

1. Namen

Metodo uporabljamo za zdrobljeno pšenico in moko.

2. Princip

Bližnja infrardeča refleksijska (NIR) spektroskopija (v nadaljnjem besedilu: NIR metoda) je hitra inštrumentalna tehnika, med drugim tudi za analizo žit tako v laboratoriju kot na terenu. Temelji na absorpciji NIR energije na peptidnih vezeh aminokislin v beljakovinskih molekulah pri specifičnih in referenčnih valovnih dolžinah. Vsebnost beljakovin določimo z matematično obdelavo spektralnih podatkov in kalibracijo glede na ustrezno referenčno metodo. Z merjenjem pri valovni dolžini absorpcije vode avtomatično korigiramo rezultat na suho snov ali na standardno vsebnost vlage.

3. Oprema

3.1. Inštrument za bližnjo infrardečo spektroskopijo s filtri ali monokromatorjem, za merjenje pri 2230, 2180, 2100, 1940 in 1680 nm.

3.2. Laboratorijski drobilec. Primerne velikosti sit so 0,5 mm 0,8 mm ali 1,00 mm.

3.3. Osebni računalnik s programsko opremo za multiplo regresijo (če ni del opreme pod 4.1).

4. Postopek

4.1. Vzorčenje

Pšenico ali moko vzorčimo v skladu s standardoma SIST ISO 13690 in SIST ISO 6644.

4.2. Priprava vzorca

Pri analizi pšenice z NIR metodo moramo vzorec najprej zdrobiti (20–50 g) v skladu z navodili za uporabo laboratorijskega drobilca. Pri vseh vzorcih, vključno z vzorci za kalibracijo, moramo uporabiti isti drobilec in isto sito. Pomembno je, da uporabljamo vedno enako tehniko in da zdrobljen vzorec dobro premešamo. Pri moki priprava vzorca ni potrebna, pred analizo jo moramo le temeljito premešati. Temperatura vzorcev se sme od temperature kalibracijskih vzorcev razlikovati za največ ± 5 °C, sicer moramo upoštevati korekcije temperature.

4.3. Odčitavanje bližnje infrardeče refleksije

Inštrument uporabljamo v skladu z navodili proizvajalca. Posebno pozornost moramo posvetiti vsakodnevnim postopkom preverjanja stanja inštrumenta, čistoči optike, referenčni ploščici (kjer je vgrajena) in nosilcu vzorca. Pomembno je, da vzorec vstavljamo v inštrument vedno na enak način.

4.4. Kalibracija inštrumenta

Inštrument moramo kalibrirati z najmanj 50 vzorci z znano vsebnostjo beljakovin, preračunanih na suho snov in določenih z referenčno metodo iz standarda SIST ISO 1871 (v nadaljnjem besedilu: referenčna metoda). Kalibracijske krivulje za moko in pšenico so različne, zato jih pripravimo posebej za moko in posebej za zdrobljeno pšenico. Vsebnost beljakovin v vzorcih za kalibracijo mora zajeti celotno območje vsebnosti v bodočih vzorcih in mora biti znotraj tega območja enakomerno porazdeljena.

Postopek kalibracije inštrumenta:

Vzorce za kalibracijo razporedimo po naključnem vrstnem redu. Če je potrebno, jih zdrobimo v skladu s točko 4.2. Izmerimo relativni logaritem refleksije $\log(1/R)$ vsakega vzorca pri 2230, 2180, 2100, 1940 in 1680 nm v skladu s točko 4.3. Za določitev kalibracijskih konstant k_0 , k_1 , k_2 , k_3 , k_4 in k_5 izračunamo multiplo regresijo vsebnosti beljakovin (B) v odvisnosti od $\log(1/R)$ pri štirih valovnih dolžinah 2180, 2100, 1940 in 1680 nm ali 2180, 2100, 1940, in 2230 (L1, L2, L3, L4, L5).

$$B = k_0 + k_1 L1 + k_2 L2 + k_3 L3 + k_4 L4 + k_5 L5$$

Konstante vnesemo v spomin inštrumenta. Kalibracijo validiramo z najmanj 30 neodvisnimi vzorci, ki smo jih izbrali na enak način kot vzorce za kalibracijo. Vsebnosti beljakovin določimo z referenčno metodo in z NIR metodo ter ovrednotimo kalibracijo kot je opisano v točki 4.5. te metode.

Če je standardni odmik razlik med referenčno in NIR metodo znotraj vrednosti, podanih v točki 4.5.3., je inštrument pravilno kalibriran in ga lahko uporabljamo za nadaljnje določitve. Če vrednosti niso dosežene, moramo kalibracijo ponoviti. Pri tem vrednotenju ne smemo odstranjevati ubežnikov.

