

狼尾草營養成分近紅外光分析檢量線之探討⁽¹⁾

陳嘉昇⁽²⁾⁽³⁾ 王紓愷⁽²⁾

收件日期：92 年 8 月 15 日；接受日期：92 年 12 月 17 日

摘 要

本研究目的為建立狼尾草品質之近紅外光分析檢量線，測定成分包括：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）。首先掃描不同地點之割期試驗樣品 332 個，選擇其中具代表性樣品 119 個建立基礎檢量線，再以畜牧場廢水灌施試驗樣品 36 個及青貯樣品 48 個進行擴充。廢水灌施試驗樣品光譜之整體距離（Global H）均在 3.0 之內，鄰接距離（Neighborhood H）介於 0.6-1.5 之間，與基礎檢量線樣品光譜特性差別不大；而青貯樣品之整體距離均在 5.0 以上，顯然青貯後植體之光譜特性有較大的改變。更新後CP、NDF、ADF、WSC檢量線之決定係數(R^2)分別為 0.99、0.95、0.98、0.99，檢量線標準機差（SEC）分別為 0.45%、1.17%、0.80%、0.45%，交互驗證標準機差（SECV）分別為 0.59%、1.37%、1.03%與 0.59%，而樣品實測值標準偏差與驗證標準機差之比值（RPD）分別為 7.8、3.9、4.8、8.8，均高於可接受之標準，且準確度高於先前建立之盤固草檢量線。本研究除一般品質成分之評估外，尚提供對植體WSC含量的快速分析，供青貯調製之參考。

關鍵詞：快速測定、粗蛋白質、中洗纖維、酸洗纖維、水溶性碳水化合物、青貯草。

緒 言

狼尾草為本地重要芻料作物之一，近年由於品種改良，產量與品質均大幅提高，配合收穫機械及青貯調製，已使狼尾草成為國產牧草的重要草種（成等，1995；成等，1997）。狼尾草屬 C4 型熱帶牧草，生育後期老化速度快是一大缺點，因為狼尾草無固定的採收期，故品質的變動極大。王等（2003）指出割期效應對狼尾草品質影響最顯著，分別佔粗蛋白質（CP）、中洗纖維（NDF）及酸洗纖維（ADF）總變方成分的 50%、78.2%及 78.8%；季節影響程度較小亦不可忽視。因此，要準確獲知狼尾草的品質必須藉助品質成分的分析。然而傳統的化學分析過程繁複耗時、分析成本昂貴，用於調配日糧或品質分級均緩不濟急，要獲得品質分析所能提供的好處，唯一的方法就是利用快速測定。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1220 號。

- (2) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。
- (3) 通訊作者。

近紅外線光譜儀技術(NIRS)應用於農產品及食品的品質管制已有多年歷史, Ben-Gera 及 Norris (1968) 首度利用近紅外光光譜儀於農產品的分析, Norris *et al.* (1976) 提出以 NIRS 分析芻料品質成分, 包括綿羊消化率與攝食量的測定。Shenk 及 Hoover (1976) 也以掃描分光器提出了 NIRS 可利用於牧草品質快速分析的證據。由於具備快速及可同時檢測多項成分的優點, 以 NIRS 進行牧草品質快速分析遂成為牧草研究發展的重要里程碑 (Reid, 1994; Fahey and Hussein, 1999)。近年來由於儀器性能之改良、電腦功能的提昇及相關軟體的開發, 應用於牧草品質的快速分析已更加成熟 (Villalobos *et al.*, 1991; Cosgrove *et al.*, 1994; Hsu, *et al.*, 1998; Griggs *et al.*, 1999; 陳等, 2000; 陳, 2001)。國內的牧草方面, 最早建立近紅外光分析技術的是盤固草 (盧及許, 1998; 李, 1999; 陳及王, 2003), 其他牧草則未有報告。本報告提出狼尾草近紅外線光譜儀速測檢量線的建立, 包括青草與青貯草, 測定成分則包括: 粗蛋白質、酸洗纖維、中洗纖維、及水溶性碳水化合物 (WSC)。

