

DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.12.025

鸭肉中金霉素残留量 LSSVR-同步荧光法测定^{*}

赵进辉 袁海超 刘木华 肖海斌 徐 将

(江西农业大学工学院,南昌 330045)

【摘要】 为实现鸭肉中金霉素残留含量的快速测定,提出了应用同步荧光法结合最小二乘支持向量回归(LSSVR)来建立鸭肉中金霉素残留含量的定量分析模型。首先应用三维同步荧光法对波长 250 ~ 450 nm 的同步荧光光谱进行分析,确定检测鸭肉中的金霉素含量的最佳波长差 $\Delta\lambda$ 为 70 nm;然后使用 sym8 小波的 2 层分解对原始同步荧光光谱进行光谱预处理,对预处理后的光谱采用遗传算法(GA)结合交互验证均方根误差(RMSECV)方法选择了 16 个波长作为检测模型的输入特征向量;最后对 LSSVR、BP 和 SVM_SteveGunn 3 种模型进行性能比较,以 LSSVR 模型的预测效果最好,其预测集的决定系数 R^2 和预测均方根误差分别为 0.949 1 和 2.566 0。试验结果表明,同步荧光法结合 LSSVR 模型检测鸭肉中的金霉素残留含量是可行的。

关键词: 同步荧光法 最小二乘支持向量回归 金霉素 小波 鸭肉

中图分类号: O657.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2012)12-0136-05

Determination of Aureomycin Content in Duck Meat Using LSSVR and Synchronous Fluorescence Spectroscopy

Zhao Jinhui Yuan Haichao Liu Muhua Xiao Haibin Xu Jiang

(College of Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract

In order to achieve the rapid prediction of aureomycin contents in duck meat, quantitative analysis models of aureomycin contents in duck meat were established by using synchronous fluorescence spectroscopy and LSSVR method. Firstly, synchronous fluorescence spectroscopies between 250 nm and 450 nm were analyzed by using 3-D synchronous fluorescence spectroscopy, and 70 nm was selected as the optimum wavelength difference. Secondly, the sym8 wavelet with two levels decomposition was used to complete the pretreatment of the original synchronous fluorescence spectroscopy, and 16 characteristic wavelengths were selected as the inputs of detection model combining with genetic algorithm and the root mean square error of cross-validation. Lastly, the performances of three models of LSSVR, BP and SVM_SteveGunn were compared. LSSVR model was optimal among them, and the determination coefficient R^2 and the root mean squared error of prediction samples were 0.949 1 and 2.566 0, respectively. The experimental results showed that it was feasible to predict the aureomycin contents in duck meat combining with synchronous fluorescence spectroscopy and LSSVR.

Key words Synchronous fluorescence spectroscopy, LSSVR, Aureomycin, Wavelet, Duck meat

收稿日期: 2012-04-25 修回日期: 2012-05-29

^{*} 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2008AA10Z209)、国家自然科学基金资助项目(31101295)、江西省教育厅科技资助项目(GJJ12244)和南方农业机械与装备关键技术省部共建教育部重点实验室开放研究项目

作者简介: 赵进辉,副教授,博士,主要从事图像处理与农畜产品无损检测研究,E-mail: zjhxiaocao@sina.com

通讯作者: 刘木华,教授,博士,主要从事农畜产品无损检测研究,E-mail: suikelmh@sina.com

引言

鸭肉因具有低脂肪、低胆固醇、高蛋白和营养均衡的特点,已成为深受消费者喜爱的一种肉类产品。目前,一些养殖户为了追求经济效益,常在鸭饲料中拌有金霉素等四环素类抗生素药物,导致大量抗生素残留在鸭体内,进而通过食物链等途径间接对人体健康和环境造成潜在的危害。以至于现在国际上已经将抗生素残留检测作为鸭肉食品安全品质检测项目之一,如中国规定鲜禽产品和冻禽产品中的金霉素残留限量不超过 $1 \text{ mg/kg}^{[1]}$ 。传统的抗生素药物残留检测方法,如酶联免疫分析法、微生物法、理化检测方法,因需对样品进行复杂的前处理,检测费时且对样品具有破坏性等特点,一般只能用于抽样检查,无法实现快速、大批量、在线的鸭肉商品化处理要求^[2-7]。因此,研究鸭肉中抗生素残留的快速检测方法具有重要的经济价值和社会意义。

