

NÁSTROJ PRO RELATIVNÍ NIVELACI PŘÍSTROJOVÝCH KALIBRAČNÍCH HLADIN A JIM RELEVANTNÍCH VÝSLEDKŮ V SÍTI MĚŘENÍ MINORITNÍCH SLOŽEK MLÉKA NEPŘÍMÝMI METODAMI SW-NIVEL

Jan Říha, Oto Hanuš

Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha

SW-Nivel: A tool for relative leveling of indirect instrumental methods calibration levels and their relevant results in the laboratory network of minor milk component measurements

Abstrakt

SW-Nivel je nivelační software (SW) pro vyrovnávání hladin kalibrací instrumentálních výsledků měření minoritních složek mléka (nejčastěji volné mastné kyseliny (VMK) a kyselina citronová (KC), ale i ostatní minoritní složky mléka) v rutinní laboratorní pracovní síti pro zajištění jejich správnosti a vzájemné srovnatelnosti, tedy zlepšení věrohodnosti výsledků měření. To může být důležité pro řízení prevence produkčních poruch dojníc, včetně mastitid, pomocí jejich správné identifikace. SW byl vyvinut na základě výsledků předchozího vlastního výzkumu a zkušeností s aplikací kalibrací minoritních složek mléka (VMK a KC) a se zohledněním odborných literárních poznatků v daném oboru. Podkladem pro zohledněné poznatky byly výsledky dřívějších výkonnostních testů (proficiency testing, PT) příslušných analytických laboratoří pracujících v síti. Tento autorizovaný software (ASW) je v užití pracovní sítě rutinních laboratoří (Českomoravská společnost chovatelů a.s., Hradištko) kontroly mléčné užitkovosti (individuální vzorky) a kvality mléka (bazénové vzorky).

Klíčová slova: syrové mléko; kvalita; analýza; volné mastné kyseliny (VMK); kyselina citronová (KC); laboratorní síť; minoritní složky mléka; FTIR; výkonnostní testy

Abstract

SW-Nivel is levelling software (SW) for balancing of calibration levels of instrumental results of minor milk component measurements (mostly free fatty acids (FFAs) and citric acid (CA), but also other milk minor components) in routine laboratory network for support of their accuracy and mutual comparability, which means the improvement of measurement result reliability. It could be important for control of prevention of dairy cow production

disorders including mastitis by their correct identification. The SW has been developed on the basis of previous own research and knowledge results with application of minor milk component calibrations (FFAs and CA) and with respect to professional literature results in given field. Basis for respected knowledge were results of previous proficiency testing (PT) of relevant analytical laboratories which cooperated in a network. This authorized software (ASW) is in use of routine laboratory network (Czech-Moravia Breeders Corporation a.s., Hradištko of milk recording (individual (bucket) samples) and milk quality control (bulk (tank) samples).

Key words: raw milk; quality; analyse; free fatty acids (FFAs); citric acid (CA); laboratory network; minor milk components; FTIR; proficiency testing