材料與方法

I. 樣品收集與準備

- (i) 不同地點割期試驗材料: 試區位於行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所、花蓮種畜繁殖場及彰化種畜繁殖場, 以狼尾草台畜草二號 (TLG2) 分別進行四種不同割期處理之週年刈割試驗。恆春分所試區除台畜草二號外, 並加入試驗品系 7728。四種週年性割期處理分別為 35-40 天 (A)、50-55 天 (B)、65-70 天 (C) 及 80-85 天 (D) 刈割, 小區面積 $4\text{ m} \times 3\text{ m} = 12\text{ m}^2$, RCB設計, 三區集。以台肥二號 ($\text{N}:\text{P}_2\text{O}_5:\text{K}_2\text{O} = 11:9:18$) 400 kg/ha 為基肥, 每次收割後, 四種處理各施以台肥一號 ($\text{N}:\text{P}_2\text{O}_5:\text{K}_2\text{O} = 20:5:10$) 200、300、400 及 500 kg/ha。收穫時調查農藝性狀, 並將莖葉分開, 分別經 80°C 、48 hr 烘乾磨粉。樣品計 332 個, 供基礎檢量線建立。
- (ii) 狼尾草灌施畜牧廢水試驗材料: 材料之來源詳見張 (2002), 取其中 36 個全株樣品進行樣品擴充。
- (iii) 狼尾草青貯料: 含花蓮、澎湖、恆春等地區狼尾草台畜二號青貯樣品 48 個。青貯開封後樣品經 80°C 、48 hr 烘乾磨粉 (通過 1 mm 網目), 保存於 8°C 冷藏室中備用。

II. 化學分析

- (i) 粗蛋白質含量: 依照 A. O. A. C. (1984) 方法測定。
- (ii) 酸洗纖維、中洗纖維含量: 依照 van Soest (1967) 之方法測定, 每一樣品重複二次。
- (iii) 水溶性碳水化合物含量測定: 樣品經烘乾磨粉, 以 80% 的乙醇於 80°C 下萃取四次, 萃取液混合, 置 70°C 烘箱中去除乙醇, 殘餘液體以蒸餾水定量, 取適量萃取液以 anthrone 呈色法測定其水溶性碳水化合物含量 (Morris, 1948), 每一樣品重複二次。

III. 基礎檢量線的建立

以紅外線光譜儀 (Foss Model 6500, Silver Spring, MD, USA) 進行樣品之近紅外線光譜掃描。掃描區間為 400-2498 nm 之連續光譜, 光譜間隔 2 nm。光譜儀每週診斷波長準確度、光量及再現性一次。每樣品重複裝填及掃描兩次, 每次掃描設定為 5 次。掃描時由偵測器讀取反射光譜值 (R), 再轉化為 $\log 1/R$ 資料, 以分析軟體 WINISI Version 2.01 進行資料處理。

利用前述材料(i)共 332 個樣品，包括二個狼尾草品系、三個地點、四種割期以及多個收穫日期之莖或葉的樣品，掃描得各樣品之近紅外線反射光譜，以 WINISI Version 2.01 軟體之 CENTER 及 SELECT 功能剔除範圍外之圖譜 ($H\ distance > 3$)，並選出具代表性之樣品計 119 個進行化學分析，將分析結果對應圖譜進行檢量線的建立。迴歸模式採用改良部分最小平方法 (Modified partial least square method)，波長範圍為 800-2498 nm，取間隔 8 nm 為一資料點。交互驗證之參數設為 4，即迴歸式運算時逢機將樣品分為四群，以三群建立迴歸式，以另一群進行驗證，再逐次交互驗證。光譜資料點經微分處理、平滑處理等不同數學模式產生不同之檢量線，再依交互驗證標準機差 (SECV，即四次交互驗證標準機差的平均值)、檢量線標準機差 (SEC)、決定係數 (R^2) 等之高低決定較佳之檢量線。

