

利用近紅外光分析儀 (NIRS) 快速測定青貯料品質⁽¹⁾

盧啟信⁽²⁾ 許福星⁽²⁾

收件日期：95年12月4日；接受日期：96年2月20日

摘要

本試驗目的在建立利用近紅外線反射光譜分析儀 (NIRS) 快速測定青割玉米及狼尾草青貯料之粗蛋白質、酸洗纖維、中洗纖維及水溶性碳水化合物含量之檢量線，以期能快速評估青割玉米及狼尾草青貯料品質，以提供酪農調配飼料配方之參考。搜集來源不同之青割玉米及狼尾草青貯料樣品，一部份樣品作化學分析，包括粗蛋白質、酸洗纖維、中洗纖維及水溶性碳水化合物，一部份樣品作NIRS掃描。試驗結果顯示，利用NIRS 建立之狼尾草青貯料粗蛋白質、酸洗纖維、中洗纖維及水溶性碳水化合物之檢量線與化學分析方法之相關性 (R^2) 分別為0.92、0.83、0.82及0.85。青割玉米青貯料則為0.93、0.85、0.87及0.84。狼尾草青貯料檢量標準偏差 (SEC) 分別為0.39%、1.80%、2.32%及0.41%，青割玉米青貯料則為0.41%、1.72%、2.00%及0.47%。這些檢量線利用其他樣品檢定統計結果，四種化學成分之NIRS測定結果，狼尾草及青割玉米青貯料之CP和化學分析結果迴歸係數超過0.85，其餘ADF、NDF及WSC之NIRS測定結果和化學分析結果迴歸係數分別是0.77 ~ 0.81之間。每一條檢量線之截距 (intercept) 及斜率 (slope) 經校正後均趨向於0.00及1.00。本試驗如能利用連續光譜掃描，將可提高其準確性。

關鍵詞：近紅外光分析儀、檢量線、狼尾草、青割玉米、青貯料。

緒言

近紅外線反射光譜分析儀 (Near infrared reflectance spectroscopy, NIRS)，早在1950年即被利用來當作分析工具，1960年代 Norris 博士發展成較廣泛的用途，直到1970年 NIRS 才真正有商品化的產品 (Day and Fean, 1982)。而 NIRS 在 1975 年美國農部所舉辦的研討會中，首度被提到應用在牧草品質分析 (Marten *et al.*, 1985)。最近幾十年，歐美各國在農業及食品的研究分析上，已經廣泛的利用NIRS作為工具，NIRS 具有下列優點 (Day and Fean, 1982)：(1) 可快速測定，每一樣品僅需30秒左右，且可同時測定多種樣品。(2) 不需任何化學處理，樣品處理簡

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1351號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所飼料作物組。

(3) 通訊作者，E-mail：chlu@mail.tlri.gov.tw。

單，操作簡便，使用人員不需具備特殊化學知識，一般人員均可操作。(3) 對樣品不具破壞性，可重複使用。由於 NIRS 具有上述一般化學分析所不及之優點，因此已經被廣泛的利用在豆類、穀類 (William, 1975; Waterson *et al.*, 1976; Hunt *et al.*, 1975)，飼料、牧草 (Norris *et al.*, 1976; Counts and Radloff, 1979; Eckard *et al.*, 1988) 及食品 (Wehling and Pierce, 1988) 中各種成分的分析。在歐美 NIRS 已被認為是未來食品界及農業界極具潛力的分析工具。美國密蘇里大學近年也發展利用 NIRS 來評估牧草品質分級 (Henning and Rinser, 1988)。而國內目前對於 NIRS 的利用尚屬起步階段，亞蔬中心利用 NIRS 來分析蔬菜的品質。Chen *et al.* (1988) 曾利用 NIRS 來分析豬飼料的成分。盧及許 (1998) 利用 NIRS 來測定盤固草之品質。區等 (1994) 利用 NIRS 測定生乳之一般成分及價格之評估。NIRS 雖然具有上述諸多優點，但其從事一般日常分析之前，必須先建立檢量線 (calibration equation)，是其最大限制，檢量線對於樣品及成分都有一定的專一性，不能互相通用。

