

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ POKUSNÉ KALIBRACE PRO STANOVENÍ KYSELINY CITRONOVÉ V MLÉCE INFRAČERVENOU SPEKTROSKOPIÍ (MIR-FT)

O. Hanuš, I. Hulová, V. Genčurová, L. Štolc, J. Kučera, J. Kopecký, R. Jedelská,
Z. Motyčka

Received: April 14, 2009

Abstract

HANUŠ, O., HULOVÁ, I., GENČUROVÁ, V., ŠTOLC, L., KUČERA, J., KOPECKÝ, J., JEDELSKÁ, R., MOTYČKA, Z.: *Result interpretation of experimental calibration for milk citric acid determination via infra-red spectroscopy (MIR-FT)*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2009, LVII, No. 5, pp. 87–102

Citric acid (KC) in milk is indicator of cow energy metabolism. Milk laboratories set up KC determination. A method can be infra-red analyse (MIR-FT). The goal was to develop a relevant method for reference sample preparation for MIR-FT (indirect method, Lactoscope FTIR and MilkoScan FT 6000) calibration. As reference was used a photometric method (c; 428 nm). KC was added (n = 3) into some reference milk samples (n = 10, bulk milk). Mean value was $9.220 \pm 3.094 \text{ mmol.l}^{-1}$ with variation range from 6.206 to 15.975 mmol.l^{-1} . Recovery c was from 100.8 to 120.2%. Correlation between c and MIR-FT were from 0.979 to 0.992 ($P < 0.001$). These were lower in the set of native milk samples (n = 7), from 0.751 (Lactoscope FTIR; $P < 0.05$) to 0.947 (MilkoScan FT 6000; $P < 0.001$) in comparison to original values from 0.981 to 0.992 (n = 10; $P < 0.001$). Correlations between calibrated MIR-FT instruments were from 0.958 to 1.0 ($P < 0.001$). Average recovery for instruments (n = 12) was $101.6 \pm 18.1\%$. The mean differences between c method and MIR-FT after calibration (n = 4) moved from -0.001 across zero to 0.037%. Standard deviation of differences was from 0.0074 to 0.0187% at MilkoScan FT 6000 and from 0.0105 to 0.0117% for Lactoscope FTIR. Relative variability of differences (MIR-F (filter technology) and FT) for major components fat (T), proteins (B) and lactose (L) in total and minor components KC and free fatty acids (VMK) was estimated to 1.0 and 7.2 and 34.4%. The KC result is inferior than T, B and L superior than VMK. Autocorrelation (0.042; $P > 0.05$) of results demonstrated the independence of consecutive measurements. Milk preservation effect amounted 0.2323 ($P < 0.001$) with bronopol and 0.0339 ($P > 0.05$) mmol.l^{-1} with dichromate. It was (3.0 and 0.44%) practically negligible, redeemable via relevant calibration. The results of proficiency testing in post-calibration period and evaluation of double transport stress effect samples (difference was $-0.006 \pm 0.071 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($P > 0.05$)) demonstrated the useability for central calibration system. Milk KC results of MIR-FT calibration were good and can be suitable for practical screening.

cow, raw milk, citric acid, calibration, infra-red analyse

Koncentrace kyseliny citronové (KC; $\text{HOOC.CH}_2\text{C(OH).COOH(CH}_2\text{COOH)}$, tj. $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) v mléce může být dobrým ukazatelem energetického metabolismu dojníc (Illek a Pechová, 1997; Baticz et al., 2002; Garnsworthy et al., 2006), zejména v době výrazného zvyšování mléčné užitkovosti a zvyšování frekvence výskytu produkčních poruch, jako je např.

ketóza. KC v mléce pozitivně korelovala s plazmatickou glukózou a negativně s celkovým plazmovým proteinem v krvi ($0,46 P < 0,01$ a $-0,31 P < 0,01$; Khalid et al., 1999). Za fyziologické rozpětí se považuje 8 až 10 mmol.l^{-1} KC v mléce (0,149 až 0,187%), když hodnoty pod vymezeným oborem indikují energetický nedostatek metabolismu krav a vyšší hodnoty

přebytek. Kubešová et al. (2009) našli vztah mezi kyselinou citronovou v mléce a nástupem luteální aktivity po porodu u krav. Aktuální znalost hodnoty KC může proto posloužit v poradenském servisu ke zlepšení nejen výživy dojníc, ale i jejich reprodukce. Koncentrace KC v mléce je rovněž ukazatelem jeho použitelnosti v sýrařství. Proto rutinní laboratoře v kontrole kvality mléka, ale zejména mléčné užitkovosti, přistupují k zavedení metod určení uvedeného energetického metabolitu. Z fyziologického hlediska je KC také těžištěm Krebsova cyklu a důležitou součástí pufrční kapacity mléka v podobě citrátů a citrátů (Pijanowski, 1977). Z fyzikálního hlediska se pak podílí 3,3 procenta na depresi bodu mrznutí mléka (Walstra a Jenness, 1984).

Jednou z potenciálních metod stanovení koncentrace kyseliny citronové v mléce může být infračervená spektroskopie (MIR-FT). Důležitým předpokladem je ovšem provedení její relevantní kalibrace. Filtrová technologie infraanalýzy (MIR-F) je využívána (Biggs, 1978; Kerkhof-Mogot et al., 1982; Sjaunja, 1984 a, b; Sjaunja et al., 1984; Biggs et al., 1984, 1987; Sjaunja a Andersson, 1985; Grappin, 1987; Hanuš et al., 1992 a, b, c, 2007) především ke stanovení majoritních složek mléka (tuk (T), bílkoviny (B), laktóza (L), sušina tukuprostá atd.). MIR-F stanovení minoritních složek (močovina, volné mastné kyseliny) mléka bylo obvykle méně úspěšné (Herre, 1998; Hanuš et al., 2001, 2008 a). Technologie měření celého IR spektra mléka s Michelsonovým interferometrem a následnými Fourierovými transformacemi (MIR-FT) pro zpracování signálu začíná být využívána ke stanovení nejen hlavních složek mléka (tuk, bílkoviny, laktóza a sušina tukuprostá; Lefier et al., 1996) a kaseinu, ale zejména minoritních složek a metabolitů, jako jsou volné mastné kyseliny, močovina, kyselina citronová nebo ketony (Berlec a Golc-Teger, 1999; Hansen, 1999; Foss, 1999, 2001, 2004 a, b; Hanuš et al., 2001, 2008 a, b, c, d; Heuer et al., 2001; Peterson et al., 2004; Bijgaart, 2006; Broutin, 2006; Roos et al., 2006; Hering et al., 2008). Stanovení těchto minoritních složek je důležité nejen v kontrole kvality mléka, ale zejména v kontrole zdravotního a výživového stavu dojníc (Famigli-Bergamini, 1987; Illek a Pechová, 1997). Pro určení mléčného složení (majoritní i minoritní složky) je v poslední době místy popisována a používána i metoda NIR-FT (Tsenkova et al., 2000; Kukačková, et al., 2000; Jankovská a Šustová, 2003; Kráčmar et al., 2004; Šustová et al., 2006, 2007).

Cílem této práce bylo zahájit vývoj relevantní metody přípravy referenční sady vzorků pro kalibraci MIR-FT na měření koncentrace kyseliny citronové v mléce včetně provedení pokusné kalibrace pro možnost zavedení postupu v rutinních laboratorních kvalitě mléka a podpory kontroly zdravotního stavu dojníc.

MATERIÁL A METODY

Jako referenční pro stanovení KC v mléčných standardech a kalibraci MIR-FT byla použita fotomet-

rická metoda (c). Měření proběhlo při vlnové délce 428 nm. Mléko bylo koagulováno pomocí kyseliny trichloroctové. Filtrát reagoval s pyridinem (30 min. při 32 °C). KC s pyridinem v acetanhydridovém médiu vytváří žlutě zbarvený komplex. Spekol 11 (Carl Zeiss Jena, Německo) byl kalibrován prostřednictvím sedmibodové škály od 1,5 do 20,0 mmol.l⁻¹, to znamená od 0,028 do 0,373 %. Přímý přepočet hodnot mmol.l⁻¹ na % KC lze docílit dělením pomocí faktoru 53,5. Jako nepřímá rutinní byla použita metoda MIR-FT v instrumentálním provedení Lactoscope FTIR (Delta Instruments, Holandsko; jeden přístroj, označení v grafech 1 nebo 2 podle pořadí kalibrace) a MilkoScan FT 6000 (Foss Electric, Dánsko; dva přístroje, 3 a 4). Rutinní laboratoře pro hodnocení složení a kvality mléka v České republice, zahrnuté v systému centrální kalibrace, pracují většinou při absenci referenčních metod. Proto je nezbytné hodnocení možného vlivu transportu referenčních standardů pro KC na kalibraci MIR-FT. K ověření spolehlivosti MIR-FT a její kalibrace na měření KC bylo použito šest souborů vzorků a výsledků:

1. bylo použito 171 individuálních vzorků mléka, které byly odebírány od krav plemene České strakaté (CF) a (H) Holštýn (1 : 1) v průběhu celé laktace v měsíčních intervalech a po celý rok. V letní sezoně byla aplikována pastva, v zimní sezoně krmení na bázi kukuřičné a travní siláže. Mléčná užitkovost krav byla 6700 kg za normovanou laktaci. Stádo je lokalizováno v nadmořské výšce 750 m. Vzorky byly změřeny na koncentraci KC fotometrickou metodou (c) a současně metodou MIR-FT na zařízení Lactoscope FTIR a to na předběžné primární (neoficiální) kalibraci. Cílem bylo prvotně ověřit pouze těsnost vztahu výsledků mezi metodami, resp. efektivitu odezvy metody MIR-FT na variabilitu a trendy koncentrace KC v závislosti na metodě referenční, bez nároku na shodu průměrných hodnot;
2. referenční sada vzorků pro analýzu KC a kalibraci metody MIR-FT byla vytvořena z deseti vzorků mléka. Byly to bazénové vzorky a bazénové vzorky s přístřikem individuálního mléka obou plemen (CF a H), z nichž některé byly v referenční sadě zdvojeny pro možnost vizuální kontroly opakovatelnosti obou metod (c a MIR-FT). Také byl do některých vzorků se známou základní hodnotou KC proveden umělý přídavek KC. Modifikovány byly tři vzorky z deseti (vyšší koncentrace), kde navážená přídávky činily konkrétně 3,483, 4,942 a 8,745 mmol.l⁻¹ (0,065, 0,141 a 0,135 %). Na tyto přídávky byla vypočtena výtěžnost metod. Podle výsledků referenční metody c byla kalibrována metoda MIR-FT. Byla posouzena úspěšnost kalibrace;
3. byla stanovena opakovatelnost (směrodatná odchylka párových diferencí) metody MIR-FT (Lactoscope FTIR a MilkoScan FT 6000) při paralelním měření KC v různých bazénových vzorcích mléka (n = 40). Dále byla stanovena citlivost metody MIR-FT (Lactoscope FTIR) na objemové ředění různých vzorků mléka (n = 8) vodou ve dvou

koncentracích při stanovení KC oproti očekávané hodnotě. Ředění vzorků (I a II) mléko : voda proběhlo ve dvou stupních, 1 : 1 a 2 : 1, bylo tedy relativně výrazné. Byla také určena recovery umělé přísady KC přímo do vzorků mléka ($n = 8$) nepřímou metodou MIR-FT (Lactoscope FTIR a MilkoScan FT 6000) za dané regulérní kalibrace oproti očekávané hodnotě. Tyto váhové přísady KC činily (I a II) 5 a 10 mmol.l⁻¹, byly tedy rovněž poměrně výrazné.

