

指纹图谱在白酒分析及质量控制中的应用

祝成¹ 张宿义^{1,2*} 赵金松²

(1.四川理工学院,四川 自贡 643000; 2.泸州老窖股份有限公司,四川 泸州 646000)

摘要 指纹图谱作为一种分析天然产物的有效手段,近期发展迅速。该文介绍了指纹图谱的概念,白酒指纹图谱的构建,白酒指纹图谱的获取技术和解析方法。并从各方面指出了目前指纹图谱在白酒应用上存在的问题,对未来指纹图谱在白酒研究上的发展趋势作出展望。

关键词 白酒 指纹图谱 构建 解析

中图分类号:TS261.4

文献标识码:A

文章编号:0254-5071(2011)11-0017-04

Application of fingerprint technology in Chinese liquor analysis and quality control

ZHU Cheng¹, ZHANG Suyi^{1,2*}, ZHAO Jinsong²

(1.Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China; 2.Luzhou Laojiao Co., Ltd., Luzhou 646000, China)

Abstract : As an effective means to analyze the natural products, the technology of fingerprint chromatography developed rapidly in recent years. In this paper, the concept and construction of fingerprint chromatography were introduced, and acquisition technique and analytical method of fingerprint used in Chinese liquor was introduced, as well. Problems existed in application of fingerprint technology in quality control and future prospect in Chinese liquor were also discussed.

Key words : Chinese liquor; fingerprint chromatography; construction; analytical method

我国白酒与白兰地、威士忌、伏特加、朗姆酒、金酒并列世界6大蒸馏酒,是宝贵的民族遗产。作为传统行业,白酒在生产与质量控制等方面大多数都是凭经验而定,导致对白酒缺乏科学系统的认识。随着分析手段的发展,已揭示了白酒的风味与白酒中微量成分及其量比关系有着很大的联系。白酒中微量成分众多,到目前为止,已分析出了数百种微量成分,且其中的大部分已定性。但受现阶段研究条件的限制,对全部微量成分进行准确的定性或定量尚有一定困难。因而,研究者们开始转向以宏观、综合的角度来研究白酒的风味,白酒指纹图谱技术应运而生。

1 指纹图谱简介

指纹图谱是指经预处理的样品,通过色谱或光谱等技术手段分析后得到的能够表示该样品特性的谱图或图像。指纹图谱不需定量测定样品的各种化学成分,而只需要将样品中化学成分的含量和比例关系以色谱或光谱图谱反映出来,从宏观上综合地看问题。因此,指纹图谱解决了白酒中风味成分众多且不易定性或定量这一难题,能更科学地应用于白酒分析和质量控制。

目前,虽然指纹图谱技术已应用于白酒领域,在白酒质量控制上发挥了一定的作用,但还处于初级探索阶段。与白酒指纹图谱相比,指纹图谱在中药方面的研究则相对成熟。但是在后期的谱图解析过程中,两者采用的方法大同小异,故可相互借鉴、取长补短,从而充分挖掘谱图所包含的信息,为白酒指纹图谱的构建提供合理、快捷的方法。

2 白酒指纹图谱的构建

白酒指纹图谱的构建步骤与中药或其他指纹图谱构建步骤类似,可大致分为以下几步:①白酒指纹图谱获取技术的确定。目前常用的有GC和GC-MS。②分析条件的优选。如采用色谱技术,应确定最适的载气流速、分流比、程序升温步骤等操作条件。③方法学考察。严格考察图谱的重现性、稳定性和再现性。④指纹图谱的建立。根据保留时间、峰面积等相关参数,确定共有峰,结合白酒风味选取特征指纹峰,制定指纹图谱。⑤指纹图谱的分析与评价。通过相似度、共有峰、N强峰等参数比较评价指纹图谱或应用计算机技术(模式识别等)解析、识别图谱信息。⑥指纹图谱的验证与校准。通过比较白酒样品测试所得图谱与所建立白酒标准指纹图谱之间的相似程度,结合感官指标,验证所构建的标准指纹图谱的可行性并进行改进。

