

## ASSESSMENT OF PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF GOAT'S COLOSTRUM USING FT-NIR SPECTROMETRY

Zuzana Procházková, Monika Plátová, Michaela Dračková, Bohumíra Janštová, Alena Pechová, Lenka Vorlová

### ABSTRACT

The aim of this work was the application of FT-NIR spectrometry on determination of some physical and chemical characteristics of goat's colostrum. Calibration models for content of proteins, total solids, fat in total solids, fat, titratable acidity and pH were developed. Samples ( $n = 182$  to  $194$ ) were scanned in FT-NIR Analyzer and simultaneously analyzed by standard methods. The spectra were measured in the transfectance mode ( $0.1$  mm path-length) between  $10\ 000$  and  $4\ 000\ \text{cm}^{-1}$ . Calibration models were developed using the partial least squares (PLS) method. The following statistical values were obtained:  $R$  (correlation coefficient) =  $0.99$  and  $\text{SEC}$  (standard error of calibration) =  $0.39$  for content of proteins,  $R = 0.95$  and  $\text{SEC} = 0.92$  for amount of total solids,  $R = 0.95$  and  $\text{SEC} = 0.82$  for content of fat in total solids,  $R = 0.81$  and  $\text{SEC} = 1.14$  for content of fat,  $R = 0.89$  and  $\text{SEC} = 1.43$  for titratable acidity and  $R = 0.73$  and  $\text{SEC} = 0.12$  for pH. The results of the study showed that FT-NIR is a suitable method for rapid analysis of some physical and chemical parameters of goat's colostrum.

**Keywords:** FT-NIR, spectrometry, colostrum, goat, calibration model

### ÚVOD

„Mlezivem“ se rozumí tekutina vylučovaná mléčnými žlázami zvířat s mléčnou užitkovostí 3 až 5 dní po porodu, která je bohatá na protilátky a minerály a předchází produkci syrového mléka (**Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006**). Mlezivo je svým složením odlišné od zralého mléka, především obsahem vysokého množství nutričních a bioaktivních komponent, které slouží k výživě mláďat a též k zajištění pasivní imunity první dny po porodu. Kolostrum a jeho specifické složky jsou často využívány k výrobě různých výživových doplňků, léků a jako součást náhražek mléčné výživy jak pro mláďata hospodářských zvířat, tak pro lidi. Vedle toho je kolostrum pro svoje jedinečné vlastnosti využíváno i v kosmetickém průmyslu a biotechnologiích (**Pakkanen, Aalto, 1997; Vivo-Sese, Pla, 2007**).

Spektrometrie v blízké infračervené oblasti využívá část elektromagnetického spektra mezi viditelným a infračerveným spektrem v rozsahu  $4\ 000 - 12\ 500\ \text{cm}^{-1}$  ( $800 - 250\ \text{nm}$ ). Umožňuje získat informace o relativním obsahu a poměru C-H, N-H a O-H vazeb, které tvoří organickou matrix všech potravin (**Cozzolino, Corbella, 2003**). Ve srovnání s klasickými analytickými metodami je to metoda citlivá, rychlá a nedestructivní, s jednoduchou přípravou vzorku a umožňuje simultánní stanovení mnoha parametrů z jednoho naměřeného spektra (**Prieto et al., 2006**). Používá se pro stanovení takových parametrů jako je obsah vody, sacharidů, bílkovin a také elektrické vodivosti, pH a dalších fyzikálně-chemických parametrů (**Rodriguez-Othero et al., 1997; Cozzolino, Corbella, 2003**). Existuje mnoho vědeckých prací zabývajících se využitím NIR spektrometrie pro stanovení laktózy, proteinů, obsahu tuku a dalších parametrů v mléce (**Díaz-Carrillo et al., 1993; Albanell et al., 1999; Laporte, Paquin, 1999; Čurda et al., 2002; Jankovská, Šustová, 2003**). Publikace zaměřené na využití NIR spektrometrie pro analýzu abnormálních mlék nejsou příliš četné. **Navrátilová et al. (2006)** se ve své práci zabývají

využitím FT-NIR spektrometrie pro analýzu bovinního kolostra.

Cílem této práce bylo vytvořit kalibrační modely pro fyzikálně-chemické parametry kozího mleziva a zjistit tak použitelnost moderní, rychlé a nedestructivní metody, FT-NIR spektrometrie, pro analýzu kozího mleziva.

