

# VYUŽITÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRIE KE STANOVENÍ EXTRAKTU V PŮVODNÍ MLADINĚ

Ing. PAVEL ČEJKA, CSc., Ing. JIŘÍ ČULÍK, CSc., Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc., Pivovarský ústav Praha, VÚPS, a. s., Ing. LADISLAV TENKL, Nicodom, s. r. o., Praha

**Klíčová slova:** *extrakt, alkohol, mladina, infračervená spektrometrie, NIR, základní rozbor piva*

## 1. ÚVOD

Stanovení extraktu v původní mladině je nejčastěji používanou metodou v pivovarské laboratoři. Předepsaná destilační metoda podle ČSN 56 0186 je však pracná a časově náročná. Proto byly hledány způsoby, jak tuto analýzu co nejvíce zjednodušit a zautomatizovat. Všeobecně známé a v našich pivovarech značně rozšířené jsou automatické analyzátoři DSA 48 od firmy Anton Paar a SCABA od firmy Tecator, o kterých již bylo v Kvasném průmyslu podrobně informováno [1]. V některých, zvláště menších pivovarech, se stále ještě používá refraktometrická metoda, jejíž slabinou je ale nižší přesnost.

K analýze pív lze využít i jiné, netradiční metody. Jednou z nich je metoda infračervené spektroskopie, jejichž aplikací v potravinářství i v pivovarství v poslední době přibývá [2–6]. Ke stanovení základních pi-

vovarských veličin (alkoholu a extraktu) nabízí firma Tecator přístroj 5665 Beer Analyzer RAPITEC (výrobce je firma Perstorp Analytical Company, u nás dodává firma Sca-Tec) [7]. V rámci spolupráce VÚPS s některými firmami byl otestován přístroj PROTEGE 460 od firmy NICOLET. Cílem práce bylo zjistit, zda by se tato metoda dala využít ke stanovení základních pivovarských veličin, tj. alkoholu, skutečného extraktu a původního extraktu v mladině.

## 2. PRINCIP METODY

Infračervená spektroskopie je optická ne-destruktivní analytická metoda, patřící do skupiny metod molekulové spektroskopie. Při interakci elektromagnetického záření s měřeným vzorkem dochází v důsledku excitace vazeb v molekulách k pohlcení záření o určitých hodnotách energie. Tím vznikají

charakteristická spektra složená z tzv. vibračních absorpčních pásů. Poloha pásů ve spektrech (tj. jejich vlnočty) je příznačná pro jednotlivé vazby nebo funkční sloučeniny v molekulách a jejich interpretací lze většinou danou sloučeninu jednoznačně identifikovat. Výška pásů vyjádřená v jednotkách absorbance nebo jejich plocha udává kvantitativní zastoupení jednotlivých složek v analyzovaných směsích.

Infračervená spektrální oblast je ve spojitém spektru elektromagnetického záření konvenčně vymezena vlnočty  $12\,500 - 10\,\text{cm}^{-1}$ , což odpovídá vlnovým délkám  $0,8 - 1000\,\mu\text{m}$ . Tato oblast se dále pro praktické využití dělí na dalekou ( $400 - 10\,\text{cm}^{-1}$ ), střední ( $4000 - 400\,\text{cm}^{-1}$ ) a blízkou ( $12\,500 - 4000\,\text{cm}^{-1}$ ).

Spektra získaná ve střední infračervené oblasti zobrazují většinou tzv. fundamen-

tální přechody a jednotlivé absorpční pásy lze přiřadit k vibračním pohybům určité funkční skupiny nebo vazby. Vibrace jsou v určité míře ovlivňovány ostatními atomy v molekule, a proto lze pomocí jejich interpretace studovat strukturu látek. Jak již bylo uvedeno výše, jednotlivé absorpční pásy je možno použít také pro kvantitativní stanovení složek ve směsi.