图谱的获取和图谱的解析是构建指纹图谱的关键,因此本文从这2方面综述了指纹图谱在白酒分析及质量控制中的应用。

2.1 图谱获取技术

气相色谱是现阶段白酒分析的常用技术。其分离性能高、分析速度快、灵敏度好,且是封闭系统色谱,受外界影响较小,亦是白酒指纹图谱研究所采用的主流技术。周围等^[1]采用气相色谱获得了几类不同香型名白酒的质量指纹图谱。所得图谱中包含32个特征峰,各峰所代表的风味成分的含量和比例的变化显著影响着白酒的香型和风格。白酒品牌不同,其质量指纹图谱也不同。郑岩等^[2]用

收稿日期 2011-01-11

作者简介 祝成(1988-),女,湖北仙桃人,硕士研究生,主要从事发酵工程研究工作,张宿义*,教授级高工,通讯作者。

GC-MS技术测定了10批茅台酒样,并采用指纹图谱计算软件建立了茅台酒的共有指纹图谱。GC-MS法所建立的指纹图谱具有较好的重现性、稳定性和再现性,适合用于白酒的质量控制。卢中明等^[3]通过对同一档次不同批次白酒进行GC-MS分析,获得了该档次白酒的标准指纹图谱。并运用夹角余弦法建立的数学模型有效地鉴别了不同香型、不同产地、不同档次的白酒。由此可知,运用GC-MS获得的指纹图谱具有较强的专一性,适合用于白酒的风味分析和质量控制。

其他获取白酒指纹图谱的方法还有近红外光谱技术^[4]、三维荧光光谱分析^[5]、GC-flash型电子鼻^[6]等。

2.2 图谱解析方法

2.2.1 测量参数的确定

早期中药指纹图谱中采用的测量参数有原始信号采样值和积分峰面积值2种。前者根据谱图间谱线上对应数据点的比较计算相似度,而后者根据谱图间对应峰面积值的比较计算相似度。随着研究的深入,研究者们发现采用峰面积值作为测量参数更具稳健性,结果更具可靠性^[7]。目前大多采用峰面积比较法。

2.2.2 数据预处理

通常在实验室获取的中药指纹图谱数据包含噪声、存在基线漂移和组分保留时间漂移等问题^[8]。为了改善相似度等匹配结果,须将获取的图谱数据进行预处理。中药指纹图谱相似度计算软件因具有快捷、直观等优点,是目前运用较多的一种谱图前处理方法。在保留时间漂移的校正和谱峰匹配方面,已有学者进行研究。倪力军等^[9]分别采用其研究提出的基于图论理论的全局最优匹配色谱图的方法和国家药典委员会推出的指纹图谱软件对4种中药的HPLC谱图进行匹配,比较匹配结果。结果表明,其提出的方法在很大程度上优于色谱指纹图谱分析软件,匹配峰组总数更多,错配和漏配峰组更少。李博岩等^[10]针对中药色谱指纹图谱中主要特征峰出现的保留时间的偏移问题,提出局部最小二乘校正方法,使得指纹图谱品质的评价更为合理、客观。

2.2.3 对照指纹图谱的建立

一般采用典型指纹图谱选择法和共有模式生成法。典型指纹图谱选择法即选择典型样品的指纹图谱作为对照指纹图谱;共有模式生成法即选择由一批样品的指纹图谱计算生成的共有模式图谱作为对照指纹图谱。目前专家更倾向于采用共有模式生成法。有关共有模式的算法,一般采用2种算法:平均矢量法和中位数矢量法。

