

科技创新研究项目技术报告

——研究成果简介附件报告

面粉及其制品质量安全的大规模 快筛技术与装备

第一阶段（2022.8-2022.10）

许长华 教授

上海海洋大学食品学院

二零二二年十一月十一日

目 录

1	面粉中常见毒害因子的多分子光谱多维原位快筛技术	1
1.1	引言	1
1.2	多分子光谱多维原位快筛技术的建立	2
2	正常面粉及其单一毒害因子的光谱指纹特征提取与识别	3
2.1	引言	3
2.2	实验原料与方法	3
2.2.1	仪器及参数	3
2.2.2	实验原料及试剂材料	3
2.2.3	预处理	4
2.2.3.1	三级红外光谱	4
2.2.3.2	PLS 建模	4
2.2.4	数据采集	4
2.2.4.1	三级红外光谱	4
2.2.4.2	PLS 建模	5
2.3	结果与分析	5
2.3.1	三级红外光谱鉴定	5
2.3.2	单一毒害因子样品的 PLS 模型分析	10
2.3.3	模型外部独立验证	12
3	多组分非法添加物的同时检测与识别	14
3.1	引言	14
3.2	实验材料与方法	14
3.2.1	仪器及参数	14
3.2.2	实验原料及试剂材料	14
3.2.3	预处理	14
3.2.3.1	红外高光谱成像	14
3.2.3.2	PLS 建模	15
3.2.4	数据采集	16
3.2.4.1	红外高光谱成像	16
3.2.4.2	PLS 建模	16
3.3	结果与分析	17
3.3.1	红外高光谱成像-同时进行毒害因子的空间检测	17
3.3.2	PLS 建模-微量毒害因子的光谱定量分析	18
4	后续配套设备与软件研发	22

4.1 面粉毒害因子的智能化现场检测设备雏形研发	22
4.2 仪器配套软件及模型	23
5 总结与展望	24
5.1 总结	24
5.2 展望	24
参考文献	26

上海市粮食和物资储备科技创新研究项目成果未经允许不得翻印

1 面粉中常见毒害因子的多分子光谱多维原位快筛技术

1.1 引言

随着国家“国民营养计划（2017-2030）”的实施和上海食品安全社会共治新形势对食品品质安全要求的提高，面粉产业已经站到了以安全、健康、绿色为发展目标的新起点。近年来，不法商贩在面粉产品中刻意添加溴酸钾、吊白块、荧光增白剂、硼砂、复合泡打粉等一系列有毒有害非法添加物的现象逐渐被媒体曝光^[1]，面粉产品品质安全问题也成为了整个社会关注的热点，但是针对这些有毒有害（强致癌、致智障等）非法添加物，尚缺乏较为系统完备的快速检测技术或标准^[2]，如五得利面粉“硼砂门”乌龙事件（目前国标检测方法并不能直接检测硼砂），加大了消费者对于生产企业的的不信任^[3,4]。当今，真菌毒素污染是威胁世界各国粮食质量安全的常见重要因素，也是危害面粉品质安全的主要生物源因子之一，其中呕吐毒素是小麦面粉中污染最为普遍的一种真菌毒素，会引起头晕、头疼、厌食、腹泻、呕吐等中毒症状^[5,6]，甚至会损害身体的造血系统而造成死亡^[7]。《食品中真菌毒素限量》规定了小麦、麦片和小麦粉中呕吐毒素的限量均为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。以上所述的毒害因子和非法现象对中国面粉产业的健康发展造成了广泛的影响和深远的危害^[8]。

2021 年我国成为小麦的最大生产国，产量达超 6800 万吨，其中约 90%加工成面粉，然后进一步制作为各类面粉制品。随着近年来面粉产品品质安全问题的频发，各国对面粉相关毒害物质的检测高度重视，多种常见的面粉中毒害物质定性定量检测的相关方法等信息在表 1 中列出^[9-15]。然而，这些方法均需要对样品进行前处理，繁琐的操作过程同时需要高水平的专业人士以及有丰富经验的操作人员，且多为事发后针对性检测，难以满足海量面粉品质、安全等多种指标的同时快速筛查，往往以偏概全、后知后觉、污染环境。由于面粉产品作为复杂混合物体系，具有多样性、整体性及其成分组成的复杂性，检测的难点主要在于可用添加物多且未知。故需要契合面粉特性的操作简单、通用性强、低成本、多组分同时检测的现场快速检测技术，构建快速、无损、直接、智能一体化的检测体系，消除问题食品于消费前，进而实现面粉产业的源头化可控管理，以保障面粉品质与安全。

表 1 面粉中六种常见毒害因子的相关国标检测方法信息

名称	检测方法	优点	缺点
呕吐毒素	TCL、HPLC、GC-MS	定量准确度高	半定量、提取效率低
甲醛合次硫酸氢钠	HPLC、蒸馏滴定法	操作简单	不能准确定量
四硼酸钠	ICP-MS、化学试剂法	定量准确度高	成本高耗时长、易受杂质干扰
溴酸钾	离子色谱法、HPLC	准确度、灵敏度高	成本高、前处理繁琐耗时
硫酸铝钾	ICP-MS、化学试剂法	回收率、精密度高	仪器精密易损、操作复杂耗时
荧光增白剂 OB-1	LC-MS/MS	定量准确度高	成本高、需要技术人员、耗时长

1.2 面粉中常见毒害因子的多分子光谱多维原位快筛技术的建立

本项目主要利用多分子红外（multi-molecular infrared, MM-IR）光谱针对性地对面粉中 6 种毒害因子进行快速筛查检测。MM-IR 是红外光谱宏观指纹技术的扩展概念，是傅里叶变换红外（FT-IR）光谱及其成像技术，二阶导数红外（SD-IR）光谱，以及与新型二维相关红外增强技术（二阶导二维相关红外（SD-2DCOS-IR）光谱，移动窗口二维相关红外（MW-2DCOS-IR）光谱和二痕二维相关红外（2T-2DCOS-IR）等^[16-19]）相结合的一种综合方法。MM-IR 可以显著从空间，光谱定性和定量分析等各个方面，提高目标成分分析的分辨率，并提升低浓度化合物甚至微量添加物的检测限，揭示复杂系统中的详细信息。

基于以上开发的方法，本项目聚焦面粉产品生产、流通、贮存、销售过程中的品质指标及其可能含有的多种常、微量非法添加物和毒害物质（荧光增白剂、溴酸钾、硼砂、呕吐毒素等），系统深入研究与开发操作简便、通用性强、低成本、高通量、多目标物的面粉中常见毒害因子的多分子光谱多维原位快筛技术，针对面粉中单一毒害因子和多组分的毒害因子进行检测，获得面粉中微量添加物的光谱指纹特征，并达到多组分检测的效果，以实现面粉毒害因子实际现场智能化快速检测，积极对接“健康中国 2030”国家战略，推动上海乃至全国面粉产品安全转型升级，占据国际领先地位，长久高效保障我国面粉产品安全和公众健康。

2 正常面粉及其单一毒害因子的光谱指纹特征提取与识别

2.1 引言

不断涌现的面粉中毒害因子现象使得消费者对食品安全产生了担忧。不法商贩通常在面粉中添加甲醛合次硫酸氢钠（吊白块, Rongalit, Rg）、溴酸钾（Potassium bromate, PB）、四硼酸钠（硼砂, Borax, Bx）、硫酸铝钾（Aluminum potassium sulfate, APS）和荧光增白剂 OB-1（Fluorescent brighter OB-1, FB）等毒害因子，以改变面粉的外观和品质，同时因生长/生产环境导致的呕吐毒素（DON）含量超标也是面粉品质安全检测中的一大难题。由于来自样品复杂混合物体系中不同成分混合信号的影响，采用常规或国标技术检测这些毒害因子因需要繁杂的分离提取等预处理操作往往耗时费力。本研究采用“多分子红外光谱法”，包括红外光谱（FTIR）、二阶导数谱（SD-IR）和二维相关光谱（2DCOS-IR）融合结合化学计量学等一系列提高分辨率的方法^[20]对各种面粉原料直接进行快速检测，无需额外溶剂提取就可以对其进行整体解析，多层次获取各类成分的化学信息和含量信息^[21, 22]，构建常见面粉产品光谱图形码数据库，进行面粉产品以及特定成分（如毒害因子）的同时鉴定与定量。