Z výsledků sériového měření KC, z párů vytvořených pozičním posunem dat z náhodně řazeného výběru individuálních vzorků mléka ($n = 52$) s větším variačním oborem byla regresní analýzou vypočtena autokorelace (Meloun a Mílitký, 1992, 1994; Kupka, 1997), která je v daném uspořádání mírou závislosti následných měření, tj. případné „paměti měřicího systému“, kdy je vyžadována nezávislost. Při daném systému sériové průtočné analýzy může zahrnovat stanovení autokorelace chybu z přenosu, tzn. například účinnost výplachu kyvety nebo také účinnost homogenizace materiálu;

4. byl stanoven efekt konzervace vzorků mléka na stanovení KC metodou MIR-FT. Ke konzervaci vzorků mléka ($n = 10$) byly použity tablety K₂Cr₂O₇ (Merck, Germany) a bronopolu (Broad Spectrum Microtabs, DaF Control Systems, England), jedna na 25 ml mléka s výslednou koncentrací 0,12 a 0,04 % účinné látky. Totožná paralelní sada vzorků zůstala bez konzervace. Po 24 hodinách uložení v chladničce (4 °C) byly vzorky mléka měřeny na KC. Pro průměrné difference výsledků v KC mezi sériemi vzorků bez a s konzervací, které posloužily ke specifické kvantifikaci efektu, byl rovněž vypočten párový t-test pro posouzení významnosti;
5. dva měsíce po provedené kalibraci MIR-FT na stanovení koncentrace KC (část 2) byl proveden výkonnostní test analytické způsobilosti mezi třemi přístroji MIR-FT. Byl proveden ve dvou alternativách: – A) na rutinní sadě deseti vzorků mléka určených pro kalibraci základních složek mléka (tuk, hrubé bílkoviny, kasein, laktóza, sušina tukuprostá), kde byly vzorky bazénové i modifikované v obsahu hlavních složek; – B) na sadě deseti nativních bazénových vzorků kravského mléka;
6. bylo provedeno hodnocení vlivu transportu mléčných referenčních standardů pro KC na kalibraci MIR-FT. Test byl proveden jak pro volné mastné kyseliny (VMK, další analyticky aktuální minoritní složka mléka pro technologie MIR-FT a MIR-F v mléčných laboratořích), tak pro KC. Deset nativních bazénových vzorků mléka s potřebným variačním oborem sledovaných analytů bylo konzervováno stejně jako při kalibraci (bronopol) a změřeno na Delta Lactoscope IRFT na VMK a KC před a po transportu. Transport v izolačním termoboxu s chladicí náplní (< 10 °C) proběhl z Rapotína do Buštěhradu a zpět. Trval

pět dní (interval od měření k opakovanému (párovému) měření) od 12. 1. do 16. 1., kdy byla provedena měření. Transportní zátěž byla rovna (čas a trasa) dvojnásobku běžného rutinního průměru.

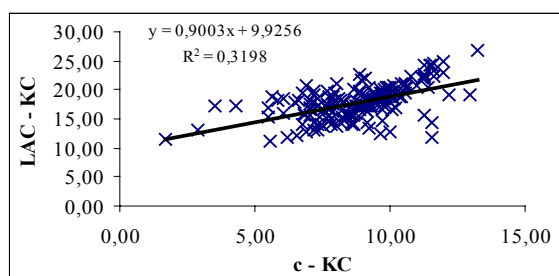
Statistické vyhodnocení (program Excel) zahrnuje testování diferencí, lineární regresní a korelační analýzu a výpočet výtěžnosti (recovery) umělých přísad KC jako hlavního analytu. Ve vhodných případech byl použit rovněž párový t-test (vliv transportu a konzervace vzorků mléka). V testech způsobilosti byly vypočteny Euklidické distance od počátku. Byly zohledněny obecné zásady posouzení věrohodnosti získaných analytických výsledků (Eckschlager, 1961; Eckschlager et al., 1980; Grappin, 1993; Leray, 1993; Meloun a Mílitký, 1992, 1994; Kupka, 1997; Hanuš et al., 1998; Suchánek et al., 1999; Feinberg a Laurentie, 2006). Uvedený cíl a metodické postupy jsou rámcově v souladu s iniciativami pracovní sítě referenčních mléčných laboratoří organizací ICAR a AFEMA.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Pilotní ověření specifičnosti MIR-FT pro KC

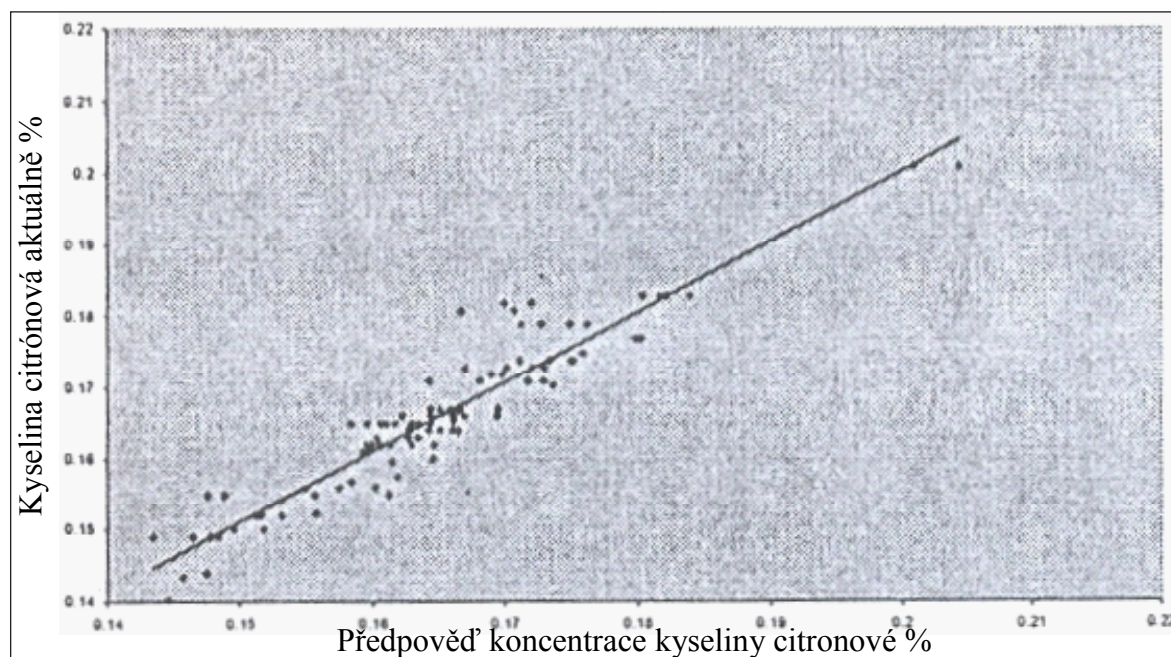
Na větším souboru nativních vzorků mléka ($n = 171$) a bez přesné (sekundární, resp. lokální) kalibrace metody MIR-FT byl mezi MIR-FT (LAC – KC) a metodou c (c – KC) dosažen korelační koeficient 0,566 ($P < 0,001$; Obr. 1) při větší průměrné diferenci mezi soubory. To znamená, že jen 32 % variací v měření MIR-FT bylo vztaženo s variacemi KC ve vzorcích, resp. s variabilitou v hodnotách referenční metody (c). Průměrná hodnota c pro KC činila $8,82 \pm 1,80$ mmol.l⁻¹ ($0,165 \pm 0,034$ %) při variačním oboru 1,70 až 13,23 mmol.l⁻¹ (0,032 až 0,247 %) a variačním koeficientu 20,4 %.

Dosažené výsledky opravňují konstatování, že MIR-FT reagovala adekvátně na relevantní minoritní analyt v mléce, nicméně s menší než očekávanou efektivitou, jaká byla dosažena např. v materiálech Foss (2004 b; Obr. 2) k referenční fotometrické metodě setu Boehringer-Mannheim (enzymatický test). Je tedy třeba získat těsnější závislost výsledků MIR-FT na sledovaném analytu KC.



Korelační koeficient $r = 0,566$ ($P < 0,001$)

1: Regresní vztah mezi výsledky referenční metody (c) pro určení koncentrace kyseliny citronové (KC v mmol.l⁻¹) v mléce a metody MIR-FT (LAC - KC) bez lokální kalibrace ($n = 171$)



2: Regresní vztah mezi výsledky referenční metody pro určení koncentrace kyseliny citrónové (KC) v mléce a metody MIR-FT (Foss, 2004b)

Kalibrace MIR-FT na měření KC

Výsledky referenční sady jsou obsaženy v Tab. I. Průměr byl $9,220 \pm 3,094 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($0,172 \pm 0,058\%$) při variačním rozpětí od 6,206 do $15,975 \text{ mmol.l}^{-1}$ (od 0,116 do 0,298%). Variační obor nativních vzorků činil od 6,206 do $9,161 \text{ mmol.l}^{-1}$ (od 0,116 do 0,171%). Výtěžnost referenční metody c z hodnoty uměle připravených vzorků KC byla ve třech vzorcích od 100,8 do 120,2%. Dosažené korelační koeficienty mezi výsledky referenčními (c) a MIR-FT před kalibrací (první měření, původní kalibrace; PM; Tab. II) a po kalibraci (kontrolní měření, KM; validační korelace, úspěšnost kalibrace; Tab. II) činily (Obr. 3 až 4) 0,979 až 0,992

I: Parametry kalibrační referenční sady (c) pro koncentraci kyseliny citrónové (KC) v mléce

Č. v.	Kyselina citrónová	
	mmol.l ⁻¹	%
1	8,292	0,155
2	6,206	0,116
3	9,161	0,171
4	6,902	0,129
5	7,597	0,142
6	6,797	0,127
7	11,108	0,208
8	12,498	0,234
9	15,975	0,298
10	7,666	0,143
x	9,220	0,172
sx	3,0943	0,0578

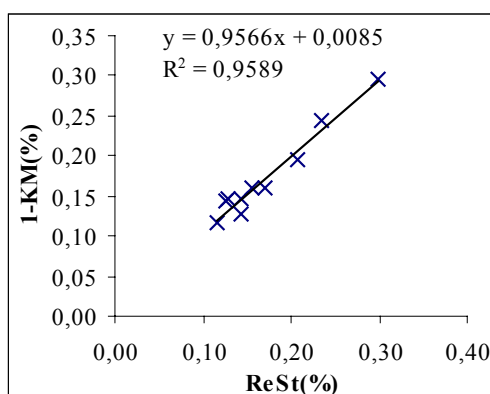
Č. v. = číslo vzorku; x = průměr; sx = směrodatná odchylka

($P < 0,001$). To znamená, že 95,9 až 98,4% variability KC u MIR-FT bylo určeno variabilitou v referenční sadě vzorků, resp. variacími hodnot referenční fotometrické metody (c; ReSt). Tyto závislosti byly tedy již poměrně velmi těsné, také z důvodu širšího variačního oboru referenční sady. Korelace výrazně kopírovaly i výsledky modifikovaných vzorků, tedy uměle připravených KC. Uvedené skutečnosti dokládají specifitu metody MIR-FT. Korelační koeficienty vypočtené v sadě pouze pro vzorky nativního mléka ($n = 7$; menší variační obor; Lactoscope FTIR (1 nebo 2) a MilkoScan FT 6000 (3 a 4)) byly nižší a činily 0,751 (Lactoscope FTIR; $P < 0,05$) až 0,947 (MilkoScan FT 6000; $P < 0,001$; Obr. 5) oproti původním hodnotám 0,981 až 0,992 ($n = 10$; oba koeficienty $P < 0,001$; Tab. II) stanoveným včetně modifikovaných referenčních vzorků. Také korelační vztahy mezi přístroji (KM, nakalibrované) metody MIR-FT byly vypočteny (Tab. III, pro PM a KM). I zde byly koeficienty velmi těsné, od 0,958 do 1,0 ($P < 0,001$; Obr. 6). Tyto skutečnosti dokládají úspěšnost technologického a technického řešení metody MIR-FT v daném ohledu.

