

豆粕中三聚氰胺显微近红外成像检测的扫描条件优化

黎 静^{1,2}, 韩鲁佳^{1*}, 杨增玲¹

(1. 中国农业大学工学院, 北京 100083; 2. 江西农业大学工学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 为了确定豆粕中三聚氰胺显微近红外成像检测的最佳扫描条件, 该文研究了扫描条件对显微近红外光谱图像质量、采集效率和豆粕中三聚氰胺检测效果的影响。针对不同光谱分辨率和扫描次数对光谱图像均方根噪声(RMS)的影响进行了单因素方差分析试验, 对干涉仪动镜移动速度(1、2.2 cm/s)、空间分辨率(25、50 μm)、光谱分辨率(8、16、32 cm^{-1})和扫描次数(4、8、16次)进行了多因素正交试验方差分析, 结果得出光谱分辨率对RMS有显著性影响, 而且采用不同扫描条件时显微近红外图像采集时间相差很大。根据图像质量、采集效率和豆粕中三聚氰胺检测效果分别得出优选扫描条件, 综合考虑上述3个方面, 最终推荐采用的扫描条件为空间分辨率为25 μm , 干涉仪动镜移动速度为1 cm/s, 光谱分辨率为32 cm^{-1} , 扫描次数为4次。该研究同时表明显微近红外成像技术可应用于豆粕中三聚氰胺的检测。

关键词: 扫描, 优化, 成像技术, 显微近红外成像, 三聚氰胺, 豆粕

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2013.13.031

中图分类号: O657.33; TP391.4; S816.46

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2013)-13-0244-11

黎 静, 韩鲁佳, 杨增玲. 豆粕中三聚氰胺显微近红外成像检测的扫描条件优化[J]. 农业工程学报, 2013, 29(13): 244-254.

Li Jing, Han Lujia, Yang Zengling. Optimization of scanning conditions on near-infrared microscopic imaging for melamine detection in soybean meal[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(13): 244-254. (in Chinese with English abstract)

0 引 言

显微近红外光谱成像(Near-infrared microscopic imaging, NIRM imaging)是利用光谱扫描手段获取样品中每一个空间点在一定波长范围内的光谱信息, 获得的原始数据是一种叫做超立方阵(hypercube)的三维数据结构($x \times y \times \lambda$)^[1], 其中 x 、 y 为图像空间坐标信息, λ 为波长信息。显微近红外光谱成像技术将近红外光谱技术、成像技术和显微技术相结合, 光谱成像不仅可以获取样本的光谱信息, 同时还可以获取样本的空间分布信息^[2], 而显微可以满足微区或微区痕量检测的需求。该技术通过光谱数据中每个像素点的近红外光谱可反映出样本中各微区的内部信息, 并据此进行样品的定性、定量或定位分析。显微近红外光谱成像技术对样本不需要进行常规化学方法中复杂的前处理, 而且具有对环境无污染、操作要求低等优点, 目前已

被广泛应用于农学^[3-7]、医药学^[8-11]、物证学^[12]、生物学^[13]、材料学^[14-15]等领域。

三聚氰胺是一种低毒的化工原料, 动物长期或反复大量摄入三聚氰胺会产生结石、肾衰竭甚至导致死亡^[16], 因其含氮量(66%)比蛋白质(平均含氮量16%)含有更高比例的氮原子, 所以造假者常将三聚氰胺添加到蛋白饲料原料中以造成蛋白质含量较高的假象, 对饲料安全构成威胁^[17]。利用显微近红外光谱成像技术检测豆粕中的三聚氰胺, 可建立化学计量学检测模型并将三聚氰胺的空间位置用图像反映出来, 对三聚氰胺无损检测技术的发展具有重要意义。

采集显微近红外光谱图像时包括光谱分辨率(resolution)、扫描次数(scans per pixel)、空间分辨率(pixel size)、干涉仪动镜移动速度(interferometer speed)等几个扫描参数。光谱分辨率指的是光谱仪能分辨的光的最小波长间隔; 扫描次数是指光谱图像多次扫描的次数, 采集的光谱图像数据中的光谱是多次扫描的平均光谱; 空间分辨率指的是检测器检测的像素点大小, 即所能分辨的最小目标大小, 反映的是成像系统空间分辨能力的大小; 干涉仪动镜移动速度反映的是扫描速度的快慢。选择不同的扫描条件对光谱图像质量会有一定的影响, 继而影响后续的分析 and 检测结果。关于扫

收稿日期: 2013-02-25 修订日期: 2013-05-27

基金项目: Quality and safety of feeds and foods for Europe (QSAFFE) (KBBE-2010-2-4-03), 欧盟第七框架项目(265702)

作者简介: 黎 静(1978-), 女, 江西宜春人, 博士生, 主要从事农产品品质光学无损检测等方面的研究。北京 中国农业大学 工学院, 100083。Email: lijing3815@163.com

*通信作者: 韩鲁佳(1964-), 女, 北京市人, 教授, 博导, 主要从事生物质资源与利用的研究。北京 中国农业大学 工学院, 100083。Email: hanlj@cau.edu.cn

描条件对近红外光谱分析的影响,之前已有一些研究人员分别针对不同的研究对象进行过相关研究,主要是从光谱分辨率^[18-24]、扫描次数^[24]、样品粒度^[23]等方面进行分析,研究表明不同因素对光谱质量和检测结果会产生不同程度的影响。鉴于此,本文以豆粕和三聚氰胺为研究对象,分别从光谱图像质量、采集效率、三聚氰胺检测效果等方面分别优选出扫描条件,再综合考虑确定最终的扫描条件,为后续豆粕中三聚氰胺检测的研究规范试验条件,也为其他研究人员进行相关研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 样 本 制 备

试验所用三聚氰胺为三聚氰胺分析纯(≥99.5%,购自国药集团化学试剂有限公司),无味,白色粉末状固体。豆粕由中国农业科学院提供,豆粕样本经 ZM200 型超离心研磨仪(Retsch GmbH, 德国)粉碎粒度至 1.0 mm 以下。

对于不同扫描条件对图像质量的影响试验,考虑到当豆粕中掺有三聚氰胺时,它们之间的位置关系通常会出现三聚氰胺位于豆粕上方、三聚氰胺位于豆粕下方、三聚氰胺位于豆粕旁边这 3 种极端情况,制备样本时在光学显微镜下将不同三聚氰胺和豆粕颗粒按照上述 3 种位置关系分别摆放在标准白板(材料为聚四氟乙烯)上。由于三聚氰胺和豆粕颗粒本身性质不同,比如样本的表面粗糙度、厚度、颗粒度大小等,为避免其对优化扫描参数的影响,试验时共制备 10 个样本做重复,豆粕和三聚氰胺粒度均 1.0 mm 以下。

对于不同扫描条件对显微近红外图像采集效率和豆粕中三聚氰胺检测效果的影响试验,共制备了 3 个不同的试验样本。一个样本制备时是将粒度均大于 250 μm 的 4 个三聚氰胺颗粒分别放置于厚度为 30、50、100、110 μm 的豆粕颗粒下面摆放到标准白板上。另 2 个样本根据实际生产掺假经济性,往粒度 1.0 mm 以下的豆粕中掺入 1% 的三聚氰胺配制混合样本,其中一个样本是将筛分后粒度大于 50 μm 的三聚氰胺与豆粕混合,另一个样本是将筛分后粒度小于 50 μm 的三聚氰胺与豆粕混合,将混合样本分别平铺到标准白板上完成制备。

