

ICS 65.120

CCS B 46

N

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—202×

饲料中抗生素滤渣的鉴别 显微红外光谱 法

Identify of antibiotic filter residue in feeds
— Microscopic infrared spectroscopy

(征求意见稿)

202×-××-××××发布

202×-××-××××实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：中国农业大学，中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量检验检测中心（北京）]，布鲁克（北京）科技有限公司，XXXXXXX。

本文件主要起草人：杨增玲，樊霞，韩鲁佳，葛辰俊，李守学，赵跃，XXXXXX。

饲料中抗生素滤渣的鉴别 显微红外光谱法

1 范围

本文件描述了饲料中抗生素滤渣的显微红外光谱鉴别方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和饲料原料中抗生素滤渣的鉴别。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 8322 分子吸收光谱法 术语

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

GB/T 8322 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

显微红外光谱 microscopic infrared spectrum

使用显微红外成像系统采集的试样中微小区域的红外光谱,微小区域的大小由选择的空间分辨率决定。

3.2

显微红外成像系统 microscopic infrared spectroscopy

可以对试样微小区域进行红外光谱的获取。采集到的数据包含试样的二维空间位置信息和试样各微小区域的红外光谱信息。

3.3

余弦相似度 cosine similarity

两个光谱向量的夹角余弦值。用于衡量光谱间的差异大小,余弦相似度值越接近 1,说明两个光谱越相似。

3.4

阈值 threshold

根据余弦相似度判断光谱是否和目标光谱相似的临界值。

4 原理

采集试样的显微红外光谱,计算试样显微红外光谱与抗生素滤渣显微红外光谱库中光谱的余弦相似度,根据判定阈值判断试样中是否含有与抗生素滤渣显微红外光谱库中光谱高度相似的光谱,可为鉴别试样中的抗生素滤渣提供一定的证据。

5 仪器设备

- 5.1 显微红外成像系统：配有光源、分光系统、检测器、样品台、测量附件和配套的数据处理软件等。
- 5.2 压片机：配有压片模具、压力表、加压系统、保护装置等。可将饲料粉末或固体颗粒压成表面平整光滑且不易损坏的压片。
- 5.3 分析天平：精确为 0.1 mg。

6 样品

按GB/T 20195规定制备试样，至少100 g，粉碎使其全部过0.425 mm试验筛，混合均匀，装入密闭容器中，备用。

7 抗生素滤渣显微红外光谱库构建及鉴别阈值确定

用于建立抗生素滤渣显微红外光谱库及鉴别阈值确定的抗生素滤渣样品应保证真实性和代表性，代表性尽量涵盖各种影响因素，如需考虑：

- a) 生产地域和原料的不同；
- b) 加工技术和工艺的不同；
- c) 储存条件的不同。

采集抗生素滤渣样品的显微红外图像，获得抗生素滤渣样品的显微红外光谱，从中选取有代表性的显微红外光谱，建立抗生素滤渣显微红外光谱库及确定鉴别阈值，抗生素滤渣显微红外光谱库构建及鉴别阈值确定实施例参见附录 A。

8 试验步骤

8.1 试样制备

为获得信噪比良好的显微红外光谱，需采用压片机将试样制备成压片，即试样压片。试样压片尺寸根据显微红外成像系统样品台尺寸确定，根据试样压片尺寸选取相应规格的压片机。取适量试样，采用一定压力及压制时间制备试样压片，所用试样质量、压力和压制时间的确定应确保压片表面平整且在分析过程中不易破损。

注 1：应检查试样压片表面平整度，避免出现凹陷、突起、裂痕等影响红外光谱采集的物理缺陷。

注 2：在试样压片制备过程中，应保持压片模具的清洁，避免出现样品污染。试样压片在制备及分析过程中应避免触摸以防污染样品。

8.2 显微红外光谱采集

按显微红外成像系统仪器厂商规定的操作指南或使用说明书，选择合适的空间分辨率，选取包含不低于 2 万条显微红外光谱的区域获取试样的显微红外图像。光谱分辨率和空间分辨率的设置可参照下列参数。

- a) 光谱分辨率为 8 cm^{-1} 。
- b) 空间分辨率为 $25\text{ }\mu\text{m} \times 25\text{ }\mu\text{m}$ 。

8.3 显微红外光谱预处理

对获取的显微红外图像采用主成分降噪方法提高红外光谱的信噪比，采用二阶导数处理提高光谱的分辨率，通过剔除 CO_2 在 2349 cm^{-1} 附近的红外波段扣除 CO_2 信号对分析的干扰。

8.4 鉴别分析

计算试样显微红外光谱与抗生素滤渣光谱库中光谱的余弦相似度，余弦相似度计算按公式（1）计算：

$$\text{similarity} = \cos(\theta) = \frac{A \cdot B}{|A| \cdot |B|} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

similarity——光谱 A、B 的余弦相似度；

θ ——光谱 A、B 的夹角；

A——光谱 A；

B——光谱 B。

根据 7 确定的鉴别阈值，判断试样中是否含有与抗生素滤渣显微红外光谱库中光谱高度相似的光谱，若余弦相似度大于阈值，则认为该光谱与抗生素滤渣库中该类抗生素滤渣光谱高度相似，为鉴别试样中存在该类抗生素滤渣提供一定的证据。饲料中抗生素滤渣鉴别实施例参见附录 B。

