

Afdeling Algemene Chemie            1986-11-10

RAPPORT 86.100                      Pr.nr. 505.6050

Onderwerp: Onderzoek naar de mogelijkheden  
              om met NIRS-analyse het gehalte  
              aan eiwit en vocht te bepalen  
              in Nederlandse brouwgerst.

Bijlagen: Grafieken en tabellen.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, directie DLO, directie AT,  
              directie PAGV, Miedema (CADKB), NIBEM (3x), sektor-  
              hoofden, afdeling Algemene Chemie (3x), bibliotheek,  
              projektleider, projektadministratie, Agralin,  
              circulatie.

Project: Ontwikkeling methoden van onderzoek voor voedings- en voeder-  
middelen met behulp van NIRS.

Onderwerp: Onderzoek naar de mogelijkheden om met NIRS-analyse het  
gehalte aan eiwit en vocht te bepalen in Nederlandse brouw-  
gerst.

Bijlagen: Grafieken en tabellen.

---

Doel:

Onderzoek naar de mogelijkheden om met NIRS-analyse het gehalte aan  
eiwit en vocht te bepalen in Nederlandse brouwergerst.

Samenvatting:

Aan de hand van 175 monsters brouwergerst, representatief voor de  
Nederlandse oogstperioden van 1984 en 1985, is nagegaan of met NIRS  
(Nabij Infrarood Reflectie Spectroscopie) het gehalte aan eiwit en  
vocht in gemalen en ongemalen monsters brouwergerst voldoende nauwkeurig  
te bepalen is.

Voor een set van 83 calibratiemonsters, geselecteerd uit de set van  
175 monsters, werden voor genoemde parameters multiple correlatie-  
coëfficiënten berekend tussen de gehalten bepaald met behulp van de  
referentiemethoden en de IA-500 (Infra Alyzer 500) (scannend NIRS  
instrument) van 0,98 met daarbij standaardafwijkingen van de verschil-  
len (SEC) van 0,30% voor eiwit en 0,20% voor vocht.

Aan de hand van verschillende zeeffracties van het gemalen produkt is  
de invloed nagegaan van de deeltjesgrootte op de nauwkeurigheid van de  
meting.

Voor een testset van 53 monsters, geselecteerd uit de overige 92 mon-  
sters, werden standaardafwijkingen van de verschillen (SEP) berekend  
van 0,30% voor eiwit en 0,15% voor vocht. Hierbij werd in drievoud ge-  
meten.

Met dezelfde calibratie- en testset zijn tevens de mogelijkheden nagegaan om met de IA-400 (vast filterinstrument) het eiwit- en vochtgehalte te bepalen. Tenslotte is nagegaan bij welke hoeveelheden monsters aanschaf van NIRS-apparatuur rendabel wordt.

Conclusies:

- Met de IA-500 kunnen de gehalten aan eiwit en vocht in gemalen monsters brouwerst voor routinematig onderzoek voldoende nauwkeurig bepaald worden (SEP voor vocht 0,15% en voor eiwit 0,30%).
- De nauwkeurigheid kan nog enigszins verbeterd worden indien de bepaling in triplo uitgevoerd wordt. Dit komt de betrouwbaarheid ten goede.
- Met de IA-400 zijn vergelijkbare resultaten te verkrijgen als met de IA-500, zij het bij gebruik van meer golflengten (filters) (SEP voor vocht 0,18% en voor eiwit 0,31%).
- Met de IA-500 kunnen de gehalten aan eiwit in ongemalen monsters brouwerst onvoldoende (SEP 0,56%) en de gehalten aan vocht voldoende (SEP 0,24%) nauwkeurig bepaald worden.
- Aanschaf van NIRS (filterapparatuur) wordt rendabel als jaarlijks ca. 1000 monsters brouwerst onderzocht worden.

---

Verantwoordelijk: drs N.G. van der Veen *AA*  
Samenstellers : R. Frankhuizen. H.H.M. van de Worp, A.J. van  
Munsteren, drs N.G. van der Veen  
Projectleider : R. Frankhuizen *FR*

## 1. Inleiding

### 1.1 Algemeen:

Op verzoek van het bedrijfsleven heeft het Ministerie van Landbouw en Visserij, in het kader van lastenverlichting voor het bedrijfsleven in de vorm van een bijdrage in de keuringskosten, toegezegd om gedurende drie jaar (1985 tot 1988) alle kosten te financieren van een certificatenregeling voor brouwerst, tarwe en koolzaad.

Met deze certificatenregeling wordt beoogd de akkerbouwers en de collecterende handel te stimuleren om meer aandacht te besteden aan de kwaliteit van de inlandse granen en koolzaad. Deze regeling zou er mede toe kunnen bijdragen, dat de kwaliteit in de telersprijs tot uitdrukking wordt gebracht.

Naast een aantal uiterlijke kwaliteitsaspecten als raszuiverheid, verontreinigingen, sortering etc. werden tevens enkele chemische aspecten als vocht, eiwit en vet/olie bepaald. Met name het onderzoek van deze chemische aspecten heeft er in 1985 toe bijgedragen, dat de onderzoekresultaten vaak erg laat (tot meer dan 4 weken na de monsternamen) beschikbaar kwamen. Een en ander hing uiteraard samen met het relatief grote monsteraanbod in een vaak erg korte periode en de beschikbare capaciteit bij de betrokken onderzoekinstelling.

Nagegaan wordt in hoeverre onderzoek met Nabij Infrarood Reflectie Spectroscopie (NIRS) voor genoemd probleem een oplossing kan bieden.

### 1.2 NIRS-spectroscopie:

De laatste jaren is de Nabij Infrarood Reflectie Spectroscopie (NIRS) voor de kwantitatieve bepaling van componenten in diverse produkten sterk in belangstelling toegenomen.

Deze techniek heeft zich in enkele jaren een plaats weten te veroveren naast de klassieke (spectroscopische) analysetechnieken. De kracht van NIRS ligt in de snelheid van de methode, waarbij (nagenoeg) geen monstervoorbereiding nodig is. NIRS is daardoor uitermate geschikt als snelle screeningsmethode voor onderzoek van diverse produkten op samenstellende bestanddelen.

Veel onderzoek is uitgevoerd naar de bruikbaarheid van NIRS om de chemische samenstelling te bepalen van o.a granen en soja. Analyses van vocht en eiwit zijn uitgevoerd naast die van vet en vezel. Ook naar de samenstelling van gerst is veel onderzoek uitgevoerd, hetgeen er toe heeft geleid dat op een aantal verwerkingsbedrijven en controleinstellingen NIRS toegepast wordt voor de kwantitatieve bepaling van componenten in gerst (1 t/m 11).

Hoewel auteurs als ook de gebruikers van NIRS enthousiast zijn over het gebruik van NIRS als kwantitatieve analysetechniek verloopt het proces van algemene acceptatie als officiële analysetechniek moeizaam. Pogingen van met name de American Association of Cereal Chemists (AACC) en de Engelse Flour Milling and Baking Research Association (FMBRA) om te komen tot algemeen toepasbare ijklijnen zijn het meest geslaagd. Er doen zich echter verschillende problemen voor die dit proces vertragen, te weten:

- standaardisatie van de monstervoorbereiding,
  - rekentechnieken en apparatuur,
  - overzetbaarheid van ijklijnen,
  - de invloed van verschillen in samenstelling van de produkten veroorzaakt door groeiomstandigheden, plaats van herkomst, etc. waardoor het moeilijk is universeel toepasbare ijklijnen te ontwikkelen.
- Het is daarom dat vele gebruikers er voor kiezen zelf ijklijnen te ontwikkelen om verzekerd te zijn van de gewenste nauwkeurigheid.

Dit onderzoek heeft dan ook, mede in verband met het grote monsteraanbod over een korte periode, ten doel na te gaan wat de mogelijkheden zijn om met NIRS-analyse snel de gehalten aan eiwit en vocht te bepalen bij Nederlandse brouwgerst. Tevens wordt nagegaan bij welke hoeveelheden monsters aanschaf van NIRS apparatuur rendabel wordt.

## 2. Proefopzet

Bij een aantal monsters brouwgerst zal het gehalte aan eiwit en vocht worden bepaald door het Nederlands Instituut voor Brouwgerst, Mout en Bier (NIBEM) met behulp van de voorgeschreven onderzoeksmethoden. Het RIKILT zal het onderzoek uitvoeren aan zowel het oorspronkelijke monstermateriaal als het fijngemalen produkt met behulp van NIRS.

Door het RIKILT zal tevens een vergelijking worden gemaakt tussen de huidige onderzoekmethoden en een eventuele onderzoekmethode met NIRS, waarbij gekeken zal worden naar de nauwkeurigheid, analysetijd, benodigde apparatuur, chemicaliën etc.

### 3. Monstermateriaal en methoden van onderzoek

#### 3.1 Monstermateriaal:

Door het NIBEM zijn 175 monsters Nederlandse brouwergerst geselecteerd op vochtgehalte, eiwitgehalte, ras, teeltwijze en plaats van herkomst. Alle monsters zijn afkomstig van de oogstperiode 1984 en 1985 (bijlage 1 en 2).

Van elk monster is zowel het oorspronkelijke monstermateriaal als het gemalen produkt (fijnheid  $\leq 1$  mm) beschikbaar.

#### 3.2 Methoden van onderzoek:

3.2.1 Vochtbeplating: het gehalte aan vocht is door het NIBEM bepaald met behulp van de droogstoofmethode.

3.2.2 Eiwitbeplating: het gehalte aan eiwit is door het NIBEM bepaald met behulp van de Kjeldahl-methode en berekend in de droge stof.