1.2 试 验 仪 器

显微近红外光谱成像所用的试验仪器为 Spotlight 400 型傅里叶显微红外成像系统(英国,PerkinElmer Ltd.公司),该系统主要由红外和可见光源、干涉仪、可移动载物台、显微光学成像系统、分光系统、检测器、CCD 照相机、图像采集和控制系统、计算机等部分组成,示意图如图 1。该系统

将 16 个 MCT 红外检测器元件合并成为线阵列检测器,与干涉仪相连的载物台顺次沿着纵横 2 个方向移动逐点同步扫描出样本的光谱图像。

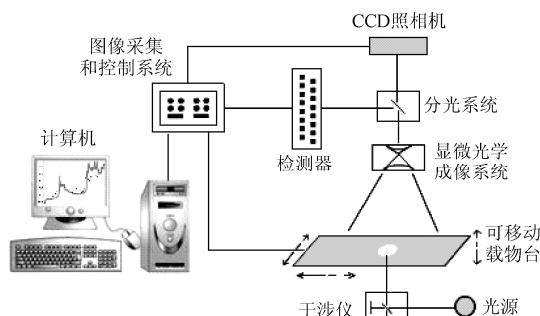
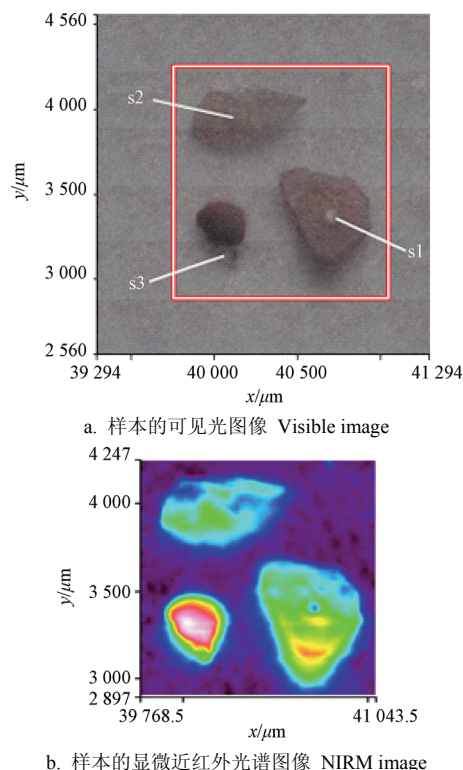


图 1 Spotlight 400 显微红外成像系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of Spotlight 400 NIRM imaging system

1.3 显 微 近 红 外 光 谱 图 像 的 采 集

将制备样本的标准白板固定到垫片上,装入载物台中。采集显微近红外光谱图像时先对样本进行可见光显微成像,图 2a)是其中一个样本在光谱成像系统中得到的可见光图像,然后从可见光图像中选择要进行分析的区域,采集其显微近红外光谱图像,如图 2b)所示。光谱图像用系统配套的 SpectrumIMAGE 软件进行采集。



注: s1. 三聚氰胺位于豆粕上方, s2. 三聚氰胺位于豆粕下方, s3. 三聚氰胺位于豆粕旁边
Note: s1. melamine on soybean, s2. melamine under soybean, s3. melamine near soybean

图 2 样本图像

Fig.2 Image of sample

1.4 试验方法

1.4.1 不同扫描条件对图像质量的影响试验

1) 光谱分辨率单因素方差分析试验

光谱噪声是衡量光谱图像质量的一个重要指标,而均方根噪声(root mean square noise, *RMS* noise)是光谱噪声中常用的一种表达方式。本试验将光谱分辨率分别设置为 2、4、8、16、32、64 cm^{-1} ,其他扫描参数取固定值,扫描次数取 8 次,干涉仪动镜移动速度取 1 cm/s ,空间分辨率取 $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$,光谱扫描波长范围取 $7\,800 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$,采集不同光谱分辨率下 10 个样本的光谱图像,每个样本取其光谱图像的平均光谱,通过单因素方差分析研究光谱分辨率对 *RMS* 的影响。

2) 扫描次数单因素方差分析试验

本试验将扫描次数分别取 2、4、8、16、32、64 次,其他扫描参数取固定值,光谱分辨率取 32 cm^{-1} ,干涉仪动镜移动速度取 1 cm/s ,空间分辨率取 $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$,扫描光谱范围 $7\,800 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$,采集不同扫描次数时 10 个样本的光谱图像,每个样本取其光谱图像的平均光谱,通过单因素方差分析研究扫描次数对 *RMS* 的影响。

3) 多因素正交试验

以 Spotlight400 显微近红外成像系统中的空间分辨率、干涉仪动镜移动速度、光谱分辨率、扫描次数 4 个扫描参数为试验因素进行正交试验设计。对于空间分辨率因素,该系统可选 $6.25 \mu\text{m} \times 6.25 \mu\text{m}$ 、 $25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ 、 $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ 3 种,但当空间分辨率选 $6.25 \mu\text{m} \times 6.25 \mu\text{m}$ 时,采集到的光谱能量低(约为 25×25 、 $50 \times 50 \mu\text{m}$ 时的 $1/3$),并且采集一个 $12 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$ 大小的光谱图像至少需要耗时 20 h,同时数据文件非常大,这不利于快速检测的实现,因此正交试验中空间分辨率因素选择 $25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ 、 $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ 2 个不同水平。对于干涉仪动镜移动速度因素,该系统只有 1 和 2.2 cm/s 2 个水平。此外,光谱分辨率、扫描次数两个因素的不同水平由其单因素方差分析试验的结果确定。正交试验各因素及其水平如表 1 所示,采用 SPSS Statistics R17.0(美国,SPSS Inc.公司)软件设计的正交试验方案进行多因素方差分析试

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

因素水平	空间分辨率 A Pixel size/ μm	干涉仪动镜移动速度 B Interferometer speed/ $(\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$	光谱分辨率 C Resolution/ cm^{-1}	扫描次数 D Scans per pixel/times
1	25×25	1	8	4
2	50×50	2.2	16	8
3	-	-	32	16

验。对每种试验方案扫描样本的光谱图像,每个样本取其光谱图像的平均光谱,研究各因素对 *RMS* 的影响,并根据试验结果方差分析优选扫描条件。

1.4.2 不同扫描条件对采集效率和三聚氰胺检测效果的影响试验

本试验分别采集制备的不同豆粕厚度下放置三聚氰胺颗粒的样本、含有 1%质量分数且粒度大于 $50 \mu\text{m}$ 三聚氰胺以及含有 1%质量分数且粒度小于 $50 \mu\text{m}$ 三聚氰胺的掺假豆粕样本的显微近红外光谱图像,研究不同扫描条件对显微近红外光谱图像采集时间、不同厚度豆粕下三聚氰胺颗粒的检测效果、豆粕中含有 1%质量分数不同粒度三聚氰胺颗粒的检测效果的影响,并分别得出优选扫描条件。

