

# pH

(A31, Oeno 438-2011)

## 1 原理

测量浸入待测溶液的两个电极的电位差。一个电极记录了与溶液的 pH 相对应的电位,同时另一个电极作为参比电极具有已知的电位。

## 2 仪器

### 2.1 pH 计

具有 pH 单位的刻度,可以测量精确至  $\pm 0.01$  pH 单位。

### 2.2 电极

玻璃电极,保存于蒸馏水中;

饱和甘汞氯化钾参比电极,保存于饱和氯化钾溶液中;或复合电极,保存于蒸馏水中。

## 3 试剂

饱和酒石酸氢钾溶液:含 5.7 g/L 酒石酸氢钾 ( $\text{CO}_2\text{HC}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{CO}_2\text{K}$ ) ( $20^\circ\text{C}$ )。(每 200 mL 加入 0.1 g 百里酚,可使此溶液最多保存 2 个月)

$$\text{pH} \begin{cases} 20^\circ\text{C} \text{ 时}, 3.58 \\ 25^\circ\text{C} \text{ 时}, 3.56 \\ 30^\circ\text{C} \text{ 时}, 3.55 \end{cases}$$

邻苯二甲酸氢钾溶液:0.05 mol/L,含 10.211 g/L 邻苯二甲酸氢钾 ( $\text{CO}_2\text{HC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{K}$ ) ( $20^\circ\text{C}$ )。(此溶液最多保存 2 个月)

$$\text{pH} \begin{cases} 15^\circ\text{C} \text{ 时}, 3.999 \\ 20^\circ\text{C} \text{ 时}, 4.003 \\ 25^\circ\text{C} \text{ 时}, 4.008 \\ 30^\circ\text{C} \text{ 时}, 4.015 \end{cases}$$

磷酸缓冲液:3.402 g 磷酸二氢钾  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、4.354 g 磷酸氢二钾  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,加水定容至 1 L。(此溶液最多保存 2 个月)

注:可以使用 SI 商业参比缓冲溶液。

$$\text{pH} \begin{cases} 25^\circ\text{C} \text{ 时}, 1.679 \pm 0.01 \\ 25^\circ\text{C} \text{ 时}, 4.005 \pm 0.01 \\ 25^\circ\text{C} \text{ 时}, 7.000 \pm 0.01 \end{cases}$$

例如:  $25^\circ\text{C}$  时, pH  $1.679 \pm 0.01$

$25^\circ\text{C}$  时, pH  $4.005 \pm 0.01$

$25^\circ\text{C}$  时, pH  $7.000 \pm 0.01$



## 4 步骤

### 4.1 仪器调零

按照仪器说明书的要求,在进行任何测量前均需将仪器调零。

### 4.2 pH 计校准

pH 计必须在 20℃ 用 SI 标准缓冲溶液进行校准。量程必须包含葡萄汁和葡萄酒可能出现的 pH 范围。如果使用的 pH 计无法满足低值时的校准,则需使用与 SI 相关且具有与葡萄汁和葡萄酒可能出现 pH 接近的标准缓冲溶液进行验证。

### 4.3 测定

将电极浸入待测溶液,待测溶液温度应保持在 20℃ 或 25℃,尽量接近 20℃。直接读取 pH。

相同样品至少进行两次测定。最终结果为两次测定的算术平均值。

## 5 结果表述

pH 的结果保留两位小数。

# 有机酸和无机阴离子(离子色谱法)

(决议 Oeno 23/2004)

## 【前言】

在常规的光谱分析方法中,酚类物质在 210 nm 紫外波长处对吸收值具有较大的干扰,采用离子色谱法经离子交换柱可以将绝大多数有机酸和阴离子分离,通过对导电性的检测,避免了这种干扰。尤其在红酒分析领域,对比试验和回收率的结果显示确认该方法有效可行。

## 1 应用对象和范围

本离子色谱法适用于检测酒精饮料(葡萄酒、葡萄蒸馏酒和甜酒)中的无机阴离子和有机酸。适宜检测浓度范围如表 1,该浓度范围指的是经过稀释的后待进样的范围。

表 1 离子色谱法分析的阴离子浓度范围

硫酸盐	0.1 mg/L~10 mg/L
磷酸盐	0.2 mg/L~10 mg/L
苹果酸	1 mg/L~20 mg/L
酒石酸	1 mg/L~20 mg/L
柠檬酸	1 mg/L~20 mg/L
异柠檬酸	0.5 mg/L~5 mg/L

