

Projectnummer 505.3070

Ontwikkeling van (snelle) analysemethoden in het kader van het onderzoekprogramma

"Plantaardige technische oliën als nieuwe landbouwgrondstoffen voor de industrie"

Plv. projectleider: H.J. van der Kamp

Rapport 91.52

November 1991

Oriënterend onderzoek naar de bepaling van het oliegehalte in *Dimorphotheca pluvialis*, *Crambe abyssinica* en *Euphorbia lagascae* met NMR en NIRS

H.J. van der Kamp, F.P.F. Groenendijk, J.J. van Oostrom en R. Frankhuizen

Afdeling: Algemene Chemie

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1991, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

hoofden onderzoekafdelingen

projectleider

afdeling Algemene Chemie (5x)

programmabeheer en informatieverzorging (2x)

circulatie

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Industrie en Handel

Directie Akker- en Tuinbouw

DLO-Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek,

ir. L.C.G. van Soest en ir. F. Mulder

DLO-Agrotechnologisch Onderzoekinstituut, drs. B.G. Muuse

DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek, ir. W. Meijer

DLO-Instituut voor Mechanisatie, Arbeid en Gebouwen, ir. A. Bouman, H. Breenhaar

Proefstation voor de Akkerbouw en de Groenteteelt in de Vollegrond, ir. G. Borm,

ing. L. Lautenbach

Landbouwuniversiteit Wageningen, dr. H. van As

Leden van NOP-Platform (9x)

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 MONSTERMATERIAAL	5
3 METHODEN VAN ONDERZOEK	6
3.1 Bepaling van het oliegehalte (klassiek)	6
3.2 NIRS	6
3.3 NMR	7
4 RESULTATEN EN DISCUSSIE	8
4.1 <i>Dimorphotheca pluvialis</i>	8
4.1.1 NIRS	8
4.1.2 NMR	9
4.2 <i>Euphorbia lagascae</i>	10
4.2.1 NIRS	10
4.2.2 NMR	12
4.3 <i>Crambe abyssinica</i>	14
4.3.1 NIRS	14
4.3.2 NMR	15
4 CONCLUSIES	17
5 AANBEVELINGEN	17
BIJLAGE	
A GEBRUIKTE STATISTISCHE FORMULES	

()

()

SAMENVATTING

In het kader van het agrificatie onderzoekprogramma van het Ministerie van LNV "Plantaardige technische oliën als nieuwe landbouwgrondstoffen voor de industrie" zijn de mogelijkheden onderzocht om het oliegehalte van *Dimorphotheca pluvialis*, *Crambe abyssinica* en *Euphorbia lagascae* met lage resolutie Nuclear Magnetic Resonance (NMR) en Nabij Infrarood Reflectie Spectroscopie (NIRS) te voorspellen.

Het monstermateriaal is afkomstig uit veldproeven uitgevoerd door het Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek (CPRO).

Het oliegehalte is gravimetrisch bepaald door de zaden in petroleum-ether in een kogelschudmolen (Prolabo) te malen. Vervolgens is de olie met petroleum-ether in een Soxhlet-apparaat geëxtraheerd.

Het NIRS-onderzoek is uitgevoerd met behulp van een NIRSystem-6500. Van ieder monster is in enkelvoud een NIR-spectrum opgenomen over het golflengtegebied van 1100-2500 nm, waarbij om de 2 nm de reflectie is gemeten in de $\log 1/R$ (R =reflectie) vorm. Vervolgens zijn met behulp van meervoudige lineaire regressie analyse (MLR) ijklijnen opgesteld aan de hand van de bepaalde oliegehalten en de bij de verschillende golflengten verkregen NIR-reflectiewaarden. Er zijn zowel correlatieberekeningen uitgevoerd aan de ruwe spectra als aan de 1e en 2e afgeleide spectra.

De NMR-metingen zijn uitgevoerd met een puls-NMR-apparaat (Minispec pc20s van Bruker) gebruikmakend van de applicatieprom EDM 3.2.1.A. Hierbij wordt het NMR-signaal gemeten volgens de spin-echomethode.

Met NIRS zijn een aantal ijklijnen opgesteld die op hun betrouwbaarheid getoetst moeten worden. De verwachting is dat het oliegehalte van *Dimorphotheca* (geveugeld zaad) bepaald kan worden met NIRS met een nauwkeurigheid van $\pm 2\%$, van *Euphorbia* met een nauwkeurigheid van $\pm 1.3\%$ en van *Crambe* met een nauwkeurigheid van $\pm 2\%$ (betrouwbaarheidsinterval van 95%).

Het oliegehalte van *Dimorphotheca pluvialis* kan niet betrouwbaar bepaald worden met de door ons gebruikte NMR. De kleine hoeveelheid monster (ca. 0.25 gram zaad) waaraan gemeten kan worden is het probleem (slechte herhaalbaarheid van de meting en grote spreiding binnen metingen van één monster).

Het oliegehalte van *Euphorbia* kan bepaald worden met NMR met een nauwkeurigheid van $\pm 2\%$ indien geijkt wordt op een aantal zaadmonsters. Indien geijkt wordt met *Euphorbia*-olie kan het oliegehalte bepaald worden met een nauwkeurigheid van $\pm 1,6\%$ (95% betrouwbaarheidsinterval). Het oliegehalte van *Crambe* kan bepaald worden met een nauwkeurigheid van $\pm 3,4\%$ (95% betrouwbaarheidsinterval).