1.5 数据分析与处理

均方根噪声 *RMS* 指的是一条光谱在某波数(横坐标)区间内 n 个数据点纵坐标值(吸光度值)的均方根偏差,用软件 Matlab 2010b(美国,MathWorks Inc.公司)按公式(1)进行计算,其值越小,反映光谱质量越好。首先计算出显微近红外光谱图像中每一个像素点对应光谱的 *RMS* 值,然后计算整个图像所有像素点光谱的 *RMS* 值的平均值,该平均值即为该图像的 *RMS* 值。单因素方差分析以每个样本图像的 *RMS* 值进行方差分析,多因素正交试验时取每种试验方案下所有样本的光谱图像的 *RMS* 的平均值作为每种试验方案的试验结果进行方差分析。单因素和多因素方差分析用 SPSS Statistics R17.0 软件完成。

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n}} \quad (1)$$

式中, y_i 为第 i 个光谱数据点的吸光度值; \bar{y} 为 n 个光谱数据点吸光度的均值; n 为光谱数据点个数。

验证试验中用 PerkinElmer 公司的图像处理软件 HyperView V2.0 对光谱图像进行主成分分析^[25](principal component analysis, PCA)处理,对比各扫描条件对不同豆粕厚度下三聚氰胺和豆粕中含有不同粒度三聚氰胺的检测效果。

2 结果与分析

2.1 不同扫描条件对光谱图像质量的影响

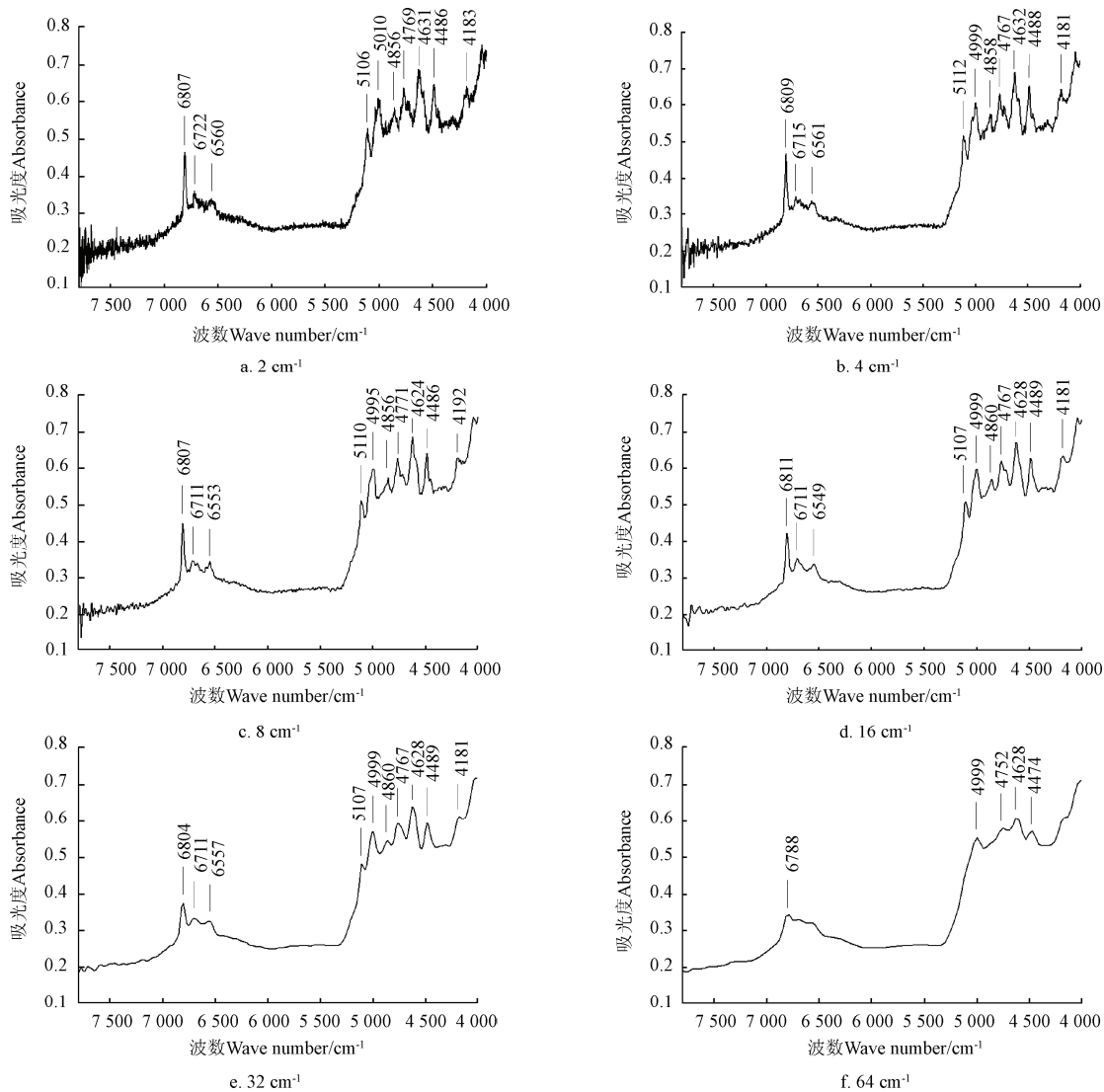
2.1.1 光谱分辨率对光谱图像质量的影响

对不同分辨率下 10 个样本图像 *RMS* 值进行单因素方差分析,当光谱分辨率分别取 2、4、8、16、32、64 cm^{-1} 时,对 *RMS* 进行单因素方差分析的结果表明这些光谱分辨率得出的光谱 *RMS* 值有显著性差异($p=0<0.05$)。图 3 为一个样本在不同光谱分辨率下三聚氰胺颗粒上一个像素点的光谱图,从

图中可看出，三聚氰胺光谱在 $6\ 850\sim 6\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 范围内有 3 个吸收峰，这是由分子中的 $-\text{NH}_2$ 一倍频引起的。而 $5\ 150\sim 4\ 100\ \text{cm}^{-1}$ 范围的多个吸收峰则是分子中含氮杂环和 $-\text{NH}_2$ 的合频吸收。光谱分辨率越高，其特征峰的分离效果越好，光谱图像区分三聚氰胺和豆粕的能力就越强；但当光谱分辨率提高到一定数值后，再提高光谱分辨率光谱的噪声将会增加。如图 3 a 所示，当光谱分辨率取 $2\ \text{cm}^{-1}$ 时，其光谱噪声非常大，图谱质量很差，并且光谱分辨率越高，采集图像文件所需时间越长，相应数据文件越大，于是将其剔除，光谱分辨率分别取 4、8、16、32、 $64\ \text{cm}^{-1}$ ，结果得出的图像 *RMS* 仍有显著性差异 ($p=0.023<0.05$)，从图 3 b 中可看出光谱分辨率取 $4\ \text{cm}^{-1}$ 时，光谱中也含有较大噪声，因此再将其剔除。分辨率分别取 8、16、32、 $64\ \text{cm}^{-1}$ ，结果说

