

# 红外光谱的陆生动物油脂中反刍动物成分鉴别分析

刘 贤, 徐凌芝, 高 冰, 韩鲁佳\*

中国农业大学工学院, 北京 100083

**摘 要** 为有效应对违法添加导致的饲料安全隐患, 完善饲用油脂的高效检测手段, 满足饲料质量安全的监管需求, 以来源可靠的不同种属动物油脂为研究对象, 通过在非反刍动物油脂中掺入不同比例(1%, 5%, 10%, 20%, 30%和40% W/W)的反刍动物油脂获得试验样品, 首次系统应用傅里叶变换红外光谱结合化学计量学方法探讨了陆生动物油脂中掺入反刍成分的鉴别分析方法与模型。研究表明基于掺入比例1%~40%样品集, 偏小二乘判别分析模型正确判别率为100%, 无假阳性和假阴性样品; 进一步研究发现, 基于陆生动物油脂中反刍成分低掺入比例0.1%~40%, 0.2%~40%, 0.4%~40%, 0.6%~40%和0.8%~40%样品集, 偏小二乘判别分析模型的正确判别率均低于100%。且随着最低掺入比例的降低, 假阳性与假阴性样品数明显增多, 其正确判别率逐步降低。因此, 陆生动物油脂中掺入反刍成分判别分析检测限约为1%; 进一步通过脂肪酸组成与差异性分析、红外光谱特征波段和特征化学键对比分析探讨其判别分析机理。非反刍动物油脂光谱 $3\ 006\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰(代表 $\text{C—H}(\text{cis-})$ 的拉伸振动)和 $914\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰(代表 $\text{—HC=CH—}(\text{cis-})$ 的弯曲振动)明显高于反刍动物油脂样品, 主要表征了顺式脂肪酸和不饱和脂肪酸的显著差异。非反刍动物油脂光谱 $965\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰(代表 $\text{—HC=CH—}(\text{trans-})$ 的弯曲振动)明显低于反刍动物油脂样品, 主要表征了反式脂肪酸和饱和脂肪酸的显著差异。掺入比例为1%的混合样品中反式 $\text{C=C}$ 键含量显著高于其他低掺入比例的样品, 而不同掺入比例样品的顺式 $\text{C=C}$ 键含量和 $\text{C—H}(\text{—CH}_2\text{—})$ 键含量均无显著性差异。因此, 基于红外光谱的陆生动物油脂中反刍动物成分鉴别分析主要是基于反式 $\text{C=C}$ 键结构的信息表征。综上所述, 红外光谱可作为一种兼顾检测效率与检测精度的技术应用于陆生动物油脂中反刍成分的鉴别分析。

**关键词** 饲用动物油脂; 反刍动物油脂; 红外光谱; 判别分析

**中图分类号:** S814.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)10-3189-04

## 引 言

近年来, 动物日粮添加油脂日益受到推崇<sup>[1-4]</sup>, 其中饲用动物油脂因其种类和来源不同, 质量差异较大<sup>[5]</sup>, 易导致一些利益驱使的违法添加。同时为了防止“疯牛病”随着养殖环节传播, 欧盟相继颁布了系列法令法规<sup>[6-9]</sup>, 禁止在陆生动物饲料中添加陆生动物源性成分, 包括油脂。2013年我国颁布《饲料和饲料添加剂管理条例》, 亦明确禁止在反刍动物饲料中添加乳和乳制品以外的动物源性成分。另外受生产条件限制, 动物油脂生产过程中互相交叉污染<sup>[10]</sup>, 也产生较大的饲料安全隐患。因此, 开展不同种属饲用油脂的鉴别分析具有重要的现实意义。与传统的油脂检测色谱法相比, 光谱

法具有前处理简单、所需样品量少、简便快速等优点, 已广泛应用于食用油掺伪鉴别中<sup>[11-14]</sup>, 极具发展潜力, 但饲用油脂掺伪鉴别相关研究尚未见报道。本研究基于前期所开展的鱼油中陆生动物油脂成分鉴别分析<sup>[15]</sup>, 首次系统应用傅里叶变换红外光谱结合化学计量学方法探讨陆生动物油脂中掺入反刍成分的鉴别分析。

