

近红外光谱法快速测定羊草干草品质的研究

石丹, 张英俊*

中国农业大学草地研究所, 北京 100193

摘要 试验共采集我国北方不同区域、不同生育期、不同干燥方式的羊草干草 150 份, 利用近红外漫反射光谱(NIRS)技术, 采用偏最小二乘回归算法(PLS), 在国内首次建立了适配范围广泛的羊草干草的粗蛋白(CP)、中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)的校正模型, 并对模型的预测能力进行了验证。结果表明, 所建模型的预测结果与常规化学分析得到的结果十分相近: 交互验证相关系数(R_{cv})分别为 0.963 7, 0.959 4 和 0.947 9, 交互验证误差(RSECV)分别为 1.41%, 1.27% 和 1.27%; 外部验证相关系数为 0.965, 0.956 和 0.953; 并且验证集样品的标准差与预测标准差之比均大于 3.0。由此可见, 近红外光谱技术可以准确预测羊草干草中的 CP, NDF 和 ADF 含量, 这对于快速测定我国羊草的品质、准确筛选优质的育种材料均具有十分重要的意义。

关键词 羊草; 近红外光谱; 品质; 模型

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)10-2730-04

引言

羊草(*Leymus chinensis*)是我国北方重要的禾本科牧草, 羊草不仅有很强的抗逆抗旱能力, 而且营养丰富, 适口性好, 各类家畜均喜食, 它是少数适合在我国北方寒冷恶劣气候种植的草种之一^[1-3]。天然羊草草地主要分布在我国东北的松嫩平原, 内蒙古的锡林郭勒草原、科尔沁草原以及呼伦贝尔草原^[4]。在牧草的收获季节, 各地通常将羊草调制制成干草以备其他季节使用, 而评价羊草品质优劣的指标主要就是粗蛋白(CP)、中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF), 但是目前在国内, 以上三个指标的检测还是用常规的化学分析法。这种方法通常耗时较长, 而且检测成本高, 并且在检测过程中所使用的化学试剂会对环境造成一定的污染^[5]。

近红外光谱技术(NIRS)是上世纪 70 年代由美国科学家 Norris 开发, 90 年代在农林、医药、化工等众多领域推广使用的检测方法。该技术具有快速、准确、无损样品、成本低等众多优点^[6]。在饲料牧草领域, 近红外光谱技术(NIRS)主要用于饲料的营养成分的分析以及饲草的品种鉴别^[7]。到目前为止, 已有利用近红外光谱法测定青贮玉米^[8]、苜蓿干草、燕麦干草、黑麦草^[9]和小麦^[10]等作物的报道。但是对于我国北方草原的优势种羊草, 还未见关于其快速检测方法的

报道。本实验的目的即是创建并优化羊草干草的近红外模型, 为羊草在生产加工过程中的品质检测, 育种材料的快速鉴定和筛选提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 采集与制备

实验样品取自内蒙古四子王旗、锡林浩特灰腾河、海拉尔陈旗, 黑龙江哈尔滨四个地点的天然羊草草地, 所采集的样品几乎涵盖了生长于北方不同的土壤类型和气候状况下的羊草。样品共计 150 份^[11], 取样时间为 2010 年 5 月至 2010 年 9 月, 每月取样一次, 几乎覆盖了羊草的整个生育期。样品的烘干方式有烘箱烘干(65 °C, 48 h)和自然晾干^[12]。将样品粉碎后过 1 mm 筛网, 装入自封袋中, 常温避光保存, 用于日后的化学测定和光谱扫描。

1.2 化学方法测定

样品的粗蛋白(CP)按照 AOAC 规定的凯氏定氮法进行测定, 中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)根据杨胜在 1993 年提出的 Van Soest 方法进行测定。

1.3 光谱扫描

使用由美国热电公司生产的近红外光谱仪(Antaris)进行样品的光谱采集, 在光谱的采集过程中, 室温保持在 25

收稿日期: 2011-01-21, 修订日期: 2011-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871822), 农业部公益性行业科技项目(200903060)和牧草产业技术体系项目(nycytx)资助