Úvod

Důležitost kvality syrového mléka zmínili, rozvedli a podtrhli četní autoři, např. BAUMGARTNER et al., 2000. Nejlepším způsobem jak kontinuálně zvyšovat a stabilizovat kvalitu mlékárenských výrobků (senzorické vlastnosti, trvanlivost, případně živinovou hodnotu) je důsledně zahrnovat jakoukoliv změnu kvality suroviny do ocenění syrového mléka. Rovněž je důležité kontrolovat zdravotní stav dojníc. Vhodné ukazatele pro posuzování zdravotního stavu krav, zejména energetického metabolismu, ale i mastitid (Obr. 1), mohou být minoritní složky mléka jako volné mastné kyseliny (VMK) a kyselina citronová ((KC); BATICZ et al., 2002; GARNSWORTHY et al., 2006; KUBEŠOVÁ et al., 2009). VMK ukazují rovněž na hygienický stav získávání mléka, popřípadě na jeho šetrné uložení (SJAUNJA, 1984; O'BRIAN et al., 1998; THOMSON et al., 2005; WIKING et al., 2006; MIKULOVÁ, 2011). Vyšší hladiny VMK jsou limitovány normou ČSN 57 0529 na $\leq 1,3$ mmol/100 g tuku. Pro KC je uváděn fyziologický obor od 6 do 8 mmol/l, vyšší hodnoty ukazují na přebytek a nižší na nedostatek energie ve výživě dojníc. Aby výsledky VMK a KC bylo možno správně interpretovat s ohledem na uvedené okolnosti, je nezbytné zajistit kvalitu analýz, resp. věrohodnost výsledků. K tomu slouží validace metod, zajištění kalibrací přístrojů používajících nepřímé metody stanovení, akreditace mlékařských laboratoří a jak známo rovněž velmi významně účast referenčních a rutinních laboratoří ve výkonnostním testování ((PT); GRAPPIN, 1987; BAUMGARTNER, 2006; LERAY, 2010). Výsledky účasti v PT je nezbytné vždy korektně vyhodnotit. V případě VMK a KC, podle předchozích výzkumů, i po úspěšně provedených kalibracích přístrojů, tyto velmi často pracují dále se systematickým posunem kalibrací v čase. Tento lze obtížně vysvětlit, ale je nezbytné ho eliminovat. Jednou z možných cest je použití výsledků z periodických PT pro stanovení referenčních výsledků a výpočet přístrojově individuálních nivelačních rovnic na jejich základě. K tomu slouží zpracování výsledků statistickými postupy v souladu s příslušnými normami a v souladu s požadavky mezinárodních profesních organizací

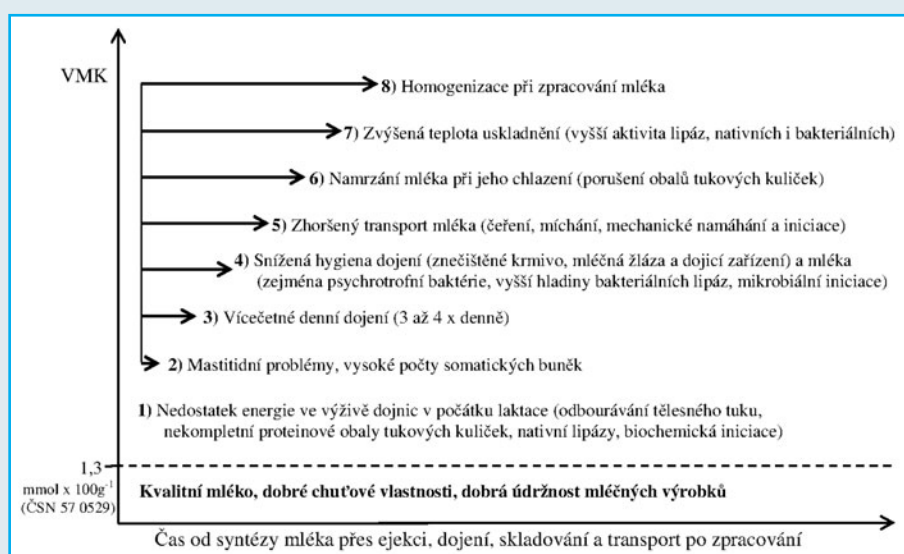
jako jsou IDF (International Dairy Federation), ICAR (International Committee for Animal Recording) nebo AFEMA (Arbeitsgruppe zur Förderung von Eutergesundheit und Milchhygiene in den Alpenländern).

Cílem bylo navrhnout algoritmus a zpracovat aplikační software pro pravidelnou derivaci individuálních nivelačních rovnic pro vyrovnávání instrumentálních hladin měření VMK a KC či ostatních minoritních složek mléka v pracovní síti rutinních mléčných laboratoří. Uvedené podpoří hodnověrnost analytických mlékařských výsledků a následně kvalitu syrového mléka, trvanlivost produktů a bezpečnost celého mléčného potravinového řetězce.

