

文章编号: 1001-3806(2017)04-0503-04

应用 3 维同步荧光光谱测定胭脂红浓度

杜家蒙^{1,2}, 陈国庆^{1,2*}, 马超群^{1,2}, 奚留华^{1,2}, 朱 纯^{1,2,3}, 赵金辰^{1,2}, 顾 颂^{1,2}

(1. 江南大学 理学院, 无锡 214000; 2. 江苏省轻工光电工程技术研究中心, 无锡 214000; 3. 江南大学 物联网工程学院, 无锡 214000)

摘要: 为了测定混合色素溶液中胭脂红的浓度, 采用归一化的方法对荧光光谱进行数据预处理, 将处理后的光谱数据结合径向基神经网络, 建立了对胭脂红含量的预测模型。结果表明, 3 维同步荧光光谱、普通 3 维荧光光谱预测结果的平均相对误差分别为 2.86%, 11.12%; 对于混合色素溶液中单个色素浓度的测定, 3 维同步荧光光谱结合径向基神经网络效果较好。该研究为预测混合色素溶液中各色素浓度提供了帮助。

关键词: 光谱学; 3 维同步荧光光谱; 径向基神经网络; 胭脂红

中图分类号: O433 文献标志码: A doi:10.7510/jgjs. issn. 1001-3806. 2017. 04. 009

Determination of carmine concentration with 3-D synchronous fluorescence spectrometry

DU Jiameng^{1,2}, CHEN Guoqing^{1,2}, MA Chaoqun^{1,2}, XI Liuhua^{1,2}, ZHENG Chun^{1,2,3}, ZHAO Jinchen^{1,2}, GU Song^{1,2}

(1. School of Science, Jiangnan University, Wuxi 214000, China; 2. Jiangsu Light Industry Photoelectric Engineering Technology Research Center, Wuxi 214000, China; 3. School of Internet of Things, Jiangnan University, Wuxi 214000, China)

Abstract: In order to determine carmine concentration in the mixed pigment solution, normalization method was used to preprocess the fluorescence spectra. The processed data were combined with radial basis function neural network to establish the prediction model of carmine content. The average relative error of the prediction results of 3-D synchronous fluorescence spectrometry and 3-D ordinary fluorescence spectrometry were 2.86% and 11.12% respectively. The results showed that the 3-D synchronous fluorescence spectrometry was superior for the determination of the mixed pigment solution. The research provides the help for the prediction of the pigment concentration in the mixed pigment solution.

Key words: spectroscopy; 3-D synchronous fluorescence spectrometry; radial basis function neural network; carmine

引言

我国《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》(GB 2760-2011)^[1] 中明确规定了食用合成色素允许使用的种类、用量及使用范围。许多食用合成色素具有一定的毒性, 过量摄入将产生致畸、致癌的风险, 需严格控制使用量^[2]。

目前常用的成分检测方法有高效液相色谱法^[3]、示波极谱法^[4-5]、薄层色谱法^[6-8]、毛细管电泳法^[9-10]和光谱法^[11]等。光谱法具有所需的样品量较少、避免了复杂的预处理过程、分析速度快等优点, 可用于实时

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61378037; 61178032); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JUSRP51517)

作者简介: 杜家蒙(1992-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为生物医学光子学。

* 通讯联系人。E-mail: cq2098@163.com

收稿日期: 2016-09-14; 收到修改稿日期: 2016-10-27

检测中。WANG 等人利用普通 3 维荧光光谱结合自加权交替三线性算法, 对中药胡黄连和人体尿液、血液循环系统中的香草酸进行了定量分析^[12], 香草酸的平均回收率(样本预测浓度和实际浓度比值的平均)分别是 98.4%, 93.1%, 89.7%。MAO 等人对样本的同步荧光光谱数据进行预处理, 选择不同波段的光谱, 结合偏最小二乘法建立了原果汁含量预测模型, 得到的预测均方根误差为 0.035832, 相关系数为 0.972570^[13]。WANG 等人将样本普通 3 维荧光光谱数据, 结合误差逆向传播神经网络, 测定溶液中苯并荧蒽和苯并芘的质量浓度, 平均回收率分别为 99.19% 和 99.26%^[14]。

