

荧光素对中国典型香型白酒的 荧光鉴别

霍丹群¹, 张苗苗¹, 秦 辉¹, 尹猛猛¹, 董家乐¹, 张 良^{2,3}, 沈才洪^{2,3}, 张宿义^{1,2}, 卢中明^{1,2}

(1. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044; 2. 泸州老窖股份有限公司, 四川泸州 646000;

3. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川泸州 646000)

摘要: 采用荧光光谱技术与模式识别分析法建立一种快速区分白酒香型的新技术。在495nm可见光激发下分别测定6种香型白酒、荧光素及这两种物质作用后200~800nm之间的荧光光谱, 探讨了荧光素与白酒的作用机理。结合模式识别法对310~380nm和504~530nm两个波段对应的荧光强度值进行分层聚类分析(Hierarchical Cluster Analysis, HCA)和线性判别分析(Linear Discriminant Analysis, LDA), 对荧光素区分不同香型白酒的效果进行验证。结果表明, HCA分析能完全区分6种香型白酒, LDA分析对所有样本均得到正确的判别, 正确率为100%。因此, 这种基于荧光素的荧光光谱法简单、有效, 可用于不同香型白酒的快速区分。

关键词: 荧光光谱, 白酒香型, 荧光素, 分层聚类分析, 线性判别分析

Fluorescent recognition of typical flavors of Chinese liquors based on fluorescein

HUO Dan-qun¹, ZHANG Miao-miao¹, QIN Hui¹, YIN Meng-meng¹, DONG Jia-le¹, ZHANG Liang^{2,3}, SHEN Cai-hong^{2,3}, ZHANG Su-yi^{1,2}, LU Zhong-ming^{1,2}

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

2. Luzhou Laojiao Group Co. Ltd., Luzhou 646000, China;

3. Liquor Making Biological Technology and Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Luzhou 646000, China)

Abstract: The fluorescent spectrometry based on fluorescein combined with pattern recognition analysis was used for fast flavors discrimination in Chinese liquors. The fluorescence spectra between 200nm to 800nm of six different flavors Chinese liquors were scanned with the visible light excited at 495nm; also, the fluorescence spectra of fluorescein and the fluorescence spectra of the six different flavors liquors reacted with fluorescein were detected in the same condition. The reacted mechanism for fluorescein and liquors were discussed. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Linear Discriminant Analysis (LDA) were used for analyzing the fluorescence intensity of two wavelength range from 310~380nm and 504~530nm to test the effect of fluorescein distinguish different flavors liquors. Analytical results indicated that the six flavors Chinese liquors could be effetely distinguished by HCA, and all simples were correctly matched in LDA with a correct rate of 100%. The study demonstrated that the fluorescent spectrometry based on fluorescein would be a simple and effective approach for typical flavors distinguishing of Chinese liquors.

Key words: fluorescence spectrum; flavors of Chinese liquors; fluorescein; hierarchical cluster analysis; linear discriminant analysis

中图分类号: TS262.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)10-0117-04

收稿日期: 2010-10-26

作者简介: 霍丹群(1965-), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向: 生物大分子、生物芯片、纳米材料与检测技术。

基金项目: 中央高校基本科研业务费(CDJXS102300); 重庆市科委攻关项目(2008AC7037); 重庆大学研究生创新团队(200909B1008); 泸州老窖股份有限公司合作研究基金项目(0221002605033); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室。

白酒历史文化悠久, 是我国的特色酒类, 与白兰地、威士忌、老姆酒、伏特加、金酒并称为世界6大蒸馏酒。其含有的醇类、酯类、酸类、醛类等微量成分是决定白酒香气、口感和风格的关键。目前, 我国白酒香型主要通过香味成分含量比例的不同来区分, 其检测技术主要依赖于气相色谱、液相色谱、质谱等大型仪器, 但因前期处理繁琐、价格昂贵、耗时长等缺