Materiál a metody

K posouzení vztahů metod stanovení VMK (KOOBS et al., 1990; BIJGAART, 2006) a KC (BATICZ et al., 2002) a vývoji statistického algoritmu a SW-Nivel byly využity metodické postupy a poznatky z vlastních výsledků (HANUŠ et al., 2008 a, b, 2009 a, b, c, 2013; GENČUROVÁ et al., 2009, 2011). Zohledněny byly rovněž publikované výsledky relevantních vědeckých a odborných prací (GRAPPIN, 1987; BAUMGARTNER, 2006; LERAY, 2010) a také oficiální materiály (IDF, 1991; FOSS, 2001 a 2004).

SW-Nivel je založen na práci nad SQL databází Firebird v2.5 (www.firebirdsql.org) a je vytvořen v programovém prostředí Borland Delphi v7 (www.embarcadero.com). Databáze obsahuje úložiště pro identifikované sady jednotlivých měření PT s časovým identifikátorem jejich provedení a hodnotami naměřenými pro jednotlivé vzorky bez použití lineární korekce, případně s identifikací lineární korekce a identifikací minoritní složky a přístroje. Tabulka



Obr. 1 Vzrůst lipolýzy tuku v syrovém mléce, zvýšení obsahu volných mastných kyselin (VMK), ohrožení kvality mléka a výrobků z něho - faktory a jejich kombinace, vztaženo ke zvířeti a technologii (modifikováno podle řady autorů, mimo jiné: SJAUNJA (1984); O'BRIAN et al. (1998); THOMSON et al. (2005); WIKING et al. (2006); HANUŠ et al. (2008 b); GENČUROVÁ et al. (2009, 2011); MIKULOVÁ (2011))

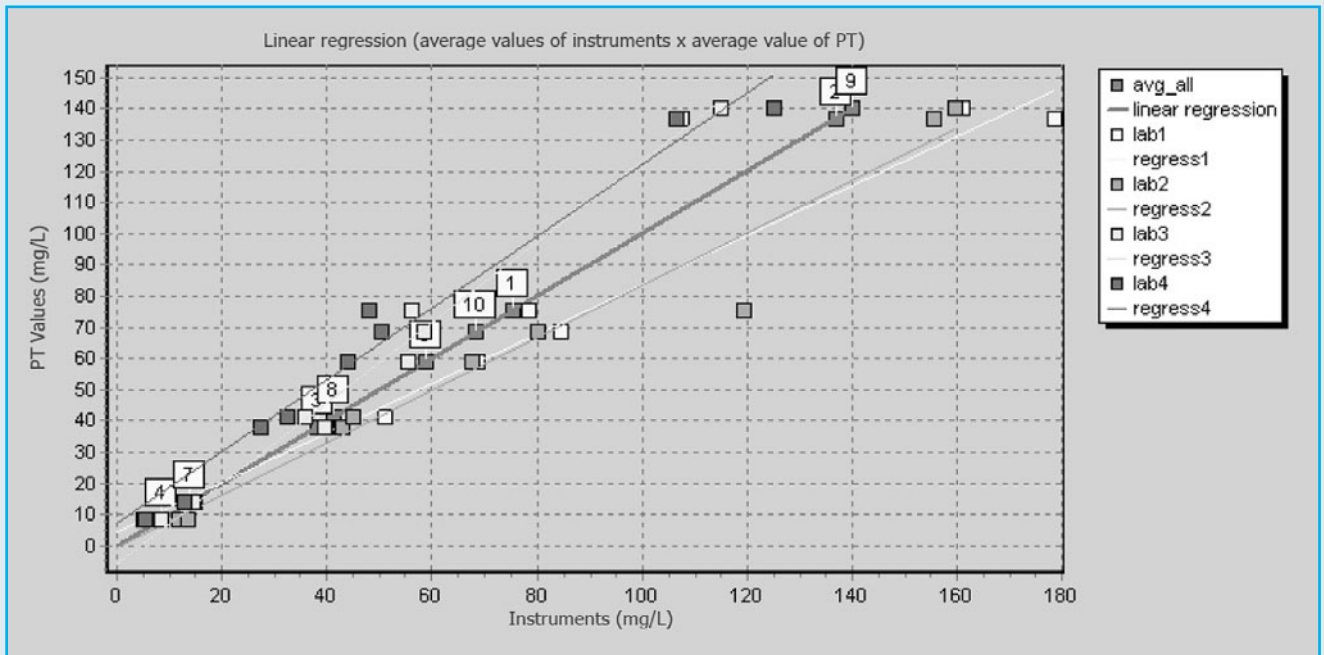
databáze pro referenční hodnoty testů je plněna buď automaticky - dle metodiky, nebo manuálně referenčními hodnotami daného testu. Nad těmito sadami vzorků a referenčních hodnot je možné provádět vyhodnocení jednotlivých sad v parametrech podle standardů ISO/IDF a jejich grafickou interpretaci.

