

A standardizáció lehetőségei és előnyei a közeli infravörös spektroszkópia alkalmazásában

Sárossy Gábor, Gergely Szilveszter és Salgó András

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 2002.06.28.

A közeli infravörös spektroszkópiái (reflexiós NIR és transzmissziós NIT) módszerek gyorsan terjednek az élelmiszer- és egyéb ipari területek minőségellenőrzési és anyagazonosítási gyakorlatában. A módszerek alkalmazásának számtalan előnye mellett, a mérési eljárás közvetett jellege (vagyis hogy spektroszkópiái jelsorozatokból különféle kalibrációk és/vagy „tanító algoritmusok” alapján számítunk, illetve prediktálunk az összetétellel arányos minőségi vagy mennyiségi adatokat) gyakran akadályozza a mérési eredmények pontosságát és összehasonlíthatóságát javításának.

A módszerek közvetett jellege legalább két fő hibaforrást eredményezhet:

- a spektrométerek, mint optikai berendezések hardverek fizikai, mérés-technikai szempontból különbözőek;
- a kalibrációs, kemometriai módszerek és az alkalmazott nedveskémiai referencia módszerek különböző mértékű hibákkal terheltek.

A két fő hibaforrás egyenkénti és együttes hatásainak csökkentésére több, mint 15 éve folynak kutatások (1, 2), amelyek célja a NIR/NIT készülékek standardizálása.

A standardizáció jelentősége tehát:

- a készülékek közötti fizikai különbségek csökkentése, illetve megszüntetése;
- ezzel a készülékek hálózatban való működtetési lehetőségének megteremtése;
- a kalibrációk (kemometriai összefüggések) készülékek közötti átvitelének (transzferálhatóság) lehetővé tétele;
- az indirekt úton nyert mérési eredmények kölcsönös elfogadásának javítása.

A standardizáció megvalósítására alapvetően kétféle – koncepciójában különböző – módszer terjedt el.

1. Az egyik eljárás szerint az optikailag különböző spektrométerek spektrum jelsorozatait „illesztjük” és ezen illesztés révén a master készülék optikai jelsorozatához „igazítjuk”, annak megfelelően a

követő (slave) készülék jelsorozatát. Vagyis a célt, a standardizációt úgy valósítjuk meg, hogy a két készülék (master és slave) közel azonos optikai jelsorozatú spektrumokat szolgáltatson.

Az ilyen típusú „illesztések” (spektrumtranszformáló algoritmusok) első generációját Shenk és munkatársai (3, 4) dolgozták ki és Dardenne és munkatársai alkalmazták (2, 5). Eljárásuk során a hullámhossz eltolódást (drift) és az abszorbancia különbségeket korrigálták a master és slave készülékek között nagyszámú, ún. transzfer minta alkalmazásával. Az eljárás hátránya, hogy az abszorpciós csúcsok alakváltozásait (csúcsszélesedés) ez az eljárás nem kezeli hatékonyan.

Jobb eredményeket szolgáltatott a szakaszonkénti közvetlen standardizáció (PDS = piecewise direct standardisation) módszere, amely egy mozgó „hullámhossz ablakot” futtat végig a spektrum mentén és ezen ablak spektrum pontjain minimálja, számítja a master és slave készülékek optikai jeleinek eltéréseit a részleges legkisebb négyzetek módszerével (PLS = partial least squares). Majd ezáltal függvényt (F) generál a különbségek korrekciójára a spektrum mentén, ami a következő alakban írható fel:

$$X_{\text{master}} = X_{\text{slave}} * F + \text{hiba}$$

Egyszerűbben fogalmazva: ez az eljárás a slave készülék optikai jeleit a lehető legkisebb hibával „hozzácipzározza” a master készülék jelsorozatához (6, 7, 8). Mivel a futó hullámhossz-ablak egyszerre több hullámhossznál mért optikai jeleket kezel és transzformál, a módszer érzékeny a jelalak változásokra és nagyon érzékeny a készülékek közötti hullámhossz eltolódásokra (ez nem lehet nagyobb, mint 0,5 nm).

