

一种同时测定酿造酱油多性质的方法研究

袁洪福¹ 郑胜虎¹ 王楠² 沈龙青² 李效玉¹

(1.北京化工大学 北京 100029)

(2.北京和田宽食品有限公司 北京 100096)

摘要 采用近红外分析建立一种能够同时测定酿造酱油多种性质(全氮、氨基酸态氮、总酸、食盐、铵盐、无盐固形物、还原糖,色率和红指)的快速分析方法。该方法适用于生产控制分析,对于解决流通领域中酱油质量快速检验问题也具有积极意义。本文还对建模光谱区间选择,以及在参考方法缺乏再现性规定的情况下如何用SEP作判别依据的有关问题作深入探讨,对近红外光谱分析建模具有指导意义。

关键词 酿造酱油 近红外光谱 建模 再现性 质量

引言

酿造酱油(fermented soy sauces)是指以大豆和/或脱脂大豆、小麦和/或麸皮为原料,经微生物发酵制成的具有特殊色、香、味的液体调味品,是人们日常生活中必不可少的调味品,也是餐饮业和许多食品的基本辅料,消费量很大。中国酱油市场年增长率在10%以上,20世纪80年代末中国酱油产量为200万吨,90年代末猛增到450万吨,2006年达到500万吨左右^[1]。因此,酱油的质量与人们生活与健康密切相关,对酱油生产过程及成品质量监控具有重要实际意义。

全氮、总酸和氨基酸态氮是酱油三个最重要的必检质量指标。酱油常规检测的质量指标还有食盐、铵盐、还原糖、无盐固形物、色率和红指等。食盐含量通常为18%~20%,如果含量过少,既达不到调味要求,又易变质;太多则味苦而不鲜,造成品质不佳。酱油中的铵盐主要来源有两种,一种是蛋白质的分解产物,常因污染的细菌多造成;另一种为色素引入的。根据GB 18186-2000《酿造酱油》标准,酿造酱油一般不允许有较多的铵盐混杂。酱油中可溶性无盐固形物含量标志着酱油的浓厚程度,无盐固形物大致可说明无变异时的质量。色率和红指是酱油的感官质量指标。

目前可溶性无盐固形物、食盐、全氮和氨基酸态氮检测方法为GB18186-2000《酿造酱油》中规定的系列方法。采用GB/T 5009.39-2003(酱油卫生标准的分析方法)测定铵盐;采用ZDX 66037-87方法测定总酸;采用ZDX 66040-87方法测定还原糖;色率和红指是北京和田宽食品有限公司内部的自控指标,采用自行制定的色板对照方法。这些方

法需要多种仪器和化学试剂,样品需要复杂的预处理,操作涉及强酸以及有毒试验,对分析人员安全具有一定的影响,检测这些指标要花费很长的时间,仅以检测总氮为例,从试剂的准备到最后完成需要3~4h。显然这些分析方法远不能满足现代酱油生产行业和消费领域对酱油产品质量进行快速分析技术日益增长的需求。如生产过程中迫切需要酱油质量在线分析技术确保产品质量是连续合格的;流通领域中则需要有快速检验方法随时对商品质量进行鉴别,确保食品安全。目前还缺乏与现实需求相适应的酱油质量检测方法,已经在酱油市场质量检测领域出现尴尬的局面,如1瓶酱油价格仅为几元钱,而一次检测费用高达300元^[2]。可以说,如果没有合适的检测技术,对于实现酱油市场质量监控实际上是一句空话。因此,酱油质量快速分析技术研究已引起酱油生产及相关行业的广泛关注。

近红外光谱具有快速、准确和几乎不需样品制备等优点^[3]。由于酱油中的氨基酸态氮、糖类、酸类、碳化物等成分的变化都将导致其近红外光谱变化,近红外光谱分析酱油质量在理论上是可行的。近红外光谱用于酱油质量检测也受到关注^[4-6]。Keiko Iizuka等采用红外光谱和近红外光谱和化学计量学模式识别方法对全豆酱油和脱脂酱油进行区分研究,研究表明近红外光谱方法识别率更高^[7]。Yukihiro Ozaki等使用近红外光谱和化学计量学方法对测定泰式鱼制酱油(Thai fish sauces)总氮、pH、密度、折光指数和糖度进行研究^[8]。迄今,关于近红外光谱测定酿造酱油中食盐、铵盐、无盐固形物、还原糖、色率和红指等性质尚未见报道,本文将对用近红外光谱同时测定全氮、总酸和氨基酸态氮及上述性质的快速分析方法进行研究,以期解决目前酱油