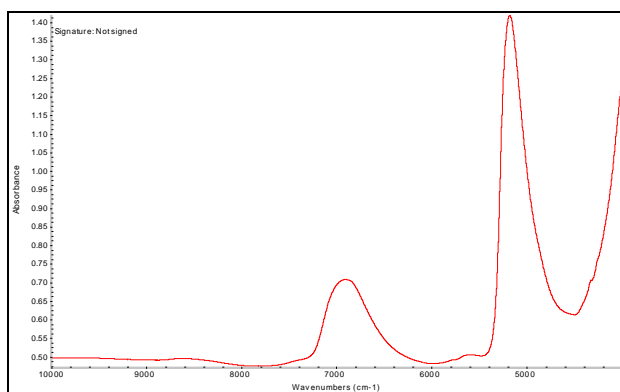
### MATERIÁL A METODIKA

V této studii bylo provedeno vyšetření vzorů kozího mleziva ( $n = 182$  až  $194$ ). Vzorok mleziva pocházely od zvířat ze stájí Kliniky chorob přežvýkavců, Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Celkem bylo do pokusu zahrnuto 34 koz. Mlezivo bylo odebíráno ode dne porodu až do pátého dne po porodu v intervalu 24 hodin. Ve vzorcích byly stanoveny následující parametry: obsah bílkovin, tuku, sušiny, tukuprosté sušiny, titrační kyselost a aktivní kyselost. Všechny parametry byly stanoveny jednak metodami standardními a jednak pomocí FT-NIR spektrometrie.

Referenční metodami bylo provedeno stanovení bílkovin podle **ČSN 57 0536 (1999)**, stanovení tuku acidobutyrometrickou metodou podle Gerbera dle **ČSN 57 0530 (1972)**, stanovení sušiny podle **ČSN 57 0530 (1972)**, stanovení sušiny vázkově, stanovení titrační kyselosti podle **ČSN 57 0107 (1966)**, stanovení aktivní kyselosti pomocí digitálního pH metru dle **ČSN 57 0107 (1966)**, stanovení tuku prosté sušiny infračervenou absorpční metodou pomocí přístroje Bentley 2000 (Bentley Instruments, Inc., Minnesota, USA).

Před měřením na FT-NIR spektrometru byly vzorky zahřáty na  $40\ ^\circ\text{C}$  ve vodní lázni, promíchány, aby bylo zajištěno rovnoměrné rozptýlení tukových kuliček a poté ochlazený na  $20\ ^\circ\text{C}$ . Měření probíhalo při  $20\ ^\circ\text{C}$ . Každý vzorek mleziva byl změřen třikrát a pro kalibraci bylo použito průměrné spektrum. NIR spektra byla měřena na spektrometru Nicolet Antaris Near – IR Analyzer (Thermo Elektron Corporation, Madison, USA) ve spektrálním rozsahu  $10\ 000 - 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$  se 100 scany, se spektrálním rozlišením 8. Čas snímání jednoho spektra se pohyboval okolo 1,5 min. Spektra byla měřena na integrační sféře v režimu reflektance s použitím

transflektační květy o tloušťce vrstvy 0,1 mm. Na Obrázku 1 je zobrazeno spektrum kozího mleziva.



Obrázek 1 Spektrum kozího mleziva

Naměřená data byla zpracována pomocí programu TQ Analyst verze 6.2.1.509 metodou částečných nejmenších čtverců (PLS) a ověřena pomocí křížové validace s použitím stejné sady vzorků jako při kalibraci. Při tomto postupu byl vždy vypuštěn jeden ze standardů a ze zbylých kalibračních dat byl vytvořen nový model, který byl použit pro výpočet vektoru koncentrací vypuštěného standardu. Vypočtené odchylky od deklarovaného obsahu složek vypuštěného standardu byly statisticky vyhodnoceny (Mlček et al., 2006). Pro identifikaci odlehklých spekter a standardů byly použity diagnostiky Spectrum Outlier a Leverage. Dále byl zvolen optimální počet PLS faktorů pro kalibraci (PRESS). Diagnostika PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares) zobrazuje, jak se hodnota sumy čtverců predikované zbytkové chyby mění s číslem faktorů použitých ke kalibraci každé složky stanovované aktivní metodou.