IV. 檢量線的更新

以材料方法中所述之材料(ii) (廢水灌施樣品) 及材料 (iii) (青貯樣品)，進行基礎檢量線的擴充。所收集樣品依前述方法進行化學分析及光譜掃描，將 (ii)、(iii) 批樣品與基礎檢量線樣品合併，再依前述步驟建立新檢量線。

結果與討論

I. 基礎檢量線的建立

以材料與方法中所述之材料(i)共 332 個樣品，掃描得各樣品之近紅外線反射光譜，以 WINISI Version 2.01 軟體之 CENTER 程式剔除範圍外之樣品 ($GH\ distance > 3$)，再以 SELECT 程式選出具代表性而相似性低之樣品計 119 個 ($NH\ distance < 0.4$)，以此 119 個進行化學分析 (圖 1)。由於樣品來源之範圍廣，且莖葉分別測定，因此化學分析測定值之變異範圍大，其結果詳列於表 1。CP 介於 2.3-24.7% 之間，NDF 介於 51.1-80.3% 之間，ADF 介於 27.5-54.8% 之間，WSC 介於 0.9-22.7% 之間，足可涵蓋大部分狼尾草青草的品質變異範圍。

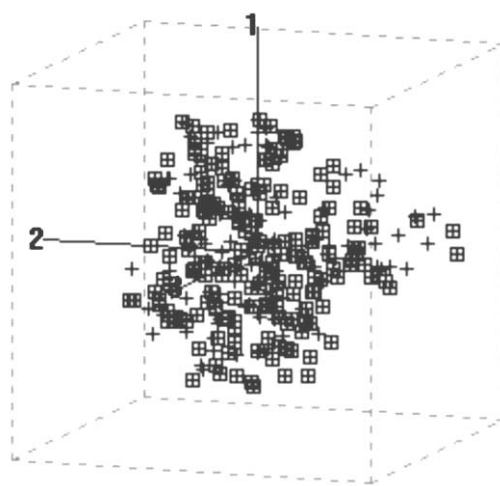


圖 1. 用於建立基礎檢量線樣品光譜三維空間分布。+：入選的樣品。□：相似性高的樣品

Fig. 1. The 3-D distribution of spectrums for samples used in basic calibration.

+ : Selected □ : Redundant

表 1. 三組狼尾草樣品之化學成分變異範圍

Table 1. The ranges and means of chemical components of three sample sets of napiergrass used for calibration

Sample*		CP	NDF	ADF	WSC
			%		
Set (i)	Min	2.4	51.1	27.5	0.9
	Max	24.7	80.3	54.8	22.7
	Mean	12.2	67.6	39.9	7.2
	Sample size	119	119	119	119
Set (ii)	Min	5.6	69.4	39.4	11.2
	Max	10.7	78.3	43.7	14.0
	Mean	8.3	73.3	41.3	12.3
	Sample size	36	36	36	18
Set (iii)	Min	4.3	65.5	38.3	0.3
	Max	11.9	77.4	49.4	0.7
	Mean	7.4	70.9	44.4	0.5
	Sample size	48	48	48	48
Total	Mean	10.2	69.3	41.3	6.0
	Standard deviation	4.6	5.4	4.9	5.2

* Sample set (i) collected from trials of different cutting intervals at different locations, sample set, (ii) collected from trials of livestock wastewater application and sample set, (iii) collected from silage.

本研究以 800-2498 nm 為波長範圍，間隔 8 nm 為一資料點，共 209 個波長參與迴歸運算，以改良部分最小平方方法建立狼尾草粗蛋白質、中洗纖維、酸洗纖維及水溶性碳水化合物檢量線。因離光譜族群平均值太遠或離迴歸參考值太遠而去除之樣品點分別為 12、4、3 及 4 個。經資料點之微分處理、平滑處理等不同數學模式產生不同之檢量線，再依 SECV、SEC、 R^2 之大小選擇較佳之檢量線。所選出之檢量線相關介量如表 2，CP、NDF、ADF 及 WSC 之 R^2 分別為 0.99、0.95、0.96 及 0.98，SEC 分別為 0.51%、1.43%、1.17% 及 0.59%，SECV 分別為 0.65%、1.70%、1.35% 與 0.75%。各項介量均優於先前建立之盤固草檢量線（陳及王，2003），蓋因本研究進行時將化學分析與近紅外光掃描之間隔時間縮得更短，且為求精準，本研究之化學分析均重複三次之故。而利用 SELECT 功能將進行化學分析之樣品數降低，不僅節省分析時間而且無損其代表性，而所節省之時間可用以增加重複，提高準確度。

