

基于食品组学技术的干邑白兰地真假鉴别研究

刘嘉飞¹, 张 静¹, 汪廷彩¹, 杨中花¹, 陈堃洁¹, 王立亚¹, 雷 毅¹, 王 晶², 梁旭霞^{1*}

(1. 广东省食品检验所, 广州 510435; 2. 广东省疾病预防控制中心, 广州 511430)

摘 要: **目的** 建立一种基于食品组学技术对干邑白兰地真假鉴别的方法。**方法** 白兰地样品过 0.45 μm 滤膜, 在高分辨质谱 Full MS/dd MS2 扫描模式下采集数据, 采用 Compound Discoverer 3.0 对样品数据进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和差异分析, 并通过 mzCloud 网络数据对干邑白兰地中的化合物检索鉴定。**结果** PCA 分析显示真假白兰地和同一品牌不同等级的白兰地均可以实现明显区分。根据差异化合物的母离子的精确质量数、母离子同位素组成及二级质谱信息鉴定出 19 种化合物, 这些化合物在真假酒样中含量不同。**结论** 该方法简单、快速、准确, 为干邑白兰地的真假鉴别及组分鉴定提供参考。

关键词: 干邑白兰地; 真假鉴别; 食品组学; 超高效液相色谱-串联高分辨质谱法

Identification of the true and false of Cognac brandy based on foodomics technology

LIU Jia-Fei¹, ZHANG Jing¹, WANG Ting-Cai¹, YANG Zhong-Hua¹, CHEN Duo-Jie¹,
WANG Li-Ya¹, LEI Yi¹, WANG Jing², LIANG Xu-Xia^{1*}

(1. Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China; 2. Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the identification of the true and false of Cognac brandy based on foodomics technology. **Methods** Brandy samples were filtered through 0.45 μm membrane and the data were collected under Full MS/dd MS2 scanning mode of high resolution mass spectrometry. Principal component analysis (PCA) and difference analysis were performed on the sample data by Compound Discoverer 3.0, and the compounds in Cognac brandy were retrieved and identified by mzCloud network data. **Results** The results of PCA indicated that true and false Cognac brandy samples were clearly distinguished as well as the different grades of the same brand. Based on the accurate mass of the parent ion of the differential compound, the parent ion isotope composition and the secondary mass spectrometry information, 19 compounds were identified, and these compounds were different in the true and false wine samples. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate, which provides references for the identification of Cognac brandy and its components.

KEY WORDS: Cognac brandy; identification of true or false; foodomics; ultra performance liquid chromatography-tandem high resolution mass spectrometry

基金项目: 广东省食品药品监督管理局科技创新项目(2018JDZ02)

Fund: Guangdong Provincial Food and Drug Administration, Science and Technology Innovation Project (2018JDZ02)

*通讯作者: 梁旭霞, 博士, 主任技师, 研究方向为食品理化检验与食品安全。E-mail: liangxuxia@126.com

*Corresponding author: LIANG Xu-Xia, Ph.D., Chief Technician, Guangdong Institute of Food Inspection, NO.1103, Zengcha Road, Baiyun District, Guangzhou 510435, China. E-mail: liangxuxia@126.com

1 引言

白兰地(brandy)是世界著名的蒸馏酒之一,受到世界各国酒客的追捧^[1]。其中法国夏朗德省干邑(Cognac)地区生产的白兰地以其温润高雅的品质被举世公认,最负盛名^[2]。白兰地是以葡萄为原料,经过榨汁、去皮、去核、发酵等工艺,得到含酒精较低的葡萄原酒,再经蒸馏得到无色高度原酒。原酒放入橡木桶储存、陈酿,再进行勾兑以达到理想的颜色、芳香味道和酒精度,从而得到优质的白兰地^[3]。干邑白兰地酿造工艺精湛,特别讲究陈酿时间与勾兑的技艺,其中陈酿时间的长短更是衡量白兰地酒质优劣的重要标准。干邑地区各厂家贮藏的橡木桶中的白兰地,有的长达 40~70 年之久。他们利用不同年限的酒,按各自世代相传的秘方进行精心调配勾兑,创造出各种不同品质、不同风格的干邑白兰地^[4]。其中,轩尼诗、马爹利、人头马是 3 个最著名的干邑白兰地品牌。干邑白兰地又分为以下几个常见等级^[5]:

(1) VS(very superior)又叫三星白兰地,属于普通型白兰地。法国政府规定,干邑地区生产的最年轻的白兰地只需要 18 个月的酒龄。

(2) VSOP(very superior old pale)属于中档干邑白兰地,享有这种标志的干邑至少需要 4 年半的酒龄。

(3) XO(extra old)属于精品干邑,依据法国政府规定此类干邑白兰地原酒在橡木桶中必须酿藏 6 年半以上,才能装瓶销售。

此外,在欧盟编号为 110/2008 的法令确认了干邑的地理标志认证,其中规定了饮品的命名、描述、介绍、标签^[6]。地理标志认证是一种标志,证明某款烈酒饮品来源于某一国家的领土,或者一个地区,或者这一领土上的某一位置,其特定的质量,信誉和这款烈酒的其它特性都可以从它的地理产地地上得以体现^[7]。然而由于干邑白兰地销量大、价格高,便有不法商贩为追求利润制假、售假,主要方式有包括使用食用酒精和添加剂勾兑,低档酒冒充高档酒,外包装仿造和回收已饮用的剩酒勾兑仿新等^[8-12],其中以次充好的高仿真假酒最为真伪难辨。因此建立更快速、准确鉴别干邑白兰地的技术对保障消费者健康和权益,加强相应产品的监督管理具有重要的作用和意义。

目前,对于白兰地的真假鉴别还没有国家标准,而广东地方标准 DB44/T 1114-2013《干邑白兰地品质鉴定技术规范》^[13]通过紫外吸收光谱技术对真假进行鉴别,无法提供具体化合物的信息。国内外对于白兰地真假鉴别的技术主要有气相色谱法、高效液相色谱法、傅里叶变换红外光谱法、核磁共振法、原子吸收光谱法、聚合酶链式反应技术等^[14],其中通过气相色谱和高效液相色谱检测挥发性成分的鉴别研究比较多,如法国的 Ledauphin 等^[15]通过采用气质联用仪分析白兰地中痕量挥发性化合物含量鉴别新鲜蒸馏的白兰地和干邑白兰地。对于采用液质进行干邑白兰

地真假鉴别的报道较少。

食品组学是将蛋白组学和代谢组学等组学的分析思路和方法(主要是多元统计分析),运用到食品分析和营养学分析范畴的一种研究方式,常用于鉴别食品的物种、产地和品质^[16-20]。基于食品组学技术的干邑白兰地鉴别,能更全面、准确地进行真假鉴定。本研究通过基于食品组学技术的超高效液相色谱-串联高分辨质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem high resolution mass spectrometry, UPLC-HRMS)方法对真假干邑白兰地进行了全扫描分析,分析样品中化合物差异,旨在为干邑白兰地真假鉴别提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

Therom Q-Exactive 超高效液相色谱-串联高分辨质谱(美国 Therom 公司); ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm×1.7 μm, 美国 Waters 公司); 代谢组学分析软件 Compound Discoverer 3.0(美国 Therom 公司); 0.45 μm GHB 滤膜(德国波尔公司)。

甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 实验室自制超纯水(美国 Millipore); 乙腈(质谱级, 德国默克公司); 乙酸铵(色谱级, 美国 Fisher 公司)。

