一种可视化快速鉴别白酒的新方法研究

霍丹群¹, 宋春霞¹, 李俊杰¹, 汪治宏¹, 李永娇¹, 周军^{1, 2}, 刘世龙^{1, 2}, 侯长军¹ (1. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

(2. 国家固态酿造工程技术研究中心, 泸州老窖股份有限公司, 四川泸州 646000)

摘要: 白酒主体香味成分的含量和比例,是白酒香型风格的"构成要素"。针对白酒的主体香味成分,选择筛选出特异性敏感元件 20 种,构建 5×4 比色传感阵列芯片,建立了一种可视化快速鉴别白酒新方法。新阵列芯片检测性能明显优于已报道的通用阵列,可精确识别出不同风味白酒,且能反映出不同白酒中主体香味成分的差异。对 15 种白酒进行检测,主成分分析结果表明,前三个主成分对识别的贡献率依次为酯、醛、缩醛类物质 (34.5%),酸类物质 (19.2%)和乙醇 (11.9%)。聚类分析发现同一品牌的白酒能正确归类,不同品牌同种香型白酒能率先聚为一类。各白酒间的相似性和差异性在聚类图上有较好的体现,不同香型白酒间的距离远近与白酒的生产原料、糖化发酵剂、酿造工艺密切相关。

关键词: 白酒; 香味成分; 比色传感阵列芯片; 主成分分析; 聚类分析 文章篇号: 1673-9078(2014)5-267-272

Development of a Colorimetric Sensor Array for Rapid Discrimination of

Chinese Liquors

HUO Dan-qun¹, SONG Chun-xia¹, LI Jun-jie¹, WANG Zhi-hong¹, LI Yong-jiao¹, ZHOU Jun^{1,2}, LIU Shi-long^{1,2}, HOU Chang-jun¹

(1.College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

(2.National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou Laojiao Group Co.Ltd, Luzhou 646000, China)

Abstract: The constitution of main flavor components resulted in different types of Chinese liquors. Focused on the main flavor components, a new 5×4 colorimetric sensor array was constructed to differentiate 15 different liquor samples after selective screening of 20 specific sensitive materials. The new sensor showed good accuracy to discriminate all liquor samples which was closely related to the main flavor components in the liquors. Data analysis was performed by principal component analysis (PCA), which suggested that the contribution rate of the main flavor components followed a descending order of esters and aldehydes (34.5%), acids (19.2%) and alcohols (11.9%). Further Hierarchical cluster analysis (HCA) elucidated that analogous liquors sample were correctly classified into one group, and those of the same type from different brands lay closer and were more easier to be clustered. Besides, the clusters indicated good accordance to the similarity of the main flavor components in the liquor, and the distance of different clusters indicated a close relationship between the liquors and raw materials, diastatic fermented agent and brewing process.

Key words: liquor; volatile composition; colorimetric sensor array; principal component analysis; Hierarchical cluster analysis

白酒主体香味成分的含量和比例形成了白酒的不同香型^[1-2],如浓香型、酱香型、清香型、凤香型等。 传统的白酒检测主要依赖品酒师品评,其可靠性易受 收稿日期: 2013-12-19 基金项目:国家自然科学基金 (30770568: 31171684);四川省科技支撑计

划(2013FZ0043;2010NZ0093); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金(NJ2011–03)并受到重庆大学大型仪器设备开放基金资助

作者简介:霍丹群(1965–),女,教授,博士生导师,研究方向:生化传感 器,酒饮料检测

通讯作者:侯长军(1963-),男,教授,博士生导师,研究方向:化学传感 器 品酒师自身因素的影响,存在主观偏见性。大型仪器 检测方法例如三维荧光光谱技术法^[3]、气相色谱法^[4]、 质谱法^[5]、气质色谱-质谱联用法^[6]等通过对白酒中的 微量成分定性、定量的分析亦可用于评定白酒风味, 但费用较高、操作复杂,不适合快速、实时检测。近 年来,电子鼻^[7]、电子舌^[8]等无损检测技术在白酒鉴别 中也发挥着越来越重要的作用,为了提升此类检测方 法对白酒鉴定的可靠度和实用度,提高传感器的特异 性和选择性是关键。以卟啉及其衍生物等敏感材料制 作而成的可视化阵列传感器识别能力强,成本低廉, 检测结果直观,操作简便,在酒饮料检测方面蕴藏着

