

UNTERSUCHUNG ZUR ANALYSE TIERISCHER LEBENSMITTEL MITTELS IR-REFLEXIONSANALYSE

Vortrag von: Ing. Manfred ALTMANN / Sales Manager / Technicon Wien  
K. Mifek, R. Frühling

Lebensmitteluntersuchungsanstalt der Stadt Wien

**Zusammenfassung:** Es konnte gezeigt werden, daß sorgfältige Eichung vorausgesetzt die Analyse auf Wasser, Fett, Rohprotein und Stärke mittels InfraLyzers bei den untersuchten Produktgruppen Verarbeitungsfleisch und Brätwürsten zu guten Ergebnissen führt und sich schnell mit sehr geringem Aufwand durchführen läßt. Es wurde festgestellt, daß die vernünftigsten Ergebnisse bei Verwendung von 10 Filterpunkten zu erhalten sind. Ebenso wurde die Temperaturabhängigkeit der Messung untersucht. Was die Verwendbarkeit des IAA betrifft, so wird er für Betriebsuntersuchungen interessant sein, wo rasch und mit geringem personellen Aufwand Zwischenergebnisse bei der Produktion vonnöten sind. Für diese Aufgabe erscheint der IAA nach unseren Ergebnissen sehr gut geeignet, das um so mehr, als nach erfolgter Ersteinigung des IAA weitere Kontrolleichungen zwar regelmäßig, aber nur in größeren Abständen nötig sein dürften. Die Diskussion über Für und Wider der Verwendung des IAA zur Untersuchung von Fleisch- und Wurstwaren in Untersuchungsanstalten jedoch muß, bis zur Lösung des Problems "Bindegewebsgehalt" hinten angestellt werden.

### Einleitung

Über die Notwendigkeit einer umfassenden chemischen Analyse tierischer Lebensmittel bezüglich der Grundstoffe, Eiweiß, Fett, Wasser, etc. sowohl von produktionstechnischer als auch von lebensmittelrechtlicher Sicht her braucht wohl nicht gesprochen zu werden. Andererseits ist aber nicht zu leugnen, daß die herkömmlichen Methoden einen ziemlichen Aufwand vor allem an Zeit, aber auch an qualifiziertem Fachpersonal bedürfen. Ein Umstand, der sich vor allem bei betriebstechnischen Qualitätskontrollen sehr hemmend auswirkt.

Eine sehr vielversprechende Alternative bietet nun die IR-Reflexionsanalyse, die sich in einigen anderen Bereichen (etwa Getreideuntersuchungen) schon einen festen Platz erobert hat. Der eminente Vorteil dieser Methode ist, daß nicht nur die gut homogenisierten Proben direkt sofort gemessen werden können, sondern auch daß die Untersuchungszeit - die entsprechende, richtige Eichung des InfraLyzers vorausgesetzt - weniger als eine Minute beträgt.

Es ist daher der Inhalt unserer Arbeit, die Verwendbarkeit der IR-Reflexionsanalyse und im speziellen das Gerät InterAnalyzer 400 der Firma Technicon auf die Verwendbarkeit zur Untersuchung von Fleisch- und Fleischwaren zu prüfen. Im vorliegenden Teil der Arbeit wurden Verarbeitungsfleisch sowie Brät untersucht.

**Geräte, Materialien:** InfraAnalyzer 400 (im folgenden als IA abgekürzt). Prinzip: IR-Reflexionsspektrometrie, im NIR (1,4 bis 2,4 nm). Als Monochromatoren dienen 19 Interferenzfilter, die nacheinander in die Strahlung eingebracht werden. Das monochromatische Licht wird an der Probenoberfläche diffus reflektiert. Ein vergoldeter, staubdichter Kugelreflektor, der zwei Detektoren einschließt, gewährleistet eine hohe Ausbeute des reflektierten Lichtes und dient gleichzeitig als interner Standard. Die Auswertung der verschiedenen Meßsignale und die Steuerung sämtlicher Funktionen erfolgt durch einen Mikroprozessor. Die Anzeige der Ergebnisse erfolgt auf einem Display oder auf einem mittels RS-232-Schnittstelle angeschlossenen Drucker. Als Küvette wurde eine offene Version gewählt, da es durch den Anpreßdruck eines Deckels zur Entmischung kommen kann (vor allem bei Erwärmung). Zur Eichung wurde ein HP 85 mittels der am IAA befindlichen RS-232-Schnittstelle angeschlossen. Die Berechnungen erfolgten durch die zur Verfügung gestellten Software "BestSets". Als Proben wurden verwendet: 1. Verarbeitungsfleisch, das mit Hilfe eines Fleischwolfes und eines 3-L-Kutters (vier rotierende sichelförmige Messer) homogenisiert und unverzüglich der Messung unterzogen wurde). 2. Brät für Brätwürste (Pariser, Extra, Frankfurter, Knacker, Leberkäse). Die Messung erfolgte bei einer Probentemperatur von 5°C, um die Bedingungen der Praxis zu simulieren. Eingefrorene Proben wurde nicht verwendet.