2 种干邑白兰地: 轩尼诗 XO(5 批次真酒样, 1 批次假酒样)、轩尼诗 VSOP(5 批次真酒样, 1 批次假酒样), 实验室抽检样品。

2.2 实验方法

样品前处理: 取 5 mL 酒液过 0.45 μm 滤膜, 上机检测。

2.3 仪器条件

2.3.1 液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: A: 10 mmol/L 乙酸铵溶液; B: 甲醇; 流速: 0.3 mL/min; 进样体积: 2 μL; 柱温: 35 °C; 洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 95%, 时间程序: 0~5.0 min, 95%B~5%B; 5.0~6.0 min, 5%B; 6.0~6.5 min, 5%B~95%B; 6.5~10.0 min, 95%B~95%B。

2.3.2 质谱条件

离子源: ESI, 负离子扫描模式; 毛细管电压: 2.5 kV; 脱溶剂气温度: 350 °C; 采集方式: 全扫描/数据依赖二级扫描(Full MS/ddMS2), 一级质谱分辨率: 70000, 扫描范围: 65~350 *m/z*; 二级质谱分辨率: 17500, 触发顶点: 8.00e³, TopN: 5, 碰撞能量 NCE: 30,50,80。

3 结果分析

3.1 酒样超高效液相色谱-串联高分辨质谱数据分析

采用 Compound Discoverer 3.0(CD3.0)组学软件分析

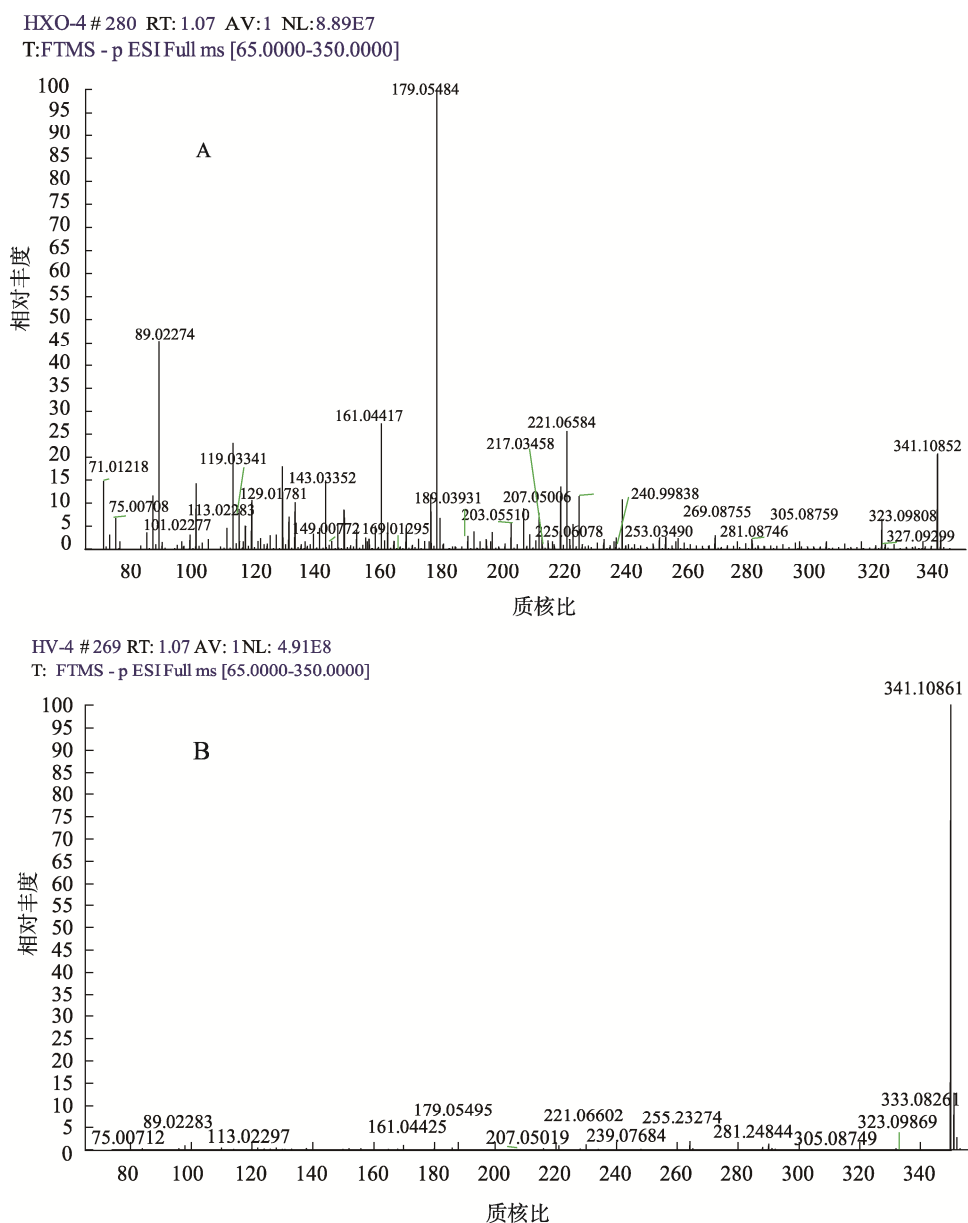
酒样 UPLC-HRMS 质谱数据。CD3.0 集成了化合物数据库和统计分析工具, 能够自动、快速处理高分辨质谱仪采集的数据, 比较样品间色谱和质谱信息的差异实现常用组学统计分析(如 PCA、聚类分析: clustering analysis, CA 等)绘制出 PCA 二维散点图、聚类树图和化合物检索匹配功能, 给出样品中化合物元素组成和结构预测信息。

