

# 利用近红外漫反射光谱法预测紫花苜蓿茎组分营养价值的研究

齐 晓<sup>1</sup>, 韩建国<sup>1\*</sup>, 聂志东<sup>1</sup>, 刘富渊<sup>2</sup>, 张泽宏<sup>2</sup>, 李曼莉<sup>1</sup>

1 中国农业大学草地研究所北京市重点实验室, 北京 100094

2 成都大业国际投资股份有限公司甘肃总部, 甘肃 酒泉 735000

**摘 要** 研究旨在探讨利用全株紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)样品的近红外漫反射光谱信息,建立能够预测其茎组分营养价值的校正模型的可行性。将66份不同年份、品种、茬次和生育期的紫花苜蓿全株样品徒手分离茎叶后,按一定的茎叶比重新混合成198份实验样品(建模样品138份,检验样品60份)。采用傅里叶变换近红外漫反射光谱技术(FT-NIRS),结合偏最小二乘法(PLS),建立了茎组分粗蛋白(CP)、中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)、粗灰分(CA)和体外可消化干物质(IVDDM)含量的预测模型。除NDF含量的预测模型外,其他4个指标预测模型的建模效果和实际预测均较好,交叉检验相关系数( $r_{cv}$ )为0.852 3~0.900 7,交叉检验标准误差(RMSECV)为0.72%~3.96%,检验样品的预测值与化学值的相关系数( $r$ )为0.925 5~0.951 2。而NDF含量预测模型的 $R_{cv}$ , RMSECV,  $r$ 分别为0.821 4, 3.70%和0.902 0,模型只可用作粗略估测。

**关键词** 紫花苜蓿; 近红外漫反射光谱; 茎叶分离; 营养价值

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)09-2062-05

## 引 言

畜牧业和乳业的发展极大地带动了国内草产业的发展,紫花苜蓿生产加工企业的销售额逐年递增,其苜蓿草产品种类也更加丰富,不再局限于干草捆、草粉、草块等传统产品,以高密度草捆技术、茎叶分离技术、叶蛋白提取技术等为代表的苜蓿加工新技术被引入国内。其中,以茎叶分离技术的应用最广,经分离得到的茎料、叶料可满足不同的市场需求。叶料中粗蛋白和类胡萝卜素的含量较茎料高,而粗纤维含量低,除可用作单胃动物的蛋白饲料外,还可作为中草药治疗糖尿病、关节炎、血液中胆固醇偏高等慢性疾病;茎料的粗蛋白含量较叶料低,粗纤维含量高,但相比于玉米秸秆等又有较高的营养价值,可替代蛋白含量过低的秸秆作为反刍家畜的粗饲料,还可用于造纸。国外更将其视为一种清洁的生物能源加以利用<sup>[1,2]</sup>。

虽然经茎叶分离得到的苜蓿茎料、叶料有多种用途,但国内牧草加工企业主要还是将其制作成茎颗粒和叶颗粒。饲喂苜蓿颗粒可显著提高奶牛的产奶量和牛奶的品质,所以国内的购买者多是大型牛奶生产加工企业。这些企业在购买产

品时,对其品质有细致的要求,如茎颗粒或叶颗粒粗蛋白含量不能低于某个值等。如何在加工生产前就能掌握原料品质,实现根据订单需求选择加工原料,就成了生产企业面临的一大难题。如果按常规方法,徒手分离茎叶后再分别对茎、叶进行化学分析,不仅费时、费力,而且需要操作人员有一定的技术和经验。本研究旨在建立不进行茎叶分离操作就可预测其经分离后所得到的茎组分中粗蛋白(CP)、中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)、粗灰分(CA)和体外可消化干物质(IVDDM)含量的近红外光谱预测模型,实现在生产中利用近红外光谱分析技术快速、准确地评估用于加工茎叶分离产品的紫花苜蓿干草原料的可利用性,使生产者在最短的时间内决定原料的利用方式。众多研究表明,利用NIRS技术建立的检测多种饲草饲料CP, NDF和ADF含量的模型均有较好的实际预测能力,与常规化学方法的检测精度相当<sup>[3-11]</sup>。另外,从原理上讲矿物质本身在近红外光谱区没有吸收峰,不能被近红外光谱感应到,但实际检测中却可以通过矿质元素与某些含H键有机物的关联间接检测出来,用以预测饲草中CA含量<sup>[12]</sup>。许多研究结果证明了这个结论,但实际预测效果并不稳定<sup>[12-16]</sup>。白琪林等建立的预测玉米秸秆IVDDM含量的校正模型具有较好的实际预测能

