

ICS 65.020

B 40

团 体 标 准

T/HXCY -2021

基于近红外光谱分析法检测构树青 贮蛋白质含量技术规程

**Code of Practice for Determination of Crude Protein Content of
Paper Mulberry Based on Near-Infrared Spectrum(NIRS)Technology**

2021-x-x 发布

2021-x-x 实施

北京华夏草业产业技术创新战略联盟 发布

目 次

前 言..... II

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 仪器设备..... 2

5 测定..... 3

6 结果处理和表示..... 4

7 异常样品的确认和处理..... 4

8 准确性和精密度..... 5

9 测试报告..... 5

附 录 A（资料性附录） 7

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由北京华夏草业产业技术创新战略联盟团体标准委员会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学、中国科学院亚热带研究所、中国科学院微生物研究所。

本文件主要起草人：倪奎奎、杨富裕、杨雪萍、王敏、钟瑾。

本文件为首次发布。

本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

基于近红外光谱分析法检测构树青贮蛋白质含量技术规程

1 范围

本文件规定了近红外法测定构树中蛋白质含量的术语和定义、仪器设备、测定、结果处理和表示、异常样品的确认和处理、准确性和精密度、测试报告等内容和技术。

本文件适用于我国分布的构树青贮饲料中粗蛋白质含量测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改版）适用于本文件。

GB/T 18868 饲料中水分，粗蛋白质，粗纤维，粗脂肪，赖氨酸，蛋氨酸快速测定 近红外光谱法

GB/T 24895 粮油检验 近红外分析定标模型验证和网络管理与维护通用规则

GB/T 29858 分子光谱多元校正定量分析通则

GB/T 37969 近红外光谱定性分析通则

FZ/T 01144 纺织品 纤维定量分析 近红外光谱法

LY/T 2151 木材中纤维素和酸性不溶木质素含量测定近红外光谱法

3 术语和定义

GB/T 24895 和 FZ/T 01144 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为便于使用，以下重复列出了 GB/T 24895 和 FZ/T 01144 中的某些术语和定义。

3.1 近红外光谱分析技术 Near infrared spectroscopy (NIRS) Technology

NIRS 是一种绿色分析技术，主要利用近红外光谱区间化学物质的光学吸收特质，主要信息来源是含氢基团的倍频和合频，多组分测定物质中的不同组分或同一组分的不同含氢基团为近红外光谱定性和定量分析提供了理论依据。NIRS 技术可以解决由于实验室法维护成本高而受到限制的饲料分析问题，从而实现饲草营养指标检测快速化、营养精准化。

3.2 定标模型 Calibration

将获得的 NIR 光谱扫描数据进行数学预处理，通过化学分析方法结合湿化学值来建构树青贮中粗蛋白组分的近红外光谱模型。

[GB/T 24895-2010, 定义 3.3]

3.3 验证模型 Validation

已获得的数学模型需要进行验证，以验证定标模型性能。

3.4 样品集 Samples Collection

具有代表性（地点、年限）、广泛性、基本覆盖相关组分含量范围的样品集合。

[GB/T 24895-2010, 定义 3.7]

3.5 定标样品集 Calibration Sets

样品蛋白质含量数据已知，具有代表性，包含所有将要分析样品含量成分范围，用来建立校正定标模型的样品。

[FZ/T 01144-2018, 定义 3.3]

3.6 验证样品集 Validation Sets

样品集中定标样品集外的样品，用来验证定标模型，评估模型的确性和精确度的样品集。

3.7 异常样品 Outlies

马氏距离 (GD 值) 代表每个样品与所有样品的谱带与所有样品平均谱带的差异，一般将 GD 值 < 3 的样品看作取自同一群体，倘使计算样品的 GD 值 > 3 ，则被认为 Outliers，应当予以剔除。

4 仪器设备

4.1 近红外光谱分析仪

由光学、电子、机械和计算机系统组成的，采用带漫反射方式检测型近红外光谱分析仪。近红外光谱仪扫描范围包含波段 1100~2500 nm (9090~4000 cm^{-1})；仪器的噪声应控制在 60×10^{-6} AU 以下；波长准确度优于 2 nm，波长重现性优于 0.05 nm；随机软件具有近红外光谱数据的收集、存储分析和计算等功能，能够建立可靠的定标模型。

