

Anniina Korhonen

# **NIR-laitteen kalibrointi härkävavun proteiinipitoisuudelle**

Opinnäytetyö

Kevät 2018

SeAMK Ruoka

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

**SeAMK** 

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU  
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

## Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: SeAMK Ruoka

Tutkinto-ohjelma: Bio- ja elintarviketekniikan tutkinto-ohjelma

Tekijä: Anniina Korhonen

Työn nimi: NIR-laitteen kalibrointi härkäpavun proteiinipitoisuudelle

Ohjaaja: Sarita Ventelä

Vuosi: 2018

Sivumäärä: 39

Liitteiden lukumäärä: 4

---

Tässä opinnäytetyössä tavoitteena oli tehdä kalibrointi ja ohjeistus kalibroinnin tekemiseen Seinäjoen ammattikorkeakoulun bio- ja elintarviketekniikan laboratoriossa olevalle Perten DA 7250 NIR analyysilaitteelle (Near Infrared spectrometry). Menetelmänä kalibroinnissa käytettiin ulkoista kalibrointia.

Näytteinä työssä oli härkäpapujauhoja, joista tutkittiin proteiinipitoisuutta. Kalibroinnin tekemiseen käytettiin 51 näytteen näytesarjaa. Datana kalibroinnissa käytettiin tutkittavien näytteiden NIR spektriä, sekä toisessa laboratoriosta saatuja NIR määrittystuloksia joita tässä työssä käytetään näytteiden laboriotuloksina. NIR spektrin ja laboriotulosten välille laskettiin The Unscrambler X-ohjelmaa käyttäen regressiomalli pienimmän neliösumman menetelmällä. Osasta näytteitä määritettiin proteiinipitoisuus myös kemiallisesti Kjeldahl-menetelmällä. Kjeldahl-menetelmällä saatuja proteiinipitoisuustuloksia verrattiin näytteiden laboriotuloksiin ja arvoitiin Kjeldahl-menetelmän toimivuutta.

Työn tuloksena Perten DA 7250 NIR analyysilaitte kalibroitiin härkäpapujauhon proteiinipitoisuuden määrittystä varten. Tässä opinnäytetyössä tehty kalibrointi toimii NIR laitteella, mutta laitteen antamissa tuloksissa on noin 2–5% virhe. Kalibroinnin lisäksi laadittiin kirjallinen ohje Perten DA 7250 analysaattorin kalibrointiin The Unscrambler X-ohjelmaa käyttäen.

Avainsanat: NIR, kalibrointi, elintarvikkeet, proteiinit, PLS

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## **Thesis abstract**

Faculty: School of Food and Agriculture

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Specialisation: Food Technology

Author/s: Anniina Korhonen

Title of thesis: Calibration of Near-infrared Spectroscopy for Protein Content of Fava Beans

Supervisor(s): Sarita Ventelä

Year: 2018 Number of pages: 39 Number of appendices: 4

---

The objective of this thesis was to do calibration and instructions for the calibration of Perten DA 7250 near-infrared spectroscopy to the laboratory of the food processing and biotechnology unit of Seinäjoki University of Applied Sciences. The calibration method was external calibration.

Samples of fava bean flours and their protein contents were examined. A sample set of 51 samples was used for the calibration. The NIR spectra and earlier laboratory results were used as raw data. The regression model was calculated from the NIR spectra and the laboratory results with help of the least squares method and by using the Unscrambler X program. The protein content was measured by the Kjeldahl method of some of the samples. The protein content obtained with the Kjeldahl method was compared with the laboratory results of the samples.

As the result of the work, near-infrared spectroscopy was calibrated to determine the protein content of fava beans. The calibration in this study was successful, but the results have a 2-5% error. A written instruction was prepared for the calibration.

Keywords: NIR, calibration, Food products, proteins, PLS,

## SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ.....	4
Käytetyt termit ja lyhenteet .....	6
1 JOHDANTO .....	7
2 PROTEIINIT ELINTARVIKKEISSA .....	8
2.1 Elintarvikkeiden proteiinipitoisuuden määrittäminen.....	8
2.2 Elintarvikkeiden proteiinipitoisuuden laskeminen .....	10
3 INFRAPUNASPEKTROSKOPIA (IR, infrared spectrometry) .....	12
3.1 NIR (Near Infrared) .....	13
3.2 Perten DA 7250.....	13
4 KALIBROINTI.....	15
4.1 Kalibrointimenetelmät.....	16
4.2 Mittaustulosten luotettavuus.....	16
4.3 Lineaarinen regressio ja pienimmän neliösumman menetelmä .....	17
4.4 The Unscrambler X .....	18
5 KALIBROINTI JA KALIBROINTIOHJEEN TEKEMINEN.....	19
5.1 Näytteiden käsittely ja syöttäminen NIRiin .....	19
5.2 Tilastolliset analyysit ja tiedon siirtäminen laitteiden välillä .....	22
5.3 Kalibroinnin testaus.....	26
5.4 Kjeldahl-poltot työselostus .....	27
5.5 Kjeldahl-tulosten ja laboratoriotulosten vertailu.....	31
6 YHTEENVETO.....	33
7 POHDINTA .....	34
LÄHTEET .....	36
LIITTEET.....	39

## **Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo**

Kuva 1. Perten DA 7250 lähi-infrapunaspektroskopia.....	14
Kuva 2. Uuden profiilin luominen Perten DA 7250 -analysaattoriin.....	20
Kuva 3. Näytteet analysoitiin pienissä kyveteissä. ....	21
Kuva 4. Uuden näytteen syöttäminen NIRiin.....	22
Kuva 5. Härkäpapunäytteiden spektri. ....	23
Kuva 6. PLS regressiomallin kuvaaja.....	24
Kuva 7. Kalibrointitiedoston asetukset. ....	25
Kuva 9. Kjeldahl-polttoputket, joissa mitattuna näyte ja reagenssit.....	28
Kuva 10. Kjeldahl-polttolaitteisto. ....	28
Kuva 11. Näytteiden tislaukset 35% NaOH-liuoksella.....	29
Kuva 12. Näytteet titrattiin 0,1M HCl-liuoksella. ....	30
Kuva 13. Titratut liuokset. ....	31
Kuvio 1. Näytteiden proteiinipitoisuudet Boreal Kasvinjalostus Oy:n määrittämänä ja Kjeldahl-menetelmällä määritettynä. ....	32
Taulukko 1. Kalibroinnin testaus ja saatujen tulosten vertailu. ....	26

## Käytetyt termit ja lyhenteet

<b>Aallonpituus</b>	Jaksollisesti toistuvan liikkeen jakson pituus.
<b>Kalibrointi</b>	Toimenpiteet, joiden avulla annetuissa olosuhteissa saadaan mittalaitteen, mittausjärjestelmän tai kiintomitan näyttämien arvojen ja mittasuureen vastaavien arvojen välinen yhteys.
<b>Kjeldahl-menetelmä</b>	Typpipitoisuuden määritysmenetelmä.
<b>Korrelaatio</b>	Tilastotieteessä ja todennäköisyyslaskennassa käytetty käsite, joka kuvaa kahden muuttujan välistä riippuvuutta.
<b>Kyvetti</b>	Optisissa mittauksissa käytetty mittausastia.
<b>NIR</b>	Near infrared spectroscopy suomeksi lähi-infrapunaspektroskopia on spektroskopian menetelmä, jossa tutkitaan molekyylin rakennetta sähkömagneettisen säteilyn avulla.
<b>Perten DA 7250</b>	Perten Instrumentsin valmistama NIR analysaattori, joka on suunniteltu elintarviketekniikan ja maatalouden analyysien tekemiseen.
<b>PLS</b>	Partial least squares suomeksi pienimmän neliösumman menetelmä.

# 1 JOHDANTO

Seinäjoen ammattikorkeakoulun (SeAMK) bio- ja elintarviketekniikan laboratoriossa on koostumusmäärittäykseen tarkoitettu Perten DA 7250 lähi-infrapunaspektrometria (NIR). Jatkossa tässä työssä Perten DA 7250 -laitteesta käytetään nimitystä NIR. NIR:llä voidaan määrittää orgaanisten aineiden kuten lihan, kalan, maidon ja rehujen koostumuksia. Yleisimpiä tutkittavia pitoisuuksia ovat hiilihydraatti, kosteus, proteiini ja tuhka. Laitteen toiminta perustuu sähkömagneettisen säteilyn imeytymiseen 780-2500nm aallonpituuksien välillä. Laite sisältää valmiita kalibrointeja, mutta laitetta ei ole aiemmin kalibroitu itse.

Opinnäytetyössä yhteistyökumppanina toimii Boreal Kasvinjalostus Oy, joka on toimittanut kalibroinnin tekemistä varten 79 kappaletta jauhettuja härkäpapunäytteitä sekä näytteiden NIR-tulokset valkuais- ja kosteuspitoisuuksista. Tässä työssä Boreal Kasvinjalostus Oy:ltä saatuja NIR-tuloksia käytetään näytteiden laboratoriotuloksina. Ohjeita ja apua opinnäytetyön tekemiseen on saatu laitteen valmistajalta Perten Instrumentsilta sekä Perten Instrumentsin laitteita maahantuovalta ja huoltavalta Sensorcell Oy:ltä.

Työn tavoitteena oli tehdä Seinäjoen ammattikorkeakoulun bio- ja elintarviketekniikan laboratorion NIR analysaattoriin kalibrointi härkäpapujauhojen proteiinipitoisuuden määrittäystä varten The Unscrambler X-ohjelmaa käyttäen, sekä laatia ohjeet kalibroinnin tekemiseen. Kalibrointia varten käytössä olevista näytteistä valittiin näytesarja, jonka NIR tuloksia verrattiin laboratoriotuloksiin. Tuloksien välille laskettiin The Unscrambler X-ohjelmaa käyttäen regressiomalli pienimmän neliösumman menetelmällä. Tavoitteena oli myös määrittää näytteiden proteiinipitoisuus kemiallisella Kjeldahl-menetelmällä ja arvioida Kjeldahl-menetelmällä saatujen proteiinipitoisuustulosten luotettavuutta vertaamalla niitä näytteiden laboratoriotuloksiin.

## 2 PROTEIINIT ELINTARVIKKEISSA

Elintarvikkeissa tärkeimpiä proteiinin lähteitä ovat maitotaloustuotteet, viljatuotteet ja lihavalmisteet. Proteiinit koostuvat 20 erilaisesta aminohaposta, jotka ovat kiinni toisissaan peptidisidoksilla. Aminohapoista 10 on välttämättömiä eikä elimistö pysty niitä itse valmistamaan, vaan ne tulee saada ravinnosta. Proteiinit kuuluvat energia- ravintoaineisiin ja niillä on useita merkityksiä tutkittaessa elintarvikkeen rakennetta ja aistinvaraista laatua. (Mutanen & Voutilainen, 2010, 135; Proteiinit, [viitattu 22.1.2018].)

Proteiinin rakenne voidaan jakaa neljään eri asteeseen: primääri-, sekundääri-, tertiääri- ja kvaternäärirakenteeseen. Proteiinien rakenne sisältää sekä happamia että emäksisiä ryhmiä, jonka ansioista proteiinit voivat ympäristön pH:n mukaan toimia joko happona tai emäksenä. (Mattila, Piironen & Ollilainen 2001, 121–123.)

### 2.1 Elintarvikkeiden proteiinipitoisuuden määrittäminen

Elintarvikkeiden raakaproteiinimääritys alkaa selvittämällä elintarvikkeessa olevan typhen määrä. Proteiinit koostuvat aminohapoista, jotka sisältävät paljon typpeä. Elintarvikkeissa on myös muita typpeä sisältäviä yhdisteitä, kuten vapaat aminohapot, peptidit, amiinit, amidit, nukleiinihapot, fosfolipidit, aminosokerit, eräät vitamiinit, urea, nitraatit ja nitriitit. (Raakaproteiinin määrittäminen elintarvikkeesta, [viitattu 3.4.2017].)

**Kjeldahl-menetelmä.** Kjeldahl-menetelmällä voidaan määrittää orgaanisen ja epä- orgaanisen aineen typpipitoisuus. Nopean ja yksinkertaisen menetelmän typhen määrittämiseen esitteli John Kjeldahl Tanskassa vuonna 1883. Kjeldahl kehitti typhen määrittäminen menetelmän työskennellessään Carlsbergin olutpanimossa tarkkaillessaan mallastusprosesseja. Menetelmä on edelleen täysin toimiva, vaikkakin tekniikka ja laitteisto ovat vuosien varrella muuttuneet. (A Guide To Kjeldahl Nitrogen Determination Methods And Apparatus, [viitattu 10.4.2017].)

Kjeldahl-määrittämisessä on kolme työvaihetta: poltto, vesihöyrytisläus ja titraus. Poltossa orgaaninen aine hapetetaan katalyyttien ja rikkihapon avulla hiilidioksidiksi,



vedeksi ja ammoniakiksi. Polton aikana vesi, hiilidioksidi ja rikkihaposta muodostuvat rikkidioksidi haihtuvat pois ja ammoniakki sitoutuu polton aikana rikkihappoliuoksessa ammoniumsulfaatiksi. Katalyyttinä voidaan käyttää kuparia, seleeniä tai jotakin muuta raskasmetallisuolaseosta. (Raakaproteiinin määrittäminen elintarvikkeesta, [viitattu 3.4.2017].)

Kjeldahl-menetelmä koostuu useasta erilaisesta työvaiheesta ja käytössä on monia laitteita ja kemikaaleja. Menetelmän sisältäessä useita muuttujia on työskennellessä oltava tarkka ja tiedostettava virheiden mahdollisuus. Kjeldahl-menetelmää käytettäessä muuttujia ovat esimerkiksi lämpötilat, lämmitysajat, katalysaattorit ja moninaiset työvaiheet. (Dumas nitrogen and total nitrogen content, [viitattu 4.12.2017].)

**Dumas-menetelmä.** Dumas-menetelmän on kehittänyt ranskalainen kemisti Jean-Baptiste-André Dumas. Menetelmässä orgaanisista yhdisteistä määritetään typpipitoisuus homogenoitua näytettä polttamalla. Näytteiden käsittelyssä on kolme vaihetta. Näytteet poltetaan nopeasti 1000 °C lämpötilassa puhtaan hapen kanssa. Palamistuotteena syntyy vettä, hiilidioksidiä ja erilaisia typpioksideja sisältävä kaasuseos, joka johdetaan 650 °C: kseen lämmitetyn kuparia sisältävän pelkistyskammion läpi. Käsittely muuntaa typpioksidit normaaliksi typeksi ja poistaa ylimääräisen veden. Jäljelle jäänyt vesi ja hiilidioksidi poistuvat prosessissa olevien ”loukkujen” avulla. Typen kokonaispitoisuus mitataan lämmönjohtavuustunnistimella typpikaasusta. Typpipitoisuudet ilmoitetaan prosentteina tai milligrammoina. ISO 1663-1:2008 standardissa on ilmoitettu muuntokertoimet, joita käyttäen eri tuotteille saadaan mitatun typpimäärän mukaan laskettua proteiinipitoisuus. (Dumas nitrogen and total nitrogen content, [viitattu 4.12.2017]; Chastain, [viitattu 25.4.2018]; Müller 2017, 2.)

**Menetelmien vertailu.** Verrattaessa toisiinsa Dumas-menetelmää ja Kjeldahl-menetelmää, on Dumas-menetelmä tekotavaltaan yksinkertaisempi ja automatisoidumpi kuin Kjeldahl-menetelmä. Dumas-menetelmällä typpipitoisuuden määrittäminen kestää muutaman minuutin, kun taas Kjeldahl-menetelmällä määrittäminen kestää useita tunteja. Dumas-menetelmässä ei käytetä kemikaaleja eikä katalysaattoreita näytteen hajottamiseen, kun taas Kjeldahlissa käytetään erilaisia katalysaattoreita ja rikkihappoa. (Müller 2017, 2.)

Dumas-menetelmällä saadut tulokset ovat yleensä hieman korkeampia. Korkeamat tulokset johtuvat siitä, että Dumasin menetelmällä näytteestä saadaan havaittua myös epäorgaaninen typpi, kun taas Kjeldahl-menetelmällä saadaan tutkittua vain orgaanisen typen määrää. Yleisesti rehu- ja elintarvikenäytteiden proteiinipitoisuus määritetään käyttäen Kjeldahl-menetelmää ja yleistä typen muuntokerrointa 6,25. (Dumas nitrogen and total nitrogen content, [viitattu 4.12.2017]; Müller 2017, 2–4.)

## 2.2 Elintarvikkeiden proteiinipitoisuuden laskeminen

Määritettäessä kemiallisesti elintarvikkeen typpipitoisuutta, tehdyistä mittauksista ja niiden tuloksista tulee kirjata määrittämisen aikana tarkkoja muistiinpanoja. Kjeldahl-menetelmässä näytteessä olevan typen määrä lasketaan kaavasta (1),

$$m = M \cdot c \cdot V \quad (1)$$

jossa,

$m$  = typen määrä, mg

$M$  = typen atomimassa, 14 mg/mmol

$c$  = suolahapon konsentraatio, 0,1 mmol/ml

$V$  = suolahapon kulutus - nollanäytteen kulutus

Typen määrä prosentteina lasketaan kaavasta,

$$\% \text{typpeä} = \frac{\text{typen määrä (mg)}}{\text{näytteen paino (mg)}} \cdot 100 \quad (2)$$

Näytteen proteiinipitoisuus lasketaan kaavasta,

$$\text{Proteiini \%} = \text{typpeä \%} \cdot \text{muuntokerroin } 6,25 \quad (3)$$

Typen määrä prosentteina lasketaan kaavan (2) mukaisesti. Näytteen proteiinipitoisuus lasketaan muuntamalla näytteen sisältämä typpi proteiiniksi kaavalla (3). Muuntokerroin 6,25 perustuu olettamukseen, että proteiinit sisältävät 16 % typpeä, jolloin  $100/16 = 6,25$ . Sama yleistypenmuuntokerroin on ollut käytössä jo satojen vuosien ajan ja on vielä tänäkin päivänä virallinen elintarvikkeiden proteiinipitoisuuden

määrittämisen muuntokerroin. (Salo-Väänänen 1996, 11–13; Eviran ohje 17030/1, [viitattu 27.10.2017].)

Väitöskirjassaan Elintarvikkeiden proteiinipitoisuuden määrittäminen niiden typpi- ja aminohappopitoisuuden avulla Salo-Väänänen (1996, 12–13) esittää kokonaistyyppipitoisuuteen perustuvassa proteiininmäärityksessä olevan merkityksellisiä heikkouksia. Hän pohtii typen muuntokertoimen 6,25 olevan harhaanjohtava. Muuntokertoimella 6,25 on alun perin ollut tarkoitus muuntaa eristetyistä proteiinifraktioista määritetty tyyppipitoisuus proteiinipitoisuudeksi. Laskettaessa elintarvikkeen tyyppipitoisuutta proteiinipitoisuudeksi muuntokerrointa 6,25 käyttäen lasketaan proteiinipitoisuuteen samanarvoisina ainesosina elintarvikkeessa olevien proteiinien typpi, sekä tyyppiä sisältävät muut yhdisteet. Muuntokerroin 6,25 ei myöskään ole Salo-Väänänen mukaan pätevä kaikille elintarvikkeille niiden erilaisten tyyppipitoisuuksien takia.

Salo-Väänänen (1996, 1–12) on väitöskirjassaan todennut typen muuntokertoimen 6,25 ylläriävän elintarvikkeiden proteiinin määrää ja hänen mukaansa kertoimen käyttäminen esimerkiksi elintarvikkeiden pakkausmerkintöjä laadittaessa on kyseenalaista. Tutkimuksessaan Salo-Väänänen on määrittänyt aminohappo- ja kokonaistyyppipitoisuuksien avulla uudet typenmuuntokertoimet nettoproteiinipitoisuuden laskemista varten kuudelle eri elintarvikeryhmälle. Tutkimuksensa perusteella hän suosittelee elintarvikkeille uutta yleistypenmuuntokerrointa 5,33.

### 3 INFRAPUNASPEKTROSKOPIA (IR, infrared spectrometry)

Orgaanisista näytteistä tehtävät analyysit kehittyvät jatkuvasti. Analyysimenetelmien kehittymistä edistää tieto yhdisteiden fysikaalisista ominaisuuksista ja kemiallisten tutkimusmenetelmien automatisointi. Tänä päivänä NIR-spektroskopiaa käytetään yleisesti elintarvike- ja rehuteollisuudessa tuotannon aikana tehtävissä rutiinimittauksissa. (Dufour 2009, 3–25.)

Valoa ja infrapunaspektrometriaa on tutkittu vuosisatojen ajan. Valon teoriaa ovat pohtineet niin muinaiset kreikkalaiset kuin Isaac Newton. Kreikkalaisen Demokritoksen mukaan ruumiiden valaiseminen saa aikaan säteileviä hiukkasia jotka ovat vuorovaikutuksessa silmien kanssa. Vuonna 1637 ranskalainen filosofi ja matemaatikko René Descartes julkaisi kirjoitelman matemaattisesta yhtälöstä, joka tunnetaan nykyisinkin lakina Sin:istä. 1600-luvun loppupuolella Isaac Newton alkoi tutkia valkoista valoa ja sen hajoamista prisman avulla. Vuonna 1690 hollantilainen fyysikko totesi valon alkavan värähtelevästä pisteestä ja leviävän pallomaisesti ympäristöönsä jota kutsutaan eetteriksi. 1800-luvulla pystyttiin osoittamaan, että valo on aaltoileva ilmiö, jonka nopeutta voidaan mitata. Moderni valonteoria on kehitetty 1900-luvun alussa ja perustuu olettamukseen sähkömagneettisen kentän aalloitusta. (Dufour 2009, 3–25.)