同步荧光法具有灵敏度高、选择性好、光谱简化、窄化光谱带、减小散射光影响和减小光谱重叠现象等优点,尤其适合于多组分混合物的定性和定量分析^[8-9]。目前,已有学者利用荧光光谱技术进行了物体内抗生素残留测定研究。侯法菊等将荧光光度法用于人血清、尿液及牛奶中金霉素含量测定中^[10]。陈志敏等应用导数同步荧光法测定了猪肉提取液中强力霉素残留含量^[11]。张艳等应用硫酸氧化同步荧光法测定了猪肉中提取液的螺旋霉素残留^[12]。从已查阅的参考文献来看,目前对固体状态物体内的抗生素残留的荧光检测是先对物体内的抗生素进行化学提取,然后用荧光光谱法对提取液进行检测,这种方法和传统的抗生素药物残留方法相比较,虽然在检测速度上有较大提高,但还需要对样本进行破坏性检测,还不能满足快速、大批量的商品化处理的要求。因此,本文直接采集鸭肉样本表面的同步荧光光谱,结合遗传算法(GA)和最小二乘支持向量回归(LSSVR)来建立鸭肉中的金霉素残留含量的定量测定模型,为鸭肉中金霉素残留含量的快速、大批量的商品化检测打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

麻鸭(购于江西农业大学菜市场);盐酸金霉素标准品(纯度约为 90%,购于中国标准物质网);NaOH 分析纯;水为超纯水。

1.2 仪器设备

Cary Eclipse 荧光分光光度计(Varian, Inc., USA); FA1004B 型电子天平(精度为 0.1 mg,上海

上平仪器有限公司);JK-50B 型超声波清洗器(合肥金尼克机械有限公司);HH-6 型数显恒温水浴锅(上海浦东物理光学仪器厂)。

1.3 荧光光谱检测系统

荧光光谱检测系统示意图如图 1 所示。荧光光谱检测系统由荧光分光光度计、光纤及探头、样本箱、可升降载物台和计算机等组成。探头安装在距离测试样本表面上方 2.5 cm,且与样本表面垂直。采集样本的荧光光谱时在样本表面会形成一个直径约为 1.2 cm 荧光光斑。