()

()

1 INLEIDING

In het kader van het agrificatie onderzoekprogramma van het Ministerie van LNV "Plantaardige technische oliën als nieuwe landbouwgrondstoffen voor de industrie" ook wel aangeduid als het "Nationaal Olie Programma"-(NOP) wordt onderzoek gedaan naar een aantal oliehoudende gewassen zoals *Dimorphotheca pluvialis*, *Crambe abyssinica*, *Euphorbia lagascae*, *Osteospermum* spp. en *Limnanthes alba*. Het onderzoek richt zich vooral op de akkerbouw (bouwplanproblematiek, ontwikkeling van zaai-, teelt- en oogsttechnieken, versnelde domesticatie van soorten), de zaadverwerking (isolatie olie uit het zaad), de benutting van olie en vetzuren en de benutbaarheid van schroot en schilfers in de veevoeding. Verschillende landbouwinstituten waaronder het RIKILT-DLO participeren in dit onderzoek. Naast het uitvoeren van een aantal ondersteunende analyses zoals het bepalen van het vocht- en oliegehalte in de zaden en de vetzuursamenstelling van de olie, is het de taak van het RIKILT-DLO de mogelijkheden te onderzoeken of er snelle screeningsmethoden ontwikkeld kunnen worden waarmee het vocht-, het oliegehalte en de vetzuursamenstelling betrouwbaar bepaald kunnen worden. In dit kader zijn de mogelijkheden onderzocht om het oliegehalte van *Dimorphotheca pluvialis*, *Crambe abyssinica* en *Euphorbia lagascae* met lage resolutie Nuclear Magnetic Resonance (NMR) en Nabij Infrarood Reflectie Spectroscopie (NIRS) te bepalen.

2 MONSTERMATERIAAL

Al het monstermateriaal is afkomstig uit veldproeven uitgevoerd door het Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek (CPRO). Voor het onderzoek naar het oliegehalte in *Euphorbia* zijn de monsters afkomstig van een veldproef waarbij in drie herhalingen 25 accessies zijn uitgezaaid. De monsters zijn geoogst in 1990 (RIKILT-nrs. 51121-51195, CPRO-nrs 1-75).

De Crambes zijn ook afkomstig van een veldproef in 1990 waarbij in drie herhalingen 22 accessies zijn uitgezaaid (RIKILT-nrs. 54301-54366, CPRO-nrs. 1-66)

De onderzochte *Dimorphotheca*'s zijn van diverse herkomsten. Bovendien zijn er proeven gedaan naar de invloed van het oogsttijdstip, de manier van oogsten en bewaarcondities. De monsters die bestaan uit vleugels, zijn gebruikt voor het onderzoek. De RIKILT-nrs. van de monsters zijn 50965-51040 en 51292-51346 (CPRO-nrs. F.M. 1-132)

Omdat de monsters vaak in herhalingen zijn uitgezaaid of afkomstig zijn van proeven naar oogsttijdstip, bewaarcondities e.d. is de spreiding in oliegehalte mogelijk gering. Dit is voor het NIRS-onderzoek niet ideaal.

3 METHODEN VAN ONDERZOEK

3.1 Bepaling van het oliegehalte (klassiek)

Het oliegehalte is gravimetrisch bepaald conform intern voorschrift A 104. De zaden worden in petroleum-ether in een kogelschudmolen (Prolabo) vermalen. Vervolgens wordt met petroleum-ether de olie geëxtraheerd, het oplosmiddel afgedampt en het oliegehalte bepaald na drogen bij 80°C onder vacuüm tot constant gewicht.

3.2 NIRS

Het NIRS-onderzoek is uitgevoerd met behulp van een NIRSystem-6500. Het betreft hier een modulair opgebouwde spectrofotometer, waarmee zowel in reflectie als in transmissie gemeten kan worden over een breed golflengtegebied (400-2500 nm). Voor de Euphorbia-zaadmonsters is gekozen voor reflectiemetingen in een roterende monstercup (benodigde hoeveelheid ca. 5 gram zaad) omdat deze cups makkelijk schoon te maken zijn na gebruik. Hierbij wordt van het totale oppervlak van de monstercup ca. 4.5 cm² aangestraald.

De Dimorphotheca- en Crambezaadmonsters zijn gemeten in een coarse-cuvet die gevuld kan worden met maximaal 100 ml zaad. Het grote voordeel van deze cup is dat er aan een grote hoeveelheid monster gemeten wordt waardoor inhomogeniteit van het monster uitgemiddeld wordt. Van ieder monster is in enkelvoud een NIR-spectrum opgenomen over het golflengtegebied van 1100-2500 nm, waarbij om de 2 nm de reflectie is gemeten in de $\log 1/R$ (R =reflectie) vorm. Als referentie is een keramisch schijfje gebruikt. Van de monsters zijn de met de referentiemethode bepaalde oliegehalten ingevoerd in de computer en gekoppeld aan de bijbehorende NIR-spectra. Vervolgens zijn met behulp van meervoudige lineaire regressie analyse (MLR) correlaties berekend tussen de bepaalde oliegehalten en de bij de verschillende golflengten verkregen NIR-reflectiewaarden. Hierbij worden golflengten geselecteerd en calibratiefactoren berekend die in combinatie de hoogste meervoudige correlatiecoëfficiënt (R) en de kleinste standaardafwijking van de verschillen ($RMSC$ = Root Mean Square error of Calibration) geven tussen de bepaalde oliegehalten en de met NIRS berekende gehalten. Er zijn zowel correlatieberekeningen uitgevoerd aan de ruwe spectra als aan de 1e en 2e afgeleide spectra (Bij afgeleide spectra wordt er gecorrigeerd voor eventuele verschillen in reflectie veroorzaakt door verschillen in structuur zoals o.a. deeltjesgrootte). Tevens is er bij de afgeleide spectra gerekend met verschillende segment- en gapgrootten ter verkrijging van een optimale signaal/ruisverhouding. Voor het oliegehalte zijn dus meerdere ijklijnen opgesteld die uiteindelijk met behulp van een toetsset, bestaande uit onbekende monsters, op hun betrouwbaarheid moeten worden getoetst. De standaardafwijking van de verschillen tussen de met NIRS voorspelde en de met de klassieke methode gevonden oliegehalten van de toetsmonsters, $RMSP$ = Root Mean Square error of Prediction, is een maat voor de nauwkeurigheid van de ijklijn.