生产过程中多种常规质量指标检测中存在的效率低和检测卫生的问题,为在生产过程中以及在流通领域中的酱油质量检测提供快速和准确的分析技术支持,具有重要的实际意义。

1 实验部分

1.1 样本收集

样本采自北京和田宽食品有限公司 2007 年 3 月—2008 年 2 月生产的 6 种酱油(特制,本酿造,老抽王,特鲜,精制和黄豆酱油)的储存样本,共计 74 个样本。其中,首批采集的 45 个样本组成 6 种酱油样本混合校正集;第二次采集的 29 个样本组成外部验证集。

1.2 性质测定

在样品采集和存储时,由北京和田宽食品有限公司质控部按照上述标准分析方法对所有样品的这些性质进行测量。

1.3 采集光谱

在 TENSOR37 型傅立叶变换红外光谱仪上,采用透射方式测定酱油的近红外吸收光谱。测量条件为:光程为 11mm,分辨率为 4cm^{-1} ,光谱范围: $4000\sim 12000\text{cm}^{-1}$,仪器预热时间为 45min。用比色皿空池测量背景光谱信号,光谱扫描次数为 16。为保证光谱测量重复性满足要求,对每个样品进行 5 次重复测量,取 5 张光谱的平均值为最终光谱。

1.4 校正与验证

采用本课题组自己编制的化学计量学软件建立酱油的多性质校正集;所有光谱均经过 1 阶微分和均值中心化方法作预处理,人工选择建模光谱区间,使用偏最小二乘法(PLS1)建立酿造酱油中全氮、氨基酸态氮、总酸、食盐、铵盐、无盐固形物、还原糖的色率和红指校正模型。用交互验证和外部验证对模型性能进行评价。

1.5 预测

使用校正集样本光谱测量条件对外部验证样本采集光谱;将所有性质模型打包,使用自己编制的化学计量学软件对外部验证样本进行预测。根据一张光谱可同时计算出上述 9 种性质。1 个酿造酱油样品的 9 种常规性质分析时间(包括测量和计算)小于 3min。

2 结果与讨论

2.1 建模光谱区间的选择

图 1 为校正集 46 个样品的吸收光谱和光谱标

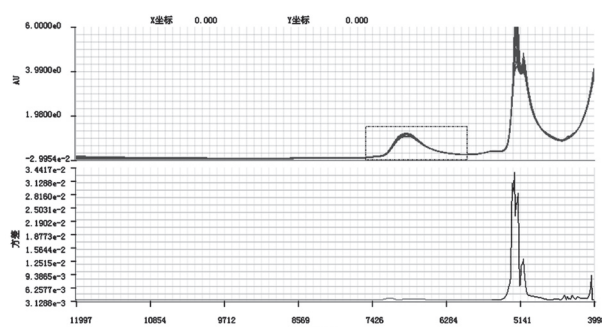


图 1 校正集 46 个样品的光谱与其方差曲线。标准偏差最大区间位于 $4780\sim 5480\text{cm}^{-1}$,这是水的特征吸收峰^[9],由于该范围内的绝对吸光度值远大于 4AU,超出检测器线性响应范围,而且水峰极易受环境温度以及酸度的影响,因此,不适合作为建立模型的光谱区域。图 2a 所示区域为 N-H 的 1 级倍频振动吸收区域^[10, 11],图 2b 所示区域为 C-H 的合频吸收和 N-H 合频吸收区域,这些区域具有明显的谱图变化,其吸光度值均在 1AU 以下,适合作为建模的光谱区间。在

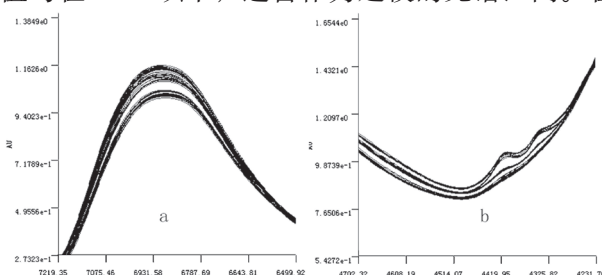


图 2 2 个区间光谱的放大图

a. $6594\sim 7173\text{cm}^{-1}$; b. $4231\sim 4702\text{cm}^{-1}$

$4000\sim 7426\text{cm}^{-1}$ 范围内光谱强度变化与总酸含量变化的相关系数绝对值接近于 1 (见图 3),氨基酸态氮,全氮,和铵盐的相关系数曲线都与总酸的光谱-性质相关系数曲线非常相似和接近,即都具有很好的相关关系;还原糖和固形物的光谱-性质相关系数曲线很接近(见图 4),形状与总酸的基本相似,只是相关系数绝对值小于 0.8,即相关性稍差;