9 鉴别报告（结果表示）

鉴别报告应包括以下信息：

- a) 鉴别试样所需的全部信息；
- b) 所有本文件未明确或被视为可选的所有操作条件；
- c) 任何可能影响结果的环境因素；
- d) 选用的抗生素滤渣光谱库及判定阈值；
- e) 获得的试样的鉴别结果。

附录 A

(资料性)

抗生素滤渣显微红外光谱库构建及鉴别阈值确定实施例

A.1 抗生素滤渣样品采集与制备

收集来自不同抗生素生产厂家的不同处理工艺和不同生产批次的代表性抗生素滤渣样品 44 个，种类及数量见表 A.1。采集的样品均为湿滤渣，统一将湿滤渣放置在空气中自然晾晒风干。所有样品干燥后粉碎过 0.425 mm 筛。

采用压片机制备厚度约 1 mm、直径 13 mm 的圆形压片，每个抗生素滤渣样品称取约 200 mg，压片机压力设定为 40 MPa，压片时间 2 min。

表 A.1 抗生素滤渣采集信息表

类别	抗生素滤渣名称	数量
氨基糖苷类	单硫酸卡那霉素滤渣	1
	硫酸新霉素滤渣	5
	硫酸安普霉素滤渣	2
	吉他霉素滤渣	1
	硫酸庆大霉素滤渣	1
	盐酸大观霉素滤渣	2
	硫酸链霉素滤渣	2
大环内酯类	酒石酸泰万菌素滤渣	4
	酒石酸泰乐菌素滤渣	4
	阿维菌素滤渣	3
	硫氰酸红霉素滤渣	1
截短侧耳素类	截短侧耳素滤渣	1
	泰妙菌素滤渣	1
四环素类	盐酸金霉素滤渣	3
	土霉素滤渣	4
林可酰胺类	盐酸林可霉素滤渣	1
多肽类	硫酸粘菌素滤渣	4
β -内酰胺类	青霉素滤渣	3
其它类	黄霉素滤渣	1

A.2 显微红外光谱采集

采用傅里叶变换红外显微成像系统采集抗生素滤渣样品的显微红外图像。采集前，添加液氮对检测器进行制冷，并预热 1h 之后，进行设备自检，自检成功后采集显微红外图像。参数设置为：波数范围 $4\ 000\text{ cm}^{-1}\sim 750\text{ cm}^{-1}$ ，光谱分辨率为 8 cm^{-1} ，扫描次数为 16 次，干涉仪动镜移动速度为 1 cm/s ，空间分辨率为 $25\ \mu\text{m}\times 25\ \mu\text{m}$ ，压片分析面积为 $4\ 000\ \mu\text{m}\times 4\ 000\ \mu\text{m}$ ，即每个压片获得 25 600 条光谱。

A.3 显微红外光谱预处理

利用主成分分析进行降噪处理，选取前 20 个主成分对显微红外图像进行重构，从而实现显微红外

光谱的降噪处理。对降噪后的红外光谱进行二阶导数处理(窗口宽度为 5)提高光谱的分辨率。剔除 $2\,422\text{ cm}^{-1} \sim 2\,263\text{ cm}^{-1}$ 波段的显微红外光谱以扣除 CO_2 信号对分析的干扰。

A.4 抗生素滤渣显微红外光谱库构建及鉴别阈值的确定

基于光谱欧氏距离从每个抗生素滤渣样品 25 600 条显微红外光谱中选取代表性光谱用于构建抗生素滤渣的显微红外光谱库及确定鉴别阈值的光谱集。在此实施例中每个抗生素滤渣选用了 4 000 条代表性显微红外光谱用于构建抗生素滤渣显微红外光谱库, 4 000 条代表性显微红外光谱作为确定鉴别阈值的光谱集。构建的抗生素滤渣显微红外光谱库中不同抗生素滤渣平均显微红外光谱如图 A.1 所示。不同来源的同一种类抗生素滤渣光谱分别如图 A.2 至图 A.12 所示。

