

STANOVENIE ZMESNÉHO VÍNNEHO DESTILÁTU V BRANDY FLUORESCENČNOU SPEKTROMETRIOU

DIANA MARKECHOVÁ, ROMAN POLÁČEK,
PAVEL MÁJEK a JANA SÁDECKÁ

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9,
812 37 Bratislava
jana.sadecka@stuba.sk

Došlo 15.4.13, prijaté 9.5.13.

Kľúčové slová: fluorescenčná spektrometria, viacrozmerná analýza, potravinárska analýza

Úvod

Vínne brandy je liehovina vyrobená z vínovice zmiešanej alebo nezmiešanej s destilátom z vína, ktorá musí vyzrieť určitú dobu v sude z dubového dreva. V procese vyzrievania sa z dubového dreva do liehoviny extrahujú rôzne zložky a vznikajú ďalšie zlúčeniny, ktoré dodávajú brandy charakteristickú farbu, chuť a vôňu^{1,2}. Zmesné víne destiláty sa vyrábajú z vínného destilátu zriadeného etanolom z iných zdrojov, do ktorého sa pridáva brandy bonifikátor, cukor, karamel (E 150a), extrakt z orechov, koreniny, med a iné. Z uvedeného vyplýva rozdiel v kvalite jednotlivých výrobkov ako aj možnosť falšovania brandy prídavkom vínného destilátu.

Cieľom tejto práce bolo navrhnúť metódu na stanovenie vínného destilátu v zmesi vínný destilát-brandy s využitím fluorescenčnej spektrometrie v spojení s analýzou viacrozmerných dát³. Na rozklad excitačno-emisných spektier sa použila paralelná faktorová analýza (PARAFAC) a na vlastné stanovenie klasická metóda najmenších štvorcov, metóda čiastočne najmenších štvorcov (PLS) a viacnásobná lineárna regresia (MLR)^{3–8}. Porovnali sa výsledky získané spracovaním spektier nameraných v klasickom kolmom usporiadaní a z povrchu.

Experimentálna časť

Vzorky a roztoky

V práci sa použili 2 vzorky brandy od 2 slovenských producentov a 5 vzoriek vínných destilátov od 5 slovenských producentov zakúpených v maloobchodných predajniach. Vzorky sa analyzovali bez úpravy. Na kalibráciu sa použila séria 21 roztokov pripravených zmie-

šaním brandy a vínného destilátu, pričom objemový podiel destilátu bol 0–100 % (interval 5 %). Na overenie predikcie modelu sa použila séria 10 roztokov pripravených zmiešaním brandy a vínného destilátu, pričom objemový podiel destilátu bol 7–97 % (interval 10 %).

Prístroje a programy

Na meranie emisných fluorescenčných spektier sa použil Perkin-Elmer LS 50 Luminescence spektrometer s Xe lampou. Šírka štrbiny excitačného a emisného monochromátora bola 5 nm, rýchlosť skenovania 200 nm min⁻¹. Použila sa kremenná kvjeta rozmerov 10 mm × 10 mm × 45 mm. V klasickom kolmom usporiadaní (90°) sa fluorescenčné spektrá merali v rozsahu emisných vlnových dĺžok $\lambda_{em} = 485–580$ nm (interval 1 nm) a excitačných vlnových dĺžok $\lambda_{ex} = 363–475$ nm (interval 2 nm), čím sa získalo 96 bodov v oblasti emisie a 57 bodov v oblasti excitácie. Pri meraní fluorescencie z povrchu (56°) sa použil rozsah $\lambda_{em} = 450–545$ nm (interval 1 nm, 96 bodov) a $\lambda_{ex} = 328–440$ nm (interval 2 nm, 57 bodov). Spektrometer bol spojený s počítačom; na zber údajov a následné spracovanie spektier sa použil FL Data Manager Software (Perkin-Elmer). Z nameraných spektier sa pre každú vzorku vytvorila excitačno-emisná dátová matica (EEM). Súbor matic sa upravil a spracoval programami Microsoft Office Excel 2003, Statistica version 7.0 (StatSoft, USA, 2004), MATLAB version 7.0 (The MathWorks Inc., USA, 2005) a PLS Toolbox version 6.0 (Eigenvector Research Inc., USA, 2010). Podrobné informácie o PARAFAC, PLS, MLR a charakteristikách využitých v tejto práci možno nájsť v odbornej literatúre^{3–8}.