3.1.1 特征质谱图

在各样品总离子流色谱图中, 保留时间为 1.07 min 处质谱响应值达到最大, 说明样品中大部分化合物在该保留

时间下流出, 从此处提取的一级质谱图能较真实反映样品中所含化合物的种类, 提取该时间窗下的一级质谱图可以获得样品的特征质谱图, 或叫做指纹谱图, 如图 1 所示。

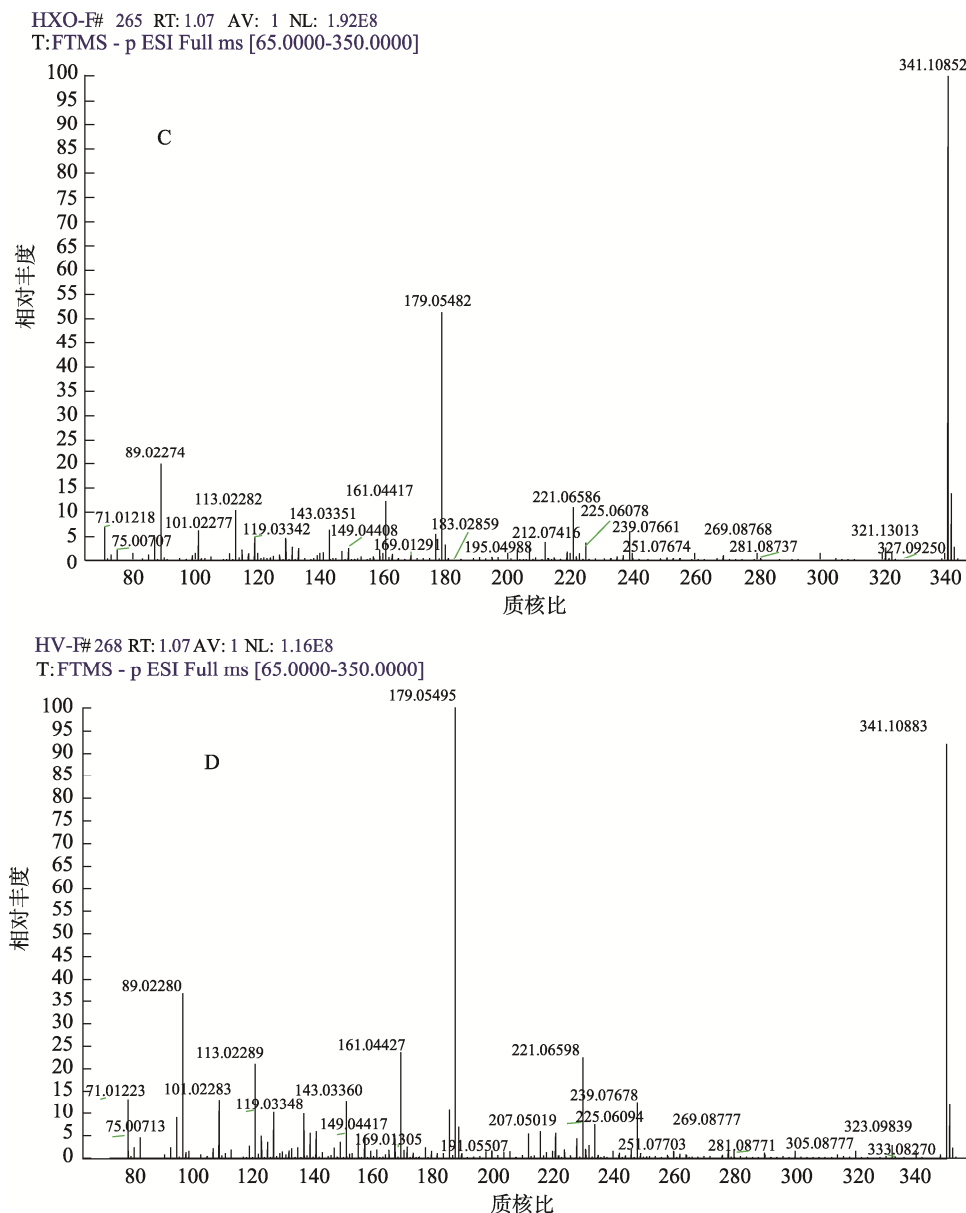
从图 1A、B 中可以看出 2 类型样品在质核比 m/z 为 65~350 区间有明显区别, 轩尼诗 XO 中的化合物种类更加丰富。从图 1A、C 中可以看出假轩尼诗 XO 中 m/z 为 341 与 179 的强度比与真轩尼诗 XO 中强度比相反, 同时假酒样中化合物种类较少。从图 1B、D 中可以看出假轩尼诗 VSOP 的质谱图与真轩尼诗 VSOP 质谱图差别很大。



注: A 为真轩尼诗 XO, B 为真轩尼诗 VSOP。

图 1 质谱图

Fig1 Mass spectrograms



注: C 为假轩尼诗 XO, D 为假轩尼诗 VSOP。

续图 1 质谱图

Fig1 Mass spectrograms

3.1.2 主成分分析