IR-menetelmä perustuu tutkittavana olevan näytteen kykyyn absorboida infrapunasäteilyä. Infrapunaspektrometrialla voidaan tutkia molekyylin rakennetta. Molekyylien rakenteissa on säännönmukaisuuksia, jotka aiheuttavat infrapunasäteilyn emissiota tai absorptiota. Jokaisella molekyylillä on olemassa taajuus joka aiheuttaa molekyylissä värähtelyä luonnostaan. Jotta Infrapunasäteily voisi absorboitua näytteen molekyyleihin täytyy säteilyn värähdellä samalla taajuudella näytteen molekyylein kanssa. Mikäli värähtelytaajuudet eroavat toisistaan kulkee infrapunasäteily näytteen läpi. IR-spektristä voidaan katsoa millä aaltoluku alueella IR-säteet ovat absorboituneet näytteeseen. Puhuttaessa infrapunasäteilystä tarkoitetaan sellaista säteilyaluetta, joka sijaitsee näkyvän valon ja mikroaaltojen välissä. Infrapunaspektri voidaan jakaa kolmeen eri alueeseen aaltolukujen perusteella: kauko-, keski- (MIR) ja lähi-infrapuna (NIR). IR-spektrometriaan perustuvia analyysimenetelmiä voidaan käyttää lähes minkä tahansa aineen tutkimiseen. Kemiallisella koostumuksella ja

aineen olomuodolla ei ole vaikutusta siihen voidaanko ainetta tutkia, mutta niillä on suuri vaikutus näytteenkäsittelyssä ja näytetekniikkaa valittaessa. (Raakaproteiinin määrittäminen elintarvikkeesta, [viitattu 3.4.2017]; Keinänen 2012, 9–10; Jaarinen & Niiranen 2008, 97.)

### **3.1 NIR (Near Infrared)**

Lähi-infrapunaspektroskopiassa tutkittavaan näytteeseen kohdistetaan lähi-infrapuna valo. Osa säteilystä absorboituu näytteeseen ja osa heijastuu pois. Lähi-infrapunaspektroskopiolla mitataan pois heijastuneen valon määrää. Säteilyn absorboitumisen aiheuttavat orgaanisissa yhdisteissä olevat C–H, O–H, ja N–H -sidokset. Se miten paljon valoa näytteeseen absorboituu, vaihtelee aallonpituuden, näytteessä olevien absorboivien sidosten ja näytteen fysikaalisen rakenteen mukaan. (Sipilä & Nousiainen 2006, 1–2.)

Lähi-infrapunaspektroskopia (NIR, Near Infrared) on menetelmä jota elintarviketeollisuus ja -tutkimus käyttävät koostumusmäärittysten tekemiseen. NIRin etuna on, että näytettä ei tarvitse esikäsitellä. Laitetta voidaan käyttää analysoitaessa orgaanisia yhdisteitä esimerkiksi elintarvikkeita, lihaa, maitoa ja rehuja. Laitteessa olevat NIR analysaattorit mittaavat näytteessä olevien sidoksien värähtelyä ja värähtelyn voimakkuutta kahden nanometrin välein. Yksi mittaustulos koostuu sadoista lyhyen ajan sisällä tehdyistä mittauksista. Haasteen NIRin käyttöön aiheuttaa laitteen kalibrointi joka tehdään yleensä laajemmin vain laitetta käyttöönotettaessa. (Nurmela 2003 [viitattu 24.4.2018].; Laiteohjeet 2015.)

### **3.2 Perten DA 7250**

Perten DA 7250 (kuva 1) on koostumusmäärittäykseen tarkoitettu lähi-infrapunaspektrometria. Nimen kirjaimet DA tulevat sanoista Diode Array, joka tekniikkana tuo monia mahdollisuuksia laitteita suunniteltaessa ja mahdollistaa tarkkojen analyysien tekemisen sekä laitteen helppokäyttöisyyden. Laite on nopea ja pystyy keräämään liikkuvasta näytteestä useita spektrejä sekunnissa. Laitteesta on suunniteltu kaksi

versiota, joista toinen laboratorio-olosuhteisiin ja toinen paremmin suojattu laite käytettäväksi tuotantotiloissa. Laitteella on mahdollista analysoida lähes minkälaisia näytteitä tahansa. Laitetoimittajalta saatavissa olevat kalibroinnit kattavat laajan tuotevalikoiman ja käytetyt parametrit on rakennettu maailmanlaajuisesta tietokannasta, joka on koottu analysoimalla satoja tuhansia näytteitä. Perten DA 7250-analysaattori on ISO 12099-standardin mukainen. (Diode Array 7250; User Manual DA 7250.)



Kuva 1. Perten DA 7250 lähi-infrapunaspektroskopia (Perten DA 7250-analysaattori [viitattu 22.2.2018]).

## 4 KALIBROINTI

Laki vaatimusten mukaisuuden arviointipalveluiden pätevyyden toteamisesta (L 25.11.2005/920), määrittelee kalibroinnin seuraavasti:

Toimenpiteitä, joiden avulla yksilöidyissä olosuhteissa saadaan mittauslaitteen, mittausjärjestelmän näyttämien, kiintomitan tai vertailuaineen edustamien suureen arvojen ja vastaavien mittanormaaleilla toteutettujen arvojen välinen yhteys.

Analyttisessä kemiassa tutkittavana olevan tunnetun yhdisteen pitoisuus saadaan selville kvantitatiivisen- eli määrällisen tutkimuksen avulla. Kvantitatiivisen analyysin eli kvantitoinnin voi suorittaa liuoskemian menetelmillä tai käyttäen instrumenttianalytiikan mittausmenetelmiä. Tutkittavan analyytin pitoisuus määritetään havainnoimalla jotakin analyytissä olevaa fysikaalista ominaisuutta. (Lehtonen & Sihvonen 2009, 81–89; Jaarinen & Niiranen 2008, 18–29.)

Kalibroinnissa tutkittavia analyyttejä verrataan sellaisiin vertailunäytteisiin, joiden pitoisuus tiedetään tarkasti. Vertailuun käytettävät näytteet sisältävät tutkittavaa ainesosaa erilaisina pitoisuuksina. Erilaisten pitoisuuksien avulla saadaan määritettyä mittaussignaalin taso. Kalibroitikäyrä on mittaussignaalin tason ja tutkittavana olevan näytteen välinen yhteys. Mittaussignaalin on muututtava näytteen pitoisuuden muuttuessa huomattavasti, jotta erilaiset pitoisuudet on mahdollista määrittää. (Lehtonen & Sihvonen 2009, 81–89; Jaarinen & Niiranen 2008, 18–29.)

Mittalaitteilla saatava mittaussignaali ei yleensä suoraan kerro haluttua lukuarvoa tutkittavana olevalle suureelle, vaan mittaussignaali muutetaan halutun laiseksi lukemaksi käyttäen apuna kalibroitikuvaajaa. Kalibroitia tehdessä selvitetään mittalaitteen tuottamassa signaalissa eli vasteessa tapahtuva muutos, kun mitattavassa kohteessa eli herätteessä tapahtuu vastaavanlainen muutos. (Lehtonen & Sihvonen 2009, 81–89; Jaarinen & Niiranen 2008, 18–29.)

## 4.1 Kalibrointimenetelmät

Tehtäessä kalibrointia kemiallisia analyysejä varten voidaan käyttää kolmea erilaista kalibrointimenetelmää: ulkoinen kalibrointi, sisäisen standardin menetelmä ja standardin lisäysmenetelmä. Standardiksi tai mittanormaaliksi kutsutaan sellaista liuosta jonka pitoisuus tunnetaan tarkasti. (Jaarinen & Niiranen 2008, 20–21.)

Yleisimmin käytetty kalibrointimenetelmä on ulkoinen kalibrointi. Ulkoisessa kalibroinnissa selvitetään mittalaitteen signaalin tasot sellaisilla kalibrointiliuoksilla, joiden pitoisuus tunnetaan tarkasti. Mittauspisteiden avulla piirretään kalibrointisuora. Mittalaitteen signaalia tutkitaan mahdollisimman laajalla pitoisuusalueella, joka saadaan aikaan käyttämällä suurta määrää liuoksia, joiden pitoisuus vaihtelee. Ulkoisen kalibroinnin menetelmällä aikaan saatua kalibrointisuoraa voidaan käyttää useamman mittaussarjan kanssa, mittaamatta sitä välillä uudelleen. Kalibroinnin oikeellisuutta voidaan pitää yllä lisäämällä näytesarjaan säännöllisin väliajoin tarkkailuliuos. (Jaarinen & Niiranen 2008, 20–21.)

## 4.2 Mittaustulosten luotettavuus

Mittaustulosten luotettavuus perustuu mittausten toistettavuuteen ja jäljitettävyyteen. Mitattaessa useaan kertaan samaa asiaa, tulee mittaustulosten olla yhtäläisiä mittalaitteen mittaustarkkuus huomioiden. Mittaustuloksen jäljitettävyys perustuu mittalaitteen kalibrointiin, jossa mittalaitteesta saatua lukemaa verrataan mittanormaalin antamaan arvoon. (Jäljitettävyys, [viitattu 5.4.2017].)

Laki mittayksiköistä ja mittanormaalijärjestelmästä (L 10.12.1993/1156) 1 luvun 2§ määrittelee mittanormaalien ja jäljitettävyyden seuraavasti.

Mittanormaali. Kiintomittaa, mittauslaitetta, vertailuainetta tai mittausjärjestelmää, jolla määritellään, toteutetaan, säilytetään tai toistetaan suureen mittayksikkö taikka suureen yksi tai useampi vertailuarvo.

Jäljitettävyys. Mittaustuloksen tai mittanormaalien yhteyttä kansallisiin tai kansainvälisiin mittanormaaleihin taikka muihin vastaaviin ilmoitettuihin vertailupisteisiin sellaisen aukottoman vertailuketjun välityksellä, jossa on ilmoitettu kaikkien vertailujen epävarmuudet.



### 4.3 Lineaarinen regressio ja pienimmän neliösumman menetelmä

Kokeellisella tutkimuksella voidaan selvittää kahden tai useamman muuttujan välistä yhteyttä. Regressio- ja korrelaatioanalyysi ovat niitä menetelmiä joiden avulla kahden tai useamman muuttujan välistä yhteyttä voidaan tilastollisesti selvittää. Korrelaatioanalyysillä voidaan tarkastella kahden muuttujan välistä yhteisvaihtelua. Korrelaatiokerroin taas kuvaa kuinka voimakas lineaarinen yhteys muuttujien välillä on. Pelkästään korrelaatiokertoimen avulla ei ole mahdollista tietää miten tutkittavien muuttujien välinen suhde muuttuu, jos esimerkiksi toisen tutkittavan muuttujan arvo pienenee. (Laininen 2004, 61–84; Nummenmaa, Holopainen & Pulkkinen 2014, 236–268.)

Regressioanalyysi on matemaattinen malli, jonka avulla voidaan kuvata tutkittavana olevien muuttujien välistä riippuvuussuhdetta. Regressioanalyysi koostuu *selitettävästä muuttujasta*  $Y$  ja yhdestä tai useammasta *selittävästä* tai *riippumattomista muuttujista*  $X$ . Muuttujista  $Y$  ja  $X$  tehdään havaintoja jotka vastaavat toisiaan. Tehdyt havainnot sovitetaan lineaariseen regressiomalliin. Yleinen tapa kuvata kahden muuttujan välistä lineaarista yhteyttä on regressiosuora. Regressiosuoran avulla voidaan melko tarkasti lineaarisesti mallintaa useimmat tilastollista analyysiä vaativat ilmiöt. (Laininen 2004, 61–84; Nummenmaa, Holopainen & Pulkkinen 2014, 236–268.)

Regressiomalli merkitään seuraavalla tavalla:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x \quad (4)$$

missä

$\hat{y}$  =  $y$ -muuttujan ennustettu arvo

$b_0$  = regressiosuoran vakiotermin

$b_1$  = regressiokerroin

$x$  =  $x$ -muuttujan arvo

Kaavaa (4) käyttämällä saadaan selville y-muuttujan arvo, kun x-muuttujan arvo kerrotaan regressiokertoimella ja saatuun tulokseen lisätään tai siitä vähennetään etumerkki huomioiden regressiosuoran vakiotermin. Kaavassa olevat kertoimet  $b_0$  ja  $b_1$  ovat parametreja joille lasketut arvot tekevät funktiosta mahdollisimman hyvin tutkittavaa aineistoa kuvaavan. Parametrien arvot lasketaan pienimmän neliösumman menetelmällä (PLS, Partial least squares regression). (Laininen 2004, 61–84; Nummenmaa, Holopainen & Pulkkinen 2014, 237.)

Pienimmän neliösumman menetelmällä tarkastellaan regressioanalyysin jäännöstermejä. Regressiomallia käytettäessä jokaiselle muuttujan y-arvolle  $y_i$  voidaan mallin avulla määrittää ennustettava arvo  $\hat{y}_i$ . Ennuste ei välttämättä ole täysin luotettava ja se saattaa poiketa todellisesta y-muuttujan arvosta huomattavasti. Poikkeamia ( $y_i - \hat{y}_i$ ) kutsutaan jäännöstermiksi ja niitä merkitään tunnuksella  $e$  (error). Jäännöstermit neliöidään jolloin positiiviset ja negatiiviset arvot, toisin sanoen liian pienet tai liian suuret arvot eivät kumoakaan summalausekkeessa. Pienimmän neliösumman menetelmällä pyritään saamaan aikaan sellainen regressiosuora, jossa neliöityjen jäännöstermien yhteenlaskettu summa on saatu mahdollisimman pieneksi. Neliösummien ollessa mahdollisimman pieniä, regressiosuora kuvaa tutkittavaa aineistoa totuuden mukaisesti. (Nummenmaa, Holopainen & Pulkkinen 2014, 238.)

#### 4.4 The Unscrambler X

Camo Software on vuonna 1984 norjalaisten tutkijoiden toimesta perustettu ohjelmistopalveluita tuottava yhtiö. The Unscrambler X on Camo Software yhtiön kaupallinen MVA (multivariate data analysis) ohjelmisto, jolla pystytään tutkimaan ja tekemään aineistosta erilaisia tilastollisia testejä ja analyyskejä. Ohjelmistolla on mahdollista käsitellä helposti ja nopeasti isoja tutkimusdataja ja yhdistää erilaisissa tiedostomuodoissa olevaa dataa samaan tutkimusaineistoon. (The Unscrambler X, [viitattu 23.1.2018].)

## 5 KALIBROINTI JA KALIBROINTIOHJEEN TEKEMINEN

Opinnäytetyön käytännön osuus koostuu NIR-laitteen kalibroinnista, kalibrointiohjeen tekemisestä sekä näytteille tehdyistä kemiallisista määryksistä. Kalibrointi tehdään ulkoisen kalibroinnin menetelmällä. Ohjemateriaalina kalibroinnin tekemisessä on käytetty Perten Instrumentsilta saatuja DA 7250 User Manual ja Unscrambler 10.3 Tutorial ohjeita. Kalibroinnin lisäksi tässä opinnäytetyössä tehdään kirjallinen ohje NIRin kalibrointiin The Unscrambler X-ohjelmaa käyttäen (Liite 4). Kalibrointiaineistona käytetään NIRiin syötettyjen näytteiden spektriä sekä näytteiden laboratoriotuloksia.

### 5.1 Näytteiden käsittely ja syöttäminen NIRiin

NIR sisältää erilaisia analyysiprofiileja tutkittaville tuotteille, eikä tuotetta voida analysoida jollei tuoteprofiilia ole luotu. Profiiliin määritetään tiedot tuotteesta ja siitä miten näyte halutaan laitteella tutkia.

Tämän opinnäytetyön toiminnallinen osuus aloitettiin luomalla NIRiin uusi analyysiprofiili jauhettuja härkäpapuja varten (kuva 2). Profiiliin määritettiin muun muassa rinnakkaisnäytteiden määrä, yhdestä näytteestä otettavien mittausten määrä sekä käytettävä näyteastia. Analysoitaessa näytteitä tätä härkäpapuprofiilia käyttäen, NIR pyytää käyttämään pientä näyteastiaa ja tekemään kolme rinnakkaisnäytettä. Jokaisesta näytteestä otetaan kymmenen mittausta. Tuloksena saadaan keskiarvo rinnakkaisnäytteille tehdyistä mittauksista. Tässä työssä näytteistä tutkittiin vain proteiinipitoisuutta. NIR mittasi näytteistä myös kosteuspitoisuuden, mutta tuloksia ei ole käytetty kalibroinnin tekemiseen.

Edit Härkäpapu 3/22/2018 10:22 AM

Profile Name: Härkäpapu Product Type: Beans

Repack: 3 Registration: Default Require

Repeat: 10 Print Template:

Control Sample:  Auto Print:

Ref.Pattern: Before

Sample Tray: Small Tray, stat

Sample Shape: Powder

Comment:

Analysis

Parameters

Display

Bias/Slope

Outlier

Home Save Cancel

Kuva 2. Uuden profiilin luominen Perten DA 7250 -analysaattoriin.

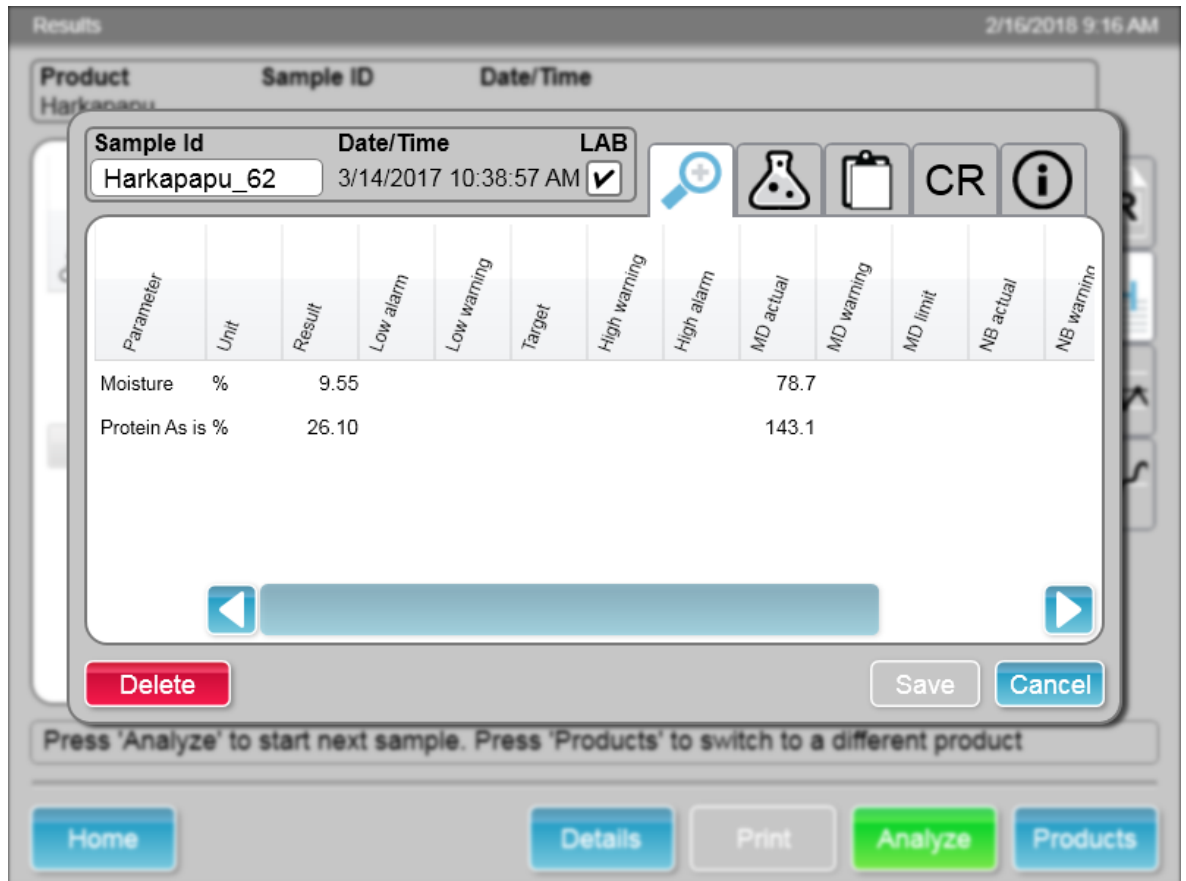
**Näytteiden valinta ja käsittely.** Näytteitä saatiin käyttöön yhteensä 79 kappaletta, joista valittiin tutkittavaksi 51 näytettä. Tutkittavat näytteet on valittu siten, että näytteiden sisältämissä proteiinipitoisuuksissa on mahdollisimman paljon hajontaa. NIR mittauksia voidaan tehdä käyttämällä erikokoisia mitta-astioita eli kyvettejä. Isoa kyvetteä käytettäessä tulos on keskiarvo jopa sadoista lyhyessä ajassa tehdyistä mittaustuksista. Isoa kyvetteä käytettäessä rinnakkaisnäytteille ei välttämättä ole tarvetta, koska jo yhden näytteen tulosta voidaan useiden mittausten ansiosta pitää luotettavana. Käytettäessä pieniä kyvettejä useamman eri näytteen tekeminen ja analysointi ovat melko aikaa vievää ja näytteitä käsiteltäessä myös virheiden mahdollisuus kasvaa.