Výsledky a diskusia

V úvodnej časti práce sa namerali EEM fluorescenčné spektrá vzoriek brandy a vínných destilátov v intervale $\lambda_{ex} = 200–500$ nm a $\lambda_{em} = 250–700$ nm. Na základe spektier sa vybral rozsah excitačných a emisných vlnových dĺžok použitých pre kvantitatívnu analýzu tak, aby pokryl čo najlepšie interval fluorescencie nápojov, neobsahoval Rayleighov a Ramanov rozptyl a získal sa rovnaký počet dát v oboch oblastiach vlnových dĺžok pre obidve techniky merania fluorescencie⁹.

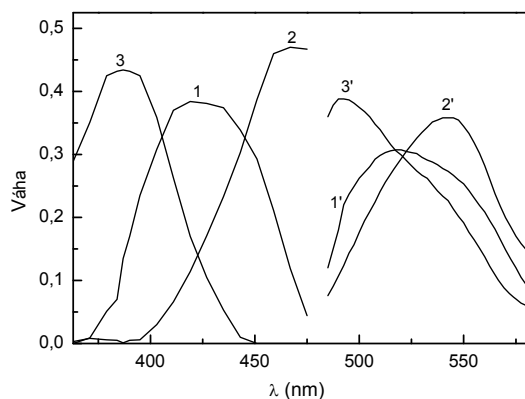
V prvej časti práce sa na prípravu kalibračnej a predikčnej série použil jeden druh brandy (B₁) a jeden druh destilátu. Zo spektier nameraných pre jednotlivé kalibračné roztoky sa vytvorili matice rozmerov 96 × 57 (počet λ_{em} × počet λ_{ex}), z matic sa vytvorilo pole s rozmermi 21 × 96 × 57 (počet kalibračných roztokov × počet λ_{em} × počet λ_{ex}), ktoré sa potom použilo ako vstup do PARAFAC. Model sa počítal pre rôzny počet faktorov (1–4) a s ohraničením hodnôt skóre a váh na kladné hodnoty, keďže intenzita fluorescencie a koncentrácia sú kladné čísla. Výsledky ukázali, že trojfaktorový model je optimálny, pričom všetky tri algoritmy

Tabuľka I

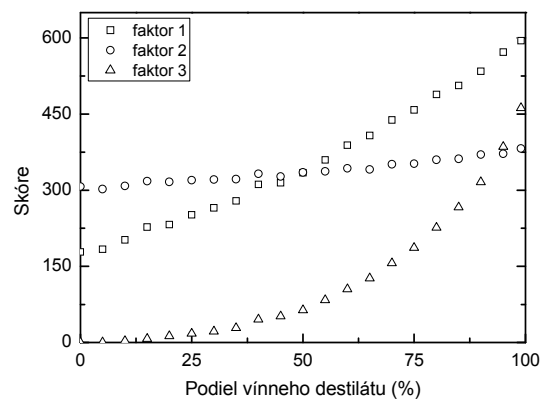
Porovnanie algoritmov na výpočet trojfaktorového PARAFAC modelu pre dve geometrické usporiadania, na prípravu roztokov sa použil jeden druh brandy (B₁) a destilátu

Algoritmus	Kolmé meranie		Meranie z povrchu	
	core consistency [%]	vysvetlený rozptyl [%]	core consistency [%]	vysvetlený rozptyl [%]
ALS	98,521	99,738	98,678	99,743
SWATLD	98,523	99,738	98,676	99,743
TLD	98,522	99,738	98,676	99,743