Výsledky analýz byly zpracovány programem Microsoft Excel 2007. U všech referenčních ukazatelů byly vypočteny souhrnné statistické charakteristiky (průměr, směrodatná odchylka, minimum, maximum).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Rozpětí referenčních hodnot pro všechny parametry byla vyjádřena pomocí směrodatných odchylek průměru (Tabulka 1).

Tabulka 1 Hodnoty jednotlivých parametrů zjištěné referenčními metodami

Parametr	n	X <sub>min</sub>	X <sub>max</sub>	X	S <sub>x</sub>
Bílkoviny (%)	193	0,42	20,16	5,13	2,64
Sušina (%)	182	9,84	31,91	16,10	3,27
Tps (%)	193	2,58	26,18	10,36	2,86
Tuk (%)	193	1,42	11,63	5,93	2,09
pH	193	3,63	6,53	6,46	0,31
Titr.kys.(°SH)	194	4	28	8,47	3,64

Pomocí diagnostických nástrojů Spectrum Outlier a Leverage byly odstraněny odlehklé standardy, u kterých byly nepřesně stanoveny referenční hodnoty, nebo se objevila spektrální odchylka. Kalibrační modely pro parametry obsah tukuprosté sušiny, obsah tuku a pH byly vytvořeny bez použití derivace, pro parametr titrační kyselost byla využita první derivace a pro parametry obsah bílkovin a celkový obsah sušiny byla využita

úprava druhou derivací. Kalibrační modely pro všechny sledované parametry byly vytvořeny pomocí PLS algoritmu. PLS využívá u vyšetřených vzorků spektrální a současně koncentrační informaci ke stanovení latentních proměnlivých PLS faktorů v souboru dat (Sørensen, Jepsen, 1998). Nejvyšší počet faktorů byl zaznamenán pro pH (10 faktorů), u parametru obsah bílkovin a obsah tuku prosté sušiny bylo zaznamenáno 9 faktorů, u obsahu sušiny a obsahu tuku bylo zaznamenáno 6 faktorů a u titrační kyselosti 5 faktorů. Spolehlivost kalibračního modelu byla ověřena křížovou validací. Pro vytvoření validačních modelů byla použita stejná sada vzorků jako při kalibraci. Křížová validace představuje pevnou závislost mezi hodnotami referenčními a hodnotami predikovanými. Přesnost validace byla posouzena na základě korelačních koeficientů validace (R) a standardních chyb validace (SECV) (Sørensen, Jepsen, 1998) (Tabulka 2).

Tabulka 2: Kalibrační a validační výsledky jednotlivých parametrů stanovené pomocí FT-NIR spektrometrie

Parametr	Kalibrace			Validace		
	R	SEC	CCV	R	SECV	PCV
Bílk. (%)	0,99	0,39	7,80	0,95	0,73	14,58
Sušina (%)	0,95	0,92	5,75	0,91	1,21	7,60
Tps (%)	0,95	0,82	7,85	0,94	0,92	8,76
Tuk (%)	0,81	1,14	18,89	0,78	1,23	20,38
pH	0,73	0,12	1,77	0,63	0,13	2,03
T.kys.(°SH)	0,89	1,43	17,62	0,86	1,60	19,72

R – korelační koeficient kalibrace nebo validace, SEC – standardní chyba kalibrace, CCV (%) – kalibrační variační koeficient, SECV – standardní chyba cross validace, PCV (%) – predikční variační koeficient

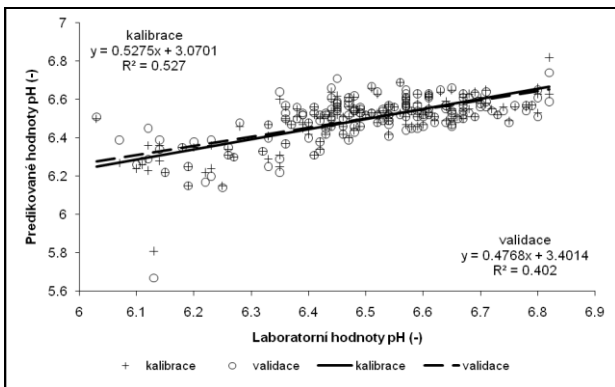
Na Obrázku 2 - 5 můžeme posoudit kalibrační a validační výsledky pro stanovení pH, bílkovin, sušiny a tuku. V případě plného překrývání regresních přímek se jedná o pevnou závislost. Dle posouzení regresních přímek bylo nejlepšího výsledku dosaženo pro parametr pH, kde jsou obě přímky téměř v zákrytu.