点,在白酒香味物质的快速鉴别方面尚有不足。近几年,随着光谱分析方法的发展,荧光分析法因其灵敏度高、选择性好、仪器设备简单等优点在白兰地、油脂、肉类^[1-3]等食品检测方面的应用日益广泛。为此,本工作拟采用荧光分析法研究代表我国6种香型的品牌白酒与荧光素作用后的荧光光谱,同时结合模式识别方法对光谱310~380nm和504~530nm两个波段对应的荧光强度值进行聚类分析(Hierarchical Cluster Analysis, HCA)和线性判别分析(Linear Discriminant Analysis, LDA),期望通过荧光分析法与模式识别相结合的方法建立不同香型白酒的光谱数据库及白酒香型鉴别标准,为生产工艺过程质量控制、未知香型白酒的鉴别及市售白酒品质监控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

荧光素 色谱纯, Sigma公司; 无水乙醇 色谱纯, 重庆川东有限公司; 实验用酒样 如表1所示, 均为市购。

表1 实验用6种白酒的酒精度、香型和产地

名称	酒精度(%)	香 型	产 地
泸州老窖特曲(LZTQ)	52	浓香型	四川·泸州
郎 酒(LJ)	53	酱香型	四川·泸州
汾 酒(FJ)	53	清香型	山西·汾阳
桂林三花酒(GLSH)	53	米香型	广西·桂林
西凤酒(XFJ)	50	凤香型	陕西·宝鸡
董 酒(DJ)	45	董香型	贵州·遵义

LS-50B荧光光谱仪 美国Perkin-Elmer公司; Millipore水纯化装置(18.2mΩ·cm) 美国MILLIPORE公司。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光素试剂的制备 准确称取0.01g荧光素置于10mL容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,混匀后于4℃冰箱避光保存12h后备用。

1.2.2 待测样品的制备 移取配制好的荧光素试剂,用6种不同香型白酒配制成 3.00×10^{-5} mol/L待测溶液;用不同浓度乙醇水溶液配制成 3.00×10^{-6} mol/L待测溶液;以上样品摇匀后避光静置12h后待测。

1.2.3 光谱测量方法 将待测样依次用1cm×1cm×4cm可密封石英比色皿盛放,设定激发波长为495nm,入射和发射狭缝别为5nm,扫描速度为1000nm/min,记录200~800nm波长范围内的荧光发射光谱,每个待测样做9次平行实验,文中的荧光光谱为求平均值所得。

1.3 数据分析

数据分析采用SPSS17.0软件中的分层聚类分析和线性判别分析法在计算机上进行。

聚类分析(HCA)是研究样品(或指标、变量)分类问题的一种多元统计分析方法。它是在变量间定义相似系数,在样品间定义距离,它们分别代表了变量或样品之间的相似程度。按其大小不同将关系密切的聚集为一个小类,然后逐步扩大,直到所有的变量或样品都聚集完毕,形成一个谱系,达到分类的目的^[4]。

判别分析(LDA)是根据表明事物特点的变量值

和它们所属的类,求出判别函数,根据判别函数对未知所属类别的事物进行分类的一种分析方法。它根据已知的观测分类和表明观测量特征的变量推导出判别函数,并把各观测量的自变量值回代到判别函数中,根据判别函数对观测量所属类别进行判别。对比原始数据的分类和按判别函数所判的分类,给出错分概率^[5]。

2 结果与分析

2.1 6种香型白酒的荧光光谱

图1所示为6种不同香型白酒在495nm激发波长下的荧光发射光谱。从图中可见,6种香型白酒除了在500nm处荧光强度值有差异外,在490~510nm波段的光谱形状相似。桂林三花(GLSH)、董酒(DJ)、西凤酒(XFJ)三种白酒在300~400nm处有较弱的发射峰。实验过程中发现,在可见光激发下,白酒的荧光光谱趋于相似,故单通过6种白酒自身的荧光光谱对其香型进行区分相对困难。因此,实验通过将荧光素掺杂到白酒溶液中,并测定了混合体系的荧光发射光谱,目的是探索一种能区分白酒香型的新方法。

