

近红外光谱(NIRS)分析技术历史悠久，值得信赖

NIRS analysis has long and credible history

作者: Bill Mahanna

译自: Feedstuffs, June 9, 2008

译者: 赵景鹏 陈继兰

在将近红外光谱分析技术应用到饲料和牧草成分常规检测的过程中，John Shenk先生无疑是早期的先驱者之一。近日，笔者非常荣幸地聆听了其所做的一次精彩报告，感觉受益匪浅。

2008年2月13日至14日，饲料和牧草近红外光谱分析协会（NIRSC）、饲料分析协会（FeedAC）和全国牧草检测协会（NFTA）联合年会在美国印第安纳州首府印第安纳波利斯隆重举行（相关新闻衔接见美国《饲料》周刊第2008/4/14期第14页）。John Shenk先生作为主要发言人，应邀出席了本次盛会。

首先，John Shenk和Paolo Berzaghi（NIRSC技术顾问）先生就近红外光谱分析技术的发展历程做了绝妙阐述；然后，他们与现场的实验室负责人或工作人员进行了交流互动。听完这次报告，笔者热血沸腾，由衷地认为，更多的营养学家当时应该莅临现场，实地取经。倘若事实果真如此的话，那么，他们在走出会场的时候，就会对眼下商业或大学实验室经常出具的近红外光谱分析数据充满信心。

在评价近红外光谱分析技术预测值的准确度时，需要特别指出的是，它是一种间接检测方法，必须以常规或标准方法做参比，通过建立回归校正模型才能实现未知样品的定性或定量分析，而这一点常常被人们所忽视。正由于此，近红外光谱分析技术的预测值永远不会比用作对照的常规检测技术更准确。作为科技工作者，我们都应清楚和铭记某些饲料养分如中性洗涤纤维（NDF）概略分析时的局限性和系统误差，在面对因参比方法缺陷而引起的近红外光谱分析技术预测模型错误时，能够给之以公平的看法和评判。

不久前，饲料和牧草近红外光谱分析协会（NIRSC）部分成员接受委派，成立了一个特别委员会，专门撰写和出版了一本有关近红外光谱分析技术的白皮书，笔者有幸参与其中。很快，这本书籍的电子版将被上传到饲料和牧草近红外光谱分析协会的网站（www.uwex.edu/cex/forage/NIRS/home-page.htm）上。本文以下所述内容，多数出于此书，可谓其精华或浓缩版。

近红外光谱分析技术由来已久

从1939年开始，有关近红外光谱分析技术的介绍就不断见于期刊杂志。尽管如此，但是，直到1968年，该技术才由来自美国农业部综合仪器研究室的Karl Norris先生及其同事应用到农产品检测中。

他们发现，在近红外区域，粮食或谷物具有专一性吸收条带，由此提示，近红外光谱仪器可以用来检测其中的蛋白质、油脂和水分含量。1976年，研究证实，牧草对其它波长近红外光的特异性吸收与其化学组成高度相关（Shenk, 2001）。

1977年,Shenk先生和他的研究团队专门设计了一套近红外光谱计算机检测系统,为牧草样品的质量分析提供了一种快速、准确的方法。1978年,他们又再接再厉,发明了一种适用于厢式货车的便携式仪器设备,实现了干草养分在田间或交易市场的直接测定。此后不久,这种可移动的近红外光谱分析大篷车经过更新换代,在宾夕法尼亚州、明尼苏达州、威斯康星州和伊利诺斯州的大学内得到了广泛应用。

为了推动粮谷和牧草近红外光谱分析科学的进步和发展,1978年,美国农业部建立并推出了名为“牧草近红外光谱检测网”的站点,以鼓励相关计算机软件的研制和开发。截止到1983年,市面上已经有几家商业公司开始经营和销售近红外光谱分析仪器和套装软件(Shenk, 2001)。

近红外光谱分析技术的工作原理

近红外光谱分析技术基于待测物质与近红外光线(700-2500nm)的相互作用,对样品的外观形态和前处理要求不高。尽管在一般情况下,样品均需干燥和细细研磨,但是,即使谷粒完整或新鲜潮湿,也可上样检测。近红外光谱分析仪器种类齐全,款式不一,既可以安置在实验室里静止固定,又可以根据实际需要四处挪动(如装配在青贮料切碎机上)。

