

文章编号:1001-9014(2007)06-0414-05

肉骨粉中牛羊源成分含量的近红外漫反射光谱分析

李琼飞^{1,2}, 杨增玲^{1,2}, 韩鲁佳^{1,2*}

(1. 中国农业大学工学院, 北京 100083; 2. 现代精细农业系统集成研究教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要:为了切断疯牛病的传播途径保证饲料安全, 开展非反刍动物肉骨粉中反刍动物成分含量的检测方法研究十分必要. 本文探讨了利用近红外漫反射光谱(NIRS)分析技术快速检测非反刍动物(猪鸡)肉骨粉中反刍动物(牛羊)成分含量的可行性. 收集了不同地区不同种类的肉骨粉样本, 在猪和鸡肉骨粉中分别掺入 0~48% 的牛或羊肉骨粉, 制备了 200 个样本. 针对含牛羊源的猪肉骨粉、含牛羊源的鸡肉骨粉和含牛羊源的猪鸡肉骨粉三类样本, 以掺入的牛羊源成分的质量比例作为真值, 分别采用改进的偏最小二乘回归(MPLS)、偏最小二乘回归(PLS)和主成分回归(PCR)三种不同建模方法建立了 NIRS 定标模型. 用独立的验证集对模型进行了验证, 最优模型验证集的决定系数(R^2)均大于 0.90, 相对分析误差(RPD)均大于 3.0. 结果表明, 利用 NIRS 分析技术可以快速检测出猪鸡肉骨粉中牛羊源成分的含量.

关键词:近红外漫反射光谱; 肉骨粉; 改进的偏最小二乘回归; 牛羊源成分
中图分类号:0657.33 **文献标识码:**A

ANALYSIS OF CATTLE AND SHEEP CONTENT IN PIG OR POULTRY MEAT AND BONE MEAL BY NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY

LI Qiong-Fei^{1,2}, YANG Zeng-Ling^{1,2}, HAN Lu-Jia^{1,2*}

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

2. Key Laboratory of Modern Precision Agriculture System Integration Research, Ministry of Education, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to protect the feed chain from contamination by bovine spongiform encephalopathy (BSE), it is necessary to detect the content of cattle and sheep meat and bone meal (MBM) in poultry or pig MBM. The objective of this study was to investigate the feasibility to determine the content of cattle and sheep MBM in poultry or pig MBM by using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). The MBM specimens were collected from different areas of China. Two hundred samples were prepared by poultry or pig MBM deliberately adulterated with cattle or sheep MBM over the weight range 0~48%. Three regression methods were compared (modified partial least squares, partial least squares and principal component regression). Three optimum models were developed from calibration sets of poultry, pig and both, respectively. The coefficients of determination (R^2) and the relative prediction deviation (RPD) of independent validation sets were greater than 0.90, 3.0, respectively. It is concluded that NIRS can be used as a rapid method to detect the content of cattle and sheep MBM in poultry or pig MBM.

Key words: near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS); meat and bone meal (MBM); modified partial least squares (MPLS); cattle or sheep MBM

引言

牛海绵状脑病(疯牛病, BSE)和羊痒病都是进行性、致死性和神经退行性疾病. 该病不仅严重威胁畜牧业安全, 而且可能引发严重的社会问题. 研究表

明, 饲喂含染病特别是同源肉骨粉(meat and bone meal, MBM)的饲料可引发疯牛病^[1]. 为了彻底切断疯牛病的传播途径, 世界各国纷纷作出了限制和禁用肉骨粉的各种管理规定. 我国农业部和国家质检总局等部委多次发布通告, 全面禁止从疫区进口牛、

收稿日期: 2006-10-13, 修回日期: 2007-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(30571074)资助项目

作者简介: 李琼飞(1971-), 女, 湖南洞口人, 博士研究生, 副教授, 主要从事农业工程研究.

Received date: 2006-10-13, revised date: 2007-01-08

牛肉类产品及其制品以及肉骨粉等动物性饲料,禁止在反刍动物饲料中添加和使用肉骨粉等动物源性饲料产品.为了落实国家有关疯牛病防范的管理规定,保障饲料质量和动物性食品安全,深入开展肉骨粉等动物源性饲料的检测方法研究十分重要.