作者简介: 石丹, 女, 1986 年生, 中国农业大学草地研究所硕士研究生 e-mail: shidanlovely@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: zhangyj@cau.edu.cn

℃。利用光谱仪附带的 RESUST-Intergration 软件设置仪器的工作参数: 谱区范围为 4 000~10 000 cm^{-1} ; 扫描次数为 32 次; 分辨率为 8 cm^{-1} ; 2 倍增益; 数据形式为 $\log(1/R)$, 装样量控制在石英样品杯容量的五分之四左右, 轻轻摇匀, 使表面平整, 然后利用 Result-Operation 软件, 进行近红外光谱的采集, 为了更好的消除由装样紧实度以及样品粒度不同所造成的误差, 每个样品重复扫描三次, 每次均扫描背景, 三次扫描的平均光谱记为样品的最终光谱, 存入计算机。图 1 为本次试验羊草干草样品的近红外发射光谱图。

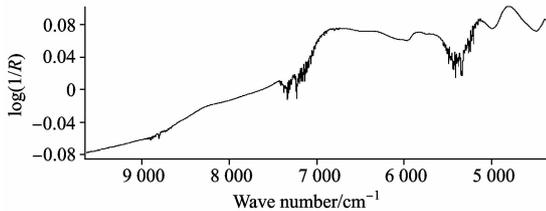


Fig. 1 Spectra of *Leymus chinensis* sample

1.4 NIRS 模型的建立与验证

将采集到的 150 个样品各个化学成分的含量按顺序排列后, 以 3:1 的比例分为校正集 (Calibration) 和验证集 (Validation) 两组。验证集的样品是在所有样品的化学分析值的梯度范围内均匀选择的。本实验采用 TQ Analyst v6.0 分析软件(美国), 利用偏最小二乘回归算法(PLS)建立羊草干草的近红外光谱校正模型, 在建模前要先计算样品光谱值的马氏距离(GH), 及时剔除建标集样品中异常值。GH 值代表一个样品的谱带与所有样品的平均谱带的差异, 若样品的 $\text{GH} > 3.0$, 则将该样品视为异常样品, 予以剔除。然后利用分析软件选取适当的谱区范围, 最佳的光谱数据形式(Data format), 适宜的滤波法(Filter)及相应建模参数, 建立校正模型, 建模后在软件的诊断模块中进行留一法的(每次剔除一个样品)交互验证和外部验证。然后根据参数 R_{cal} , RMSEC, RMSEP, R_{cv} , RMSECV, 以及验证集样品的化学值与预测值的决定系数 R^2 确定最终的模型^[13], 另外利用相对分析误差 RPD(SD/RMSECV, SD 为校正集样品标准偏差, RMSECV 为交互验证标准差)值对模型的定标效果做进一步的验证。当 RPD 的值大于 3.0 时, 表明模型预测的准确度比较可靠, 可以将模型用于实际的生产^[14]。

2 结果与讨论

2.1 羊草干草营养成分的测定结果

实验采集了我国北方从东至西四个地点不同生育期的羊草干草, 这就使样品中各个化学成分的含量形成较大的梯度, 使得模型具有较广的预测范围。同时在干燥方式上选择了室内阴干和在 65 °C 烘箱中烘干(48 h), 这是目前在实际生产中常用的两种干燥方式, 使所建立的模型具有较强的实用性。如表 1 所示, 羊草干草的各个化学成分的校正集和验证集的平均值、最大值、最小值和标准差都比较接近, 说明验证集中的样品有较强的代表性, 可以较好的说明模型的预测能力。

Table 1 Chemical analyzing results of calibration and validation samples(DM%)

统计参数	样品个数	最小值	最大值	平均值	标准差
校正集					
CP	112	4.21	24.82	11.60	5.26
NDF	113	51.37	73.62	63.38	4.54
ADF	113	24.56	40.57	33.28	4.22
验证集					
CP	37	4.92	22.97	11.54	5.07
NDF	37	54.39	72.19	63.47	4.32
ADF	37	24.57	39.47	33.85	4.12

