

Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 93 (2002)
Heft: 1

Artikel: Potenzial der FT-IR-Spektrometrie als analytische Schnellmethode in der Molkenkonzentrierung
Autor: Luginbühl, Werner
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-981713>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 13.05.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Potenzial der FT-IR-Spektrometrie als analytische Schnellmethode in der Molkenkonzentrierung

Werner Luginbühl, Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft (FAM)
Liebefeld, Bern

Eingegangen 14. November 2001, angenommen 21. Januar 2002

Einleitung

Die bei der Konzentrierung von Molke mittels Ultrafiltration auftretenden Konzentrationsänderungen der Inhaltsstoffe können mit klassisch-chemischen Analysemethoden nicht genügend rasch verfolgt werden. Für die Prozessführung ist es jedoch wünschenswert, Gehaltswerte möglichst verzugsfrei zur Verfügung zu haben. Insbesondere gilt dies für die Proteinkonzentration im Retentat. Die Fourier Transform Infrarot (FT-IR)-Spektrometrie, sei es im mittleren oder im nahen Infrarot (MIR oder NIR), ist für diese Art der Schnellbestimmung prädestiniert. Voraussetzung für diese indirekten Messmethoden ist jedoch eine die Gesamtvariabilität des Messgutes umfassende Kalibrierung der spektrometrischen Messung (1).

Zur Anwendung der NIR-Spektrometrie in der Prozesskontrolle bei der Herstellung und Verarbeitung von Lebensmitteln wurde sehr viel publiziert. Zur Analyse von Veränderungen während der Verarbeitung von Molke wurde die NIR-Spektrometrie von *Pouliot et al.* (2) eingesetzt. Untersucht wurden dabei die thermische Denaturierung bei der Erhitzung, die Veränderung der Zusammensetzung (Gesamtstickstoff (TN), Nicht-Protein-Stickstoff (NPN), Laktose) des Retentats bei der Ultrafiltration und der Hydrolysegrad eines Molkenproteinkonzentrats während der Hydrolyse mit Trypsin. Für die Proteinbestimmung wurde eine Partial Least Squares (PLS)-Kalibrierung mit 38 Proben erstellt, die Validierung erfolgte mit 11 Proben. Der Standardfehler der Kreuzvalidierung (SECV, Standard Error of Cross Validation) betrug mit 5 PLS-Faktoren 0,024 g/100 g. Die Validierung ergab eine Standardabweichung der Differenzen zwischen Referenz- und IR-Werten von 0,33 g/100 g. Der Proteingehalt der Proben für die Kalibrierung war im Bereich von 0,8 bis 4,5 g/100 g.

Die MIR-Spektrometrie hat für on-line Messungen noch wenig Verbreitung gefunden, weil die Herstellung von MIR-Lichtleiterfasern wesentlich aufwendiger und damit teurer ist. Für die Laboranalytik von ultrafiltrierten Molkenkonzentraten hat die Firma Foss Electric A/S (Dänemark) eine gerätespezifische, kommerzielle Partial Least Squares (PLS) Basiskalibrierung für die Protein- und Trockensubstanz (TS)-Bestimmung für das FT-IR-Spektrometer «MilkoScan FT120» erstellt. Besitzer dieses Gerätetyps können diese Kalibrierung kaufen, müssen jedoch eine Endkalibrierung mit eigenen Proben durchführen (sog. Slope/Intercept Kalibrierung). Die Basiskalibrierung ist in einer «Foss Electric Application Note» beschrieben (3). Es ist dies die einzige dem Verfasser bekannte Publikation zur FT-IR spektrometrischen Bestimmung des Proteingehaltes in ultrafiltrierter Molke im mittleren Infrarot. Für diese Basiskalibrierung wurden 77 ultrafiltrierte Molkenkonzentrate aus Frankreich und Deutschland verwendet. Der Proteingehalt reichte von 1,96 bis 22,3 g/100 g; die TS von 10,1 bis 27,1 g/100 g. Der Standardfehler der Kreuzvalidierung (berechnet als RMSEP, Root Mean Square Error of Prediction) mit fünf PLS-Faktoren betrug 0,132 g/100 g, die Wiederholbarkeit war 0,021 g/100 g. Die Validierung mit 30 unabhängigen Proben ergab für die Proteinbestimmung einen RMSEP von 0,127 g/100 g und eine Wiederholbarkeit von 0,011 g/100 g.

