基于中红外光谱技术的甘氨酸铁螯合物判别研究

石晓妮,田静,贾铮,徐思远,樊霞*

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所,农业农村部农产品质量安全重点实验室,北京 100081)

摘 要:目的 研究基于中红外光谱(mid infrared spectroscopy, MIRS)技术定性判别有机微量元素添加剂掺假的可行性。方法 以甘氨酸铁螯合物和硫酸亚铁为研究对象,分析样品的中红外光谱,解析不同样品光谱的特异性;建立偏最小二乘判别(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)校正模型对掺假样品进行判别,并比较不同预处理方法、全光谱与特征波段对校正模型判别效果的影响。结果 甘氨酸铁螯合物与硫酸亚铁光谱差异显著,主要分布在(3500~3000) cm⁻¹、(1600~1300) cm⁻¹、(1300~1000) cm⁻¹、(660~550) cm⁻¹,通过采用 平滑(smoothing, SM)、归一化(normalization, Norm)与一阶导数(first derivative, FD)相结合的方法对光谱进行预处理,结合 1300 cm⁻¹~1000 cm⁻¹波段建立的 PLS-DA 校正模型判别效果最优,校正集的判别正确率为 97.5%,验证集的判别正确率为 100.0%,对外部样品的判别正确率达到 92.7%。结论 中红外光谱技术结合化学计量 学方法能够对甘氨酸铁螯合物的掺假进行准确判别。

关键词: 甘氨酸铁螯合物; 中红外光谱; 偏最小二乘判别法; 掺假判别

Identification of adulteration of glycine chelate iron based on middle infrared spectroscopy

SHI Xiao-Ni, TIAN Jing, JIA Zheng, XU Si-Yuan, FAN Xia*

(Key Laboratory of Agricultural Product Quality and Safety Research of Ministry of Agriculture, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Objective To study the feasibility of qualitative identification of adulteration of organic trace element additives based on mid infrared spectroscopy (MIRS). **Methods** Taking glycine chelate iron and ferrous sulfate as research objects, the middle infrared spectra of samples were analyzed, and the specificity of the spectra of different samples was analyzed. A partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) calibration model was established to discriminate adulterated samples, and the effects of different pretreatment methods, full spectrum and feature bands on the discriminant effect of the calibration model were compared. **Results** The spectra of ferrous glycine chelate and ferrous sulfate were significantly different, mainly ranging from (3500–3000) cm⁻¹, (1600–1300) cm⁻¹, (1300–1000) cm⁻¹, (660–550) cm⁻¹. The spectra were preprocessed by smoothing (SM), normalization and first derivative (FD) methods, and PLS-DA correction model was established for the 1300 cm⁻¹–1000 cm⁻¹ bands. The discriminant accuracy of the correction set was 97.5%, the discriminant accuracy of the verification set was 100.0%,

基金项目:"十三五"国家重点研发计划项目(2016YFF0201105),中国农业科学院创新工程

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFF0201105), and the Agricultural Science and Technology Innovation Program (ASTIP)

^{*}通讯作者: 樊霞, 博士, 研究员, 主要研究方向为饲料质量安全及检测技术。E-mail: fanxia@caas.cn

^{*}Corresponding author: FAN Xia, Ph.D, Professor, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products of CAAS, 12 Zhongguancun South Street, Haidian District, Beijing 100081, China. E-mail: fanxia@caas.cn

and the discriminant accuracy of the external sample reached 92.7%. **Conclusion** Middle infrared spectroscopy combined with stoichiometry can accurately distinguish the adulteration of glycine chelate iron.

KEY WORDS: glycine chelate iron; middle infrared spectrum; partial least squares discrimination analysis; adulteration discriminant

1 引 言

铁是畜禽机体生长发育所需要的最重要的微量元 素之一,对于促进动物生长、增强机体免疫等方面具有 重要功能^[1-3]。当前,铁源微量元素添加剂形式多样,其 中氨基酸螯合铁是近年来国内外发展较快的第3代铁源 添加剂, 是金属铁元素以配位键及离子键和氨基酸结合 形成的具有环状结构的络合物^[4-6]。与其他形式的铁源添 加剂相比,氨基酸螯合铁不仅能起到补充氨基酸和微量 元素的双重作用,还在增强吸收代谢、提高动物生产性能 和畜产品品质及绿色环保等方面具有明显的优势[7-10]。甘 氨酸易溶于水,且在氨基酸中分子量最小,由甘氨酸和 亚铁螯合成的甘氨酸亚铁更容易穿过小肠上皮细胞而被 整体吸收,因而在畜禽养殖中应用最广泛,是当前国内 研制开发应用的热点[11,12]。由于氨基酸螯合铁添加剂没 有相应的产品标准, 也无有效的检测方法, 不良商家为 了谋取暴利,使用甘氨酸与微量元素的混合物或者少量 螯合物和大量无机物组成的混合物冒充甘氨酸铁螯合 物,严重扰乱了市场秩序,影响了养殖户的利益。