Separátní funkce SW umožňuje vybrat minoritní složku a provést její nivelaci pro jednotlivé přístroje zapojené v daném testu. Zkalkulované funkce pro jednotlivé přístroje a celková nivelační rovnice je pak součástí reportu pro daný test a může být spolu s ním rozeslána účastníkům. Součástí SW-Nivel je také dlouhodobé grafické hodnocení jednotlivých přístrojů a jejich nivelačních rovnic pro danou minoritní složku mléka.

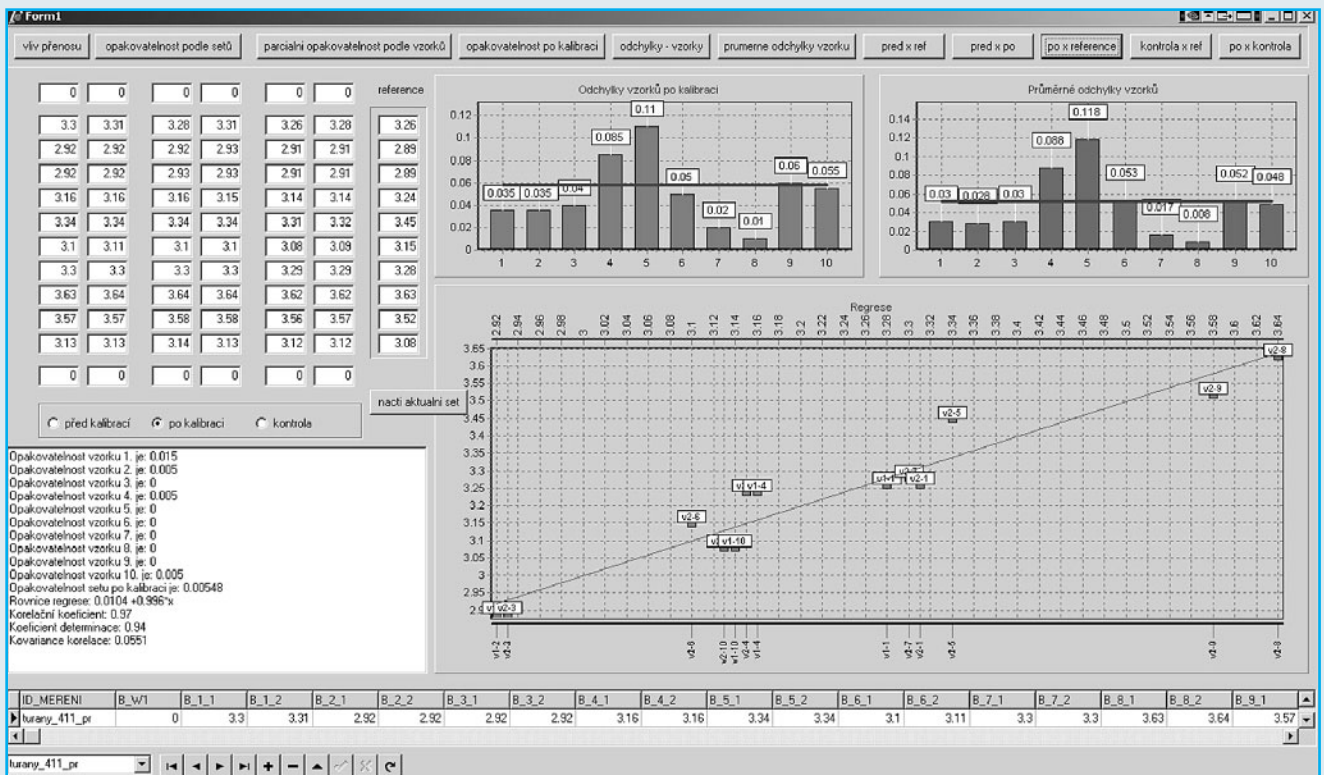
Výsledky a diskuse

Z analýzy variací stability kalibrace metody MIR-FT pro měření VMK a KC (HANUŠ et al., 2008 a, b, 2009 a, b, c, 2013; GENČUROVÁ et al., 2009, 2011; KUBEŠOVÁ et al., 2009; MIKULOVÁ, 2011) lze vyvodit jako účelné konstruovat SW pro výpočet nivelačních rovnic jednotlivých přístrojů v laboratorní síti pro zvýšení věrohodnosti výsledků VMK a KC. Navržený algoritmus a SW pro jeho implementaci a rutinní provádění spočívá v následujících krocích:

- provedení běžné kalibrace přístrojů v pracovní síti na měření VMK, KC nebo jiné cílové komponenty v mléce;
- v první možnosti je přímé použití hodnot referenční metody z referenční sady vzorků po provedené kalibraci pro další kalkulaci (a);
- ve druhé variantě je, že při měření sady referenčních vzorků při aktuální kalibraci je použit Grubbsův test odlehlosti (na hladině pravděpodobnosti 0,05 %) pro zařazení přístrojových výsledků vzorku do výpočtu referenční hodnoty vzorku (b);
- tato hodnota je tvořena aritmetickým průměrem očištěného souboru hodnot vzorku podle jednotlivých přístrojů (laboratoří);
- hodnoty vzorků referenční sady každého přístroje jsou vztaheny k příslušným hodnotám referenčním souboru přístrojů v pracovní síti (a nebo b);
- pro každý přístroj je pak vypočtena individuální nivelační rovnice;