2.2 实验原料与方法

2.2.1 仪器及参数

傅里叶变换红外光谱仪和成像系统（Spotlight 400，英国 PerkinElmer）配备了衰减全反射（ATR）附件和 DTGS 检测器，范围为 $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ ，分辨率为 4 cm^{-1} 。通过 32 次扫描和 0.2 cm/s^{-1} 的 OPD 速度记录光谱。扫描时会减去 H_2O 和 CO_2 的干扰。

2.2.2 实验原料及试剂材料

面粉原料购自上海超市。面粉首先分别通过 GB/T 20188-2006，GB 5009.275-2016, GB/T 20188-2006, GB5009.182-2017 和 SNT4396-2015 的中国国家标准认证，

交叉验证是否存在吊白块、溴酸钾、硼砂、硫酸铝钾、荧光增白剂和呕吐毒素。

化学标准品吊白块（甲醛合次硫酸氢钠，AR）、硼砂（四硼酸钠，AR）、溴酸钾（AR）、硫酸铝钾（AR）、荧光增白剂 OB-1（AR）和呕吐毒素（AR）购自国药化学试剂有限公司。

2.2.3 预处理

2.2.3.1 三级红外光谱

将 Rg, PB, Bx, AP, FB 和 DON 分别按比例与面粉混合，DON 的浓度范围为 0.1ppm, 0.2 ppm, 0.5 ppm, 0.75 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm 和 5 ppm, 其余毒害因子的最终浓度范围为 2ppm, 6ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 50ppm, 70ppm, 90ppm, 100ppm（毒害因子/面粉），然后分别密封并用微涡旋混合设备混合 30 分钟，最后过 150 目筛。此外，本文采用 SD-2DCOS IR 分析毒害因子在面粉样品种的实际特征峰，为了使代表毒害因子的自动峰更明显，在 SD-2DCOS IR 中样品的最终浓度比用于定量分析的样品更高，分别为 300ppm, 500ppm, 700ppm, 900ppm, 1000ppm, 1200ppm, 1500ppm 和 2000ppm。

2.2.3.2 PLS 建模

通过 2.2.3.1 的方法将 6 种毒害因子与面粉分别混合，每组样品中重复 15-20 次。利用 2.2.3.1 中毒害因子浓度范围的样品分别进行 PLS 建模。

2.2.4 数据采集

2.2.4.1 三级红外光谱

通过 ATR 附件测量面粉样品以获得原始光谱。将所获原始光谱数据使用 Perkin - Elmer spectrum（版本 10.6.4）光谱软件进行基线校正和 Savitzky-Golay 多项式拟合（13 点平滑）处理获得二阶导数谱图。在本研究中，所有 2DCOS-IR 光谱均由不同浓度样品的二阶导数谱图计算得出，并由 MATLAB 2016a（The MathWorks, Natick, MA, USA）使用自制脚本执行。

2.2.4.2 PLS 建模

将所有样品按 2:1 的比例分为校正集和验证集。偏最小二乘 (PLS) 法定量预测模型采用 Spectrum Quant (PerkinElmer Instrument, Inc.) 进行分析。此外, 使用 t 检验验证预测值的可靠性。

2.3 结果与分析

2.3.1 三级红外光谱鉴定

整体来看, 小麦面粉 $4000\sim 650\text{ cm}^{-1}$ 范围内的中红外谱图比较相似, 存在较多的共同谱峰, 它们的峰高、峰形和出峰的位置差异不是很大。在 $3300\sim 2700\text{ cm}^{-1}$, 3280 cm^{-1} 和 2927 cm^{-1} 附近的峰, 主要是 -C=N , O-H 和脂肪族 $\text{C-H}^{[23]}$ 的伸缩振动引起的, 它们在小麦面粉中比较常见。 $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 处主要是由脂质、脂肪酸中 C=O 对称伸缩振动和蛋白质酰胺 I 带 (1646 cm^{-1})^[24]。由于糖类中的 C-OH 伸缩振动会使光谱在 $1200\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 附近出现多个吸收峰, 而 $1000\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 则出现多个强吸收峰, 包括 C=C 和 C-H 平面外弯曲振动, 这个波段在大约 997 cm^{-1} 处吸光度达到最大峰值, 主要是氢化葡萄糖环^[25]的 O-C 伸缩振动。然而, 再与 DON 的标准光谱相比, 仅仅通过比较 FT-IR 光谱中的吸收峰并不能直接识别 DON 在复杂系统中的痕量微弱信号(图 1)。随着 DON 浓度的增加, 由于 DON 在小麦粉中的含量相对较低, 峰的形状和位置没有显著差异。因此, 为了进一步揭示不同浓度小麦面粉中 DON 的变化规律, 计算并分析了相应的小麦面粉的 SD-IR, 从而进一步提高其分辨率。

二阶导数谱 (SD-IR) 通常用来揭示谱图中被掩盖的吸收峰。简而言之, 导数光谱是原始吸收光谱的微分。原始光谱的重叠谱带可以通过微分解决, 因为随着微分阶数的增加, 偶数导数谱的谱带变得更窄。因此, 通常用二阶导数光谱揭示复杂混合物红外光谱的隐藏信息。在不同浓度毒害因子样品的 SD-IR 谱中可以看到: 低浓度到高浓度毒害因子的样品谱图仅在峰强度上有微小差别, 峰强变化没有规律性, 并且其出峰位置也均与正常面粉相同, 说明在 SD-IR 谱中也没有毒害因子的直接信息 (图 2)。因此, 不同毒害因子浓度的样品差异需要被放大 (图 1 与图

2 中均以 DON 为添加物举例,其他添加物样品的谱图与 DON 得到了同样的效果,故此处不进行展示)。

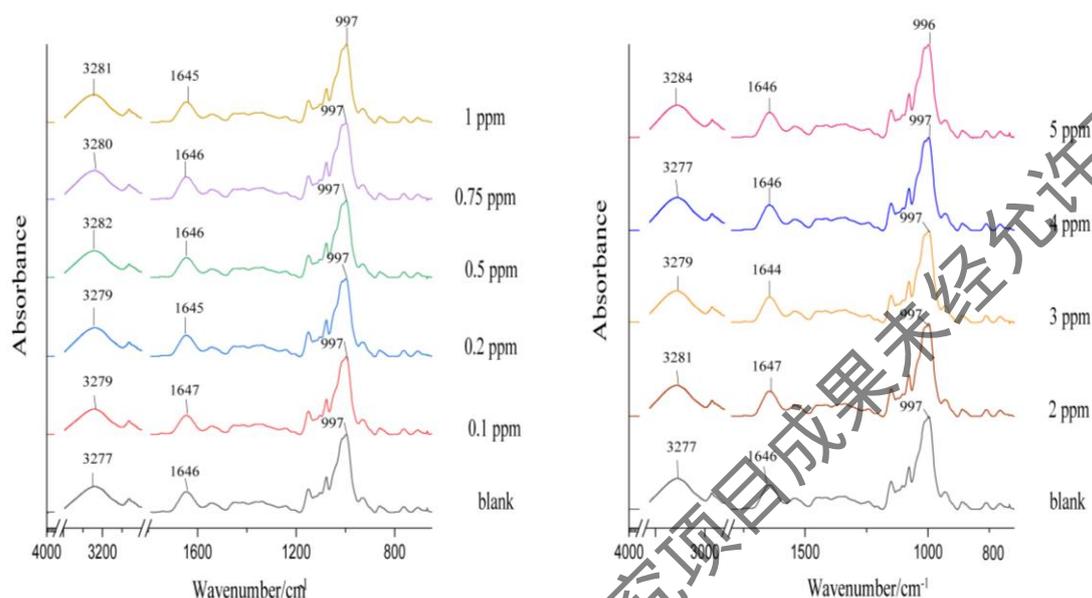


图 1 添加不同浓度毒害因子与正常面粉的红外光谱对比

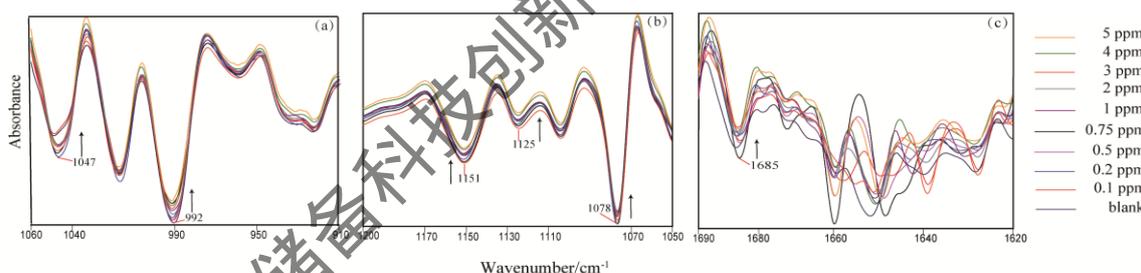


图 2 添加不同浓度 Rg 的面粉样品的二阶导数红外光谱 (2-100 ppm)