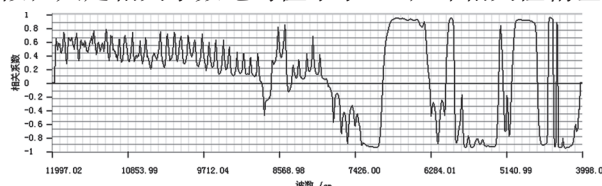


图 3 总酸的光谱-性质相关系数曲线

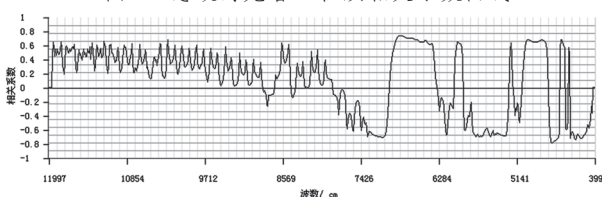


图 4 还原糖的光谱-性质相关系数曲线

食盐和色率的光谱 - 性质相关曲线接近 (见图 5), 其形状与总酸的有明显不同, 且相关系数绝对值小于 0.7, 即相关性更差。红指的光谱 - 性质相关曲线形状与总酸的相似, 相关系数绝对值小于 0.6 (见图 6), 是在所有性质中最差的。图 7 列出总酸建

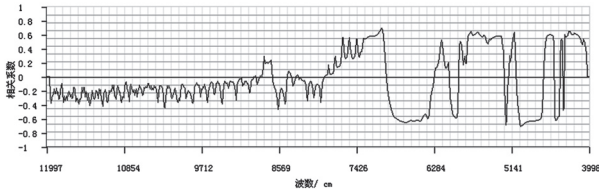


图 5 食盐的光谱 - 性质相关系数曲线

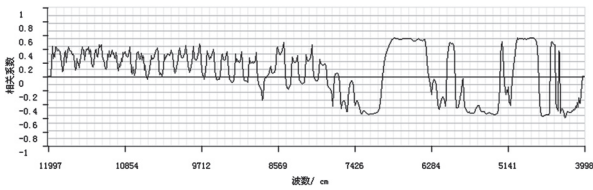


图 6 红值的光谱 - 性质相关系数曲线

模选择区间为 1399.8~1843.1nm 和 2100.0~2404.8 nm, 这些区间中的相关系数绝对值都接近于 1, 避开水峰 (1881.2~1947.7nm)。采用 PLS1 校正, 得到的 PRESS (预测残差平方和) 对主成分数作图形状异常 (见图 8), 即随着参加拟合的主成分数增加, PRESS 变大的现象, 其原因可能是建模选择的光

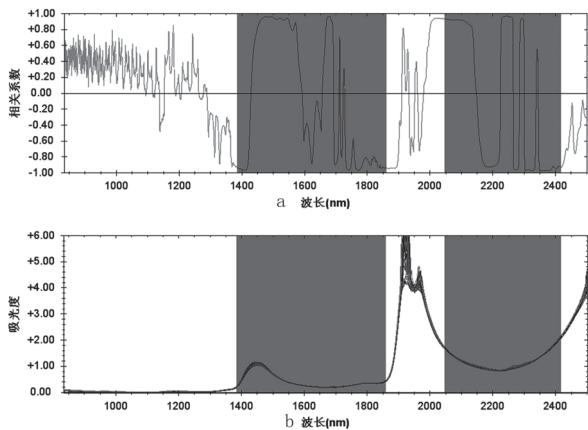


图 7 总酸建模光谱区间 (没有选择水峰)