Tässä työssä käytetyt näytteet olivat saapuessaan pakattuina paperisiin pusseihin. Näytemäärissä oli isoja eroja joten NIR analyysit päätettiin tehdä käyttämällä pieniä kyvettejä. Jokainen näyte sekoitettiin omassa pussissaan lusikalla, ennen näytteen laittamista mittausastiaan (kuva 3). Tuloksena saadut kosteus- ja proteiinipitoisuus kirjattiin ylös (liite 2.)



Kuva 3. Näytteet analysoitiin pienissä kyvetteissä.

**Näytteiden tallentaminen.** Opinnäytetyön tekemisessä käytetyt näytteet tallennettiin NIRiin näytenumeroiden mukaan. NIRiin syötetyt näytteet merkittiin laboratoriönäytteiksi (kuva 4). Laboratorionäytteellä tarkoitetaan näytettä, jonka proteiinipitoisuus on määritetty NIRin lisäksi myös kemiallisesti. Tässä työssä laboratoriotuloksina käytettiin Boreal Kasvinjalostus Oy:ltä saatuja NIR tuloksia, joita voidaan pitää luotettavina mittauksiin käytettävien laitteiden asianmukaisen ylläpidon ansiosta.

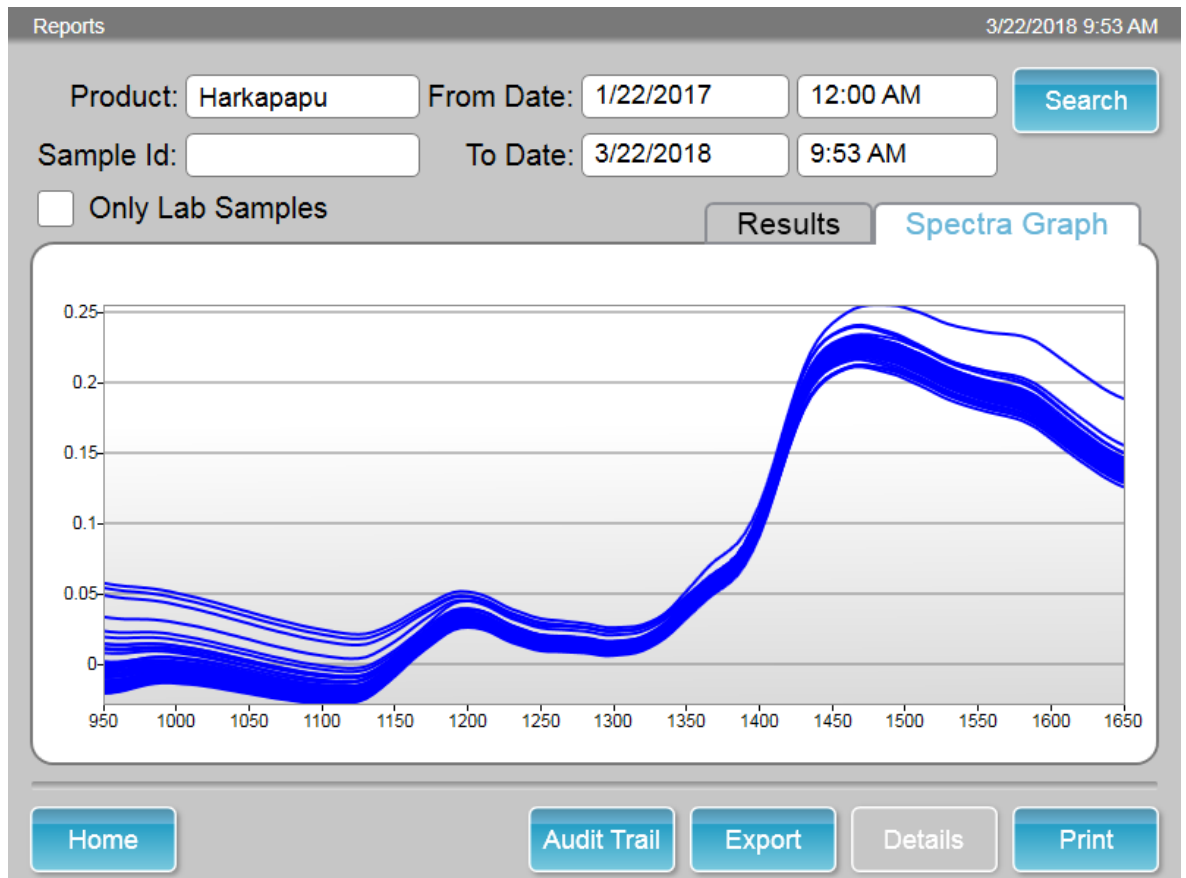


Kuva 4. Uuden näytteen syöttäminen NIRiin.

## 5.2 Tilastolliset analyysit ja tiedon siirtäminen laitteiden välillä

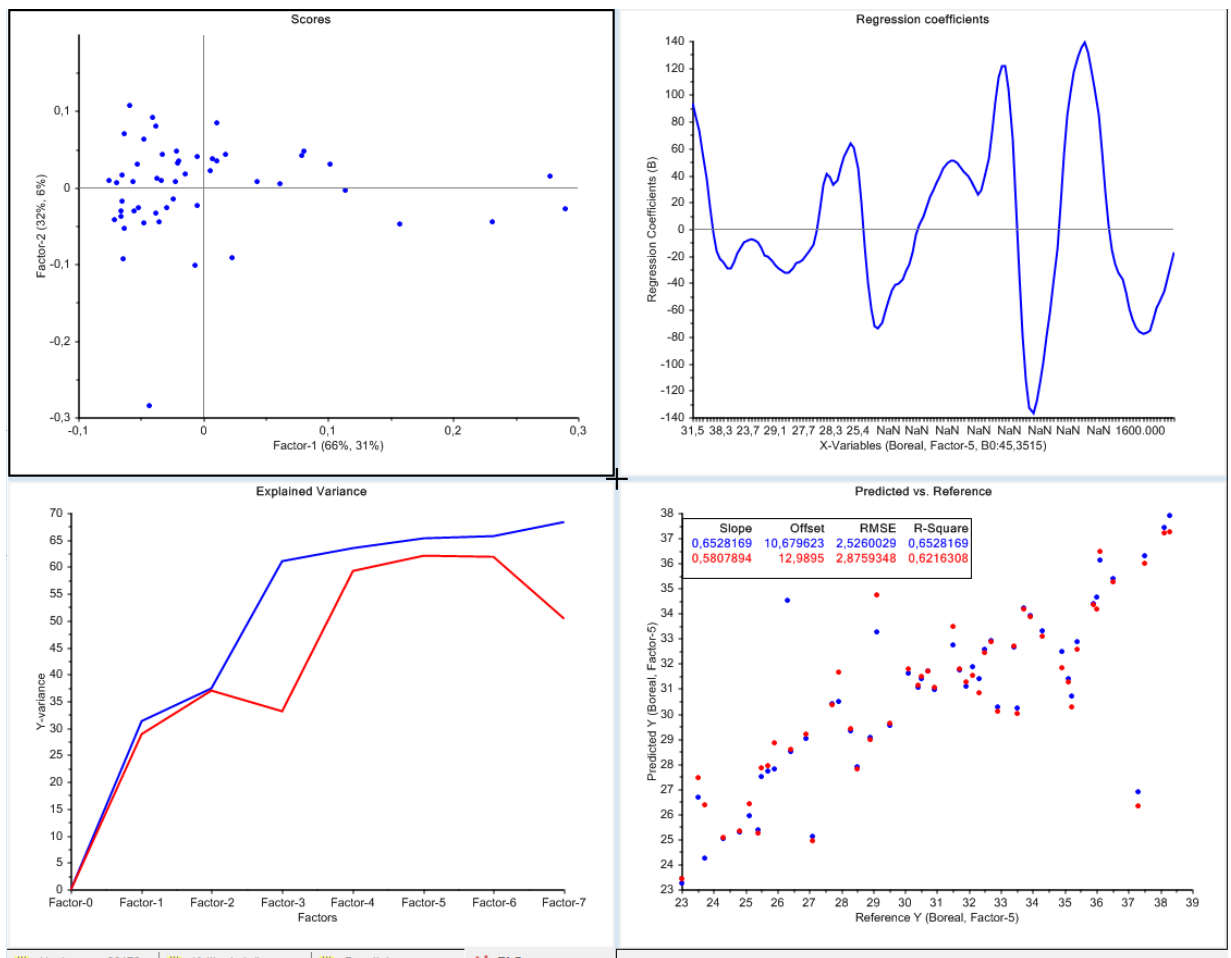
Kalibrointi tehtiin laskemalla NIRiin tallennetuista näytteistä saadun spektrin ja laboratoriotulosten välille regressiomalli pienimmän neliösumman menetelmällä. Regressiomalli lasketaan The Unscrambler X-ohjelmalla. Spektri (kuva 5) on tulostettu NIRistä .csv tiedostona ja siirretty muistitikulla tietokoneelle jossa on The Unscrambler X-ohjelma. NIRistä tulostettu tiedosto sisältää spektrin lisäksi näytteiden nimet ja perustietoja näytteistä.

NIRistä tulostettu tiedosto voidaan avata suoraan Unscramblerissa, kun se tuodaan ohjelmaan Perten Dx-tiedostona. Unscramblerissa tiedosto avautuu taulukkona. Taulukkoa voidaan muokata lisäämällä siihen tietoja sekä lajittelemalla taulukon sisältämää raakadataa. Käytettäessä Perten Dx-tiedostomuotoa NIRiltä kopioidut tiedot ovat valmiiksi lajiteltuna.



Kuva 5. Härkäpapunäytteiden spektri.

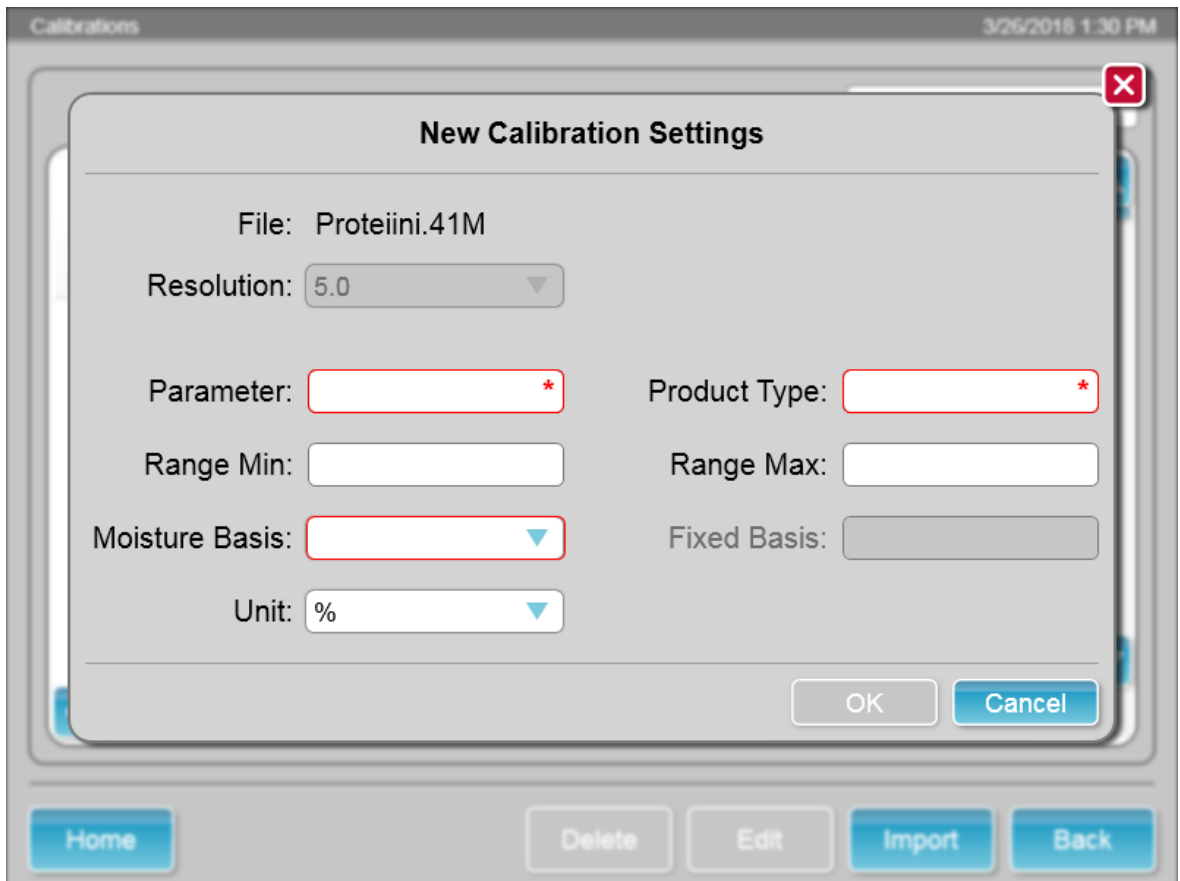
**Tilastolliset analyysit.** Tässä työssä NIRistä saadun spektrin lisäksi Unscrambleriin siirrettiin myös laboratoriotulokset näytteiden proteiinipitoisuuksista. Laboratoriotulokset oli tallennettu Excel-tiedostoon, joka avattiin Unscramblerilla. Laboratoriotulokset liitettiin samaan taulukkoon spektrin kanssa. Kaikkien regressioanalyysiin käytettävien tietojen ollessa samassa taulukossa raakadatan tutkiminen ja lajittelu on yksinkertaisempaa. Lajitellusta aineistosta laskettiin ohjelman avulla regressiomalli PLS menetelmällä. Unscramblerissa regressiomallia voi tarkastella ja muokata erilaisien kuvaajien (kuva 6) ja taulukoiden avulla. Unscramblerissa laskettu regressiomalli kuvaa tutkittua näytejoukkoa ja sitä voidaan käyttää NIR laitteella kalibrintisuorana. Tässä työssä kalibroinnin tekemiseen käytetyt näytteet valittiin manuaalisesti näytejoukosta, eikä näytteitä poistettu tai regressiomallia laskettu uudelleen havainnoitaessa regressiomallin kuvaajia.



Kuva 6. PLS regressiomallin kuvaajia.



**Tiedon siirtäminen The Unscramblerista NIRiin.** Valmis kalibrointisuora tallennetaan Unscrambler ohjelmasta muistitikulle .41M tiedostomuodossa. Tiedosto tuodaan NIRin kalibrointitiedostoihin ja laite pyytää automaattisesti määrittämään kalibroinnille perustiedot (Kuva 7). Määrittämisen jälkeen kalibrointi voidaan ottaa käyttöön haluttuun analyysiprofiiliin.



Calibrations 3/26/2016 1:30 PM

### New Calibration Settings

File: Proteiini.41M

Resolution: 5.0

Parameter: \* Product Type: \*

Range Min: Range Max:

Moisture Basis: Fixed Basis:

Unit: %

OK Cancel

Home Delete Edit Import Back

Kuva 7. Kalibrointitiedoston asetukset.

### 5.3 Kalibroinnin testaus

Kalibrointia testattiin tekemällä NIRin härkäpapu analyysiprofiililla mittaukset viidestä eri näytteestä, joiden laboratoriotulos oli tiedossa. Testissä käytetyt näytteet valittiin siten, että niiden laboratoriotulokset olivat melko lähellä toisiaan. Näin ollen voidaan paremmin arvioida tulosten totuudenmukaisuutta. Taulukossa 1 NIRillä saatuja mittaustuloksia verrattiin näytteiden laboratoriotuloksiin.

Taulukko 1. Kalibroinnin testaus ja saatujen tulosten vertailu.

Näyte	Laboratoriotulos	NIR tulos
1	28,1	25,8
2	23,7	19
3	26,9	24,8
4	30,7	26,45
5	30,9	25,8

Tuloksista voidaan päätellä, että uudella kalibroinnilla tulokset ovat virheellisiä noin 2–5 %. Kalibrointisuoran virhe saattaa johtua regressiomallissa olevista virheellisistä näytteistä. Kalibrointisuoraa voidaan korjata laskemalla suoralla Bias-korjauskerroin.

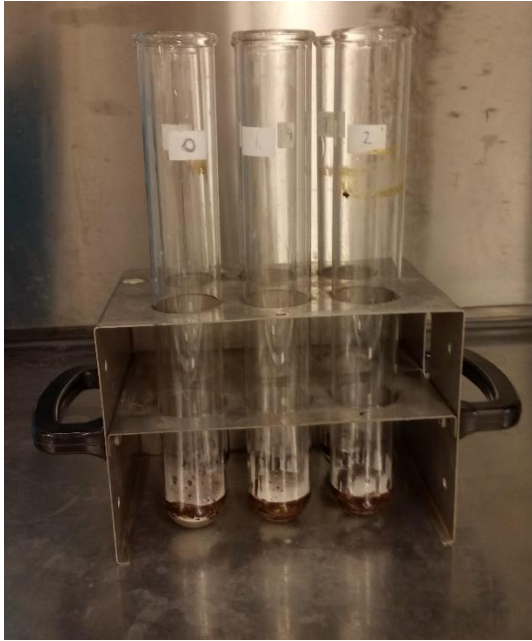
Tutkittaessa satunnaisotoksesta koostuvaa näytejoukkoa, ilmenee näytteiden tuloksissa kahden tyyppisiä virheitä: satunnaisvirhe (random error) ja harha (bias). Satunnaisvirheen oletetaan olevan nolla. Käytännössä satunnaisvirheen arvo vaihtelee eri havaintojen välillä nollan molemmin puolin ja virhe on mahdollista kumota tehtäessä useita havaintoja. Harha on virhe, jota ei voida kumota vaan arvo poikkeaa systemaattisesti tarkasta arvosta. (Laininen 2004, 14–15). NIRissä bias-korjauskerroin määritetään matemaattisesti vähentämällä näytteiden laboratoriotulosten keskiarvosta, laitteella näytteistä saatujen tulosten keskiarvo (Uotinen 2018, 1–11.)

## 5.4 Kjeldahl-poltot työselostus

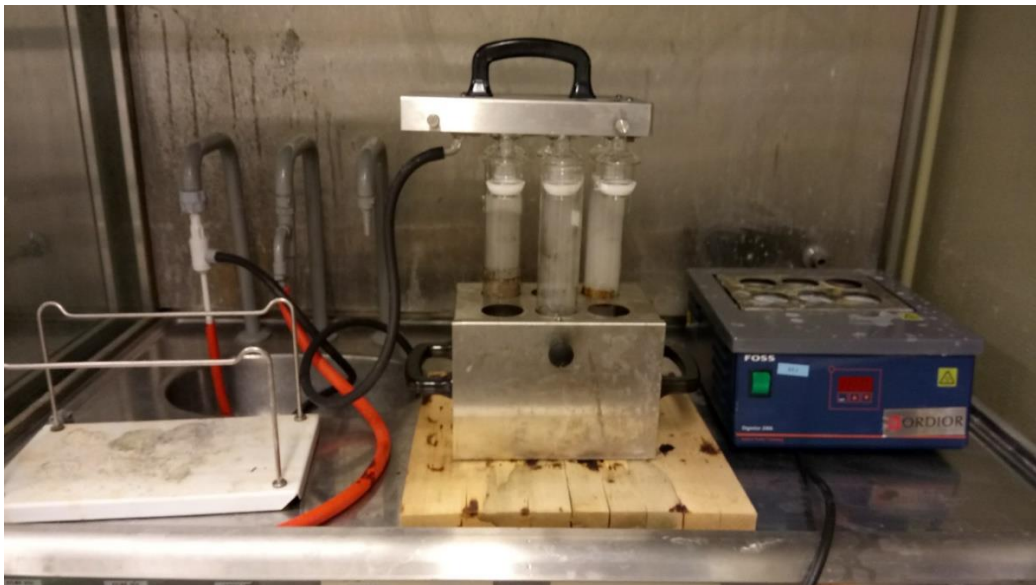
Kjeldahl-poltot suoritetaan Minna Rotola-Pukkilan 2.11.2015 päivittämän työhjeen (liite 1) mukaisesti Seinäjoen ammattikorkeakoulun bio- ja elintarviketekniikan kemian laboratoriossa.

Kjeldahl-polttoja tehtiin touko–syyskuu 2017 välillä. Näytteitä analysoitiin 37 kappaletta ja jokaiselle näytteelle tehtiin yksi rinnakkaisnäyte. Yhden polton aikana käsiteltiin kuusi näytettä. Yhden päivän aikana ehdittiin tehdä kaksi polttoa. Jokaiselle päivälle jolloin näytteitä käsiteltiin, tehtiin yksi nolla näyte eli yhden päivän aikana tehtyjen polttojen tulokset on laskettu samalla nollanäytteen tuloksella. Tislaukseen ja titraukseen käytettäviä liuoksia ei tehty jokaiselle polttokerralle uusia, vaan uusia työhjeen (liite 1) mukaisia liuoksia tehtiin lisää tarvittaessa. Indikaattoriliuos sekoitettiin jokaiselle polttokerralle erikseen.

