

Adam Florkiewicz

**WALIDACJA PROCEDURY OZNACZANIA BIAŁKA
W MLEKU PEŁNYM LUB CZĘŚCIOWO ODTŁUSZCZONYM
METODĄ FTIR (DETEKCJA W ZAKRESIE PODCZERWIENI
Z WYKORZYSTANIEM ANALIZY *FOURIERA*)**

Małopolskie Centrum Monitoringu i Atestacji Żywności Uniwersytetu Rolniczego
w Krakowie

Kierownik: prof. dr hab. *E. Cieślik*

Przeprowadzono walidację metody oznaczania zawartości białka w mleku pełnym lub częściowo odtłuszczonym opartej na spektrofotometrii w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR) z wykorzystaniem urządzenia MilkoScan FT 120 firmy FOSS. Podstawowy materiał badawczy stanowiło mleko krowie dobrej jakości oraz mleko wzorcowe. Przeprowadzone sprawdzenie udowodniło wiarygodność tej metody analitycznej i wykazało, że spełniona ona wymagania dotyczące zakładanych kryteriów.

Hasła kluczowe: walidacja, białko, mleko, FTIR.

Key words: validation, protein, milk, FTIR.

Badanie właściwości fizyko-chemicznych mleka i produktów mlecznych klasycznymi metodami chemicznymi jest często bardzo czasochłonne, analitycznie trudne, a wykorzystywane odczynniki dodatkowo niekorzystnie oddziałują na środowisko. Stąd wprowadzane są inne szybkie i dokładniejsze metody np. pracujące w oparciu o spektrofotometrię w podczerwieni z transformatą *Fouriera* (FTIR). Jest to instrumentalna metoda analityczna stosowana w zakresie podczerwieni i tzw. dalekiej podczerwieni ($25\text{--}1000\cdot 10^{-6}$ m). Promieniowanie polichromatyczne jest dzielone na dwie wiązki. Po przejściu jednej wiązki przez próbkę interferuje ją z wiązką z tego samego źródła, która jednak nie przeszła przez próbkę. Dzięki zmieniającej się w czasie różnicy dróg optycznych docierają one do detektora przesunięte w czasie dając interferogram. Tak uzyskana zależność natężenia promieniowania od różnicy dróg optycznych wiązek promieniowania zostaje przekształcona w widmo (wykres zależności natężenia promieniowania od długości fali) (1). Według normy EN/PN 17025:2001 walidacja metod badawczych stosowanych w laboratoriach, jest potwierdzeniem przez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały spełnione wymagania dotyczące zamierzonego zastosowania. Pojęcie walidacja metody analitycznej obejmuje proces, który polega na eksperymentalnym udokumentowaniu stopnia wiarygodności metody analitycznej i wykazaniu, że metoda jest przydatna do rozwiązywania danego zadania analitycznego (2, 3, 4).

Celem pracy było przeprowadzenie walidacji metody oznaczania zawartości białka w mleku pełnym lub częściowo odtłuszczonym opartej na spektrofotometrii

w podczerwieni z transformatą *Fouriera* (FTIR) z wykorzystaniem urządzenia MilkoScan FT 120 firmy FOSS.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło:

- Mleko krowie dobrej jakości o zawartości białka ok. 3,4%;
- Mleko surowe wzorcowe (Laboratorium Referencyjnym z/s w Paszniewie, ul. Przyszłości 1, 05-804 Pruszków);
- Lacprodan 80 nr katalogowy 4329611 firmy FOSS, preparat zawierający 80% białek serwatkowych;
- S-6060 Zero Liquide Concentrate nr katalogowy 6000656, płyn zerujący MilkoScan FT 120 firmy FOSS;
- S-470 Cleaning Agent, nr katalogowy 5310611 firmy LECO, środek myjący MilkoScan FT 120 firmy FOSS.

Wszystkie analizy wykonano z wykorzystaniem analizatora MilkoScan FT120 firmy FOSS działającego wg metody FTIR (1). Mleko świeże i zakonserwowane dwuchromianem potasu było poddane analizie po wcześniejszym podgrzaniu w łaźni wodnej w temp. 40°C (firmy Elpin+) i wymieszaniu zawartości, niepowodującego nadmiernego pienienia ani wzburzenia (5, 6).