巨大的潜力。

已报道的可视化阵列传感器多为具有广普响应性 质的仿生传感芯片,通过敏感单元与待测样品反应后 发生不同程度的光谱变化,实现特定组分的定性、定 量识别^[9]。虽然其适用性广,但专一性与特异性的缺 失导致了其在实际检测中易受多种干扰因素影响。另 外,由于敏感材料的筛选主要依赖于紫外、荧光分光 光度计等大型仪器,提高了试验成本,也影响了所筛 选材料的实用性^[10-11]。在白酒检测方面,尽管可以实 现不同白酒样品的区分,但只是对白酒中可挥发香气 成分的一个整体响应,不能反应各种风味酒品独特的 主干成分,无法实现个性化、专一性识别,或者需要 与大型仪器联用,无法实现实时、现场分析^[12]。本研 究针对实际白酒样品鉴别,旨在为白酒香型的快速检 测提供了一种简便、直观、高效的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.2 试验方法

1.2.1 传感阵列的构建

针对白酒主体风味化合物,分别筛选出对每一类物质有光谱响应的敏感材料,用毛细管取 1 μL 敏感材料溶液固定在永久亲水聚偏氟乙烯(PVDF)超过滤 膜上,50 ℃干燥 24 小时即制成 5×4 的传感阵列芯片(图 1a),阵列芯片上每一个圆点都代表一种敏感元件,从第一排左起向右依次为 S1、S2、S3……S18、S19、S20。S1~S20 的组成见表 2。

表 2 比色传感阵列芯片对应的敏感材料

Table 2 The responsive components of corresponding sensor

dot			
编号	传感物质		
S1	曙红 Y+盐酸		
S2	茜素+过硫酸钾		
S 3	硝酸铈铵		
S4	亚甲基蓝+硫酸		
S5	溴甲酚绿+甲基红+高锰酸钾+硫酸		
S6	中性红+氢氧化钠		
S 7	中性红+溴百里香芬蓝+氢氧化钠		
S 8	酚酞+百里酚蓝+氢氧化钠		
S9	刚果红		
S10	刚果红+溴酚蓝		
S 11	溴酚蓝		
S12	2,4-二硝基苯肼+浓硫酸+溴二甲苯芬蓝		
S13	2,4-二硝基苯肼+浓硫酸+尼罗红		
S14	2,4-二硝基苯肼+浓硫酸+茜素		
S15	2,4-二硝基苯肼+浓硫酸+靛蓝胭脂红		
S16	2,4-二硝基苯肼+浓硫酸+甲苯胺蓝 O		
S17	2,4-二硝基苯肼+浓硫酸+原卟啉		
S18	2,4-二硝基苯肼+浓硫酸+铟卟啉		
S19	2,4-二硝基苯肼+浓硫酸+铁无氟四苯基卟啉		
S20	2、4-二硝基苯肼+浓硫酸+锌卟啉		

1.2.2 检测方法

采用传感阵列芯片(图 2a)和检测系统(图 2b) 进行检测,检测步骤为:采集芯片反应前的图谱,将 芯片置于干燥培养皿中。取待测白酒样品 5 ml 加入超 声雾化器,选择中档雾量,时间设置为 10 秒,使白酒 成为细微的气雾,均匀喷洒于芯片上。用保鲜膜封住 培养皿,放入微波炉中(400 W 功率,60 ℃)处理 2 min,处理后的芯片再次采集图像。对反应前后的图 谱作标准化处理,得到白酒反应前后的芯片差谱图, 并得到阵列上每个点的 RGB 特征值,每种白酒重复 5

衣 15 种何测口沿			
品牌	洒粘度(V/V)	香刑	
国窖 1573	52%	浓香	
泸州老窖特曲	52%	浓香	
汾酒	53%	清香	
玉林泉酒	50%	清香	
茅台	53%	酱香	
郎酒	53%	酱香	
湘山酒	50.8%	米香	
桂林山花酒	-53%	米香	
西凤酒	50%	凤香	
景芝白干	49%	芝麻香	
白云边	42%	浓酱兼	
董酒	45%	药香	
衡水老白干	67%	老白干	
玉冰烧酒	29%	豉香	
四特酒	45%	特香	