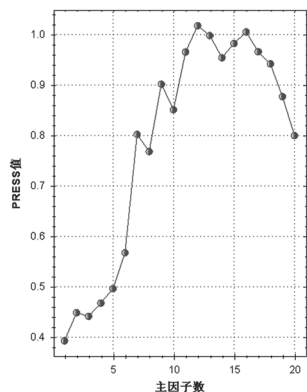


图 8 总酸的 PRESS 图 (没有选择水峰)

谱范围信息不足, 或参考数据误差大。考虑到总酸的氢离子存在会影响水分子的缔结状态, 尝试增加与总酸相关的水峰信息建模。图 9 是在图 7 基础上增加 1881.2~1947.7nm 区间 (水峰), 得到图 10 所示的正常 PRESS 图, 最佳主成分数为 10, 具有更小的 PRESS 值 (0.28)。为比较光谱区间选择对模型的影响, 分别使用图 7 和图 9 所示光谱区间建立的 2 个校正模型, 对同一组样品重复测量的光谱运算, 考察模型的稳定性。每个样品有 5 次重复测量的光谱, 用这 5 张光谱计算性质结果的重复性能够

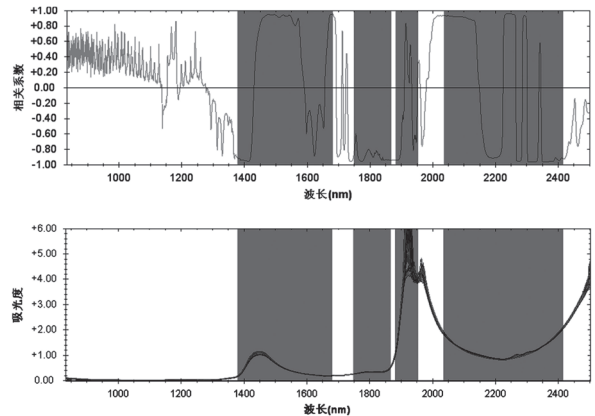


图 9 总酸建模光谱区间 (选择水峰)

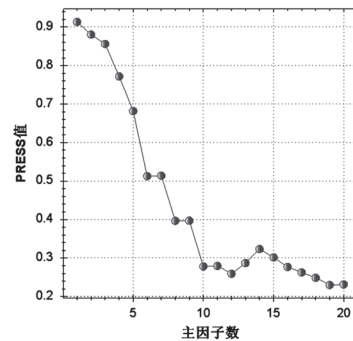


图 10 总酸建模的 PRESS 图 (选择水峰)

反映模型的稳定性。图 11 列出用图 7 所示区间和 1 个主因子 (见图 8) 建立的模型对每个样本连续 5 次测量的结果, 每个样品都具有非常好的重复性。图 11 为用图 9 所示区间和 10 个主因子建立的模型对同一组样品的重复性预测结果, 重复性很差, 说

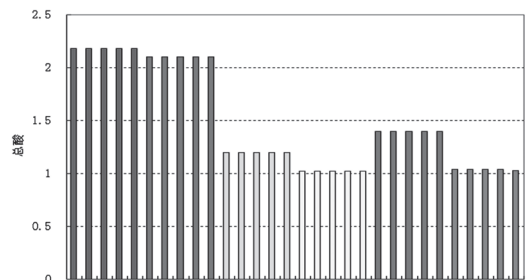


图 11 总酸模型预测结果重复性 (没有选水峰) 1 个颜色代表 1 个样品, 每个样品重复 5 次。

明引入吸光度远大于 2AU 的水峰建模, 虽然改善 PRESS 曲线趋势和降低最佳因子数的 PRESS 值, 但非线性响应问题严重影响模型的稳定性, 因此, 水峰不适合参加建模, 须予以剔除 (见图 12)。

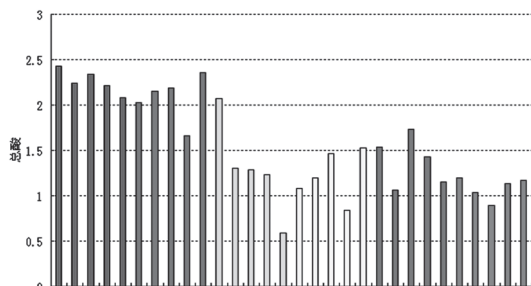


图 12 总酸模型预测结果重复性 (选择水峰)
1 个颜色代表 1 个样品, 每个样品重复 5 次。

2.2 模型精确度

2.2.1 交互验证结果 按照本文 1.4 中所述步骤对所有性质进行建模, 其交互验证结果 (见表 1)。表 1 中建模样本数是指从 45 个校正样本中剔除异常样本 (通常为性质数据测量不准确的样本) 后用来建立模型的实际样本数; 表 1 列出各性质的建模