Aloitettaessa Kjeldahl-polttojen tekemistä SeAMK:in bio- ja elintarviketekniikan laboratoriossa oli käytettävissä 8 polttoputkea (kuva 8). Yhden polton tekemiseen tarvitaan 6 polttoputkea. Tehtäessä peräkkäin useampia polttoja putkia täytyi pestä ja kuivata polttojen välillä, joka aiheutti haasteita polttojen tekemiseen. Huomattiin, että polttoputket tulee kuivata huolellisesti ennen uuden polton tekemistä, jotta näyte sekoittuu kunnolla reagenssien kanssa.



Kuva 8. Kjeldahl-polttoputket, joissa mitattuna näyte ja reagenssit.



Kuva 9. Kjeldahl-polttolaitteisto.

Näytteitä poltettiin polttolaitteistolla (kuva 9), kunnes ne olivat kirkkaita. Aikaa näytteidien polttamiseen meni noin 45–80 min. Näytteidien palamista seurattiin nostamalla näyteputkia hetkeksi pois polttolaitteesta ja arvioimalla aistinvaraisesti miltä liuos näyttää. Polton ollessa valmis näytteidien annettiin jäähtyä noin 15 minuuttia, jonka jälkeen polttoputkeen lisättiin tislattua vettä.

Muutamalla polttokerralla näytteiden ollessa jäähtyneitä polttoputken pohjalle alkoi kertyä valkoista ainetta. Aine on todennäköisesti reagenssina käytettyä suolaa, joka jäähtyessään kiteytyy uudelleen. Kiteytymistä tapahtui, vaikka näytteet olivat polton loppuessa olleet täysin kirkkaita.



Kuva 10. Näytteiden tislaukseen käytettyä 35% NaOH-liuosta.

Poltetut näytteet tislattiin 35% NaOH-liuoksella (Kuva 10). Tislauslaitteiston kanssa oli ajoittain ongelmia, eikä laite annostellut tislaukselle tarvittavaa määrää. Laitteeseen käytettävää NaOH-tislausliuosta säilytetään 10 litran kanisterissa. Letkuun jota pitkin tislaukselle kulkee säilytyskanisterista tislaukselle oli päässyt ilmakuplia, minkä takia laite ei annostellut tislaukselle tarvittavaa määrää. "Vajaa" jääneiden näytteiden määrä mitattiin ja huomioitiin tuloksia laskettaessa.

Tislauksen aikana tislattavien näytteiden (myös nollanäytteen) tulisi muuttua väriltään mustaksi. Kaikilla polttokerroilla nollanäyte ei kuitenkaan vaihtanut väriä. Asiaa koitettiin ratkaista polttamalla näytteitä pidemmän aikaa ja tekemällä jokaiselle polttokerralle lisää tislauслиuosta, ettei laitteistoon pääsisi ilmakuplia. Edellä mainituista korjauksista huolimatta ongelma ei kokonaan korjaantunut. Virheelliset näytteet kuitenkin titrattiin normaalisti, eikä tulokset merkittävästi eronneet onnistuneiden näytteiden tuloksista.



Kuva 11. Näytteet titrattiin 0,1M HCl-liuoksella.

Tislatut näytteet titrattiin 0,1M HCl-liuoksella. Titraamiseen käytettiin 50 mL:n byrettiä ja nollanäyte titrattiin käyttäen 10mL:n byrettiä. Apuna titrauksessa käytettiin magneettisekoittajaa (kuva 11). Titrattavan liuoksen väri muuttui vihreästä punaiseksi ekvivalenttikohdassa (kuva 12). Liuoksen värin muuttuessa HCl-kulutus merkittiin ylös.



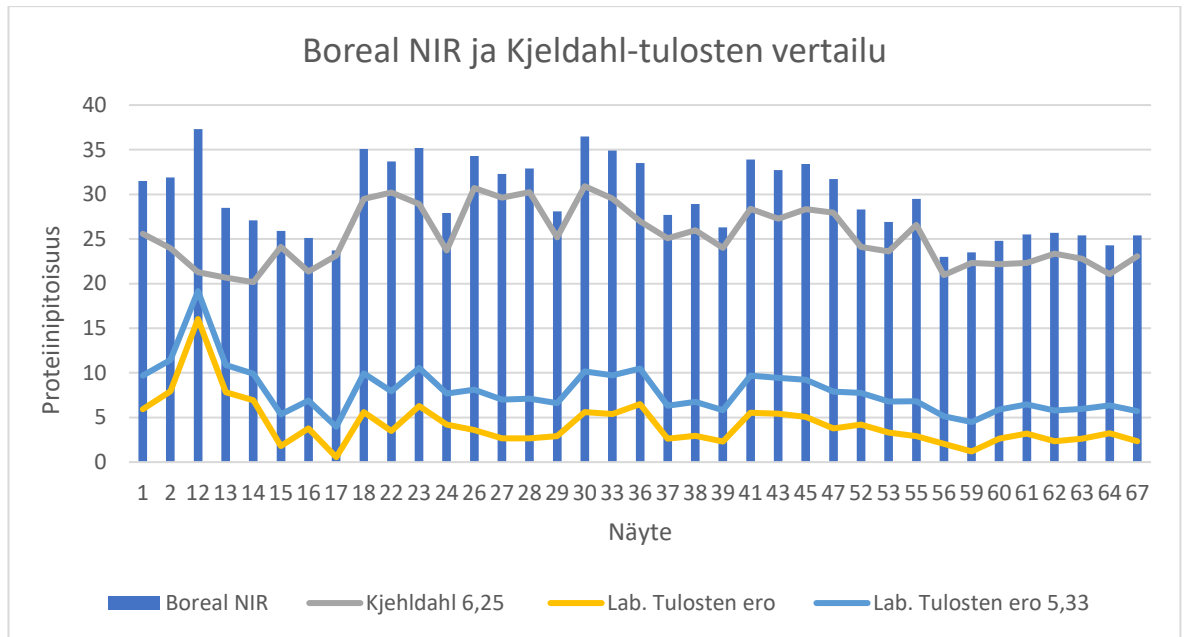
Kuva 12. Titratut liuokset.

**Kjeldahl-tulosten laskeminen.** Kjeldahl-poltoista saadut tulokset laskettiin työohjeessa (liite 1) olevan laskuohjeen mukaan. Muuntokertoimena on käytetty yleistä tyydenmuuntokerrointa 6,25. Proteiinipitoisuudet on laskettu myös Salo-Väänäsen (1996, 3) väitöskirjassa Elintarvikkeiden proteiinipitoisuuden määrittäminen niiden typpi- ja aminohappopitoisuuden avulla, suosittelemaa muutonkerrointa 5,33 käyttäen (liite 3).

### 5.5 Kjeldahl-tulosten ja laboratoriotulosten vertailu

Kjeldahl-määrittäksessä saatuja proteiinipitoisuustuloksia (liite 3) verrattiin näytteiden virallisiin Boreal Kasvinjalostus Oy:ltä saatuihin proteiinimäärittäystuloksiin. Vertailun tavoitteena on arvioida Kjeldahl-määrittäksen luotettavuutta. Vertailussa käytettiin Kjeldahl-tuloksia, jotka on laskettu yleistyydenmuuntokertoimella 6,25, sekä Salo-Väänäsen (1996, 1–12) esittämällä muuntokertoimella 5,33.





Kuvio 1. Näytteiden proteiinipitoisuudet Boreal Kasvinjalostus Oy:n määrittämänä ja Kjeldahl-menetelmällä määritettynä.

Kuviossa 1 voidaan huomata, että kaikissa näytteissä laboratoriotulokset ovat korkeampia, kuin Kjeldahl-menetelmällä saatu tulos. Erot eivät kuitenkaan ole johdonmukaisia vaan erot vaihtelevat muuntokertoimella 6,25 lasketuissa tuloksissa 0,5–16 % välillä ja muuntokertoimella 5,33 lasketuissa tuloksissa 5,7–11 % välillä. Kuviossa on esitetty Boreal NIR tulosten ja eri muuntokertoimilla laskettujen tulosten ero. Kuvioista voidaan päätellä, että Kjeldahl-tulokset, joissa on käytetty muuntokerrointa 6,25 ovat lähempänä Boreal NIR tuloksia, kuin muuntokertoimella 5,33 lasketut tulokset. Tätä työtä tehdessä ei ole ollut tiedossa mitä menetelmää käyttäen Boreal Kasvinjalostus Oy:n NIR laite on kalibroitu.

Tässä työssä määritettyjä Kjeldahl-tuloksia ei voida pitää kovin luotettavina, koska määrittysten tekemisessä oli työselosteessa kohdassa 5.4 kuvattuja haasteita. Alhaisempia Kjeldahl-tulokset voivat olla merkki siitä, että näytteiden poltto ei ole ollut täydellistä. Näin ollen kaikkea näytteiden sisältämää tyyppiä ei ole saatu talteen ja tulos on alhaisempi. Epäily polton epätäydellisyydestä on ilmennyt, koska osaan jo poltetuista näytteistä ilmestyi näytteen jäähtyttyä sakkaa. Sakka on todennäköisesti reagenssina käytettyä suolaa, joka ei ole polton aikana palanut pois.



## 6 YHTEENVETO

Kalibrointi tehdään käyttämällä näytteitä jotka sisältävät tutkittavaa parametria erilaisina pitoisuuksina ja pitoisuus on tiedossa. Näytteiden pitoisuuden ja mittaussignaalin tason välille määritetään kalibrointikäyrä. Ulkoisessa kalibroinnissa mittalaitteella selvitetään mittaussignaalin tasot tunnetuille kalibrointinäytteille. Mittauksessa saatujen pisteiden kautta voidaan piirtää kalibrointisuora. (Jaarinen & Niiranen 2008, 18–21). Toimivan kalibroinnin tekeminen vaatii huolellisuutta näytteitä käsiteltäessä ja luotettavia laboratoriotuloksia. Luotettavien laboratoriotulosten saaminen edellyttää, että näytteiden käsittely tapahtuu testatulla ja vakioidulla menetelmällä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tehdä Perten DA 7250 analysaattorin kalibrointi härkävun proteiinipitoisuuden määrittämistä varten. Opinnäytetyön tuloksena NIR saatiin kalibroitu The Unscrambler X-ohjelmaa käyttäen ja kalibroinnin tekemiseen saatiin kirjallinen ohje. Kalibroinnin toimivuutta testattiin ja havaittiin että tuloksissa on noin 2–5 % virhe. Virhe johtuu todennäköisesti regressiomallia laskettaessa käytetyistä virheellisistä näytteistä.

Opinnäytetyössä 37 näytteen näytesarjasta määritettiin proteiinipitoisuus kemiallisesti Kjeldahl-menetelmällä. Tavoitteena oli arvioida Kjeldahl-menetelmän luotettavuutta. Kjeldahl-menetelmällä saatuja proteiinipitoisuuksia verrattiin näytteiden laboratoriotuloksiin. Vertailussa huomattiin, että näytteiden laboratoriotulokset ovat korkeampia, kuin Kjeldahl-menetelmällä saadut tulokset. Kjeldahl-menetelmällä tehtyjen määrytyksien tuloksia ei voida pitää kovin luotettavana, eikä tuloksia ole järkevää käyttää kalibroinnin tekemiseen.

## 7 POHDINTA

Tässä työssä kalibrointi tehtiin laskemalla kalibroitisuora NIR spektrin ja näytteiden laboratoriotulosten välille. Kalibroinnin tekemiseen käytettiin The Unscrambler X-ohjelmaa. The Unscrambler X-ohjelmalla on mahdollista tehdä valtava määrä erilaisia tilastollisia analyysejä. Ohjelman käyttö oli melko yksinkertaista ja sujuvaa, mutta ohjelman tarjotessa paljon erilaisia mahdollisuuksia ja työkaluja aineiston käsittelemiseen oli vaikeaa rajata mitä työkaluja on tarpeellista käyttää.

Haasteita kalibroinnin tekemiseen aiheutti myös NIRin ja The Unscrambler X-ohjelman yhdistäminen. Käytännössä tiedonsiirto laitteiden välillä oli sujuvaa, mutta se mitä tietoa kalibroinnin tekemiseen tarvitaan ja miten tarvittava raakadata löytyy NIRistä, oli monimutkaista saada selville. Apuna työn tekemisessä olivat Perten Instrumentsin sovellusasiantuntijat sekä Sensorcell Oy:n Antti Uotinen. Ohjeina kalibroinnin tekemisessä käytettiin Perten intrumentsilta saatuja The Unscrambler X-ohjelman ohjeita sekä NIRin käyttöohjeita. Yleisesti lähi-infrapunaspektroskopiasta menetelmänä löytyy melko hyvin tietoa, mutta NIR laitteesta ja etenkin laitteen kalibroinnista materiaalia on saatavilla niukasti.

Osasta näytteitä proteiinipitoisuus määritettiin Kjeldahl-menetelmällä. Kjeldahl-menetelmällä saadut tulokset eivät ole kovin luotettavia. Määrittäessä laitteiden käytössä oli ongelmia ja laboratoriotyöskentely ei ollut minulle ennestään kovinkaan tuttua. Kjeldahl-menetelmän testaaminen ja menetelmässä olevien työvaiheiden vakiointi voisi mahdollistaa sen, että määrittäessä saatuja tuloksia voitaisiin käyttää kalibroinnin tekemiseen. Menetelmää vakioitaessa tulisi määrittää tarkasti esimerkiksi näytteiden polttoaika, rinnakkaisnäytteiden määrä ja se miten kauan eri reagenssiliuokset säilyvät käyttökelpoisina.

Opinnäytetyölle asetetut tavoitteet laitteen kalibroinnista ja kalibrointiohjeen tekemisestä saavutettiin. Kalibroitisuorassa on testauksen mukaan 2–5 % virhe, joka aiheutuu todennäköisesti virheellisistä näytteistä, joita on käytetty regressiomallia laskettaessa. Kalibroitisuorassa olevan virheen korjaaminen voisi onnistua poistamalla regressiomallista selkeästi virheellisiä näytteitä, laskemalla malli uudelleen ja testaamalla kalibroinnin toimivuutta isommalla näytemäärällä. Kalibrointiohjeen ansiosta laitteelle tehtyä kalibrointia voidaan jatkossa päivittää ja laskea tarvittaessa

uudelleen. Uskon, että kalibrointiohjeen avulla The Unscrambler X-ohjelman käyttö on helpompaa ja ohjelmaa voidaan käyttää myös muihin tarkoituksiin, kuin kalibrointien tekemiseen.

Tämä opinnäytetyö sisälsi monia eri osioita, joita kaikkia olisi voinut tutkia enemmänkin. Tärkeimmässä osassa tässä työssä oli kalibroinnin ja kalibrointiohjeen tekeminen. Työtä voisi jatkaa tutkimalla ja vakioimalla Kjeldahl-menetelmää siten, että menetelmällä saatuja tuloksia voisi käyttää kalibrointisuoran laskemiseen. Myös Kjeldahl-tulosten laskeminen ja vertailu eri typenmuuntokerrointa käyttäen olisi mielenkiintoinen tutkimuksen aihe.

## LÄHTEET

- Chaistain, B. 3.4.2018. Jean-Baptiste-André Dumas. [Verkkajulkaisu]. Encyclopædia, Inc. [Viitattu 25.4.2018]. Saatavana: <https://www.britannica.com/biography/Jean-Baptiste-Andre-Dumas>
- Diode Array 7250, At-line & Lab NIR Analysis System. Perten instruments.
- Dufour, E. 2009. Principles of Infrared Spectroscopy. Teoksessa: Sun, D-W. Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. Academic Press. 3–25.
- Dumas nitrogen and total nitrogen content. Ei päiväystä. [Verkkajulkaisu]. VELP scientifica. [Viitattu 4.12.2017]. Saatavana: [http://www.velp.com/en/service\\_support/dumas\\_nitrogen](http://www.velp.com/en/service_support/dumas_nitrogen)
- Eviran ohje 17030/1. Ravintoarvomerkitäöpas elintarvikevalvojille ja elintarvikealantoimijoille. Helsinki: Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. [Viitattu 27.10.2017]. Saatavana: [http://www.leipatiedotus.fi/media/pdf-tiedostot/ravintoarvomerkitäöpas\\_elintarvikevalvojille\\_ja\\_elintarvikealan\\_toimijoille.pdf](http://www.leipatiedotus.fi/media/pdf-tiedostot/ravintoarvomerkitäöpas_elintarvikevalvojille_ja_elintarvikealan_toimijoille.pdf)
- A Guide To Kjeldahl Nitrogen Determination Methods And Apparatus. Ei päiväystä. [Verkkokirja]. ExpotechUSA. [Viitattu 10.4.2017]. Saatavana: <http://www.expotechusa.com/catalogs/labconco/pdf/KJELDAHLguide.PDF>
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5. uud. p. Helsinki: Edita.
- Jäljitettävyys. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Helsinki: Mittatekniikan keskus. [Viitattu 3.4.2017]. Saatavana: <http://www.mikes.fi/mittayksik%C3%B6t/j%C3%A4ljitet%C3%A4vyys>
- Keinänen, P. 2012. Analyyttinen spektroskopia lukion kemian oppimäärässä. Itä-Suomen Yliopisto: Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta. Saatavana: [http://epublications.uef.fi/pub/urn\\_nbn\\_fi\\_uef-20120950/urn\\_nbn\\_fi\\_uef-20120950.pdf](http://epublications.uef.fi/pub/urn_nbn_fi_uef-20120950/urn_nbn_fi_uef-20120950.pdf)
- L. 10.12.1993/1156. Laki mittayksiköistä ja mittanormaalijärjestelmästä.
- L. 25.11.2005/920. Laki vaatimustenmukaisuuden arviointipalvelujen pätevyiden toteamisesta.
- Laininen, P. 2004. Tilastollisen analyysin perusteet. 3.korj. painos. Helsinki: Ota-tieto.

- Laiteohjeet. 7.5.2015. Bio- ja elintarviketekniikka: NIR analysaattori, Perten DA 7250. Seinäjoki: Seinäjoen ammattikorkeakoulu. Julkaisematon.
- Lehtonen, P & Sihvonen, M, -L. 2009. Laboratorioalan analyttinen kemia. 2.painos. Helsinki: Opetushallitus.
- Mattila, P., Piironen, V. & Ollilainen, V. 2001. Elintarvikekemia ja -analytiikka. Helsinki: Yliopistopaino.
- Mutanen, M. & Voutilainen, E. 2010. Energia ravintolaineet, ravintokuitu ja alkoholi. Ravitsemustiede: Aro, A., Mutanen, M. & Uusitupa, M. Helsinki: WS Bookwell Oy. 110-143.
- Müller, J. 2017. Dumas or Kjeldahl for reference analysis? Comparison and considerations for nitrogen/protein analysis of food and feed. Denmark: Foss.
- Nummenmaa, L., Holopainen, M. & Pulkkinen, P. 2014. Tilastollisten menetelmien perusteet. Helsinki: Sanoma Pro.
- Nurmela, T. 2003. Infrapunaspektroskopia nopea menetelmä elintarvikkeiden analysoinnissa. [Verkkajulkaisu]. Kehittyvä Elintarvike & Elintarviketieteiden Seura r.y. [Viitattu 24.4.2018]. Saatavana: <http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/43-infrapunaspektroskopia-nopea-menetelma-elintarvikkeiden-analysoinnissa>
- Perten DA7250-analysaattori. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Sensorcell Oy. [Viitattu 22.2.2018]. Saatavana: [https://www.sensorcell.fi/epages/sensorcell.sf/fi\\_FI/?ObjectPath=/Shops/2016080104/Products/072500](https://www.sensorcell.fi/epages/sensorcell.sf/fi_FI/?ObjectPath=/Shops/2016080104/Products/072500)
- Proteiinit. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Helsinki: Ruokatieto Yhdistys Ry. [Viitattu 22.1.2018]. Saatavana: <https://www.ruokatieto.fi/ruokakasvatus/ruokaketju-ruuan-matka-pelloilta-poytaan/ravitsemus-ja-ruuan-valinta/energiaravintoaineet/proteiinit>
- Raakaproteiinin määrittäminen elintarvikkeesta. Ei päiväystä. Laboratorioanalyysit. [Verkkosivu]. Helsinki: Opetushallitus. [Viitattu 3.4.2017]. Saatavana: [http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/elintarvikeanalyysit\\_proteiinit.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/elintarvikeanalyysit_proteiinit.html)
- Salo-Väänänen, P. 1996. Elintarvikkeiden proteiinipitoisuuden määrittäminen niiden typpi- ja aminohappopitoisuuden avulla. Helsinki: Helsingin yliopisto, soveltuvan kemian ja mikrobiologian laitos. Väitöskirja, EKT- sarja 1050.
- Sipilä, A. & Nousiainen, J. 2006. NIRS-tekniikka nurmirehun laadun arvioinnissa. Nurmitieto 4.2.2. Suomen Nurmijhdistyksen ja MTT:n julkaisusarja. [Viitattu 10.4.2017]. Saatavana: [http://www.nurmijhdistys.fi/Nurmitieto/NT\\_4-2-2.pdf](http://www.nurmijhdistys.fi/Nurmitieto/NT_4-2-2.pdf)

The Unscrambler X. 2018. [Verkkosivu]. Camo Software AS. [Viitattu 23.1.2018].  
Saatavana: <http://www.camo.com/rt/Products/Unscrambler/unscrambler.html>

Uotinen, A. 2018. Bias-korjausohje. Helsinki: Sensorcell Oy. Julkaisematon.