曙红 Y、硝酸铈铵、过硫酸钾、2,4-二硝基苯肼、 中性红,阿拉丁试剂有限公司;卟啉类化合物、其余 染料,Sigma-Aldrich 公司;硫酸、盐酸、氢氧化钠, 川东化工有限公司;PHS-3CpH 仪,上海精科仪器设 备有限公司;永久亲水聚偏氟乙烯(PVDF)超过滤 膜,上海名列化工科技有限公司;100 mm×0.3 mm (i.d.)点样毛细管,华西医科大学仪器厂;超声雾化 器,上海鱼跃医疗设备有限公司;微波炉,美的集团;。 **Modern Food Science and Technology**



图 「 (a) LE1を感性列头物图, (b) 極測系统原理图 Fig.1 (a) Real figure of the sensor array; (b) schematic illustration of the detection system

2 结果与讨论

2.1 敏感材料与酒中主体香味物的响应

要构建针对不同风味白酒的检测阵列传感器,筛 选出对白酒主体成分具有特异性响应的敏感物质是关 键。据文献报道,白酒主体香味成分主要包括酸、醛、 缩醛、醇、酯^[13]。有鉴于此,本研究针对白酒中已报 道的各类主体香味物质分别筛选特异敏感材料,构建 新阵列以实现白酒风味的个性化鉴别。

白酒中的第一类主体成分为醇,主要包括乙醇合同其它醇。其中,乙醇可以与曙红在酸性条件下形成的曙红内酯反应生成橙色物质,还可以抑制过硫酸钾与茜素能发生退色的作用。因此,S1、S2这两种敏感单元可以实现乙醇成分的比色检测。含10个碳原子以下的醇和硝酸铈铵作用可生成红色或橙色的络合物,同时也易与硫酸发生酯化反应,消耗的硫酸和生成的水使亚甲基蓝颜色改变。此外,酸性高锰酸钾有极强的氧化性,氧化醇类物质生成相应的有机酸导致溴甲酚绿与甲基红混合指示剂产生显著的颜色变化,因此,S3、S4、S5可以作为醇类识别的特异性敏感材料。S1、S2与乙醇的响应差谱图见图 2a(图 2a 阵列上第一、二行的三个敏感点分别为 S1、S2),S3、S4、S5 与其余醇的响应差谱图见图 2b(图 2b 阵列上第一、二、三行的三个敏感点分别为 S3、S4、S5)。





20mg/100mL 40mg/100mL 60mg/100mL 80mg/100mL 100mg/100mL 图 2 (a) S1-S2 与乙醇的响应差谱图; (b) S3-S5 对醇类物质 的响应差谱图; (c) S6-S8 对酯类物质的响应差谱图; (d) S9-S11 与 15 种白酒中酸的响应差谱图; (e) S12-20 与不同浓度的醛、 缩醛的响应差谱图

Fig.2 (a) Feature images of ethanol with S1~S2; (b) Feature images of alcohol with S3~S5; (c) Feature images of ester with S6~S8; (d)Feature images of the acid in 15 liquors with S9~S11;

(e) Feature images of aldehyde and acetal with S12~S20

酯类物质是白酒芳香风味的主要来源。在微波作 用下,酯与过量碱的皂化反应即使在温度较低的情况 下也能快速完成。NaOH 催化与酯类物质在微波作用 下会发生皂化反应,所引发的 pH 变化会引起酸碱指 示剂发生不同程度的改变颜色,从而实现酯类的间接

得到各白

监测,因此,S6、S7、S8可以作为酯类识别的特异性 敏感材料。S6、S7、S8与酯类物质的响应差谱图见图 2c(图 2c阵列上第一、二、三行的三个敏感点分别为 S6、S7、S8)。