同步荧光分析法具有窄化谱带、提高选择性^[15]等优点, 被应用于许多分析领域中, 特别是对多组分混合物的测定。对混合物质中各成分含量的测定, 目前多采用 2 维同步荧光光谱结合神经网络的方法。2 维同步荧光光谱中, 激发波长与发射波长的间隔 $\Delta\lambda$ 的选择很关键, 直接影响光谱的形状、带宽及信号强度^[15]。

$\Delta\lambda$ 的值可以从理论上做预测, 当其等于斯托克斯位移(激发光和荧光之间波长的移动)时, 获得荧光信号最强且半峰宽度最小的单峰 2 维同步荧光光谱。 $\Delta\lambda$ 的值最终要通过实验来确认。与 2 维同步荧光光谱相比, 3 维同步荧光光谱^[16] 中 $\Delta\lambda$ 为一个范围, 含有更多荧光光谱数据, 避免了有效荧光信息的丢失。3 维同步荧光光谱数据为非线性结构, 径向基(radial basis function, RBF)神经网络可以任意精度逼近非线性模型, 结构简单、收敛速快, 是非线性拟合的理想方法之一^[17-18]。本文中采用 3 维同步荧光光谱结合径向基神经网络的方法, 测定胭脂红、日落黄混合溶液中胭脂红^[19] 的浓度, 得到了较好的结果。

1 原理

1.1 3 维同步荧光光谱

3 维同步荧光光谱为荧光强度同时随激发波长、激发波长与发射波长的间隔(即 $\Delta\lambda$)变化的关系图谱。3 维同步荧光光谱有等角 3 维投影图^[15] 和等高线光谱图两种表现形式。本文中采用等高线光谱图。

1.2 径向基神经网络

径向基神经网络属于前向神经网络类型, 由 MOODY 和 DARKEN 提出。径向基神经网络分为输入层、隐含层及输出层。隐含层空间为由 RBF 作为隐单元的“基”构成, 输入矢量在隐含层中发生变换, 在低维线性不可分的数据变换到高维空间, 在高维空间实现线性可分^[17-18]。因此, RBF 适用于非线性模型。RBF 神经网络能逼近任意非线性函数, 广泛应用于模式识别、时间序列分析、非线性控制等领域。

2 实验

2.1 试剂与仪器

实验中所用仪器为 FLS920P 荧光光谱仪(英国 Edinburgh 公司)、移液器等。由国家标准物质研究中心提供胭脂红、日落黄标准色素溶液。所用水为超纯水。

配制浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胭脂红、日落黄单体色素溶液。另配制成 12 组不同浓度的混合色素溶液样品, 其中, 待测物胭脂红在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、干扰物日落黄在 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内。测量样品的 3 维同步荧光光谱和普通 3 维荧光光谱。

2.2 参量设置

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胭脂红、日落黄单体色素溶液, 3 维同步荧光光谱激发波长为 250nm ~ 550nm, 每隔 2nm 激发一次; $\Delta\lambda$ 在 10nm ~ 200nm 范围内, 每隔 2nm 进行同

步扫描。普通 3 维荧光光谱激发波长在 250nm ~ 550nm 范围内, 每隔 2nm 激发一次; 发射波长在 260nm ~ 750nm 范围内, 每隔 2nm 扫描一次。混合色素溶液, 3 维同步荧光光谱激发波长为 250nm ~ 350nm, 每隔 2nm 激发一次; $\Delta\lambda$ 在 10nm ~ 200nm 范围内, 每隔 2nm 进行同步扫描。普通 3 维荧光光谱激发波长范围为 250nm ~ 350nm, 每隔 2nm 激发一次; 发射波长 260nm ~ 550nm, 每隔 2nm 扫描一次。入射和出射单色狭缝仪大小均为 5nm, 积分时间为 0.1s。

