 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>	Vydání	1
	50050.1 – Stanovení vybraných parametrů v rostlinném materiálu metodou NIRS	Revize	1

## STANOVENÍ VYBRANÝCH PARAMETRŮ V ROSTLINNÉM MATERIÁLU METODOU NIRS

### 1 Rozsah a účel

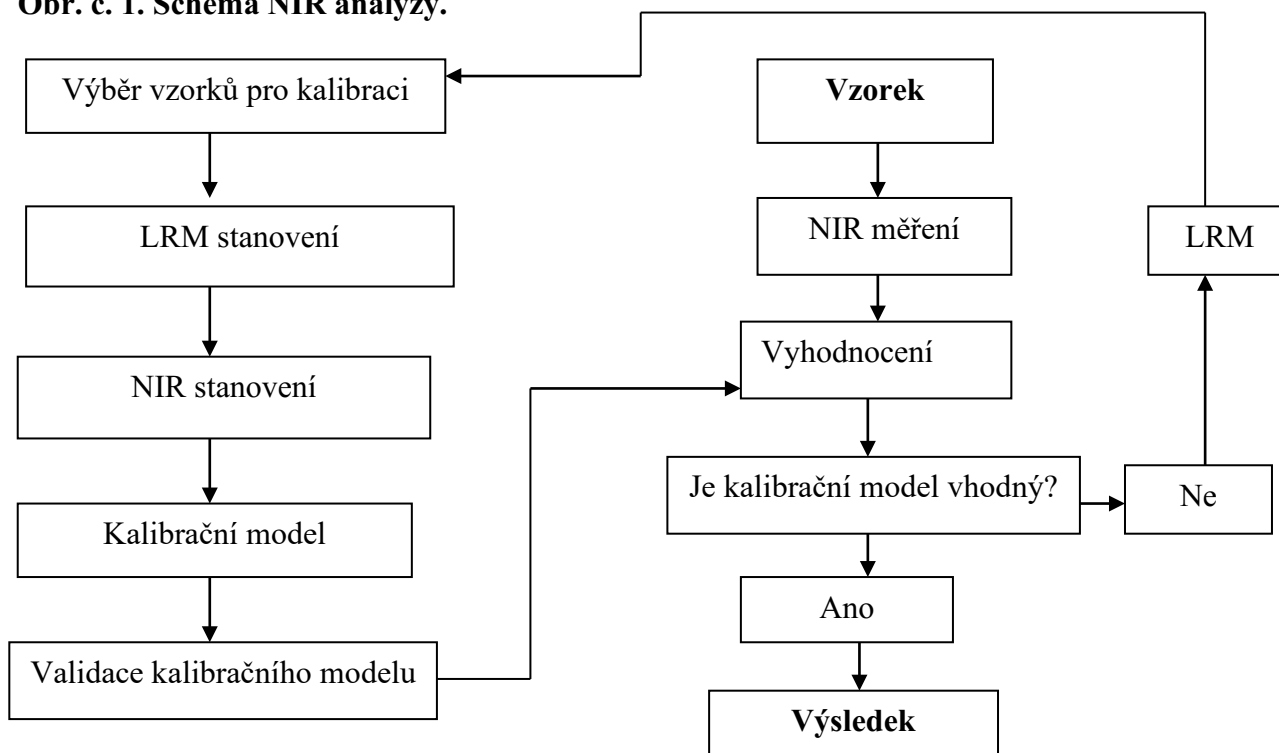
Metoda NIR spektroskopie je vhodná pro stanovení vybraných parametrů ve vzorcích olejnin, luskovin, kukuřice silážní, obilovin a pšeničné mouky.


### 2 Princip

Vzorky se měří metodou NIR spektroskopie v blízké infračervené spektrální oblasti (4 000 – 10 000)  $\text{cm}^{-1}$ , (1000 – 2500) nm s reflektanční detekcí. Vyhodnocení se provádí matematickými statistickými postupy z kalibračního modelu. Kalibrační model pro určitý parametr vyjadřuje míru korelace mezi výsledky získanými NIR metodou a laboratorní referenční metodou (LRM) a pro jeho spolehlivé vytvoření je potřeba získat dostatečně obsáhlý soubor analyzovaných vzorků.

Měření probíhá v pevném vzorku, který se před měřením předupraví mletím (s výjimkou vzorků řepky olejky, máku setého a hořčice).

Obr. č. 1. Schéma NIR analýzy.



