

ICS 65.020

B 40

团 体 标 准

T/HXCY -2021

基于近红外光谱分析法检测燕麦青 贮可溶性糖含量技术规程

**Code of Practice for Determination of Water-soluble Carbohydrate
Content of Oat 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 原理..... 1

5 仪器设备..... 1

6 测定..... 2

7 结果处理和表示..... 3

8 异常样品的确认和处理..... 3

9 准确性和精密度..... 4

10 测试报告..... 4

附 录 A（资料性附录） 6

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、陈菲、李小梅、江德带、刘晗、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燕麦青贮可溶性糖含量技术规程

1 范围

本文件规定了近红外法测定燕麦青贮中可溶性糖含量的术语和定义、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燕麦青贮饲料中可溶性糖含量测定。

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

3 术语和定义

GB/T 18868 和 GB/T 24895 确立的术语和定义适用于本文件。

3.1 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立燕麦青贮中可溶性碳水化合物的近红外光谱模型。

3.2 定标样品集 Calibration Sets

样品可溶性碳水化合物含量数据已知，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。

3.3 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。

3.4 异常样品 Outlies

样品近红外光谱与定标样品差别过大，具体表现为样品近红外光谱的马哈拉诺比斯(Mahalanobis)距离(GD 值)大于 3，则该样品被视为异常样品。

3.5 标准分析误差 (SEC 或 SEP)

样品的近红外光谱法测定值与经典方法测定值间残差的标准差，表达为 $\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n-1}}$ ，样品常以 SEC 表示，检验样品常用 SEP 表示。

4 原理

利用可溶性糖中的 C-H、O-H 等化学键的泛频振动或转动对近红外光的吸收特性，用化学计量学方法建立燕麦青贮样品近红外光谱与其可溶性糖之间的相关关系，计算燕麦青贮样品的可溶性糖含量。

5 仪器设备

5.1 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。

5.2 样品粉碎设备

粉碎后样品的粒度分布和均匀性应符合近红外分析仪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。

6 测定

6.1 样品集准备

取适量燕麦青贮样品放置于 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。

6.2 分析步骤

6.2.1 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。

6.2.2 定标

6.2.2.1 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。

6.2.2.2 定标样品标准值的测定

采用蒽酮硫酸法测可溶性糖含量（附录 A）。

6.2.2.3 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。

6.2.2.4 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可溶性糖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燕麦可溶性糖含量定标模型。

6.2.3 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可溶性糖。

6.2.4 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。按照近红外分析仪（5.1）说明书的要求，取适量的燕麦青贮样品，使用规定的粉碎设备（5.2）粉碎，将粉碎好的样品用近红外分析仪进行测定，记录测定数据。每个样品应测定两次，第一次测定后的测定样品应与原待测样品混匀后，再次取样进行第二次测定。

7 结果处理和表示

7.1 试样结果

为了得到有效的结果，测定结果应在仪器使用的定标模型所覆盖的可溶性糖含量范围内。

7.2 结果处理

如果两个测试结果的绝对差值不符合 9.2 的要求，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。

8 异常样品的确认和处理

8.1 异常样品的分类

异常样品可为“好”、“坏”两类，好的异常样品加入定标模型后，可增加该模型的分析能力，而坏的异常样品加入定标模型后，只能降低分析的准确度。“好”、“坏”甄别标准有二：一是 GD 值，通常“好”的异常样品 GD 值为 >0.6 或 H 值 ≤ 3 ，通常“坏”的异常样品 GD 值 >3 ；二是 SEC，通常“好”的异常样品加入定标模型后，SEC 不会显著增加，而“坏”的异常样品加入定标模型后，SEC 将显著增加。

8.2 异常样品的确认

形成异常测定结果的原因，可能来自于以下几个方面：

- 该样品粗蛋白质的含量超过了该仪器定标模型的范围；
- 该样品的品种与参与该仪器定标样品集的品种有很大差异；
- 采用了错误的定标模型；
- 样品杂质过多；
- 光谱扫描过程中样品发生了位移；
- 样品温度超出定标模型规定的温度范围。

8.3 异常样品的处理

NIR 分析中发现异常样品后要用经典方法对该样品进行分析，同时对该异常样品类型进行确定，属于“好”异常样品则保留，并加入到定标模型中，对顶标模型进行升级；属于“坏”异常样品则放弃。

9 准确性和精密度

9.1 准确性

测试样品可溶性糖含量的预测标准偏差(SEP)应不大于 3%。

9.2 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，获得的可溶性糖含量两次测定结果的绝对差应不大于 1.5%。

9.3 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，对相同燕麦样品测定获得的可溶性糖质含量，两个独立测定结果之间的绝对差应不大于 2%。

10 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

蒽酮-硫酸法测定可溶性碳水化合物

A1 方法原理

在浓硫酸溶液中，燕麦青贮 WSC 先脱水为糖醛或羟甲基糖醛，再与蒽酮反应生成蓝绿色化合物，其颜色深度与含糖量成正比，其吸收波峰长 620 nm。

A2 试验材料和试剂

供试材料：燕麦。

蒽酮-硫酸溶液：0.4 g 蒽酮溶于 100 ml 88%硫酸溶液，混匀放入冰箱或冷水中冷却备用，临用时配制。

糖标准液：准确称取 0.25 g 蔗糖，以 80%乙醇溶解，定容至 250 ml，稀释为 40-100 微克/毫升的浓度。

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 工作曲线的绘制：

于两组干燥试管中，分别注入 0.0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0 微克蔗糖标准溶液。加水调整整个试管溶液均为 2.00 ml，放入冷水中冷却 2 分钟，各试管中加入 6.00 ml 蒽酮-硫酸溶液，摇匀，迅速放入冷水中冷却 2 分钟。放入沸水中 5 分钟显色，完毕后，取出，用流水冷却至室温。以 2.00 ml 蒸馏水按上述操作所得空白液为参比，与 620 nm 波长下比色，绘制工作曲线。

A5 测定步骤

5.1 样品处理：称取磨碎样品 0.5 g (W)，用少量 80%乙醇冲入带塞试管中，使体积在 7 ml 左右，盖上塞子，置于 80℃水浴中提取 30 分钟，取出冷却后转入 50 ml 容量瓶中，定容，摇匀后静置，取上清液稀释合适倍数到 2 ml 待测。

5.2 测定：620 nm 下比色，按工作曲线所述步骤，测定沸水显色后溶液的吸光度。用标准曲线获得每 2 ml 待测液中的微克数，再计算出 WSC 的含量。

A6 结果计算

$$X = \frac{C \times 50 \times n}{2 \times W} \times 100\%$$

X——试样中可溶性碳水化合物的含量，单位为克每千克 (g/kg); C——由标准曲线求得试样溶液中可溶性糖的质量，单位为微克 (μg); 50——第一次定容体积，单位为毫升 (ml); n——待测液稀释倍数; 2——吸取待测液 B 的体积; W——青贮饲料干样的质量，单位为(g)。