

# 生物传感器法快速测定酒中的乙醇含量

冯 东<sup>1,2</sup>, 王丙莲<sup>1,2</sup>, 梁晓辉<sup>3</sup>, 李雪梅<sup>1,2</sup>, 李大海<sup>1,2</sup>

(1. 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250014; 2. 山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南 250014;

3. 山东省科学院能源研究所, 山东 济南 250014)

**摘要:** 利用酶固定化技术, 制备乙醇生物传感器, 并用其测定酒中乙醇含量。结果表明, 生物传感器法测定酒中乙醇含量快速而准确, 检测时间为 20 s, 回收率为 99.3 %~101.2 %, 相对标准偏差为 0.97 %~1.50 %, 检测灵敏度高, 检出限为 1 mg/100 mL; 与气相色谱法、密度瓶法相比较, 差异不显著( $P>0.05$ ); 且具有操作简单、成本低廉、专一性强等优势, 有望成为酒类乙醇含量测定的新方法、新手段。

**关键词:** 生物传感器; 酒; 乙醇; 测定分析

中图分类号: TS262.3; TS261.7; O657

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2012)02-0083-04

## Rapid Determination of Ethanol Content in Liquor by Biosensor

FENG Dong<sup>1,2</sup>, WANG Binglian<sup>1,2</sup>, LIANG Xiaohui<sup>1,3</sup>, LI Xuemei<sup>1,2</sup> and LI Dahai<sup>1,2</sup>

(1. Biology Research Institute of Shandong Academy of Sciences, Ji'nan, Shandong 250014; 2. Key Lab for Biosensors of Shandong Province, Ji'nan, Shandong 250014; 3. Energy Research Institute of Shandong Academy of Sciences, Ji'nan, Shandong 250014, China)

**Abstract:** Ethanol biosensor based on enzyme immobilization technology was used to determinate ethanol content in liquor. The results showed that the biosensor could measure ethanol content rapidly and accurately, with response time of 20 s, recovery ratio of 99.3 %~101.2 %, and repeatability relative standard deviation (RSD) 0.97 %~1.50 %. There was no significant difference ( $P>0.05$ ) in determination results between biosensor, gas chromatography (GC) and density bottle method. Besides, it had the advantages such as high sensitivity (detection limit was 1 mg/100 mL), easy operation, low cost and high specificity. It seemed that biosensor would become the novel method of ethanol detection in liquor.

**Key words:** biosensor; liquor; ethanol; determination

对于酒精类饮品, 譬如白酒、啤酒、果酒、米酒以及其他药酒、保健酒等酒类, 乙醇含量是检测其质量的重要指标之一, 国家对此有严格规定, 故快速准确地检测酒中乙醇含量在食品工业质量控制中十分重要。目前, 酒中乙醇含量的测定方法包括密度瓶法<sup>[1]</sup>、酒精计法<sup>[2]</sup>、气相色谱法<sup>[3-4]</sup>、分光光度法<sup>[5]</sup>、比色法<sup>[6]</sup>、化学氧化法等<sup>[7]</sup>。上述几种测定方法中, 密度瓶法、酒精计法和化学氧化法均为国家标准规定方法, 但是测定前需对样品进行蒸馏, 且操作过程复杂, 同时也会因为仪器和人为因素干扰而使测定结果与实际值存在一定误差。分光光度法和比色法受样品颜色干扰较为严重。相比较而言, 气相色谱法结果准确, 但是操作复杂、设备昂贵, 大大提高了相关行业的生产成本, 故在指导生产的实际应用中受到较大限制。为此, 有必要建立一种快速、准确且成本较低的乙醇含量分析方法, 以适应当前食品、饮料、酿酒等相关行业对低成本、高效率的需求。

生物传感器法是采用酶固定化技术, 将乙醇氧化酶固定于载体材料制成乙醇氧化酶酶膜, 并结合生物传感器技术制备乙醇生物传感器。利用酶催化反应特异性, 从而实现对各种酒精类饮品中乙醇含量进行快速、灵敏、准确测定。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂和材料