Note: CP: Crude protein; NDF: Neutral detergent fiber; ADF: Acid detergent fiber; The same below; DM%: 营养化学成分占干物质百分比(下同)

2.2 羊草干草营养成分预测模型的建立和优化

实验选用偏最小二乘回归算法为建模方法, 利用 TQ 光谱定量分析软件对获取的光谱进行预处理, 选择适宜的谱区范围, 最佳的光谱数据形式以及最优的光谱预处理组合方式。在选择光谱的数据形式时, 由于二阶导数对光谱信息的利用程度要显著高于原始光谱和一阶导数, 它能够更好地减少由样品状态和扫描条件等因素所造成的光谱平移或旋转, 所以本实验中三种化学成分的校正模型都采用二阶导数的光谱数据形式^[15]。CP, NDF 和 ADF 的最佳光谱处理方法见表 2, 由此建立的模型的决定系数最大, 标准误差最小。根据以上的建模参数, 最终建立的校正模型的相关参数见表 3。由表 3 显示, 羊草干草中的 CP, NDF 和 ADF 含量的预测模型的建模相关系数均达到 0.95 以上, 交叉检验的相关系数也都达到 0.94 以上, 并且各项误差也较低(1.12%~1.41%), 基本达到了理想的预测效果。另外, 在蛋白质(CP)的建标模型中, 根据 GH 值, 剔除了一个异常点, 故在表 1 中, CP 预测模型的样品总数为 149 个。

Table 2 Main parameters of 3 best calibrations

化学成分	因子数	数据格式	滤波法	滤波参数
CP	4	二阶导数 2 nd Der	S. G.	3, 2
NDF	9	二阶导数 2 nd Der	N. D.	5, 2
ADF	2	二阶导数 2 nd Der	N. D.	5, 2

Note: S. G.: Savitzky-Golay filter; N. D.: Norris derivative filter; 2nd Der: Second derivative filter; Parameters: For Savitzky-Golay filter, the parameters include data points and polynomial order; For Norris derivative filter, it means segment length and gap between segment

Table 3 Main results of calibration and validation of 3 characters(DM%)

化学成分	R_{cal}	RMSEC	RMSEP	R_{cv}	RMSECV	RPD
CP	0.974 4	1.18	1.12	0.963 7	1.41	4.47
NDF	0.967 9	1.12	1.38	0.959 4	1.27	3.13
ADF	0.950 2	1.24	1.33	0.947 9	1.27	3.10

Note: R_{cal} : Coefficient of calibration; RMSEC: Root mean square error of calibration; R_{cv} : Coefficient of correlation of cross-validation; RMSECV: Root mean square error of prediction; RPD=SD/RMSEP

2.3 模型的外部验证

校正模型建立之后, 为了进一步的验证模型的预测效果, 对模型进行了外部验证。表 4 就是用预测模型对验证集的 37 个样品的 CP, NDF 和 ADF 的含量的预测结果。从表 4 中可以看出, 通过 $\alpha=0.01$ 的双尾 t 检验, 验证集中的样品的 CP, NDF 和 ADF 的预测值和化学分析值的差异均未达到显著水平, 且二者有很高的相关性, 相关系数均达到了 0.95 以上。图 2 显示了三种化学成分的近红外预测值与常规化学分析值的相关图。RPD 为验证集样品标准差与预测残差均方根的比值, 本试验中所建立的 CP, NDF 和 ADF 近红外模型的 RPD 值分别为 4.47, 3.13, 3.10, 均大于 3, 表明本实验所建立的预测模型预测效果可靠, 可以将其用于羊草干草的 CP, NDF 和 ADF 三项品质指标的实际检测^[16]。

Table 4 Paired samples t-test and correlations analysis of 37 validation samples

化学成分	$t_{0.01}$	D_f	Sig(2-tailed)	Correlation	Sig.
CP	0.916	36	-0.107	0.965	0.000
NDF	0.486	36	0.704	0.956	0.000
ADF	0.610	36	-0.515	0.953	0.000