User Manual DA 7250. 2013. Perten Instruments AB.

## LIITTEET

Liite 1. Työohje kjeldahl-poltot

Liite 2. NIR-analyysin tulokset

Liite 3. Näytteiden proteiinipitoisuudet eri menetelmillä määritettynä

Liite 4. Kalibrointiohje

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Kemian työt

Elintarvike ja maatalous

Ohje päivitetty: Minna Rotola-Pukkila 2.11.2015

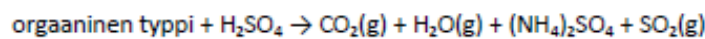
Bio- ja elintarviketekniikka

**TYÖ: TYPEN JA PROTEIININ MÄÄRITYS POLTTOLAITTEISTOLLA JA HÖYRYTISLAUKSELLE KJELDAHL-MENETELMÄLLÄ**JOHDANTOA:

Kjeldahl -menetelmällä määritetään elintarvikkeen kokonaisproteiinipitoisuus ns. raakaproteiinipitoisuus laskemalla se näytteen kokonaistyyppipitoisuudesta muuntokertoimen avulla. Proteiinit koostuvat runsaasti tyypeä sisältävistä aminohapoista. Koska elintarvikkeessa on mukana myös muita tyyppipitoisia yhdisteitä, tulevat ne mukaan tässä määrittäksessä ja siksi tulosta sanotaan raakaproteiiniksi.

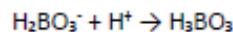
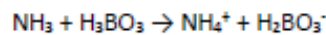
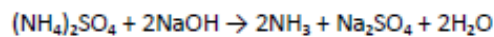
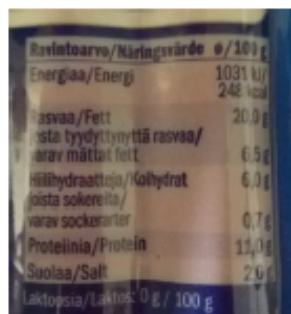
Menetelmän työvaiheita ovat *poltto, vesihöyrytisläus ja titraus*.

Menetelmässä kokonaistyyppi määritetään polttamalla näytteen orgaaninen aines pois ja muuttamalla orgaaninen tyyppi ammoniumtypeksi. Orgaaninen aine hapetetaan rikkihapolla hiilidioksidiksi, vedeksi ja ammoniakiksi. Ammoniikki sitoutuu rikkihappoliuoksessa ammoniumsulfaatiksi ja hiilidioksidi ja vesi sekä rikkidioksidi haihtuvat polton aikana pois.



Koska näytteen kaikki komponentit eivät hajoa väkevän rikkihapon kiehumispisteessä (337 °C), täytyy kiehumispistettä nostaa suolalla, tässä tapauksessa kaliumsulfaatilla (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Katalyyttinä käytetään kuparia (CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O).

Tislauksessa ammoniikki vapautetaan ammoniumsulfaatista lisäämällä näytteeseen väkevää natriumhydroksidia. Vapautunut ammoniikki sidotaan tislaukselaitteen etuastiasa olevaan boorihappoon. Tämän jälkeen ammoniikki titrataan boorihappoliuoksesta vetykloridihapolla (suolahapolla). Titraukseen kuluneen vetykloridihapon määrän perusteella näytteessä olleen typen määrä voidaan laskea.

Ravintoarvo/Näringsvärde	g/100 g
Energiaa/Energ	1031 kJ 248 kcal
Rasvaa/Fett	20,0 g
joista tyydyttyneitä rasvoja/ avara mättar fett	6,5 g
Hilhydraatteja/Kolhydrat	6,0 g
joista sokereita/ varav sockerarter	0,7 g
Proteiinia/Protein	11,0 g
Suolaa/Salt	2,9 g
Laktosia/Laktos	0 g / 100 g

Kuva 1. Vasemmallla: Nakkipaketin nakkien proteiinipitoisuudeksi on ilmoitettu 11,0g /100g.



REAGENSIT:

**Polttoliuos:** Väkevä rikkihappo ( $H_2SO_4$ ), 95-96-massaprosenttista, tiheys  $1,84 \text{ kg/dm}^3$  eli  $1,84 \text{ g/mL}$

**Katalyytti ja suola:** Jokaiseen polttoputkeen punnitaan  $7 \text{ g } K_2SO_4$  ja  $0,8 \text{ g } CuSO_4 \cdot 5H_2O$

**Vastaanottoliuos:** 0,4% boorihappo

Liutetaan  $4 \text{ g}$  boorihappoa  $0,5\text{-}0,6$  litraan kuumaa, tislattua vettä. Sekoitetaan ja lisätään tislattua vettä niin, että lopputilavuus on  $0,9$  litraa

**Indikaattoriliuos:** bromokresolinvihreä / metyyli-punaindikaattori

- Liutetaan  $10 \text{ mg}$  bromokresolinvihreää  $10 \text{ mL}$ :aan metanolia
- Liutetaan  $10 \text{ mg}$  metyyli-punaa  $10 \text{ mL}$ :aan metanolia
- Sekoitetaan  $10 \text{ mL}$ :aa bromokresolinvihreän liuosta ja  $7 \text{ mL}$ :aa metyyli-punan liuosta. Laimennetaan litraksi ionivaihdetulla vedellä ja sekoitetaan varovasti. Säilytetään tummassa pullossa.

**Tislausliuos:** 35% w/v NaOH-liuos (valmiina omassa kanisterissaan)

- Punnitaan  $350 \text{ g}$  NaOH ja sekoitetaan varovasti ionivaihdettuun veteen  $1000 \text{ mL}$ :n mittapullossa. Sekoitetaan varovasti. Annetaan jäähtyä (tunteja) ja täytetään vedellä merkkiin.

**Titrausliuos:**  $0,1 \text{ M}$  HCl (valmistusohje tämän työohjeen lopussa)

TYÖN SUORITUS

- Laitetaan polttolaite lämpiämään  $420 \text{ }^\circ\text{C}$  vetokaapissa
- Jauhetaan näytteet (lihanäytteet, esim. makkara) homogeeniseksi huumareella ja punnitaan näytteitä n.  $1 \text{ g}$  polttoputkeen. Tehdään rinnakkaismääritykset ja merkitään punnitustulos ylös  $0,0001 \text{ g}$  tarkkuudella. Näytteen määrä riippuu sen typpipitoisuudesta. Jos tiedetään, että näytteessä on paljon proteiinia (esim.  $80 \text{ g}/100 \text{ g}$ ) kannattaa näytettä punnita esim.  $0,7 \text{ g}$ .
- Lisätään polttoputkiin katalyytti ( $CuSO_4$ ) ja suola ( $K_2SO_4$ ). Katalyytin ja suolan voi punnita valmiiksi annoksiksi ennakkoon
- Sekoitetaan näytettä, katalyyttia ja suolaa polttoputkessa varovasti esim. Vortex-sekoittimella
- Nollanäytteeseen punnitaan ainoastaan katalyytti ja suola
- Lisätään kaikkiin putkiin varovasti  $12 \text{ mL}$  väkevää rikkihappoa (pumpetilla ja lasisella mittapipetillä) vetokaapissa. Käytetään suojahanskoja ja suojalaseja!
- Sekoitetaan varovasti käsin. Putket voi jättää hetkeksi huoneenlämpöön ennen polttolaitteeseen asettamista
- Asetetaan polttoputket polttotelineeseen ja liitetään kaasunpoistokansi putkien päälle, käännetään vesi-imupumppu täysille
- Asetetaan teline ja putket lämmitettyyn polttohauteeseen. Vesi-imupumppu käännetään pienemmälle noin  $5 \text{ min}$  polton jälkeen. Oikea imunopeus on silloin, kun höyryt juuri ja juuri nousevat poistokanteen
- Jatketaan polttamista kunnes näytteet ovat kirkkaita (sinisen- tai vihreän värisiä, ei sameita). Tämä kestää yleensä n.  $60\text{-}90 \text{ min}$  riippuen näytetyypistä ja määrästä

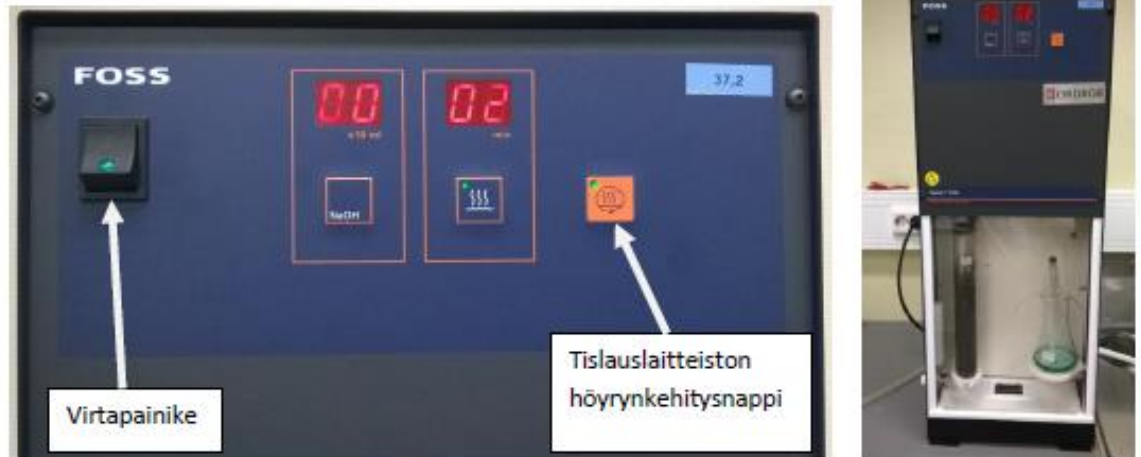
- Kun näytteet ovat kirkkaita, nostetaan teline putkineen (poistokansi edelleen paikoillaan) pois polttolaitteesta sille varatun alustan päälle, ei suoraan kylmälle metallipinnalle vetokaappiin.
- Annetaan putkien jäähtyä 10-20 min, jäähtytyksen jälkeen poistokansi voidaan poistaa
- Lisätään kuhunkin putkeen 75 mL ionivaihdettua vettä ennen tislausta



Kuva 2. Punnitut näytteet polttoputkissa, näytteet polttolaitteessa ja näytteiden väri polton jälkeen

#### TISLAUS

- Kiinnitetään tisluslaitteisto vesikiertoon (valkoinen letku) ja avataan hana. Laitetaan virta tisluslaitteistoon. Suljetaan hetken kuluttua tisluslaitteiston takana oleva poistoletku mustasta vivusta. Laitteen höyrykehitin täyttyy.
- Asetetaan tislaimen testipolttoputki ja erlenmeyer, joissa molemissa on pelkkää vettä. Polttoputkessa esim. 75 mL vettä ja erlenmeyerissä 25 mL. Painetaan kerran höyrykehittimen nappia, jolloin laite lämmittää höyryn ja lämpenee. Kun laite on lopettanut toimintansa, jatketaan varsinaisilla näytteillä. Testipolttoputkia voi vesihöyrytislata kaksikin kappaletta jos edellisestä käyttökerrasta on kulunut aikaa.
- Sekoitetaan vastaanottoliuosta ja indikaattoriliuosta samassa suhteessa kuin liuoksia valmistettiin (0,9:1). Esimerkiksi 90 mL + 100 mL, mittalasitarkkuudella esim. 250 mL:n mittapullossa. Lisätään tätä seosta 25 mL:aa Erlenmeyer-pulloon ja asetetaan se tislusyksikköön tisleen ulostuloputken kohdalle siten, että putken pää on liuoksen sisällä (käytä leveämpisuisia Erlenmeyer-pulloja, 250 mL). Asetetaan polttoputki tiiviisti tislusyksikköön ja suljetaan ovi.
- Painetaan tisluslaitteiston höyrykehitysnappia kerran. Laitteistoon on ohjelmoitu valmis ohjelma.
- Laitteisto tislaa näytettä 4 minuuttia, ja annostelee putkeen 50 mL NaOH-liuosta (5\*10mL). Tänä aikana tislettä kertyy Erlenmeyeriin n. 130-150 mL.



Kuva 3. Tislauslaitteiston painikkeet

- Tislauksen loputtua poistetaan polttoputki. Polttoputki on todella kuuma. Poistetaan myös Erlenmeyer astia.
- Jatketaan tislausta muilla näytteillä. Suljetaan lopuksi vesihana ja vesikierto, tyhjenetään höyrykehitin avaamalla musta vipu laitteiston takaa
- Pyyhitään tisluslaitteisto huolellisesti

### TITRAUS

- Titraataan Erlenmeyerissä olevat näytteet 0,1M HCl-liuoksella
- Käytetään näytteille 50 mL:n byrettiä, nollanäytteen kulutus tulisi olla vain muutamia tippoja (0,1 mL)
- Ekvivalenttikohdassa liuoksen väri muuttuu vihreästä punaiseksi
- Merkitse muistiin HCl-kulutus byretistä. Ole erityisen huolellinen nollanäytettä titratessasi.



Kuva 4. Liuoksen väri ennen titrausta (vihreä) ja värin muutos ekvivalenttikohdassa (punainen). Titrauksessa käytettävä byretti ja magneettisekoittaja (voi sekoittaa myös käsin).



TULOSTEN LASKEMINEN

$$m = M * c * V$$

m = typen määrä mg

V=(näytteen kulutus – nollanäytteen kulutus) mL

c = HCl konsentraatio mol/L (tässä 0,1mmol/mL)

M= typen moolimassa, 14,007mg/mmol

$$\% \text{ typpeä} = \frac{\text{typen määrä}_{mg}}{\text{näytteen paino}_{mg}} * 100$$

$$\% \text{ proteiinia} = \% \text{ typpeä} * 6,25$$

Typen muuntokerroin proteiiniksi on tässä 6,25.

REAGENSSIEN TARVE:

Polttoputkia 6kpl / poltto

(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 12mL x 6 = 72mL

(K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 7g x 6 = 42g

(CuSO<sub>4</sub>) 0,8g x 6 = 4,8g

(0,4% boorihappo, vastaanottoliuos) 25mL (0,9/1,9) \* 6 = 71,05 mL

(indikaattoriliuos, väriiliuos) 25 mL (1,0/1,9)\*6 = 78,95 mL

(35% NaOH) 50mL x 6 = 300 mL + testiputket alussa esim. 2x50 mL

(0,1M HCl) 1-100mL / näyte \* 6 = 60-600 mL, kannattaa valmistaa 1L, jotta voi huuhdella byrettiä

LISÄTIETOA:

*Miten muuntokertoimet määritetään?*

Esimerkiksi jo 1800-luvun loppupuolella proteiinipitoisuuden laskemiseen on käytetty muuntokerrointa 6,25 perustuen olettamukseen, että proteiinit sisältäisivät typpeä 16% (100/16=6,25). Nykyään käytetään tuoteryhmäkohtaisia kertoimia, koska proteiinien tyypipitoisuudet ovat hyvin erilaisia. Proteiinerroin lihalle ja kalalle on 6,25. Maidolle ja maitovalmisteille 6,38 ja viljalle ja viljavalmisteille 5,7.

*0,1M HCl-liuoksen valmistaminen:*

Miten valmistetaan 1000 mL 0,1M HCl-liuosta kun meillä on väkevää vetykloridihappoa (37%) jonka tiheys on 1,18 g/ mL?

Oletetaan, että väkevää vetykloridihappoa on 1000 mL.

Liuoksen massa on tällöin  $m = \rho \cdot V = 1,18 \text{ g/mL} \cdot 1000 \text{ mL} = 1180 \text{ g}$

Tässä määrässä on vetykloridihappoa 37% eli  $0,37 \cdot 1180 \text{ g} = 436,6 \text{ g}$

$M(\text{HCl}) = 1,008 + 35,453 = 36,461 \text{ g/mol}$

$n(\text{HCl}) = m/M = (436,6 \text{ g}) / (36,461 \text{ g/mol}) = 11,9744 \text{ mol}$

$c(\text{HCl}) = n/V = 11,9744 \text{ mol/L}$

$c_1 V_1 = c_2 V_2 \rightarrow V_1 = (c_2 V_2) / c_1$

$$V_1 = \frac{(0,1 \text{ mol/L}) \cdot 1 \text{ L}}{11,9744 \text{ mol/L}} = 0,00835 \text{ L} = 8,35 \text{ mL}$$

Väkevää HCl-liuosta pipetoidaan 8,35 mL:aa yhteen litraan ionivaihdettua vettä, jotta saadaan 0,1 M vetykloridihappoliuos.

Näyte	Val.Nir. Boreal	Kosteus SeAMK	
		Nir	Valk. SeAMK Nir
15	25,9	9,21	<b>24,5</b>
61	25,5	9,51	25,21
56	23	9,26	<b>25,46</b>
76	0	9,1	25,65
62	25,7	9,55	26,1
64	24,3	9,04	26,5
59	23,5	9,25	26,84
65	24,1	9,18	26,87
60	24,8	8,96	27,1
17	23,7	7,79	27,23
66	24,9	8,9	27,24
73	0	8,62	27,5
58	24,8	9,07	27,57
12	37,3	9,2	27,65
39	26,3	9,39	27,78
67	25,4	8,79	27,82
79	0	7,79	28,14
63	25,4	8,77	28,21
53	26,9	10,3	28,24
37	27,7	9,67	28,4
2	31,9	9,88	28,52
57	26,1	8,93	28,52
13	28,5	9,43	28,54
7	30,5	10,04	28,6
14	27,1	8,67	28,72
42	32,1	9,61	28,72
11	36,1	10,78	28,88
52	28,3	9,57	28,9
16	25,1	8,84	28,91
5	30,9	9,96	29,02
24	27,9	9,42	29,05
44	31,3	9,93	29,35
51	27,5	9,68	29,35
10	37,5	10,83	29,36
29	28,1	9,67	29,46
75	0	7,92	29,49
36	33,5	9,8	29,59
78	0	8,58	29,64

Näyte	Val.Nir. Boreal	Kosteus SeAMK	
		Nir	Valk. SeAMK Nir
72	0	8,61	29,71
6	30,4	10,22	29,73
4	30,7	10,15	29,78
25	29,1	9,68	29,84
9	38,3	10,74	29,87
38	28,9	9,61	29,88
54	26,6	9,86	29,92
43	32,7	9,52	29,93
1	31,5	10,14	29,96
49	28,7	9,66	30,32
69	0	8,94	30,37
41	33,9	10,07	30,38
48	29,2	9,77	30,45
55	29,5	9,15	30,49
46	29,9	9,45	30,63
8	35,4	10,09	30,82
21	30,1	9,66	30,84
47	31,7	9,75	30,85
45	33,4	9,6	31
33	34,9	10,09	31,11
80	0	8,36	31,17
34	33,1	9,83	31,18
23	35,2	10,1	31,36
71	0	8,29	31,38
31	35,8	9,79	31,57
19	32,5	9,54	31,64
3	35,9	10,18	31,65
40	34,5	8,82	31,75
70	0	8,28	31,76
35	29,3	7,57	31,79
30	36,5	9,52	31,89
18	35,1	9,38	32,38
27	32,3	9,33	32,42
68	0	8,23	32,71
22	33,7	9,73	33,02
20	36	9,95	33,22
77	0	7,74	33,4
74	0	7,9	33,84
28	32,9	9,11	34,08
32	34,6	9,15	34,48
26	34,3	9,05	34,55

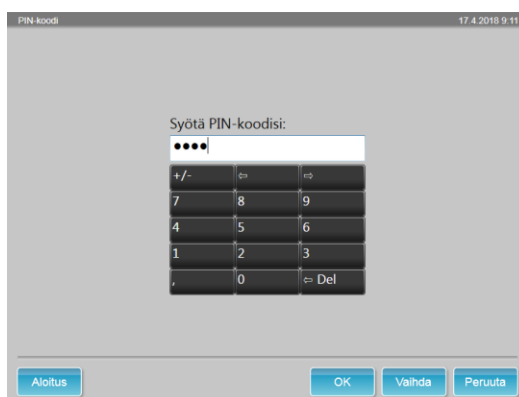
Näyte	Boreal NIR	SeAMK NIR	Kjehldahl 6,25	Kjehldahl 5,33
1	31,5	29,96	25,58	21,82
2	31,9	28,52	23,98	20,45
12	37,3	27,65	21,27	18,14
13	28,5	28,54	20,67	21,82
14	27,1	28,72	20,67	20,45
15	25,9	<b>24,5</b>	24,11	20,56
16	25,1	28,91	21,34	19,75
17	23,7	27,23	21,34	24,63
18	35,1	32,38	28,88	25,15
22	33,7	33,02	30,20	25,75
23	35,2	31,36	28,92	24,66
24	27,9	29,05	23,71	25,75
26	34,3	34,55	30,70	24,66
27	32,3	32,42	28,76	25,28
28	32,9	34,08	30,25	25,79
29	28,1	29,46	25,19	21,49
30	36,5	31,89	30,91	26,36
33	34,9	31,11	29,51	21,49
36	33,5	29,59	26,99	26,36
37	27,7	28,4	25,08	21,49
38	28,9	29,88	25,96	26,36
39	26,3	27,78	24,00	21,49
41	33,9	30,38	28,37	26,36
43	32,7	29,93	27,27	21,49
45	33,4	31	28,34	26,36
47	31,7	30,85	27,93	21,49
52	28,3	28,9	24,11	26,36
53	26,9	28,24	25,15	21,49
55	29,5	30,49	26,57	26,36
56	23	<b>25,46</b>	20,94	21,49
59	23,5	26,84	22,30	26,36
60	24,8	27,1	22,21	21,49
61	25,5	25,21	22,32	26,36
62	25,7	26,1	23,35	21,49
63	25,4	28,21	22,79	26,36
64	24,3	26,5	21,05	21,49
67	25,4	27,82	23,07	26,36
69	0	30,37	26,57	21,49
71	0	31,38	26,73	26,36
73	0	27,5	21,87	21,49
74	0	33,84	29,50	26,36
76	0	25,65	25,55	21,49
77	0	33,4	27,99	26,36
78	0	29,64	23,03	21,49
80	0	31,17	25,69	26,36



## Analyysiprofiilin tekeminen NIR:iin



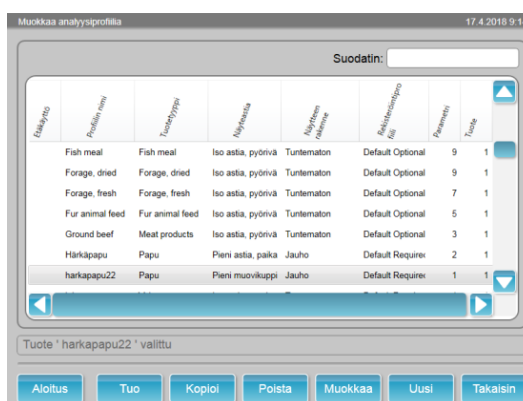
Valitse aloitusvalikosta  
**Asetukset**



Syötä laitteen PIN-koodi



Valitse **Analyysiprofiilit**



Valitse sivun alalaidasta **Uusi**

Muokkaa 17.4.2016 9:17

Profilin nimi:  Tuotetyyppi:

Täytä:  Rekisteröinti:

Toista:  Tulostusmalli:

Vertailunäyte:  Automaattii tulostus:

Referenssi:

Näyteastia:

Näytteen rakenne:

Kommentti:

Aloitus Tallenna Peruuta

## Analysoi

Määrittele miten laite analysoi tuotteen:

- Täytä = Rinnakkaisnäytteet (kpl)
- Toista = mittausten määrä/näyte
- Rekisteröinti = nimeääkö laite näytteen itse, vai nimeääkö käyttäjä tutkittavat näytteet.

