

多种拉曼光谱归一化法对乙醇定量分析的研究

吴正洁¹, 黄耀熊^{1*}, 王成², 黎绍发²

1. 暨南大学生物医学工程研究所, 广东 广州 510632

2. 华南理工大学计算机科学与工程学院, 广东 广州 510640

摘要 通过对多种拉曼光谱归一化方法进行乙醇定量分析的探讨, 提出使用选取最高浓度下乙醇谱中谱强最高点作为归一化参照的乙醇浓度定量分析方法, 其线性相关系数达到 0.999, 检验样的平均相对误差率仅为 0.0678, 组间数据的相对标准偏差为 0.0463, 其有效性和准确性均优于内标法和比值法, 并具有良好的抗干扰能力。同时, 在结合基线校准处理后, 不仅能有效消除组间数据差异, 而且明显提高了乙醇定量分析的精确性。以此法用于市场白酒样品的乙醇含量检测, 可快速简便获得准确的结果, 其相对标准偏差小于 0.012, 具有良好的商业应用前景。

关键词 激光拉曼光谱; 乙醇; 归一化法; 基线校准; 定量分析

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)04-0971-04

引言

尽管激光拉曼光谱分析技术发展了几十年, 但是将其应用于商业的研究才起步不久^[1,2]。而乙醇的定量分析对于食品工业、药品制造业、以及市场检验都具有重要意义。同时, 基于激光拉曼光谱的乙醇定量分析技术相对目前的其他乙醇定量分析技术^[3-8]而言, 具有制样简单、分析快速、无损、以及所检测的样品仅需微量即可满足测量要求等诸多优点。

目前, 基于激光拉曼光谱技术的乙醇定量分析方法主要有 2 种: 一种是以水的谱峰作为内标^[9], 得到 884 cm^{-1} 处的谱峰强度与乙醇浓度之间的函数关系, 从而定量分析未知样品的乙醇浓度。但是, 这种方法所获得的函数关系仅适用于乙醇浓度为 4%~40% 的情况。并且, 该方法有效的前提是, 作为内标的水的谱峰在不同乙醇浓度下谱峰半宽必须是不变的; 第二种方法是取各个乙醇浓度谱的两个特征峰 (2873 和 2969 cm^{-1}) 的强度比值^[10], 获得该比值与乙醇浓度间的函数关系, 从而定量分析未知样品的乙醇浓度。但是, 由于所选取的 2969 cm^{-1} 特征峰紧邻水的谱峰, 其特征峰强易受水谱带的干扰, 进而极大影响了乙醇浓度定量分析的准确性。同时, 这两种定量分析方法是分别对各个乙醇浓度下的谱图数据进行分析, 由于各个浓度下乙醇谱图获取的时空差异性会导致各个实验环境的差异性, 实验组间数据会出现波动,

从而也将会影响这两种定量分析函数的准确性和有效性。

通过以上分析可知, 上述 2 种乙醇浓度定量分析方法的不足或局限是因分析处理中的原始谱强易受扰动所致, 而在拉曼光谱分析中采用归一化处理可以有效地消除这种影响^[11-14]。因此, 本文在乙醇定量分析中分别采用多种拉曼光谱归一化方法进行处理。通过比较分析, 获得最适于乙醇定量分析的归一化处理方法, 同时结合基线校准方法^[15,16] 来有效消除由实验环境差异所造成的组间数据的波动及提高乙醇定量分析的准确性。通过实验数据分析和对市场白酒乙醇含量的实际检测结果可知, 本文提出的乙醇定量分析方法具有简单、快速、适用范围更广、准确性更高、受外界环境干扰小等优点。

1 材料与方 法

1.1 试剂

用双蒸、去离子水将无水乙醇(分析纯, 天津市化学试剂一厂)稀释至 5%, 10%, 25%, 30%, 50%, 75% 的浓度。食用白酒为普通市售(红星二锅头酒 56°; 打虎牌头曲酒 33°; 九江双蒸酒 29.5°)。

1.2 仪器

显微共焦激光拉曼光谱仪(Horiba JY RAM INV, 法国 JY 公司)。采用 Ar^+ 离子激光(514 nm)作为激发光源, 其输

收稿日期: 2009-05-06, 修订日期: 2009-08-09

基金项目: 国家自然科学基金仪器专项项目(30227001)和面上项目(60377043)资助

作者简介: 吴正洁, 女, 1982 年生, 暨南大学生命科学技术学院博士研究生 e-mail: wuzhengjiemoon@163.com

*通讯联系人 e-mail: tyxhuang@nu.edu.cn

出为 15 mW, 共焦孔径 200 μm , 光谱范围 400 ~ 4 000 cm^{-1} , 分辨率 1 ~ 2 cm^{-1} 。其波数轴及激光功率的校准采用标准硅片进行, 即每次测量样品之前, 将硅片特征峰校准至 520.7 cm^{-1} ; 并且, 以硅片特征峰的最高强度来表征测量时的激光功率, 确保每次测量时, 照射到样品处的激光功率相同。