近红外光谱仪器发射的单色光与植物材料的作用方式多样,包括反射、折射、吸收和衍射等。含氢基团X-H(X为碳、氮、氧等)能够定量吸收某些特定波长的辐射,从而发生电子跃迁,促使分子处于激发状态。从这一前提出发,人们可以利用化学键的特异性振动(产生独特的光谱),推断某种饲料成分如淀粉等的准确含量。

物质分子每次被置于相同的辐射区域时,都会表现出恒定的反应方式。这种优良的可重复性和精密度,使光谱学的研究和发展最终成为可能。

在测定某些单一的无机元素如钙、磷、镁等或混合物如粗灰分等的浓度时,近红外光谱仪器的敏感性大打折扣。究其原因,主要是由于近红外光谱分析技术对这些杂质材料的检测建立在共价键的基础之上。

建立定标方程

某些致力于预测模型研究的实验室或学术性团体,运用套装软件,开发出许多数学换算公式,将标准样品的近红外光谱特性与其化学计量紧密联系起来。这种算术推理过程被称为“化学统计”,这些换算公式被称为“预测模型”或“定标方程”。

近红外光谱预测模型的稳定性和准确度,在一定程度上取决于标准样品的群体大小和其代表性。从严格意义上讲,用作参比的标准样本应该能够容纳待检植物材料的所有变异。

例如,科研人员如果想要开发用于玉米粒中粗蛋白成分测定的预测模型的话,那么,他就必须首先采集不同遗传和环境背景的全部样品,然后在具有全国

牧草检测协会 (NFTA) 同等或以上标准的实验室内选择合适的分析方法, 进行定量测定。在特殊情况下, 某些化学成分的常规检测方法可能尚未存在, 如谷物发酵产物中的乙醇含量等, 此时, 实验室就必须建立和健全全新的参比技术。

为了获取准确的回归校正模型, 工作人员应当运用近红外光谱分析技术和湿化学方法, 对试验材料进行大量地不厌其烦地检测。通常而言, 概念验证性模型需要 50-60 个标准样本; 成品上市模型波动范围较大, 少则需要 80-100 个, 多则高达成千上万个, 关键取决于每次分析时的误差项大小。事实上, 不论何种模型, 参比样品的最终数目都依赖于常规分析和光谱测定的差距和变异 (Sevenich, 2008)。

为了降低总体误差的大小, 运用参比方法和近红外光谱仪器对标准样品进行多重分析和比较非常重要。如果预测模型定位于干燥、粉末状样品的话, 那么, 其前处理程序就必须被规范和优化。由于光谱反应对于样品颗粒的大小和形状十分敏感, 因此, 每次上样前, 各个样本的物理特性应当保持一致。

当工作人员利用相同的定标方程对待检样品进行近红外光谱分析时, 不同的实验室之间往往呈现出结果的差异。究其原因, 最大的误差来源之一就是这些实验室对于样品的前处理方式不同 (如研磨机的型号或使用年限不同等; Berzaghi, 2008)。

为了建立性能稳定的预测模型, 获取真实有效的试验结果, 各实验室必须做到以下 7 点: (1) 在整个分析过程中, 尽量减少误差来源; (2) 参比方法的精密度和准确度要高; (3) 样品的准备和分析过程要规范; (4) 校正和优化近红外光谱仪器的使用; (5) 仪器要注重日常维护和保养; (6) 待检样品与标准 (或参比) 样品的相关系数要高; (7) 所有相关仪器日常要例行检修, 预测模型每年要定时更新 (Sapienza, 2008; Berzaghi, 2008)。

实验室常见问题剖析

作为近红外光谱分析技术的使用者, 对于质疑和咨询与定标方程和湿法化学检测的契合度和准确度有关的问题, 我们应当坦诚布公, 直言不讳。通常而言, 对于标准误或置信区间等生物统计量的正确理解, 将有助于我们增强对于试验数据的科学性和真实性的自信心, 而在总结试验结果时, P 值等其它生物统计量的合理运用, 将有助于我们去伪存真, 盖棺定论。

下面, 本文就一些著名的近红外光谱实验室经常用到的生物统计量逐一展开论述 (Ruser, 2007; Allen, 2008; Sevenich, 2008; Owens, 2008)。

(1) 在定标方程的建立过程中, 标准样品的测定数目 (N) 取决于目的性状的自然变异程度。参比样本的来源范围越窄, 个体差异化的能见度就越难检测。通常而言, 建立一个初级预测模型, 需要 80-100 个参比样品; 建立一个高度成熟的定标方程, 需要成百上千个参比样品。