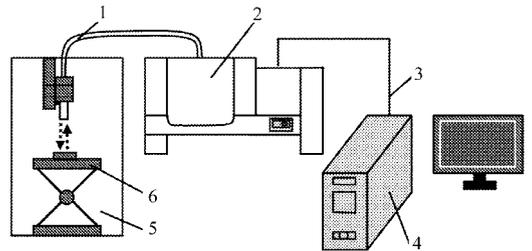


图 1 荧光光谱检测系统示意图

Fig. 1 Schematic illustration of fluorescence spectrum detection system

1. 光纤及探头 2. 荧光分光光度计 3. 数据线 4. 计算机
5. 样本箱 6. 可升降载物台

1.4 试验方法

从鸭身上取下鸭胸脯肉并剔除表面的膜,放入冰箱中冷冻。称取 10.0 mg 金霉素标准品,以超纯水稀释定容至 100 mL,超声溶解,配制成 100 mg/L 标准储备液,使用时用超纯水逐级稀释至所需质量浓度。将冷冻鸭胸脯肉切成长和宽约 1.5 cm、厚度约 0.2 cm 的小立方体。分别取不同体积金霉素标准溶液于棕色容量瓶中,加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 1 mL,用超纯水稀释定容至刻度,摇匀,得到 53 个质量浓度范围为 0.5 ~ 40 mg/L 的金霉素样本溶液,其统计结果如表 1 所示。将切好的鸭胸脯肉放入不同质量浓度的金霉素样本溶液中,在沸水浴中反应 45 min,冷却后放入冰箱中在 4℃ 的条件下储存。鸭肉浸泡 7 d 后,使之能够在单位体积鸭肉中尽可能地充分吸收等体积不同质量浓度的金霉素溶液,利用荧光光谱检测系统采集其同步荧光光谱。同步荧光光谱采集参数设置为:波长差 $\Delta\lambda 70 \text{ nm}$ 、PMT 探测器电压 800 V、激发和发射狭缝 5 nm、中等扫描速度,在波长 250 ~ 450 nm 范围内同步扫描。试验共获取 53 个样本,其中 40 个作为校正集样本,13 个作为预测集样本。

1.5 数据分析

用 Matlab 工具箱分析同步荧光光谱与鸭肉中的金霉素残留含量之间的关系。先用小波分析进行光谱预处理,然后用 GA 结合 RMSECV 法进行特征

表1 金霉素含量统计结果

Tab.1 Statistical results of aureomycin contents

项目	校正集	预测集
质量浓度范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.5 ~ 40.0	2.5 ~ 38.5
质量浓度均值/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	20.75	21.62
标准偏差	11.676 7	11.685 4
数量	40	13

波长的提取,最后应用 LSSVR 建立鸭肉中的金霉素残留含量的定量测定模型。

2 试验结果与分析

2.1 同步荧光光谱

按照试验方法,在 $\Delta\lambda$ 为 70 nm、激发波长为 250 ~ 450 nm 的条件下扫描金霉素标准溶液、不含金霉素的鸭肉和含金霉素的鸭肉同步荧光光谱。从图 2 可以看出,金霉素标准溶液的同步荧光峰是宽度为 300 ~ 400 nm 的宽谱峰,波峰波长大致为 344 nm。不含金霉素的鸭肉在波长 250 ~ 315 nm 存在一个明显的同步荧光宽谱峰,波峰波长大致为 285 nm,在波长 316 ~ 415 nm 同步荧光峰不明显。由此说明,金霉素标准溶液和不含金霉素的鸭肉同步荧光峰没有发生明显的重叠现象,为采用同步荧光法检测鸭肉中的金霉素含量提供了重要理论依据。鸭肉中金霉素同步荧光峰相对金霉素的标准溶液的同步荧光峰产生约 5 nm 的红移,鸭肉背景峰和金霉素的同步荧光峰得到了较好的分离。

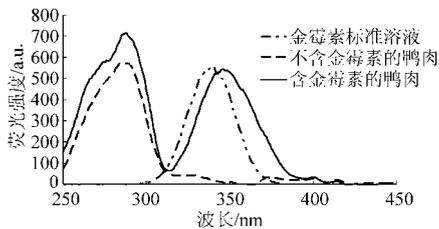


图2 样本的同步荧光光谱

Fig.2 Synchronous fluorescence spectroscopy of samples

2.2 波长差选择

选择合适波长差 $\Delta\lambda$ 直接关系到重叠的同步荧光光谱的分离效果和预测精度。为了获取较优的同步荧光光谱,测定含有金霉素的鸭肉样本的三维同步荧光光谱, $\Delta\lambda$ 分别为 55、60、65、70、75、80 和 85 nm。从图 3 可以看出,随着 $\Delta\lambda$ 增加,鸭肉背景峰的同步荧光强度呈现减弱的趋势,金霉素的同步荧光峰强度呈现先增大后减小的趋势。结果表明,在本研究的 $\Delta\lambda$ 范围内,鸭肉背景和金霉素的同步荧光峰得到了较好地分离,且在 $\Delta\lambda = 70$ nm 时,金霉素的同步荧光峰达到最强。综合分析,本研究选择