II: Korelační koeficienty ($P < 0,001$) vztahu referenční metody c a nepřímé metody MIR-FT pro určení koncentrace KC

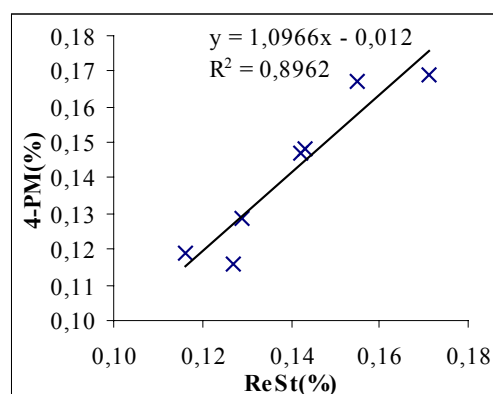
	MIR-FT	PM	KM
1		0,982	0,979
2		0,981	0,983
3		0,990	0,992
4		0,992	0,989

PM = první měření, původní kalibrace; KM = kontrolní měření, validační korelace, úspěšnost kalibrace; 1 a 2 = Lactoscope FTIR; 3 a 4 = MilkoScan FT 6000



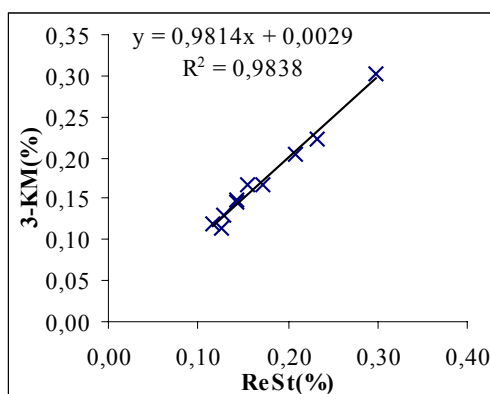
Korelační koeficient $r = 0,979$ ($P < 0,001$)

3: Regresní vztah mezi výsledky ($n = 10$) referenční metody (c) pro určení koncentrace kyseliny citronové (KC v %) v mléce a metody MIR-FT (KM, 1; Tab. II)



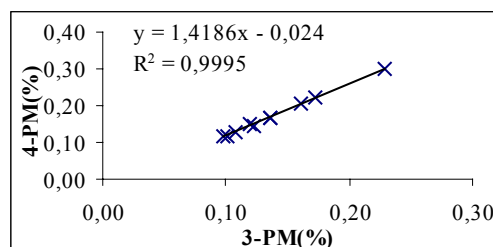
Korelační koeficient $r = 0,947$ ($P < 0,001$)

5: Regresní vztah mezi výsledky ($n = 7$) referenční metody (c) pro určení koncentrace kyseliny citronové (KC v %) v mléce a metody MIR-FT (PM, 4) pouze pro nativní vzorky mléka



Korelační koeficient $r = 0,992$ ($P < 0,001$)

4: Regresní vztah mezi výsledky ($n = 10$) referenční metody (c) pro určení koncentrace kyseliny citronové (KC v %) v mléce a metody MIR-FT (KM, 3; Tab. II)



Korelační koeficient $r = 1$ ($P < 0,001$)

6: Regresní vztah mezi výsledky ($n = 10$) určení koncentrace kyseliny citronové (KC v %) v mléce metodou MIR-FT vzájemně (PM; 3 a 4; Tab. III)

Recovery KC při kontrolním měření po kalibraci (validaci kalibrace) metody MIR-FT (Lactoscope FTIR a MilkoScan FT 6000) se pohybovala od 59,9 do 120,2%. Průměrná hodnota výtěžnosti pro tři vzorky a čtyři přístrojová měření ($n = 12$) byla $101,6 \pm 18,1\%$ (Lactoscope FTIR $110,6 \pm 3,9\%$; MilkoScan FT 6000 $92,6 \pm 22,6\%$).

Pokud se jedná o diferenční analýzu (Tab. IV) určení KC v mléce různými metodami (c, MIR-FT): – průměrné difference (MIR-FT – c) instrumentálních stanovení a referenční metody po provedených kalibracích (KM; $n = 4$) se pohybovaly od $-0,037$ do $0,001\%$, dvě průměrné difference činily 0% ; – variabilita individuálních diferencí vyjádřená jako směrodatná od-

chylna byla od $0,0074$ do $0,0187\%$ u MilkoScan FT 6000 a od $0,0105$ do $0,0117\%$ pro Lactoscope FTIR. Průměrně to bylo $0,0121\%$. Pokud je zohledněna standardní hodnota daného ukazatele pro majoritní složky mléka (T, B a L) u infračervené spektroskopie (MIR-F filtrová technologie i MIR-FT), která činí maximálně $\pm 0,06\%$ (ČSN 57 0536, 1999), což je relativně od $1,25$ do $1,76\%$ (pro T $4,00\%$, pro B $3,40\%$ a pro L $4,80\%$), pak u KC je to relativně $7,20\%$ (pro průměr KC $9,00 \text{ mmol.l}^{-1}$, tzn. $0,168\%$). V případě MIR-F (T, B a L) je pak zkušeností ověřená skutečnost cca $1,00\%$ (jako kvalifikovaný odhad). Komparace těchto hodnot (T, B a L $1,00\%$ a KC $7,20\%$) ukazuje sice na první pohled na rozdílný výsledek, který však může být re-

III: Korelační koeficienty ($P < 0,001$) vztahu mezi MIR-FT pro určení koncentrace KC v mléce

MIR-FT	PM			KM		
	2	3	4	2	3	4
1	1,000	0,959	0,964	0,999	0,963	0,958
2		0,960	0,964		0,967	0,961
3			1,000			0,999

IV: Diferenční analýza výsledků určení koncentrace KC (%) v mléce mezi MIR-FT po provedených kalibracích a referenční metodou c

Parametr	KM				KM			
	1	2	3	4	1 – c	2 – c	3 – c	4 – c
x	0,173	0,172	0,172	0,136				
sx	0,0565	0,0571	0,0572	0,0406				
d					0,001	0	0	-0,037
sd					0,0117	0,0105	0,0074	0,0187

d = průměrná difference; sd = směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů

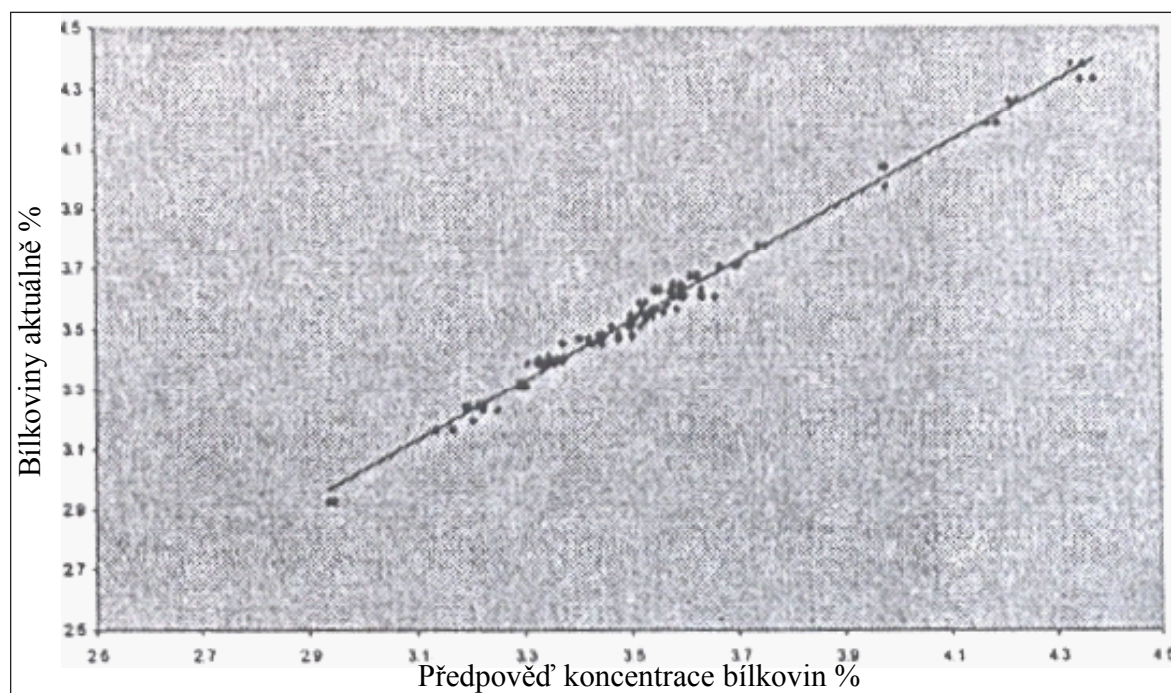
lativně srovnatelný pro měření majoritních složek mléka a složky minoritní. Uvedené hodnoty u KC působí jako poměrně velmi úspěšný výsledek, pokud je zohledněno, že se jedná o rutinní nepřímou analýzu minoritní složky mléka.

