

Trasferibilità delle calibrazioni fra tre strumenti di differente tecnologia e casa costruttrice

Giuseppe Ferrari * Marta Bellatti** Paolo Gelmini***

* BÜCHI Italia S.r.l., Assago (MI)

** Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari, Parma

***Veronesi Verona S.p.A., Quinto (VR)

Introduzione

La trasferibilità delle calibrazioni nel Vicino Infrarosso da uno strumento all'altro è uno dei punti chiave della spettroscopia NIR. Lo sviluppo di una buona calibrazione richiede l'acquisizione di un elevato numero di campioni preanalizzati con tecniche ufficiali, ben distribuiti sul range d'interesse e possibilmente raccolti in un ampio arco temporale. La possibilità di trasferire una calibrazione da uno strumento ad un altro, ridurrebbe drasticamente quest'aspetto, inoltre se il trasferimento fosse possibile anche tra strumenti di costruttori diversi, si favorirebbe lo scambio di dati fra i diversi centri di analisi e ricerca.

La Buchi Labortechnik AG, ha sviluppato un software che, utilizzando la funzione matematica denominata "cubic spline", permette di rendere compatibili spettri acquisiti con il proprio spettrometro a trasformata di Fourier NIRLab N-200, con spettri di strumenti a minor definizione e hardware diverso (monocromatore).

La funzione matematica Cubic Spline è utilizzata in numerosi campi che vanno dalla statistica alla grafica per computer, da software per progettazione a programmi di gestione d'immagine.

Questa funzione consente essenzialmente di generare matematicamente i punti mancanti di una linea d'interpolazione tra due punti noti di una funzione complessa o, nel caso di un'immagine a bassa risoluzione, di aumentarne i pixel artificialmente. Come esempio sono riportate le figure 1A e B. La 1A mostra una foto a bassa risoluzione, la 1B mostra la stessa immagine manipolata con un software grafico che consente di incrementare il numero di pixel, ottenendo artificialmente una foto con una maggior risoluzione.



Figura 1A Foto a bassa risoluzione



Figura 1B Foto a bassa risoluzione manipolata

Una procedura simile è utilizzata dal software sviluppato dalla Buchi, per incrementare il numero di punti in uno spettro NIR, acquisito con una risoluzione inferiore a quella del NIRLab.

Nella figura 2A, la linea nera mostra un ipotetico spettro NIR. La linea blu con i punti a forma di quadrato, rappresenta lo stesso spettro, acquisito con uno strumento con risoluzione di 8 cm^{-1} . La linea viola, con i punti a forma di rombo, rappresenta sempre lo stesso spettro, acquisito con la risoluzione a 8 cm^{-1} ma ricostruito applicando il software di conversione, ottenendo una risoluzione di 4 cm^{-1} .

Si può notare che, mentre la linea viola segue l'andamento dello spettro ipotetico, la semplice interpolazione dei punti blu rappresentati con i quadrati, dà uno spettro diverso da quello teorico e comunque non simile a quello acquisibile con uno strumento a risoluzione maggiore, non rendendo quindi possibile una corretta unione dei dati.

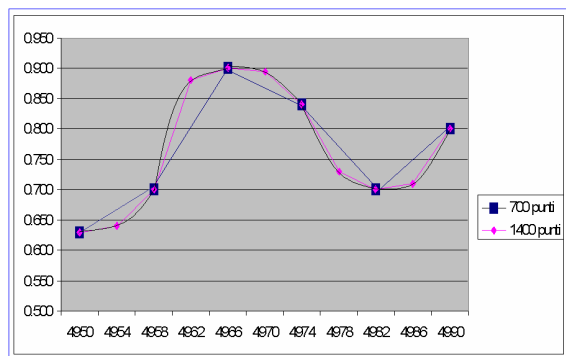


Fig. 2A Spettro teorico, spettro reale e spettro ricostruito con la “Cubic Spline”