A master és slave készülékek jelsorozat illesztésének egy újabb módja (9), amikor a master és slave spektrumok közötti függvénykapcsolatot mesterséges neurális hálózati számítás (ANN = artificial neural networking) nemlineáris módszerének alkalmazásával határozzuk meg.

A készülékek optikai illesztése után a kalibrációs összefüggések készülékről készülékre való átvitelét, vagyis a kalibráció transzferét kell megoldani. Az átvitel után nyert mérések pontosságát, a modell érzékenységét, robusztusságát a kalibrációs eljárások matematikai-statisztikai és kemometriai módszerei befolyásolják. A nagy adatbázisokra leggyakrabban használt kalibrációs módszerek (MLR, PLS, ANN, LOCAL) hatásait és az átvitel okozta változásait, a hibaterjedést nagy körültekintéssel kell kezelni (10, 11, 12).

2. A fent ismertetett kétlépcsős standardizálás (fizikai standardizáció, majd kalibráció átvitele) mellett egyre szélesebb körben terjed az ún. globális kalibráció módszere.

Büchmann és munkatársai (13) óriási (több ezres) európai mintapopulációk felhasználásával gyűjtöttek spektroszkópiai és kémiai (referencia) adatokat búza és árpa minták (teljes szem) nedvesség- és fehérjetartalmára vonatkozóan. Ezen adatbázist – ami a különféle fajták termesztési és betakarítási körülmények és spektroszkópiai mérési feltételek variációit tartalmazta – kiterjesztették európai, USA-beli, kanadai, ausztráliai minták tízezreire vonatkozóan, és a mesterséges neurális hálózati számítás (ANN) módszerével globális kalibrációt építettek fel (14).

Ilyen méretű globális kalibrációs modell egyelőre csak ezen néhány gabonára (búza, árpa, rozs, triticales) és szójára került kidolgozásra, de ez a módszer épp a transzmissziós (NIT) készülékek hálózati üzemeltetési feltételeit javítja gyökeresen. A validált globális kalibrációk a követő (slave) készülékeken a tengelymetszet és meredekség (intercept és slope) ellenőrzése és beállítása után rutincélú mérésekre közvetlenül alkalmasak. A globális kalibrációk felépíthetők lineáris (PLS) és nemlineáris (ANN) statisztikai-kemometriai módszerek alkalmazásával egyaránt, de az ANN módszer valamint pontosabb, sokkal robusztusabb és időben állandó modelltranszferálhatóságot biztosít (14).

Vizsgálataink célja volt közeli infravörös reflexiós spektrométerünk standardizálása és annak vizsgálata, hogy a standardizálás és az azt követő robusztus kalibrációk alkalmazása milyen várható mérési pontosság-javulást eredményez gabonák beltartalmi tulajdonságainak elemzésében.

Anyagok és módszerek

Vizsgálatainkat egy EU IV. keretprogramban együttműködő partnerként végeztük és azok kiterjedtek:

- a spektrométerek fizikai és mérés technikai standardizálására;
- spektroszkópiai és kémiai adatgyűjtésre, európai (master) kalibrációk kidolgozására;
- a kalibrációk standardizált készülékeken történő validálására.

Standardizációs minták: 30 db különféle mezőgazdasági élelmiszeripari alap-, adalék- és segédanyag (15); 10-10 db válogatott búza, árpa és kukorica minta; 5 db inert anyag (15); mind standard őrlött formában.

Kalibráló minták: 60-60 db európai országokból származó búza, árpa és kukorica minta egységesen központilag őrölt formában, ill. teljes szem formában.

Validáló minták: 30-30 db búza, árpa és kukorica minta mind őrlemény formában, ill. teljes szem formájában a saját őrlési művelet értékelésére.

A kalibráció és a validálás céljaira olyan reprezentatív, a lehetséges optikai és kémiai variációt a legnagyobb mértékben megjelenítő mintasor szükséges, ami az ún. globális (fajtától, termőhelytől, vizsgált tartománytól, készüléktől független) kalibrációk kialakításához megfelel. Fenti célokra a résztvevő országokból származó, 1200 minta (1996-97-98. évi termésekből) spektroszkópiai szűrése után nyert 90-90 búza, árpa és kukorica mintát használtuk (60 minta kalibrációhoz és 30 minta független validálási célokra).