Výsledky kalibrace MIR-FT na další minoritní složku mléka, obsah volných mastných kyselin (VMK) mléčného tuku poskytly korelační koeficient až 0,99 (Hanuš et al., 2008 a). To bylo ovšem při poměrně širokém variačním oboru referenční sady vzorků. Shoda dvou totožně nakalibrovaných přístrojů měřících na stejném principu byla vyjádřena korelací rovněž 0,99. V tomto případě aplikace MIR-FT pro měření minoritních složek mléka (VMK) se však jedná pouze o metodu screeningovou (rovněž Bijgaart, 2006). Na sadě reálných vzorků s menším variačním oborem VMK byly korelace mezi instrumenty (podle použitých principů kalkulací, MIR-F a MIR-FT) logicky méně těsné 0,67 a 0,72, v jiný termín kalibrace (zde neuváděné) také 0,85. Rovněž další modelová kalibrace MIR-FT na VMK vykazovala méně těsné, i když stále výhodné korelační vztahy 0,90 a 0,87 k referenční metodě. Ty dokázaly dobrou schopnost (Bijgaart, 2006) metody kvantifikovat uve-

dený analyt (Hanuš et al., 2008 a). Rovněž materiály Foss (2001) doložily hodnotu 0,90 MIR-FT k metodě BDI jako referenční. Pokud byla relativní variabilita individuálních rozdílů při kalibraci (MIR-F i FT) pro T, B a L a KC odhadnuta na 1,0 a 7,2%, pak u VMK (Hanuš et al., 2008 a) to bylo 34,4% (jen MIR-FT; sd = 0,8536 a $x = 2,48 \text{ mmol.} \cdot 100\text{g}^{-1}$ tuku). Je zřejmé, že pro VMK jako minoritní složku mléka byla tato hodnota 4,8krát vyšší než u KC, kterou tak lze považovat za výrazně lepší pro věrohodnost analytických výsledků.

Materiály Foss (2004 b) uvádějí pro kalibraci MIR-FT na měření koncentrace KC při kalibraci na 83 vzorcích (48 nativních vzorků a 31 ošetřených, celkový rozsah 0,15 až 0,19% pro obojí vzorky) poměrně těsnou závislost. Srovnání absolutních rozšířených nejistot (na hladině 95%) správnosti u majoritní (bílkoviny) a minoritní (KC) složky uvádí hodnoty 0,06 a 0,008%. V relativní formě je to 1,68 a 4,62%. Je tedy měření KC pomocí MIR-FT (Obr. 2) „zjednodušeně řečeno 2,75krát méně spolehlivé“ než odhad např. obsahu bílkovin (Obr. 7) v mléce stejnou metodou. Podobnou relaci vykazují i zde dosažené výsledky.

Celkově lze výsledky provedených kalibrací hodnotit jako úspěšné a výsledky nakalibrovaných mě-



7: Regresní vztah mezi výsledky referenční metody (Kjeldahl) a metody MIR-FT pro určení obsahu bílkovin (v %) v mléce (Foss, 2004 b)

ření jako vhodné pro kvalitní screening KC v mléce při rutinním měření.

Opakovatelnost, sensitivita, recovery a autokorelace výsledků měření KC pomocí nepřímé instrumentální metody MIR-FT

Směrodatné odchylky opakovatelnosti výsledků měření metody MIR-FT pro Lactoscope FTIR a MilkoScan FT 6000 při paralelním měření KC v různých bazénových vzorcích kravského mléka činily $\pm 0,0792 \text{ mmol.l}^{-1}$, tj. $\pm 0,00148\%$, tj. relativně $\pm 0,82\%$ a $\pm 0,0588 \text{ mmol.l}^{-1}$, tj. $\pm 0,0011\%$, tj. relativně $\pm 0,55\%$. Relativní hodnoty opakovatelnosti jsou srovnatelné s hodnotami u analýz hlavních složek mléka (tuk, bílkoviny, laktóza) metodami MIR-F a MIR-FT (ČSN 57 0536; Hanuš et al., 1998) nebo jen mírně vyšší. Proto je lze označit za velmi dobré pro praktickou aplikaci metody.

Průměrné hodnoty KC (Tab. V) základní sady nativních (N) bazénových vzorků mléka ($n = 8$) činily podle Lactoscope FTIR a MilkoScan FT 6000 $7,81 \pm 0,688 \text{ mmol.l}^{-1}$ (tj. $0,1460 \pm 0,0129\%$) a $8,33 \pm 0,606 \text{ mmol.l}^{-1}$ (tj. $0,1558 \pm 0,0113\%$) a $8,15 \pm 0,62 \text{ mmol.l}^{-1}$ (tj. $0,1523 \pm 0,0116\%$). Další střední hodnoty a jejich variability vzorků ředěných (Ř), podle hladin I a II a zvýšených, resp. obohacených (O, přídavky) I a II, jsou uvedeny v Tab. V. Rozdíly mezi stanovením a jejich variabilita jsou v Tab. VI. Z nich vyplývá, pro srovnatelné x a sx , relativně dobrá shoda použitých postupů měření (MIR-FT) s ohledem na rozdíly (d) i jejich variabilitu (sd) a tedy

na případnou chybu systematickou nebo náhodnou.

Ředění vzorků mléka na dvou úrovních (I a II) bylo zachyceno prostřednictvím MIR-FT pro zařízení MilkoScan FT 6000 a Lactoscope FTIR při měření KC v mléce v rozsahu (I) $110,47 \pm 1,68$ (variační koeficient $vx 1,52\%$), $111,22 \pm 2,13$ ($vx 1,92\%$) a $67,25 \pm 4,69\%$ ($vx 6,97\%$; zjištěné oproti očekávané polovině = 100%) a (II) $110,15 \pm 1,87$ ($vx 1,70\%$), $108,72 \pm 1,52$ ($vx 1,40\%$) a $90,80 \pm 2,57\%$ ($vx 2,83\%$) oproti očekávanému poklesu o 1/3 (100%). Průměrnou sensitivitu nelze uvést, neboť každý typ instrumentace vykazoval rozdílnou hodnotu (Obr. 8). Odezva MIR-FT v KC na ředění mléka vodou byla poměrně výrazně odlišná vzájemně mezi konstrukčními typy MIR-FT a rovněž od hodnoty očekávané. To bylo pravděpodobně ovlivněno rovněž souběžnou, výraznou koncentrační (ředicí) změnou celé mléčné matrice, tzn. sumou simultánních interferenčních efektů pozadí měření. Modifikační změna daná ošetřením vzorků mléka byla tedy výrazná. To ovšem působilo také vedle vlastní možné odchylky směrnice kalibrační přímky v reálném oboru měření KC. Ta zřejmě může zvětšovat nebo zmenšovat lineárně svůj dopad, resp. chybu, do výsledků KC s rostoucí vzdáleností od průměrné hodnoty původní sady referenčních (kalibračních) vzorků mléka pro MIR-FT.

Zvýšení koncentrace KC v mléce jejími přídavky (I; II) bylo dokumentováno na dvou hladinách v procentech (zjištěné oproti očekávané) diferenční recovery (odpočet původní KC od zjištěné navýšené hodnoty) pro MilkoScan FT 6000 a Lactoscope FTIR: (I)

V: Průměrné hodnoty (x , $n = 8$) a směrodatné odchylky (sx) KC (mmol.l^{-1}) sad vzorků mléka nativních (N), ředěných (Ř, I a II) a obohacených (O, I a II) metodou MIR-FT

Úroveň		Ř		N	O	
		I	II		I	II
x	FTIR	2,631	4,734	7,811	13,486	19,285
sx		0,3458	0,5096	0,6878	0,6594	0,6887
x	Foss	4,600	6,118	8,331	14,272	19,882
sx		0,3152	0,4612	0,6062	0,5912	0,7059
x	Foss	4,527	5,904	8,147	13,927	19,597
sx		0,3269	0,4403	0,6213	0,5946	0,6956

FTIR = Lactoscope FTIR; Foss = MilkoScan FT 6000; poměry ředění a obohacení vzorků mléka KC jsou specifikovány u Obr. 8

VI: Průměrné rozdíly (d , $n = 8$) mezi hodnotami KC (mmol.l^{-1}) sad vzorků mléka nativních (N), ředěných (Ř, I a II) a obohacených (O, I a II) a jejich variabilita (sd) metodou MIR-FT

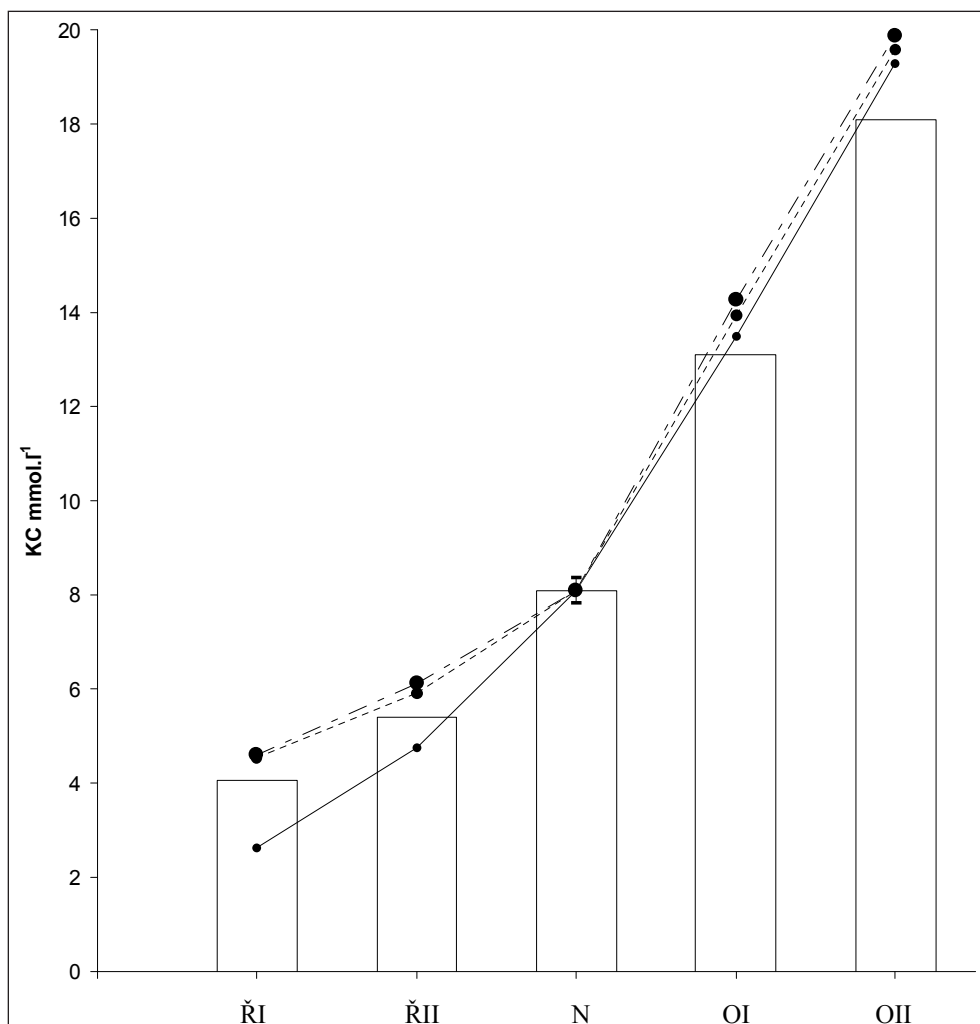
Úroveň		Ř		N	O	
		I	II		I	II
d	FTIR-Foss1	-1,969	-1,384	-0,521	-0,786	-0,597
sd		0,0846	0,1218	0,2332	0,2035	0,5541
d	FTIR-Foss2	-1,895	-1,170	-0,337	-0,442	-0,313
sd		0,1122	0,1138	0,2292	0,2125	0,5257
d	Foss1-Foss2	0,074	0,214	0,184	0,344	0,284
sd		0,0549	0,0495	0,0483	0,0333	0,0833

d = průměrná diference mezi výsledky; sd = směrodatná odchylka průměru individuálních diferencí

118,94 ± 0,718 (vx 0,60%), 115,72 ± 1,008 (vx 0,87%) a 113,62 ± 2,157% (vx 1,90%); (II) 115,44 ± 1,93 (vx 1,67%), 114,44 ± 1,960 (vx 1,71%) a 114,68 ± 2,730% (vx 2,38%). Jak patrné, výsledky mezi přístroji v souborech I a II i mezi soubory byly poměrně velmi vyrovnané, rovněž s nízkou variabilitou uvnitř všech, tedy nejen úrovních (I a II), ale i přístrojových souborů výsledků (vx od 0,60 do 2,38%). Zde ovšem byla změna mléčné matrice prostřednictvím manipulace minimální. Celkový odhad přídavku KC byl proto reálnější v porovnání k odhadu ředění. Průměrně lze uvést specifitu jako recovery hodnotou 115,5 ± 1,86% (Obr. 8). Důvod odchylky může být především směrnice s ohledem na kalibrační rovnici.