同时,在制作二维相关光谱之前要对原始光谱进行相应的谱图处理,以消除噪音干扰。但是无论是基线校正还是光谱平滑都会使光谱包含的样品信息受到影响,因此在噪音影响不明显的情况下一般不需要进行平滑处理。常见的同步 2DCOS-IR 光谱对角线上的峰为自动峰,自动峰值始终为正,因为变量的频谱强度变化与其自身相同,自动峰值的幅度反映了扰动下变量的变化程度。本研究中,基于轻微的扰动(毒害因子浓度的增加),通过 2DCOS-IR 分析动态光谱,理论上可以揭示毒害因子浓度的动态变化^[26]。尽管如此,面粉中的其他化合物仍可能掩盖毒害因子的具体信息。为了找到复合物中毒害因子的特征峰,本研究用 SD-IR 光谱(SD-

2DCOS-IR) 和群峰比对方法 (group-peak matching) 进行了 2DCOS-IR 分析, 获得了较高的光谱分辨率。群峰比对法是根据样品中目标物特征峰的位置和数量对目标物进行识别的一种光谱分析方法, 当且仅当样品有多个峰与已知物或标准品相对应时, 才能确定该样品与目标物为同一物质。

本研究使用了三种不同浓度范围的毒害因子样品获得的 SD-2DCOS IR (范围 1: 300 ppm, 500 ppm, 700 ppm, 900 ppm; 范围 2: 700 ppm, 900 ppm, 1200 ppm, 1500 ppm; 范围 3: 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm, 2000 ppm) 来解释样品自动峰的微小变化。这三个范围涵盖了面粉市场上非法添加的大多数情况。SD-2DCOS IR 显示出了从窄范围 (范围 1, 范围 2) 到宽范围 (范围 3) 的多个相似的自动峰, 表明自动峰是由于毒害因子的存在而引发的。

在图 3(A) 中, 含有 Rg 的样品主要自动峰区域在 850 cm^{-1} 到 1150 cm^{-1} 之间, 通过与 Rg 标准品特征峰进行比较, 发现 $1030\text{-}1031\text{ cm}^{-1}$, $1006\text{-}1007\text{ cm}^{-1}$, $966\text{-}968\text{ cm}^{-1}$ 波段为其对应的特征峰, 从而证明 Rg 在面粉中的特征峰; 图 3(B) 显示了含有 PB 样品的 SD-2DCOS IR 光谱, 其主要自动峰区间在 750 cm^{-1} 到 1000 cm^{-1} 之间, 对应 PB 标准品的特征峰波段有 $934\text{-}935\text{ cm}^{-1}$, $850\text{-}856\text{ cm}^{-1}$, $837\text{-}838\text{ cm}^{-1}$, $789\text{-}793\text{ cm}^{-1}$, $764\text{-}765\text{ cm}^{-1}$; 图 3(C) 为 Bx 的 SD-2DCOS IR 光谱, 主要自动峰区间在 900 cm^{-1} 到 1500 cm^{-1} 之间, 对应 Bx 标准品的特征峰波段有 $1403\text{-}1407\text{ cm}^{-1}$, $1347\text{-}1352\text{ cm}^{-1}$, 1134 cm^{-1} , $1123\text{-}1124\text{ cm}^{-1}$, $1072\text{-}1074\text{ cm}^{-1}$, $987\text{-}996\text{ cm}^{-1}$; 在图 3(D) 中, 含有 APS 的样品主要自动峰区域在 850 cm^{-1} 到 1250 cm^{-1} 之间, 与 APS 标准品对应的特征峰波段有 1192 cm^{-1} , 1134 cm^{-1} , $1123\text{-}1124\text{ cm}^{-1}$, $1088\text{-}1091\text{ cm}^{-1}$, $1062\text{-}1063\text{ cm}^{-1}$, $984\text{-}985\text{ cm}^{-1}$; 图 3(E) 中的含 FB 面粉样品 SD-2DCOS IR 光谱主要自动峰区间为 $700\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, 对 FB 标准品的特征峰波段有 $1606\text{-}1613\text{ cm}^{-1}$, $1511\text{-}1517\text{ cm}^{-1}$, $1487\text{-}1494\text{ cm}^{-1}$, $1427\text{-}1433\text{ cm}^{-1}$, $1414\text{-}1417\text{ cm}^{-1}$, $1375\text{-}1377\text{ cm}^{-1}$, 1208 cm^{-1} , $888\text{-}894\text{ cm}^{-1}$, $754\text{-}760\text{ cm}^{-1}$, $716\text{-}723\text{ cm}^{-1}$; 同理, 可得含 DON 面粉样品 SD-2DCOS IR 主要自动峰区域为有 $740\text{-}710\text{ cm}^{-1}$ 、 $880\text{-}820\text{ cm}^{-1}$ 、 $1180\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ 和 $1730\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ 。由此可以得出, 每个毒害因子在 SD-2DCOS IR 光谱均有多个与标准品对应的自动峰, 根据群峰比对原则, 可以证明这些特征峰确实为面粉中毒害因子的特征峰, 这些在普通 FT-IR 和 SD-IR 谱图中不能得到的隐藏信息能够在

SD-2DCOS IR 光谱中揭示出来，印证了三级红外光谱在分析微量面粉毒害因子的可能性。

然而，由于样品中的面粉含量很高，自动峰肯定会包含一部分面粉的信息。以上得到的面粉毒害因子特征峰并不一定全部由毒害因子而引发，也有可能是面粉中的一些组分引起的^[27]。因此，通过将不同样品二维相关光谱中的自动峰与毒害因子特征峰进行比对筛选，我们得到了 6 种毒害因子的实际特征峰（表 2）。得出的实际特征峰是毒害因子在面粉样品光谱中体现的真实信息，这证明了 SD-2DCOS-IR 可以揭示复杂混合物中的隐藏信息（微量添加）。因此，在本研究中，每个毒害因子都有自己的对面粉光谱的特定的影响区域，在图 4 中就能表现出来。它们的影响区域不一样，影响的范围大小也不一样。如果要针对性地检测某种毒害因子，可以根据该毒害因子的实际特征峰选择波段。