## 1 实验部分

### 1.1 动物油脂样品的收集与制备

供试动物油脂样品共22个, 包括猪脂6个, 鸡油5个, 牛脂6个和羊脂5个, 收集自全国不同的饲用油脂企业。样品均经聚合酶链式反应技术检测, 无交叉污染。

收稿日期: 2018-08-13, 修订日期: 2018-12-28

基金项目: 国家奶牛产业技术体系项目(CARS36)和国家重点研发计划项目(2017YFE0115400)资助

作者简介: 刘 贤, 1979年生, 中国农业大学工学院副教授 e-mail: lx@cau.edu.cn

\* 通讯联系人 e-mail: hanlj@cau.edu.cn

采用均匀混合法进行陆生动物油脂中掺加反刍成分的样品制备, 试验设计混合比例为: 1%, 5%, 10%, 20%, 30% 和 40% (W/W)。每个混合比例随机组合非反刍和反刍动物油脂制备 20 个样品, 共制备样品 120 个。

### 1.2 脂肪酸含量分析

样品脂肪酸含量通过气相色谱仪 (GC-2014C, 日本岛津公司) 进行测定, 色谱分析条件为: 进样量 1  $\mu$ L, 进样口温度 225  $^{\circ}$ C, 氢火焰离子检测器, 检测温度 320  $^{\circ}$ C。脂肪酸甲酯混合标准样品 (47885-U) 购买于 Sigma-Aldrich 公司。采用外标法计算每种脂肪酸在 37 种脂肪酸总含量中的相对含量百分比。

### 1.3 红外光谱数据采集

红外光谱采集仪器为 Perkin Elmer FT-IR Spectrum 400 (美国 Perkin Elmer 公司), 采用衰减全反射附件。光谱采集范围为 4 000~550  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数 32 次, 每个样品重复扫描 3 次取其平均光谱。

### 1.4 数据统计与分析方法

采用偏最小二乘判别分析法 (PLS-DA) 进行定性判别<sup>[16-17]</sup>。利用模型的正确判别率进行评价。所用软件为 Matlab (R2010b, 美国 Mathworks 公司)。采用单因素方差分析法

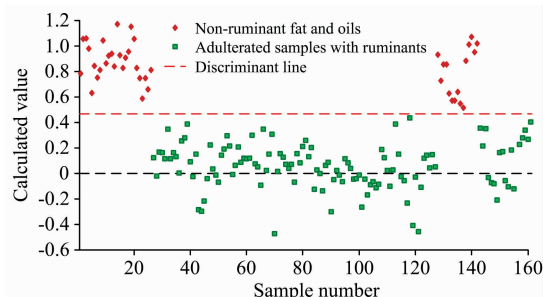


图 1 PLS-DA 判别分析模型结果

Fig. 1 Results of PLS-DA discrimination

进行差异性分析, 所用软件为 SPSS (17.0, 美国 SPSS 公司)。

## 2 结果与讨论

采用 PLS-DA 法建立陆生动物油脂中掺加反刍成分的定性判别模型, 并采用独立验证集进行分析, 模型结果见图 1。结果显示, 所构建判别模型对独立验证集的正确判别率为 100%, 无假阳性和假阴性样品。

上述结果可知, 陆生动物油脂中掺加反刍成分判别分析检量限可能低于 1%。因此, 以相同方法进一步配制动物油脂中掺加反刍成分比例为 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6% 和 0.8% 的样品, 探讨其定性判别检量限, 结果见表 1。

表 1 红外光谱判别分析检量限研究结果

Table 1 Results of FTIR detection limit

样品集 / %	校正			验证		
	假阳性数	假阴性	正确判别率 / %	假阳性数	假阴性	正确判别率 / %
0.1~40	3	19	88.78	1	5	90.77
0.2~40	3	13	91.16	0	9	85
0.4~40	3	13	90.36	1	6	87.27
0.6~40	2	8	93.38	0	5	90.00
0.8~40	0	2	98.53	0	2	95.56

基于 0.1%~40%, 0.2%~40%, 0.4%~40%, 0.6%~40% 和 0.8%~40% 样品集 PLS-DA 判别模型的正确判别率均低于 100%, 且随着最低掺加比例的降低, 假阳性与假阴性样品数明显增多, 其正确判别率逐步降低。因此, 陆生动物油脂中掺加反刍成分判别分析检量限约为 1%。

基于上述结果, 进一步探讨其判别分析机理。首先通过脂肪酸组成与差异性分析 (表 2) 发现, 非反刍动物油脂 (猪脂与鸡油) 与反刍动物油脂 (牛脂和羊脂) 样品的 9 种脂肪酸含

表 2 不同种属动物油脂脂肪酸组成与差异性分析

Table 2 Fatty acid composition and statistical analysis of animal fat and oil materials