酸是白酒的主干成分之一,pH 仪检测 15 种待测 白酒的pH 介于 3.4~4.5 之间。前期预实验发现刚果红、 溴酚 蓝、刚果红 与 溴酚 蓝 混合 指示剂 与 pH 介于 3.4~4.5 的酸性溶液接触后颜色产生明显变化,因此 S9、S10、S11 可作为白酒中酸类物质检测的敏感材料。 S9、S10、S11 与 15 中白酒中酸类物质的响应差谱图 见图 2d (图 2d 阵列上第一、二、三行的三个敏感点 分别为 S9、S10、S11)。

此外,白酒中的醛类和缩醛类也是白酒风味的主体成分。由于醛类可以与2,4-二硝基苯肼(DNPH)反应生成2,4-二硝苯腙和水,改变了体系的pH,使得可引发特定染料显色变化^[13-16],乙缩醛在酸性条件下分解生成的醛也进行上述反应,用DNPH与不同浓度的染料和卟啉按最佳比例混合,可作为传感阵列上的醛、缩醛类特异性敏感单元,S12~S20与不同浓度醛和缩醛的响应差谱图见图2e(图2e阵列上9个敏感点从第一行左起按S12~S20依次排序)。

按1.2.2 的方法对15种白酒进行检测,

2.2 白酒的指纹图谱



观察白酒的差谱图发现,酒精度相同的白酒在 S1、S2上的颜色相同,说明S1、S2对酒精度的区分 良好。同种香型白酒的指纹图谱具有相似性,而不同 香型白酒的指纹图谱差异较大,原因在于同种香型白 酒在一些主体风味化合物的种类和含量上有共性。郎 酒和茅台的差图谱的相似性主要表现在S1~S8,可以 推断除酒精度相同外,茅台和郎酒酸类物质和酯类物 质的组成相似性较高,S11~S20差异显著,表明酱香 型白酒中的醛类和缩醛类物质在不同品牌中具有特异性。

2.3 主成分分析

对 75 组实验数据进行主成分分析,结果显示前 3 个主成分代表了 60 维 RGB 总信息量的 67.6%,前 8 个主成分能代表原始数据 91%的信息。分析各传感点 原始变量在主成分上的载荷可以得到各传感点对主成 分的贡献(表 3)。





Fig.4 (a) Score plots of PC1 and PC2 for the analysis of 15 different liquors; (b) Score plots of PC1 and PC3 for the analysis of 15 different e liquors

在第一主成分上,敏感单元贡献最大的是 S6~S8, 其次是 S12~S20。由此推断第一主成分主要是对酯类 物质和醛、缩醛类物质的识别。第二主成分上载荷值 最大的是 S9~S11,推断第二主成分主要对酸进行识 别。第三主成分上 S1~S2 的载荷值最高,推断第三主 成分主要对酒精度进行识别。观察二维得分图(图9a) 可知,15种白酒在第一主成分上的投影顺序与酒中主 要酯类物质的种类和含量相关,主体酯类物质相似的 白酒位置靠近。此外,衡水老白干、湘山酒、桂林三 花酒中醛类物质和缩醛类物资含量较低,但汾酒、玉 林泉酒属清香型酒,醛类物质含量高于米香型白酒, 茅台、郎酒和景芝白干中含有较高的异物醛和糠醛, 表明了第一主成分同时也对醛类物质进行识别。

白酒在第二主成分上的投影顺序为:董酒、四特 酒、郎酒、茅台、汾酒、玉林泉酒、白云边、衡水老 白干、老窖特曲、1573、湘山酒、桂林山花酒、景芝 白干、玉冰烧、西凤酒,基本符合总酸度从高到低的 趋势,再次验证第二主成分是基于对酸的识别。

白酒在第三主成分上投影的顺序为:衡水老白干; (汾酒,郎酒,茅台、桂林山花);(1573、老窖特曲); (湘山酒、玉林泉酒、西凤酒、景芝白干);(董酒、 四特酒);白云边;玉冰烧,基本符合酒精度从高到低 的趋势,说明第三主成分是基于酒精含量识别的推断。

