

Near Infrared Spectroscopy

Authors:

Ben Perston

Rob Packer

PerkinElmer Inc.

Shelton, CT

DairyGuard: 奶粉营养成分 检测与掺假筛查

概述

奶粉是世界上贸易量最大的食品商品之一，每年出口量超过250万吨。^[1] 从婴幼儿配方食品到烘焙糕点，很多食品中都会使用奶粉。然

而，乳制品也是食品造假的常见对象之一，仅2011~2012年间美国药典委员会（USP）就记录了全球范围内137例因经济利益而发生的掺假事件。^[2] 奶粉的营养价值关键在于蛋白质含量，但是目前蛋白质检测的标准方法仅仅是对氮元素含量进行简单测试，然后根据氮元素含量推算蛋白质含量。因此，掺入富含氮元素的化学物质可以人为增加蛋白质的表观含量，从而提高奶粉的价格。

经济利益驱使的掺假案例使得对于奶制品中三聚氰胺含量的限制非常严格。例如，美国FDA规定食品中三聚氰胺和氰尿酸的含量要低于2.5 ppm，婴儿奶粉中二者含量要低于1 ppm。^[3]在上述含量水平上证明食品中不含这些掺假成分需要LC/MS/MS等灵敏度非常高的检测方法。^[4]一些灵敏度极高的实验室检测方法是非常重要的，但是这类方法往往也非常昂贵和耗时，可能导致无法获得具有代表性的样品。对于经济利益驱使的掺假行为来说，还有两个需要考虑的因素。首先，在ppm量级水平掺假基本上是无利可图的，因此确实掺假的样品中掺杂物质的含量应该更高。例如，让脱脂奶粉中氮元素占奶粉总质量的比例增加0.16%（对应于使蛋白质占奶粉总质量的比例增加1%），需要添加2400 ppm的三聚氰胺。其次，更难解决的问题在于，除了三聚氰胺以外还有其他各种各样可以添加的富含氮元素的化学物质。^[5]要有效地预防非法掺假行为，必须考虑目前已知掺假物质之外的其他可能性。

基于上述原因，在应对经济利益驱使的掺假行为时，不需要进行分离而是检测样品整体成分的“指纹图谱”技术具有非常重要的作用。近红外（NIR）光谱已经广泛用于食品、饲料和农业领域的蛋白质、水分、脂肪等营养和品质参数的定量分析。然而并不被人所熟知的是，近红外光谱也可以作为检测掺假样品的有力方法。近红外光谱测试几秒钟即可完成，包含了任意掺假成分在内的样品全部成分信息。检测过程中没有任何样品分离措

施，因此需要恰当的化学计量学方法来区分奶粉基质和掺假物质的光谱信号。本文描述了DairyGuard 奶粉分析仪和Adulterant Screen 算法如何检测奶粉中含量远低于1%的7种掺假成分，不需要耗时建立偏最小二乘（PLS）或其他化学计量学校正模型。

什么是Adulterant Screen?

以前使用近红外光谱进行掺假物质检测都是使用标准化学计量学方法（如图1所示）。以偏最小二乘回归为基础的定量分析方法能够比较准确的检测出三聚氰胺的含量。然而，这类靶向检测方法仅仅适用于建立校正模型时所针对的掺假物质，而且模型建立过程非常耗时——需要准备几十到几百个样品，并且准确测定这些样品中掺假物质的含量。

另一种可供选择的思路是：使用SIMCA等基于主成分分析（PCA）的化学计量学方法，建立未掺假样品的光谱模型，根据待测样品光谱与该模型的匹配程度确定其是否合格。这类方法是真正的非靶向检测，能够检测任意掺假物质，但是无法给出不合格样品产生的原因（没有对掺假物质进行识别）。这类方法没有用到掺假物质的光谱，灵敏度也不会高于定量分析方法。