表 1 交互验证结果

性质	建模样本数	建模波长范围 /nm	建模主因子数	R ²	SEC	标准分析方法重复性
全氮	42	1399.8~1892.9	2030.0~2391.5	7	0.996	0.029 GB/T18186 0.03g/100mL
氨基酸态氮	42	1365.5~1887.4	2027.6~2412.6	5	0.996	0.022 GB18186 0.03g/100mL
铵盐	40	1388.5~1879.2	2016.6~2416.0	4	0.990	GB/T 5009.39 <10%
总酸	40	1399.8~1843.1	2100.0~2404.8	1	0.975	ZDX 66037-87 0.1g/100mL
无盐固形物	38	1397.9~1873.8	2071.4~2427.3	4	0.962	0.68 GB18186 0.30g/100mL
还原糖	42	1388.5~1864.3	2088.9~2414.8	10	0.983	0.12 ZDX 66040-87 <0.1mL
食盐	40	1405.4~1862.3	2062.3~2401.4	5	0.931	0.184 GB18186 0.10g/100mL
色率	37	138.5~1689.4	2015.0~2307.4	8	0.927	0.107 企业标准
红指	44	1388.5~1689.4	2026.1~2381.6	9	0.991	154.2 企业标准

2.2.2 外部验证结果 按照 1.4 所述步骤对外部验证集的样本进行预测。按照式 (2) 计算 SEP。验证样本个数和参考性质数据误差对 SEP 的影响非常敏感。理论上, 作为验证样本的数据应是通过多个实验室和多次重复测量, 并证实这些数据是准确的, 实际上实施起来是有难度的。在日常分析采用参考方法得到的数据中, 受多种因素的影响, 许多样品性质测量值往往存在着明显误差。如果使用误差比较大的样本计算 SEP, SEP 将失去判断的意义。因此, 本文建议首先对从常规分析中收集得到的验证样本性质值进行分析, 避免录入的笔误, 然后, 剔除近红外光谱分析结果与实际值差别 (预测残差) 大的样品, 或者有条件的话, 应将样品返回实验室进行重新分析予以核定。在建模过程中应将参考分析方法的再现性误差设为残差阈值作为剔除

光谱范围和参加建模的主成分数目; 通常分析方法的误差用重复性和再现性表示。虽然近红外分析方法与参考分析方法不属于同种方法, 在定义上, 再现性并不适用这两种方法之间的比较, 但根据 SEC (建模样品集近红外分析值与实际值之间的标准偏差) 和 SEP (外部验证样品集近红外分析值与实际值之间的标准偏差) 与参考分析方法再现性误差的比较, 可以基本判断所建立的近红外光谱分析模型是否可行或满足实际工作的需要。在酿造酱油的标准分析方法中只规定 2 次测量之间所允许的误差, 即重复性, 而没有规定再现性误差要求。通常再现性误差是重复性误差的 3~6 倍, 如果 SEC 或 SEP 达到或接近参考方法的重复性要求, 则 SEC 或 SEP 优于参考方法的再现性要求。表 1 中数据说明所有性质的 SEC 均与参考分析方法的重复性相当, 且所有性质的 R² (近红外分析结果与实际值之间的相关系数平方, 又称决定系数) 都大于 0.9, 说明模型交互验证中预测结果与实际值一致。

不合格样本的依据之一。酿造酱油标准分析方法中只规定重复性, 而没有规定再现性要求, 根据分析方法的再现性误差要远大于其重复性的规律, 本文建议将参考分析方法重复性的 4 倍作为残差阈值。外部验证结果 (见表 2), 表 2 中样本数是从 29 个样品中剔除大于残差阈值样本后的样本数。可以看出总酸, 全氮, 氨基酸态氮, 铵盐性质被剔除的样本很少, 这些性质的实际值与预测值的相关性都很好, 其他性质被剔除的样本数相对较多, 这些规律与前边所述光谱 - 性质相关系数曲线中的规律具有相似性, 说明剔除样本较多的性质数据可能存在较多测量误差。表 2 说明所有性质的 SEP 接近于残差阈值 (相当于参考分析方法的再现性误差) 的一半。除食盐和色率外, 所有其他性质的实际值和预测值的相关系数平方均大于 0.9。SEP 和 R² 都说明