乙醇氧化酶(AOX 5483 U/mL), 美国 Sigma 公司; 缓冲溶液为 0.1 mmol/L, pH7.2 的磷酸缓冲液; 市售中国劲酒(35 %vol)、蒙山十足全蝎酒(35 %vol)、张裕三鞭酒(30 %vol)、特制二锅头(56 %vol); 其他试剂均为分析纯。

#### 1.2 固定化乙醇氧化酶酶膜及酶电极制备

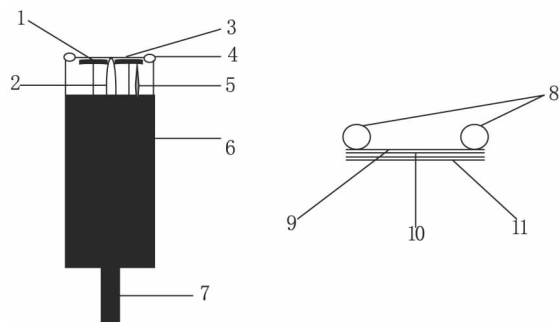
乙醇氧化酶酶膜及乙醇酶电极结构见图 1, 乙醇氧化酶经戊二醛交联剂固定于核微孔基质膜。固定化乙醇氧化酶酶层通过酶膜片及 O 型密封圈固定于过氧化氢

收稿日期: 2011-11-09

作者简介: 冯东(1972-), 男, 大学本科, 副研究员, 研究方向: 生物传感器的研究与开发。

通讯作者: 王炳莲, E-mail: wangbinglian79@126.com。

电极顶端,制备酶电极<sup>[8]</sup>。乙醇酶电极系统包括2个电极及其插头。固定化乙醇氧化酶对溶液中乙醇进行催化反应,生成的 $H_2O_2$ 由过氧化氢电极检测并进行结果显示,从而实现对乙醇的定量。

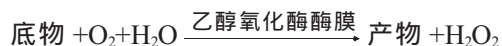


注:1.银电极;2.铂电极;3.酶膜片;4.酶膜圈;5.热敏电阻;6.电极杆;7.电极引线;8.O型密封圈;9.核微孔基质膜;10.酶层;11.内膜层

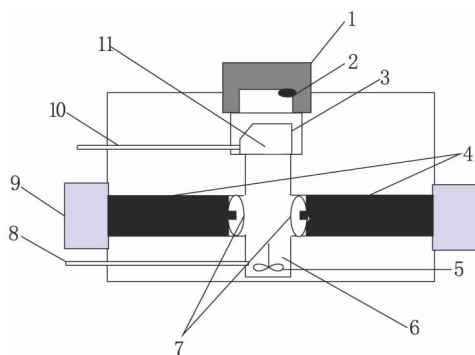
图1 酶电极(左)及固定化酶膜(右,放大)

### 1.3 乙醇生物传感器制备

本研究中,乙醇生物传感器是利用酶促反应来定量乙醇,其样品分析原理如下:



该生物传感器系统通过 $H_2O_2$ 的定量分析实现对乙醇含量的测定,故过氧化氢电极和固定化乙醇氧化酶均是乙醇生物传感器的核心器件。乙醇生物传感器系统结构见图2,样品室侧面装有过氧化氢电极,电极表面覆盖固定化乙醇氧化酶酶膜。含有乙醇的底物在样品室内与固定化乙醇氧化酶层接触并反应,产生的 $H_2O_2$ 由过氧化氢电极检测并转变为电信号,该电信号经放大处理显示测定结果,并自动记录和打印。因为产生的 $H_2O_2$ 的量与乙醇质量浓度成线性比例关系,故该乙醇生物传感器系统可测定样品中乙醇含量。



注:1.进样帽;2.光传感器;3.反应池顶帽;4.过氧化氢电极;5.电磁搅拌子;6.样品室;7.乙醇氧化酶酶膜;8.缓冲液进口和废液排空管;9.电极旋钮;10.废液吸出管;11.进样口