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, die Anwendbarkeit der FT-IR-Spektrometrie zur raschen Analyse des Retentats bei der Molkenkonzentrierung zu beurteilen, dies bei möglichst geringem Aufwand für die Kalibrierung und ohne Verwendung geräteabhängiger, kommerzieller Analysenverfahren.

Material und Methoden

Proben

Die Proben wurden in zwei Versuchen hergestellt. Aus dem ersten Versuch (V1) standen sieben Proben (1 Molke, 6 Retentate), aus dem zweiten Versuch (V2) nur fünf Proben (1 Molke, 4 Retentate) für die IR-Spektrometrie zur Verfügung (je ca. 40 ml). Die Molke (und damit auch die Retentate) waren mit Bronopol konserviert (0,02 g/100 g) und wurden vor der Aufnahme der Spektren wenige Tage bei 4°C gelagert. Die chemisch-analytischen Referenzwerte für die Kalibrierung und Validierung der IR-spektrometrischen Messung wurden in den akkreditierten Laboratorien der Forschungsanstalt ermittelt; Werte und Methoden sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

FT-IR-Spektrometrie

Die Aufnahme der Transmissions-Einstrahlspektren der auf 40°C erwärmten Proben erfolgte in einer auf 40°C thermostatisierten CaF₂-Flüssigkeitszelle (optische Schichtdicke 36,6 µm) eines Hochdruckhomogenisators (Delta Instruments) mit einem FT-IR-Spektrometer (FTS-7 von Bio-Rad, Wolfram IR-Quelle, DTGS-

Tabelle 1

Referenzwerte der Proben (g/kg) nach den Methoden (8–12)

Versuch	Probenbezeichnung	TN ^a	NPN ^b	TPN ^c	LMH ^d	TS ^e	Asche
V1	UF-Molke 1	0,71	0,28	0,43	42,40	48,95	4,19
V1	Retentat 1	1,48	0,51	0,98	93,30	109,17	9,32
V1	Retentat 2	1,36	0,41	0,95	87,50	101,16	7,44
V1	Retentat 3	1,08	0,30	0,78	44,30	54,14	4,32
V1	Retentat 4	0,39	0,30	0,09	53,50	59,28	5,37
V1	Retentat 5	1,16	0,35	0,81	72,20	83,58	6,23
V1	Retentat 6	0,27	0,24	0,03	11,50	15,45	3,05
V2	UF-Molke 2	0,70	0,28	0,42	40,70	48,92	4,18
V2	Retentat 7	1,24	0,34	0,90	62,00	74,95	5,53
V2	Retentat 8	1,33	0,41	0,92	86,00	100,40	7,06
V2	Retentat 9	1,28	0,38	0,91	81,30	95,95	6,38
V2	Retentat 10	1,45	0,48	0,97	89,20	107,78	9,06
	Minimum	0,27	0,24	0,03	11,50	15,45	3,05
	Maximum	1,48	0,51	0,98	93,30	109,17	9,32

^aTN = Gesamtstickstoff^bNPN = Nicht-Protein-Stickstoff^cTPN = Protein-Stickstoff («True Protein Nitrogen» berechnet: TPN = TN - NPN)^dLMH = Laktosemonohydrat^eTS = Trockensubstanz

Detektor, KBr Strahlenteiler) im Bereich von 3000 bis 900 cm⁻¹ mit einer spektralen Auflösung von 4 cm⁻¹. Für jedes Spektrum wurden 16 Scans akkumuliert. Die Referenzspektren wurden unter gleichen Bedingungen mit entmineralisiertem Wasser erstellt.

Entsprechend der Durchführung der Ultrafiltrationsversuche V1 und V2 wurden die Spektren in einem zeitlichen Abstand von etwas mehr als einem Monat aufgenommen.