3.2.3 NIRS-analyse: de NIRS-analyse is door het RIKILT uitgevoerd met behulp van een Technicon Infra Alyzer-500 (IA-500), gekoppeld aan een HP-1000 minicomputer. Dit instrument is een computergestuurde spectrometer, uitgerust met een monochromator. Hiermee zijn spectra opgenomen over een golflengtegebied van 1100-2500 nm, waarbij de reflectie om de 4 nm werd gemeten.

Naar een uitgebreide beschrijving van deze apparatuur en het gebruik in de praktijk wordt verwezen naar het "Operation Manual" van de Technicon Infrarood Alyzer-500 (12).

3.2.4 Calibratieprocedure: 83 van de 175 gemalen monsters zijn bij gebruik van een gesloten monstercup in enkelvoud ingelezen. De gemeten reflectiewaarden, verkregen bij gebruik van 350 golflengten, zijn opgeslagen op een "fixed hard disc" in de  $\log 1/R$  ( $R = \text{reflectie}$ ) vorm. Dezelfde monsters zijn eveneens in hun oorspronkelijke staat (ongemalen) in enkelvoud ingelezen, waarbij in verband met de korrelgrootte een open monstercup werd gebruikt.

Met behulp van een "multiple lineaire regressie" programma ("Step up search" alsook "all combination search") zijn golflengten geselecteerd en calibratiefactoren berekend die in combinatie de hoogste multiple correlatiecoëfficiënt ( $R$ ) en de laagste standaardafwijking van de verschillen gaven ( $\text{SEC} = \text{standard error of calibration}$ ) tussen de NIR-waarden en de chemisch bepaalde vocht- en eiwitgehalten (13,14,15,16). Tevens is nagegaan of met 1e of 2e afgeleide spectra betere resultaten verkregen kunnen worden.

De keuze van de golflengten alsook het aantal is mede bepaald aan de hand van specifieke absorptiepieken van water en eiwit in de spectra en de informatie uit het golflengte-correlatie diagram, terwijl de uiteindelijke keuze is bepaald door met verschillende ijklijnen de gehalten van een testserie te voorspellen. Hierbij is ervan uitgegaan dat de ijklijn die deze gehalten het best voorspelt, in de praktijk de gehalten in onbekende monsters ook het best zal voorspellen.

3.2.5 Testprocedure: circa 10 afzonderlijke ijklijnen zijn getest met 53 monsters, geselecteerd uit de overige 92 monsters van de monsterset. Zowel het gemalen produkt als het oorspronkelijke produkt zijn hiervoor in drievoud ingelezen in een gesloten respectievelijk open monstercup.

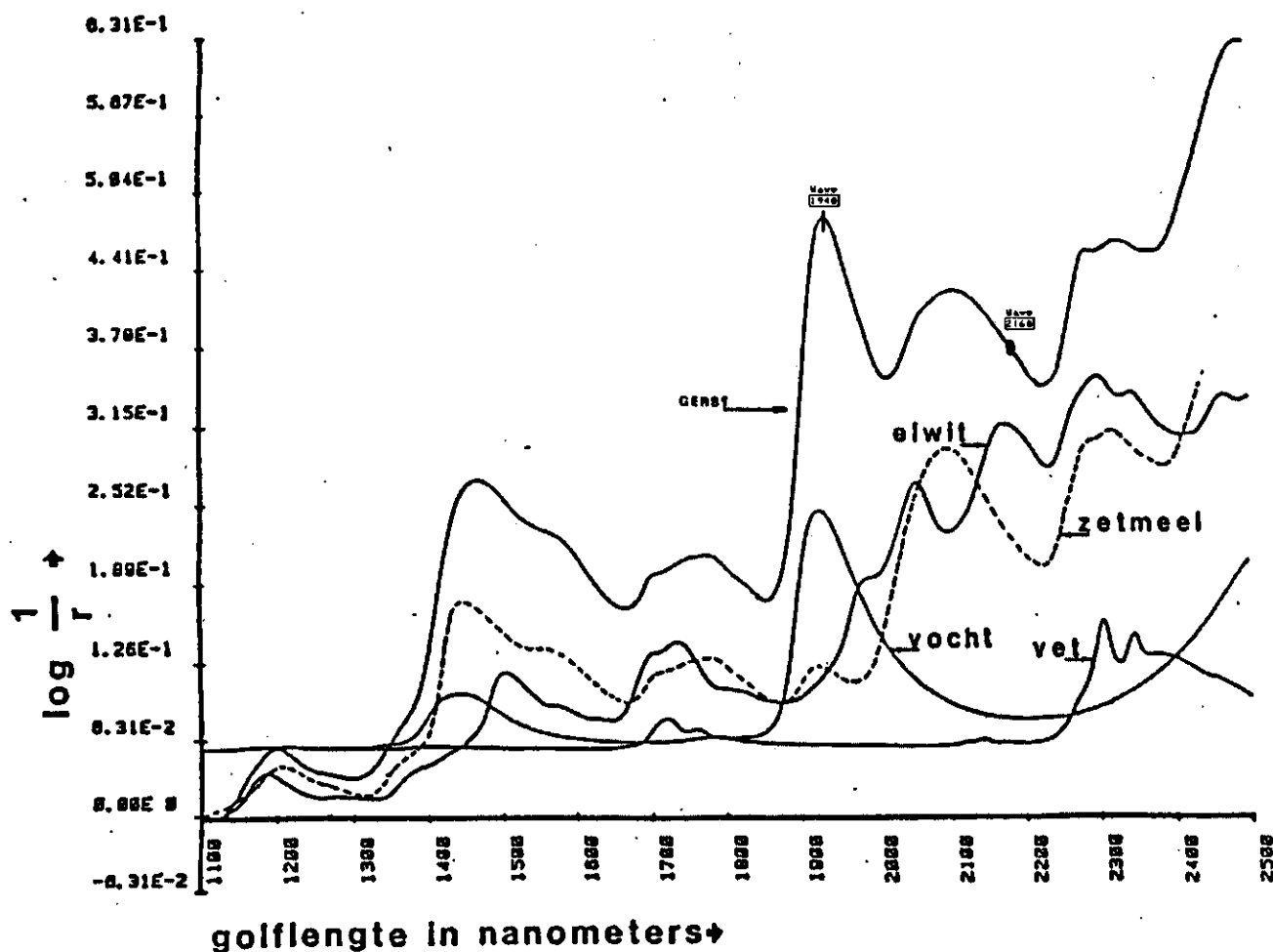
Tussen de chemisch bepaalde vocht- en eiwitgehalten en de vocht- en eiwitgehalten voorspeld met de verschillende ijklijnen, uitgaande van de gemiddelde reflectiewaarden van drie metingen, zijn de standaardafwijkingen van de verschillen berekend ( $\text{SEP} = \text{standard error of prediction}$ ).

De beste resultaten van deze testprocedure zijn weergegeven in de tabellen 1 t/m 3.

#### 4. Resultaten

Hoewel de plaats van specifieke absorptie van componenten als water en eiwit in het NIR-spectrum van gerst globaal vastligt (figuur 1) blijft het moeilijk de exacte plaats te berekenen. Zowel verticale verschuivingen in het spectrum veroorzaakt o.a. door variatie in deeltjes-grootte als horizontale verschuivingen veroorzaakt door wederzijdse beïnvloeding van componenten van het monster en overlapping van absorptiegebieden geven de techniek een empirisch karakter. Om die reden kan dan ook niet volstaan worden met een enkele meting bij in de literatuur aangegeven specifieke absorptiegolflengten. Een groot aantal berekeningen moet uitwijzen welke golflengte in het te onderzoeken produkt onder de gekozen omstandigheden de meest specifieke is en welke combinatie van golflengten de gehalten in de monsters het best voorspelt.

Figuur 1: Nabij Infrarood Spectra van gerst en van de samenstellende componenten eiwit, zetmeel, vocht en vet met daarin weergegeven de geselecteerde component-specifieke golflengte voor de bepaling van vocht (l) en eiwit (o) m.b.v. de IA-500.





4.1 Resultaten voor de bepaling van het vocht- en eiwitgehalte van monsters gemalen brouwerst met behulp van de Infra Alyzer-500 (IA-500).

Bij de calibratie werd voor vocht, bij gebruik van 83 monsters, een multiple correlatiecoëfficiënt berekend van 0,984 tussen de vochtgehalten bepaald met de referentiemethode en de vochtgehalten voorspeld met de IA-500, met daarbij een standaardafwijking van de verschillen van 0,21%. Voor de testset, bestaande uit 53 monsters, werden geen significante verschillen gevonden ten opzichte van de vochtgehalten, bepaald met de referentiemethode. De standaardafwijking van de verschillen voor de testset (SEP) was zelfs lager dan die van de calibratiemonsters n.l. 0,15% (tabel 1).

De vochtgehalten in de monsters van de calibratieset varieerden van 10,4-16,1%.

Bij de calibratie werd voor het eiwitgehalte in de droge stof een multiple correlatiecoëfficiënt berekend tussen de eiwitgehalten bepaald met de referentiemethode en de eiwitgehalten voorspeld met de IA-500 van 0,980 met daarbij een standaardafwijking van de verschillen van 0,30%. Voor de testmonsters verder geen significante verschillen gevonden ten opzichte van de eiwitgehalten, bepaald met de referentiemethode (standaardafwijking van de verschillen bedraagt eveneens 0,30%). De eiwitgehalten in de droge stof van de monsters van de calibratieset varieerden van 8,3 tot 13,9%.