3 计算与讨论

3.1 数据处理

为便于神经网络的应用, 需对荧光光谱数据进行归一化处理。利用下式将数据归一化到 0.1 ~ 0.9:

$$y = 0.1 + 0.8 \left(\frac{x - x_{\min}}{x_{\max} - x_{\min}} \right) \quad (1)$$

式中, x, x_{\max}, x_{\min} 分别表示光谱数据、光谱数据中的最大值和最小值, y 表示归一化后的数据^[20]。

归一化后的数据作为 RBF 神经网络的输入。RBF 神经网络的输出为胭脂红的浓度。实验中采用交叉验证方法中的留一交叉验证法, 即对于 n 个样本, 每次剔除一个作为预测样本, 其余作为训练样本。实验共预测 12 次, 11 组作为训练样本, 1 组预测, 12 组样本均被预测一次。采用留一交叉验证法, 可充分利用已有的样本, 减少神经网络因训练样本的输入顺序不同而产生的随机性, 减小误差, 提高网络的稳定性^[20]。以 12 组样本的平均相对误差, 即相对误差绝对值的平均, 来判定模型的准确性。与普通 3 维荧光光谱数据结合 RBF 神经网络算法预测结果对比, 验证 3 维同步荧光光谱结合 RBF 神经网络, 测定混合色素溶液中胭脂红的浓度具有优越性。

3.2 实验结果

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胭脂红、日落黄单体色素溶液, 在最佳激发波长下的发射谱如图 1 所示。

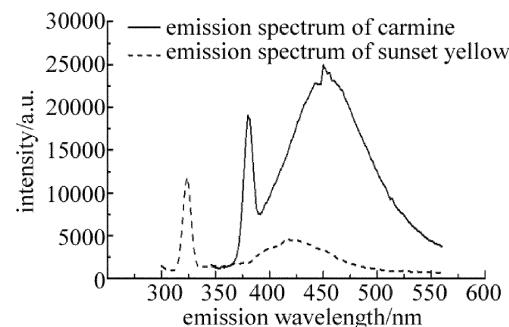


Fig. 1 Emission spectra of carmine and sunset yellow in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution at the best excitation wavelength

实验中得到胭脂红、日落黄的荧光光谱特征参量

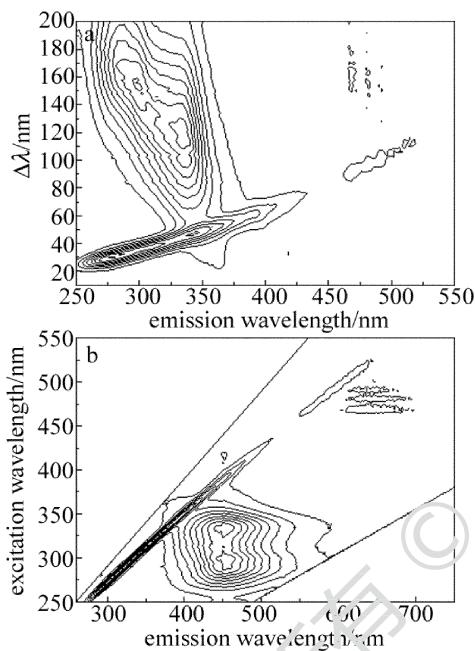
如表1所示。

Table 1 Features of fluorescence spectra

pigment	effective excitation wavelength range/nm	optimum excitation wavelength/nm	fluorescence emission wavelength range/nm	fluorescence peak wavelength/nm
carmine	260~350	336	400~510	450
sunset yellow	264~308	288	380~470	418

由胭脂红、日落黄在其最佳激发波长下的发射谱及其荧光特征参量表均可以看出,胭脂红与日落黄荧光峰的位置比较接近。

图2为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胭脂红溶液3维同步荧光光谱等高线图及普通3维荧光光谱等高线图。