Spektroszkópiai vizsgálatok

A standardizálási műveletet egy európai keretprogramban (STAFANIR, EU, SMT4-CT96-2102) valósítottuk meg amelyben 9 követő és egy master NIR spektrométert használtunk. A résztvevő országok (szervezetek) és alkalmazott készülékeik listáját az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: Standardizációban résztvevő partnerek és készülékeik

Intézet rövidítés	Ország	Készülék
CCFRA	Nagy-Britannia	NIRSystems 6500
CATNIR	Spanyolország	NIRSystems 6250
ETSIAM	Spanyolország	NIRSystems 6500
INRA	Franciaország	Technicon 500
ITCF	Franciaország	NIRSystems 6500
STATKORN	Norvégia	Technicon 500
SAC	Skócia	NIRSystems 6500
TEAG	Írország	NIRSystems 6500
TUBH	Magyarország	NIRSystems 6500
<i>CRAgx (master)</i>	<i>Belgium</i>	<i>NIRSystems 6500</i>

Az összes résztvevő készülékén a 65 standardizációs minta spektrumát felvettük kétszer ismételve (kb. 2 óra időkülönbséggel) azért, hogy a készülék instabilitásából eredő varianciákat is figyelembe tudjuk venni. A minták esetleges időbeli változásának követésére a 65 mintát a master készüléken minden egyes kiküldés és visszaérkezés előtt, ill. után is

szkenneltettük. A készülékenként használható és készülékenként specifikus optikai standardizációs modellt az összes készüléken elvégzett spektroszkópiai mérések után alakítottuk ki.

Kalibrációs mintákat (60-60 búza, árpa, kukorica) őrlött formában 3 készüléken függetlenül szkenneltük (CRAGx, TEAG, CCFRA) és az így nyert anyagokként 180 spektrumot használtuk a master kalibráció kialakításához.

A master kalibráció validálási művelete során a 30-30 validáló mintát készülékenként szkenneltük, amelyek központilag megőrölt formában és intakt mag formában is rendelkezésre álltak, az őrlési művelet különbségeiből adódó eltérések elemzésére.

A spektroszkópiai és nedveskémi adatkezelést, számításokat, valamint a standardizációs számításokat az ISI (Infrasoft International, Port Matilda, USA) szoftvercsomag használatával végeztük, kalibrációs módszerként PLS eljárást alkalmaztunk.