明在 $\alpha=0.05$ 水平上这些光谱分辨率采集出的图像 *RMS* 无显著性差异 ($p=0.536>0.05$)。

采集光谱图像时应该选择大小合适的光谱分辨率，该光谱分辨率既要保证光谱的质量，同时又要保证检测对象特征峰的出现。如图 3 所示，当降低分辨率可提高光谱的信噪比，但光谱分辨率降到 $64\ \text{cm}^{-1}$ 时，如图 3 f，与其他光谱分辨率下的三聚氰胺光谱图相比，在 $6\ 810\sim 6\ 550\ \text{cm}^{-1}$ 范围内 $6\ 711$ 、 $6\ 553\ \text{cm}^{-1}$ 附近的 2 个吸收峰以及 $5\ 150\sim 4\ 100\ \text{cm}^{-1}$ 范围内 $5\ 110$ 、 $4\ 860$ 、 $4\ 181\ \text{cm}^{-1}$ 附近的三个吸收峰没有完全分离出来，这将对三聚氰胺的检测效果造成影响，因而将该光谱分辨率 $64\ \text{cm}^{-1}$ 剔除。结合上述结果确定光谱分辨率取 8、16、 $32\ \text{cm}^{-1}$ 这 3 个水平用于多因素正交试验设计。



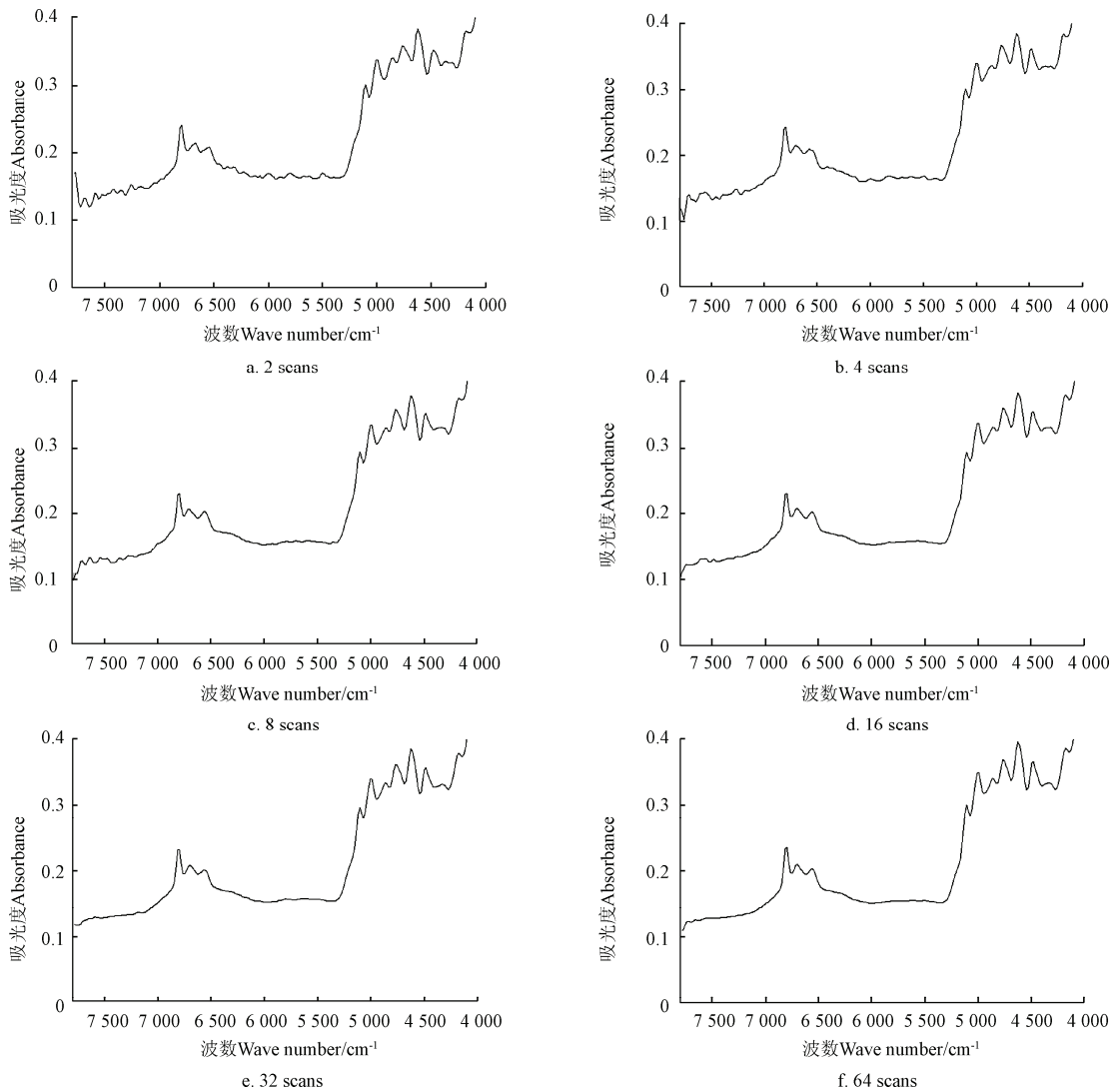
注：扫描次数取 8 次，干涉仪动镜移动速度取 $1\ \text{cm/s}$ ，空间分辨率取 $50\ \mu\text{m}\times 50\ \mu\text{m}$ ，光谱扫描波长范围取 $7\ 800\sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$
 Note: scans per pixel was 8, interferometer speed was $1\ \text{cm/s}$, pixel size was $50\ \mu\text{m}\times 50\ \mu\text{m}$ and the wavenumber range was $7\ 800\sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$

图 3 不同分辨率下三聚氰胺样本的光谱图
 Fig.3 Spectra of melamine at different resolutions

2.1.2 扫描次数对光谱图像质量的影响

显微近红外图像采集时与近红外光谱类似，检测器的噪声占了总噪声的主要部分并且是随机的，若扫描次数过少，光谱质量较差，因而采集时需要采用通过多次扫描取平均值的方法。试验对不同扫描次数下 10 个样本图像 RMS 值进行单因素方差分析，当扫描次数分别取 2、4、8、16、32、64 次时，对光谱图像 RMS 进行单因素方差分析的结果表明这些扫描次数采集的图像 RMS 值有显著性差异

($p=0<0.05$)。图 4 为一个样本在不同扫描次数下三聚氰胺颗粒上一个像素点的光谱图，从图 4a 中可看出扫描次数取 2 次时，光谱中含有较大噪声，于是将扫描次数 2 次剔除，研究扫描次数分别取 4、8、16、32、64 次时对光谱图像质量的影响，结果图像 RMS 值无显著性差异 ($p=0.053>0.05$)。但次数过多，光谱图像采集时间会很长，因此结合图像光谱质量与采集效率本文选择 4、8、16 次作为多因素正交试验扫描次数的水平。