2.4 聚类分析

观察聚类图发现,同一品牌白酒能正确归类,同 种香型的白酒在聚类图上率先聚为一类。不同香型酒 之间,清香型和凤香型白酒较先聚为一类,两种酒都 是以高粱为原料、以大麦和豌豆大曲为糖化发酵剂。 药香型的董酒大小曲并用,曲药中含有近百种中药成 分,但该酒原料为高粱,且大曲中含有大麦,在聚类 图上与清香型和凤香型白酒距离也较近。衡水老白干 和白云边也是以高粱为原料,衡水老白干用的是小麦 中温大曲,白云边是浓酱兼香型代表酒,采用小麦高 温大曲,两种酒在聚类图上的位置既能体现出原料上 与前三种香型酒的共同之处,也能体现出曲药上的差 异。四特酒与玉冰烧都是以大米为原料,能较先与米 香型白酒聚为一类。景芝白干是芝麻香型的典型代表, 以高粱和麦麸为原料,在聚类图上占据着一个特殊的 位置,介于以大米为原料和以高粱为原料风味酒品之 间。1573 和老窖特曲以高粱、大米、糯米、小麦、玉 米为原料,以大麦、小麦、豌豆制曲,复杂的原料和 曲药使得浓香型白酒与其他酒相距较远。酱香型虽然 是以高粱单粮为原料,以小麦为曲,但曲药量高于其 他所有香型,且制作工艺、生产周期和贮存期较其他 香型酒都更长。这导致酱香型白酒酸高酯低,糠醛、 异戊醛、正丙醇等物质含量较高,在聚类图上独成一 簇。以上分析可知,不同白酒在聚类分析结果与白酒 的生产原料、糖化发酵剂、发酵工艺的差异有着紧密 联系。



图 5 实验样本聚类树图

Fig.5 Dendrogram of all samples data

注: 1~5-四特酒; 6~10-玉冰烧; 11~15-湘山酒; 16~20-桂 林山花酒; 21~25-景芝白干; 26~30-白云边; 31~35-衡水老白干; 36~40-董酒; 41~45-西凤酒; 46~50-汾酒; 51~55-玉林泉酒; 55~60-老窖特曲; 61~65-1573; 66~70-茅台; 71~75-郎酒。

2.5 与通用阵列检测效果比较研究





Fig.6 (a) Feature images of five different aromatic Chinese liquors with new colorimetric sensor array; (b)Feature images of five different aromatic Chinese liquors with primary

colorimetric sensor array





为考察新阵列的检测效果,将新阵列与已报道的 通用阵列^[17]进行对比研究。以五大香型白酒的检测结 果为例,新阵列(图 6a)和通用阵列(图 6b)与白酒

现代食品科技

反应后的响应强度如图 7。图 7 显示,新阵列的响应强 度高于通用阵列,且不同白酒间响应强度的差异更显 著,平行样的稳定性更好。图 6b 可直观显示出,通用 阵列上只有 6~12 个敏感点能与白酒产生响应,差谱图 颜色相似,比色检测效果不明显。观察图 6a 发现,新 阵列上每个敏感单元都能与白酒产生响应,反应灵敏。 从反应时间看,白酒与通用阵列的作用时间为 25 min^[17],而新阵列只需与白酒反应 2 min 就可实现检测。 此外,通用阵列属于广普响应芯片,专一性不突出, 新阵列可视差图可以直接显示出各白酒中主体风味物 质的差异,更具针对性。因此,新阵列的检测能力优 于通用阵列。

3 结论

白酒成分复杂、种类繁多,快速、高效、准确对 不同风味、来源白酒进行鉴别有着十分重要的理论意 义和巨大的应用价值。本研究针对白酒风味中发挥重 要作用的醇、酸、酯、醛、缩醛类物质,选择性筛选 特异性敏感材料,构建了一种新型、高效、个性化的 比色传感阵列芯片。优化后的阵列芯片检测性能明显 优于原来的广普响应阵列芯片,可直接对白酒进行检 测,并直观的反映出与白酒中重要风味化合物的可视 化响应结果,简单快捷,适用于现场、实时检测。结 合图像处理提取白酒指纹图谱的 RGB 特征值,运用 模式识别分析方法可进一步提高检测、识别效果。本 方法为白酒香型鉴别提供了新思路,有一定的发展前 景。

