

TRFES 结合化学计量学在山茶油产地识别中的应用研究

陈晖, 陆道礼, 陈斌

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 本文采用时间分辨荧光发射谱 (TRFES) 结合化学计量学建立了一种准确、快速的山茶油产地识别方法。收集浙江、江西和湖南的山茶油样品共 180 个, 采集它们的 TRFES 并从稳态荧光发射和荧光衰减维度对荧光信号的特点进行了对比; 利用平行因子分析 (PARAFAC) 对训练集样品数据进行降维和特征优化; 最终选取了两个因子的因子得分作为人工神经网络 (ANN) 的输入并建立山茶油产地识别模型。结果表明, 相较于稳态荧光发射, 荧光衰减受荧光分子浓度影响较小。因此 TRFES 被认为指纹性极强, 有利于山茶油产地识别。山茶油产地识别模型的验证相关系数为 98.7%, 预测相关系数为 96.1%, 表明该模型稳健、准确, 适合山茶油产地识别。最终表明, TRFES 结合化学计量学分析可以完成对山茶油产地的准确、快速识别。

关键词: 时间分辨荧光发射谱; 化学计量学; 山茶油; 产地识别

文章编号: 1673-9078(2018)09-251-255

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.035

TRFES Combined with Chemometrics for Geographical Identification of Camellia Oils

CHEN Hui, LU Dao-li, CHEN Bin

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: An accurate and rapid method for geographical identification of camellia oil was established based on the combination of time-resolved fluorescence emission spectrum (TRFES) and chemometrics. Totally 180 samples from Zhejiang, Jiangxi and Hunan were collected and their TRFES were compared from the dimensions of steady-state fluorescence emission and fluorescence decay; Parallel factor analysis (PARAFAC) was performed for the dimensional reduction and the optimization of characteristics based on training set; two factors were selected and then their factor scores were utilized as the input of artificial neural network (ANN), and finally the geographical identification model of camellia oil was established. The result showed that fluorescence decay was less influenced by the concentration of fluorophores than steady-state fluorescence emission. Hence, TRFES displayed stronger fingerprint characteristics and could be good for the geographical identification of camellia oil. The cross-validation coefficient was 98.7% and prediction coefficient was 96.1% for the geographical identification model of camellia oil, indicating the strong robustness and high accuracy of the model, which is considered to be suitable for the geographical identification of camellia oil. This study proved that geographical identification of camellia oil could be completed by the combination of TRFES and chemometrics.

Key words: time-resolved fluorescence emission spectrum; chemometrics; camellia oil; geographical identification

我国是食用植物油消费大国^[1]。食用植物油除了给机体提供生长代谢所需要的能量外, 还能提供重要的营养物质, 如必需脂肪酸、植物甾醇、维生素 E 及酚类化合物等^[2,3]。目前, 由于各种食用植物油之间的营养价值和市场认可度等存在差异, 因此不同种类的食用植物油价格往往存在较大差异。以山茶油为例,

收稿日期: 2018-05-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31271874)

作者简介: 陈晖 (1988-), 男, 博士研究生, 研究方向: 食品品质光学检测

通讯作者: 陈斌 (1960-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品品质无损检测

近年来对其成分的研究表明, 其脂肪酸组成接近橄榄油, 而且由于其饱和对人体健康有益的维生素 E、茶多酚和角鲨烯等营养物质, 其价格往往高于一般的食用植物油^[4-8]。另外, 由于产地之间的差别, 不同山茶油之间的认可度也不尽相同。例如, 浙江常山的山茶油由于其独特的品质, 已经注册成为地理标志产品。受经济利益的驱使和生活水平提高的影响, 国内关于食用植物油品质的问题屡见不鲜, 且人们对于食用植物油产地的偏好已经形成^[9-11]。实际生活中, 消费者通常只能根据感官对不同种类的食用植物油进行判

断,而涉及到不同产地的同种食用植物油识别时,受限于个体的实践经验和判别能力,其产地识别率往往不高。因此食用植物油产地的准确、快速识别方法的建立显得尤为重要^[12]。