W celu przeprowadzenia walidacji metody wyznaczono zakres roboczy próg wykrywalności i oznaczalności, precyzję, poprawność, odzysk oraz wyliczono całkowitą standardową niepewność pomiaru. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Excel v. 7.0.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W celu wyznaczenia zakresu roboczego oznaczania zawartości białka wykonano analizę dziesięciu próbek o różnym stężeniu wodnego roztworu preparatu Lacprodan 80 w trzech powtórzeniach y_n . Wyniki wraz z wyliczoną wartością średnią \bar{y} zestawiono w tab. I.

Zakres roboczy powinien odznaczać się liniowością oraz akceptowalną poprawnością i precyzją. Aby sprawdzić czy uzyskane wyniki posiadają porównywalną precyzję w całym zakresie roboczym, a rozrzut wyników jest jednakowy niezależnie od stężenia przeprowadzono test F-Snedecora wariancji najniższego i najwyższego stężenia. $F_{obl.}$ było równe 4, natomiast odczytane z tabeli $F_{kryt.} = 19$ (2). Ponieważ $F_{obl.} < F_{kryt.}$, więc różnica współczynników zmienności była nieistotna statystycznie i zaakceptowano powyższy zakres roboczy.

Według wielu autorów najlepszą miarą zależności zmiennych x i y jest współczynnik korelacji r . Im wartość bezwzględna współczynnika korelacji bliższa jest jedności, tym silniejszy jest związek pomiędzy zmiennymi (2, 4). Uzyskana wartość współczynnika była równa 1,000.

W celu dalszego testowania liniowości krzywej kalibracji obliczono współczynniki regresji a i b . Współczynnik nachylenia krzywej kalibracji b wynosił 0,977, natomiast współczynnik przesunięcia a 0,141. Ponieważ współczynniki b i a obar-

zione są niepewnością przeprowadzono testowanie ich istotności. Na podstawie wartości b i odchylenia standardowego S_b wyznaczono wartość t_{obl} (62,59) i porównano z wartością dystrybuanty rozkładu t -Studenta (t_{kryt}) dla $n - 2$ stopni swobody ($f = 8$) i poziomu istotności $\alpha = 0,05$ (2,31). Współczynnik nachylenia tego równania regresji jest miarą czułości metody. Im jest on większy, tym większa jest jej czułość, a więc i lepsza metoda analityczna. Ponieważ $t_{obl} > t_{kryt}$ co świadczy, że współczynnik nachylenia był istotny. Stwierdzono więc, że metoda odznacza się akceptowalną czułością. W sposób analogiczny postępowano w celu określenia istotności współczynnika przesunięcia a . Na podstawie wartości a i S_a obliczono wartość t wynoszącą 27,08. Ponieważ $t_{obl} > t_{kryt}$ (2,31) współczynnik przesunięcia także był istotny. Liniowa krzywa kalibracji została więc wyrażona wzorem $y = 0,976x - 0,141$.

Tab e l a I. Zawartość białka w wodnym roztworze preparatu Lacprodan 80 (%)

Tab l e I. Protein content in aqueous solution of Laprodan 80 (%)

Lp.	Stężenie wyliczone	y_1	y_2	y_3	\bar{y}
1	0,00	0,14	0,14	0,13	0,14
2	0,62	0,75	0,75	0,76	0,75
3	1,24	1,35	1,35	1,37	1,36
4	1,87	1,97	1,96	1,97	1,97
5	2,49	2,58	2,58	2,58	2,58
6	3,11	3,17	3,17	3,18	3,17
7	3,73	3,77	3,77	3,77	3,77
8	4,36	4,40	4,40	4,42	4,41
9	4,98	5,00	5,01	5,00	5,00
10	5,60	5,62	5,61	5,63	5,62

Granica wykrywalności będącą najniższą wartością stężenia analitu, na podstawie której można wnioskować o obecności tego składnika z wystarczającą pewnością statystyczną została wyznaczona poprzez analizę w warunkach powtarzalności 6 serii pomiarowych po 10 powtórzeń mleka krowiego o dobrej jakości (tab. II).

Uzyskane wyniki poddano analizie testem Q-Dixona, który nie wykazał występowania błędów grubych i żaden z nich nie został odrzucony.

Wartość granicy wykrywalności LoD wyliczona poprzez podzielenie trzykrotności odchylenia standardowego s otrzymanych wyników przez wartość współczynnika nachylenia krzywej b i wyniosła ona 0,021%. Granica oznaczalności (LoQ) będąca najniższą wartością stężenia analitu, którą można oznaczyć z akceptowalną precyzją i dokładnością została wyznaczona poprzez pomnożenie LoD i współczynnika krotności przyjętego na poziomie 2. Granica oznaczalności białka wyniosła 0,0417 g/100 g.