青割玉米及狼尾草為酪農最常用於調製青貯料之芻料。利用 NIRS 快速測定青割玉米及狼尾草青貯料之成分含量，可迅速提供有關成分含量資料供酪農調配每日完全日糧之參考。

材料與方法

I. 試驗材料：

搜集來源不同之青割玉米及狼尾草青貯料數十種，包括不同割期、季節、青貯方式及種植地等。一部份樣品作化學分析，包括粗蛋白質 (Crude protein, CP)、酸洗纖維 (Acid detergent fiber, ADF)、中洗纖維 (Neutral detergent fiber, NDF)、水溶性碳水化合物 (Water soluble carbohydrate, WSC)。一部份樣品作 NIRS 掃描。將化學分析值與 NIRS 19 種波長掃描所得之反射值作複迴歸分析，依據相關性 (R^2) 及標準偏差 (Standard error of calibration, SEC)，選擇出分析值與波長間有較佳相關性之波長 4-7 種組成檢量線。

II. 樣品處理：

樣品經 95°C 烘乾後，先磨成 2 mm 左右之顆粒，再以 cyclon mill 附 1 mm 之篩網再研磨一次，以期樣品之顆粒大小均一。一部份樣品作化學分析，包括粗蛋白質 (CP)、酸洗纖維 (ADF)、中洗纖維 (NDF) 及水溶性碳水化合物 (WSC) 等。一部份樣品作 NIRS 掃描。利用 NIRS 掃描前以 80°C 烘乾 12 小時，以求水分均一，冷卻後再利用 NIRS 進行掃描。

III. NIRS 測定：

樣品區分成兩組，一組作為檢量線之建立 (calibration set)，另一組作為檢量線檢定用 (prediction validation)，樣品各成分含量範圍如表 1。

i. 檢量線之建立：

NIRS 所用之儀器為 BRAN+LUBBE 公司生產的 Technicon Infra Alyzer 450 型，具有 19 種可用之固定波長。經處理後之樣品經 19 種波長之繞射，得到每波長之反射值，然後將化學分析值與 19 種波長反射值作複迴歸分析，依據相關性 (R^2)，檢量標準偏差 (standard error of calibration, SEC)，選擇出分析值與波長間有較佳線性關係的波長 4-7 種，組成檢量線，相關波長之常數可轉存至主機體的記憶體中。

$$SEC = \{ [\sum (x - y) - \sum (x - y) / n]^2 / (n - p - 1) \}^{1/2}$$

x：NIRS測定值，y：化學分析值，n：樣品數，p：波長數
各成分含量可用簡單數學式計算。其計算式如下：

$$C = K_o + \sum_{i=1}^{N_w} K_i (\log 1/R_i)$$

C：樣品之成分含量 Ri：相關波長之反射值

Ki：相關波長之常數值 Ko：常數 Nw：光波數目

ii. 檢量線之檢定

取上述處理後而未作檢量線之另一組樣品，以所得之檢量線測定其成分含量，並與化學分析值作統計比較，依據化學分析值及 NIRS 測定值之相關係數（r），檢定標準偏差（standard error of prediction, SEP）及作偏差校正後之斜率及截距決定檢量線之取捨。

$$SEP = \{ [\sum (x - y) - \sum (x - y) / n]^2 / (n - 1) \}^{1/2}$$

x，y及n代表之含意與SEC相同。

選定之檢量線再利用統計法決定否可代表化學分析之結果。

結果與討論

表1所列為狼尾草及青割玉米青貯料樣品用於建立 NIRS 檢量線樣品之成分含量範圍。取樣技術及樣品的代表性是造成 NIRS 分析誤差的一大因素（Abrams, 1985），本試驗中，狼尾草及青割玉米青貯料的來源包括了不同割期、季節、青貯方式及種植地，所以包含範圍甚廣，可將樣品代表性引起的誤差降至最低。就成分含量的範圍而言，兩種青貯料成分的含量範圍均甚廣。利用NIRS分析時，其檢量線的成分含量範圍愈廣者，其所得標準偏差愈低，分析結果也愈正確（Starr *et al.*, 1981；William, 1975）。所以本試驗中，狼尾草及青割玉米青貯料中四成分的含量範圍已儘可能包括低含量及高含量範圍的樣品。