基于光谱数据库检索的方法——即便是使用多元算法——的困难在于不能准确拟合样品基质的光谱变化，而且商业数据库的应用也非常有限。

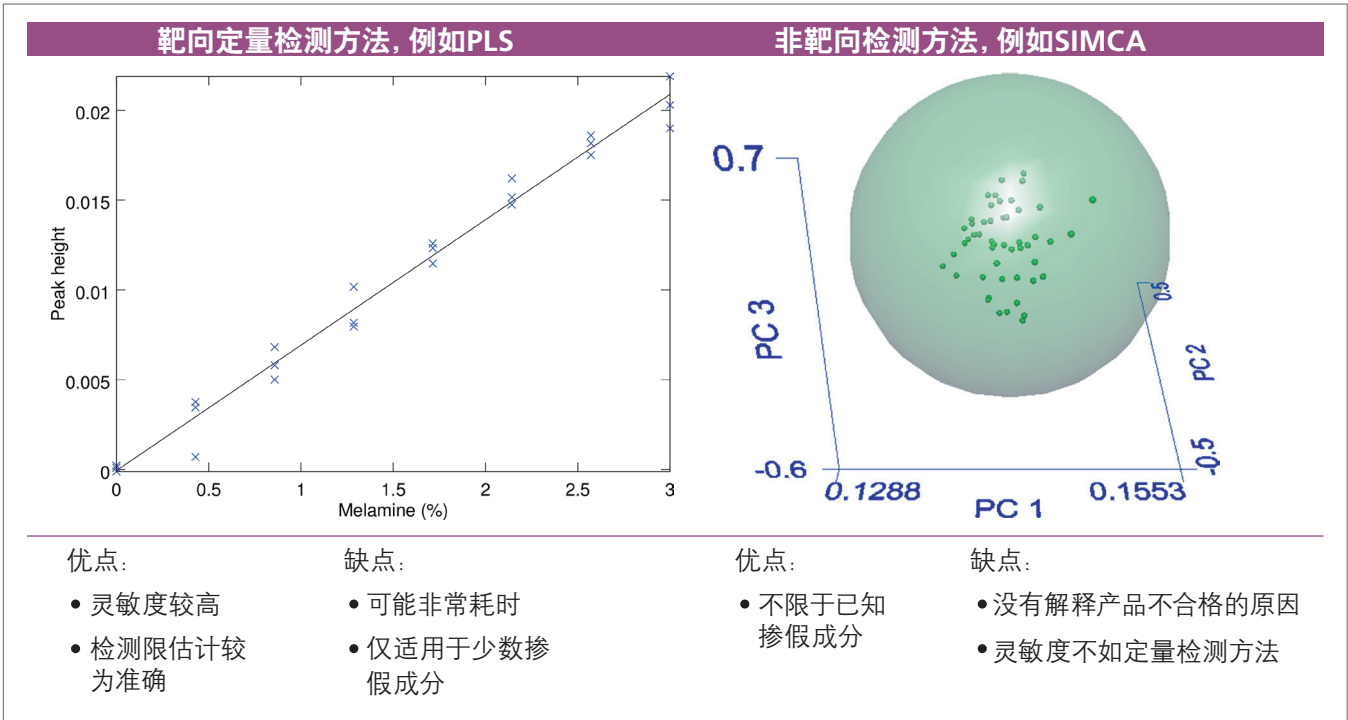


图1. 现有的掺假分析化学计量学方法的示意图。左侧：定量分析，例如单一峰高度或者偏最小二乘（PLS）回归。右侧：基于因子分析的非靶向方法，例如SIMCA。

Adulterant Screen是专门为复杂基质中任意潜在掺假成分筛查而设计的新算法。该算法综合了非靶向筛查方法的通用性和简便性优势，以及靶向检测方法的高灵敏度优势。

Adulterant Screen如何工作？

第一步，建立未掺假样品的的光谱数据库，这与建立SIMCA模型的步骤类似。这个数据库应该尽可能包含各种类型的样品，例如包括不同批次、不同生产者、不同工艺参数的产品。然而，这些样品应该都是正常的，不需要像建立营养成分定量分析方法那样选择高杠杆值的特殊样品（例如含有特殊营养成分的产品）。样品光谱数量取决于基质复杂程度和所要求的灵敏度，一个典型的奶粉数据库大概包含几十个样品。

第二步，建立掺假成分的光谱数据库。只需要纯物质的光谱即可，不用制备混合样品。DairyGuard软件中已经内置了一个包含19种富含氮元素的农业和工业化合物的光谱数据库。在数据库中添加新的掺假成分也非常简单，只要测量纯掺假成分的光谱，并将其拷贝到数据库文件夹即可。