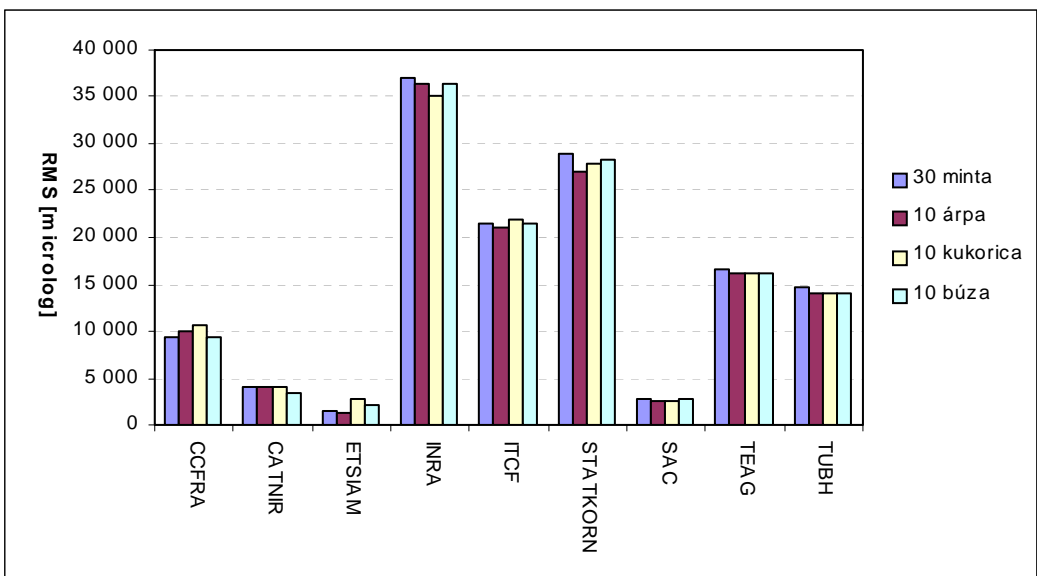
Nedveskémi vizsgálatok

Az anyagtípusonként (búza, árpa, kukorica) szelektált 90-90 minta nedvesség-, fehérje-, ill. kukorica esetén nedvesség- és olajtartalmát határoztuk meg standard módszerekkel. A fehérje meghatározást Kjeldahl- és Dumas-módszerrel egyaránt elvégeztük (15).

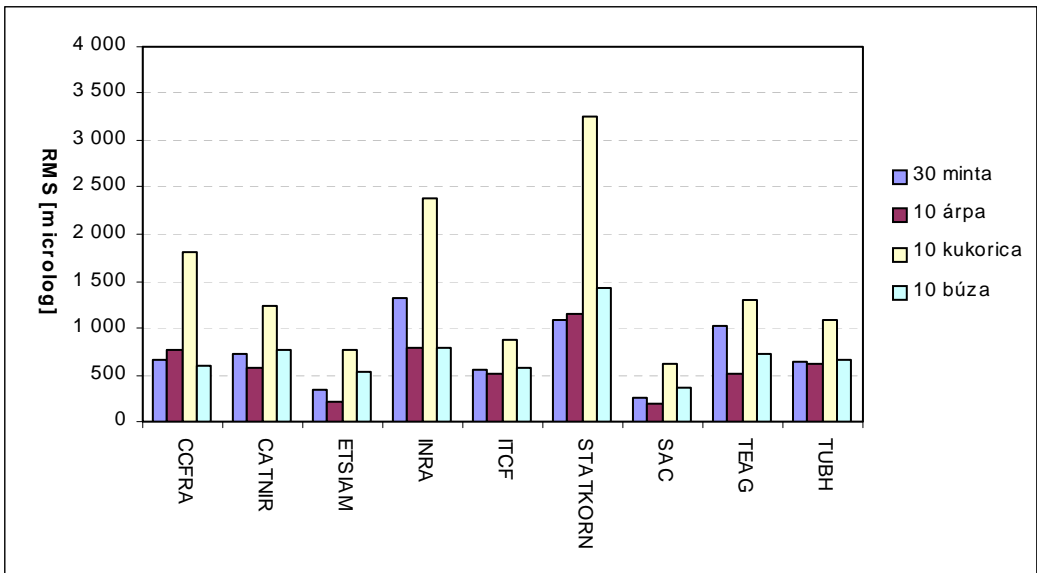
Eredmények és értékelés

A spektrométerek fizikai standardizációja

A 65 standard anyagminta spektroszkópiai vizsgálati eredményei alapján a követő készülékeket standardizáltuk a lépésenkénti közvetlen standardizálás (PDS = piecewise direct standardisation) módszerének alkalmazásával. Ez a módszer a spektrum mentén – egy 12 nm széles mozgó ablakot (7 mérési pont) alkalmazva – folyamatosan számolja a master és slave készülékek optikai adatkülönbségeit a legkisebb négyzetek módszere (PLS = partial least squares) segítségével. A számítás alapján függvényt generáltunk (F), ami a spektrum mentén elvégezte a master és slave készülékek abszorbancia adatainak megfeleltetését. A master és a különböző slave készülékek optikai különbségeit elemeztük „standardizálatlan” és standardizált állapot esetén. Az összehasonlító eredményeket az 1. ábra mutatja be (RMS = root mean square, azaz szórás vagy középhiba).



