

鱼粉中肉骨粉的可见-近红外光谱快速定性判别方法

杨增玲^{1,2}, 韩鲁佳^{1,2*}, 刘 贤^{1,2}, 李琼飞³

(1. 中国农业大学工学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学动物营养学国家重点实验室, 北京 100091; 3. 上海金融学院信息管理学院, 上海 201209)

摘 要: 为了能更加快速准确的定性判别鱼粉中是否掺有肉骨粉 (MBM), 该文收集中国常用的鱼粉和肉骨粉, 制备定标集样品 201 个, 其中 111 个为掺有不同肉骨粉质量分数 (1%~33%) 的样品, 90 个为纯鱼粉, 并独立制备 113 个验证集样品, 其中 74 个为掺有不同肉骨粉质量分数 (1%~33%) 的样品, 39 个为纯鱼粉。在 400~2 498 nm 波长范围内进行光谱扫描, 选择合适的光谱预处理方法和光谱范围, 采用 DPLS 方法建立判别分析模型。建立的判别分析模型: 数学预处理方法为 2-8-6-1, 散射校正方法为变量标准化处理 (SNV), 光谱范围为全谱 (408~2 492 nm), 定标模型的正确判断率为 95.7%, 外部验证正确判断率为 95.6%, 对于掺入量 $\geq 5\%$ MBM 时, 正确判断率为 100%。研究结果证明近红外反射光谱可以提供一种快速鉴别鱼粉中 MBM 的方法。

关键词: 近红外反射光谱 (NIRS), 分析模型, 判别分析, 饲料安全, 肉骨粉, 鱼粉

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2009.07.056

中图分类号: S87

文献标识码: B

文章编号: 1002-6819(2009)-7-0308-04

杨增玲, 韩鲁佳, 刘 贤, 等. 鱼粉中肉骨粉的可见-近红外光谱快速定性判别方法[J]. 农业工程学报, 2009, 25 (7): 308—311.

Yang Zengling, Han Lujia, Liu Xian, et al. Rapidly qualitative discrimination of meat and bone meal in fishmeal by visible and near infrared reflectance spectroscopy[J]. Transactions of the CSAE, 2009, 25(7): 308—311. (in Chinese with English abstract)

0 引 言

研究表明, 从英国开始的牛海绵状脑病 (BSE) 又称“疯牛病”, 是由于使用了含有肉骨粉 (Meat and Bone Meal, 简称 MBM) 的配合饲料而引发的。因此, 世界各国政府纷纷做出限制或禁用肉骨粉的各种管理规定。鱼粉 (Fish Meal) 蛋白质含量高、氨基酸种类齐全、消化率较高, 是非常重要的畜禽蛋白饲料原料。但由于中国鱼粉资源相对匮乏、供需缺口大、市场价格持续走高。与此同时, 同样是动物性蛋白原料的肉骨粉在国内遭遇禁用, 致使肉骨粉的市场价格持续走低。为此, 一些不法鱼粉加工企业、销售商, 生产和销售添加肉骨粉的鱼粉。因此, 在贸易中为了确保鱼粉的质量, 寻求快速、简便的检测方法显得尤为重要。

目前用于检测动物源性成分含量的方法研究主要集中于: 显微分析法^[1]、酶联免疫吸附试验^[2]、聚合酶链反应^[3]。这些方法对操作人员要求高, 检测周期长, 并且对经高温加工的肉骨粉检测存在很大的限制。Murray 等的研究表明: 利用可见-近红外光谱可以定性区分鱼粉中是否掺加了肉骨粉^[4], 同时国外的研究表明利用近红外光谱技术快速检测配合饲料中肉骨粉含量是可行的^[5-9]。国内的研究刚刚起步^[10-14], 牛智有等人利用傅里叶变换近红外光谱仪研究了基于近红外光谱定量检测鱼粉和饲料中 MBM 含量的可行性^[10-11]。对肉骨粉质量分数 $\geq 5\%$ 的鱼粉进行定量分析, 获得了较理想的结果^[11]。但在含量较低时, 正确性较差, 从鉴别造假产品的需要来看, 建立一种既快速而又更加精确、可靠的定性鉴别方法尤为重要。