上述两组光谱导入软件之后，就可以开始使用Adulterant Screen技术了。

Adulterant Screen与SIMCA比较：物理掺假样品

通过喷雾-干燥法获得66个全脂奶粉样品，其中48个用于建立参考样品数据库，12个用于制备掺假样品，其余6个作为空白对照。所使用的潜在掺假成分为三聚氰胺、尿素、双缩脲、双氰胺、环丙氨嗪和氰尿酸。每种掺假成分在研细后分别以质量分数0.2%和2%的比例与奶粉充分混合均匀。通过其他方式（例如湿法混合）生产的奶粉样品可能产生不同的结果，需要对数据库中参考样品光谱进行调整。所有样品光谱都通过PerkinElmer DairyGuard奶粉分析仪系统进行测量，其中包含一台Frontier 近红外(NIR)光谱仪，配备NIRA II漫反射附件。每个样品累积扫描20秒，光谱分辨率为16 cm⁻¹。

使用PerkinElmer AssureID 软件建立SIMCA模型，置信度水平设置为默认值(99%)。参考样品数据库中所有48个样品的光谱均被用于建模。

Adulterant Screen中24个样品的光谱用于建立模型，另外24个样品的光谱用于验证模型（设定阈值）。

样品分析结果如表1所示，表明Adulterant Screen方法的检测灵敏度要优于SIMCA方法。

Adulterant Screen算法

获得一个样品的光谱之后，该算法首先将其与参考样品PCA模型进行比较。然后，依次使用各种潜在掺假成分的光谱对该模型进行扩展。如果在模型中增加某种掺假成分的光谱之后，样品光谱的拟合程度得到显著增加，说明该样品很可能含有这种掺假成分。该算法也适用于同时含有多种掺假成分的样品，可以检索最多三种掺假成分的各种组合方式。该算法的输出结果是数据库中各种掺假成分的估计浓度、检测限和置信指标。

对浓度的估计是根据数据库中掺假成分光谱与其在样品光谱中分量的相对强度，没有考虑到有效光程的差异。因此，这只是一种半定量的估计结果。检测限的估计结果也采取同样的方式。最后，置信指标显示了该掺假成分实际存在的可能性大小。

置信指标和检测限估计值是非常重要的，因为该方法的灵敏度取决于掺假成分光谱与样品光谱的相似程度。如果要验证检测限的准确性，建议准备一些掺假成分含量略高于检测限的样品，看这些样品中的掺假成分是否能以较高的置信程度被检出。

如果样品中的掺假成分不在数据库之内，或者奶粉本身与参考样品的匹配程度较差，软件会提醒用户该样品中可能存在未知异常成分。

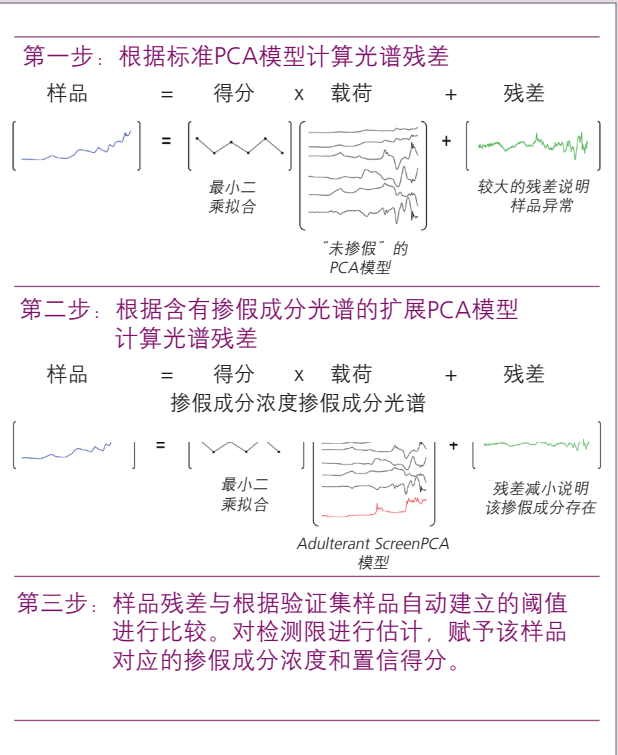


表1.物理掺杂全脂奶粉样品的SIMCA (置信度为99%) 和Adulterant Screen分析结果。AS = Adulterant Screen。错误识别结果(假阴性) 被加亮显示。对于检测限和置信指标的解释请参见上页侧边栏。