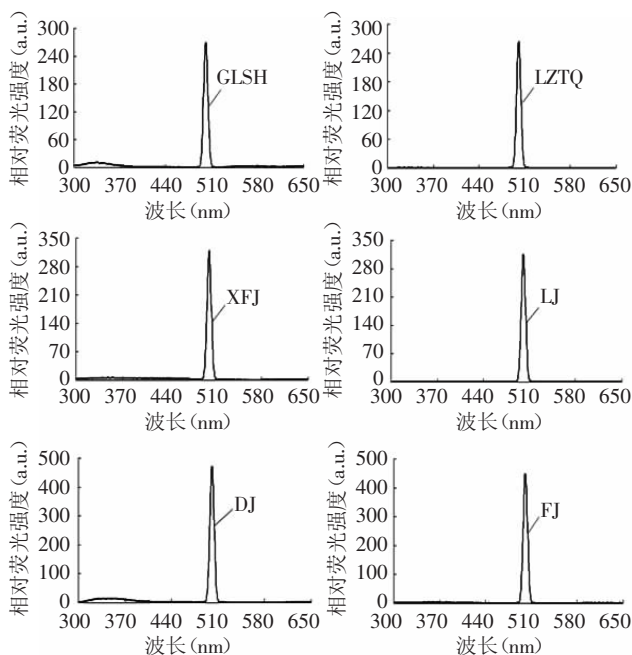


图1 6种白酒的荧光光谱

2.2 荧光素的荧光光谱

荧光素在乙醇水溶液中的荧光光谱如图2所示。在495nm激发波长激发下,荧光素在乙醇水溶液中的最大荧光发射峰在516nm附近。有文献表明,荧光素在中性溶液或乙醇溶液中,其第一吸收谱带在440~520nm之间,发射光谱一般在510~590nm之间,最大发射峰在515nm左右^[6]。在53%、50%、45%这3个浓度条件下,随着乙醇含量的递减,其荧光强度在最大发射峰处依次减弱。在53%乙醇水溶液中荧光素的荧光强度最大,这可能是受乙醇和水分子缔合度的影响。在53%乙醇水溶液中,乙醇分子和水分子之间形成较好的缔合状态,其氢键作用力占主导地位,乙醇分子在氢键作用下,形成新的分子团,分子间的相互作用力增强,分子结构变得刚性,有利于体系的荧光

强度增大;同时缔合状态也固化了荧光素的刚性平面结构,使得荧光量子产率增加,此时虽然丧失了部分未成对的电子,但总体荧光强度增大。在45%乙醇水溶液中荧光素的荧光强度较低,参考刘莹等人的研究成果^[7],可能原因是因为乙醇-水分子之间形成了一种新的配合物,而这种新的配合物与荧光素分子碰撞后使无辐射跃迁增加,荧光光子数目锐减,导致荧光强度降低,发生了荧光猝灭。

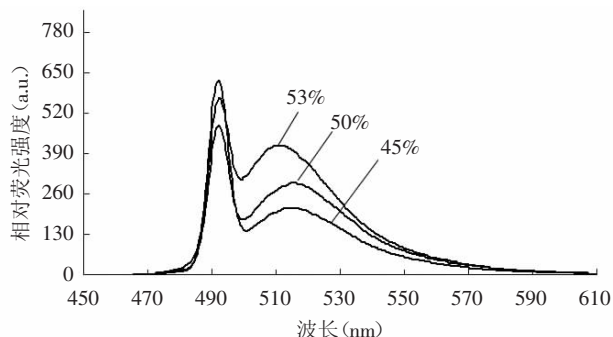


图2 荧光素在不同浓度乙醇水溶液中的发射光谱

2.3 荧光素-白酒体系的荧光光谱

上述研究表明,荧光素的荧光强度与乙醇浓度有一定联系,但是其光谱形状几乎不受乙醇浓度影响。而实际研究发现,荧光素与不同白酒作用后的荧光强度和光谱形状有较大区别,这归因于酒体风格特征及所含微量成分的差别。因此,将荧光素用于不同香型白酒的区分具有一定的可行性,期望通过白酒与荧光素作用后光谱之间的差异对其香型进行区分鉴别。