Auswertungen

Aus den Einstrahlspektren der 12 Proben wurden die Absorptionsspektren berechnet (4) und als Kalibrier- bzw. Validierspektren verwendet. Die Spektralbereiche für die Kalibrierungen (3000–1700 cm⁻¹ und 1590–975 cm⁻¹, insgesamt 995 Absorptionswerte pro Spektrum) wurden aufgrund üblicher Kriterien (u.a. Bestimmtheitsmasse zwischen den Konzentrationen und Absorptionswerten) gewählt. Abbildung 1 zeigt die IR-Spektren aller Proben mit den verwendeten Spektralbereichen.

Die PLS-Kalibrierungen und Kreuzvalidierungen, wie auch die Validierung durch Analyse unabhängiger Proben, wurden mit dem Programm PLSplus/IQ (5) ausgeführt, die statistischen Kennzahlen der Validierung wurden mit Excel (6) berechnet.

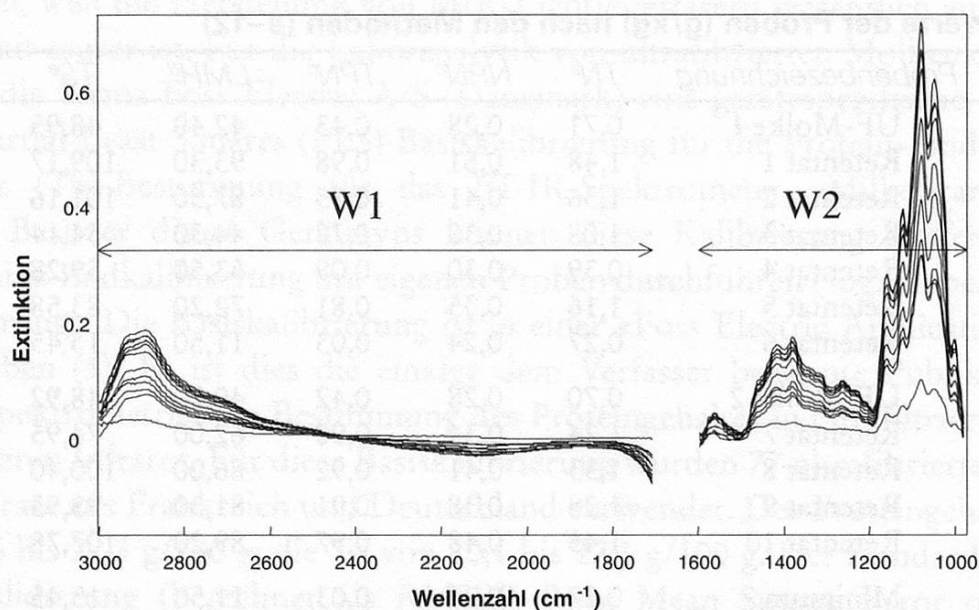


Abbildung 1 **IR-Spektren aller Proben.** W1 und W2 bezeichnen die ausgewerteten Bereiche

Ergebnisse und Diskussion

In den Tabellen 2 und 3 sind die Resultate der PLS-Kreuzvalidierung und der unabhängigen Validierung für das Merkmal Gesamtstickstoff (TN) bzw. Rohprotein (berechnet als $TN \times 6,38$) zusammengestellt. Die Ergebnisse der übrigen Merkmale sind aus Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 2

Ergebnisse der Kreuzvalidierung der PLS-Kalibrierungen für TN und Rohprotein
(Werte in Klammern)

Kalibrierproben (Anzahl Spektren)	PLS-Faktoren	SECV g/kg	r^2	Bias g/kg
V1 (7)	3	0,07 (0,45)	0,9742	-0,004 (-0,02)
V1 (7)+V2 (5)	3	0,07 (0,42)	0,9735	-0,002 (-0,02)

Tabelle 3

Ergebnisse der Validierung für die Bestimmung des TN und Rohprotein
(Werte in Klammern)

Kalibrierproben (Anzahl Spektren)	Validierproben (Anzahl Spektren)	PLS- Faktoren	RMSEP g/kg	SEP g/kg	r^2	Bias g/kg
V1 (7)	V2 (5)	3	0,08 (0,53)	0,06 (0,40)	0,9639	-0,05 (-0,35)

Tabelle 4

Ergebnisse der Validierungsanalysen der fünf Proben von V2 (Kalibrierung mit den sieben Proben von V1). *Werte in g/kg