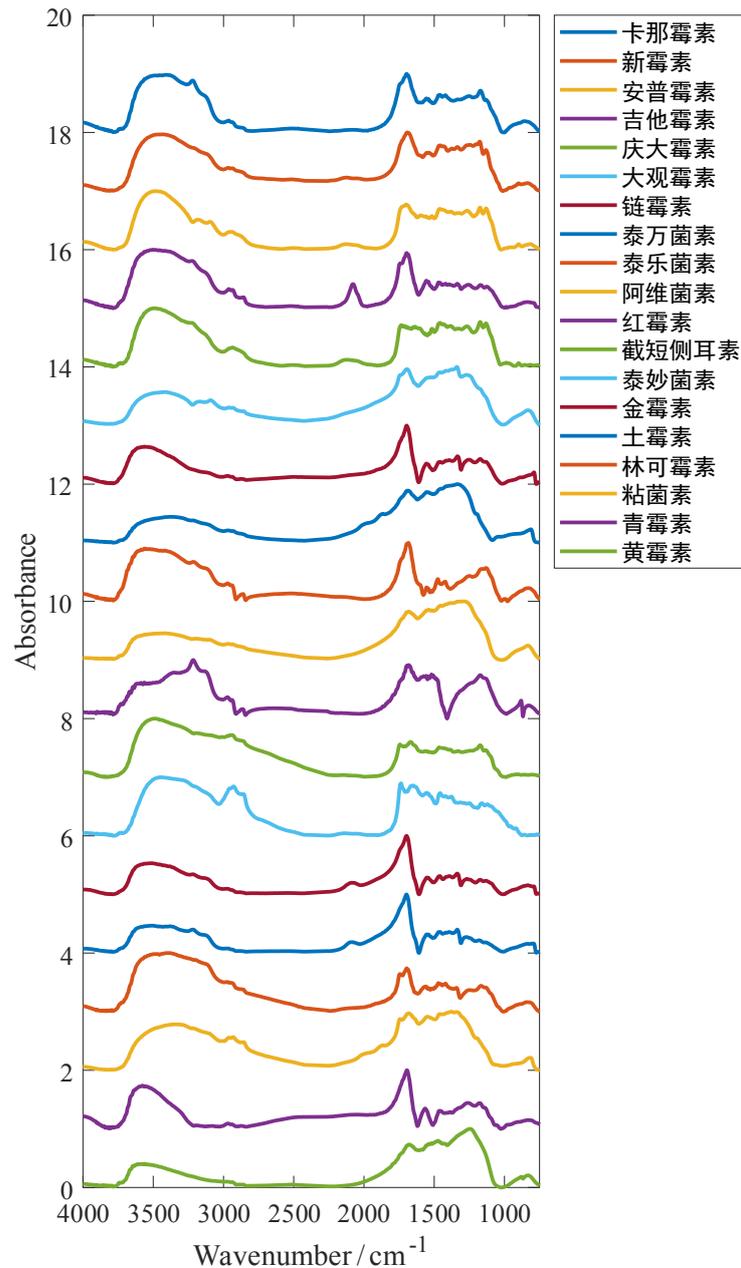


图 A.1 抗生素滤渣显微红外光谱库中各类抗生素滤渣的平均显微红外光谱

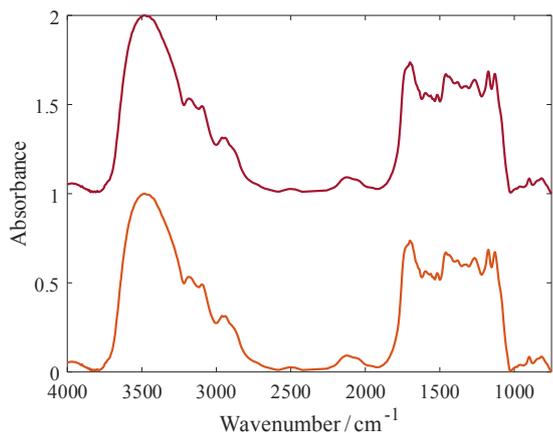


图 A.2 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源安普霉素滤渣的平均显微红外光谱

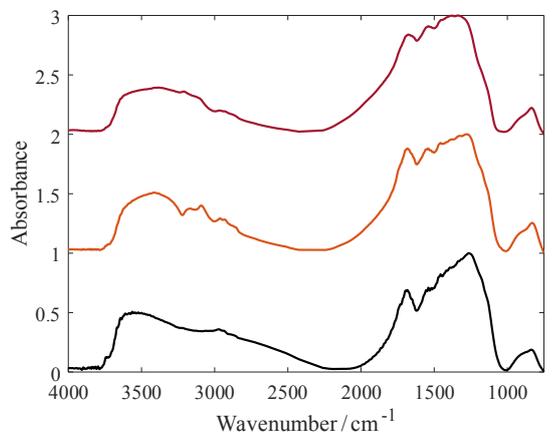


图 A.3 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源阿维菌素滤渣的平均显微红外光谱

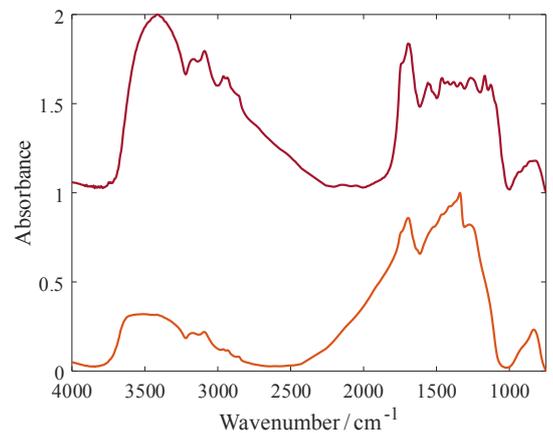


图 A.4 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源大观霉素滤渣的平均显微红外光谱

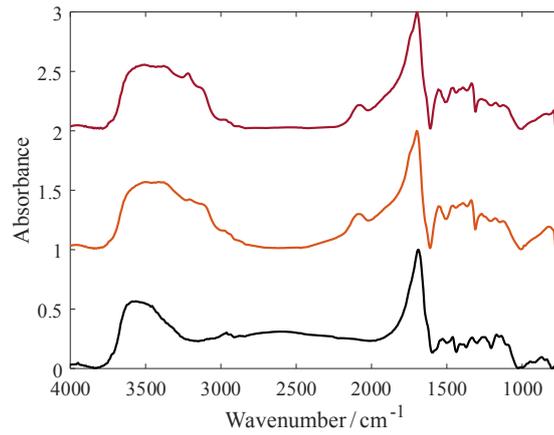


图 A.5 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源金霉素滤渣的平均显微红外光谱

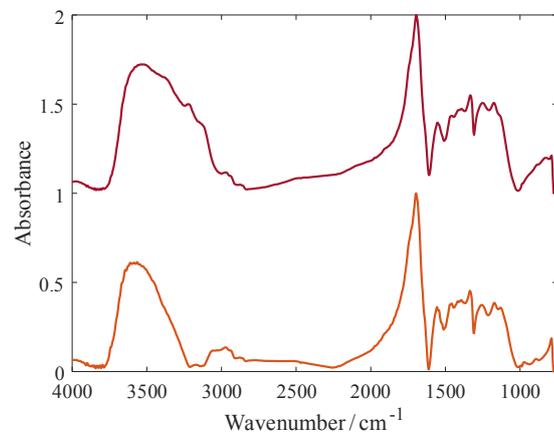


图 A.6 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源链霉素滤渣的平均显微红外光谱

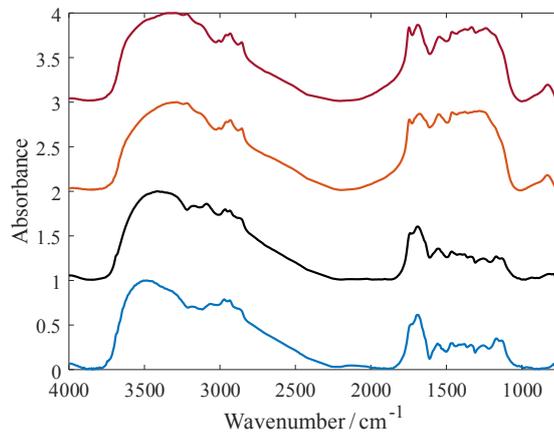


图 A.7 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源粘菌素滤渣的平均显微红外光谱