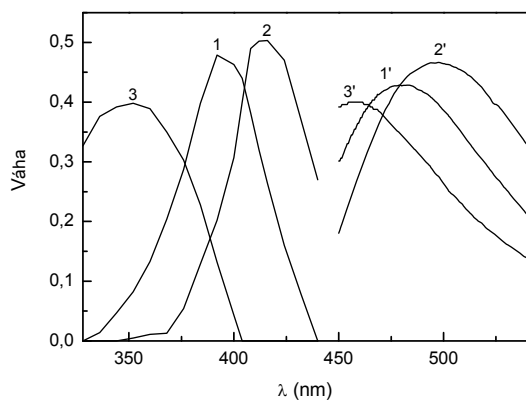
a



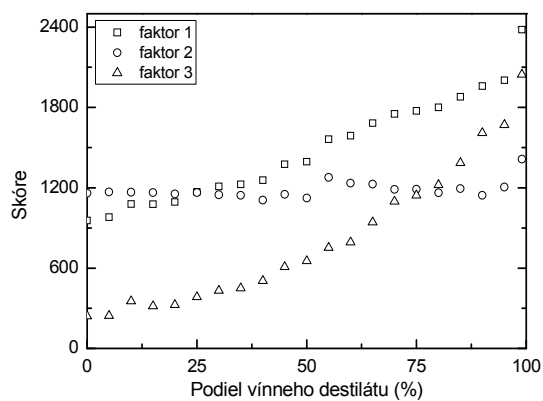
b



c



d



Obr. 1. Trojfaktorový PARAFAC model pre kalibráciu; a – excitačné (1,2,3) a emisné (1',2',3') váhy, kolmé meranie; b – skóre, kolmé meranie; c – excitačné (1,2,3) a emisné (1',2',3') váhy, meranie z povrchu; d – skóre, meranie z povrchu; na prípravu roztokov sa použil jeden druh brandy a destilátu

(ALS, SWATLD, TLD) poskytujú veľmi dobré a takmer rovnaké výsledky (tab. I). V nasledujúcom texte sú uvedené výsledky získané použitím algoritmu TLD. Výsledkom modelovania sú excitačné a emisné spektrálne profily

(váhy) (obr. 1a a obr. 1c) a hodnoty skóre faktorov pre jednotlivé kalibračné roztoky. Z obr. 1b a obr. 1d je zrejmé, že hodnoty skóre faktorov 1 a 3 závisia od množstva destilátu v zmesi destilát-brandy, preto sa na kvantitatívnu

Tabuľka II

Porovnanie strednej kvadratickej chyby a koeficientu determinácie kalibrácie a predikcie v lineárnej regresii (LR), PLS a MLR pre dve geometrické usporiadania, na prípravu roztokov sa použil jeden druh brandy (B_1) a destilátu

Parameter ^a	Kolmé meranie			Meranie z povrchu		
	LR	PLS	MLR	LR	PLS	MLR
Faktor	1	1 a 3	1 a 3	1	1 a 3	1 a 3
RMSEC	3,8	1,8	1,8	7,7	2,4	2,5
$R^2(\text{cal})$	0,984	0,996	0,996	0,982	0,987	0,987
RMSEP	3,3	1,3	1,4	7,4	2,2	2,3
$R^2(\text{pred})$	0,986	0,997	0,998	0,984	0,993	0,993

^a RMSEC – stredná kvadratická chyba kalibrácie; $R^2(\text{cal})$ – koeficient determinácie v kalibrácii; RMSEP – stredná kvadratická chyba predikcie; $R^2(\text{pred})$ – koeficient determinácie v predikcii

analýzu použili: a) skóre faktora 1 a na kalibráciu klasická metóda najmenších štvorcov, b) skóre faktorov 1 a 3 v kombinácii s PLS a c) skóre faktorov 1 a 3 v kombinácii s MLR.

Ako prvý sa vytvoril PLS model^{5,6}, v ktorom hodnoty faktorového skóre získané z PARAFAC boli prediktory kalibračnej závislosti a objemové podiely destilátu (%) v zmesi destilát-brandy boli regresory (závislé premenné). PLS model sa vytvoril v PLS1 móde (PLS sa počíta pre každý komponent osobitne) použitím kalibračnej matice skóre 21×2 (počet kalibračných roztokov \times počet faktorov). Pri konštrukcii PLS1 modelu sa prediktory štandardizovali autoškálovaním s rozdelením $N(0,1)$.

PLS tiež vyžaduje správny výber počtu komponentov, ktoré majú byť zahrnuté do modelu. V práci sa použila krížová validácia (leave-one-out cross-validation)⁶, z ktorej vyplynul optimálny počet komponentov 2. Následne sa s týmto počtom komponentov a použitím všetkých kalibračných vzoriek vytvoril výsledný PLS kalibračný model. Charakteristiky modelu⁷ – počet komponentov, stredná kvadratická chyba kalibrácie (RMSEC) a koeficient determinácie pre kalibráciu ($R^2(\text{cal})$) – sú uvedené v tab. II. Potom sa PLS model použil na predikciu množstva destilátu v brandy takto – zo spektier nameraných pre jednotlivé predikčné roztoky sa vytvorili matice rozmerov 96×57 (počet λ_{em} \times počet λ_{ex}), z matíc sa vytvorilo pole s rozmermi $10 \times 96 \times 57$ (počet roztokov \times počet λ_{em} \times počet λ_{ex}), ktoré sa použilo ako vstup do PARAFAC modelu vytvoreného z kalibračnej série (spektrálne profily faktorov sú rovnaké). Výsledkom výpo-

