



## Pouzdanost NIR metode u određivanju sadržaja ulja i proteina u semenu soje

Svetlana Balešević-Tubić · Vuk Đorđević · Vojin Đukić ·  
Jegor Miladinović · Mladen Tatić

primljeno / received: 17.11.2009. prihvaćeno / accepted: 25.05.2010.  
© 2010 IFVC

**Izvod:** Primarna karakteristika difuzne refleksne spektroskopije je brzo i nedestruktivno određivanje sadržaja stvarnih konstituenata u proizvodima. Cilj je da se tačno zabeleži priroda apsorpcije (koja je zavisna od talasne dužine) u odnosu na stabilni standard. NIR spektroskopija je tehnologija koja je uglavnom zasnovana na stvarnom broju molekula svakog pojedinačnog konstituenta i teoretski predstavlja visoko-primenljivu analitičku metodu. Nakon konstrukcije nove kalibracione krive, prilikom transfera kalibracije sa jednog na drugi NIR instrument, potrebno je proveriti nagib i pomeranje kalibracione krive. Dobijeni rezultati višegodišnjih ispitivanja pokazuju pomeranje kalibracione krive, dok je nagib krive ostao nepromenjen, što znači da je navedeno pomeranje translatorne prirode.

**Cljučne reči:** kalibracija, NIR spektroskopija, sadržaj proteina, sadržaj ulja, soja

### Uvod

Teorija infracrvene spektroskopije je poznata više od 160 godina, ali prvi instrument se pojavio u industrijskim laboratorijama 1930. godine. Od 1940. prvi komercijalni infracrveni spektroskop je postao dostupan, a infracrvena spektroskopija je počela značajno da napreduje. Danas se NIR (bliska infracrvena) spektroskopija svrstava među najvažnije analitičke metode. Njene prednosti su joj omogućile da postane jedna od značajnih alatki za rešavanje različitih vrsta analitičkih problema u različitim oblastima, uključujući poljoprivredu, prehrambenu, hemijsku, farmaceutsku, tekstilnu, kozmetičku industriju, kao i industriju lekova (Batten 1998, Reeves & McCarty 2001, McClure 2003, Reich 2005). Brojni istraživači su koristili ovu metodu za brzo utvrđivanje biološke aktivnosti poljoprivrednog zemljišta, kao i za rutinsko ispitivanje teksture i sadržaja makro i mikro elemenata u zemljištu (Reeves et al. 2000, Confalonieri et al. 2001, Moron & Cozzolino 2003).

Proteini, ugljeni hidrati, ulja (ili masti) predstavljaju složene molekule koji su sastavljeni od prostih hemijskih komponenata, kao što su amino kiseline, monosaharidi, disaharidi, masne kiseline i glicerol. Molekuli osciliraju na frekven-

cijama koje odgovaraju talasnim dužinama u infracrvenom regionu elektromagnetnog spektra. NIR spektroskopska analiza je metod za sakupljanje i prevođenje tih oscilacija u uzorke, veoma brzom analitičkom procedurom bezbednom za okolinu.

Mnogi istraživači su zaključili da je NIR metoda ekonomična, jednostavna, brza i jedna je od najboljih metoda za analize velikih populacija u ranim generacijama u oplemenjivačkim programima (Panford 1987, Robbelen 1990, Tajuddin et al. 2002). Mogućnost brzog i nedestruktivnog određivanja kvaliteta zrna soje predstavlja jedan od glavnih faktora pri uspešnom oplemenjivanju soje na poboljšan hemijski sastav zrna.

Prilikom kalibracije i validacije, određeni broj uzoraka (kalibracioni set) mora biti analiziran korišćenjem i referentnog i NIR metoda, što znači da se praktično primenom ove dve procedure analiziraju različiti poduzorci svakog uzorka (Hruschka 1987).