1.3 实验方法

将配置好的不同浓度乙醇溶液及普通市场白酒分别滴加到玻片上, 每次只需加入 5 μL 的样品。然后以拉曼谱仪采集乙醇溶液的拉曼谱和玻片拉曼谱。信号采集的曝光时间为 10 s, 每个样品测量 3 次, 取其平均谱。从乙醇溶液拉曼谱中减去玻片背景谱后得到每一样品对应的乙醇拉曼谱。各谱线使用 JY 公司的拉曼分析软件进行基线校准。

每一实验取 3 组平行样, 每组样品的实验时间间隔为一周; 另再取 2 组检验样, 每组浓度分别为 10%, 25%, 30%, 50%, 75%。

本文分别采用 4 种归一化方法对乙醇拉曼谱进行数据处理, 获得乙醇浓度与乙醇特征峰的函数关系。所采取的归一化方法分别为: (1) 选取每组最高浓度下乙醇谱中谱强最高点作为此组所有数据归一化的参照; (2) 选取每组最高浓度下乙醇谱中谱强最高点所对应的谱峰面积作为该组所有数据归一化的参照; (3) 选取每组最高浓度下乙醇谱中指纹区域的面积作为该组所有数据归一化的参照; (4) 选取每组最高浓度下乙醇谱的整谱面积作为该组所有数据归一化的参照。归一化的公式如下

$$S_i = \frac{S_i}{S} \times 100\% \quad (i = 0, 1, \dots, n, \dots)$$

其中, S_i 为原谱中各谱点强度, S 为参照值, S_i 为归一化后的值。

考虑由于在不同时间实验时拉曼光谱仪、激光输出和环境等因素变化对谱图各点干扰的随机性, 因此, 每个乙醇谱图取 4 个特征峰(880, 2 888, 2 937, 2 981 cm^{-1}), 分别对这 4 个特征峰的峰强与乙醇浓度作线性回归分析, 获得它们之间的函数关系。并使用各函数线性回归分析中的相关系数 r 和决定系数 R^2 值、以及 2 组检验样在各函数下的平均相对误差综合分析评价各函数的优劣, 即 r 和 R^2 值越接近于 1 则线性相关性越好, 平均相对误差越小则准确性越高。并选择最优函数关系作为最终乙醇定量分析函数式。

同时, 将 3 组平行样的数据作随机区组方差分析获得区组间的 F 值, 进而得到统计概率 P , 若 P 值大于 0.05 时, 说明组间差异不具有统计学意义, 若 P 值小于 0.05, 则说明组间差异具有统计学意义。若 P 值小于 0.05, 则说明组间差异具有统计学意义。而对 P 值都大于 0.05 的谱数据, 则进一步计算其组间数据的相对标准偏差 RSD, RSD 越小, 说明其组间数据波动越小^[17]。

最后, 根据上述确定的乙醇定量分析函数式对普通市场白酒乙醇浓度进行检测, 并使用由本文方法计算出的白酒乙醇浓度和归一化后样品 3 次测量值的相对标准偏差来衡量本文方法在实际应用中的精密度。

2 结果与分析

首先, 分别采用 4 种归一化方法对乙醇拉曼谱进行数据处理, 各种归一化方法下所获得的乙醇浓度与乙醇特征峰间函数关系以及函数评价指标如表 1 ~ 表 4。

Table 1 Results obtained by normalization method (1)

谱带/ cm^{-1}	相关系数 r	决定系数 R^2	相对误差	不同组间差异统计 P
880	0.998	0.997	0.176 567	0.160
2 888	0.997	0.995	0.133 444	0.182
2 937	0.999	0.999	0.067 752	0.199
2 981	0.998	0.997	0.178 817	0.129

Table 2 Results obtained by normalization method (2)

谱带/ cm^{-1}	相关系数 r	决定系数 R^2	相对误差	不同组间差异统计 P
880	0.998	0.997	0.508 34	0.172
2 888	0.997	0.995	0.118 522	0.219
2 937	0.999	0.999	0.080 391	0.144
2 981	0.998	0.997	0.160 114	0.195