Tabel 1: NIR-parameters (IA-500) voor vocht en eiwit in calibratie- en testmonsters gemalen brouwerst.

Rekenmethode	Aantal golf- lengten	Component	Calibratie- monsters			Test- monsters	
			N	R	SEC	N	SEP
Step up	3	vocht	83	0,985	0,21%	53	0,15%
Step up	4	eiwit in droge stof	83	0,980	0,30%	53	0,30%

4.2 Resultaten voor de bepaling van het vocht- en eiwitgehalte van monsters brouwerst bepaald in de hele korrel met behulp van de IA-500.

Voor vocht en eiwit in het oorspronkelijke produkt werden multiple correlatiecoëfficiënten berekend van 0,940 respectievelijk 0,917 tussen de gehalten bepaald met behulp van de referentiemethoden en de IA-500 met daarbij standaardafwijkingen van de verschillen van 0,25% voor vocht en 0,61% voor eiwit (tabel 2).

Tabel 2: NIR-parameters (IA-500) voor vocht en eiwit in calibratie- en testmonsters brouwerst (hele korrels).

Rekenmethode	Aantal golflengten	Component	Calibratiemonsters			Testmonsters	
			N	R	SEC	N	SEP
All combination	4	vocht	83	0,940	0,25%	53	0,24%
All combination	4	eiwit	83	0,917	0,61%	53	0,56%

Voor de testmonsters werden standaardafwijkingen van de verschillen berekend die vergelijkbaar zijn met die van de calibratiemonsters n.l. 0,24% voor vocht en 0,56% voor eiwit.

4.3 Resultaten voor de bepaling van het vocht- en eiwitgehalte van monsters gemalen brouwerst met behulp van de IA-400.

Met behulp van een filtersimulatieprogramma zijn de ruwe data verkregen met de IA-500, eerst rekentechnisch omgezet in data die ingevoerd kunnen worden in de IA-400. Daarna is met het "all combination" programma gerekend met die golflengten die corresponderen met de filters aanwezig in een standaard Infra Alyzer-400.

Voor vocht werd een multiple correlatiecoëfficiënt berekend tussen het vochtgehalte bepaald met behulp van de referentiemethode en het vochtgehalte voorspeld met de IA-400 van 0,986 met daarbij een standaardafwijking van de verschillen van 0,20%. 4 golflengten (filters) waren nodig, waarvoor die van water (1940 nm) de meest significante informatie levert ( $t$  (student test) = 50). Voor eiwit werd met 5 golflengten een multiple correlatiecoëfficiënt berekend van 0,975 met daarbij een standaardafwijking van de verschillen van 0,33% (tabel 3).

De golflengten van 2100 nm voor zetmeel en 2190 nm voor eiwit gaven de meest significante informatie.

Voor de testmonsters werden standaardafwijkingen van de verschillen berekend die vergelijkbaar zijn met die van de calibratiemonsters n.l. 0,18% voor vocht en 0,31% voor eiwit.

Tabel 3: NIR-parameters (IA-400) voor vocht en eiwit in calibratie- en testmonsters gemalen brouwergerst.

Rekenmethode	Aantal golf- lengten	Component	Calibratie- monsters			Test- monsters	
			N	R	SEC	N	SEP
All combination	4	vocht	83	0,986	0,20%	53	0,18%
All combination	5	eiwit	83	0,975	0,33%	53	0,31%

### 5. Herhaalbaarheid

Van een over een 1 mm zeef gemalen willekeurig monster brouwergerst is de herhaalbaarheid van de NIRS-meting bepaald door elk monster in tienvoud in te lezen, waarbij de monstercup telkens opnieuw werd gevuld en afgedicht met een venster.

Afhankelijk van de structuur van het monster (deeltjesgrootte enz.) zal het monsteroppervlak in de monstercup een variatie vertonen. Dit heeft tot gevolg dat de gemeten reflectiewaarden zullen variëren en bijgevolg ook de met NIRS bepaalde gehalten of andere parameters. Er treedt een zogenaamde "repack error"  $S_{\text{repack}}$  op ( $S$  = standaarddeviatie). In deze fout is ook de oriëntatie van de monstercup begrepen.

Het NIRS-instrument wordt gecalibreerd aan de hand van op het laboratorium met referentiemethoden bepaalde gehalten of andere parameters. Daardoor bevat de calibratie een zogenaamde laboratoriumreferentiefout  $S_{\text{lab}}$ . Zo zijn er meerdere foutenbronnen, zoals elektronische ruis en drift ( $S_{\text{instrument}}$ ) en bemonsteringsfout  $S_{\text{sample}}$ .

Bij gebruik van multiple lineaire regressie in NIRS geldt dat de totale variantie  $V$  (met  $V = \text{SEC}^2$ , waarin SEC = standaarddeviatie voor de calibratie of "Standard Error of Calibration") gelijk is aan de som van de afzonderlijke varianties  $V_i$  (Met  $V_i = S_i^2$ ) (17).

Er geldt nu:

$$\text{SEC}^2 = S_{\text{repack}}^2 + S_{\text{lab}}^2 + S_{\text{instrument}}^2 + S_{\text{sample}}^2 \quad (\text{vgl. 1}).$$

De repack error wordt bepaald zoals boven is aangegeven. De overige varianties mogen constant worden verondersteld en kunnen gesommeerd worden tot een variantie  $S^2_{\text{all others}}$ . Dit levert:

$$SEC^2 = S^2_{\text{repack}} + S^2_{\text{all others}} \quad (\text{vgl. 2})$$

Voor eiwit werd een SEC berekend van 0,30% (tabel 1) en voor de repack error  $S_{\text{repack}}$  werd ca. 0,11% gevonden (tabel 4, 1e kolom). Invullen in vgl. 2 levert  $S_{\text{all others}} = 0,28\%$ .

Hieruit volgt dat de repack error bij de bepaling van eiwit klein is ten opzichte van de overige fouten.

Voor vocht werd een  $SEC = 0,21\%$  gevonden (tabel 1) en een repack error  $S_{\text{repack}} = 0,062\%$  (tabel 5). Hieruit volgt dat  $S_{\text{all others}} = 0,20\%$ . Ook hier is de repack error klein ten opzichte van de overige fouten.

Indien de bijdrage van de repack error groot zou zijn, dan kan deze fout verkleind worden door het monster meerdere malen in te lezen op het NIRS-instrument.

Bij  $m$  maal inlezen geldt (17):

$$SEC^2 = \frac{S^2_{\text{repack}}}{m} + S^2_{\text{all others}} \quad (\text{vgl. 3})$$

Bij het bovenstaande is aangenomen dat monsters gemalen brouwerst homogeen zijn. In de praktijk bleek echter dat de monsters uitzakken en dat er vezels aanwezig waren die de zeef met maaswijdte van 1 mm gepasseerd waren. Om enig inzicht te verkrijgen in de invloed hiervan op de repack error, zijn de monsters in enkele zeeffracties opgesplitst. De resultaten hiervan zijn vermeld in tabel 4 voor eiwit en tabel 5 voor vocht. In kolom 2 van tabel 4 en 5 zijn de (al eerder genoemde) resultaten vermeld van een op het NIBEM standaard gemalen monster brouwerst, in kolom 3 t/m 5 de resultaten van enige zeeffracties verkregen uit het NIBEM-monster, terwijl in kolom 6 de resultaten vermeld zijn van hetzelfde monster, nu echter gemalen met behulp van een Pep-pink kruisslagmolen met 1 mm zeef.

Uit de tabellen blijkt dat er een invloed van de spreiding in de deeltjesgrootte op de repack error is. Met name is de repack error voor eiwit van de zeeffractie > 1 mm (veel vezels aanwezig) groot (0,92%). Dit wordt veroorzaakt door de relatief grote verschillen in deeltjesgrootte binnen deze fractie, alsook de verschillen in samenstelling van deze deeltjes die, gelet op de vezelstructuur, hoofdzakelijk afkomstig zijn van de buitenkant (zemel) van de korrel.