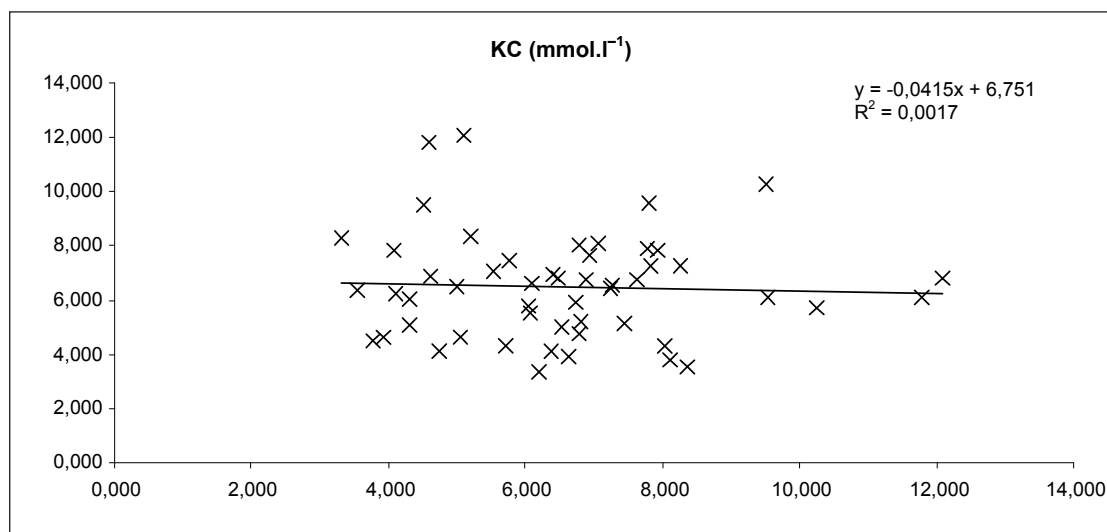
Adekvátní citlivost metody MIR-FT při stanovení KC v mléce na ředění vzorků vodou a specifita k umělým přídavkům KC do vzorků prostřednictvím relevantní recovery byly uvedenými výsledky plně

prokázány. Zmíněné hodnoty zachycené změny (ředění, výtěžnost) nicméně nebyly tak věrohodné, jako bývají většinou u metod referenčních. Obousměrně, pro snížení i zvýšení koncentrace KC, vyšší odchylky MIR-FT od hodnot očekávaných, byly, při výrazných změnách KC, vedle maticí změny (snížení KC), pravděpodobně dány mírnou (běžnou) odchylkou směrnice sekundární kalibrace, neboť i jejich orientace naznačovala plynulý lineární efekt. Její běžný vliv na věrohodnost rutinních výsledků při rutinních měřeních by však neměl být, v obvyklém variačním oboru měření KC kravského mléka, nijak fatální. Tzn. (Obr. 8), podhodnocení nebo nadhodnocení koncentrací při výrazném umělém poklesu hodnot KC (ředění) a opačně nadhodnocení výsledků v oboru výrazného umělého zvýšení hodnot KC (přídavky). Uvedené vysvětlení efektem kalibrační směrnice při známé opakovatelnosti metody potvrzují také: 1) experimentálně prokázané po-



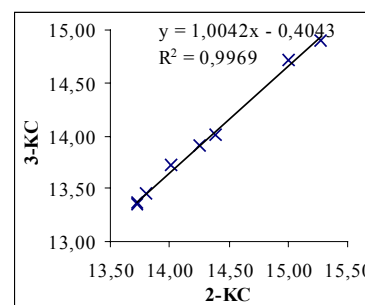
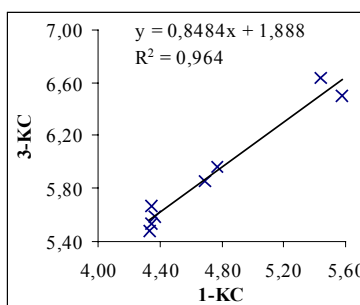
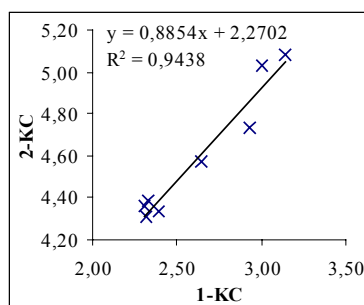
Ř = ředěné mléko, I (1 : 1, mléko : voda) a II (2 : 1); N = nativní mléko, ve sloupci jsou změřené hodnoty; O = obohacené mléko kyselinou citronovou, I (o 5 mmol.l⁻¹) a II (o 10 mmol.l⁻¹); n = 8 vzorků v každé měřené sadě; ve sloupcích ŘI, ŘII, OI a OII jsou teoreticky očekávané hodnoty; Lactoscope FTIR, plná křivka; MilkoScan FT 6000, krátce čárkovaná a dlouze čárkovaná křivka

8: Výsledky ředění (Ř) vzorků nativního (N) kravského mléka destilovanou vodou a jejich obohacení kyselinou citronovou (KC; mmol.l⁻¹)



Korelační koeficient $r = 0,042$ ($P > 0,05$)

9: Regresní vztah výpočtu autokorelace jako ukazatele „paměti měření systému“ mezi výsledky MIR-FT (Lactoscope FTIR) měření KC (mmol.l⁻¹) v mléce



Grafy, ředění II (1-KC Lactoscope FTIR a 2-KC MilkoScan FT 6000), nativní mléko (1-KC Lactoscope FTIR a 3-KC MilkoScan FT 6000), přídávky I (2-KC a 3-KC MilkoScan FT 6000); $r = 0,971$, $0,982$ a $0,998$ (vše $P < 0,001$)

10: Regresní vztahy mezi výsledky MIR-FT měření KC (mmol.l⁻¹) v mléce na různých hladinách měření

měrně nízké kolísání (1,40 až 6,97%) zachyceného vlivu poklesu KC pro obě úrovně ředění na všech přístrojích; 2) pokusně potvrzená velmi nízká variabilita (v_x 0,60 až 2,38%), tzn. značná stabilita, změřeného efektu vyšší recovery pro obě hladiny přídávky KC na všech třech aparátech, tedy obou typech instrumentace.

Při stanovení autokorelace metody MIR-FT u měření KC v mléce činil korelační koeficient pro Lactoscope FTIR 0,042 (Obr. 9; $P > 0,05$). Uvedené konstatování dokládá nezávislost výsledků sériového měření KC, minimální „paměť systému“, resp. chybu z přenosu, tedy analytickou způsobilost metody.

Regrese vzájemných vztahů výsledků různých měření MIR-FT reprezentovaly korelační koeficienty. Ty na všech hladinách měření KC v mléce, od snížených (ředění) přes nativní po zvýšené (přídávky) soubory ($n = 8$ vzorků v souboru), varírovaly v oboru od 0,685 do 0,998 (Obr. 10). Třináct koeficientů bylo významných na hladině pravděpodobnosti $P < 0,001$, jeden koeficient $P < 0,05$ a jeden $P > 0,05$. Uvedené zjištění rovněž potvrzuje způsobilost měření. Celkové výsledky naznačují, že v pří-

padě validace metod by odhady rozšířených kombinovaných nejistot výsledků měření (Kupka, 1997; Suchánek et al., 1999) KC v mléce prostřednictvím MIR-FT byly pravděpodobně mírně vyšší pro zařízení Lactoscope FTIR.

Efekt konzervace vzorků při měření KC pomocí MIR-FT

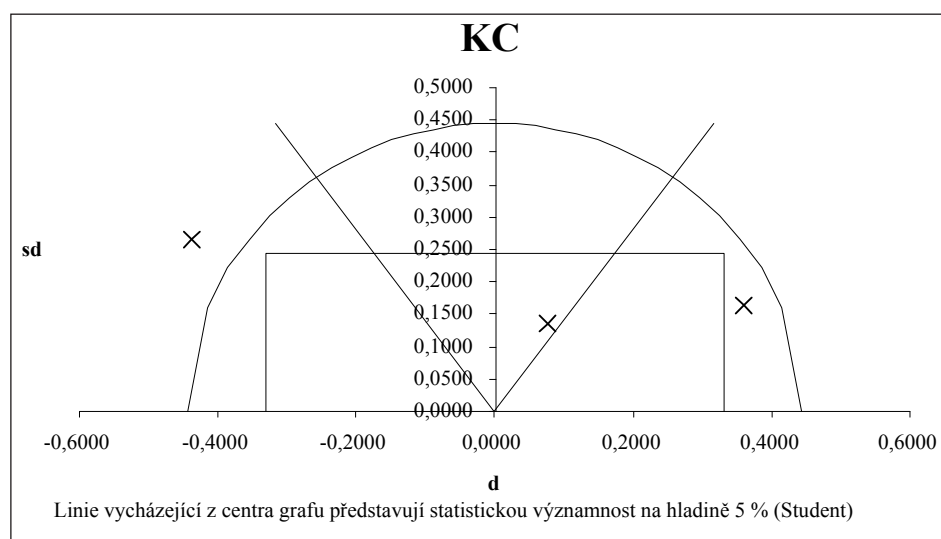
Vliv konzervace vzorků mléka na stanovení KC metodou MIR-FT byl kvantifikován na $0,0339 (\pm 0,1391)$ mmol.l⁻¹, tj. 0,0006 % pro $K_2Cr_2O_7$ a na $0,2323 (\pm 0,1326)$ mmol.l⁻¹, tj. 0,0043 % pro bronopol. Párový t-test doložil statistickou nevýznamnost u dvojchromanu ($t = 0,73$; $P > 0,05$) a významnost u bronopolu ($t = 5,25$; $P < 0,001$). Korelace mezi výsledky vzorků nekonzervovaných a konzervovaných činily 0,947 a 0,955 (obě $P < 0,001$). Lze konstatovat, že tento vliv byl relativně malý (0,44 a 3,0%), resp. prakticky zanedbatelný a srovnatelný s vlivy u hlavních složek mléka (Hanuš et al., 1992 a, b, c). Přesto je samozřejmě výhodnější kompenzovat konzervační efekt kalibrací na stejně ošetřených vzorcích mléka, jako jsou měřeny rutinně.