$$\text{平均矢量} = \sum [(X_{1j}, X_{2j}, \dots, X_{ij}, \dots, X_{nj})/n]$$

$$\text{中位数矢量} = \text{median}(X_{1j}, X_{2j}, \dots, X_{ij}, \dots, X_{nj})$$

式中: X_{ij} 为当第 i 个样品的保留时间为 j 时的峰位置或峰面积。

当一批样品中存在有超常样本时,推荐使用中位数矢量来作为共有模式矢量^[11]。但如果不存在超常样本,2种

方法计算所得结果区别不大。一般情况下,采用平均矢量法来处理相对保留时间,对于相对峰面积,则采用中位数矢量法来处理。

2.2.4 化学计量学用于图谱解析

化学模式识别:化学模式识别是化学计量学(Chemo-metrics)的一个重要分支。模式识别是一种将某些现象进行分类并尽可能地使识别结果与客观事实相符的分类与识别方法。化学模式识别是在化学中有机地引入模式识别相关理念来处理化学问题。目前用于指纹图谱研究的化学模式识别方法有:系统聚类分析、主成分分析、判别分析、人工神经网络等。

(1)系统聚类分析:系统聚类分析操作简便、结果直观,广泛应用于指纹图谱研究。其基本原理是按照一定准则将具有相同或相似性质的不同物质聚为一类。聚类分析在白酒香型、风格等的归类和区分上都有很好的应用。万益群等^[12]采用HPLC法构建了江西5个不同白酒厂家的36个样品的指纹图谱,采用欧氏距离计算相似度,并用Ward方法进行系统聚类。结果表明,不同厂家的白酒各自聚为一类,系统聚类法能对样品进行正确分类。

(2)主成分分析:主成分分析是在数据空间中找出几个能控制所有变量的主成分,将数据从高维空间降至低维,从而使数据处理更为简便。在指纹图谱研究中,主成分分析可将数据投影至低维空间,其细微差别更为明显,进而使评价结果更为准确、客观。一般直接采用PCA投影进行分类,但当样品间的变量数过多且特征不够明显时,可先利用遗传算法对变量进行选取。万益群等^[12]等利用主成分分析-投影法对江西5个厂家36个白酒样品进行分类。36个白酒样品可明显地聚为5类,这和实际情况一致,说明主成分分析-投影法能有效地对不同厂家白酒进行分类。高永梅等^[6]使用GC-flash型电子鼻识别浓香、酱香、清香3种香型白酒,采用电子鼻自带的主成分分析软件可将3种香型的白酒正确区分开来。

(3)判别分析:判别分析是根据事物特点的变量值及其所属的类求出判别函数,根据判别函数对事物进行分类的一种分析方法^[13]。常用的判别分析法有距离判别法、Fisher判别法、逐步判别法、Bayes判别法等。研究者们可以通过判别分析对一种酒所属的香型、等级等进行判定,同时还可利用判别分析计算待测样品与标准样品之间的相似度,对样品质量进行控制。潘凤琴^[5]对23个江西白酒样品的7个共有峰的峰面积数据进行逐步判别分析,得到判别函数,并通过回判检验来衡量任意两类间的判别效果。结果表明,所有白酒样品均被正确归类,且回判准确率高达100%。

(4)人工神经网络:人工神经网络是模拟人脑功能的全新信息处理方法,特别适合于处理那些关系不明确、背景不清楚、推理规则不确定的问题^[13]。因此,对白酒指纹图谱信息的处理具有独到之处。反向传播(BP)模型是目前应

用最广泛的人工神经网络模型。万益群等^[12]采用经Levenber-Marquardt (LM)算法优化的标准BP网络对江西白酒的三维荧光指纹图谱进行处理。多次训练预报结果表明,网络已基本稳定,且预测结果准确度高,可用于对未知白酒样品的属性进行预报。

相似度计算 相似度比较是模糊信息分析法的一种,可以将指纹图谱相似性以客观的数字表示出来。从而避免了直观比较法(直观比较峰的数目、顺序、面积或峰高以及各峰间的相互比例等)带有的主观随意性。

指纹图谱的相似度计算首先是将一张指纹图谱视为一个n维向量,组成这个向量的元素是谱图的色谱峰面积信息。2张指纹图谱之间的相似度是对2个n维向量运用公式计算而得。目前相似度计算方法包括相关系数法、夹角余弦法、欧氏距离法等。其中以夹角余弦法和相关系数法应用最为普遍。