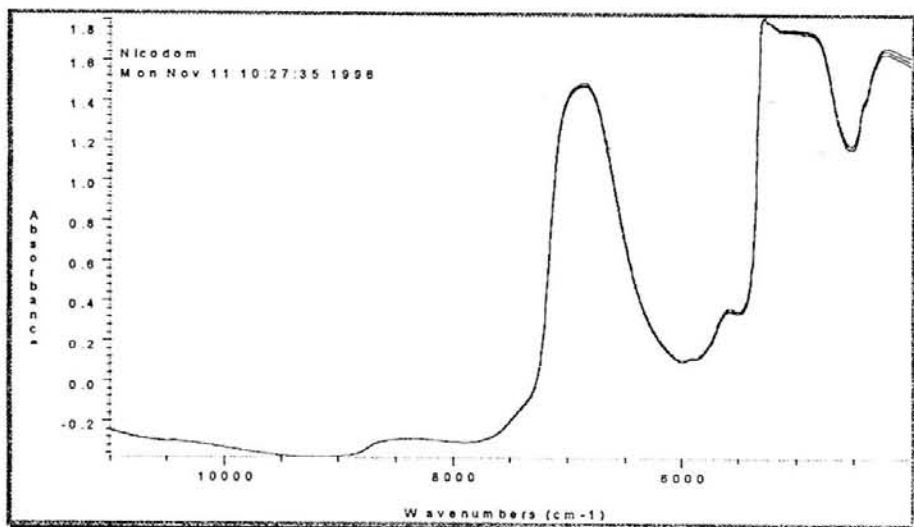
V blízké infračervené oblasti (NIR) je identifikace a přiřazení absorpčních pásů dané strukturní jednotce podstatně složitější. Podstatnou výhodou je ovšem skutečnost, že záření v této oblasti prochází křemenem. Ve spektru získaném interakcí zkoumaného vzorku s elektromagnetickým zářením v oblasti NIR se uplatňují především tzv. svrchní tóny a kombinační přechody. Svrchní tóny odpovídají energetickým přechodům, při kterých se kvantové vibrační číslo mění o více než 1. Jejich vlnově je přibližně celistvým násobkem vlnové fundamentálního. Kombinační přechody vznikají současnou změnou dvou vibračních kvantových čísel u polyatomových molekul. NIR spektrum vzniká lineárními kombinacemi pásů nalézajících se střední infračervené oblasti a lze ho tedy teoreticky z těchto pásů „modelovat“.

Při praktickém použití NIR spektroskopie je spektrum hodnoceno globálně za pomoci chemometrických softwarů, které využívají metod matematické statistiky. Statistické postupy při zpracování naměřených spekter podmiňují specifický charakter kalibračního souboru. Vyžadují proto pokud možno větší nebo velký soubor kalibračních standardů, které by měly co nejvíce charakterizovat vlastnosti analyzovaného materiálu. Funkčnost regresního modelu (jehož principem je porovnání spekter s kalibračním polynommem) je úzce závislá na splnění těchto základních podmínek. Přímá kalibrace na hodnoty malého počtu referenčních standardů je pro funkčnost vytvořeného modelu značně riskantní. Dále je nutno si uvědomit, že analýzami pomocí NIR spektroskopie nelze dosáhnout vyšší přesnosti, než mají výchozí vstupní údaje získané klasickými postupy.