**Prinzip der Eichung:** Eine Voraussetzung, um möglichst genaue und zuverlässige Analysen zu erhalten, ist eine umfangreiche und sorgfältige Grundeichung. Die Eichung hat einerseits den Zwecke: a) die charakteristischen Filter bzw. Filterkombinationen zur Messung an dem Maxima des betreffenden Inhaltsstoffes zu finden, und andererseits b) die Regressionskoeffizienten der selektierten Filter zu ermitteln (der Regressionskoeffizient entspricht der Wertigkeit des Filters). Weiters wird bei der Eichung der BIAS-Wert (FOO) ermittelt. (Der BIAS-Wert dient zum Ausgleich eines systematischen Fehlers). Zur Eichung benötigt man eine größere Anzahl von Proben, deren Zusammensetzung exakt mittels Standardmethoden bestimmt wurden. (im vorliegenden Fall: Wasser-Trocknung; Fett-Soxhletextraktion; Protein-Kieldahl (mittels AutoAnalyzer); Stärke-Polarimetrisch). (Abb.1). Mit den Logarithmen der Reflexionswerte und den manuellen Analysenwerten wird in einer stufenweisen multiplen Regressionsrechnung für jeden Inhaltsstoff die Filterkombination und deren zugehörige Regressionswerte ermittelt. Die Eichung wird je so zuverlässiger, je mehr Proben vorhanden sind, je homogener sie vorliegen und je genauer die manuellen Werte sind. Bei der Auswahl der Proben, welche für die Eichung verwendet werden, ist darauf zu achten, daß die Schwankungsbreite der Zusammensetzung der Probe ähnliche Verhältnisse aufweist, wie die zu analysierenden Proben. **Prinzip der Analyse:** Die bei der Eichung berechneten Regressionskoeffizienten der spezifischen Filter und der BIAS-Wert (FOO) können direkt im IAA gespeichert werden (Speicherplatz für 98 Probenarten mit je neun Inhaltsstoffen). Die Probenbehandlung beschränkt sich auf das Homogenisieren und das Einstreichen der Proben in die Küvette, wobei zu achten ist, daß die Oberfläche möglichst glatt ist und keine großen Bindegewebestücke enthält. Die bei der Messung erhaltenen Reflexionswerte werden mit den im Gerät gespeicherten Werten berechnet. Das Ergebnis erscheint in der gewünschten Einheit am Display. Für die Berechnung der Konzentrationswerte der einzelnen Inhaltsstoffe liegt folgende Gleichung zugrunde:  $y = FOOx + F02x \cdot R2x + F03x \cdot R3x + \dots + Fnx \cdot Rnx$  R2x-Rnx: Reflexionssignale bei den Wellenlängen 2 bis n für Inhaltsstoff x. Der Meßvorgang dauert 50 sec. Da das IR-Licht nur wenige nm tief in die Probe eindringt, entspricht die Analyse einer Analyse der Oberfläche. Die Oberfläche ist natürlich sehr von der Homogenität abhängig. Um eine größere Genauigkeit zu erzielen, empfiehlt es sich, pro Probe mindestens drei Bestimmungen durchzuführen.

