

Stanovenie bielkovín v sušenom mlieku metódou NIR

EVA PASTIEROVÁ

Súhrn. V práci sme rozpracovali postup NIR stanovenia bielkovín v sušenom mlieku. Určili sa optimálne podmienky merania vzoriek a matematického spracovania výsledkov. Vyhodnotila sa funkčná závislosť pre NIR stanovenie bielkovín v sušenom mlieku. Podľa vypracovanej metódy možno stanoviť bielkovinový dusík so štandardnou odchýlkou výsledkov $s_y = 1,34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Funkčná závislosť platí v rozsahu od 36,92 do 55,45 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ N}_2$. Korelačný koeficient NIR metódy je pre bielkoviny $r = 0,98$.

Uplatnenie moderných technologických zariadení si vyžaduje získavať spoľahlivo, rýchlo a opakovane informácie o parametroch medziproduktov a výrobkov v priebehu výrobného procesu.

Stanovenie klasickými laboratórnymi metódami je často pre časovú náročnosť nevýhodné. Jednou z vhodných metód, ktorá spĺňa nároky na zrýchlenie analytickej kontroly, je metóda blízkej infračervenej difúžno-reflexnej spektroskopie (NIR). Táto metóda využíva analýzu odrazeného svetla od povrchu skúmanej vzorky (reflektancia) pri rôznych vlnových dĺžkach (1300—2400 nm). Tieto hodnoty sú v korelácii s obsahom zložiek vo vzorke, stanovených klasickou laboratórnou metódou. Prístroje založené na princípe reflektancie využívajú túto koreláciu na stanovenie charakteristickej vlnovej dĺžky (stupeň korelácie dosahuje maximálnu hodnotu) a K -regresných konštánt spolu so štandardnou odchýlkou merania [1]. Takto sa zistia aj ďalšie charakteristické vlnové dĺžky. Na základe týchto charakteristík sa zostaví rovnica, ktorá vyjadruje vzťah medzi NIR hodnotami a nameranými parametrami.

Svetlo difúzne odrazené od povrchu testovanej vzorky dopadá na 4 reflexné detektory PbS. Výstupný signál z detektorov po prechode cez úzky pásový filter dopadá na demodulátor a prevodník. Funkciu systému a prepočty riadi mikropočítačový systém. Pre užívateľa sú údaje o stave prístroja a nameraných výsled-

Ing. Eva Pastierová, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava.

kov k dispozícii cez display a tlačiareň [2]. Infrapid 61 spracuje namerané údaje použitím týchto typov rovníc:

$$\%X = K_0 + K_1C_1 + K_2C_2 + \dots + K_6C_6,$$

kde $\%X$ je koncentrácia testovaných komponentov vo vzorke, K_i sú regresné koeficienty, C_i hodnoty, ktoré sa získajú zo spektrálneho údaju podľa vzťahu:

$$C_i = T[R(\lambda_{2i-1})] - T[R(\lambda_{2i})], \quad i = 1, 2, \dots, 6,$$

kde $R(\lambda_i)$ sú reflektancie namerané pri vlnových dĺžkach vybraných pri kalibrácii, T — operátor matematickej transformácie (zistený pri kalibrácii) [3].

Stanovenie charakteristických vlnových dĺžok testovaných substancí vyžaduje experiment a počítačové spracovanie. Pretože NIR technika je komparatívna, vyžaduje sa analýza laboratórnou konvenčnou metódou pri 30—50, prípadne viac kalibračných vzoriek.

Kalibrácia sa skladá z týchto krokov:

- zaznamenanie spektra kalibračných vzoriek,
- prebehnutie regresného programu,
- naprogramovanie parametrov odhadnutej rovnice do kanála prístroja.

Vložením kalibračných konštánt do kanála prístroja mikroprocesor vypočíta hodnotu daného parametra. Kanálom sa nazýva pamäťový rozsah, ktorý obsahuje potrebné informácie pre koncentračné meranie maximálne 6 zložiek jednej látky. Spoľahlivosť kalibrácie je limitovaná spoľahlivosťou referenčnej metódy.

NIR analyzátory reprezentujúce prelom v rozvoji analýz potravín a krmív sa rozšírili od roku 1970. Prvá firma, ktorá začala výrobu NIR prístrojov bola Dickey—John, Neotec a Technicon. Roku 1980 sa vyvinuli analyzátory PERCON v NSR, TREBOR v USA a LABOR MIM v Maďarsku. NIR technika je založená na semiempirickom postupe. Tieto aplikácie vyžadujú kalibrácie založené na niektorých iných chemických a fyzikálnych meraniach [4, 5].