1/a ábra: A master (CRAGx) és különböző slave készülékek optikai különbségei standardizálás előtt



1/b ábra: A master (CRAGx) és különböző slave készülékek optikai különbségei standardizálás után

A hisztogramok alapján jól látható hogy NIR spektrométerünk (TUBH) standardizálatlan állapotban 14 000 - 15000 microlog eltérést mutat a master készülékhez (CRAGx) képest. Az eltérést összevetve a standardizációs folyamatban résztvevő másik 8 készülékkel megállapítható, hogy hardverünk átlagos optikai eltérést mutat. Az INRA és STATKORN többlettől eltérő típusú készülékei (Technicon 500) esetén szignifikánsan nagyobbak az optikai eltérések. Az eltérések alapvető okait a berendezések optikai és fizikai különbségeiben, valamint korábban kereshetjük.

A készüléket a saját standardizációs összefüggésünkkel standardizálva, a mastertől való eltérés közel két nagyságrenddel csökken (600 - 1 000 microlog). A standardizált állapot esetén feltűnő a kukorica minták esetén tapasztalt viszonylag eltérő microlog érték, ami a keményszemű kukorica magvak őrlésének, nagy felületi változékonyságának eredménye. A standardizáció révén a készülékek optikai különbségei nemcsak csökkentek, de ki is egyenlítődték a 100 - 1 500 microlog tartományban. Itt kell megjegyezni azt a körülményt, hogy hullámhossz eltolódást mutató készülékek, vagy ilyen jellegű hiba jelentkezése esetén a készülékek kis hatékonysággal standardizálhatók.

A standardizációs modell kialakításával megteremtettük a lehetőségét annak, hogy az optikai mérés és a szoftveres hozzáállítás után készülékünk olyan látens spektrumot produkál, ami minimális eltérést mutat a független master készüléken mért spektrumhoz képest. Az átlagos különbséget számszerűen kifejezve az kisebb, mint 1 000 microlog egység. A számítási modell egyes spektrométerekre érvényes koefficienseit ad hoc fájlba tároltuk és ezen koefficiensekkel módosítottuk a lokális spektrumadatokat. E módszerrel a bármely spektrométeren mért és a master készüléken mért NIR spektrum azonos lesz, illetve eltérésük minimált.

A módszerrel megteremtettük az ún. klónozott, virtuális készülékek hálózatát. Következő lépésként ezen készülékekre alkalmas globális kalibrációk kidolgozását végeztük el.

Kalibrációs eredmények

A búza, árpa és kukorica minták elemzésére alkalmas globális kalibrációk statisztikai jellemzőit (a master készülékre vonatkozóan) a 2. táblázat mutatja be.

2. táblázat: Globális kalibrációk master készüléken (CRAGx) való validálásának eredményei

	SEP(C) [%]	R ²	Global H	Minta
Fehérje (Kjeldahl)	0,29	0,97	1,05	búza + árpa
Fehérje (Dumas)	0,28	0,97	0,90	búza + árpa
Olaj	0,20	0,98	1,49	kukorica

SEP(C) Eltolódással korrigált meghatározási hiba [%]

R² Lineáris korrelációs koefficiens

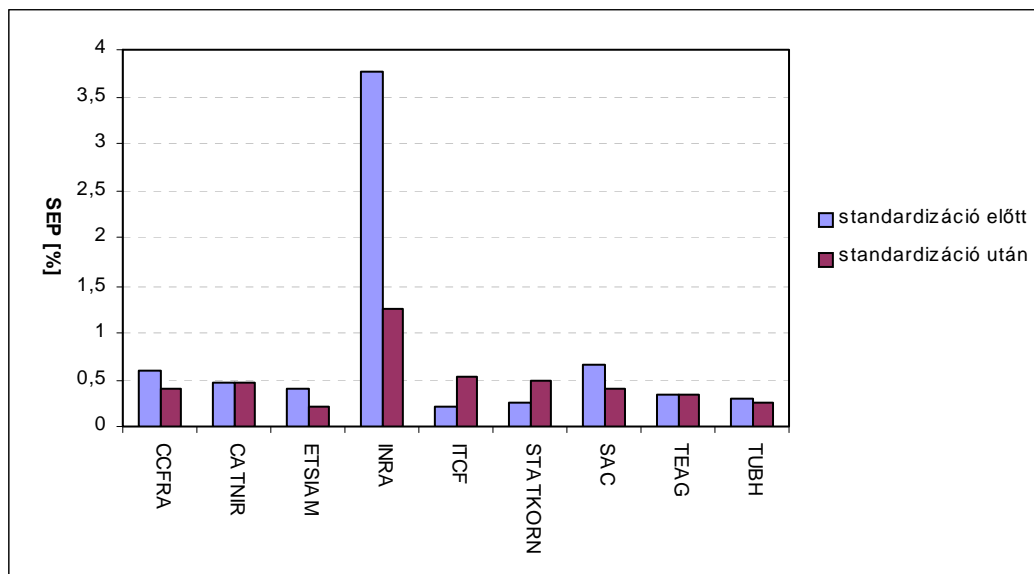
Global H Globális Mahalanobis távolság (<3), jellemzője az adott minta mintaseregbe való illeszkedésének

