

精料补充料中肉骨粉的显微近红外成像识别*

姜训鹏 杨增玲 韩鲁佳 刘 贤

(中国农业大学工学院, 北京 100083)

【摘要】 探讨了利用显微近红外成像技术识别精料补充料中肉骨粉的可行性。分别采集奶牛精料补充料和肉骨粉样品,制备沉淀颗粒,规则排列于聚四氟乙烯(PTFE)背景底板上,进行显微近红外图像采集。设置像素点大小为50 μm×50 μm,采集面积为5 000 μm×5 000 μm,100×100个像素(共计10 000条光谱)。光谱范围为7 800~4 000 cm⁻¹,光谱分辨率为8 cm⁻¹。采用主成分分析和模糊聚类分析,对显微近红外图像数据集进行信息提取与处理。结果显示,肉骨粉与精料补充料可依据在图像上不同的主成分得分进行区分;在主成分分析的基础上,通过模糊聚类方法可以进一步细化样本类别。研究表明,显微近红外成像方法可应用于肉骨粉快速检测中。

关键词: 精料补充料 肉骨粉 显微近红外成像

中图分类号: O657.33; TP391.41; S816.401.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2011)07-0155-05

Discrimination of Meat and Bone Meal in Concentrate Supplement by Near-infrared Microscopic Imaging

Jiang Xunpeng Yang Zengling Han Lujia Liu Xian

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

Abstract

The possibility of using near-infrared microscopic imaging to discriminate meat and bone meal (MBM) in concentrate supplement was investigated. Samples of MBM and dairy concentrate supplement were collected, and the sediment particles were prepared and arranged on polytetrafluoroethene (PTFE) background plate for near infrared imaging. Image size was 5 000 μm×5 000 μm, using 50 μm pixel resolution (10 000 spectra were obtained). Each spectrum was across the wavelength range 7 800~4 000 cm⁻¹, with 8 cm⁻¹ data resolution. Both principal component analysis and fuzzy clustering analysis were used to extract and present relevant information from NIR microscopic imaging data sets. The results showed that MBM could be distinguished from dairy concentrate supplement by the scores from principal component analysis, and the samples were subdivided by using fuzzy C-means clustering based on the PCA analysis. It is demonstrated that NIR microscopic imaging approach is one of the most promising methods for detecting MBM.

Key words Concentrate supplement, Meat and bone meal, Near-infrared microscopic imaging

引言

农业部2004年发布了《动物源性饲料产品安全卫生管理办法》,禁止在反刍动物饲料中添加和使用包括肉骨粉在内的动物源性成分。研究表明,源

于英国的“疯牛病”与反刍动物饲料中添加和使用肉骨粉等动物源性成分有关^[1]。因此,研究开发反刍动物饲料中肉骨粉的检测方法对于落实国家规定、防范“疯牛病”的发生具有现实意义。

20世纪90年代末,随着近红外阵列检测器技

收稿日期: 2010-10-08 修回日期: 2010-11-22

* 国家自然科学基金资助项目(31072062、QSAFFE)、国际科技合作项目(2010DFA34540)、欧盟第七框架协议项目(FP7-265702)和中国与比利时科技合作项目(国科外函[2010]177号)

作者简介: 姜训鹏,博士生,主要从事生物质工程研究,E-mail: jiangxp@cau.edu.cn

通讯作者: 韩鲁佳,教授,博士生导师,主要从事生物质工程研究,E-mail: hanlj@cau.edu.cn

术的发展,显微近红外成像技术应运而生^[2]。该技术为获取局部微观区域的近红外图像提供了更为快捷的手段。显微近红外成像技术目前已在药品检测、医学诊断等领域^[3~5]取得了成功应用,但未见将其应用于肉骨粉检测的报道。

本文利用显微近红外成像技术,借助主成分分析和聚类识别方法对肉骨粉显微近红外图像数据集进行信息提取和处理,以达到借助图像识别精料补充料与肉骨粉的目的。

1 材料与方法

1.1 样本制备

实验样品选用奶牛精料补充料和猪肉骨粉。采样后均密封包装,存贮于恒温4℃的药品冷藏箱中。实验开始前,取出样品,放至室温。

样品需经 ZM100 型旋风磨(德国 Retsch 公司)粉碎处理,粒度为 1.0 mm。取上述一定质量(肉骨粉 3.0 g、精料补充料 10.0 g)的粉碎样品与 100 mL 四氯乙烯(密度为 1.62 g/cm³)在分液漏斗中混匀,静置 5 min。从溶液中分离出底部的沉淀颗粒,主要包括骨颗粒、矿质成分等。分别等分沉淀颗粒,一份供显微镜检测^[6],确认样品的真实性;另一份供显微近红外成像分析。