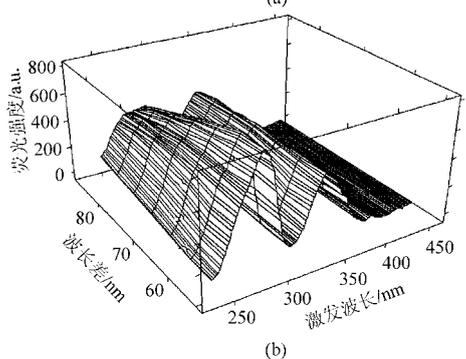
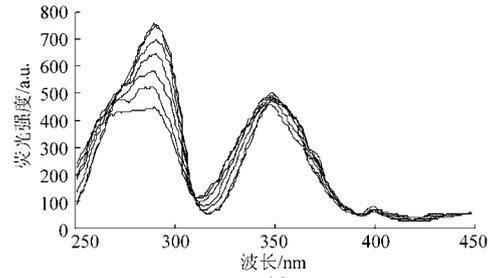


图3 含有金霉素的鸭肉样本的三维同步荧光光谱图

Fig.3 3-D synchronous fluorescence spectroscopy of duck meat samples with aureomycin

(a) 三维同步荧光光谱二维平面图

(b) 三维立体等角同步荧光光谱图

$\Delta\lambda = 70$ nm 进行试验。

2.3 基于小波的光谱预处理

由于样本背景、仪器和环境条件等因素的影响,在采集的荧光光谱中常包含一些与样品性质无关的噪声。为了消除这些噪声对建模的影响,采用 sym8 小波消噪方法消除噪声,进行了 2、3、4、5、6 共 5 层分解研究分析,以提高信号的信噪比。消噪效果一般用信噪比(SNR)和均方根误差(RMSE)作为衡量标准,信号的信噪比越高,均方根误差越小,消噪效果就越好^[13]。从表 2 可以看出,以 2 层分解时的信噪比最大,均方根误差最小,因此在后面试验中选择 2 层小波分解。

表2 不同层次分解的小波消噪效果

Tab.2 De-noising effect for different levels decomposition of wavelets

分解层数	信噪比	均方根误差
2	106.005 6	1.343 86
3	103.685 4	1.508 86
4	102.651 5	1.588 76
5	102.135 8	1.630 18
6	102.176 1	1.646 22

2.4 GA 结合 RMSECV 法的特征波长提取

由于全光谱一般包含大量对建模无用的波长,且全光谱的波长数据量大,会降低建模精度和运算

速度,因此本研究采用 GA 算法结合交互验证均方根误差(RMSECV)进行特征波长的提取,即运用 GA 算法对所选变量集合进行特征波长提取并作出 RMSECV 值绘制的曲线^[14-15]。当 RMSECV 值达到最小时,这时所对应的变量集合即为该次筛选的结果,通过循环筛选来进一步缩小有用信息变量的范围,当 RMSECV 不能再降低时,所选的变量组即最后结果。GA 算法的相关参数为:初始群体 30、变异概率 P_m 0.01、交叉概率 P_c 0.5,以 RMSECV 值构造 GA 算法的适应度函数,当迭代 100 次时本次迭代终止。表 3 给出了不同循环次数下 GA 算法提取特征波长。从表 3 可以看出,当循环次数达到 3 次时 RMSECV 值最小,当第 4 次循环时 RMSECV 值反而增大。因此,选择第 3 次循环条件下的 GA 算法提取结果作为最终的特征波长,被选择波长为 16 个,它们分别为 280.0、281.1、282.0、314.1、315.0、315.9、317.0、320.0、321.1、328.0、335.1、336.0、347.1、348.0、435.0 和 436.1 nm,波长压缩率为 91.959 8%。