Az adatok megfelelő pontosságú, „homogén” (búzára és árpára együttesen alkalmazható) kalibrációkat jeleznek. A kukorica esetén

tapasztható magasabb globális H érték a nagyobb anyagi, szerkezeti érzékenységet jelzi.

A követő készülékek statisztikai jellemzése, validálás

A fizikai (optikai) standardizálást követően a slave készülékek validálását végeztük el a globális kalibrációk felhasználásával. Példaként a 9 követő készülék standardizáció előtti és utáni statisztikai eredményeit mutatjuk be árpa minták fehérjetartalmának vizsgálata esetén, Kjeldahl referencia módszer alkalmazása mellett (SEP = standard error of prediction, azaz a NIR alapú meghatározás hibája).



2. ábra: Árpa minták fehérjetartalmának meghatározási hibája (SEP) standardizáció előtt és után (Kjeldahl referencia módszer alkalmazása mellett)

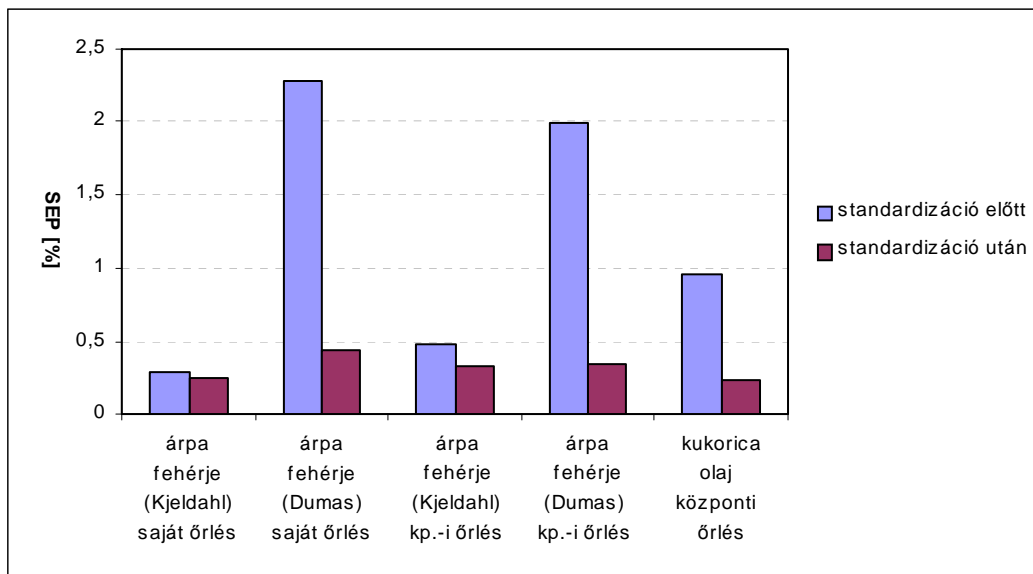
A 2. ábra eredményei igazolják, hogy a standardizáció eredményeképp a meghatározás (predikció) pontossága általában javul. Az INRA feltűnően pontatlan adatpárja annak tulajdonítható, hogy ez a készülék az összes többi készülékhez képest 10 nm-es durva hullámhossz eltolódást (drift) mutatott, amit a PDS módszer (és más módszer sem) nem tud kompenzálni. A standardizáció után nyert, átlagosan 0,3 %-os mérési pontosság (SEP érték) jó összhangban van a 2. táblázat megfelelő adatával (SEP(C) = 0,29).