将沉淀颗粒过筛,取筛分粒度大于 250 μm 的颗粒作为扫描样本^[7]。将待扫描颗粒排列于聚四氟乙烯(polytetrafluoroethene,简称 PTFE)背景底板上,肉骨粉与精料补充料沉淀颗粒各成单列,随机交替排列。

1.2 实验仪器

实验采用美国 Perkin Elmer 公司生产的 Spotlight 400 型傅里叶近红外图像分析系统。该系统包括产生及检测近红外光谱的傅里叶变换近红外光谱仪(FT-NIR)、获取样本微区图像的显微镜系统以及调控检测区域的自动工作台和计算机控制系统。

显微镜系统中可见光与红外光通过共轴光路分别采集图像。通过可见光 CCD 照相机提供高质量的可视图像;通过线阵列检测器提供红外图像。线阵列检测器含 16 个检测单元,逐点获取光谱组合成像,比焦平面阵列检测器多次循环逐个波长采集图像更加快速。

1.3 样本显微近红外成像

针对近红外图像扫描,采用碲镉汞(mercury cadmium telluride,简称 MCT)阵列检测器,获取反射光谱。图像采集的像素点大小为 50 μm×50 μm,采集面积为 5 000 μm×5 000 μm,100×100 个像素

(一次扫描可获取 10 000 条光谱)。光谱范围为 7 800~4 000 cm⁻¹,光谱分辨率为 8 cm⁻¹,每条光谱取 8 次平均,扫描光谱以 lg(1/R)形式存储,其中 R 为光谱反射率。扫描过程中在检测室内充高纯氮气进行空气校正,以减少由水蒸气和二氧化碳造成的光谱吸收。

1.4 图像处理方法

1.4.1 显微近红外图像数据

通过显微近红外成像,获取的是四维数据集,分别包括: X 坐标值、Y 坐标值、波数 Z 和光谱强度。图像中任意一像素点都包含有一条具有光谱数据特点、可反映此像素点上物质内部特征的近红外光谱,如图 1 所示。同时,数据集也具有图像数据的特点,反映样本的空间分布。

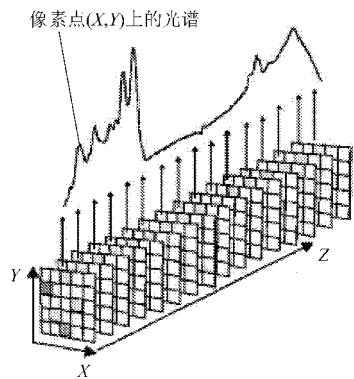


图 1 光谱四维数据集立体示意图

Fig. 1 Schematic of the spectral hypercube

1.4.2 图像数据集处理

为提高信噪比,采用 Savitzky-Golay 多项式算法的九点平滑对光谱进行处理。对图像光谱进行一阶求导^[8],得到一阶导数光谱图像数据集。

利用 Hyperview 2.0 软件(美国 Perkin Elmer 公司)提供的主成分分析手段,对一阶导数光谱图像数据集,运用非线性迭代最小二乘法(nonlinear interative partial least squares,简称 NIPALS)分解矩阵,计算特征向量和特征值,由此得主成分。再通过 Malinowski 设计的 IND 函数法和内在相关性的 F 检验方法,决定所需的主成分数。