Muokkaa KalibrointiTesti 17.4.2016 9:27

Profilin nimi: KalibrointiTesti Tuotetyyppi: Fababeans

Protein As is % 22,50 38,30 As is Päivitä Poista Proteiini 41M

Lisää parametri Kalibrointi Kaava Käyttäjän syö

Aloitus Tallenna Peruuta

## Parametrit

- Käytettävän kalibroinnin valinta, jos kalibrointia ei ole vielä tehty kannattaa valita, jokin jo olemassa olevista samantyyppisistä kalibroinneista ja vaihtaa myöhemmin itse tehtyyn kalibrointiin.

Muokkaa KalibrointiTesti 17.4.2016 9:29

Profilin nimi: KalibrointiTesti Tuotetyyppi: Fababeans

Protein As is     Ei käytössä Ylös

Alas

Aloitus Tallenna Peruuta

## Näyttö

- Mitä tietoja laitteen näytöllä näkyy tuotetta analysoitaessa

Muokkaa KalibrointiTesti 19.4.2016 9:31

Profilin nimi: KalibrointiTesti Tuotetyyppi: Fababeans

Protein As is Bias 0,00 Slope 1,000

Aloitus Tallenna Peruuta

## Bias/Slope

- Voidaan syöttää Bias/Slope korjauskertoimet.

Muokkaa KalibrointiTesti 17.4.2018 9:32

Profilin nimi: KalibrointiTesti Tuotetyyppi: Fababeans

Uudelleentäytön hylkääminen: Ei aktiivinen

MD hylkäysraja:

Parametri	MD virhe	MD toleranssi
Protein As Is	4.0	7.0

Analyyysi  
Parametri  
Näyttö  
Bias/Slope  
Poikkeama

Aloitus Tallenna Peruuta

Tuotteet 17.4.2018 9:34

Suodatin:

Tuotteen nimi	Analyysiprofiili	Tuotteen tyyppi	Luokituskategoria	Luokituksen muutos	Näytä ylemmässä osassa	Alin tyypin ylemmässä osassa	Meat analyysi	Pois käytöstä
Ground beef	Ground beef						<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Härkäpapu	Härkäpapu						<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
harkapapu22	harkapapu22						<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
johanna	johanna						<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
KalibrointiTesti	KalibrointiTesti						<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Meat and bone m	Meat and bone m						<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Meat by-products	Meat by-products						<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Meat products	Meat products						<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Aloitus Tuo Poista Muokkaa Uusi Takaisin

### Poikkeama

- Uudelleen täytön (rinnakkaisnäytteen) hylkääminen ja hylkäämiselle määritellyt rajat

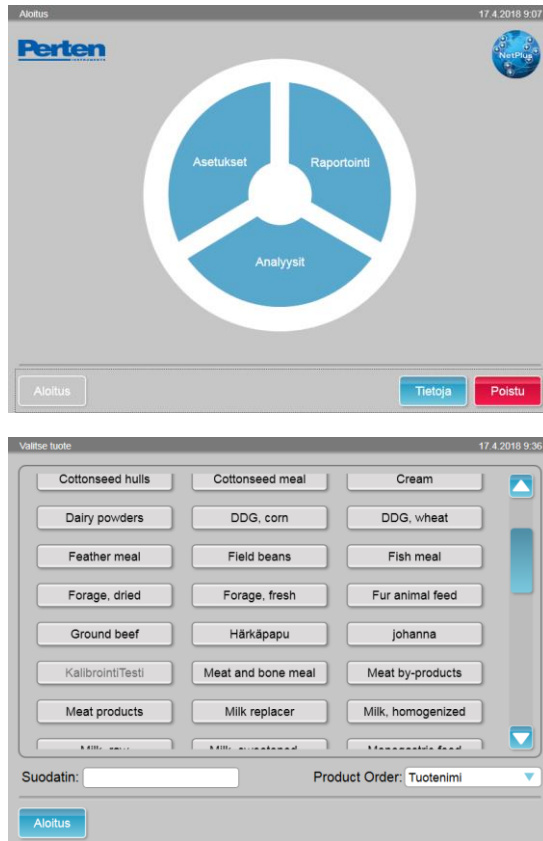
Valitse aloitusnäytöltä

**Asetukset** → syötä laitteen salasana → valitse

**Tuoteprofiilit** → etsi tekemäsi profiili → tarkista, ettei tekemäsi profiiliin kohdalla ole valittuna "poissa käytöstä".

Tekemäsi profiili näkyy nyt analysoitavien tuotteiden listalla.

## Näytteiden syöttäminen NIR:iin



Valitse aloitusvalikosta **Analysit**

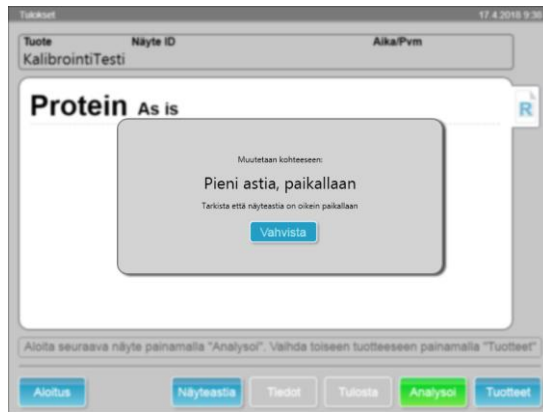
Etsi käyttämäsi analyysiprofiili



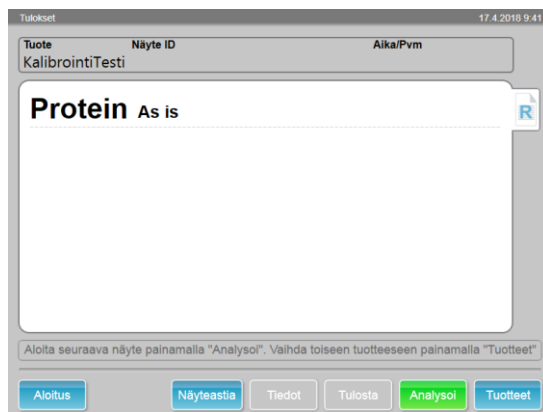
Tee näytteet, muista käyttää oikeankokoista näyteastia!



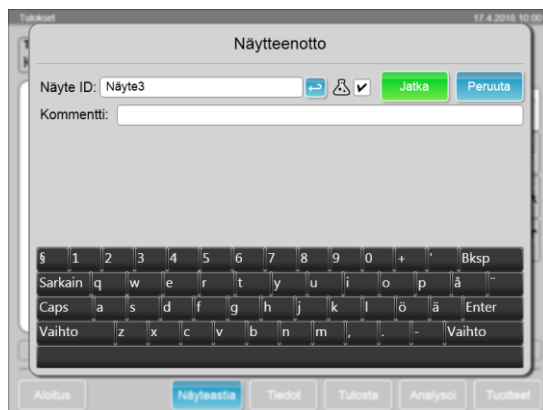
Aseta näyte NIR:iin



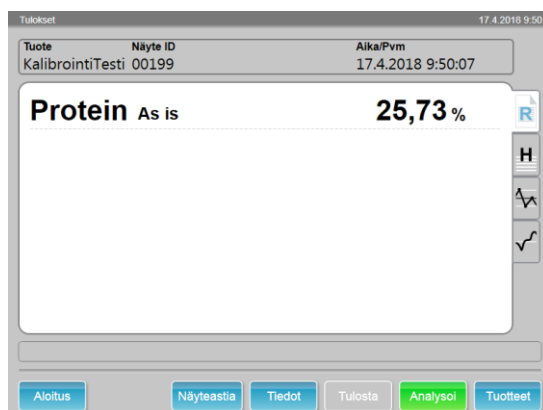
Laite pyytää käyttämään analyysiprofiiliin määriteltyä näyteastiaa ja tarvittaessa tekemään analyysiprofiiliin määritellysti uudelleen täyttöjä (rinnakkaisnäytteitä).



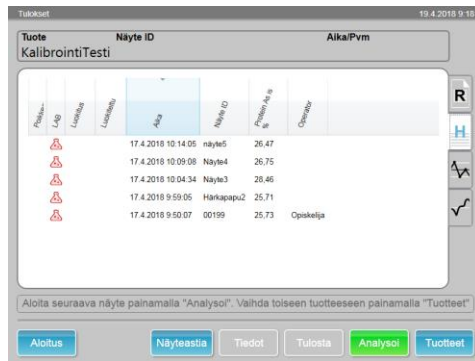
Paina **Analysoi**



Nimeä näyte ja merkitse se tarvittaessa laboratorionäytteeksi. Laboratorionäytteille voidaan lisätä kemiallisesti määritetyt laboratoriotulokset.



Mittausten jälkeen näytöllä näkyy analyysin tulokset



Tulokset 19.4.2018 9:18

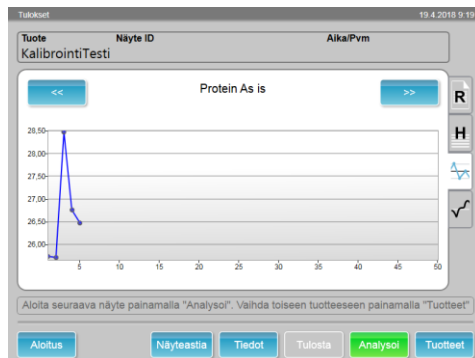
Tuote: KalibrointiTesti

Päivä	Lag	Luokka	Luokka	Alue	Näyte ID	Arvo	Yksikkö	Operator
17.4.2018	10:14:05	näyte5			näyte5	26.47		
17.4.2018	10:09:08	Näyte4			Näyte4	26.75		
17.4.2018	10:04:34	Näyte3			Näyte3	28.46		
17.4.2018	9:59:05	Häikkäpappu2			Häikkäpappu2	25.71		
17.4.2018	9:50:07	00199			00199	25.73		Oskarija

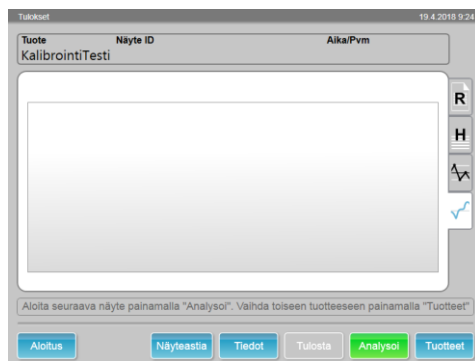
Aloita seuraava näyte painamalla "Analysoi". Vaihda toiseen tuotteeseen painamalla "Tuotteet"

Aloitus Näyteastia Tiedot Tulosta Analysoi Tuotteet

Välilehdeltä näet tallennetut näytteet ja niiden tulokset



Näytteiden tulokset graafisesti, klikkaamalla yläreunassa olevasta nuolesta, näet muut tutkitut parametrit.



Voit tarkastella spektrin grafiikka



Tulokset 19.4.2018 13:10

Tuote: KalibrointiTesti

Näyte ID: näyte5 Pvm/Aika: 17.4.2018 10:14:05 LAB Kommentti:

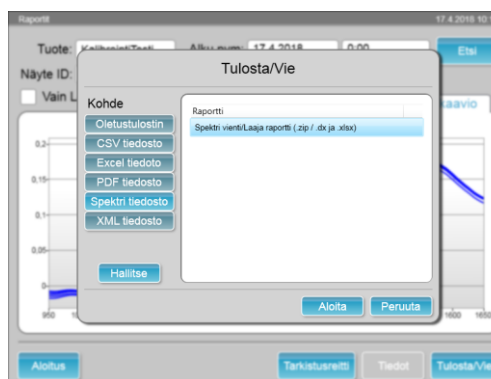
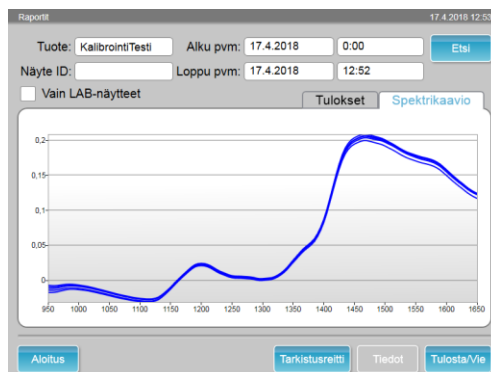
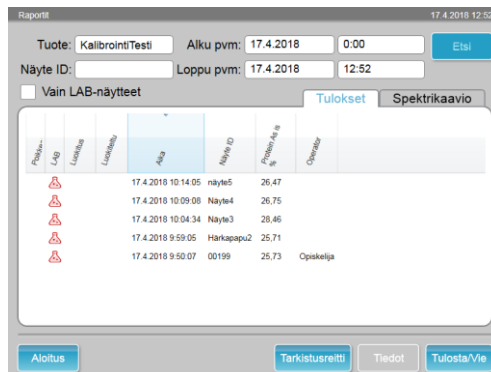
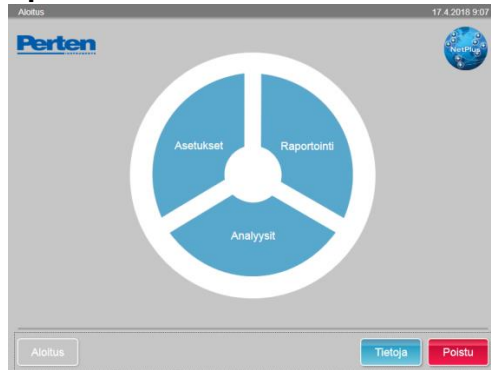
Parametri	Yksikkö	Arvo	Lag
Protein As is	%	26.47	

Poista Tallenna Peruuta

Aloitus Näyteastia Tiedot Tulosta Analysoi Tuotteet

Valitsemalla sivun alareunasta tiedot, voit lisätä tallennetuille näytteille manuaalisesti tietoja esim. laboratorioarvot.

## Spektrin tulostaminen

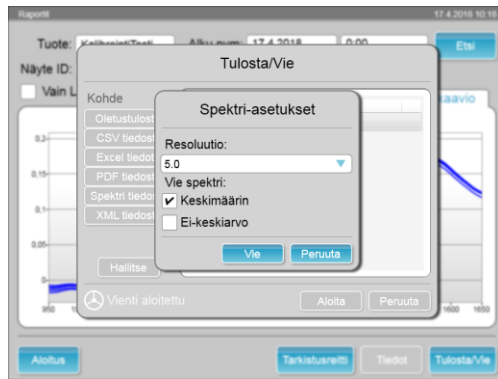


Valitse **Raportointi**

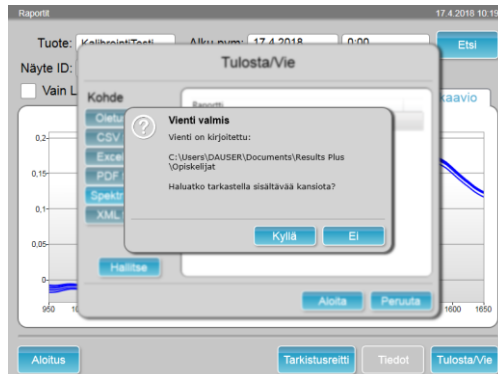
Täytä seuraavat tiedot  
Alku pvm, loppu pvm ja tuotteen nimi. Jos näytteille on lisätty laboratorioarvoja, voit rajata hakua valitsemalla "Vain **Lab-näytteet**".  
Paina **Etsi**.  
Näytölle tulee näkyviin näytteet määrittelemältäsi ajan jaksolta.

Valitsemalla **Spektrikaavio** saat näkyviin näytteistä piirretyn spektrin.  
Tulosta spektri valitsemalla **Tulosta/Vie**.

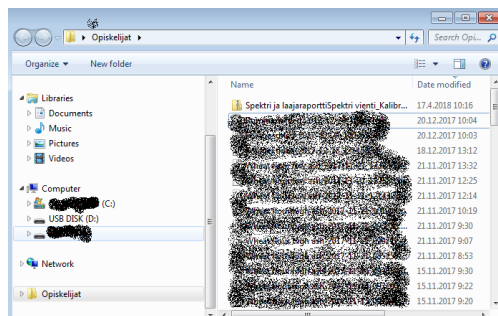
Valitse **Spektri tiedosto** ja klikkaa aktiiviseksi **Spektri vienti/Laaja raportti**.  
Käynnistä tiedoston vienti klikkaamalla **Aloita**.



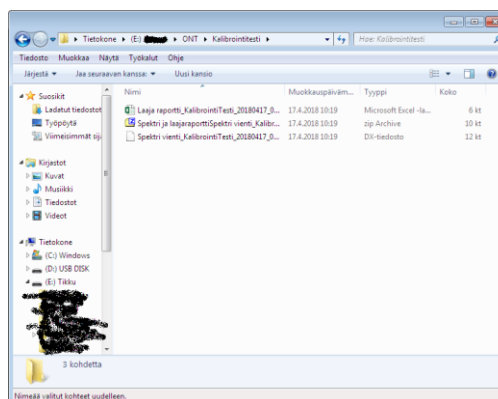
Määritä Spektri-asetukset ja valitse **Vie**.



Valitsemalla **Kyllä**, kone avaa automaattisesti kansion, johon spektritiedosto on tallennettu.



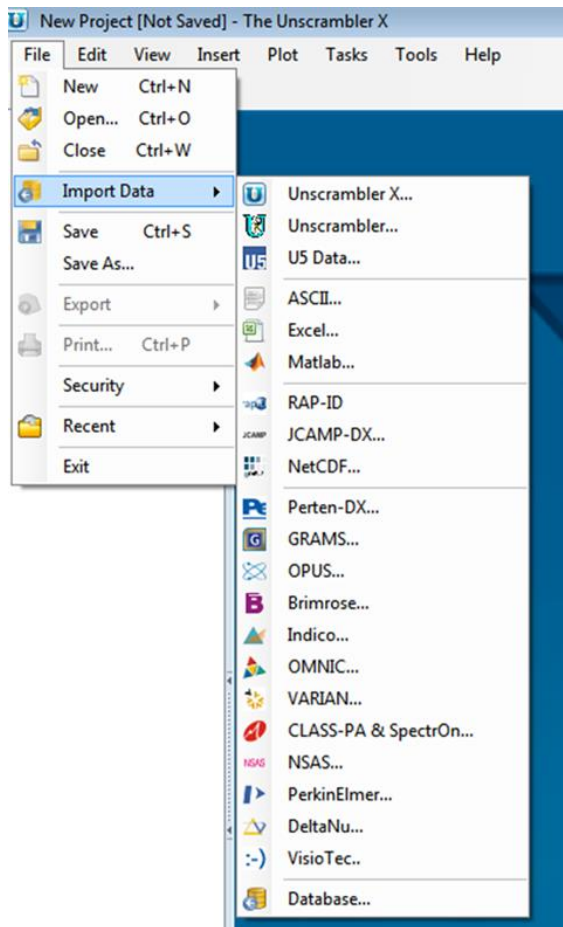
Tiedosto kannattaa tallentaa NIR:in muistista esim. muistitikulle.