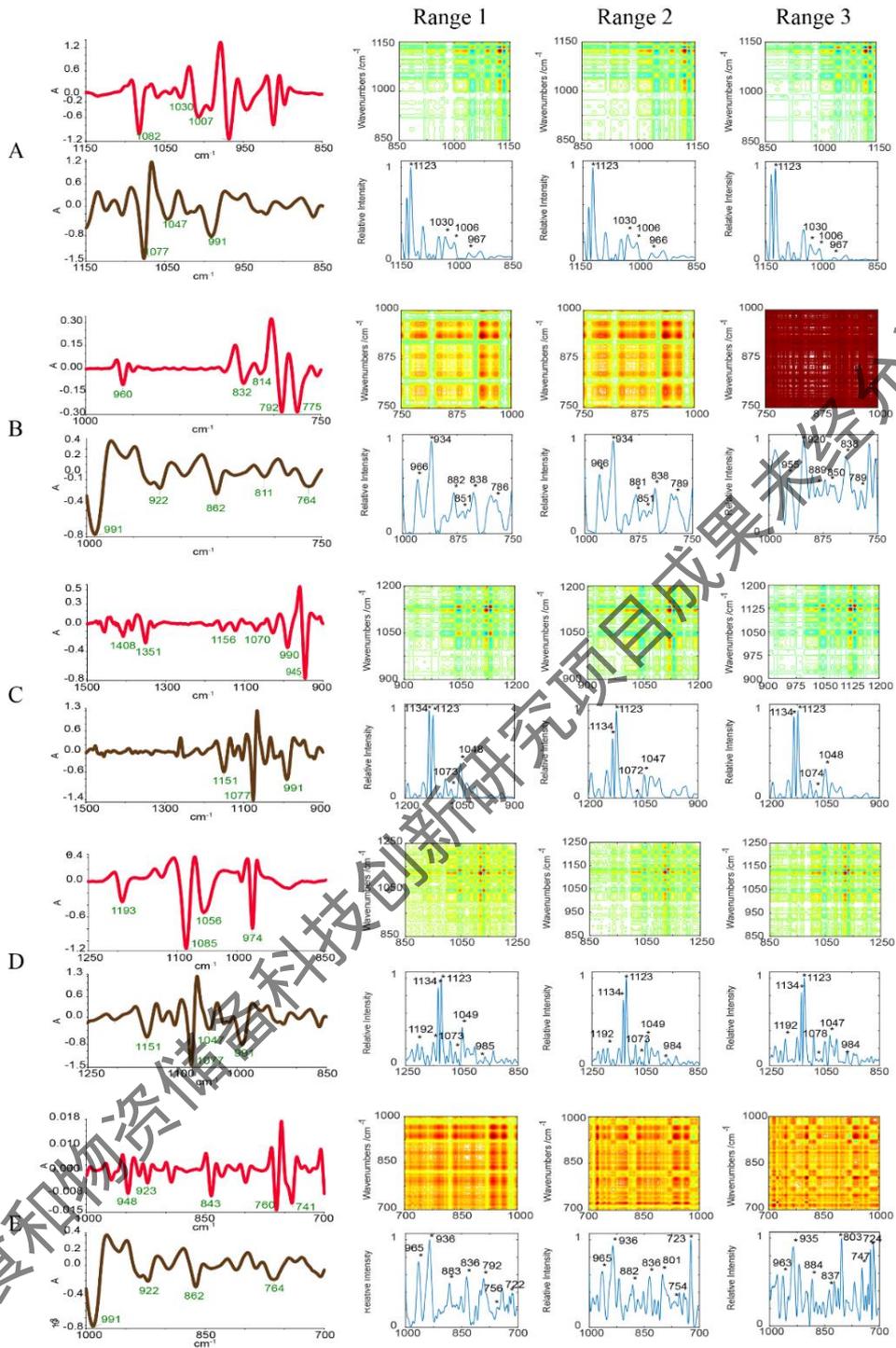


图 3 包含不同毒害因子的面粉样品的红外光谱和 SD-2DCOS-IR。(A: Rg, B: PB, C: Bx, D: APS, E: FB; 左: 毒害因子(上侧)和面粉(下侧)的红外光谱; 右: 不同的浓度范围内的 SD-2DCOS IR)

表 2 六种毒害因子的实际特征峰

毒害因子	实际特征峰 (cm ⁻¹)
Rg	1030-1031, 1006-1007, 966-968
PB	850-856, 837-838, 789-793
Bx	1403-1407, 1347-1352, 1072-1074, 987-996
Aps	1192, 1088-1091, 1062-1063
FB	1606-1613, 1511-1517, 1487-1494, 1427-1433, 1414-1417, 1375, 1377, 1208, 888-894, 754-760, 716-723
DON	1685-1682, 1068, 1031, 1047-1043, 951, 971

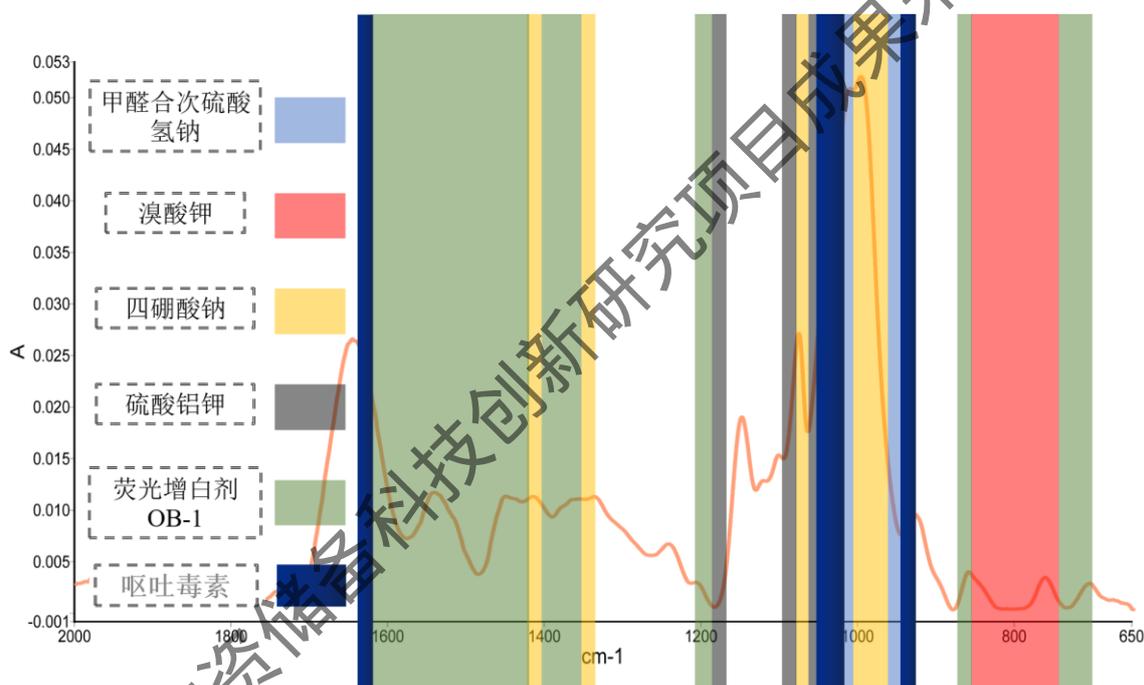


图 4 不同毒害因子在面粉样品红外光谱中的特征峰区域

2.3.2 单一毒害因子样品的 PLS 模型分析

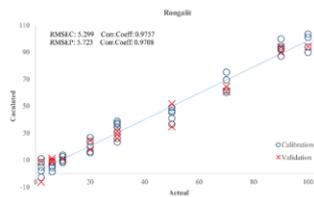
本研究通过 PLS 回归模型对 6 种毒害因子的单一添加情况进行定量分析。PLS 通常被用于处理数据中的特定问题，尤其是小数据集，缺失值和多重共线性问题。尽管类似于主成分分析（PCA）回归，但它被认为是多元线性回归和 PCA 回归方法的更好替代方法，因为它提供了更优化的模型参数，该参数不会随着新的校准样品而改变^[28]。

表 3 总结了用于建立微量毒害因子定量模型的 FT-IR 光谱参数。在本研究中，所构建模型的预测值接近面粉中各毒害因子浓度的实际值（图 6），吊白块校正集中的相关系数为 0.9757，均方根校正误差（RMSEC）为 5.299，验证集中的相关系数为 0.9708，均方根预测误差（RMSEP）为 5.723，为了得到最佳的定量模型，PLS 因子数为 5；PB 校正集中的相关系数为 0.9242，RMSEC 为 9.997，验证集中的相关系数为 0.9661，RMSEP 为 9.137，PLS 因子数为 1；Bx 校正集中的相关系数为 0.9710，RMSEC 为 5.879，验证集中的相关系数为 0.9062，RMSEP 为 12.565，PLS 因子数为 6；APS 校正集中的相关系数为 0.9688，RMSEC 为 6.208，验证集中的相关系数为 0.9516，RMSEP 为 7.825，PLS 因子数为 6；OB-1 校正集中的相关系数为 0.9768，RMSEC 为 5.188，验证集中的相关系数为 0.9581，RMSEP 为 7.023，PLS 因子数为 5；DON 校正集中的相关系数为 0.9490，RMSEC 为 0.5263，验证集中的相关系数为 0.9161，RMSEP 为 0.7170，PLS 因子数为 5。