样品	SIMCA检测通过?	AS检测通过?	AS估计含量 (%)	AS检测限 (%)	AS置信指标
空白对照1-6	是	是	低于检测限		
掺假成分 2%	否	否	所有掺假成分都被准确识别		
双缩脲 0.2%	是	否	0.19	0.15	可能
氰尿酸	是	否	0.37	0.25	非常可能
环丙氨嗪	是	是	0.017	0.11	不可能
双氰胺	是	是	0.019	0.095	非常不可能
三聚氰胺	否	否	0.21	0.12	非常可能
尿素	否	否	0.14	0.07	非常可能

两种方法都能正确识别出空白对照样品为未掺假样品。SIMCA在检测达到百分之一量级的掺假成分时没有问题，某些情况下掺假成分（三聚氰胺和尿素）含量仅为0.2%时也能被检测出来。在检测灵敏度方面，Adulterant Screen效果更好，能够检测出含量为0.6%的氰尿酸和0.2%的双缩脲（但是没有检测出含量为0.2%的环丙氨嗪和双氰胺）。

除了提高检测灵敏度之外，Adulterant Screen也正确识别出了掺入的成分。而SIMCA仅能识别出样品是否合格，对于不合格样品的产生原因没有任何解释。

高级诊断分析

Spectrum 软件为高级用户提供了一系列结果诊断工具。

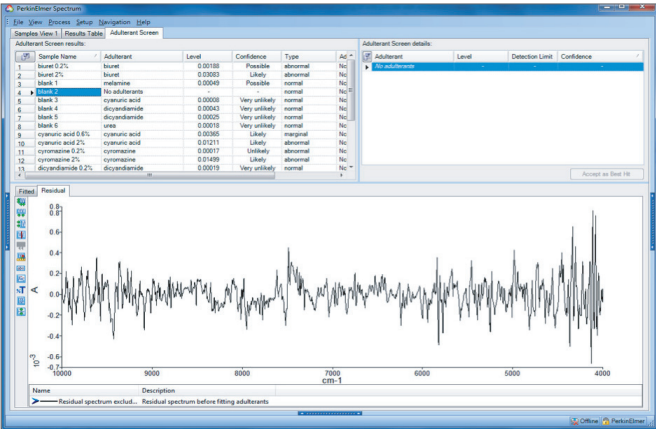


图2. Spectrum v10软件中典型的Adulterant Screen分析结果界面，显示了一个未掺假样品的残差光谱。

图2所示为AdulterantScreen的分析结果显示界面。注意，对于空白对照样品，各种掺假成分的浓度水平和置信程度都极低。图中显示了一个空白对照样品的残差光谱，没有明显迹象表明该样品中含有未被拟合的异常成分。

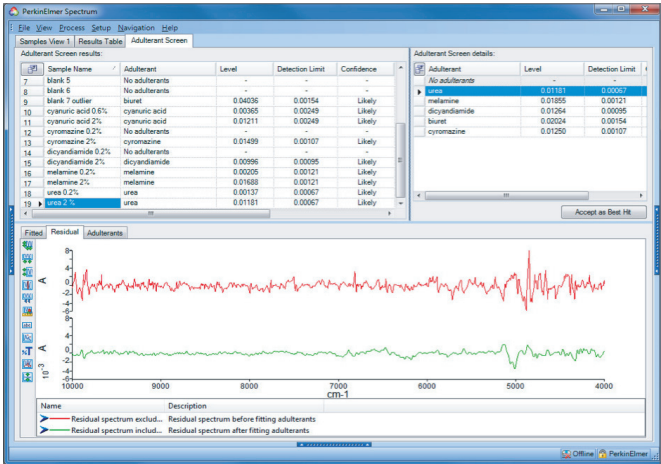


图3. 某个含有掺假成分样品的残差光谱。红色曲线：PCA残差光谱，显示出明显未被拟合的成分。绿色曲线：Adulterant Screen残差光谱，拟合结果得到显著改善。

相比之下，某个掺假样品（尿素含量为2%）的残差光谱显示出明显的未被拟合的成分（如图3中红色曲线所示）。当掺假成分的光谱加入到拟合过程中时，残差光谱中未被拟合的成分被消除（如图3中绿色曲线所示）。

即便是掺假成分的存在所导致的残差光谱出现特殊结构，残差光谱通常也很难与掺假成分光谱一致。残差光谱上总是会有正的和负的光谱特征，对应于未掺假样品（纯奶粉）和掺假成分的光谱。