中红外光谱(mid infrared spectroscopy, MIRS)是由 分子中基团原子振动跃迁时吸收红外光产生,反映分子 中原子间的伸缩和变形振动运动。绝大多数有机物和无 机物的基频吸收带都出现在中红外区,因此中红外区是 信息量最大的区域。红外光谱能够反映被测样品的组成 和结构性质,不同化合物有特定的红外吸收光谱,其谱 带数量、位置、形状和强度均随化合物而变化。相同的 样品有着极度相似的光谱,如果样品的组成结构性质存 在差异,则红外光谱也存在差异。基于此特点,红外光 谱分析技术与化学计量学结合在物质定性和定量分析 中有着广泛研究,已成功应用于油类、蜂蜜、果汁、肉 类等掺假检测,该技术在分析过程中待检样品无需复杂 的前处理和任何化学试剂,无污染,成本较低,是一种 环境友好型技术^[13-16]。

本研究以饲用甘氨酸铁螯合物和硫酸亚铁为研究对 象,探讨了基于MIRS技术快速识别甘氨酸铁螯合物掺假 的可行性,以期为建立一种快速、简单、经济的甘氨酸铁 螯合物掺假识别的检测方法提供参考。

2 材料与方法

2.1 样品的收集与制备

分别从黑龙江、四川、安徽、湖南等省份共采集了140 个样品(80 个甘氨酸铁螯合物和 60 个硫酸亚铁),所有样品 均取自饲料添加剂生产企业的生产线,以确保获取的样品 中未掺入任何其他成分。将硫酸亚铁分别以1%、5%、10%、 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%(质量分数) 比例添加到甘氨酸铁螯合物中,每个掺假浓度配制 15 个样 品,共配制了165 个样品。为了保证掺假样品的均匀性,将 掺假样品置于 5 mL 塑料管中,放入混匀机中混匀15 s。

样品由国家饲料质量监督检验中心(北京)提供。

2.2 光谱数据采集

采用 Spectrum400+Spotlight 400 傅里叶变换近红外和 中红外成像系统(美国 PerkinElmer 公司)获取样品中红外光 谱。所有样品以 KBr 压片的方式获取红外光谱。光谱采集 参数: 波数范围为(4000~400) cm⁻¹,分辨率为 4 cm⁻¹,扫描 次数为 32 次。每个样品制备 3 次,获取光谱后取平均。纯 品共采集 80 条光谱,掺假样品共采集 225 条光谱。

2.3 光谱预处理

光谱采集时,由于受样品均匀度、仪器状态、压片状态等因素影响,常出现谱图偏移或漂移、背景干扰现象, 干扰光谱与样品内有效成分含量间的关系,并影响模型的 可靠性、稳定性。因此,在建立校正模型前,需对原始光 谱进行预处理,不仅可以减少系统噪音、杂散光等影响, 得到高信噪比、低背景干扰的光谱数据,还可以提高所建 模型的预测能力和稳健性^[19]。本实验中主要研究了未处理 (none)、一阶导数(first derivative, FD)处理、二阶导数 (second derivative, SD)处理、平滑(smoothing, SM)处理、标 准正态变量(standard normal variable, SNV)处理、多元散射 校正(multiple scattering correction, MSC)处理、归一化 (normalization, Norm)处理以及它们之间的共同作用对光 谱建模的影响,从而优选出最佳的预处理方式。

2.4 判别模型的建立方法

偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)是一种线性分类的监督方法,基于 PLS

回归方法,将光谱数据与分类变量进行线性回归的模式识别,分析过程中可以对自变量进行信息整合,消除众多信息中相互重叠的部分,使得分析数据更加准确可靠。其判别过程首先是建立校正集样本的分类变量,再通过分类变量与光谱数据进行偏最小二乘(partial least squares, PLS)分析,经过校正模型内部交互验证,以交互验证均方根误差(root mean square error in cross validation, RMSECV)最小和样本误判数最少为原则,建立分类变量和光谱数据间的PLS 模型,最后根据校正集所建立的分类变量和光谱数据的PLS-DA 模型对独立的预测集样本进行预测验证^[17,18]。