利用 Hyperview 2.0 软件提供的模糊聚类方法对经主成分提取后的光谱图像数据集进行分析,采用模糊 C 均值算法进行聚类判别。

2 结果与讨论

2.1 扫描区域可见光和显微近红外图像

图 2a 为样本的可见光图像,选取方框区域(5 000 μm×5 000 μm)为扫描区域,其中 A 区为肉骨粉沉淀颗粒,其余区域的颗粒为精料补充料沉淀

颗粒。扫描区域内,总颗粒数共计为 39 个,其中肉骨粉颗粒为 22 个。图 2b 为沉淀颗粒近红外光谱平均吸收图像,每个像素点灰度与该像素点在 7 800 ~

4 000 cm^{-1} 光谱范围内的吸光度平均值相关。可以看出,底板背景基本不吸收,不同样品颗粒有着相近的吸光度平均值,无法直接分辨出样品颗粒的类别。

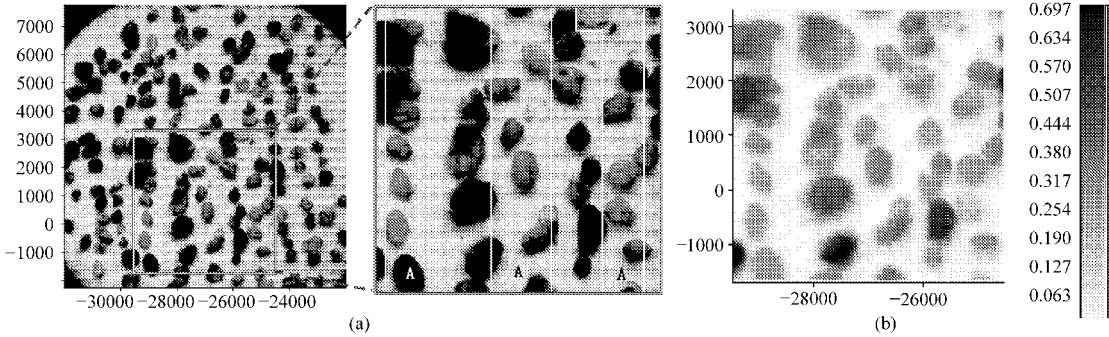


图 2 扫描区域的可见光和近红外光谱图像

Fig. 2 Visible and NIR microscopic images of scanning area
(a) 可见光图像 (b) 显微近红外图像

2.2 主成分分析

图 3 为主成分分析的前 6 个特征向量。可以看出:主成分 1~4 在 5 500 ~ 4 000 cm^{-1} 波数范围内的权重曲线具有明显差异,主成分 4、5 的权重曲线非常相近,主成分 6 在所有波数处的权重值基本一致,为零。

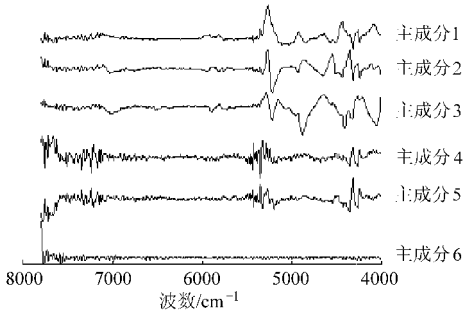


图 3 主成分分析的前 6 个特征向量

Fig. 3 First six factors from the PCA analysis on the NIR microscopic imaging data

图 4 为前 6 个主成分对应的得分图。依据每个像素点(即每条光谱)在不同主成分上的得分,进行类别判断。在图 4a 上,样本区域与背景底板之间的得分存在明显差异。图 4b 中,肉骨粉沉淀颗粒区域的得分为负值,精料补充料沉淀颗粒区域的得分为正值,底板背景的得分仍为零。通过主成分 1 和主成分 2 的得分图,可以初步区分肉骨粉和精料补充料。在主成分 3 的得分图(图 4c)中,所有精料补充料沉淀颗粒区域的得分并不一致,有的得分为负值,有的得分为正值,这可能是由于在精料补充料沉淀中包含有矿物质和植物源性颗粒。从图 4d、图 4e 和图 4f 中可以看出,主成分携带的变化信息量逐渐减少。各个像素点(即每条光谱)的差异主要表现在前 5 个主成分,因而利用前 5 个主成分进行重建,并以此为基础,进行聚类分析。

2.3 模糊聚类分析

当分类数设为 2 时,聚类分析的结果如图 5a 所示。白色为第 1 类,代表背景底板;黑色为第 2 类,代表颗粒样品。当分类数设为 3 时,结果如图 5b 所示。从图 5b 中看到,颗粒样本被进一步分为两类,即肉骨粉和精料补充料。当分类数增至 4 时,精料补充料沉淀颗粒被进一步划分,如图 5c 所示。在图 5c 中,Ⅰ是背景底板,Ⅱ是未被识别颗粒(对照图 2a),Ⅲ是植物性颗粒,Ⅳ是骨颗粒,Ⅴ是矿物质颗粒。继续增加分类数,新类别与原有类别在光谱上无明显差异,故而终止分类。依据分类结果,对不同类别颗粒的原始光谱进行比较,如图 5d 所示。在图 5d 中,Ⅰ是背景底板光谱,不含特征吸收峰;Ⅱ号光谱,对应于图 5c 中Ⅱ颗粒,未被识别,这是由于与背景光谱极其相近,二者导数光谱差异不显著;Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ号光谱,对应于图 5c 中的Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ颗粒,分别与已报道的动物源性光谱、植物性颗粒光谱和矿物质光谱相一致^[9]。