图3是凤香型白酒(XFJ)、米香型白酒(GLSH)、浓香型白酒(LZTQ)、清香型白酒(FJ)、董香型白酒(DJ)、酱香型白酒(LJ)分别与荧光素作用后的荧光光谱。其中浓、酱、清、米这四大香型是我国白酒的基本香型,董香和凤香为白酒的衍生香型。由图3可见,这几种白酒在495nm左右都存在强烈的散射峰,这主要是容器表面散射、背景散射、白酒体系散射^[8-9]共同作用的结果。此外,在最大发射峰处,西凤酒的相对荧光强度最强,郎酒最弱。研究发现,荧光强度与白酒含醇类、酸类、醛类等微量成分种类及量比存在密切关系。西凤酒含有高于清香型和浓香型白酒的异戊醇及丙酸羟胺、乙酸羟胺等自身特征香气成分^[10]。异戊醇的羟基连在亚甲基上,受到水分子形成的氢键影响,使得羟基上电子受到的束缚较弱,易于转移到荧光素的共轭 π 键结构上,在可见光激发下,其荧光强度增强;而丙酸羟胺、乙酸羟胺分子结构中的羧基基团与荧光素分子中羟基基团作用后生成含有羟胺基的荧光素衍生物,使得分子基态激发能降低,体系荧光强度增大。郎酒酸含量高,醛酮类含量大(特别是糠醛含量为所有白酒之冠,异戊醛、苯甲醛、丁二酮、3-羟基丁酮含量也高),含氮化合物为各香型白酒之最(以四甲基吡嗪、三甲基吡嗪最为突出)^[10]。而酸类、醛类、酮类物质会影响荧光素物质的刚性结构,使其形成内酯结构,产生位阻效应,导致荧光强度降低。在300~400nm波段,董酒与其他白酒发射峰有较明显的区别,其 $\lambda_{\text{eml}}=342\text{nm}$ 处,发射峰的荧光强

度为29.08,在测定的6种酒样中相对荧光强度最大。可能原因主要有以下两点:a.董酒属于药香型白酒,酿造原料中配有品种繁多的中草药,其经微生物分解代谢,生成新的荧光物质,使其荧光强度增强;b.据文献报道,董酒中醇类含量高达 $4.00\sim 4.60\text{g/L}$ ^[11],醇类物质和其他众多微量成分缔合形成新的分子团,也有利于荧光强度增强。因此,董酒与其他白酒在300~400nm之间荧光强度差异可作为判断其香型的主要依据。

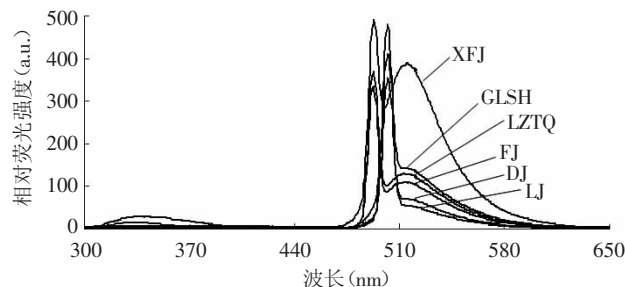


图3 荧光素与6种白酒作用后的发射光谱

2.4 6种香型白酒特征谱的HCA和LDA分析

经过对分层聚类法中各种分析方法的比较,采用欧氏距离法对选取的样本进行聚类分析。从每种白酒中随机选取3个样本的光谱数据,截取310~380nm,504~530nm两个波段对应的荧光强度值进行分析。图4为6种白酒的分层聚类树状图。从图中可见,6种白酒在各自区分的基础上,又被分为两大类。其中西凤酒单独为一类,其他5种白酒归为一类。第一类中桂林三花酒、汾酒和泸州老窖特曲酒聚为一小类,郎酒、董酒聚为另一小类。对比图3可知,其类别主要是根据504~530nm波段对应的荧光强度值划分的。

