

基于连续分类策略的饲用鱼油掺假陆生动物油脂红外光谱鉴别分析

高冰, 徐帅, 韩鲁佳, 刘贤*

中国农业大学工学院, 北京 100083

摘要 与其他动物油脂相比, 饲用鱼油的营养价值高、产量低、提炼工艺复杂, 其真实性的鉴定有利于市场的正常运行和消费者权益的保障。本研究提出一种基于红外光谱的连续分类策略, 并将其应用于饲用鱼油中违法掺假陆生动物油脂的鉴别分析。实验收集动物油脂样品共50个(鱼油12个、猪脂10个、鸡油9个、牛脂10个、羊脂9个), 采用均匀混合法制备饲用鱼油中掺加陆生动物油脂的样品160个。采用主成分分析(PCA)方法进行饲用鱼油中掺假陆生动物油脂红外光谱鉴别分析的可行性分析。结果表明: 纯鱼油和掺假陆生动物油脂鱼油之间得到了较好的区分; 其他掺假陆生动物油脂鱼油之间有一定的鉴别分析潜力。基于偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和单类别偏最小二乘法(OC-PLS), 第一步, 建立检测鱼油真实性的单类别筛查模型; 第二步, 建立多类别陆生动物油脂掺假的鉴别模型, 探讨了两种陆生动物油脂类别划分方式对鉴别模型的影响。研究表明: 单类别筛查模型成功区分了纯鱼油和掺假鱼油, 识别率和拒绝率均为100%, 误判率为0%; 按照纯鱼油、猪脂掺假鱼油、鸡油掺假鱼油、牛脂掺假鱼油和羊脂掺假鱼油进行分类, 多类别鉴别模型的识别率和拒绝率均大于80%, 误判率均在15%以下; 按照纯鱼油、非反刍动物油脂掺假和反刍动物油脂掺假进行分类, 多类别鉴别模型的识别率和拒绝率均提升至90%以上, 误判率减小至7%以下。在提出的连续分类策略中, 中红外光谱技术结合化学计量学可以用于高效筛查鱼油中是否掺假陆生动物油脂, 并且可以进一步确证掺假陆生动物油脂种类。该方法作为一种快速筛查与确证分析工具可满足大样本量鱼油中陆生动物油脂掺假的检测需求。

关键词 连续分类策略; 饲用鱼油; 红外光谱; 定性判别

中图分类号: S814.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)08-2427-05

引言

农业部第1773号公告《饲料原料目录》将动物油脂列入了饲料原料目录, 作为饲料中重要的能量物质被广泛添加在各类畜禽饲料中^[1]。目前, 市场上常见的饲用动物油脂为鱼油、猪脂、牛脂和家禽油脂。其中鱼油的营养价值高、产量低、提炼工艺复杂^[2], 因此鱼油的价格高于其他饲用动物油脂。受利益驱使, 市面上鱼油的掺伪现象严重, 其中陆生动物油脂是鱼油中常见的掺假物质^[3]。饲用鱼油掺假陆生动物油脂的行为不仅扰乱市场, 严重损害消费者的权益, 反刍动物油脂掺假更可能导致“疯牛病”随着养殖环节传播^[4]。

目前, 国内外常用的油脂掺伪检测技术为基于脂肪酸组分检测的气相色谱法^[5]。该方法虽能对样品化学组分进行直接检测, 但操作费时费力, 对操作人员有严格的技术要求,

不适合大样本量的检测^[6]。与之相比, 光谱法具有无需样品预处理、兼顾检测精度与检测效率等优点, 符合现阶段产业的需求。有研究表明, 光谱法可以运用于鱼油的掺假鉴别^[7]。Bellorini等利用FTIR光谱技术检测鱼油中的牛脂掺假^[8]; Rohman等利用光谱法鉴别鱼肝油中的猪脂、牛脂和羊脂的掺假^[9]; Xu等开展了鱼油中单类别陆生动物油脂掺假红外光谱判别分析的可行性研究, 并探讨了鱼油中陆生动物油脂的检出限^[10]。以上研究均对鱼油与掺假陆生动物油脂鱼油之间进行单类别判别分析, 并未对多类别判别的可行性与效果进行探讨。