4.2 样品粉碎设备

高速万能粉碎机，粉碎后样品的粒度分布和均匀性应符合近红外分析建立定标模型时的要求，使用时应采用和定标模型建立与验证时同样的制备过程。

5 测定

5.1 样品集准备

将收集到的构树青贮样品放置于 65℃烘干直至恒重，用高速万能粉碎机粉碎后过 1mm 筛，粉碎符合近红外分析仪建立定标模型的要求，将粉样装入封闭洁净盒中保存，以备光谱扫描和化学分析检测。定标样品集样品个数与验证样品集样品个数的比例为 2:1。

5.2 样品集化学值测定

采用凯式定氮法测粗蛋白质含量（附录 A）。

5.3 分析步骤

5.3.1 仪器检测

每次测定前按照近红外光谱分析仪（5.1）说明书的要求对仪器状态自检测试及维护。仪器开机后在正常状态下预热 30 min。

5.3.2 定标

5.3.2.1 定标样品选择

参与定标的样品应具有代表性，即需包含所有将要分析样品的特性。创建一个新的定标模型，对于工业研究上需要 200 个样品以上，按照 Kennard and Stone 算法确定建模集与验证集样品，其中 1/3 作为预测集样品，其余用于定标外部检验。

5.3.2.2 定标样品标准值的测定

采用凯氏定氮法测粗蛋白质含量（附录 A）。

5.3.2.3 光谱数据收集

光谱数据收集过程中，测定条件以及样品和环境温度尽量保持一致。将样品装入与仪器相配套测量盒，保持表面平整以防漏光。样品重复扫描 3 次（每次扫描更换位置），数据以吸光度（ $-\log$ 相对漫反射率， $\log 1/R$ ）表示。为防止验证模型时外推预测数值的情况出现，各项指标的最大、最小值划归定标集。

5.3.2.4 定标模型建立

利用仪器建模软件，优化各建模参数，进行光谱预处理，将近红外波段光谱信息和粗蛋白含量测定值一一对应，采用偏最小二乘法（Partial Least Squares, PLS）利用化学计量学软件建立构树粗蛋白含量定标模型。

5.3.3 NIRS 模型评价

通过校正决定系数（ R^2 ）、校正标准差（SECV）、验证标准差（SEP）、残差（Bias）、验证决定系数（ r^2 ）等参数对模型评估。 R^2 和 RMSE 常常应用于定量分析真值和预测值之间的相关性和偏差程度，对于定性分析而言，可以判别带分析组分是否属于粗蛋白质。

5.3.4 模型验证及使用

已获得的数学模型需进行验证及模型优化，扫描待测样品获得光谱数据进而利用所建立的模型预测出待测样品的成分含量。

6 结果处理和表示

6.1 试样测试

选择已建立的定标模型，按照近红外光谱仪要求的试样量测试，记录测试数据。每个样品应测试两次，第一次测试后的测试样品应与原待测样品混匀后，再次取样做第二次测试。

6.2 试样测试

粗蛋白含量湿化学值两次测试结果的绝对差应分别不大于 1.5%，取两次数据的平均值为测试结果，测试结果保留小数点后两位。

如果两个测试结果的绝对差值不符合上述要求，则应再做 2 次独立测试，获得 4 个独立测试结果，若 4 个独立测试结果的极差（ $X_{\max} - X_{\min}$ ）小于或等于绝对差允许值的 1.3 倍，则取 4 个独立测试结果的平均值作为最终测试结果；如果 4 个独立测试结果的极差（ $X_{\max} - X_{\min}$ ）大于允许差的 1.3 倍，则取 4 个独立测试结果的中位数作为最终测试结果。对于异常测试结果，所得数据不应作为有效测试数据。

7 光谱数据处理与回归分析统计方法

7.1 数据处理方式

采用各种适合的数学处理方式对原始光谱进行预处理，从而提高、优化校正模型。光谱预处理方法主要使用标准正态变量转换法（Standard Normal Variable, SNV）、去趋势（Detrend）、平滑处理（Smoothing）通常使用 Savitzky-Golay、导数处理即一阶导数（1st Deriv.）