上述的溶液浓度范围只是一个示例,需要结合实际情况为:常见的仪器校准范围,对仪器类型(柱子性能、检测器灵敏度等)和检测条件(进样温度、稀释倍数等)等综合考虑。

## 2 原理

离子交换树脂对无机和有机阴离子进行分离,检测其导电性。采用保留时间定性,采用标准曲线法定量。

## 3 试剂

分析过程中的所有试剂均为分析纯。制备溶液所用水为电导率小于 0.06  $\mu\text{S}$  的蒸馏水或去离子水,水中所含待测离子浓度应低于仪器检测低限。

### 3.1 洗脱液

洗脱液的组成与分离柱的性质、待分离物质的特性有关。最常使用洗脱液为氢氧化钠溶液。氢氧化钠溶液的碳化会降低色谱分析的效能。流动相池在加入氢氧化钠溶液前,应用氮气吹扫,避免空气进入。可使用商业浓缩氢氧化钠溶液。

注:下文第 9 部分的表中列出了样品中存在的容易导致干扰的物质。在分析之前,有需要了解这些物质



是否会随同待测离子一起洗脱出来,是否在这一浓度范围同时存在。

发酵饮料含有琥珀酸,会影响苹果酸的测定。必要时向洗脱剂中加入甲醇以提高柱子对这两种物质的分辨率(20%甲醇)。

### 3.2 标准储备溶液

按表2中所列浓度的标准储备参比溶液。将一定质量的盐或对应质量的酸用水溶液在1 000 mL容量瓶中。

表2 标准参比溶液中待测离子的浓度

阴离子和酸	称量化合物	最终浓度/(mg/L)	称量质量/mg
硫酸盐	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500	739.5
磷酸盐	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	700	1003.1
苹果酸	苹果酸	1 000	1 000.0
酒石酸	酒石酸	1 000	1 000.0
柠檬酸	一水合柠檬酸	1 000	1 093.8
异柠檬酸	二水合异柠檬酸三钠	400	612.4

注:操作过程中应注意一些盐的吸潮性。

### 3.3 标准溶液

标准溶液是将每种离子或酸的标准储备溶液经过水稀释得到的,应当与待测样品中所含有的离子和酸的成分,具有相同的浓度范围。标准溶液必须现配现用。

至少选择两个标准溶液和一个空白溶液来建立标准曲线,对于每种物质,标准曲线至少有三个点(0、最大浓度一半、最大浓度)。

注:表1给出了标准曲线中离子和酸的最大浓度建议值,实际操作中使用浓度较低的溶液会使色谱柱的效能更好。所以可以尝试寻找最优的柱效和样品稀释水平组合。一般来说,除个别情况外,样品最大可以稀释50~200倍。为了延长稀释溶液的存放时间,可以使用水-甲醇溶液(80-20)来制备稀释溶液。

## 4 仪器

4.1 离子色谱仪系统,包括:

4.1.1 洗脱液池。

4.1.2 定量喷射泵,无脉冲效应。

4.1.3 进样器,手动或自动,具有环状进样阀(例如25 μL或50 μL)。

4.1.4 分离柱。具有可控效能的离子交换柱,可能有前置柱。

4.1.5 检测系统。具有很小体积的流动电导池连接至具有多个灵敏度范围的电导计。

为了降低洗脱剂的电导率,在电导池之前安装了一个化学抑制构件阳离子交换器。

4.2 天平:精确至1 mg。

4.3 容量瓶:10 mL~1000 mL。

4.4 校准移液管:1 mL~50 mL。

4.5 过滤膜:孔径 0.45  $\mu\text{m}$ 。

## 5 样品制备

根据待测的无机阴离子和有机酸浓度对样品进行稀释,若样品中的待测物的浓度不确定,做两个稀释水平以确保至少一个样品的稀释浓度落在标准曲线范围内。

## 6 步骤

按照仪器说明书打开仪器。调整泵(洗脱液流量)和检测器条件,使仪器能够在分析的范围浓度范围内得到较好的分离峰。平衡系统直至基线稳定。

### 6.1 标准曲线

按照 3.3 要求制备系列浓度的标准溶液,并注射标准溶液。

根据每个点绘制标准曲线,最终的标准曲线必须符合线性要求。

### 6.2 空白试验

以配制标准溶液和样品的水为空白进样,并与标准品对照对其中的无机阴离子(氯离子、硫酸根离子等)进行定量。

### 6.3 分析

将 5 中制备好的样品进行分析,样品进样前用过滤膜(4.5)对稀释液进行过滤。

## 7 重复性、重现性

对该方法进行了实验室间测定,按照 ISO 5725 计算了每个离子的重复性限和重现性限。

每个分析重复 3 次。

参加实验室数量:11;结果如下:

表 3 白葡萄酒结果汇总

项目	实验室编号	平均/(mg/L)	重复性/(mg/L)	重现性/(mg/L)
苹果酸	11/11	2 745	110	559
柠檬酸	9/11	124	13	37
酒石酸	10/11	2 001	96	527
硫酸盐	10/11	253	15	43
磷酸盐	9/11	57	5	18

表 4 红葡萄酒结果汇总

项目	实验室编号	平均/(mg/L)	重复性/(mg/L)	重现性/(mg/L)
苹果酸	7/11	128	16	99
柠檬酸	8/10	117	8	99

表 4(续)

项目	实验室编号	平均/(mg/L)	重复性/(mg/L)	重现性/(mg/L)
酒石酸	9/11	2 154	8	44
硫酸盐	10/11	324	17	85
磷酸盐	10/11	269	38	46

## 8 回收率计算

加标的样品是一个白葡萄酒。

表 5 白葡萄酒加标样品结果汇总表

项目	实验室数量/ (mg/L)	初始浓度/ (mg/L)	实际添加/ (mg/L)	测量添加/ (mg/L)	回收率/%
柠檬酸	11/11	122	25.8	24.2	93.8
苹果酸	11/11	2 746	600	577	96.2
酒石酸	11/11	2 018	401	366	91.3

## 9 干扰风险

本方法中最常见的干扰物质如表 6 所示：

表 6 最常见的干扰物质汇总表

离子或酸	干扰物质
硝酸盐	溴化物
硫酸盐	草酸盐、马来酸盐
磷酸盐	邻苯二甲酸
苹果酸	琥珀酸、柠草酸
酒石酸	丙二酸
柠檬酸	
异柠檬酸	

注：流动相中加入甲醇能够一定程度解决分析中的问题。

# 莽草酸

(决议 Oeno 33/2004)

## 1 介绍

莽草酸(3,4,5-三羟甲基-1-环己烯-1-羧酸)由奎宁酸脱水生物法合成,可以作苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和植物生物碱的前体,是一种经常在水果中发现的小型羧酸。

经过国际联合比对实验确认,本方法可有效应用于分析葡萄酒样品中天然存在的 10 mg/L~150 mg/L 莽草酸。该方法经过实验室间使用 HPLC、GC/FID 和 GC/MS 方法进行比对,进一步确认了其真实性。

## 2 范围

本文介绍了采用高效液相色谱法测定莽草酸含量在 1 mg/L~300 mg/L 范围内的红葡萄酒、桃红葡萄酒和白葡萄酒(包括气泡葡萄酒和特种葡萄酒)。此方法用于气泡葡萄酒检验时,样品应先进行脱气处理(建议超声法)。

## 3 原理

无需前处理,使用有联用柱的高效液相色谱对葡萄酒样品中的莽草酸直接进行测定。第一步,葡萄酒中的有机酸被  $C_{18}$  反相柱预分离,然后在 65℃ 下用阳离子交换柱进行进一步分离。使用轻微酸化的水作为洗脱液,莽草酸可以从基线中显露出来,葡萄酒基质无干扰。因为环己烯双键共轭作用,莽草酸具有强烈的吸收,可以使用紫外检测器在 210 nm 波长处进行检测。

## 4 试剂和材料

- 4.1 莽草酸,纯度至少为 98%。
- 4.2 0.5 mol/L 硫酸。
- 4.3 双蒸水。
- 4.4 洗脱液的制备(0.01 mol/L 硫酸溶液):吸取 20 mL 0.5 mol/L 的硫酸溶液转移至 1 000 mL 的容量瓶中,加入约 900 mL 双蒸水,摇匀后定容,使用 0.45  $\mu$ m 滤膜进行过滤,脱气。
- 4.5 标准储备溶液的制备(500 mg/L 莽草酸):准确称量 50 mg 莽草酸,完全转移至 100 mL 容量瓶中,加入大约 90 mL 双蒸水,摇匀后定容。-18℃ 下该储备液可以存放数月。
- 4.6 标准工作溶液的制备:用双蒸水将 500 mg/L 的储备液稀释至 5 个标准工作溶液,分别为 5 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L。标准工作溶液现配现用。