收稿日期: 2007-02-08, 修订日期: 2007-05-16

基金项目: 农业部“948”滚动项目(2006-G38)和北京市教育委员会共建科研项目(XK100190552; JD100190531)资助

作者简介: 齐 晓, 1982年生, 中国农业大学草业科学专业在读硕士研究生 e-mail: tq07mms@sina.com

\* 通讯联系人 e-mail: grasslab@public3.bta.net.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

力<sup>[17]</sup>,表明利用NIRS技术预测饲草的IVDDM含量具有可行性。然而,以往的研究均是以预测一个整体中某类物质的含量为目的的,而利用物质整体的近红外光谱信息预测某一部分的某种物质含量的尝试还未见报道,是本研究的创新之处。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 全株紫花苜蓿干草样品

实验样品取自成都大业国际投资股份有限公司在甘肃省酒泉市玉门镇的下西角紫花苜蓿生产基地(97.02°E, 40.16°N, 海拔1527 m),采集品种包括甘农三号、中苜一号、阿尔冈金。采集到的全株样品共66份,其中鲜草自然阴干样品34份,干草捆样品32份(2005年样品24份,2006年样品8份);样品覆盖了3个茬次的从营养生长早期,到初花期、盛花期和结荚期等多个生育时期紫花苜蓿。将样品自然阴干至水分低于10%,备用。

#### 1.1.2 茎叶分离样品

徒手分离全株样品的茎、叶(小叶柄、花和荚归为茎),然后用滚刀式植物粉碎机将所有紫花苜蓿茎、叶样品(共132份)进行初次粉碎;从每个初粉样品中各取出100 g,用FOSS公司生产的1069型旋风磨(Cyclone mill, 1 mm)进行二次粉碎,粉碎至可过40目筛后装入自封袋,常温避光保存,备用。

### 1.2 茎粉样品的常规化学分析

取适量粉碎好的茎粉进行各指标含量的常规化学分析。

(1)水分含量的测定:将样品放入(105±2)℃烘箱中,烘干4 h<sup>[18]</sup>; (2)CP的含量测定:凯氏定氮法,测定按照国家标准GB/T6432—1994<sup>[18]</sup>; (3)NDF和ADF的含量测定:范氏纤维测定法<sup>[18,19]</sup>; (4)CA的含量测定:测定按照国家标准GB/T6438—1992<sup>[18]</sup>; (5)IVDDM含量的测定:参照Tilly和Terry的两步消化法,将样品装入滤袋后放入试管中,在39℃恒温水浴下分别与瘤胃液和盐酸胃蛋白酶各反应48 h<sup>[20]</sup>。

测定完成后,将所有指标含量换算成以干物质(DM)为基础的含值,即建模参照值。

#### 1.3 全株配比样品的制备

经二次粉碎后,取适量一一对应的茎粉和叶粉,按照茎叶比分别为3:1, 1:1和1:3的比例进行混合,混合得到全株配比样品共198份,备上机扫描用。作为背景的分同样含有需要预测的物质。茎叶比不同,则背景中该物质的绝对量就会有差异,这就造成虽然作为预测目标的组分中某物质的含量相同,但全株样品的近红外光谱信息却有差异。将不同茎叶比的样品用于建模,可提高预测模型弱化背景组分影响的能力。

#### 1.4 全株配比样品的近红外漫反射光谱采集

采用美国Thermo Nicolet公司的Antaris FT-NIR Analyzer光谱仪,漫反射积分球附件,旋转石英样品杯(内径约5 cm),附带TQ Analyst v6和RESULT集成软件,包括

RESULT-Integration和RESULT-Operation两部分。

采集光谱前,先使用RESULT-Integration软件编写光谱采集程序,设置仪器工作参数。仪器主要工作参数为:扫描谱区范围4000~10000 cm<sup>-1</sup>,扫描次数32次;分辨率8 cm<sup>-1</sup>,2倍增益。数据采集形式为log(1/R)。

上机扫描前,所有需采集光谱的样品需在近红外光谱仪所在实验室放置48 h以上(25℃恒温,相对湿度65%,恒湿)。扫描样品时,取适量混匀的全株配比样品均匀装入样品杯中,装样量控制在样品杯容量的80%左右,轻轻摇匀,使表面平整,然后打开RESULT-Operation软件,调取已编写好的光谱采集程序进行近红外光谱的采集。每个样品重复扫描3次,每次均扫描背景,计算其平均光谱。图1为所采集的60个样品的近红外漫反射光谱图。