荧光技术结合化学计量学分析是一种快速、灵敏的食用植物油识别分析方法^[13,14]。然而,食用植物油中的荧光信号往往被高浓度荧光分子主导,低浓度荧光分子信号经常“淹没”在高浓度荧光分子信号中。这一现象在稳态荧光测量中十分明显,通常引起荧光谱指纹性下降,并将最终导致产地识别模型性能的下降。相较于稳态荧光测量,时间分辨荧光测量提供了荧光发射的动态信息,检测时不易受荧光分子浓度干扰,因而受到广泛关注^[15~18]。荧光衰减是停止激发后荧光强度减弱的动态过程,不同的荧光分子拥有其对应的本征荧光衰减,因此更具指纹性^[19]。所以,基于荧光衰减测量的时间分辨荧光发射谱(TRFES)更契合产地识别的要求。

本研究的目的在于利用 TRFES 对山茶油产地进行识别研究,选用浙江、江西和湖南 3 个产地的山茶油为研究对象,通过化学计量学方法提取 TRFES 中的有效信息并建立产地识别模型,为食用植物油产地识别提供新的方法和思路,加深对时间分辨荧光技术的理解。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

收集浙江、江西、湖南的山茶油油料籽各 60 份,总计 180 份,去壳烘干作为榨油原料。为排除工艺等因素对山茶油样品的影响,所有山茶油样品均采用物理冷榨方式获得。正己烷(分析纯),镇江华东器化玻有限公司提供。

1.2 仪器与设备

油夫人(YFR) WMTL-A3 智能榨油机,唯美天丽电器有限公司;TenPro 3 时间分辨荧光仪(配备 370 nm LED 激发器和 TBX-07C 检测器),HORIBA 公司;Frontier 5000 Multi Pro 多功能离心机, OHAUS 公司。

1.3 样品制备与 TRFES 采集

1.3.1 山茶油样品的制备

山茶油样品制备的工艺流程:山茶籽挑选脱壳,采用榨油机进行压榨,毛油经过 Frontier 5000 Multi Pro 多功能离心机 3000 r/min, 5 min 离心,离心后静置 10 min 取上层油样作为试验用山茶油样品。

1.3.2 山茶油样品 TRFES 的采集

试验采用 HORIBA TenPro 3 时间分辨荧光光谱仪(配备时间相关单光子计数器)采集 TRFES。首先以二氧化硅散射溶液作为仪器响应函数测定的标准品标定仪器,仪器标定以采集到二氧化硅散射溶液在激发波长 370 nm 处的荧光光子数到达 10000 为止(Peak Press)。设定 TenPro 3 时间分辨荧光仪在下列条件下采集 3 个产地山茶油的 TRFES,具体检测条件:激发波长:370 nm;光谱采集范围:380~600 nm;波长间隔:5 nm;积分时间:10 s;采集时间范围:0~200 ns;提取信号时间范围:55~60 ns;时间分辨率:0.05 ns;出入射狭缝宽度:2 nm。

山茶油样品 TRFES 的采集:将待测油样装于光程为 10 mm 的四通石英比色皿中,以 TenPro 3 时间分辨荧光仪在上述检测参数条件下进行 TRFES 光谱数据的采集,每个油样重复 3 次试验,油样测定完成后用正己烷清洗比色皿,然后进行下个油样的 TRFES 光谱的采集。利用 DAS6 软件进行光谱数据转换, Matlab 数据处理软件对所得光谱数据进行处理。

1.3.3 山茶油样品特征波长荧光衰减分析

为说明 TRFES 的强指纹性,结合课题组之前的预备试验分析,特选取山茶油样品在 410 nm 处的荧光衰减进行深入分析。通常,能够从荧光衰减获得的特征参数为荧光寿命,它是荧光分子的本征参数,表明荧光分子衰减的平均时间,和荧光分子浓度无关,决定于分子的种类。一般来说,荧光寿命不同,则表明分子种类不同;不同种类的荧光分子虽然在荧光发射谱中发射峰位可能相同,但是由于其寿命的不同,会造成该波长处荧光衰减形式与荧光衰减时间不同;而荧光衰减时间和荧光寿命一样不受分子浓度影响,因此通过分析荧光寿命,可以证明 TRFES 的强指纹性。

为获得山茶油样品在 410 nm 处的荧光寿命,对其 410 nm 处的荧光衰减进行了测定和分析,具体检测条件为:二氧化硅散射溶液作为仪器响应函数测定的标准品标定仪器,370 nm 激发波长处峰值光子数(Peak Press)为 10000;激发波长:370 nm;发射波长:410 nm;410 nm 发射波长处峰值光子数(Peak Press)为 10000;出入射狭缝宽度:2 nm;激发速率:1 MHz。采用 DAS6 软件进行荧光衰减谱拟合并计算荧光寿命,拟合优度卡方低于 1.05 时为可接受的拟合。