将样品分为真轩尼诗 XO 组、真轩尼诗 VSOP 组以及假轩尼诗 XO 组、假轩尼诗 VSOP 组通过 CD3.0 组学软件的分析。得出 PCA 分析及 CA 聚类分析如图 2。从图 2A 中可以看出真轩尼诗 XO 样品和真轩尼诗 VSOP 样品被明显区分出来, 说明同一品牌干邑白兰地具有区分不同等级的特征性成分, 同时该方法又可以区分出假的干邑白兰地。从图 2B 化合物热图中可以看出真轩尼诗 XO 中的物质复杂程度远大于真轩尼诗 VSOP, 这也印证了轩尼诗 XO 比 VSOP 香气优雅浓郁, 口味细腻丰满的品质特征。假的轩尼诗 XO 样品中化合物种类远比真轩尼诗 XO 少, 说明这是一个比较典型的以低档充高档的造假案例。

3.1.3 差异化合物分析

(CD3.0) 分析软件能很直观的给出每个化合物在各样品中分布信息, 便于快速找到样品间的差异性特征化合物, 本文选取 2 个化合物为例提取色谱图, 如图 3 所示。从图 3A 中可以看出 $m/z=342.11585$ 这个化合物在 VSOP 中含量比 XO 高, 而假 XO 样品中该物质的含量比真 XO 样品含量高, 假轩尼诗 VSOP 样品中该物质的含量比真 VSOP 样品含量低; 图 3B 说明 $m/z=198.05176$ 这个化合物在轩尼诗 XO 远高于 VSOP, 而假 XO 样品中该物质的含量比真 XO 样品含量低, 假轩尼诗 VSOP 样品中该物质的含量比真 VSOP 样品含量高, 通过软件分析可以简单快速找到差异性特征化合物。