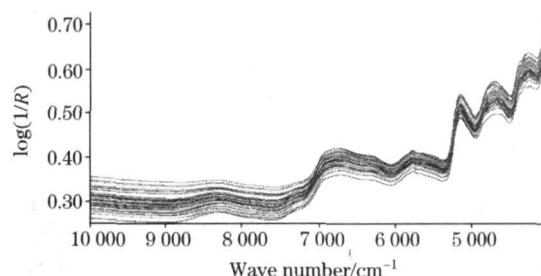


Fig 1 NIRS of 60 alfalfa samples

### 1.5 划分建模样品集和检验样品集

在将样品按某个指标含量大小顺序排列后,以约2:1的比例将全部样品划分成建模样品集和检验样品集(建模样品138份,检验样品60份)。选取检验样品时,茎叶比为3:1, 1:1和1:3的全株配比样品各占1/3(20份),并且使两个样品集中茎组分各指标含量均呈相似分布。表1为建模和检验样品数量的分布情况,用于外部检验的检验集样品各指标含量分布情况,与其对应的建模集样品的分布情况大体相同,检验集样品应能很好地检验所建模型的优劣。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 模型的建立及建模效果分析

实验利用TQ Analyst v6光谱处理软件,选择PLS作为建立定标模型的化学计量方法。可以通过TQ Analyst v6光谱处理软件自主选择合适的建模用光谱范围,并且包括附加散射校正(multiplicative scattering correction, MSC)、标准正态化处理(standard normal variety, SNV)、一阶导数(First derivative, 1st Deriv)、二阶导数(Second derivative, 2nd Deriv)、Savitzky-Golay平滑处理(Savitzky-Golay smoothing)和Norris平滑处理(Norris derivative smoothing)等在内的多种光谱预处理方法。不同的数据平滑方法还需设置相关参数: Savitzky-Golay平滑法需要对数据点(Data points)和多项式等级(Polynomial order)进行选择; Norris平滑法要选择不同的段长(Segment length)和段间距(Gap between segment),这些参数对模型准确性都起着非常重要的作用。模型的建模相关系数( $r_{\text{cal}}$ )、交叉检验相关系数( $r_{\text{cv}}$ )、建模标

准误差(RMSEC)、交叉检验标准误差( RMSECV) 都是衡量模型优劣的重要指标。一个好的模型应该有较高的  $r_{cal}$ 、 $r_{CV}$  和较低的 RMSEC 和 RMSECV。本研究以  $r_{cal}$ 、RMSEC、 $r_{CV}$  和 RMSECV 作为建模效果的评判依据。其中最为重要的指标为  $r_{CV}$  和 RMSECV, 因为虽然较高的  $r_{cal}$  和较低的 RMSEC 表示模型预测建模样品的能力更强, 但有可能产生过拟合, 使预测未知样品的能力下降, 而更高的  $r_{CV}$  和更低的 RMSECV 则表明模型的预测非建模样品的准确性更高。

表 2 为在选择最佳建模光谱范围和光谱预处理方法并剔

除异常样品后, 得到的茎粉各指标含量校正模型的建模参数和交叉验证效果, 其中 CP、ADF、CA 和 IVDDM 含量的校正模型的  $r_{CV}$  分别为 0.860 5、0.852 3、0.900 7 和 0.862 3, 均达到 0.85 以上, RMSECV 分别为 1.31%、3.96%、0.72% 和 3.16%, 接近化学分析的准确度, 说明这 4 项指标的近红外校正模型具有较好的预测效果; 但茎组分 NDF 的校正模型  $r_{CV}$  仅有 0.821 4, RMSECV 为 3.70%, 预测效果不佳, 只可用作粗略估测。

Table 1 Distribution of calibration and validation sample for the five analyzed components

| 成分  |       | 样品个数 | 最小值/( % 干重) | 最大值/( % 干重) | 平均值/( % 干重) | 标准偏差/( % 干重) |
|-----|-------|------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 建标集 | CP    | 138  | 7.50        | 19.45       | 12.88       | 3.41         |
|     | NDF   | 138  | 42.30       | 66.81       | 55.02       | 7.33         |
|     | ADF   | 138  | 29.48       | 57.97       | 44.72       | 9.27         |
|     | CA    | 138  | 5.95        | 13.05       | 8.76        | 2.20         |
|     | IVDDM | 138  | 50.88       | 77.92       | 64.31       | 8.21         |
| 检验集 | CP    | 60   | 8.38        | 17.22       | 12.83       | 2.83         |
|     | NDF   | 60   | 44.16       | 62.94       | 55.02       | 6.27         |
|     | ADF   | 60   | 33.66       | 54.99       | 44.74       | 7.79         |
|     | CA    | 60   | 6.41        | 11.09       | 8.71        | 1.98         |
|     | IVDDM | 60   | 56.18       | 74.73       | 64.31       | 6.57         |