本研究共有305个样品,其中165个掺假样品(人为在 甘氨酸铁螯合物中加入硫酸亚铁),80个甘氨酸铁螯合物, 60个硫酸亚铁。按照校正集和验证集比例为2:1的关系,从 掺假样品的各个浓度梯度中随机选出10个样品作为校正 集样品,剩余的为验证集样品。样品分集情况如表1。

表 1 校正集和验证集样品划分信息 Table 1 Sample partition information of calibration set and validation set

类别	样品数		
	校正集	验证集	
甘氨酸铁螯合物	54	26	
含掺入硫酸亚铁的甘氨酸铁螯合物	150	75	
总计	204	101	

本试验中所有的数据处理都是在 Matlab R 2018b(The Mathworks, Inc., Natick, MA, U) 与 8.0.2 版本的 PLS_toolbox(Eigenvector Research, Wenatchee, WA, U)上实现的。

3 结果与分析

3.1 原始光谱分析

实验共获得80条甘氨酸铁螯合物样品的光谱、60条 硫酸亚铁的光谱和 165 条掺假样品的光谱。甘氨酸铁螯合 物和硫酸亚铁的平均光谱如图 1 所示, 甘氨酸铁螯合物的 中红外光谱信息丰富,提供了诸多关于甘氨酸铁螯合物配 合模式的信息,其光谱特征峰主要分布在 3249、1630、 1330、1100、913、689、533 cm⁻¹, 其中 3249 cm⁻¹ 为 NH³⁺ 的不对称伸缩振动, 1694 cm⁻¹ 为 C=O 的伸缩振动, 1630 cm⁻¹为 COO⁻的反对称伸缩振动, 1592 cm⁻¹为 COO⁻的对称 伸缩振动, 1499 cm⁻¹为 COO⁻的对称伸缩振动, 1387 cm⁻¹为 C-N 的伸缩振动和 C-O 的伸缩振动, 913 cm⁻¹ 为 COOH 的 面外弯曲振动, 533 cm⁻¹为 Fe-O 键伸缩振动; 硫酸亚铁的 光谱特征峰为 3467、1624、1107、614、434 cm⁻¹, 其中 3467 cm⁻¹ 为羟基伸缩峰, 1624 cm⁻¹ 为羟基的弯曲振动峰, 1107 cm⁻¹ 为硫酸盐中 SO₄²⁻伸缩振动导致。甘氨酸铁螯合物 MIRS 的特征吸收峰为(1650~1200) cm⁻¹波段, 硫酸亚铁的 特征吸收峰为 614、434 cm⁻¹。



采集不同掺假比例样品的红外光谱信息,如图 2 所示, 从中可以看出,甘氨酸铁螯合物纯品和掺假样品光谱走势 基本相同,不同掺伪样品的光谱图重叠性和相似性都很大, 从局部区域放大图可以看出,随着掺假浓度的增加,在 (1650~1200) cm⁻¹范围内吸收峰的强度越来越低,在1150、 614、434 cm⁻¹处的吸收峰强度越来越高,仅通过 MIRS 光 谱就可以准确实现一定掺假浓度的判别。

3.2 光谱预处理

本研究采取 13 种预处理方式对光谱数据进行处理, 结果如表 2。从表 2 中可以发现,当采用 Norm、SM 及 FD 相结合的方式时,模型的判别效果最好,使得校正集的判 别正确率由 94.6%提高到 97.5%,验证集的判别正确率由 95.0%提高到 98.0%。因此,模型中选择 Norm 和 SM 以及 FD 处理联用为最佳光谱预处理方式。

3.3 光谱范围的选择

当采用全波段红外光谱进行光谱建模时,由于全波 段光谱包含了成百上千的光谱波长变量,不仅计算量巨大, 而且模型的预测精度也很难得到保证。本实验在原始光谱 的不同波段分别建立定性判别模型,所建模型的预测结果 如表 3 所示。通过观察可以发现,4 个波段所建立的模型的 判别效果较全波段来说均有所提高,在(1300~1000) cm⁻¹ 波数范围内,校正集的判别正确率为 97.5%,验证集的判 别正确率为 100.0%, 因此模型建立选用的最佳波段为 (1300~1000) cm⁻¹。

