

**Bestimmung der Buttersorte durch neuronale
Netzanalyse kompositioneller Parameter**
Chemometrisches Verfahren

DIN
10474

ICS 67.100.20

Determination of the butter type with neural network analysis
of compositional parameters —
Chemometric method

Détermination de catégorie de la sorte de beurre par des réseaux
neu-ronaux des paramètres compositionnelles —
Méthode chimiométrique

Inhalt

	Seite
Vorwort	2
1 Anwendungsbereich	2
2 Normative Verweisungen	2
3 Begriffe	2
4 Abkürzungen	2
5 Kurzbeschreibung	3
6 Chemikalien	3
7 Geräte	4
8 Probenahme	6
9 Durchführung	6
10 Auswertung	8
11 Präzision des Verfahrens	13
12 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Datensätze der Parameter pH-Wert, Citronensäure, Adenosin- und Uridingehalte von 30 Butterproben (Tr) für das Training des neuronalen Netzes sowie von 15 Butterproben (T) für die Überprüfung des trainierten Netzwerkes	14

Fortsetzung Seite 2 bis 17

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN
Deutsches Institut für Normung e.V.

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuss „Chemische und physikalische Milchuntersuchung“ erarbeitet.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein chemometrisches Verfahren zur Bestimmung der Buttersorte nach der Butterverordnung vom 03.02.1997 [1] fest.

Diese Norm gilt für die Deklarationskontrolle der Handelsklasseneinstufung der Buttersorten Sauerrahmbutter, Süßrahmbutter und mildgesäuerte Butter.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

DIN 10325, *Bestimmung des Citronensäuregehaltes in Schmelzkäse – Enzymatisches Verfahren.*

DIN 10349, *Bestimmung des pH-Wertes im Butterserum.*

DIN EN ISO 707, *Milch- und Milchprodukte — Leitfaden zur Probenahme (ISO 707:1997); Deutsche Fassung EN ISO 707:1997.*

DIN EN ISO 3727-1, *Butter — Bestimmung des Wassergehaltes, der fettfreien Trockenmasse und des Fettgehaltes — Teil 1: Bestimmung des Wassergehaltes (Referenzverfahren) (ISO 3727-1:2001); Deutsche Fassung EN ISO 3727-1:2001.*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Butterplasma

fettfreie wässrige Phase, die durch Zentrifugation aus der bei 65 °C aufgeschmolzenen Butter vom Butteröl abgetrennt und durchmischt wird

3.2

Butterserum

enteiweißtes Butterplasma, das durch Zentrifugation aus dem Butterplasma abgetrennt wird

4 Abkürzungen

HPLC Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography).

5 Kurzbeschreibung

Eine Deklarationskontrolle bezüglich der Handelsklasseneinstufung der Buttersorten wird durch eine Verknüpfung kompositioneller Produktparameter ermöglicht. Zu diesen Butterserumparametern zählen Citronensäure, die Ribonucleoside Adenosin und Uridin und der pH-Wert. Zur Merkmalsextraktion wird ein neuronales Netzwerk mit Hilfe computergestützter Berechnungen erstellt und zur Befundung der analytischen Daten eingesetzt. Mit einem dreilagigen, vorwärts verknüpften neuronalen Netz ist eine chemometrische Klassifizierung der drei Buttersorten möglich. Mit einem Minimum von zwei Eingabeneuronen (pH-Wert, Citronensäure) und einer Zwischenschicht sowie drei simultanen Ausgabeneuronen ist eine fehlerfreie Zuordnung der drei Buttersorten zu erreichen.

6 Chemikalien

6.1 Allgemeines

Es sind analysenreine Chemikalien zu verwenden. Das verwendete Wasser muss bidestilliert oder mindestens von entsprechender Reinheit sein.

6.2 Ammoniaklösung, $w(\text{NH}_3) = 25\ \%^{1)}$, wässrige Lösung.

6.3 Ameisensäure, $w(\text{HCOOH}) = 98\ \% \text{ bis } 100\ \%^{1)}$.

6.4 Elutionsmittel für HPLC

6.4.1 di-Ammoniumhydrogenphosphat, (Elutionsmittel A; siehe Bild 1).

Lösung von 0,1 mol di-Ammoniumhydrogenphosphat in Wasser mit einem pH-Wert von 9,8

13,2 g di-Ammoniumhydrogenphosphat werden in einem 100-ml-Becherglas in etwa 80 ml Wasser unter Rühren (Magnetrührer, siehe 7.6) gelöst. Die Lösung wird in einen 1 000-ml-Messzylinder übergeführt, auf etwa 980 ml mit Wasser aufgefüllt und mit Ammoniaklösung (6.2) auf pH = 9,8 eingestellt. Unter Kontrolle des pH-Wertes wird mit Wasser aufgefüllt.

