

啤酒¹H NMR 指纹谱与模式识别分析

赵蕊¹, 张巍², 欧阳捷¹, 尚倩¹, 邓志威^{1,*}

(1.北京师范大学分析测试中心, 北京 100875; 2.北京市理化分析测试中心, 北京 100089)

摘要: 本实验以啤酒为研究对象, 提出了一种基于核磁共振质子(¹H NMR)谱的指纹识别分析方法。该工作根据啤酒样本的特点, 对样品预处理方法、核磁共振实验技术与实验条件、数据处理以及模式识别等环节进行了分析研究。在此基础上获取了一组市售听装啤酒的¹H NMR谱, 并对其指纹特征进行了初步判证。同时利用主成分分析等手段对上述样品的谱图数据进行了模式识别的类分析, 成功地将19种啤酒按产地区分出来。实验中所采用的方法可靠、易控, 可以直接用于液态食品检验。

关键词: 核磁共振; 指纹谱; 模式识别; 啤酒

¹H NMR Fingerprinting Spectra and Pattern Recognition of Beer

ZHAO Rui¹, ZHANG Wei², OUYANG Jie¹, SHANG Qian¹, DENG Zhi-wei^{1,*}

(1. Analytical and Testing Center, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

2. Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China)

Abstract: In this study, an analytical method of the fingerprint identification based on ¹H NMR spectroscopy was proposed with beer as object. The procedure including sample pretreatment, NMR technique, experimental condition, data treatment and principle component analysis was investigated for beer specially. In this work, with the access to the ¹H NMR spectra of 19 brands of beer, their fingerprinting characteristics were preliminary distinguished. While using such means as principle component analysis of the data for the sub-category, the selected samples were successfully grouped basing on producing areas. The results showed that the created method is reliable, feasible and easy to be handled, and it can be used in the proof-test of liquid food products.

Key words: nuclear magnetic resonance; fingerprint spectra; pattern recognition; beer

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)12-0564-04

指纹识别是基于指纹谱和模式识别建立起来的一种对事物进行准确判别的方法; 该方法简捷且适应性强, 因而受到人们亲睐。目前, 基于不同测试技术建立起来的指纹识别方法已在人们的科研、生产和生活中得到广泛的应用。核磁共振(NMR)在现代科学研究与测试中扮演了重要的角色, 其信息丰富、非破坏性和无偏向性的技术特点为获取“指纹谱”提供了可靠的保障^[1-2]。核磁共振的测试方法很多, 其中以¹H NMR效率最高, 用途也最广。在¹H NMR谱中, 谱线的位置(化学位移)与样品中化合物的氢原子核存在着对应关系, 既提供了化合物的组成信息, 谱线的强弱又与样品中各组分的相对含量有关; 因而, 样本(混合物)的¹H NMR谱具有明显的“指纹”特征。

目前¹H NMR指纹图谱已在鉴别植物中药方面作出了卓越贡献^[3-4]。近年来, ¹H NMR指纹谱与模式识别的

分析方法十分活跃, 特别是代谢组学研究的兴起不仅使其得到了不断的发展和完善, 同时也以其特有的技术特点和优势赢得相关领域的关注, 食品质量与安全有可能会成为该方法实际应用的另一重要的领域^[5]。

指纹谱是指纹识别的基础, 指纹谱的建立应遵循系统性、特征性、重现性三个基本原则。首先, 指纹谱必须提供被测物体系所含成分的种类或指标性成分的完整信息; 其二, 所反映的某些信息具有高度选择性(可以视为被测物体系自身的“化学条码”); 此外, 获取指纹谱的检测方法和实验条件必须规范, 以保证图谱的通用性和可比性。因而, 指纹识别分类方法虽然简捷, 但对方法严谨性和规范性有着很高的要求。本实验以啤酒为样本, 以期建立一种可用于食品分类的检测方法。啤酒成分相对比较复杂, 各种组分的含量相差较大, 自然对核磁共振的测试的要求较高; 但啤酒是国

收稿日期: 2007-11-13

作者简介: 赵蕊(1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向为核磁共振指纹识别分析。E-mail: raincr727@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 邓志威(1953-), 男, 教授, 研究方向为核磁共振与核磁共振波谱学。E-mail: dengzw@bnu.edu.cn