2.4 讨论

结果显示,肉骨粉和精料补充料沉淀颗粒可以通过导数光谱图像的主成分图进行区分;同时,通过模糊聚类分析方法将图像中不同颗粒按照光谱之间的差异程度进行类别判断,能够达到区分骨颗粒、矿物质与植物性成分颗粒的目的。

本文在探索肉骨粉和精料补充料显微近红外成像鉴别的可行性中,采用了沉淀样本间隔排列等简化方式,主要目的是明确样本颗粒的来源,验证分类结果。已有的研究也表明排列方式对颗粒的光谱特性无显著影响^[10]。因而,本文方法可用于精补料与肉骨粉沉淀颗粒在单层平铺下的识别,但该方法对识别肉骨粉在堆积排列等情况下的适用性需要进一步验证。

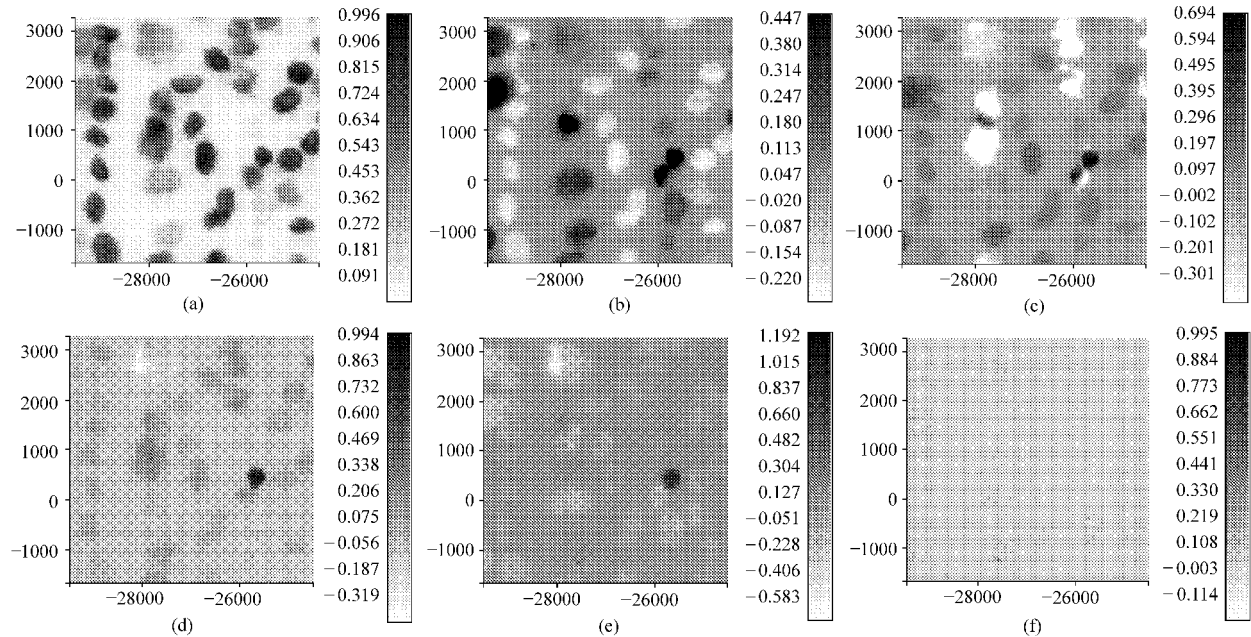


图4 前6个主成分的得分图

Fig.4 First six scores from the PCA analysis on the NIR microscopic imaging data
(a) 主成分1 (b) 主成分2 (c) 主成分3 (d) 主成分4 (e) 主成分5 (f) 主成分6

