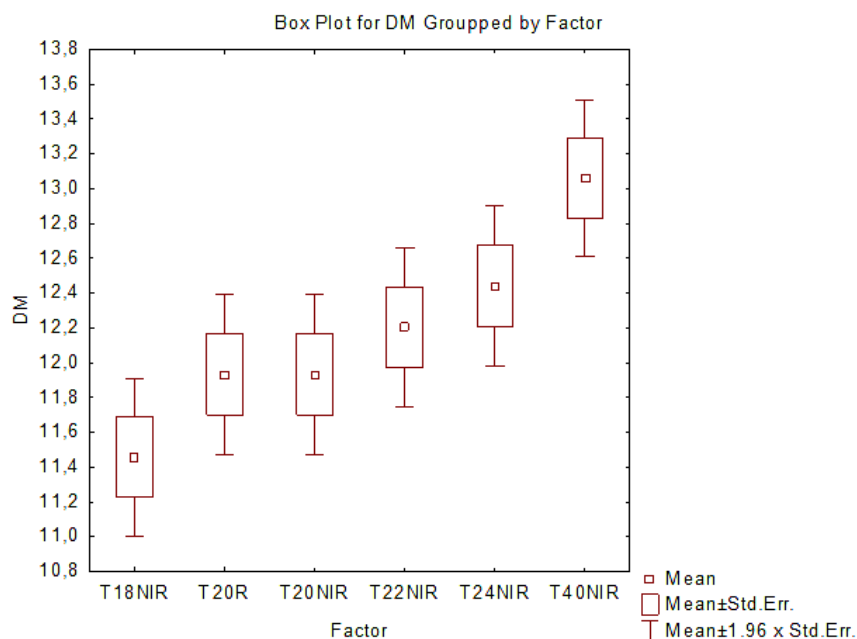
Obr. 78: Grafické znázornění seskupení výsledků pro obsah bílkovin v mléce v závislosti na teplotě



Obr. 79: Grafické znázornění seskupení výsledků pro obsah laktózy v mléce v závislosti na teplotě



Obr. 80: Grafické znázornění seskupení výsledků pro obsah tuku v mléce v závislosti na teplotě



Obr. 81: Grafické znázornění seskupení výsledků pro obsah sušiny mléka v závislosti na teplotě

Jako poslední byla provedena nejjednodušší analýza srovnání pomocí párového t-testu, kdy byly porovnávány pro každou obsahovou složku hodnoty naměřené při různých teplotách na NIR spektroskopu s hodnotou získanou referenční analýzou při 20 °C. Výsledky analýz jsou uvedeny v Tab. XXXIII – XXXVI.

Tab. XXXIII: Párový t-test pro stanovení obsahu bílkovin v mléce

Parametr	Faktory	n	Rozdíl	Rozdíl sm. odchylek	t	df	P
<b>Bílkoviny T20R</b>	T18NIR	29	0,398	0,131	16,354	28,0	0,000 **
	T20NIR	29	-0,003	0,020	-0,820	28,0	0,419
	T22NIR	29	-0,356	0,073	-26,297	28,0	0,000 **
	T24NIR	29	-0,568	0,082	-37,337	28,0	0,000 **
	T40NIR	29	-1,230	0,177	-37,342	28,0	0,000 **

**n** – počet vzorků; **t** – vypočtená hodnota kritéria; **df** – počet stupňů volnosti t-testu; **P** – pravděpodobnost zamítnutí nulové hypotézy; **T20R** – kalibrace obsahu bílkovin v mléce měřených při teplotě vzorku 20 °C



Tab. XXXIV: Párový t-test pro stanovení obsahu laktózy v mléce

Parametr	Faktory	n	Rozdíl	Rozdíl sm. Odchylek	t	df	P	
<i>Laktóza T20R</i>	T18NIR	29	0,407	0,154	14,208	28	0,000	**
	T20NIR	29	-0,009	0,012	-4,107	28	0,000	**
	T22NIR	29	-0,295	0,058	-27,211	28	0,000	**
	T24NIR	29	-0,514	0,095	-29,242	28	0,000	**
	T40NIR	29	-0,943	0,166	-30,562	28	0,000	**

**n** – počet vzorků; **t** – vypočtená hodnota criteria; **df** – počet stupňů volnosti t-testu; **P** – pravděpodobnost zamítnutí nulové hypotézy; **T20R** – kalibrace obsahu laktózy v mléce měřené při teplotě vzorku 20 °C

Tab. XXXV: Párový t-test pro stanovení obsahu tuku v mléce

Parametr	Faktory	n	Rozdíl	Rozdíl sm. Odchylek	t	df	P	
<i>Tuk T20R</i>	T18NIR	29	0,336	0,127	14,277	28	0,000	**
	T20NIR	29	-0,005	0,017	-1,565	28	0,129	
	T22NIR	29	-0,249	0,073	-18,444	28	0,000	**
	T24NIR	29	-0,566	0,243	-12,542	28	0,000	**
	T40NIR	29	-1,182	0,282	-22,574	28	0,000	**

**n** – počet vzorků; **t** – vypočtená hodnota criteria; **df** – počet stupňů volnosti t-testu; **P** – pravděpodobnost zamítnutí nulové hypotézy; **T20R** – kalibrace obsahu tuku v mléce měřeného při teplotě vzorku 20 °C.

Tab. XXXVI: Párový t-test pro stanovení obsahu sušiny mléka

Parametr	Faktory	n	Rozdíl	Rozdíl sm. odchylek	t	df	P	
<b>Sušina T20R</b>	T18NIR	29	0,477	0,147	17,488	28	0,000	**
	T20NIR	29	0,000	0,000	0,436	28	0,667	
	T22NIR	29	-0,269	0,070	-20,640	28	0,000	**
	T24NIR	29	-0,506	0,081	-33,841	28	0,000	**
	T40NIR	29	-1,127	0,186	-32,672	28	0,000	**

**n** – počet vzorků; **t** – vypočtená hodnota criteria; **df** – počet stupňů volnosti t-testu; **P** – pravděpodobnost zamítnutí nulové hypotézy; **T20R** – kalibrace obsahu sušiny mléka měřené při teplotě vzorku 20 °C

Z tabulek je zřejmé, že pro všechny sledované parametry byly zjištěny velmi významné rozdíly mezi jednotlivými teplotami měřených vzorků, jinými než 20 °C. Platí tedy, že nulovou hypotézu lze zamítnout ve všech sledovaných parametrech a přijmout alternativní hypotézu. Bylo také zjištěno, že výsledné hodnoty obsahů bílkovin, tuku a sušiny stanovené referenčními metodami a NIR spektroskopem při 20 °C nevykazovaly žádné rozdíly. Lze tedy předpokládat, že obě metody jsou rovnocenné, ovšem s podmínkou, že teplota aktuálně měřeného vzorku na přístroji FT-NIR je 20 °C nebo se jí blíží. Při statistické analýze bylo pro stanovení obsahu laktózy dosaženo neočekávaného výsledku při hledání rozdílů mezi referenční metodou a NIR analýzou při 20 °C. Dle Obr. 79 jsou průměrné hodnoty obsahu laktózy pro T20R a T20NIR stejné, ovšem po provedení analýzy párovým t-testem byl nalezen rozdíl ve variabilitě hodnot mezi oběma metodami. Nicméně, na základě obecných znalostí z testování dalších parametrů, je možné předpokládat, že obě metody ekvivalentní pro laktózu na úrovni 20 °C, měří stejně. Relativně vysoká citlivost párového t-testu na variabilitu párových rozdílů by neměla být v tomto případě nadhodnocena.

V rámci statistického hodnocení byly provedeny také regresní analýzy, které byly modifikovány tak, aby bylo možné každý vzorek považovat za nezávisle proměnnou. Regrese byla provedena pro všechny vzorky, s výjimkou vzorku č. 13, který byl z analýz vyloučen. Byly provedeny všechny regresní analýzy za účelem získání trendu, tzn., že byly vypočteny regresní závislosti, to vedlo k získání regresního koeficientu pro každou analýzu,

což představuje trend vlivu faktoru teploty na hodnoty analyzovaných parametrů. Získané regresní koeficienty vyjadřují citlivost měření NIR spektroskopem na teplotní odchylky, což vede k výstavbě kalibračních křivek v závislosti na úrovni teploty. Jedná se však jen o úvahu bez řádného statistického dopadu. Jde pouze o prezentaci průměrných regresních koeficientů a jejich variability. Vliv teploty byl statisticky významný. Úrovně korelačních koeficientů se pohybovaly u jednotlivých regresí mezi hodnotami  $R = 0,965$  a  $0,995$  u jednotlivých regresí. Průměrné hodnoty trendů regresních koeficientů jsou uvedeny v Tab. XXXVII.

Tab. XXXVII: Průměrné hodnoty regresních koeficientů pro obsahové složky

Parametr	Průměr „b“	Směrodatná odchylka „b“
<i>Bílkoviny</i>	0,155501	0,013517
<i>Laktóza</i>	0,200061	0,010174
<i>Tuk</i>	0,107855	0,050521
<i>Sušina</i>	0,468597	0,047475

**b** – koeficient regrese

Byla tedy prokázána vysoká závislost analýzy hodnot všech hledaných obsahových složek vzorku na aktuální teplotě analyzovaného vzorku. Tento závěr je velmi důležitý pro praktické laboratorní analýzy kdy, a to velmi často, je závislost přesnosti měření na teplotě vzorku vynechána a kalibrace vytvořené pro vzorky měřené při konkrétní teplotě jsou používány pro celou řadu různých úrovní teplot. Tento fakt je způsoben také chemickými změnami vzorků mléka při jejich zahřívání. WALSTRA *et al.* (2006) uvádí, že při záhřevu mléka dochází k různým změnám, mezi které patří např. ztráta části plynů, včetně  $\text{CO}_2$ , denaturace bílkovin, degradace laktózy na organické kyseliny či tvorba laktulózy. Obdobný experiment s využitím jiné vyhodnocovací techniky provedla KUKAČKOVÁ (2001) a došla ke stejným závěrům. Ve své práci se zabývala vlivem teploty na měření UHT mlék při teplotách měření  $10 - 40$  °C. Předmětem jejího zájmu bylo mléko ošetřené vysokými teplotami, přičemž při tomto záhřevu dochází již k jistým změnám ve vlastním složení mléka.

Také ŠUSTOVÁ (2007) zjistila vliv teploty vzorku na přesnost měření obsahových složek mléka, když srovnávala výsledky měření pro vzorky mléka o teplotě 20 °C, 21 °C, 23 °C a 25 °C. V současné době vzrůstá v mlékárnách, ale i v dalších potravinářských provozech trend zavádění FT-NIR spektroskopických sond do potrubních systémů za účelem hodnocení chemického složení materiálů. Vzhledem k výsledkům práce je vhodné měřit vzorky mléka vždy při stejných teplotách, při jakých byly vyhotovovány kalibrační modely.

## 5.9 Detekce falšování sýrů

V této části je řešena schopnost FT-NIR spektroskopu reagovat na změny chemického složení v kozích sýrech způsobených nahrazením kozího mléka mlékem kravským.

Při falšování kozích sýrů se lze nejčastěji setkat s náhradou části mléka kozího mlékem kravským. Kravské mléko je levnější a dostupnější. Konzumentům, kteří trpí alergií na mléčnou bílkovinu, může způsobit zdravotní problémy. Je tedy nutné vyvíjet nové metody analýz, které budou rychle reagovat na skutečnost, že falšovatelé potravin jsou čím dál vynalézavější (HUCK-PEZZEI *et al.*, 2014).

Velmi častou metodou používanou při hodnocení kvality mléka a mléčných výrobků je také metoda enzymatické imunoanalýzy (ELISA), která je založena na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednoho z těchto partnerů je kovalentně navázán enzym. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na barevně odlišný produkt. Stanovuje se pak spektrofotometricky nebo na základě fluorescence (GAN *et PATEL*, 2013).

Dalšími metodami vhodnými pro detekci kravského mléka v kozím sýru jsou např. plynová či kapalinová chromatografie (CSERHÁTI *et al.*, 2004, ENNE *et al.*, 2005). Pro hodnocení autenticity kozích sýrů je dále využitelná elektromigrační separační metoda s využitím polyakrylamidového gelu (KLOUDA, 2003; MAYER, 2005) nebo metoda PCR (MAFRA *et al.*, 2007; RENTSCH *et al.*, 2012).

Cílem experimentů bylo vyrobit kozí sýry, s přidavkem určitého množství kravského mléka a ověřit citlivost FT-NIR spektroskopu Antaris při detekci jeho přidavku. V průběhu experimentu došlo ze strany Státního veterinárního ústavu (SVÚ) v Jihlavě k žádosti o poskytnutí námi vyrobených sýrů k analýze pomocí soupravy MILK FRAUD/ BOVINE ELISA, která je určena pro testování vzorků mléka, smetany a syrovátky, za účelem zjištění, zda je tato souprava použitelná také při testování čerstvých sýrů. Toho bylo také využito pro

porovnání této metody s metodou FT-NIR pro hodnocení autenticity kozích sýrů. K tomuto účelu byla využita metoda diskriminační analýzy a metoda PLS.

### 5.9.1 Analýza metodou ELISA

Analýza kozích sýrů metodou ELISA byla provedena pracovníky SVÚ v Jihlavě. Zjištěné výsledky a informace o postupu testu byly poskytnuty pro potřeby zpracování disertační práce. Testování bylo provedeno pomocí soupravy MILK FRAUD/BOVINE ELISA (EuroProxima, Nizozemí). Jedná se o kompetitivní enzymatickou imunoanalýzu, která je určena pro kvantitativní analýzu syrového a tepelně ošetřeného kravského a buvolího mléka v mléce ostatních druhů zvířat v množství vyšším než 0,25%. Souprava obsahuje pět  $\kappa$ -kaseinových standardů k tvorbě kalibrační křivky v rozsahu 0,1 – 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , což odpovídá při ředění vzorků 1:100 rozsahu 0,25 – 6,25% přidaného kravského mléka. Detekční rozsah lze upravit následujícím ředěním, takže při použitém celkovém ředění 1:1000 je rozsah testu 1,7 – 42,5%. Množství navázaného konjugátu je vizualizováno přidáním roztoku, který obsahuje komplex substrát/chromogen. Pomocí enzymu v konjugátu je bezbarvý chromogen přeměněn na barevný produkt. Reakce je po určité době zastavena a intenzita zbarvení se proměřuje na readru při 450 nm. Intenzita zbarvení je nepřímo úměrná koncentraci bovinního  $\kappa$ -kaseinu ve vzorku. Označení vzorků pro analýzu ELISA je uvedeno v Tab. XXXVIII. Vzorky sýrů byly nejprve standardním způsobem homogenizovány a následně testovány v duplikátech.

Tab. XXXVIII: Označení vzorků pro analýzu ELISA

Označení vzorků	Množství kravského mléka (%)	Množství koziho mléka (%)
<i>1</i>	100	0
<i>2</i>	0	100
<i>3</i>	1	99
<i>4</i>	2	98
<i>5</i>	5	95
<i>6</i>	10	90
<i>7</i>	20	80
<i>8</i>	50	50

Extrakty vzorků č. 2, 3, 4 a 5 byly ředěny 1:100. Výsledky jsou shrnuty v Tab. XXXVIX.

Tab. XXXVIX: Výsledky získané testem ELISA pro všechny vzorky

Označení vzorku	% přídatku kravského mléka	Průměr (%)	Směrodatná odchylka	Hodnocení
<i>1</i>	100	> 6.25	0.759	> <b>6.25 %</b>
<i>2</i>	0	0.008	0.010	< <b>0.25 %</b>
<i>3</i>	1	0.161	0.030	< <b>0.25 %</b>
<i>4</i>	2	0.243	0.018	< <b>0.25 %</b>
<i>5</i>	5	0.374	0.037	<b>0.37 %</b>
<i>6</i>	10	1.126	0.048	<b>1.13 %</b>
<i>7</i>	20	2.086	0.189	<b>2.09 %</b>
<i>8</i>	50	5.195	0.573	<b>5.20 %</b>

Při testování prvních čtyř vzorků bylo zjištěno, že test nereaguje podle předpokladů. Výsledné hodnoty bovinního  $\kappa$ -kaseinu v  $\mu\text{g/ml}$ , odečtené z kalibrační křivky a následně vypočítané hodnoty % přídavku kravského mléka sice se zvyšujícím se objemem přidaného kravského mléka stoupaly, ale výtěžnost byla velice nízká. V podstatě lze, podle SVÚ Jihlava, za prokazatelně pozitivní považovat až vzorek č. 5 s 5% přídavkem kravského mléka. Zjištěná hodnota v testu však byla pouze 0,37 %. Hodnoty předchozího vzorku č. 4 s 2% kravského mléka nelze hodnotit ani jako pozitivní ani jako negativní výsledek testu. Průměrná hodnota však nepřekročila limit stanovitelnosti. Vzorky vykazovaly vždy pozitivní reakci, ale výsledné hodnoty zjištěné tímto testem jsou asi desetkrát nižší než teoretická hodnota v připravených vzorcích.