人喜好的一种饮料，市场上销售的品牌繁多，样本获取较容易。因而，以啤酒为样本开展指纹识别方法的研究既具有典型的意义，同时也具有实际应用价值。

1 材料与方 法

1.1 材 料

市场上收集的 19 种不同品牌的听装啤酒作为待测啤酒样品，其中 10 种为北京地区生产的本地啤酒，9 种为境外生产的进口啤酒。待测样本在冰箱的冷藏室(4℃)内储存，并保证测试在样品标注的保质期内完成。

表 1 10 种北京产啤酒和 9 种国外产啤酒样本

Table 1 Ten kinds of Beijing beer and nine kinds of overseas beer samples

编号	名称	产地
1	蓝带蓝宝因特超爽	北京
2	蓝带蓝宝纯生	北京
3	燕京本生啤酒	北京
4	朝日生啤超爽	北京
5	朝日清爽啤酒	北京
6	燕京纯生啤酒	北京
7	老五星啤酒	北京
8	北京特生啤酒	北京
9	五星全麦啤酒(清爽型)	北京
10	蓝带黑啤酒	北京
11	黑牌生啤酒	日本
12	惠比寿生啤酒	日本
13	健力士黑啤酒	马来西亚
14	纽卡索棕色啤酒	英国
15	比美鲜啤酒	爱尔兰
16	宝汀顿啤酒	英国
17	海特啤酒	韩国
18	柯露娜白啤酒	德国
19	万胜啤酒	德国

1.2 试剂

重水(氘代度>99.9%)、DSS(4,4- 二甲基 -4- 硅代戊磺酸钠, CIL) 北京化工厂。

1.3 仪器

KQ-250DB型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器公司; 5mm 核磁管 上海有机所; Eyela 旋转蒸发仪。

Bruker DRX-500 型超导核磁共振波谱仪 布鲁克公司, 质子的激发频率为 500.13 MHz, 配备双核探头(DUL)和 BTO2000 温控系统, 控温偏差< 0.1K。

1.4 方法

1.4.1 指纹识别分析流程的建立

指纹识别早已被人们广泛接受并采用，但所采取的技术路线却存在着很大的差异。实际技术路线的设计中，既要考虑到测试目的和指纹谱获取的手段，更要特别关注测试样本的自身特性。根据核磁共振的技术特点，通过实验建立了用于啤酒样本的指纹识别分析流程(图 1)。

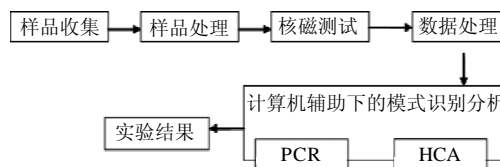


图 1 啤酒核磁共振谱——模式识别分析流程示意图

Fig.1 ¹H NMR for beer-pattern recognition analysis process

1.4.2 样品预处理

指纹识别分析对样品的预处理要求很高，为了避免样品的污染或丢失，一般不希望引进繁琐的预处理步骤。实验在样品的预处理中只采用了一步排气措施，目的是避免啤酒中的 CO₂ 气体对核磁共振测试的干扰。取新开装的啤酒 10ml，转移到 50ml 的干净烧杯中，置于 25℃ 恒温水浴中进行 10min 的超声脱气处理。取脱气处理后的啤酒液 450 μl，转移至 5mm 标准核磁管中，并加入 50 μl D₂O(氘代率大于 99.9% 含 0.01mol/L DSS)。混合均匀并将核磁管加封后直接进行 ¹H NMR 测试。

1.4.3 测试方法与实验条件的选择

核磁共振测试利用布鲁克公司的 XWIN-NMR 3.5 软件进行操控，并在所有指纹测试中使用了统一的实验参数。主要参数如下：谱宽(SWH) 8000 Hz，中心频率(O1)2349 Hz，采样点数(TD)32 × 1024，扫描次数(NS) 256，空扫次数(DS)8，延迟时间(D1)8s，接收增益(RG) 固定为 32，实验温度(T)控制在 298.0 ± 0.1 K。重水提供了氘锁场的锁场信号，而 DSS 被用作内标。