Table 2 Optimal parameters and results of five best calibrations

| 成分    | 建模样品数 | 光谱范围/( $\text{cm}^{-1}$ ) | 光谱预处理方法   | 参数    | $r_{CV}$ | RMSECV/( % DM ) |
|-------|-------|---------------------------|-----------|-------|----------|-----------------|
| CP    | 138   | 7 294.31~4 128.61         | NP        | —     | 0.860 5  | 1.32            |
| NDF   | 135   | 7 246.00~4 124.60         | S+ 1st+ N | 5, 3  | 0.821 4  | 3.70            |
| ADF   | 138   | 8 009.02~4 009.79         | M+ 1st+ N | 15, 1 | 0.852 3  | 3.96            |
| CA    | 138   | 7 506.07~4 934.05         | M+ SG     | 25, 3 | 0.900 7  | 0.72            |
| IVDDM | 138   | 7 149.65~5 271.20         | M+ SG     | 23, 4 | 0.862 3  | 3.16            |

注: NP= 不处理; 1st= 求一阶导数; S= 标准正常化处理; N= Norris 平滑处理; M= 附加散射校正; SG= Savitzky-Golay 平滑处理; Norris 平滑处理和 Savitzky-Golay 平滑处理需设置的参数分别为段长、段间距和数据点、多项式等级。

2.2 模型的外部验证及预测效果分析

本研究选取了预测相关系数( $r$ )和预测标准误差(RMSEP)为衡量依据。

表 3 为用优化后的预测模型对 60 个检验集样品中茎组分 CP、NDF、ADF、CA 和 IVDDM 含量的预测结果。从中可以看出, 样品各指标的近红外预测平均值与常规化学分析平均值差异不大。对 60 个检验样品的两种分析值进行成对样本两尾  $t$  检验(Paired-sample  $t$ -Test), 各指标的两种分析

值差异均不显著( $P>0.05$ ), 说明所建各近红外模型具有较好的整体预测效果。茎组分 CP、ADF、CA 和 IVDDM 含量的近红外预测值与化学分析值之间的相关性较高(见图 2、图 4、图 5、图 6), 表明可以直接预测未知全株紫花苜蓿样品中茎组分的 CP、ADF、CA 和 IVDDM 含量。但进行相关性分析时发现, 预测茎组分 NDF 含量校正模型的  $r$  仅为 0.902 0(见图 3), 表明针对个体样品预测而言, 准确性并不稳定, 只可用于粗略估测。

Table 3 Evaluation of the five calibration models of stem with validation sets

| 成分    | 检验样品数 | 近红外预测平均值/( % 干重) | 化学分析平均值/( % 干重) | $r$     | RMSEP/( % DM) | $t$   | $t_{0.05}$ |
|-------|-------|------------------|-----------------|---------|---------------|-------|------------|
| CP    | 60    | 12.71            | 12.83           | 0.936 2 | 0.96          | 1.173 | 2.000      |
| NDF   | 60    | 54.90            | 55.02           | 0.902 0 | 2.83          | 0.356 | 2.000      |
| ADF   | 60    | 44.38            | 44.74           | 0.926 3 | 3.13          | 1.047 | 2.000      |
| CA    | 60    | 8.64             | 8.71            | 0.951 2 | 0.70          | 1.093 | 2.000      |
| IVDDM | 60    | 64.36            | 64.31           | 0.925 5 | 2.34          | 0.211 | 2.000      |