表 2. 狼尾草粗蛋白質、中洗纖維、酸洗纖維及水溶性碳水化合物基礎檢量線之介量
Table 2. The parameters of the basic calibration equations for crude protein, neutral detergent fiber, acid detergent fiber, and water-soluble carbohydrates of napiergrass

Chemical components	Sample size	Math transformation ^a	Scatter correction ^b	Number of terms ^c	Range of estimate	Mean	SEC ^d	R ²	SECV ^e
						%			%
CP	107	2,10,10,1	SNV and Detrend	8	0-27.4	11.8	0.51	0.98	0.65
NDF	115	2,10,10,1	SNV and Detrend	7	49.3-86.0	67.6	1.43	0.92	1.70
ADF	116	2,10,10,1	SNV and Detrend	6	23.2-56.5	39.9	1.17	0.94	1.35
WSC	115	2,10,10,1	SNV and Detrend	8	0.0-17.5	6.5	0.59	0.97	0.75

a Values are order of the derivative of log 1/R, number of 2 nm data points over which the derivative is calculated, and number of data points used in running smooth 1 and smooth 2.
b Standard normal variant and detrend were used to reduce light scatter interference and sample particle size effect on the spectra.
c Number of terms in modified partial least square regression.
d Standard error of calibration.
e Standard error of cross-validation.

II. 基礎檢量線的測試與更新

基礎檢量線建立後，為更強化檢量線之適用性，本研究再加入二批樣品來源不同之樣品進行擴充，一為畜牧廢水灌施試驗之狼尾草青草，一為經過青貯之材料。採用此兩批材料係考慮其所施肥料性質不同，或經過青貯可能造成植體化性之差異而影響光譜。經掃描結果，灌施廢水之狼尾草整體距離（Global H, GH）均在 3.0 之內，鄰接距離（Neighborhood H, NH）約介於 0.6-1.5 之間，與第一批樣品光譜特性差別不大，但無重複；而青貯狼尾草之 GH 均在 5.0 以上，可知青貯樣品與非青貯樣品間之光譜特性差距較顯著（圖 2）。因此將兩批樣品均送化驗室進行化學分析，再將結果併入第一批樣品重新建立檢量線，化學分析結果見表 1。

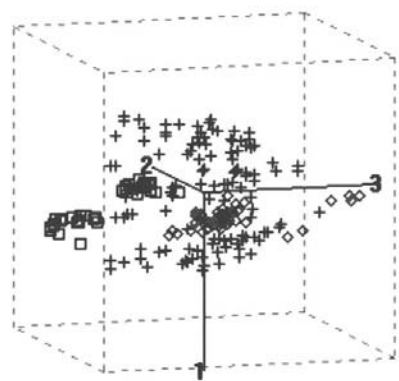


圖 2. 三批樣品光譜的三維空間分布。+：基礎檢量線樣品。□：灌施畜牧廢水樣品。◇：青貯樣品。
Fig. 2. The 3-D distribution of spectrums for the three sets of samples. +: Basic calibration □: Wastewater application ◇: Silage.