本研究以鱼粉为原料, 采用有监督的模式识别方法 DPLS (Discriminant PLS) 通过比较不同的光谱范围和光谱预处理方法, 探讨基于可见-近红外反射光谱技术定性分析鱼粉中肉骨粉的可行性, 探索丰富中国动物源性饲料快速定性检测的新方法。

1 材料与方法

1.1 样本的制备

收集鱼粉共 111 种, 其中国产鱼粉共 91 种, 分别来自北京、湖北、山东、青海等地饲料加工厂, 进口鱼粉 20 种, 主要来自秘鲁和智利; 肉骨粉 58 个, 包括牛源、羊源、猪源、鸡源和不同源的混合肉骨粉。样品的品质、性状、产地都存在差异, 具有较好的代表性。所有样品使用旋风磨粉碎, 使之全部通过 0.5 mm 标准筛孔, 密封后置于冰柜中保存。

1) 定标集

定标集包括 90 个纯鱼粉和 111 个不同 MBM 含量的鱼粉样品 (1%~33%, m/m)。含有 MBM 的鱼粉样品在实验室制备, 用电子分析天平 (精度为 0.0001 g) 称质量, 在鱼粉中加入不同比例 (1%~33%) 的肉骨粉^[15], 以鱼粉中掺入的 MBM 含量作为试验样本的真实值。定标集的 MBM 质量分数范围为 0~33%, 标准差为 10.81%。

2) 验证集

独立的外部验证集包括 39 个纯鱼粉样和 74 个不同 MBM 质量分数的鱼粉样品 (1%~33%, m/m), 其制备方法同定标集, 质量分数分布为: 15 个 1%~5%, 10 个 6%~10%, 49 个 11%~33%。外部验证集的 MBM 质量分数范围为 0~33%, 标准差为 10.71%。

1.2 近红外反射光谱仪

美国 FOSS 公司生产的 NIRSystems™ 6500 型光栅可见-近红外光谱仪。光源为钨卤灯, 检测器在可见光和短波近红外范围 (408~1 092 nm) 为硅检测器, 在近红外范围 (1 108~2 492 nm) 为硫化铅检测器, 仪器带宽 10 nm, 往复移动式样品池, 标准陶瓷片作为参比。数据处理软件为仪器自带的 WinISI III V1.5 软件。

1.3 样本近红外反射光谱扫描

样本在室内放置 72 h 以上, 使其温度达到室温。打开电源, 使仪器预热 45 min 以上, 按照生产商规定的日常检测程序检测仪器 (包括仪器的响应、波长准确度和噪声检测)。为保持装样

收稿日期: 2008-08-22 修订日期: 2009-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571074); 国家“十一五”科技支撑计划子课题项目 (2006BAD12B03-03); 动物营养学国家重点实验室自主研发课题

作者简介: 杨增玲 (1977—), 女, 山东莱芜人, 副教授, 博士, 中国农业工程学会会员 (E040100001M), 主要从事生物质资源开发与利用方向的研究。北京海淀区清华东路 17 号 中国农业大学东区 191#, 100083。

Email: yangzengling@cau.edu.cn

*通信作者: 韩鲁佳 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事生物质资源开发与利用和农产品加工工程方向的研究。北京海淀区清华东路 17 号 中国农业大学东区 191#, 100083。Email: hanlj@cau.edu.cn

刘贤, 中国农业工程学会会员 (E040100003M)

量一致，装样时使样品表面与样品池边缘相平，盖上样品池自带的盖子压实，放入检测位置，对样本进行近红外反射光谱扫描。为减小误差，每个样本分别装样 3 次，进行扫描，这样每个样品有 3 个光谱。同时，为了减小系统误差，样本按随机顺序扫描。

扫描范围 400~2 500 nm，扫描次数 32 次，采样间隔 2 nm，扫描光谱以 $\lg(I/R)$ 的形式存储。

1.4 近红外分析模型的定标方法

使用 WinISI III V1.5 软件对光谱数据进行处理，在建立定性分析模型之前，为了得到更稳定的模型，对光谱数据进行预处理，光谱预处理方法包括数学预处理和散射校正。