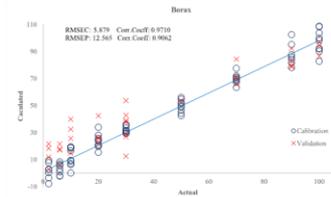
表 3 PLS 模型的部分参数

参数	说明
光谱范围	始:4000 cm ⁻¹ , 终: 650 cm ⁻¹
校正	二阶导数
归一化	标准正态校正
加权	仪器响应加权, 中红外黑体加权
平滑	10 点

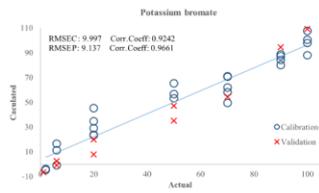
甲醛合次硫酸氢钠



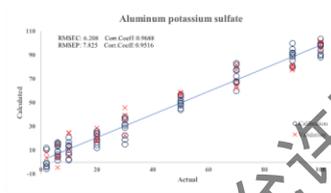
四硼酸钠



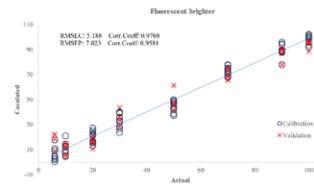
溴酸钾



硫酸铝钾



荧光增白剂 OB-1



呕吐毒素

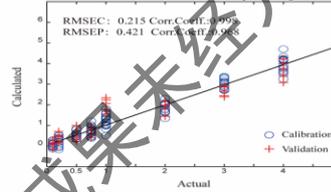


图 6 六种非法添加物的 PLS 定量模型 (单添加)

2.3.3 模型外部独立验证

基于上述定量预测模型所求得样品的预测值，以呕吐毒素为例，进行验证面粉中毒害因子含量的准确性和适用性(分别配制 0.75、1、3 mg/kg 进行准确性检测，高效液相测得 3 组平行求平均，红外预测模型每组设 5 个重复并求平均，详见表 4)。由于小麦面粉中呕吐毒素的添加浓度比较低，预测值与实际值之间略有偏差。采用 t 分布理论中 t-test 临界值表对样本的实测值进行进一步统计分析，从而考察预测值与实测值之间的差异。根据 $f=n-1=4$, $\alpha=0.05$, 和 $t(1-\alpha/2; f=n-1)=t(0.975; 4)=2.776$, 样本 A、B、C 的 t 绝对值也小于 2.776, 说明 A、B、C 组的标准差和显著性、预测值均无显著性差异, 模型预测数值与 HPLC 检测值的标准偏差较小 ($SD<0.1$), 且相关系数均达到 0.99 以上, 说明模型预测可信度较高 (表 5)。

表 4 小麦面粉中 DON 实际添加量、HPLC 测定值和 FTIR 模型预测值的统计表

实际值 (ppm)	HPLC		FTIR					平均值 (ppm)
	预测值 (ppm)		1	2	3	4	5	
0.75	0.77		0.90	0.85	0.52	0.50	0.82	0.72
1	1.02		0.97	1.08	1.08	1.11	0.97	1.04
3	3.07		3.30	3.61	3.57	2.83	2.92	3.25

表 5 小麦面粉中 DON 含量定量模型的准确性检验

	SD	RSD	f	t	Coff.
IR1-S1	0.093	13.65%	4	0.799	
IR2-S2	0.030	2.91%	4	1.405	0.9987
IR3-S3	0.174	5.57%	4	1.526	
IR1-HPLC1	0.107	15.49%	4	-0.920	
IR2-HPLC2	0.016	1.51%	4	0.736	0.9988
IR3-HPLC3	0.124	3.94%	4	1.092	
S1-HPLC1	0.014	1.86%	4	1.436	
S2-HPLC2	0.014	1.40%	4	0.850	0.9999
S3-HPLC3	0.049	1.63%	4	0.658	

3 多组分非法添加物的同时检测与识别

3.1 引言

在实际生产、储存、销售过程中，面粉中可能同时添加多种非法添加物或者需要针对多种成分进行快速筛查。因此，本项目利用融合了图像和光谱的高光谱成像技术，从空间分辨的角度对面粉毒害因子进行直接检测，获得面粉样本的空间信息、光谱信息并大幅度提高检测限，实现对多种常、微量异杂物的同时分析^[29]；通过结合化学计量学或大数据融合算法进一步构建定性判别和定量测定的数学模型对大量样本进行多组分快速定量分析与准确识别。该技术不仅可对面粉进行整体和微区检测，而且可实现整体成分组和多种特定成分的同时定性定量分析^[30]，一次性解决关于面粉是不是（毒害因子种类）和是多少（成分含量）的关键问题，而且具有分析效率高、样品无需预处理、操作简便、便于实现智能化现场检测分析等特点。

3.2 实验材料与方法

3.2.1 仪器及参数

傅里叶变换红外光谱仪和成像系统(Spotlight 400, 英国 PerkinElmer)同 2.2.1。使用 ATR 成像附件(PerkinElmer, Waltham, USA)进行高光谱成像测试。红外吸收图像的尺寸为 $500 \times 500 \mu\text{m}$ ，光谱分辨率为 4 cm^{-1} ，范围为 $4000-750 \text{ cm}^{-1}$ 。像素大小为 $6.25 \mu\text{m}$ ，每次扫描收集 2 个像素。

3.2.2 实验原料及试剂材料

原料及试剂材料同 2.2.2。

3.2.3 预处理

3.2.3.1 红外高光谱成像

利用 2.2.3.1 中的方法，制备同时添加 5 种非法添加物的样品，每份样品中 5

种非法添加物浓度相同，最终的浓度范围为 0.5%，1%，5%（非法添加物/面粉），每份样品有 3 个重复。

3.2.3.2 PLS 建模

通过 2.2.3.1 的方法将 5 种非法添加物与面粉同时混合，每组样品中重复 15-20 次，每 4 个平行合成一张平均谱，以平均谱为最终样品谱图制作模型。根据已有文献和相应的检测标准，并以正交实验设计法为参考，设计 25 个样品中每种非法添加物的最终浓度范围（表 6 和表 7）。

表 6 因素-水平对应表

非法添加物	因子	水平 (ppm)				
		a	b	c	d	e
Rg	A	2	10	30	50	70
PB	B	10	20	30	50	70
Bx	C	2	10	30	50	70
APS	D	2	10	30	50	70
FB	E	2	10	50	70	100

表 7 不同组别样品中 5 种非法添加物的最终浓度

组别	A	B	C	D	E
样品 1	a	a	a	a	a
样品 2	a	b	b	b	b
样品 3	a	c	c	c	c
样品 4	a	d	d	d	d
样品 5	a	e	e	e	e
样品 6	b	a	b	c	d
样品 7	b	b	c	d	e
样品 8	b	c	d	e	a
样品 9	b	d	e	a	b
样品 10	b	e	a	b	c
样品 11	c	a	c	e	b

样品 12	c	b	d	a	c
样品 13	c	c	e	b	d
样品 14	c	d	a	c	e
样品 15	c	e	b	d	a
样品 16	d	a	d	b	e
样品 17	d	b	e	c	a
样品 18	d	c	a	d	b
样品 19	d	d	b	e	c
样品 20	d	e	c	a	d
样品 21	e	a	e	d	c
样品 22	e	b	a	c	d
样品 23	e	c	b	a	e
样品 24	e	d	c	b	a
样品 25	e	e	d	c	b

3.2.4 数据采集

3.2.4.1 红外高光谱成像

红外高光谱成像的 3 组样品中分别含有 0.5%，1%，5% 的非法添加物。将样品放在 ATR 成像附件上，然后通过附件的压力杆压制成片，使样品片严密地贴在 ATR 晶体上。采集到的 ATR 光谱均为 4,000-750 cm^{-1} 范围，光谱分辨率为 4 cm^{-1} ，每个像素光谱均为八次扫描的平均值。用 Spectrum Image 软件（版本 R1.10）处理成像数据的差分光谱和相关性成像图。

3.2.4.2 PLS 建模

将所有样品按 2.2.4.2 中的方法分为校正集和验证集并建立定量预测模型。使用 15 个样品（与样品 12，样品 17 和样品 21 相同的浓度水平，每个样品 3 个平行）测试建立的模型的适用性。此外，t 检验用于验证预测值的可靠性。