Validace výsledků KC testem analytické způsobilosti kalibrovaných přístrojů MIR-FT

Dva měsíce po kalibraci MIR-FT (Lactoscope FTIR a MilkoScan FT 6000) na určení KC (popsáno v části 2) byly ve výkonostním testu (Obr. 11 (A) a 13 (B); hodnoceno systémem Euklidické distance od počátku; Leray, 1993; Hanuš et al., 1998) analytické způsobilosti tří přístrojů výsledky označitelné za velmi dobré, pokud se jedná o míru shody. Průměrné odchylky od referenčních hodnot testu (statistický průměr metody MIR-FT očištěný Grubbovým testem odlehlosti (na hladině 0,05 % pravděpodobnosti) o „outliers“) činily: A) $0,077 \pm 0,137$, $0,360 \pm 0,163$ a $-0,437 \pm 0,266$ mmol.l⁻¹, tj. relativně (průměr sady vzorků, tři přístrojů je 100%, tj. $8,108 \pm 0,357$ mmol.l⁻¹) $0,95 \pm 1,69$, $4,44 \pm 2,01$ a $-5,39 \pm 3,28$ % (10 vzorků mléka určených pro kalibraci základních složek); B) $0,085 \pm 0,056$, $0,125 \pm 0,073$ a $-0,302 \pm$

Hodnocení možného vlivu transportu referenčních standardů na kalibraci MIR-FT pro měření KC

Vliv transportu vykázal na výsledky KC a VMK následující vlivy: 1) KC před transportem $7,698 \pm 0,607$ mmol.l⁻¹; 2) KC po transportu $7,704 \pm 0,561$ mmol.l⁻¹; 3) průměrná difference v KC před a po transportu $-0,006 \pm 0,071$ mmol.l⁻¹; 4) VMK před transportem $1,525 \pm 0,878$ mmol.100g⁻¹ tuku; 5) VMK po transportu $1,672 \pm 0,987$ mmol.100g⁻¹ tuku; 6) difference ve VMK před a po transportu $-0,147 \pm 0,164$ mmol.100g⁻¹ tuku; 7) použití párového t-testu poskytlo hodnoty kritéria 0,27 pro KC ($P > 0,05$) a 2,83 pro VMK ($P < 0,05$); 8) korelace mezi hodnotami před a po transportu pro KC a VMK činily 0,996 a 0,991 (obojí $P < 0,001$; KC Obr. 15). I když se jeví výsledky možného ovlivnění stability kalibrace MIR-FT transportem lepší pro KC než pro VMK, lze

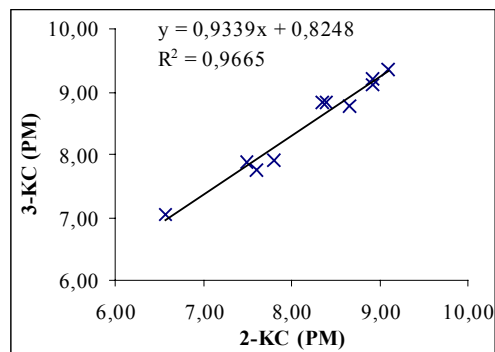


d = průměrná difference od referenčních hodnot testu; sd = směrodatná odchylka průměru individuálních diferencí

11: Výsledky testu analytické způsobilosti shodně nakalibrovaných přístrojů MIR-FT pro stanovení koncentrace kyseliny citronové v mléce (KC; mmol.l⁻¹) v modifikovaných vzorcích (A)

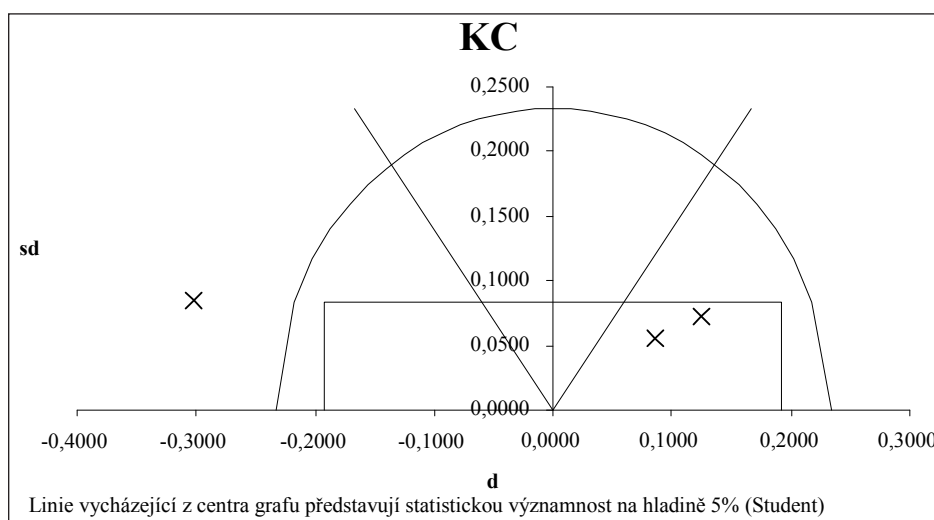
$0,085$ mmol.l⁻¹, tj. relativně (průměr sady vzorků, tři přístrojů, je 100%, tj. $7,967 \pm 0,537$ mmol.l⁻¹) $1,07 \pm 0,70$, $1,57 \pm 0,92$ a $-3,79 \pm 1,07$ % (10 nativních bazénových vzorků mléka). Odchylky byly relativně malé a prakticky (analyticky) zanedbatelné.

Také regresní závislosti měření vzájemně mezi shodně nakalibrovanými přístroji byly, s celkovým ohledem na metodu, relativně velmi dobré (Obr. 12 (A) a 14 (B)). Relevantní validační korelační koeficienty se pohybovaly od 0,819 do 0,983 (A) a od 0,993 do 0,996 (B; všechny koeficienty $P < 0,001$) pro všechny kombinace použitých přístrojů. Manipulace se základními složkami mléka v běžném koncentračním oboru tedy věrohodnost výsledků stanovení KC pomocí MIR-FT podstatně neovlivňuje.

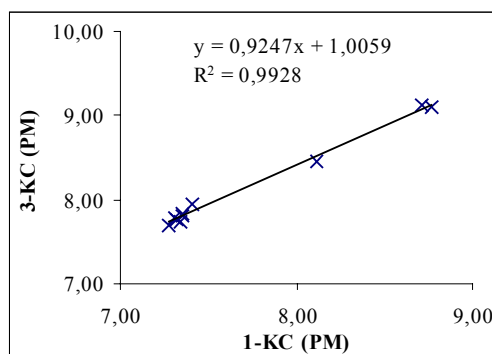


Korelační koeficient $r = 0,983$ ($P < 0,001$); KC = mmol.l⁻¹; PM = první měření

12: Regresní vztah mezi výsledky přístrojů MIR-FT (MilkoScan FT 6000) při stanovení kyseliny citronové (KC) v mléce v modifikovaných vzorcích (A)

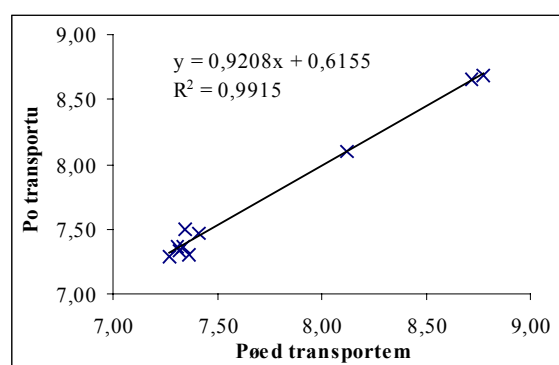


13: Výsledky testu analytické způsobilosti shodně nakalibrovaných přístrojů MIR-FT pro stanovení koncentrace kyseliny citronové v nativním mléce (KC; mmol.l⁻¹), vzorky B



Korelační koeficient $r = 0,996$ ($P < 0,001$); KC = mmol.l⁻¹; PM = první měření

14: Regresní vztah mezi výsledky přístrojů MIR-FT (Lactoscope FTIR a MilkoScan FT 6000) při stanovení KC v nativním mléce (KC; mmol.l⁻¹), vzorky B



Korelační koeficient $r = 0,996$ ($P < 0,001$)

15: Regresní vztah mezi výsledky přístroje MIR-FT (Lactoscope FTIR) při stanovení KC v nativním mléce (KC; mmol.l⁻¹) před a po rutinním transportu referenčních standardů.

daný vliv s určitostí označit za zanedbatelný u obou analytů. Výsledky celkově potvrzují možnost použití systému centrální kalibrace.

Limitní hodnoty úspěšné kalibrace MIR-FT pro měření KC

Studium zdrojů výsledkové variability KC přineslo také možnost navrhnout limitní hodnoty pro úspěšnou kalibraci metody MIR-FT. Jedná se o pilotní návrh, kdy lze úspěšnost kalibrace MIR-FT na měření KC vyhodnotit posouzením:

- hodnoty posunu průměru MIR-FT od udaného referenčního průměru (požadavek do $\pm 0,15$ mmol.l⁻¹);
- hodnoty směrodatné odchylky individuálních diferencí hodnot MIR-FT od hodnot referenčních (požadavek do $0,26$ mmol.l⁻¹);
- korelačního vztahu výsledků KC na MIR-FT k referenci před a po (validační měření) provedené kalibraci (požadavek $r \geq 0,94$);

- hodnoty adiční recovery KC (základní vzorek mléka s původním obsahem KC) pro vzorky s přídkem (≥ 85 a ≤ 115 %);
- hodnoty opakovatelnosti (směrodatné odchylky) měření metody (požadavek do $0,16$ mmol.l⁻¹);
- pozice úspěšnosti ve výkonnostním testu v určeném časovém intervalu po provedené kalibraci MIR-FT.

ZÁVĚR

Výsledky analýzy a jejich interpretace ukázaly, že jak použitá metoda přípravy sady referenčních vzorků, tak provedená kalibrace infraanalýzy MIR-FT k určení koncentrace kyseliny citronové v mléce, mohou poskytnout relevantní výsledky k praktickému použití při stanovení dané minoritní složky mléka. Studie a uvedené postupy byly provedeny v ČR jako pilotní. Výsledky jsou použitelné k aplikaci v rutinním systému centrální kalibrace MIR-FT na měření KC. Samozřejmě, spolehlivost

odhadu KC je zhruba 2–3krát nižší než majoritních složek mléka. Rutinní zavedení vyšetřovací metody v mléčných laboratořích umožní v budoucnu rozsáhlé analýzy fyziologických, zdravotních, chovatelských nebo technologických vlivů na koncentraci kyseliny citronové v mléce. Ty budou disponovat zvýšenou pravděpodobností správnosti odhadů pro

masovost získaných dat. Uvedené skutečnosti budou užitečné pro zlepšení praktické interpretace výsledků. Odstartování použití metody stanovení KC pomocí MIR-FT v mléčných laboratořích kontroly užitkovosti a kontroly kvality mléka může jako kvalitní screeningový test přispět ke zlepšení zdravotního a výživového stavu dojnic.