近红外分析结果与参考分析方法的一致。从剔除样品的数目也可以看出无盐固形物,还原糖和食盐性质数据存在着较大的测量误差,应需要进一步试验核实。

表2 外部验证结果

性质	样品数	残差 阈值	R ²	SEP	标准分析方法重复性
全氮	26	0.12	0.98	0.06	GB/T18186/0.03g/100mL
氨基酸态氮	28	0.09	0.99	0.03	GB18186/0.03g/100mL
铵盐	28	0.032	0.97	0.01	GB/T5009.39 /<10%
总酸	27	0.4	0.91	0.12	ZDX 66037-87/0.1g/100mL
无盐固形物	14	1.2	0.94	0.75	GB18186 /0.30g/100mL
还原糖	15	0.4	0.91	0.23	ZDX 66040-87/<0.1mL
食盐	17	0.4	0.52	0.26	GB18186/0.10g/100mL
色率	20	0.5	0.65	0.33	企业标准
红指	20	500	0.97	304	企业标准

2.2.3 精密度 从6种酿造酱油中任意各采集1个样本,在建模条件下,对每个样品连续采集5张光谱,使用已建立的模型,对这5张光谱计算性质结果,并计算其标准偏差,用以检验近红外光谱分析方法的重复性。表3列出近红外光谱分析方法(NIR)重复性与标准分析方法的对照结果。可以看出,对所有性质,NIR重复性远远优于标准分析方法的重复性(色率和红指没有参照指标)。

3 结论

近红外光谱同时测定酿造酱油多种性质的快速分析方法是可行的;该方法重复性优于相应的参考方法;SEP接近于4倍的参考方法重复性误差的一半,方法精确度可以满足酿造酱油生产控制分析和流通领域酿造酱油质量的检测要求。

表3 近红外光谱分析方法重复性与标准分析方法重复性对照

样品名称	氨基酸态氮		全氮		总酸		铵盐		还原糖	
	结果	标准偏差	结果	标准偏差	结果	标准偏差	结果	标准偏差	结果	标准偏差
s_01 特制	0.92	0.002	1.41	0.011	2.18	0.00	0.204	0.0006	5.54	0.14
s_08 本酿造	1.02	0.003	1.53	0.007	2.10	0.00	0.228	0.0007	5.95	0.11
s_15 老抽王	0.44	0.002	0.74	0.027	1.20	0.00	0.079	0.0007	4.91	0.07
s_22 特鲜	0.46	0.003	0.85	0.018	1.02	0.00	0.088	0.0008	4.70	0.15
s_29 精制	0.77	0.001	1.19	0.020	1.40	0.00	0.168	0.0003	5.54	0.11
s_36 黄豆	0.44	0.003	0.83	0.026	1.04	0.04	0.083	0.0004	4.77	0.16
标准方法重复性		0.03		0.03		0.1		0.01		0.10
样品名称	固形物		食盐		色率		红指			
	结果	标准偏差	结果	标准偏差	结果	标准偏差	结果	标准偏差		
s_01 特制	17.35	0.13	16.58	0.018	5.69	0.31	154	87		
s_08 本酿造	18.96	0.07	15.48	0.015	5.72	0.09	320	189		
s_15 老抽王	16.14	0.26	16.59	0.021	5.62	0.33	2933	247		
s_22 特鲜	13.20	0.10	16.55	0.013	5.35	0.52	1685	454		
s_29 精制	13.86	0.09	16.54	0.013	5.53	0.21	712	329		
s_36 黄豆	12.85	0.30	16.84	0.029	5.40	0.15	1533	412		
标准方法重复性		0.30		0.10						