Překrývání regresních přímek je však jen jedním kritériem pro vyhodnocení výsledků. Dalšími ukazateli kvality kalibračního modelu je korelační koeficient kalibrace, resp. validace (R). V optimálním případě se jeho hodnota blíží číslu jedna a zároveň jsou hodnoty korelačního koeficientu pro kalibraci a korelačního koeficientu pro validaci co nejpodobnější. U parametru pH nebylo dosaženo tak vysokých hodnot korelačních koeficientů jako u ostatních parametrů, ale pokud vezmeme v úvahu další ukazatele kvality kalibračního modelu, CCV a PCV (kalibrační, resp. predikční variační koeficient), můžeme konstatovat, že kalibrační model pro tento parametr je velmi spolehlivý. CCV a PCV udávají míru spolehlivosti kalibrace NIR přístroje pro různé parametry. Jejich zhodnocením, kdy CCV u sledovaného parametru nepřesáhl hodnotu 5 % a PCV hodnotu 10 % můžeme kalibraci i validaci posoudit jako vysoce spolehlivé, pokud jeden z nich přesahuje danou hodnotu, jedná se o spolehlivý model a pokud oba koeficienty přesahují dané hodnoty, jedná se o nespolehlivý model (Albanell et al., 1999; Esbensen, 2003). Dle tohoto hodnocení bylo pro parametr obsah bílkovin, obsah sušiny a obsah tukuprosté sušiny dosaženo spolehlivé kalibrace, pro titrační kyselost a obsah tuku byla kalibrace nespolehlivá. Přesto však je u těchto parametrů z grafu patrná plná závislost hodnot predikovaných NIR přístrojem na hodnotách získaných referenčními metodami, v případě tuku se obě regresní přímky dokonce plně překrývají. Tato

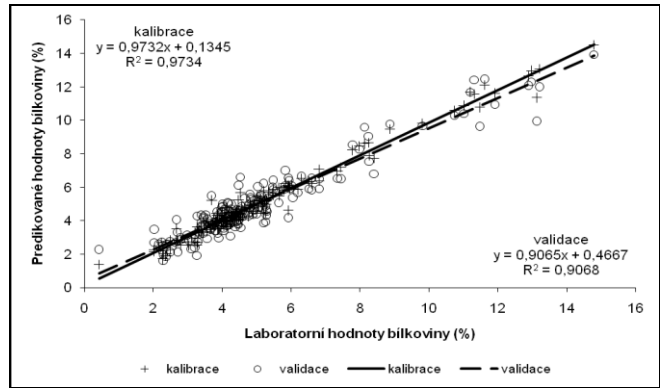
skutečnost je pravděpodobně způsobena samotným souborem dat, kdy k plnému překrytí přímek přispívá fakt, že hodnoty tuku rovnoměrně pokrývají celé rozpětí souboru dat. U ostatních parametrů je z grafů patrné, že hodnoty nejsou rozmístěny zcela rovnoměrně. FT-NIR spektrometrie není primární metodou, proto se u ryze přírodních substancí s proměnlivým složením, naplno projeví vliv kvality vkládaných informací na kvalitu kalibračního modelu.

U obsahu tuku a titrační kyselosti bylo dosaženo vysokých korelačních koeficientů kalibrace i validace, z grafů je patrná plná závislost regresních přímek, ale CCV a PCV jednoznačně vypovídají o nespolehlivosti vytvořených modelů. Tato nesrovnalost je zřejmě způsobena tím, že mlezivo se od porodu až do pátého dne po porodu postupně mění v mléko a některé parametry tedy mohou svými hodnotami odpovídat spíše mléku než mlezivu. Je tedy velmi obtížné říci, zda sekret vylučovaný mléčnou žlázou je čistě jen mlezivo nebo už mléko, zvláště čtvrtý a pátý den po porodu. Navíc v rámci jednoho vzorku se mohou hodnoty parametrů lišit a ovlivňují tak vzhled naměřených spekter, která pak nezapadají do celého souboru dat. Ani pomocí diagnostik Spectrum Outlier a Leverage nemohou být taková data všechna vyloučena, jelikož při odstranění příliš vysokého množství odlehklých dat se výrazně snižuje robustnost celého modelu.