檢量線更新後之各項介量見表 3。CP、NDF、ADF、WSC之 R^2 分別為 0.99、0.95、0.98、0.99（圖 3），SEC分別為 0.45%、1.17%、0.80%、0.45%，SECV分別為 0.59%、1.37%、1.03%與 0.59%。除CP之SEC外，其他各介量均優於盤固草檢量線（盧及許，1998；陳及王，2003）。蓋因儀器性能改良（如少數固定波長變為連續波長），或選擇具代表性樣品、縮短掃描與化學分析之時間間隔之故。

表 3. 狼尾草更新後之粗蛋白質、中洗纖維、酸洗纖維及水溶性碳水化合物基礎檢量線之介量

Table 3. The parameters of updated calibration equations for crude protein, neutral detergent fiber, acid detergent fiber and water-soluble carbohydrates of napiergrass

Chemical components	Sample number	Math transformation ^a	Scatter correction	Number of terms ^b	Range of estimate	Mean	SEC ^c	R ²	SECV ^d
					————— %	—————			%
CP	197	2,5,5,1	SNV and Detrend	12	0.0-24.3	10.3	0.45	0.99	0.59
NDF	195	2,5,5,1	SNV and Detrend	10	53.0-85.6	69.3	1.17	0.95	1.38
ADF	198	2,5,5,1	SNV and Detrend	12	26.6-55.8	41.2	0.80	0.97	1.03
WSC	180	2,5,5,1	SNV and Detrend	11	0.0-20.9	5.8	0.46	0.99	0.59

a, b, c, d as shown in Table 2.