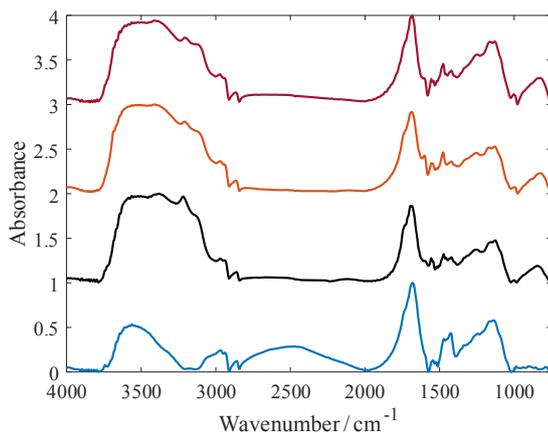


图 A.8 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源泰乐菌素滤渣的平均显微红外光谱

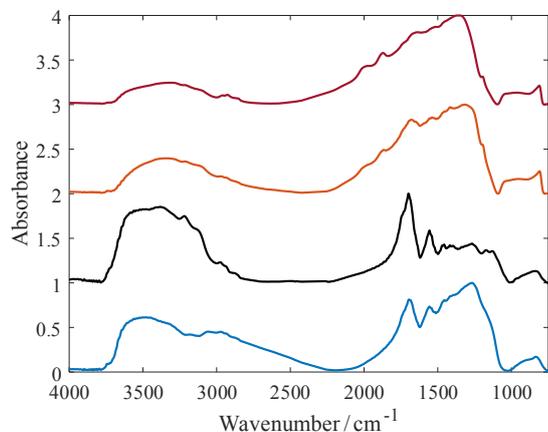


图 A.9 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源泰万菌素滤渣的平均显微红外光谱

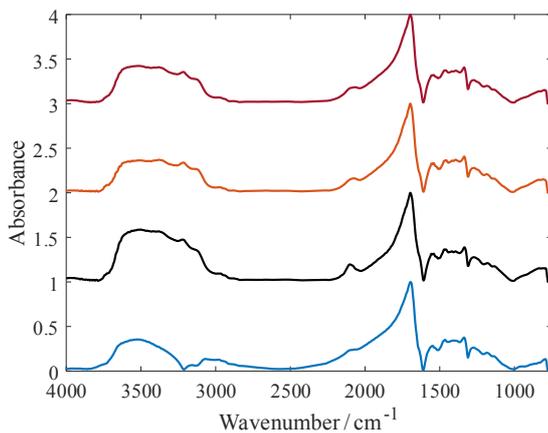


图 A.10 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源土霉素滤渣的平均显微红外光谱

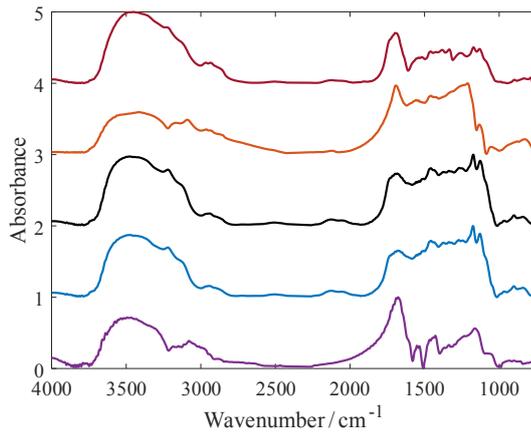


图 A.11 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源新霉素滤渣的平均显微红外光谱

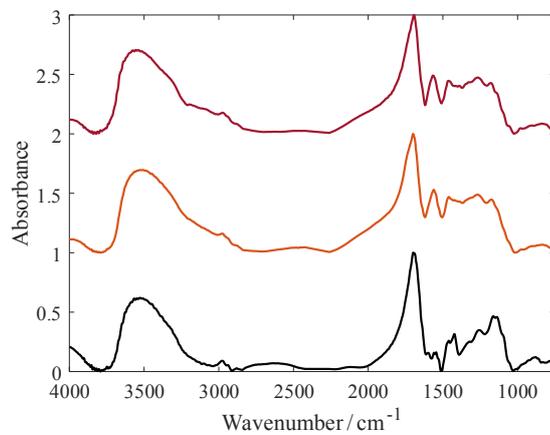


图 A.12 抗生素滤渣显微红外光谱库中不同来源青霉素滤渣的平均显微红外光谱

对每一类抗生素滤渣样品，按公式（1）计算确定鉴别阈值光谱集光谱与抗生素滤渣显微红外光谱库中同类抗生素滤渣光谱的余弦相似度值，按照余弦相似度值 2.5% 下百分位数确定判别阈值。抗生素滤渣名称、抗生素滤渣显微红外光谱库中该类抗生素滤渣显微红外光谱数量及判定阈值如表 A.2 所示。

表 A.2 抗生素滤渣鉴别显微红外光谱余弦相似度阈值

抗生素滤渣名称	光谱库中显微红外光谱数	判定阈值
单硫酸卡那霉素滤渣	4 000	0.94
硫酸新霉素滤渣	20 000	0.92
硫酸安普霉素滤渣	8 000	0.91