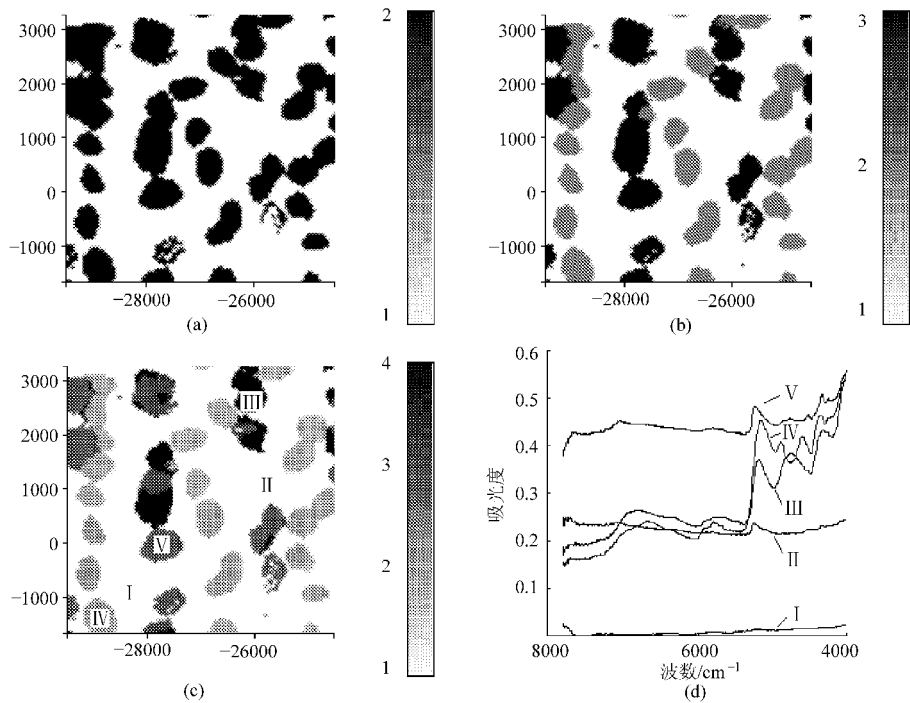


图5 模糊聚类分析的分类图与不同类别颗粒的光谱

Fig.5 Clustered images and the five spectra from different kinds of particles
(a) 2类 (b) 3类 (c) 4类 (d) 5种颗粒光谱

3 结束语

采用显微近红外成像技术,结合主成分分析和

模糊聚类方法,对精料补充料与肉骨粉的沉淀颗粒进行了图像识别,研究表明,显微近红外成像方法可应用于精料补充料与肉骨粉的快速识别。

参 考 文 献

1 Wilesmith J W, Wells G A, Cranwell M P, et al. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies[J]. Veterinary Record, 1988, 123(25): 638 ~ 644.
2 Treado P J, Levin I W, Neil Lewis E. Indium antimonide (InSb) focal plane array (FPA) detection for near-infrared imaging

- microscopy [J]. *Applied Spectroscopy*, 1994, 48(5): 607 ~ 615.
- 3 Clarke F. Extracting process-related information from pharmaceutical dosage forms using near infrared microscopy [J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2004, 34(1): 25 ~ 35.
 - 4 Awa K, Okumura T, Shinzawa H, et al. Self-modeling curve resolution (SMCR) analysis of near-infrared (NIR) imaging data of pharmaceutical tablets [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 619(1): 81 ~ 86.
 - 5 Wang Y, Yao X, Parthasarathy R. Characterization of interfacial chemistry of adhesive/dentin bond using FTIR chemical imaging with univariate and multivariate data processing [J]. *Journal of Biomedical Materials Research—Part A*, 2009, 91(1): 251 ~ 262.
 - 6 EC 152/2009 Annex VI: Methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed [S]. *Official Journal of the European Union*, 2009.
 - 7 Baeten V, Michotte-Renier A, Sinnaeve G, et al. Analyses of feeding stuffs of near-infrared microscopy (NIRM): detection and quantification of meat-and-bone-meal (MBM) [C] // *Proc. of the Sixth Food Authenticity and Safety International Symposium (FASIS)*. Nantes: FASIS Organization Committee, 2001:1 ~ 11.
 - 8 杨增玲, 韩鲁佳, 李琼飞, 等. 基于 NIRS 的反刍动物饲料中肉骨粉判别[J]. *农业机械学报*, 2009, 40(7): 124 ~ 128.
Yang Zengling, Han Lujia, Li Qiongfai, et al. Discriminant analysis of meat and bone meal content in ruminant feed based on NIRS[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2009, 40(7): 124 ~ 128. (in Chinese)
 - 9 Baeten V A, Von Holst C B, Garrido A C, et al. Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near-infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382(1): 149 ~ 157.
 - 10 Manley M, Williams P, Nilsson D, et al. Near infrared hyperspectral imaging for the evaluation of endosperm texture in whole yellow maize kernels [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(19): 8 761 ~ 8 769.