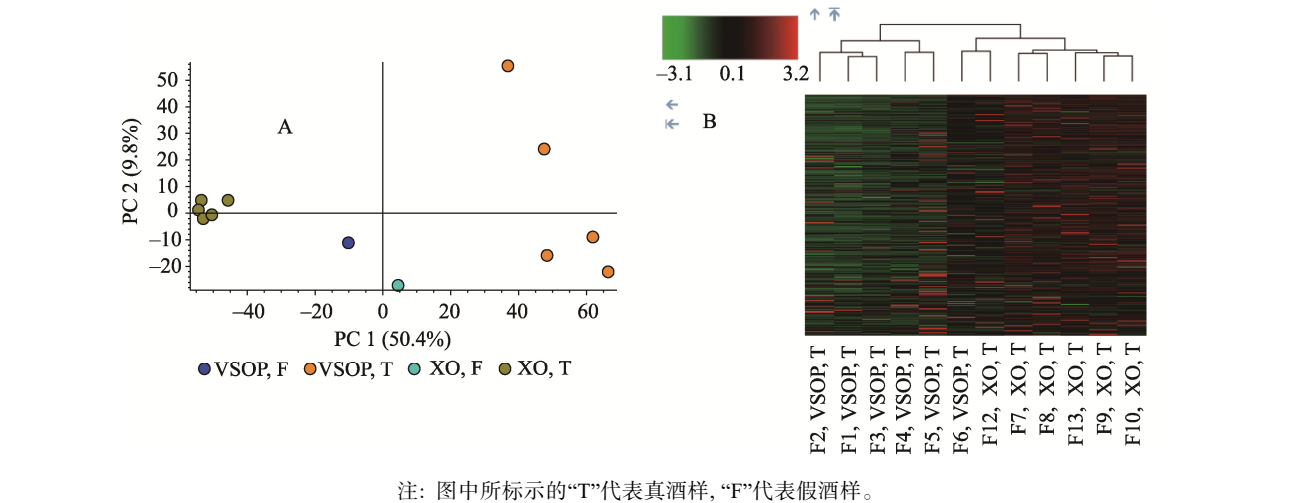


图 2 轩尼诗系列样品化合物主成分分析图(A)聚类热分析图(B)