表 1. 狼尾草及青割玉米青貯料粗蛋白質、酸洗纖維、中洗纖維及水溶性碳水化合物之NIRS檢量線測定成分的含量範圍

Table 1. The scope of the contents of crude protein, acid detergent fiber, neutral detergent fiber and water soluble carbohydrate on napiergrass and forage maize silage for the NIRS calibration and prediction

Constituent	Napiergrass	Forage maize
Crude protein, %	2.11 ~ 9.33	2.5 ~ 10.21
Acid detergent fiber, %	36.3 ~ 47.4	31.4 ~ 41.0
Neutral detergent fiber, %	66.4 ~ 78.4	60.6 ~ 70.5
Water soluble carbohydrate, %	2.32 ~ 7.45	3.4 ~ 15.2

表2為利用複迴歸分析，選擇出來利用NIRS分析狼尾草及青割玉米青貯料之CP、ADF、NDF及WSC之檢量線的相關統計係數。狼尾草青貯料之CP、ADF、NDF及WSC檢量線和化學分析之迴歸係數 (R^2) 分別達0.92、0.83、0.83及0.85。青割玉米青貯料則為0.93、0.85、0.87及0.84。狼尾草青貯料檢量標準偏差 (SEC) 分別為0.39%、1.80%、2.32%及0.41%。青割玉米青貯料則為0.41%、1.72%、2.00%及0.47%。利用 NIRS 分析牧草之品質已經有很多學者加以探討，CP之 R^2 大多介於0.93~0.99，SEC則為0.42% ~ 1.00%，ADF 之 R^2 介於0.97 ~ 0.99，SEC依不同牧草有較大的差異大多介於0.6 ~ 1.7%。(盧及許，1998；Day and Fean, 1982；Norris *et al.*, 1976；Marten *et al.*, 1983；Eckard *et al.*, 1988；Winch and Major, 1981；Counts and Radloff, 1979)。本試驗中狼尾草及青割玉米青貯料樣品數量較少，其結果也較差。但兩種青貯料CP 之檢量線顯然較 ADF、NDF及WSC之檢量線為優。對於檢量線的計算，一般有兩種方式，一為反射值的簡單數學式 ($\log 1/R$)，另一為反射值的第二次微分。Norries *et al.* (1976) 及 Starr *et al.* (1981) 曾提到，CP 一般以簡單數學式即可得到極佳的檢量線，而纖維方面則應做第二次微分計算，其結果較佳。本試驗所用之計算軟體，僅能做簡單數學處理，所以 CP 之結果較 ADF、NDF及WSC 為佳。

表3為狼尾草及青割玉米青貯料粗蛋白質、酸洗纖維、中洗纖維及水溶性碳水化合物之測定檢量線之檢定統計結果，四成分之NIRS測定結果，狼尾草及青割玉米青貯料之CP和化學分析結果相關性最高超過0.85，其餘ADF、NDF及WSC之NIRS測定結果和化學分析結果相關性分別是0.77 ~ 0.81之間。此結果與盤固草乾草品質利用NIRS測定比較，準確度為低，而檢定標準偏差 (SEP) 亦較盤固草乾草之測定為高 (盧及許，1998)。推測狼尾草及青割玉米青貯料利用NIRS測定較測定盤固草乾草為差的原因，可能是青貯料採樣較不均勻，所以建立檢量線時需採用較多之樣品數，才能將樣品中莖及葉不均勻之因素含蓋於檢量線中，提高其測定之準確性。本試驗之檢量線結果雖未達極佳狀態，但每一條檢量線之截距 (intercept) 及斜率 (slope) 經校正後均趨向於0.00及1.00，此為NIRS檢量線的理想狀態。截距及斜率大小，往往與樣品之顆粒大小及均勻度有密切的關係 (Minson *et al.*, 1983)，顆粒不均勻且利用簡單數學式處理反射值，往往造成截距偏離遠點斜率不等於1。本試驗之截距及斜率分別接近 0.00 及 1.00，顯然樣品的處理尚屬理想狀態。