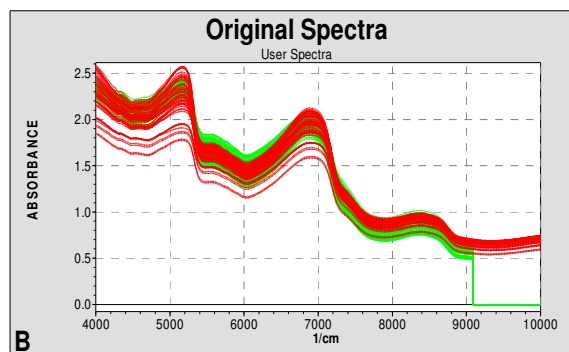


Fig. 2B Spettri dal NIRLab N-200 e dall’InfraAlyzer 500

Sia gli spettri del Foss NIRSystem 5000 che quelli del Bran+Luebbe InfraAlyzer 500, hanno un range spettrale compreso tra 1100 nm e 2500 nm ($4000 - 9090,9 \text{ cm}^{-1}$). Manca quindi una parte di spettro per raggiungere il range spettrale del NIRLab ($4.000 \text{ a } 10.000 \text{ cm}^{-1}$). Per rendere i range spettrali uguali, il software d’importazione, durante la conversione, fissa i valori d’assorbanza, per la parte mancante a zero. La figura 2B mostra degli spettri di prosciutto crudo acquisiti con un Bran+Luebbe, già trasformati con il software di conversione (in verde) e alcuni campioni acquisiti con il NIRLab (in Rosso).

Materiali e Metodi

Le matrici analizzate sono state: prosciutto crudo stagionato, alimenti liofilizzati per l’infanzia, dadi per brodo alimentare e mangimi di varia natura.

Lo strumento sul quale sono state trasferite le calibrazioni è uno Spettrometro FT-NIR Buchi NIRLab N-200. Il range di lavoro utilizzato è stato da $4.000 \text{ a } 10.000 \text{ cm}^{-1}$ ($1000 - 2500 \text{ nm}$) con una risoluzione di 4 cm^{-1} per un totale di 1552 punti. Il campione è alloggiato in una piastra Petri di vetro da 9 cm di diametro prodotte dalla Schott Glass GmbH (Germania). Si è utilizzato il dispositivo rotante con lettura periferica, impostando tre cicli di misura da 64 scansioni l’una per un totale di 192, ottenendo così un’informazione spettrale sicuramente rappresentativa della matrice analizzata. Il tempo totale di lettura è di circa 3 minuti.

Per la sperimentazione sui dadi, il campione è stato alloggiato tal quale nella petri, utilizzata in associazione ad un apposito riduttore, ideato per piccole quantità di campione. La rotazione è stata esclusa e il campione ripreparato tre volte.

Uno strumento da cui sono state importate le calibrazioni è un Foss NIRSystem 5000 a monocromatore, con range di misura compreso tra $4000 \text{ e } 9090,9 \text{ cm}^{-1}$ ($1100-2500 \text{ nm}$). La risoluzione è di 2 nm per 700 punti. La presentazione del campione è su capsule in vetro di produzione del costruttore, con diametro di circa 3 centimetri, alloggiato su un dispositivo rotante, con lettura centrale. La capsula di lettura è ripreparata 3 volte, per un tempo totale di circa 3 minuti.

Gli altri due strumenti, da cui sono state importate le calibrazioni sono due strumenti a monocromatore Bran+Luebbe InfraAlyzer 500, con range di misura da $4.000 \text{ a } 9090,9 \text{ cm}^{-1}$ ($1100 \text{ a } 2500 \text{ nm}$). La risoluzione è di 4 nm per 350 punti di lettura. I campioni sono presentati in una capsula fabbricata dal costruttore con finestra di lettura in quarzo dal diametro di circa 3 cm con lettura centrale. Il dispositivo di lettura non è rotante, per cui è necessario ripreparare la tazza 3 volte. Il tempo totale di scansione è di circa 4 minuti.

Le matrici analizzate sono state: prosciutto crudo stagionato, alimenti liofilizzati per l’infanzia, dadi per brodo alimentare e mangimi di varia natura.

