

GC-MS 结合模式识别评价鱼新鲜度的研究

戴煌, 黄星奕*, 姚丽娅, 孙宗保

(江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013)

摘要: **目的** 对鱼新鲜度进行客观评价。**方法** 用顶空固相微萃取气相色谱质谱联用(HS-SPME-GC-MS)检测不同储藏时间下鱼的挥发性成分, 建立鱼肉挥发性物质的特性指纹图谱, 利用模糊 C 均值聚类法(FCM)分析特征共有峰。为验证聚类分析的结果, 建立鱼新鲜度神经网络判别模型。**结果** FCM 能较好地将贮藏 9 d 的鱼可分成 3 类(新鲜、次新鲜和腐败), 建立的 RBF 神经网络模型能很好鉴别鱼的新鲜度, 其训练集和测试集的正确分类率都达到 100%。**结论** 此方法效果好, 为分析和检验鱼新鲜度提供了一种新的方法。

关键词: 气相色谱-质谱法; 模式识别; 鱼新鲜度; 模糊 C 均值聚类分析

Study on evaluating of fish freshness by GC-MS combined with pattern recognition

DAI Huang, HUANG Xing-Yi*, YAO Li-Ya, SUN Zong-Bao

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

ABSTRACT: Objective To objectively evaluate fish freshness. **Methods** The volatile components of fish stored at different days were detected and analyzed by headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). According to the characteristic fingerprint of the fish volatile substances, common peaks were analyzed using the fuzzy C-means clustering (FCM). Then neural network discriminant model was built to verify the result of FCM. **Results** It showed that fish stored at 9 days could be classified into 3 statuses (fresh, second fresh, bad) with the results of FCM. RBF neural network discriminant model could classify data from the fish volatile substances, and the accuracy rate of train set and test set was both 100%. **Conclusion** The method has good effects and is suitable for the analysis and detection of fish freshness.

KEY WORDS: gas chromatography-mass spectrometry; pattern recognition; fish freshness; fuzzy C-means clustering

1 引言

鱼肉味道鲜美, 且营养物质含量高, 其中蛋白质含量约为 15%~24%, 其不饱和脂肪酸具有防治心脑血管疾病等功效^[1], 深受广大消费者青睐。然而在不恰当的贮藏、运输条件下, 鱼类极易腐败变质。新鲜度是衡量鱼及其产品质量的一项重要指标, 不同

新鲜度的鱼营养价值、口感甚至安全性有很大的差别。鱼在贮藏过程中其挥发性物质会发生变化, 通过研究不同新鲜程度的鱼挥发性成分的特征物质, 可以判断鱼的新鲜级别。目前指纹图谱分析技术在中药材和食品分析中应用广泛^[2-4], 通过比较物质的指纹图谱就可以判断出样品差异。根据鱼在贮藏期间其挥发性成分的变化作指纹图谱, 并进行聚类分析, 建立

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201003008)

*通讯作者: 黄星奕, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 农产品检测技术。E-mail: h_xingyi@163.com

相关的鱼新鲜度判别模型的研究目前还未见报道。

本实验研究不同新鲜度大黄鱼的挥发性成分,提取特征色谱峰,建立鱼新鲜度指纹图谱。对不同新鲜度鱼的特征峰进行聚类分析,根据聚类分析的结果建立鱼新鲜度的神经网络判别模型,以期提供一种客观、准确检测鱼新鲜度的新方法。

2 材料与方法

2.1 材料

冰鲜大黄鱼,购于镇江欧尚超市。撒上冰块低温保存送回实验室。

2.2 仪器与设备

DK S24 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);YC-300L 型医用冷藏箱(中科美菱低温科技有限责任公司);JYL-C010 九阳料理机(九阳股份有限公司);手动 SPME 进样器配有 75 μm CAR/PDMS 萃取头(美国 Supelco 公司);Agilent 6890N /5973 气相色谱质谱联用仪(美国 Finnigan Mat 公司)。

2.3 样品准备

用蒸馏水将每条鱼洗净,放入保鲜袋,封口,贮藏于冷藏柜中,贮藏温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 。每天取出 4 条目测大小相近的鱼去掉保鲜袋,用洁净菜刀除去鱼的鳞片、头、尾,取鱼的背脊肉约 40 g。将鱼背脊肉用九阳料理机(每次使用前用沸腾腾蒸馏水消毒,减少微生物的污染)搅碎成鱼糜状。