近红外漫反射光谱(NIRS)分析技术是20世纪70年代兴起的一种新型有机物定性和定量分析技术,目前广泛应用于农业、食品、石化、纺织与医药等领域^[2,3,4]. Dorlores C等(2004)和P. Dardenne等(2005)研究表明,利用NIRS可进行饲料中肉骨粉的定量检测^[5,6].牛智有等(2006)的研究表明,利用NIRS可进行鱼粉中肉骨粉的定量检测^[7].朱荣光等(2006)的研究表明NIRS可定量检出复合肥料中的肉骨粉^[8]. Ana Garrido-Varo(2005)研究了不同种类的动物蛋白在近红外谱区的相关吸收特征,建立了不同种类的动物蛋白中反刍成分的定性和定量模型,但仍需深入研究以提高其模型的精度和稳定性^[9].目前,关于NIRS分析非反刍肉骨粉中反刍成分的研究尚未见报道.

本研究以猪鸡肉骨粉为原料,通过添加不同含量的牛羊源成分,探讨基于近红外光谱分析技术的牛羊源成分含量的定量检测方法和模型,探索丰富我国动物源性饲料快速检测的新方法.

1 材料与方法

1.1 实验样品的采集与制备

采集自河北、山东和北京等地的肉骨粉39个,其中牛5个,羊4个,猪和鸡各15个.肉骨粉经旋风磨粉碎,过0.5mm筛.用电子天平称重,随机选取肉骨粉,在猪肉骨粉中按2%间隔分别添加质量比例0~48%(W/W)的牛或羊肉骨粉,制备130个样本,在鸡肉骨粉中按2%间隔分别添加质量比例0~44%(W/W)的牛或羊肉骨粉,制备70个样本.制备的样本人工充分混和均匀.利用WINISI II版本1.5软件(美国Infrasoft公司)^[10]随机选择含牛羊源的猪肉骨粉、含牛羊源的鸡肉骨粉和含牛羊源的猪鸡肉骨粉三类样本的校正集和验证集,表1为各样本集中牛羊肉骨粉含量的统计结果.

1.2 光谱采集

实验仪器为Foss 6500光栅型近红外光谱仪(丹麦Foss公司),其光源为卤钨灯,可见及短波近红外谱区(400~1098nm)为硅检测器,近红外谱区(1100~2500nm)为硫化铅检测器,往复移动式样品池,标准陶瓷片作为参比.样本光谱采集时仪器工作

表1 猪鸡肉骨粉中掺入牛羊源成分的比例及其统计结果
Table 1 Statistics of the content of cattle or sheep MBM in poultry and pig MBM

	校正集				验证集					
	样本数	最大值/%	最小值/%	平均值/%	标准偏差/%	样本数	最大值/%	最小值/%	平均值/%	标准偏差/%
猪	97	48	0	17.87	12.67	33	48	0	18.64	13.70
鸡	47	44	0	22.00	13.41	23	44	0	21.08	14.01
总体	141	48	0	19.22	13.01	59	48	0	19.62	13.76

表2 定标信息统计结果

Table 2 Statistics of calibration information

	校正样本数	验证样本数	异常样本数	光谱范围	数学处理方法*	散射校正**	主因子数
猪	97	33	4	1108~2492nm	1,4,4,1	None	9
鸡	47	23	1	1108~2492nm	1,4,4,1	StdMSC	7
总体	141	59	5	1108~2492nm	1,4,4,1	Wtd MSC	10

*1,4,4,1;代表求一阶导,求导的数据间隔为4,一次平滑的点数4和二次平滑的点数为1.

**Std MSC; Standard Multiplicative Scatter Correction Wtd MSC; Weighted Multiplicative Scatter Correction

参数设定为:谱区范围400~2500nm,扫描次数32次,数据间隔为2nm,数据以 $\log(1/R)$ 的形式存储.在室温(20~22℃)环境下,样本装填在1/4样品杯内进行扫描.每个样本分别装填三次,分别进行扫描,加和取平均得到各样本的光谱.