注：光谱分辨率取 32 cm^{-1} ，干涉仪动镜移动速度取 1 cm/s ，空间分辨率取 $50\text{ }\mu\text{m}\times 50\text{ }\mu\text{m}$ ，扫描光谱范围 $7\text{ }800\sim 4\text{ }000\text{ cm}^{-1}$
 Note: resolution was 32 cm^{-1} , interferometer speed was 1 cm/s , pixel size was $50\text{ }\mu\text{m}\times 50\text{ }\mu\text{m}$ and the wavenumber range was $7\text{ }800\sim 4\text{ }000\text{ cm}^{-1}$

图 4 不同扫描次数下三聚氰胺样本的光谱图
 Fig.4 Spectra of melamine at different scans number

2.1.3 多因素正交试验直观分析

根据表 1 中确定的因素和水平，用混合正交试验表 $L_9(2^2\times 3^2)$ 设计的试验方案进行多因素正交试验，试验结果及方差分析见表 2、3。由表 2 的极差 R_{RMS} 结果可以得出 4 个因素对图像质量影响的

主次顺序为： $C>D>B>A$ ，即光谱分辨率>扫描次数>干涉仪动镜移动速度>空间分辨率。表 3 结果显示 4 个因素中因素 C（光谱分辨率）对光谱图像 RMS 有显著性影响 ($p=0.048<0.05$)，应该选最好的水平，根据表 2 中的试验结果，因素 C 有

$\overline{K_{3RMS}} < \overline{K_{2RMS}} < \overline{K_{1RMS}}$ ，因此光谱分辨率取 32 cm^{-1} 。对于其他 3 个非显著性影响因素，水平可以根据图像质量、采集效率、三聚氰胺检测效果等方面选取效率高且检测效果好的水平。其中因素 B 有 $\overline{K_{1RMS}} < \overline{K_{2RMS}}$ ，且当动镜移动速度取较大值 2.2 cm/s 时，检测器接收的能量只有 1 cm/s 时的 $1/3$ ，所以因素 B 应选择水平 1，即干涉仪动镜移动速度

选 1 cm/s 。对于因素 A 有 $\overline{K_{2RMS}} < \overline{K_{1RMS}}$ ，因素 D 有 $\overline{K_{3RMS}} < \overline{K_{2RMS}} < \overline{K_{1RMS}}$ ，因此根据图像质量，可得出优选试验方案为 $A_2B_1C_3D_3$ ，即扫描条件为：空间分辨率 (pixel size) = $50 \mu\text{m}$ ，干涉仪动镜移动速度 (interferometer speed) = 1 cm/s ，光谱分辨率 (resolution) = 32 cm^{-1} ，扫描次数 (scans per pixel) = 16 次，将该扫描条件设定为方案 10。

表 2 正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal test

试验号 Test number	因素 Factors				均方根噪声 RMS	时间 Time /min
	A 空间分辨率 Pixel size/ μm	B 干涉仪动镜移动速度 Interferometer speed/($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)	C 光谱分辨率 Resolution/ cm^{-1}	D 扫描次数 Scans per pixel /times		
1	25	1	8	4	0.0024	50.00
2	25	1	16	8	0.0014	58.20
3	25	2.2	32	16	0.0012	40.60
4	25	1	16	16	0.0012	118.00
5	25	1	32	4	0.0013	18.30
6	25	2.2	8	8	0.0025	50.00
7	50	1	32	8	0.0010	20.20
8	50	1	8	16	0.0013	98.40
9	50	2.2	16	4	0.0021	8.20
$\overline{K_{1RMS}}$	0.0017	0.0014	0.0021	0.0019		
$\overline{K_{2RMS}}$	0.0015	0.0019	0.0016	0.0017		
$\overline{K_{3RMS}}$	-	-	0.0012	0.0012		
R_{RMS}	0.0002	0.0005	0.0009	0.0007		
$\overline{K_{1Time}}$	55.85	60.52	66.10	25.50		
$\overline{K_{2Time}}$	42.30	32.90	61.50	42.80		
$\overline{K_{3Time}}$	-	-	26.40	85.70		
R_{Time}	13.55	27.62	39.70	60.20		

表 3 正交试验方差分析结果

Table 3 Variance analysis results of orthogonal test

变异来源 Variance of source	III 型平方和 III Sum of squared deviations	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
A	1.019×10^{-7}	1	1.019×10^{-7}	3.267	0.207
B	4.940×10^{-7}	1	6.422×10^{-7}	19.267	0.056
C	1.194×10^{-6}	2	5.278×10^{-7}	15.833	0.048
D	7.769×10^{-7}	2	3.011×10^{-7}	9.033	0.072
误差	6.012×10^{-8}	2	3.333×10^{-8}		
总计	2.599×10^{-5}	9			

2.2 不同扫描条件对采集效率和三聚氰胺检测效果的影响

在确定扫描条件时还需要考虑检测效率，因为若采集样本成像面积较大，采集样本图像可能需要花费几个甚至十几个小时，耗时过长影响整个检测

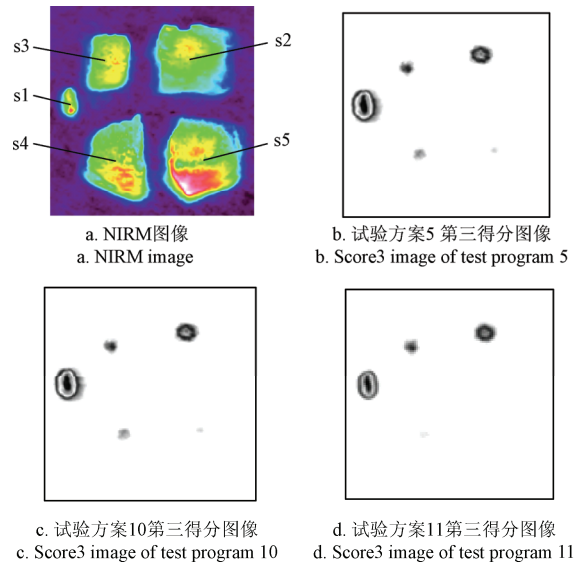
效率。空间分辨率越大，光谱分辨率越低，扫描次数越少，干涉仪动镜移动速度越快，采集效率越高。由表 2 的极差 R_{Time} 结果可以得出 4 个因素对图像采集效率影响的主次顺序为：D>C>B>A，即扫描次数>光谱分辨率>干涉仪动镜移动速度>空间分辨率。其中因素 D 有 $\overline{K_{1Time}} < \overline{K_{2Time}} < \overline{K_{3Time}}$ ，因素 C 有 $\overline{K_{3Time}} < \overline{K_{2Time}} < \overline{K_{1Time}}$ ，因素 A 有 $\overline{K_{2Time}} < \overline{K_{1Time}}$ ，因素 B 同前选择水平 1。因此根据图像采集效率，可得出优选试验方案为 $A_2B_1C_3D_1$ ，即扫描条件为：空间分辨率 (pixel size) = $50 \mu\text{m}$ ，干涉仪动镜移动速度 (interferometer speed) = 1 cm/s ，光谱分辨率 (resolution) = 32 cm^{-1} ，扫描次数 (scans per pixel) = 4 次，将该扫描条件设定为方案 11。