V posledním testu byla testována série pěti vzorků s hodnotami kravského mléka od 5 do 100 % při ředění 1:1000. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny v Tab. XL.

Tab. XL: Výsledky testu ELISA při ředění vzorků 1:1000

Označení vzorku	% přídavek kravského mléka	Průměr v %	Směrodatná odchylka	Hodnocení
<b>1</b>	100	7.990	0.024	<b>7.99 %</b>
<b>5</b>	5	2.439	0.048	<b>2.44 %</b>
<b>6</b>	10	2.873	0.36	<b>2.88 %</b>
<b>7</b>	20	3.281	0.072	<b>3.28 %</b>
<b>8</b>	50	5.091	0.573	<b>5.10 %</b>

Výsledné hodnoty většinou nekořespondovaly s předchozími výsledky. Pouze u vzorku č. 8, který byl vyroben z 50 % z kravského mléka, byly výsledky srovnatelné. Výtěžnost byla při ředění 1:1000 také nízká (od cca 50 % do 10 %). V případě vzorku č. 1, který byl připraven pouze z kravského mléka, byla zjištěná hodnota pouze 8 %. Závěrem lze konstatovat, že tato ELISA metoda, zatím jediná svého druhu dostupná na trhu, se nehodí ke kvantitativnímu vyšetřování sýrů. Existoval předpoklad, že  $\kappa$ -kasein z kravského mléka nebude při výrobě čerstvých sýrů tak poškozen, aby nemohl být specificky vyváznut protilátkou. Test by byl schopen zachytit falšování čerstvých kozích sýrů již cca od 2 % přídavku kravského mléka a mohl by tak být využit pouze ke kvalitativním analýzám. Limit

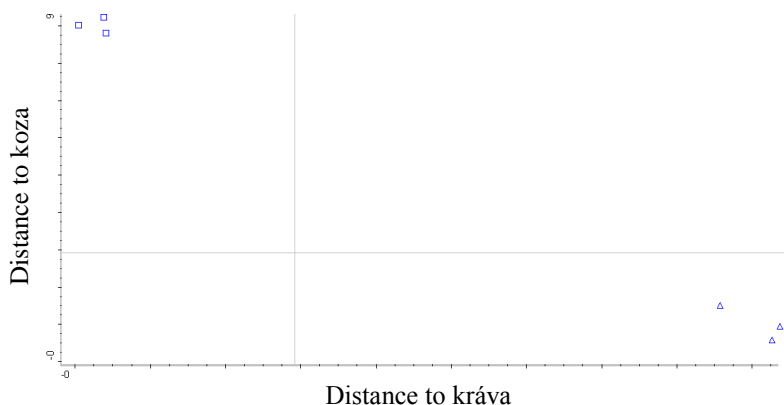
detekovatelnosti by však bylo třeba ověřit u různých typů výrobků. Jakákoliv kvantifikace se ukázala jako zcela nedostatečná. Problémem by v tomto případě mohl být také způsob přepočítávání hodnot  $\kappa$ -kaseinu zjištěných odečtením z kalibrační křivky. Vzorce doporučené výrobcem setu pro výpočty % přídatku kravského mléka do mléka koziho zřejmě nejsou vhodné pro takové matrice, jako jsou sýry.

### 5.9.2 Analýza metodou FT-NIR

Vyrobené sýry byly analyzovány na FT-NIR spektroskopu a získaná spektra byla zpracována programem TQ Analyst s použitím metody PLS a diskriminační analýzy na hladině pravděpodobnosti  $\alpha = 0,05$ . Každý vzorek se vyznačuje svým specifickým spektrem a nelze najít dva vzorky, které mají identická spektra. Z vizuálního hlediska jsou si sice spektra daných vzorků velice podobná, avšak i malá změna ve spektru je pro spektroskop dostatečná k rozlišení jednotlivých vzorků. Díky diskriminační analýze jsou výsledky snadněji interpretovatelné.

#### 5.9.2.1 Diskriminační analýza

Úkolem prvního vyhodnocení bylo zjistit, zda FT-NIR spektroskop reaguje na rozdílné složení čistého koziho a kravského sýra a na základě toho ověřit použitelnost metody pro detekci falšování kozích sýrů kravským mlékem (Obr. 82).

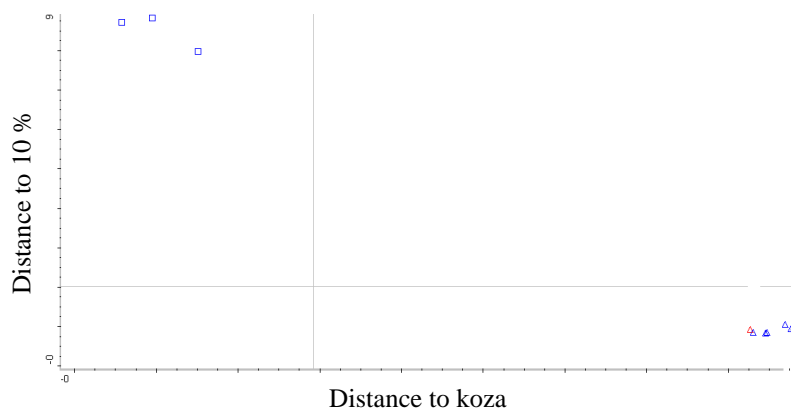


Obr. 82: Diskriminační analýza čistých kozích sýrů ( $\square$ ) a kravských sýrů ( $\Delta$ )

Na grafu je zcela viditelný diskriminační kříž, u vzorků je tedy jednoznačný rozdíl mezi kvalitativními charakteristikami, z čehož plyne, že FT-NIR spektroskopie je vhodná pro rozlišení koziho a kravského sýra. V dalším vyhodnocení tedy byly vůči sobě srovnávány

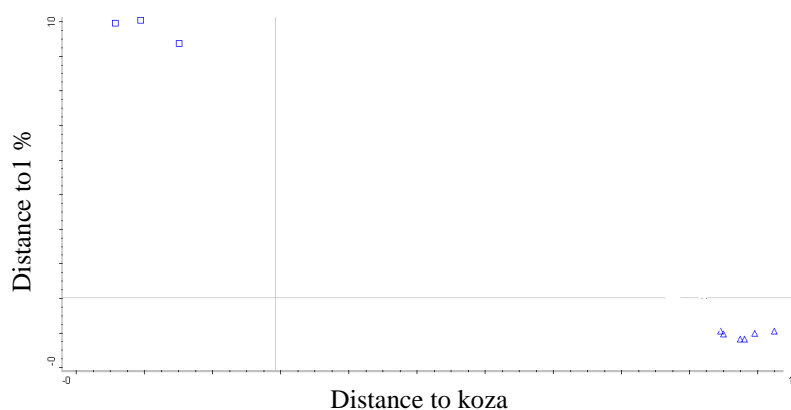


vzorky čistého koziho sýra a koziho sýra falšovaného kravským mlékem v poměrech 0 %, 1%, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 50 % a 100 %. Vzhledem k přítomnosti diskriminačních křížů u všech koncentrací, byla pro demonstraci rozdílu mezi sýry vybrána koncentrace kravského mléka 10 % (Obr. 83).



Obr. 83: Diskriminační analýza čistých kozích sýrů (□) a sýrů s přidavkem 10 % kravského mléka (Δ)

Posledním důležitým vyhodnocením v rámci detekce falšování kozích sýrů kravským mlékem bylo zjistit, zda je technika FT-NIR schopna detekovat i minimální přidavek kravského mléka. Pro tento účel byl vyroben vzorek koziho sýra s 1% přidavkem kravského mléka.



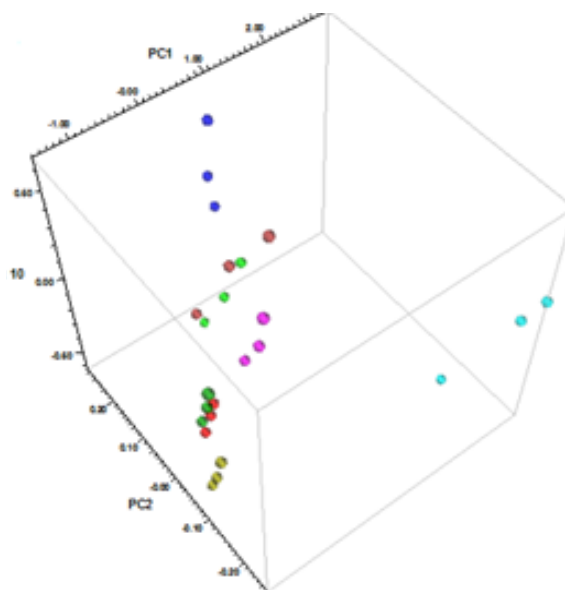
Obr. 84: Diskriminační analýza čistých kozích sýrů (□) a sýrů s přidavkem 1 % kravského mléka (Δ)

Diskriminační graf (Obr. 84) ukazuje naprosto jednoznačně rozpoznatelné vzorky. Diskriminační kříž je zde zcela patrný, v protilehlých kvadrantech se nachází odlišné vzorky seskupené do klastrů. Výsledkem experimentu je, že analýzou na FT-NIR spektroskopu byl

zcela přesně rozpoznán vzorek falšovaný 1 % kravského mléka. Celkový pohled rozdělení všech koncentračních přídavek kravského mléka do kozího sýra podává 3D vizualizace diskriminační analýzy (Obr. 85).

Fakt, že analýzou došlo k diferenciaci srovnávaných vzorků do definovaných tříd, je pravděpodobně způsoben rozdílnou skladbou mastných kyselin v mléčném tuku a také různým zastoupením kaseinových frakcí v bílkovinách. Tuto domněnku podporují i práce POTOČNIKA *et al.* (2011), ALBENZIA *et al.* (2012) či MYRZAKOZHYY *et al.* (2014).

- Přídavek kravského mléka 0 %
- Přídavek kravského mléka 1 %
- Přídavek kravského mléka 2 %
- Přídavek kravského mléka 5 %
- Přídavek kravského mléka 10 %
- Přídavek kravského mléka 20 %
- Přídavek kravského mléka 50 %
- Přídavek kravského mléka 100 %



Obr. 85: Rozdělení klastrů jednotlivých přídavek kravského mléka diskriminační analýzou s 3D vizualizací

### 5.9.2.2 Kalibrace metodou PLS

I přes nízký počet různých vzorků v experimentu ( $n = 8$ ) bylo přistoupeno k vytvoření kalibrace pro hodnocení přídavku kravského mléka do kozího sýra. Algoritmem PLS byla vytvořena kalibrace, která byla orientovaná na procentuální přídavek kravského mléka do kozího sýra. Spektra byla do kalibrací vkládána v celém měřeném spektrálním rozsahu tj.  $10\,000 - 4\,000\text{ cm}^{-1}$ , přičemž spektra nebyla nijak upravována. Před vlastní kalibrací bylo použito diagnostického nástroje Spectrum Outlier (viz kap. 3.16), kdy byla identifikována spektra, která byla na základě spektrálních odlišností neodpovídajících kalibračnímu setu, vyřazena z kalibrace (MLČEK *et al.*, 2013). Základní statistické charakteristiky referenčních hodnot jsou uvedeny v Tab. XLI. Charakteristiky získaného kalibračního modelu jsou zapsány v Tab. XLII, hodnoty validační udává Tab. XLIII.

Tab. XLI: Charakteristiky referenčních hodnot přídatku kravského mléka

Charakteristika	n	$x_p$ (%)	$S_x$ (%)	Min (%)	Max (%)
Přídavek kravského mléka (%)	8	18,72	29,08	0	100

**n** – počet vzorků;  **$x_p$**  – průměr přídatku kravského mléka;  **$S_x$**  – směrodatná odchylka, **Min** – minimální hodnota přídatku; **Max** – maximální hodnota přídatku

Tab. XLII: Kalibrační hodnoty kalibračního modelu

Charakteristika	R	SEC (%)	CCV (%)	$f_{PLS}$	$a \pm bx_i$
Přídavek kravského mléka (%)	0,999	0,0407	0,217	10	$0,9986 \pm 0,0032x$

**n** – počet vzorků; **R** – koeficient korelace kalibrace; **SEC** – standardní chyba kalibrace; **CCV** – kalibrační variační koeficient;  **$f_{PLS}$**  – počet použitých PLS faktorů v kalibraci

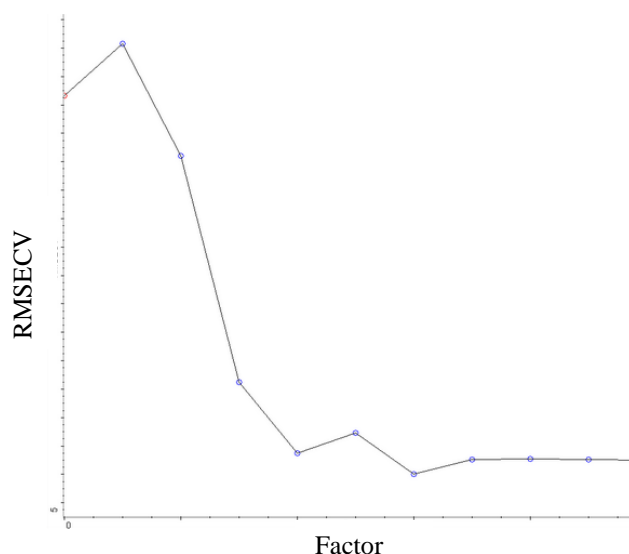
Tab. XLIII: Validační hodnoty kalibračního modelu

Charakteristika	$R_v$	SEP (%)	PCV (%)	$f_{PLS}$	$a \pm bx_i$
Přídavek kravského mléka (%)	0,783	2,45	13,08	10	$0,9659 \pm 0,0344x$

**$R_v$**  – koeficient korelace validace; **SEP** – standardní chyba predikce; **PCV** – predikční variační koeficient;  **$f_{PLS}$**  – počet použitých PLS faktorů v kalibraci

Kalibrační model dosáhl velmi příznivých výsledků. Bylo dosaženo koeficientu korelace, který je popsán téměř absolutní závislostí (CHRÁSKA, 1998). Výpočet kalibračního variačního koeficientu také poskytl příznivé výsledky. ČURDA *et al* (2002) uvádí, že dobrá kalibrace má CCV do 5 %, do 10 % CCV je model použitelný. Dalším nástrojem, který byl

použit pro hodnocení vytvořené kalibrace je diagnostika funkce PRESS. Dosažená křivka PRESS má klesající charakter (Obr. 86). Přes to, že hodnoty kalibračního modelu jsou uspokojivé, je nutné kalibrační model dále rozšiřovat a zdokonalovat.



RMSECV – Root-Mean-Square Error of Cross-Validation (Střední kvadratická chyba křížové validace)

Obr. 86: Křivka funkce PRESS pro kalibrační model hodnocení přídavku kravského mléka

Párovým T-testem na střední hodnotu byla otestována nulová hypotéza  $H_0: \mu d = 0$  při hladině pravděpodobnosti  $\alpha = 0.05$ . Výpočtem byly získány hodnoty, ze kterých plyne, že mezi hodnotami referenčními a predikovanými je statisticky neprůkazný rozdíl (Tab. XLIV).

Tab. XLIV: Párový t-test na střední hodnotu pro vytvořený kalibrační model

Charakteristika	$X_{REF}$ (%)	$X_{NIR}$ (%)	SD	$t_{stat}$	$t_{krit}(1)$	$t_{krit}(2)$
<b>Přídavek kravského mléka (%)</b>	18,72	18,68	8,767	1,511	1,943	2,450

$n$  – počet vzorků;  $X_{REF}$  – průměr referenčních hodnot;  $X_{NIR}$  – průměr predikovaných hodnot;  $SD$  – směrodatná odchylka difference;  $t_{stat}$  – hodnota t-testu;  $t_{krit}(1)$  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ;  $t_{krit}(2)$  – tabulková hodnota při hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ .

Celá řada autorů (viz kap. 3.10.5 a související podkapitoly) se shoduje, že metoda blízké infračervené spektroskopie je použitelná pro stanovení různých jakostních parametrů mléka i mléčných výrobků. Významnou kapitolou je pak detekce falšovaných složek v potravinách. Problematikou falšování mléka se zabývalo zatím jen málo vědeckých prací např. ZHANG *et al.* (2013), kteří tvořili směsi mléka s pěti druhy příměsí v různém množství, a to v koncentraci 5 %, 10 %, 15 %.