Indien de RMSP overeenkomt met de RMSC en indien de intercept en slope van de regressielijn van de voorspellingen die van de ijklijn (intercept = 0 en slope = 1) benaderen, wordt de ijklijn betrouwbaar geacht.

3.3 NMR

De NMR-metingen zijn uitgevoerd met een puls-NMR-apparaat (Minispec pc20s van Bruker) gebruikmakend van de applicatieprom EDM 3.2.1.A. Hierbij wordt het NMR-signaal gemeten volgens de spin-echomethode, waarbij de 90° puls gevolgd wordt door een 180° puls na een tijdsinterval van τ sec. Er ontstaat op deze manier een spin-echosignaal (= NMR-signaal) na $2 \times \tau$ sec. Het tijdstip waarop de 180° puls wordt afgegeven moet zodanig gekozen worden dat er alleen signaal afkomstig van olie gemeten wordt en geen signaal van gebonden water. De "free induction decay" (FID = exponentiële verval van het NMR-signaal in de tijd) van gebonden water is groter dan die van olie. Wanneer de vochtgehalten van de zaden boven de 10% komt, kan het water ook als vrij water in het zaad aanwezig zijn. De oliebepaling kan dan gestoord worden.

De NMR-meting wordt uitgevoerd aan 3 ml zaad hetgeen betekent dat afhankelijk van het soortelijk gewicht van het zaad gemeten kan worden aan 0.2 tot 2 gram zaad. Het apparaat is zodanig ingesteld dat de 180° puls gegeven wordt 3000 μ sec na de 90° puls. Het signaal wordt gemeten na nog eens 3000 μ sec. Per monster wordt 15 keer gemeten om de ruis van het signaal uit te middelen.

Met de NMR kunnen ijklijnen opgesteld worden met behulp van zaden met een bekend oliegehalte of aan de hand van zuivere olie verkregen uit de zaden. De standaardafwijking van de verschillen tussen de met NMR voorspelde en de met de klassieke methode gevonden oliegehalten van de toetsmonsters, RMSP (= Root Mean Square error of Prediction), is een maat voor de nauwkeurigheid van de bepaling.

Verder is er onderzoek gedaan naar de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid van de NMR-meting en de binnenmonstervariatie. De herhaalbaarheid is berekend ($2.8 \times$ s.d. van de verschillen in oliegehalte) uit de gevonden oliegehalten verkregen door n monsters (1 keer inwegen) in duplo met de NMR te meten op dezelfde ijklijn. De reproduceerbaarheid ($2.8 \times$ s.d. van de verschillen) is bepaald door van n monsters in enkelvoud het oliegehalte op verschillende dagen te bepalen met behulp van opnieuw opgenomen ijklijnen. De binnenmonstervariatie in oliegehalte ($2.8 \times$ s.d. van de verschillen) is bepaald door n monsters in duplo af te wegen en vervolgens het oliegehalte te bepalen met NMR op één ijklijn.

4 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.1 Dimorphotheca pluvialis

4.1.1 NIRS

Voor het opstellen van de NIRS-ijklijnen zijn de monsters die veel verontreinigingen (in dit geval veelal schelpen) bevatten buiten beschouwing gelaten omdat met de klassieke methode lagere oliegehalten worden gevonden. Bij de NIRS-metingen is het niet duidelijk welke van de aanwezigheid van schelpen heeft op de spectra. Hierdoor is de monsterset van 91 monsters gereduceerd tot 69 monsters. In deze monsterset zijn alleen die Dimorphotheca's opgenomen die uit gevleugeld zaad bestaan (kegels zijn verwijderd tijdens het opschonen op het CPRO).

De NIRS-ijklijnen opgesteld aan de hand van ruwe spectra en 1e afgeleide spectra bieden nauwelijks perspectief, hetgeen verklaard kan worden door het feit dat verschillen in spectra voornamelijk veroorzaakt worden door verschillen in structuur (o.a. deeltjesgrootte); kleine zaadjes geven een hoger absorptieniveau dan grote zaadjes. Door het omzetten van de ruwe spectra in 2e afgeleide spectra wordt hiervoor grotendeels gecorrigeerd. Aan de hand van de 2^e afgeleide spectra met een segment van 8 nm en een gap van 0 nm zijn een aantal NIRS-ijklijnen opgesteld. De ijklijnen die het meeste perspectief bieden, zijn opgenomen in tabel 1. Deze ijklijnen geven een RMSC van ca. 1%. In figuur 1 zijn van ijklijn 1 de oliegehalten gevonden met de klassieke methode uitgezet tegen de oliegehalten gevonden met NIRS (voorspeld aan zichzelf).

Tabel 1. Gegevens van de NIRS-ijklijnen die het meeste perspectief bieden, opgesteld voor de oliegehalten in Dimorphotheca.