4.5. Ocena kalibracije

Kalibracijo preverimo z 20 neodvisnimi vzorci, ki jih nismo uporabili pri kalibraciji in ki vsebujejo beljakovine v podobnem razponu vrednosti, kot smo jih uporabili pri kalibracijskih vzorcih. V vsakem od teh vzorcev določimo vsebnosti beljakovin z NIR metodo in z referenčno metodo. Podatke obdelamo z metodo najmanjših kvadratov tako, da vrednosti, dobljene z NIR metodo, nanašamo na x-os in vrednosti, dobljene z referenčno metodo, na y-os:

$$y = a + bx$$

Če y_i predstavlja posamezno vrednost, dobljeno z referenčno metodo, in x_i posamezno vrednost, dobljeno z NIR metodo, sta formuli za konstanti a in b naslednji:

$$b = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2} = \frac{n\sum x_i \cdot y_i - \sum x_i \cdot \sum y_i}{n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

kjer je:

x_i = vrednost vsebnosti beljakovin, dobljena z metodo NIR, za vzorec i

y_i = vrednost vsebnosti beljakovin, dobljena z referenčno metodo, za vzorec i

$\bar{x}$ = srednja vrednost vsebnosti beljakovin, dobljenih z NIR metodo

$\bar{y}$ = srednja vrednost vsebnosti beljakovin, dobljenih z referenčno metodo

n = število vzorcev

$\sum$ = vsota od 1 do n

Izmed dveh enakovrednih načinov za b je prvi primernejši za programiranje na računalniku, ker je manj občutljiv za napake pri zaokrožanju, medtem ko je drugi lažji za ročno izračunavanje, pod pogojem, da pri vmesnih stopnjah izračuna upoštevamo dovolj signifikantnih števil.

4.5.1. Preverjanje sploščenosti

Po spodaj prikazani formuli izračunamo Studentovo t – vrednost z metodo najmanjših kvadratov in s tem določimo, če vrednost naklona b odstopa od 1.

$$t = \frac{1 - b}{s / \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\text{Kjer je } s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2 - b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 2}}$$

Če je $|t| > 2$ in je točnost izven meja, navedenih v 4.5.3., je kalibracija sploščena in odstopanj sploh ne obravnavamo. V takem primeru je najbolje, da instrument ponovno kalibriramo. Alternativno lahko sploščenost korigiramo z množenjem vseh koeficientov (vključno K_O) z b in dodamo a h K_O .

4.5.2 Preverjanje odstopanja

Če sploščenosti ni, preverimo odstopanje tako, da izračunamo razlike (NIR metoda – referenčna metoda, d_i) vseh vzorcev (n), ob upoštevanju predznaka, in izračunamo:

$$t = \frac{\sum d_i / n}{\sqrt{\frac{\sum d_i^2 - (\sum d_i)^2 / n}{n(n - 1)}}$$

Če je $|t| > 2$ in je točnost izven meja, navedenih v 4.5.3., kalibracija odstopa. V takem primeru moramo srednjo vrednost razlike, d_i , odšteti od K_O . Konstante K_O ne korigiramo, če je manjša od 2.

4.5.3. Preverjanje točnosti

Izračunamo standardni odmik razlik rezultatov, dobljenih z NIR in referenčno metodo:

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{n}}$$

Točnost preverimo z 20 vzorci. Standardni odmik razlik med NIR in referenčno metodo ne sme biti večji od 0,4% za zdrobljeno pšenico in 0,3% za moko.

4.5.4. Preverjanje natančnosti

Izračunamo standardni odmik razlik med paralelnima določitvama beljakovin z metodo NIR n vzorcev:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{2n}}$$

kjer je d_i razlika med rezultatoma vsakega para paralelne določitve.

Natančnost preverja isti izvajalec istega dne tako, da posodo (kiveto) za vzorec ponovno napolni s svežim vzorcem.

Vrednosti s_r za določanje beljakovin v žitu in moki z NIR ne smejo biti večje od 0,10%.

4.5.5. Preverjanje kalibracije

Ko smo z validacijo ugotovili, da sploščenosti ni in da odstopanja niso prisotna, in ko smo potrdili natančnost, kot je podana v točki 4.5.4., ostane kalibracija v daljšem časovnem obdobju nespremenjena. Vendar je priporočljivo, da jo občasno preverimo z referenčno metodo. Vsak dan pa kalibracijo preverjamo s kontrolnimi vzorci. Na začetku vsake sezone moramo preveriti točnost kalibracije z najmanj dvanajstimi vzorci iz tekoče sezone.

4.6. Določitev

Če je potrebno, vzorce zdrobimo v skladu s točko 4.2. in izvedemo meritev.

5. Podajanje rezultatov

5.1. Izračun

Vsebnosti beljakovin v vzorcu izračuna mikroprocesor avtomatično in se prikažejo na ekranu ali izpišejo. Rezultate izrazimo kot % beljakovin, zaokrožene na 0,1%, in jih, odvisno od zahteve, preračunamo na suho snov ali na standardno količino vlage.

5.2. Natančnost določitve

Razlika med dvema določitvama, ki ju izvede isti izvajalec istega dne, ne sme biti večja od 0,30%.