Le analisi di riferimento sono state fatte con metodiche ufficiali e interne dei laboratori che hanno collaborato alla sperimentazione.

Risultati e discussione

La prima prova è stata effettuata con un’applicazione su campioni di prosciutto crudo stagionato DOP: una calibrazione sviluppata in anni d’analisi con uno strumento a monocromatore (InfraAlyzer 500 Bran+Luebbe) è stata trasferita al Buchi N-200, semplicemente importando gli spettri con il software di

trasferimento e rielaborandoli con il software Chemiometrico NIRCal® di produzione della Buchi Labortechnik AG. Successivamente 25 nuovi campioni di prosciutto crudo sono stati analizzati con la calibrazione ottenuta, applicata allo spettrometro Buchi NIRLab N-200, ottenendo dei risultati completamente diversi da quelli di laboratorio. Gli stessi spettri sono stati quindi uniti a quelli vecchi. Il nuovo set ottenuto è stato rielaborato ottenendo delle calibrazioni con prestazioni identiche alle originali. La tabella 1, riporta i risultati ottenuti.

*NTCA: Il parametro NTCA indica la frazione azotata non proteica costituita da aminoacidi e oligopeptidi, rimasta in soluzione dopo aver trattato un estratto acquoso del campione con Acido Tricloroacetico al 10%. Il rapporto % fra l'azoto non proteico e l'azoto totale, chiamato indice di proteolisi, esprime il grado di maturazione. Un prosciutto DOP con stagionatura a 12 mesi deve avere un Indice di proteolisi non superiore al 31%.

Calibrazioni con solo spettri Bran+Luebbe					
Proprietà	Range	N. Campioni	R	SEE	SEP
Umidità	55.34 – 63.92	221	0.98	0.26	0.26
Proteine	22.58 – 29.45	221	0.94	0.30	0.27
Sale	4.61 – 10.33	199	0.98	0.14	0.15
NTCA *	5.87 – 9.10	221	0.92	0.22	0.21
Calibrazioni con spettri Bran+Luebbe e Buchi					
Proprietà	Range	N. Campioni	R	SEE	SEP
Umidità	55.34 – 63.92	246	0.98	0.26	0.26
Proteine	22.58 – 29.45	246	0.95	0.28	0.27
Sale	4.61 – 10.33	244	0.98	0.15	0.16
NTCA *	5.87 – 9.10	246	0.92	0.20	0.20

Tabella 1 Risultati delle calibrazioni sul prosciutto crudo stagionato DOP

Le nuove calibrazioni ottenute sono state provate, analizzando con il NIRLab un nuovo set di 15 campioni, di cui si conoscevano le analisi di riferimento. I risultati sono riportati nella tabella 2.

Campione	Umidità		Proteine		Sale		NTCA	
	Lab.	NIRLab	Lab.	NIRLab	Lab.	NIRLab	Lab.	NIRLab
1	62.34	62.64	27.20	27.16	5.46	5.21	7.34	7.11
2	62.37	62.93	26.31	25.80	4.91	5.09	6.76	6.56
3	63.13	63.15	26.31	26.20	5.05	5.33	7.25	7.21
4	62.01	62.06	26.22	26.23	5.16	5.16	7.07	7.21
5	63.52	63.16	26.03	25.75	5.41	5.64	6.52	6.90
6	62.22	61.71	27.06	26.68	5.53	5.79	7.30	7.62
7	63.20	62.58	25.33	25.59	5.46	5.69	6.30	6.55
8	58.94	59.65	26.99	26.46	6.27	6.44	7.05	7.37
9	61.26	61.75	27.87	27.42	4.56	4.57	7.89	7.81
10	62.10	62.42	27.69	27.59	4.59	4.68	8.42	8.23
11	62.69	62.64	26.60	26.58	5.27	5.35	7.74	7.62
12	60.24	60.88	28.42	27.98	5.59	5.36	8.7	8.45
13	63.02	63.14	27.32	27.40	4.76	5.02	7.79	8.21
14	62.67	62.76	25.48	25.62	5.33	5.23	7.67	7.51
15	61.37	61.67	25.93	25.69	5.60	5.48	6.42	6.02