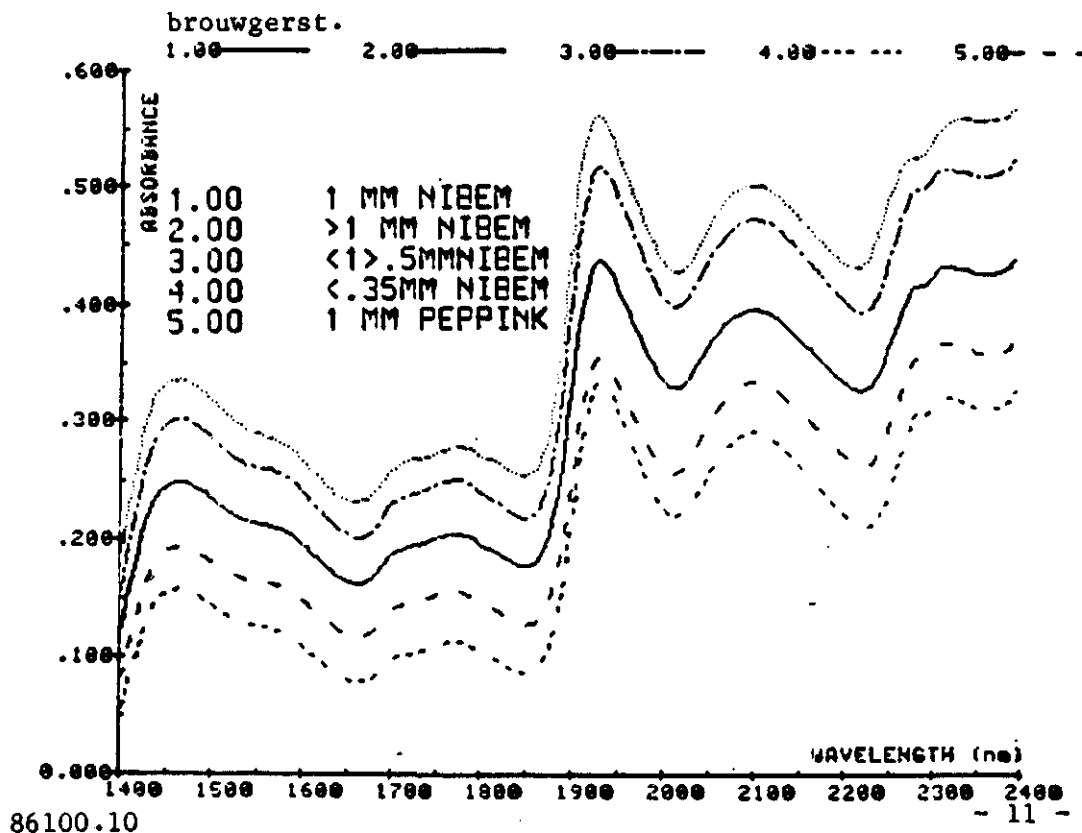
Dat de repack error voor de 0,5-1 mm fractie (4e kolom) zowel voor eiwit als vocht groter is dan die voor de 1 mm fractie (2e kolom) zal, ondanks het feit dat de 0,5-1 mm fractie homogener van samenstelling is dan de 1 mm fractie, verband houden met het feit dat de gemiddelde deeltjesgrootte in de 0,5-1 mm fractie groter is dan die in de 1 mm fractie.

Zowel in het met de kruisslagmolen gemalen monster als in het NIBEM monster (beide 1 mm zeef) kwamen deeltjes > 1 mm voor (ca. 15% van het monster).

De berekende standaardafwijkingen voor beide maalsels zijn vergelijkbaar met elkaar (tabel 4 en 5, kolom 2 en 6).

De invloed van de deeltjesgrootte op de absorptie is erg groot. In figuur 2 zijn de spectra afgebeeld voor de zeeffracties zoals vermeld in tabel 4. Echter door relatieve reflectiemetingen uit te voeren wordt voor de verschillen grotendeels gecorrigeerd.

Figuur 2: NIRS spectra van verschillende zeeffracties van gemalen brouwgerst.



Tabel 4: Statistische gegevens betreffende de herhaalbaarheid van een eiwitbepaling in tienvoud met behulp van NIRS bepaald in verschillende zeeffracties gemalen brouwergerst.

Zeeffractie	1 mm NIBEM	> 1 mm	0,5 -1 mm	< 0,35 mm	1 mm Peppink
gem. % eiwit	11.5668	11.8896	11.9537	10.7995	11.5246
S	0.1082	0.9223	0.2387	0.1326	0.1364
herh.abs.	0.3061	2.6102	0.6756	0.3754	0.3861
herh.rel.	2.6464	21.9535	5.6514	3.4757	3.3506

Tabel 5: Statistische gegevens betreffende de herhaalbaarheid van een vochtbepaling in tienvoud met behulp van NIRS bepaald in verschillende zeeffracties gemalen brouwergerst.

Zeeffractie	1 mm NIBEM	> 1 mm	0,5 -1 mm	< 0,35 mm	1 mm Peppink
gem. % vocht	12.3010	12.4241	12.1205	12.3905	12.2819
S	0.0619	0.1144	0.1137	0.0521	0.0627
herh.abs.	0.1752	0.3237	0.3218	0.1474	0.1774
herh.rel.	1.2979	2.6055	2.6552	1.1895	1.6713

De herhaalbaarheid werd ook voor hele korrels brouwergerst bepaald.

Hierbij werd gebruik gemaakt van calibraties die gelden voor de hele korrels.

Voor eiwit werd een relatieve herhaalbaarheid van 12,8% gevonden bij een gemiddeld gehalte van 11,83%. Voor vocht waren de resultaten beter. Bij een gemiddeld vochtgehalte van 11.35% werd een relatieve herhaalbaarheid van 3,3% gevonden.

De SEC-waarde voor eiwit bedraagt 0,61%. De repack error bedraagt 0,535%. Hieruit volgt dat  $S_{all\ others} = 0,29\%$ . Deze waarde is vergelijkbaar met de al eerder opgegeven  $S_{all\ others}$  voor de gemalen produkten.

Geconcludeerd kan worden dat met name voor eiwit de nauwkeurigheid van metingen aan hele korrels beduidend slechter is dan die van metingen aan het gemalen produkt.

De nauwkeurigheid wordt beter bij meten in drievoud. Volgens vlg. 3 wordt dan een SEC-waarde van 0,42% gevonden voor de hele korrels.

Daarnaast zal ook de betrouwbaarheid van de metingen toenemen.

## 6. Discussie

De berekende standaardafwijkingen van de verschillen tussen de gehalten voor vocht en eiwit bepaald met de IA-500 respectievelijk de IA-400 en de laboratoriumreferentiemethoden zijn alleszins acceptabel. Deze standaardafwijking wordt aangeduid met SEP (Standard Error of Prediction). Deze SEP is uit een aantal fouten opgebouwd, met name de fout in de laboratoriumreferentiemethode  $S_{lab}$ .

Zowel het aantal golflengten (tabel 1) als de grootte van de regressiecoëfficiënten zijn klein, hetgeen duidt op een goede calibratie.

In figuur 3 en 4 zijn de correlatiediagrammen weergegeven voor respectievelijk vocht en eiwit van de calibratieset. Hierin is voor elke golflengte de enkelvoudige correlatie tussen log  $l/R$ -waarde en laboratoriumreferentiewaarde uitgezet voor het gehele golflengtegebied.

Duidelijk is te zien dat deze correlatie over het gehele golflengtegebied laag is. Dit wordt onder andere veroorzaakt door verschillen in absorptieniveaus ten gevolge van variatie in o.a. deeltjesgrootte.

Naast de enkelvoudige correlatie is in fig. 3 en 4 ook de meervoudige correlatie weergegeven en wel die van de uiteindelijke calibratie (tabel 1). Omdat voor een meervoudige correlatieberekening de log  $l/R$  waarde bij meerdere golflengten gemeten wordt, kan er nu enerzijds gecorrigeerd worden voor de verschillen in absorptieniveaus ten gevolge van variatie in deeltjesgrootte en anderzijds voor de invloed in absorptie veroorzaakt door overlapping van de verschillende componenten in het NIRS-spectrum.

De keuze van de meest significante golflengten (figuur 1) is zowel voor vocht als voor eiwit specifiek (fig. 3 en 4, meervoudige correlatie), hetgeen een zekere onderbouwing van de techniek geeft. De keuze van de overige golflengten is grotendeels, empirisch en zal als regel één of meerdere referentiegolflengten bevatten en één of meerdere golflengten die corrigeren voor de effecten veroorzaakt door overlapping van de verschillende componenten in het NIRS-spectrum (tabel 6 en 7).

Tabel 6: Golfengtekeuze met specifieke respons voor de bepaling van vocht en eiwit in gemalen brouwergerst met behulp van de IA-500.

$\lambda$ nm vocht	t-test	Specifieke respons	$\lambda$ nm eiwit	t-test	Specifieke respons
1940	28	vocht	2168	31	eiwit
1996	12	referentie	1232	-14	vocht
2178	-4	eiwit	1168	14	referentie
			2140	-28	eiwit/ zetmeel

Tabel 7: Golfengtekeuze met specifieke respons voor de bepaling van vocht en eiwit in gemalen brouwergerst met behulp van de IA-400.

$\lambda$ nm vocht	t-test	Specifieke respons	$\lambda$ nm eiwit	t-test	Specifieke respons
1680	-7	referentie	1445	14	vocht
1778	8	zetmeel/ cell.vezel	1680	4	referentie
1940	50	vocht	1818	-7	cellulose
2139	-16	eiwit/ zetmeel	2100	-27	zetmeel
			2190	30	eiwit

De grootte van de t-test geeft de relatieve belangrijkheid aan van de bijdrage van de geselecteerde golflengte aan het met NIRS verkregen resultaat.

In figuur 5 t/m 16 zijn enkele statistische grootheden weergegeven. In figuur 5 is het verband weergegeven tussen de vochtgehalten voorspeld met de IA-500 en bepaald met de laboratoriumreferentiemethode voor de calibratieset. Figuur 6 geeft de frequentieverdeling van de vochtgehalten van de calibratieset en figuur 7 de frequentieverdeling van de verschillen tussen de vochtgehalten voorspeld met de IA-500 en bepaald met de laboratoriumreferentiemethode.

In figuur 8 t/m 10 zijn dezelfde statistische grootheden weergegeven voor vocht van de testset, in figuur 11 t/m 13 voor eiwit van de calibratieset en in figuur 14 t/m 16 voor eiwit van de testset. De opbouw van de calibratiesets en testsets zijn nog niet geheel ideaal (figuur 6, 9, 12 en 15); met name geldt dit voor vocht van de calibratieset (gewenst is dat alle gehalten even vaak voorkomen). Uit figuur 7, 10, 13 en 16 volgt dat de verschillen tussen de gehalten voorspeld met de IA-500 en bepaald met de referentiemethoden bij benadering een normale verdeling volgen, hetgeen een voorwaarde is voor het lineair zijn van de calibratiecurven.