1.4 数据分析

1.4.1 光谱预处理

在进行统计分析之前,采用标准正交变化(SNV)

算法对光谱进行预处理,以排除基线漂移的影响;然后,采用5点窗口的Savitzky-Golay平滑算法进行处理,以降低光谱噪声的影响。

1.4.2 PARAFAC 分析

平行因子分析(PARAFAC)是一种多维数据分析方法,它可以被理解为主成分分析(PCA),分析后得到的因子得分可以进一步进行回归分析、判别分析等^[20,21]。在应用PARAFAC分析前,将训练集样品的TRFES组成一个三维矩阵Z。训练集样品的总数为150(浙江、江西、湖南的山茶油样本各50个);TRFES采集范围:380~600 nm,间隔为5 nm;有效信号时间范围:55~60 ns,时间分辨率:0.05 ns。因此三维矩阵Z的结构为150×44×100。三维矩阵Z建立后,再进行PARAFAC分析。

在PARAFAC分析过程中,首先采用核一致性分析方法判断模型的有效因子数,然后在这些因子构建的空间中对三维矩阵Z进行拟合,得到拟合因子的载荷向量和得分向量,最后将因子的得分向量作为人工神经网络算法(ANN)的输入建立产地识别模型。

1.4.3 山茶油产地识别模型的建立

选择ANN算法建立山茶油产地识别模型,采用交叉验证和外部验证检验模型的识别能力。训练集样品总数为150个(浙江、江西、湖南的山茶油样本各50个),预测集样本总数为30个(浙江、江西、湖南的山茶油样本各10个)。计算山茶油产地识别模型的校正均方根误差(RMSEC)、交叉验证均方根误差(RMSECV)和预测均方根误差(RMSEP),以及对应的校正相关系数(R_c^2)、交叉验证相关系数(R_{cv}^2)和预测相关系数(R_p^2),用以评价模型的性能。

2 结果与讨论

2.1 不同产地山茶油的 TRFES 分析

TRFES 可以从光谱与时间两个维度提供荧光信息,因此以下分析从这两个方面进行。从光谱维度观测 TRFES 时,相当于观测某一“时间切片”下的稳态荧光发射。图 1a 为山茶油 TRFES 在 56 ns 时刻的荧光发射谱。从谱中可以看出,浙江、江西和湖南的山茶油样品荧光发射谱峰位、峰强相似,表明利用稳态荧光很难区分不同产地的山茶油。由稳态荧光测量的原理可知,某波长下的荧光强度是所有在该波长下荧光分子发射荧光的叠加。这一叠加忽略了荧光发射的过程差异而导致时间平均效应的产生,这导致不同产地山茶油稳态荧光缺乏指纹性,而指纹性的缺乏必将导致基于稳态荧光测量的山茶油产地识别模型识别能力

的下降。

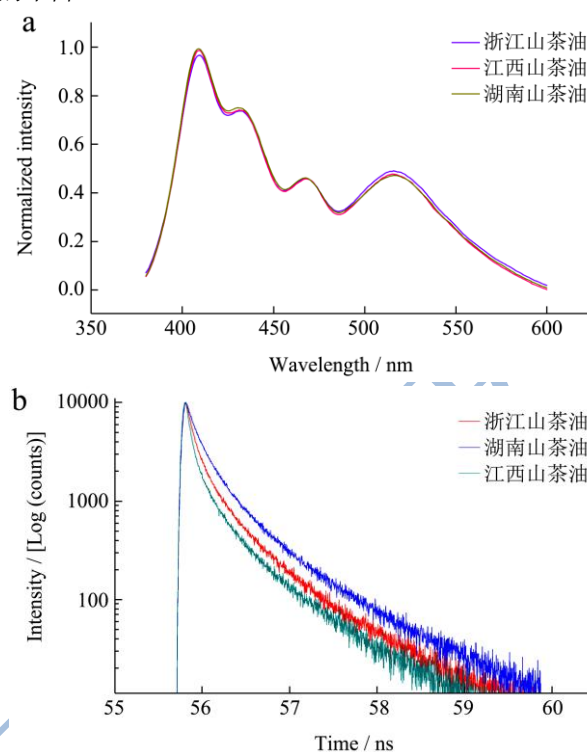


图1 山茶油的荧光发射谱(a)和荧光衰减谱(b)