Tabella 2 Confronto analisi NIR-Laboratorio dopo la correzione delle curve originali per il prosciutto crudo

I risultati dimostrano che la trasferibilità della calibrazione è possibile e funziona egregiamente. E' opportuno aggiungere che dopo questo test, lo strumento è entrato in routine su quest'applicazione ed attualmente analizza i nuovi campioni con le calibrazioni trasferite dal Bran+Luebbe, riconfermando, giorno dopo giorno, le prestazioni indicate nella sperimentazione sopra riportata.

Il secondo esperimento è stato condotto con un altro InfraAlyzer 500, seguendo lo stesso procedimento del primo ma con campioni d'alimenti liofilizzati per l'infanzia e dadi per brodo alimentare.

Calibrazioni con solo spettro Bran+Luebbe					
Proprietà	Range	N. Campioni	R	SEE	SEP
Umidità	1.02 - 5.09	75	0.98	0.18	0.22
Lipidi	9.37 - 24.26	75	0.99	0.33	0.30
Proteine	43.05 - 76.46	75	0.99	0.38	0.46
Calibrazioni con spettro Bran+Luebbe e Buchi					
Proprietà	Range	N. Campioni	R	SEE	SEP
Umidità	1.02 - 5.09	87	0.98	0.17	0.21
Lipidi	9.37 - 24.26	87	0.99	0.29	0.29
Proteine	43.05 - 76.46	87	0.99	0.47	0.47

Tabella 3 Risultati delle calibrazioni sugli alimenti liofilizzati per l'infanzia

La tabella 3 mostra i valori delle calibrazioni per gli alimenti liofilizzati, sviluppate con il NIRcal® con solo i campioni acquisiti con il Bran+Luebbe e le stesse calibrazioni ricalcolate con l'aggiunta di 12 nuovi campioni scansionati con il Buchi NIRlab N-200.

Le calibrazioni ottenute risultano simili e sono state quindi testate, analizzando un nuovo set di 13 campioni, di cui si conoscevano le

analisi di riferimento, sia con il NIRLab Buchi che con l'InfraAlyzer 500 Bran+Luebbe. I risultati sono riportati nella tabella 4.

Campione	Umidità			Lipidi			Proteine		
	Lab.	IA500	NIRLab	Lab.	IA500	NIRLab	Lab.	IA500	NIRLab
1	1.73	1.47	1.86	20.17	20.66	20.32	62.73	62.59	62.77
2	2.61	2.55	2.65	12.60	13.47	12.95	65.93	67.45	66.67
3	2.64	2.69	2.70	16.44	17.57	16.78	67.45	67.21	66.64
4	2.20	2.47	2.24	12.35	12.60	12.60	70.83	72.13	69.97
5	1.72	1.46	2.20	5.35	3.66	5.98	62.66	64.69	64.17
6	2.50	2.49	2.43	5.17	4.19	5.82	62.99	65.56	62.81
7	1.77	2.20	2.08	11.39	11.69	12.00	70.88	72.45	70.33
8	1.68	1.92	1.92	12.21	12.87	12.80	70.09	71.50	69.98
9	2.47	2.51	2.53	15.32	15.43	14.65	66.68	68.03	67.03
10	3.10	3.03	2.83	16.32	14.48	14.48	66.32	67.73	66.53
11	2.63	2.61	2.54	17.46	17.34	17.02	63.83	65.61	65.25
12	2.50	2.41	2.38	18.43	17.98	17.25	64.76	65.74	65.15
13	2.47	2.88	2.51	8.80	10.28	9.24	53.86	56.39	55.57

Tabella 4 Confronto analisi NIR-Laboratorio dopo la correzione delle curve originali su alimenti liofilizzati per l'infanzia

Si può osservare che le prestazioni dei due strumenti sono comparabili e in linea con i dati di riferimento. E' interessante osservare che per le proteine dei campioni 5 e 6, il NIRlab ha dato addirittura dei valori migliori dello strumento con la calibrazione originale. Nel campione N. 10 invece entrambi gli spettrometri hanno una lettura errata per le proteine, riconfermando un ottimo parallelismo di predizione.