参考文献

- 1 付菊,廖珊.我国酱油产业市场现状分析,糖酒快讯,2007,5:18
- 2 http://finance.ce.cn/law/home/wqxw/200704/04/t20070404_10927534.shtml
- 3 陆婉珍,袁洪福等.现代近红外光谱分析技术.北京:中国石化出版社,2000
- 4 Haiyan Cen,Yong He. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. Trends in Food Science & Technology 2007,18:72~83
- 5 于丽燕,方如明,陈斌.近红外光谱透射法测定酱油的主要成分,食品科技,2001,(1):64~65
- 6 郭峰,陆洋等.酱油中总氮和氨基酸态氮成分的快速检测及研究,食品科学,2006,27(12):699~703
- 7 Keiko Iizuka, Tetsuo Aishima, Different determination of Soy Sauce by Pattern Recogniti on Analysis of Mid- and Near-IR Spectra, Journal of Food Composition and Analysis 1999,12:197~209
- 8 Pitiporn Titthiruangdej, et., and Yukihiro Ozaki, Determination of total nitrogen content, pH, density, refractive index, and brix in Thai fish sauces and their classification by near infrared spectroscopy with searching combination moving window partial least square, Analyst, 2005, 130:1439~1445
- 9 Masato Takeuchi, L. Bertinetti, Gianmario Martra, Salvatore Coluccia, Masakazu Anpo, States of H₂O adsorbed

(下转第38页)

采用数理统计的 t 检验^[3], 检验两种方法是否存在显著性差异 (见表 3)。

表 3 两种方法测定结果的一致性检验

样品	标准方法测	便携式快速水质检	\bar{d}_j	\bar{d}_j^2
	定均值 \bar{x}_i	测仪测定均值 \bar{y}_i		
电镀废水 1	39.3	37.1	2.2	4.84
电镀废水 2	1.95	1.95	0	0
市政污水 1	0.274	0.294	-0.02	0.0004
市政污水 2	0.849	0.902	-0.053	0.002809
大厦污水 1	0.254	0.252	0.002	0.000004
大厦污水 2	0.995	1.058	-0.063	0.003969
印染废水 1	0.739	0.737	0.002	0.000004
印染废水 2	0.361	0.375	-0.014	0.000196
焦化废水 1	0.397	0.404	-0.007	0.000049
焦化废水 2	0.151	0.149	0.002	0.000004
	45.27	43.221	2.049	4.847435

计算统计量, $S_{\bar{d}}=0.701$, $S_{\bar{d}}=0.2218$, 自由度 $f=10-1=9$ 。

$$t = |\bar{d}| / S_{\bar{d}} = 0.923 < 2.226(t_{0.05(9)})$$

根据以上计算, 可以发现两方法之间没有显著性差异。由此可见, 采用便携式快速水质检测仪 (改进法) 测定水中的六价铬是可行的。

3 结论

北京普析通用仪器有限责任公司生产的便携式快速水质检测仪在监测水中六价铬时, 与标准方法相比没有显著性差异, 鉴于该仪器便携的特点, 特别适宜于一线监测人员野外现场和应急场合的监测。

参考文献

- 1 GB7467-1987. 水质 六价铬的测定, 北京: 中国标准出版社, 1987
- 2 国家环保总局编. 水和废水监测分析方法 (第四版), 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- 3 环境水质监测质量保证手册, 北京: 化学工业出版社, 1994

Determination of hexavalent chrome in the waste water by portable fast instrument for water quality analysis

Chen Lianming Ma Fangjun Li Dongming

(Beijing Pukinje General Instrument Co., Ltd, Beijing 100081)

Abstract To measure the hexavalent chromium in the waste water using the method of diphenylcarbazide-spectrophotometry by Portable fast Instrument for Water quality Analysis, It has the features of convenience and speediness, and has no significant differences comparing with the national method by mathematics statistics T-test.

Key words Portable fast instrument Environmental monitoring Hexavalent chromium Fiber-optics probe t-test

(上接第35页)

on oxides: An investigation by near and mid infrared spectroscopy, Applied Catalysis A: General 2006, 307: 13~20
10 Paul.J Curran. Foliar spectral features [J]. Remote sensing of

Enviroment, 1989, 30: 271~278

11 George W Gokel. 有机化学手册 [M], 北京: 化学工业出版社, 2006

Simultaneous determination of multi-properties of fermented soy sauces using near infrared spectroscopy

Yuan Hongfu¹ Jong Sunghuo¹ Wang Nan² Shen Longqing² Li Xiaoyu¹

(1. Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

(2. Beijing Wadakan Food Co. Ltd, Beijing 100096)

Abstract A method of simultaneously measuring fermented soy sauce multi-properties, including total nitrogen content, amino acid nitrogen content, total acid content, salt content, ammonium content, soluble solids content, deoxidized sugar content, color rate and red index, was established using near infrared spectroscopy.

Key words Fermented soy sauce Near infrared spectroscopy Model construction Reproducibility