多类别判别分析方法广泛应用于油脂^[11]、饲料^[12]、葡萄酒^[13]等食品的真实性和掺假研究。与多类别判别分析方法可以确证特定的掺假物不同, 单类别判别分析只能筛查样本是否为掺假样本^[14]。因此, 单类别判别分析模型常应用于大样本量的快速筛选^[15]。

收稿日期: 2019-11-11, 修订日期: 2020-04-28

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFE0115400)和现代农业(奶牛)产业技术体系建设专项资金项目(CARS-36)资助

作者简介: 高冰, 1995年生, 中国农业大学工学院博士研究生 e-mail: gaobing@cau.edu.cn

* 通讯作者 e-mail: lx@cau.edu.cn

本研究提出一种连续分类策略(单类别判别分析筛查+多类别判别分析确证)探究饲用鱼油中掺假陆生动物油脂的红外光谱鉴别分析潜力。

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 50 个, 包括鱼油 12 个、猪脂 10 个、鸡油 9 个、牛脂 10 个和羊脂 9 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。

采用均匀混合法进行饲用鱼油中掺加陆生动物油脂的样品制备, 获得掺假猪脂的鱼油样品 40 个, 猪脂含量(W/W)范围: 2.9%~49.4%; 掺假鸡油的鱼油样品 40 个, 鸡油含量(W/W)范围: 3.1%~51.3%; 掺假牛脂的鱼油样品 40 个, 牛脂含量(W/W)范围: 2.8%~50.6%; 掺假羊脂的鱼油样品 40 个, 羊脂含量(W/W)范围: 2.9%~50.3%。样品总计 160 个。

1.2 红外光谱数据分析

红外光谱仪 Perkin Elmer FTIR 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 cm^{-1} , 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描次数 32, 每个样品重复扫描 3 次取平均光谱。使用 SNV, Smoothing, Autoscale 等方法预处理光谱数据。

1.3 分析方法

采用主成分分析(PCA)进行光谱数据分类探索性分析。采用偏最小二乘判别分析(PLS-DA)进行定性判别分析。所用软件为 Matlab(R2015a, 美国 Mathworks 公司)。采用残差统计剔除异常值, 置信区间设为 95%。为防止过拟合, 使用“leave one out”法进行交叉验证^[16]。通过 Hotelling T^2 和 Q 残差值进行异常样本的剔除。以识别率、拒绝率和误判率作为判别模型的评价指标, 其中识别率和拒绝率越接近 1, 误判率越接近 0, 说明判别分析效果越好^[17]。

2 结果与讨论

2.1 主成分分析

采用 PCA 对光谱数据进行探索性分析, 如图 1 所示, 前两个主成分分别占总变异系数的 62.54% 和 12.41%。可以看出, 纯鱼油和掺假陆生动物油脂鱼油之间得到了较好的区分, 不存在相互混杂的样品; 掺假反刍动物油脂的鱼油样品主要分布在第二主成分的正方向, 牛脂和羊脂掺假样品相互混杂, 区分效果差; 掺假非反刍动物油脂的鱼油样品主要分布在第二主成分的负方向, 同样可以看到猪脂和鸡油掺假样品相互混杂, 区分效果差; 反刍动物油脂掺假样品和非反刍动物油脂掺假样品之间虽有少量的重叠, 总体上区分较为明显。

2.2 单类别掺假鱼油判别分析

建立鱼油中是否掺假陆生动物油脂的单类别 PLS-DA 判别模型, 图 2 为掺假陆生动物油脂鱼油单类别预测结果。结

果表明, 纯样品和掺假样品的识别率和拒绝率均为 100.00%。OC-PLS 分析结果同样表明纯样品和掺假样品的识别率和拒绝率均为 100.00%。说明中红外光谱技术可以准确判别纯鱼油和掺假陆生动物油脂鱼油, 可作为快速工具应用于鱼油样品是否掺假陆生动物油脂的筛查。