表 2. 利用NIRS檢量線測定狼尾草及青割玉米青貯料之粗蛋白質、酸洗纖維、中洗纖維及水溶性碳水化合物與化學分析之迴歸係數(R^2)及標準偏差(SEC)

Table 2. The regression coefficients (R^2) and standard errors of calibration (SEC) between NIRS and the chemical analysis on determining the crude protein, acid detergent fiber, neutral detergent fiber and water soluble carbohydrate in napiergrass and forage maize silage

	Crude protein		Acid detergent fiber		Neutral detergent fiber		Water soluble carbohydrate	
	N	M	N	M	N	M	N	M
R^2	0.92	0.93	0.83	0.85	0.83	0.87	0.85	0.84
SEC, %	0.39	0.41	1.80	1.72	2.32	2.00	0.41	0.47

N: Napiergrass silage; M: Forage maize silage.

表 3. 狼尾草及青割玉米青貯料粗蛋白質、酸洗纖維、中洗纖維及水溶性碳水化合物之NIRS測定檢量線之檢定

Table 3. The parameters of the prediction validation to predict the contents of crude protein, acid detergent fiber, neutral detergent fiber and water soluble carbohydrate of napiergrass and forage maize silage by the calibration equation of NIRS

	Crude protein		Acid detergent fiber		Neutral detergent fiber		Water soluble carbohydrate	
	N	M	N	M	N	M	N	M
r	0.86	0.85	0.78	0.80	0.80	0.81	0.77	0.79
SEP, %	0.89	0.99	2.65	2.84	2.75	2.96	1.25	1.21
Slope	1.99	1.00	0.98	1.00	1.01	1.00	1.00	1.00
Intercept	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00

N: Napiergrass silage; M: Forage maize silage; r: 波長反射值; r: Correlation coefficient

NIRS的優點確實可以幫助我們快速評估牧草品質，但影響NIRS測定結果的正確性之因子很多，Norris *et al.* (1976) 及 Starr *et al.* (1981) 曾提到，顆粒大小會影響NIRS測定的正確性，因此本試驗中，所有樣品均利用相同的磨粉機處理，以降低顆粒不均勻所造成之誤差。水分含量也是影響測定結果的因素之一 (Fales and Gummias, 1982)，本試驗中為了降低水份的差異，每一樣品在NIRS掃描前，均先以 80°C 烘乾 12 小時，以求水份含量的均一。本試驗所建立之檢量線，其與化學分析之迴歸係數 (R^2) 雖已超過0.80以上，但檢定結果，並不是很理想，如能利用連續光譜掃描，並再增加更多之樣品，可以再提高其準確性。

參考文獻

- 區少梅、陳陽壽、陳玉舜、謝能。1994。近紅外線光譜儀定量生乳之一般組成及在計價上之評估。中國農業化學會誌。32：384 - 394。
- 鄒簾生、洪端良。1990。如何製備近紅外線分析儀之檢量線。近紅外線分析儀在各種農產品品質管制上之應用研討會；新化。
- 盧啟信、許福星。1998。以近紅外光分析儀 (NIRS) 測定盤固草之粗蛋白質、酸洗纖維及粗纖維。畜產研究。31：77 - 85。
- Abrams, S. M. 1985. Analysis procedure : Sampling, In near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) : Analysis of forage quality, edited by Martun G. C. et. al., MSDA. Agri. Res. Serv. Agri. Hand. No. 643: 22.
- Chen, S. L. Y., A. Hsu and M. L. Lee. 1987. Application of near infrared reflectance spectroscopy to composition analysis of commercial pig feed mix. J. A. O. A. C. 70 : 420-423.
- Counts, G. E., and H. D. Radloff, 1979. The potential of infrared analysis in forage evaluation. J. Anim. Sci. 53: 261 (abstr.)