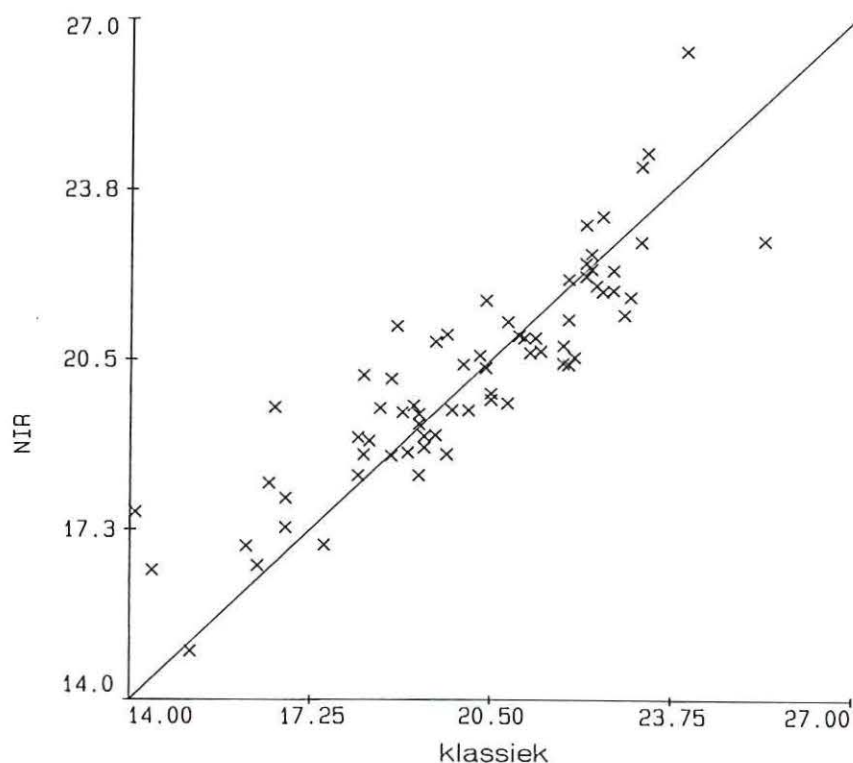
IJklijn	Naam	n	R	RMSC	g1	g2	g3
1	D63-3TF2	63	0.91	0.86	1702	2268	2340
2	D69-3TF0	69	0.90	1.08	1702	2268	2340

n = aantal monsters in ijklijn

g = golflengte (in nm)

R = Regressie coëfficiënt (klassiek t.o.v. NIRS)

RMSC = Root Mean Square error of Calibration



Figuur 1: Oliegehalten van *Dimorphotheca* bepaald met NIRS (voorspeld aan zichzelf) uitgezet tegen de klassiek gevonden gehalten.

Deze ijklijnen moeten uiteindelijk met behulp van een toetsset bestaande uit onbekende monsters op hun betrouwbaarheid worden getoetst. Deze toetsing zal uitgevoerd worden met de monsters die in het kader van NOP in de winter van 1991-1992 onderzocht worden.

Er van uitgaande dat de toetsing een RMSP geeft van dezelfde orde van grootte als de RMSC is de verwachting dat het oliegehalte van *Dimorphotheca* (geveugeld zaad) met NIRS bepaald kan worden met een nauwkeurigheid van $\pm 2\%$ met een betrouwbaarheidsinterval van 95%. In vergelijking met de klassiek bepaalde oliegehalten (herhaalbaarheid $r = 1.0\%$) is de nauwkeurigheid wel iets geringer, maar als screeningsmethode lijkt NIRS bruikbaar.

4.1.2 NMR

Met 6 monsters *Dimorphotheca* (veldnrs. 5-23-45-47-55-74) waarvan het oliegehalte in enkelvoud bepaald is met de klassieke methode, is een ijklijn opgesteld. Vervolgens is een willekeurig gekozen monster 10 maal ingewogen en in duplo gemeten op de NMR. De berekende oliegehalten staan vermeld in tabel 2.

Tabel 2: Gevonden oliegehalten van één monster *Dimorphotheca* in tienvoud bepaald (duplo NMR-meting)

Meting	% olie	% olie
1	17.6	18.0
2	21.1	22.5
3	15.3	17.6
4	14.9	16.0
5	19.6	20.5
6	20.5	21.9
7	21.0	22.3
8	20.4	20.9
9	20.3	21.5
10	20.3	21.8

De herhaalbaarheid van de NMR-meting is 2.6%. Verder valt de enorme binnenmonstervariatie op (min 14.9% max 22.5% olie). De oorzaak hiervan moet gezocht worden in de kleine hoeveelheid monster (ca. 0.25 gram zaad) waaraan gemeten wordt, hetgeen betekent dat de monsters zeer homogeen moeten zijn om goed het oliegehalte te voorspellen. Bovendien moet het signaal zodanig versterkt worden dat een slechte signaal/ruis verhouding wordt verkregen hetgeen de herhaalbaarheid van de NMR-meting niet ten goede komt. Gezien de slechte herhaalbaarheid van de meting en de grote verschillen binnen een monster is van verder onderzoek afgezien.