Fig.1 Fluorescence emission spectra (a) and fluorescence decay spectra (b) of camellia oils

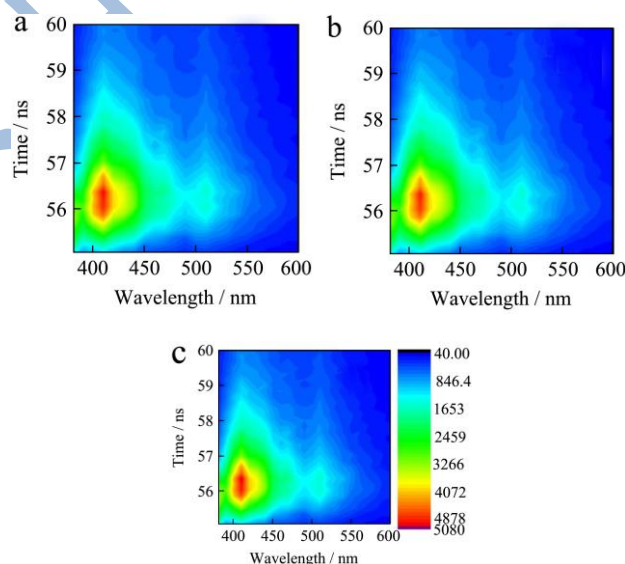


图2 山茶油 TRFES

Fig.2 TRFES of camellia oils

注: a: 浙江; b: 江西; c: 湖南

图 1b 为山茶油 TRFES 特征波长(410 nm)处的荧光衰减谱。从谱中可以看出,虽然在特征波长处3个产地的山茶油荧光发射峰强几乎相同,但是它们的衰减表现出了不同的形式。荧光衰减时间:江西<浙江<湖南,这表明湖南山茶油中某荧光分子的寿命要长于浙江和江西山茶油。表1为3个产地山茶油410

nm 处荧光衰减分析结果。从表 1 可以看出, 3 个产地山茶油中均存在三类寿命分子, 它们之间的荧光寿命差异较大。3 个产地山茶油荧光分子最大荧光寿命 (T_3): 江西<浙江<湖南, 和图 1b 荧光衰减谱的衰减时间一致。由于荧光寿命是荧光分子的本征参数, 决定于分子的种类, 反映在荧光衰减上, 因此荧光衰减的差异也可体现 3 种植物油荧光分子组成的本质差异, 且这种差异更具指纹性, 因此更契合食用植物油产地识别的要求。

图 2 为三种山茶油的 TRFES 等高线图。从 TRFES 中可以看出, 浙江、江西、湖南山茶油之间的荧光发射强度接近, 而荧光衰减差异较大。具体表现为, 在 400~550 nm 范围内, 荧光衰减时间: 江西<浙江<湖南。TRFES 从多个波长监测了山茶油的荧光衰减, 并显示出极强的指纹性, 针对这一指纹性极强的多波长荧光衰减进行分析在提高食用植物油产地识别率中显得尤为有效。因此, 分析认为基于多波长荧光衰减测量的 TRFES 更能反映食用植物油这一类复杂体系的指纹特征, 从而更加契合产地识别这类要求强指纹性的分析任务。

表 1 3 个产地山茶油 410 nm 荧光衰减分析结果

Table 1 The results of fluorescence decay at 410 nm of 3 geographical camellia oils

山茶油产地	卡方	T_1 (ns)	T_2 (ns)	T_3 (ns)
浙江山茶油	1.04	0.34 ± 0.01	1.37 ± 0.02	4.33 ± 0.01
江西山茶油	1.03	0.32 ± 0.02	1.35 ± 0.02	4.28 ± 0.01
湖南山茶油	1.03	0.38 ± 0.01	1.31 ± 0.01	4.66 ± 0.01