NIR:iltä tulostuva spektritiedosto on pakattu tiedosto, joka täytyy purkaa ennen kuin tiedostoja voidaan käyttää.

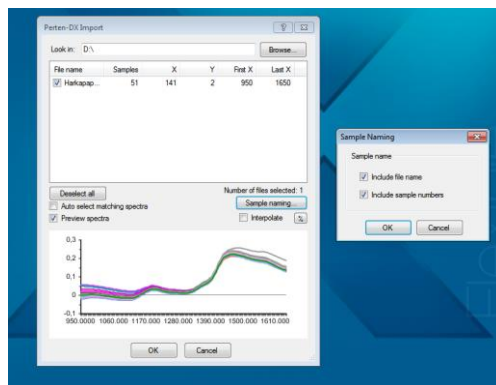


## THE UNSCRAMBELER X



Dataa voidaan tuoda Unscrambleriin erilaisissa tiedostomuodoissa

Perten DA 7250 laitteen ResultPlus toiminnon kautta tallennetut tiedostot voidaan aukaista Unscramblerissa valitsemalla tiedostomuodoksi Perten-Dx.



Etsi ja valitse käyttämäsi tiedosto. Jos haluat sisällyttää tuomaasi tiedostoon tiedostojen nimet ja näytteiden numerot, tee valinnat Sample Naming-valikon kautta.

Spektrin saat näkyviin valitsemalla **Preview spectra**

Spektri vienti_KalibrointiTesti_20180417_0000_To_20180417_1015_5						950.0000	955.0000	960.0000	965.0000	970.0000	975.0000	980.0000	
		LONG DATE	Repack	Repeat		1	2	3	4	5	6	7	
00199	Spektri vienti	1.0000	2018-04-17T	3	10	1	-0,0182	-0,0182	-0,0180	-0,0173	-0,0162	-0,0151	-0,0142
Härkapapu2	Spektri vienti	2.0000	2018-04-17T	3	10	2	-0,0099	-0,0102	-0,0102	-0,0098	-0,0091	-0,0083	-0,0076
Näyte3	Spektri vienti	3.0000	2018-04-17T	3	10	3	-0,0079	-0,0083	-0,0084	-0,0082	-0,0076	-0,0070	-0,0065
Näyte4	Spektri vienti	4.0000	2018-04-17T	3	10	4	-0,0150	-0,0152	-0,0151	-0,0145	-0,0137	-0,0128	-0,0120
näyte5	Spektri vienti	5.0000	2018-04-17T	3	10	5	-0,0123	-0,0125	-0,0124	-0,0118	-0,0109	-0,0100	-0,0092

Tuomasi tiedosto on taulukkomuodossa, tiedoston nimi näkyy vasemmassa reunassa olevalla projektilistalla.

### Taulukon tulkitseminen:

- Oikealla olevat keltaiset sarakkeet kertovat perustietoja näytteistä (esim. päivämäärä, laite jolla näyte on analysoitu, montako rinnakkaisnäytettä on otettu jne..)
- Sarakkeet (1-141) sisältävät näytteiden spektrin
- Sarakkeet (142 ja eteenpäin) sisältävät vertailuarvoja näytteistä (esim. kosteus, proteiini)
- Vasemmalla olevan oranssit sarakkeet sisältävät ennalta määritettyjä luokamuuttujia (esim. mikä näyte on kyseessä, minkälaisessa astiassa näyte on analysoitu)

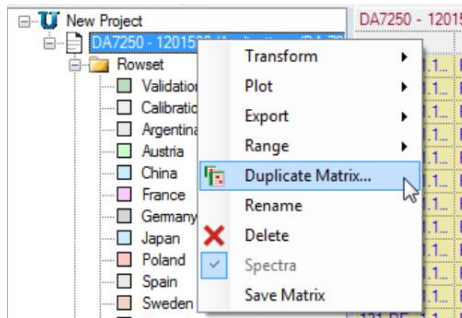
Spektri vienti_KalibrointiTesti_20180417_0000_To_20180417_1015_5						Protein As is	INSTRUMEN	SPECTROM	Instrument T	Product Type	Shape Type	Tray Type	Operator	IsReject
		LONG DATE	Repack	Repeat		142	143	144	145	146	147	148	149	150
00199	Spektri vienti	1.0000	2018-04-17T	3	10	1	1512503	SNIR3567	DA7250	Fababeans	Jauho	Pieni astia. p	Opiskelija	No
Härkapapu2	Spektri vienti	2.0000	2018-04-17T	3	10	2	1512503	SNIR3567	DA7250	Fababeans	Jauho	Pieni astia. p		No
Näyte3	Spektri vienti	3.0000	2018-04-17T	3	10	3	1512503	SNIR3567	DA7250	Fababeans	Jauho	Pieni astia. p		No
Näyte4	Spektri vienti	4.0000	2018-04-17T	3	10	4	1512503	SNIR3567	DA7250	Fababeans	Jauho	Pieni astia. p		No
näyte5	Spektri vienti	5.0000	2018-04-17T	3	10	5	1512503	SNIR3567	DA7250	Fababeans	Jauho	Pieni astia. p		No

### Raaka datan lajittelu The Unscrambler X-ohjelmassa

- Unscrambleriin tuodut tiedot ovat järkevää lajitella. Data lajitellaan rivien ja sarakkeiden mukaan. Tietojen lajittelu selkeyttää analyysien tekemistä.
- Kun tuot tiedoston muodossa Perten-DX, tiedosto on automaattisesti lajiteltu, mutta automaattinen lajittelu on hyvä tarkistaa!
- Muita tiedostomuotoja käytettäessä, lajittelu tulee tehdä itse.

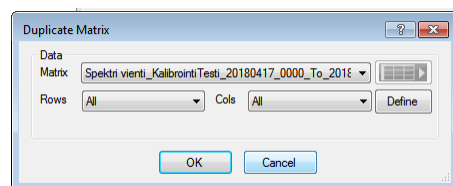


## ERI TIETOKANTOJEN YHDISTÄMINEN

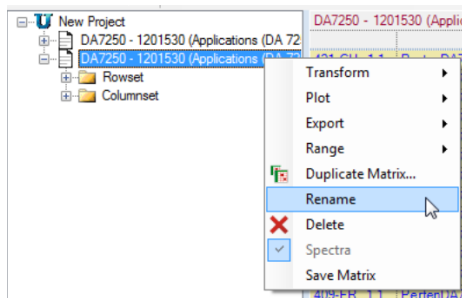


Ennen tietokantojen yhdistämistä varmista, että sarakkeiden lukumäärä on identtinen ja että kopioidut parametrit ovat oikeassa järjestyksessä.

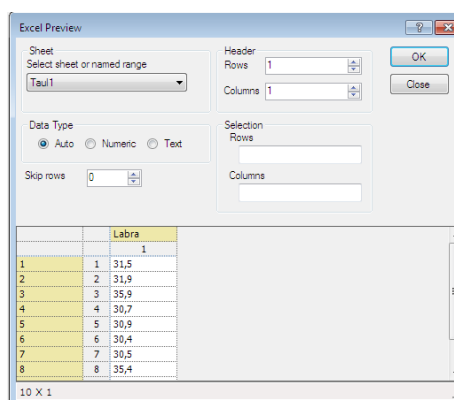
Aloita tekemällä kopio alkuperäisestä tiedostosta. Valitse alkuperäinen tiedosto projekttilistalta, klikkaa hiiren oikeaa nappia ja valitse **Duplicate Matrix**.



Tarkista, että olet kopioimassa oikean taulukon ja valitse **OK**.

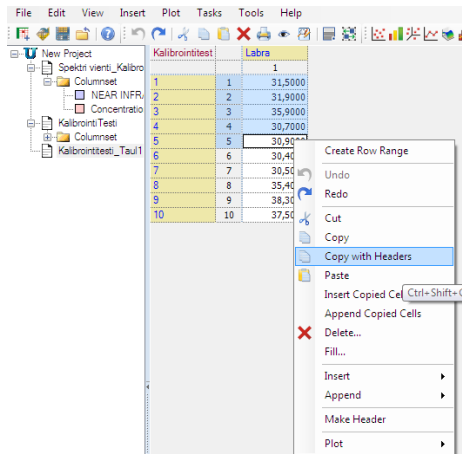


Nimeä uusi tiedosto projekttilistalle klikkaamalla hiiren oikeaa nappia ja valitsemalla **Rename**.

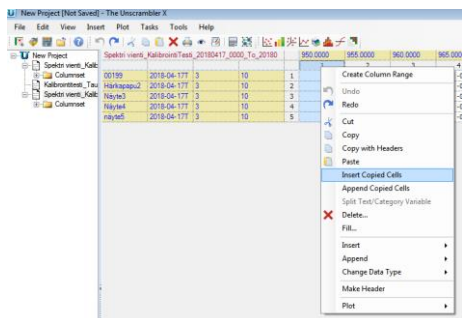


Tuo uusi tiedosto ohjelmaan kohdassa **The Unscrambler X** olevan ohjeen mukaan. Tässä esimerkissä tiedostomuodoksi on valittu Excel.

Valitse käyttämäsi rivit ja sarakkeet ja paina **OK**.

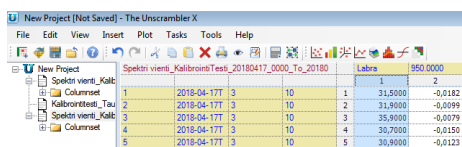


Avaa tuomasi tiedosto.  
Valitse ja aktivoi ne rivit/sarakkeet, joita olet kopioimassa. Klikkaa hiiren oikeaa nappia ja valitse **Copy With Headers**.



Avaa tiedosto, johon olet liittämässä tietojasi.

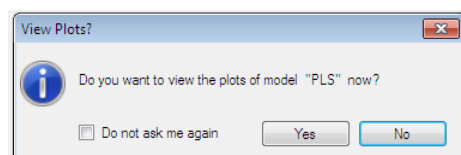
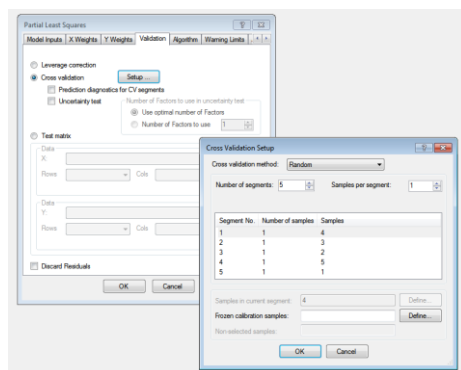
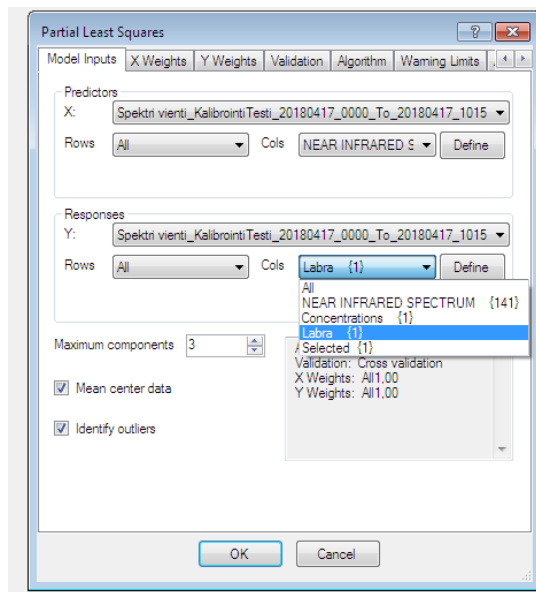
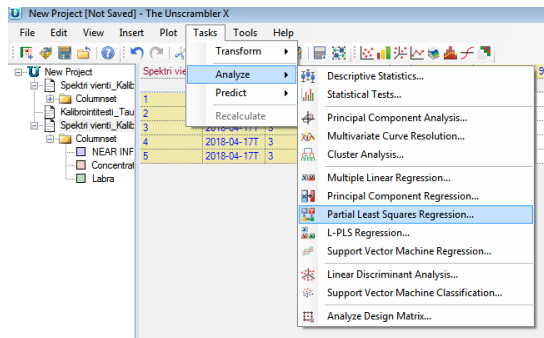
Aktivoi taulukosta ensimmäinen rivi, joka sisältää numeerista dataa.



Klikkaa hiiren oikeaa nappia ja valitse **Insert Copied Cells**

Kopioimasi tiedot lisätään taulukkaan omaksi sarakkeeksi. Tarkista vielä, että tiedot ovat kopioituneet oikein.

## PLS REGRESSIO



Avaa projektilistalta käyttämäsi tiedosto.

Valitse ylävalikosta **Task** →

**Analyze** → **Partial Least Squares Regression**

Valitse Predictors (ennustajat)

Cols (sarakkeet) vetovalikosta lajittelemasi spektri.

- Valitse Responses (vastaavat) Cols vetovalikosta yksi tutkittava parametri (esim. kosteus)
- Jos halutulle parametrille ei ole luotu omaa sarakettaan (=tietoja ei ole lajiteltu), voidaan se tehdä nyt valitsemalla Define.
- Jos regressiomallia laskettaessa ei haluta käyttää kaikkia näytteitä, voidaan Rows valikosta valita vain käytettävät rivit. Valinnan voi tehdä joko Predictors tai Responses valikossa, toinen valikko muuttuu automaattisesti samanlaiseksi.

Validointi välilehdeltä valitaan

**Cross Validation.**

Ristiinvalidoinnin asetukset

voidaan muokata **Setup**

painikkeen kautta. Ristiinvalidointi

tehdään usein

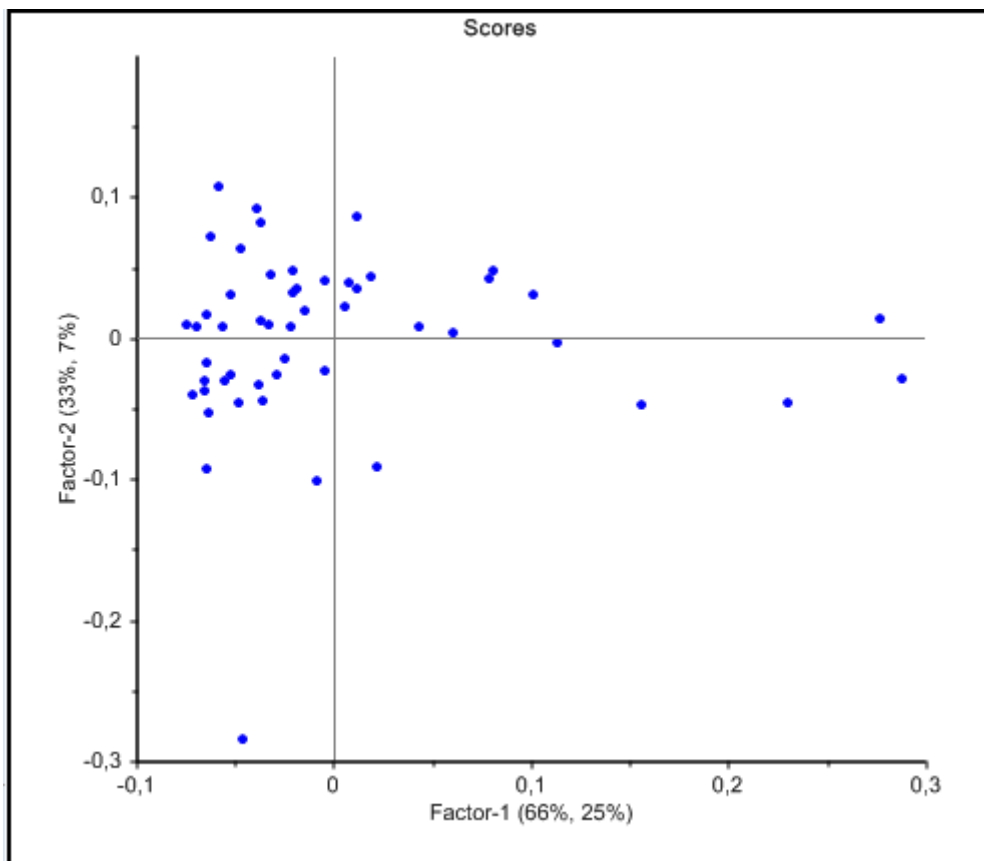
satunnaismenetelmällä (random).

Luo regressiomalli valitsemalla

**Yes.**

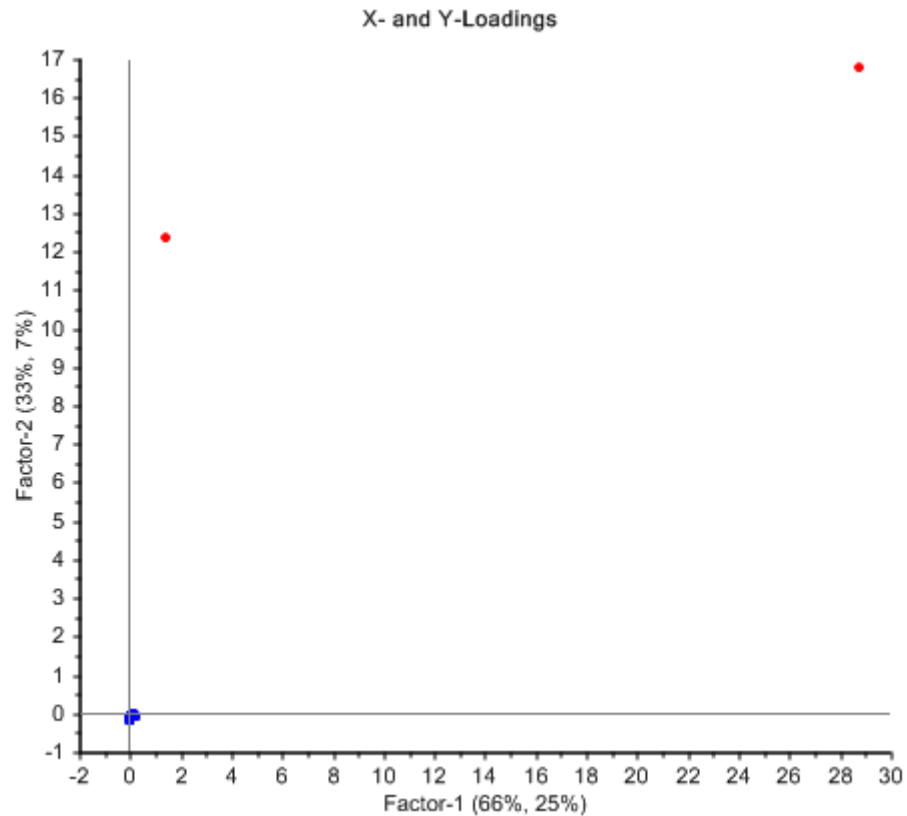
## ESIMERKKEJÄ KUVIOSTA JA NIIDEN TULKITSEMISESTA

- Kun regressiomalli luodaan, esitetään se ohjelmassa erilaisina kuvioina.
- Aktiivisena olevan ruudun ympärillä näkyy musta kehys.
- Näkyvillä olevia kuvioita voidaan muuttaa avaamalla projektilistalta kansio **Plots** ja valitsemalla eri kuviota. Joissain tapauksissa kaikkien ruutujen kuviot muuttuvat.