研究不同扫描条件对三聚氰胺检测效果的影响时，考虑到粒度小于 $50 \mu\text{m}$ 的三聚氰胺颗粒的检

测，将采集效率最高扫描条件的空间分辨率设为 $25\ \mu\text{m}$ ，即为方案 5，与根据图像质量优选的方案 10、根据采集效率优选的方案 11 对比三聚氰胺检测效果。

检测豆粕中的三聚氰胺时 3 种位置关系中检测难度最大的是位于豆粕下面的三聚氰胺颗粒，如图 5a 所示，s1 为三聚氰胺颗粒，s2~s5 为厚度依次约 30、50、100、110 μm 的豆粕，下面放有三聚氰胺颗粒，对该样本按方案 5、10、11 中的扫描条件分别采集其显微近红外光谱图像。计算 RMS 值分别为 0.0019、0.0017、0.0020，扫描时间分别为 18.3、37.0、9 min，可见这 3 种扫描条件下光谱图像的质量差别较小，而对比图像采集时间发现差别较大。

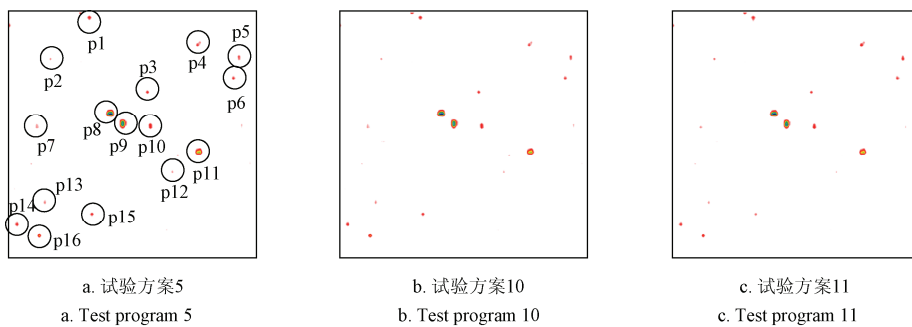
然后利用图像处理软件 HyperView V2.0 对光谱图像进行 PCA 处理，因子数取 10，结果发现第三主成分因子得分图像 (score3) 主要反映豆粕中三聚氰胺的分布，如图 5 所示，试验方案 5、10、11 对应的结果如图 5b~5d，从图中可见 3 种试验方案的扫描条件对不同厚度豆粕下三聚氰胺颗粒的检测效果相近，其中 s2 与 s3 下面的三聚氰胺颗粒非常清楚地被检测出来，s4 下面的三聚氰胺颗粒检测效果较差些，s5 豆粕下面的三聚氰胺颗粒检测效果最差，而且采集效率最高的试验方案 11 中 s5 豆粕下三聚氰胺颗粒的检测效果不如另 2 个方案。该试验结果同时也反映了不同厚度的豆粕对三聚氰胺颗粒的检测效果会有一定程度的影响，原因是较厚豆粕下面的三聚氰胺颗粒的光谱信号相对较弱，特征峰不明显。此外，由于光在不同粒度样本中的光程不同从而影响光谱图像的光强，因此三聚氰胺颗粒度大小也会对检测结果产生影响。



注：s1 为三聚氰胺颗粒，s2~s5 为厚度依次约 30、50、100、110 μm 的豆粕
 Note: s1 is a melamine particle, s2~s5 are soybean meal particles with the thickness of about 30, 50, 100 and 110 μm respectively

图 5 不同厚度豆粕下三聚氰胺检测结果
 Fig.5 Detecting results of melamine under soybean meal particles of different thickness

对于 1%质量分数且粒度大于 $50\ \mu\text{m}$ 的三聚氰胺颗粒和豆粕的混合物，采集试验方案 5、10、11 扫描条件下的显微近红外光谱图像，经 PCA 处理后的得分图像分别如图 6a~6c 所示，图 6a 中 p1~p16 圈内的点为三聚氰胺像素点，从图中可以看出 3 种方案下检测到的三聚氰胺颗粒基本一致，因而可得出 3 各种扫描条件对粒度大于 $50\ \mu\text{m}$ 三聚氰胺颗粒的检测效果相同。



注：p1~p16 圈内的点为三聚氰胺像素点
 Note: the points in the circles p1~p16 are melamine pixel points

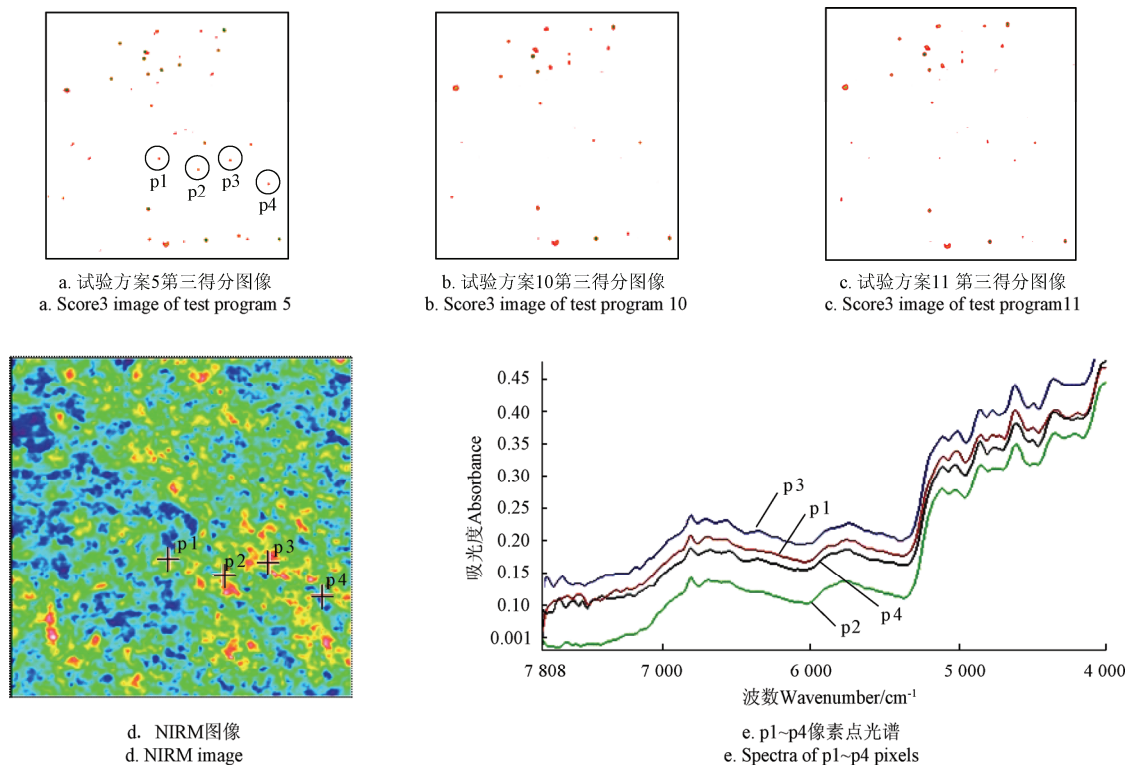
图 6 含有 1%质量分数且粒度大于 $50\ \mu\text{m}$ 三聚氰胺颗粒的掺假豆粕样本的检测结果(第三得分图像)
 Fig.6 Detecting results of adulterate soybean sample with 1% melamine of particle size more than $50\ \mu\text{m}$ (score3 image)