表 2 基于不同光谱预处理建立的模型预测结果 Table 2 Model prediction results based on different spectral pretreatment

不同预处理方法	校正集		验证集	
	鉴别错误 个数	正确率	鉴别错误 个数	正确率
None	11	94.6%	5	95.0%
SM	10	95.1%	5	95.0%
Norm	8	96.0%	4	96.0%
MSC	8	96.0%	4	96.0%
SNV	9	95.6%	5	95.0%
SM+FD	7	96.5%	2	98.0%
SNV+SM+FD	8	96.0%	3	97.0%
MSC+SM+FD	6	97.0%	2	98.0%
Norm+SM+FD	5	97.5%	2	98.0%
SM+SD	7	96.5%	4	96.0%
SNV +SM+SD	6	97.0%	3	97.0%
MSC+SM+SD	5	97.5%	4	96.0%
Norm+SM+SD	5	97.5%	3	97.0%





特征波段校正模型的判别结果如图 3, 从图 3 中可以 看出,校正集有 5 个掺假样品被误认为真样品,而验证集 样品被全部正确分类,表明 PLS-DA 模型能够鉴别甘氨酸 铁螯合物是否掺伪。





3.4 模型外部验证

为了检验所建模型对外部样品的判别效果,利用 55 个随机配制的掺假样本对所建模型进行检验,结果如表 4 所示。当甘氨酸铁螯合物掺入硫酸亚铁的含量≥30%时, 所建模型的正确判别率为 100.0%;当掺入 10%~30%硫酸 亚铁时,有1个样品被误判,正确判别率为 90.0%;当掺入 的硫酸亚铁含量≤10%时,有3 个样本被误判,正确判别 率为 70.0%,掺入硫酸亚铁含量过少时可能会出现误判。 结果表明,总体样本的正确判别率为 92.7%,说明模型有 较强的预测能力和稳定性。

4 结 论

采用 MIRS 方法结合 PLS-DA 建立甘氨酸铁螯合物掺 假判别模型,通过比较不同光谱预处理方法、不同特征谱 区分段建模方法优化模型的准确性。实验最终选取 Norm、 SM 和 FD 预处理联用、(1300~1000) cm⁻¹特征光谱谱区和 PLS-DA 方法建立判别甘氨酸铁螯合物掺假定性分析模型, 校正集的判别正确率为 97.5%,验证集的判别正确率为 100.0%,对外部样品的判别正确率达到 92.7%。本研究结 果表明采用 MIRS 技术和化学计量学方法应用于甘氨酸铁 螯合物的掺假判别是可行的。

Table 3Prediction results of models built in different spectral ranges					
波段/cm ⁻¹ —	校正	校正集			
	鉴别错误个数	正确率	鉴别错误个数	正确率	
4000~400	11	94.6%	5	95.0%	
3500~3000	8	96.0%	3	97.0%	
1600~1300	6	97.0%	4	96.0%	
1300~1000	5	97.5%	0	100.0%	
660~550	6	97.0%	2	98.0%	

表 3 不同光谱范围所建模型的预测结果 able 3 Prediction results of models built in different spectral ranges

表 4 所建模型对未知样品的判别结果 Table 4 Discriminant results of the model to unknown sample

样品	样本数量	判断正确样本数量	正确判别率	总体样本正确判别率		
甘氨酸铁螯合物	15	15	100.0%			
掺≥50%硫酸亚铁的甘氨酸铁螯合物	10	10	100.0%			
掺 50%~30%硫酸亚铁的甘氨酸铁螯合物	10	10	100.0%	92.7%		
掺 30%~10%硫酸亚铁的甘氨酸铁螯合物	10	9	90.0%			
掺≤10%硫酸亚铁的甘氨酸铁螯合物	10	7	70.0%			

参考文献

[1] 朱年华,肖俊武. 有机微量元素应用现状与趋势[J]. 饲料广角, 2014, (13): 20-23.

Zhu NH, Xiao JW. Application status and trend of organic trace elements [J]. Feed China, 2014, (13): 20–23.

- [2] Dzhardimalieva GI, Uflyand IE. Review: recent advances in the chemistry of metal chelate monomers [J]. J Coord Chem, 2017, 70(9): 1468–1527.
- [3] 王坤坤,洪作鹏. 有机微量元素的研究进展及应用现状[J]. 饲料研究, 2012, (4): 34-36.

Wang KK, Hong ZP. Research progress and application status of organic trace elements [J]. Feed Res, 2012, (4): 34–36.