Nakon konstrukcije nove kalibracione krive, potrebno je proveriti nagib i pomeranje kalibracione krive. Uzroci koji dovode do pomeranja kalibracione krive i promene nagiba su različiti i zavise od same konstrukcije instrumenta, uslova sredine u kojima se instrument nalazi, kvaliteta izvora svetlosti, kao i samih uzoraka koji se ispituju (Osborn & Stivenson 1987, Hong et al. 1994). U poljoprivredi su moguće razlike u nagibu i pomeranju kalibracione krive u zavisnosti od vegetacione sezone (Golic & Walsh 2006). Navedeni faktori, pojedinačno ili združeno, utiču na

S. Balešević-Tubić (✉) · V. Đorđević · V. Đukić · J. Miladinović · M. Tatić  
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Srbija  
e-mail: svetlana.tubic@ifvcns.ns.ac.rs

preciznost merenja, te je neophodno sprovesti stalnu kontrolu pomeranja i nagiba kalibracione krive kako bi merenja NIR spektroskopijom bila što pouzdanija.

### Materijal i metode

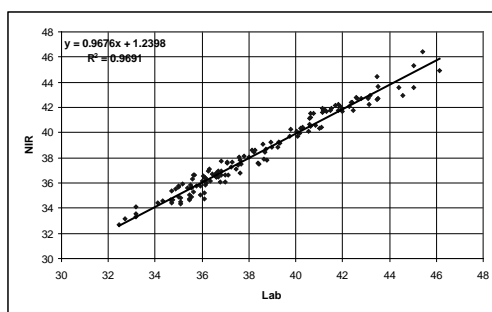
Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja ulja i proteina u semenu soje konstruisana je po metodologiji Balešević-Tubić i sar. (2007). Parametri stabilnosti kalibracionih kriva računati su na osnovu validacionog, nezavisnog seta uzoraka. Raspon vrednosti za sadržaj proteina u validacionom setu kretao se od 36% do 46%, dok je raspon sadržaja ulja bio od 15% do 23%. Sadržaj proteina u uzorcima određen je standardnom Kjeldahl metodom JUS/ISO 1871 (1992), dok je sadržaj ulja izražen preko udela heksanskog ekstrakta metodom JUS/ISO 695 (1991). Standardne hemijske analize sadržaja ulja i proteina u semenu soje urađene su u duplikatu i validacionom setu priključeni su samo oni uzorci čija je standardna laboratorijska greška bila manja od 0,5%. Za sva izračunavanja, laboratorijska vrednost sadržaja proteina i ulja u semenu soje iskazana je kao prosečna vrednost merenja standardnim tehnikama.

Parametri stabilnosti kalibracionih kriva izračunati su na osnovu linearne regresije laboratorijskih i NIR merenja. Pomeraj kalibracione krive izražen je kao razlika između aritmetičkih sredina laboratorijskih i NIR merenja. Nagib linearne regresije i pomeraj kalibracione krive testirani su t-testom.

### Rezultati i diskusija

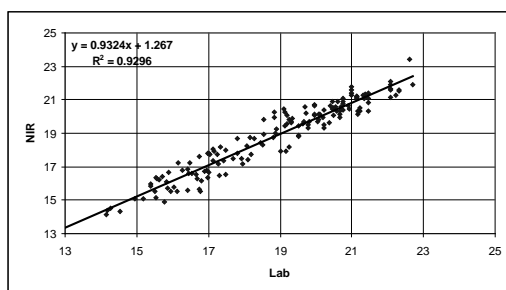
NIR instrument određuje sadržaj proteina i drugih komponenti merenjem logaritamskih vrednosti koje bi morale biti povezane sa količinom komponenti čiji je sadržaj određen nekim drugim metodom, referentni ili standardni metod. Referentne vrednosti se stavljaju u regresioni odnos sa vrednostima dobijenim NIR metodom da bi se dobile kalibracione konstante. Povećanje tačnosti kalibracionih podataka predstavlja rezultanta graničnih poboljšanja stvarne tačnosti, ukoliko je standardna greška referentnih podataka na početku bila manja od dobijene stvarne tačnosti odgovarajuće NIR kalibracije.