Detekcí falzifikace kozího mléka resp. sýrů kravským mlékem se zabývalo mnoho autorů (viz kap. 3.10.5 a související podkapitoly), ale ve většině případů byly k tomuto výzkumu využity separační, imunologické, či molekulárně-biologické metody. Možnostmi metody FT-NIR spektroskopie v této problematice se žádní autoři dosud nezabývali. SCANO *et al.* (2014) využili ke zjištění přídavku kravského mléka do mléka kozího plynovou chromatografii v kombinaci s hmotnostní spektroskopií (GC-MS). Tvořili směsi kozího a kravského mléka v rozmezích 0 – 100 %, přičemž získané výsledky vykazovaly chybu měření 5 %. Pro tuto metodu autoři stanovili minimální limit detekce 5 % přídavku kravského mléka s odůvodněním, že nižší přídavek by byl pro případné falšovatele ekonomicky nevýhodný. PESIC *et al.* (2011) použili metodu elektroforézy na polyakrylamidovém gelu a zjistili, že tato technika je schopna detekovat 3% přídavek kravského mléka. Mezi autory patří k nejoblíbenějším metodám využívaným k ověření falšování kozího mléka mlékem kravským metody imunologické. HURLEY *et al.* (2006) využili metodu heterogenní kompetitivní enzymovou imunoanalýzu (ELISA) a prokázali, že tato metoda je schopná detekovat 0,01% přídavek kravského mléka do měkkých kozích sýrů. Z molekulárně-biologických metod je, ke stanovení přídavku kravského mléka do mléka kozího, často využívána metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). RODRIGUES *et al.* (2012) uvedli, že mez detekce přídavku kravského mléka měřená touto metodou byla 0,5 %. Ke stejnému závěru došli i GOLINELLI *et al.* (2014), kteří ještě navíc využili metodu senzorické analýzy, kdy pravidelným konzumentům kozího mléka byly podávány vzorky s přídavkem kravského mléka. Nejmenší přídavek, který většina respondentů identifikovala, byl 10 %. LÓPEZ-CALLEJA *et al.* (2006) ve své práci snížili limit detekce přídavku kravského mléka do kozího mléka metodou PCR na 0,1 %. Poslední zajímavou metodou detekce falšování kozího mléka a sýrů kravským mlékem je využití elektronického jazyka. Těto metody využili DIAS *et al.* (2009), jež vytvořili směsi kozího a kravského mléka v koncentracích 1 – 99 %. Úspěšnost detekce touto metodou byla 87 %.

Výsledky této části práce byly publikovány v časopisu *Journal of AOAC International* (DVOŘÁK, L. – MLČEK, J. – ŠUSTOVÁ, K. Comparison of FT-NIR and ELISA for a detection of adulteration of goat cheeses with cow's milk. *Journal of AOAC International*, 99 (1): 180-181, 2016).

## 6 ZÁVĚR

V disertační práci byla na základě experimentů hodnocena možnost rozšíření využití FT-NIR techniky v potravinářském průmyslu při kontrole kvantitativních a kvalitativních parametrů různých potravin a potravinářských surovin. Modelovými komoditami bylo kravské, kozí a ovčí mléko, med, máslo a káva. Dále byla testována ovlivnitelnost přesnosti měření FT-NIR technikou změnou teploty vzorku popř. změnou referenční metody použité k následné tvorbě kalibrací. V práci byla hodnocena také citlivost metody pro detekci nepovolených surovin (kravské mléko) při výrobě kozích sýrů.

### Mléko

V experimentech byly rozšířeny již existující kalibrační modely pro hodnocení obsahu sušiny, tuku, bílkovin a laktózy v kravském mléce. Kvalita rekalibrovaných modelů je na vysoké úrovni a modely, které byly rozšířeny o 60 vzorků, lze definovat jako funkční a spolehlivé pro hodnocení těchto obsahových složek. A to i přes to, že kvalita rekalibrovaného modelu pro hodnocení obsahu sušiny zaznamenala zhoršení oproti její poslední rekalibraci. Ostatní kalibrace zůstaly na podobné úrovni.

Kalibrační modely pro hodnocení obsahu tuku, laktózy a bílkovin v kozím mléce byly v rámci experimentů rozšířeny o 55 vzorků. Nové modely lze opět označit jako velmi spolehlivé. Model pro hodnocení obsahu tuku dosáhl mírného zlepšení ve srovnání s jeho poslední rekalibrací. Modely pro obsah bílkovin a laktózy nezaznamenaly výraznou změnu.

Kalibrační modely pro kvantifikaci obsahových složek ovčího mléka (obsah sušiny, tuku, bílkovin a laktózy) byly v experimentech rozšířeny o 37 nových vzorků, přičemž všechny modely jsou opět definovány vysokou spolehlivostí při stanovení. Kvalita všech modelů je s poslední rekalibrací srovnatelná.

Při hodnocení kvality byla FT-NIR metoda použita k hodnocení vzorků mléka na základě tučnosti a druhu mléka. Ze získaných výsledků vyplývá, že FT-NIR spektroskopie je vhodná i ke kvalitativnímu hodnocení mléka, jelikož došlo ve všech případech testování k rozdělení jednotlivých zkoušených vzorků do zvolených klasifikačních tříd.

### **Máslo**

V experimentech byla rovněž testována možnost stanovení obsahu vody, tuku a čísla kyselosti ve vzorcích másla. Pro hodnocení byla zvolena metoda režimu reflektance přes PE sáček a překrytí vzorku alobalem. Výsledky prokázaly, že zvolená metoda je velmi vhodná pro hodnocení obsahů vody a tuku, protože bylo dosaženo velmi spolehlivých kalibračních modelů. Pro hodnocení čísla kyselosti přístroj nebyl z důvodu malé variability hodnot nakalibrován. U vzorků másla bylo rovněž hodnoceno číslo kyselosti jako jeho důležitý kvalitativní parametr. Stanovení bylo provedeno na počátku experimentu, tj. ihned po zakoupení a na konci experimentu, tj. po uplynutí expirační doby. Na základě diskriminační analýzy nebylo možné od sebe oddělit jednotlivé třídy másla. To je ve shodě s výsledky výše zmiňované kvantitativní analýzy. U vzorků másla tedy v průběhu skladování nedocházelo k výrazné hydrolyze tuku.

### **Med**

Na základě experimentů byla ověřena možnost stanovení obsahu vody, pylových zrn, elektrolytické vodivosti, rotace sacharidů před a po jejich inverzi dvěma způsoby měření (ve skleněné kádince v režimu interaktance pomocí optické sondy a režimem reflektance v kompresní kyvetě s využitím transflektanční kyvety s kovovým zrcátkem o  $h = 0,2$  mm). Bylo zjištěno, že metoda interaktance optickou sondou je pro hodnocení vzorků medu, z důvodu jeho vysoké viskozity, nepoužitelná. Byla vypracována metodika pro tvorbu kalibračních modelů hodnocených parametrů. Výsledky potvrzují, že režim reflektance je použitelný pro hodnocení vzorků medu a že je možné vytvořit kvalitní kalibrace pro hodnocení jeho fyzikálních parametrů. Tyto kalibrace je ovšem vhodné ještě rozšířit o další vzorky. Kalibrační modely pro hodnocení obsahu vody a pylových zrn se na přístroji vytvořit nepodařilo.

### **Káva**

V práci byla hodnocena možnost využití NIR spektroskopie při hodnocení obsahu kofeinu a fenolů v kávě. Dosažené výsledky naznačují vhodnost využití metody pro hodnocení obsahu kofeinu v zrnech kávy při využití režimu interaktance pomocí optické sondy. Bylo ale zjištěno, že technika nepoužitelná při hodnocení obsahu fenolů, podobně jako při hodnocení čísla kyselosti u másla. Z hlediska kvalitativních analýz byla hodnocena



schopnost NIR techniky reagovat na způsob přípravy vzorků před měřením a také na změny při pražení kávy. Ve všech případech byla technika schopna správně reagovat a hodnocené vzorky selektovat do definovaných jakostních tříd.

### **Vliv referenční metody na přesnost měření**

V rámci experimentů byl také hodnocen vliv vedlejší referenční metody na kvalitu kalibrací pro hodnocení obsahu tuku v individuálních vzorcích kravského mléka. Jako hlavní referenční metoda byla zvolena metoda hodnocení obsahu tuku dle Röse-Gottlieba. Vedlejší metodou byla označena metoda dle Gerbera. Pro obě metody byly získány velmi spolehlivé kalibrační modely a po jejich následném použití při hodnocení obsahu tuku v neznámých vzorcích mléka byly získány výsledky, jejichž hodnoty nevykazují žádné statisticky průkazné rozdíly. Získané výsledky ukazují na možnost vytváření spolehlivých kalibračních modelů pro stanovení obsahu tuku v kravském mléce jak metodou dle Röse-Gottlieba tak metodou dle Gerbera.

### **Vliv teploty vzorku na přesnost měření**

Experimentálně byl posouzen vliv rozdílných teplot vzorků mléka na přesnost a výsledky měření FT-NIR spektroskopií. U vzorků kravského mléka byly referenčními metodami stanovovány obsahy sušiny, tuku, laktózy a bílkovin. Následně byly vzorky temperovány na různé teploty měření (18, 20, 22, 24 a 40 °C) a snímány na přístroji FT-NIR Antaris v režimu reflektance na integrační sféře pomocí kompresní a transflektanční kyvety s kovovým zrcátkem o  $h = 0,2$  mm. Podle dosažených výsledků lze usuzovat, že teplota vzorku při měření na FT-NIR spektroskopu je velmi důležitým faktorem pro přesnost analýzy. Při měření vzorků na jiných úrovních teplot, než byl vytvořený kalibrační model, byly prokázány významné statistické rozdíly u všech hodnocených parametrů. Z toho plyne, že mléko by mělo být měřeno při takové teplotě, na jakou je nakalibrováno přístrojové vybavení. Nejvyšší rozdíly ve vztahu k referenční analýze byly získány při měření mlék o teplotě 40 °C. Obecně je možné říct, že se zvyšující se teplotou se zvyšovaly predikované hodnoty všech stanovovaných charakteristik. V případě on-line analýzy mléka ve výrobě je nutné počítat s tím, že rozdílné teploty mléka výrazně ovlivní naměřené výsledky.

### **Detekce falšování sýrů**

Na základě výsledků experimentů byla ověřena možnost využití FT-NIR techniky při hodnocení falšování kozích sýrů přidavkem kravského mléka. Využití techniky NIR k těmto účelům je zcela originální, jelikož doposud zjišťování přidavku kravského mléka do kozího mléka a kozích sýrů bylo posuzováno různými metodami od metod separačních, přes imunologické až po metody molekulárně-biologické. Tyto techniky dokážou identifikovat přídavek kravského mléka od 0,01 %, ale jsou poměrně časově i finančně náročné. Část experimentů probíhala ve spolupráci s SVÚ v Jihlavě, když vyrobené sýry byly hodnoceny komerčním setem metodou ELISA primárně určenou pro hodnocení kravského mléka a mléčných výrobků. Na základě výsledků bylo zjištěno, že FT-NIR spektroskopie v kombinaci s využitím diskriminační analýzou splňuje požadovaný účel a spektroskop dokáže rozeznat i pouhý přídavek 1 % kravského mléka do kozího sýra, zatímco zvolená metoda ELISA reagovala při takto nízkém přídavku velmi špatně. Je možné říci, že metoda ELISA určená pro hodnocení výrobků z kravského mléka není vhodná pro hodnocení výrobků z jiných druhů mléka. Na rozdíl od toho metoda FT-NIR je vhodná k prokázání falšování kozích sýrů přidavkem kravského mléka může být s úspěchem využita v praxi.

#### **Na základě výsledků získaných v této práci lze tedy FT-NIR spektroskopii doporučit:**

- k hodnocení majoritních složek (tuk, laktóza, bílkoviny a sušina) v kravském, kozím a ovčím mléce metodou režimu reflektance přes Petriho misku s využitím transflektanční kyvety s kovovým zrcátkem,
  - ke kontrole složení másla v souladu s legislativními požadavky,
  - k hodnocení jakostních parametrů medu důležitých pro jeho autentizaci,
  - k hodnocení obsahu kofeinu v kávě,
  - k rychlé detekci falšování kozích sýrů kravským mlékem.
- 
- Nebyl prokázán vliv kalibrační metody na stanovení obsahu tuku v kravském mléce (metoda dle Röse-Gottlieba a dle Gerbera).
  - Byl ověřen vliv teploty vzorku kravského mléka na přesnost měření jeho obsahových složek (sušina, tuk, bílkoviny, laktóza).

---

**7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

ADAM, M., DOBIÁŠ, P., BAJEROVÁ, P., VENTURA, K., 2009: Comparison of various methods for determination of water in white yoghurts, *Food Chemistry*, 115(3), 1069-1073, doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.027.

ALAMPRESE, C., CASALE, M., SINELLI, N. LANTERI, S. CASIRAGHI, E., 2013: Detection of minced beef adulteration with turkey meat by UV-VIS, NIR and MIR spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 225-232, doi:10.1016/j.lwt.2013.01.027.

ALBANELL, E., CÁCERES, P., CAJA, G., MOLINA, E., GARCOURI, A., 1999: Determination of Fat, Protein, and Total Solids in Ovine Milk by Near-Infrared Spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 82 (3), 753 – 758, PMID: 10367392.

ALBANELL, E., CAJA, G., SUCH, X., ROVAI, M., SALAMA, A. A. K., CASALS, R., 2003: Determination of fat, protein, casein, total solids, and somatic cell count in goat's milk by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 86 (4), 746 – 752, PMID: 14509434.

ALBENZIO, M., CAMPANOZZI, A., D'APOLITO, M., SANTIOLL, A., PETTOELLO MANTOVANI, M., SEVI, A., 2012: Differences in protein fraction from goat and cow milk and their role on cytokine production in children with cow's milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 105 (1–3), 202 – 205, doi:10.1016/j.smallrumres.2012.02.018.

ANDRÉS, S., MURRAY, I., NAVAJAS, E. A., FISCHER, A. V., LAMBE, N. R., BÜNGER, L. 2007: Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*, 76(3), 509-516, doi:10.1016/j.meatsci.2007.01.011.

ANONYM, 2006: Diskriminační analýza. Lékařská a Přírodovědecká fakulta MU v Brně, Databáze online [cit. 24. 6. 2009]. Dostupné na:  
[http://www.iba.muni.cz/~budinska/microarray/res/files/diskr\\_analyza\\_0\\_.pdf](http://www.iba.muni.cz/~budinska/microarray/res/files/diskr_analyza_0_.pdf).

ANONYM, 2012: Navrhovanie experimentov – DOE (Design of Experiment) Dostupné na [cit. 7. 10. 2012]:

[http://kme.elf.stuba.sk/moodle/pluginfile.php/1020/mod\\_resource/content/1/DEO%20Postu2pri%20navrhu%20experimentu.ppt?forcedownload=1](http://kme.elf.stuba.sk/moodle/pluginfile.php/1020/mod_resource/content/1/DEO%20Postu2pri%20navrhu%20experimentu.ppt?forcedownload=1).

ARMSTRONG, P. R., MAGHIRANG, E. B., XIE F., DOWELL, F. E. 2006: Comparison of dispersive and Fourier-transform NIR instruments for measuring grain and flour attributes. *Applied Engineering in Agriculture*, 22(3), 453-457, doi: 10.13031/2013.20448.

ATANASSOVA, S., NAYDENOVA, N., KOLEV, T., ILIEV, T., MIHAYLOVA, G., 2011: Near infrared spectroscopy for monitoring changes during yellow cheese ripening. *Agricultural Science and Technology*, 3(4), 390-394, ISSN: 313-8820.

BAER, I., GURNY, R., MARGOT, P., 2007: NIR analysis of cellulose and lactose-Application to ecstasy tablet analysis. *Forensic Science International*, 167 (2-3), 234 – 241, PMID: 16860953.

BALABIN, R. M., SAFIEVA, Z. R., LOMAKINA, I. E., 2007: Comparison of linear and nonlinear calibration models based on near infrared (NIR) spectroscopy data for gasoline properties prediction. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 88 (2), 183 – 188, doi:10.1016/j.chemolab.2007.04.006.

BARBIN, D. F., SOUZA MADUREIRA FELICIO, A. L., SUN, D-W, NIXDORF, S. L., HIROOKA, E. Y., 2014: Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview, *Food Research International*, 61, 23 – 32, doi:10.1016/j.foodres.2014.01.005.

BÁZÁR, G., ROMVÁRI, R., SZABÓ, A., SOMOGYI, T., ÉLES, V., TSENKOVA, R., 2016: NIR detection of honey adulteration reveals differences in water spectral pattern. *Food Chemistry*, 194, 873-880, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.092.

BEATEN, V., DARDENNE, P., 2002: Spectroscopy: Developments in Instrumentation and Analysis. *Grasas y Aceites*, 53 (1): 45 – 63, doi:10.3989/gya.2002.v53.i1.289.