Dallo stesso strumento, si sono importati degli spettri di dado per brodo alimentare, rielaborando la

Calibrazioni con solo spettro Bran+Luebbe					
Proprietà	Range	N. Campioni	R	SEE	SEP
Glutammato	7.8 - 22.4	94	0.96	0.89	0.93
Calibrazioni con spettro Bran+Luebbe e Buchi					
Proprietà	Range	N. Campioni	R	SEE	SEP
Glutammato	7.8 - 22.4	122	0.96	0.94	0.96

Tabella 5 Risultati delle calibrazioni sui dadi per brodo alimentare

calibrazione col NIRCal® usando solo gli spettri del Bran+Luebbe. Successivamente si è sviluppata una nuova calibrazione, aggiungendo 28 nuovi campioni, acquisiti con il NIRLab N-200 Buchi. L'unico parametro testato

in questo caso è il quantitativo di Glutammato. I risultati sono riportati nella tabella 5.

La nuova calibrazione è stata testata con un altro set di 8 campioni di cui si conosceva il valore di glutammato, analizzandoli sia con l'InfraAlyser 500 che con il NIRlab N-200. I risultati sono riportati nella tabella 6

Campione	Glutammato		
	Lab.	IA500	NIRLab
1	5.70	8.35	3.84
2	9.70	9.95	9.17
3	17.20	16.96	17.02
4	18.90	17.32	17.04
5	16.70	14.93	14.11
6	18.80	17.41	17.48
7	18.80	17.40	16.50
8	19.10	18.99	18.52

Tabella 6 Confronto analisi NIR-Laboratorio dopo la correzione delle curve originali su dadi per brodo alimentare

Dai risultati, si nota che le prestazioni dei due strumenti sono simili e in ogni modo all'interno dei valori attesi, in relazione con gli errori indicati dai risultati della calibrazione. E' opportuno sottolineare che la tipologia di prodotto era composta da dadi vegetali, di carne e pesce, per cui la matrice era molto varia, inoltre alcuni campioni di test, si collocavano in zone dove i set di calibrazione erano scarsi e addirittura in un caso fuori range.

Il terzo esperimento è stato condotto con un FOSS NIRSystem 5000 a monocromatore, con campioni di nuclei e mangime di varia tipologia destinati prevalentemente a bovini.

Gli spettri provenienti dallo spettrometro FOSS sono stati convertiti, importati e rielaborati con il software chemiometrico NIRCal®, ottenendo i risultati riportati nella

tabella 7. Successivamente si sono ricalcolate le stesse calibrazioni, includendo 15 campioni di mangime letti con il NIRlab, di cui alcuni di matrice diversa da quelli contenuti nel dataBase originale. I risultati sono riportati sempre nella stessa tabella.

Calibrazioni con solo spettri FOSS NIRSystem					
Proprietà	Range	N. Campioni	R	SEE	SEP
Umidità	5.2 - 13.04	215	0.94	0.4	0.44
Proteine	12.26 - 38.96	216	0.99	0.75	0.77
Fibra	2.13 - 5.94	126	0.92	0.3	0.31
Ceneri	3.98 - 32.68	146	0.97	1.2	1.01
Calibrazioni con spettri FOSS NIRSystem e Buchi					
Proprietà	Range	N. Campioni	R	SEE	SEP
Umidità	5.2 - 13.04	226	0.94	0.4	0.45
Proteine	12.26 - 38.96	232	0.98	0.97	0.94
Fibra	2.13 - 17.25	140	0.98	0.48	0.56
Ceneri	3.98 - 32.68	155	0.98	1.1	0.95