**Restanordnung:** Ziel: a) Erfahrung über die Eichung des Gerätes b) praktische Handhabung c) Zuverlässigkeit der Analyseergebnisse. Da das Haupt Einsatzgebiet einer Schnelluntersuchung mittels des IAA die Betriebskontrolle darstellen dürfte, wurden

vorerst Versuche mit Verarbeitungsfleisch und Brät durchgeführt, dessen Zusammensetzung dem durchschnittlichen Anfall in einem Fleischverarbeitungsbetrieb entspricht. Die Fleischproben wurden in drei Gruppen eingeteilt (Tabelle 1): 1. Teil-Eichung 1 2. Teil-Eichung 2 1.+2. Teil-Eichung 1+2 Der dritte Teil wurde nur zur Überprüfung der Analyseergebnisse verwendet und ist in keine Eichung eingegangen. Weiters wurden mit einer in Deutschland veröffentlichten Eichung (Lit. W. Arneht) IR-spektroskopische Schnellanalyse der Hauptbestandteile von Fleisch- und Fleischwaren (Fleischwirtschaft 54 / 2/84). Versuche unternommen. Dabei wurden einerseits die Originalwerte der Eichung verwendet (Eichung FO), andererseits zwar die Filterkombination belassen (Eichung FC) jedoch die Regressionskoeffizienten neu berechnet. Bei jeder Probe wurden drei Messungen vorgenommen. Die Reflexionswerte aller Messungen wurden auf einem Magnetband gespeichert. Alle Fleischproben wurden bei Raumtemperatur gemessen (die Brätproben bei 5°C). **Erstellung der Eichung:** 1. Schritt: Ermittlung der Regressionskoeffizienten bei Verwendung aller 19 Filter. 2. Schritt: Treichung der Ausreißer, die teils durch die Inhomogenität, teils durch Oberflächenbeschaffenheit entstehen können. Als Ausreißer dürfen jedoch nur einzelne Messungen gestrichen werden, wenn sie von den anderen Messungen der gleichen Probe durchschnittlich hoch abweichen. Das Streichen aller Messungen einer Probe sollte vermieden werden. Die Anzahl der Streichungen muß unter 10 % der Messung liegen. 3. Schritt: Neuerliche Entwicklung der Regressionskoeffizienten ohne Ausreißer. 4. Schritt: Ermittlung der Eichkurven-Kenndaten. 5. Schritt: Ermittlung der effizienten Filterkombinationen. Dieser Vorgang ist sehr rechenintensiv und benötigt oft mehrere Tage. Um die Rechenzeit zu verkürzen, ist es sinnvoll, schon im Vorhinein einige (3-4) Filter zu eliminieren bzw. einige Filter als unbedingt notwendig einzustufen. Als Entscheidungshilfe dient dazu der T-Test, der eine Aussage darüber gibt, wie groß die Übereinstimmung bzw. die Effizienz des jeweiligen Filters ist (je größer der T-Wert, desto größer die Effizienz). Die Filter dürfen jedoch nur einzeln eliminiert werden. Nach der Eliminierung eines Filters müssen die Regressionswerte und die T-Werte neu berechnet werden. Danach kann der Vorgang wiederholt werden. Nach der Eliminierung von einigen Filtern werden 2-3 Filter als unbedingt notwendig eingestuft und die endgültige Berechnung kann durchgeführt werden. Auf diese Weise verringert sich die Rechenzeit auf einige Stunden. Diese Schritte müssen für jeden Inhaltsstoff wiederholt werden. Die Eichungskenndaten geben darüber Aufschluß, ob die Eichung korrekt durchgeführt wurde bzw. ob eine Eichung überhaupt möglich ist. Über die Anzahl der zu verwendenden Filter soll das Regressions-Filter-Verhältnis (Regressions-R-Ratio) Auskunft geben (die Filteranzahl mit dem höchsten Wert sollte gewählt werden). Um dies zu testen, wurden für den Teil 2 von 4-12 Filter erstellt.