为了提供更加容易解析的光谱，Adulterant Screen将待测样品光谱对未掺假样品和掺假成分光谱进行最小二乘拟合，从而估计待测样品光谱中掺假成分的贡献。特别是对于光谱特征非常显著的掺假化学成分，提取出的掺假成分光谱与数据库光谱非常一致，充分表明了该掺假成分确实存在。反之，如果提取出的光谱中缺少数据库光谱的谱带，说明该样品中含有的掺假成分不在数据库之内。图4所示为掺有2%尿素的奶粉样品中提取的掺假成分光谱（黑色曲线）与数据库中尿素的光谱（红色曲线）。数据库光谱中所有特征峰都与提取出的光谱匹配，由此我们可以确认该样品中确实含有尿素。

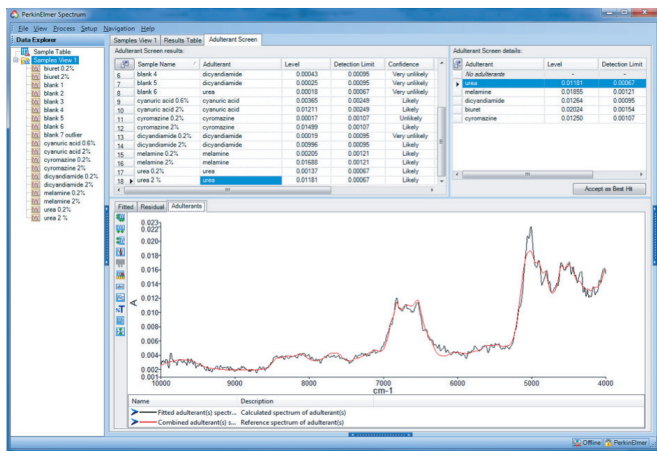


图4. 掺有2%尿素的奶粉样品中提取的掺假成分光谱（黑色曲线）与数据库中尿素的光谱（红色曲线）。

上述结果显示模式对于分析结果在检测限附近的样品特别有用，例如三聚氰胺含量为0.2%的掺假奶粉样品（如图5所示）。该样品在SIMCA和Adulterant Screen中都没有通过检测，说明需要进一步对其进行分析。Adulterant Screen分析结果表明该样品中可能含有三聚氰胺，为下一步分析提供了指导信息。

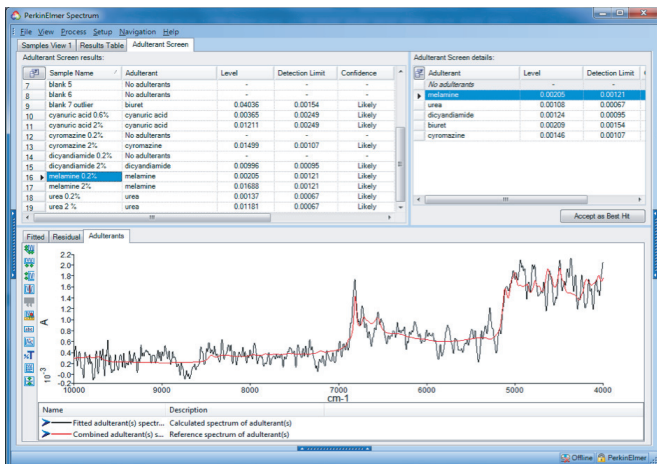


图5. 掺有0.2%三聚氰胺的奶粉样品中提取的掺假成分光谱（黑色曲线）与数据库中三聚氰胺的光谱（红色曲线）。

Adulterant Screen与SIMCA比较: 合成掺假样品

为了进一步比较SIMCA和Adulterant Screen的检测灵敏度，我们将0.1%到2.0%的各种掺假成分光谱添加到一个空白对照样品光谱中，从而获得了一系列数学模拟的合成掺假样品光谱。通过这种方式获得的掺假样品光谱与物理掺假样品光谱有所不同，因为掺假成分的有效光程依赖于所测量的基质成分（掺假成分本身或者奶粉）。但是，这些光谱可以用于比较SIMCA和Adulterant Screen两种方法的相对检测灵敏度。