啤酒内含成分相当复杂，可溶性物质多达数百种^[6]，而且各种成分的含量相差很大，其中水为主体成分，乙醇则是另一种主要成分。就本实验而言，以上两种物质含量虽高，但并不具有指纹性意义，而且在 ¹H NMR 测量中水与乙醇的共振信号会对低含量物质信号的获取产生严重干扰。因而，抑制或消除水和乙醇信号是获取理想啤酒 ¹H NMR 指纹谱的关键环节之一。通过预处理去除样品中的水和乙醇组分是最直接的方法，但实践中发现：由于样品预处理的环节多、耗时长，定量控制难度大，重现性难以得到保障。选择性压制是 ¹H NMR 测试中常用的对干扰信号(如溶剂信号)进行抑制的手段，例如，在生物样品测试中采用由“noesypr1d”脉冲序列组成的预饱和技术就能实现对水峰信号的完全抑制^[7]。类似的实验技术还很多，如“预饱和”、“WET”、“WATERGATE”、“1c1pncwps”等脉冲序列均具有选择性抑制信号的效果^[8]。其中“1c1pncwps”脉冲序列最早是为 LC-NMR 联用技术设计的一种溶剂信号压制的手段，具有对多组信号进行选择性压制功能。本实验将对两种不同实验技术获取 ¹H NMR 进行比较。

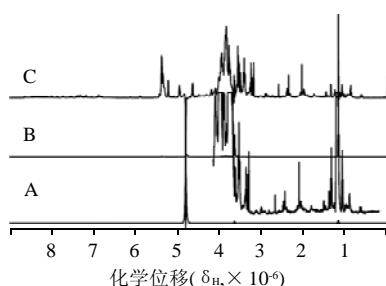
1.4.4 模式识别分析

具体的操作步骤包括：(1)谱线修正：窗函数拟

合、相位与基线校正和位移定标；(2)数据处理：主要有①分段积分，采用定区间 $\Delta \delta_{\text{H}}0.01$ 对谱图 $\delta_{\text{H}}10.0 \sim \delta_{\text{H}}0.7$ 区域进行连续积分，共得到920个数据点；②信号的区域筛选，数据处理过程中将被压制的信号区域——水峰区域($\delta_{\text{H}}4.90 \sim \delta_{\text{H}}4.70$)、乙醇峰区域($\delta_{\text{H}}3.75 \sim \delta_{\text{H}}3.60$ 和 $\delta_{\text{H}}1.20 \sim \delta_{\text{H}}1.10$)的数据删除，提高分析结果的可信度；③归一化处理，建立Excel模式的数据库；(3)数据分析，主成分分析采用协方差主成分分析法。

2 结果与分析

2.1 核磁共振测试



A. 常规氢谱；B. 采用预饱和和单压制；C. 采用多压制。

图2 单压制水峰和多重压制的 ^1H NMR实验结果

Fig.2 ^1H NMR experimental results of single- and multiple-suppression of solvent

常规 ^1H NMR谱(图2A)中水峰信号很强，且覆盖范围较大，乙醇信号虽然弱些，但相对于除水峰以外的其他信号还是很大。上述信号不仅直接影响了对所处区域其他信号的观测，更主要的是由于水和乙醇的信号构成了核磁共振中自由衰减信号(FID)的主体，必然会抑制低浓度组分信号的信噪比改善。

预饱和和实验技术对水峰信号进行了有效的压制(图2B)，但啤酒样品中同时存在着三组较强的信号(其中一组为水峰信号，另外两组分别为乙醇的甲基和亚甲基信号)，且相互独立分布在 $\delta_{\text{H}}1.2 \sim \delta_{\text{H}}4.8$ 区间内，因而，该方法难以满足本工作的要求。乙醇信号对观测的干扰仍无法排除。图2C是利用“ $1c1pncwps$ ”脉冲序列，并通过实验参数优化后获得的啤酒样品多重压制的 ^1H NMR谱。该谱图中，水和乙醇的信号被有效的抑制，就整体而言，低浓度组分的信号清晰可辨，将该谱图与未压制的常规 ^1H NMR(图2A高场放大大部分)进行比较，不难看出，前者的信噪比明显优于后者，已能达到本工作预期设想的“指纹谱”要求。针对样品的自身特性和实验的目的要求，确定了以“ $1c1pncwps$ ”脉冲序列为获取 ^1H NMR指纹谱的技术手段，该脉冲序列具有对多组信号进行选择性的压制功能

2.2 啤酒 ^1H NMR指纹谱分析

啤酒的酿造原料主要是大麦、酒花、辅助原料(通

常多采用未发芽的谷物或糖类，国内较常采用的是大米、玉米、大麦、糖或糖浆等)、酿造用水等^[6]。 ^1H NMR谱则可提供原料中以及酿造过程中所生成的化合物的种类与含量信息。实验结果显示：在 ^1H NMR谱上，啤酒样品的信号分布在 $\delta_{\text{H}}9.0 \sim \delta_{\text{H}}0.0$ 之间。根据核磁共振谱线所对应的化合物特征，可将谱图分为“脂肪区”、“碳水化合物区”和“芳香区”三个区域(图3)^[9]。