图2 乙醇生物传感器结构示意图

### 1.4 测定方法

#### 1.4.1 乙醇标准溶液配制

无水乙醇溶于蒸馏水或传感器专用缓冲液,配制浓度依次0 mg/100 mL、0.50 mg/100 mL、1.00 mg/100 mL、2.00 mg/100 mL、4.00 mg/100 mL、6.00 mg/100 mL、8.00 mg/100 mL、10.00 mg/100 mL、20.00 mg/100 mL、40.00 mg/100 mL、60.00 mg/100 mL、80.00 mg/100 mL、100.00 mg/100 mL、120.0 mg/100 mL的乙醇标准溶液。

乙醇标准液现配现用,用于检验乙醇生物传感器的线性范围和检测限。

#### 1.4.2 测定步骤

##### 1.4.2.1 乙醇生物传感器定标

乙醇生物传感器使用前先定标,以100 mg/100 mL乙醇标准溶液作为仪器的定标溶液<sup>[9]</sup>。传感器最终自动定标为100,然后即可进行线性范围、检测限的确定,以及待测样品乙醇含量的测定。

##### 1.4.2.2 乙醇生物传感器标准曲线的制作

乙醇生物传感器自动定标后,用特制微量进样器吸取浓度0 mg/100 mL、0.50 mg/100 mL、1.00 mg/100 mL、2.00 mg/100 mL、4.00 mg/100 mL、6.00 mg/100 mL、8.00 mg/100 mL、10.00 mg/100 mL、20.00 mg/100 mL、40.00 mg/100 mL、60.00 mg/100 mL、80.00 mg/100 mL、100.00 mg/100 mL、120.0 mg/100 mL的乙醇标准溶液各25  $\mu$ L,进行测定,每个浓度重复3次。以乙醇标准溶液浓度为横坐标,测定结果为纵坐标,绘制标准曲线,测定乙醇生物传感器的检测灵敏度及线性响应规律。

##### 1.4.2.3 酒样样品测定

乙醇生物传感器线性范围及检测限确定之后,将酒样用蒸馏水或乙醇传感器专用缓冲液按相应比例稀释,调整pH值为6~8。准确吸取25  $\mu$ L稀释的酒样,根据仪器“进样”指示将酒样注入反应池。20 s后乙醇生物传感器自行显示并打印测定结果,结合稀释倍数即可测得酒样中乙醇含量,整个测定周期控制在1 min左右。

### 1.5 数据处理方法

采用t检验分析,比较酒精计法、气相色谱法与乙醇生物传感测定结果之间的显著性差异。判断标准: $p > 0.05$ ,差异不显著; $p < 0.05$ ,差异显著; $p < 0.01$ ,差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 pH值对乙醇氧化酶酶膜活性的影响

乙醇氧化酶在不同的pH值测定环境中,酶活性、稳定性及使用寿命不同,过酸或过碱的溶液环境均导致其活性下降,以致失活,从而严重影响乙醇生物传感器测定的准确度。调整0.1 mmol/L磷酸缓冲液pH值为1~11。乙醇氧化酶膜活性随pH值变化曲线及不同pH值环境