2.4 色谱条件

2.4.1 HS-SPME 条件

称取 3.0 g 鱼糜样品,装于 15 mL 顶空瓶中。将 75 μm CAR/PDMS 萃取头老化 2 h,然后插入顶空瓶,置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中吸附 40 min。然后将萃取头插入气相色谱仪于 250 $^{\circ}\text{C}$ 解吸 5 min。

2.4.2 GC-MS 条件

GC 条件:DB WAX 弹性毛细管柱 60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm ;程序升温:柱初温 40 $^{\circ}\text{C}$,保持 4 min,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 90 $^{\circ}\text{C}$,然后再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 230 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min,进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$,载气为氦气(He),以 0.80 mL/min 恒定流速流动,不分流进样,接口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。

MS 条件:电离方式 EI;电离电压 70 eV;离子源温度 200 $^{\circ}\text{C}$;扫描质量范围为 33~450 amu^[5]。

2.5 数据处理方法

2.5.1 共有峰的选择和提取

所得到的鱼挥发性物质色谱峰较多,且较为密集。根据不同贮藏时间的鱼总离子流图中共有性和各色谱峰相对保留时间的一致性确定共有峰。在色谱图中选择一个特定色谱峰作为内参峰,该峰为所有样本色谱图所共有,且位于色谱图较中间位置,相对峰面积较大,各峰与参照峰的比值比较稳定。在此基础上将各共有色谱峰保留时间和峰面积与同一图谱中参照峰的保留时间和峰面积相比,其比值为各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积^[2]。各共有峰的集合作为鱼新鲜度的特征指纹峰。

2.5.2 模糊 C 均值聚类分析

用模糊 C 均值聚类(Fuzzy C-Means clustering, FCM)法对特征共有峰进行分类。与系统聚类^[6]和 K-均值聚类^[7]相比,FCM 法的主要思想是将新样本按照一定规则算出到不同类之间的距离,然后根据距离标准将样本归类的方法模糊化,用隶属度来确定属于某个聚类程度的一种方法^[8]。

将大黄鱼贮藏 9 d,每天检测 4 条。将这 36 个样本的特征共有峰用 FCM 法聚类。

2.5.3 鱼新鲜度判别模型的建立

径向基函数(radial basis function, RBF)神经网络属于前向神经网络类型^[9,10]。基本思想是用 RBF 作为隐单元的“基”构成隐含层空间,隐含层对输入矢量进行变换,将低维的模式输入数据变换到高维空间内,使得低维空间内的线性不可分的问题在高维空间内线性可分^[11,12]。RBF 是以隐中心矢量和核函数控制参数为参量,最常用的 RBF 形式是高斯函数,它的可调参数有 2 个,即中心和方差(函数宽度参数)。本研究采用高斯函数作为 RBF,用高斯函数时整个网络的可调参数有 3 个,即各基函数的中心位置、方差和输出单元的权值。

为验证 FCM 法的聚类结果,用 36 个样本的特征共有峰数据作为神经网络的输入,将聚类分析结果得出鱼新鲜度等级作为神经网络的输出,建立 RBF 神经网络判别模型。建立 RBF 神经网络中,利用 K-Means 聚类方法求基函数中心,这种聚类方法有效提取数据的潜在联系,使得簇内的数据与其在其它簇内更具有相似性。利用高斯函数求解方差,用最小二乘法计算隐含层和输出层之间的连接权值。

3 结果与讨论

3.1 不同贮藏天数的鱼样本色谱图共有峰的提取

在所得到的色谱图上选择保留时间在 26.58 min 的色谱峰作为参考峰, 经检索 NIST05a.L 谱库, 确定此色谱峰对应的物质为十七烷。在此基础上求出所有色谱峰的相对保留时间 t_R 和相对峰面积 S_r , 并选择相对峰面积 $S_r > 1\%$ 的共有峰进行比较, 若 $S_r < 1\%$, 色谱峰的相对峰面积按零计算^[13]。

选取第 1、3、5、7、9 d 鱼样本的气相色谱数据, 生成鱼新鲜度对照指纹图谱, 如图 1 所示。对照指纹图谱是根据所有批的峰面积、保留时间的平均值计算得来的, 包含所有样本的色谱峰。根据不同贮藏时间下鱼的气相色谱图结合对照指纹图谱选取的共有峰作为判定鱼新鲜度的特征峰。经筛选符合要求的共有峰为 17 个, 见图 1。样品的相对峰面积如表 1。