3 结论

实验采集我国不同区域、不同生长期的羊草, 采用烘箱烘干和自然晾干两种方法制备羊草干样。样品来源广泛, 所测的品质指标含量变幅较大, 粗蛋白(CP)的变幅为 4.21~24.84%, 中性洗涤纤维(NDF)的变幅为 51.37~73.62%, 酸性洗涤纤维(ADF)的变幅为 24.56~40.57%, 指标的含量变幅基本上可以覆盖未知样品可能出现的含量水平。样品的干燥方法贴近实际生产, 使本实验所建立的羊草干草 NIRS 模型能够满足实际生产和科研的要求。

实验利用偏最小二乘回归法(PLS), 通过选择适当谱区范围, 最佳的光谱数据形式, 适宜的参数等建立了 CP, NDF 和 ADF 的校正模型, 并对模型进行了交叉检验和外部检验, 结果显示: 模型的交叉检验系数均在 0.94 以上, 交叉检验误差均在 2% 以内。对验证集样品的预测值和化学分析值的成对数据进行 t 检验, 差异不显著($p>0.05$), 预测的相关系数均在 0.95 以上。表明模型的预测结果与化学分析的结果非常相近, 近红外光谱技术可以用于羊草的主要品质的快速测定。

References

- [1] WU Bao-guo(武保国). Journal of Rural Animal-Breeding Technology(农村养殖技术), 2003, 10: 28.
- [2] SHI Li, DU Guang-ming, HAN Yu-jing(史丽, 杜广明, 韩玉静). Feed Wide-Angle Reviews(饲料广角), 2010, 19: 39.
- [3] LI Hong, YANG Yong-fei(李红, 杨允菲). Chinese Journal of Applied Ecology(应用生态学报), 2004, 15: 819.
- [4] PENG Yu-mei(彭玉梅). China Herbivores(中国食草动物), 2000, 1: 33.
- [5] DING Wu-rong, GAN You-min, GUO Xu-sheng, et al(丁武蓉, 干友民, 郭旭生, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2009, 29(2): 358.
- [6] SHI Su-jia(史苏佳). Food Research and Development(食品研究开发), 2007, 28: 177.