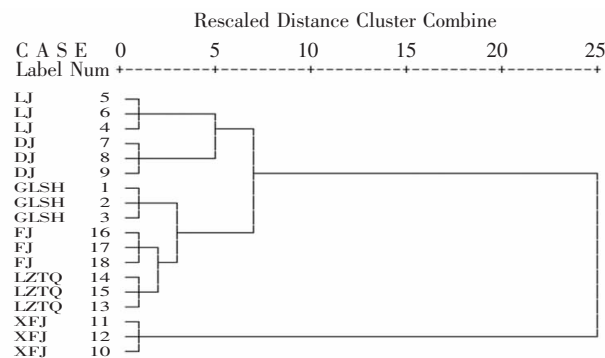


图4 6种白酒的分层聚类分析图

对6种白酒54个样本310~380nm和504~530nm两个波段对应的荧光强度值进行线性判别分析,表2为6种白酒的判别结果总结表。从分类结果可知,6种香型白酒能完全被区分开,正确率为100%。利用判别分析可以对光谱的区分能力进行度量。除此之外,利用判别分析还可以根据光谱数据对未知样本进行类型判别,将未知样本与已测光谱数据进行比对,就可以确定未知样本的种类。随机选取1个样本,以其余的53个样本为“训练样本”建立判别函数,然后对开始取出的1个样本进行判别,确定其类别,并与样本实际类别比对。通过对53个样本进行上述判别分析,所有样本均得到正确的判别,正确率为100%。目前

的实验表明, 本文选取的波长范围及荧光强度值可对6种白酒进行准确区分。

表2 判别结果总结表

分类结果	预测组成员						
	GLSH	LJ	DJ	XFJ	LZTQ	FJ	合计
计数	GLSH	8	0	0	0	0	8
	LJ	0	8	0	0	0	8
	DJ	0	0	8	0	0	8
	XFJ	0	0	0	8	0	8
	LZTQ	0	0	0	0	8	8
	FJ	0	0	0	0	0	8
初始	未分组的案例	1	1	1	1	1	6
	GLSH	100.0	0	0	0	0	100.0
	LJ	0	100.0	0	0	0	100.0
	DJ	0	0	100.0	0	0	100.0
	XFJ	0	0	0	100.0	0	100.0
	LZTQ	0	0	0	0	100.0	100.0
%	FJ	0	0	0	0	0	100.0
	未分组的案例	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	100.0

3 结论

本文探讨了基于荧光素的荧光光谱法区分不同香型白酒的新方法, 在合适的荧光素与白酒配比反应和荧光检测条件下, 通过分析荧光素与不同浓度乙醇水溶液和6种不同香型白酒反应后的荧光光谱, 证明了乙醇、水分子之间的缔合程度(氢键形成)是影响体系荧光强度的一个主要因素, 而白酒中微量成分的种类及其量比是影响荧光光谱的另一重要因素。在对310~380nm和504~530nm两个光谱波段对应的荧光强度值进行模式识别分析(HCA、LDA)的基础上, 证明荧光光谱法可以有效区分不同香型的白酒。由于荧光分析相对简单, 分析操作时间短而且检测费用低廉, 可以以荧光素为基础建立不同香型白

酒的荧光数据库, 用于白酒香型快速鉴别。综上所述, 以荧光光谱结果为数据源, 通过模式识别分析, 可为白酒香型、品牌甚至年份的鉴定提供新的途径, 在生产工艺过程质量控制及市售白酒品质监控等方面都具有重要意义。