Utvrđena je bliska veza između laboratorijskih i NIR vrednosti za ispitivanje sadržaja proteina i ulja u semenu soje. Opseg kalibracije pokriva širok dijapazon očekivanih vrednosti merenja. U svetskoj kolekciji germplazme soje, sadržaj pro-



Grafikon 1. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja proteina u uzorcima semena soje

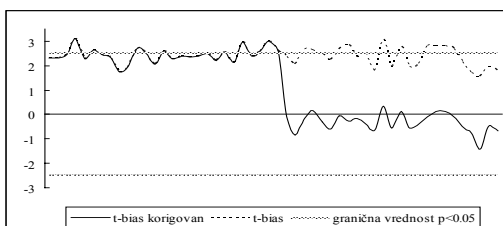
Graph 1. Calibration curve for protein content determination in soybean seed samples



Grafikon 2. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja ulja u uzorcima semena soje

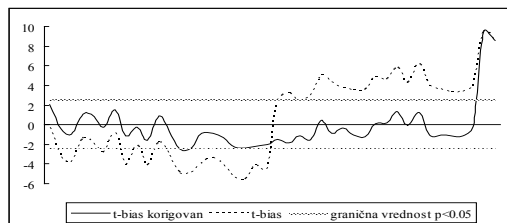
Graph 2. Calibration curve for oil content determination in soybean seed samples

teina u zrnu kreće se od 30% do 53%, dok je sadržaj ulja između 10% i 25% (Dong et al. 2004). S obzirom da su uzorci sa ekstremno niskim, odnosno ekstremno visokim sadržajem proteina i ulja veoma retki, kalibraciona kriva pokriva veliku većinu očekivanih vrednosti merenja (Graf. 1 i 2). Najpreciznija ocena tačnosti NIR spektroskopije utvrđena je kada su standardna greška kalibracije i standardna greška predviđanja bile korigovane za nepreciznost referentnih podataka (Sorensen 2002). Visoke vrednosti



Grafikon 3. Promena t-vrednosti za pomeraj krive: oscilacije

Graph 3. Changes in bias t-values: oscillations

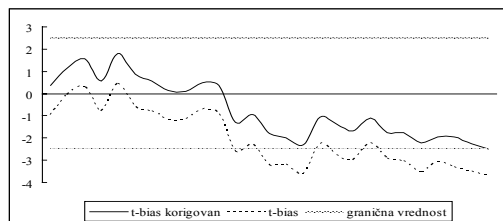


Grafikon 4. Promena t-vrednosti za pomeraj krive: skokovite promene

Graph 4. Changes in bias t-values: jump changes

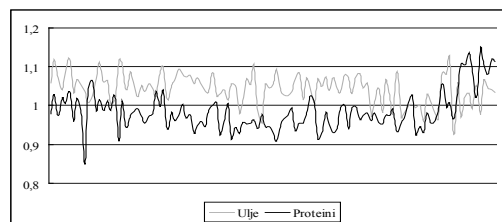
koeficijenta determinacije, za ispitivane konstituente u semenu soje, kao i niske vrednosti standardne greške kalibracije, pokazuju da postoji visoka međuzavisnost merenja laboratorijskim tehnikama i NIR tehnikom (Balešević-Tubić i sar. 2007).

Na osnovu višegodišnjeg praćenja parametara stabilnosti i preciznosti kalibracione krive za sadržaj proteina i ulja u zrnu soje, moguće je uočiti tri tipa pomeranja kalibracione krive: lagano pomeranje, skokovito i slabe oscilacije oko određene vrednosti (Graf. 3-5). Skokovito pomeranje kalibracione krive je najlakše uočiti i to bez svakodnevnih merenja referentnih uzoraka. Međutim, lagano pomeranje i slabe oscilacije kalibracione krive veoma je teško detektovati bez svakodnevnih merenja referentnih uzoraka. Pojava da uzorci iz različitih godina mogu uticati na pomeranje krive dobro je