注: ANL 为近红外预测平均值; LAB 为化学分析平均值。

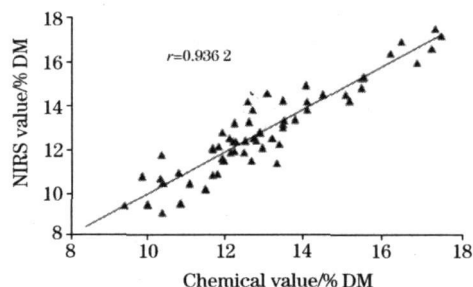


Fig. 2 Correlation between chemical value and NIRS value of stem's CP content

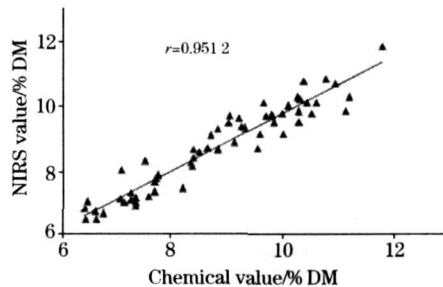


Fig. 5 Correlation between chemical value and NIRS value of stem's CA content

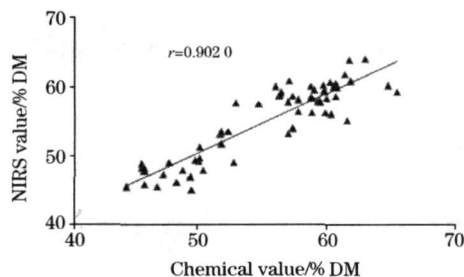


Fig. 3 Correlation between chemical value and NIRS value of stem's NDF content

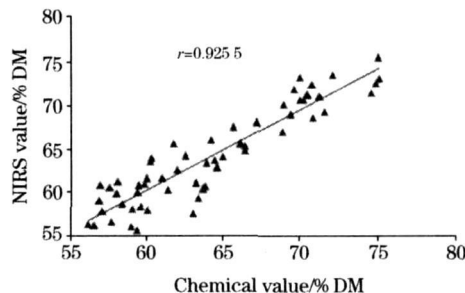


Fig. 6 Correlation between chemical value and NIRS value of stem's IVDDM content

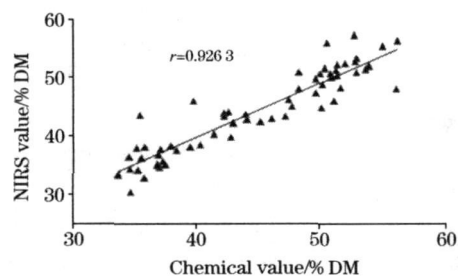


Fig. 4 Correlation between chemical value and NIRS value of stem's ADF content

### 3 结 论

本研究尝试建立了利用全株紫花苜蓿干草样品的近红外光谱信息, 预测茎叶分离后茎组分营养价值(粗蛋白、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、粗灰分和体外可消化干物质的含

量)的校正模型。研究表明, 利用傅里叶变换近红外漫反射光谱法, 可以在不分离紫花苜蓿茎叶的前提下准确预测全株紫花苜蓿茎组分中粗蛋白、酸性洗涤纤维、粗灰分和体外可消化干物质的含量; 虽然对中性洗涤纤维的预测效果不够理想, 但仍可进行粗略检测。

### 4 讨 论

由于没有类似的研究成果作为参考, 所以在研究过程中只能用已有的模型效果判定标准来评价建模效果与实际预测效果, 而这些标准是否完全适用于此类研究, 还有待于进一步探讨。不过, 综合分析实验结果可以看出, 这种新的尝试的确取得了阶段性的成功。接下来, 应补充更多的有代表性的样品完善已有模型, 并尝试建立预测紫花苜蓿叶组分营养价值的校正模型; 然后, 应扩大研究对象的范围, 进一步探讨利用样本整体的近红外光谱信息分析其局部某种特性的可行性、规律性和适用范围。

### 参 考 文 献

- [1] Koegel R G, Straub R J. Value Added Products from Fractionated Alfalfa. Meeting Abstract Accepted by Agricultural Research Services, United States Department of Agriculture, 2000.
- [2] Sheaffer C C, Martin N P, Lamb J A F S, et al. Agronomy Journal, 2000, 92(4): 733.
- [3] ZHAO Huan-huan, YAN Yan-lu (赵环环, 严衍禄). Journal of Maize Sciences (玉米科学), 1999, 7(3): 77.
- [4] WEI Liang-ming, YAN Yan-lu, DAI Jing-rui (魏良明, 严衍禄, 戴景瑞). Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2004, 37(5): 630.
- [5] Norris K H, Barnes R F, Moore J E, et al. Journal of Animal Science, 1976, 43(4): 889.
- [6] Garcia-Criado B, Garcia-Ciudad A. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1990, 50(4): 479.