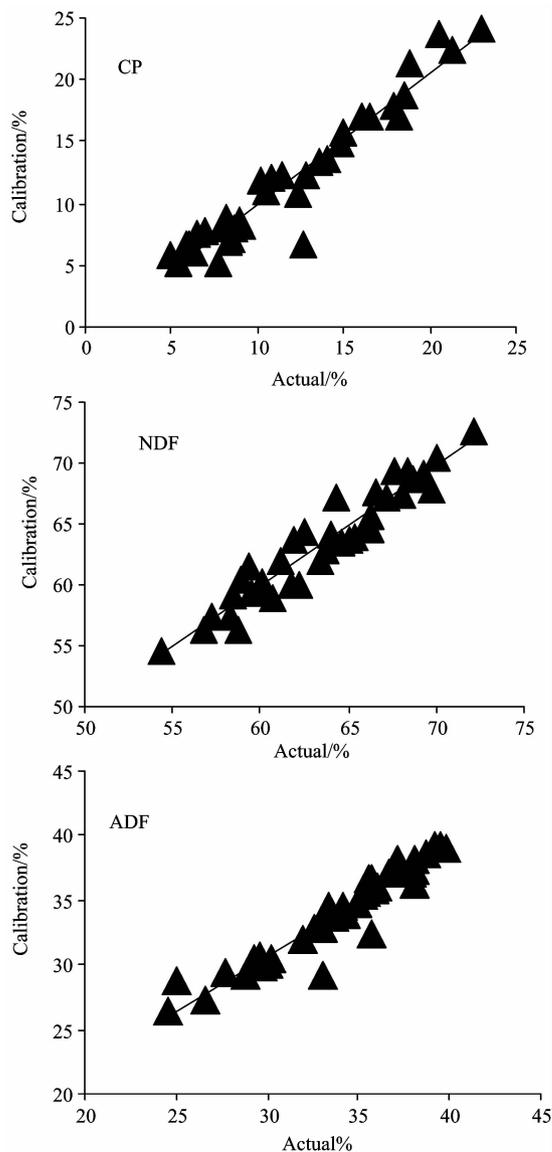


Fig. 2 Relationship between the chemical and NIRS value of validation samples

由于近红外光谱技术是一种间接的检测技术, 它的预测效果和样品的化学分析值紧密相关, 所以对模型的维护和优化是持续性的, 在实际应用中, 如果发现模型的预测能力下降, 就需要加入新的有代表性的样品重新对模型进行矫正和优化, 以此来提高模型的预测能力。

- [7] YANG Ying, FAN Ling(杨 英, 范 凌). Feed Industry(饲料工业), 2000, 21: 2.
- [8] BAI Qi-lin, CHEN Shao-jiang, YAN Yan-lu, et al(白琪林, 陈绍江, 严衍禄, 等). Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学), 2006, 39: 1346.
- [9] ZHAO Huan-huan, HU Yue-gao, ZHAO Qi-bo(赵环环, 胡跃高, 赵其波). Chinese Journal of Animal Nutrition(动物营养学报), 2001, 13(4): 40.
- [10] LI Da-qun(李大群). Optics and Precision Engineering(光学精密工程), 1989, (2): 50.
- [11] DING Li-min, JI Cheng, RONG Yi, et al(丁丽敏, 计 成, 戎 易, 等). China Feed(中国饲料), 1997, (1): 11.
- [12] Blosser T H, Reeves Iii J B, Bond J. Journal of Dairy Science. 1988, 71(2): 398.
- [13] Murray I. Forage Analysis by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Sward Management Handbook. UK; British Grassland Society, 1993. 285.
- [14] Malley D F, Williams P C, Stainton M P. Water Research, 1996, 30(6): 1325
- [15] YAN Yan-lu, ZHAO Long-lian, HAN Dong-hai, et al(严衍禄, 赵龙莲, 韩东海, 等). Fundamental and Application of Near Infrared Spectroscopy Analysis(近红外光谱分析基础与应用). Beijing: China Light Industry Press(北京: 中国轻工业出版社), 2005. 113.
- [16] Williams P C, Norris K H. Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. St. Paul(Minnesota, USA); American Association of Cereal Chemist, 2001. 164.

Determination of *Leymus Chinensis* Quality by Near Infrared Reflectance Spectroscopy

SHI Dan, ZHANG Ying-jun*

Institute of Grassland Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract One hundred fifty *Leymus chinensis* samples with different growth stage, areas, and preparing method (oven-drying and shading natural dry), were selected to study the potential of determination of crude protein(CP), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber(ADF) in the present research. The quality parameters of *Leymus chinensis* were firstly predicted using the near infrared reflectance spectroscopy in China. The three models were validated by cross-validation and external-validation. The results indicated that the NIRS models of *Leymus chinensis* quality prediction highly accessed the precision of chemical analysis. The coefficient of correlation of cross-validation of crude protein, neutral detergent fiber and acid detergent fiber were 0.963 7, 0.959 4 and 0.947 9, and the RMSECV of the three models were 1.41%, 1.27% and 1.27%, respectively; the correlation coefficients of external-validation were 0.965, 0.956 and 0.953, and all the ratios of standard deviation to root mean square error of prediction were higher than 3. Thus it can be testified that using NIRS analysis can rapidly and accurately determine the quality of *Leymus chinensis*. This method is of great significance for quick analysis of the trait of *Leymus chinensis* production and screening of breeding materials in *Leymus* spp. research of China.

Keywords *Leymus chinensis*; Near infrared reflectance spectra; Quality; Calibration

(Received Jan. 21, 2011; accepted May 10, 2011)

* Corresponding author