Tabella 7 Risultati delle calibrazioni sui mangimi

Dai risultati si può osservare che per umidità e ceneri, il trasferimento è avvenuto mantenendo prestazioni simili alle calibrazioni originali. Per proteine e fibra, c'è stato apparentemente un lieve peggioramento giustificato dalla notevole variazione nelle nuove matrici analizzate. I nuovi campioni infatti triplicano il range massimo di misura della fibra, portandolo da 5.94 a 17.25. Questi spettri si collocano sia per le proteine che per la fibra, in zone della calibrazione dove la distribuzione originale dei campioni non è buona, ottenendo quindi un lieve

peggiore delle capacità predittive delle due curve. Per verificare la capacità predittiva della nuova applicazione ottenuta, sono stati analizzati 15 nuovi campioni delle tipologie presenti in entrambe le popolazioni. I risultati sono riportati nella tabella 8.

	Umidità		Proteine		Fibra		Ceneri	
	NIR	LAB	NIR	LAB	NIR	LAB	NIR	LAB
Test 1	10.80	10.70	28.17	27.00	5.40	4.10	5.90	6.00
Test 2	9.04	8.90	20.83	19.20	8.04	7.00	6.81	8.30
Test 3	9.47	9.20	20.43	18.60	9.66	10.40	8.87	9.20
Test 4	10.30	10.30	20.43	20.00	6.95	6.20	8.14	7.50
Test 5	9.19	9.00	26.50	25.00	2.85	2.50	5.46	7.00
Test 6	10.71	10.90	16.81	16.70	2.59	2.80	14.23	13.50

Test 7	10.32	10.60	17.98	19.60	6.86	5.80	9.01	7.60
Test 8	9.98	10.40	15.03	16.80	8.75	8.00	8.15	6.60
Test 9	10.14	10.60	19.02	19.70	6.86	6.00	9.24	8.40
Test 10	10.69	10.80	20.15	18.70	7.54	6.20	6.92	7.60
Test 11	9.39	9.00	15.98	17.60	8.62	7.80	8.90	8.90
Test 12	7.00	7.15	21.72	19.16	6.72	6.00	7.44	6.39
Test 13	11.66	11.32	38.28	39.00	9.63	9.15	8.76	10.20
Test 14	10.61	10.35	27.21	25.90	6.50	6.58	7.58	8.90
Test 15	8.47	8.74	40.54	38.90	11.83	12.34	8.00	9.60

Tabella 8 Confronto analisi NIR-Laboratorio dopo la correzione delle curve originali sui mangimi

La comparazione tra i valori di laboratorio e quelli NIR, mostra una buona capacità analitica della calibrazione del Foss trasferita al Buchi, con valori predetti sempre all'interno degli errori attesi.

Conclusioni

Dalle quattro sperimentazioni eseguite, si è dimostrato che è possibile trasferire i database e quindi le calibrazioni, da strumenti NIR con monocromatore a spettrometri FT-NIR, ottenendo prestazioni simili alle originali. Generalmente le nuove calibrazioni hanno portato solo ad una modifica dei fattori originali di calibrazione, in alcuni ad un loro aumento, in altri ancora è stato necessario cambiare anche il pretrattamento. Questa opportunità, apre nuove frontiere all'utilizzo della spettrometria al Vicino Infrarosso, poiché permette di utilizzare database creati in anni di raccolta dati, su strumentazione d'ultima generazione. Si associa così l'indispensabile storicità dei campioni, a hardware e software innovativi e si riducono drasticamente i tempi necessari per la messa a punto di nuovi strumenti.

Bibliografia

Gary D. Knott (2000) *Interpolating Cubic Splines*. Birkhauser, Boston

Tom Fearn (2001) *Standardisation and calibration transfer for near infrared instruments: a review*. Journal of Near Infrared Spectroscopy Vol. 9, 229-244 (2001)

Jim Drennen (2003) *Calibration transfer: a critical component of analytical method validation*. NIR News Vol. 14 No.5

Ringraziamenti

Laboratorio Centrale Star Alimentare, Agrate (MI)
 Consorzio del Prosciutto di Parma