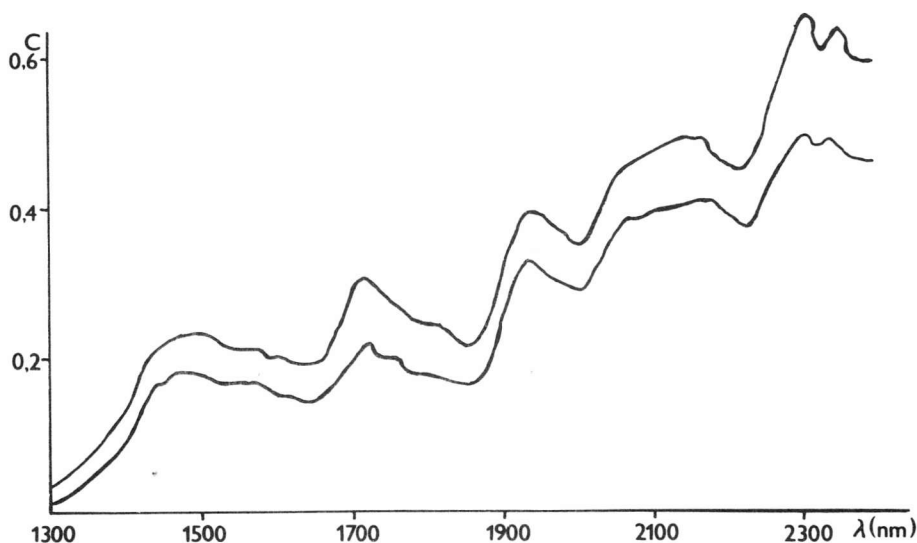
Prvá aplikácia tejto metódy sa uplatnila pri analýze sójových bôbov [6]. Metódy na stanovenie bielkovinového dusíka sa vypracovali pre rôzne potravinárske a poľnohospodárske produkty. Najčastejšie sa využíva stanovenie proteínu v pšenici [7], zaujímavé sú aj iné aplikácie, napr. stanovenie bielkovín v rastlinnom pletive [8], rybách [9] a múke [10]. Najnovšie poznatky v tejto oblasti vedú k využitiu miešania vzoriek pomocou rozptyľovania vzduchom.

Experimentálna časť

Práca na prístroji Infrapid 61 si vyžaduje optimalizáciu podmienok merania a vyhodnotenie, ako aj kalibráciu sledovaného parametra v jednom druhu vzoriek.

Vzorky sušeného mlieka nám dodal VÚ mliekárensky Žilina. Pochádzali z viacerých mliekárni na Slovensku: Milex Levice, Poľnohospodársko-potravinársky kombinát Rimavská Sobota, Mliekareň Nitra a Milex Čalovo.

Na kalibráciu bielkovín sa použil kalibračný súbor 68 vzoriek sušeného mlieka. Tento súbor predstavoval celý rozsah meraného parametra s rovnomerným rozložením v rámci rozsahu, čo je dôležitou požiadavkou kalibrácie. Bielkoviny sme stanovili destilačnou metódou podľa Kjeldahla v zariadení Kjeltec fy Tecator. Spektrá vzoriek sme merali na analyzátore Infrapid 61 maďarskej firmy LABOR MIM v rozsahu vlnových dĺžok od 1300 do 2400 nm oproti štandardnej reflexnej doštičke s intervalom 10 nm. Analytické údaje o vzorkách sa v analyzátore priradia k nameraným optickým údajom, ktoré možno spracovať jednou z 10 matematických transformácií. V nadväznosti na vopred dodané hodnoty kalibrácie prístroj automaticky vyhodnotí obsah bielkovín vo vzorke. Po zmeraní a vyhodnotení vzorky možno dodať do prístroja ďalšiu vzorku a pokračovať v meraní.



Obr. 1. NIR spektrum vzoriek sušeného mlieka pri MATH 1.

Fig. 1. NIR spectrum of milk powder samples at MATH 1.