序号	脂肪酸	脂肪酸含量 / %			
		猪脂	鸡油	牛脂	羊脂
1	肉豆蔻酸 C14 : 0	1.20 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.55 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	3.16 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	3.03 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>
2	十五烷酸 C15 : 0	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.04 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
3	十七烷酸 C17 : 0	0.23 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.94 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	2.62 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>
4	十八烷酸 C18 : 0	16.04 $\pm$ 2.12 <sup>b</sup>	5.87 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>	29.75 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>	31.65 $\pm$ 3.84 <sup>a</sup>
5	反-9-十八碳烯酸 C18 : 1n9t	0.10 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.94 $\pm$ 1.03 <sup>b</sup>	3.51 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>
6	顺-9-十八碳烯酸 C18 : 1n9c	39.06 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>	41.32 $\pm$ 2.82 <sup>a</sup>	29.61 $\pm$ 3.25 <sup>b</sup>	29.36 $\pm$ 4.51 <sup>b</sup>
7	顺-9,12-十八碳二烯酸 C18 : 2n6c	13.09 $\pm$ 1.24 <sup>b</sup>	22.56 $\pm$ 6.50 <sup>b</sup>	1.53 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	1.73 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>
8	顺-11-二十碳烯酸 C20 : 1	0.74 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.09 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.06 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
9	顺-5,8,11,14-二十碳四烯酸 C20 : 4n6	0.19 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.13 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.06 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
—	饱和脂肪酸 SFA	43.95 $\pm$ 1.39 <sup>b</sup>	30.22 $\pm$ 1.47 <sup>c</sup>	63.87 $\pm$ 1.71 <sup>a</sup>	63.57 $\pm$ 2.36 <sup>a</sup>
—	单不饱和脂肪酸 MUFA	41.53 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>	45.95 $\pm$ 1.88 <sup>c</sup>	34.26 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>	34.08 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>
—	多不饱和脂肪酸 PUFA	14.53 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>	23.83 $\pm$ 3.01 <sup>c</sup>	1.86 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	2.35 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>
—	不饱和脂肪酸 UFA	56.05 $\pm$ 1.39 <sup>b</sup>	69.78 $\pm$ 1.47 <sup>c</sup>	36.13 $\pm$ 1.71 <sup>a</sup>	36.43 $\pm$ 2.36 <sup>a</sup>

注: ND: 未检测到; 相同行的不同字母上标表示有显著性差异 ( $p < 0.05$ )

Note: ND: not detected; The values in the same row with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ )

量存在显著差异。其中非反刍动物油脂的饱和脂肪酸和反式脂肪酸含量显著低于反刍动物油脂；而其不饱和脂肪酸和顺式脂肪酸含量则显著高于反刍动物油脂。

对应的红外光谱特征波段对比分析表明(图 2), 非反刍动物油脂光谱  $3\ 006\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰(代表  $\text{=C-H(cis-)}$  的拉伸振动)和  $914\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰(代表  $\text{-HC=CH-(cis-)}$  的弯曲振动)明显高于反刍动物油脂, 主要表征了顺式脂肪酸和不饱和脂肪酸的显著差异; 而非反刍动物油脂光谱  $965\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰(代表  $\text{-HC=CH-(trans-)}$  的弯曲振动)明显低于反刍动物油脂, 这与脂肪酸的差异性分析相一致, 主要表征了反式脂肪酸和饱和脂肪酸的显著差异<sup>[18]</sup>。

进一步计算获得动物油脂中掺加反刍成分  $0\sim 1\%$  混合试验样品的特征化学键包括  $\text{C=C}$  键及  $\text{C-H(-CH}_2\text{-)}$  键数及反式与顺式的  $\text{C=C}$  键数, 并作差异性分析, 结果见表 3。

分析可知, 当掺加反刍动物油脂比例为  $0.8\%$  时, 混合样品中反式  $\text{C=C}$  键数开始出现差异, 掺加比例为  $1\%$  的混合样品中反式  $\text{C=C}$  键数显著高于其他低掺加比例样品; 而顺式  $\text{C=C}$  键和  $\text{C-H(-CH}_2\text{-)}$  键数均无显著性差异。由此, 基于红外光谱的动物油脂中反刍成分鉴别分析主要是基于反式  $\text{C=C}$  键结构的信息表征。

### 3 结 论

傅里叶变换红外光谱可作为一种兼顾检测效率与检测精度的技术应用于陆生动物油脂中反刍成分的鉴别分析。对于掺加比例  $1\%\sim 40\%$  样品集, 红外光谱辅以 PLS-DA 方法可较好地陆生动物油脂中反刍动物油脂掺加成分的鉴别分析, 正确判别率为  $100\%$ , 判别分析检量限约为  $1\%$ , 其鉴别分析机理主要是基于反式  $\text{C=C}$  键结构的信息表征。

