



中华人民共和国国家标准

GB/T 18868—2002

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

Method for determination of moisture, crude protein,
crude fat, crude fibre, lysine and methionine
in feeds—Near infrared reflectance spectroscopy

2002-09-24 发布

2003-03-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准是建立在经典方法基础上的饲料中水分、粗蛋白质、粗纤维、粗脂肪、赖氨酸和蛋氨酸的快速测定方法,对于仲裁检验应以经典方法为准。所谓经典法是指国家标准已规定的常规方法,即 GB/T 6432—1994《饲料中粗蛋白测定方法》、GB/T 6433—1994《饲料粗脂肪测定方法》、GB/T 6434—1994《饲料中粗纤维测定方法》、GB/T 6435—1986《饲料水分的测定方法》、GB/T 15399—1994《饲料中含硫氨基酸测定方法 离子交换色谱法》和 GB/T 18246—2000《饲料中氨基酸的测定》。

本标准中水分、粗蛋白质、粗纤维的测定参考采用美国公职分析化学家协会(AOAC)方法(第十五版),方法的编号分别为 989.03 和 991.01。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:国家饲料质量监督检验中心(北京)。

本标准主要起草人:杨曙明、宋荣、张瑜、苏晓鸥。

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

1 范围

本标准规定了以近红外光谱仪快速测定饲料中水分、粗蛋白质、粗纤维、粗脂肪、赖氨酸和蛋氨酸的方法。对于仲裁检验应以经典方法为准。

本标准适用于各种饲料原料和配合饲料中水分、粗蛋白质、粗纤维和粗脂肪,各种植物性蛋白类饲料原料中赖氨酸和蛋氨酸的测定,本方法的最低检出量为 0.001%。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6432 饲料中粗蛋白测定方法

GB/T 6433 饲料粗脂肪测定方法

GB/T 6434 饲料中粗纤维测定方法

GB/T 6435—1986 饲料水分的测定方法

GB/T 15399 饲料中含硫氨基酸测定方法

GB/T 18246 饲料中氨基酸的测定

3 原理

近红外光谱方法(NIR)利用有机物中含有 C-H、N-H、O-H、C-C 等化学键的泛频振动或转动,以漫反射方式获得在近红外区的吸收光谱,通过主成分分析、偏最小二乘法、人工神经网络等现代化学和计量学的手段,建立物质光谱与待测成分含量间的线形或非线形模型,从而实现用物质近红外光谱信息对待测成分含量的快速计量。

4 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

4.1

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 $\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n-1}}$,对于定标样品常以 SEC 表示,检验样品常用 SEP 表示。

4.2

相对标准分析误差[SEC(C)]

样品标准分析误差中扣除偏差的部分,表达为 $\sqrt{SPC^2 - Bias^2}$ 。

4.3

残差(d)

样品的近红外光谱法测定值与真实值(经典分析方法测定值)的差值。

4.4

偏差($Bias$)

残差的平均值。

4.5

相关系数(R 或 r)

近红外光谱法测定值与经典法测定值的相关性,通常定标样品相关系数以 R 表示,检验样品相关系数以 r 表示。

4.6

异常样品

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(H 值)大于0.6,则该样品被视为异常样品。

5 仪器

5.1 近红外光谱仪

带连续扫描单色器的漫反射型近红外光谱仪或其他类产品,光源为100 W钨卤灯,检测器为硫化铅,扫描范围为1 100 nm~2 500 nm,分辨率为0.79 nm,带宽为10 nm,信号的线形为0.3,波长准确度0.5 nm,波长的重现性为0.03 nm,在2 500 nm处杂散光为0.08%,在1 100 nm处杂散光为0.01%。

5.2 软件

为DOS或WINDOWS版本,该软件由C语言编写,具有NIR光谱数据的收集、存储、加工等功能。

5.3 样品磨

旋风磨,筛片孔径为0.42 mm,或同类产品。

5.4 样品皿

长方形样品槽,10 cm×4 cm×1 cm,窗口为能透过红外线的石英玻璃,盖子为白色泡沫塑料,可容纳样品为5 g~15 g。

6 试样处理

将样品粉碎,使之全部通过0.42 mm孔筛(内径),并混合均匀。

7 分析步骤

7.1 一般要求

每次测定前应对仪器进行以下诊断。

7.1.1 仪器噪声

32次(或更多)扫描仪器内部陶瓷参比,以多次扫描光谱吸光度残差的标准差来反映仪器的噪声。残差的标准差应控制在 $30 \lg(1/R)10^{-6}$ 以下。

7.1.2 波长准确度和重现性

用加盖的聚苯乙烯皿来测定仪器的波长准确度和重现性。以陶瓷参比做对照,测定聚苯乙烯皿中聚苯乙烯的三个吸收峰的位置,即1 680.3 nm、2 164.9 nm、2 304.2 nm,该三个吸收峰的位置的漂移应小于0.5 nm,每个波长处漂移的标准差应小于0.05 nm。