参考文献

- 王忠彦, 尹昌树. 白酒色谱骨架成分的含量及比例关系对香型和质量的影响[J]. 酿酒科技, 2000,6:93-96
 WANG Zhong-yan, YIN Chang-shu. Effects of the content and ratio relationship of the chromatic spectrum structure components on liquor flavor style and quality [J]. Liquor making Science& Technology, 2000, 6: 93-96
- [2] 吴天祥,杨海龙,章克昌. 白酒香型风格与白酒色谱骨架成 分关系的初步研究[J]. 酿酒, 2002,3:25-28
 WU Tian-xiang, YANG Hai-long, ZHANG Ke-chang. The basic study on liquor aroma related to chromatograph skeleton components in liquor [J]. Liquor Making, 2002, 3: 25-28
- [3] 杨建磊,朱拓,徐岩,等.基于最小二乘支持向量机算法的三维 荧光光谱技术在中国白酒分类中的应用[J].光谱学与光谱 分析,2010,1:243-246

YANG Jian-lei, ZHU Tuo, XU Yan, et al. Application of three- dimensional fluorescence spectra technique to

discrimination of distilled spirits based on support vector machines [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 1: 243-246

- [4] Peng Q R, Dong R, Xun S Y, et al. Determination of volatile phenols in Chinese liquors by high-performance liquid chromatography associated with β -cyclodextrin and a protective barrier layer [J]. Flavor and Fragrance Journal, 2013, 28(3): 137-143
- [5] Zhen C, Zhou Y M, Zhang N, et al. Differentiation of chinese liquors by using ambient glow discharge ionization mass spectrometry [J]. Analyst, 2013, 138: 3830-3835
- [6] Fan W L, Shen H Y, Xu Y. Quantification of volatile compounds in chinese soy sauce aroma type liquor by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(7): 1187-1198
- [7] Liu, M, Han X M, Tu K, et al.. Application of electronic nose in chinese spirits quality control and flavour assessment [J].
 Food Control, 2012, 26(2): 564-570
- [8] Ceto X, Llobet M, Marco J, et al. Application of an electronic tongue towards the analysis of brandies [J]. Anal. Methods, 2013, 5: 1120-1129
- [9] Zhang C, Suslick K S. Colorimetric sensor array for soft drink analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007,55(2): 237-242
- [10] Zhang Y, He K, Lu Z M, et al. Colorimetric artificial nose for baijiu identification [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2012, 27(2): 165-170
- [11] Qin H, Huo D Q, Zhang L, et al. Colorimetric artificial nose for identification of chinese liquor with different geographic origins [J]. Food Research International, 2012, 45(1): 45-51
- [12] 侯长军, 戴斌, 霍丹群, 等. 基于液体阵列味觉仿生传感器鉴别白酒香型的新方法[J]. 高等学校化学学报, 2013,7: 1623-1628

HOU Chang-jun, DAI Bin, HUO Dan-qun, et al. New method for identifying the aromatic types of chinese liquors based on a 96 well plate [J]. Chemical journal of Chinese university, 2013, 7: 1623-1628

- [13] Kuwata K, Uebori M, Yamasaki H, et al. Determination of aliphatic aldehydes in air by liquid chromatography [J]. Analytical Chemistry, 1983, 55(12): 2013-2016
- [14] Potter W, Karst U. Identification of chemical interferences in aldehyde and ketone determination using dual-wavelength detection [J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(19): 3354-3358
- [15] Wang T, Tong H W, Yan X Y, et al. Determination of volatile

现代食品科技

Modern Food Science and Technology

2014, Vol.30, No.5

carbonyl compounds in cigarette smoke by LC-DAD [J]. Chromatographia, 2005, 62(11-12): 631-636

- [16] Dossi N, Susmel S, Toniolo R, et al.. Simultaneous determination of derivatized light aldehydes by microchip electrophoresis with electrochemical detection [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1207(1-2): 169-174
- [17] 霍丹群, 尹猛猛, 侯长军, 等. 可视化阵列传感器技术鉴别不 同香型白酒[J]. 分析化学, 2011, 4:516-520
 Huo Dan-qun, Yin Meng-meng, Hou Chang-jun, et al. Identification of different aromatic chinese liquors by colorimetric array sensor technology [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 4: 516-520