- tato rovnice má být používána v období od kalibrace aktuální do kalibrace následně pro transformaci výsledků dané složky pro každý přístroj na nivelované výsledky pracovní sítě;
- v čase lze způsoby a) i b) kombinovat, např. podle dostupnosti referenčních hodnot k danému testu.



Obr. 2 Sada instrumentálně specifických nivelačních rovnic v systému měření VMK a KC v pracovní síti rutinních mléčných laboratoří pro období mezi dvěma následnými PT jako produkt SW-Nivel



Obr. 3 Uživatelské rozhraní autorizovaného software SW-Nivel

Algoritmus pro software byl tedy sestaven podle dříve uvedených bodů. Následně byl konstruován vlastní nivelační software SW-Nivel pro vyrovnávání hladin kalibrací instrumentálních výsledků měření minoritních složek mléka (volné mastné kyseliny (VMK) a kyselina citronová (KC)) v rutinní laboratorní pracovní síti pro zajištění jejich správnosti a vzájemné srovnatelnosti, tedy zlepšení věrohodnosti výsledků měření VMK a KC.

SW-Nivel je složen z uživatelské části, která umožňuje zadání výsledků jednotlivých testů do centrální databáze a části, která umožňuje vyhodnocení dat a generování reportů (Obr. 2). Po provedení nivelace pro zvolený test, složku a přístroje je pak vygenerována nivelační rovnice a také nivelační rovnice pro jednotlivé přístroje (Obr. 3).

Popsaný software je v užití pracovní sítě rutinních laboratoří (Českomoravská společnost chovatelů a.s.,

Hradištko) kontroly mléčné užitkovosti (individuální vzorky) a kvality mléka (bazénové vzorky). Zde je v měsíčních nebo dvouměsíčních intervalech při PT měření hlavních složek mléka (na 5 až 10 nativních vzorcích kravského mléka v sadě) generována sada nivelačních rovnic (pro VMK a KC) specifických pro jednotlivé přístroje pro následující mezikalibrační (také období mezi PT) období.