7.1.3 仪器外用检验样品测定

将一个饲料样品(通常为豆粕)密封在样品槽中作为仪器外用检验样品,测定该样品中粗蛋白质、粗纤维、粗脂肪和水分含量并做 T 检验,应无显著差异。

7.2 定标

NIR 分析的准确性在一定程度上取决于定标工作,定标的总则和程序见附录 A。

7.2.1 定标模型的选择

定标模型的选择原则为定标样品的 NIR 光谱能代表被测定样品的 NIR 光谱。操作上是比较它们光谱间的 H 值,如果待测样品 H 值 ≤ 0.6 ,则可选用该定标模型;如果待测样品 H 值 > 0.6 ,则不能选用该定标模型;如果没有现有的定标模型,则需要对现有模型进行升级。

7.2.2 定标模型的升级

定标模型升级的目的是为了使该模型在 NIR 光谱上能适应于待测样品。操作上是选择 25 个~45 个当地样品,扫描其 NIR 光谱,并用经典方法测定水分、粗蛋白质、粗纤维、粗脂肪或赖氨酸和蛋氨酸含量,然后将这些样品加入到定标样品中,用原有的定标方法进行计算,即获得升级的定标模型。

7.2.3 已建立的定标模型

7.2.3.1 饲料中水分的测定

定标样品数为 101 个,以改进的偏最小二乘法(MPLS)建立定标模型,模型的参数为: $SEP = 0.24\%$ 、 $Bias = 0.17\%$ 、MPLS 独立向量(Term)=3,光谱的数学处理为:一阶导数、每隔 8 nm 进行平滑运算,光谱的波长范围为 1 308 nm~2 392 nm。

7.2.3.2 饲料中粗蛋白质的测定

定标样品数为 110 个,以改进的偏最小二乘法(MPLS)建立定标模型,模型的参数为: $SEP = 0.34\%$ 、 $Bias = 0.29\%$ 、MPLS 独立向量(Term)=7,光谱的数学处理为:一阶导数、每隔 8 nm 进行平滑运算,光谱的波长范围为 1 108 nm~2 500 nm。

7.2.3.3 饲料中粗脂肪的测定

定标样品数为 95 个,以改进的偏最小二乘法(MPLS)建立定标模型,模型的参数为: $SEP = 0.14\%$ 、 $Bias = 0.07\%$ 、MPLS 独立向量(Term)=8,光谱的数学处理为:一阶导数、每隔 16 nm 进行平滑运算,光谱的波长范围为 1 308 nm~2 392 nm。

7.2.3.4 饲料中粗纤维的测定

定标样品数为 106 个,以改进的偏最小二乘法(MPLS)建立定标模型,模型的参数为: $SEP = 0.41\%$ 、 $Bias = 0.19\%$ 、MPLS 独立向量(Term)=6,光谱的数学处理为:一阶导数、每隔 8 nm 进行平滑运算,光谱的波长范围为 1 108 nm~2 392 nm。

7.2.3.5 植物性蛋白类饲料中赖氨酸的测定

定标样品数为 93 个,以改进的偏最小二乘法(MPLS)建立定标模型,模型的参数为: $SEP = 0.14\%$ 、 $Bias = 0.07\%$ 、MPLS 独立向量(Term)=7,光谱的数学处理为:一阶导数、每隔 4 nm 进行平滑运算,光谱的波长范围为 1 108 nm~2 392 nm。

7.2.3.6 植物性蛋白类饲料中蛋氨酸的测定

定标样品数为 87 个,以改进的偏最小二乘法(MPLS)建立定标模型,模型的参数为: $SEP = 0.09\%$ 、 $Bias = 0.06\%$ 、MPLS 独立向量(Term)=5,光谱的数学处理为:一阶导数、每隔 4 nm 进行平滑运算,光谱的波长范围为 1 108 nm~2 392 nm。

7.3 对未知样品的测定

根据待测样品 NIR 光谱选用对应的定标模型,对样品进行扫描,然后进行待测样品 NIR 光谱与定标样品间的比较。如果待测样品 H 值 ≤ 0.6 ,则仪器将直接给出样品的水分、粗蛋白质、粗纤维、粗脂肪或赖氨酸和蛋氨酸含量;如果待测样品 H 值 > 0.6 ,则说明该样品已超出了该定标模型的分析能力,对于该定标模型,该样品被称为异常样品。

7.3.1 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”异常样品的识别标准有二:一是H值,通常“好”的异常样品H值为 >0.6 或 $H \leq 5$,通常“坏”的异常样品 $H > 5$;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。

7.3.2 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,对定标模型进行升级;属于“坏”异常样品则放弃。