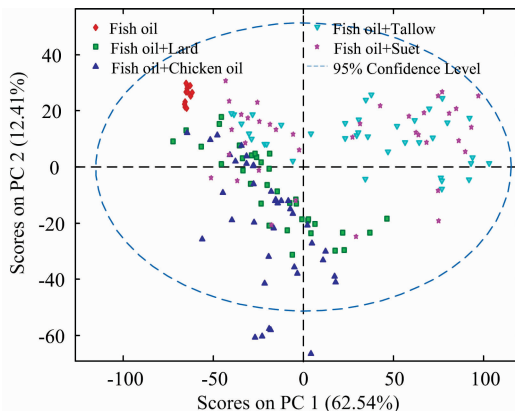


图 1 基于纯鱼油和掺假陆生动物油脂鱼油红外光谱的主成分得分图

Fig. 1 Score plot of PCA based on the FTIR of pure fish oil and adulterated fish oil

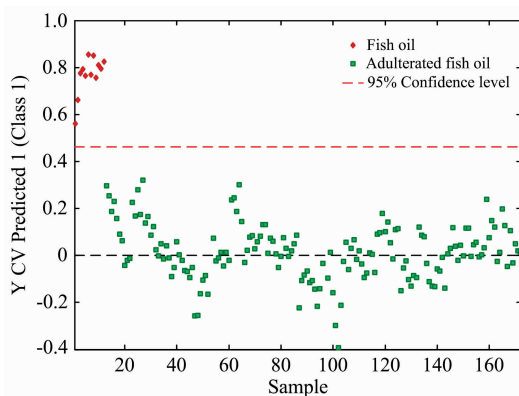


图 2 单类别 PLS-DA 判别模型结果

Fig. 2 Results of PLS-DA one-class model

2.3 多类别掺假鱼油判别分析

为了进一步确证掺假陆生动物油脂的种属源, 建立鱼油中是否掺假陆生动物油脂的多类别 PLS-DA 判别模型: 按照猪脂掺假、鸡油掺假、牛脂掺假和羊脂掺假划分类别建立判别 1 模型; 按照非反刍动物油脂掺假和反刍动物油脂掺假划分类别建立判别 2 模型。模型结果如表 1、表 2 所示。

判别 1 和判别 2 结果均表明, 纯鱼油样品的不确定性分类样品比率为 0.00%, 识别率和拒绝率均为 100.00%, 这一结果与单类别判别模型结果相同。图 3(a)和图 3(f)的判别线将纯鱼油样品和掺假陆生动物油脂样品成功区分, 未出现混杂样品。

对判别 1 的结果进行分析, 牛脂、猪脂、羊脂和鸡油掺假样品的不确定性分类比率依次降低, 分别为 43.59%, 30.00%, 20.08% 和 15.38%(表 1); 整体的识别率和拒绝率

在 82.10%和 92.30%(表 1)之间;其中鸡油掺假样品的拒绝率和识别率最高,误判率为 7.70%(表 1),不确定分类样品比率最低,判别效果最优。图 3(b)中掺假猪脂样品有多个样品并未正确分类,且少量鸡油掺假样品和牛脂掺假样品被判定为猪脂掺假样品;图 3(c)中部分猪脂掺假样品被误判为鸡

油掺假样品;图 3(d)和图 3(e)为掺假牛脂和掺假羊脂样品的判别 1 预测结果,牛脂掺假和羊脂掺假样品相互误判现象明显。上述讨论表明,猪脂掺假样品和鸡油掺假样品互为主要误判样品来源,牛脂掺假样品和羊脂掺假样品同样相互混杂现象严重,此分析与 PCA 结果一致。

表 1 鱼油掺假陆生动物油脂种属 PLS-DA 多类别判别 1 预测结果

Table 1 Results of first PLS-DA multi-class predictions

掺假物	样品数	纯样	猪脂	鸡油	牛脂	羊脂	NA	MA	IR/%	识别率/%	拒绝率/%	误判率/%
纯样	12	12	0	0	0	0	0	0	0.00	100.00	100.00	0.00
猪脂	40	0	34	0	6	0	6	6	30.00	85.00	89.90	12.50
鸡油	39	0	5	38	0	0	1	5	15.38	92.30	92.30	7.70
牛脂	39	0	1	1	30	6	9	8	43.59	82.10	89.20	14.40
羊脂	39	0	0	0	3	33	6	3	20.08	82.10	91.50	13.20