而对于 1%质量分数且粒度小于 $50\ \mu\text{m}$ 的三聚氰胺颗粒和豆粕的混合物，用试验方案 5、10 和 11 采集的显微近红外光谱图像，经 PCA 处理后的得分图像分别如图 7a~7c 所示，图中大部分三聚氰胺

颗粒在两种方案下检测结果相近，但有部分三聚氰胺颗粒的检测效果在方案 10 和 11 中不如方案 5，例如如图 7a 中 p1~p4 标记内的 4 个像素点，分别对应于显微近红外光谱图像(图 7d)中标记的像素点，

相应的光谱见图 7e 属于三聚氰胺颗粒。分析其检测差异的原因, 试验方案 10 和 11 中的空间分辨率是 $50 \mu\text{m}$, 而方案 5 的空间分辨率是 $25 \mu\text{m}$, 说明

空间分辨率取 $25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ 对微小三聚氰胺颗粒的检测更有利。因此, 根据三聚氰胺检测效果可知优选扫描条件为方案 5。



注: p1~p4 圈内的点为三聚氰胺像素点

Note: the points in the circles p1~p4 are melamine pixel points

图 7 含有 1% 质量分数且粒度小于 $50 \mu\text{m}$ 三聚氰胺颗粒的掺假豆粕样本的检测结果

Fig.7 Detecting results of adulterate soybean sample with 1% melamine of particle size less than $50 \mu\text{m}$

2.3 显微近红外图像扫描条件的确定

由上述试验结果可知, 采用显微近红外图像方法检测豆粕中三聚氰胺时, 对于不同的扫描条件, 根据图像质量可得到优选试验方案 10, 根据采集效率可得到优选试验方案 11, 根据三聚氰胺检测效果得到优选方案 5。综合考虑可见试验方案 5 在耗时较少的情况下可获得更准确的三聚氰胺检测效果, 因此最终推荐采用试验方案 5 中的扫描条件, 即空间分辨率 (pixel size) = $25 \mu\text{m}$, 干涉仪动镜移动速度 (interferometer speed) = 1 cm/s , 光谱分辨率 (resolution) = 32 cm^{-1} , 扫描次数 (scans per pixel) = 4 次。同时, 试验结果也显示了显微近红外成像技术检测豆粕中的三聚氰胺掺假物的可行性, 但利用该技术结合化学计量学方法建立更高精度三聚氰胺检测模型以及其它情况掺假产品的检测还需要今后进一步研究。

3 结论

1) 试验以豆粕中三聚氰胺为研究对象, 通过显微近红外成像扫描参数的单因素方差分析和多

因素正交试验, 发现光谱分辨率对 RMS 有显著性影响, 而且采用不同扫描条件时显微近红外图像采集时间相差很大;

2) 多因素试验中其它不显著性因素的水平变化未导致不同厚度豆粕下三聚氰胺以及粒度大于 $50 \mu\text{m}$ 三聚氰胺颗粒检测效果的较大差异, 对于粒度小于 $50 \mu\text{m}$ 三聚氰胺颗粒的检测, 空间分辨率取 $50 \mu\text{m}$ 时检测效果不如 $25 \mu\text{m}$ 好;

3) 综合考虑图像质量、采集效率、以及对不同厚度豆粕下三聚氰胺样本和含有 1% 质量分数且不同粒度三聚氰胺的掺假豆粕样本的检测效果, 最终推荐采用的扫描条件为空间分辨率 (pixel size) = $25 \mu\text{m}$, 干涉仪动镜移动速度 (interferometer speed) = 1 cm/s , 光谱分辨率 (resolution) = 32 cm^{-1} , 扫描次数 (scans per pixel) = 4 次;

显微近红外成像技术检测豆粕中三聚氰胺, 除设备购置外, 检测过程无需任何试剂等费用, 又因其对样品无破坏性, 且可满足微小检测物的定性定量定位检测, 是对无损检测技术的发展和补充, 具有广阔应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Sabin GP, Breitzkreitz MC, de Souza AM, et al. Analysis of pharmaceutical pellets: An approach using near-infrared chemical imaging[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 706(1): 113–119.
- [2] De Juan A, Tauler R, Dyson R, et al. Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis[J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2004, 23(1): 70–79.
- [3] Abbas O, Fernández Pierna J, Boix A, et al. Key parameters for the development of a NIR microscopic method for the quantification of processed by-products of animal origin in compound feeding stuffs[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397(5): 1965–1973.
- [4] 郑东耀, 丁天怀. 纤维红外吸收特性及其在皮棉杂质检测中的应用[J]. *农业工程学报*, 2004, 20(3): 104–108.
Jia Dongyao, Ding Tianhuai. Infrared absorption characteristics of fibers and their application in detection of foreign fibers in cotton[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2004, 20(3): 104–108. (in Chinese with English abstract)
- [5] Delarozadelgado B, Soldado A, Martinezfernandez A, et al. Application of near-infrared microscopy (NIRM) for the detection of meat and bone meals in animal feeds: A tool for food and feed safety[J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(3): 1164–1170.
- [6] 姜训鹏, 杨增玲, 韩鲁佳, 等. 精料补充料中肉骨粉的显微近红外成像识别[J]. *农业机械学报*, 2011, 42(7): 152–159.
Jiang Xunpeng, Yang Zengling, Han Lujia, et al. Discrimination of meat and bone meal in concentrate supplement by near-infrared microscopic imaging[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2011, 42(7): 152–159. (in Chinese with English abstract)
- [7] Von Holst C, Baeten V, Boix A, et al. Transferability study of a near-infrared microscopic method for the detection of banned meat and bone meal in feeding stuffs[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 392(1): 313–317.
- [8] Wang Dong, Ding Yunsheng, Cao Jinli, et al. Study of spatial distribution for the active ingredient in ibuprofen tablet based on near-infrared micro-imaging technology[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2011, 22(11): 1335–1338.
- [9] Sabin G P, de Carvalho Rocha WF, Poppi R J. Study of the similarity between distribution maps of concentration in near-infrared spectroscopy chemical imaging obtained by different multivariate calibration approaches[J]. *Microchemical Journal*, 2011, 99(2): 542–547.
- [10] 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.
- [11] Carneiro R L, Poppi R J. Homogeneity study of ointment dosage forms by infrared imaging spectroscopy[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 58: 42–48.
- [12] 黄红娟, 郑一平, 楼寿松. 傅立叶显微红外化学成像在朱墨时序鉴定中的应用研究[J]. *刑事技术*, 2010(4): 29–32.
Huang Hongjuan, Zheng Yiping, Lou Shousong. Application of FT-IR microscopic chemical imaging system to identify the sequence of crossed writings and seal stamps[J]. *Forensic Science and Technology*, 2010(4): 29–32. (in Chinese with English abstract)
- [13] 王冬. 近红外显微图像技术及其在生物学中的应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2007.
Wang Dong. Near-Infrared Micro-Image Technology and its Application in Biology[D]. Beijing: China Agricultural University, 2007. (in Chinese with English abstract)
- [14] Alexandrino G L, Poppi R J. NIR imaging spectroscopy for quantification of constituents in polymers thin films loaded with paracetamol[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 765: 37–44.
- [15] 王冬, 马智宏, 赵柳, 等. 两种相似塑料材料的显微近、中红外成像方法研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2011, 31(9): 2377–2382.
Wang Dong, Ma Zhihong, Zhao Liu, et al. Comparative research on the NIR and MIR micro-imaging of two similar plastic materials[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2011, 31(9): 2377–2382. (in Chinese with English abstract)
- [16] 王辉, 董元华, 安琼. 环丙氨嗪(Cyromazine)的生物毒性与环境行为研究进展[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(1): 246–249.
Wang Hui, Dong Yuanhua, An Qiong. Research advance in biotoxicology and environmental behavior of cyromazine[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2008, 24(1): 246–249. (in Chinese with English abstract)
- [17] Balabin R M, Smirnov S V. Melamine detection by mid- and near-infrared (MIR/NIR) spectroscopy: A quick and sensitive method for dairy products analysis including