Fig. 2 Fluorescence spectra of carmine in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution

a—contour plot of 3-D synchronous spectra b—contour plot of ordinary 3-D spectra

图2a和图2b中荧光峰的个数相同,荧光特征参量相近。3维同步荧光光谱等高线图中光谱明显发生了窄化。

2维同步荧光光谱和普通3维荧光光谱分别结合RBF神经网络,计算得到的混合溶液中待测物胭脂红的预测浓度和相对误差分别见表2。表中第1组、第2组样本胭脂红浓度均为2.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$,干扰物日落黄浓度不等。因表格空间限制,synchronous fluorescence代表3维同步荧光光谱。

由表2可知,3维同步荧光光谱结合RBF神经网络,测定胭脂红浓度,预测的平均相对误差为2.86%。普通3维荧光光谱结合RBF神经网络,预测结果平均相对误差为11.12%,3维同步荧光光谱平均相对误差减小了8.26%。图3中示出了3维同步荧光光谱、普

Table 2 Relative error and predicted concentration of carmine by 3-D synchronous fluorescence using RBF

actual concentration/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	predicted concentration of synchronous fluorescence/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	predicted concentration of three dimensional fluorescence/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	relative error of synchronous fluorescence prediction/%	relative error of three dimensional fluorescence prediction/%
2.04	2.014	2.150	-1.28	5.37
2.04	2.049	1.655	0.45	18.88
2.72	2.613	2.687	-3.93	-1.22
3.20	3.069	3.294	-4.11	2.95
3.52	3.408	3.133	-3.18	-11.00
3.76	3.776	3.896	0.43	3.61
3.82	3.822	3.793	0.05	0.70
4.3	4.362	3.457	1.44	-19.70
4.36	4.270	4.674	-2.08	7.19
4.52	4.197	5.434	-7.16	20.22
4.80	4.832	4.534	0.67	-5.55
5.26	4.750	3.315	-9.51	-36.98
average relative error/%			2.86	11.12

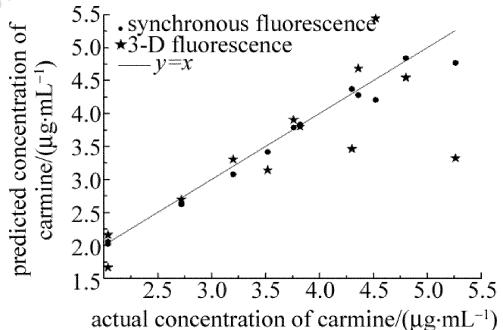


Fig. 3 Predicted concentration of 3-D synchronous fluorescence and 3-D ordinary fluorescence

通3维荧光光谱结合RBF神经网络预测胭脂红浓度结果。 x 轴为实际浓度, y 轴为预测浓度。从图3可以看出,3维同步荧光光谱预测结果均匀分布在直线 $y=x$ 两侧,距离较近,表明预测结果较好。普通3维荧光光谱预测结果距离直线分布较远,表明预测结果较差。

3.3 分析与讨论

(1)同步荧光分析法能够减小光谱重叠、窄化谱带、提高分辨率,对于多组分混合物的分析常采用该分析方法。3维同步荧光光谱中 $\Delta\lambda$ 为一个范围,与2维同步荧光光谱相比,有效避免了有用荧光信息的丢失。可知,对混合色素溶液中各成分含量的检测,3维同步荧光光谱更具有优势。

(2)3维同步荧光光谱数据为非线性结构,RBF神经网络适用于非线性模型。因此,测定日落黄、胭脂红

两种荧光峰相近的混合色素溶液中胭脂红的浓度,3维同步荧光光谱结合 RBF 神经网络结果较好。

4 结 论

通过采用 3 维同步荧光光谱结合 RBF 神经网络算法的方法,预测荧光光谱重叠严重的胭脂红、日落黄混合溶液中胭脂红的浓度,预测结果平均相对误差为 2.86%。结果表明,对于混合色素溶液各色素浓度测定,3 维同步荧光光谱具有优越性。