SOUHRN

Koncentrace kyseliny citronové (KC) v mléce může být dobrým ukazatelem energetického metabolismu dojnic a použitelnosti mléka v sýrařství. Aktuální znalost této hodnoty může posloužit v poradenském servisu ke zlepšení výživy dojnic. Proto mléčné laboratoře zavádějí určení KC. Metodou může být infraanalýza (MIR-FT). Důležitým předpokladem je její relevantní kalibrace. Cílem bylo vyvinout relevantní metodu přípravy referenční sady vzorků pro kalibraci MIR-FT k určení KC včetně pokusné kalibrace. Jako referenční pro KC a kalibraci MIR-FT byla použita fotometrická metoda (c ; 428 nm). Mléko bylo koagulováno, filtrát reagoval s pyridinem v acetanhydridu na žlutý komplex. Spektr 11 byl kalibrován prostřednictvím sedmibodové škály od 1,5 do 20,0 mmol.l⁻¹. Jako nepřímá byla použita metoda MIR-FT, Lactoscope FTIR a MilkoScan FT 6000. Byl ověřen vztah mezi c a MIR-FT s prvotní kalibrací (bez lokální kalibrace). U 171 individuálních vzorků mléka byl korelační koeficient 0,566 ($P < 0,001$). Průměrná hodnota KC pro c byla $8,82 \pm 1,80$ mmol.l⁻¹. Do některých referenčních vzorků mléka ($n = 10$) byla přidána KC ($n = 3$) pro stanovení recovery. Průměr byl $9,220 \pm 3,094$ mmol.l⁻¹ ($0,172 \pm 0,058\%$) při variačním rozpětí od 6,206 do 15,975 mmol.l⁻¹ (od 0,116 do 0,298 %). Výťažnost c byla od 100,8 do 120,2 %. Korelační koeficienty mezi výsledky c a MIR-FT činily 0,979 až 0,992 ($P < 0,001$), v sadě pro vzorky nativního mléka ($n = 7$) byly nižší, 0,751 (Lactoscope FTIR; $P < 0,05$) až 0,947 (MilkoScan FT 6000; $P < 0,001$) oproti původním hodnotám 0,981 až 0,992 ($n = 10$; oba $P < 0,001$). Korelační vztahy mezi nakalibrovanými přístroji MIR-FT byly od 0,958 do 1,0 ($P < 0,001$). To potvrzuje úspěšnost technického řešení metody MIR-FT. Průměrná hodnota výťažnosti pro přístrojová měření ($n = 12$) byla $101,6 \pm 18,1\%$ (Lactoscope FTIR, $110,6 \pm 3,9\%$; MilkoScan FT 6000, $92,6 \pm 22,6\%$). Průměrné difference metody c a MIR-FT po kalibracích ($n = 4$) se pohybovaly od -0,001 do 0,037 %, dvakrát 0 %. Směrodatná odchylka individuálních diferencí byla od 0,0074 do 0,0187 % u MilkoScan FT 6000 a od 0,0105 do 0,0117 % pro Lactoscope FTIR. Relativní variabilita individuálních rozdílů při kalibraci (MIR-FT) pro majoritní složky mléka jako tuk (T), bílkoviny (B) a laktózu (L) dohromady a minoritní složky jako KC a obsah volných mastných kyselin (VMK) byla odhadnuta na 1,0 a 7,2 a 34,4 %. Výsledek KC je slabší než výsledek T, B a L. Při srovnání výsledku KC k VMK lze tento považovat za lepší pro věrohodnost analytických výsledků. Autokorelace (0,042; $P > 0,05$) výsledků měřicího systému prokázala nezávislost po sobě jdoucích měření. Vliv chemické konzervace vzorků mléka bronopolem (komerční Broad Spectrum Microtabs, DaF Control Systems, England) byl významný ($P < 0,001$) a dvojchromanem (Merck) nevýznamný ($P > 0,05$) a činil 0,2323 a 0,0339 mmol.l⁻¹ oproti nekonzervovaným vzorkům. Korelace mezi nekonzervovanými a konzervovanými vzorky činily 0,955 a 0,947 ($P < 0,001$). Vliv byl relativně malý (3,0 a 0,44 %), prakticky zanedbatelný a je možné kompenzovat ho relevantní kalibrací. Výsledky vyhodnocení výkonnostního testu analytické způsobilosti měření KC v období po kalibraci metody MIR-FT a zejména posouzení vlivu dvojnásobné transportní zátěže kalibračních vzorků (průměrná difference v KC před a po transportu byla $-0,006 \pm 0,071$ mmol.l⁻¹ ($P > 0,05$)) doložily možnost použití systému centrální kalibrace metody MIR-FT na měření KC. Celkově lze výsledky kalibrací hodnotit jako úspěšné a výsledky měření pak jako vhodné pro praktický screening KC v mléce.

kráva, syrové mléko, kyselina citrónová, kalibrace, infračervená spektroskopie

SUMMARY

Citric acid (KC) concentration in milk can be good indicator of cow energy metabolism and milk usability for cheesemaking. Actual knowledge of this value can serve for dairy cow nutrition improvement in advisory service. That is reason why milk laboratories set up KC determination. A method can be infra-red analyse (MIR-FT). Important presumption is its relevant calibration. The goal was to develop a relevant method for reference sample set preparation for MIR-FT calibration to KC determination including experimental calibration. As reference for KC and MIR-FT calibration was used a photometric method (c ; 428 nm). Milk was coagulated and filtrate with pyridine created a yellow complex in acethanhydride. Spektr 11 was calibrated via seven-point scale from 1.5 to 20.0 mmol.l⁻¹. As indirect method was used MIR-FT it means Lactoscope FTIR and MilkoScan FT 6000. Relationship

between c and MIR-FT with primary calibration (without a local calibration) was investigated. Correlation coefficient was 0.566 ($P < 0.001$) in 171 individual milk samples. Average KC value for c was $8.82 \pm 1.80 \text{ mmol.l}^{-1}$. KC was added ($n = 3$) into some reference milk samples ($n = 10$) for recovery determination. Mean value was $9.220 \pm 3.094 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($0.172 \pm 0.058\%$) with variation range from 6.206 to $15.975 \text{ mmol.l}^{-1}$ (from 0.116 to 0.298%). Recovery c was from 100.8 to 120.2%. Correlation coefficients between c and MIR-FT results were from 0.979 to 0.992 ($P < 0.001$). These were lower in the set of native milk samples ($n = 7$), from 0.751 (Lactoscope FTIR; $P < 0.05$) to 0.947 (MilkoScan FT 6000; $P < 0.001$) in comparison to original values from 0.981 to 0.992 ($n = 10$; both $P < 0.001$). Correlation relationships between calibrated MIR-FT instruments were from 0.958 to 1.0 ($P < 0.001$). It confirms the fruitfulness of technical solution of MIR-FT method. Average recovery value for instrumental measurements ($n = 12$) was $101.6 \pm 18.1\%$ (Lactoscope FTIR, $110.6 \pm 3.9\%$; MilkoScan FT 6000, $92.6 \pm 22.6\%$). The mean differences between c method and MIR-FT after calibration ($n = 4$) moved from -0.001 to 0.037% , two times were 0%. Standard deviation of individual differences was from 0.0074 to 0.0187% at MilkoScan FT 6000 and from 0.0105 to 0.0117% for Lactoscope FTIR. Relative variability of individual differences at calibration (MIR-F (filter technology) and FT) for major milk components such as fat (T), proteins (B) and lactose (L) in total and minor components such as KC and content of free fatty acids (VMK) was estimated to 1.0 and 7.2 and 34.4%. The KC result is inferior than T, B and L result. KC result is possible to consider as better for analytical result reliability in comparison to VMK. Autocorrelation (0.042; $P > 0.05$) of measurement system results demonstrated the independence of consecutive measurements. The effect of chemical preservation of milk samples with bronopol (commercial Broad Spectrum Microtabs, DandF Control Systems, England) was significant ($P < 0.001$) and with dichromate (Merck) insignificant ($P > 0.05$) and amounted 0.2323 and 0.0339 mmol.l^{-1} as compared to unpreserved samples. Correlation between unpreserved and preserved samples amounted 0.955 and 0.947 ($P < 0.001$). The effect was relatively small (3.0 and 0.44%), practically negligible and it is possible to compensate it via relevant calibration. The results of proficiency testing evaluation of MIR-FT citric acid measurement in post-calibration period and especially evaluation of double transport stress effect on calibration samples (average difference in KC before and after transport was $-0.006 \pm 0.071 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($P > 0.05$)) demonstrated the possibility for use of central calibration system of MIR-FT method to KC measurement. In total it is possible to evaluate the results of calibrations as successful and measurement results as suitable for milk KC practical screening.

Tato výzkumně-vývojová metodická práce byla podporována projekty MŠMT, MSM 2678846201, MŠMT INGO LA 09030 a také provedena v rámci aktivit NRL-SM.

REFERENCE

- BATICZ, O., TÖMÖSKÖZI, S., VIDA, L., 2002: Concentrations of citrate and ketone bodies in cow's raw milk. *Periodica Polytechnica, Ser. Chem. Eng.*, 46, 1–2, 93–104.
- BERLEC, M., GOLC-TEGER, S., 1999: Determination of nitrogen components content in milk by FTIR spectrometry. 2. Slovenian Congress „Milk and Dairy Products” Portorož, PB-18, 63.
- BIGGS, D. A., 1978: Instrumental infrared estimation of fat, protein, and lactose in milk: collaborative study. *J. AOAC*, 61, 5, 1015–1034.
- BIGGS, D. A., JOHNSON, G., SJAUNJA, L. O., 1987: Analysis of fat, protein, lactose, total solids by infra-red absorption. *IDF Bulletin, Doc. 208*, 21–29.
- BIGGS, D. A., SZIJARTO, L. F., VOORT VAN DE, F. R., 1984: Fresh milk sampling for centralized milk testing. *J. Dairy Sci.*, 67, 3085–3092.
- BIJGAART VAN DEN, H., 2006: New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 2 Free fatty acids. *IDF Bulletin*, 406, 22–28.
- BROUTIN, P. J., 2006: New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 1 Casein. *IDF Bulletin*, 406, 2–21.
- ČSN 57 0536, 1999: Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátelem. Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) Český normalizační institut, Praha.
- ECKSCHLAGER, K., 1961: Chyby chemických rozborů. Praha, SNTL, 163.
- ECKSCHLAGER, K., HORSÁK, I., KODEŠ, Z., 1980: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. Praha, SNTL.
- FAMIGLI-BERGAMINI, P., 1987: Rapporti tra patologia (non mammaria) ed aspetti quali-quantitativi del latte nella bovina. *Società Italiana di Buiatria*, Bologna, 19, 8–10, 89–99.
- FEINBERG, M., LAURENTIE, M., 2006: A global approach to method validation and measurement uncertainty. *Accred. Qual. Assur.*, 11, 3–9.
- FOSS, 2004 a: MilkoScan FT 120; Urea calibration: Determination of urea in raw cow's milk. Foss Analytical Application Note No. 95a, December, P/N 492280, 1–6.
- FOSS, 2004 b: MilkoScan FT 120; Improved milk calibration. Foss Analytical Application Note No. 128e, November, P/N 580282, 1–14.