Závěr

Autorizovaný Software (ASW) SW-Nivel je koncipován pro použití v rutinních laboratorních kontroly užitkovosti a kontroly kvality mléka a individuální a bazénové vzorky v ČR. Může být použit k nivelaci hladin kalibrací přístrojů pro stanovení minoritních složek mléka, zejména volných mastných kyselin a kyseliny citronové, aby byla zajištěna věrohodnost a srovnatelnost jejich výsledků. Funkce ASW bazíruje na odvození referenčních hodnot a nivelačních rovnic z výkonnostních testů. Uživatelem je Českomoravská společnost chovatelů a.s., Hradištko. Spolehlivá kontrola kvality syrového mléka je věcí veřejného zájmu ve věci zajištění zdraví zvířat, trvanlivosti mléčných výrobků a kontroly kvality mléčného potravinového řetězce.

Reference

- BATICZ, O.- TÖMÖSKÖZI, S.- VIDA, L.- GAÁL, T.: Relationship between concentration of citrate and ketone bodies in cow's milk. *Acta Vet. Hung.*, 50, 3, 2002, 253-261.
- BAUMGARTNER, C. und Expertengruppe für Qualitätssicherung und Qualitätsmanagement: Qualitäts: Leitfaden für den Betrieb von Routine - Untersuchungsgeräten in Rohmilch - Prüfungslaboratorien, 1. Ausgabe, 32, 2000.
- BAUMGARTNER, C.: Reference system - principle and practice. 3rd ICAR reference laboratory network meeting - Kuopio, Finland - 6th June, 41-48. Breeding, production recording, health and the evaluation of farm animals. EAAP publication No. 121, 2007, Proceedings of the 35th biennial session of ICAR, 2006, ISBN: 978-90-8686-030-2, 309.
- BIJGAART VAN DEN, H.: New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 2 Free fatty acids. *IDF Bulletin*, 406, 2006, 22-28.
- FOSS, 2001: MilkoScan FT 6000; Free fatty acids measurement (FFA). Spectrum Calibration.
- FOSS, 2004: MilkoScan FT 120; Improved milk calibration. Analytical Application Note No. 128e.
- GARNSWORTHY, P. C.- MASSON, L. L.- LOCK, A. L.- MOTTRAM, T. T.: Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89, 2006, 1604-1612.
- GRAPPIN, R.: Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis - application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. *Bulletin of IDF*, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, 1987, 3-12.
- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Tvorba a vývoj kalibračního modelu pro nepřímé stanovení volných mastných kyselin mléčného tuku a metody přípravy referenčních vzorků. *Výzkum v chovu skotu*, LIII, 193, 1, 2011, 10-20.
- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- KUČERA, J.- SOJKOVÁ, K.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Free fatty acids as possible indicator for milk quality improvement. *Acta Fyt. Zoot.*, 12, 2009, 25-28.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- MOTYČKA, Z.- ČERNOCKÝ, M.: Interpretace výsledků experimentální kalibrace rutinních IR přístrojů pro měření látkového obsahu volných mastných kyselin (VMK) mléčného tuku. *Výzkum v chovu skotu*, L, 182, 2, 2008 a, 55-62.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŠTOLC, L.- HULOVÁ, I.- MOTYČKA, Z.- KLIMEŠ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Zajištění kvality stanovení minoritních metabolicko-diagnostických složek mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT). *Sborník přednášek*, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, Komorní Lhotka, 2009 a, 211-237.
- HANUŠ, O.- HULOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- ŠTOLC, L.- KUČERA, J.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- MOTYČKA, Z.: Interpretace výsledků pokusné kalibrace pro stanovení kyseliny citronové v mléce infračervenou spektroskopii (MIR-FT). *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LVII, 5, 2009 b, 87-101.
- HANUŠ, O.- KUČERA, J.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Vybrané parametry validace metody MIR-FT k měření volných mastných kyselin v mléčném tuku pro laboratoře kvality mléka. *Výzkum v chovu skotu*, LI, 187, 3, 2009 c, 27-34.
- HANUŠ, O.- SAMKOVÁ, E.- ŘÍHA, J.- VYLETĚLOVÁ - KLIMEŠOVÁ, M.- ROUBAL, P.: Evaluation of development in indirect determination of milk fat free fatty acids in Czech Republic. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LXI, 6, 2013, 1669-1679.
- HANUŠ, O.- VEGRICHT, J.- FRELICH, J.- MACEK, A.- BJELKA, M.- LOUDA, F.- JANŮ, L.: Analyse of raw cow milk quality according to free fatty acids contents in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, 1, 2008 b, 17-30.
- IDF, 1991: Determination of free fatty acids in milk and milk products. IDF Bulletin No. 256, Brussels, International Dairy Federation.
- KOOPS, J.- KLOMP, H.- HEMERT VAN, H.: Rapid enzymatic assay of free fatty acids (lipolysis) in farm tank milk by a segmented continuous-flow method. Comparison of the results with those obtained by the BDI procedure. *Neth. Milk Dairy J.*, 6, 44, 1990, 3-19.
- KUBEŠOVÁ, M.- FAJMON, T.- FRELICH, J.- TRÁVNÍČEK, J.- MARŠÁLEK, M.: Analysis of milk urea and milk citrate content during the postpartal period and their impact on reproduction in dairy cows. *Výzkum v chovu skotu*, LI, 185, 1, 2009, 2-13.
- LERAY, O.: Analytical precision performance in ICAR proficiency testing programmes. ICAR 37th Annual Meeting, Riga, Latvia, 31 May - 4 June, 2010.
- MIKULOVÁ, M.: Content of free fatty acids lipolytic bacteria and somatic cells in relation to milking technology. *J. Agrobiol.*, 28, 1, 2011, 49-54.
- O BRIAN, B.- O CALLAGHAN, E.- DILLON, P.: Effect of milking machine systems and components on free fatty acid levels in milk. *J. Dairy Res.*, 65, 1998, 335-339.
- THOMSON, N. A.- WOOLFORD, W. M.- COPEMAN, A. P. J.: Milk harvesting and cow factors influencing seasonal variation in the levels of free fatty acids in milk from Waikato dairy herds. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 48, 2005, 11-21.
- SJAUNJA, L. O.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. III. The effect of different treatments on infrared analyses. *Acta Agric. Scand.*, 34, 1984, 273-285.
- WIKING, L.- NIELSEN, J. H.- BAVIUS, A. K.- EDVARDSSON, A.- SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.: Impact of milking frequencies on the level of free fatty acids in milk, fat globule size, and fatty acid composition. *J. Dairy Sci.*, 89, 2006, 1004-1009.