Bij de calibratie van de IA-500 met hele korrels brouwgerst zijn meer golflengten (tabel 2) nodig dan bij de calibratie met het gemalen produkt (tabel 1). De regressiecoëfficiënten van de calibratiecurven voor de hele korrels zijn ongewenst groot. De correlatiecoëfficiënten R en de SEP-waarden zijn slechter dan die voor het gemalen produkt. Dit geldt in het bijzonder voor de bepaling van eiwit. De SEP-waarde van 0,56% is dusdanig groot dat de bepaling van eiwit in de hele korrel met behulp van NIRS geen nauwkeurige resultaten oplevert. Dit kan veroorzaakt worden door het feit dat het eiwitgehalte per korrel enigszins kan verschillen terwijl dit ook niet homogeen verdeeld is over de hele korrel. Daar de lichtintensiteit dermate zwak is dat NIR-straling slechts ca. 1 à 1,5 mm in de korrel kan doordringen, betekent dit dat de meting niet representatief zal zijn voor de gehele korrel, en dus ook niet voor het gehele monster. Dit wordt nog eens versterkt doordat, ten gevolge van de beperkte inhoud van de monstercup, slechts enkele korrels gescand worden.

Niveaueverschillen in absorptie en variatie in de standaardafwijkingen van de verschillende zeeffracties, veroorzaakt door het verschil in deeltjesgrootte (figuur 2) tonen aan dat het zinvol is metingen aan onbekende monsters in meervoud aan het gemalen produkt uit te voeren. Berekeningen met behulp van 1e en 2e afgeleide spectra geven geen verbetering te zien ten opzichte van de berekeningen aan de "ruwe data" (log 1/R-waarden). Voor vocht waren de resultaten zelfs slechter. In verband met de wenselijkheid van het overzetten van ijklijnen van de IA-500 naar de IA-400 (vaste filter) apparatuur en het ontbreken van de mogelijkheid van werken met afgeleide grootheden op de laatst genoemde apparatuur, is van verdere uitwerking van deze mogelijkheden afgezien.

7. Vergelijking tussen huidige onderzoekmethode en onderzoek met NIRS  
Eén van de redenen van het succes van NIRS is de combinatie van nauwelijks of geen monstervoorbewerking met de snelheid van analyse. Het RIKILT heeft inmiddels ruim 5 jaar ervaring met de NIRS-techniek. Aan de hand van praktijkgegevens over deze periode (18) kan berekend worden dat aanschaf van NIRS-apparatuur (uitgerust met filters) rendabel wordt indien tenminste 1000 monsters brouwgerst jaarlijks onderzocht worden op eiwit.

Hierbij is de "winst" ontstaan door reductie van chemicaliëngebruik, aanschaf en reiniging van glaswerk en afvoer van afvalstoffen niet verwerkt. Eveneens is niet verwerkt het feit dat simultaan meerdere parameters bepaald kunnen worden (vocht maar bijv. ook zetmeel). Uiteraard kunnen met behulp van hetzelfde instrument meerdere produkten op samenstelling geanalyseerd worden, waardoor het rendement evenredig toeneemt.

#### 8. Conclusies

- Met de Infra Alyzer-500 kunnen de gehalten aan eiwit en vocht in gemalen monsters brouwgerst voor routinematig onderzoek voldoende nauwkeurig bepaald worden (SEP voor vocht 0,15% en voor eiwit 0,30%).
- De nauwkeurigheid kan nog enigszins verbeterd worden indien de bepaling in triplo uitgevoerd wordt. Dit komt de betrouwbaarheid ten goede.
- Met de Infra Alyzer-400 zijn vergelijkbare resultaten te verkrijgen als met de Infra Alyzer-500, zij het bij gebruik van meer golflengten (filters) (SEP voor vocht 0,18% en voor eiwit 0,31%).
- Met de Infra Alyzer-500 kunnen de gehalten aan eiwit in ongemalen monsters brouwgerst onvoldoende (SEP 0,56%) en de gehalten aan vocht voldoende (0,24%) nauwkeurig bepaald worden.
- Aanschaf van NIRS (filterapparatuur) wordt rendabel als jaarlijks ca. 1000 monsters brouwgerst onderzocht worden.

Literatuur

1. M.J. Allison, I.A. Cowe and R. McHale  
The use of infrared reflectance for the rapid estimation of the soluble  $\beta$ -glucan content of barley.  
J. Inst. Brew., 1978, 84 (3), 153-155.
2. A. de Groen  
Rapid determination of protein, water and  $\beta$ -glucan in barley and malt.  
Mschr. Brau., 1980, 33 (4), 131-135 (in German).
3. A.A. Gill, C. Starr and D.B. Smith  
Lysine and nitrogen measurement by infra-red reflectance analysis as an aid to barley breeding.  
J. Agric. Sci. Camb., 1979, 93, 727-733.
4. C. Starr, A.G. Morgan and D.B. Smith  
An evaluation of near infra-red reflectance analysis in some plant breeding programmes.  
J. Agric. Sci. Camb., 1981, 97, 107-118.
5. S.A. Jensen  
Analytical application of NIR to determine moisture and protein in barley.  
Autoanalyst, 1982, June, 2-4.
6. T.P. Hodge, A.G. Morgan and D.B. Smith  
Rapid identification of potential malting quality.  
HGCA Prog. Rep. 1979/80, 34-38.
7. C.F. McGuire  
Near-infrared reflectance estimates of malt extract.  
Cereal Chem., 1982, 59 (6), 510-511.
8. A.G. Morgan and P.G. Gothard  
Rapid prediction of malt hot water extract by near infrared reflectance spectroscopy studies on barley.  
J. Inst. Brew., 1979, 85 (6), 339-341.
9. D.A. Baker  
Report of the technical sub-committee on barley analysis.  
J. Am. Soc. Brew. Chem., 1980, 38, 94-96.
10. Y. Pomeranz, R.B. Moore and F.A. Lai  
Reliability of five methods for protein determination in barley and malt.  
J. Am. Soc. Brew. Chem., 1977, 35, 86-93.
11. W. Schmütz and Q.N. Do  
Further improvements in the rapid protein determination in barley with infrared reflection spectroscopy.  
Mühle Mischfuttertechnik, 1982, 119 (19), 258-261 (in German).

12. Operation Manual Technicon Infra Alyzer-500. Publication no. TA-8-2512-00.
13. H.W. Vedder and J.H. Wolsink  
Monster(voor)behandeling bij Nabij Infrarood Reflectie-analyse.  
Intern analysevoorschrift IVVO, Lelystad, Mei 1984.
14. E. Stark  
Condensed definitions combination search printout.  
Technicon Infra Alyzer-500 users' club, November 16th, 1983, USA.
15. R. Frankhuizen and N.G. van der Veen  
Determination of major and minor constituents in milk powders and cheese by near infra-red reflectance spectroscopy.  
Neth. Milk Dairy J. 39, (1985), 191-207.
16. R. Frankhuizen, E.A.M. Boers and N.G. van der Veen  
NIRA, een betrouwbare routine methode voor de vochtbepaling in magere melkpoeder.  
RIKILT rapport 84.20.
17. H. Mark and J. Workman  
Effect of repack on calibrations produced for Near Infrared Reflectance Analysis.  
Anal. Chem., 1986, 58, 1454-1459.
18. R. Frankhuizen  
Voordracht op het NIRS-symposium 15 april 1986 te Scheveningen.  
RIKILT rapport 86.68. Bijlage 2. De mogelijkheden van NIR-spectroscopie voor onderzoek van voedings- en voedermiddelen.

I -  $\leq 8,9$  %

	e %	v %
Z 20	8,3	13,7
537	8,3	14,1
584	8,3	13,7
589	8,3	14,4
570	8,4	14,2
575	8,4	14,1
26	8,5	13,5
571	8,5	14,5
577	8,5	14,3
14	8,6	13,8
572	8,6	14,5
581	8,7	14,1
339	8,8	13,5
574	8,8	14,6
579	8,8	14,2
30	8,9	13,6
32	8,9	13,6
583	8,9	13,8

II - 9,0-9,4 %

	e %	v %
Z 10	9,0	13,9
18	9,0	13,8
28	9,0	13,4
24	9,2	13,7
341	9,2	13,8
586	9,2	13,6
8	9,3	13,7
12	9,3	13,8
337	9,3	13,5

III - 9,5-9,9 %

	e %	v %
Z 16	9,5	13,5
569	9,5	14,6
576	9,5	14,5
179	9,6	13,8
340	9,6	13,9
580	9,6	13,8
582	9,6	13,6
178	9,7	13,5
347	9,7	13,6
588	9,7	14,2
345	9,8	12,3
585	9,8	13,7
Y 854	9,8	13,3
Z 344	9,9	13,4

IV - 10,0-10,4 %

	e %	v %
Z 192	10,0	16,6
338	10,0	13,5
578	10,0	13,8
587	10,0	13,8
342	10,1	13,6
180	10,2	13,6
189	10,2	13,6
343	10,2	13,5
191	10,3	14,8
334	10,3	13,8
336	10,3	13,8
188	10,4	13,8
346	10,4	12,4
Y 878	10,4	13,0

V - 10,5-10,9 %

	e %	v %
Z 190	10,6	13,9
Y 877	10,6	13,1
Z 229	10,8	13,7
Y 872	10,8	13,1
846	10,9	13,1
857	10,9	13,2