Postup pri optimalizácii bol nasledovný: Do prístroja sa dodali základné meracie parametre (číslo kanála, druh matematickej transformácie, rozsah vlnových dĺžok merania, intervaly medzi vlnovými dĺžkami a výtlačný formát). Po zmeraní spektier vzoriek vo vzorkovacích kyvetách sme grafický priebeh spektier (obr. 1) porovnávali s klasicky stanovenými obsahmi bielkovín. Overili sme závislosť spektrálnych čiar od zloženia materiálu pri viacerých spôsoboch matematického spracovania optických signálov. Určili sme optimálny spôsob matematického vyhodnotenia a charakteristické vlnové dĺžky, pri ktorých dochádzalo k zmene spektra v závislosti od obsahu sledovanej zložky. Pritom sme zohľadňovali najlepšie korelácie medzi priebehom zmien klasicky stanovených údajov a nameraných optických hodnôt. Zo súboru hodnôt sme vylúčili odľahlé údaje. Namerané výsledky sme podrobili opakovanej lineárnej regresii podľa funkcie, ktorá vyjadruje závislosť medzi optickým signálom a koncentráciou zložky vo vzorke.

Výsledky a diskusia

Prístroj Infrapid 61 nemá fixne nastavené podmienky pre určité analýzy a ani firma nedodáva aplikačné návody. Na Infrapide 61 v základnom vybavení sme manuálnou formou optimalizovali podmienky merania bielkovín sušeného mlieka. Tento postup má výskumný charakter, práca trvá dlhšie a je menej spoľahlivá ako v spojení s počítačom. Pri vývoji metód pre Infrapid 61 je závažnejší problém určiť vhodné vlnové dĺžky na meranie obsahu jednotlivých zložiek a určenie spôsobu ich matematického spracovania. Získané optické hodnoty musia korelovať s údajmi o obsahu zložiek stanovenými klasicky.

Pri výpočte funkčnej závislosti sme použili optické signály spracované matematickou transformáciou MATH 1, t.j. optickú denzitu (OD)

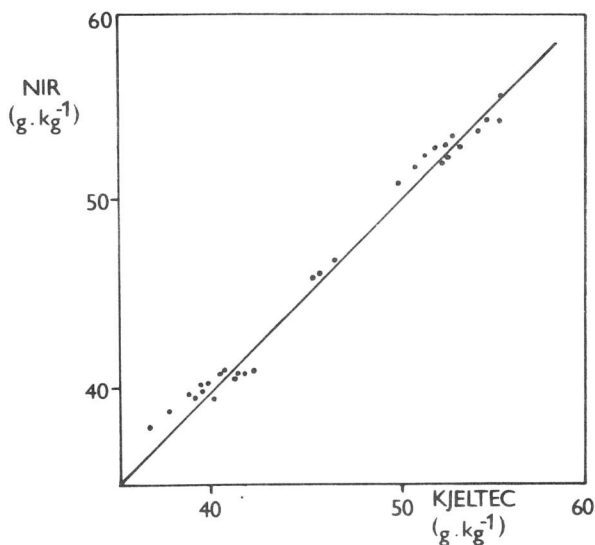
$$OD(\lambda) = \log \frac{1}{R(\lambda)},$$

kde R je reflektancia, λ = vlnová dĺžka.

Výsledkom našich pokusov bolo, že sme optimalizovali vlnové dĺžky a spôsob matematického spracovania údajov tak, že v súčasnosti možno na Infrapide nedeštruktívnym meraním stanoviť bielkoviny v sušenom mlieku. Po zmeraní štandardnej reflexnej doštičky, zmeria prístroj vzorku a automaticky vyhodnotí obsah bielkovín, resp. bielkovinového dusíka v sušenom mlieku podľa funkčnej závislosti:

$$\text{obsah dusíka [g. kg}^{-1}] = 4,536 - 10,02 C_{1720\text{ nm}} + 10,39 C_{1730\text{ nm}}.$$

Prepočítavací faktor na bielkoviny je 6,38. Uvedená funkčná závislosť platí v rozsahu od 36,92 do 55,45 g. kg⁻¹ N₂. Korelačný koeficient vyjadrujúci zhodu klasickej a NIR metódy v prípade bielkovín je $r = 0,98$. Porovnanie hodnôt obsahu bielkovín stanovených NIR spektroskopiou a referenčnou laboratórnou metódou je na obr. 2.



Obr. 2. Rozptyl NIR údajov pri stanovení dusíka v sušenom mlieku v porovnaní s referenčnou laboratórnou metódou.

Fig. 2. Scattering of NIR values by the nitrogen determination in milk powder compared with reference laboratory method.