O využití SW-Nivel existuje smlouva podepsaná poskytovatelem (Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha) a uživatelem (Českomoravská společnost chovatelů a.s., Hradištko).

Recenze tohoto příspěvku je zároveň dokladem odborného projednání cíle, metod vývoje, funkcí, výsledků, výhod a otázek praktické aplikace autorizovaného software SW-Nivel.

S ohledem na srovnání novosti postupu: SW-Nivel je novým postupem vyhodnocovací metody vyplývající z výsledků vlastního předchozího výzkumu a relevantních výsledků odborné literatury.

Odhad přínosů použití ASW SW-Nivel byl proveden s následujícími výsledky za 10 roků exploatace a ročně:
- celkový přínos pro přímého uživatele (Českomoravská společnost chovatelů a.s., Praha, laboratoře pro mléko) 600 000 a 3 960 000 = 4 560 000 Kč za zisk nových klientů;
- celkový přínos pro nepřímé uživatele (farmáři) 1 760 000 Kč;
- celkový přínos pro nepřímé uživatele (mlékárny) 4 000 000 Kč. Celkový přínos, přímý i nepřímý, aplikace SW-Nivel v oboru mlékařství na všech hladinách

potenciálního dopadu může činit 10 320 000 Kč za 10 roků, tedy 1 032 000 Kč ročně.

Povinné zveřejnění a dostupnost výsledků získaných jako produkt vývoje a inovací prostřednictvím veřejných prostředků na VaVaI: www.mastitis.cz/sw-nivel

Vývoj tohoto ASW s označením SW-Nivel (2014) byl podporován projekty NAZV KUS QJ1210301 a RO1414.

Přijato do tisku: 10. 11. 2014

Lektorováno: 1. 12. 2014

***Hezké prožití vánočních svátků a v novém roce
dobré zdraví, hodně štěstí, spokojenosti
a úspěchů v práci a v osobním životě
přeje všem čtenářům a spolupracovníkům
redakce časopisu***