(2) 校正标准误 (SEC) 是指近红外光谱预测值与同一标准值 (参比样品的化学测定值) 的吻合度, 一般而言, 该生物统计值越低越好。例如, 如果参比值

为 30，标准误为 3 的话，那么，这就意味着 66.7% 的近红外光谱预测值应当位于 27-33 的区间范围内。

(3) 预测标准误 (SEP) 是指近红外光谱预测值与同一待测值 (验证样品的化学测定值) 的吻合度，一般而言，该生物统计值越低越好。

(4) 交叉验证标准误 (SECV) 是指近红外光谱预测值与诸多标准值的时序性或选择性验证吻合度，一般而言，该生物统计值越低越好。交叉验证标准误与校正标准误高度相关，如果两者之间差异显著的话，那么，该定标方程的预测性能就非常低下。

(5) 相对预测误差 (RPD) 是指所有参比样品的标准差与校正标准误的比值，在某些历史久远的文献资料中，该生物统计量又被称为“相对差异百分比”。一般而言，该数值越高越好。例如，如果参比样品的标准差为 9，校正标准误为 3 的话，那么，相对预测误差就等于 9 除以 3。在通常条件下，如果相对预测误差为 2-3 的话，那么，该预测模型就宣布失效；如果相对预测误差为 3-5 的话，那么，该预测模型就有待改进；如果相对预测误差大于 5 的话，那么，该预测模型就近乎完美。

(6) 回归系数 (R² 或 RSQ) 是指近红外光谱预测值与相关参比值的最佳拟合度，一般而言，该生物统计值越高越好。如果回归系数值为 1 的话，那么，定标方程对于实测值的预测准确度就为 100%。

(7) 参比方法的标准误由标准样品的多重分析计算而来，在一般情况下，该生物统计值越低越好。通常而言，参比方法的误差大小取决于所选化学方法的本身属性。

为了评价参比方法的优劣性，我们可以采用一些表示程度的关键词来对其进行描述。例如，消化率的常规测定值的标准误大约为 2 个单位，我们就说其拟合优度偏低；以干物质为基础，中性洗涤纤维的百分含量的常规测定值的标准误为 1.0-1.5，我们就说其拟合优度中等；以干物质为基础，粗蛋白质的百分含量的常规测定值的标准误为 0.3-0.5，我们就说其拟合优度较高。

如果参比方法的准确度不高，待测样品的化学组分的预测值就难以服众，表现为较高的预测标准误和较低的回归系数 (Sapienza, 2008)。

附表采用浮动计算法，描述了近红外光谱预测模型与参比方法的拟合优度随后者标准误不断变化的情况。研究者将拟合优度的优劣属性分为 3 档，分别为良好、中等和较差 (Sapienza, 2008)。

附表 近红外光谱预测模型与参比方法的拟合优度

拟合优度	参比方法的标准误	预测标准误	回归系数
良好	0.3-0.5	约等于标准误	> 0.95
中等	1.0-1.5	2倍标准误	> 0.90
较差	2.0-3.0	3倍标准误	< 0.80

通常而言,预测标准误的大小与参比方法的标准误直接相关。近红外光谱分析技术如果想要成为一项功能卓越、行之有效的检测方法的话,那么,参比方法的标准误就必须低。例如,以干物质为基础,粗蛋白质的百分含量的定标方程的预测标准误为0.3-0.5,回归系数为0.95,这就是一个拟合优度优良的预测模型的典型代表。

反过来讲,以干物质为基础,中性洗涤纤维的百分含量的定标方程的预测标准误为2-3,回归系数为0.80,这可能就是一个拟合优度低下的预测模型的经典范例(Sapienza, 2008)。

结语

近红外光谱分析技术历史悠久,值得信赖。由于它是一种间接的检测方法,因此,其预测值永远不可能比用作参照的常规技术更准确。为了快速检测饲料的营养价值,达到较高的可重复性,以帮助畜牧科技工作者发现和处理不同牧草种类内或种类间的组成差异,定标方程的拟合优度一定要高,各生物统计量必须达标。

与价格昂贵的湿化学检测方法相比,近红外光谱分析技术可在有限的财政预算范围内测定更多的次级样本或序贯样本。因此,其成本效益较高,总体误差较小。

为了提高近红外光谱分析技术的可信度和普及性,营养学家、生产者和实验室工作人员应当广泛交流,畅所欲言,力求将大家对于定标方程和湿化学方法的认识和理解抬升到一个新的高度和层次。