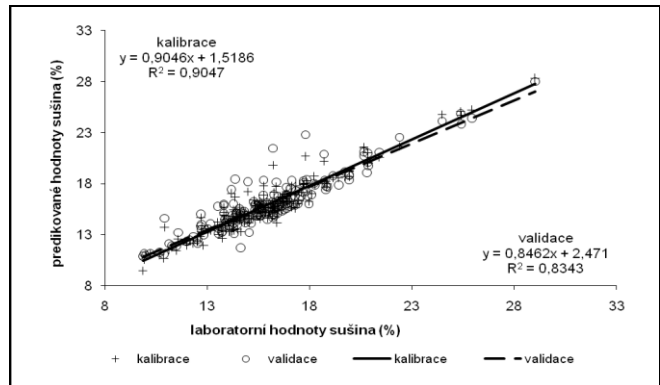
Navrátilová et al. (2006) se ve své práci zabývají využitím FT-NIR spektrometrie v analýze kravského mleziva. Se soubory dat o počtu vzorku 90 a 60 se jim podařilo vyvinout pro parametry obsah sušiny, tuku, tukuprosté sušiny a bílkovin velmi spolehlivé kalibrace a pro parametr laktóza kalibraci spolehlivou. Ve své práci využívají srovnání s publikacemi popisujícími využití NIR spektrometrie pro hodnocení mléka. Mlezivo je však natolik unikátní a svým obsahem mnoha biologicky aktivních látek natolik odlišné od normálního mléka, že ačkoli majoritní složky obou substancí jsou totožné, složky minoritní, především obsah specifických funkčních bílkovin a především jejich struktura mají velký vliv na měření spekter a jejich vyhodnocování a tím ovlivňují i výsledek celé kalibrace.



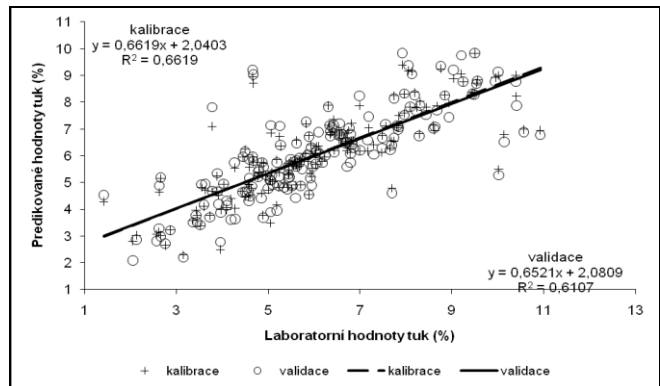
Obrázek 2: Hodnoty pro parametr pH predikované NIR proti hodnotám měřeným referenční metodou



Obrázek 3: Hodnoty pro parametr obsah bílkovin predikované NIR proti hodnotám měřeným referenční metodou



Obrázek 4: Hodnoty pro parametr obsah sušiny predikované NIR proti hodnotám měřeným referenční metodou



Obrázek 5: hodnoty pro parametr obsah tuku predikované nir proti hodnotám měřeným referenční metodou

### ZÁVĚR

Zhodnocení výsledků bylo provedeno na základě korelace mezi referenčními hodnotami a hodnotami vypočtenými pomocí FT-NIR spektrometrie. Korelační koeficienty (R) se přibližují hodnotě 1, což je pro použitelnost modelu nejvhodnější. Spolehlivost celého kalibračního modelu byla posouzena na základě korelačních variačních koeficientů (CCV) a predikčních variačních koeficientů (PCV). Pro pH byl získán velmi spolehlivý kalibrační model, pro obsah bílkovin, sušiny a tukuprosté sušiny byly získány modely spolehlivé a pro obsah tuku a titrační kyselost nebylo dosaženo spolehlivých modelů. Výsledky studie naznačují vhodnost použití FT-NIR spektrometrie pro hodnocení fyzikálně chemických parametrů mleziva, v závislosti na

kvalitě vstupních dat, s poukázáním na důležitost jejich výběru. Pro optimalizaci použití metody pro vyšetření mleziva by bylo vhodné nashromáždit dostatek dat v rámci jednotlivých dní od porodu a vytvořit tak homogennější soubory dat, které by byly podkladem pro vývoj kalibračních modelů s vyšší spolehlivostí.