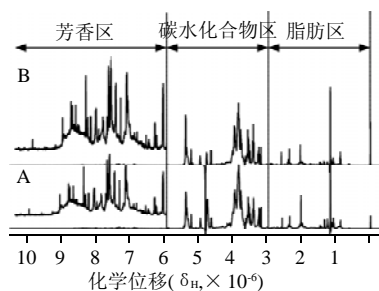


图3 两组常规啤酒样品的多重压制 ^1H NMR指纹图谱(D₂O)
Fig.3 ^1H NMR fingerprint spectra of two beer samples with multiple-suppression of solvent(D₂O)

脂肪区处于谱图的高场端($\delta_{\text{H}}3.0 \sim \delta_{\text{H}}0.0$)。信号来源于啤酒中的脂肪类化合物或化合物的脂肪基团，主要与啤酒酿制的原料中所含的脂肪酸化合物有关。这部分信号相对比较清晰，容易识别，而不同品牌的啤酒的这部分信号区别并不十分明显。这显然无法用于区分不同品牌的啤酒，但从一定程度上反映了啤酒类饮料的共有特征谱。

芳香区处于谱图的低场端($\delta_{\text{H}}9.0 \sim \delta_{\text{H}}5.5$)，信号相对较弱(与其他两个区域的信号相比)，显然与之对应的物质在啤酒中的含量应该不高。信号主要是由芳香类基团质子或氨基酸上的氨基质子所提供，而这类物质通常与色泽或口感等有关，与啤酒的特点或特征有着某种特定的联系，因而，在啤酒鉴别中有着特殊的意义。尽管这一区域的信号相对弱些，但放大后的区域谱(图3)的谱线清晰可辨。对该区域信号进行比较，可明显发现不同的啤酒样品间存在着差异，并具有一定的特征性，可以直接用来进行指纹判别。

碳水化合物区处于谱图的中段($\delta_{\text{H}}5.5 \sim \delta_{\text{H}}3.0$)，主要包含了糖类和氨基酸的 α -质子的信号。啤酒酿制所用的谷物原料(如大麦、大米、玉米等)中均含大量的糖类化合物，所使用的原料和酿制工艺上的差异会直接影响啤酒产品中糖的类型与含量。谱图比较分析显示：这一区域的信号相对较强，具有明显的糖类化合物的信号特征，仔细观察可以发现不同样品间的信号存在着差异。然而，谱峰重叠现象较为严重，样品间信号的差异也并非十分明显，对谱图进行人工差异分析难度较大。

2.3 啤酒的模式识别分析

啤酒 ^1H NMR谱可提供大量具有指纹特征的信息，

但谱图十分复杂,人工识别不仅耗时且具难度。此外啤酒的生产环节较多,所含成分相当复杂,利用单一(或几组)信号进行分析评估很难避免结论的偏颇。模式识别是一种对复杂体系进行数据分析的方法,可以从大量复杂数据中最大限度的提取识别信息,以达到对样品进行类分的效果。基于¹H NMR的模式识别方法不仅可以充分利用模式识别自身强大的数据处理能力,而且能够进一步体现核磁共振信息丰富的优势。

引用全部测试数据是模式识别数据样本处理中通常采用的方法,而本实验只采用了部分数据进行模式识别的分析研究。此前的分析结果显示:脂肪区的信号无显著差异,对类分析帮助不大;芳香区信号差异很大,模式识别类分处理后发现数据点过于分散,虽然可以将大部分样品区分开来,但难以建立类分模式。根据本实验设计目的,这里只选用了碳水化合物区段的数据,利用主成分分析法(PCA)对北京产的本地啤酒与国外生产的进口啤酒进行类分分析。