Probe	Merkmal ^a	Referenzwert*	IR-Analyse*	Differenz IR-Referenz*	Rel. Differenz %	Statistik	Wert
UF-Molke 2	NPN	0,28	0,29	0,01	4,60	bias*	0,01
Retentat 7	NPN	0,34	0,36	0,02	4,75	r ²	0,8572
Retentat 8	NPN	0,41	0,43	0,02	4,45	RMSEP*	0,03
Retentat 9	NPN	0,38	0,41	0,04	10,49	SEP*	0,03
Retentat 10	NPN	0,48	0,44	-0,04	-8,56		
UF-Molke 2	TPN	0,42	0,25	-0,17	-39,78	bias*	-0,14
Retentat 7	TPN	0,90	0,80	-0,10	-11,43	r ²	0,9872
Retentat 8	TPN	0,92	0,80	-0,12	-13,13	RMSEP*	0,16
Retentat 9	TPN	0,91	0,78	-0,13	-14,19	SEP*	0,08
Retentat 10	TPN	0,97	0,79	-0,17	-17,92		
UF-Molke 2	LMH	40,70	40,25	-0,45	-1,11	bias*	1,23
Retentat 7	LMH	62,00	63,47	1,47	2,38	r ²	0,9981
Retentat 8	LMH	86,00	86,53	0,53	0,62	RMSEP*	1,90
Retentat 9	LMH	81,30	82,84	1,54	1,90	SEP*	1,45
Retentat 10	LMH	89,20	92,26	3,07	3,44		
UF-Molke 2	TS	48,92	50,65	1,73	3,53	bias*	1,80
Retentat 7	TS	74,95	77,29	2,34	3,12	r ²	0,9992
Retentat 8	TS	100,40	102,45	2,06	2,05	RMSEP*	2,13
Retentat 9	TS	95,95	98,21	2,26	2,35	SEP*	1,14
Retentat 10	TS	107,78	108,39	0,61	0,56		
UF-Molke 2	Asche	4,18	4,44	0,26	6,25	bias*	0,36
Retentat 7	Asche	5,53	6,11	0,58	10,54	r ²	0,8303
Retentat 8	Asche	7,06	7,77	0,72	10,18	RMSEP*	0,86
Retentat 9	Asche	6,38	7,51	1,13	17,67	SEP*	0,78
Retentat 10	Asche	9,06	8,19	-0,87	-9,62		

^aNPN = Nicht-Protein-Stickstoff; TPN = Protein-Stickstoff («True Protein Nitrogen» berechnet: TPN = TN - NPN); LMH = Laktosemonohydrat; TS = Trockensubstanz

Auffallend ist, dass die Leistungsmerkmale der Kreuzvalidierung durch den Einbezug der Proben aus V2 nicht wesentlich verändert wurden. Daraus und aus der gleichbleibenden Anzahl von PLS-Faktoren lässt sich schliessen, dass die spektroskopische Gesamtvariabilität der 12 Proben bereits mit den sieben Proben aus dem Versuch V1 erschlossen war. Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, dass dies für die referenzanalytisch ermittelten Inhaltsstoffe zutrifft, in dem Sinne, dass alle Konzentrationen aus V2 innerhalb der Konzentrationsbereiche aus Versuch V1 liegen. Daraus folgt weiter, dass die fünf Proben aus dem Versuch V2 für die Validierung geeignet waren (dies wäre nicht der Fall, wenn die minimalen und maximalen Konzentrationen ausserhalb des kalibrierten Bereichs lägen).