表2. Adulterant Screen与SIMCA（指明置信度水平）对合成掺假样品的分析结果比较

掺假成分	最低检测浓度（合成掺假样品）		
	SIMCA (99%)	SIMCA (95%)	Adulterant Screen
双缩脲	>2%	>2%	0.2%
氰尿酸	>2%	>2%	0.3%
环丙氨嗪	0.6%	0.5%	0.3%
双氰胺	1.4%	1.2%	0.3%
三聚氰胺	0.7%	0.6%	0.3%
尿素	1.7%	1.4%	0.3%

很明显，Adulterant Screen的检测能力更强。这是因为SIMCA仅仅考虑残差的大小，而Adulterant Screen会去搜索与识别出的掺假成分所对应的残差光谱特征。

虽然在分析物理掺假样品时两种方法的差距没有这么明显，Adulterant Screen对于掺假样品的检测能力仍然强于SIMCA。

集成于完整的工作流程

Adulterant Screen 可以根据含量水平和置信程度两个指标设定检测通过/失败的判断准则，可以作为原材料日常例行检测方法的一部分。该过程可以集成于Spectrum Touch App，使得普通操作者也能进行简便、可靠地分析检测。DairyGuard奶粉分析仪包含了Spectrum Touch App软件（如图6所示），其中含有SIMCA、Adulterant Screen和示例定量分析方法，可以作为您开发自己应用程序的起点。

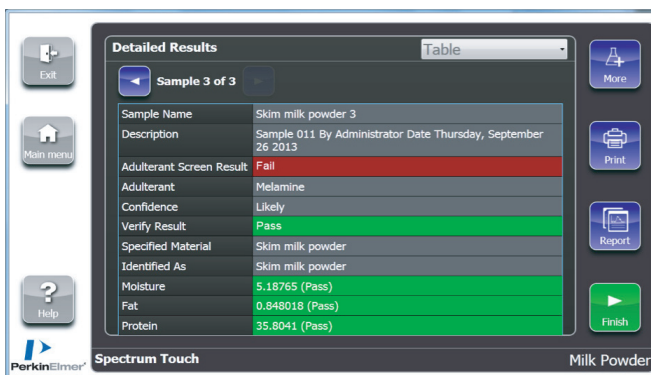


图6. DairyGuard Touch App分析结果显示屏幕。一个样品通过了认可分析（Certificate of Analysis, COA）和SIMCA非靶向筛查，但是因为含有少量的三聚氰胺而没有通过更加灵敏的Adulterant Screen检测。

结论

为了获得经济利益而在食品或食品原料中掺假的问题由来已久,也不可能在短时间内得以消除。我们需要使用各种可能的分析方法来应对食品掺假问题,近红外光谱在原材料检测中的广泛应用将使其起到非常关键的作用。PerkinElmer所提供的Adulterant Screen算法不仅保留了SIMCA等非靶向化学计量学方法的优势,而且通过潜在掺假成分光谱数据库获得了更高的灵敏度。通过简单的调整,该方法即可用于新产品类型或新掺假成分的筛查,不需要准备混合物样品建立校正模型。掺假成分光谱数据库还能提供更加丰富的诊断信息,让分析结果更加可靠,为下一步分析提供指导信息。PerkinElmer所提供的DairyGuard奶粉分析仪是一个完整的解决方案,预置了用于奶粉检测的Adulterant Screen方法(以及相关的定量分析方法),所有功能都集成于简单的触屏操作界面。

参考文献

1. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. Dairy: *World Markets and Trade*. 25 July 2011.
2. United States Pharmacopoeia. *Food Fraud Database*. Web address: <http://www.foodfraud.org> (accessed November 2013).
3. United States Food and Drug Administration. Press release: *FDA Issues Interim Safety and Risk Assessment of Melamine and Melamine-related Compounds in Food*. October 3, 2008. Web address: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2008/ucm116960.htm> (accessed November 2013).
4. Sherri Turnipseed, Christine Casey, Cristina Nochetto, David N. Heller. *Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Infant Formula using LC-MS/MS*. US FDA Laboratory Information Bulletin 4421, October 2008.
5. Shaun MacMahon, Timothy H. Begley, Gregory W. Diachenko, Selen A. Stromgren. *A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of economically motivated adulteration in protein-containing foods*. *Journal of Chromatography A*, 1220 (2012), 101-107.

珀金埃尔默仪器(上海)有限公司
地址: 上海 张江高科技园区 张衡路1670号
邮编: 201203
电话: 021-60645888
传真: 021-60645999
www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表, 请访问<http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs>

版权所有 ©2013, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自所有者或所有者的财产。