1.3 异常样本的剔除

异常样本判别分为两类,一类依据GH(标准化的马氏距离)值进行判别,GH值代表样本光谱与平均谱带的差异,GH值>3.0的样本,视为异常样本予以剔除.另一类是依据T检验值进行判别,T阈值设为2.5,如果真值与预测值之间的差的绝对值除以交互验证标准差(SECV)>2.5,即认为异常予以剔除^[10,11].各样本集剔除的异常样本数见表2.

1.4 光谱数据的预处理

为了消除光谱信号的基线漂移和一些随机噪音,使用了原始光谱、一阶和二阶导数加平滑三种数学处理方法.为了消除样本粒度分布不均匀引起的散射,使用了变量标准化(SNV)和多元散射校正(MSC)方法^[10,15].

1.5 定量模型建立的方法

利用WinISI II版本1.5软件进行光谱数据预处理和定量校正模型的建立.以猪鸡肉骨粉中实际掺入牛羊源成分的质量比例作为真值,分别使用改进的偏最小二乘回归(MPLS)、偏最小二乘回归(PLS)和主成分回归(PCR)三种建模方法建立模

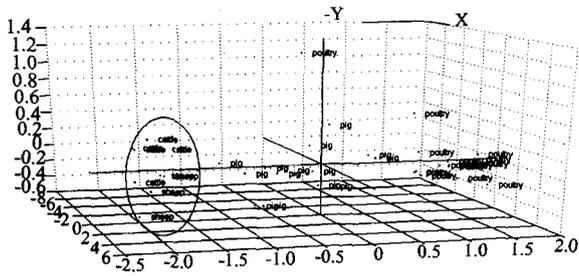


图1 不同种类的肉骨粉样本光谱第1、2和3的主成分空间分布图
Fig.1 PCA score for the three PCs for different MBM species

型^[12]. 为了防止过拟合现象的发生,采用交互验证(Cross Validation)方法确定模型的主因子数. 为了考察模型的准确性,用独立的验证集进行了预测. 校正集的统计参数包括决定系数(R^2)、校正标准差(SEC)、交互验证决定系数(R_{cv}^2)和交互验证标准差(SECV). 验证集的统计参数包括决定系数(R_{val}^2)、系统偏差(Bias)、斜率(Slope)和验证标准差(SEP). 由 R_{cv}^2 最大和 SECV 最小来确定最优模型^[13]. 另外,使用相对分析误差(RPD)对模型进行深入的评价,即校正集的相对分析误差 $RPD = SD/SEC$ (SD 为校正集标准偏差)和验证集的相对分析误差 $RPD_{val} = SD_{val}/SEP$ (SD_{val} 为验证集标准偏差). 如果 $RPD \geq 3$,说明定标效果良好,建立的定标模型可以用于实际检测;如果 $2.5 < RPD < 3$,说明利用 NIRS 进行定量分析是可行的,但预测精度有待于进一步提高;如果 $RPD \leq 2.5$,则说明难于进行 NIRS 定量分析^[14].

2 实验数据与分析

2.1 样本近红外漫反射光谱分析

对所收集的 39 个纯肉骨粉样本(其中牛 5 个,羊 4 个,猪和鸡各 15 个)的原始光谱,使用 The Un-

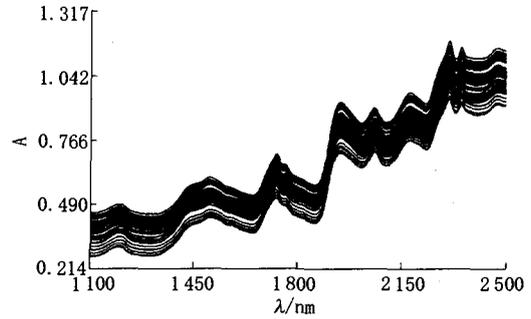


图2 含 0~44% 牛羊源成分的 70 个鸡肉骨粉样本的近红外漫反射光谱
Fig.2 Spectroscopy of 70 pig MBM samples with 0~44% of ruminant MBM

scrambler 版本 9.1(CAMO 挪威)软件在全谱区进行主成分分析,图 1 为不同种类的肉骨粉样本光谱第一、二和三的主成分空间分布图. 其中第一主成分的方差贡献率为 63%,第二主成分的方差贡献率为 34%,第三主成分的方差贡献率为 2%. 从主成分空间分布图可以看出,牛羊肉骨粉样本聚集在一起,与猪鸡肉骨粉样本能够较好地地区别开来,与猪鸡肉骨粉相比,牛羊肉骨粉可以等同对待. 这与 Cozzolino 等(2004)的研究是一致的^[17].