3.3 结果与分析

3.3.1 红外高光谱成像-同时进行非法添加物的空间检测

红外高光谱成像是一种常用于复杂混合物系统中的检测技术。通过高光谱成像技术，可以客观地获得来自样品图像的物理和化学信息，例如所有像素的红外光谱，异质成分的分布和大小等^[31,32]。然而，与标准非法添加物光谱相比，复杂系统中非法添加物的信号无法通过原始红外光谱中的吸收峰比较直接识别。因此，我们引入了差分光谱以增强红外图像中非法添加物信号的分辨率^[33]。同时，为了快速定位和探索非法添加物的分布，还采用了参考光谱的相关性成像图。

在制作相关性成像图之前，将红外图像中每个像素的光谱处理为差分光谱（原始红外光谱减去面粉的标准光谱）。然后将减去面粉谱图后的成像图上的每个像素点与各非法添加物进行比较，故其相关性图像能显示面粉样品中不同非法添加物的近似分布（图 7. A）。成像图上颜色越鲜艳的地方表示其与非法添加物相似度越高，这可以反应不同浓度样品中非法添加物的相对含量，也就可以根据这些区域来进行取点分析。可以从图中得出，非法添加物含量为 5% 的面粉样品的相关性成像图具有最大的亮色区域，其在亮色区域和相关性绝对值上都高于 1% 和 0.5% 的样品。

提取每个图像中最具代表性的像素（具有最高相关系数的像素）的差分光谱，并与非法添加物的标准光谱进行比较（图 7. B）。根据群峰匹配方法，在 5%（P1-P5）中提取的每个谱图都包含有对应非法添加物标准谱图的多个匹配峰（PB 除外，因为它只有 1 个特征峰）。但是，在 1% 和 0.5%（P6-P15）中提取的大多数光谱中，非法添加物几乎没有甚至没有相应的峰，表明像素中的成分并不是该非法添加物，或者是由于浓度太低，面粉中的其他成分干扰了谱图。FB 是在每种浓度（P5, P10, P15）的样品中均能唯一发现的一种，可能是因为它具有很高的红外吸收能力。因此，红外高光谱成像可能是一种有效的工具，可以在空间上验证面粉中微量非法添加物的存在和分布，而分辨率还需要进一步提高。

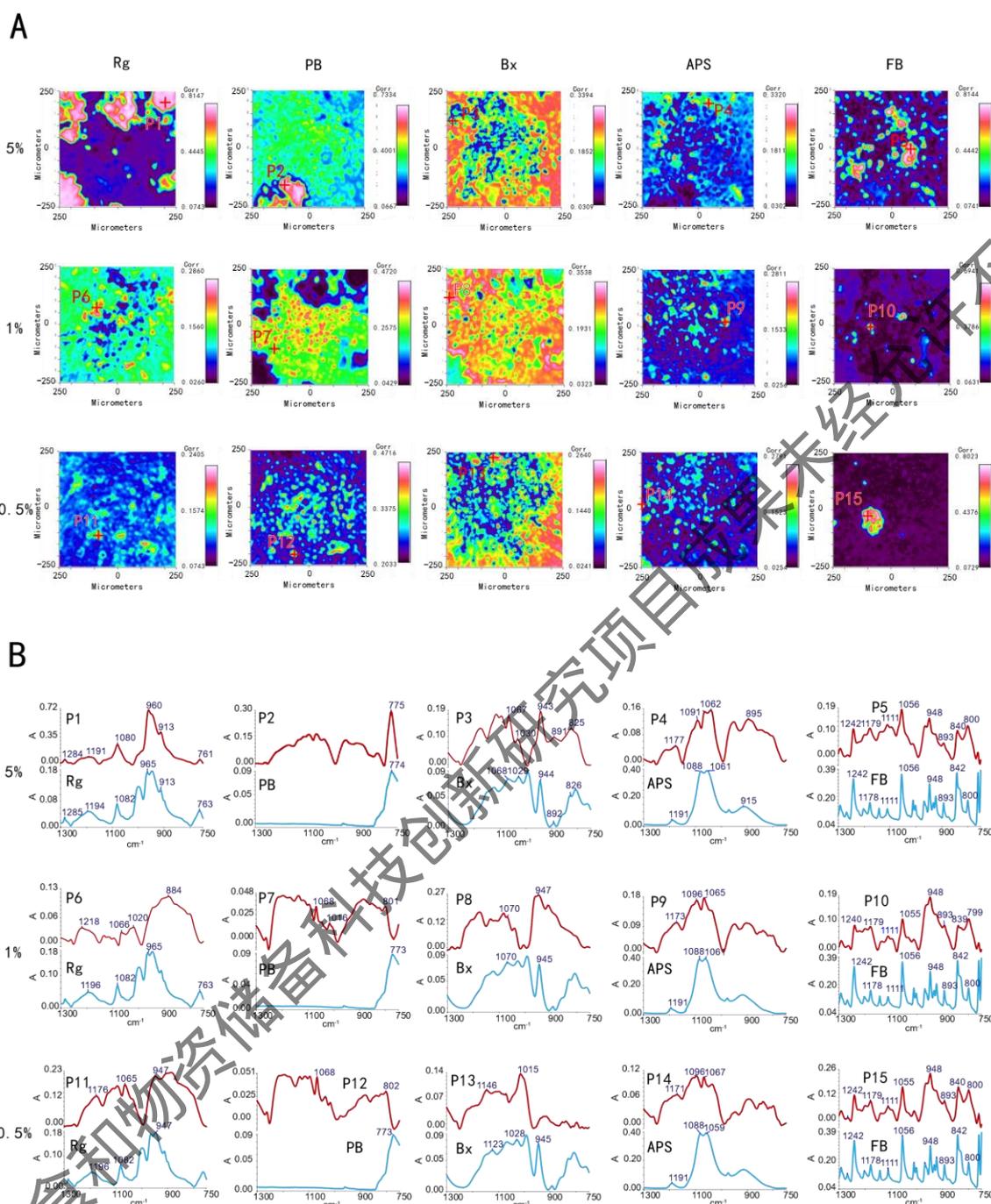


图 7 面粉与非法添加物参考光谱在 $4000\text{--}750\text{ cm}^{-1}$ 区域内的相关图像以及代表性像素的光谱比较 (A: 通过差分光谱法比较不同非法添加物浓度的面粉样品的红外图像, 并制作相关性成像图; B: 代表像素光谱与非法添加物标准光谱的比较)

3.3.2 PLS 建模-微量非法添加物的光谱定量分析

为了建立面粉中 5 种微量非法添加物的定量预测模型, 选择了 145 个样品 (随机选取用于校正的 87 个样品和用于验证的 58 个样品) 进行偏最小二乘 (PLS) 分

析。模型光谱参数与表 3 相同。

所建立模型的预测值接近于面粉中 5 种非法添加物浓度的实际值，校正集中相关系数 > 0.8856，均方根校正误差 (RMSEC) 在 3.1931 至 8.7709 之间；验证集中相关系数 > 0.8175，均方根预测误差 (RMSEP) 的范围从 7.4051 到 14.4857。为了得到最佳的定量模型，Rg, PB, Bx, APS 和 FB 的 PLS 因子数目分别为 7、6、6、5 和 6。Rg, PB, Bx, APS 和 FB 的 PLS 校正模型的潜在变量数分别为 6、6、6、5、6。根据 ICHQ2B 的介绍，检测限 (LOD) 可以表示为： $LOD = 3.3 \delta / S$ ， δ ：响应值的标准偏差 deviation, S: 校准曲线的斜率。用此方法计算此模型中 Rg, PB, Bx, APS 和 FB 的 LOD 分别为：19.43、25.43、17.47、17.66 和 14.50 ppm。

吊白块			判断浓度: 30ppm actual			溴酸钾			判断浓度: 30ppm actual		
			-	+				-	+		
predicted	-	50	0		predicted	-	47	4			
	+	0	50			+	0	50			
假阴性率: 0%			假阳性率: 0%			假阴性率: 0%			假阳性率: 8%		