中酶膜寿命曲线见图3。

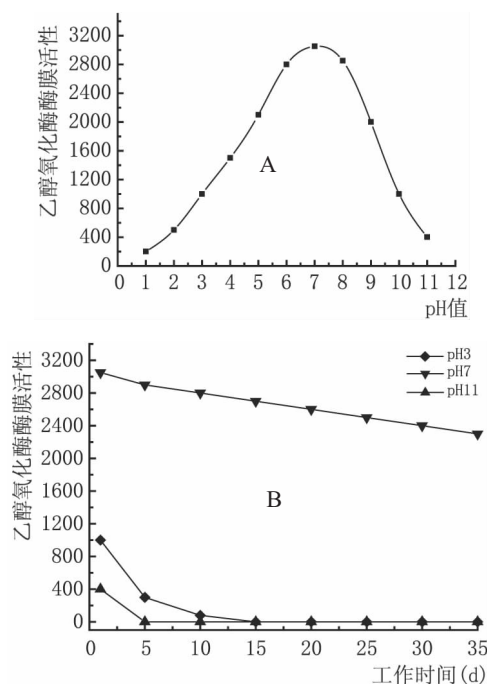


图3 pH值对乙醇氧化酶酶膜活性(A)及酶膜寿命(B)的影响

图3表明,在pH值6~8范围内,乙醇氧化酶均保持很高活性;pH7左右时酶活性达到最高。此外,pH7的测定环境中乙醇氧化酶膜能长时间(35 d)保持较高的活性。鉴于此,乙醇生物传感器选用pH7.2的磷酸缓冲液,待测酒样需调整pH值6~8,强酸或强碱样品液均将导致传感器酶膜寿命短以及测定不准确。

## 2.2 线性范围及检出限

图4为乙醇生物传感器的标准曲线。由图4(A)可知,乙醇浓度为0~120.00 mg/100 mL范围时,传感器线性关系较差,回归方程为 $Y=1.38987X-5.10163$ ,相关系数 $r=0.94012$ 。去掉0.50 mg/100 mL、120.00 mg/100 mL乙醇浓度,绘制传感器标准曲线,见图4(B)。结果表明,乙醇浓度在1.00~100.00 mg/100 mL范围内时,传感器测定值与乙醇浓度呈良好线性关系,其回归方程为: $Y=0.99696X+0.12329$ ,相关系数 $r$ 为0.99984。由此可认为,乙醇生物传感器的线性范围为1.00~100.00 mg/100 mL,检出限为1.00 mg/100 mL。

## 2.3 共存物对乙醇生物传感器测定结果的影响

按方法“1.4.1”配制浓度均为50 mg/100 mL的甲醇、丙醇、丁醇、乙酸、乙酸乙酯、乙醇+甲醇、乙醇+丙醇、乙醇+丁醇、乙醇+乙酸、乙醇+乙酸乙酯等溶液。利用乙醇生物传感器对各溶液分别进行含量检测,并以50 mg/100 mL的乙醇标准溶液做对比。每个测试重复3次,结果见表1。

由表1可以看出,乙醇生物传感器能够准确测定溶

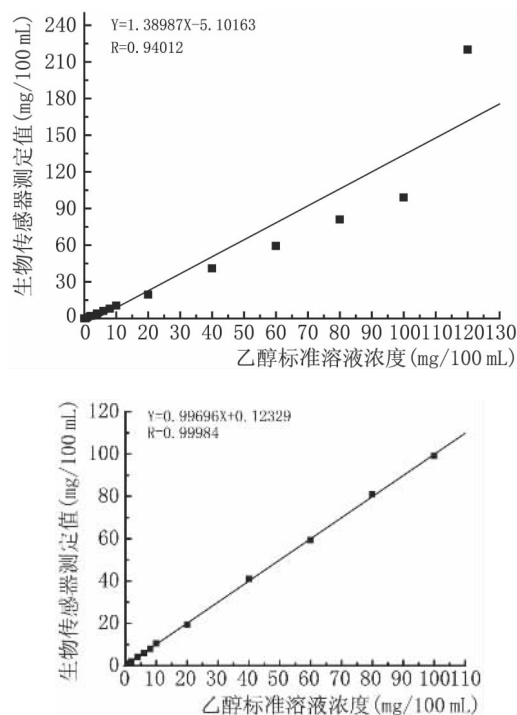


图4 乙醇生物传感器的标准曲线

表1 乙醇生物传感器的专一性试验(n=3)