Um die Ergebnisse der Kreuzvalidierung und der Validierung mit den in der Einleitung erwähnten Publikationen zu vergleichen (was in Anbetracht der sehr verschiedenen Konzentrationsbereiche und Probenzahlen wenig sinnvoll ist), müssen die Rohproteinergebnisse in den Tabellen 1 und 2 durch 10 dividiert werden. Interessanter ist die Feststellung, dass die geringen Rohproteinkonzentrationen der Validierungsproben aus Versuch V2 (0,45 bis 0,925 g/100 g) mit einer Präzision von 0,04 g/100 g bestimmt werden konnten (Tabelle 3, SEP). Der Bias von rund -0,03 g/100 g ist analytisch kein Problem, weil diese Abweichung durch die Messung von Referenzproben erkannt und korrigiert werden kann (sog. Bias- oder Intercept-Korrektur). Diese Leistungsdaten der Validierung sind im Rahmen der bei der IR-Analytik von Milch erreichten Genauigkeit, wie sie auch im FIL/IDF-Standard 141C:2000 (bzw. in der identischen Norm ISO 9622:1999) für die Milchinhaltsstoffe Fett, Protein und Laktose gefordert wird (7).

Bemerkenswert sind auch die guten Validierungsergebnisse für Laktosemonohydrat und die TS (siehe Tabelle 4). Die relativen Fehler der IR-Bestimmung dieser zwei Merkmale sind alle kleiner als 3,6 %.

Schlussfolgerungen

Dass aus den vorliegenden Resultaten noch keine endgültigen Schlüsse gezogen werden können, liegt auf der Hand. Trotzdem kann man ohne weiteres Folgendes feststellen:

Die Bestimmung des Rohprotein-, Laktose- und Trockensubstanzgehalts in UF-Molke mittels FT-IR-Spektrometrie ist mit guter Präzision und Richtigkeit möglich, wenn die chemisch-physikalische Beschaffenheit der Kalibrierproben repräsentativ für die zu untersuchenden Proben ist. Die Genauigkeit der IR-spektrometrischen Reinproteinanalyse kann durch eine Erhöhung der Anzahl Kalibrierproben vermutlich noch verbessert werden. Allerdings ist bei diesem Merkmal zu bedenken, dass bereits die zur Kalibrierung verwendeten Referenzwerte für den TPN eine höhere Messunsicherheit aufweisen als die Referenzwerte für TN und NPN, weil beide Terme der Differenz TN-NPN mit der Messunsicherheit der Kjeldahl-Analyse behaftet sind (d.h., für TPN kann theoretisch nicht die gleiche Genauigkeit erreicht werden wie für TN oder NPN).

Der Aufwand für die PLS-Kalibrierung kann durch eine optimale Auswahl der Kalibrierproben gering gehalten werden. Es muss jedoch sichergestellt werden, dass die gesamte chemisch-physikalische Variabilität des zukünftigen Messgutes in der Kalibrierung erfasst wird.

Da es sich bei der quantitativen IR-Spektrometrie um eine indirekte Methode handelt, ist es notwendig, mit jeder IR-Messreihe an unbekannten Proben zusätzlich Kontrollproben bekannter Zusammensetzung zu messen, um gegebenenfalls eine Bias-Korrektur vornehmen zu können.

Die hier untersuchten Protein- und TS-Gehalte der Retentate waren eher tiefer als üblich und es wird weitere Untersuchungen brauchen, um die Leistung der IR-Methode bei höheren Gehalten zu ermitteln.

Generell gilt auch bei dieser Anwendung der quantitativen IR-Analytik, dass der Einsatz nur wirtschaftlich ist, wenn eine Kontinuität in der Pflege und Überwachung der Kalibrierungen gewährleistet ist und wenn regelmässig Serien von Proben untersucht werden.

Zusammenfassung

Um die Eignung der Fourier Transform Infrarot (FT-IR)-Spektrometrie zur raschen Analyse von Retentaten ultrafiltrierter Molke zu beurteilen, wurden Partial Least Squares (PLS)-Kalibrierungen erstellt, deren Qualität durch Kreuzvalidierung und durch die Analyse unabhängiger Proben beurteilt wurde. Für die Bestimmung des Rohproteingehaltes betrug der Standardfehler der Kreuzvalidierung (SECV) 0,42 g/kg (3 PLS-Faktoren, 12 Proben) und der Standardfehler der Vorhersage (SEP) 0,40 g/kg (7 Kalibrierproben, 3 PLS-Faktoren, 5 Validierproben). Trotz des beschränkten Umfangs der Untersuchung kann gesagt werden, dass die FT-IR-Spektrometrie als Methode zur raschen Analyse von ultrafiltrierten Molkeretentaten eingesetzt werden kann, dies bei geringem Aufwand für die Kalibrierung. Durch die rasche Verfügbarkeit der Gehaltswerte werden gezielte Veränderungen von Prozessparametern während der Ultrafiltration ermöglicht.