**Analysen:** Um die Qualität der Fleischeichung zu überprüfen, wurde der dritte Teil der Proben am IAA gemessen. Um an diesen Proben mehrere Eichungsvarianten durchzurechnen wurden die Logarithmen der Reflexionswerte im Computer gespeichert. Mittels eines selbstentwickelten Programms konnte nun mit Hilfe des Computers eine Vielzahl von Eichungen getestet werden und in Form von Kenndaten beurteilt werden. Um die Bräteichung zu überprüfen wurde mittels der aus der 1. Gruppe erhaltenen Eichung die Werte der 2. Gruppe berechnet bzw. mittels der aus der 2. Gruppe erhaltenen Eichung die 1. Gruppe berechnet und den manuellen Werten gegenübergestellt. (Abb. 2). Weiters konnte man bei Bedarf die Steigerung der Eichkurve korrigieren bzw. einen systematischen Fehler mittels FOO ausgleichen. Als Kriterien der Qualität der Eichung wurden folgende Kenngrößen gewählt: 1. RMS(s): Relative mittlere Standardabweichung. Die RMS ist ein Maß für Abweichung, wobei gilt:  $(\bar{m}-s; \bar{m}+s) = 68,3\%$   $(\bar{m}-2s; \bar{m}+2s) = 95,4\%$   $(\bar{m}-3s; \bar{m}+3s) = 99,7\%$  2. r-Korrelationskoeffizient: ist ein Maß für die lineare Abhängigkeit von Wertpaaren.  $r=0$  absolute lineare Unabhängigkeit  $r=1$  absolute lineare Abhängigkeit 3. CRMS: korrigierte relative mittlere Standardabweichung CRMS=RMS nach Korrektur des systematischen Fehlers 4. SCRMS: Steigerungskorrigierte relative mittlere Standardabweichung

**Auswertung der Analysen:** Die Auswertung der Eichungen mit 4-12 Filter ergaben, daß die Filteranzahl, die sich an Hand des Regression-Filter-Verhältnisses ergaben, eher zu tief lagen. Wie die Kurve Nr. 1 zeigt, empfiehlt es sich  $\approx 10$  Filter für Wasser, Fett, Protein zu verwenden. Mit der Eichung 1+2 und der Eichung 2 konnten bei Wasser, Fett und Eiweiß gute Ergebnisse erzielt werden (Tab. 2) Die Eichung 1 lieferte keine guten Ergebnisse. Dies ist darauf zurückzuführen, daß der 1. Probeanteil fast ausschließlich aus Rindfleisch Qualitätsklasse II bestand und sich daher die Eichung nur auf einen sehr engen Bereich beschränkte. Bei Verwendung der Eichung FO ergaben sich nur bei Protein gute Ergebnisse. Der Grund für das relativ schlechtere Abschneiden der restlichen Eichungen dürfte bei fertigungstechnischen Toleranzen der verwendeten Geräte (v.a. Filter) liegen. Bei der Nachkorrektur der Eichung FO konnten dann bei allen Messungen gute Werte erzielt werden. Die Zahl der Ausreißer war bei allen funktionierenden Eichungsvarianten sehr gering. Durchschnittlich 1,5% bei Wasser, 1,2% bei Fett und kein Ausreißer bei Protein. Die Auswertung der Bräteeichungen ergaben für beide Varianten gleich gute Ergebnisse. Abweichungen vom manuellen Wert sowie die Zahl der Ausreißer waren geringer als bei Fleisch. Auch die Reproduzierbarkeit der Werte ist bei Brät (auf Grund der großen Homogenität) höher. Die Umrechnung der Fleischeichung auf das Brät brachte weniger zufriedenstellende Ergebnisse. Es ist daher unbedingt notwendig für jede Produktgruppe eine eigene Eichung zu erstellen. **Temperaturabhängigkeit:** Um die Temperaturabhängigkeit der Messung zu testen, wurde eine Fleischprobe mit 2 Eichungsvarianten bei 0-27°C gemessen. Es zeigten sich große Unterschiede