- Day, M. S. and F. R. B. Fean. 1982. Near infrared reflectance as an analytical technique. Part I, History and development. *Labo. practice* 31: 350-352.
- Eckard, R. J., N. Miles and N. V. Tainton 1988. The use of near infrared reflectance spectroscopy for determination of plant nitrogen. *J. Grassl. Soc. South Afr.* 3: 175-177.
- Fales, S. L. and D. G. Gummias. 1982. Reducing moisture-induced error associated with measurement forage quality using near infrared reflectance. *Agron. J.* 74: 585-588.
- Henning, J. C. and N. E. Riner. 1988. The Mizzou. mobile forage testing lab. *Agri. Guide.* 1-4.
- Hunt, W. H., D. W. Falk, B. Elder, and K. M. Norris. 1978. Collaborative study on infrared reflectance devices for determination of protein in hard red winter wheat and oil soybeans. *Cereal Chem.* 22: 534-536.
- Marten, G. C., J. L. Halgerson and J. H. Channy. 1983. Quality prediction of small grain forage by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.* 23: 94-96.
- Minson, P. J., K. L. Butler, N. Grammit and D. P. Law. 1983. Bias when predicting crude protein, dry matter digestibility and voluntary in take of tropical grasses by near infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Tech.* 9: 221-237.
- Norris, K. H., R. F. Barnes, J. E. Mooke and J. S. Shark. 1976. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *J. Anim. Sci* 43: 889-897.
- Starr, C., A. G. Morgan and D. B. Smith. 1981. An evaluation of near infrared reflectance analysis in some plant breeding programmes. *J. Agri. sci* 97: 107-118.
- Waterson, C. A., D. Curnill and E. Dikeman, 1976. Evaluation of near red winter wheat. *Cereal Chem.* 53: 214-222
- Wehling, R. L., M. M. Pierce. 1988. Determination of moisture in cheddar cheese by near infrared reflectance spectroscopy. *J. A. O. A. C.* 71: 571-574.
- William, P. C. 1975. Application of near infrared reflectance spectroscopy to analysis of cereal grain and oil seed. *Cereal Chem.* 52: 561-576.
- Winch, J. E. and H. Major, 1981. Predicting nitrogen and digestibility of forage using near infrared reflectance photometry. *Can. J. Plant Sci.* 61: 45-51.

Quick determination of silage quality with near infrared reflectance spectroscopy⁽¹⁾

Chi-Hsin Lu ⁽²⁾⁽³⁾ and Fu-Hsing Hsu ⁽²⁾

Received : Dec. 4, 2006 ; Accepted : Feb. 20, 2007

Abstract

Objectives of this study were to establish the calibration equations for quick determination of crude protein (CP), acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF) and water soluble carbohydrate (WSC) of forage maize and napiergrass silage with the near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) and providing information to prepare the rations for dairy cows. The silage samples of forage maize and napiergrass were taken from diverse sources. Parts of the sample were taken for determining CP, ADF, NDF and WSC by traditional chemical analysis. The others were scanned by NIRS. The results showed that the regression coefficients (R^2) between calibration equation and chemical analysis for CP, ADF, NDF and WSC of napiergrass silage were 0.92, 0.83, 0.82, and 0.85, respectively, and those for forage maize silage were 0.93, 0.85, 0.87 and 0.84, respectively. The standard errors of calibration (SEC) for CP, ADF, NDF and WSC of napiergrass silage were 0.39, 1.80, 2.32, and 0.41 %, respectively, and those for forage maize silage were 0.41, 1.72, 2.00 and 0.47 %, respectively. On the other hand CP, ADF, NDF and WSC of the different silage samples were determined by the established calibration equations. The results showed that correlation coefficients (r) between NIRS and chemical analysis for CP of napiergrass and forage maize silages were above 0.85. However, those for ADF, NDF and WSC of both napiergrass and forage maize silages were between 0.77 and 0.81. The intercept and the slope of each calibration equation after correction were near 0 and 1, respectively. The prediction precision might be increased by the calibration equation with continuous spectrum.

Key words: Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS), Calibration equations, Napiergrass, Forage maize, Silage.

(1) Contribution no.1351 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, R.O.C.

(2) Forage Crops Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(3) Corresponding author, E-mail: chlu@mail.tlri.gov.tw