这些特征峰可作为判别不同鱼新鲜度的原始数据。其余峰在部分样品中出现, 但这些色谱峰没有特

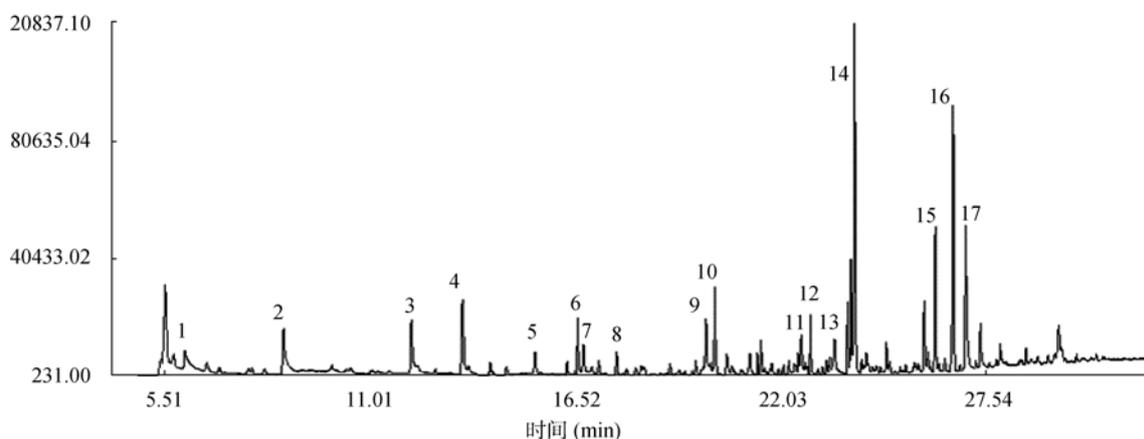


图 1 不同贮藏期鱼新鲜度的指纹图谱

Fig. 1 The reference fingerprint of freshness of fish stored in different periods

表 1 不同贮藏期鱼共有峰的相对保留时间和相对峰面积值

Table 1 Relative retention time and relative peak area of common peaks of fish stored in different periods

相对保留 时间(min)	样 本								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.22	0.30±0.01	0.11±0.04	0.05±0.02	0.05±0.02	0.06±0.01	0.08±0.03	0.02±0.00	0.04±0.01	0.02±0.01
0.33	0.56±0.05	0.14±0.02	0.14±0.02	0.10±0.04	0.20±0.05	0.17±0.05	0.10±0.02	0.14±0.02	0.13±0.00
0.45	0.36±0.12	0.14±0.02	0.16±0.04	0.19±0.03	0.30±0.09	0.20±0.06	0.12±0.03	0.16±0.04	0.13±0.00
0.51	0.34±0.05	0.06±0.01	0.04±0.02	0.05±0.01	0.07±0.02	0.06±0.02	0.04±0.01	0.03±0.01	0.04±0.02
0.58	0.15±0.01	0.06±0.02	0.06±0.02	0.08±0.03	0.07±0.01	0.07±0.03	0.05±0.01	0.04±0.00	0.06±0.00
0.62	0.25±0.00	0.13±0.02	0.15±0.05	0.14±0.06	0.17±0.04	0.19±0.03	0.11±0.02	0.14±0.04	0.18±0.00
0.63	0.32±0.08	0.10±0.04	0.09±0.02	0.17±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02	0.05±0.01	0.08±0.02	0.14±0.02
0.66	0.17±0.05	0.06±0.01	0.10±0.04	0.15±0.06	0.08±0.01	0.07±0.05	0.06±0.02	0.06±0.01	0.10±0.00
0.76	0.36±0.01	0.13±0.02	0.12±0.02	0.14±0.02	0.26±0.06	0.16±0.05	0.13±0.03	0.20±0.03	0.18±0.01
0.81	0.12±0.02	0.12±0.03	0.11±0.02	0.11±0.03	0.10±0.01	0.17±0.02	0.17±0.04	0.16±0.02	0.15±0.00
0.82	0.22±0.04	0.08±0.01	0.07±0.02	0.07±0.01	0.10±0.02	0.08±0.03	0.07±0.02	0.10±0.03	0.10±0.01
0.88	0.22±0.08	0.15±0.02	0.12±0.04	0.14±0.07	0.12±0.03	0.13±0.01	0.12±0.04	0.15±0.02	0.10±0.00
0.89	0.38±0.00	0.13±0.03	0.09±0.00	0.16±0.06	0.14±0.03	0.11±0.02	0.07±0.01	0.11±0.02	0.11±0.01
0.90	1.11±0.09	1.48±0.22	1.09±0.64	0.50±0.06	1.17±0.02	1.73±0.01	1.60±0.02	1.72±0.04	1.78±0.02
0.98	0.52±0.07	0.36±0.03	0.36±0.04	0.41±0.04	0.37±0.09	0.41±0.06	0.33±0.04	0.36±0.05	0.40±0.01
1.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
1.01	1.10±0.07	0.27±0.15	0.36±0.07	0.35±0.04	0.28±0.03	0.31±0.11	0.22±0.05	0.27±0.06	0.26±0.02