Grafikon 5. Promena t-vrednosti za pomeraj krive: lagano pomeranje

Graph 5. Changes in bias t-values: slow changes



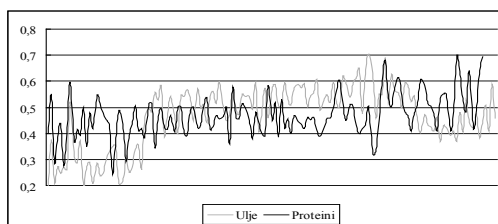
Grafikon 6. Promene nagiba kalibracione krive za sadržaj ulja i proteina

Graph 6. Calibration slope changes of oil and protein content

poznata u NIR spektroskopiji (Golic & Walsh 2006, Đorđević i sar. 2008).

Kada kalibraciona kriva osciluje oko granične vrednosti, neophodno je svakodnevno praćenje, kao i pravovremena i precizna korekcija pomeranja krive, čime se eliminiše greška pri merenju nepoznatih uzoraka.

Za sadržaj proteina i ulja u semenu soje praćen je i testiran nagib kalibracione krive (Graf. 6). Vrednost za nagib kalibracione krive bila je bliska vrednosti jedan i nije zabeleženo statistički značajno odstupanje. Ovakav nagib kalibracione krive pokazuje da su navedeni tipovi pomeranja kalibracione krive translatorni. Standardna greška predviđanja imala je vrednosti kao i prilikom razvijanja kalibracije, ukrštene provere i eksterne validacije kalibracije (Graf. 7).



Grafikon 7. Promene standardne greške predviđanja kalibracionih kriva za sadržaj ulja i proteina

Graph 7. Calibration standard error of predicting changes of oil and protein content

## Zaključak

Promene kalibracione krive za sadržaj proteina i ulja u semenu soje ukazuju da je jedino svakodnevnim praćenjem kalibracione krive moguće pravovremeno uočiti translatorno pomeranje krive i obaviti korekciju koja razlike u NIR i standardnim merenjima svodi na slučajno variranje.

Svakodnevno merenje referentnih uzoraka i izračunavanje parametara kalibracione krive oduzimaju malo vremena, a veoma efikasno obezbeđuju tačnost merenja nepoznatih uzoraka. Drugi način koji bi mogao da reši ovaj problem je konstrukcija kalibracione krive na osnovu više hiljada divergentnih uzoraka i upotreba složenijih statističkih metoda (Wesley et al. 1999). Ovakvo rešavanje problema pomeranja kalibracione krive je svakako trajnije, međutim, daleko je skuplje i prevazilazi potrebe kalibracije jednog NIR instrumenta za analizu hemijskog sastava semena soje.