图 2 所示为含 0~44% 牛羊源成分的 70 个鸡肉骨粉样本的近红外漫反射光谱图. 图中横坐标为波长(nm),纵坐标为吸光度. 由图 1 可知,在 1100~2500nm 谱区范围内,样本光谱间存在较大差异,肉骨粉中的蛋白质和脂肪类含有大量的 C-H、O-H 和 N-H 化学键的官能团,在 1450~1800nm 的二倍频区有较强烈的吸收,在 1900~2500nm 合频区有较强烈的吸收^[15]. 而反刍动物和非反刍动物的脂肪不同,反刍动物的脂肪酸主要是反式脂肪酸,非反刍动物的脂肪酸主要是顺式脂肪酸,这为进行定量分析提供了一定的理论依据^[9,16].

表 3 校正集与验证集结果统计

Table 3 Statistics for results of calibration set and validation set

建模方法	牛羊源成分	R^2	SEC	校正集			RPD	R_{val}^2	SEP	验证集		
				SECV	R_{cv}^2	Bias				Slope	RPD _{val}	
MPLS	猪	0.9422	2.97	3.93	0.8985	3.22	0.9170	3.98	0.20	0.95	3.44	
	鸡	0.9844	1.69	2.08	0.9763	6.45	0.9600	2.94	0.38	1.07	4.77	
	总体	0.9129	3.83	4.26	0.8915	3.05	0.9130	4.17	-0.75	1.05	3.30	
PLS	猪	0.9302	3.29	3.79	0.9078	3.34	0.8910	4.51	0.49	0.96	3.04	
	鸡	0.9713	2.29	2.49	0.9656	5.39	0.9400	3.53	0.78	1.06	3.97	
	总体	0.9027	3.99	4.24	0.8901	3.07	0.8870	4.17	-0.55	1.07	3.30	
PCR	猪	0.6765	6.80	8.07	0.5454	1.57	0.5530	9.16	1.49	0.98	1.50	
	鸡	0.9561	2.83	3.17	0.9444	3.62	0.9480	3.14	-0.38	1.07	4.46	
	总体	0.7303	6.72	7.27	0.6818	1.79	0.7340	7.13	0.16	1.11	1.93	

2.2 NIRS 校正模型的建立和检验

表2所列校正集和验证集的样本数目、建立校正模型选择的最优光谱预处理方法和建模所用的最优主因子数目等统计信息。采用表2所确定的最优光谱预处理方法和主因子数,利用 MPLS、PLS 和 PCR 三种建模方法分别建立含牛羊源的猪肉骨粉、含牛羊源的鸡肉骨粉和含牛羊源的猪鸡肉骨粉中牛羊源成分的 NIRS 校正模型,模型的统计参数见表3。

由表3可以看出,在光谱预处理方法和主因子数相同的情况下,三种建模方法所建模型的 R^2 、RPD 等均不同,MPLS 建模方法所建模型的 R_{cv}^2 最大且 SECV 最小,选其为最优模型。含牛羊源的猪肉骨粉和含牛羊源的鸡肉骨粉中牛羊源成分含量的 NIRS 最优校正模型的 R_{cv}^2 分别为 0.8985 和 0.9763,SECV 分别为 3.93% 和 2.08%,RPD 分别为 3.22 和 6.45;验证集的 R_{val}^2 分别为 0.9170 和 0.9600,SEP 分别为 3.98% 和 2.94%,RPD_{val} 分别为 3.44 和 4.77。