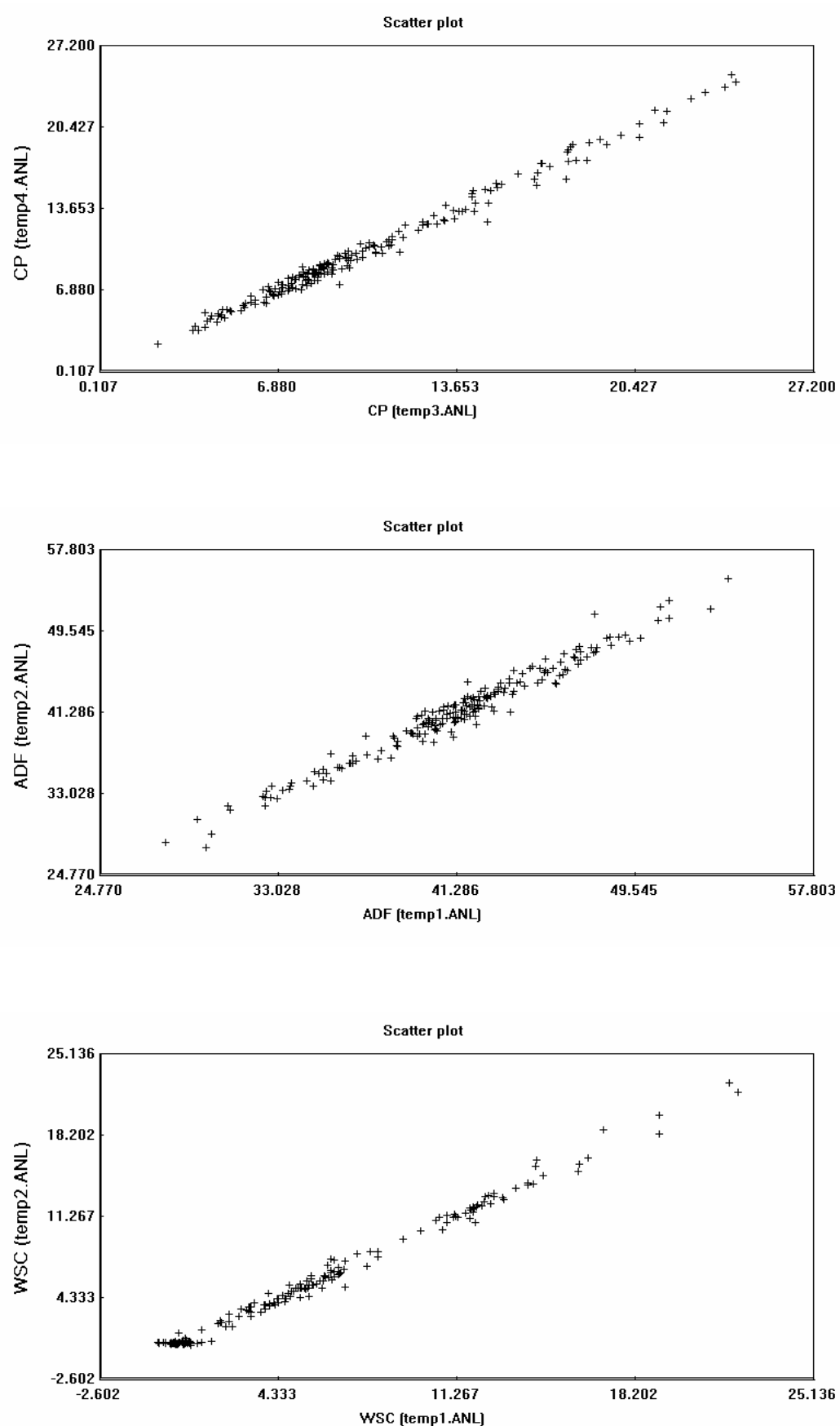


圖 3. 狼尾草成分實測值與預測值的關係。上圖為 CP，中圖為 ADF，下圖為 WSC，橫軸為化學測定值，縱軸為 NIR 之預測值。

Fig 3. The relationships between laboratory reference values and NIR predicted values. Up: CP, middle: ADF, below: WSC. Horizontal axis: reference values, vertical axis: NIR predicted values.

除上述統計值外，樣品實測值標準偏差與驗證標準機差之比值 (RPD)亦常做為預測之準確度可接受與否之指標，一般以 2.5 以上為可接受，然視預測成分的特性不同，並非所有預測標的都可達此標準 (Hsu *et al.*, 1998)。本研究 CP、ADF、NDF 及 WSC 之 RPD 值分別為 7.8、3.9、4.8、8.8，均超越可接受之標準。

本研究所建立之檢量線標的，除例行分析之 CP、ADF、NDF 外，尚包含 WSC。WSC 含量是

青貯時微生物生長繁殖的主要能量來源，為影響青貯成敗的重要因素（王等，1999；王等，2002）。對植體 WSC 含量的未能掌握，為造成青貯品質難以穩定的主要原因，WSC 含量的快速分析，可供收穫調製之決策參考，將有助於狼尾草青貯調製之穩定性。

參考文獻

- 王紓愍、陳嘉昇、成游貴。1999。狼尾草品系水溶性碳水化合物含量與青貯品質的關係。畜產研究 33：352~361。
- 王紓愍、陳嘉昇、成游貴。2002。水溶性碳水化合物含量的變化對狼尾草青貯品質的影響。畜產研究 35：143~150。
- 王紓愍、陳嘉昇、陳文、顏素芬、成游貴。2003。割期、季節及地區對狼尾草粗蛋白質、中洗纖維及酸洗纖維的影響。畜產研究 36：357~367。
- 成游貴、陳嘉昇、吳建福。1995。矮性狼尾草產量與品質之改良。畜產研究 28：285~294。
- 成游貴、黃耀興、陳嘉昇、李美珠。1997。地區尾草品系選拔及飼養式之研究。畜產研究 30：171~181。
- 李春芳。1999。近紅外線反射光譜分析(NIRS)在牧草營養研究上之應用。八十八年度飼料製造技術研習會專輯。pp.149~160。台南，台灣。
- 陳嘉昇、張定偉、王紓愍。2000。牧草品質與品質的快速測定。行政院農業委員會畜產試驗所專輯第 72 號。
- 陳嘉昇。2001。NIRS 在牧草品質快速檢測之應用。財團法人農業機械研究發展中心研討會專輯。台北，台灣。
- 陳嘉昇、王紓愍。2004。盤固草營養成分與碳水化合物含量的近紅外光分析。畜產研究。
- 張定偉。2002。養牛場廢水灌施狼尾草對牧草產量品質及土壤性質之影響。畜產研究 35:187~204。
- 盧啓信、許福星。1998。以近紅外光分析測定盤固草之粗蛋白質、酸洗纖維、粗纖維。畜產研究 31：77~85。
- A. O. A. C. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 14 ed. Washington DC. pp. 125~142.
- Ben-Gera, I. and K. H. Norris. 1968. Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. J. Food Sci. 33 : 64~67.
- Cosgrove, G. P., J. C. Burns, D. S. Fisher, J. P. Muller and K. R. Pond. 1994. Near infrared reflectance spectroscopy prediction of quality from masticated temperate forage species tall fescue, orchardgrass, regrass. Crop Sci. 34 : 789~792.
- Fahey, Jr., G. C. and H. S. Hussein. 1999. Forty years of forage quality research : Accomplishments and impact from an animal nutrition perspective. Crop Sci. 39 : 4~12.
- Griggs, T. C., K. b. Lobos, and D. E. Kingery. 1999. Digestibility analysis of undried, unground, and dry ground herbage by near-infrared reflectance spectroscopy. Crop Sci. 39 : 1164~1170.
- Hsu, H. A. McNeil, E. Okine, G. Mathison and R. Soofi-Siawash. 1998. Near infrared spectroscopy for measuring *in situ* degradability in barley forages. J. Near Infrared Spectrosc. 6 : 129~143.
- Morris, D. L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with dry-wood's anthrone reagent. Science 107 : 254~255.
- Norris, K. H., R. F. Barnes, J. E. Moore, and J. S. Shenk. 1976. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. J. Anim. Sci. 43 : 889~897.