V nadväznosti na údaje vyplývajúce z matematickoštatistického spracovania výsledkov treba uviesť, že existuje dobrá korelácia medzi klasickým a NIR stanovením bielkovín. Smerodajná odchýlka laboratórneho stanovenia bielkovín je $s_{\text{lab}} = 1,05 \text{ g.kg}^{-1}$ a smerodajná odchýlka NIR stanovenia bielkovín je $s_x = 1,34 \text{ g.kg}^{-1}$. Zaujímavým štatistickým údajom je veličina BIAS, ktorá vyjadruje strednú systematickú odchýlku vypočítaných NIR hodnôt od výsledkov chemických rozborov. Systematická odchýlka stanovenia obsahu bielkovín je $1,106 \text{ g.kg}^{-1}$. Môžeme konštatovať, že NIR stanovenie bielkovín je pomerne spoľahlivé.

Výhody a nevýhody NIR technicky môžeme zhrnúť do týchto bodov:

Výhody:

1. nedeštruktívna metóda (bez nároku na prípravu vzorky a na chemikálie),
2. rýchla analýza (1 vzorka/5 minút),

3. jednoduchá obsluha,
4. vysoká opakovateľnosť výsledkov,
5. možnosť uplatnenia pri sériových analýzach.

Nevýhody:

1. vysoká cena prístroja,
2. nevyhnutnosť optimalizácie podmienok meraní a vyhodnotení spektier,
 - a) automaticky — zakúpenie počítača a programov (cena prístroja sa zdvojnásobí),
 - b) výskumne — nižšia efektívnosť,
3. potreba rozsiahlej kalibrácie každého parametra v každom type vzoriek,
4. závislosť spoľahlivosti výsledkov od referenčnej metódy použitej na kalibráciu.

Záver

Navrhovaný spôsob analýzy bielkovín urýchli kontrolu akosti technologického procesu pri výrobe sušeného mlieka. Možnosť využitia tejto metódy je pri veľkých sériách analýz rovnakého typu v rovnakom druhu vzoriek. Nevyhnutným krokom pri optimalizácii NIR analýz na Infrapide 61 je využitie počítača.

Literatúra

1. NADAI, B. T., *Acta Aliment.*, 12, 1983, s. 119.
2. Infrapid 61, *Instrumentanleitung*, Typ QA-262. Budapest, Labor MIM, s. 10.
3. POKORNÝ, T., *Hung. Sci. Instr.*, 58, 1984, s. 7.
4. WEISBERG, S.: *Applied Linear Regresion*. New York, 1980.
5. BROWLEE, K. A.: *Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering*. New York, 1965.
6. BEN-GERA, I.—NORRIS, K. H., *Israel J. Agric. Res.*, 18, 1968, s. 125.
7. WILLIAMS, P. C., *Cereal Chem.*, 56, 1979, s. 169.
8. ISSAC, R. A., *J. Assoc. Anal. Chem.*, 67, 1984, s. 506.
9. MATHIAS, J. A.—WILLIAMS, P. C.—SOBERING, D. C., *Aquaculture*, 61, 1987, s. 303.
10. DAVIES, A. M. C.—GRANT, A., *J. Food Sci. Technol.*, 22, 1987, s. 191.

Do redakcie došlo 20. 5. 1991

Определение белков в сушеном молоку NIR методом

Резюме

В работе мы разработали метод NIR определения белков в сушеном молоку. Определились оптимальные условия измерения проб и математическая обработка результатов. Была оценена функциональная зависимость для NIR определения белков в сушеном молоку. По разработанному методу можно определить белковый азот с стандартным отклонением результатов $s_x = 1,34 \text{ г} \cdot \text{кг}^{-1}$. Функциональная зависимость действует в диапазоне 36,92—55,45 $\text{г} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ N}_2$. Коэффициент корреляции NIR метода есть для белка $r = 0,98$.

Determination of proteins in milk powder using the NIR method

Summary

The NIR method of protein determination in milk powder is elaborated in this paper. The optimal conditions of both sample measurement and mathematical evaluation of results have been determined. The functional dependence for NIR determination of proteins in milk powder has been evaluated. According to this method, the proteinous nitrogen with the standard deviation of results $s_x = 1.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ can be determined. The functional dependence ranging between 36.92 to 55.45 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of N_2 is accepted. The correlation coefficient of NIR method has the value of $r = 0.98$ for proteins.