(1)相关系数 计算公式:

$$R_{mr} = \frac{\sum_{k=1}^n (X_{mk} - \bar{X}_m)(X_{rk} - \bar{X}_r)}{\sqrt{\sum_{k=1}^n (X_{mk} - \bar{X}_m)^2 \sum_{k=1}^n (X_{rk} - \bar{X}_r)^2}} \quad (R \in [-1, 1])$$

式中: X_{mk} 代表第m个样品第k个变量, $\bar{X}_m$ 代表第m个样品所有变量的均值, X_{rk} 代表共有模式向量第k个变量, $\bar{X}_r$ 代表共有模式所有变量的均值($k=1, 2, 3, \dots, n$)。相关系数测度的是样品间在变量的变化模式上形状的相似性,不受变量单位和变量值大小的影响。

(2)夹角余弦^[14] 计算公式:

$$C_{mr} = \frac{\sum_{k=1}^n X_{mk} X_{rk}}{\sqrt{\sum_{k=1}^n X_{mk}^2 \sum_{k=1}^n X_{rk}^2}} \quad (C \in [0, 1])$$

式中: X_{mk}, X_{rk} 意义同上。夹角余弦同样是测度样品间在变量的变化模式上形状的相似性。越接近于1,两个向量越相似。

(3)欧式距离 计算公式:

$$d_{mr} = \sqrt{\sum_{k=1}^n (X_{mk} - X_{rk})^2}$$

式中: X_{mk}, X_{rk} 意义同上。欧氏距离测度的是特征变量值的大小亲疏程度的相似性,忽略了各指纹峰的相关性和方差的差异性,一般用于聚类分析。

(4)程度相似度 在20世纪90年代,周美立等^[15]提出了相似系统理论。刘永锁等^[16]在相似系统基础上提出了采用程度相似度和改良的程度相似度进行中药指纹图谱的相似度评价的方法,从一定程度上克服了相关系数和夹角余弦计算不够灵敏的缺点。詹雪艳等^[17]在此基础上进一步改进,提出了一种新的相似度评价方法:新改良程度相

似度。该方法可将与参照样本的总体差异相同,但差异分布不同的样本区分开来,在共有峰峰面积差异不大的情况下,使峰面积的相对差异反映更为灵敏。

(5)相似度软件的应用 目前常用的指纹图谱相似度评价软件是针对中药液相色谱图谱所进行的相似度计算,大都采用相关系数或夹角余弦法,数据处理过程简便快速,自动化程度高。

(6)新的相似度计算方法 杨忠民等^[18]提出了峰面积权值非均一性进行相似度计算的新方法,避免了夹角余弦法或相关系数法对样品总量变化反映不灵敏的缺点。该方法能够体现样品中化学成分比例不变但总量变化时的情况。孙国祥等^[19]从化学成分分布相似性和含量相似性2个方面对栀子药材的HPLC指纹图谱进行评价,提出了比率定性相似度、投影含量相似度等一系列概念。结果表明,定性相似度不能揭示含量特征,只有定性相似度和定量相似度都合格的产品才能满足实际生产和应用。

在色谱指纹图谱相似度计算领域,其他尚有Nei系数法与改进的Nei系数法^[20]、相对熵方法^[21]、指数相似系数法与相似性比测度法^[22]、t检验法^[23]、总量统计矩相似度法^[24]等相似度算法。

2.2.5 色谱指纹图谱融合

聂磊等^[25]采用二极管阵列检测器(DAD)对栀子药材中的3类有效成分建立了3个特征吸收波长处的指纹图谱,然后将上述3张色谱指纹图谱分别采用整合法和主成分分析法进行融合,并比较了2种融合方法的差异。