BENITO, J. M. T., OJEDA, B. C., ROJAS, S. F., 2008: Process Analytical Chemistry: Applications of Near Infrared Spectrometry in Environmental and Food Analysis: An Overview. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43 (5), 452 – 484, doi: 10.1080/05704920802031382.

BERGLES, E., 2008: White Paper: NIR Spectral Engines, [cit. 18. 7. 2012]. Dostupné na: <http://www.bayspec.com/userfiles/file/BaySpec%20White%20Paper%20%20NIR%20Spectral%20Engines.pdf>.

BERTONE, E., VENTURELLO, A., GIRAUDO, A., PELLEGRINO, G., GEOBALDO, F., 2015: Simultaneous determination by NIR spectroscopy of the roasting degree and Arabica/Robusta ratio in roasted and ground coffee. *Food Control*, 59(1), 683 – 689, doi:10.1016/j.foodcont.2015.06.055.

BIEN R., 2006: NIR spektroskopie v systéme hodnocení jakosti potravin a krmiv, NIR instrumentace Perten Instruments. Databáze online [cit. 20. 2. 2011]. Dostupné na: [www.graphix.sk/webhosting/bezpecnostpotravin/index.php/.../22](http://www.graphix.sk/webhosting/bezpecnostpotravin/index.php/.../22).

BICHO, N. C., LEITAO, A. E., RAMALHO, J. C., DE ALVARENGA, N. B., LIDON, F. C., 2013: Impact of Roasting Time on the Sensory Profile of Arabica and Robusta Coffee. *Ecology of Food and Nutrition*, 52 (2), 163 – 177, doi: 10.1080/03670244.2012.706061.

BLAKEY, J., van ROOYEN, Z., 2011: Non-destructive measurement of moisture content using handheld NIR. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 34, 9-12.

BLANCO, M., VILLARROYA, I., 2002: NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends in Analytical Chemistry*, 21 (4): 240 – 250, doi:10.1016/S0165-9936(02)00404-1.

BOGDANESCU, V., GIURGINCA, M., IFTIMIE, N., MIHALACHE, R., MEGHEA, A., 2005: The determination of impurities from coffee by spectral methods. *Revista de Chimie*, 56 (4), 378 – 381.

BOGDANOV, S., MARTIN, P., LULLMAN, C., 1997: Harmonized methods of the international honey commission, extra issue, *Adipologie*, Springer Verlag, Germany, 1 – 59, dostupné na [cit. 2.7. 2015]: [www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf](http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf).

BOYSWORTH, M. K., BOOKSH, K. S., 2007: *Aspects of Multivariate Calibration Applied to Near-Infrared Spectroscopy*, p. 207 – 229. In: BURNS, D. A., CIURCZAK, E. W., *Handbook of Near infrared analysis*. 3th ed., CRC Press, New York, 681 p, ISBN 0-8493-7393-X.

BÜNING-PFAUE H., 2003: Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 82(1), 107-115, doi:10.1016/S0308-8146(02)00583-6.

BURNS, D. A., CIURCZAK, E. W., 2007: *Handbook of Near infrared analysis*. 3th ed., CRC Press, New York, 681 p., ISBN 0-8493-7393-X.

BYRNE, C.E., DOWNEY, G., TROY, D.J., BUCKLEY, D.J. 1998: Non-destructive prediction of selected quality attributes of beef by near-infrared reflectance spectroscopy between 750 and 1098 nm. *Meat Science*, 49(4), s. 399-409, doi:10.1016/S0309-1740(98)00005-9.

CARL, R. T., 1991: Quantification of the fat content of milk using a partial-least-squares method of data analysis in the near infrared. *Journal of Analytical Chemistry*, 339, 70-71.

CASTRITIUS, S., KRON, A., SCHÄFER, T. RÄDLE, M., HARMS, D., 2010: Determination of Alcohol and Extract Concentration in Beer Samples Using a Combined Method of Near-Infrared (NIR) Spectroscopy and Refractometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12634-12641, doi: 10.1021/jf1030604.

CAYUELA, J. A., GARCÍA, J. M., CALIANI, N., 2009: NIR prediction of fruit moisture, free acidity and oil content in intact olives. *Grasas y Aceites*, 60(2), 194-202, doi:10.3989/gya.097308.

CENTNER V., 1999: Near infrared spectroscopy (NIR) and his technology application *CHEMagazín*, 1 (9): 22 – 23.

CENTNER V., 2002: *Vícerozměrná kalibrace*, p. 296 – 306. In: MELOUN, M., MILITKÝ, J.: Kompendum statistického zpracování dat, Metody a řešené úlohy včetně CD, PDF, Academia Praha, 766 p., ISBN: 9788020010087.

CEVOLI, C., GORI, A., NOCETTI, M., CUIBUS, L., CABONI, M. F., FABBRI, A., 2013: FT-NIR and FT-MIR spectroscopy to discriminate competitors, non compliance and compliance grated Parmigiano Reggiano cheese. *Food Research International*, 52(1), 214-220, doi:10.1016/j.foodres.2013.03.016.

COLLELL, C., GOU, P., PICOUET, P., ARNAU, J., COMAPOSADA, J., 2010: Feasibility of near-infrared spectroscopy to predict  $a_w$  and moisture and NaCl contents of fermented pork sausages. *Meat Science*, 85(2), 325-330, doi:10.1016/j.meatsci.2010.01.022.

COZZOLINO, D., CORBELA, E., 2003: Determination of honey quality components by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Apicultural Research*, 42(1-2), 16-20, doi: 10.1080/00218839.2003.11101081.

CROCKER, W. P., JENKINS, D. I., PROVAN, A. L., MACDONALD, F. J., ROWLAND, S. J., WHITE, J. C. D., 2009: A comparison of the Gerber and Röse Gottlieb methods for the determination of fat in milk. *Journal of Dairy Research*, 22 (3), 336 – 339, doi: : <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029900007871>.

CRUZ, J., BAUTISTA, M., AMIGO, J., M., BLANCO, M., 2009: Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets. *Talanta*, 80(2): 473 – 478, doi:10.1016/j.talanta.2009.07.008.

CSERHÁTI, T., FORGÁCS E., DEYL Z., MIKSIK I., 2004: Chromatography in autenticity and traceability tests of vegetable oils and dairy products: a review. *Biomedical Chromatography*, 19 (3), 183 – 190, PMID:15803455.

ČERNÁ, E., 2015: *Hodnocení barvy medu*, Diplomová práce, MENDELU v Brně, 62 p., in MS.

ČERNÁ, E., CVAK, Z., 1986: *Analytické metody pro mléko a mlékárenské výrobky*, Díl I. – chemie, VÚPP, Praha, 439 p.

ČIŽMÁR, D., 2010: *Vývoj kalibrační rovnice na N-látky a škrob ve sladovnickém ječmeni metodou FT-NIRS*, ÚKZÚZ, Brno, Bulletin 2010, 14 (1): 1 – 8.

ČURDA, L., KUKAČKOVÁ, O., NOVOTNÁ, M., 2002: NIR spektroskopie a její využití při analýze mléka a mléčných. *Chemické Listy*, 96 (5), 305 – 310, ISSN: 1213-7103.

De MARCHI, M., FAGAN, C. C., O'DONNELL, C. P., CECCHINATO, A., Dal ZOTTO, R., CASSANDRO, M., BITTANTE, G., 2009: Prediction of coagulation properties, titratable acidity, and pH of bovine milk using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 423-432, doi:10.3168/jds.2008-1163.

Di EGIDIO, V., SINELLI, N., GIOVANELLI, G., MOLES, A., CASIRAGHI, E. 2010: NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation. *European Food Research and Technology*, 230(6), 947-955, doi: 10.1007/s00217-010-1227-5.

DIAS, L. A., PERES, A. M., VELOSO, A. C. A., REIS, F. S., VILAS-BOAS, M., MACHADO, A. A. S. C., 2009: An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136 (1), 209 – 217, doi:10.1016/j.snb.2008.09.025.

DOLEŽÁLEK, L., HLADÍK, J., PECH, Z., 1963: *Cvičení z chemie mléka a mléčných výrobků*, Učební texty vysokých škol, VŠCHT, Praha, SNTL, 1963, 117 p.

DOREAU, M., BOULOT, S., JEUNET, R., TRIN, J. M., DUBROEUCQ, H., 1985: Comparaison de différentes méthodes de dosage des matières grasses et des matières azotées du lait de jument. *Le Lait*, 65 (649 650), 149 – 161. Dostupné na [cit 22. 7. 2015] <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00929043/document>.



DOU Y., SUN, Y., REN, Y., JU, P., REN, Y., 2005: Simultaneous non-destructive determination of two components of combined paracetamol and amantadine hydrochloride in tablets and powder by NIRnext term spectroscopy and artificial neural networks. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(3): 543 – 549, doi: 10.1016/j.jpba.2004.11.017.

DOWNEY, G. 1996: Authentication of Food and Food Ingredients by Near Infrared Spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 4 (1) 47 – 61, doi: 10.1255/jnirs.75.

DOWNEY, G., SHEEHAN, E., DELAHUNTY, C., O'CALLANGHAN, D., GUINEE, T., HOWARD, V., 2005: Prediction of maturity and sensory attributes of Cheddar cheese using near-infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 15, s. 701-709, doi:10.1016/j.idairyj.2004.06.013.

DRAČKOVÁ, M., HADRA, L., JANŠTOVÁ, B., NAVRÁTILOVÁ, P., PŘIDALOVÁ, H., VORLOVÁ, L., 2008: Analysis of Goat Milk by Near-Infrared Spectroscopy. *Acta Veterinaria Brno*, 77: 415 – 422, doi: 10.2754/avb200877030415.

DRAČKOVÁ, M., NAVRÁTILOVÁ, P., HADRA, L., VORLOVÁ, L., HUDCOVÁ, L., 2009: Determination Residues of Penicillin G and Cloxacillin in Raw Cow Milk Using Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy. *Acta Veterinaria Brno*, 78(4), 685-690, <http://dx.doi.org/10.2754/avb200978040685>.

DRAGOUNOVÁ, H., HEJTMÁNKOVÁ, A., KOUŘIMSKÁ, L., 2007: Ovčí mléko a jeho význam v lidské výživě, Agrární WWW portál AGRIS, [cit. 20. 8. 2012]. Dostupné na: [http://www.agris.cz/Content/files/main\\_files/75/153130/32\\_05.pdf](http://www.agris.cz/Content/files/main_files/75/153130/32_05.pdf).

DVOŘÁK, L., MLČEK, J., ŠUSTOVÁ, K., 2016: Comparison of FT-NIR Spectroscopy and ELISA for Detection of Adulteration of Goat Cheeses with Cow's Milk. *Journal of AOAC International*, 99 (1): 180-181, <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.15-0190>.

ECKSCHLAGER, K., 1961: *Chyby chemických rozborů*, SNTL, Praha, 162 p.

ECKSCHLAGER, K., 1991: Úvodní slovo ke knize MELOUN, M., MILITKÝ, J., *Chemometrie – zpracování experimentálních dat na IBM-PC*. SNTL, Praha, 384 s.

ENGELHARD, S., LÖHMANNSRÖBEN, H. G., SCHAEEL, F., 2004: Quantifying Ethanol Content of Beer Using Interpretive Near-Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 58(10), 1205-1209, doi: 10.1366/0003702042336000.

ENNE, G., ELEZ, D., FONDRINI, F., BONIZZI, I., FELIGINI, M., ALEANDRI, R., 2005: High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk addition in water buffalo Mozzarella: Comparison with results from raw milk and cheese matrix. *Journal of Chromatography*, 1094 (1-2), 169 – 174, PMID: 16257304.

ESBENSEN, H. K., 1998: *Multivariate analysis-in practise*, 5. Edition, Camo ASA, 587 p., ISBN 82-993330-3-2.

ESCUREDO, O., GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I., RODRÍGUEZ-FLORES, M. S., SEIJO M., C., 2015: Near infrared spectroscopy applied to the rapid prediction of the floral origin and mineral content of honeys. *Food Chemistry*, 170 (1), 47 – 52, doi:10.1016/j.foodchem.2014.08.061.

ESTEBAN-DIEZ, I., GONZALEZ-SAIZ, J. M., PIZARRO, C., 2004: Prediction of roasting colour and other quality parameters of roasted coffee samples by near infrared spectroscopy. A feasibility study. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 12 (5), 287 – 297, doi: 10.1255/jnirs.437.

ESTEBAN-DÍEZ, I., GONZÁLEZ-SÍIZ, J. M., SÁENZ-GONZÁLEZ, C., PIZZARO, C., 2007: Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy. *Talanta*, 71 (1), 221 – 229, doi:10.1016/j.talanta.2006.03.052.

FERUS, M., 2006: *FTIR spektrometrie plynných polutantů*, Bakalářská práce, Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, Praha, 62 p.

GAN, D. S., PATEL, R. K, 2013: Enzyme Immunoassay and Enzyme-linked Immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133 (9), e 12, ISSN: 0022-202X.

GARCÍA-ALVAREZ, M., CERESUELA, S., HUIDOBRO, F. J., HERMIDA, M., RODRÍGUEZ-OTERO, L. J., 2002: Determination of Polarimetric Parameters of Honey by Near-Infrared Transflectance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (3), 419 – 425, doi: 10.1021/jf0105438.

GARCÍA-ALVAREZ, M., HUIDOBRO, J. F., HERMIDA, M., RODRÍGUEZ-OTERO, J. L., 2000: Major Components of Honey Analysis by Near-Infrared Transflectance Spectroscopy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48 (11), 5154 – 5158, doi: 10.1021/jf000170v.

GARDEN, S. W., PRUNEDA, T., IRBY, S., HYSERT, D. W., 2000: Development of Near-Infrared Calibrations for Hop Analysis. *Journal-American Society Of Brewing Chemists*, 58(2), 73-82, doi: 10.1094/ASBCJ-58-0073.

GASPARDO, B., Del ZOTTO, S., TORELLI, E., CIVIDINO, S. R., FIRRAO, G., DELLA RICCIA, G., STEFANON, B., 2012: A rapid method for detection of fumonisins B1 and B2 in corn meal using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy implemented with integrating sphere. *Food Chemistry*, 135(3), 1608-1612, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.078.

GELADI, P., 2003: Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics: A review. *Spectrochimica Acta*, Part B, 58 (5), 767 – 782, doi: 10.1016/S0584-8547(03)00037-5.

GIANGIACOMO, R., BRAGA, F., GALLIENA, C., 1991: In: I. Murray and I.A. Cowe (ed): *Making light work: Advances in near infrared spectroscopy*. VCH Weinheim, New York, p. 399-407.

GIOVENZANA, V., BEGHI, R., GUIDETTI, R. 2014: Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 142, 80-86, doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.06.017.

GIVENS, D. I., DE BOEVER, J., L., DEAVILLE, E., R., 1997: The principles, practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of

foods for animals and humans. *Nutrition Research Reviews*, 10 (1), 83 – 114, doi: 10.1079/NRR19970006.

GODULA, M., 2010: Food Authenticity – Profiling Foods, ThermoFisher Scientific,

Dostupné na [cit. 27. 7. 2012]:

file:///C:/Users/lukas/Downloads/2010%20Global%20Perspective%206%20part%20(2).pdf.

GOLINELLI, L. P., CARVALHO, A. C., CASAES, R. S., LOPES, C. S. C., DELIZA, R., PASCHOALIN, V. M. F., SILVA J. T., 2014: Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese, *Journal of Dairy Science*, 97 (11), 6693 – 6699, doi: 10.3168/jds.2014-7990.

GONÇALVES, F. D. M., BAGGIO, R. S., 2012: Evaluation of quality of butter from different provenance. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32 (3), 629 – 635, doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000091>.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I., HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M., REVILLA, I., VIVAR-QUINTANA, A., ORTEGA, I. L., 2011: The mineral composition (Ca, P, Mg, K, Na) in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times using near infrared spectroscopy with a fibre-optic probe. *Food Chemistry*, 127(1), 147-152, doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.114.

GRASSI, S., AMIGO, J. M., LYNDGAARD, C. B., FOSCHINO, R., CASIRAGHI, E. 2014: Beer fermentation: monitoring of process parameters by FT-NIR and multivariate data analysis. *Food Chemistry*, 155, 279-286, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.060.

GURNÝ, P., GURNÝ, M., 2009: Lineární diskriminační analýza a Lévyho procesy při určování pravděpodobnosti úpadku finančních institucí. *7. mezinárodní konference Finanční řízení podniků a finančních institucí*, 80-93.

HAALAND, M. D., THOMAS, V. E., 1988b: Partial Least – Squares Methods for spectral Analyses. 2. Application to Simulated and Glass Spectral Data. *Analytical Chemistry*, 60 (11), 1202 – 1208, doi: 10.1021/ac00162a021.