硼砂			判断浓度: 30ppm actual			硫酸铝钾			判断浓度: 30ppm actual		
			-	+				-	+		
predicted	-	49	1		predicted	-	50	0			
	+	0	50			+	0	50			
假阴性率: 0%			假阳性率: 2%			假阴性率: 0%			假阳性率: 0%		

荧光增白剂OB-1			判断浓度: 50ppm actual		
			-	+	
predicted	-	50	0		
	+	0	50		
假阴性率: 0%			假阳性率: 0%		

图 8 面粉中的 5 种非法添加物的假阴性、假阳性验证

为了验证该模型的适用性和准确性，准备了三个标有 A, B 和 C 的面粉样品组（它们的非法添加物含量分别与样品 12、17 和 21 的含量相同）以进行准确性测试，每组有五个重复样品。由于面粉中掺入的非法添加物浓度低 (ppm 级)，预测值与实际值之间可能存在细微偏差。为了研究这些值的显著性，通过样本 t 检验方

法对数据进行了统计分析（表 8）。根据 t 值和标准偏差，A，B 和 C 组的预测值与实际值之间无显著性差异（ $P > 0.05$ ），从而验证了预测模型的准确性。同时，为了验证模型的假阴性、假阳性概率，对每组样品设置判断浓度阈值：Rg，PB，Bx，APS 和 FB 分别为 30ppm，30ppm，30ppm，30ppm，50ppm。每组利用 100 份外部样品进行验证，假阴性、假阳性率均 $<10\%$ （图 8）。因此，通过使用 PLS 建模，可以即时获得微量非法添加物的定量信息。

化学计量学工具（例如 PLS 和 PCR）已被应用于各种领域中目标组分的光谱研究，但是，鲜有人能够解释目标组分的存在如何影响光谱，尤其是低浓度样品。在本研究中，SD-2DCOS IR 的结果可以准确地解释投影到 PLS 模型计算中的面粉中微量非法添加物的分子振动信息，反之亦然，PLS 建模具有证明 SD-2DCOS IR 解析准确性的能力。因此，基于 MM-IR 建立的面粉多分子光谱多维原位快筛技术能为食品中微量非法添加物分析的提供可靠方法。

表 8 面粉毒害因子多组分定量模型的准确性测试

样品组	非法添加物	实际值 (ppm)	预测值 (ppm)		平均值 (ppm)	t	标准偏差 (S)	显著性 (P)	置信区间 (95%)		
			25.97	31.32					下限	上限	
Sample A	Rg	30.00	25.97	31.32	30.69	0.480	4.053	0.656	-4.161	5.903	
	PB	20.00	22.01	21.28	31.92	2.451	5.290	0.070	-0.770	12.367	
	Bx	50.00	40.88	48.03	50.79	47.42	-1.330	4.339	0.254	2.807	
	APS	2.00	-0.31	5.45	11.81	9.80	1.705	5.025	0.163	-2.407	10.071
	FB	50.00	47.70	50.66	53.15	57.80	1.704	5.199	0.164	-2.493	10.419
Sample B	Rg	50.00	51.32	46.18	48.88	50.25	51.17	2.125	-3.926	2.197	
	PB	20.00	21.72	16.52	21.88	22.37	20.52	2.381	-2.354	3.558	
	Bx	70.00	72.02	68.16	76.87	75.14	68.55	3.875	-2.667	6.957	
	APS	30.00	25.29	27.02	34.64	28.40	30.05	3.616	-5.555	3.424	
	FB	2.00	-1.06	11.60	2.62	8.65	3.32	5.053	-3.250	9.298	
Sample C	Rg	70.00	66.35	69.89	70.79	76.62	81.38	0.322	-4.395	10.410	
	PB	10.00	12.86	9.63	7.06	1.93	2.61	4.641	-8.946	2.578	
	Bx	70.00	62.88	63.64	70.19	75.89	79.96	7.478	-8.772	9.799	
	APS	50.00	59.37	49.00	45.08	36.38	43.13	8.482	-13.941	7.123	
	FB	50.00	46.28	51.29	72.11	79.82	80.04	16.054	-4.026	35.841	

4 配套设备与软件研发

4.1 面粉毒害因子的智能化现场检测设备雏形研发

本项目后续计划完成面粉毒害因子智能化检测设备雏形（型号 MPN-Q8）研制（图 9），该设备结合了傅立叶变换红外光谱仪与 ATR 直接测试组件，通过新开发的配套智能化分析识别软件可以结合化学计量学模型得到面粉中的多种毒害因子种类和含量。单个样品检测时间在 3 分钟内，且仪器体积小，配备高灵敏度 DLaTGS 检测器和 ATR 检测附件，可应用于现场快速检测，使用寿命可达 5 年以上。仪器预计的主要参数记录于表 7。

表 4 仪器性能参数

光谱仪	参数
尺寸（长×宽×高）(mm)	300×215×150
光源	SIC
检测器	DLTGS
分束器	ZnSe
工作原理	傅里叶变换
光谱测量范围	4000-500 cm^{-1}
光谱分辨率	优于 2 cm^{-1}
信噪比	>10000:1
光谱测量速度	最快每秒 1 张谱图



图 9 面粉中毒害因子研制的智能化面粉检测仪雏形 MPN-Q8（研发中）

4.2 仪器配套软件及模型初步开发

图 10 为正在研发的仪器配套软件（MPN-P8 v1.0）界面，目前计划拥有光谱采集、保存、处理等常用基本功能，并且集成以上研究所获得的面粉红外光谱数据库，辅以化学计量学算法可以实现面粉毒害因子的多组分快速筛查。

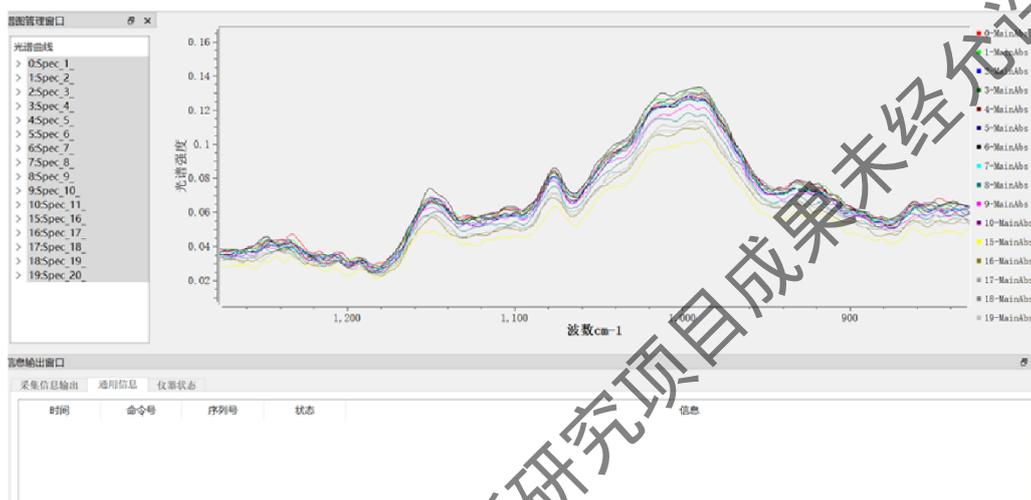


图 1 仪器配套软件 v1.0 的界面图

5 总结与展望

5.1 总结

本研究所建立的多分子光谱多维原位筛查技术可以从空间分辨（高光谱成像）、光谱定性分析（三级红外和其他高分辨率技术）和定量分析（化学计量方法）的层面多组分同时快速检测面粉中的微量毒害因子。利用差分光谱、相关性成像图和群峰匹配法，可以快速鉴别毒害因子的化学信息及其空间分布。当毒害因子的含量低至 ppm 级时，光谱定性分析（FT-IR、SD-IR、SD-2DCOS IR）能够同时检测解析多种微量毒害因子，并获得更高的分辨率（假阴性、假阳性<10%）；通过群峰匹配技术，定位和提取面粉中微量毒害因子的微弱特征峰，融合 PLS 模型测定含量。