为扩大样本的代表性和提高模型的适应性,采用上述所有样本建立校正模型,并对该模型进行了检验。含牛羊源的猪鸡肉骨粉总体样本中牛羊源成分含量的 NIRS 最优校正模型的 R_{cv}^2 为 0.8915,SECV 为 4.26%,RPD 为 3.05,验证集 R_{val}^2 为 0.9130,SEP 为 4.17%,RPD_{val} 为 3.30。

所建3个模型的 RPD 均大于 3.0,表明定标效果良好,可以用于实际检测。3个最优模型的验证集的牛羊成分含量的真值与 NIRS 预测值相关关系散点图为图3所示。

3 结论

本试验采用 MPLS、PLS 和 PCR 三种建模方法分别建立了猪肉骨粉、鸡肉骨粉和猪鸡肉骨粉中牛羊源成分的 NIRS 校正模型。用独立的验证集对模型进行了验证,最优模型验证集的决定系数(R^2)均大于 0.90,相对分析误差(RPD)均大于 3.0。

从建模过程看,NIRS 光谱预处理方法的选择非常重要,只有选好合适的预处理方法和散射校正,以扣除干扰信息尽可能多的提取光谱信息,才能获得较理想的分析结果,否则所建模型准确度不能满足实际需求。

从建模方法看,MPLS 方法所建模型较 PLS 和 PCR 法准确度更高,可见建模方法的选择是提高模型的准确度的方法之一。

研究表明,采用近红外漫反射光谱定量分

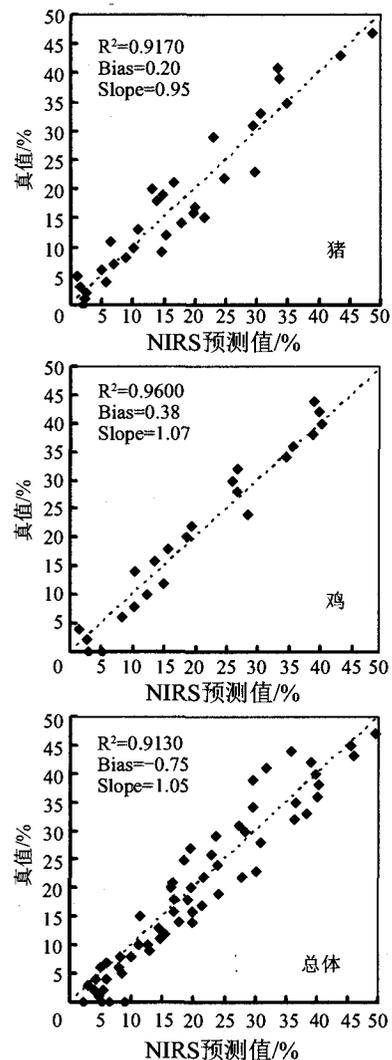


图3 验证集真值与 NIRS 预测值相关关系

Fig.3 Actual value vs. predicted value for validation set

析猪鸡肉骨粉中掺入牛羊源成分的含量是一种可行的方法。NIRS 方法可以快速测定猪鸡肉骨粉掺入牛羊源成分的含量,但在进行实际应用前,有必要扩大样品集的范围,以进一步提高模型的稳定性。NIRS 方法在不同种类的肉骨粉检测上有一定潜力。

致谢 感谢中国农业大学严衍禄教授、比利时 Wallon Agricultural Research Center 的 Vincent Baeten 博士和 Foss 中国有限公司赵武善先生的帮助,同时感谢国家饲料质量监督检验中心(北京)协助提供部分实验样本。

REFERENCES

- [1] ZHOU Jun-Mei. Prion Diseases and The "Protein only" Hypothesis[J]. *Prog. Biochem. Biophys* (周筠梅. Prion 疾病和 "Protein only" 假说. 生物化学与生物物理进展),