HAALAND, M., D., THOMAS, V., E., 1988a: Partial Least – Squares Methods for spectral Analyses. 1. Reaction to Other Quantitative Methods and the Extraction of Qualitative Information. *Analytical Chemistry*, 60 (11), 1193 – 1202, doi: 10.1021/ac00162a020.

HADRA, L., DRAČKOVÁ, M., JANŠTOVÁ, B., NAVRÁTILOVÁ, P., VORLOVÁ, L., 2006: Využití FT NIR v analýze pasterovaného kozího mléka, Sborník přednášek semináře *Mléko a sýry 2006*, Praha, 124 – 127.

HART-DAVIS, A., 2011: *Věda, Obrazový průvodce vědy a techniky*, Euromedia Group, k.s., 512 P., ISBN 978-80-242-3078-8.

HEISE, H. M., WINZEN, R., 2008: *Fundamental Chemometric Methods*, 47 – 72. In: SIESLER, H. W., OZAKI, Y., KAWATA, S., HEISE, H. M. (ed): *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*, John Wiley & Sons, 361 p. ISBN 978-0-471-67201-2.

HELL, J., PRÜCKLER, M., DANNER, L., HENNIGES, U., APPRICH, S., ROSENAU, T., BÖHMDORFER, S., 2016: A comparison between near-infrared (NIR) and mid-infrared (ATR-FTIR) spectroscopy for the multivariate determination of compositional properties in wheat bran samples. *Food Control*, 60, 365-369, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.08.003.

HERMIDA, M., GONZALEZ, M., J., SANCHEZ, M., RODRIGUEZ-OTERO, L., J., 2001: Moisture, solids-non-fat and fat analysis in butter by near infrared spectroscopy, *International dairy journal*, 11 (1), 93-98, doi: 10.1016/S0958-6946(01)00039-5.

HEUSSEN, C. M. P., JANSEN, H-G., SAMWEL, B. M. I., van DUYNHOVEN, P. M. J., 2007: The use of multivariate modelling of near infra-red spectra to predict the bitter fat content of spreads, *Analytica Chimica Acta*, 595 (1-2), 176 – 181, doi:10.1016/j.aca.2007.01.048.

HOLÍK, M., 2007: Mezinárodní konference CHEMOMETRICS IV, Bulein, Chem Listy, 28 (1), dostupné na [cit. 25. 6. 2014]: <http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin281/9701010.html>.

HONNER, M., 2008: Infračervená Spektrometrie, Skripta 3. kapitola, Výzkumné centrum západočeské univerzity v Plzni, Dostupné na [cit. 8. 3. 2012]: [http://ttp.zcu.cz/files/pdf/skripta\\_kap3\\_irspektrometrie.pdf](http://ttp.zcu.cz/files/pdf/skripta_kap3_irspektrometrie.pdf).

HORÁK, M., PAPOUŠEK, D., 1976. *Infračervená spektra a struktura molekul*. Academia, Praha, 836 p.

HORÁK, M., VÍTEK, A., 1980: *Zpracování a interpretace vibračních spekter*. Nakladatelství technické literatury, Praha, 430 p.

HOYER, H., 1997: Application NIR on-line analysis in the food industry, *Process Control and Quality*, 9: 143 – 152.

HRNČÍŘOVÁ, K., 2009: *Využití NIR spektroskopie při kontrole jakosti másla*, Diplomová práce, MZLU v Brně, 65 p., in MS.

<http://www.konicaminolta.com/instruments/knowledge/color/part2/02.html>.

HUANG, Y., MIN, S., DUAN, J., WU, L., LI, Q., 2014: Identification of additive components in powdered milk by NIR imaging methods. *Food Chemistry*, 145, 278-283, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.116.

HUCK, C. W., GUGGENBICHLER, W., BONN, G. K., 2005: Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 538 (1-2), 195 – 203, doi:10.1016/j.aca.2005.01.064.

HUCK-PEZZEI, V. A., SEITZ, I., KARER, R., SCHMUTZLER, M., De BENEDICTIS, L., WILD, B., HUCK, C. W., 2014: Alps food authentication, typicality and intrinsic quality by Near infrared spectroscopy, *Food Research International*, 62, 984 – 990, doi:10.1016/j.foodres.2014.05.021.

HURBURGH, CH. R., IGNE, B., 2010: *The New Guidance Method for Calibration, Validation and Use of Near Infrared Analyzers*, Iowa State University. 24 p., Dostupné na [cit. 7. 7. 2012]: [http://www.aocs.org/files/AMPresentation/37961\\_fulltext.pdf](http://www.aocs.org/files/AMPresentation/37961_fulltext.pdf).

HURLEY, I. P., COLEMAN, R. C., IRELAND, H. E., WILLIAMS, J. H. H.; 2006: Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese, *International Dairy Journal*, 16 (7), 805 – 812, doi:10.1016/j.idairyj.2005.07.009.

CHEN, L., WANG, J., YE, Z., ZHAO, J., XUE, X., van der HEYDEN, Y., 2012: Classification of Chinese honeys according to their floral origin by near infrared spectroscopy, *Food Chemistry*, 135 (2), 338 – 342, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.156.

CHEN, L.Z., Xue, X., YE, Z., ZHOU, J., CHEN, F., ZHAO, J., 2011: Determination of Chinese honey adulterated with high fructose corn syrup by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 128(4): 1110-1114.

CHEN, Y. J., IYO, CH., KAWANO, S., 1999: Development of calibration with sample cell compensation for determining the fat content of unhomogenised raw milk by a simple near infrared transmittance method. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 7 (4), 265 – 273, doi: <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.257>.

CHRÁSKA, M., 1998: *Základy výzkumu v pedagogice*. 2. Vydání, Olomouc, Vydavatelství univerzity Palackého, 257 p. ISBN: 80-7067-798-8.

JANKOVSKÁ, R., 2004: *Využití blízké infračervené spektroskopie (NIR) při hodnocení vybraných mléčných produktů*. Disertační práce, MZLU v Brně, 176 p., in MS.

JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., 2003: Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. *Czech Journal of Food Science*, 21 (4), 123 – 128.

JIRSA, O., HRUŠKOVÁ, M., ŠVEC, I., 2008: Hodnocení vlastností pšeničného těsta analýzou NIR spekter mouky. *Chemické Listy*, 102 (9), 829 – 836, ISSN 1213-7103.

KÁBA, B., SVATOŠOVÁ, L., 1998: Některé poznatky ze statistického rozboru výsledků přijímacího řízení na PEF v letech 94-97. *Sborník konference Agrární perspektivy VI*, PEF ČZU, Praha, s. 439-441.

KAMRUZZAMAN, M., EL MASRY, G., SUN, D. W., ALLEN, P. 2013: Non-destructive assessment of instrumental and sensory tenderness of lamb meat using NIR hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 141(1), 389-396, doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.094.

KANIA, P., 2007: INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE, VŠCHT Praha, Dostupné na [cit. 1. 8. 2012]: <http://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf>.

KAROUI, R., De BAERDEMAEKER, J., 2007: A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, 102 (3), 621 – 640, doi:10.1016/j.foodchem.2006.05.042.

KAROUI, R., DUFOUR, E., PILLONEL, L., SCHALLER, E., PICQUE, D., CATTENOZ, T., BOSSET, J., O., 2005: The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses. *International Dairy Journal*, 15 (3), 287 – 298, doi:10.1016/j.idairyj.2004.07.005.

KAROUI, R., MAZEROLLES, G., DUFOUR, E., 2003: Spectroscopic techniques coupled with chemometric tools for structure and texture determination in dairy products. *International Dairy Journal*, 13 (8), 607 – 620, doi:10.1016/S0958-6946(03)00076-1.

KAYS, S. E., BARTON, F. E., 2002: Near-Infrared Analysis of Soluble and Insoluble Dietary Fiber Fractions of Cereal Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3024-3029, doi: 10.1021/jf0116552.

KLEIN, R. D., 2014: *Organic Chemistry*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, 1392 p., ISBN 1118795709.

KLÍČ, A., VOLKA, K., DUBCOVÁ, M., 2002: *Fourierova transformace*, 3. Vydání, VŠCHT, Praha, 196 p., ISBN: 978-80-7080-478-0.

KLOUDA, P., 2003: *Moderní analytické metody*, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 132 p., ISBN 80-86369-07-2.

KÖSSLER, I., 1960: *Infračervená spektroskopie v chemické analýze*. SNTL, Praha, 196 p.



KOZELKOVÁ, M., 2012: *Využití FT NIR spektroskopie v mlékárenském průmyslu*, Disertační práce, MENDELU v Brně, 209 p., in MS.

KRÁČMAR, S., JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., KUČTÍK, J., ZEMAN, L., 2004: Analysis of amino acid composition of sheep colostrum by Near-infrared spectroscopy. *Czech Journal of Animal Science*, 49 (5), 177 – 182.

KRATOCHVÍL, L., VEDLICH M., 1974: *Výroba másla*, Praha, 268 s., 1. vyd., SNTL, 04-208-74.

KŘIVÁKOVÁ, L. 2011: *Využití FT NIR spektrometrie k detekci přídavných látek v jogurtech*. Diplomová práce, MENDELU v Brně, 93 p.

KUBANOVÁ, J., LINDA, B., 2007: *Kritické hodnoty a kvantily vybraných rozdělení pravděpodobností*. 1. dotisk vyd. Pardubice: Tiskařské středisko University Pardubice, 53 p., ISBN 80-7194-852-755-7.

KUKAČKOVÁ, O., 2001: *Aplikační možnosti NIR spektroskopie při kontrole mléka a mlékárenských výrobků*. Disertační práce, VŠCHT v Praze, 198 p., in MS.

KUKAČKOVÁ, O., ČURDA, L., JINDŘICH, J., 2000: Multivariate calibration of raw cow milk using NIR spectroscopy. *Czech Journal of Food Science*, 18 (1), 1 – 4, r. n. 20000403658.

LAPORTE, M. F., PAQUIN, P., 1999: Near-Infrared Analysis of Fat, Protein, and Casein in Cow's Milk. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2600-2605, (1999). doi: 10.1021/jf980929r.

- LAROUSSE-MEZGHANI, S., VANLOOT, P., MOLINET, J., DUPUY, N., HAMMAMI, M., GRATI-KAMOUN, N., ARTAUD, J., 2015: Authentication of Tunisian virgin olive oils by chemometric analysis of fatty acid compositions and NIR spectra. Comparison with Maghrebian and French virgin olive oils. *Food Chemistry*, 173, 122-132, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.002.
- LATORRE, H. C., CRECENTE, R. M. P., MARTÍN, S. G., GARCÍA, J. B., 2013: A fast chemometric procedure based on NIR data for authentication of honey with protected geographical indication, *Food Chemistry*, 141 (4), 3559 – 3565, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.022.
- LIANG, X. Y., LI, X. Y., WU, W. J., 2012: Classification of Floral Origins of Honey by NIR and Chemometrics. *Advanced Materials Research*, 605-607, 905 – 909, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.605-607.905.
- LICHTENBERG-KRAAG B., HEDTKE CH., BIENEFELD K., 2002: Infrared spectroscopy in routine quality analysis of honey. *Adipologie*, 33 (3), 327 – 337, doi: 10.1051/apido:2002010.
- LIU, Y.L., LYON, B.G., WINDHAM, W.R., REALINI, C.E., PRINGLE, T.D.D., DUCKETT, S.D. 2003: Prediction of color, texture, and sensory characteristics of beef steaks by visible and near infrared reflectance spectroscopy. A feasibility study. *Meat Science*, 65, s. 45-54, doi:10.1016/S0309-1740(02)00328-5.
- LOHUMI, S., LEE, S., LEE, W. H., KIM, M. S., MO, C., BAE, H., CHO, B. K., 2014: Detection of Starch Adulteration in Onion Powder by FT-NIR and FT-IR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(38), 9246-9251, doi: 10.1021/jf500574m.
- LÓPEZ-CALLEJA, I. M., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., HERNÁNDEZ, P., E., GARCÍA, T., MARTÍN, R., 2006: Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses, *International Dairy Journal*, 17 (1), 87 – 93, doi:10.1016/j.idairyj.2006.01.006.

LU, C., XIANG, B., HAO, G., XU, J., WANG, Z., CHEN, C., 2009: Rapid detection of melamine in milk powder by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 17(2), 59, doi: <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.829>.

LUCAS, A., ANDUEZA, D., ROCK, E., MARTIN, B., 2008: Prediction of Dry Matter, Fat, pH, Vitamins, Minerals, Carotenoids, Total Antioxidant Capacity, and Color in Fresh and Freeze-Dried Cheeses by Visible-Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6801-6808, doi: 10.1021/jf800615.

LUYKX, D. M., Van RUTH, S. M., 2008: An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107(2), 897-911, doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.038.

LUŽOVÁ, T., 2011: *Využití FT NIR spektroskopie ke kontrole kvality potravin*. Disertační práce, Mendelova univerzita v Brně, Brno, 149 p.

LUŽOVÁ, T., ŠUSTOVÁ, K., KUČTÍK, J., MLČEK, J., VORLOVÁ, L., SUMCZYNSKI, D., 2014: Determination of fatty acid content in sheep milk by mean soft Near infrared spectroscopy, *Acta Veterinaria Brno*, 83, 27 – 34, doi: 10.2754/avb201483S10S27.

LUŽOVÁ, T., ŠUSTOVÁ, K., KUČTÍK, J., MLČEK, J., VORLOVÁ, L., SUMCZYNSKI, D., 2014: Determination of fatty acid content in sheep milk by means of near infrared spectroscopy. *Acta Veterinaria Brno*, 83, 27 – 34, <http://dx.doi.org/10.2754/avb201483S10S27>.

MAFRA I., ROXO A., FERREIRA I. M., OLIVERIA M. B., 2007: A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cow milk in goats milk cheese. *International Dairy Journal*, 17 (9), 1132 – 1138, doi:10.1016/j.idairyj.2007.01.009.

MAJA, P., MARTIN, Š., DEJAN, Š., MARJETA, Č. P., 2010: Application of near infrared spectroscopy to predict chemical composition of meat and meat products. *Tehnologija Mesa*, 51(2), 133-142.

MANLEY, M., DOWNEY, G., BAETEN, V., 2008: *Spectroscopic Technique: Nearinfrared (NIR) Spectroscopy*, p. 65 – 99. In: SUN, D. W. (ed): *Modern Techniques for Food Authentication*, Elsevier Inc., 720 p., ISBN: 978-0-12-374085-4.

MANLEY, M., MC GILL, A. E. J., OSBORNE, B. G., 1994: The Effect of Light Scattering on NIR Reflectance and Transmittance Spectra of Wheat. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2 (1), 93 – 99, doi: 10.1255/jnirs.36.

MANLEY, M., Van ZYL, L., OSBORNE, B. G., 2002: Using Fourier transform near infrared spectroscopy in determining kernel hardness, protein and moisture content of whole wheat flour. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10(1), 71-76, <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.323>

MARTELO-VIDAL, M. J., VÁZQUEZ, M., 2014: Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV–VIS–NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry*, 158, 28-34, doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.080.

MATĚJKA, P., 2006: Spektroskopie v blízké infračervené oblasti. Databáze online [cit24. 5. 2009]. Dostupné na: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/NIR.pdf>.

MAURIZIO, A., LOUVEAUX J., 1965: Pollen de plantes mellifères d'Europe, *Union des groupements apicoles français*, Paris, France, 4 (29) 148 p., OCLC: 6632652.

MAYER H. K., 2005: Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*, 15 (6-9), 595 – 604, doi:10.1016/j.idairyj.2004.10.012.

MAZUREK, S., SZOSTAK, R., KITA, A., 2016: Application of infrared reflection and Raman spectroscopy for quantitative determination of fat in potato chips. *Journal of Molecular Structure*, doi:10.1016/j.molstruc.2016.01.064.

McCAIG, T. N., 2002: Extending the use of visible/near-infrared reflectance spectrophotometers to measure colour of food and agricultural products. *Food Research International*, 35 (8), 731 – 736, doi:10.1016/S0963-9969(02)00068-6.

McCARTHY, W. J., KEMENY, G. J., 2007: *Fourier Transform Spectrophotometers in the Near-Infrared*, p. 79 - 91. In: BURNS, D. A., CIURCZAK, E. W. (ed): *Handbook of Near infrared analysis*. 3th ed., CRC Press, New York, 836 p., ISBN 0-8493-7393-X.

McCLURE, F. W., 2003: Review: 204 years of near infrared technology: 1800 – 2003. *Journal Near Infrared Spectroscopy*, 11 (1), 487 – 518, doi: 10.1255/jnirs.399.

McCLURE, W., F., TSUCHIKAWA, S., 2007: *Instruments*, 75-108. In: OZAKI (ed.), Y., McCLURE (ed.), W., F., CHRISTY (ed.), A., A., *Near – infrared spectroscopy in food science and technology*, Wiley, 424 p.