注: NA: 没有进行分类的品数; MA 为: 重分类的样品数; IR 为不确定性分类样品的比率

Note: NA: not assigned; MA: multiple assigned; IR: inconclusive ratio

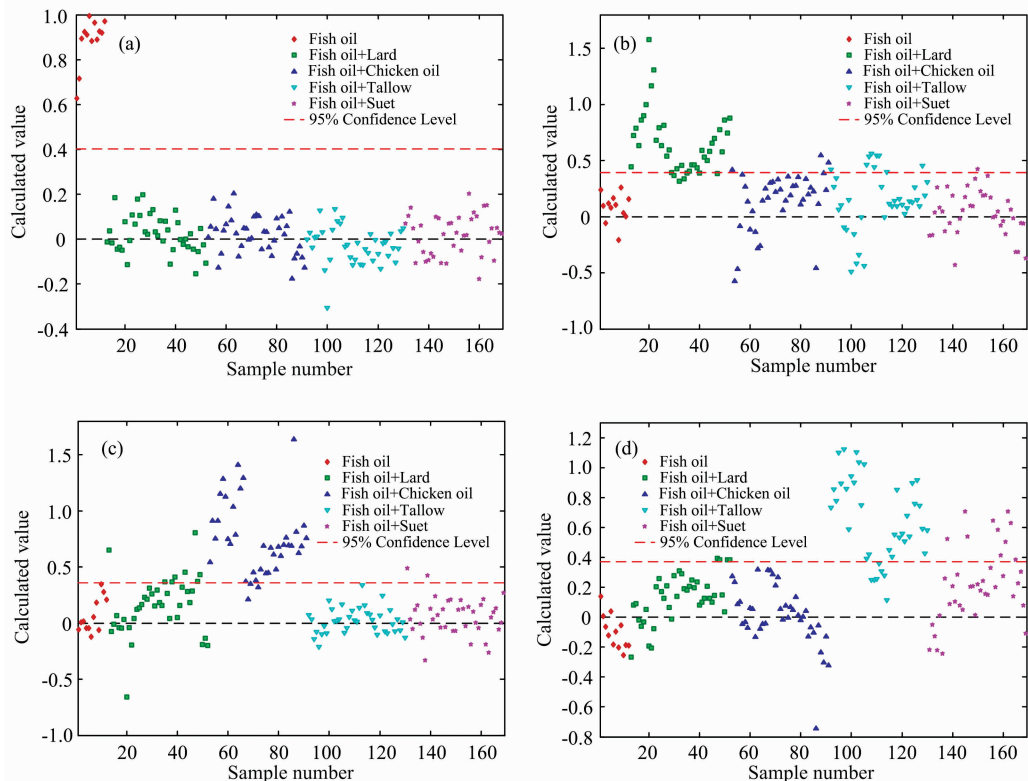
表 2 鱼油掺假陆生动物油脂种属 PLS-DA 多类别判别 2 预测结果

Table 2 Results of second PLS-DA multi-class predictions

掺假物	样品数	纯样品	非反刍	反刍	NA	MA	IR/%	识别率/%	拒绝率/%	误判率/%
纯样品	12	12	0	0	0	0	0.00	100.00	100.00	0.00
非反刍	79	0	77	3	2	3	6.33	94.90	92.20	6.42
反刍	78	0	2	75	3	2	6.41	97.40	96.70	2.90