本项目针对面粉及其制品中化学源、生物源毒害物质缺乏绿色高效快速检测技术的难点问题，利用自主创新的多分子光谱多维指纹分析技术研发面粉毒害物质的多维原位检测与快筛方法，实现面粉中多种微量毒害因子的快速筛查和同时检测，无需分析提取或其他繁琐的预处理操作，快速高通量，ppm 级检测限，有望实现现场“批批检”。因此，该有效、简单、节省成本的技术方法可用于整体或特异性地分析食品等复杂混合物体系，可为将来实现市场上面粉产品的品质及其毒害因子的多组分快速筛查奠定坚实的技术基础。

5.2 展望

本项目所开发的多分子光谱多维原位快筛技术对于面粉中微量毒害因子同时进行定性和定量检测具有良好效果。基于以上阶段性研究成果，拟将从检测技术升级、软件设备研制以及预警平台构建等三个层面继续开展研究：

- ① **检测技术升级：**对于面粉中毒害因子的多分子光谱多维原位快筛技术，进行面粉及其制品的整体直接鉴别、品质识别评价、危害物原位快检的多层次定性定量研究，进一步提高该方法的分辨率和检测限，实现对其种类、品质、安全、营养等关键属性的高通量识别。

- ② **软件设备研制**：利用面粉产品品质安全快速筛查技术结合自主开发的大数据融合分析软件（含物联网功能），针对各类面粉产品建立专属识别与定量模型组，开发可自主学习的面粉产品的多组分智能化现场检测设备。并对仪器部件、光路和样品训练集做深度优化改进，以提高识别率和检测限，并进一步降低假阴性、假阳性率。
- ③ **预警平台构建**：基于以上已形成的面粉产品品质安全整体快检技术与设备，运用大数据高级融合，与面粉相关企业和政府部门联合系统创建上海首个面粉产品多分子光谱信息大数据库，构建其多维度分析的云端大数据预警平台，实时收集面粉产品在时间、空间等多维度上的成分信息，以期未来实现品质安全实时监控预警、大数据全面筛查把控、营养健康基础数据共享等食安舆情预警功能，为形成上海乃至我国的面粉产品品质与安全整体绿色现场快检技术与精准预警体系奠定理论与技术基础。

参考文献

- [1] 陆俊, 陈英. 食品添加剂的风险点及其防控措施 [J]. 科技资讯, 2018, 29): 48.
- [2] LISTED N. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [J]. World Health Organization Technical Report, 1997, 868(956): i.
- [3] 周惠明. 面粉添加剂的种类,作用机理及使用方法 [J]. 粮食与饲料工业, 000(11): 5-10.
- [4] 吴立. 粮食制品中"吊白块"的测定方法 [J]. 中国稻米, 000(003): 46-7.
- [5] X. L. Proceedings of the Second Asian Conference on Food Safety. ; proceedings of the Food poisoning caused by Fusarium toxins, Chatuchak, Thailand: International Life Sciences Institute., F, 1994 [C].
- [6] AL. B R V B S R R Y E. Outbreak of trichothecenes mycotoxiosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley [J]. Lancet, 1989, 1(8628): 35—37.
- [7] J. P J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance [J]. Archives of toxicology, 2010, 84(9): 663-679.
- [8] 唐黎标. 面粉添加剂溴酸钾的危害及替代品研究 [J]. 现代面粉工业, 2016, 1): 23-4.
- [9] 林祥. 食品中违法添加硼砂的危害与对策 [J]. 现代预防医学, 037(007): 1252-4.
- [10] 郭文静, 巩飏, 杨如璞. 2013—2017 年开封市食品中铝含量监测结果分析 [J]. 华南预防医学, 2019, 44(5): 492-4.
- [11] 刘燕, 徐子婷, 卫润鑫, et al. 食品及农产品中荧光增白剂检测技术研究进展 Research Progress on the Detection Technology of Fluorescent Brightening Agent in Food and Agricultural Products [J]. Hans Journal of Food and Nutrition Science, 2019, 8(04): 239.
- [12] 李蓉, 何春梅, 薄艳娜, et al. 高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定面粉中 7 种荧光增白剂 [J]. 色谱, 2017, 35(2): 162-8.
- [13] 殷国英, 刘思超, 廖灵灵. 面制食品铝残留量监测及人群暴露量评估 [J]. 海峡预防医学杂志, 2017, 23(3): 0-.
- [14] 李青, 刘思洁, 方赤光. 食品中铝含量及其危害研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 2016 年 01): 14-9.

- [15] 肖驰, 郑先哲, 关尔渤. 食品中甲醛次硫酸氢钠分析方法的研究与探索 [J]. 科学技术创新, 2013, 25): 105-.
- [16] 郭小溪. 三种常见非食用物质的光谱快速检测与识别模型构建 [D]; 上海海洋大学.
- [17] GUO X X, HU W, LIU Y, et al. Rapid analysis and quantification of fluorescent brighteners in wheat flour by Tri-step infrared spectroscopy and computer vision technology [J]. Journal of Molecular Structure, 2015, 1099(393-8).
- [18] SKOOG D A, HOLLER F J, CROUCH S R. Principles of instrumental analysis [M]. Cengage learning, 2017.
- [19] 孙素琴. Rapid Testing of Food and Traditional Chinese Medicine by (Mid-) Infrared Spectroscopy%食品与中药的(中)红外光谱快速检测技术 [J]. 现代科学仪器, 000(4): 11-20.
- [20] 孙素琴. 中药二维相关红外光谱鉴定图集 [J]. 2003,
- [21] ZHANG X, WEI W, HU W, et al. Accelerated chemotaxonomic discrimination of marine fish surimi based on Tri-step FT-IR spectroscopy and electronic sensory [J]. Food Control, 2017, 73(1124-33).
- [22] WANG Y, WANG P, XU C, et al. Discrimination and chemical characterization of different *Paeonia lactifloras* (*Radix Paeoniae Alba* and *Radix Paeoniae Rubra*) by infrared macro-fingerprint analysis-through-separation [J]. Journal of Molecular Structure, 1099(68-76).
- [23] XU C H, CHEN J B, ZHOU Q, et al. Classification and identification of TCM by macro-interpretation based on FT-IR combined with 2DCOS-IR [J]. Biomedical Spectroscopy & Imaging, 2015.
- [24] GAN J H, XU C H, ZHU H Z, et al. Analysis and discrimination of ten different sponges by multi-step infrared spectroscopy [J]. Chinese Chemical Letters, 26(2): 215-20.
- [25] HU X-Z, LIU S-Q, LI X-H, et al. Geographical origin traceability of Cabernet Sauvignon wines based on Infrared fingerprint technology combined with chemometrics [J]. Scientific reports, 2019, 9(1): 1-9.
- [26] HOU S-W, WEI W, WANG Y, et al. Integrated recognition and quantitative detection of starch in surimi by infrared spectroscopy and spectroscopic imaging [J]. Spectrochim Acta A, 2019, 215(1-8).

- [27] HU W, GUO X-X, WANG X-C, et al. Rapid Discrimination of Different Grades of White Croaker Surimi by Tri-Step Infrared Spectroscopy Combined with Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) [J]. Food Anal Methods, 2016, 9(4): 831-9.
- [28] ZHANG X-Y, HU W, TENG J, et al. Rapid recognition of marine fish surimi by one-step discriminant analysis based on near-infrared diffuse reflectance spectroscopy [J]. International journal of food properties, 2017, 20(12): 2932-43.
- [29] 郝童斐. 红外光谱技术在食品检测中的应用 [J]. 食品安全导刊, 2017, 35): 73-.
- [30] CHOONG Y K, XU C-H, LAN J, et al. Identification of geographical origin of Lignosus samples using Fourier transform infrared and two-dimensional infrared correlation spectroscopy [J]. Journal of Molecular Structure, 1069(188-95).
- [31] GUO X-X, HU W, LIU Y, et al. Rapid determination and chemical change tracking of benzoyl peroxide in wheat flour by multi-step IR macro-fingerprinting [J]. Spectrochim Acta A, 2016, 154(123-9).
- [32] 刘司琪, 王锡昌, 王传现, et al. 基于红外光谱的葡萄酒关键质量属性快速分析评价研究进展 [J]. 食品科学, 19): 274-83.
- [33] 孙素琴, 周群, 陈建波. 中药红外光谱分析与鉴定= Infrared Spectroscopy for Complex Mixtures : Applications in Food and Traditional Chinese Medicine : 英文 [M]. 2011.