MELOUN, M., MILITKÝ, J., 2002: *Kompendium statistického zpracování dat*, Metody a řešené úlohy včetně CD, PDF, Academia Praha, 766 p.

MÍKA, V., 1997: *Využití infračervené spektroskopie (NIRS) pro hodnocení kvality rostlinných výrobků*. Metodika pro zemědělskou praxi, Praha, 28 p., ISBN 978-80-87011-53-9.

MÍKA, V., KOHOUBEK, A., NERUŠIL, P. 2008: *Spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR)*. Výběr praktických aplikací v zemědělství, Praha, 44 p.

MÍKA, V., KOHOUBEK, A., NERUŠIL, P., 2008: *Spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR)*. Výběr praktických aplikací v zemědělství. METODIKA PRO PRAXI, Praha, 44 p.

MILDE, D., 2008a: INFRAČERVENÁ A RAMANOVA SPEKTROMETRIE 2004 - 2008, VŠCHT Praha, Dostupné na [cit. 1. 8. 2012]: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/im-ir-raman-pdf-1287047361.pdf>.

MILDE, D., 2008b: Spektrální metody. Databáze online [cit. 9. 2. 2010]. Dostupné na: <http://aix-lin.upol.cz/~milde/IM-uvod.pdf>.

MLČEK, J., ROP, O., DOHNAL, V., ŠUSTOVÁ, K., 2011: Application of near infrared spectroscopy to estimate selected free aminoacids and soluble nitrogen during cheese ripening, *Acta Veterinaria Brno*, 80 (3), 293 – 297, doi: 10.2754/avb201180030293.

MLČEK, J., ROP, O., ŠUSTOVÁ, K., SIMEONOVÁ, J., GÁL, R., 2010: Možnosti využití spektroskopie NIR v masném průmyslu. *Chemické Listy*, 104(9), 855 – 860, ISSN 1213-7103.

MLČEK, J., ŠUSTOVÁ, K., ROP, O., JURÍKOVÁ, T., HUMPOLÍČEK, P., BALLA, S. 2013: Rapid assessment of selected free aminoacids during Edam cheese ripening by near infrared spectroscopy, *Acta Veterinaria Brno*, 82 (2), 191 – 196, doi: 10.2754/avb201382020191.

MLČEK, J., ŠUSTOVÁ, K., SIMEONOVÁ, J., 2006: Application of FT NIR spectroscopy in the determination of basic chemical composition of pork and beef. *Czech Journal of Animal Science*, 51(8), 361 – 368, ISSN 1212-1819.

MOROS, J., ARMENTA, S., GARRIGUES, S., de la GUARDIA, M., 2006: Univariate near infrared methods for determination of pesticides in agrochemicals. *Analytica Chimica Acta*, 579(1), 17-24, doi:10.1016/j.aca.2006.07.009.

MÜLLEROVÁ, M., 2015: *Sledování jakostních parametrů pražené kávy během skladování v závislosti na balení*. Diplomová práce, MENDELU, 79 p., in MS.

MUSELÍK, J., 2012: Aplikace blízké infračervené spektroskopie ve farmaceutické analýze. *Chemické Listy*, 106 (1), 10 – 15, ISSN 1213-7103.

MYRZAKOZHA, D., TURGALIEV, D., SATO, H., 2014: Determination of Fatty-Acid Composition in Oils of Animal Origin by Near-Infrared Spectroscopy. *Food and Nutrition Sciences*, 5 (14), 1408 – 1414, doi:10.4236/fns.2014.514153.

NAGARAJAN, R., SINGH, P., MEHROTRA, R., 2006: Direct Determination of Moisture in Powder Milk Using Near Infrared Spectroscopy. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 4 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/JAMMC/2006/51342>.

NAVRÁTILOVÁ, P., DRAČKOVÁ, M., JANŠTOVÁ, B., PŘIDALOVÁ, H., CIPÁKOVÁ, Š., VORLOVÁ, L., 2012: *Hygiena produkce mléka*, 1. Vydání, VFU v Brně, Brno, 129 p., ISBN: 978-80-7305-625-4.

NĚMCOVÁ, I., ČERMÁKOVÁ, L., RYCHLOVSKÝ, P., 2004: *Spektrometrické analytické metody I*. Karolinum, Praha, 166 p., ISBN 80-246-0776-X.

NICOLET CZ, 2006a: *Result Integration software – stručný návod*. Firemní literatura, 69 p.

NICOLET CZ, 2006b: *TQ Analyst – spektroskopický software*. Firemní literatura, 51 p.

NICOLET CZ, 2007a: *TQ Analyst – stručný návod*. Firemní literatura, 97 p.

NICOLET CZ, 2007b: *TQ Analyst – Vývoj kalibračního modelu pro kvantitativní stanovení pomocí algoritmu PLS*. Firemní literatura, 13 p.

NICOLET CZ, 2011: *TQ Analyst – spektroskopický software, stručný návod*. Firemní literatura, 112 p.

NICOLET CZ, 2012: Antaris II, Nicolet CZ s.r.o., Dostupné na [cit. 8. 5. 2012]: <http://www.nicoletcz.cz/nir-spektrometry/>.

NICOLET CZ, 2013: *Omnisc software – stručná návod*. Firemní literatura, 86 p.

NIEMÖLLER, A., BEHMER, D., 2008: *Use of Near Infrared Spectroscopy in the Food Industry*, p. 67 - 84. In: IRUDAYARAJ, J., REH, C. (ed): *Nondestructive Testing of Food Quality*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 384 p., ISBN 0813828856.

NORDON, A., MILLS, A., BURN, R. T., CUSICK, F. M., LITTLEJOHN, D., 2005: Comparison of non-invasive NIR and Raman spectrometries for determination of alcohol content of spirits. *Analytica Chimica Acta*, 548(1), 148-158, doi:10.1016/j.aca.2005.05.067.

NOVOTNÁ, M., 1998: *Vznik a registrace spekter v infračervené a blízké infračervené oblasti*, Letní škola NIR, MU Brno, 5 - 18.

- NÚÑEZ-SÁNCHEZ, N., MARTÍNEZ-MARÍN, A. L., POLVILLON O., FERNÁNDEZ-CABANÁS, V. M., CARRIZOSA, J., URRUTIA, B., SERRADILLA, J. M., 2016: Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats. *Food Chemistry*, 190, 244-252, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.05.083.
- OHE, K., OHE, W., 2007: Celle's Melissopalynological Collection. LAVES - *Institut für Bienenkunde Celle*, 3. edition, 236, OCLC: 456767872.
- OHE, W., PERSANO ODDO, L., PIANA, M. L., MORLOT, M., MARTIN, P., 2004: Harmonized methods of melissopalynology, *Adipologie*, Springer Verlag, Germany, 35, 18-25, dostupné na [cit. 2. 7. 2015]: <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal00891894/document>.
- ORMAN, B. A., SCHUMAN Jr., R. A., 1991: Comparison of near-infrared spectroscopy calibration methods for the prediction of protein, oil, and starch in maize grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(5), 883-886, doi: 10.1021/jf00005a015.
- OSBORNE, B. G., 1996: Near infrared spectroscopic studies of starch and water in some processed cereal flours. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 4, 195-200, <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.90>.
- OSBORNE, B. G., 2001: *Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis*, p. 1 -14. In MEYERS, R. A. (ed): *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications: Theory and Instrumentation*, 1 ed, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2188 p., ISBN 0471976709.
- OSBORNE, B. G., FEAM, T., 1986: *Near infrared spectroscopy in Food Analysis*, Longman Scientific & Technical, 200 p., ISBN 0470206756.
- OSBORNE, B., G., 2000: *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 14 344 p.
- OZAKI, Y., MORITA. S., DU, Y., 2007: *Spectral analysis*, p. 47 – 72. In: SIESLER, H. W., OZAKI, Y., KAWATA, S., HEISE, H. M., McCLURE, W. F., CHRISTY, A. (ed): *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 361 p., ISBN 3-527-30149-6.



PARK, Y. W., JUAREZ, M., RAMOS, M., HAENLEIN, G. F. W., 2007: Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68 (1-2), 88 – 113, doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.013.

PASQUINI, C., 2003: Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications REVIEW. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2), 198 – 219, ISSN 1678-4790.

PATAKA, L. C., NETO, W. B., MARCUCCI, M. C., POPPI, R. J., 2007: Determination of apparent reducing sugars, moisture and acidity in honey by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry. *Talanta*, 71(5), 1926-1931, doi:10.1016/j.talanta.2006.08.028.

PAVLÍK, J., 2005: *Aplikovaná statistika*, Vydavatelství VŠCHT, Praha, 1. vyd., 172 p., ISBN: 80-7080-569-2.

PESIC, M., BARAC, M., VRVIC, M., RISTIC, N., MACEJ, O., STANOJEVIC, S., 2011: Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and bovine milks using native-PAGE. *Food Chemistry*, 125 (4), 1443 – 1449, doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.045.

PILLONEL, L., LUGINBÜHL, W., PICQUE, D., SCHALLER, E., TABACCHI, R., BOSSET, J., 2003: Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese: mid- and near-infrared spectroscopy. *European Food Research and Technology*, 216(2), 174-178, doi: 10.1007/s00217-002-0628-5.

PINTO, C. M., CARRASCO, R. E., FRASER, L. B., BARRIGA, I. C., 2000: Validity of Gerber butyrometric method compared with Röse Gottlieb method for milk fat determination. *Agro Sur 2000*, 28 (1), 123 – 132, ISSN 0304-8802.

PIZZARO C., ESTEBAN-DÍEZ, I., GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M., SÁENZ-GONZÁLEZ, C., 2007: Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy, *Talanta*, 71 (1), 221 – 229, doi:10.1016/j.talanta.2006.03.052.

POSPÍŠIL, M., 2004: *Instrumentální metody výzkumu a analýzy 1*. Vydavatelství ČVUT, Praha, 2. vyd., 141 p., ISBN:8001029220.

POTOČNIK, K., GANTNER, V., KUTEROVAC, K., CIVIDINI, A., 2011: Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo* 61(2), 107 – 113.

PRAUS, P., DOMEK, V., KLIKA, Z., 2001: *Základy analytické chemie, učební texty pro posluchače jednosemestrálního kurzu analytické chemie*. Vysoká škola báňská – technická univerzita, Ostrava, 1. vyd., 105 p., ISBN: 80-7078-896-8.

PROCHÁZKOVÁ, Z., DRAČKOVÁ, M., REMEŠOVÁ, A., JANŠTOVÁ, B., PŘIDALOVÁ, H., VORLOVÁ, L., 2010: Využití blízké infračervené spektroskopie pro stanovení základních fyzikálně-chemických parametrů ovčího mléka, *Potravinářstvo*, 1(4), 70 – 73, ISSN: 1337-0960.

PROCHÁZKOVÁ, Z., DRAČKOVÁ, M., SALÁKOVÁ, A., GALLAS, L., POSPIECH, M., VORLOVÁ, L. BUCHTOVÁ, H., 2010: Application of FT NIR Spectroscopy in the Determination of Basic Physical and Chemical Properties of Sausages. *Acta Veterinaria Brno*, 79(9), 101-106, <http://dx.doi.org/10.2754/avb201079S9S101>.

PUCHERT, T., LOCHMANN, D., MENEZES, J., C., REICH, G., 2010: Near-infrared chemical imaging (NIR next term-CI) for counterfeit drug identification - A four-stage concept with a novel approach of data processing (Linear Image Signature). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (1), 138 – 145, doi: 10.1016/j.jpba.2009.08.022.

REICH, G., 2005: Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (8), 1109 – 1143, doi:10.1016/j.addr.2005.01.020.

RENTSCH J., WEIBEL S., RUF J., EUGSTER A., BECK K., KÖPPEL R., 2012: Interlaboratory validation of two multiplex quantitative real-time PCR methods to determine species DNA of cow, sheep and goat as a measure of milk proportions in cheese. *European Food Research Technology*, 236, 217 – 227, doi: 10.1007/s00217-012-1880-y.

RICCIARDELI d'ALBORE, G., 1997: *Textbook of melissopalynology*, Apimondia, Bucharest, Apimondia Publishing House, 308 p., ISBN: 97360502238.

RØDBOTTEN, R., NILSEN, B.N., HILDRUM, K.I. 2000: Prediction of beef quality attributes from early post mortem near infrared reflectance spectra. *Food Chemistry*, 69(4), s. 427-43, doi:10.1016/S0308-8146(00)00059-5.

RODRIGUES, N. P. A., GIVISIEZ, P. E. N., QUEIROGA, R. C. R. E., AZEVEDO, P. S., GEBREYES, W. A., OLIVIERA, C. J. B., 2012: Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by small holders in northeastern Brazil by a duplex PCR assai. *Journal of Dairy Science*, 95 (5), 2749 – 2752, doi: 10.3168/jds.2011-5235.

RUOFF K., 2006: *Authentication of the Botanical Origin of Honey*. Dissertation thesis, Zurich, 203 p., in MS.

RUOFF, K., LUGINBÜHL, W., BOGDANOV, S., BOSSET, J. O., ESTEMANN, B., ZIOLKO, T., AMAD, R., 2007: Quantitative determination of physical and chemical measurands in honey by near-infrared spektrometry. *European Food Research and Technology*, 225(3-4), 415-423, doi: 10.1007/s00217-007-0634-8.

RŮŽIČKOVÁ, J., 2007: *Aplikace NIR spektrometrie v kontrole kvality zemědělských materiálů a produktů*. Disertační práce, MZLU v Brně, 150 p., in MS.

RŮŽIČKOVÁ, J., LUŽOVÁ, T., NĚMCOVÁ, A., MÝLOVÁ, P., ŠUSTOVÁ, K., 2006: Evaluation of Gloeosporium fungal decay attack in Idared and Golden Delicious Reinders cultivars using NIR spectroscopy. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 54,(4), 53 – 60, <http://dx.doi.org/10.11118/actaun200654040053>.

SÁNCHEZ, M. T., FLORES-ROJAS, K., GUERRORO, J. E., GARRIDO-VARO, A., PÉREZ-MARÍN, D., 2010: Measurement of pesticide residues in peppers by near-infrared reflectance spectroscopy. *Pest Management Science*, 66(6), 580-586, doi: 10.1002/ps.1910.

SATO, T., KAWANO, S., IWAMOTO, M., 1990: Detection of Foreign Fat Adulteration of Milk Fat by Near Infrared Spectroscopic Method. *Journal of Dairy Science*, 73(12), 3408-3413, doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)79037-6.

SAWYER, R., 1988: *Honey identification*, Cardiff Academic Press, UK, 115 p., ISBN: 1871254000.

SCANO, P., MURGIA, A., PIRISI, F., M., CABONI, P., 2014: A gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomic approach for the characterization of goat milk compared with cow milk. *Journal of Dairy Science*, 97 (10), 6057 – 6066, doi: 10.3168/jds.2014-8247.

SHAN, J., SUZUKI, T., SUHANDY, D., OGAWA, Y., KONDO, N., 2014: Chlorogenic acid (CGA) determination in roasted coffee beans by Near Infrared (NIR) spectroscopy. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 7(4), 139-142, doi:10.1016/j.eaef.2014.08.003.

SHIROMA, C., RODRIGUEZ-SAONA, L., 2009: Application of NIR and MIR spectroscopy in quality control of potato chips. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(6), 596-605, doi:10.1016/j.jfca.2008.09.003.

SCHMIDT, J., GERGELY, S., SCHÖNLECHNER, R., GRAUSGRUBER, H., TÖMÖSKÖZI, S., SALGÓ, A., BERGHOFER, E., 2009: Comparison of Different Types of NIR Instruments in Ability to Measure  $\beta$ -Glucan Content in Naked Barley. *Cereal Chemistry*, 86(4), 398-404, <http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM-86-4-0398>.

SINIJA, V. R., MISHRA, H. N., 2009: FT-NIR spectroscopy for caffeine estimation in instant green tea powder and granules. *LWT-Food Science and Technology*, 42(5), 998-1002, doi:10.1016/j.lwt.2008.12.013.

SIVAKESAVA, S., IRUDAYARAJ, J., 2002: Rapid Determination of Tetracycline in Milk by FT-MIR and FT-NIR. *Spectroscopy Journal of Dairy Science*, 85(3), 487-493, doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74099-X.

SKEIE, S., FETEN, G., ALMØY, T., ØSTLIE, H., ISAKSON, T., 2006: The use of near infrared spectroscopy to predict selected free amino acids during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 16(3), 236-242, doi:10.1016/j.idairyj.2005.03.008.

SØRENSEN, L.K., JEPSEN, R. 1998: Assessment of Sensory Properties of Cheese by Near-infrared Spectroscopy. *International Dairy Journal*, 8, s. 863-871, doi:10.1016/S0958-6946(98)00130-7.