- Reid, R. L. 1994. Milestones in forage research (1969-1994). p.1~58. In G. C. Fahey (ed.) Forage Quality, Evaluation, and Utilization. Am. Soc. Agro., Inc. Madison, Wisconsin.
- Shenk, J. S., and M. R. Hoover. 1976. Infrared reflectance spectro-computer design and application. P. 122~124. In Proc. 7th Technicon Int. Cong., 2, Tarrytown, N.Y.
- van Soest, P. J. 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. J. Anim. Sci. 26 : 119~128.
- Villalobos, J. L., J. C. Burn, D. S. Fiser, and K. R. Pond. 1991. *In vitro* dry matter disappearance and cell-wall concentration of flactidgrass masticates predicted by near-infrared reflectance spectroscopy. Crop Sci. 31 : 1571~1574.

Nutritional component determination in napiergrass using near-infrared spectroscopy analysis

Chia-Sheng Chen⁽²⁾⁽³⁾, Shu-Min Wang⁽²⁾

Received : Aug. 15, 2003 ; Accepted : Dec. 17, 2003

Abstract

The purpose of this research was to set up the calibration equations for near infrared spectrum (NIRS) for rapid crude protein (CP), acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF), and water-soluble carbohydrates (WSC) measurement analysis in napiergrass. Three hundred thirty-three samples from different cutting interval trials at different locations were scanned using NIRS. One hundred nineteen samples were selected to set up the basic calibration equations. The basic calibration equations were rebuilt by adding 36 samples from a livestock wastewater application trial and 48 samples from a silage making trial. The global H distance was lower than 3.0 and the neighborhood H was between 0.6 and 1.5 for all samples from the wastewater trial. This indicated that they were similar to the basic calibration samples in spectrum characteristics. The global H values for the silage samples were higher than 5.0, indicating that the spectrum characteristics had significantly changed after ensiling. The R^2 of the updated regressions for CP, NDF, ADF, and WSC were 0.99, 0.95, 0.98, and 0.99, respectively. The SEC were 0.45%, 1.17%, 0.80%, and 0.45%, and the SECV (standard error of cross verification) were 0.59%, 1.37%, 1.03%, and 0.59%, respectively. The RPD (ratio of the constituent standard deviation to the standard error of prediction) were 7.8, 3.9, 4.8, and 8.8, indicating that the four calibration equations were acceptable for predicting the component accurately. The accuracy was higher than that for pangolagrass set up previously. Besides determining the nutritional components, this method was also applied to determine the WSC content, which is an useful information for ensiling forages.

Key words : Rapid analysis, Crude protein, Acid detergent fiber, Neutral detergent fiber, Water soluble carbohydrates, Silage.

(1) Contribution No. 1220 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
(2) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 946, Taiwan, R. O. C.
(3) Corresponding author.