Table 3 Results obtained by normalization method (3)

谱带/ cm^{-1}	相关系数 r	决定系数 R^2	相对误差	不同组间差异统计 P
880	0.998	0.997	0.237 962	0.202
2 888	0.997	0.995	0.164 134	0.269
2 937	0.999	0.999	0.358 623	0.276
2 981	0.998	0.997	0.164 769	0.214

Table 4 Results obtained by normalization method (4)

谱带/ cm^{-1}	相关系数 r	决定系数 R^2	相对误差	不同组间差异统计 P
880	0.998	0.997	0.179 815	0.130
2 888	0.997	0.995	0.232 073	0.122
2 937	0.999	0.999	0.174 898	0.016
2 981	0.998	0.997	0.238 467	0.130

通过对各表数据统计的比较分析可见, 本文进行的乙醇定量分析采用归一化方法(1)情况下, 2 937 cm^{-1} 的特征峰强与乙醇浓度之间的函数关系, 其决定系数达到 0.999, 相关系数为 0.999; 检验样的平均相对误差率仅为 0.067 8; 且组间数据差异的统计概率 P 大于 0.05, 说明其组间差异不具有统计学意义。也就是说采用该方法对同一样品在不同时间进行的实验可得到相同的结果, 即该方法抗干扰能力强。

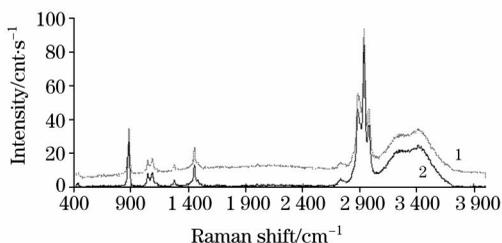


Fig 1 Raman spectra of ethanol

1: Original spectrum; 2: After baseline correction

同时,我们结合基线校准方法进一步探讨本文提出的乙醇浓度定量分析方法,如表 5 所示。其采用基线校准技术前的拉曼谱图如图 1 所示。

Table 5 Results obtained by normalization method (1) either with baseline and without

	谱带/ cm^{-1}	相关系数 r	决定系数 R^2	相对误差	不同组间差异统计 P	RSD
基线校准之前	880	0.998	0.997	0.176 567	0.160	0.091 643
	2 888	0.997	0.995	0.133 444	0.182	0.081 232
	2 937	0.999	0.999	0.067 752	0.199	0.046 292
	2 981	0.998	0.997	0.178 817	0.129	0.082 087
基线校准之后	880	0.998	0.997	0.042 726	0.590	0.038 382
	2 888	0.999	0.998	0.035 362	0.702	0.063 441
	2 937	0.999	0.998	0.049 634	0.951	0.052 977
	2 981	0.993	0.986	0.123 381	0.932	0.087 673

从表 5 数据可知,基线校准方法的引入,基本不影响本文方法函数的线性相关性,却显著改善了乙醇定量分析的精确性,其相对误差减小到 0.035 4。另一方面,基线校准方法的引入,对各特征谱峰函数的抗干扰能力的影响呈现出规律性:880 cm^{-1} 处的谱峰由于远离水的干扰谱峰,其组间数据的稳定性有明显的改善,相对标准偏差明显减小,仅为 0.038 4; 2 888 cm^{-1} 次之;而其他两个谱峰由于近邻水的干

扰谱峰,其组间数据的稳定性有轻微的变坏,离干扰谱峰越近,所受影响越大。这说明,当引入基线校准方法后,最优的定量谱峰应选择远离干扰谱峰的特征谱带。

为了更进一步分析本文乙醇浓度定量分析方法的优劣,在相同实验数据处理的情况下,与引言中提及的两种现行的乙醇浓度定量分析方法进行了相关比较。表 6 分别为前述 2 种方法对本文实验数据分析处理的结果。

Table 6 Results by using internal standard and ratio methods

方法	相关系数 r	决定系数 R^2	相对误差	不同组间差异统计 P	RSD
内标法	0.997	0.994	0.134 502	0.120	0.085 054
比值法	0.957	0.917	0.332 373	0.239	0.023 643

通过比较可知,前述 2 种方法的线性相关性都差于本文方法,并且通过计算组间数据相对标准偏差和检验样品分析,内标法的平均相对误差和组间数据的相对标准偏差都远大于本文方法,说明其定量分析的准确性和抗环境干扰的能