wie aus der Kurve Nr. 2 zu entnehmen ist. Bei Mehrfachbestimmung ist es nicht möglich, eine Küvettenfüllung für mehrere Messungen zu verwenden. Wie aus der Kurve Nr. 3 hervorgeht, streuen die Werte bei Mehrfachmessung derselben Küvettenfüllung erheblich. Der Grund liegt in der Erwärmung der Probe in der Meßkammer (30°C) und der dadurch erfolgenden Abtrocknung der Oberfläche der Probe. **Diskussion und praktische Konsequenzen:** Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß der IAA, unter Einhaltung gewisser Regeln, für die Untersuchung von Wasser, Fett und Eiweiß in Fleisch- und Fleischprodukten gut geeignet ist. Die Werte sind in dem durch die Eichung abgesteckten Bereich zuverlässig. Sie weisen eine gute Reproduzierbarkeit und eine relativ geringe Abweichung vom Soll-Wert auf. Die RMS bei Mehrfachbestimmung einer Probe zeigt gute Reproduzierbarkeit. Sie hängt vor allem von der Homogenität der Probe ab, und beträgt bei: Wasser 0,3-0,4% (Fleisch) 0,3-0,4% (Brät) Fett 0,5-0,6% (Fleisch) 0,3-0,4% (Brät) Protein 0,2-0,4% (Fleisch) 0,1-0,4% (Brät) Stärke 0 (Fleisch) 0,3-0,4% (Brät) Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß die RMS bei Würsten auf Grund der besseren Homogenität gegenüber Fleisch sinkt. Bei sehr groben, abgetrockneten Würsten liegt die RMS etwas höher. Bei entsprechender Eichung kann der Linearitätsbereich sehr weit gedehnt werden. Bei dieser Arbeit zeigt sich, daß Rindfleisch und Speck mit einer Eichung gemessen werden können, wobei die RMS bezogen auf den Soll-Wert über den ganzen Bereich ungefähr gleich bleibt. Die RMS bei Mehrfachbestimmungen erhöht sich auf Grund der Inhomogenität bei Speck, Stoß und sehr bindegewebsreichen Proben. Als vorteilhaft erwiesen sich 3 Messungen pro Probe. Sie gewährleisten eine relativ sichere Erkennung von Ausreißern. Bei der Übernahme von bestehenden Eichungen ist eine sachgemäße Nacheichung und deren Kontrolle auf ihre Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit notwendig. **Untersuchung weiterer Inhaltsstoffe bei Fleischprodukten:** Informative Untersuchungen für weitere Inhaltsstoffe ergaben folgendes: Der Stärkegehalt (in Brät) läßt sich mittels IAA einwandfrei bestimmen, ist jedoch für die Betriebskontrolle weniger interessant, da er durch die Rezeptur vorgegeben ist. Der Aschegehalt ist mittels IAA nicht bestimmbar. Die Asche setzt sich aus anorganischen Salzen (P, CA, NA, K...) zusammen. Bei Wurst größtenteils aus NaCl. All diese Substanzen absorbieren nicht im NIR. Trotzdem erscheint es so, als ob die Asche eichbar wäre und man erhält auch relativ gute Werte. Dies beruht jedoch nur darauf, daß z.B. bei Fleisch der Aschegehalt dem Eiweißgehalt etwa proportional ist. Der Kollagenwert, ein Problem der schnellen Fleischanalyse konnte mit dieser Methode vorerst noch nicht zufriedenstellend gelöst werden. Die Probleme dürften vielschichtig sein. a) Bindegewebe bzw. kollagene Fasern lassen sich am schlechtesten homogenisieren. b) der Kollagenwert bewegt sich an der Größenordnung von 1-4%. Die für das Kollagen charakteristische Aminosäure, das Hydroxyprolin, ist jedoch nur zu 12,5% im Kollagen enthalten. Daraus ergibt sich ein Prozentgehalt des Hydroxyprolin von 0,1 - 0,5%