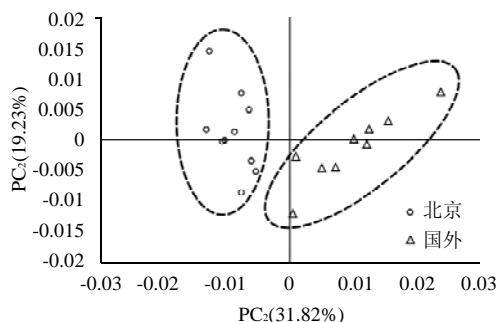


图4 19种不同产地啤酒的PC₁/PC₂的得分图
Fig.4 PC₁/PC₂ score of 19 kinds of beer

图4给出了根据19种啤酒的¹H NMR指纹谱碳水化合物区段数据获得的PCA类分图。在图4上,北京产啤酒的数据点和国外产啤酒的数据点明显分成两个区域(在图中分别以虚线圈出)。以PC₁做参比轴,北京产啤酒的数据点全部落入了负值区,而国外产的啤酒的数据点则出现在正值区域,显示了极佳的区分效果。此外,结果还反映出了另一个值得关注的现象,图中的数据点相对分散。这表明即使是类分落在同一区域内的样本,其¹H NMR谱图之间也存在整体性且可辨别的差异,显然这可用于区分两种不同品牌的啤酒(真伪识别),也可用来对不同批次的样本进行评估(质量控制)。

利用聚类分析HCA法处理这组数据,结果见图5。可以看到北京产啤酒点被聚集成一个大类(5样本除外),其中1、2和10样本属于蓝带啤酒集团产品被单独聚集为一小类,并与北京产的其他啤酒分开。而燕京啤酒集团的产品(3和6)和五星啤酒集团的产品(7、8和9)相互混杂被聚为另一小类。国外生产的7种啤酒(11、12、13、15、16、18和19)聚在一起成一大类,其中产自

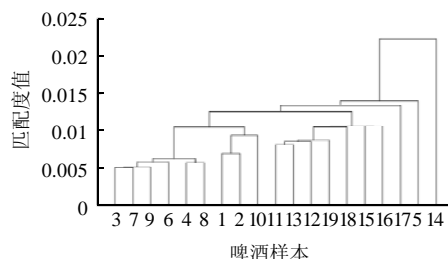


图5 19种啤酒的HCA分析结果
Fig.5 HCA analytical results of 19 kinds of beer

日本和马来西亚的三种啤酒(11、12和13)被聚为一小类且与德国产的两种啤酒(18和19)为接近,而15和16属浅色啤酒被另聚一小类。

3 结论

本实验以啤酒为样本,对基于¹H NMR实验的指纹识别类分分析进行了探讨,并建立了一套可行的样品制备、核磁共振检测、谱图处理和数据分析的啤酒样本类分分析方法。该方法利用了核磁共振自身多手段的技术优势,在¹H NMR测量中采用了多压制技术,有效地消除了样品中高含量成分对测量的干扰;更重要的是简化了样品的预处理环节,这无疑有利于保证测试数据的重现性。所获取的¹H NMR清晰,信息完整,达到了指纹谱的基本要求,也为模式识别类分分析提供了可靠的实验数据基础。利用已建立的分析方法,以产地为基础对19种啤酒进行了¹H NMR——模式识别类分分析,成功地将北京地区生产的本地啤酒与国外生产的进口啤酒区分开来。所建立的方法简单,易于操控,结果可靠性高,应该可以直接用于液体样品(如饮料)的真伪判别、产品质量控制或质量评估。

参考文献:

- [1] 杨军,宋硕林.代谢组学及其应用[J].生物工程学报,2005,21(1):1-5.
- [2] 颜贤忠,赵剑宇,彭双清.代谢组学在后基因组时代的作用[J].波谱学杂志,2004,21(2):263-271.
- [3] 秦海林,尚玉俊,赵伟.核磁共振氢谱法鉴别黄连的研究[J].药学学报,2001,36(6):462-466.
- [4] 秦海林,赵天增,袁卫梅,等.何首乌和掌叶大黄唐古特大黄的¹H NMR指纹图解析[J].药学学报,2002,27(12):919-923.
- [5] DUARTE I F, BARROS A, BELTON P S, et al. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 2475-2481.
- [6] 桂祖发.酒类制造[M].北京:化学工业出版社,2001.
- [7] 毛希安,叶朝辉.生物核磁共振实验中的相移预饱和和压水峰技术[J].中国科学C辑:生命科学,1997,27:315-319.
- [8] 毛希安.现代核磁共振实用技术及应用[M].北京:科学技术文献出版社,2000.
- [9] WARD J L, HARRIS C, LWIS J, et al. Assessment of ¹H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of arabidopsis thaliana[J]. Phytochem, 2003, 62: 949-957.