吉他霉素滤渣	4 000	0.95
硫酸庆大霉素滤渣	4 000	0.93
盐酸大观霉素滤渣	8 000	0.90
硫酸链霉素滤渣	8 000	0.92
酒石酸泰万菌素滤渣	16 000	0.94
酒石酸泰乐菌素滤渣	16 000	0.92
阿维菌素滤渣	12 000	0.90
硫氰酸红霉素滤渣	4 000	0.94
截短侧耳素滤渣	4 000	0.93
泰妙菌素滤渣	4 000	0.93
盐酸金霉素滤渣	8 000	0.93
土霉素滤渣	16 000	0.96
盐酸林可霉素滤渣	4 000	0.95
硫酸粘菌素滤渣	16 000	0.95
青霉素滤渣	12 000	0.92
黄霉素滤渣	4 000	0.93

注：判定阈值会随抗生素滤渣显微红外光谱库的变化而变化，但随着代表性抗生素滤渣样品的丰富，该阈值会逐渐趋于稳定。

附录 B

(资料性)

饲料中抗生素滤渣鉴别实施例

B.1 试样制备

对含有 5% (质量分数) 抗生素滤渣的豆粕、酵母蛋白渣、玉米酒精糟 (DDGS)、核苷酸渣和鸡配合饲料样品制备试样压片, 每个试样称取约 200 mg, 采用压片机制备厚度约 1 mm、直径 13 mm 的圆形压片, 压片机压力设定为 40 MPa, 压片时间 2 min。

B.2 试样显微红外光谱采集

同 A.2。

B.3 试样显微红外光谱预处理

同 A.3。

B.4 试样中抗生素滤渣的鉴别结果

根据公式 (1) 计算试样显微红外光谱与抗生素滤渣光谱库 (同 A.4) 中光谱的余弦相似度, 根据确定的鉴别阈值 (表 A.2) 鉴别饲料中是否掺有抗生素滤渣, 图 B.1- B.4 给出了豆粕、酵母蛋白渣、玉米酒精糟 (DDGS)、核苷酸渣和鸡配合饲料中青霉素滤渣、土霉素滤渣、新霉素滤渣、泰乐菌素滤渣的鉴别结果, 含有抗生素滤渣的饲料试样中均检测出了对应的抗生素滤渣光谱。