力远逊于本文方法。而比值法虽然有较好的抗干扰能力,但其平均相对误差却达到 0.332 4,说明将其用于定量分析的准确性不高。

Table 7 Results obtained from analysis of alcohol in some wines

测量样	计算得出值(, %)	平均值(, %)	数据处理后 3 次测量值的 RSD
酒 1	56.513 18, 55.415 68, 56.569 55	56.166 14	0.011 568
酒 2	32.716 36, 32.699 32, 33.376 82	32.930 83	0.011 707
酒 3	29.323 64, 29.885 23, 29.607 5	29.605 45	0.009 463

更进一步地,我们采用对市场白酒乙醇浓度的检测来验证本文方法的实用有效性,结果如表 7 所示。

从数据可知,本文方法对市场白酒乙醇浓度检测的相对标准偏差 RSD 均小于 0.012,表明本文方法具有理想的精密程度,应用于商业检测的前景良好。

3 结 语

本文提出了结合基线校准技术并采用选取最高浓度下乙

醇谱中谱强最高点作为归一化参照的乙醇浓度定量分析方法,通过有关实验、数据分析和对市场白酒乙醇浓度的检测结果,均表明本文方法具有精确度高、抗干扰能力强等优点,且其有效性和准确性均远优于内标法和比值法。为快速、准确地检测乙醇浓度提供了一种简单有效的方法,具有良好的商业应用前景,并拓展了拉曼光谱定量分析的应用。

参 考 文 献

- [1] Tseng C, Mann C K, Vickers T J. *Appl. Spectrosc.*, 1994, 48: 535.
- [2] HONG Wen-xing, HE Song-yu, HUANG Shun-hua, et al(洪文兴, 何松裕, 黄舜华, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2008, 28(10): 2343.
- [3] Stackler B, Christensen E N. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1974, 25: 202.
- [4] Collins T S, Miller C A, Altria K D, et al. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1997, 48: 280.
- [5] Nagarajan R, Gupta A, Mehrotra R, et al. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2006. 45102.
- [6] Cassada D A, Zhang Y, Snow D D, et al. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 4654.
- [7] Ortega C, Lopez R, Cacho J, et al. *J. Chromatogr. A*, 2001, 93: 205.
- [8] Tangerman A. *Clin. Chem.* 1997, 43(6): 1003.
- [9] LIU Wen-han, YANG Mo, WU Xiao-qiong, et al(刘文涵, 杨 未, 吴小琼, 等). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2007, 35(3): 416.
- [10] ZHANG Hong-bo, SU De-zhi, HE Yan-lan(张洪波, 宿德志, 何焰蓝). *Analysis and Testing Technology and Instruments(分析测试技术与仪器)*, 2007, 13(3): 190.
- [11] Pelletier M J, Davis K L, Carpio R A. *Electrochem. Soc. Proc.*, 1995, 95(2): 282.
- [12] Svensson O, Josefson M, Langkilde F W. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 1999, 49: 1.
- [13] Hancewicz T M, Petty C. *Spectrochim Acta A*, 1995, 51: 2193.
- [14] Swierenga H, de Weijer A P, van Wijk R J, et al. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 1999, 49: 1.
- [15] Li K, Banerjee S. *Appl. Spectrosc.*, 1991, 45: 1047.
- [16] Berger A J, Koo T W, Itzkan I, et al. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 623.
- [17] SUN Zhen-qiu(孙振球). *Statistics of Medicine(医学统计学)*. Beijing: People's Medical Publishing House(北京: 人民卫生出版社), 2002.

Normalization Methods for Ethanol Raman Spectra Quantitative Analysis

WU Zheng-jie¹, HUANG Yao-xiong^{1*}, WANG Cheng², LI Shao-fa²

1. Institute of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. Department of Computer Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

Abstract By performing different Raman normalization methods for ethanol quantitative analysis, the authors proposed the method which used the highest band intensity of the ethanol Raman spectra in the maximum concentration as the normalization metric for ethanol concentration quantitative analysis. By using this method, the correlation coefficient was 0.999, the mean relative error was only 0.0678, and the relative standard deviation (RSD) of the data from different experimental groups was 0.0463. Both the validity and accuracy of this method were much better than the internal standard and ratio methods. Combined with baseline correction, the method can not only effectively resist the data fluctuation between different experimental groups, but also improve the accuracy of ethanol quantitative analysis obviously. The test using the method to measure the ethanol concentration of some wines from market proved that the relative standard deviations were all smaller than 0.012, indicating that the method is excellent for ethanol concentration quantitative analysis in commercial applications.

Keywords Laser Raman spectra; Ethanol; Normalization methods; Baseline correction; Quantitative analysis

(Received May 6, 2009; accepted Aug. 9, 2009)

* Corresponding author