注: NA: 没有进行分类的品数; MA: 多重分类的样品数; IR: 不确定性分类样品的比率

Note: NA: not assigned; MA: multiple assigned; IR: inconclusive ratio



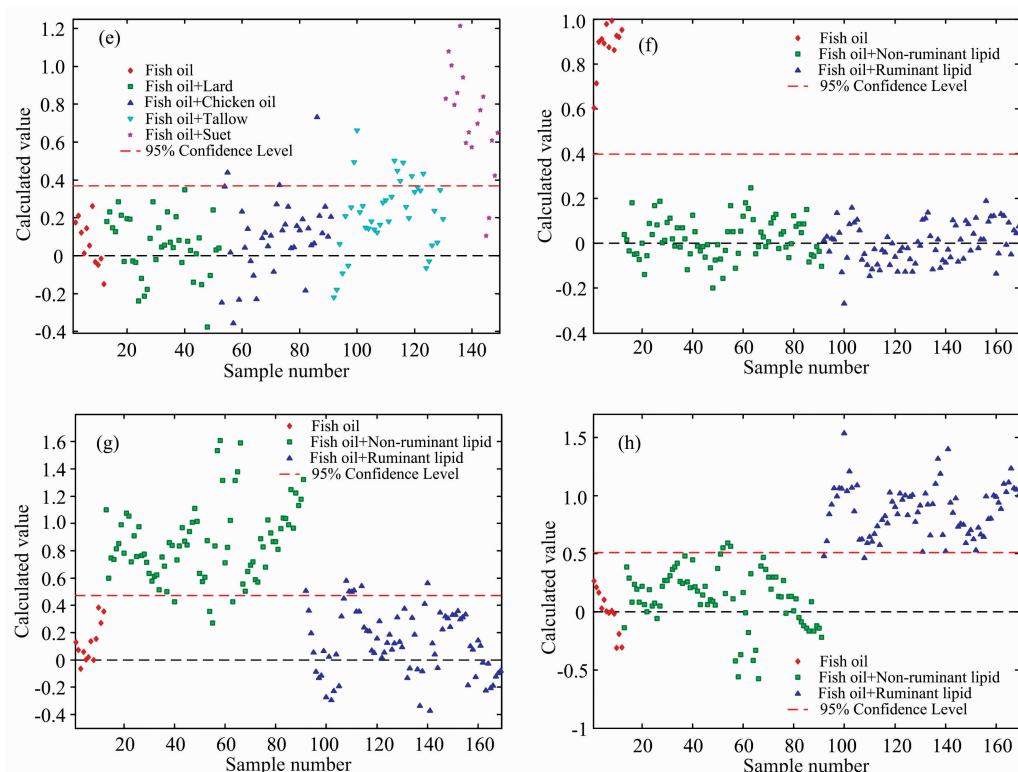


图 3 多类别 PLS-DA 判别模型结果

(a): 纯鱼油判别 1 结果; (b): 猪脂掺假判别 1 结果; (c): 鸡油掺假判别 1 结果; (d): 牛脂掺假判别 1 结果;
(e): 羊脂掺假判别 1 结果; (f): 纯鱼油判别 2 结果; (g): 非反刍动物油脂掺假判别 2 结果; (h): 反刍动物油脂掺假判别 2 结果

Fig. 3 Results of PLS-DA multi-class model

(a): Discrimination 1 for pure fish oil; (b): Discrimination 1 for lard; (c): Discrimination 1 for chicken oil;
(d): Discrimination 1 for tallow; (e): Discrimination 1 for suet; (f): Discrimination 2 for pure fish oil;
(g): Discrimination 2 for non-ruminant lipid; (h): Discrimination 2 for ruminant lipid

基于上述分析,重新划分判别类别,判别 2 的结果表明,掺假陆生动物油脂样品的不确定性分类比率均下降到 10% 以内,其中非反刍动物油脂掺假样品和反刍动物油脂掺假样品的不确定性分类比率分别为 6.33% 和 6.41% (表 2); 整体拒绝率和识别率提升至 90% 以上,反刍动物油脂掺假样品的判别效果较优,识别率和拒绝率分别为 97.40% 和 96.70% (表 2),误判率为 2.90% (表 2)。图 3(g) 和图 3(h) 所示的掺假非反刍和反刍动物油脂鱼油的判别 2 预测结果表明,掺假反刍和非反刍动物油脂掺假样品之间的混杂样品较少,这一结果同样与 PCA 结果基本一致。

结果表明 PLS-DA 结合中红外光谱技术可以判别纯鱼油和多类别陆生动物油脂掺假鱼油,可应用于鱼油样品掺假陆

生动物油脂种属源的确证分析。

3 结论

一种快速筛查结合确证分析的连续分类策略应用于鱼油掺假陆生动物油脂的检测。中红外光谱技术结合化学计量学可以筛分纯鱼油和掺假陆生动物油脂鱼油,识别率和拒绝率均为 100.00%,所建立的多类别判别模型可以进一步确证掺假陆生动物种属源,拒绝率和识别率均达到 82.00% 以上,其中鸡油掺假样品和反刍动物油脂掺假样品判别效果最优。该方法作为一种快速筛查与确证分析工具可满足大样本量鱼油中陆生动物油脂掺假的检测需求。

References

- [1] Caballero M J, Obach A, Rosenlund G, et al. *Aquaculture*, 2002, 214(1): 253.
- [2] Tocher D R. *Aquaculture*, 2015, 449: 94.
- [3] Man A R Y B. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2012, (47): 1.
- [4] LIU Xian, XU Ling-zhi, GAO Bing, et al (刘 贤, 徐凌芝, 高 冰, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2019, 39(10): 3189.
- [5] Bosque-Sendra J M, Cuadros-Rodríguez L, Ruiz-Samblás C, et al. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 724: 1.