- FOSS, 2001: MilkoScan FT 6000; Free fatty acids measurement (FFA). Spectrum Calibration. Foss Electric, 1–8.
- FOSS, 1999: MilkoScan FT 6000; Urea measurement, Issue 76100-30bGB, November, 1–5.
- GARNSWORTHY, P. C., MASSON, L. L., LOCK, A. L., MOTTRAM, T. T., 2006: Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89, 1604–1612.
- GRAPPIN, R., 1987: Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. IDF Bulletin, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, 3–12.
- GRAPPIN, R., 1993: European network of dairy laboratories. V: Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories. Sonthofen / Germany, 1992-05-18/20, Brussels, 205–211.
- HANSEN, P. W., 1999: Screening of dairy cows for ketosis by use of infrared spectroscopy and multivariate calibration. *J. Dairy Sci.*, 82, 2005–2010.
- HANUŠ, O., BENDA, P., GENČUROVÁ, V., 1992 a: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. I. ověření bakteriostatických a baktericidních vlastností a interferenčního vlivu. Tests of Milkofix a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part I. Checks of bacteriostatic and bactericidal abilities and interferential effect. (In Czech) *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1, 21–31.
- HANUŠ, O., BENDA, P., JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J., 1998: Design a vyhodnocení prvního celostátního testu kvality rutinních analýz základního složení mléka. Design and evaluation of the first national qualitative testing of routine milk analyses. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno)*, ISSN 1211-8516, XLVI, 3, 33–53.
- HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., GABRIEL, B., 1992 b: Vliv stárnutí vzorků na přesnost infračervené analýzy základního složení mléka. The effect of sample aging on the accuracy of an infrared analysis of basic milk composition. (In Czech) *Veter. Med. (Praha)*, 37, 3, 149–160.
- HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., ŽVÁČKOVÁ, I., 1992 c: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. II. ověření konzervačního účinku ve vztahu k infračervené analýze. Tests of Milkofix a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. (In Czech) Part II. Checks of preservative effects in relation to the infrared analysis. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1, 33–43.
- HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., KOPECKÝ, J., JEDELSKÁ, R., MOTYČKA, Z., ČERNOCKÝ, M., 2008 a: Interpretace výsledků experimentální kalibrace rutinních IR přístrojů pro měření látkového obsahu volných mastných kyselin (VMK) mléčného tuku. The interpretation of experimental calibration results of routine IR instruments for determination of free fatty acid contents of milk fat. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 182, 2, ISSN 0139-7265, 55–62.
- HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., JANŮ, L., JEDELSKÁ, R., 2007: Rámcové představení hlavních prvků systému QA u chemických a fyzikálních metod v referenčních a rutinních laboratořích pro analýzy kvality syrového mléka v ČR. A framework performance of main elements of QA system of chemical and physical methods in reference and routine laboratories for raw milk quality analyses in the CR. (In Czech) *Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment*, ISBN 978-80-86380-37-7, Komorní Lhotka, 33–50.
- HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., ŘÍHA, J., VYLETĚLOVÁ, M., JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J., DO-LÍNKOVÁ, A., 2008 b: Specifika referenčních materiálů a výkonnostního testování způsobílosti výsledků u základních mlékařských analýz. Specificity of reference materials and results proficiency testing in basic milk analyses. (In Czech) In proceedings: Referenční materiály a mezilaboratorní porovnávání zkoušek III. Reference materials and interlaboratory investigation comparison III. Mezinárodní konference, 2 THETA Analytical standards and equipment, Medlov, ISBN: 978-80-86380-46-9, 53–78.
- HANUŠ, O., HERING, P., FRELICH, J., JÍLEK, M., GENČUROVÁ, V., JEDELSKÁ, R., 2008 c: Reliability of milk urea analysis results by various methods in use of artificial milk control samples. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, 4, 156–165.
- HANUŠ, O., SKYVA, J., HOFBAUER, J., KLOPČIČ, M., GENČUROVÁ, V., JEDELSKÁ, R., 2001: Reliability of analytical methods applicable at milk urea determination. (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno)*, XLIX, 3, 143–154.
- HANUŠ, O., VEGRICHT, J., FRELICH, J., MACEK, A., BJELKA, M., LOUDA, F., JANŮ, L., 2008 d: Analyse of raw cow milk quality according to free fatty acids contents in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, 1, 17–30.
- HERRE, A., 1998: Den Harnstoff-Werten nicht blind vertrauen! *Top Agrar*, 2, R10.
- HERING, P., HANUŠ, O., FRELICH, J., PYTLOUN, J., MACEK, A., JANŮ, L., KOPECKÝ, J., 2008: Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, 2, 64–76.
- HEUER, C., LUNGE, H. J., LUTZ, E. T. G., SCHUKEN, Y. H., MAAS VAN DER, J. H., 2001: Determination of acetone in cow milk by Fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. *J. Dairy Sci.*, 84, 575–582.
- ILLEK, J., PECHOVÁ, A., 1997: Poruchy metabolismu dojníc a kvalita mléka. Metabolic disorders at cows and milk quality. (In Czech) *Farmář*, 6, 29–30.

- JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., 2003: Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. *Czech J. Food Sci.*, 21, 4, 123–128.
- KERKHOF-MOGOT, M. F., KOOPS, J., NEETER, R., SLANGEN, K. J., HEMERT VAN, H., KOOYMAN, O., WOOLDRIF, H., 1982: Routine testing of farm tank milk with the Milko-Scan 203. 1. Calibration procedure and small-scale experiments. *Neth. Milk Dairy J.*, 36, 115–130.
- KHALED, N. F., ILLEK, J., GAJDŮŠEK, S., 1999: Interactions between nutrition, blood metabolic profile and milk composition in dairy goats. *Acta Vet. Brno*, 68, 253–258.
- KRÁČMAR, S., JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., KUČTÍK, J., ZEMAN, L., 2004: Analysis of amino acid composition of sheep colostrum by near-infrared spectroscopy. *Czech J. Anim. Sci.*, 49, 5, 177–182.
- KUBEŠOVÁ, M., FAJMON, T., FRELICH, J., TRÁVNÍČEK, J., MARŠÁLEK, M., 2009: Analysis of milk urea and milk citrate content during the postpartal period and their impact on reproduction in dairy cows. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 185, 1, ISSN 0139-7265, 2–13.
- KUKAČKOVÁ, O., ČURDA, L., JINDŘICH, J., 2000: Multivariate calibration of raw cow milk using NIR spectroscopy. *Czech J. Food Sci.*, 18, 1, 1–4.
- KUPKA, K., 1997: Statistické řízení jakosti. Trilobyte. ISBN 80-238-1818-X, 119.
- LEFIER, D., GRAPPIN, R., POCHET, S., 1996: Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier transform infrared spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. *J. AOAC*, 79, 3, 711–717.
- LERAY, O., 1993: CECALAIT: an organization to support analytical quality assurance in dairy laboratories. V: *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories*. Sonthofen / Germany, 1992 -05-18/20, Brussels, 349–360.
- MELOUN, M., MILITKÝ, J., 1992: Statistické zpracování experimentálních dat na osobních počítačích. Statistical processing of experimental data by personal computer. Díl IIA, Pardubice, 102.
- MELOUN, M., MILITKÝ, J., 1994: Statistické zpracování experimentálních dat. Plus spol. s r.o..
- PETERSON, A. B., FRENCH, K. R., RUSSEK-COHEN, E., KOHN, R. A., 2004: Comparison of analytical methods and the influence of milk components on milk urea nitrogen recovery. *J. Dairy Sci.*, 87, 1747–1750.
- PIJANOWSKI, E., 1977: *Základy chemie a technologie mlékářstva*. Příroda – Bratislava, 69.
- ROOS DE, A. P. W., BIJGAART VAN DEN, H. J. C. M., HORLYK, J., JONG DE, G., 2006: Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. Technical presentations, 35th ICAR Session, Kuopio, Finland, 10th June, 53–59.
- SJAUNJA, L. O., 1984 a: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. II. Factors affecting milk analyses by infrared technique under laboratory conditions. *Acta agric. scand.*, 34, 260–272.
- SJAUNJA, L. O., 1984 b: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. III. The effect of different treatments on infrared analyses. *Acta Agric. Scand.*, 34, 273–285.
- SJAUNJA, L. O., ANDERSSON, I., 1985: Laboratory experiments with a new infrared (IR) milk analyzer, the Milko-Scan 605. *Acta agric. scand.*, 35, 345–352.
- SJAUNJA, L. O., PHILIPSSON, J., LUNDSTRÖM, K., SWENSSON, CH., 1984: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. IV. Factors affecting milk analyses in a routine system by automated apparatuses. *Acta agric. scand.*, 34, 286–299.
- SUCHÁNEK, M., PLZÁK, Z., ŠUBRT, P., KORUNA, I., 1999: Kvalimetrie, 7. Validace analytických metod. *Eurachem*, 140.
- 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 univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LIV, 2, 131–138.
- ŠUSTOVÁ, K., RŮŽIČKOVÁ, J., KUČTÍK, J., 2007: Application of FT near spectroscopy for determination of true protein and casein in milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 52, 9, 284–291.
- TSENKOVA, R., ATANASSOVA, S., ITOH, K., OZAKI, Y., TOYODA, K., 2000: Near infrared spectroscopy for biomonitoring: Cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. *J. Anim. Sci.*, 78, 515–522.
- WALSTRA, P., JENNESS, R., 1984: *Dairy Chemistry and Physics*, New York – Chichester – Brisbane – Toronto – Singapore.

Adresa

doc. Ing. Oto Hanuš, Ph.D., Výzkumný ústav pro chov skotu Rapotín, Výzkumníků 267, 788 13 Vikýřovice, Česká republika, Ing. Václava Genčurová, Ph.D., Mgr. Irena Hulová, Radoslava Jedelská, Jaroslav Kopecký, Agrovýzkum Rapotín, Výzkumníků 267, 788 13 Vikýřovice, Česká republika, prof. Ing. Ladislav Štolc, CSc., Česká zemědělská univerzita Praha, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika, Ing. Josef Kučera, Ph.D., Svaz chovatelů českého strakatého skotu, U Topíren 2, 170 41 Praha 7, Česká republika, Zdeněk Motýčka, Českomoravská společnost chovatelů, a. s. Praha, Laboratoř pro rozbor mléka Buštěhrad, Lidická 2/334, 273 43 Buštěhrad, Česká republika