8 分析的允许误差

分析的允许误差见表1。

表 1 %

样品中组分	含量	平行样间相对偏差 小于	测定值与经典方法测定值之间的偏差 小于
水分	>20	5	0.40
	$>10, \leq 20$	7	0.35
	≤ 10	8	0.30
粗蛋白质	>40	2	0.50
	$>25, \leq 40$	3	0.45
	$>10, \leq 25$	4	0.40
	≤ 10	5	0.30
粗脂肪	>10	3	0.35
	≤ 10	5	0.30
粗纤维	>18	2	0.45
	$>10, \leq 18$	3	0.35
	≤ 10	4	0.30
蛋氨酸	≥ 0.5	4	0.10
	<0.5	3	0.08
赖氨酸		6	0.15

附录 A

(规范性附录)

定标的总则和程序

A.1 样品的选择

参与定标的样品应具有代表性,即需含概将来所要分析样品的特性。创建一个新的校正模型,至少需要收集 50 个样品。通常以 70 个~150 个样品为宜。样品过少,将导致定标模型的欠拟合性;样品过多,将导致模型的过拟合性。

A.2 稳定样品组

为了使定标模型具有较好的稳定性,即其预测性性能不受仪器本身波动和样品的温度发生变化的影响,在定标中应加上温度发生变化的样品和仪器发生变化的样品。

A.3 定标样品选择的方法

对定标样品的选择应使用主成分分析法 PCA (principal component analysis) 和聚类分析 (cluster analysis)。根据某样品 NIR 光谱与其他样品光谱的相似性,仅选择其 NIR 光谱有代表性的样品,去除光谱非常接近的样品。

对于 PCA 方法,通常是选用前 12 个目标值 (score value) 用于选择定标样品组。或者从每一 PCA 中选择具有最大和最小目标值的样品 (min/max); 或者将每一 PCA 种的样品分为等同两组,从每一组中选择等同数目的代表性样品参与定标。两种方法中以 min/max 法是最通常采用的方法。

对于聚类分析方法,使用马哈拉诺比斯距离 (或 H 值) 等度量样品光谱间的相似性。通常选择有代表性样品的边界 H 值为 0.6,即如果某样品 NIR 光谱与其他样品的 H 统计值大于或等于 0.6,则将其选择进入定标样品;如果某样品 NIR 光谱与其他样品的 H 统计值小于 0.6,则不将其选择进入定标。

A.4 定标样品真实值的测定

对于定标样品需要知道其水分、粗蛋白质、粗纤维、粗脂肪、赖氨酸和蛋氨酸等含量的“真值”,在实际操作中,通常以 GB/T 6432、GB/T 6433、GB/T 6434、GB 6435、GB/T 15399 和 GB/T 18246 的测定值来代替。

A.5 定标方法

A.5.1 逐步回归 (stepwise multiple linear regression, SMLR)

选择回归变量,产生最优回归方程的一种常用数学方法。它首先通过单波长点的回归校正,误差最小的波长点的光谱读数就为多线性回归模型中的第一独立变量;以此为第一变量,进行二元回归模型比较,误差最小的波长所对应的光谱读数则为第二独立变量;以此类推获得第三……独立变量。但是独立变量的总数量不应超过 $[(N/10)+3]$, N 为定标系中样品数量,否则将产生模型的过适应性。

A.5.2 主成分回归法 (principal components regression, PCR)

如果在回归中应用所有的 100 个 (NIT) 或 700 个 (NIR) 波长点光谱的信息,这样在建立回归模型时,至少需要 101 个或 701 个样品建立 101 个或 701 个线性方程组。主成分分析可用于压缩所需要的样品数量,同时又应用光谱所有的信息。它将高度相关的波长点归为一个独立变量 (factor) 中,进而就以为数不多的独立变量建立回归方程,独立变量内高度相关的波长点可用主成分得分 (score) 将其联系起来。内部的检验 (cross validation, CV) 用于防止过模型现象。

A.5.3 偏最小二乘法回归法(partial least square regression, PLSR)

部分最小偏差回归法是 80 年代末应用到近红外光谱分析上的。该法与 PCR 很相似,仅是在确定独立变量时,不仅考虑光谱的信息(X 变量),还考虑化学分析值(Y 变量)。该法是目前近红外光谱分析上应用最多的回归方法,在制定饲料中水分、粗蛋白质、粗纤维、粗脂肪、赖氨酸和蛋氨酸测定的定标模型时使用此方法。

A.6 定标模型的更新

定标是一个由小样本估计整体的计量过程,因此定标模型预测能力的高低取决于定标样品的代表性。由于预测样品的不确定性,因此,很难一下选择到合适的定标样品。所以,在实际分析工作中,通常用动态定标模型办法来解决这个问题。所谓动态定标模型办法就是在日常分析中边分析边选择异常样品,定期进行定标模型的升级,可概括为以下步骤:

- 定标设计
- 分析测定
- 定标运算
- 实际预测
- 异常数据检查
- 再定标设计
- 再分析测定
- 再定标运算

A.7 对定标模型的检验和选取

检验定标模型的检验,其简单的方法是直接比较一个有代表样品群的预测值(y_i)和真实值(Y_i),以预测误差平方的加权平均值(MSE)来表示; $MSE=E(Y_i-y_i)^2/N$ 。