- liquid milk, infant formula, and milk powder[J]. *Talanta*, 2011, 85(1): 562—568.
- [18] Salguero-Chaparro L, Baeten V, Abbas O, et al. On-line analysis of intact olive fruits by vis-NIR spectroscopy: Optimisation of the acquisition parameters[J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 112(3): 152—157.
- [19] Schimleck L R, Sturzenbecher R, Jones P D, et al. Development of wood property calibrations using near infrared spectra having different spectral resolutions[J]. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2004, 12(1): 55—61.
- [20] 赵丽丽, 赵龙莲, 李军会, 等. 傅里叶变换近红外光谱仪扫描条件对数学模型预测精度的影响[J]. *光谱学与光谱分析*, 2004, 24(1): 41—44.
- Zhao Lili, Zhao Longlian, Li Junhui, et al. Influence of FT-NIR spectrometer scanning requirements on the math model's precision[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, 24(1): 41—44. (in Chinese with English abstract)
- [21] 谢丽娟, 刘东红, 张宇环, 等. 分辨率对近红外光谱和定量分析的影响研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(8): 1489—1492.
- Xie Lijuan, Liu Donghong, Zhang Yuhuan, et al. Study on the influence of resolution on near Infrared spectra and quantitative analysis[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, 27(8): 1489—1492. (in Chinese with English abstract)
- [22] 王冬, 叶升锋, 闵顺耕, 等. 近红外光谱分辨率对液体样品近红外定量模型影响的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(7): 1813—1817.
- Wang Dong, Ye Shengfeng, Min Shungeng, et al. Comparison of the models of mixed liquid samples under different near-infrared spectral resolutions[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, 29(7): 1813—1817. (in Chinese with English abstract)
- [23] 段焰青, 杨涛, 孔祥勇, 等. 样品粒度和光谱分辨率对烟草烟碱 NIR 预测模型的影响[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2006, 28(4): 340—344, 349.
- Duan Yanqing, Yang Tao, Kong Xiangyong, et al. Effects of sample granularity and spectral resolution on tobacco nicotine NIR predictive model[J]. *Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition*, 2006, 28(4): 340—344, 349. (in Chinese with English abstract)
- [24] 蒋焕煜, 彭永石, 谢丽娟, 等. 扫描次数对番茄叶漫反射光谱和模型精度的影响研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(8): 1763—1766.
- Jiang Huanyu, Peng Yongshi, Xie Lijuan, et al. Study on the influence of scan number on near-infrared diffuse spectra of tomato leaf and model precision[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, 28(8): 1763—1766. (in Chinese with English abstract)
- [25] 周竹, 李小昱, 陶海龙, 等. 基于高光谱成像技术的马铃薯外部缺陷检测[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(21): 221—228.
- Zhou Zhu, Li Xiaoyu, Tao Hailong, et al. Detection of potato external defects based on hyperspectral imaging technology[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2012, 28(21): 221—228. (in Chinese with English abstract)

Optimization of scanning conditions on near-infrared microscopic imaging for melamine detection in soybean meal

Li Jing^{1,2}, Han Lujia^{1*}, Yang Zengling¹

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Engineering College, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Melamine is used as a non-protein nitrogen adulterant in soybean meal to increase the protein content, and it is harmful to the animals. The existing conventional detecting techniques have the shortcomings of complex pretreatment, high cost, and cannot achieve online detection. Near-infrared microscopic (NIRM) imaging technology combines the spectral and imaging technology. It can detect the material compositions and visualize the position. However, different scanning condition will affect the NIRM image quality and the detecting effect. In this article, a Spotlight 400 NIRM imaging system was used to acquire the NIRM images of the samples. The influence of the scanning condition on NIRM image quality and detection performance of the melamine in soybean meal was studied, and the scanning condition of melamine detection in soybean meal by NIRM imaging

was optimized. At first, 10 samples in which the melamine particles were placed on the soybean meal particle, under the soybean meal particle, and beside the soybean meal particle were prepared, and the images were scanned. The influence of different resolution and scan times on the spectral image root mean square noise (*RMS*) were examined by one-way ANOVA analysis. The results reflected that the levels of 8, 16, 32, 64 cm^{-1} of spectral resolution and the 4, 8, 16 scans per pixel didn't significantly influence on *RMS*. Different interferometer speed (1, 2.2 cm/s), pixel size (25, 50 μm), resolution (8, 16, 32 cm^{-1}) and scans per pixel (4, 8, 16) were analyzed by the multi-factor orthogonal experiment. The results showed that resolution had a significant influence on *RMS* and the optimized scanning condition (test program 10) was as follows: pixel size=50 μm , interferometer speed=1 cm/s , resolution=32 cm^{-1} , scans per pixel=16. Meanwhile the following most efficient scanning condition (test program 11) was obtained: pixel size=50 μm , interferometer speed=1 cm/s , resolution=32 cm^{-1} , scans per pixel=4. Considering that the melamine particle size may be less than 50 μm , another scanning condition (test program 5) was set by changing the pixel size of the most efficient scanning condition to 25 μm . Then, in order to inspect the influence on melamine detection, three other samples were prepared to compare the detection performance of melamine in soybean meal with the optimized scanning condition of test program 5, 10 and 11. One sample was prepared with the melamine particles placed under 4 soybean meal particles of different thicknesses. The other two samples were the mixture samples artificially contaminated with 1% melamine, and the melamine particle size was less than and more than 50 μm , respectively. The results showed that the scanning condition of test program 5 had obtained a more accurate melamine detecting result for the mixture sample contaminated with 1% melamine of particle size less than 50 μm because the pixel size was 25 μm . There was little difference between the three scanning conditions for the other samples. Therefore, considering the optimized scanning conditions obtained by the image quality, the scanning time, and the detection performance of the melamine in soybean meal, the final scanning conditions were recommended as follows: pixel size=25 μm , interferometer speed=1 cm/s , resolution= 32 cm^{-1} , scans per pixel=4. The study also indicated that NIRM imaging technology could effectively detect melamine in soybean meal.

Key words: scanning, optimization, imaging techniques, NIRM imaging, melamine, soybean meal

(责任编辑: 郭海枫)