表 3 不同循环次数下的 GA 算法提取特征波长

Tab.3 Extract feature wavelengths using GA algorithm at different cycle numbers

循环次数	被选择波长个数	RMSECV	压缩率/%
1	59	1.777 0	70.351 8
2	18	1.743 3	90.954 8
3	16	1.740 1	91.959 8
4	14	1.752 3	92.964 8

2.5 LSSVR 模型预测结果

根据 GA 结合 RMSECV 法优选出的 16 个特征波长作为 LSSVR 模型的输入,以径向基函数作为其核函数,采用交叉验证方法进行参数优化,鸭肉中金霉素含量的预测值与实测值之间的关系如图 4 所示。从图 4 可以看出,预测集的决定系数 R^2 和预测均方根误差 RMSEP 分别为 0.949 1 和 2.566 0,与全光谱相比,不仅入选的波长数由 199 个减少到 16 个,使模型得到简化,而且能提高预测模型的速度,使之满足鸭肉中金霉素含量快速测定要求。

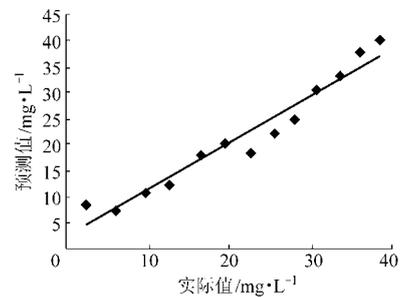


图 4 鸭肉中金霉素含量预测值与实测值之间的关系

Fig.4 Relationship between actual value and predictive value of aureomycin contents in duck meat

2.6 模型性能比较与讨论

为了客观的评价 LSSVR 模型的建模的效果,以优选的 16 个特征波长作为 LSSVR、BP 和 SVM_SteveGunn 模型的输入分别建立预测模型,不同模型的预测结果如表 4 所示。模型的预测效果强弱可以通过 R^2 和 RMSEP 来衡量,若预测模型的 R^2 越大, RMSEP 越小,说明该模型的预测能力越强。从表 4 可知,LSSVR 模型的预测效果最好,SVM_SteveGunn 模型预测效果次之,BP 模型的预测效果最差,表明同步荧光法结合 LSSVR 模型检测鸭肉中的金霉素残留含量的方法是可行的。

表 4 不同模型性能比较

Tab.4 Comparison of different models

模型	R^2	RMSEP
LSSVR	0.949 1	2.566 0
SVM_SteveGunn	0.889 4	5.140 6
BP	0.856 9	5.308 0

3 结论

(1)根据三维同步荧光法优选出检测鸭肉中的金霉素含量的最佳波长差 $\Delta\lambda$ 为 70 nm,并采用 GA 算法结合 RMSECV 选择了 16 个波长作为模型的输入特征向量。

(2)对 LSSVR、BP 和 SVM_SteveGunn 3 种模型的性能进行比较,以 LSSVR 模型的预测效果最好,其 R^2 和 RMSEP 分别为 0.949 1 和 2.566 0,表明同步荧光法结合 LSSVR 模型检测鸭肉中的金霉素残留含量的方法是可行的。

参 考 文 献

- GB 16869—2005 鲜、冻禽产品[S]. 2005.
GB 16869—2005 Fresh and frozen poultry product [S]. 2005. (in Chinese)
- Huet A C, Charlier C, Tittlemier S A, et al. Simultaneous determination of (Fluoro)quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(8): 2 822 ~ 2 827.
- Shen H Y, Jiang H L. Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using