- [ 7 ] Berardo N, Odoardi M, Scotton M, et al Ziliotto U. Rivistadi Agronomia, 1996, 30(3): 288.
- [ 8 ] Villamarin B, Fernandez E, Mendez J. Journal of AOAC International, 2002, 85(3): 541.
- [ 9 ] Gislum R, Micklander E, Nielsen J P. Field Crops Research, 2004, 88: 269.
- [ 10 ] BAI Qi-lin, CHEN Shao-jiang, DONG Xiao-ling, et al(白琪林, 陈绍江, 董晓玲, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(11): 1345.
- [ 11 ] LIU Qiang, MENG Qing-xiang, BAI Qi-lin, et al(刘 强, 孟庆翔, 白琪林, 等). Chinese Journal of Animal Science(中国畜牧杂志), 2005, 41(11): 39.
- [ 12 ] Vazquez de Aldana B R, Garcia-Criado B, Garcia-Ciudad A, et al. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1996, 27: 795.
- [ 13 ] Clark D H, Cary E E, Mayland H F. Agronomy Journal, 1989, 81(1): 91.
- [ 14 ] Cozzolino D, Fassio A, Gimenez A. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, 81(1): 142.
- [ 15 ] Valdes E V, Young L G, McMillan I, et al Winch J E. Canadian Journal of Animal Science, 1985, 65(3): 753.
- [ 16 ] LIU Li-ying, CHEN Hong-zhang(刘丽英, 陈洪章). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(2): 275.
- [ 17 ] BAI Qi-lin, CHEN Shao-jiang, DONG Xiao-ling, et al(白琪林, 陈绍江, 董晓玲, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(2): 271.
- [ 18 ] ZHANG Li-ying(张丽英). Feed Analysis and the Determining Technology of Feed Quality, Second Edition(饲料分析及饲料质量检测技术, 第2版). Beijing: China Agricultural University Press(北京: 中国农业大学出版社), 2003. 46.
- [ 19 ] Van Soest P J. Journal of Animal Science, 1967, 26: 119.
- [ 20 ] Tilley J M A, Terry R A. Journal of the British Grassland Society, 1963, 18: 104.

## Research on Predicting the Qualities of Stem of Alfalfa Hay by Near Infrared Reflectance Spectroscopy

QI Xiao<sup>1</sup>, HAN Jian-guo<sup>1\*</sup>, NIE Zhi-dong<sup>1</sup>, LIU Fu-yuan<sup>2</sup>, ZHANG Ze-hong<sup>2</sup>, LI Man-li<sup>1</sup>

1. Institute of Grassland Science, China Agricultural University, Beijing Major Laboratory, Beijing 100094, China

2. Gansu Branch of Chengdu Daye International Investment Co. Ltd., Jiuquan 735009, China

**Abstract** The present research was attempted to predict the qualities of stem of alfalfa (*Medicago sativa* L.) without separation from the whole plant by near infrared reflectance spectroscopy and discussed the feasibility of using the near infrared reflectance spectra information of the whole object to predict the qualities of a certain part. Sixty six whole alfalfa hay samples of separated stems from leaves were collected and they were distinguishing by years, cultivars, cuts and growing periods. There were 138 calibration samples and 60 validation samplers. Fourier transform near infrared reflectance spectroscopy(FT-NIRS) and partial least square(PLS) were used to set up the calibration models of stem's crude protein(CP), neutral detergent fiber(NDF), acid detergent fiber(ADF), crude ash(CA) and in vitro digestible dry matter(IVDDM) contents. All models showed great calibration and prediction performances except the one of stem's NDF content. The correlation coefficients of cross-validation( $r_{CV}$ ) were between 0.852 3 and 0.900 7, the root mean square errors of cross-validation(RMSECV) were between 0.72% and 3.96% and the correlation coefficients of NIRS values and chemical values( $r$ ) were between 0.925 5 and 0.951 2. However,  $r_{CV}$ , RMSECV and  $r$  of the model of stem's NDF content were 0.821 4, 3.70% and 0.902 0, respectively. It wasn't exact enough and would be used for rough predicting only. All of the results showed that near infrared reflectance spectra information of whole alfalfa hay could be used to predict some components of its stem exactly. It was the maiden attempt of using near infrared reflectance spectra information of the whole objects to evaluated the qualities of a certain part.

**Keywords** Alfalfa; Near infrared reflectance spectroscopy; Separating stems from leaves; Nutrition qualities

(Received Feb. 8, 2007; accepted May 16, 2007)

\* Corresponding author