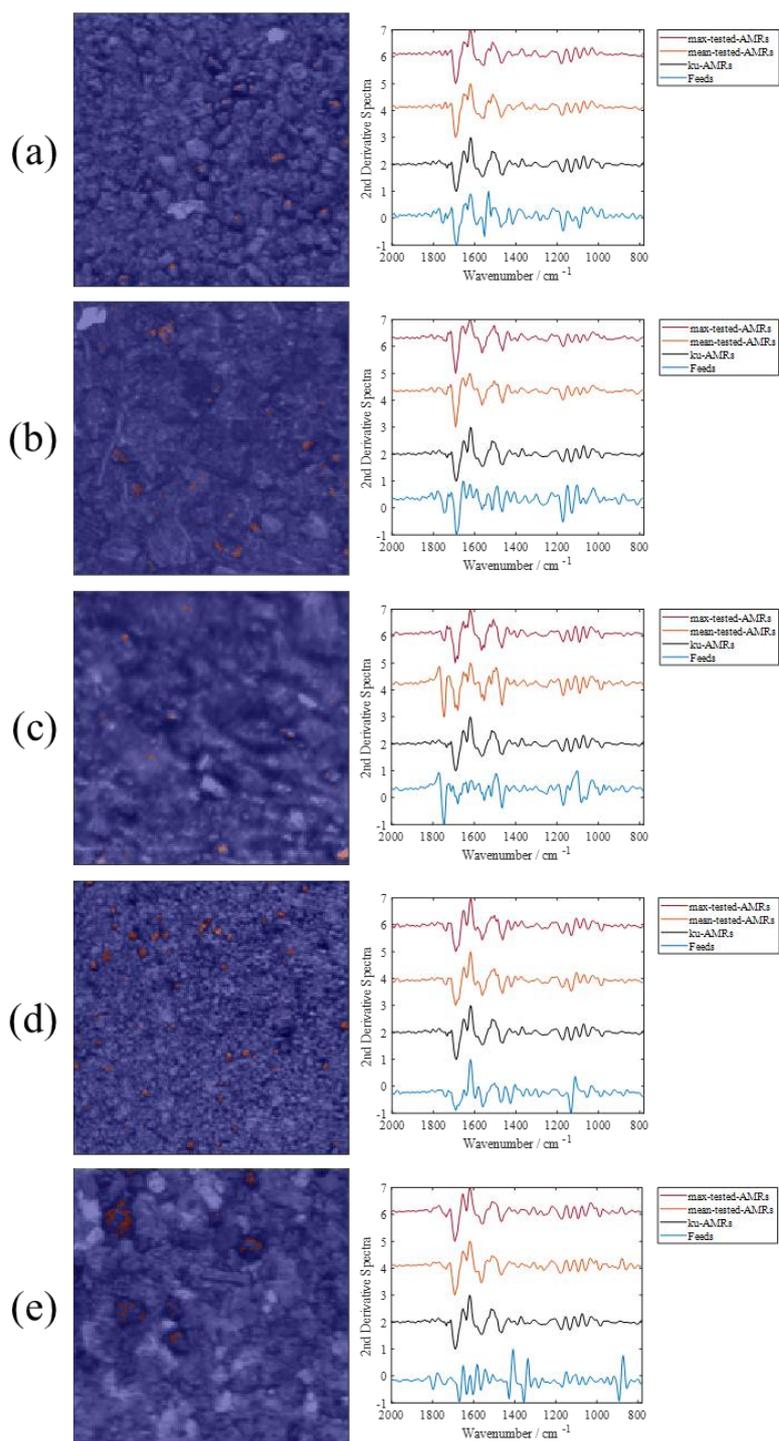


图 B.1 饲料 ((a-e) 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料) 中青霉素滤渣鉴别结果
 左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外光谱库余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，库中青霉素滤渣的平均光谱、饲料的平均光谱