čtu sú hodnoty predikčných skóre jednotlivých faktorov. Matica predikčných skóre s rozmermi 10×2 (počet roztokov \times počet faktorov) a PLS model vytvorený v kalibrácii sa použili na predikciu množstva vínneho destilátu. Výsledné predikčné charakteristiky⁵ – stredná kvadratická chyba predikcie (RMSEP) a koeficient determinácie pre predikciu ($R^2(\text{pred})$) – sú uvedené v tab. II. Malé hodnoty RMSEC a RMSEP a koeficienty determinácie R^2 blízke 1 naznačujú vhodnosť PLS modelov pre stanovenie destilátu v brandy, pričom lepšie charakteristiky modelu sa dosiahli pre kolmé usporiadanie.

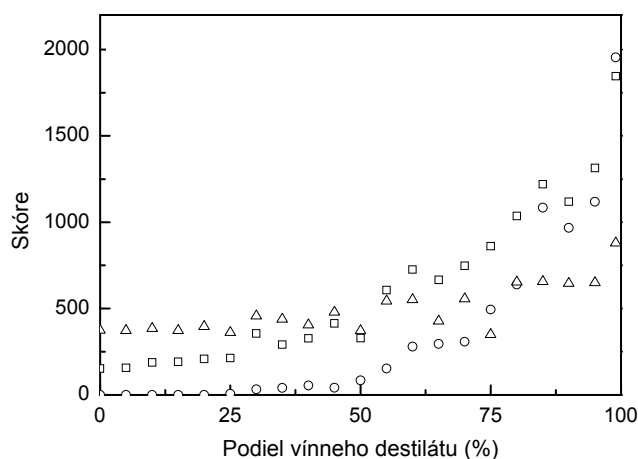
Podobne sa vytvoril a využil aj MLR model⁸. Faktorové skóre z modelov PARAFAC boli prediktory kalibračnej závislosti a objemové podiely destilátu (%) v brandy boli regresory. V tab. II sú porovnané výsledky z PLS a MLR na základe RMSEC, $R^2(\text{cal})$, RMSEP a $R^2(\text{pred})$, z ktorých vyplýva, že obidve regresie poskytujú takmer zhodné výsledky, pričom kolmé meranie fluorescencie umožňuje lepšiu kalibráciu aj predikciu. Veľmi dobré výsledky sa dosiahli aj využitím jednoduchej lineárnej regresie skóre faktora 1 pre kolmé meranie. Tento spôsob vyhodnotenia umožnil stanoviť 3,3 % destilátu v zmesi destilát-brandy. Predikcia je o niečo horšia ako pri viacrozmernej kalibrácii, ale výsledky sú stále uspokojivé.

Prieskumná analýza 16 vzoriek brandy a 30 vzoriek destilátov ukázala značnú podobnosť vzoriek brandy, ale významné rozdiely v destilátoch⁹. V reálnej situácii je k dispozícii vzorka brandy, ale ťažko možno odhadnúť, ktorý z destilátov použiť na kalibráciu. Cieľom druhej časti práce bolo preto zistiť vplyv druhu brandy a destilátu

Tabuľka III

Porovnanie trojfaktorového PARAFAC modelu pre dva druhy brandy a kolmé meranie

	Brandy B_1		Brandy B_2	
	core consistency [%]	vysvetlený rozptyl [%]	core consistency [%]	vysvetlený rozptyl [%]
Kalibrácia	86,12	99,95	88,35	99,97
Predikcia	85,78	99,88	86,15	99,84



Obr. 2. Faktorové skóre PARAFAC modelu pre kalibráciu; kolmé meranie, na prípravu roztokov sa použil jeden druh brandy a päť druhov destilátů; □ faktor 1, ○ faktor 2, Δ faktor 3

Tabuľka IV

Porovnanie strednej kvadratickej chyby a koeficientu determinácie kalibrácie a predikcie v PLS a MLR pre kolmé meranie, na prípravu roztokov sa použili dva druhy brandy a päť druhov destilátů

Parameter ^a	Brandy B ₁			Brandy B ₂		
	PLS	MLR	MLR	PLS	MLR	MLR
Faktor	1-3	1-3	1 a 2	1-3	1-3	1 a 3
RMSEC	8,1	8,3	9,7	10,3	10,2	11,1
R ² (cal)	0,805	0,802	0,802	0,814	0,812	0,786
RMSEP	8,1	8,4	9,8	8,9	9,1	10,0
R ² (pred)	0,804	0,803	0,800	0,803	0,802	0,795