- [4] Richard M. 如何甄别络合物和螯合物[J]. 饲料广角, 2016, (19): 33-34.
 Richard M. How to identify complexes and chelates [J]. Feed China, 2016, (19): 33-34.
- [5] 李芳, 王韶辉, 罗雄. 甘氨酸亚铁合成及检测方法的研究现状[J]. 饲料研究, 2017, (18): 52-56.

Li F, Wang SH, Luo X. Research status of synthesis and detection methods of ferrous glycine [J]. Feed Res, 2017, (18): 52–56.

- [6] Manangi MK, Vazques AM, Richards JD, *et al.* The impact of feeding supplemental chelated trace minerals on shell quality, tibia breaking strength, and immune response in laying hens [J]. J Appl Poult Res, 2015, 24(3): 316–326.
- [7] Kwiecień M, Samolińska W, Bujanowicz-Haraś B. Effects of iron–glycine chelate on growth, carcass characteristic, liver mineral concentrations and haematological and biochemical blood parameters in broilers [J]. J Anim Physiol Anim Nutr, 2015, 99(6): 1184–1196.
- [8] Richards JD, Zhao JM, Harrell RJ, et al. Trace mineral nutrition in poultry and swine [J]. Asian Austral J Anim, 2010, 23(11): 1527–1534.
- [9] Senthilkumar S, Muralidharan J, Vasanthakumar P, et al. Preciseness of chelated minerals on the performance of animals [J]. Maejoint J Sci Tech, 2015, 1008–1012.
- [10] Gorlov IF, Levakhin VI, Radchikov VF, et al. Effect of feeding with organic micro element complex on blood composition and beef production of young cattle [J]. Mod Appl Sci, 2015, 9(10): 8.
- [11] Mersal GAM, Adam AMA, Hassan RF, et al. Spectral and cyclic voltammetric studies of glyceryl guaiacolate drug in pure form and in situ chelation with some different transition metals [J]. J Mol Liq, 2017, 237: 128–140.
- [12] Kwiatkowska K, Winiarskamieczan A, Kwiecień M. Effect of Application of Fe–glycinate chelate in diet for broiler chickens in an amount covering 50 or 25% of the requirement on physical, morphometric and strength parameters of tibia bones [J]. Biol Trace Elemres, 2018, 184(2): 483–490.

- [13] 王德发,苏亚琴. 傅立叶变换红外光谱技术在分析化学领域的应用[J]. 化学分析计量, 2016, 18(4): 82-87.
 Wang DF, Su YY. Application of Fourier transform infrared spectroscopy in analytical chemistry [J]. Chem Anal Meterage, 2016, 18(4): 82-87.
- [14] 翁诗甫.傅里叶变换红外光谱仪[M].北京:化学工业出版社,2005.
 Weng SF. Fourier transform infrared spectrometer [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [15] 房靖. 化学计量学在分析化学中的应用及发展前景[J]. 科技资讯, 2010, (21): 242.

Fang J. Application and development prospect of chemometrics in analytical chemistry [J]. Sci Technol Inform, 2010, (21): 242.

- [16] 康继,顾小红,汤坚,等. 中红外反射光谱结合偏最小二乘法快速定量 分析葡萄酒[J]. 光谱实验室, 2010, 27(3): 789–796.
 Kang J, Gu XH, Tang J et al. Rapid quantitative analysis of wine by mid–infrared reflectance spectroscopy combined with partial least squares method [J]. Chin J Spectrosc Lab, 2010, 27(3): 789–796.
- [17] Caravaca AM, Maggio RM, Verardo V, et al. Fourier transform infrared spectroscopye partial least squares (FTIR–PLS) coupled procedure application for the evaluation of fly attack on olive oil quality [J]. Lwt–Food Sci Technol, 2013, 3(50): 153–159.
- [18] Femanfez MR, Berrueta LA, Lobato SG, et al. Feasibility study of FT-MIR spectroscopy and PLSR for the feast determination of anthocyanins in wine [J]. Talanta, 2012, 15(88): 303–310.
- [19] Luna AS, Silva AP, Ferre J, et al. Classification of edible oils and modeling of their physico-chemical properties by chemometric methods using mid-IR spectroscopy [J]. Spectroshim Acta A, 2013, 1(100): 109–114.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



石晓妮,硕士研究生,主要研究方向 为饲料质量安全及其检测技术。 E-mail: 419657439@qq.com