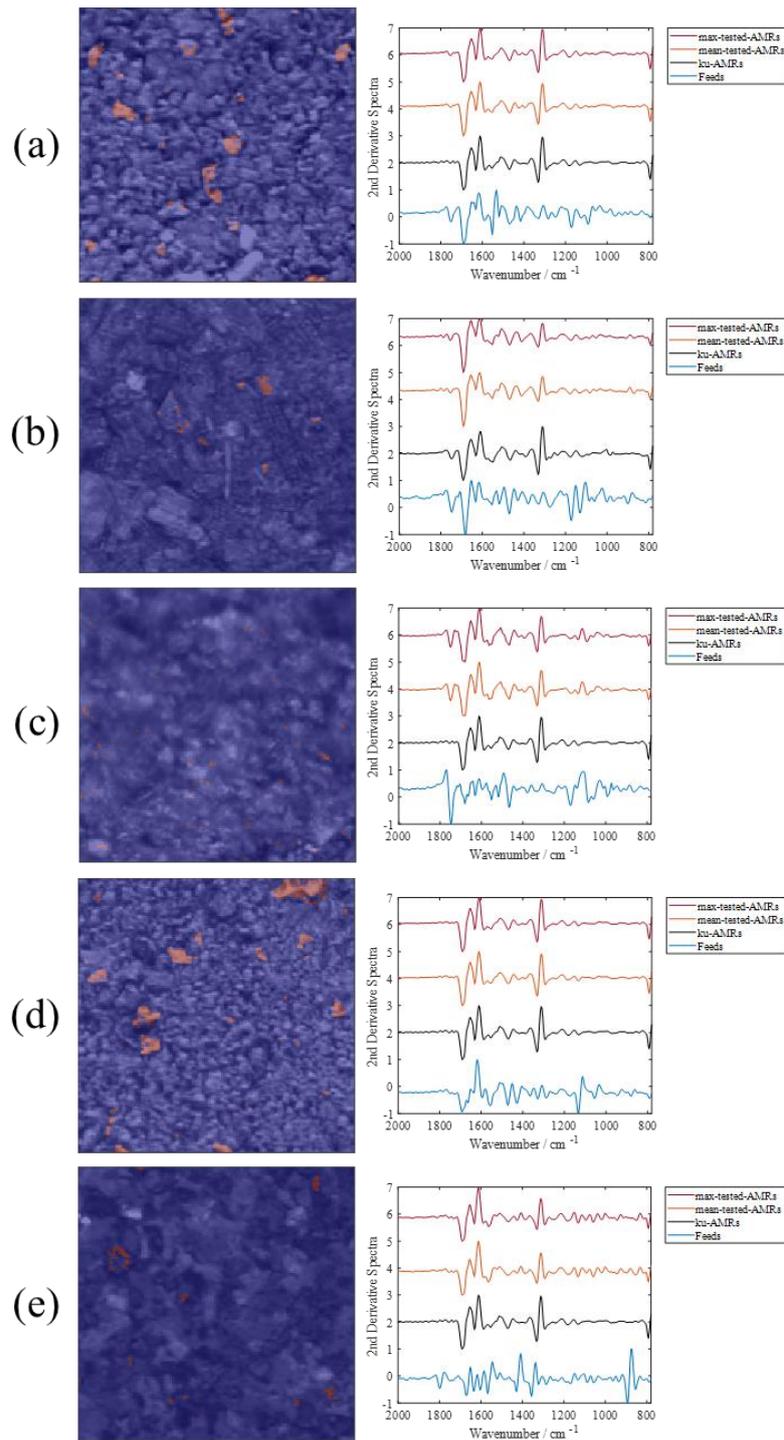


图 B.2 饲料 ((a-e) 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料) 中土霉素滤渣鉴别结果
 左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外光谱库余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，库中土霉素滤渣的平均光谱、饲料的平均光谱