4.2 *Euphorbia lagascae*

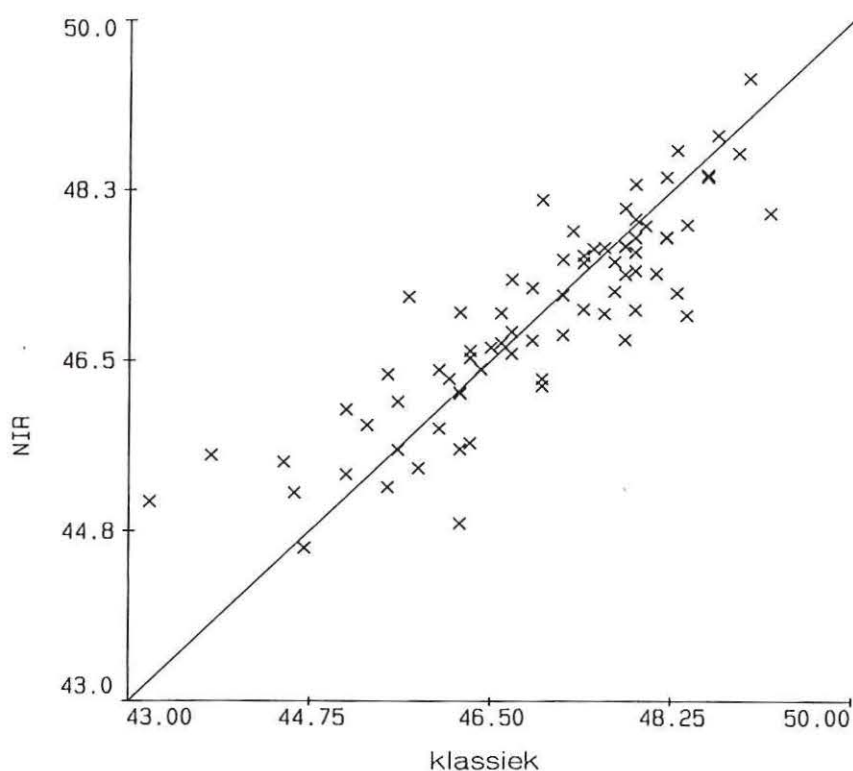
4.2.1 NIRS

Ook hier geldt dat de NIRS-ijklijnen opgesteld aan de hand van ruwe spectra en 1e afgeleide spectra nauwelijks perspectief bieden. Aan de hand van de 2^e afgeleide spectra met een segment van 8 nm en een gap van 0 nm zijn een aantal NIRS-ijklijnen opgesteld. De ijklijnen die het meeste perspectief bieden, zijn opgenomen in tabel 3. Deze ijklijnen geven een RMSC van ca. 0.65%. In figuur 2 zijn van ijklijn 1 de oliegehalten gevonden met de klassieke methode uitgezet tegen de oliegehalten gevonden met NIRS (voorspeld aan zichzelf).

Tabel 3: Gegevens van de NIRS-ijklijnen die het meeste perspectief bieden, opgesteld voor de oliegehalten in Euphorbia.

IJklijn	Naam	n	R	RMSC	g1	g2	g3
1	E7-2TOFA	75	0.87	0.64	1382	1478	-
2	E7-2T1FA	75	0.86	0.65	1382	1498	-
3	E7-3T2FA	75	0.87	0.64	1382	1498	2196

n = aantal monsters in ijklijn
g = golflengte (in nm)
R = Regressie coëfficiënt (klassiek t.o.v. NIRS)
RMSC = Root Mean Square error of Calibration



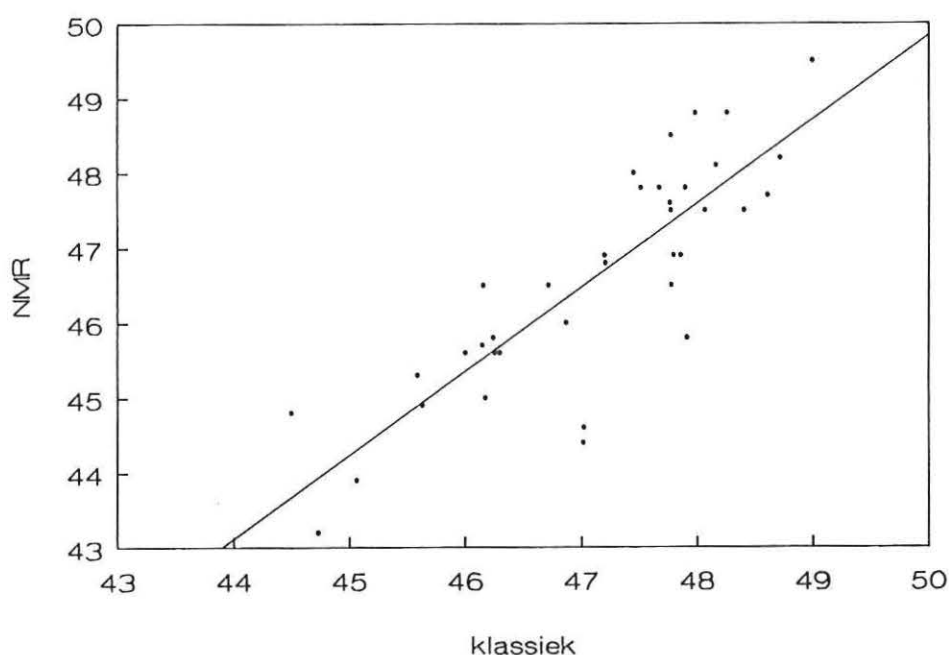
Figuur 2: Oliegehalten van Euphorbia bepaald met NIRS (voorspeld aan zichzelf) uitgezet tegen de klassiek gevonden gehalten.

Ook deze ijklijnen worden op hun betrouwbaarheid getoetst met de monsters die in het kader van NOP in de winter van 1991-1992 onderzocht zullen worden.

Er van uitgaande dat de toetsing een RMSP geeft in dezelfde orde van grootte als de RMSC is de verwachting dat het oliegehalte van Euphorbia bepaald kan worden met NIRS met een nauwkeurigheid van $\pm 1.3\%$ (95% betrouwbaarheidsinterval). De herhaalbaarheid van de olie bepaling (klassiek) is niet bekend maar zal vermoedelijk ca. 1.0% bedragen.

4.2.2 NMR

In eerste instantie is er een ijklijn opgesteld met 6 monsters Euphorbiazaad (veldnrs. 70-40-68-7-20-24) waarvan het oliegehalte klassiek in enkelvoud bepaald is. Met deze ijklijn is vervolgens van de andere Euphorbiamonsters het oliegehalte bepaald. In figuur 3 zijn de met NMR gevonden gehalten uitgezet tegen de met de klassieke methode gevonden gehalten. Er is een correlatie coëfficiënt gevonden van 0.86 tussen de klassiek en de met NMR bepaalde oliegehalten met een RMSP van 1.0%. Wel wordt met de NMR gemiddeld 0.5% minder olie gevonden. Bij de interpretatie van de gegevens moet er rekening mee worden gehouden dat het oliegehalte van de monsters klassiek in enkelvoud bepaald is.