SPITZER, K., KÜNNEMEYER, R., WOOLFORD, M., CLAYCOMB, R. 2005: On-line milk spectrometry: Analysis of bovine milk composition. *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*, 5852, 698 – 707, doi: 10.1117/12.621888.

SUN, D. W. 2008: *Infrared Spectroscopy For Food Quality Analysis And Control*, Elsevier - Academic Press, 448 p., ISBN: 978-0-12-374136-3.

ŠAŠIĆ, S., OZAKI, Y., 2001: Short Wave Near-Infrared Spectroscopy of Biological Fluids. 1. Quantitative Analysis of Fat, Protein, and Lactose in Raw Milk by Partial Least-Squares Regression and Band Assignment, *Analytical Chemistry*, 73 (1), 64 – 71, doi: 10.1021/ac000469c.

ŠIKOLA, J., 2002: NIR Spektroskopie – Perspektivní metoda pro kvalitativní a kvantitativní analýzu v potravinách. *Kvalita potravin*, 2 (4), 18 – 19.

ŠIŠKANOVÁ, T., 2010: Potraviny, Přednášky z Analytické chemie II, Dostupné na [cit. 7. 7. 2012]: [http://eso.vscht.cz/cache\\_data/1293/www.vscht.cz/anl/pan2/I/synopse13\\_2009.pdf](http://eso.vscht.cz/cache_data/1293/www.vscht.cz/anl/pan2/I/synopse13_2009.pdf).

ŠUSTOVÁ, K., 2007: Appraisal of the influence of the temperature at the composition of cow's milk by FT NIR spectroscopy. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 55 (4), 95 – 102, <http://dx.doi.org/10.11118/actaun200755040095>.

ŠUSTOVÁ, K., KUČTÍK, J., 2007: Stanovení obsahových složek kozího mléka pomocí FT NIR spektrometrie. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 55 (4), 103 – 109, doi: <http://dx.doi.org/10.11118/actaun200755040103>.

ŠUSTOVÁ, K., KUČTÍK, J., KRÁČMAR, S. 2006: Analysis of ewe's milk by FT Near Infrared spectroscopy: measurement of samples on Petri dishes in reflectance mode. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 54 (2), 131 – 138, doi: <http://dx.doi.org/10.11118/actaun200654020131>.

ŠUSTOVÁ, K., RŮŽIČKOVÁ, J., KUČTÍK, J., 2007: Application of FT near spectroscopy for determination of true protein and casein in milk. *Czech Journal of Animal Science*, 52(9), 284.

ŠUSTOVÁ, K., SÝKORA, V., 2013: *Mlékárenské technologie*, skripta MENDELU, Brno, 223 p., ISBN 978-80-7375-704-5.

TABASI, S., H., MOOLCHANDANI, V., FAHMY, R., HOAG, S., W., 2009: Sustained release dosage forms dissolution behavior prediction: A study of matrix tablets using NIRnext term spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 382 (1-2), 1 – 6, doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.07.029.

TENKL, L., ŠEC, K., KESNER, F., 2009: Infračervená spektroskopie - alternativní instrumentální technika při kontrole výroby. *Kvasný průmysl*, 55 (7–8), 188 – 191, ISSN: 0023-5830.

THERMONICOLET, 2004: *Spektroskopický software TQ Analyst*, Firemní literatura, Praha, 51 p.

TRILČOVÁ, A., ČOPÍKOVÁ, J., COIMBRA, M. A. BARROS, A. S., KŘÍSTKOVÁ, H., EGERT, L., SYNITSYA, A., 2005: Využití infračervené spektroskopie při sledování kvality kakaového prášku. *Chemické Listy*, 99 (11), 821 – 824, ISSN 1213-7103.

TRIPATHI, S., MISHRA, H. N., 2009: A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B<sub>1</sub> in red chili powder. *Food Control*, 20(9), 840-846, doi:10.1016/j.foodcont.2008.11.003.

TSENKOVA, R., ATANASSOVA, S., KAWANO, S., TOYODA, K., 2001: Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: a new diagnostic tool. *Journal of Animal Science*, 79(10), 2550-2557, doi:/2001.79102550x.

TSENKOVA, R., ATANASSOVA, S., TOYODA, K., OZAKI, Y., ITOH, K., FEARN, T. 1999: Near-Infrared Spectroscopy for Dairy Management: Measurement of Unhomogenized Milk Composition. *Journal of Dairy Science*, 82 (11), 2344 – 2351, doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75484-6.

VALNÍČEK, B., 2006: *Nová spektroskopie*. p. 55 - 58. In: FOLTA, J. (ed): Dějiny vědy a techniky 14. - Rozpravy NTM 200, Národní technické muzeum, Praha, 153 p.

VENEL, C., MULLEN, A.C., DOWNEY, G., TROY, D.J. 2001: Prediction of tenderness and other quality attributes of beef by near infrared reflectance spectroscopy between 750 and 1100 nm; further studies. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 9(3), s. 185-198, doi: <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.305>.

VENKATESAN, P., DHARUMAN, C., GUNASEKARAN, S., 2011: A comparative study of principal component regression and partial least squares regression with application to FTIR diabetes data, *Indian Journal of Science Technology*, 4 (7), 740 – 746, doi: 10.17485/ijst/2011/v4i7/30103.

VOLKA, K., et al, 1997: *Analytická chemie I*, vysokoškolská skripta, VŠCHT, Praha, 228 p., ISBN 80-7080-245-6.

VORLOVÁ, L., KRÁLOVÁ, M., BORKOVCOVÁ, I., JANŠTOVÁ, B., NAVRÁTILOVÁ, BARTÁKOVÁ, K., 2012: *Chemie potravin - Praktická cvičení*, 1. vydání, vysokoškolská skripta, VFÚ Brno, 165 p., ISBN 978-80-7305-646-9.

WALCZAK, B., MASSART, D. L., 1998: Multiple outlier detection revisited, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 41 (1) 1 – 15, doi:10.1016/S0169-7439(98)00034-3.

WALSTRA, P., WOUTERS, T. M. J., GEURTS, J. T., 2006: *Dairy science and technology*. CRC press, 2<sup>nd</sup> edition, 763 p., ISBN 978-0-8247-2763-5.

WEHLING, R. L., 2010: *Infrared Spectroscopy*, p. 413 - 424. In: NIELSEN, S. S.: Food Analysis, 4th ed., Cluwer Academic, Plenum Published, New York, 550 p., ISBN 978-1-4419-1477-4.

WEHLING, R. L., 2014: p. 413 - 424. In: Nielsen S. S.: *Food Analysis*, 4<sup>th</sup> edition. Cluwer Academic, Plenum Published, New York., 602 p., ISBN 978-1-4419-1477-4.

WILLIAMS, P. C., NORRIS, K., 1990: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 330 p., ISBN: 0-913250-49-X

WILLIAMS, P. C., STEVENSON, S. G., 1990: Near-infrared reflectance analysis: food industry applications, *Trends in Food Science and Technology*, 1, 44 – 48, doi:10.1016/0924-2244(90)90030-3.

WILSON, R., H., 1994: *Spectroscopic techniques for food analysis*, VCH Publishers, New York, 246 p., ISBN: 1-56081-037-8.

WOO, Y-A., TERAZAWA, Y., CHEN, J. Y., IYO, C., TERADA, F., KAWANO, S., 2002: Development of a new measurement unit (MilkSpec-1) for rapid determination of fat, lactose, and protein in raw milk using near-infrared transmittance spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 56 (5), 599 – 604, doi: 10.1366/0003702021955150.

WORKMAN, J., 2005: An Introduction to Near Infrared Spectroscopy, Dostupné na [cit. 14. 7. 2012]:  
<http://www.spectroscopynow.com/details/education/sepspec1881education/AnIntroduction-to-Near-Infrared-Spectroscopy.html?tzcheck=1#Refs>

ZAJÍC, J., 1959: *Příručka pro cvičení z tuků*, vysokoškolská skripta, VŠCHT, Praha, 100 p., č.p. 31595.

ZHANG, L., ZHANG, X., NI, L., XUE, Z., GU, X., HUANG, S., 2013: Rapid identification of adulterated cow milk by non-linear pattern recognition methods based on near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 145, 342 – 348, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.064.



ZHANG., X., LI, W., YIN, B., CHEN, W., KELLY, P. D., WANG, X., ZHENG, K., DU, Y., 2013: Improvement of near infrared spectroscopic (NIRS) analysis of caffeine in roasted Arabica coffee by variable selection method of stability competitive adaptive reweighted sampling (SCARS). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 114, 350 – 356, doi: 10.1016/j.saa.2013.05.053.

ZHU, X., LI, S., SHAN, Y., ZHANG, Z., LI, G., SU, D., LIU, F., 2010: Detection of adulterants such as sweeteners materials in honey using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Food Engineering*, 101 (1), 92 – 97, doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.06.014.

ZOMEÑO, C., JUSTE, V., HERNÁNDEZ, P., 2012: Application of NIRS for predicting fatty acids in intramuscular fat of rabbit. *Meat Science*, 91(2), 155-159, doi:10.1016/j.meatsci.2012.01.009.

#### LEGISLATIVA A NORMY

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1983: FAO/WHO food standards programme, Codex Alimentarius commission, 15. Session, Rome, Italy, 4-15 July, 34 p., dostupné na [cit. 17. 7. 2015]: file:///C:/Users/lukas/Downloads/al83\_23e.pdf

CODEX ALIMENTARIUS: List of standards - GUIDELINES ON PERFORMANCE CRITERIA AND VALIDATION OF METHODS FOR DETECTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF SPECIFIC DNA SEQUENCES AND SPECIFIC PROTEINS IN FOODS, CAC/GL 74-2010, 22 p. dostupné na [cit. 17. 7. 2015]: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/gmfp/resources/CXG\\_074e.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/gmfp/resources/CXG_074e.pdf)

ČSN 46 7092-8 (1998): Metody zkoušení krmiv – Část 8: Stanovení čísla kyselosti tuku

ČSN 57 0530 (1974): Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků

ČSN EN ISO 1211 (2011): Mléko - Stanovení obsahu tuku - Vážková metoda (Referenční metoda)

ČSN EN ISO 3727-1 (2002): - Máslo - Stanovení obsahu vody, tukuprosté sušiny a tuku (Referenční metoda) - Část 1: Stanovení obsahu vody

ČSN EN ISO 660 (2009): - Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení čísla kyselosti a kyselosti

ČSN EN ISO 8968-1 (2002): Mléko - Stanovení obsahu dusíku - Část 1: Metoda dle Kjeldahla

ČSN ISO 2446 (2010): Mléko: Stanovení obsahu tuku

ČSN ISO 6731 (1998): Mléko, smetana a zahuštěné neslazené mléko – Stanovení obsahu celkové sušiny (Referenční metoda)

FIL-IDF 152 A:1997 (ISO 11870:2009): Milk and milk products - Determination of fat content - General guidance on the use of butyrometric methods

FIL-IDF 1D:1996 (ISO 1211:2010): Milk - Determination of Fat Content - Gravimetric Method (Reference Method)

NAŘÍZENÍ RADY (ES) č. 1234/2007 ze dne 22. října 2007, kterým se stanoví společná organizace zemědělských trhů a zvláštní ustanovení pro některé zemědělské produkty („jednotné nařízení o společné organizaci trhů“).

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Rozložení světla na barevné spektrum pomocí optického hranolu (Konica Minolta, 2015) .....	15
Obr. 2: Rozdělení elektromagnetického spektra (KLEIN, 2014) .....	18
Obr. 3: Znázornění modelu harmonického oscilátoru (MILDE, 2008a) .....	20
Obr. 4: Znázornění křivky průběhu potenciální energie harmonického a anharmonického oscilátoru (KLOUDA, 2003) .....	21
Obr. 5: Znázornění druhů vibrace skupiny -CH <sub>2</sub> - (KLOUDA, 2003) .....	21
Obr. 6: Změny průběhu spektra v obou oblastech při identifikaci skupiny –OH (KLEIN, 2014) .....	22
Obr. 7: Charakteristické absorpční pásy a jejich vlnočty (KLEIN, 2014) .....	24
Obr. 8: Vlnočty, ve kterých se nachází dané charakteristické vazby (KLEIN, 2014).....	24
Obr. 9: Infračervená spektra mléka získaná na A) Reflektanci; B) Transmisi; C) Interaktanci .....	25
Obr. 10: Převod interferogramu na infračervené spektrum u vzorku kávy .....	26
Obr. 11: Schéma jedno-paprskového disperzního infračerveného spektrometru (KLOUDA, 2003) .....	27
Obr. 12: Interferometr přístroje FT-NIR Antaris .....	28
Obr. 13: Schematické znázornění interference dvou monochromatických vlnění na Michalsonově interferometru a jeho převedení na spektrum (KOZELKOVÁ, 2012) .....	29
Obr. 14: Referenční spektra pozadí přístroje: A) integrační sféra; B) transmisní kyveta; C) optická sonda .....	30
Obr. 15: FT-NIR Antaris: A) Režimy přístroje 1) reflektance, 2) transmise, 3) interaktance; B) celkový pohled na přístroj; C) příslušenství přístroje .....	32
Obr. 16: Transmisní režim na FT-NIR Antaris: A) transmisní komora; B) kyvetový prostor; C) skleněná kyveta s optickou drahou paprsku 1 mm .....	32
Obr. 17: Reflektanční režim na FT-NIR Antaris: A) integrační sféra; B) integrační sféra se spinerem; C) kompresní kyveta; D) detail kovového zrcátka transflektanční kyvety; E) transflektanční kyvety .....	33
Obr. 18: Interaktanční režim na FT-NIR Antaris: A) optická sonda; B) transflektanční nástavec na ústí sondy .....	33

Obr. 19: <i>Softwary využívané na FT-NIR Antaris: A) Omnic; B) Result; C) TQ Analyst</i> ....	34
Obr. 20: <i>Algoritmy určené ke kvantitativní a kvalitativní analýze na FT-NIR</i> .....	40
Obr. 21: <i>Režim transmise (MILDE, 2008b)</i> .....	41
Obr. 22: <i>Režim reflektance (MILDE, 2008b)</i> .....	42
Obr. 23: <i>Vzájemné působení blízkého infračerveného záření s pevnými částicemi ve vzorku</i> .....	42
Obr. 24: <i>Vizualizace Lambert-Beerova zákona (en.wikipedia.org)</i> .....	43
Obr. 25: <i>Kvantitativní NIR kalibrace (HURBURGH et IGNE, 2010)</i> .....	60
Obr. 26: <i>NIR spektrum medu bez jakýchkoliv úprav</i> .....	63
Obr. 27: <i>První derivace infračerveného spektra medu</i> .....	64
Obr. 28: <i>Druhá derivace infračerveného spektra medu</i> .....	64
Obr. 29: <i>Ukázka robustnosti kalibračního modelu: a) robustní model; b) nedostatečně robustní model</i> .....	66
Obr. 30: <i>Grafické znázornění metody nejmenších čtverců (KOZELKOVÁ, 2012)</i> .....	68
Obr. 31: <i>Znázornění aplikace diskriminační analýzy (KOZELKOVÁ, 2012)</i> .....	69
Obr. 32: <i>Pražička kávy (MÜLLEROVÁ, 2015)</i> .....	86
Obr. 33: <i>Měření mléka na integrační sféře</i> .....	94
Obr. 34: <i>Metodika měření vzorků másla</i> .....	95
Obr. 35: <i>Měření medu na integrační sféře</i> .....	96
Obr. 36: <i>Měření medu pomocí optické sondy</i> .....	96
Obr. 37: <i>Měření vzorků kávy režimem interaktance</i> .....	96
Obr. 38: <i>Infračervená spektra kravského, kozího a ovčího mléka</i> .....	100
Obr. 39: <i>NIR spektra syrového kravského mléka - pásy 8443, 6880, 5154 <math>\text{cm}^{-1}</math> = absorpce vody, pásy 7444, 5803, 5602, 4324 a 4330 <math>\text{cm}^{-1}</math> = absorpce tuku</i> .....	102
Obr. 40: <i>Rekalibrovaný model pro stanovení sušiny v syrovém kravském mléce</i> .....	105
Obr. 41: <i>Srovnání křivek PRESS rekalibrovaného modelu pro stanovení obsahu sušiny v syrovém kravském mléce – A) PRESS v práci RŮŽIČKOVÉ (2007), B) PRESS v naší práci</i> .....	105
Obr. 42: <i>3D grafické znázornění diferenciací vzorků mléka měřených různými metodami</i> .....	108
Obr. 43: <i>3D grafické znázornění diferenciací vzorků mléka na základě jejich tučnosti</i> .....	108
Obr. 44: <i>3D grafické znázornění diferenciací vzorků mléka v závislosti na druhu mléka</i> .....	109