### SCORES

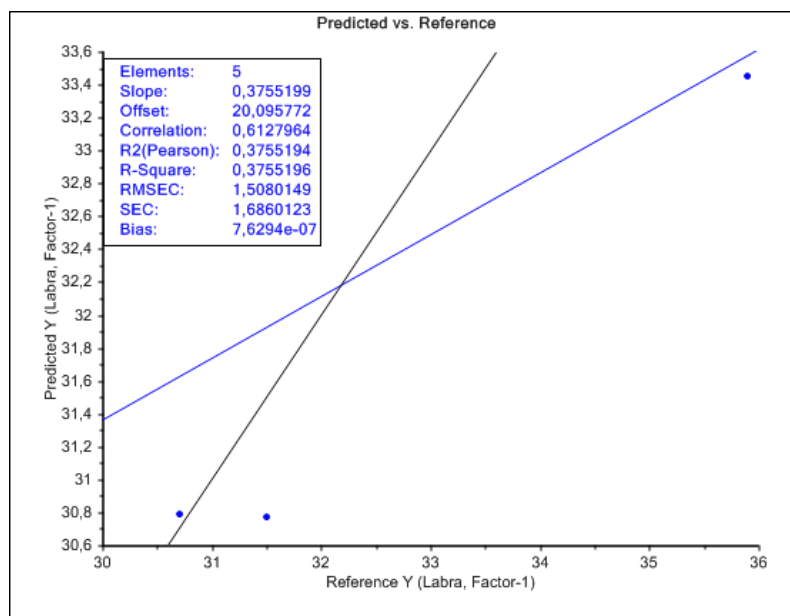
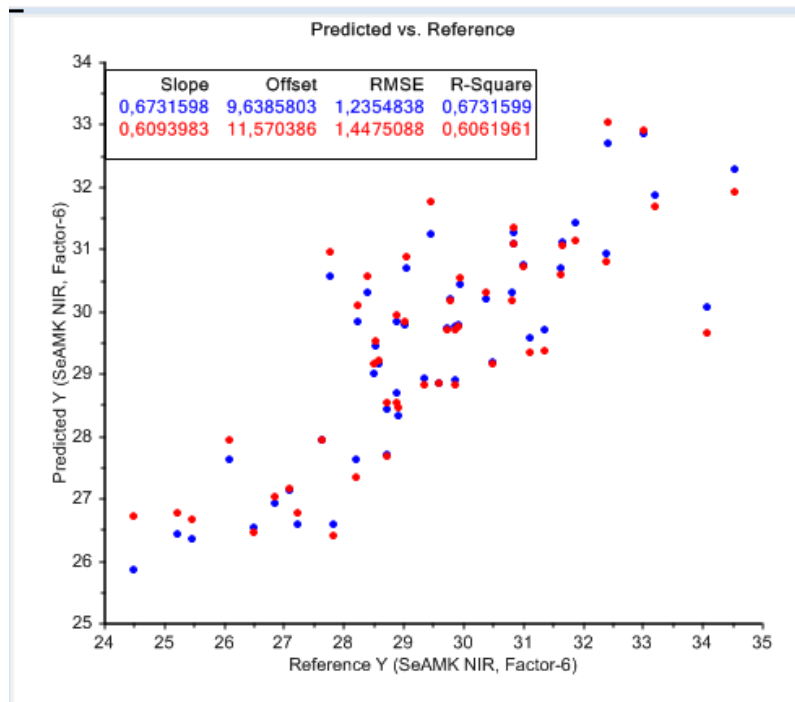
- Tämä on kaksiulotteinen havaintokuva kahdesta määritellystä tekijästä PLS-regressiossa. Kuvio antaa tietoa näytteiden sijoittumisesta havainto-alueelle. Havainnointia helpottaa sivuilla olevat tunnusluvut 1 ja 2.
- Havaintokuvioista voidaan päätellä näytteiden välisiä yhtäläisyyksiä ja eroavaisuuksia. Mitä lähempänä näytteet ovat toisistaan, sitä enemmän niissä on samankaltaisuuksia ja päinvastoin.
- Piirroksista voidaan helposti huomata, jos jotkin näytteet ovat hyvin erilaisia, kuin toiset. Selkeästi eri kohtaan sijoittuneet näytteet on järkevintä tutkia uudelleen. Eroavaisuudet voivat johtua esimerkiksi spektrissä olevasta virheestä tai siitä, ettei näyte kuulu niihin näytteisiin joita halutaan tutkia.



### JÄÄNNÖSTERMIT VS. Y-ENNUSTETTU

- Tässä kuvassa näkyvät Y-jäännöstermit ja ennustetut Y-arvot
- Klikkaa kuvaa hiiren oikealla painikkeella ja valitse **Plot/Residuals/General/Y-residuals vs. Y-predicted**.
- Hyväksyttävää mallia varten jäännöstermit on jaoteltu satunnaisiin ja pieniin.
- Poikkeavilla näytteillä on paljon suurempi jäännös, kuin toisilla näytteillä.
- Jos jäännöstermit eivät ole jakautuneet satunnaisesti vaan niiden välillä voidaan havaita systemaattinen rakenne, se voi olla merkki regressiomallin puuttumisesta.





### PREDICTED VS. REFERENCE

- Tämä kuvio kertoo tutkittavasta aineistosta olennaisimman. Kuviosta näkee kalibroinnin aikana tehdyt ennusteet ja voidaan tarkistaa regressiomallin laatu. Regressiomalli on hyvä, jos havaintopisteet ovat lähellä origon kautta kulkevaa suoraa ja suoran kulmakerroin on lähelle 1. Selvästi poikkeavat tulokset voidaan havaita kuviosta helposti.
- Kalibrointitulokset on merkitty kuvioon sinisellä, validointi tulokset punaisella.

## POIKKEVAT NÄYTTEET JA NIIDEN POISTAMINEN

Outlier Warnings

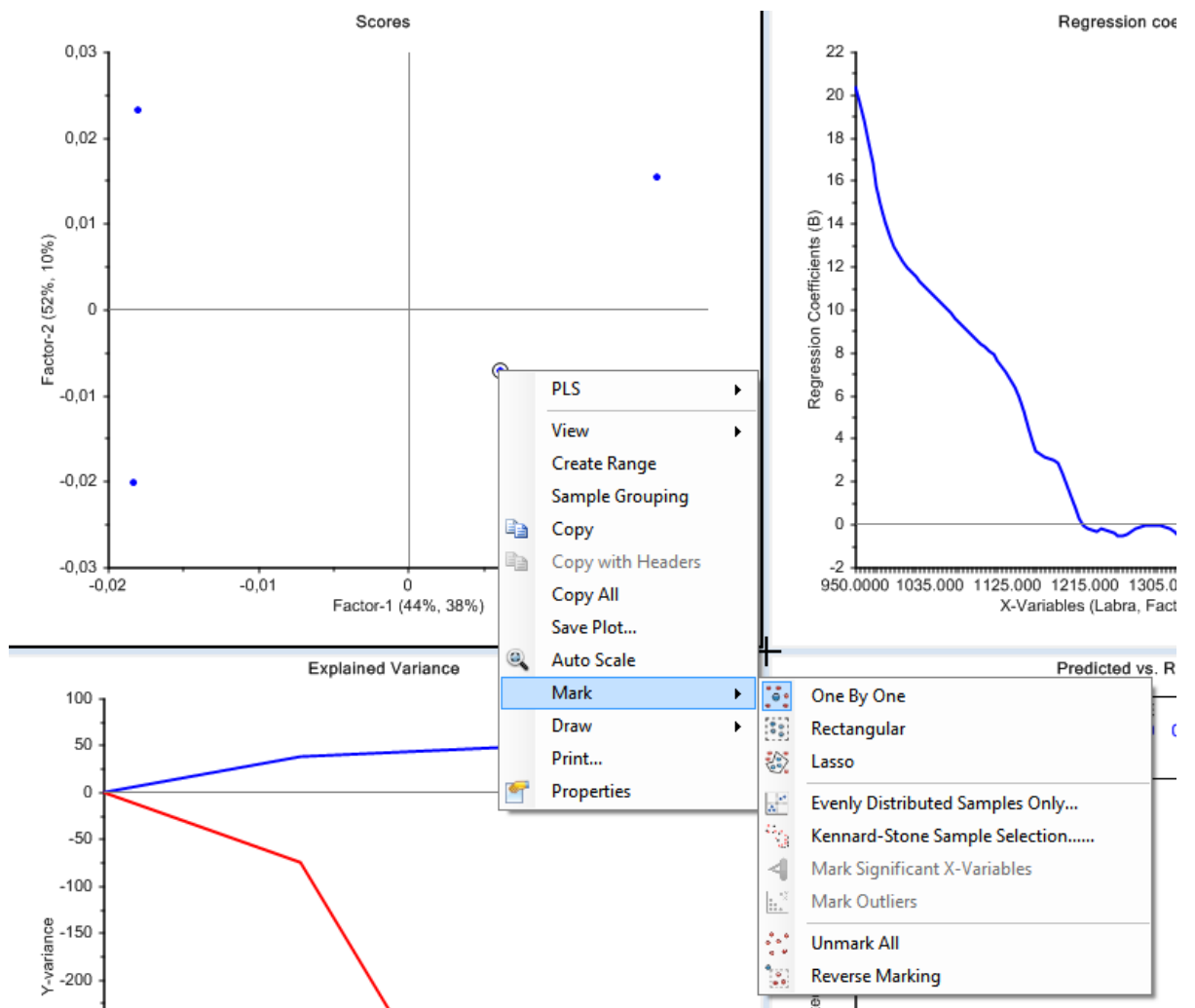
Warning ID	Description
1	Error in Y increases in early components. This may indicate either: Lack of representativity, Outliers or Small number of significant components

Outlier list

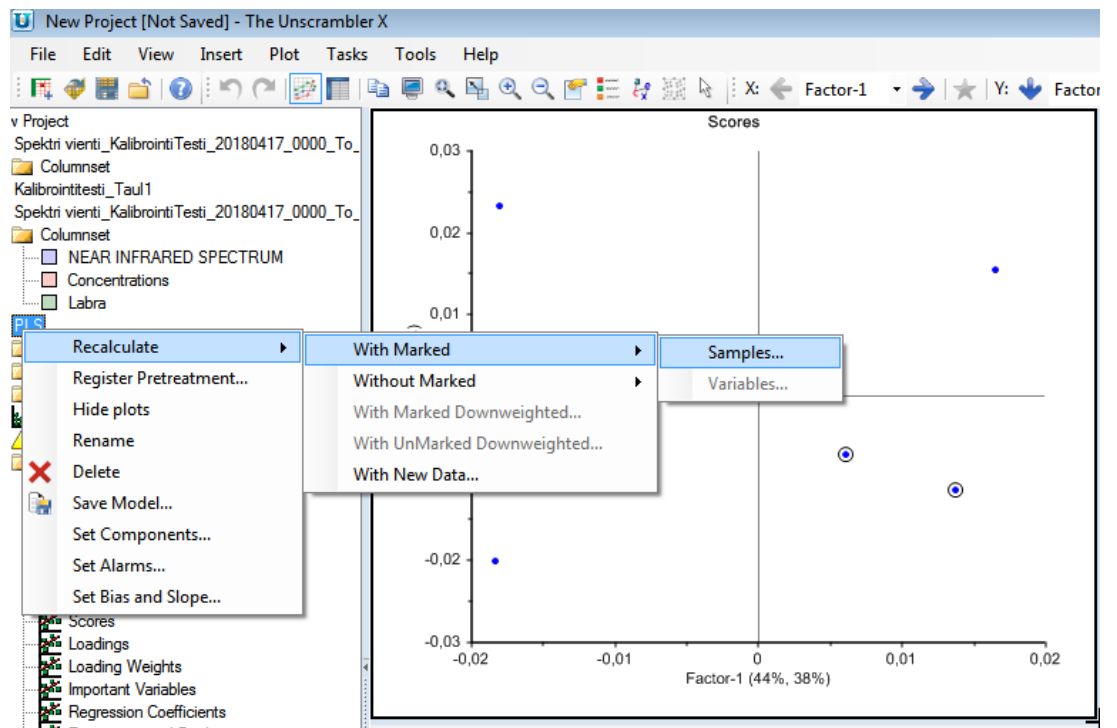
Outlier ID	Component	OW	Warning	Limit	Actual
1	1	181	Y: Total Residual Validation variance increases during the first 3 components	6	75,18639
2	2	181	Y: Total Residual Validation variance increases during the first 3 components	6	199,475

- Ohjelma antaa varoituksen, jos regressiomallia laskettaessa on havaittu poikkeavuuksia.

## POIKKEAMIEN POISTAMINEN

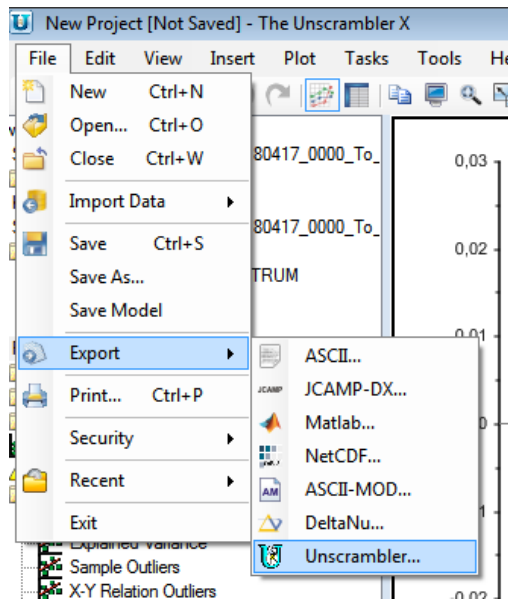


- Poikkeavia näytteitä voidaan merkitä kuvioon klikkaamalla hiiren oikeaa painiketta, valitsemalla **Mark** → valitsemalla jokin merkitsemistyökaluista.

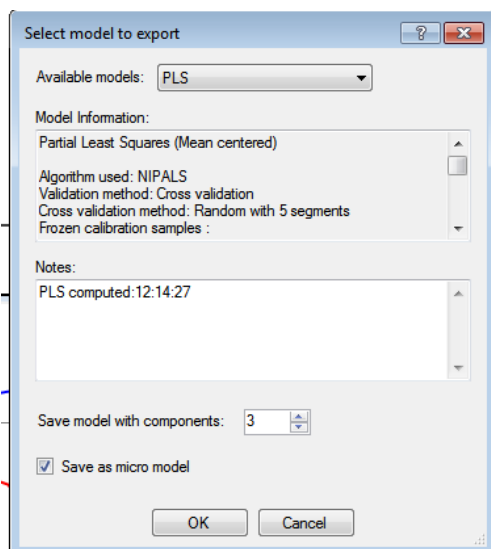


- Jos jokin poikkeava näyte on valittu, malli voidaan laskea uudelleen ilman sitä napsauttamalla hiiren oikealla painikkeella projektilistalta PLS tiedostoa ja valitsemalla **Recalculate** → **Without Marked** → **Samples**.

## REGRESSIOMALLIN TALLENTAMINEN

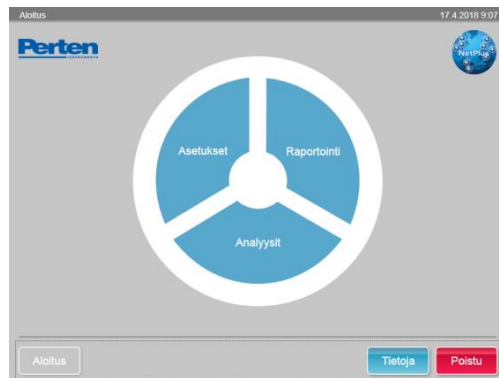


Tallenna tiedosto **File** →  
**Export** → **Unscrambler**

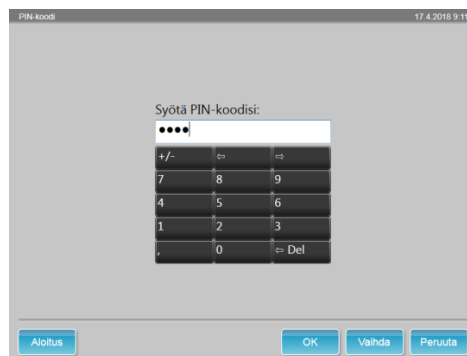


Valitse tallannettavat tiedot  
ja paina **OK**. Tallenna  
tiedosto haluamaasi  
kohteeseen .41M  
tiedostomuodossa.

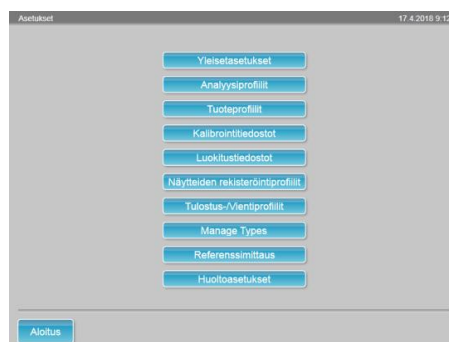
## TIEDOSTON TUOMINEN



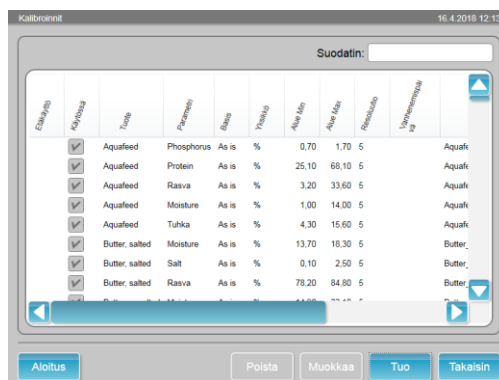
Valitse **Asetukset**



Syötä laitteen salasana



Valitse **Kalibrointitiedostot**



Erätyyppi	Aine	Tyyppi	Parametri	Yksikkö	Pääkäyttäjän nimi	Alue	Alue	Alue	Lisäparametri	Lisäparametri
✓	Aquafeed	Phosphorus	As is	%	0.70	1.70	5			Aquafeed
✓	Aquafeed	Protein	As is	%	25.10	68.10	5			Aquafeed
✓	Aquafeed	Rasva	As is	%	3.20	33.60	5			Aquafeed
✓	Aquafeed	Moisture	As is	%	1.00	14.00	5			Aquafeed
✓	Aquafeed	Tuhka	As is	%	4.30	15.60	5			Aquafeed
✓	Butter, salted	Moisture	As is	%	13.70	18.30	5			Butter_
✓	Butter, salted	Salt	As is	%	0.10	2.50	5			Butter_
✓	Butter, salted	Rasva	As is	%	78.20	84.80	5			Butter_

Valitse sivun alareunasta **Tuo** ja valitse tiedostoista unscramblerista tallentamasi tiedosto.

Uudet kalibrointiasetukset

Tiedosto: PLS.41M

Resoluutio: 5.0

Parametri:  Tuotetyyppi:

Alue MIN  Alue MAX

Moisture Basis:  Fixed Basis:

Yksikkö: %

OK Peruuta

Näytölle aukeaa automaattisesti sivu, jossa määritetään uudet kalibrointiasetukset.

Muokkaa analyysiprofiilia

Suodatin:

Makeryty	Profiilin nimi	Tuotetyyppi	Mittaus	Mittausalue	Mittausyksikkö	Parametri	Tote
Fish meal	Fish meal	Fish meal	Iso astia, pyörivä	Tuntematon	Default Optional	9	1
Forage, dried	Forage, dried	Forage, dried	Iso astia, pyörivä	Tuntematon	Default Optional	9	1
Forage, fresh	Forage, fresh	Forage, fresh	Iso astia, pyörivä	Tuntematon	Default Optional	7	1
Fur animal feed	Fur animal feed	Fur animal feed	Iso astia, pyörivä	Tuntematon	Default Optional	5	1
Ground beef	Meat products	Meat products	Iso astia, pyörivä	Tuntematon	Default Optional	3	1
Härkäpapu	Papu	Papu	Pieni astia, paika	Jauho	Default Require	2	1
harkkapu22	Papu	Papu	Pieni muovikuppi	Jauho	Default Require	1	1

Tuote 'harkkapu22' valittu

Aloitus Tuo Kopioi Poista Muokkaa Uusi Takaisin

Lisää kalibrointi analyysiprofiiliin valitsemalla aloitusnäytöltä **Asetukset** → syötä laitteen salasana → **Analyysiprofiilit** Etsi käyttämäsi analyysi ja valitse sivun alareunasta **Muokkaa**.

Muokkaa Kalibrointi Testi

Profiilinnimi: KalibrointiTesti Tuotetyyppi: Fababeans

Parametri	Yksikkö	Alue MIN	Alue MAX	Moisture Basis	Lämpö
Protein As is %		22.50	38.30	As is	

Päivitä Poista Proteini 41M

Lisää parametri Kalibrointi Kaava Käyttäjän syö

Aloitus Tallenna Peruuta

Mene **parametri**-välilehdelle, valitse lisää parametri: **kalibrointi**. Jos samalla parametrilla on jo käytössä jokin toinen kalibrointi, se täytyy ensin poistaa.

Muokkaa Kalibrointi Testi

Valitse kalibrointi

Tuote	Parametri	Yksikkö	Alue MIN	Alue MAX	Lämpö
Com grts	Moisture	As is %	5.90	15.30	Com grts Moisture Nov 1 2011 micro
Com grts	Rasva	As is %	0.30	2.20	Com grts Oil ass Nov 1 2011 micro.4
Com grts	Tuhka	As is %	0.20	0.90	Com grts Ash ass Nov 1 2011 micro.
Cottonseed hull	Kuitu	As is %	25.40	52.60	CottonSeedHullsMay192008 cal(4)
Cottonseed hull	Moisture	As is %	5.20	9.70	CottonSeedHullsMay192008 cal(1)
Cottonseed hull	Rasva	As is %	0.70	4.60	CottonSeedHullsMay192008 cal(3)

Valitse Peruuta

Aloitus Tallenna Peruuta

Etsi listalta haluamasi kalibrointi ja paina valitse.

Muokkaa KalibrointiTesti 19.4.2018 12:45

Profilin nimi: KalibrointiTesti Tuotetyyppi: Fababeans

Parametri	Yksikkö	As is	As is	As is	As is	Label	
Protein As is	%	22,50	38,30	As is	Päivitä	Poista	Proteiini.41M
Moisture	%	12,10	18,10	Päivitä	Poista	Field beans Apr	

Lisää parametri Kalibrointi Kaava Käyttäjän syö

Aloitus Tallenna Peruuta

Tallenna tekemäsi valinnat. Kalibrointi on nyt käytössä analyysiprofiilissa.