VI - 11,0-11,4 %

	e %	v %
Z 68	11,0	12,9
72	11,0	12,8
Y 828	11,0	16,3
Z 226	11,1	13,4
227	11,1	13,6
332	11,1	13,5
Y 842	11,1	12,5
860	11,1	12,8
Z 74	11,2	12,7
64	11,3	12,1
Y 850	11,3	13,7
856	11,3	12,8
861	11,3	13,0

VII - 11,5-11,9 %

	e %	v %
Y 830	11,5	13,2
Z 187	11,5	13,1
Y 832	11,6	13,0
Z 56	11,7	13,1
185	11,7	13,9
224	11,7	12,6
228	11,7	13,4
244	11,7	13,6
333	11,7	13,9
54	11,8	12,9
233	11,8	13,5
58	11,9	13,0
66	11,9	12,0
70	11,9	13,8
230	11,9	13,9
247	11,9	12,5
Y 844	11,9	13,1

VIII - 12,0-12,4 %

	e %	v %
Z 225	12,0	13,8
Y 853	12,0	13,3
Z 231	12,1	13,5
Y 865	12,1	13,1
867	12,1	13,3
Z 62	12,2	13,1
223	12,2	13,6
248	12,2	12,8
Y 875	12,2	13,1
Z 182	12,3	13,7
232	12,3	13,7
Y 847	12,3	13,2
Z 183	12,4	13,6
245	12,4	12,8
Y 879	12,4	13,2

IX - 12,5-12,9 %

	e %	v %
Z 246	12,5	12,5
Y 870	12,5	13,3
Z 186	12,6	13,8
Y 852	12,6	12,9
Z 249	12,7	13,0
Y 851	12,7	13,3
858	12,7	12,6
Z 243	12,8	12,8
Y 855	12,8	13,1
876	12,8	12,8
Z 251	12,9	12,8

X -  $\geq 13,0$  %

	e %	v %
Z 60	13,3	13,2

serie monsters voor NIR-analyse eiwit/vocht.

nummer	eiwitgehalte	vochtgehalte	nummer	eiwitgehalte	vochtgehalte
8	11.4	13.7	625	11.1	13.8
0	12.2	13.6	664	11.9	14.5
2	13.2	13.7	673	10.8	14.9
7	10.6	13.9	676	11.4	15.1
			680	12.4	14.6
			689	10.8	14.9
2	10.2	12.3	696	10.1	14.6
			837	11.1	10.7
2	12.3	14.4	850	11.1	11.3
5	10.5	13.8	858	11.6	11.6
5	11.1	14.6			
7	12.0	14.8	578	10.3	13.4
4	13.7	12.0	633	12.3	14.7
4	10.5	13.4	677	11.7	14.7
8	10.3	11.0	678	10.3	14.9
8	13.2	11.3	681	11.9	15.4
4	9.6	10.4	686	10.9	15.0
9	9.9	10.5			
			807	12.9	14.4
0	10.1	13.9			
9	11.7	14.9	609	13.4	13.9
0	11.3	18.1	624	11.9	16.0
3	13.9	14.5	628	11.6	14.4
1	9.9	14.0	631	13.3	15.1
1	12.8	14.0	685	11.0	15.0
7	11.4	13.9	693	10.7	14.0
5	12.0	12.6	902	11.3	11.8
8	10.5	13.7			
9	10.4	12.7	592	8.9	13.4
5	10.8	12.9	636	12.9	16.1
3	10.2	12.9			
1	11.1	11.2			
7	12.3	10.8			
3	10.1	11.1			

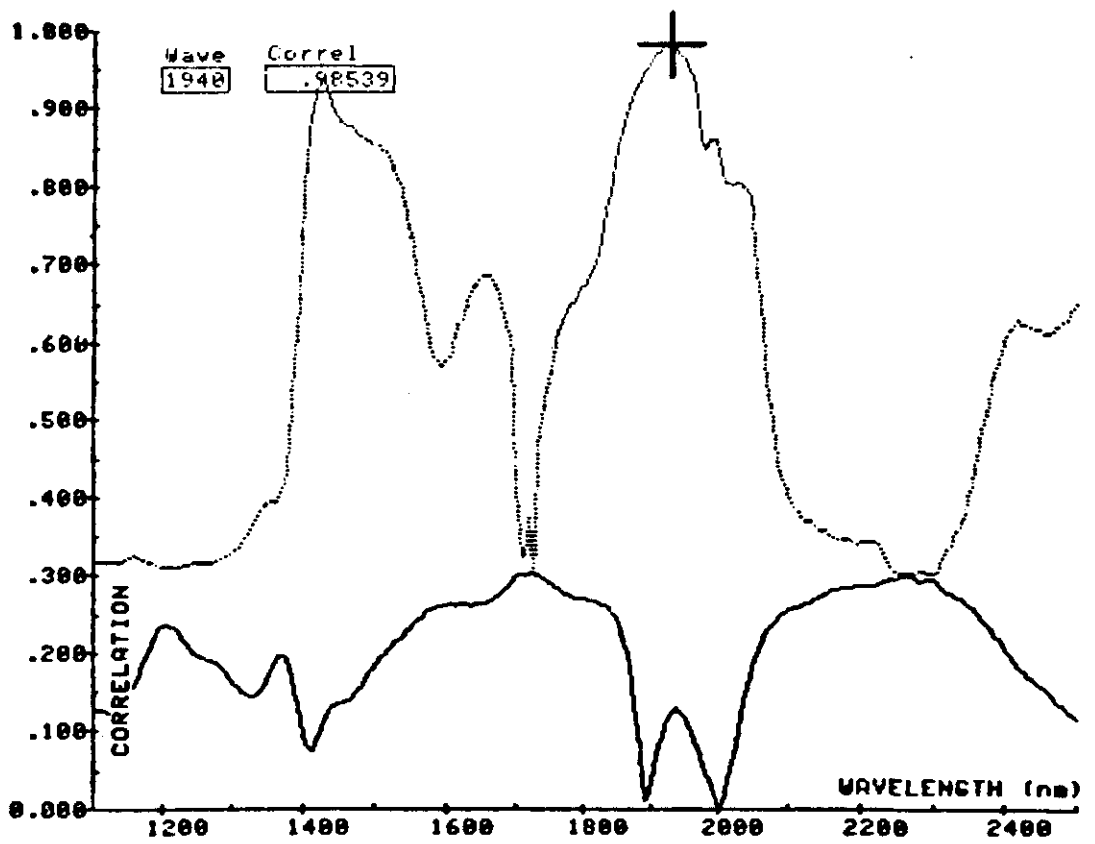


Fig. 3: Correlatie tussen het vochtgehalte in brouwerst en de absorbtie bij 350 golflengten  
 ----- Enkelvoudige correlatie (1 golflengte)  
 ..... Meervoudige correlatie

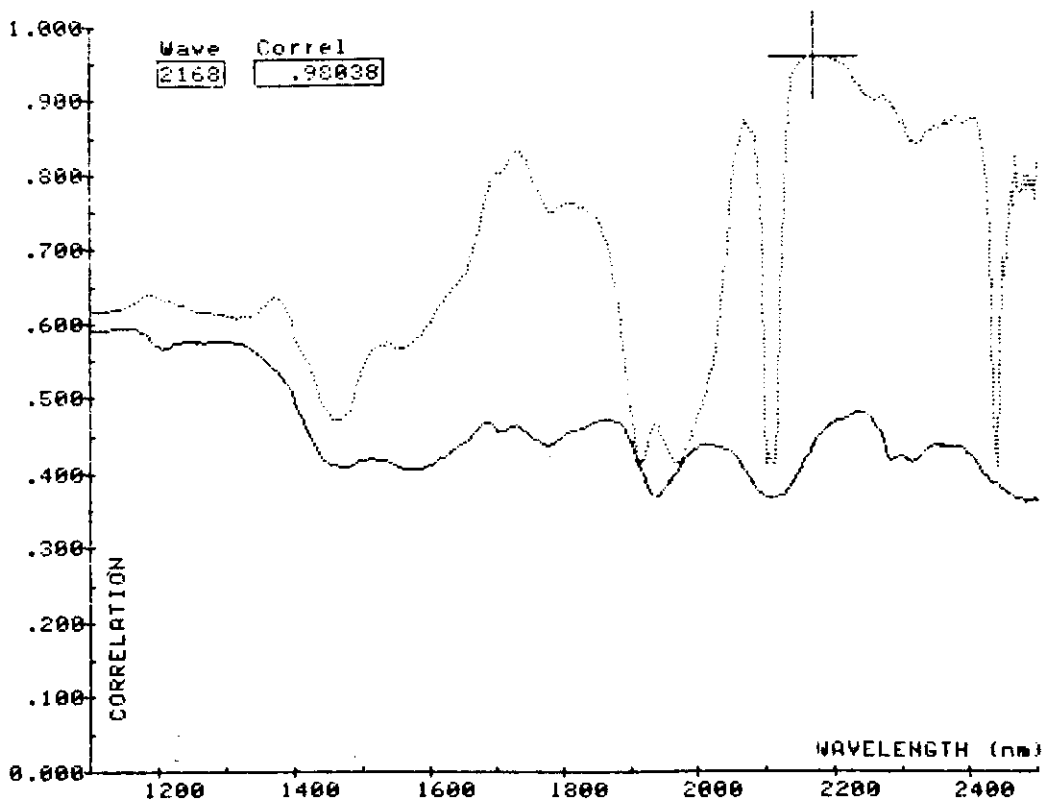


Fig. 4: Correlatie tussen het eiwitgehalte in brouwerst en de absorbtie bij 350 golflengten  
 ----- Enkelvoudige correlatie (1 golflengte)  
 ..... Meervoudige correlatie