	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50050.1 – Stanovení vybraných parametrů v rostlinném materiálu metodou NIRS	Vydání	1
		Revize	1

### 3 Přístroje a pomůcky

- 1 Spektrometr měřící v blízké infračervené spektrální oblasti NIR (FT-NIR).
- 2 Křemenná měřicí kyveta o vhodném průměru.
- 3 Nožový laboratorní mlýnek, (např. VM-7 Minirazant nebo obdobný).
- 4 Kladívkový šrotovník, (např. MILL 120 nebo obdobný).
- 5 Ultraodstředivý laboratorní mlýnek, (např. Retsch ZM 200 nebo obdobný).
- 6 Úderový laboratorní mlýnek (např. Record nebo obdobný).
- 7 Laboratorní mlýn (např. Bühler MLU 202, Chopin CD1).

### 4 Postup

#### 4.1 Příprava vzorků

Metoda NIR spektroskopie nevyžaduje speciální přípravu vzorků, ale musejí být dodrženy přesné postupy pro sušení, mletí a homogenizaci vzorků.

##### 4.1.1 Sušení

V případě, že vzorek je potřeba před NIR analýzou sušit, teplota v horkovzdušné sušárně nesmí přesáhnout 65 °C.

Způsob úpravy vzorků musí být totožný s postupy, které byly použity při tvorbě kalibračních modelů.

##### 4.1.2 Mletí

Úprava vzorků pro testování odrůd je popsána také v JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu, kap. 5.

##### 4.1.3 Homogenizace vzorků


Upravené vzorky vyžadují před vlastním měřením důkladné promíchání, aby bylo dosaženo maximální homogenity vzorků. Pokud vzorky nejsou homogenní, může být významně ovlivněna přesnost a správnost NIR analýzy.

### 4.2 Měření vzorků na NIR spektrometru

Před měřením vzorků se přístroj nastaví podle doporučení výrobce.

NIR spektra upravených vzorků se snímají v křemenných kyvetách o průměru např. (2 – 5) cm. Nemleté vzorky řepky olejky a máku setého se měří v kulatých křemenných kyvetách o průměru např. 12 cm z důvodu zabezpečení dostatečné homogenity vzorku.

Upravený a dokonale promíchaný vzorek se rovnoměrně nadávkuje do měřicí kyvety v takovém množství, aby bylo možné kyvetu uzavřít. Vzorek se musí nadávkovat tak, aby pokrýval celou plochu kyvety a aby se neobjevovaly vzduchové mezery mezi částmi vzorku,

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50050.1 – Stanovení vybraných parametrů v rostlinném materiálu metodou NIRS	Vydání	1
		Revize	1

kteřé by mohly negativně ovlivnit správnost měření. Takto nadávkovaný vzorek se umístí do měřicí části přístroje a nasnímá se jeho NIR spektrum.

Všechna NIR měření se provádějí v režimu reflektance. Každý vzorek se měří dvakrát (ve dvou kyvetách).

## 5 Vyhodnocení výsledků

Vývoj NIR metody pro stanovení sledovaného parametru v požadovaných maticích je založen na vytvoření kalibrační rovnice (modelu) z dostatečně rozsáhlého souboru měřených vzorků, která kvantifikuje vztah mezi informací NIR absorpce a hodnotou stanovenou laboratorní referenční metodou. Počet měřených vzorků pro vytvoření vhodného NIR kalibračního modelu je rozhodující z hlediska dostatečné robustnosti celé metody (doporučuje se nejméně 60 vzorků).

Vyhodnocování výsledků neznámých vzorků pro danou matici a parametr se provádí softwarově s použitím matematických a statistických postupů aplikovaných na vytvořené příslušné kalibrační modely.

K vyhodnocování získaných spektrálních dat se používá vhodný vyhodnocovací software. Naměřená NIR spektra jsou v tomto programu uložena a následně je možné k jednotlivým vzorkům přiřadit laboratorní referenční hodnoty. Kalibrace jsou zpracovány vhodnou regresní metodou, např. PLS. Ke kontrole kalibračního modelu a ověření predikční schopnosti daného modelu se používá metoda příčné validace (cross validation), která poskytuje optimální počet latentních proměnných (hlavních komponent). Dále jsou používány různé matematické úpravy snímaných spekter, jako např. derivace, korekce rozptylu záření SNV a výběr vhodných vlnových délek tak, aby byly získány co nejkvalitnější regresní charakteristiky kalibračního modelu. Predikční schopnosti vytvořených kalibračních modelů se ověří porovnáním laboratorní referenční metody a NIR metody na testovaných vzorcích, které nejsou zahrnuty do vývoje kalibračního modelu.

Predikci neznámých vzorků, které nejsou součástí kalibračního modelu, je nutné provádět v souladu s validačními parametry stanovenými pro danou metodu. Výsledky stanovení neznámého vzorku se uvádějí v % přepočtených na obsah sušiny vzorku.

### Poznámky

*1 Neznámé vzorky se měří nejméně ve 2 paralelních stanoveních. Pokud hodnota paralelního stanovení překročí opakovatelnost metody NIR spektroskopie, je nutné měření opakovat.*