Résumé

En vue d'apprécier l'applicabilité de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) par rapport à l'analyse rapide des rétentats de lactosérum ultrafiltré, on a effectué des calibrages à moindres carrés partiels (PLS) dont la qualité a été appréciée au travers de la validation croisée et de l'analyse d'échantillons indépendants. En ce qui concerne la détermination de la teneur en protéine brute, l'erreur standard de validation croisée (SECV) s'est élevée à 0,42 g/kg (3 variables latentes PLS, 12 échantillons) et l'erreur standard de prédiction (SEP) à 0,40 g/kg (7 échantillons de calibrage, 3 variables latentes PLS, 5 échantillons de validation). Malgré l'étendue limitée de l'étude, on peut dire que l'on peut utiliser la spectromé-

trie IR-TF en tant que méthode pour analyser rapidement les rétentats de lactosérum ultrafiltré, cela étant peu exigeant au niveau du calibrage. Vu que l'on peut disposer rapidement des résultats analytiques relatives aux teneurs, il est désormais possible de procéder, au cours de l'ultrafiltration, à des modifications ciblées des paramètres du processus.

Summary "Potential of FT-IR Spectrometry for Rapid Analysis in Whey Concentration"

The suitability of Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrometry for the rapid analysis of ultrafiltrated whey retentates was assessed on Partial Least Squares (PLS) calibrations by cross validation as well as by analyses of independent samples. The Standard Error of Cross Validation (SECV) and the Standard Error of Prediction (SEP) in the determination of crude protein was 0.42 g/kg (3 PLS factors, 12 samples) and 0.40 g/kg (7 calibration samples, 3 PLS factors, 5 validation samples), respectively. Despite the limited scope of this study it can be concluded that FT-IR spectrometry may be used for the rapid analysis of ultrafiltrated retentates with modest expenditure of calibration. The quick availability of the measured contents allows the controlled adjustment of process parameters during ultrafiltration.

Key words

FT-IR spectrometry, Whey, Protein, Rapid method, Multivariate calibration

Literatur

- 1 Martens, H. and Naes, T.: Multivariate calibration, 2nd printing, 305 ff. John Wiley and Sons, Chichester 1996.
- 2 Pouliot, M., Paquin, P., Martel, R., Gauthier, S.F. and Pouliot, Y.: Whey changes during processing determined by near infrared spectroscopy. *J. Food Sci.* **62**, 475–479 (1997).
- 3 Foss Electric A/S: Application Note No. 110, Ultrafiltrated Whey Calibration, P/N 578963, 1998.
- 4 Galactic Industries Corporation: GRAMS/32 User's Guide Vs. 5.2, Salem, NH, USA 1999.
- 5 Galactic Industries Corporation: PLSplus/IQ for GRAMS/32 Vs. 5.07, Salem, NH, USA 1997.
- 6 Microsoft Corporation (1997), Excel 97.
- 7 International Dairy Federation: FIL/IDF International Standard 141C:2000 Whole milk – Determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments.
- 8 International Dairy Federation: FIL/IDF International Standard 20B:1993 Milk. Determination of nitrogen content. Part 1 – Kjeldahl method, Part 3 – Block digestion method (semi-micro rapid routine method).
- 9 International Dairy Federation: FIL/IDF International Standard 20B:1993 Milk. Determination of nitrogen content. Part 4 – Determination of non-protein-nitrogen content.
- 10 Boehringer GmbH: Methoden der biochemischen Analytik und Lebensmittelanalytik, Mannheim 1986.

- 11 International Dairy Federation: FIL/IDF International Standard 21B:1987 Milk, cream and evaporated milk. Determination of total solids content.
- 12 Schweizerisches Lebensmittelbuch: Kapitel 1/5.3 Bestimmung der Asche – gravimetrisch. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1987.

Dr. Werner Luginbühl, Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft (FAM) Liebefeld, Chemie und Physik, Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern,
E-mail: werner.luginbuehl@fam.admin.ch