参 考 文 献

- [1] NATIONAL HEALTH AND FAMILY PLANNING COMMISSION OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA. GB2760-2011 National food safety standards-standards for uses of food additives [S]. Beijing: Standards Press of China, 2011: 8-179 (in Chinese).
- [2] CHEN G Q. Studies on application of fluorescence spectroscopy in food safety supervision [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010: 1-2 (in Chinese).
- [3] VAVROUS A, VAPENKA L, SOSNOVCOVA J, *et al.* Method for analysis of 68 organic contaminants in food contact paper using gas and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. Food Control, 2016, 60:221-229.
- [4] XIA L Y, HAN Y Y, KUANG L H, *et al.* Simultaneous determination of basic orange 2, metanil yellow, tartrazine, sunset yellow in bean-product and acid orange II, ponceau 2R, rhodamine B in chili powder by thin-layer chromatographic scanning [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2010, 29(6):15-18 (in Chinese).
- [5] TANG T X, XU X J, WANG D M, *et al.* A rapid and green limit test method for five synthetic colorants in foods using polyamide thin layer chromatography [J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(2):459-466.
- [6] VLAJKOVIC J, ANDRIC F, RISTIVOJEVIC P, *et al.* Development and validation of a tlc method for the analysis of synthetic food-stuff dyes [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2013, 36(17):2476-2488.
- [7] BLAZHEYEVSKIY N Y, LABUZOVVA V Y. Determination of cefazolin by oscillographic polarography as 1's S, S'-dioxide [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2014, 59(1):883-886.
- [8] JIANG Zh L, LI F, LIANG H. Resonance scattering spectroscopic study of the system α -PMo₁₂ heteropoly acid and rhodamin S [J]. Acta Chimica Sinica, 2009, 58(8):1059-1062 (in Chinese).
- [9] MEI F, ZHAO X Y, QU F. Comparison of interaction between cytochrome c and single strain deoxyribonucleic acid pools based on capillary electrophoresis [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(12):1229-1234 (in Chinese).
- [10] REFINETTI P, MORGENTHALER S, EKSTROM P O. Cycling temperature capillary electrophoresis: A quantitative, fast and inexpensive method to detect mutations in mixed populations of human mitochondrial DNA [J]. Mitochondrion, 2016, 29:65-74.
- [11] ZHENG C Y, GUO Zh H, JIN L. Measurement of total viable count on chilled mutton surface based on hyperspectral imaging technique [J]. Laser Technology, 2015, 39(2):284-288 (in Chinese).
- [12] WANG X J, YANG L, LIU D L, *et al.* Determination of vanillic acid in rhizoma picrorhizae and body fluids by excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration methods [J]. Journal of Hebei Normal University(Natural Science Edition), 2016, 40(5):412-417 (in Chinese).
- [13] MAO L X, ZHANG X L, FAN S F. Determination of content of raw juice in orange juice by synchronous fluorescence spectrometry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(6):90-93 (in Chinese).
- [14] WANG Sh T, CHEN D Y, WANG X L, *et al.* Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons combining fluorescence analysis with ABC-EP neural network [J]. Chinese Journal of Lasers, 2015, 42(11):115031 (in Chinese).
- [15] YU J G, WANG Z B. Fluorescence spectroscopy [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2006: 131-160 (in Chinese).
- [16] KUMAR K, MISHRA A K. Parallel factor (PARAFAC) analysis on total synchronous fluorescence spectroscopy (TSFS) data sets in excitation-emission matrix fluorescence (EEMF) layout: Certain practical aspects [J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2015, 147:121-130.
- [17] LIU B, GUO H X. MATLAB neural network super learning handbook [M]. Beijing: Beijing University of Posts and Telecommunications Press, 2014: 194-216 (in Chinese).
- [18] SHI F, WANG X C, YU L, *et al.* 30 case analysis of MATLAB neural network [M]. Beijing: Beijing University of Aeronautics and Astronautics Press, 2011: 65-73 (in Chinese).
- [19] LI R, CHEN G Q, ZHU C, *et al.* Quantitative analysis of two food colours using excitation-emission matrix spectra coupled with parallel factor algorithm [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 34(1):111-115 (in Chinese).
- [20] KONG F B. The study of the synchronous fluorescence of several food colors [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013: 31-43 (in Chinese).