6.4.2 Ammoniumformiat, (Elutionsmittel B; siehe Bild 1).

Lösung von 0,03 mol Ammoniumformiat in Wasser mit einem pH-Wert von 3,4

1,9 g Ammoniumformiat werden in einem 100-ml-Becherglas in etwa 50 ml Wasser unter Rühren (Magnetrührer, siehe 7.6) gelöst. Die Lösung wird in einen 1 000-ml-Messzylinder übergeführt, mit Wasser auf etwa 980 ml aufgefüllt und mit Ameisensäure (6.3) auf pH = 3,4 eingestellt. Unter Kontrolle des pH-Wertes wird mit Wasser aufgefüllt.

6.4.3 Weitere Elutionsmittel, (Elutionsmittel C: Methanol, geeignet für HPLC; Elutionsmittel D: Wasser; siehe Bild 1).

6.5 Weitere Chemikalien

Nach DIN 10325 und DIN EN ISO 3727-1.

¹⁾ w ist der Massenanteil

7 Geräte

Übliche Laborgeräte sowie:

7.1 Ribonucleosid-HPLC-Analysensystem

7.1.1 Apparativer Aufbau

Der apparative Aufbau des Analysensystems besteht aus einem Zweisäulen-Hochleistungsflüssigchromatographen, wobei die Vorsäule (C1) mit der Trennsäule (C2) über ein automatisches Säulenschaltventil (AS) gekoppelt ist (siehe Bild 1).

Das Analysensystem besteht darüber hinaus aus zwei Pumpen (P1, P2), einem Steuermodul (SM), einem Probeaufgabesystem (PA), einem UV-Detektor (UV) und einem Auswertemodul (AM).

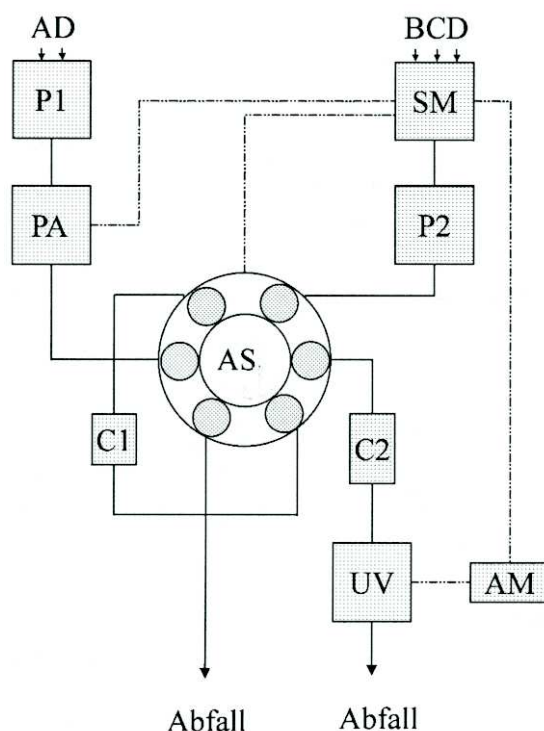


Bild 1 — Apparativer Aufbau des Ribonucleosid-HPLC-Analysensystems

7.1.2 Automatisches Säulenschaltventil

In der Stellung „LOAD“ ist die Vorsäule mit dem Probeaufgabesystem verbunden. Parallel kann über die Pumpe P 2 die Trennsäule (C2) betrieben werden (siehe Bild 2).

In der Stellung „INJECT“ koppelt das automatische Säulenschaltventil (AS) die Vorsäule (C1) mit der Trennsäule (C2) zum Transfer der Ribonucleoside von der Vorsäule auf die Trennsäule (siehe Bild 2). Nach Umschaltung in die Stellung „LOAD“ erfolgt die analytische Trennung der Ribonucleoside Adenosin und Uridin auf der Trennsäule und gleichzeitig die Reäquilibrierung der Vorsäule.