及二阶导数（2ed Deriv.）。

7.2 多元校正方法

常用的多元校正方法有主成分分析法（Principal Component Regression, PCR）、偏最小二乘法（Partial Least Squares, PLS）、支持向量机（Support Vector Machine, SVM）及人工神经网络（Artificial Neural Network, ANN）等。

8 准确性和精密度

8.1 准确性

测试样品粗蛋白质含量的预测标准偏差(SEP)应不大于 3%。

8.2 重复性

在同一实验室，由同一操作者使用相同的仪器设备，按相同测试方法，在短的时间内通过重新分样和重新装样，对同一被测样品相互独立测定，获得的粗蛋白质含量两次测定结果的绝对差应不大于 1.5%。

[GB/T24895-2010]

8.3 再现性

在不同实验室，由不同操作人员使用同一型号不同设备，按相同的测定方法，对相同构树样品测定获得的粗蛋白质含量，两个独立测定结果之间的绝对差应不大于 2%。

[GB/T24895-2010]

9 测试报告

测试报告应包括(但不限于):

- 本文件编号;
- 对试样的名称、采样方法、制备方法、编号等信息的描述;
- 仪器型号和序列号;
- 建模波段;
- 光谱预处理方法;
- 定标模型名称;

- 定标模型的适用浓度范围、温度范围；
- 试样测试时的温度；
- 试样测定结果及必要说明；
- 采用的测定的方法或标准；
- 出现异常样品时，应提供异常样品类型及处理的有关信息；
- 测试单位、测试人及测试时间；
- 本文件或引用文件中未规定的并可影响结果的任何操作。

附录 A

(资料性附录)

凯式定氮法测定粗蛋白质含量

A1 方法原理

构树样品与硫酸茺一同加热消化，分解有机质，释放出的 NH_3 与硫酸结合成硫酸铵留在溶液，用凯式定氮仪测定时，在消化管中，氢氧化钠中和硫酸铵生成氢氧化铵，高温蒸汽加热又分解 NH_3 ， NH_3 会发反应池中被硼酸吸收，用标定过的盐酸滴定（溴甲酚绿和甲基红溶液做指示剂），从而计算出总氮量，可换算为蛋白含量。

A2 试验材料和器材

供试材料：构树。

试验试剂和器材包括：浓硫酸；催化剂；氢氧化钠；硼酸吸收液；硫酸铵；盐酸标准液；甲基红溶液；溴甲酚绿溶液；95%乙醇溶液；无水碳酸钠；蒸馏水；烘箱；干燥器；1000mL 烧杯；玻璃棒；G4 玻璃砂芯漏斗；分析天平（精确到 0.0001 克）；消煮炉；移液器。

A3 样品预处理

每个青贮样品烘干至恒重后用高速粉碎机粉碎，将粉碎后的样品置于密封盒中备用。

A4 盐酸浓度的标定

用分析天平称取约 0.4 g（精确到 0.0001 g，土壤样品时称取约 0.2 g）基准 Na_2CO_3 ，记取重量（W1），移入 200 mL 锥形瓶，加 40 mL 蒸馏水，再各加 8 滴甲基红和溴甲酚绿指示剂，此时溶液呈草绿色，用盐酸标准液滴至粉红色，记下所用盐酸毫升数（A1）。将锥形瓶中的溶液煮沸几分钟，再用自来水冷却至室温，此时粉红色褪去，继续使用盐酸滴定至粉红色复现，记下滴定毫升数（A2）。再将锥形瓶中的溶液煮沸几分钟，然后用自来水冷却至室温，此时粉红色褪去，继续使用盐酸滴定至粉红色复现，记下滴定毫升数（A3）。

HCl 浓度 = $(18.870 \times W1) / (A1 + A2 + A3)$ ，浓度必须精确到小数点后 4 位，例如 0.1000 mol/L。注：滴定盐酸溶液所用体积约为 70 mL。

A5 硼酸吸收液配制

用蒸馏水配制成 1% 的硼酸溶液；每升硼酸溶液加入 7 mL 甲基红溶液和 10 mL 溴甲酚绿溶液。