### LITERATURA

ALBANELL, E., CÁCERES, P., CAJA, G., MOLINA, E., GARGOURI, I., 1999. Determination of fat, protein and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy. In *Journal of AOAC International*, vol. 82, 1999, p. 753-758.

COZZOLINO, D., CORBELLA, E., 2003. Determination of honey quality components by near infrared reflectance spectroscopy. In *Journal of Apicultural Research*, vol. 1-2, 2003, p. 16 – 20.

ČSN 57 0536. Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem. 1999-02.

ČSN 57 0530. Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. 1972-05.

ČSN 57 0107. Metody zkoušení sýrů, tvarohů, krémů a pomazánek. 1966-06.

ČURDA, L., KUKAČKOVÁ, O., NOVOTNÁ, M., 2002. NIR spektroskopie a její využití při analýze mléka a mléčných výrobků. In *Chemické Listy*, vol. 96, 2002, p. 305-310.

DÍAZ-CARRILLO, E., MUÑOZ-SERRANO, A., ALONSO-MORAGA, A., SERRADILLA-MANRIQUE, J.M., 1993. Near infrared calibrations for goat's milk components: protein, total casein,  $\alpha_s$ ,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins, fat and laktose. In *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, vol.1, 1993, p. 141-146.

ESBENSEN, K., 2003. Multivariate analysis in practise. [online] Publikováno 22. 4. 2003. [citováno 9. 12. 2010]. Dostupné z <<http://www.spectroscopynow.com>>.

JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., 2003. Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 21, 2003, p. 125-128.

LAPORTE, M.F., PAQUIN, P., 1999. Near infrared analysis of fat, protein and casein in cow's milk. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, 1999, p. 2600-2605.

MLČEK, J., ŠUSTOVÁ, K., SIMEONOVÁ, J., 2006. Application of FT NIR spectroscopy in the determination of basic chemical composition of pork and beef. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 6, 2006 p. 361-368.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1662/2006 ze dne 6. listopadu 2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.

NAVRÁTILOVÁ P., L. HADRA, M. DRAČKOVÁ, B. JAŠTOVÁ, L. VORLOVÁ, L. PAVLATA., 2006. Use of FT-NIR spectroscopy for bovine colostrum analysis. In *Acta Veterinaria Brunensis*, vol. 75, 2006 , p. 57-63.

PAKKANEN, R., AALTO, J., 1997. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. In *International Dairy Journal*, vol. 7, 1997, p. 285-297.

PRIETO, N., ANDRÉS, S., GIRÁLDEZ, F. J., MANTECÓN, A. R., LAVÍN, P., 2006. Potential use of

near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the estimation of chemical composition of oxen meat samples. In *Meat Science*, vol. 74, 2006, p. 487 - 496.

RODRIGUEZ-OTERO, J. L., HERMIDA, M., CENTENO, J., 1997. Analysis of dairy products by near infrared spectroscopy: A review. In *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 8, 1997, p. 2815 – 2819.

SØRENSEN, L.K., JEPSEN, R., 1998. Assessment of sensory properties of cheese by near-infrared spectroscopy. In *International Dairy Journal*, vol. 81, 1998, p. 863-871.

VIVO-SESE, I., PLA, M.D., 2007. Bioactive Ingredients in Cosmetics, In: Amparo Salvador, Alberto Chisvert, Amparo Salvador Carreno, Alan Townshend and Amparo Salvador Carreno, Editor(s). *Analysis of Cosmetic Products*. 2007, p. 380-389.

### Poděkování:

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

### Kontaktní adresa:

MVDr. Zuzana Procházková, Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika. Tel. +420 541 562 722, email: [zprochazkova@vfu.cz](mailto:zprochazkova@vfu.cz)

Monika Plátová, Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika. Email: [monikaplatova@centrum.cz](mailto:monikaplatova@centrum.cz)

MVDr. Michaela Dračková, Ph.D., Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika. Tel.: +420 541 562 714, email: [drackovam@vfu.cz](mailto:drackovam@vfu.cz)

Doc. MVDr. Bohuslava Janštová, Ph.D., Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika. Tel.: +420 541 562 2712, email: [janstovab@vfu.cz](mailto:janstovab@vfu.cz)

Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D., Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika. Tel.: +420 541 562 2710, email: [vorloval@vfu.cz](mailto:vorloval@vfu.cz)