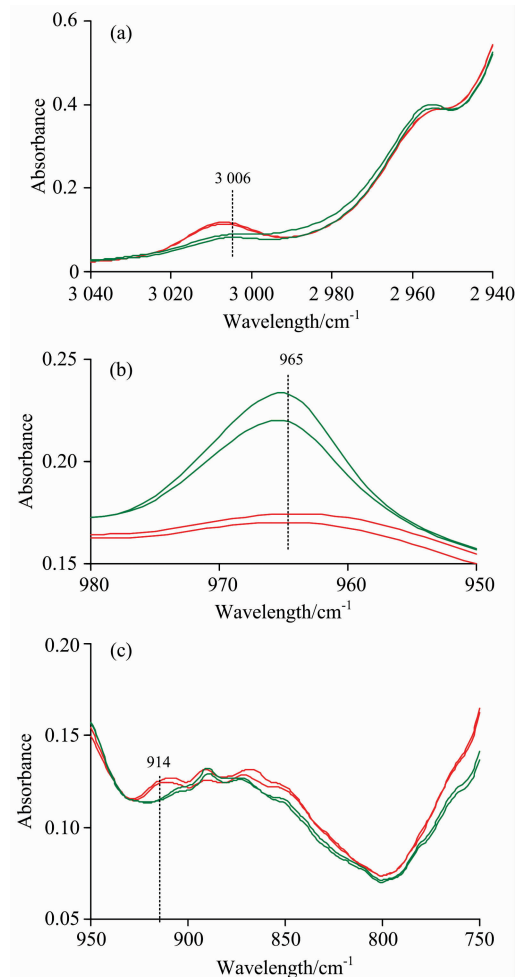


图 2 动物油脂红外光谱对比分析

红色: 非反刍动物油脂; 绿色: 反刍动物油脂

Fig. 2 Comparative analysis of infrared spectra of animal fat and oils

Red: Non-ruminant; Green: Ruminant

表 3 动物油脂中掺加反刍成分特征化学键差异性分析

Table 3 Comparative analysis of chemical bonds for animal fat and oils adulterated with ruminants

掺加比例/%	C=C 键数			C-H(-CH <sub>2</sub> -)键数
	总和	反式	顺式	
0	83.12±8.30 <sup>a</sup>	0.11±0.05 <sup>a</sup>	83.01±8.30 <sup>a</sup>	2 752.77±27.28 <sup>a</sup>
0.1	83.35±6.42 <sup>a</sup>	0.10±0.04 <sup>ab</sup>	83.25±6.41 <sup>a</sup>	2 751.48±18.69 <sup>a</sup>
0.2	83.04±8.96 <sup>a</sup>	0.11±0.05 <sup>ab</sup>	82.93±8.94 <sup>a</sup>	2 752.66±31.81 <sup>a</sup>
0.4	83.55±8.84 <sup>a</sup>	0.12±0.06 <sup>abc</sup>	83.43±8.84 <sup>a</sup>	2 750.68±30.12 <sup>a</sup>
0.6	82.60±9.34 <sup>a</sup>	0.13±0.05 <sup>abc</sup>	82.47±9.34 <sup>a</sup>	2 756.51±30.43 <sup>a</sup>
0.8	82.61±5.63 <sup>a</sup>	0.13±0.04 <sup>bc</sup>	82.48±5.64 <sup>a</sup>	2 755.20±14.88 <sup>a</sup>
1	80.99±5.67 <sup>a</sup>	0.14±0.05 <sup>c</sup>	80.84±5.69 <sup>a</sup>	2 758.52±21.01 <sup>a</sup>

注: 相同列的不同字母上标表示有显著性差异( $p<0.05$ )

Note: The values in the same column with different superscripts are significantly different ( $p<0.05$ )

### References

- [1] Yadav A K, Srivastava P P, Shrivastava P, et al. Journal of Aquaculture & Research Development, 2012, 3(5): 138.  
 [2] Liu P, Kerr B J, Chen C, et al. Journal of Animal Science, 2014, 92(7): 2980.