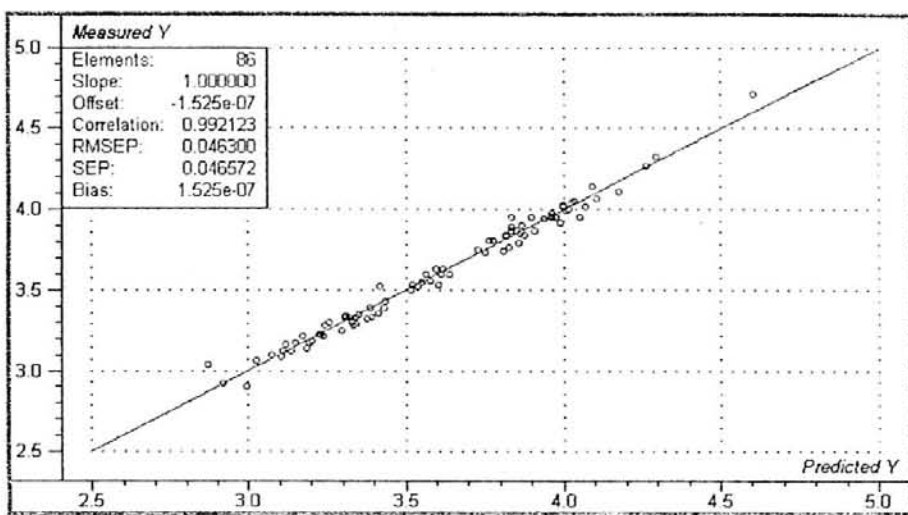
V případě úspěšné kalibrace má práce v oblasti NIR, a to především při měření za pomoci externí reflexní sondy, tyto přednosti:

- velká úspora práce, času a materiálu
- nedestruktivní měření
- eliminace přípravy vzorku před analýzou
- nejsou potřeba váhy ani chemikálie
- možnost měření přes transparentní obaly (světlé sklo, polyethylen)
- možnost měření kapalných vzorků v křemenných kyvetách.

NIR spektra jsou využívána zejména pro kvantitativní analýzu za použití různých regresních metod – nejčastěji PLS (Partial Least Squares) a pro sledování kvality velkých souborů látek strukturně identických nebo podobných pomocí tzv. analýzy hlavních komponent (PCA – Principal Component Analysis). Metoda se používá nejčastěji při kontrole jakosti vstupních surovin, mezproduktů a výrobků.



Obr. 1 Transmisní spektra vybraného kalibračního standardu



Obr. 2 Kalibrační graf pro stanovení obsahu alkoholu v 10%, 11 % a 12% pivech (na ose y koncentrace alkoholu stanovené destilační metodou, na ose x koncentrace stanovené NIR spektrometrem)

Pozn. SEP – standardní chyba predikce (pro alkohol = 0,047 %)

Výhodou měření vzorků v oblasti NIR je možnost použití křemenné optiky, která propouští elektromagnetické záření přibližně nad 2000 cm<sup>-1</sup>. To umožňuje také použití cenově dostupné externí sondy se světlovodivými vlákny.

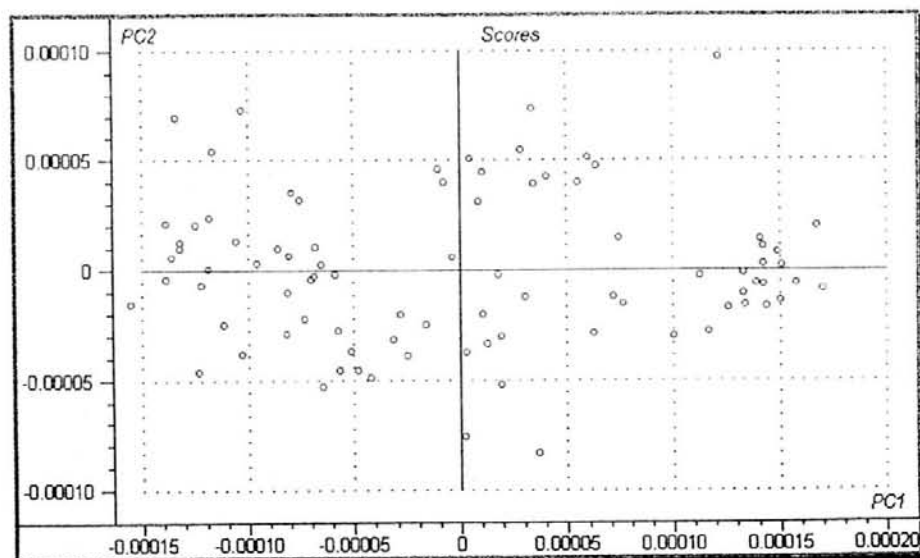
### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Základní rozbor 86 vzorků pív (bylo vy-