A saját készülékünk (TUBH) validálásának paramétereinkénti adatait a 3. ábra mutatja be.

A standardizálás látványos pontosság javulást eredményezett minden vizsgált paraméter, illetve mintakezelés esetén. A művelet segítségével a fehérjetartalom referencia módszertől függetlenül 0,25 - 0,35 %-os abszolút

pontossággal meghatározható. A Dumas-módszerrel nyert kalibrációk standardizálás után is valamivel pontatlanabbak, mint a Kjeldahl alapúak.

A 3. ábra alapján látható, hogy a standardizálás készülékünk (TUBH) pontosságának jelentős javulását eredményezte a Kjeldahl-féle meghatározás esetén. A SEP 0,29 %-ról 0,25 %-ra, az eltolódás (bias) értéke a felére, a globális H értéke szintén a felére csökkent (adatot itt nem közlünk).



3. ábra: Készülékünk (TUBH) validálásának eredményei a meghatározási hibák (SEP) tükrében standardizáció előtt és után

A Dumas-módszer esetén a pontosság javulása még inkább szembevetű. A SEP, bias és globális H értékek egy vagy két nagyságrenddel javultak. Hasonló megállapítások tehetők, amennyiben a Kjeldahl- és Dumas-módszer eredményeit együtt kezeljük. A darálás, őrlés művelete hatással van a mérési pontosságra, ez a hatás azonban lényegesen kisebb, mint a standardizáció hatása. A kalibrációs modellek transzfere esetén ezt a körülményt gondosan vizsgálni kell. Az olajtartalom mérés pontossága az eredeti standardizálatlan állapothoz képest kb. ötszörösen javul, ugyanilyen mértékű a globális H érték csökkenése.

A fenti eredmények alapján megállapítható, hogy a kidolgozott kalibrációs modellek (master kalibráció) az ellenőrzés (predikció) során jó eredményeket nyújtanak minden olyan készüléken, amelyek nem mutatnak 0,5 nm-nél nagyobb szisztematikus hullámhossz eltolódást. A kalibrációs modellek transzfere tehát azonos típusú, monokromátoros készülékek között kivitelezhető és a predikciós célérték (hiba fehérjére kisebb, mint 0,3 %) reálisan megvalósítható. A TUBH spektrométere – annak ellenére,

hogy viszonylag koros készülék – jól standardizálható, a független validálás alapján egy jó átlagos pontosságú monokromátoros berendezés.

A kalibrációs modell gyakorlati használatának ellenőrzésére 10 független búzaminta elemzését is elvégeztük standardizálás nélkül és standardizálás beiktatásával. Az eredményeket a 3. táblázat foglalja össze.

Mint az eredmények jelzik, a standardizálás szisztematikus modellmódosítást igényelt és az elérhető mérési pontosság radikálisan javítható volt.

3. táblázat: A standardizálás eredményének statisztikai ellenőrzése 10 független búzaminta vizsgálatával

Mintaszám	Fehérjetartalom [%]				
	Master (CRAGx)	Standardizálás előtt		Standardizálás után	
		TUBH	Eltérés	TUBH	Eltérés
WH1	13,26	12,07	1,19	13,19	0,07
WH2	12,67	11,29	1,39	12,61	0,06
WH3	12,00	10,63	1,37	11,92	0,08
WH4	12,57	11,03	1,54	12,48	0,09
WH5	13,47	12,14	1,32	13,43	0,04
WH6	12,30	10,87	1,44	12,22	0,08
WH7	13,46	12,19	1,27	13,44	0,02
WH8	10,13	8,50	1,62	10,09	0,04
WH9	8,89	7,30	1,59	8,80	0,09
WH10	9,41	7,70	1,71	9,33	0,08
átlag			1,444		0,065
szórás			0,167		0,024

Összefoglalás, következtetések

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a klónozott magyar készülék (NIRSystems 6500, BME) hullámhossz eltolódása 0,171 nm (a megengedett hiba kisebb, mint 0,5 nm). A standardizált készülék optikai (abszorbancia) eltérése a master készüléktől 500 - 1 000 microlog, standard hibája egy jó átlagos európai készülék hibatarományával megegyezik, idős kora ellenére az optikai elemek öregedése átlagos.