采用有监督的模式识别方法 DPLS (Discriminant PLS) 来建立模型，即用已知类别的样本作为校正集，将不同类别的样本分别存放于独立的数据库，以类别变量代表每一类，采用偏最小二乘法，建立判别分析校正模型。校正模型进行内部交互验证，以交互验证标准差 SECV (Standard Error of Cross-Validation) 最小来确定模型的主成分因子数。利用独立的验证集对所建立的定性分析模型进行检验。定性分析模型的评价指标为正确率，即正确判断的样品数占全部样品数的百分比。

2 结果与分析

2.1 样本近红外反射光谱

图 1 为鱼粉和肉骨粉的近红外反射光谱的二阶导数光谱图，可以明显地看出经过二阶导数处理以后，在 1 700 nm 附近鱼粉和肉骨粉的光谱存在较大的差异，这主要因为鱼粉和肉骨粉的不饱和脂肪酸含量差异很大的缘故，这为利用可见-近红外光谱检测鱼粉中肉骨粉提供了一定的依据^[4]。

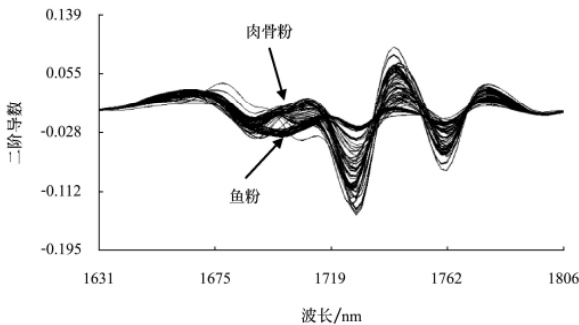


图 1 鱼粉和肉骨粉的近红外光谱特征
Fig.1 Near Infrared reflectance Spectroscopic (NIRS) characteristics of fishmeal and Meat and Bone Meal (MBM)

图 2 显示了鱼粉和 MBM 在第 1、第 2 主成分空间得分的散点分布图，从图中可以看出，鱼粉在主成分空间分布图中比较集中，能够与分布很散的 MBM 样品区分开来，这也为鱼粉中肉骨粉的检测提供了一定的依据。

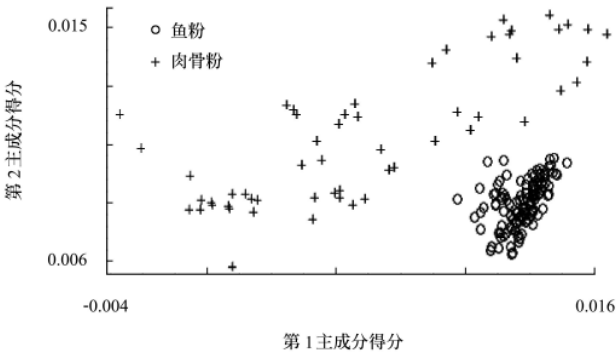


图 2 主成分得分散点图
Fig.2 Plot of principal component score

2.2 定性分析模型的建立

为了得到更加准确和稳定的模型，在建立定性分析模型前，对原始光谱数据进行预处理，主要是数学预处理和散射校正。

数学预处理主要为了消除光谱信号的基线漂移和一些随机噪音，包括原始光谱，微分加平滑 3 种方法，表示为：0-0-1-1，1-4-4-1，2-8-6-1。其中第 1 个数值代表微分处理，0 代表不求导，1 代表求一阶导，2 代表求二阶导；第 2 个数值代表求导的数据间隔；第 3 和第 4 个数值分别代表 1 次和 2 次平滑的点数，1 代表不平滑。求导间隔和平滑点数均可作适当的调整，但平滑点数尽量不大于求导间隔。

散射校正主要为了消除样本粒度分布不均匀引起的散射，使用了无散射处理 (None)、变量标准化处理和去散射处理结合 (SNVDT)、变量标准化处理 (SNV)、去散射处理 (DT)、标准乘性散射校正 (Std MSC) 等 5 种方法。

表 1 显示了不同数学处理方法和散射校正对定标结果的影响。由表 1 可以看出：数学预处理方法对定标结果的影响非常明显，光谱经过一阶导数和二阶导数处理后，定标效果明显好于不进行导数处理的结果。这主要是因为经过导数处理后有用的光谱信号被加以放大，有利于 MBM 的检出。综合考虑不确定数、正确率和交互验证标准误差三项指标，最终选择数学预处理方法为 2-8-6-1，散射校正为变量标准化处理 (SNV) 作为最优光谱预处理方法。