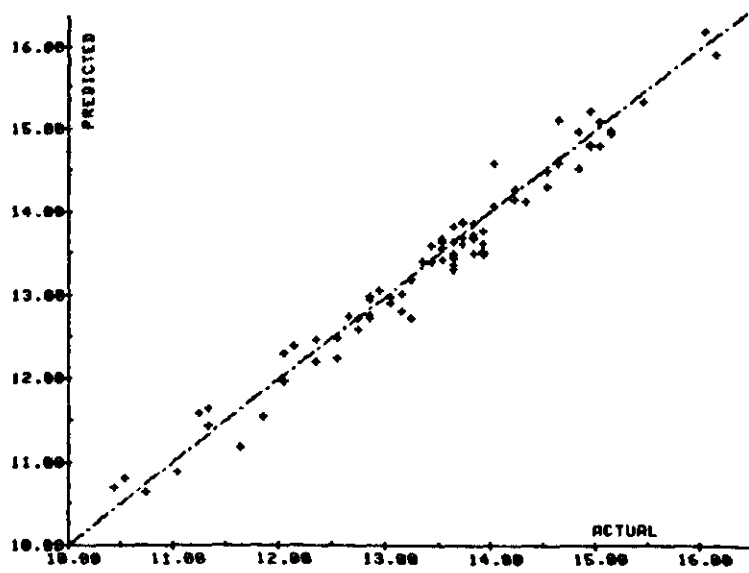


Fig. 5: Verband tussen de vochtgehalten van de calibratieset voorspeld met NIRS en bepaald met de referentiemethode (N=83).

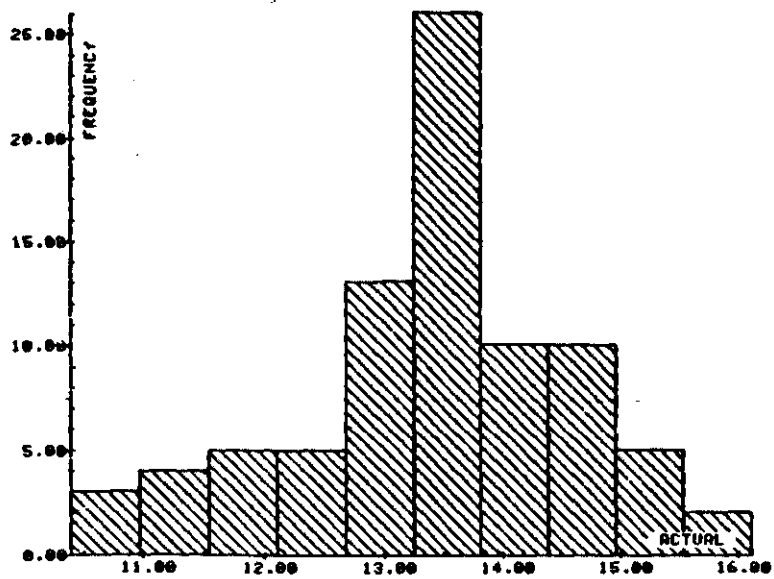


Fig. 6: Frequentieverdeling van de vochtgehalten van de calibratieset brouwerst (N=83).

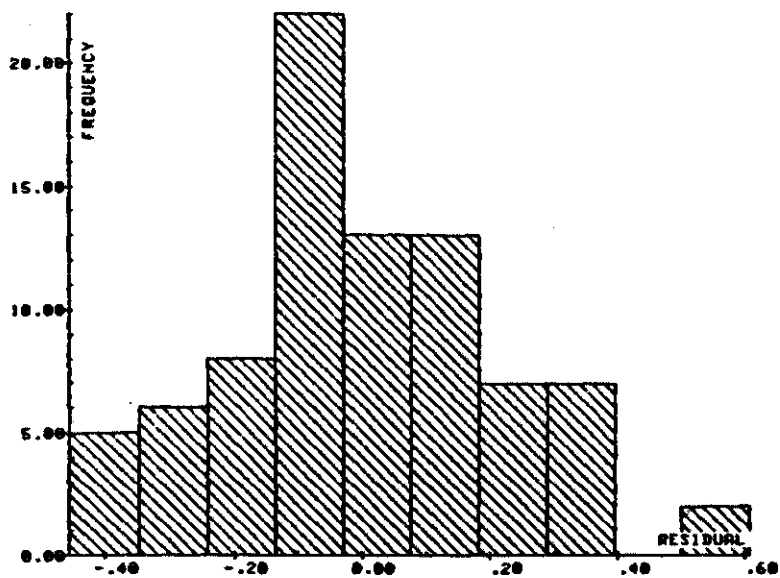


Fig. 7: Frequentieverdeling van de verschillen tussen de vochtgehalten van monsters brouwerst (calibratieset) voorspeld met NIRS en bepaald met de referentiemethode.



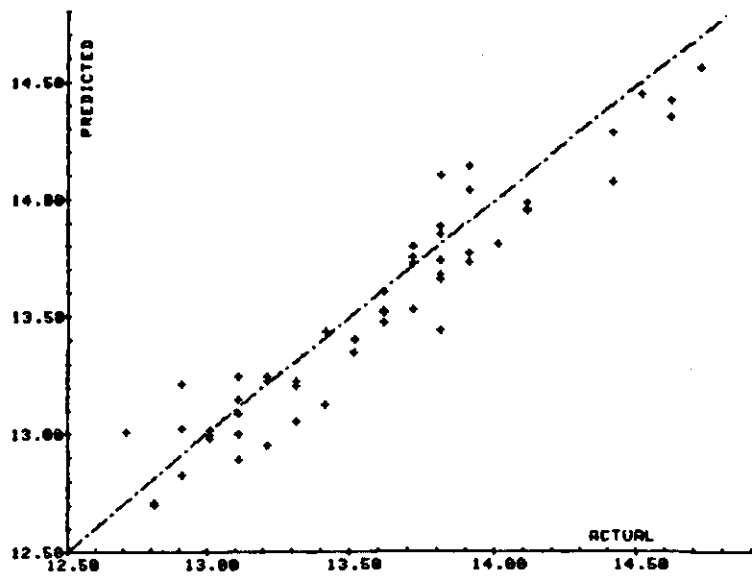


Fig. 8: Verband tussen de de vochtgehalten van de testset voorspeld met NIRS en bepaald met de referentiemethode (N=54).

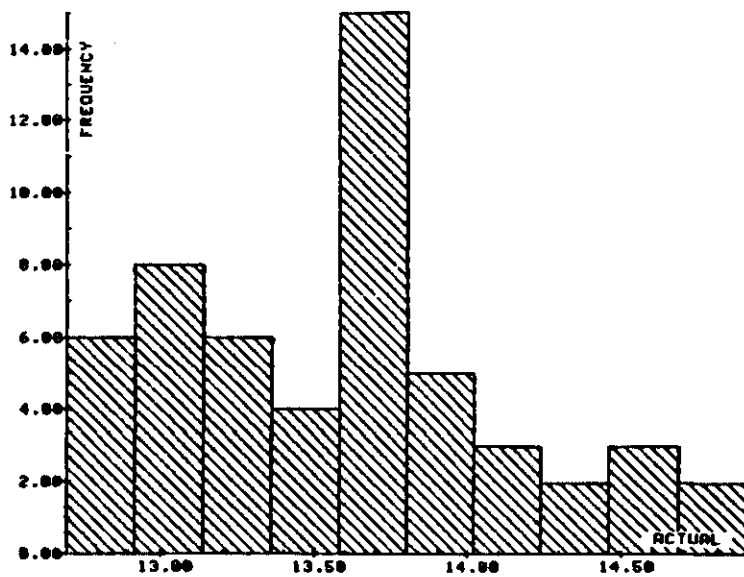


Fig. 9: Frequentieverdeling van de vochtgehalten van de testset brouwerst (N=54).