- [ 3 ] Liu P, Kerr B J, Weber T E, et al. *Journal of Animal Science*, 2014, 92(7): 2971.
- [ 4 ] Konieczka P, Czauderna M, Rozbicka-Wieczorek A, et al. *Journal of Animal & Feed Sciences*, 2015, 24(3): 244.
- [ 5 ] HUANG Li-lan, HUANG Guang-ming(黄立兰, 黄广明). *Feed Industry(饲料工业)*, 2017, 38(11): 41.
- [ 6 ] European Commission(EC). *Official Journal of the European Union*, 2001, L147: 1.
- [ 7 ] European Commission(EC). *Official Journal of the European Union*, 2002, L273: 1.
- [ 8 ] European Commission(EC). *Official Journal of the European Union*, 2003, L173: 6.
- [ 9 ] European Commission (EC). *Official Journal of the European Union*, 2013, L20: 33.
- [10] LI Jun-ling, QIANG Li, GONG Ling-ling, et al(李俊玲, 强 莉, 宫玲玲, 等). *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine(山东畜牧兽医)*, 2014, 7: 16.
- [11] DING Qing-zhen, LIU Ling-ling, WU Yan-wen, et al(丁轻针, 刘玲玲, 武彦文, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2014, 34(10): 2690.
- [12] Hirri A, Bassbasi M, Platikanov S, et al. *Food Analytical Methods*, 2016, 9(4): 974.
- [13] Rohmana A, Che Man Y B. *Food Additives and Contaminants*, 2011, 28(11): 1469.
- [14] Rohmana A, Che Man Y B, Sunarminingsih R. *American Journal of Food Technology*, 2012, 7(3): 151.
- [15] Lingzhi X, Fei G, Zengling Y, et al. *International Journal of Agricultural & Biological Engineering*, 2016, 9(3): 179.
- [16] Bassbasi M, De Luca M, Ioele G, et al. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2014, 33(2): 210.
- [17] Hell J, Prückler M, Danner L, et al. *Food Control*, 2016, 60: 365.
- [18] Wójcicki K, Khmelinskii I, Sikorski M, et al. *Food Chemistry*, 2015, 187: 416.

## Discriminant Analysis of Ruminant Constituents in Terrestrial Fat and Oils by Infrared Spectroscopy

LIU Xian, XU Ling-zhi, GAO Bing, HAN Lu-jia\*

College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

**Abstract** In order to effectively cope with the feed safety risk caused by illegal additions, improve the detection methods of feeding fat and oils and meet the supervision requirements of feed quality and safety, reliable animal fat and oils were collected, and experimental sample set was obtained by adulterating different proportion (1%, 5%, 10%, 20%, 30% and 40% W/W) of ruminant fats in terrestrial animal fat and oils. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) combined with stoichiometric analysis was used for discriminant analysis of ruminant constituent in terrestrial fat and oils. Results showed, for the sample set of 1% ~ 40% adulteration proportion, the correct discriminant rate of partial least squares discriminant analysis model was 100%, and no false positive and false negative was found. For the sample set of 0.1% ~ 40%, 0.2% ~ 40%, 0.4% ~ 40%, 0.6% ~ 40% and 0.8% ~ 40% adulteration proportion, the correct discriminant rates were all lower than 100%. With the decrease of the lowest adulteration proportion, the number of false positive and false negative obviously increase, the correct discriminant rate decreases gradually, and the detection limit of FTIR discriminant analysis is proved to be about 1%. The discriminant analysis mechanism was further discussed by comparative analysis of fatty acids, infrared spectral band and chemical bond. It was proved that the absorption peaks at  $3\ 006\ \text{cm}^{-1}$  (representing the tensile vibration of C—H (cis-)) and  $914\ \text{cm}^{-1}$  (representing the flexural vibration of —HC=CH—(cis-)) of non-ruminant samples were higher than those of ruminant samples. These mainly reflected the significant difference of cis and unsaturated fatty acids. The absorption peaks at  $965\ \text{cm}^{-1}$  (representing the flexural vibration of —HC=CH—(trans-)) of non-ruminant samples were lower than those of ruminant samples, reflecting the significant difference of trans and saturated fatty acids. The content of trans-C=C bond for 1% adulteration proportion was significantly higher than the other samples of lower proportions. There was no significant difference for the content of cis-C=C bond and C—H (—CH<sub>2</sub>—) bond between the samples with different adulteration proportions. Therefore, the discrimination of ruminant constituent in terrestrial animal fat and oils by FTIR was mainly based on the characterization of trans-C=C bond structure. In summary, infrared spectroscopy can be used as a technique to discriminant ruminant constituent in terrestrial fat and oils with both high efficiency and accuracy.

**Keywords** Feeding animal fat and oils; Ruminant fat and oils; Infrared spectroscopy; Discriminant analysis

\* Corresponding author

(Received Aug. 13, 2018; accepted Dec. 28, 2018)