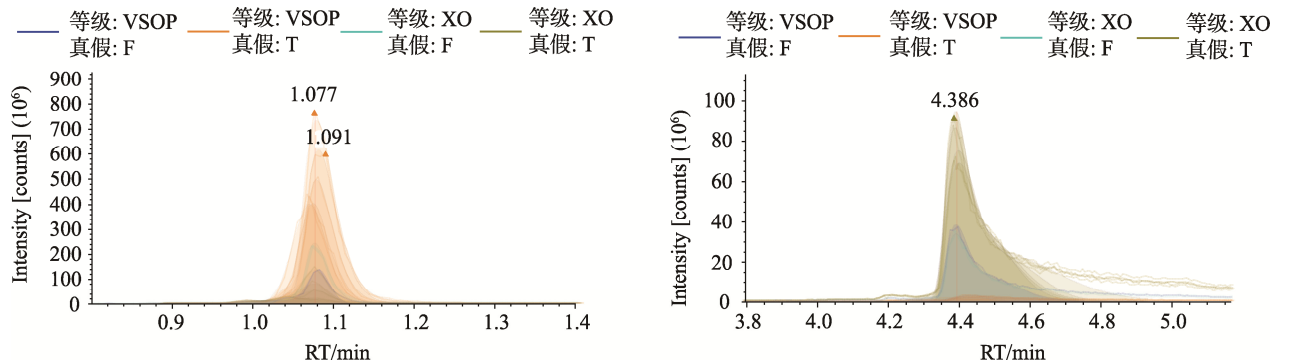


图 3 各酒样中色谱图差异

Fig.3 Difference of chromatograms in different wine samples

3.2 化合物分析

根据软件给出的化合物分布信息筛选出轩尼诗 XO 真酒样品中含有的特征化合物离子经过 Compound Discoverer 3.0 软件根据母离子的精确质量数、母离子同位素组成及二级质谱信息进行元素组成的确定并检索 mzCloud 质谱数据库进行匹配, 当匹配度大于 85%时共检索出 16 种酸 1 种醛 1 种吡啶 1 种酯及双乙酰。结果如表 1。

表 1 mzCloud 检索化合物 Table 1 mzCloud retrieval compounds			
序号	化合名称	分子式	分子质量
1	乳酸	C ₃ H ₆ O ₃	90.03169
2	香草醛	C ₈ H ₈ O ₃	152.04734
3	辛酸	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.11503
4	丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.05282
5	癸酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.14633
6	乙酰丙酸	C ₅ H ₈ O ₃	116.04734
7	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	170.02152

续表 1			
序号	化合名称	分子式	分子质量
8	月桂酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.17763
9	3-羟基-2-甲基吡啶	C ₆ H ₇ NO	109.05276
10	双乙酰	C ₄ H ₆ O ₂	86.03678
11	桂皮酸	C ₉ H ₈ O ₂	148.05243
12	巴豆酸	C ₄ H ₆ O ₂	86.03678
13	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	188.10486
14	豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.20893
15	豆蔻酸乙酯	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.24023
16	奎尼酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.06339
17	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.05791
18	苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₂	122.03678
19	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	192.02700

4 结果与讨论

本研究采用超高效液相色谱-四级杆/静电轨道阱高分

辨质谱法分析了轩尼诗干邑白兰地的不同等级的共计 10 个真酒样品和 2 个假酒样品。基于食品组学技术应用主成分分析研究真假酒和不同等级酒之间的差异,同时通过 mzCloud 数据库对特征化合物进行分析鉴定,并通过高分辨质谱全扫描得到真酒样品的指纹图谱。结果表明真假酒之间、不同等级的酒之间能实现明显区分,聚类趋势明显。通过组学软件筛选出差异性特征化合物,并鉴定出 19 种化合物。该方法稳定可靠,快速准确,为干邑白兰地的真假鉴别提供了一种分析方法。