以上是针对液相色谱,分别在不同波长处获得各类有效成分的指纹图谱。但可借鉴应用于白酒,即通过分别控制不同气相色谱条件得到各类有效成分指纹图谱,再进行融合,从而实现白酒气相色谱指纹图谱的全面评价。

2.2.6 精细指纹图谱比较

虽然全保留时间段的色谱指纹图谱相似度很高,但是在某一特定保留时间段内的图谱应该有一定的差别,该“精细指纹图谱”可以用于样品的质量判别。张洁等^[26]利用保留时间40min~80min的“精细指纹图谱”确定了22个特征指纹峰,能有效反映不同厂家六味地黄丸之间的差异。“精细指纹图谱”方法同样可借鉴来用于白酒分析。

3 现阶段存在问题与展望

3.1 实验条件的优化

高分离效能的色谱柱是获取白酒指纹图谱的关键。由于指纹图谱反映的是白酒中各种风味组分的全貌,因此选择的色谱柱必须尽可能多地将白酒风味组分分析出来。同时,还需了解各种操作条件(如温度、载气及其流速等)对图谱峰貌的影响,从而选择合适的实验条件,实现白酒的高效快速分离。这些都需要研究者在平时的实验中不断实践,积累经验。

3.2 白酒本身质量的控制

我国白酒采用传统固态发酵,开放式操作导致同一工艺、不同批次所产白酒的指纹图谱存在一定的差异,增大了白酒指纹图谱构建方面的不可控因素。在实际生产中,需严格控制工艺条件,确保白酒质量的稳定,尽量避免由于操作不当或管理不完善造成白酒指纹图谱研究上的误差。

3.3 图谱获取技术

目前大多采用GC或GC-MS获取白酒指纹图谱,但是要全面地分析白酒中所有风味组分,仅气相色谱技术是远远不够的。建议对同一白酒可根据实际情况尝试从多种技术层面构建一组指纹图谱,包括GC、HPLC和IC等技术手段。由于同一张指纹图谱上组分的数目、次序和量比关系是相互联系、相互影响的,采用不同分析手段建立的指纹图谱表现了白酒各个不同侧面的特征,其之间可以相互结合与补充,综合评价白酒的质量。

3.4 图谱解析方法

因研究条件的限制,现阶段都是针对峰面积较大的峰进行比对,对一些峰面积相对较小的峰甚至直接略去不计,这种分析方法带有主观盲目性,无法确定对白酒风味有关键影响的特征风味物质,因而无法科学有效地鉴别白酒的质量。

在相似度计算软件方面,现阶段大都利用中药指纹图谱相似度计算软件进行相似度分析。其具有直观、快速的优点,同时可以避免数据校正计算的误差,但主要是针对中药进行开发的,在图谱导入格式上存在一些问题。且值得注意的是:白酒中乙醇占大部分体积,若不经处理便直接计算,所得相似度值普遍偏高。现有方法一般是采用将乙醇峰除外的其他色谱峰数据输入EXCEL或其他统计学软件(如SPSS)计算相关系数和夹角余弦或利用中药相似度计算软件将谱峰以乙醇峰为界分成2段,分别计算各自的相似度,再将计算结果进行综合。但2种方法都计算繁琐,故提出合理且易实施的指纹图谱相似性的分析方法并开发针对白酒指纹图谱相似性评价的相应软件,与分析仪器相配套,用于白酒的质量控制和评判是一个亟待解决的问题。

3.5 研究领域

一方面,现阶段指纹图谱主要应用于白酒质量的稳定性评价、白酒香型的鉴别和白酒储存年限的判别等方面,而关于将指纹图谱与白酒感官评价特征相结合对白酒风味进行综合评价,则鲜有报道。另一方面,通过确定的生产工艺流程和测试方法得到的指纹图谱不仅可用于成品酒的质量控制,而且可用于控制白酒的生产过程。即根据各生产环节指纹图谱的变化,考察操作条件对白酒质量的影响程度,确定合理的工艺条件。故今后的研究重点可转向于这2方面。

参考文献:

- [1] 周 围,周小平,赵国宏,等.名优白酒质量指纹专家鉴别系统[J].分析化学,2004,32(6):735-740.
- [2] 郑 岩,汤庆莉,吴天祥,等.GC-MS法建立贵州茅台酒指纹图谱的研究[J].中国酿造,2008(9):74-76.
- [3] 卢中明,张宿义,吴卫宇.白酒质量控制数学模型的研究与应用[J].酿酒科技,2009(5):57-59.
- [4] 王 莉,汪地强,汪 华.近红外透射光谱法和气相色谱法结合建立茅台酒指纹模型[J].酿酒,2005,32(4):18-19.
- [5] 潘凤琴.江西白酒指纹图谱及化学组分分析方法的研究[D].南昌:南昌大学硕士论文,2008.
- [6] 高永梅,刘远方,李艳霞,等.主要香型白酒的电子鼻指纹图谱[J].酿酒科技,2008(5):38-41.
- [7] 陈闰军,程翼宇,林瑞超.中药色谱指纹图谱相似性计算方法的研究[J].中成药,2002,24(12):905-908.
- [8] 杨 云.中药指纹图谱数据处理技术的研究及应用[D].广州:华南理工大学硕士论文,2007.
- [9] 倪力军,王国东,郭 佳,等.基于图论的色谱指纹图谱谱峰的全局匹配[J].分析化学,2006,34(10):1454-1458.
- [10] 李博岩,梁逸曾,胡 芸,等.中药色谱指纹图谱组分保留时间漂移的校准[J].分析化学,2004,32(3):313-316.
- [11] 刘 义.中药指纹图谱库的建立及指纹图谱评价[D].长春:吉林大学硕士论文,2004.
- [12] 万益群,潘凤琴,谭 婷.化学计量学用于解析江西白酒的高效液相色谱指纹图谱[J].食品科学,2009,30(4):239-242.
- [13] 袁 洁,尹京苑,高海燕.指纹图谱在白酒中的应用研究进展[J].食品科学,2008,29(11):680-684.
- [14] 王龙星,肖红斌,梁鑫森,等.一种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法:向量夹角法[J].药学报,2002,37(9):713-717.
- [15] 周美立,吴报任.系统相似度数值方法[J].安徽工学院学报,1991,10(3):67-73.
- [16] 刘永锁,曹 敏,王义明,等.相似系统理论定量评价中药材色谱指纹图谱的相似度[J].分析化学,2006,34(3):333-337.
- [17] 詹雪艳,史新元,展晓日,等.基于相似系统理论的相似度计算方法的改进[J].分析化学,2010,38(2):253-257.
- [18] 杨忠民,李忠民,赵曰利,等.指纹图谱相似度新算法的研究[J].中国测试技术,2008,34(3):141-144.
- [19] 孙国祥,侯志飞,张春玲,等.色谱指纹图谱定性相似度和定量相似度的比较研究[J].药学报,2007,42(1):75-80.
- [20] 谷瑞敏,涂洪谊,孙 鹤.中药色谱指纹图谱相似度计算方法的探讨[J].中成药,31(7):988-990.
- [21] 王 康,杜 凯,李 华.相对熵方法用于中药指纹图谱相似度计算[J].计算机与应用化学,2007,24(1):49-52.
- [22] 蔡宝昌,刘训红.常用中药材 HPLC 指纹图谱测定技术[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [23] 张良圣,倪永年.t 检验法用于评价中药色谱指纹图谱的相似度[J].分析科学学报,23(5):511-514.
- [24] 黄 胜,贺福元,刘文龙,等.总量统计矩相似度法对左金缓释片多成分释放相似度的评价研究[J].中成药,31(1):35-39.
- [25] 聂 磊,胡 震,罗国安,等.中药指纹图谱的融合技术[J].分析化学,2005,33(6):898.
- [26] 张 洁,段继诚,梁 振,等.六味地黄丸的精细指纹图谱分析及模式识别分类研究[J].分析化学,2006,34(10):1423-1425.