- [6] Qiankun P, Lujia H, Xian L. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2014, 18(3): 321.
- [7] Valdés A, Beltrán A, Mellinas C, et al. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 77: 120.
- [8] Bellorini S, Strathmann S, Baeten V, et al. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382(4): 1073.
- [9] Rohman A, Che Man Y B. *Food Additives & Contaminants; Part A*, 2011, 28(11): 1469.
- [10] Xu Lingzhi, Fei G, Zengling Y. *Int. J. Agric. & Biol. Eng.*, 2016, 9(3): 179.
- [11] Maggio R M, Cerretani L, Chiavaro E, et al. *Food Control*, 2010, 21(6): 890.
- [12] Gao F, Xu L, Zhang Y, et al. *Food Chemistry*, 2018, 240: 989.
- [13] Miaw C S W, Sena M M, Souza S V C D, et al. *Food Chemistry*, 2018, 266: 254.
- [14] Riedl J, Esslinger S, Fahl-Hassek C. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 885: 17.
- [15] McGrath T F, Haughey S A, Patterson J, et al. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 76: 38.
- [16] Gondim C D S, Junqueira R G, Souza S V C D, et al. *Food Chemistry*, 2017, 230: 68.
- [17] Gao F, Zhou S, Han L, et al. *Food Chemistry*, 2017, 237: 342.

A Sequential Classification Strategy Applied to the Detection of Terrestrial Animal Lipid in Fish Oil by MID-Infrared Spectroscopy

GAO Bing, XU Shuai, HAN Lu-jia, LIU Xian*

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

Abstract Compared with other animal fat, fish oil has the traits of the high demand of extraction technology, low oil yield and high nutritive value. Authenticity appraisal of fish oil is conducive to the normal operation of the feed market and the protection of consumer rights and interests. In the present study, a Sequential Classification Strategy (SCS) was proposed and applied to identify illegally adulterated terrestrial animal lipid in fish oil. A total of 50 animal fat samples (12 fish oil, 10 lard, 9 chicken oil, 10 tallow and 9 suet) were collected in this experiment, and 160 adulterated fish oil samples with terrestrial animal fat were prepared by homogeneous mixing method. Exploratory research based on the principal component analysis (PCA) method was used to identify the feasibility of identification analysis. The results showed that pure fish oil and adulterated fish oil were well differentiated. The species identification of terrestrial animal fat adulterants is potential. Based on partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) and one class-partial least squares (OC-PLS), the first step was to establish a one class screening model to detect the authenticity of fish oil. In the second step, the identification model of multi-class adulterations (two types of classification) of terrestrial animal lipid was established. Results show that the one-class screening model distinguished pure fish oil from adulterated fish oil, and the recognition rate and rejection rate of the one-class screening model were both 100%, the first multi-class model for the classification of adulterants (lard, chicken oil, suet, tallow) in pure fish oil performed well with the recognition rate and rejection rate higher than 80% and the mis-discrimination ratio lower than 15%, the second multi-class model for the classification of adulterants (ruminant animal lipid, non-ruminant animal lipid) performed better than the first multi-class model with the recognition rate and rejection rate higher than 90% and the mis-discrimination ratio lower than 7%. With the proposed SCS, infrared spectroscopy combined with chemometrics can be used to identify pure fish oil from adulterated fish oil. Furthermore, the species source of adulterants can be recognized effectively. Finally, we can suggest this type of application as a potential tool to assist the feed industry and regulatory organisms in food quality control, allowing detection in feeding fish oil through direct, fast and reliable screening analyses.

Keywords Sequential classification strategy; Feeding fish oil; Infrared spectroscopy; Discriminant analysis

(Received Nov. 11, 2019; accepted Apr. 28, 2020)

* Corresponding author