Powtarzalność wyników określono na podstawie wartości obliczonego odchylenia standardowego 6 serii pomiarowych po 10 powtórzeń przeprowadzonych w laboratorium, przez jednego analityka, z wykorzystaniem jednego urządzenia pomiarowego, w krótkim okresie czasu. Wyniki poddano analizie błędów grubych Q-Dixona. Żaden z wyników nie został odrzucony (tab. II).

Tabela II. Zawartość białka w mleku krowim (%)

Table II. Protein content in cow milk (%)

Lp.	Stężenie białka					
1	3,45	3,47	3,45	3,44	3,45	3,45
2	3,45	3,47	3,46	3,45	3,46	3,46
3	3,45	3,47	3,46	3,46	3,46	3,46
4	3,45	3,47	3,46	3,46	3,46	3,46
5	3,46	3,46	3,46	3,46	3,46	3,46
6	3,46	3,46	3,46	3,46	3,46	3,46
7	3,46	3,46	3,46	3,46	3,46	3,46
8	3,47	3,46	3,46	3,46	3,46	3,46
9	3,47	3,46	3,46	3,46	3,47	3,46
10	3,47	3,45	3,47	3,48	3,47	3,47
\bar{x}_i	3,46	3,46	3,46	3,45	3,46	3,46
s_i^2	0,0001	4,555E-05	2,222E-05	9,888E-05	3,222E-05	1,111E-05
s	0,0068					

Wartość powtarzalności obliczono jako współczynnik odchylenia wartości średniej ($v_r\%$):

$$v_r\% = \frac{s_r \times 100\%}{\bar{x}_i}$$

gdzie:

\bar{x}_i – średnia arytmetyczna wyników w serii pomiarowej;

s_r – względne odchylenie standardowe (2).

Wartość tego współczynnika wyniosła $v_r\% = 0,219\%$.

W dalszej kolejności wyznaczono precyzję pośrednią (RSD%) również na podstawie wartości obliczonego odchylenia standardowego 6 serii pomiarowych po 10 powtórzeń przeprowadzonych w laboratorium, przez jednego analityka, ale w dłuższym okresie czasu. Test Q-Dixona nie wykazał występowania błędów grubych, dlatego żaden z wyników nie został odrzucony (tab. II).

Na podstawie uzyskanych wyników precyzja pośrednia RSD% wyniosła 0,197%.

Kolejnym ocenianym parametrem była poprawność (b_{wzg}), która określa jak blisko wartości prawdziwej znajduje się średnia wartość szeregu wyników. W celu wyznaczenia poprawności wykonano 10 powtórzeń oznaczenia zawartości białka w mleku surowym wzorcowym o zawartości deklarowanej 3,19%.

Korzystając ze wzoru:

$$b_{wzg} = \frac{\bar{x} - u}{u} \times 100\%$$

gdzie:

\bar{x} – średnia arytmetyczna wyników w serii pomiarowej;

u – prawdziwa zawartość składnika,

obliczono wartość błędu względnego b_{wzg} , który w tym przypadku wyniósł $-0,470\%$.

Na podstawie analizy dziesięciu próbek mleka wzorcowego, oznaczonych w warunkach powtarzalności, wyliczona została także wartość odzysku (R_i), będącego procentowym udziałem wartości uzyskanej w wyniku pomiaru w stosunku do wartości zadanej. Średnia wartość odzysku wynosiła 99,5%, co mieści się w przedziale założonym przez *Dobeckiego* (2) i świadczy o akceptowalności metody.

W celu wyznaczenia całkowitej standardowej niepewności pomiaru przeprowadzono identyfikację i analizę źródeł niepewności.

Zawartość białka w % wyrażono zależnością:

$$c_{\text{białka}} = p_1 \times p_2 \times d$$

gdzie:

p_1 – współczynnik powtarzalności;

p_2 – współczynnik odzysku;

d – niepewność materiału odniesienia.

Niepewność złożoną obliczono jako sumę kwadratów niepewności względnych:

$$U_c = \sqrt{U(p_1)^2 + U(p_2)^2 + U(d)^2}$$

Następnie obliczono niepewność rozszerzoną jako:

$$U = k \times U_c$$

gdzie:

$k = 2$, przy założeniu rozkładu normalnego i prawdopodobieństwa = 0,95

$$U = 2 \times 0,53\% = 1,06\%$$

Wszystkie uzyskane wartości parametrów walidacji zebrano w Karcie Walidacji (tab. III) i porównano z przyjętymi kryteriami (2,4).