^a RMSEC – stredná kvadratická chyba kalibrácie; R²(cal) – koeficient determinácie v kalibrácii; RMSEP – stredná kvadratická chyba predikcie; R²(pred) – koeficient determinácie v predikcii

na kalibráciu a predikciu. Na prípravu kalibračnej a predikčnej série sa použil: a) jeden druh brandy (B₁) a päť rôznych náhodne vybraných destilátů a b) iné brandy (B₂) a päť destilátů z časti (a) v rovnakom poradí. Namerali sa excitačno-emisné spektrá v kolmom usporiadaní, ktoré sa v predchádzajúcej časti ukázalo ako výhodnejšie, a zopakoval sa vyššie uvedený postup výpočtov. Výsledky z PARAFAC ukázali, že trojfaktorový model je optimálny (tab. III). Hodnoty skóre všetkých troch faktorov závisia od množstva destilátu v zmesi destilát-brandy (obr. 2), preto sa na kvantitatívnu analýzu použili skóre faktorov 1, 2 a 3 v kombinácii s PLS alebo MLR. Výsledky sú uvedené v tab. IV. Aj v tomto prípade poskytuje MLR a PLS takmer rovnaké výsledky. Chyba kalibrácie aj predikcie je väčšia v porovnaní s výsledkami pre brandy B₁ v tab. II a tento nárast je spôsobený hlavne variabilitou destilátů, čo vyplýva z malých rozdielov pre brandy B₁ a B₂ (tab. IV). Celkovo tento spôsob vyhodnotenia umož-

nil stanoviť 9 % destilátu v zmesi destilát-brandy. Ak sa na kalibráciu a predikciu použijú hodnoty skóre len dvoch významnejších faktorov, chyba sa zvýši asi o 1 %.

Záver

Excitačno-emisná fluorescenčná spektrometria v spojení s PARAFAC-PLS alebo PARAFAC-MLR je zaujímavou alternatívou umožňujúcou simultánne stanovenie zložiek, ktorých spektrá sa značne prekrývajú. Ak sa použijú spektrá namerané v klasickom kolmom usporiadaní, navrhnutý postup umožňuje stanoviť 9–10 % vínneho destilátu v zmesi destilát-brandy, pričom výsledky z PLS a MLR sa významne neodlišujú. Výhodou je nízka cena, nie je potrebná úprava vzorky a neprodukuje sa iný odpad než vzorka.

Táto práca bola podporovaná Programom na podporu mladých výskumných pracovníkov STU v Bratislave.

LITERATÚRA

1. Regulation (EC) No 110/2008 of the European Parliament and of the Council of 15 January 2008 on the definition, description, presentation, labelling and the protection of geographical indications of spirit drinks and repealing Council Regulation (EEC) No 1576/89: Official J. Eur. Union 51, 16 (2008).
2. Mosedale J. R., Puech J. L.: Trends Food Sci. Technol. 9, 95 (1998).
3. Andersson C. A., Bro R.: Chemom. Intell. Lab. Syst. 52, 1 (2000).
4. Bro R.: Chemom. Intell. Lab. Syst. 38, 149 (1997).
5. Surribas A., Amigo J. M., Coello J., Montesinos J. L., Valero F., MasPOCH S.: Anal. Bioanal. Chem. 385, 1281 (2006).
6. Wold S., Sjostrom M., Eriksson L.: Chemom. Intell. Lab. Syst. 58, 109 (2001).
7. Čurda L., Kukačková O., Novotný M.: Chem. Listy 96, 305 (2002).
8. Pires J. C. M., Martins F. G., Sousa S. I. V., Alvim-Ferraz M. C. M., Pereira M. C.: Environ. Modell. Softw. 23, 50 (2008).
9. Markechová D., Uričková V., Májek P., Sádecká J.: Chem. Listy 108, 233 (2014).

D. Markechová, R. Poláček, P. Májek, and J. Sádecká (*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Determination of Mixed Spirits in Brandy by Fluorescence Spectrometry**

The determination has been carried out using excitation-emission matrix fluorescence along with parallel factor analysis (PARAFAC), partial least-squares regression (PLS) and multiple linear regression (MLR). Calibration models consisting of varying spirit composition and brandy were constructed and their accuracy was evaluated through the root-mean-square error of prediction (RMSEP). PLS was a better method compared with MLR due to its lower RMSEP values. The right-angle cell geometry of fluorescence measurements yielded better results than the front-face technique.