- ELISA, HPLC-LJVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 535(1~2): 33~41.
- 4 Ang C Y W, Luo W H, Kiessling C R, et al. A bridging study between liquid chromatography and microbial inhibition assay method for determining amoxicillin residues in catfish muscle[J]. *Journal of AOAC International*, 1998, 81(1): 33~39.
- 5 Pikkemaat M G, Dijk S O, Schouten J, et al. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: the nouws antibiotic test (NAT-screening) [J]. *Food Control*, 2008, 19(8): 781~789.
- 6 Mohammad M K, Sang H L, Hyun S L, et al. A batch chemiluminescence determination of enoxacin using a tris-(1,10-phenanthroline) ruthenium (II)—cerium(IV) system [J]. *Journal of Fluorescence*, 2006, 16(4): 535~540.
- 7 Pikkemaat M G. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(4): 893~905.
- 8 葛立新,高淑梅,刘思斌. 基于紫外光诱导血浆的三维同步荧光光谱共振能量转移及能量再吸收的分析[J]. *光子学报*, 2011, 40(10): 1500~1504.
Ge Lixin, Gao Shumei, Liu Sibin. Three-dimensional UV-induced plasma synchronous fluorescence spectrum resonance energy transfer and energy analysis of resorption[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, 40(10): 1500~1504. (in Chinese)
- 9 王春艳,江华鸿,高居伟,等. 基于三维同步荧光光谱确定原油样品浓度的新方法[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(6): 1080~1083.
Wang Chunyan, Jiang Huahong, Gao Juwei, et al. A new method for concentration determination of crude oil sample using three-dimensional synchronous fluorescence spectra [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, 26(6): 1080~1083. (in Chinese)
- 10 侯法菊,王玉宝,苗延虹,等. 荧光光度法研究修饰 β -环糊精与Eu(III)-金霉素体系的相互作用及其应用[J]. *分析科学学报*, 2011, 27(2): 231~234.
Hou Faju, Wang Yubao, Miao Yanhong, et al. Fluorescence study of the interaction between the modified β -cyclodextrin and europium (III)-chlortetracycline system and its analytical application[J]. *Journal of Analytical Science*, 2011, 27(2): 231~234. (in Chinese)
- 11 陈志敏,陈冠华,郝庆红,等. 导数同步荧光法测定猪肉中强力霉素残留[J]. *河北大学学报:自然科学版*, 2011, 31(1): 57~62.
Chen Zhimin, Chen Guanhua, Hao Qinghong, et al. Determination of doxycycline residue in pork by derivative synchronous fluorimetry[J]. *Journal of Hebei University: Natural Science Edition*, 2011, 31(1): 57~62. (in Chinese)
- 12 张艳,陈冠华,郝庆红,等. 硫酸氧化同步荧光法测定猪肉中的螺旋霉素残留[J]. *河北大学学报:自然科学版*, 2010, 30(1): 64~68.
Zhang Yan, Chen Guanhua, Hao Qinghong, et al. Determination of spiramycin residue in pork by synchronous fluorimetry with sulphuric acid oxidation [J]. *Journal of Hebei University: Natural Science Edition*, 2010, 30(1): 64~68. (in Chinese)
- 13 蔡剑华,王先春,胡惟文. 基于EMD的土壤有机质含量近红外光谱检测[J]. *农业机械学报*, 2010, 41(9): 182~186.
Cai Jianhua, Wang Xianchun, Hu Weiwen. Near-infrared spectrum detection of soil organic matter content based on empirical mode decomposition[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2010, 41(9): 182~186. (in Chinese)
- 14 周竹,李小昱,高海龙,等. 马铃薯干物质含量高光谱检测中变量选择方法比较[J]. *农业机械学报*, 2012, 43(2): 128~133.
Zhou Zhu, Li Xiaoyu, Gao Hailong, et al. Comparison of different variable selection methods on potato dry matter detection by hyperspectral imaging technology [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2012, 43(2): 128~133. (in Chinese)
- 15 冯晓莉,仇宝云,杨兴丽,等. 大型泵站运行优化方法及其应用[J]. *排灌机械工程学报*, 2011, 29(2): 127~132.
Feng Xiaoli, Qiu Baoyun, Yang Xingli, et al. Optimal methods and its application of large pumping station operation [J]. *Journal of Drainage and Irrigation Machinery Engineering*, 2011, 29(2): 127~132. (in Chinese)