Figuur 3: Oliegehalten van Euphorbia bepaald met NMR (ijkling met Euphorbiazaad) uitgezet tegen de klassiek gevonden gehalten.

Tevens is onderzocht of de NMR ook geijkt kan worden met zuivere Euphorbia-olie door verschillende hoeveelheden olie af te wegen in een NMR-buis. Met de opgestelde ijklijn zijn 25 monsters Euphorbia (veldnrs. 26 t/m 50) gemeten. In figuur 4 zijn de met NMR gevonden gehalten uitgezet tegen de met de klassieke methode gevonden gehalten. Ook hier is een goede relatie gevonden tussen de klassiek bepaalde en met NMR bepaalde gehalten (corr. coëff. 0.91, RMSP 0.8%).

Uit het onderzoek blijkt dat het oliegehalte in Euphorbia met NMR bepaald kan worden met een nauwkeurigheid van 1.6% (95% betrouwbaarheidsinterval) indien geijkt wordt op Euphorbia-olie.

4.3 Crambe abyssinica

4.3.1 NIRS

Ook hier geldt dat de NIRS-ijklijnen opgesteld aan de hand van ruwe spectra en 1e afgeleide spectra nauwelijks perspectief bieden. Aan de hand van de 2^e afgeleide spectra met een segment en gap van 8 nm zijn een aantal NIRS-ijklijnen opgesteld. De ijklijnen die het meeste perspectief bieden zijn opgenomen in tabel 5. Deze ijklijnen geven een RMSC van ca. 1.1%. In figuur 5 zijn van ijklijn 1 de oliegehalten gevonden met de klassieke methode uitgezet tegen de oliegehalten gevonden met NIRS (voorspeld aan zichzelf).

Tabel 5: Gegevens van de NIRS-ijklijnen die het meeste perspectief bieden, opgesteld voor de oliegehalten in Crambe.

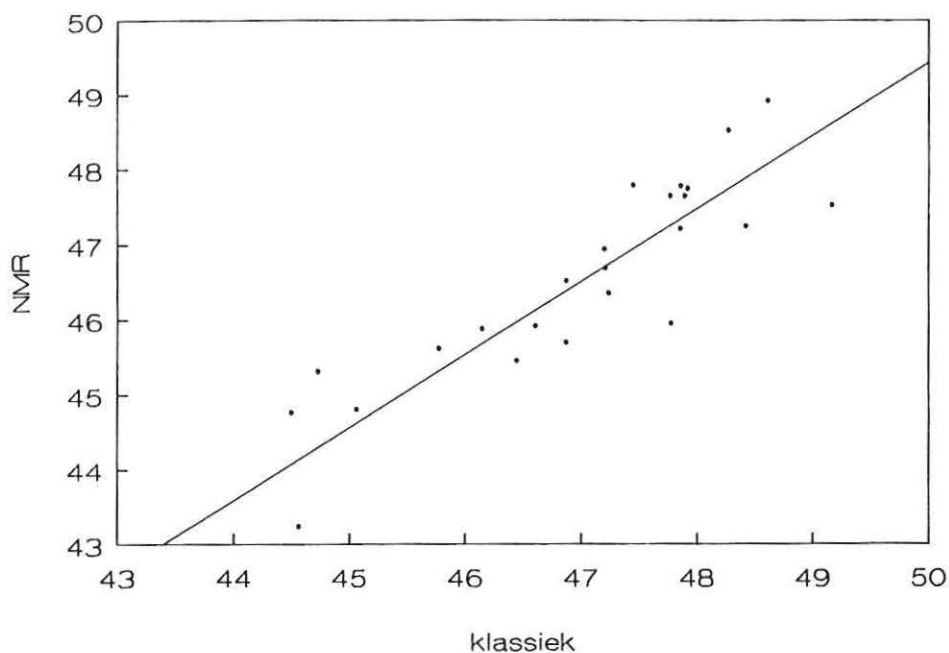
IJklijn	Naam	n	R	RMSC	g1	g2	g3
1	C08-3T0F	66	0.81	1.08	1226	1322	1814
2	C08-3T2F	66	0.80	1.10	1226	2216	1750
3	C08T3F3A	66	0.79	1.12	2166	1392	1876
4	C083T3FC	66	0.82	1.06	2056	1376	1278
5	C88R3TF2	60	0.85	0.85	1228	2212	1073

n = aantal monsters in ijklijn

g = golflengte (in nm)

R = Regressie coëfficiënt (klassiek t.o.v. NIRS)

RMSC = Root Mean Square error of Calibration



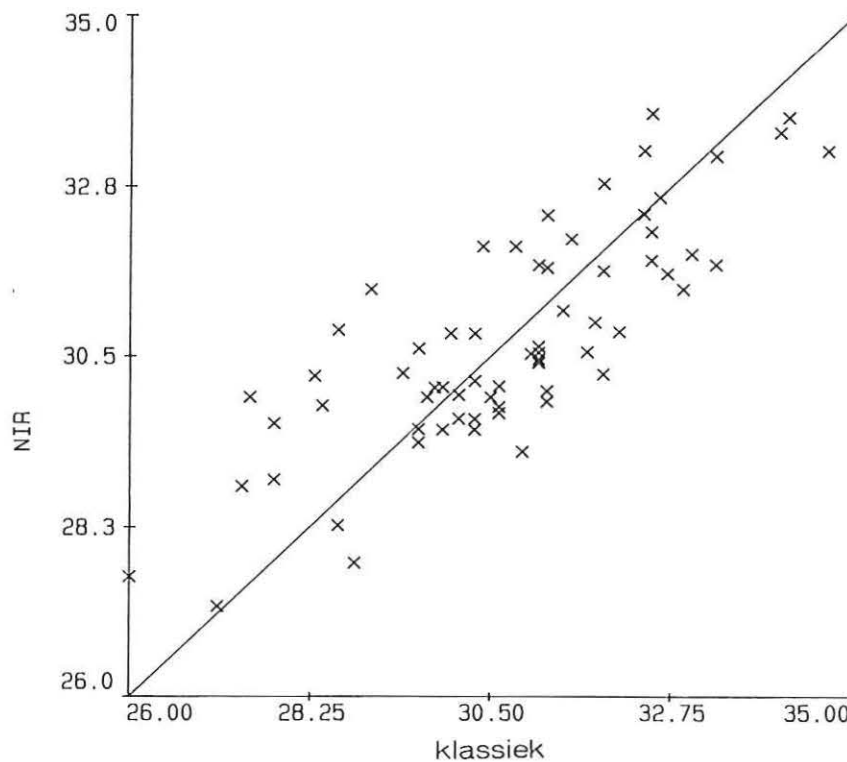
Figuur 4: Oliegehalten van Euphorbia bepaald met NMR (ijking met Euphorbia-olie) uitgezet tegen de klassiek gevonden gehalten.