Tab e l a III. Karta walidacji oznaczania zawartości białka

Tab l e III. Validation card of protein content measurements

Lp.	Parametry walidacji		Kryteria (2)	Wyniki
1	Zakres roboczy			0,14 – 5,6 g/100 g
2	Liniowość		$r \geq 0,999$	1,00
3	Czułość		$T_{\text{obl}} > T_{\text{kryt}}$	$T_{\text{obl}} > T_{\text{kryt}}$
4	Granica wykrywalności (LoD)		$3 \times s / b$	0,021 mg/100 g
5	Granica oznaczalności (L_Q)		$LoQ = k \times LoD$	0,042 mg/100 g
6	Poprawność		-20% do 20% wyrażony jako błąd względny	-0,47%
7	Precyzja	Powtarzalności	$\leq 2,8\%$	0,22%
		Pośrednia		0,20%
9	Odzysk		98% do 102%	99,5%
10	Niepewność rozszerzona			1,06%

WNIOSKI

1. Testowana metoda odznaczała się bardzo wysoką czułością, co wskazuje na możliwość jej wykorzystania do oznaczania zawartości białka w mleku.
2. Współczynnik korelacji, świadczący o wzajemnym dopasowaniu metody, wyniósł 1,000, czyli posiadał wartość maksymalną.
3. Granicę oznaczalności białka wyliczono na poziomie 0,14 g/100 g. W przypadku stosowania tej metody zarówno w warunkach laboratoriów badawczych, jak i zakładów produkcyjnych jest to wartość zadowalająca.
4. Zarówno poprawność (-0,470%), jak i odzysk (99,5%) metody mieściły się w założonym przedziale.
5. Omawiana metoda odznaczała się akceptowalnymi współczynnikami zmienności zarówno dla precyzji powtarzalności, jak i precyzji pośredniej.
6. Walidowana metoda cechowała się bardzo niską niepewnością rozszerzoną wyniku wynoszącą 1,06% wartości wyniku.

Adam Florkiewicz

VALIDATION OF THE PROCEDURE OF DETERMINING THE WHITE IN THE WHOLE MILK OR PARTLY SKIMMED WITH FTIR METHOD (DETECTION WITHIN THE SCOPE OF THE INFRARED USING THE *FOURIER* ANALYSIS)

Summary

Conducting the full validation is an essential receipt of fulfilling not only specific qualitative criteria, but also checking technical competence of the laboratory in the accreditation process. She is attesting to the fact that the laboratory controls the applied method and he is issuing credible findings. The profound knowledge of characteristics of the method is giving the possibility of for her improving moreover, of adaptation to peculiar needs and he lets for obtaining data for estimating the measurement uncertainty as well as he enables correct interpretations of achieved results.

Using conducted examinations a full validation of the method of determining the white in the whole milk or partly was carried out skimmed with FTIR method. the cow's milk full of the good quality and the model milk constituted research Material. This method was characterized by a very high sensitivity and a precision, with humble abode of the marking and with acceptable recycling what allows to categorize her to standard methods used in meaning the protein content in the milk. Moreover she was marked by a very low widened uncertainty of the result (1.06 % value of the result).

PIŚMIENNICTWO

1. *Fetterman M.R.*: Fourier-transform infrared derivative spectroscopy with an improved signal-to-noise ratio. *Optics Letters*, 2005; 30: 17. – 2. *Dobecki M.* (red.): Zapewnienie jakości analiz chemicznych. Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera. 2004; Łódź. – 3. *Hoffman D., Kringle R.*: A Total Error Approach for the Validation of Quantitative Analytical Methods. *Pharmaceutical Research*, 2007; 24(6). – 4. PN-EN ISO/IEC 17025:2001: Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorujących. – 5. PN-ISO 9620:2006: Mleko pełne. Oznaczanie zawartości tłuszczu mlecznego, białka i laktozy. Wytyczne dotyczące obsługi analizatorów w zakresie średniej podczerwieni. – 6. *Fortuna T., Juszcak L., Sobolewska-Zielińska J.*: Podstawy analizy żywności. Wydawnictwo AR, 2003; Kraków.

Adres: 30-149 Kraków, ul. Balicka 122.