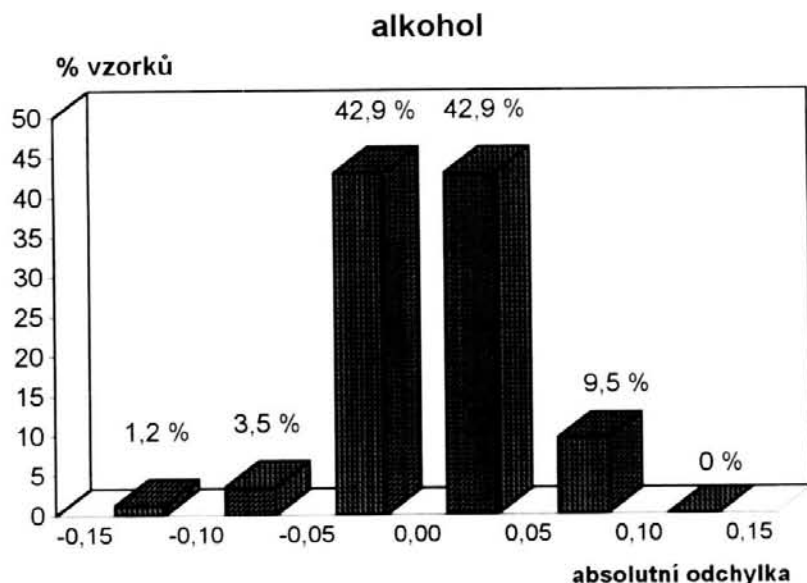
užito analýz pív, které se zúčastnily I. kola soutěže PIVEX 97) byl proveden jednak klasickou destilační metodou tak, jak se běžně provádí ve VÚPS Praha, a jednak byla piva analyzována na přístroji PROTÉGÉ 460 od firmy NICOLET. Před vlastním měřením byly vzorky zbaveny oxidu uhličitého vytřepáním. Vzorky analyzované klasickou cestou byly použity jako kalibrační standardy.

Tab.1 10%, 11% a 12% piva – korelační koeficienty kalibračních a validačních regresí při použití upravených a neupravených spekter všech kalibračních vzorků

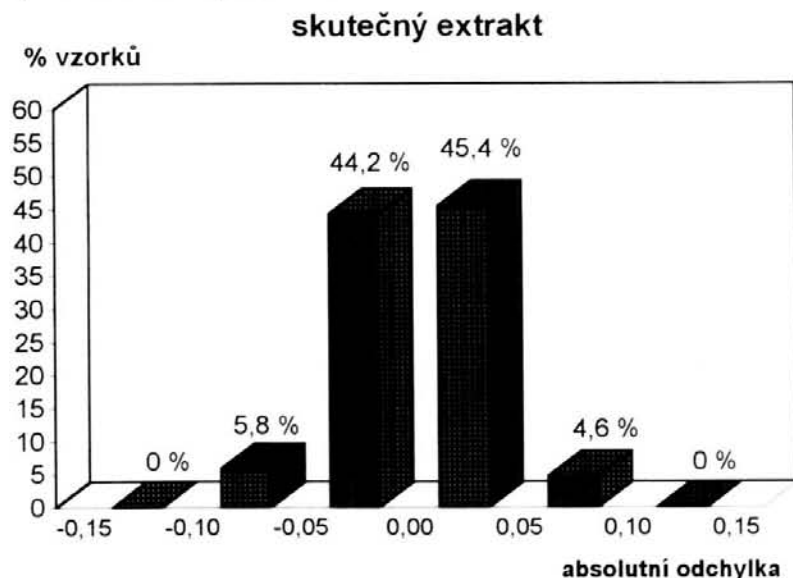
		extr. zdán. [%] r	extr. skut. [%] r	alkohol [%] r	extr. pův. [%] r
Nederivovaná spektra	kalibrace	0,9986	0,9897	0,9933	0,9886
	validace	0,9814	0,9846	0,9906	0,9861
1. derivace	kalibrace	0,9954	0,9968	0,9898	0,9929
	validace	0,9870	0,9908	0,9875	0,9901
2. derivace	kalibrace	0,9920	0,9964	0,9921	0,9957
	validace	0,9399	0,9494	0,9906	0,9781