参考文献

- [1] 赵玉平, 李记明, 徐岩, 等. 张裕 XO 级白兰地挥发性成分的提取分离与鉴定[J]. 色谱, 2008, (2): 212-222.
Zhao YP, Li JM, Xu Y, *et al.* Extraction, separation and identification of volatile constituents from Changyu XO grade brandy [J]. Chin J Chromatogr, 2008, 26(2): 212-222.
- [2] 高云, 汪廷彩, 张静, 等. 真假干邑白兰地的鉴定研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 2881-2886.
Gao Y, Wang TC, Zhang J, *et al.* Progress in the identification of true and false cognac [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(12): 2881-2886.
- [3] GB/T 11856-2008 白兰地[S].
GB/T 11856-2008 Brandy [S].
- [4] 于波, 张葆春. 干邑白兰地的魅力之源[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2011, (6): 106-109.
Yu B, Zhang BC. The charm of cognac [J]. Chin Foreign Grapes Wine, 2011, (6): 106-109.
- [5] DB 44/T 1114-2013 干邑白兰地品质鉴定技术规范[S].
DB 44/T 1114-2013 Technical specification for quality identification of cognac [S].
- [6] (EC)110/2008 关于烈性酒的定义、描述、说明、标签和地理标志保护[S].
(EC)110/2008 Definition, description, description, labelling and geographical indication protection of spirits [S].
- [7] 王莉. 欧盟地理标志产品管理研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
Wang L. Research on product management of eu geographical indications [D]. Changchun: Jilin University, 2015.
- [8] 曾玩嫻, 余婉乔, 李小那. 干邑白兰地真伪的鉴定方法初探[J]. 酿酒科技, 2007, (9): 98-100.
Zeng WX, Yu WQ, Li XN. A preliminary study on the identification method of the authenticity of cognac in cognac [J]. Liq-Mak Sci Technol, 2007, (9): 98-100.
- [9] 程劲松. 洋酒为何要戴假面具?[J]. 中国质量万里行, 2005, (5): 60.
Cheng JS. Why do foreigners wear masks? [J]. China Qual Wanlixing, 2005, (5): 60.
- [10] 王森, 刘英. 制售假酒案的侦办难点及打防对策[J]. 中国防伪报道, 2018, (6): 60-61.
Wang S, Liu Y. Investigation difficulties and countermeasures of producing and selling fake wine cases [J]. China Anti-Count Report, 2018, (6): 60-61.
- [11] 佚名. 散装酒穿上“马甲”变“名酒”[J]. 中国防伪报道, 2018, (10): 67.
Anonymity. Loose wine put on “waistcoat” and become “famous wine” [J]. China Anti-Counterfeit Report, 2018, (10): 67.
- [12] 王雪莲. “真瓶装假酒”销售如何定性[N]. 江苏法制报, 2016-10-13(00C).
Wang XL. How to determine the sales of “fake wine in real bottles” [N]. Jiangsu Legal Daily, 2016-10-13(00C).
- [13] DB 44/T 1114-2013 干邑白兰地品质鉴定技术规范[S].
DB 44/T 1114-2013 Technical specification for quality identification of cognac [S].
- [14] Reynolds. Managing wine quality [M]. English: Woodhead Publishing, 2010.
- [15] Ledauphin J, Saint-Clair JF, Lablanquie O, *et al.* Identification of trace volatile compounds in freshly distilled Calvados and cognac using preparative separations coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(16): 28-40.
- [16] 田宏, 熊月丰, 包斌, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 代谢组学技术分析不同系列白酒特征性化合物[J]. 现代食品科技, 2017, 33(3): 317-322.
Tian H, Xiong YF, Bao B, *et al.* Analysis of characteristic compounds in different series of liquor based on hs-spmc-gc-ms metabolomics [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(3): 317-322.
- [17] 邵远洋, 徐国杰, 晋小雁, 等. 基于高分辨液质联用技术的不同产地鲜丹参药材品质分析[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(11): 946-953.
Shao YY, Xu GJ, Jin XY, *et al.* Quality analysis of fresh salvia miltiorrhiza from different origins based on high resolution liquid mass combined application technology [J]. J Beijing Univ Chin Med, 2017, 40(11): 946-953.
- [18] 程明川, 姜川, 杨宇, 等. 基于高分辨质谱和代谢组学分析方法的白酒成分分析和香型鉴别[J]. 环境化学, 2016, 35(12): 2618-2621.
Cheng MC, Jiang C, Yang Y, *et al.* Composition analysis and flavor identification of liquor based on high resolution mass spectrometry and metabolomics analysis [J]. Environ Chem, 2016, 35(12): 2618-2621.
- [19] 王雨, 焦珊瑶, 刘亚, 等. 食品组学研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(5): 277-283.
Wang Y, Jiao SY, Liu Y, *et al.* Advances in food omics [J]. Food Ferment Ind, 2018, 44 (5): 277-283.
- [20] 俞邱豪, 张九凯, 叶兴乾, 等. 基于代谢组学的食品真实属性鉴别研究进展[J]. 色谱, 2016, 34(7): 657-664.
Yu QH, Zhang JK, Ye XQ, *et al.* Advances in the identification of food authentic properties based on metabonomics [J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(7): 657-664.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



刘嘉飞, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 183158863@qq.com

梁旭霞, 博士, 主任技师, 研究方向为食品理化检验与食品安全。

E-mail: liangxuxia@126.com