参考文献

- [1] Sádecká J, Tóthová J, Májek P. Classification of brandies and wine distillates using front face fluorescence spectroscopy [J]. Food Chemistry, 2009; 117-494.
- [2] Ewa Sikorska, Tomasz Górecki, Igor V Khmelinskii, et al. Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy [J]. Food Chemistry, 2005; 217-225.
- [3] Irène Allais, Christophe Viaud, Arnaud Pierre, et al. A rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of the texture of meat emulsions and frankfurters [J]. Meat Science, 2004; 219-229.
- [4] 王静, 宋敏, 李冕. SPSS软件的应用研究[J]. 中国科技博览, 2009(1): 42.
- [5] 卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析 [M]. 第3版. 电子工业出版社, 2003: 448.
- [6] 夏锦尧. 实用荧光分析法 [M]. 中国人民公安大学出版社, 1992: 345.
- [7] 刘莹, 彭长德, 兰秀凤, 等. 乙醇和水分子形成配合物与荧光光谱特性研究[J]. 物理学报, 2005, 54(11): 5459.
- [8] 葛凤燕, 闫喜龙, 潘惠英, 等. 含活性基荧光素衍生物[J]. 化学通报, 2005(3): 168.
- [9] 庄明扬. 中国白酒的胶体特性及其应用原理与方法酿酒[J]. 酿酒, 2002, 29(1): 23-24.
- [10] 赖登辉. 中国十种香型白酒工艺特点、香味特征及品评要点的研究[J]. 酿酒, 2005, 32(6): 1-5.
- [11] 李维青. 白酒的香气与香型[J]. 酿酒, 2007, 34(2): 6.

(上接第116页)

3.2 羊奶酪蛋白热稳定性随温度的升高而降低。

3.3 随着酪蛋白溶液中 Ca^{2+} 浓度增加, 羊乳酪蛋白的热稳定性减小; 在柠檬酸钠的添加量为0.4g/L时, 羊奶酪蛋白的热稳定性最好; 三聚磷酸钠的添加量为0.5g/L时, 羊奶酪蛋白的热稳定性最好; 调节pH至6.8之后, 在0.4g/L时酪蛋白的热稳定性最好, 与未调pH组相比, 羊奶酪蛋白的热稳定性有明显提高; 干酪素对酪蛋白热稳定性的影响不明显。

参考文献

- [1] 焦凌梅, 袁唯. 改善山羊乳风味的方法研究[J]. 乳品加工, 2006(6): 56-57.
- [2] 杨晓青, 王俊国, 双全, 等. 发酵乳饮料稳定性的研究[J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2000(3): 84-89.
- [3] 侯志敏, 徐书英. 酪蛋白的提取及检测[J]. 实验室科学, 2006(5): 46-47.
- [4] 谢家麟, 田子. 山羊奶营养价值高[J]. 肉品卫生, 2001(5): 38.
- [5] 王蕊. 牛奶保鲜技术的研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2003

(4): 28-43.

- [6] Zapico P, Gaya p, Paz M De, et al. Influence of breed, animal, and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk [J]. Dairy Sci, 1991, 74: 783-787.
- [7] Dagleish DG, et al. Studies on the heat stability of milk[J]. Journal of Dairy Research, 1987, 54: 29-37.
- [8] 李春梅, 迟玉杰. UHT乳质量异常问题的分析及控制[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(5): 53-55.
- [9] Atherton H V. Report of the NCIMS goat milk task force (with addenda) [J]. Mimeo, 1983: 27.
- [10] 蒋志刚, 陆毓明. 果味牛奶中柠檬酸盐对酪蛋白稳定性的影响[J]. 食品与机械, 1999(4): 30-31.
- [11] 高艳华, 王联结, 马刚. 乳蛋白胶粒的稳定性研究及应用[J]. 食品科技, 2004(5): 4-7.
- [12] 张静. 酸性果乳稳定性和酸性条件下牛乳酪蛋白稳定特性的研究[D]. 西北农林科技大学, 2004: 34-43.
- [13] Darling D F. Heat stability of milk [J]. Journal of Dairy Research, 1980, 47: 199-210.