Obr. 3 Výsledek analýzy hlavních komponent vložených kalibračních spekter (Principal Component Analysis- PCA)  
Analýza hlavních komponent popisuje homogenitu vložených kalibračních standardů



Obr. 4 Odchylky při stanovení alkoholu mezi destilační metodou a infračervenou spektroskopii v hmotnostních procentech



Obr. 5 Odchylky při stanovení skutečného extraktu mezi destilační metodou a infračervenou spektroskopii v hmotnostních procentech

Transmisním měřením za použití křemenných kyvet 0,2 cm byla získána spektra kalibračních standardů. Měření bylo provedeno za těchto podmínek:

Spektrální rozsah	11 000 – 4 000 $\text{cm}^{-1}$
Počet snímání	32
Rozlišení	16 $\text{cm}^{-1}$

Každý ze standardů byl měřen třikrát, při trojím nalití do kyvety. Na obr. 1 je ukázka naměřených spekter pro vybraný kalibrační standard.

Získaná spektra byla následně upravena průměrováním a dále první a druhou derivací. Kalibrace byly provedeny s původními i derivovanými spektry metodou PLS (Partial Least Squares) za použití tzv. „Cross Validation“, při které je během výpočtů vyloučen v závislosti na počtu standardů z kalibrace postupně vždy jeden nebo více kalibračních bodů. Získaná kalibrační závislost byla použita pro výpočet validační hodnoty. Do kalibračních regresních modelů byly vloženy společně naměřené hodnoty pro všechna 10%, 11% a 12% piva. V tab. 1 jsou uvedeny kalibrační a validační korelační koeficienty pro regresní modely počítané z analyzovaných vzorků.

Jako ukázka je dále uveden kalibrační graf pro stanovení obsahu alkoholu (obr. 2) a výsledek analýzy hlavních komponent vložených kalibračních spekter (obr. 3). Z obrázku 3 vyplývá, že data nemají tendenci tvořit shluky a že tedy jednotlivá měření jsou na sobě nezávislá.

Průměrné odchylky při stanovení skutečného extraktu, alkoholu a původního extraktu mezi klasickou metodou a metodou infračervené spektroskopie jsou uvedeny na obr. 4, 5 a 6. Hodnoty původního extraktu byly vypočítány z hodnot skutečného extraktu a alkoholu pomocí Ballingova vzorce, neboť vykazovaly těsnější korelaci s původními hodnotami ve srovnání s přímo vypočítanými hodnotami.