表 2 FCM 的分类结果
Table 2 The classification of FCM

第一类	第二类	第三类
1-1, 1-2, 1-3, 1-4	2-1, 2-2, 2-4, 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 4-1, 4-2, 4-4, 5-1, 5-2, 5-3, 5-4	2-3, 4-3, 6-1, 6-2, 6-3, 6-4, 7-1, 7-2, 7-3, 7-4, 8-1, 8-2, 8-3, 8-4, 9-1, 9-2, 9-3, 9-4

定的规律, 可视为变异峰。

3.2 FCM 结果

将上述不同新鲜度的鱼的指纹图谱特征峰原始数据采用 FCM 分析, 结果如表 2 所示。

可以看出 FCM 方法把样品分为 3 类。第一、二、三类占样本总数比例分别为 11.11%, 38.89%, 50%。第一类为第 1 天的 4 个样本, 第二类中包含有第 2~5 天的样本。第三类包括第 6~9 天的全部样本, 由于存在误差因素, 2-3, 4-3 可视为异常样本。这 3 类鱼的新鲜度对应为: 新鲜、次新鲜、腐败。这种分类结果与感官评价和实际情况基本相符, 达到分类效果。

由于受到多种因素的影响, 人工感官对鱼的新鲜度的评价很难做到十分精确, 不同的人在不同的环境中对同一条鱼新鲜度的判定有所不同。实际生活中判定的鱼新鲜度是指在某一程度上的新鲜, 而不是绝对新鲜或者不新鲜。FCM 正是利用这一原理来进行分类, 用隶属度来表示属于某个聚类程度, 将实际情况与数学方法相结合达到最佳效果。所以 FCM 的分类效果可以达到要求。