Omdat bekend is dat het aanwezige vocht de bepaling van het oliegehalte kan verstoren is van 6 monsters Euphorbiazaad het oliegehalte in duplo bepaald met NMR voor en na drogen (in de vacuümstoof bij 80°C gedurende 2.5 uur). De resultaten staan in tabel 4.

Tabel 4. Oliegehalten van Euphorbia bepaald met NMR voor en na drogen.

veld.nr.	% direct	% na drogen	% vocht
41	47.2	47.5	4.1
42	47.8	47.3	4.0
43	47.7	47.9	4.0
44	46.9	46.8	4.0
45	48.2	48.0	3.9
46	44.3	44.5	4.3

Uit de cijfers blijkt dat het in deze zaden aanwezige vocht geen invloed heeft op de bepaling van het oliegehalte met NMR. Of dit ook het geval is indien de zaden een hoger vochtgehalte bevatten, moet onderzocht worden. De herhaalbaarheid van de NMR-meting bedraagt 0.45% (s.d. 0.16%), de reproduceerbaarheid 0.65% (s.d. 0.23) en de spreiding binnen monsters 0.56% (s.d. 0.20).



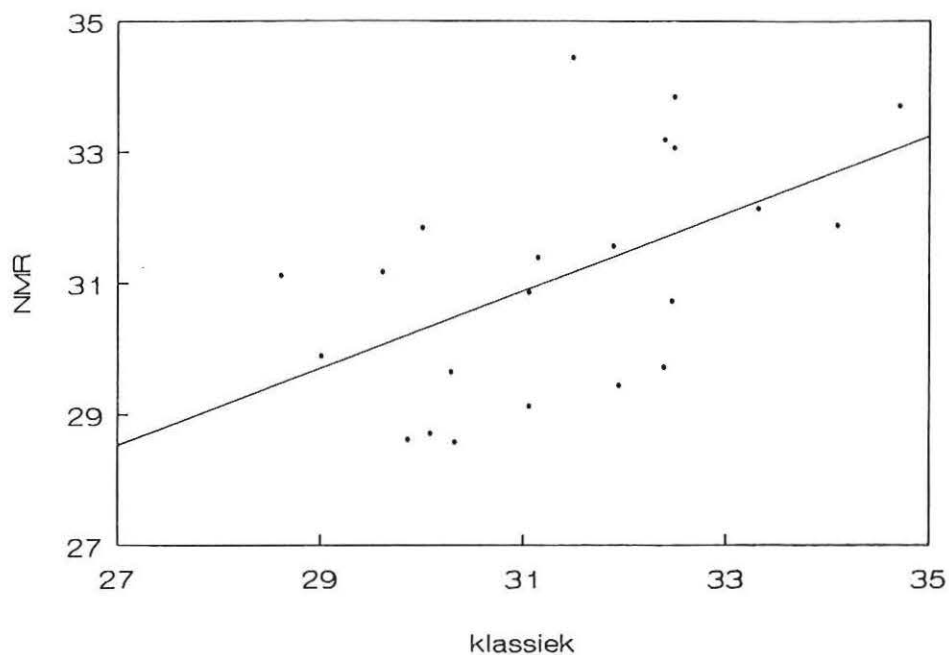
Figuur 5: Oliegehalten van Crambe bepaald met NIRS (voorspeld aan zichzelf) uitgezet tegen de klassiek gevonden gehalten.

De toetsing zal uitgevoerd worden met de monsters die in het kader van NOP in de winter van 1991-1992 onderzocht worden.

Er van uitgaande dat de toetsing een RMSP geeft in dezelfde orde van grootte als de RMSC is de verwachting dat het oliegehalte van Crambe bepaald kan worden met NIRS met een nauwkeurigheid van $\pm 2\%$ (95% betrouwbaarheidsinterval). De herhaalbaarheid van de klassieke olie bepaling bedraagt 1.2%.

4.3.2 NMR

Er is een ijklijn opgesteld met 22 monsters Crambe (veldnrs. 23 t/m 44) waarvan het oliegehalte klassiek in duplo bepaald is. Een voorspelling van de oliegehalten van veldnrs. 23-44 (voorspelling aan zichzelf) geeft een RMSC van 1.5%. Met deze ijklijn is vervolgens van de veldnrs. 45 t/m 66 het oliegehalte bepaald. In figuur 6 zijn de met NMR gevonden gehalten uitgezet tegen de met de klassieke methode gevonden gehalten. Er is een correlatiecoëfficiënt gevonden van 0.65% met een RMSP van 1.7% tussen de klassiek en de met NMR bepaalde oliegehalten hetgeen inhoudt dat onbekende monsters met een nauwkeurigheid (95% betrouwbaarheidsinterval) van $\pm 3.4\%$ bepaald kunnen worden.