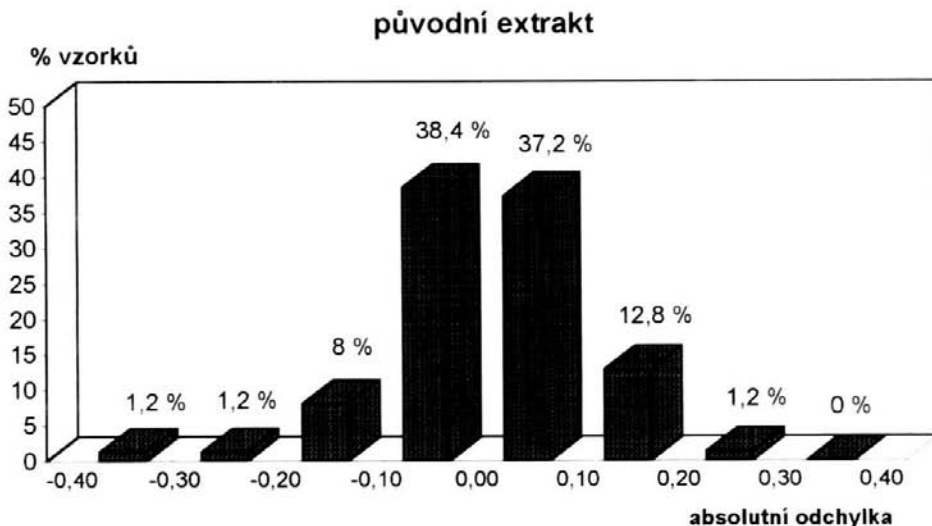
#### 4. DISKUSE VÝSLEDKŮ

V tab. 2 jsou uvedeny průměrné relativní odchylky jednotlivých veličin mezi klasickou a testovanou metodou. Aby bylo možné provést obecnější zhodnocení, byly údaje v tab. 2 doplněny o údaje vypočítané z dřívějšího publikovaného sdělení, které bylo věnováno porovnání klasické destilační metody s analyzátelem SCABA firmy TECATOR a přístrojem DSA 48 firmy A. PAAR [1].

Jak vyplývá z tab. 2, metoda infračervené spektroskopie vykazuje lepší parametry než přístroj DSA 48, ale o něco horší než analyzátor SCABA (ve třech sledovaných veličinách, tj. zdánlivý extrakt, alkohol a původní extrakt – hodnoty skutečného extraktu jsou nepatrně lepší). Je pravděpodobné, že piva z jednoho pivovaru, která se od sebe svým charakterem odlišují méně, budou vykazovat ještě nižší odchylky vůči klasické metodě, než tomu bylo u testovaného souboru pív z různých pivovarů.

Z porovnání výsledků stanovení původního extraktu piva klasickou metodou a metodou infračervené spektroskopie na sou-





Obr. 6 Odchylky při stanovení původního extraktu piva mezi destilační metodou a infračervenou spektroskopií v hmotnostních procentech

Tab. 2 Průměrné relativní odchylky zdánlivého extraktu, skutečného extraktu, alkoholu a původního extraktu mezi klasickou destilační metodou a testovanými přístroji nebo metodami

	extr. zdán. [%]	extr. skut. [%]	alkohol [%]	extr. pův. [%]
SCABA	1,39	0,85	0,76	0,51
DSA 48	2,00	1,38	1,35	0,73
Infračervená spektrometrie	1,67	0,79	0,98	0,67

boru 86 vzorků pív a porovnání obou metod po stránce pracnosti, časové náročnosti, obslužnosti přístroje atd. byly zjištěny tyto výhody a nevýhody testované metody:

*Výhody:*

- a) velmi dobrá shoda s klasickou metodou
- b) stanovení trvá velice krátkou dobu (3 min)
- c) ke stanovení stačí malý objem vzorku

- d) vlastní stanovení nevyžaduje kvalifikovanou obsluhu
- e) po zavedení kalibračního modelu se již přístroj nemusí kalibrovat
- f) přístroj je možné využít i pro jiné účely

*Nevýhody:*

- a) vyšší cena
- b) provedení kalibračního modelu vyžaduje určité znalosti a schopnosti

## LITERATURA

- [1] ČEJKA, P.: Kvasný prům. 38, 1992, s. 331
- [2] WILLIAMS, P., NORRIS, K. H.: Near Infra Technology in the Agricultural and Food Industries, St. Paul, USA, 1987, s. 169
- [3] LEBOUTLLE, J. L. M., DROST, W. C.: Multivariate Calibration and Cloning of Near Infrared Analysis in Malting and Brewing. EBC Symposium of Instrumentation and Measurement Monography XX, 1992, s. 14.
- [4] OSBORNE, B. G., FEARNT, T., HINDLE, P. H.: Practical NIR Spectroscopy with Application in Food and Beverage Analysis. Logman Food Technology, Ed. D. Browning, 1991, s. 145
- [5] ALLISON, M. J., BROWN, A. T., FREEMAN, P. L.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., 1989, s. 229.
- [6] ALLISON, M. J., MAULE, A. P.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., 1991, s. 133.
- [7] Rapitec 5665 Beer Analyzer, prospektový materiál fy Tecator.

Lektoroval Ing. Pavel Dostálek, CSc.  
Do redakce došlo 30. 4. 97