| 底物      | 实际浓度<br>(mg/100mL) | 测定值<br>(mg/100mL) |
|---------|--------------------|-------------------|
| 乙醇      | 50.00              | 49.30 ± 0.33      |
| 甲醇      | 50.00              | 1.67 ± 0.33       |
| 丙醇      | 50.00              | 1.00 ± 0.57       |
| 丁醇      | 50.00              | 0.67 ± 0.33       |
| 乙酸      | 50.00              | 1.00 ± 0.57       |
| 乙酸乙酯    | 50.00              | 0.00 ± 0.00       |
| 乙醇+甲醇   | 乙醇 50.00           | 51.33 ± 0.33      |
|         | 甲醇 50.00           |                   |
| 乙醇+丙醇   | 乙醇 50.00           | 49.67 ± 0.33      |
|         | 丙醇 50.00           |                   |
| 乙醇+丁醇   | 乙醇 50.00           | 50.00 ± 0.57      |
|         | 丁醇 50.00           |                   |
| 乙醇+乙酸   | 乙醇 50.00           | 51.67 ± 0.67      |
|         | 乙酸 50.00           |                   |
| 乙醇+乙酸乙酯 | 乙醇 50.00           | 49.33 ± 0.33      |
|         | 乙酸乙酯 50.00         |                   |

液中乙醇的含量,而对其他类似结构干扰物无明显响应;且对于乙醇与干扰物的混合溶液,传感器测定值亦与乙醇浓度相接近,由此可认为,乙醇溶液中其他醇类、酯类等物质对测定影响甚微。综上所述,乙醇生物传感器对乙醇专一性较高,用于混合液中乙醇含量检测时能够有效排除其他杂质的干扰。

## 2.4 回收率检验

最佳试验条件下,取市售不同浓度样品(张裕三鞭酒、中国劲酒、二锅头)进行加标回收率实验。酒样稀释后每个样品平均分成2份,其中一份加入等体积质量浓度

为30%的乙醇对照溶液做回收实验。按照“1.4.2”步骤测定各酒样的乙醇含量。每个测定重复3次,求平均值。由回收率计算公式: $P = (\text{加标试样测定值} - \text{试样测定值}) / \text{加标量} \times 100\%$ ,即得传感器测定酒中乙醇含量的回收率,在99%~102%范围内,结果见表2。

表2 生物传感器、分析仪回收实验(n=3)

| 样品 | 酒样质量浓度测定值<br>(%) | 加标酒样质量浓度测定值<br>(%) | 回收率<br>(%) |
|----|------------------|--------------------|------------|
| 1# | 23.7±0.6         | 53.7±1.1           | 100.0      |
| 2# | 27.3±0.5         | 57.6±1.5           | 101.2      |
| 3# | 44.3±0.6         | 74.1±1.3           | 99.3       |

## 2.5 精密度实验

按标准曲线范围对不同浓度的酒样(张裕三鞭酒、中国劲酒、特制二锅头)进行稀释,分别用乙醇生物传感器测定其乙醇含量,每个样品重复测定5次,其变异系数均<5%,符合生物样品分析要求,结果见表3。

表3 精密度实验

| 酒样 | 乙醇含量(%vol)     | 标准偏差(SD) | 相对标准偏差(RSD) |
|----|----------------|----------|-------------|
| 1# | 30 30 30 30 29 | 0.45     | 1.50        |
| 2# | 35 35 35 34 35 | 0.45     | 1.28        |
| 3# | 56 56 56 57 57 | 0.55     | 0.97        |

## 2.6 生物传感器法与密度瓶法、气相色谱法测定酒中乙醇含量的对比实验

取4种市售酒样,按相应倍数稀释后,分别用生物传感器法、密度瓶法、气相色谱法进行乙醇含量测定,每种样品测试重复6次,求平均值;将密度瓶法、气相色谱法分别与生物传感器法进行差异性分析,结果见表4。