2.2 PARAFAC 结果分析

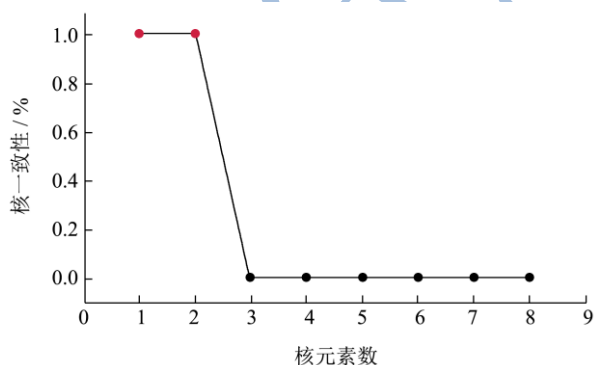


图 3 核一致性分析结果

Fig.3 Results of core consistence analysis

图 3 为 PARAFAC 核一致性分析结果图。由图 3 可知, 选用 2 个因子 (核一致性大于 99.9%) 即可成功地对山茶油的三维矩阵 Z 进行分解。这一结果也表明 PARAFAC 可以成功地应用于 TRFES 的分解。

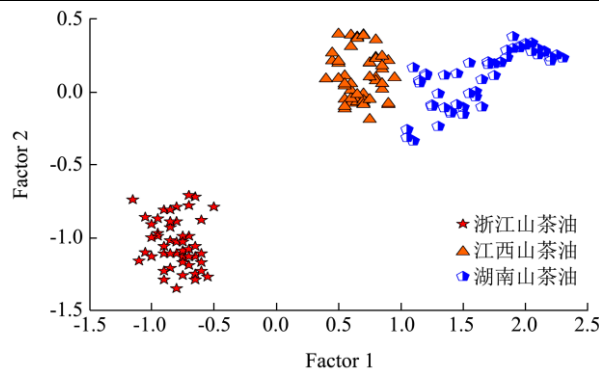


图 4 山茶油平行因子得分

Fig.4 PARAFAC scores of camellia oils

图 4 为 3 个产地山茶油的平行因子得分图。由图 4 可知, 3 个产地山茶油的 TRFES 经过 PARAFAC 分析后, 可以较好地被预分离。其中浙江山茶油和江西山茶油、湖南山茶油在平行因子得分图中的位置相距较远, 表明浙江山茶油的组成和江西山茶油、湖南山茶油差异较大; 江西山茶油和湖南山茶油在平行因子得分图中的位置接近, 这可能是由于这两地地缘相近导致山茶油成分接近所致。另外, 湖南山茶油组内样品在平行因子得分图中的跨度也很大, 这可能和湖南省内山茶生长环境差异有关。

2.3 山茶油 ANN 产地识别模型的建立

山茶油 TRFES 经 PARAFAC 分析后, 采用平行因子得分作为 ANN 的输入建立山茶油产地识别模型。训练集样品总数为 150 (浙江山茶油、江西山茶油和湖南山茶油各 50 个), 预测集样本总数为 30 个 (浙江山茶油、江西山茶油和湖南山茶油各 10 个), 产地识别模型性能评价结果如表 2 所示。由表 2 可知, 山茶油产地识别模型的交叉验证相关系数 R_c^2 为 98.7%, 预测相关系数 R_p^2 为 96.1%, 表明山茶油产地识别模型稳健可靠, 产地预测结果较为准确, 可以实现 3 个产地山茶油的准确、快速识别。

表 2 山茶油产地识别模型统计分析结果

Table 2 Statistics for geographical identification model of camellia oil

模型	校正		交叉验证		外部验证	
	RMSEC	R_c^2	RMSECV	R_{cv}^2	RMSEP	R_p^2
A NN	1.1	0.991	1.4	0.987	2.7	0.961

3 结论

本文采用 TRFES 技术结合化学计量学方法建立

了一种准确、快速的山茶油产地识别方法。相较于稳态荧光, 荧光衰减受荧光分子浓度影响较小因此更具指纹性, 因此 TRFES 更加契合诸如产地识别等要求强指纹性的任务。山茶油 TRFES 经 PARAFAC 分析后最终建立了山茶油产地识别模型, 模型的交叉验证相关系数为 98.7%, 预测相关系数为 96.1%, 表明该模型稳健、准确, 适合进行山茶油产地识别。综上分析得出, 通过对 TRFES 这一指纹性极强的动态荧光谱进行分析, 可以完成对山茶油产地的准确、快速识别。