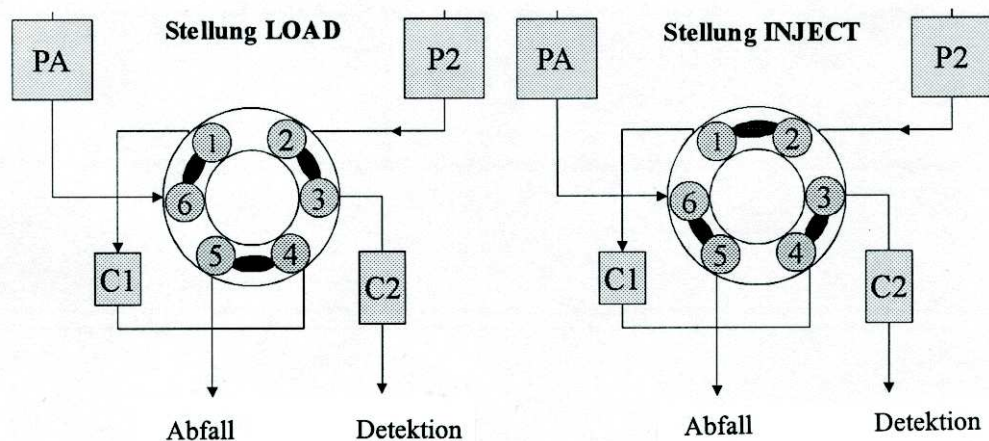


Bild 2 — Ventil-Stellungen des Säulenschaltventils

7.2 Neuronales Netzwerk

Es wird ein dreilagiges, vorwärtsverknüpftes neuronales Netzwerk mit zwei (Berechnungsweg I) oder mit drei (Berechnungswege II, III) Eingabeneuronen (Eingabe-Schicht) und einer Zwischenschicht (verdeckte Schicht) sowie drei simultanen Ausgabeneuronen (Ausgabe-Schicht) verwendet.

7.3 Zentrifugen

7.3.1 Zentrifuge, einstellbar auf 12 000 g bis 15 000 g.

7.3.2 Zentrifuge, einstellbar auf (350 ± 50) g.

7.4 Zentrifugengefäße

7.4.1 Zentrifugengefäße aus Kunststoff, konische Maße etwa 10 mm × 40 mm, passend für die Zentrifuge nach 7.3.1.

7.4.2 Zentrifugengefäße aus Glas, beidseitig mit Stopfen, zylindrische Maße etwa 22 mm × 110 mm, passend für die Zentrifuge nach 7.3.2.

7.5 pH-Meter, nach DIN 10349.

7.6 Magnetrührer

7.7 Messzylinder, Nennvolumen 1 000 ml.

7.8 Bechergläser, Nennvolumen 100 ml.

7.9 Analysenwaage

7.10 Messkolben, Nennvolumen 10 ml.

7.11 Spektralphotometer, Zweistrahlige, geeignet zur Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 262 nm.

7.12 Membranfilter, Porendurchmesser 0,2 µm und 1,2 µm.

8 Probenahme

Nach DIN EN ISO 707.

9 Durchführung

9.1 Herstellung der Probenlösung

9.1.1 Butterplasma (siehe 3.1)

80 g bis 90 g Butter (Lagerung bei 4 °C) werden abgewogen und bei 65 °C geschmolzen. Das Butterplasma wird durch Zentrifugation (10 min bei $(350 \pm 50) g$) vom Butteröl abgetrennt. Nach der Entnahme aus der Zentrifuge wird die Butterprobe bis zur Erstarrung der Fettphase gekühlt. Das Butterplasma wird in ein Reagenzglas bzw. Becherglas abgegossen und durchmischt. Das Butterplasma kann bis zur Analyse bei -20 °C gelagert werden.

9.1.2 Butterserum (siehe 3.2)

Zur Bestimmung des Adenosin- und Uridingehalts (siehe 9.2.3) wird das Butterplasma (siehe 9.1.1) mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt, 20 min bei 12 000 g bis 15 000 g zentrifugiert und der Überstand abschließend durch ein Membranfilter (Porendurchmesser 0,2 µm) filtriert. Das angesäuerte Butterserum kann bis zur Analyse bei -20 °C gelagert werden.

9.2 Bestimmungen

9.2.1 Wassergehalt

Der Wassergehalt der Butterprobe wird nach DIN EN ISO 3727-1 bestimmt.

9.2.2 Citronensäuregehalt

100 µl des nach 9.1 erhaltenen Butterplasmas werden mit 900 µl Wasser in einem Zentrifugengefäß nach 7.4.1 gemischt und in einer Zentrifuge nach 7.3.1 zentrifugiert. Der Überstand wird mikrofiltriert (Porendurchmesser 1,2 µm). Die enzymatische Bestimmung der Citronensäure erfolgt in 0,2 ml der verdünnten Butterplasmalösung nach DIN 10325. Bei der Verwendung von im Handel verfügbaren Fertigreagenzien ist die Arbeitsvorschrift des Herstellers zu berücksichtigen. Der Gehalt an Citronensäure wird als Massenanteil in mg je 100 g Butter angegeben.

9.2.3 Adenosin- und Uridingehalt

Adenosin und Uridin werden flüssigchromatographisch aus dem Butterserum bestimmt (siehe 9.3). Die Nucleosidgehalte werden in µg je 100 g Butter angegeben.