Diese Werte sind sehr klein im Vergleich mit den großen Schwankungen der restlichen Inhaltsstoffe. c) Bisher war es uns aus apparativen noch nicht möglich, die Filter für die Bestimmung von Hydroxyprolin zu optimieren. Die bisherigen Untersuchungen des Bindegewebes brachten Abweichungen von bis zu  $\pm 25$  relativ. Es ist also gegenwärtig nicht möglich, auch beim Bindegewebe zu einer vertretbaren Genauigkeit bei der Analyse mittels IAA zu kommen. Der Beef-Wert (das bindegewebsfreie Fleischiweiß) ist mittels IAAA nicht direkt bestimmbar. Trotzdem tauchten in mehreren Veröffentlichungen schon Eichungen mit relativ guten Korrelationen bzw. Standardabweichungen für den BEEFE-Wert auf. Dies beruht darauf, daß der BEEFE-Wert nur sehr gering von dem um einen mittleren Bindegewebsgehalt reduzierten Proteinwert abweicht. Das sein an einem Beispiel erläutert: Frankfurter haben einen mittleren Proteingehalt von 11% und einen Kollagenwert von durchschnittlich 17,8 ( $\bar{x}$  von 100 Proben). Daraus folgt ein Bindegewebsanteil von 1,96%. Unter der Annahme, daß 95% aller Proben einen Kollagenwert zwischen 13,3 bis 22,3 besitzen, ergibt sich daraus eine Standardabweichung des Bindegewebsgehaltes von 0,25%. Das heißt, daß man rechnerisch vom Proteingehalt nur den mittleren Bindegewebsgehalt abziehen muß, um eine RMS zu erreichen, die unter Berücksichtigung der RMS der Proteinbestimmung, kleiner oder gleich den veröffentlichten Werten ist. Wie man sieht ist daher der Nutzen einer direkten BEEFE-Bestimmung mittels IAA sehr zweifelhaft.

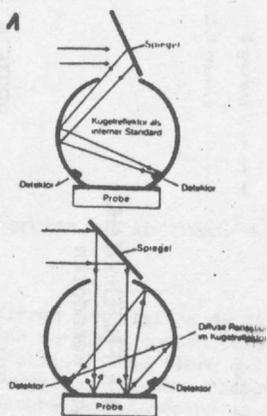


Tabelle 1: Zusammensetzung der Probenteile

Fleisch	Messungen	Wasser	Fett	Eiweiß	Stärke
Teil 1 Rindfleisch II	60	57-72	6-24	17-20	
Teil 2 Rindfl. I-IV, Schweinefl. I-Speck	120	11-74	4-84	3-23	
Teil 3 Rindfl. I-III, Schweinefl. I-IV	60	39-72	6-50	10-20	
Brät für Brätwurst 1a, 1b, 2	201	55-65	19-29	8-13	∅ -3



# TEMPERATURABHAENIGKEIT DER IIA - WERTE

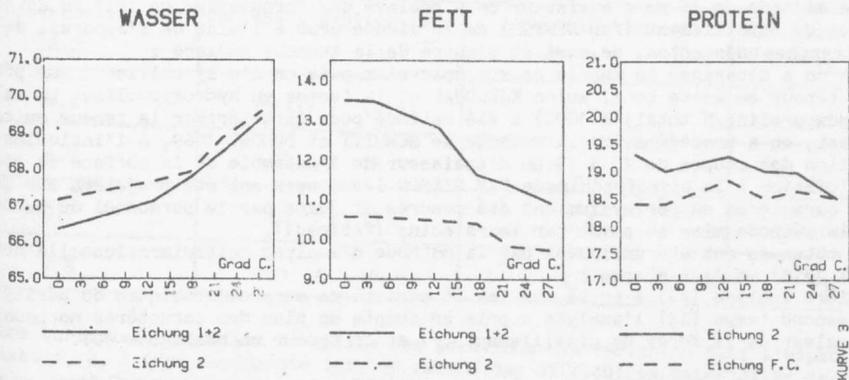


Tabelle 2: Kerndaten der Kontrolluntersuchungen

	Wasser			Fett			Protein		
	RMS	CRMS	r	RMS	CRMS	r	RMS	CRMS	r
Eichung 1	1,04	1,04	0,995	1,64	1,64	0,992	0,66	0,66	0,978
Eichung 2	0,55	0,47	0,999	0,67	0,62	0,999	0,65	0,64	0,972
Eichung 1 + 2	0,58	0,56	0,999	0,88	0,71	0,999	0,56	0,56	0,976
Eichung FO	-	-	-	-	-	-	0,63	0,62	0,974
Eichung FC	0,67	0,54	0,999	0,77	0,77	0,998	0,60	0,60	0,980
Bräueichung 1	0,38	0,37	0,985	0,41	0,41	0,984	0,32	0,32	0,892
Bräueichung 2	0,38	0,36	0,987	0,42	0,42	0,983	0,35	0,33	0,888