3.3 鱼新鲜度神经网络判别模型的验证结果

为验证 FCM 法聚类的结果, 建立 RBF 神经网络对鱼样本的新鲜度进行判别。

先对这 36 个样本共 612 个数据进行主成分分析, 各个主成分的贡献率结果如图 2 所示。

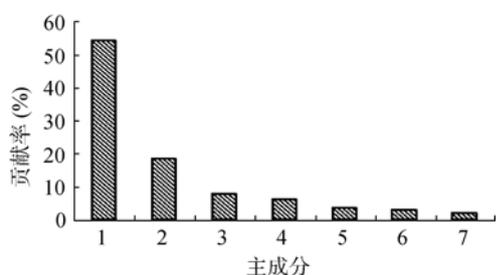


图 2 主成分分析结果

Fig. 2 The results of principal component analysis

设计合适的 RBF 神经网络模型, 考察主成分数对所建模型分类效果的影响。在 36 个样本中, 随机

选取 27 个样本作为训练集, 9 个样本作为测试集, 3 类新鲜程度作为神经网络模型的输出, 分类结果如图 3 所示。

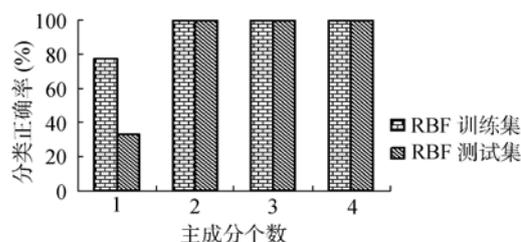


图 3 RBF 神经网络模型分类结果

Fig. 3. The classification of RBF neural network

可以看出当主成分个数 2 时, 训练集和预测集的正确分类率都达到 100%。选取前 2 个主成分作为 RBF 神经网络的输入就可以准确判断出鱼样本的新鲜度。

鱼在储藏过程中挥发性物质的种类和含量会发生很大的变化, 在储藏初期鱼保持着新鲜的状态, 有鱼特殊的香味, 气味变化很小, 相应挥发性物质含量变化少。在储藏后期, 鱼已经严重腐败, 产生的生物胺(尸胺、腐胺、组胺等)会出现并大量增加, 伴有严重恶臭气味, 这些物质的气味会完全掩盖鱼在初期所特有的香味^[14]。在 36 个总离子流色谱图样本中提取样本中共有的 17 个色谱峰作为研究对象, 选取的共有峰组成的数据变化很大, 简单的分类模型不能满足准确分类的要求。RBF 网络的优点是将低维的模式输入数据变换到高维空间内, 使得低维空间内的线性不可分的问题在高维空间内线性可分。所以从上面的结果可以看出使用 RBF 神经网络可以得到很好的结果, 同时验证了 FCM 结果。

4 结论

运用 HS-SPME-GC-MS 法对不同储藏时间鱼的挥发性成分进行检测分析, 通过建立不同贮藏时间下鱼新鲜度特征指纹图谱, 选取特征共有峰, 运用 FCM 分析。将样品按新鲜程度分为三类: 新鲜、次新鲜和腐败。建立的 RBF 神经网络模型也能较好利

用鱼挥发性物质的共有峰实现鱼新鲜度的判别。本研究是一种与传统评价鱼新鲜度不同的新方法, 为对不同新鲜级别鱼肉的评价提供了新的依据和思路。

参考文献

- [1] 彭增起, 刘承初, 邓尚贵. 水产品加工学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010.
- [2] 朱潘炜, 周建弟, 刘东红. 不同年份黄酒基酒 HS-SPME-GCMS 指纹图谱的建立[J]. 中国食品学报, 2012, 12 (2): 165-172.
- [3] 李雪琴, 黎海红, 苗笑亮. 指纹图谱相似度在芝麻油掺伪检测中的应用[J]. 食品科技, 2008, 34(3): 259-264.
- [4] 朱美施, 巫景铭, 曾玩娴. GC 指纹图谱在干邑白兰地真伪鉴别中的应用[J]. 酿酒科技, 2011, 7: 68-71.
- [5] Cirlinia M, Caligiana A, Pallab L, *et al.* HS-SPME/GC-MS and chemometrics for the classification of balsamic vinegars of modena of different maturation and ageing [J]. Food Chem, 2011, 124(4): 1678-1683.
- [6] 王霞, 宁正元, 赵艳萍. 系统聚类在土壤成分研究中的应用[J]. 福建电脑, 2006, 2: 16-17.
- [7] 王林, 吴海桥, 郑友石. 一种改进的 K 均值聚类算法[J]. 科技信息, 2010, 32: 136-137.
- [8] 孙英娟, 孙英慧, 蒲东兵. 模糊 C 均值聚类算法在识别中的应用研究[J]. 长春师范学院学报, 2010, 29(5): 13.
- [9] 丛爽. 面向 MATLAB 工具箱的神经网络理论与应用[M]. 北京: 中国科学技术大学出版社, 2008.
- [10] 谢中华. MATLAB 统计分析与应用: 40 个案例分析[M]. 北京: 北京航空航天大学出版社, 2010.
- [11] Roy A, Govil S, Miranda R. An algorithm to generate radial basis function(RBF)-like nets for classification problem [J]. Neural Networks, 1995, 8(2): 179-201.
- [12] Park J, Sandberg IW. Approximation and radial-basis-function networks [J]. Neural Comput, 1993, 5(2): 305-316.
- [13] 朱斌, 马瑜璐, 张雷, 等. 质谱法评价猪肉新鲜度[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(1): 40-44.
- [14] 张金彪, 杨筱珍, 范朋, 等. 两种常见海水鱼高温贮存过程中挥发性盐基氮和生物胺含量变化[J]. 水生生物学报, 2012, 36(2): 284-290.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



戴煌, 硕士, 研究方向: 农产品检测技术。
E-mail: daihuang1987@126.com



黄星奕, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 农产品检测技术。
E-mail: h_xingyi@163.com