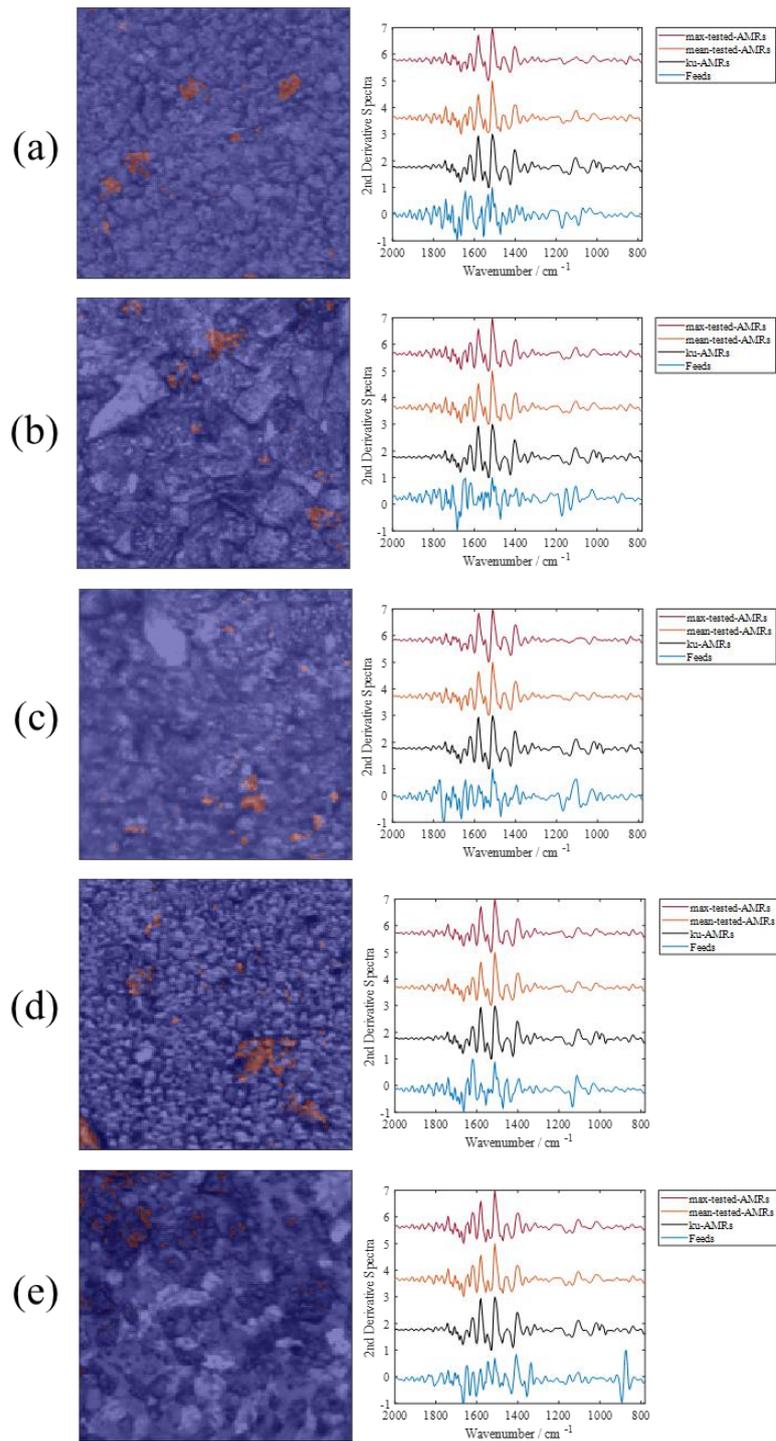


图 B.3 饲料 ((a-e) 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料) 中新霉素滤渣鉴别结果
 左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外光谱库余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，库中新霉素滤渣的平均光谱、饲料的平均光谱

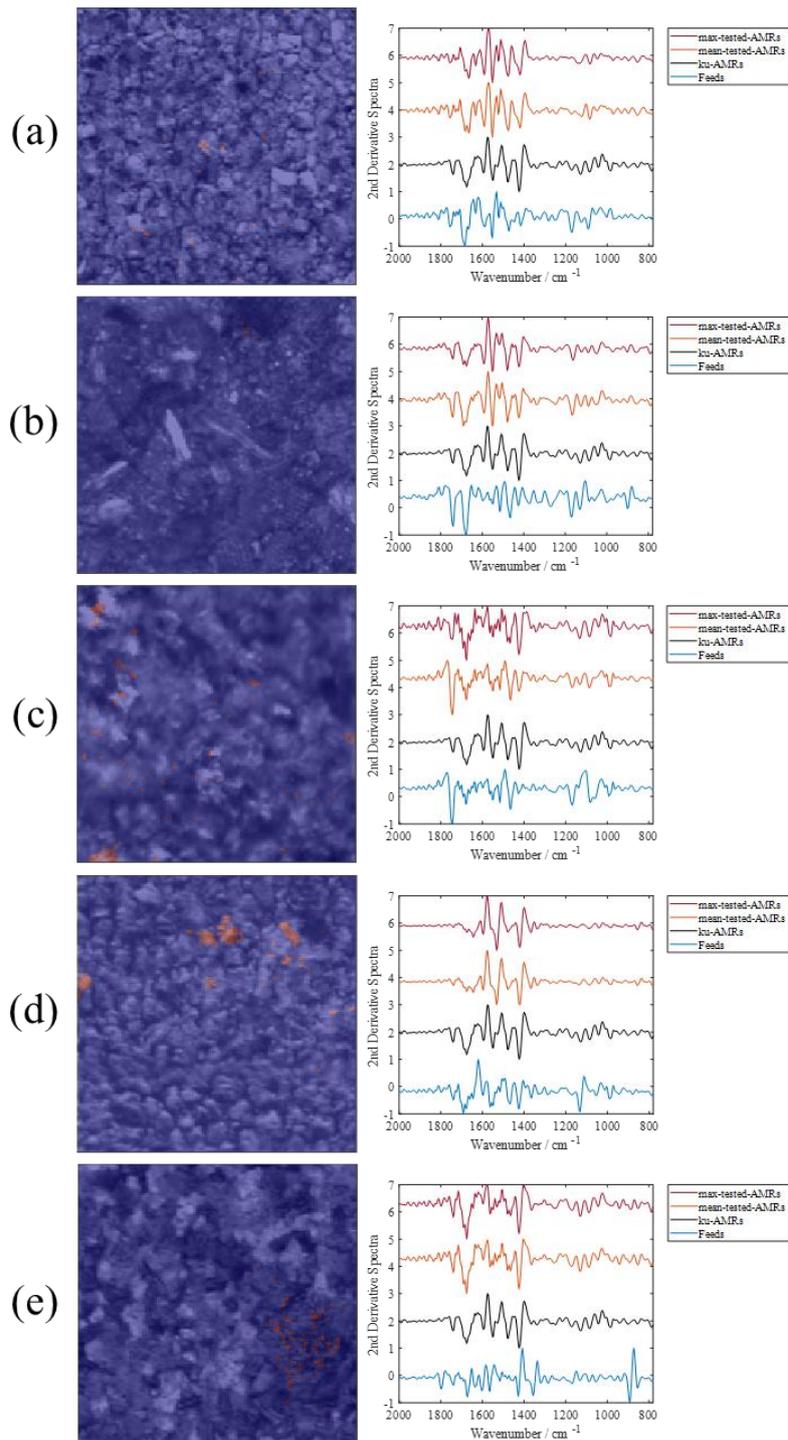


图 B.4 饲料 ((a-e) 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料) 中泰万菌素滤渣鉴别结果
 左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外光谱库余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，库中泰万菌素滤渣的平均光谱、饲料的平均光谱