参考文献

- [1] 王瑞元. 中国食用植物油加工业的现状与发展趋向[J]. 粮油食品科技, 2010, 25(3): 7-9
WANG Rui-yuan. Current situation and development trend of edible vegetable oil processing industry in China [J]. Science and Technology of Grain, Oil and Food, 2010, 25(3): 7-9
- [2] 薛莉, 黄晓荣, 汪雪芳, 等. 食用植物油营养成分及检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 446-451
XUE Li, HUANG Xiao-rong, WANG Xue-fang, et al. Research progress on nutritional functional components and detection techniques of edible vegetable oils [J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2017, 8(2): 446-451
- [3] 姜波, 胡文忠. 九种植物油中脂肪酸成分的比较研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 108-113
JIANG Bo, HU Wen-zhong. Comparative study of fatty acid composition in nine plant oils [J]. Food Industry Science and Technology, 2015, 36(8): 108-113
- [4] Bumrungpert A, Pavadhgul P, Kalpravidh R W. *Camellia* oil-enriched diet attenuates oxidative stress and inflammatory markers in hypercholesterolemic subjects [J]. Journal of Medicinal Food, 2016, 19(9): 895-899
- [5] Ma J, Ye H, Rui Y, et al. Fatty acid composition of *Camellia oleifera* oil [J]. Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit, 2011, 6(1): 9-12
- [6] Sahari M A, Ataii D, Hamedi M. Characteristics of tea seed oil in comparison with sunflower and olive oils and its effect as a natural antioxidant [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2004, 81(6): 585-588
- [7] Hsu C L. Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl₄-induced oxidative damage in rats [J]. Food & Chemical Toxicology, 2007, 45(6): 888-895
- [8] ZHONG Hai-yan, Drjr B, Bishop A G, et al. Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils [J]. Food Chemistry, 2007, 99(4): 1544-1551
- [9] 赵彩红, 蔡勇, 曹忻, 等. 环介导恒温扩增快速检测植物油中掺假地沟油方法的建立[J]. 食品工业科技, 2018, 2: 240-244
ZHAO Cai-hong, CAI Yong, CAO Xin, et al. Rapid detection of adulterated cooking oil in vegetable oil by loop mediated isothermal amplification [J]. Food Industry Science and Technology, 2018, 2: 240-244
- [10] Durã n M s I, Domã Nguéz M J, Airado R D, et al. Detection and quantification of extra virgin olive oil adulteration by means of autofluorescence excitation-emission profiles combined with multi-way classification [J]. Talanta, 2018, 178: 751-762
- [11] Tan J, Li R, Jiang Z T, et al. Synchronous front-face fluorescence spectroscopy for authentication of the adulteration of edible vegetable oil with refined used frying oil [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 274-280
- [12] Milanez K D T M, Pontes M J C. Classification of edible vegetable oil using digital image and pattern recognition techniques [J]. Microchemical Journal, 2014, 113: 10-16
- [13] Dankowska A, Maeca M. Application of synchronous fluorescence spectroscopy for determination of extra virgin olive oil adulteration [J]. European Journal of Lipid Science & Technology, 2009, 111(12): 1233-1239
- [14] Poulli K I, Mousdis G A, Georgiou C A. Synchronous fluorescence spectroscopy for quantitative determination of virgin olive oil adulteration with sunflower oil [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2006, 386(5): 1571-1575
- [15] Latterini L, Elisei F, Aloisi G G, et al. Space-resolved fluorescence properties of phenolphthalein-hydrotalcite nanocomposites [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2002, 4(12): 2792-2798
- [16] Loge G W, Tieg J J, Wampler F B. Fluorescence lifetimes and Zeeman quantum beats of single rotational levels in ³B/_{sub 2}/ carbon disulfide [J]. J. Chem. Phys, 1986, 84: 7-12
- [17] Collier B B, Mcshane M J. Time-resolved measurements of luminescence [J]. Journal of Luminescence, 2013, 144(12): 180-190
- [18] Brandao M P. Time resolved fluorescence of cow and goat milk powder [J]. Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy, 2016, 171: 193-199
- [19] 陈晖, 祁兴普, 郭丽, 等. 时间分辨荧光技术在食品品质检测中的应用[J]. 食品科学, 2017, 38(15): 250-255
CHEN Hui, QI Xing-pu, GUO Li, et al. Time-resolved fluorescence technique and its application in food quality detection [J]. Food Science, 2017, 38(15): 250-255
- [20] Bro R. PARAFAC. Tutorial and applications [J].

Chemometrics & Intelligent Laboratory Systems, 1997, 38(2):
149-171

[21] LIN H, YUAN C, DU J, et al. Estimation of DOA for

Noncircular Signals via Vandermonde Constrained Parallel
Factor Analysis [J]. International Journal of Antennas &
Propagation, 2018, 2018: 1-9