表 1 不同光谱预处理方法对定标结果的影响
Table 1 Effects of different spectrum pretreatment methods on calibration results

数据点	数学预处理	散射校正	主因子数	不确定数	正确率/%	R^2	校正标准差	R_{cv}^2	交互验证标准差
260	0-0-1-1	None	30	160	73.5	0.91	0.1463	0.90	0.1585
		SNVDT	24	157	74.0	0.89	0.1670	0.87	0.1807
		SNV	28	172	71.5	0.90	0.1543	0.89	0.1658
		DT	27	143	76.3	0.90	0.1591	0.88	0.1709
		Std MSC	27	131	78.3	0.90	0.1567	0.89	0.1670
259	1-4-4-1	None	22	72	88.1	0.92	0.1419	0.90	0.1587
		SNVDT	20	47	92.2	0.93	0.134	0.91	0.1498
		SNV	21	52	91.4	0.93	0.1354	0.91	0.1510
		DT	22	51	91.5	0.93	0.1356	0.91	0.1534
		Std MSC	21	54	91.0	0.93	0.1358	0.91	0.1512
252	2-8-6-1	None	27	31	94.9	0.94	0.1191	0.91	0.1452
		SNVDT	22	23	96.2	0.94	0.1228	0.91	0.1484
		SNV	27	26	95.7	0.95	0.1117	0.92	0.1397
		DT	26	27	95.5	0.94	0.1208	0.91	0.1470
		Std MSC	27	25	95.9	0.95	0.1119	0.92	0.1400

注： R_{cv}^2 ：交互验证相关系数；None：无散射处理；SNVDT：变量标准化处理和去散射处理结合；SNV：变量标准化处理；DT：去散射处理；Std MSC：标准乘性散射校正。

为了研究不同谱区对定标模型的影响, 针对全谱 (408~2492 nm)、可见光和近红外短波谱区 (408~1092 nm) 和近红

外谱区 (1108~2492 nm) 分别建立了定性分析模型, 如表 2 所示。

表 2 不同光谱范围对定标结果的影响
Table 2 Effects of different spectrum regions on calibration results

预处理方法	光谱范围	数据点	主因子数	不确定数	正确率/%	R^2	校正标准差	R_{cv}^2	交互验证标准差
2-8-6-1 SNV	可见光区	82	27	147	75.6	0.84	0.2004	0.79	0.2271
	近红外区	170	19	64	89.4	0.91	0.1472	0.90	0.1592
	全谱区	252	27	26	95.7	0.95	0.1117	0.92	0.1397

由表 2 可以看出, 只使用可见和短波近红外光谱区建立定标模型效果不好, 但基于全谱区建立的定标模型优于基于近红外谱区建立的模型, 因此可见和短波近红外光谱区对于鱼粉中 MBM 的鉴别有一定作用, 最终选择全谱区建立定标模型, 模型的正确判断率为 95.7%。

2.3 定性分析模型的验证

用独立的验证集对模型进行验证, 图 3 显示了验证集样品的得分图, 每个样品测量 3 次在图中用不同的符号表示。

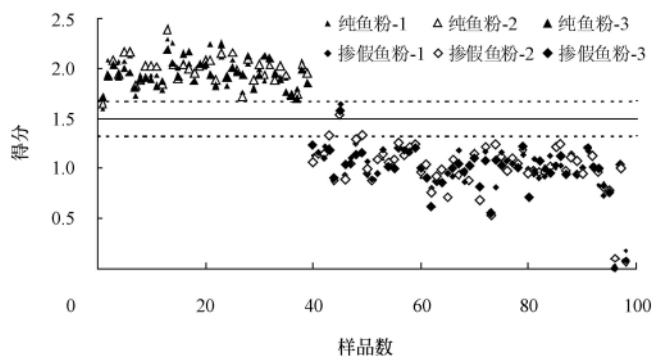


图 3 判别分析模型的验证
Fig.3 Validation result of discriminant analysis model

未受 MBM 污染的鱼粉样品的得分在 2 附近, 而掺有 MBM 的鱼粉样品的得分在 1 附近, 两类的分界线为 1.5, 每个参与验证的样本, 对应每一组都有 1 个得分值, 两组的得分之和为 3.0。样本被分为哪一组, 是由样本的得分值来判断的。如果纯的鱼粉样品得分小于 1.5 为假阳性样品, 如果掺有 MBM 的鱼粉样品的得分大于 1.5 则为假阴性样品, 这两类错误在建立模型时都应尽量避免。位于两条虚线之间的样品, 即得分在 $(1.5 \pm 2.5 \times \text{SECV}/2)$ 之内的样品, 为不确定样品, 对于这些样品, 定标模型不能对其所属的类别做出肯定的判断。