- 2004, **31**(2): 95—105.
- [2] LU Wan-Zhen, YUAN Hong-Fu, XU Guang-Tong, *et al.* *Modern Analysis Technique for Near Infrared Spectra* [M]. Beijing: Chinese Oil and Chemical Press(陆婉珍,袁洪福,徐广通,等. 现代近红外光谱分析技术. 北京:中国石化出版社), 2001: 6—8.
- [3] JIA Dong-Yao, DING Tian-Huai. Novel method of detecting foreign fibers in lint by fiber's infrared absorption characteristic[J]. *J. Infrared Millim. Waves*(郑东耀,丁天怀. 利用纤维红外吸收特性的皮棉杂质检测新方法. *红外与毫米波学报*), 2005, **24**(2): 147—150.
- [4] FAN Xiao-Fei, ZHANG Yong-Hong, BAI Jing, *et al.* Near-infrared optical mammographer with single source detector [J]. *J. Infrared Millim. Waves*(范晓飞,张永红,白净,等. 单光源单探测器的近红外光学乳腺成像系统. *红外与毫米波学报*), 2006, **25**(1): 10—12.
- [5] Dolores C Perez-Marin, Ana Garrido-Varo, Jose Emilio Guerrero, *et al.* Detection and quantification of mammalian meat and bone meal in compound feedingstuffs using NIR [C]. *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference. NIR Publications*, 2004, 667—671.
- [6] Dardenne P, Murray I, Carrido-Varo A, *et al.* *Strategies and Methods to Detect and Quantify Mammalian Tissues in Feedingstuffs. Final report of the STRATFEED project* [M]. Luxembourg: European Communities, 2005.
- [7] NIU Zhi-You, HAN Lu-Jia, SU Xiao-Ou, *et al.* Analysis of meat and bone meal content in fish meal by near infrared reflectance spectroscopy[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*(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. *农业机械学报*), 2006, **37**(8): 126—129.
- [8] ZHU Rong-Guang, HAN Lu-Jia, YANG Zeng-Ling. Rapid detection of meat and bone meal content in compound fertilizer by near infrared reflectance spectroscopy[J]. *J. Infrared Millim. Waves*(朱荣光,韩鲁佳,杨增玲. 近红外反射光谱分析技术快速检测复合化学肥料中肉骨粉含量的研究. *红外与毫米波学报*), 2006, **25**(4): 267—270.
- [9] Ana Garrido-Varo, Dolores Perez-Marin, Jose Emilio Guerrero, *et al.* Near infrared spectroscopy for enforcement of European legislation concerning the use of animal by-products in animal feeds[J]. *Biotechnol. Agrom. Soc. Environ*, 2005, **9**(1): 3—9.
- [10] *WINISI II version 1.5 Manual* [M]. Foss Tecator-Infrasoft International, USA; Port Matilda PA.
- [11] Kerstin Michel, Christian Bruns, Thomas Terhoeven-Urselmans, *et al.* Determination of chemical and biological properties of composts using near infrared spectroscopy [J]. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 2006, **14**(4): 251—259.
- [12] SU Ming, WANG Dan-Hong, ZHENG Neng-Xiong. Fast determination of components in meat-bone-powder by near infrared reflectance spectroscopy [J]. *Chinese Journal of Pest Control*(苏敏,王丹红,郑能雄. 近红外漫反射光谱法快速测定肉骨粉的成分. *医学动物防制*), 2004, **20**(10): 602—604.
- [13] Cozzolino D, Moronb A. Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2004, **111**(1): 161—173.
- [14] Malley D F, McClure C, Martin P D. Compositional analysis of cattle manure during composting using a field portable near infrared spectrometer [J]. *Communications in Soil Science & Plant Analysis*, 2005, **36**(4): 455—476.
- [15] YAN Yan-Lu, ZHAO Long-Lian, HAN Dong-Hai, *et al.* *The Technique and Application for Near-infrared Spectra Analysis* [M]. Beijing: Chinese Light Industry Press(严衍祿,赵龙莲,韩东海,等. *近红外光谱分析基础与应用*. 北京:中国轻工出版社), 2005: 29—112.
- [16] Stefano Bellorini, Stefan Strathmann, Vincent Baeten, *et al.* Discriminating animal fats and their origins: assessing the potentials of Fourier transform infrared spectroscopy, gas chromatography, immunoassay and polymerase chain reaction techniques [J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **382**(4): 1073—1083.
- [17] Cozzolino D, Murray I. Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy [J]. *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, 2004, **37**(4): 447—452.