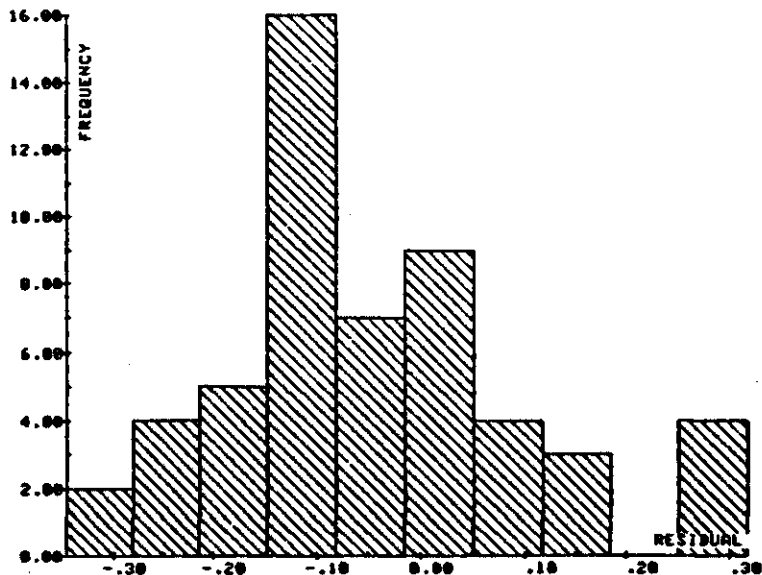


Fig. 10: Frequentieverdeling van de verschillen tussen de vochtgehalten van monsters brouwerst (testset) voorspeld met

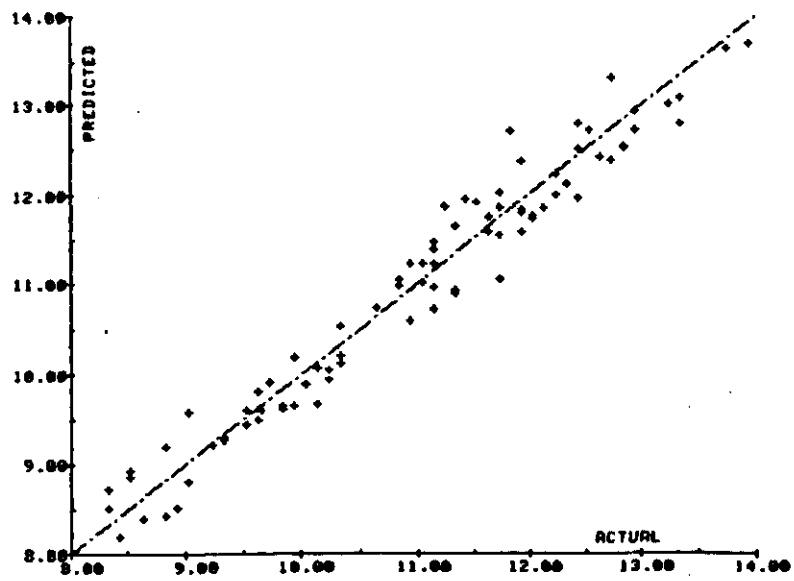


Fig. 11: Verband tussen de eiwitgehalten van de calibratieset voorspeld met NIRS en bepaald met de referentiemethode (N=83).

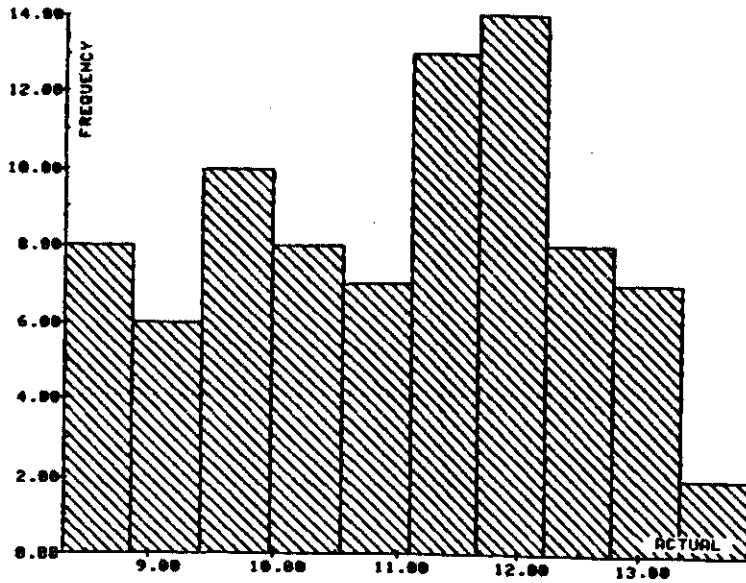


Fig. 12: Frequentieverdeling van de eiwitgehalten van de calibratieset brouwerst (N=83).

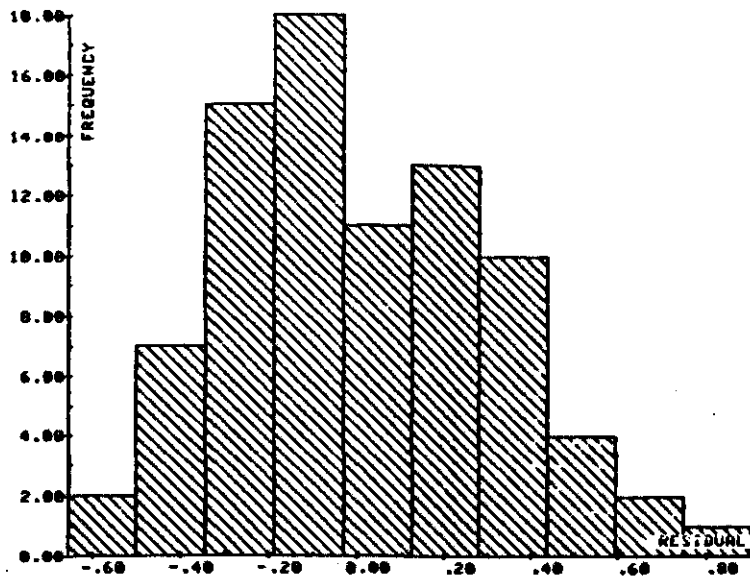


Fig. 13: Frequentieverdeling van de verschillen tussen de eiwitgehalten van eenzelfde brouwerst (calibratieset) voorspeld

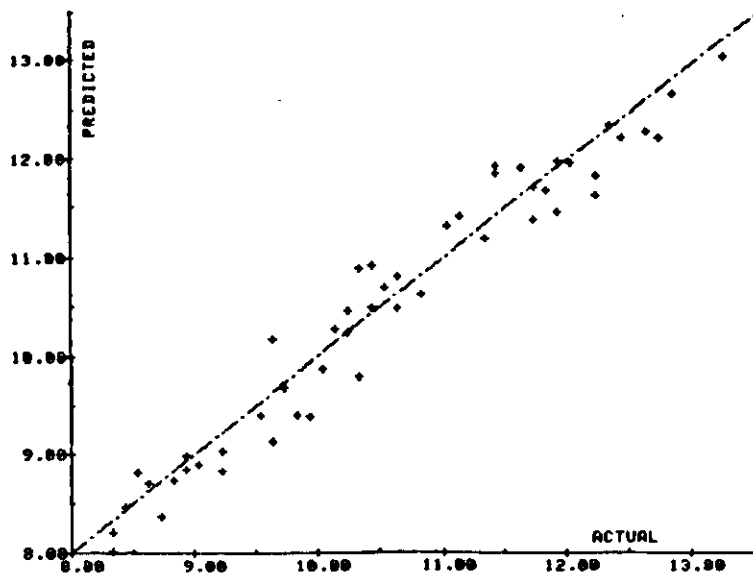


Fig. 14: Verband tussen de de eiwitgehalten van de testset voorspeld met NIRS en bepaald met de referentiemethode (N=54).

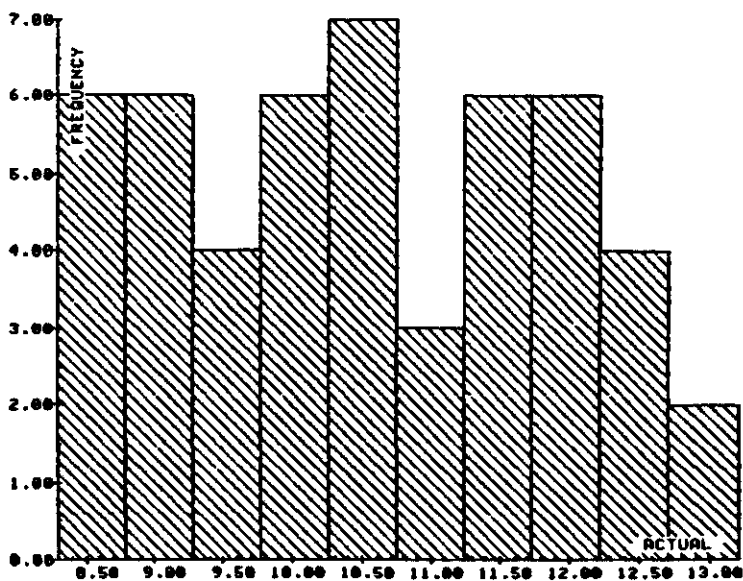


Fig. 15: Frequentieverdeling van de eiwitgehalten van de testset brouwerst (N=54).

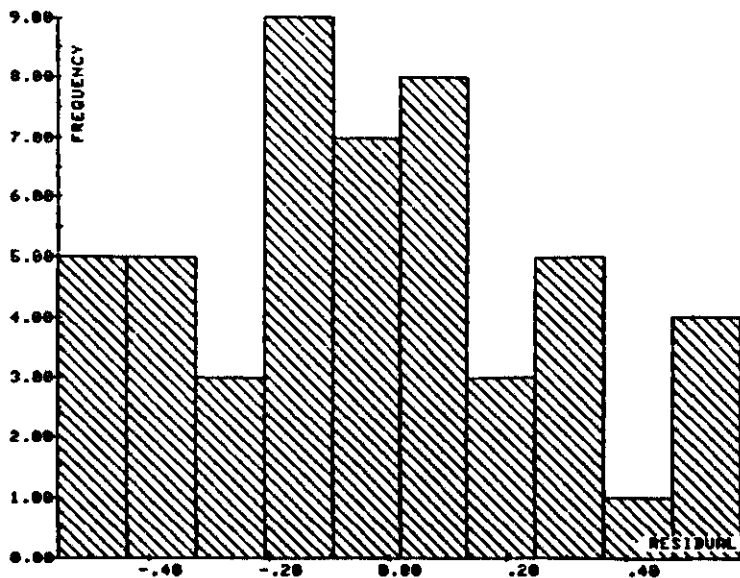


Fig. 16: Frequentieverdeling van de verschillen tussen de eiwitgehalten van monsters brouwerst (testset) voorspeld met