对 113 个验证样本, 定标模型的验证结果显示: 没有假阳性样品, 但有 1 个假阴性样品 (MBM 质量分数为 3%), 有 5 个不确定样品 (MBM 质量分数分别为 0, 0, 2, 3, 4) (只要有一次检测结果为不确定即为不确定样品), 正确判断率为 95.6%。鱼粉中 MBM 质量分数 $\geq 5\%$ 时正确判断率为 100%, 并且由 3 次扫描的结果可以看出所建模型比较稳定。从结果可以看出, 只有含量较低时才出现不确定样品, 其中一个假阴性样品的采集地点不同于其他样品, 可能因为定标集缺少该产地鱼粉的信息, 因此可以预想通过扩大定标集的代表性, 该模型会更准确和稳定。

3 结论

本研究以鱼粉为原料, 通过添加不同含量的肉骨粉, 探讨基于 DPLS 的鱼粉中肉骨粉含量的近红外反射光谱的定性判别分析方法。建立的判别分析模型: 数学预处理方法为 2-8-6-1,

散射校正方法为变量标准化处理 (SNV), 光谱范围为全谱 (408~2492 nm), 定标模型的正确判断率为 95.7%, 外部验证正确判断率为 95.6%。并且对方法的重复性进行了验证, 3 次重复结果保持了很好的一致性, 说明所建模型具有一定的稳定性。

本文的研究结果证明利用近红外反射光谱可以较快速而准确地定性鉴别鱼粉中是否掺有肉骨粉 (MBM), 可与鱼粉中肉骨粉的定量分析模型联合使用, 对于定性模型判别为阳性的样品, 进一步进行含量多少的预测, 这对于实际应用更加有意义。

志谢: 感谢比利时瓦隆农业研究中心的 Vincent Baeten 博士 (STRATFEED 计划协调人) 和 Foss 中国有限公司赵武善先生给予的技术支持和热心帮助。

[参考文献]

- [1] Frick G, Rietschi A, Hauswirth H. Mikroskopische untersuchung von futtermitteln[J]. AGRARForschung, 2002, 9 (11/12): 497—504.
- [2] Ansfield M, Reaney S D, Jackman R. Performance assessment and validation of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine heat stable proteins in compound animal feedstuffs[J]. Food Agric, Immunol, 2000, 12: 285—297.
- [3] Bellagamba F, Moretti V M, Comincini S, et al. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 3775—3781.
- [4] Murray I, Aucott L S, Pike I H. Use of discriminant analysis on visible and near infrared reflectance spectra to detect adulteration of fishmeal with meat-and bone meal[J]. J Near infrared Spectrosc, 2001, 9(5): 297—311.
- [5] Pérez-Marín D, Garrido-Varo A, Guerrero J E, et al. Detection and quantification of mammalian meat and bone meal in compound feedingstuffs by NIR Spectroscopy[A]. Davies A M C and Garrido A. Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference[C]. Chichester, West Sussex, UK: NIR Publications, 2004: 667—672.
- [6] Fernández M, Martínez A, Modroños, et al. Near infrared reflectance spectroscopy as a tool to predict qualitative and quantitative meat and bone meal presence in compound feed[A]. Davies A M C and Cho R K. Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference[C]. Chichester, West Sussex, UK: NIR Publications, 2002: 307—312.
- [7] Termes S, Tauler R, Puigdomènech A. Preliminary results in the determination of meat and bone meal in feedingstuffs[A]. Davies A M C and Garrido A. Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference[C]. Chichester, West Sussex, UK: NIR Publications, 2004: 659—662.
- [8] Pérez-Marín D, Garrido-Varo A, Guerrero J E, et al. Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the mandatory labeling of compound feedingstuffs: chemical composition and open-declaration[J]. Anim Feed Scienc Techn, 2004, 116 (3/4): 333—349.
- [9] Garrido A, Pérez-Marín M D, Guerrero J E, et al. Near infrared reflectance spectroscopy as an essential tool in food safety programmes: predicting ingredients in commercial compound feed[A]. Davies A M C and RK Cho. Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference[C]. Chichester, West Sussex, UK: NIR Publications, 2002: 145—150.