A kidolgozott master kalibrációk jó minőségű, transzferálható, elég érzékeny modellek. A master kalibrációk használatával a standardizált készülékek pontossága lényegesen javítható. A független validálás eredményei ugyanazon tendenciákat tükröznek, mint a többi európai készülék esetén: búza és árpa minták esetére kiváló minőségű, kompatibilis mérési adatokat nyertünk. Az elért mérési pontosság a pontossági

célértéknél jobb. A mintaelőkészítés (aprítás) művelete nagyon körültekintő elemzést igényel, különösen a kemény magvú gabonák (kukorica) esetén.

A kidolgozásra került, ún. standardizációs fájlok használata a pontosságot, a független mérések eredményeit alapvetően megjavította (átlagos SEP érték standardizálás nélkül búzára 1,44 %, standardizálás után 0,07 %). A standardizációs fájlok használatával a rutin mérés feltételei lényegesen átalakultak, a transzferálhatóság és a kölcsönös adatelfogadás feltételei javultak.

A NIR berendezések standardizálása jelentősen segítheti a megbízható nyersanyag- és termékellenőrzést, javítva ezzel a minőségellenőrzés feltételeit, a termelési biztonságot.

Irodalomjegyzék

- (1) J.S. Shenk, In Proc. 3rd Int. Conf. on NIRS, Ed. by R. Biston and N. Bartiaux-Thill. Agr. Res. Cent. Publishing, Gembloux, Belgium p. 649 (1991)
- (2) P. Dardenne and R. Biston, In Proc. 3rd Int. Conf. on NIRS, Ed. by R. Biston and N. Bartiaux-Thill. Agr. Res. Cent. Publishing, Gembloux, Belgium p. 655 (1991)
- (3) J.S. Shenk, M.O. Westerhaus and W.C. Templeton, Crop Sci. 25, 159 (1985)
- (4) J.S. Shenk and M.O. Westerhaus, US Patent No. 48 66644 Sept.12. (1989)
- (5) P. Dardenne, R. Biston and G. Sinnaeve, In Near Infrared Spectroscopy: Briding the Gap between Data Analysis and NIR Applications, Ed. by K.I. Hildrum, T. Isaksson, T. Naes, A. Tandberg and Ellis Horwood. Chichester, UK p. 453 (1992)
- (6) Y. Wang, D.J. Velkamp and B.R. Kowalski, Anal. Chem. 63, 2750 (1991)
- (7) Y. Wang and B.R. Kowalski, Appl. Spectrosc. 46, 764 (1992)
- (8) E. Bouveresse and D. Massart, Chemom. Intel. Lab. Syst. 32, 201 (1996)
- (9) L. Duponchel, C. Ruckebusch, J.P. Huvenne and P. Legrand, J. Near Infrared Spectrosc. 7, 155 (1999)
- (10) B.G. Osborne, Z. Kotwal, I.J. Wesley, L. Saunders, P. Dardenne and J.S. Shenk, J. Near Infrared Spectrosc. 7, 167 (1999)
- (11) F.E. Barton II, J.S. Shenk, M.O. Westerhaus and D.B. Funk, J. Near Infrared Spectrosc. 8, 201 (2000)
- (12) P. Dardenne, G. Sinnaeve and V. Baeten, J. Near Infrared Spectrosc. 8, 229 (2000)
- (13) N.B. Büchmann and S. Runfors, J. Near Infrared Spectrosc. 3, 35 (1995)
- (14) N.B. Büchmann, H. Josefsson and I.A. Cowe, Cereal Chemistry, 78, 572 (2001)
- (15) Final report. Standardisation of Food Analysis by Near Infrared Reflectance. EU Project SMT4-CT96-2102 (1999)