表4 乙醇含量对比测试结果(n=6) (%vol)

| 样品名称          | 生物传感器法     | 密度瓶法        | 气相色谱法       |
|---------------|------------|-------------|-------------|
| 张裕三鞭酒(30%vol) | 29.80±0.45 | 30.79±1.21* | 30.13±0.09* |
| 中国劲酒(35%vol)  | 34.80±0.45 | 34.10±1.34* | 34.96±0.12* |
| 蒙山全蝎酒(35%vol) | 34.60±0.55 | 35.92±0.98* | 35.09±0.07* |
| 特制二锅头(56%vol) | 56.40±0.55 | 57.05±1.89* | 55.83±0.10* |

注:经t检验分析,\*: $P > 0.05$ 。

表4数据显示,在测定酒中乙醇含量时,乙醇生物传感器与密度瓶法、气相色谱法之间无显著差异。鉴于乙醇生物传感器具有操作简单、成本低廉的优势,其有望代替密度瓶法、气相色谱法等,成为酒中乙醇含量测定的新方法、新手段。

## 3 结论

3.1 该测定方法有较高的准确度、精密度,且与密度瓶法、气相色谱法测定结果一致,完全可用于各类酒中乙醇含量的测定。

3.2 该方法无需进行复杂的样品前处理,且测定过程只需“进样”操作,大大简化了测定程序和测定成本。

3.3 该方法反应快速,检测时间为20s,使整个分析时间控制在1min左右;进样量仅为25μL,亦一定程度上节省了测定成本。

3.4 该方法测定范围较宽,检测灵敏度高,检出限为1.00mg/100mL,亦适用于其他行业低含量乙醇的测定。

3.5 该方法利用“酶促”反应原理,专一性很强,使得测定不受杂质以及样品颜色和浑浊度的影响,故其在各行业的乙醇分析中均具有广阔的应用前景。

3.6 该方法受测定环境pH值影响较为明显,故样品测定前需调整样品pH值。此外,该方法测定上限为100mg/100mL,故超过该浓度的酒样需进行稀释。

## 参考文献:

- [1] 田栖静,等.发酵产品与实验方法标准汇编-蒸馏酒[M].北京:中国标准出版社,1992.
- [2] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会,GB/T5009.48—2003 蒸馏酒与配制酒卫生标准的分析方法[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [3] Xu Rong, Gong Qian. The application of optical fiber sensing technology in multiphase flow parameter measurement [J]. Journal of Engg College of Armed Police Force, 2000, 16(6): 21-24.
- [4] 迪克斯 D J,尼柯拉斯 P V 著.食品分析的气相色谱法[M].无锡轻工学院译.北京:轻工业出版社,1987:342.
- [5] 刘春英,弓晓峰,张振辉.刚果红吸光光度法测定酒中乙醇含量[J].理化检验-化学分册,2006,42(10):855-856.
- [6] 邵法都,梅朝勇,沈振新,等.用比色法测定啤酒中的酒精度[J].酿酒,1999,2(2):90-93.
- [7] 马美范,张印贞.化学氧化法测定白酒中乙醇含量的研究[J].酿酒科技,2007(2):93-94.
- [8] 毕春元,田永忠,李保国,等.酶电极法测定玫瑰酒中的乙醇含量[J].中外葡萄与葡萄酒,2008(6):64-65.
- [9] 冯东,王丙莲,梁晓辉,等.生物传感器在纤维素乙醇测定中得应用[J].农业工程学报:增刊,2011(27):313-316.

# 贵州茅台预计 2011 年净利同比增 65 %以上

本刊讯 据《糖酒快讯-食品资讯》报道,中国知名白酒生产商贵州茅台酒股份有限公司近日发布业绩预增公告,经初步测算,预计公司 2011 年度净利润同比增长 65 %以上,主要原因是产品销量与价格同比上年度增长所致。2010 年度实现归属于上市公司股东的净利润为 50.51 亿元人民币,基本每股收益 5.35 元。贵州茅台 2011 年前三季度公司实现归属于上市公司股东的净利润 65.69 亿元,同比增长 57.38 %;基本每股收益 6.33 元。(小小荐)

来源 糖酒快讯-食品资讯 2012-01-18