## Literatura

- Balešević-Tubić S, Đorđević V, Tatić M, Kostić M, Ilić A (2007): Primena bliske infracrvene spektroskopije u određivanju sadržaja ulja i proteina u semenu soje. *Arhiv za poljoprivredne nauke* 246: 5-12
- Batten D G (1998) An appreciation of the contribution of NIR to agriculture. *J. Near Infrared Spectrosc.* 6: 163-172
- Confalonieri M, Fornasier F, Ursino A, Boccardi F, Pintus B, Odoardi M (2001): The potential of near infrared reflectance spectroscopy as a tool for the chemical characterisation of agricultural soils. *J. Near Infrared Spectrosc.* 13: 213-223
- Dong Y, Zhao L, Liu B, Wang Z, Jin Z, Sun H (2004): The genetic diversity of cultivated soybean grown in China. *Theor. Appl. Genet.* 108: 931-936
- Đorđević V, Balešević-Tubić S, Đukić V, Tatić M, Mikić A (2008): Parametri stabilnosti NIR merenja hemijskog sastava zrna soje. Multifunkcionalna poljoprivreda i ruralni razvoj, Zemun, Srbija: 4-5 decembar, 2008, 278-284
- Golic M, Walsh K (2006): Robustness of calibration models based on near infrared spectroscopy for the in-line grading of stonefruit for total soluble solids content. *Analytica Chimica Acta.* 555: 286-291
- Hong T L, Tsai S J, Tsou S C S (1994): Development of a sample set for soya bean calibration of near infrared reflectance spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* 2: 223-227
- Hruschka W (1987): Data Analysis: Wavelength selection methods. In: Williams, P and Norris K (Eds), *Near-infrared technology in agriculture and food Industries*, American association of cereal chemistry, St. Paul, Minnesota, USA, 185-200
- JUS/ISO (1992): Poljoprivredno-prehrambeni proizvodi – opšta uputstva za određivanje azota metodom po Kjeldahlu, 1871:1992
- JUS/ISO 695:199 (1991): Određivanje ulja: Određivanje heksanskog ekstrakta (ili petrolearskog ekstrakta) nazvanog "količina ulja".
- McClure W F (2003): 204 years of near infrared technology: 1800-2003. *J. Near Infrared Spectrosc.* 11: 487-518
- Moron A, Cozzolino D (2003): Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy to study physical properties and microelements in soils. *J. Near Infrared Spectrosc.* 11: 145-154
- Osborne B, Stevenson S (1987): Near-infrared resarc in Europe. In: Williams, P and Norris K (Eds), *Near-infrared technology in agriculture and food Industries*, American association of cereal chemistry, St. Paul, Minnesota, USA, 185-200
- Panford J (1987): Application of Near-Infrared reflectance spectroscopy in North America. In: Williams, P, Norris, K. (Eds): *Near-Infrared Technology in Agriculture and Food Industries*. American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, Minnesota, USA, 201-212
- Reeves J B, McCarty G W, Meisinger J J (2000): Near infrared reflectance spectroscopy for the determination of biological activity in agricultural soils. *J. Near Infrared Spectrosc.* 8: 161-170
- Reeves J B, McCarty G W (2001): Quantitative analysis of agricultural soil using near infrared reflectance spectroscopy and fibre-optic probe. *J. Near Infrared Spectrosc.* 9: 25-34
- Reich G (2005): Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* 57: 1109-1143
- Robbelen G (1990): Mutation breeding for quality improvement: A case study for oilseed crops. *Mutation Breeding Review*, n. 6, FAO/ IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna
- Sorensen L K (2002): True accuracy of near infrared spectroscopy and its dependence on precision of reference data. *J. Near Infrared Spectrosc.* 10: 15-25
- Tajuddin T, Watanabe S, Masuda R, Harada K, Kawano K (2002): Application of near infrared transmittance spectroscopy to the estimation of protein and lipid contents in single seeds of soybean recombinant inbred lines for quantitative trait loci analysis. *J. Near Infrared Spectrosc.* 10: 315-325
- Wesley I, Uthayakumaran S, Anderssen R, Cornish G, Bekes F, Osborne B, Skerritt J (1999): A curve-fitting approach to the near infrared reflectance measurement of wheat flour proteins which influence dough quality. *J. Near Infrared Spectrosc.* 17: 229-240

## Reliability of NIR Method in Protein and Oil Content Determination in Soybean

Svetlana Balešević-Tubić · Vuk Đorđević · Vojin Đukić · Jegor Miladinović · Mladen Tatić

Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

**Summary:** A primary characteristic of diffuse reflectance spectroscopy is fast and non-destructive determination of constituent concentration in products. The main goal is to find the nature of absorption (depending of wave length) and compare it with stable standard. NIR spectroscopy is a technology based on real number of molecules of each constituent and represents highly applicable analytical method. After calibration development or calibration transfer from one to another NIR instrument, it is necessary to verify the slope and bias of calibration. Results from multi year experiments show bias changes, while slope was constant, implicating that calibration changes had translator nature.

**Key words:** calibration, NIR spectroscopy, oil content, protein content, soybean