Figuur 6: Oliegehalten van Crambe bepaald met NMR uitgezet tegen de klassiek gevonden gehalten.

Verder is er onderzoek gedaan naar de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid van de NMR-meting en de binnenmonstervariatie. De herhaalbaarheid van de NMR-meting bedraagt 0.36%, de reproduceerbaarheid 2.1% en de binnenmonstervariatie 2.1%. Uit deze cijfers blijkt dat de homogeniteit van monsters Crambes sterk te wensen overlaat.

Omdat bekend is dat het aanwezige vocht de bepaling van het oliegehalte kan verstoren is van 6 monsters Crambe het oliegehalte in duplo bepaald met NMR voor en na drogen (in de vakuümstoof bij 80°C gedurende 2.5 uur). De resultaten staan in tabel 6.

Tabel 6: Oliegehalten van Crambe bepaald met NMR voor en na drogen.

veld.nr.	% direct	% na drogen	% vocht
41	47.2	47.5	4.1
42	47.8	47.3	4.0
43	47.7	47.9	4.0
44	46.9	46.8	4.0
45	48.2	48.0	3.9
46	44.3	44.5	4.3

Uit de cijfers blijkt dat het in deze zaden aanwezige vocht geen invloed heeft op de bepaling van het oliegehalte met NMR. Of dit ook het geval is indien de zaden een hoger vochtgehalte bevatten, moet onderzocht worden.

4 CONCLUSIES

Er van uitgaande dat de toetsing een RMSP geeft van dezelfde orde van grootte als de RMSC is de verwachting dat de oliegehalten van *Dimorphotheca* (ge vleugeld zaad), *Euphorbia* en *Crambe* bepaald kunnen worden met NIRS met een nauwkeurigheid van resp. $\pm 2\%$, $\pm 1.3\%$ en $\pm 2\%$ (betrouwbaarheidsinterval van 95%). De uiteindelijke toetsing van de ijklijnen op hun betrouwbaarheid moet uitsluitend geven over de bruikbaarheid van NIRS bij de bepaling van het oliegehalte.

Het oliegehalte van *Dimorphotheca pluvialis* (vleugels) kan niet betrouwbaar bepaald worden met de bij dit onderzoek gebruikte NMR. De kleine hoeveelheid monster (ca. 0.25 gram zaad) waaraan gemeten kan worden is het probleem (slechte herhaalbaarheid van de meting en grote spreiding binnen metingen van één monster).

Voor *Euphorbia* is een correlatiecoëfficiënt gevonden van 0.86 met een RMSP van 1.0% tussen de klassiek en de met NMR bepaalde oliegehalten indien geijkt wordt op een aantal zaadmonsters. Indien geijkt wordt met olie uit *Euphorbia* zaden wordt een goede relatie gevonden tussen de klassiek bepaalde en met NMR bepaalde gehalten (corr. coëff. 0.91, RMSP 0.8%).

Voor *Crambe* is een correlatiecoëfficiënt gevonden van 0.65 met een RMSP van 1.7% tussen de klassiek en de met NMR bepaalde oliegehalten hetgeen inhoudt dat onbekende monsters met een nauwkeurigheid (95% betrouwbaarheidsinterval) van $\pm 3.4\%$ bepaald kunnen worden.

5 AANBEVELINGEN

Uit het onderzoek blijkt dat de binnenmonstervariatie van *Dimorphotheca* en *Crambe* groot is. Dit kan grote invloed hebben op de klassiek bepaalde oliegehalten, maar ook op de metingen met NMR en NIRS, met name als gemeten wordt aan kleine hoeveelheden zaad. Bij verder onderzoek zal dan ook aandacht besteed moeten worden aan de monsternamen (monsterverdeelapparaat, eventueel malen van zaden). Verder is het aan te bevelen met name de NMR-metingen uit te voeren aan grotere hoeveelheden monster, hetgeen inhoudt dat gemeten moet worden op een NMR-apparaat met een grotere monstercup.

BIJLAGE A

GEBRUIKTE STATISTISCHE FORMULES.

RMSC (Root Mean Square error of Calibration) = standaarddeviatie van de verschillen tussen de met NIRS voorspelde en met de klassieke methode gevonden gehalten van de calibratieset.

$$RMSC = \sqrt{\frac{\sum (x - y)^2}{(n - 1)}}$$

waarin x = klassiek gevonden gehalten
 y = NIRS voorspelde gehalten
 n = aantal monsters

RMSP (Root Mean Square error of Prediction) = standaarddeviatie van de verschillen tussen de met NIRS voorspelde en met de klassieke methode gevonden gehalten van de toetsset.

$$RMSP = \sqrt{\frac{\sum (x - y)^2}{(n - 1)}}$$

waarin x = klassiek gevonden gehalten
 y = NIRS voorspelde gehalten
 n = aantal monsters

r = correlatiecoëfficiënt

$$r = \frac{\sum (x_i y_i - n \bar{x} \bar{y})}{\sqrt{(\sum x_i^2 - n \bar{x}^2)(\sum y_i^2 - n \bar{y}^2)}}$$

waarin x = klassiek gevonden gehalten
 y = NIRS voorspelde gehalten
 n = aantal monsters

NMR-metingen:

Herhaalbaarheid: 2.8 x s.d. van de verschillen in oliegehalte verkregen door n monsters (1 keer inwegen) in duplo te meten op één ijklijn.

Reproduceerbaarheid: 2.8 x s.d. van de verschillen in oliegehalte verkregen door van n monsters in enkelvoud het oliegehalte op verschillende dagen te bepalen met behulp van opnieuw opgenomen ijklijnen.

Binnenmonstervariatie: 2.8 x s.d. van de verschillen in oliegehalte door n monsters in duplo af te wegen en vervolgens het oliegehalte te bepalen met NMR op één ijklijn.