Obr. 45: Srovnání křivek PRESS rekalibrovaného modelu pro stanovení obsahu sušiny v syrovém kozím mléce – A) PRESS v práci KOZELKOVÉ (2012); B) PRESS v naší práci .....	112
Obr. 46: Závislost kalibračního modelu měření obsahu tuku v másle .....	119
Obr. 47: Závislost kalibračního modelu měření obsahu sušiny másla .....	119
Obr. 48: Závislost kalibračního modelu měření čísla kyselosti másla .....	119
Obr. 49: Diagnostika funkce PRESS pro kalibrační model obsahu tuku v másle .....	120
Obr. 50: Diagnostika funkce PRESS pro kalibrační model obsahu sušiny másla .....	121
Obr. 51: Diagnostika funkce PRESS pro kalibrační model stanovení čísla kyselosti másla .....	121
Obr. 52: Vyhodnocení skupin másel po vyšetření na FT-NIR .....	125
Obr. 53: 2D grafické znázornění diskriminační analýzy čísel kyselosti másel měřeného po zakoupení a po expiraci .....	126
Obr. 54: 3D grafické znázornění diskriminační analýzy čísel kyselosti másel měřeného po zakoupení a po expiraci .....	126
Obr. 55: Infračervená spektra medu naměřená optickou sondou .....	127
Obr. 56: Infračervená spektra medu naměřená na integrační sféře .....	128
Obr. 57: Znázornění nedostatečné robustnosti kalibračního modelu pro obsah vody v medu .....	130
Obr. 58: Křivka diagnostiky PRESS pro hodnocení obsahu vody v medu .....	130
Obr. 59: Diskriminační kříž medů autentických ( □ ) a porušených ( Δ ) .....	131
Obr. 60: Diskriminační kříž medů autentických ( □ ) a cukerných sirupů ( Δ ) .....	132
Obr. 61: Diskriminační kříž medů porušených ( □ ) a cukerných sirupů ( Δ ) .....	132
Obr. 62: Rozdílnost spekter medů a sirupu získaných režimem reflektance .....	133
Obr. 63: 3D diskriminační analýza postavení skupiny medů pekařských vůči ostatním definovaným třídám .....	133
Obr. 64: 2D diskriminační analýza vzorků medů získaných ze sbírky ( □ ) a vzorků pořízených v tržní síti ( Δ ) .....	134
Obr. 65: Křivka PRESS pro hodnocení obsahu kofeinu v kávě .....	137
Obr. 66: Kalibrační model pro stanovení obsahu fenolů v kávě .....	137
Obr. 67: 3D diskriminace vzorků kávy na základě celistvosti zrn .....	139
Obr. 68: 3D diskriminační analýza pražících profilů kávy .....	139
Obr. 69: Diskriminační analýza vzorků káv zabalených v papíru ( □ ) a v obalu s jednocestným ventilem ( Δ ) .....	140

Obr. 70: Diskriminační analýza vzorků káv skladovaných v ideálních podmínkách (□ ) a v lednici (Δ) .....	140
Obr. 71: Diskriminační analýza vzorků skladovaných v ideálních podmínkách (□ ) a v extrémních podmínkách (Δ) .....	140
Obr. 72: Kalibrace a funkce PRESS pro stanovení obsahu tuku v mléce dle Röse-Gottlieba .....	143
Obr. 73: Kalibrace a funkce PRESS pro stanovení obsahu tuku v mléce dle Gerbera .....	143
Obr. 74: Infračervená spektra kravského mléka měřeného při teplotách 18, 20, 22 a 40 °C .....	147
Obr. 75: Diskriminační analýza rozlišení kravského mléka měřeného při teplotách 18 (□ ) a 40 °C (Δ) .....	147
Obr. 76: Diskriminační analýza rozlišení kravského mléka měřeného při teplotách 20 (□ ) a 22 °C (Δ) .....	148
Obr. 77: Diskriminační analýza rozlišení kravského mléka měřeného při teplotách 18 (□ ) a 22 °C (Δ) .....	148
Obr. 78: Grafické znázornění seskupení výsledků pro obsah bílkovin v mléce závislosti na teplotě .....	150
Obr. 79: Grafické znázornění seskupení výsledků pro obsah laktózy v mléce v závislosti na teplotě .....	151
Obr. 80: Grafické znázornění seskupení výsledků pro obsah tuku v mléce v závislosti na teplotě .....	151
Obr. 81: Grafické znázornění seskupení výsledků pro obsah sušiny mléka v závislosti na teplotě .....	152
Obr. 82: Diskriminační analýza čistých kozích sýrů (□ ) a kravských sýrů (Δ) .....	160
Obr. 83: Diskriminační analýza čistých kozích sýrů (□ ) a sýrů s přídavkem 10 % kravského mléka (Δ) .....	161
Obr. 84: Diskriminační analýza čistých kozích sýrů (□ ) a sýrů s přídavkem 1 % kravského mléka (Δ) .....	161
Obr. 85: Rozdělení klastrů jednotlivých přídavků kravského mléka diskriminační analýzou s 3D vizualizací .....	162
Obr. 86: Křivka funkce PRESS pro kalibrační model hodnocení přídavku kravského mléka .....	164

**9 SEZNAM TABULEK**

Tab. I: Rozdělení infračervené oblasti dle OSBORNE <i>et</i> FEAM (1986) .....	19
Tab. II: Hodnoty koeficientů korelace (r) dle CHRÁSKY (2000) .....	72
Tab. III: Párový t-test o středních hodnotách .....	78
Tab. IV: Charakteristika medů použitých k analýzám .....	82
Tab. V: Charakteristika profilů použitých při pražení káv použitých pro diskriminační analýzy .....	86
Tab. VI: Charakteristiky kalibračních modelů složek pro kravské mléko měřené při 20 °C .....	98
Tab. VII: Složení jednotlivých druhů mlék dle PARK <i>et al.</i> (2007) .....	101
Tab. VIII: Statistické parametry referenčních hodnot analyzovaných složek v kravském mléce .....	103
Tab. IX: Srovnání rekalibrovaných charakteristik modelů pro kravské mléko .....	103
Tab. X: Výsledky párového t-testu na střední hodnotu pro rekalibrované modely hlavních složek kravského mléka .....	104
Tab. XI: Referenční hodnoty analýz kozího mléka .....	110
Tab. XII: Srovnání rekalibrovaných charakteristik modelů pro kozí mléko .....	111
Tab. XIII: Hodnoty t-testu analýz kozího mléka .....	111
Tab. XIV: Základní statistické charakteristiky referenčních hodnot analýz ovčího mléka .....	115
Tab. XV: Srovnání rekalibrovaných charakteristik modelů pro ovčí mléko .....	115
Tab. XVI: t-test rekalibrovaných modelů pro syrové ovčí mléko .....	116
Tab. XVII: Celkový přehled naměřených hodnot referenční analýzou .....	117
Tab. XVIII: Kalibrační hodnoty pro obsahové složky másla .....	118
Tab. XIX: Validační výsledky pro obsahové složky másla .....	118
Tab. XX: Hodnoty t-testu ( $\alpha = 0,05$ ) pro kalibrační modely měření vzorků másla .....	122
Tab. XXI: Hodnoty čísel kyselosti másel po jejich zakoupení a po expiraci .....	123
Tab. XXII: Základní statistické ukazatele referenčních analýz vzorků medu .....	128
Tab. XXIII: Data získaná při tvorbě kalibračních modelů pro hodnocení medu .....	129
Tab. XXIV: Základní statistické hodnoty použité pro tvorbu kalibrací na vzorky kávy .....	135

---

Tab. XXV: Charakteristické hodnoty vytvořených kalibrací pro vzorky kávy .....	136
Tab. XXVI: Statistické hodnoty získané t-testem při hodnocení kalibračních modelů vytvořených pro vzorky kávy .....	138
Tab. XXVII: Referenční hodnoty stanovení obsahu tuku v individuálních vzorcích mléka .....	141
Tab. XXVIII: Kalibrační charakteristiky modelů pro obsah tuku v mléce .....	142
Tab. XXIX: Hodnoty obsahu tuku v nově vytvořených vzorcích mléka .....	144
Tab. XXX: Statistická analýza kalibračních modelů .....	145
Tab. XXXI: Statistická analýza kalibrací pro metody dle Röse-Gottlieba a Gerbera .....	145
Tab. XXXII: Popisné charakteristiky statistiky pro jednotlivé sledované parametry dle teploty .....	149
Tab. XXXIII: Párový t-test pro stanovení obsahu bílkovin v mléce .....	152
Tab. XXXIV: Párový t-test pro stanovení obsahu laktózy v mléce .....	153
Tab. XXXV: Párový t-test pro stanovení obsahu tuku v mléce .....	153
Tab. XXXVI: Párový t-test pro stanovení obsahu sušiny mléka .....	154
Tab. XXXVII: Průměrné hodnoty regresních koeficientů pro obsahové složky .....	155
Tab. XXXVIII: Označení vzorků pro analýzu ELISA .....	158
Tab. XXXIX: Výsledky získané testem ELISA pro všechny vzorky .....	158
Tab. XL: Výsledky testu ELISA při ředění vzorků 1:1000 .....	159
Tab. XLI: Charakteristiky referenčních hodnot přídatku kravského mléka .....	163
Tab. XLII: Kalibrační hodnoty kalibračního modelu .....	163
Tab. XLIII: Validační hodnoty kalibračního modelu .....	163
Tab. XLIV: Párový t-test na střední hodnotu pro vytvořený kalibrační model .....	164



**10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A ZNAČEK**

$\alpha$  - hladina významnosti ( $\alpha = 0,05$ ), pravděpodobnost chyby prvního druhu, teoretická

(předpokládaná) hodnota koeficientu  $a$

$\alpha\lambda$  – molární absorpční koeficient  $i$ -té složky při dané vlnové délce  $\lambda$

$\delta$  – deformační vibrace, dráhový rozdíl

$\zeta$  – vlnočet ( $\text{cm}^{-1}$ )

$\varepsilon$  – dekadický extinkční koeficient

$\tilde{\nu}$  – vlnočet

$\lambda$  – vlnová délka

$\nu$  – frekvence

$c$  – rychlost světla ve vakuu ( $3 \cdot 10^8$  m/s)

$\lambda$  – vlnová délka ( $\text{cm}^{-1}$ )

$^{\circ}\text{SH}$  – titrační kyselost ve stupních Soxhlet-Henkela

$\mathbf{a} \pm \mathbf{b}x_i$  – parametry regresní přímky predikce

**AF** – Agronomická Fakulta

**ANN** – metoda umělých neuronových sítí (Artificial Neural Network)

$\mathbf{a}_w$  – vodní aktivita

**BPANN** – metoda zpětného šíření umělé neuronové sítě (Back Propagation Artificial Neural Network)

**CaF<sub>2</sub>** – fluorid vápenatý

**CCV** – kalibrační variační koeficient (Calibration Coefficient of Variation %)

**CLS** – klasická metoda nejmenších čtverců (Classic Least Squares)

$\text{cm}^{-1}$  – reciproký centimetr (jednotka vlnové délky)

**ČR** – Česká republika

**ČSN** – Česká Státní Norma

**DA** – diskriminační analýza (Discriminant Analysis)

$df$  – počet stupňů volnosti t-testu

**DTGS** – deuterovaný triglycinsulfátový detektor

**ELISA** – enzymatická imuno-analýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

**ES** – Evropské společenství

**EU** – Evropská Unie

**FFT** – fenolftalein

- FIR** – vzdálená infračervená oblast (Far Infra-Red)
- FT** – Fourierova transformace (Fourier Transformation)
- GA-ANN** – metoda umělých neuronových sítí s využitím genetických algoritmů (Genetic Algorithm-Artificial Neural Network)
- GC** – plynová chromatografie (Gass Chromatography)
- GC-MS** – plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (Gass Chromatography-Mass Spectrometry)
- GPa** – GigaPascal (jednotka tlaku)
- h** – Planckova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{31}$  J.s), **h** (0,2 a 0,3 mm) – výška kovového zrcátka
- H<sub>0</sub>** – nulová hypotéza ( $\mu = \mu_1 = \mu_2$ )
- H<sub>1</sub>** – alternativní hypotéza ( $\mu = \mu_1 > \mu_2$ )
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – kyselina sírová
- HCl** – kyselina chlorovodíková
- HMF** – hydroxymethylfurfural
- HPLC** – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
- IČ** – infračervená spektroskopie
- IF** – index fermentace
- InGaAs** – detektor Indium – Gallium – Arsenide
- IR** – infračervená oblast (Infra-Red)
- ISO** – Mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organization for Standardization)
- KBr** – bromid draselný
- kNN** – algoritmus k-nejbližších sousedů (k-Nearest Neighbors)
- KOH** – hydroxid draselný
- LDA** – lineární diskriminační analýza (Linear Discriminant Analysis)
- LF-NMR** – nukleárně rezonanční reflexometrie (Low Field-Nuclear Magnetic Resonance)
- LWR** – lokálně vážená regrese (Locally Weighted Regression)
- Max** – maximální naměřená hodnota
- MD-DA** – diskriminační analýza s výpočtem Mahalanobisovy vzdálenosti (Mahalanobis Distance-Discriminant Analysis)
- MENDELU** – MENDELova Univerzita
- Min** – minimální naměřená hodnota
- MIR** – střední infračervená oblast (Middle Infra-Red)

- MLR** – vícenásobná regrese (Multiple Linear Regression)
- MLS** – algoritmus slučování podobných standardů (Merge Like Standards)
- mm** – milimetr (jednotka délky)
- MPLS** – modifikovaná metoda částečných nejmenších čtverců (Modified Partial Least Squares)
- MTC** – detektor Mercury – Cadmium – Telluride
- n** – vibrační kvantové číslo ( $n = 0, 1, 2, \dots$ ), **n** – počet vzorků použitých pro kalibraci
- TGS** – triglycinsulfátový detektor
- NaOH** – hydroxid sodný
- NIR-CI** – blízká infračervená spektroskopie s analýzou obrazu (Near Infra-Red Chemical Imaging)
- NIRs** – blízká infračervená spektroskopie (Near-Infra Red spectroscopy)
- nm** – nanometr (jednotka délky)
- P** – pravděpodobnost zamítnutí nulové hypotézy
- PbS** – sulfid olovnatý
- PC** – souřadnicový systém hlavních komponent (Principal Component)
- PCA** – analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis)
- PCA-PLS** – metoda spojující algoritmus částečných nejmenších čtverců s analýzou hlavních komponent
- PCR** – komponentní regrese (Principle Component Regression)
- PCR** – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
- PCV** – predikční variační koeficient (Prediction Coefficient of Variation, %)
- PLS** – metoda částečných nejmenších čtverců, počet faktorů (Partial Least Squares)
- PLS-DA** – metoda diskriminační analýzy spojená s využitím algoritmu nejmenších čtverců (Partial Least Squares Discriminant Analysis)
- PLSR** – regrese částečných nejmenších čtverců (Partial Least Squares Regression)
- PRESS** – předpovězené reziduální chyby metody PLS (Predicted Residual Sum of Squares)
- R** – koeficient korelace kalibrace
- R<sub>v</sub>** – Koeficient korelace validace
- SD** – výběrové variační rozpětí dvojic, směrodatná odchylka difference
- SEC** – směrodatná odchylka kalibrace (Standard Error of Calibration, %)
- SEP** – směrodatná odchylka validace (Standard Error of Prediction, %)
- SIMCA** – metoda nezávislého modelování tříd analogů (Soft Independent Modelling of Class Analogies)

**SMLR** – postupná vícenásobná regrese (Stepwise Multiple Linear Regression)

**SNV** – redukce na velikost částic (Standard Normal Variate)

**SR** – čtverce reziduálu (Square Residual)

**SSA** – spektrální analýza podobnosti (Spectral Similarity Analysis)

**SVM** – Support Vector Machine

**SVÚ** – Státní Veterinární Ústav

**S<sub>x</sub>** – směrodatná odchylka průměru

**t<sub>krit</sub>(1)** – tabulková hodnota při  $\alpha = 0,05$

**t<sub>krit</sub>(2)** – tabulková hodnota při  $\alpha = 0,01$

**t<sub>stat</sub>** – statistika t-test

**ÚCB** – Ústavu Chemie a Biochemie

**UHPLC-PDA** - Ultra High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array

**UHT** – záhřev mléka na teplotu 135 – 150 °C (Ultra High Temperature)

**ÚCHHZ** – Ústavu chovu a šlechtění zvířat

**ÚTP** – Ústav Technologie Potravin

**UV/VIS** – oblast ultrafialového záření (UltraViolet/VISible)

**ÚZRHV** – Ústavu Zoologie, Rybářství, Hydrobiologie a Včelařství

**X<sub>NIR</sub>** – průměrná hodnota předpověděná z NIR spektra

**x<sub>p</sub>** – průměr laboratorních hodnot složky

**X<sub>REF</sub>** – průměrná referenční hodnota