- [10] 牛智有, 韩鲁佳. 饲料中肉骨粉含量的近红外反射光谱检测方法[J]. 农业工程学报, 2008, 24(4): 271–274.
Niu Zhiyou, Han Lujia. Prediction of meat and bone meal content in feed by near infrared reflectance spectroscopy[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2008, 24(4): 271–274. (in Chinese with English abstract)
- [11] 牛智有, 韩鲁佳, 苏晓鸥, 等. 鱼粉中肉骨粉含量的近红外反射光谱分析[J]. 农业机械学报, 2006, 37(8): 126–129.
Niu Zhiyou, Han Lujia, Su Xiaou, et al. Analysis of meat and bone meal content in fish meal by near infrared reflectance spectroscopy[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2006, 37(8): 126–129. (in Chinese with English abstract)
- [12] 杨增玲, 韩鲁佳, 李琼飞, 等. 反刍动物精料补充料中肉骨粉快速检测近红外光谱法[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(6): 1278–1282.
Yang Zengling, Han Lujia, Li Qiongfei, et al. NIRS method for determination of meat and bone meal content in ruminant concentrates[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(6): 1278–1282. (in Chinese with English abstract)
- [13] 李琼飞, 杨增玲, 韩鲁佳. 反刍动物源肉骨粉的近红外漫反射光谱判别分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(3): 572–577.
Li Qiongfei, Yang Zengling, Han Lujia. Discriminant analysis of near infrared diffuse reflectance spectra to detect adulteration of non-ruminant meat and bone meal[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(3): 572–577. (in Chinese with English abstract)
- [14] 李琼飞, 杨增玲, 韩鲁佳. 肉骨粉中牛羊源成分含量的近红外漫反射光谱分析[J]. 红外与毫米波学报, 2007, 26(6): 414–418.
Li Qiongfei, Yang Zengling, Han Lujia. Analysis of cattle and sheep content in pig or poultry meat and bone meal by near infrared reflectance spectroscopy[J]. J Infrared Millim Waves, 2007, 26(6): 414–418. (in Chinese with English abstract)
- [15] Garrido-Varo A, Pérez-Marín D, Guerrero J E, et al. Construction of the stratified sample bank and preparation of sample sets (WP2)[A]. Stratified Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs[R]. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2005.

Rapidly qualitative discrimination of meat and bone meal in fishmeal by visible and near infrared reflectance spectroscopy

Yang Zengling^{1,2}, Han Lujia^{1,2*}, Liu Xian^{1,2}, Li Qiongfei³

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. State Key Laboratory of Animal Nutrition, China Agricultural University, Beijing 100091, China;

3. School of Information Management, Shanghai Finance University, Shanghai 201209, China)

Abstract: In order to rapidly and accurately discriminate whether fishmeal was adulterated with meat and bone meal (MBM) or not, representative fishmeal and MBM samples were collected in China. 201 calibration samples were prepared, including 111 samples adulterated with MBM (1%–33%) and 90 pure fishmeal samples. 113 external validation samples were prepared independently, including 74 samples adulterated with MBM (1%–33%) and 39 pure fishmeal samples. The spectra were scanned from 400 nm to 2 498 nm. The effects of spectrum pretreatment methods and spectrum region on the calibration results were considered. The calibration equations were established by DPLS. A DPLS discriminant analysis model was developed based on spectra region from 400 nm to 2 498 nm with mathematic pretreatment 2-8-6-1 and scatter correction treatment the standard normal variate (SNV). The accurate discriminant rate of calibration and external validation was 95.7% and 95.6% respectively. For the adulterated samples (MBM mass percentage $\geq 5\%$), the accurate discriminant rate was 100%. The results of the study indicate that NIRS can provide a rapid discrimination method for meat and bone meal in fishmeal.

Key words: near infrared reflectance spectroscopy (NIRS), analytical models, discriminant analysis, feed safety, meat and bone meal, fishmeal