## 5 仪器

### 5.1 高效液相色谱系统

- 5.1.1 具有六向进样阀,5  $\mu$ L 进样器或其他装置的高效液相色谱仪。



- 5.1.2 泵系统,可形成精确、稳定的流速。
- 5.1.3 柱加热系统,可以使 300 mm 柱加热至 65℃。
- 5.1.4 UV-VIS 检测器,可在 210 nm 波长下检测。
- 5.1.5 积分仪或其他数据采集装置。

## 5.2 HPLC 不锈钢柱

### 5.2.1 保护柱

建议在分析柱之前装一个适当的前柱。

### 5.2.2 分析柱系统

#### 5.2.2.1 反相柱

材料:不锈钢。内径:4 mm~4.6 mm。长度:200 mm~250 mm。

固定相:球状 C<sub>18</sub>反相材料,颗粒直径 5 μm\*。

#### 5.2.2.2 阳离子交换柱(可加热至 65℃)

材料:不锈钢。内径:4 mm~7.8 mm。长度:300 mm。

固定相:磺酸化立体二乙烯苯胶体型树脂(S-DVB),氢包裹,交联度为 8%\*\*。

## 6 样品

干净的样品可直接装入样品瓶,无需前处理直接上机。若样品浑浊可用 0.45 μm 滤膜过滤后,舍弃最初滤出液,上机。

## 7 步骤

### 7.1 HPLC 的操作条件

用全环状进样系统将 5 μL 葡萄酒注入色谱仪。

流速:0.4 mL/min(如果阳离子交换柱的内径是 4 mm);

0.6 mL/min(如果阳离子交换柱的内径是 7.8 mm)。

流动相:0.01 mol/L 硫酸溶液。

阳离子交换柱温度:65℃。

运行时间:40 min。

平衡时间:20 min(保证葡萄酒基质中的所有物质均被洗脱)。

检测器波长:210 nm。

进样体积:5 μL。

注:因为不同柱子的分离特性不同,且不同 HPLC 装置的死体积不同,莽草酸峰的保留时间可能会存在一定差异。莽草酸可以通过计算与酒石酸峰的相对保留值来进行鉴别。尝试不同的 C<sub>18</sub>反相柱和阳离子交换柱,计算出相对保留值为 1.33(±0.2)。

### 7.2 检测限

根据 OIV 协议计算本方法的检测限为 1 mg/L。

\* Lichrospher™ 100 RP-18, Hypersil™-ODS 或 Omnichrom™ YMC-ODS-A 等可作为参考的商业化固相柱。

\*\* Aminex™ HPX 87-H 或 Rezex™ ROA-Organic Acid 等可作为参考的商业化固相柱。



## 8 计算

用工作标准溶液(4.6)做一个5点标准曲线。

按外标法,可以通过对比待测液和工作曲线中莽草酸峰保留时间的峰面积进行莽草酸的定量。莽草酸的浓度以 mg/L 表述,结果保留1位小数。

## 9 精密度

本方法由19间国际实验室参与协同比对实验研究进行验证。研究包括红葡萄酒和白葡萄酒共5个不同样品。样品中莽草酸的浓度范围为10 mg/L~120 mg/L(见附录C)。

重现性和再现性的标准差与莽草酸的浓度关系(见附录B),实际方法精密度参数可依下列公式计算:

$$S_r = 0.0146 \times x + 0.2716$$

$$S_R = 0.0286 \times x + 1.4883$$

其中, $x$ 为莽草酸的浓度(mg/L)。

例如,莽草酸浓度为50 mg/L,此时:

$$S_r = \pm 1.0 \text{ mg/L}$$

$$S_R = \pm 2.92 \text{ mg/L}$$

## 10 附录

附录A为莽草酸与其他有机酸分离的典型色谱图。

附录B为莽草酸浓度与重现性标准差、再现性标准差的关系。

附录C为实验室间协同比对实验研究结果的统计数据。

## 参考文献

- [1] Römpp Lexikon Chemie-Version 2.0, Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag 1999.
- [2] Wallrauch S., Flüssiges Obst 3, 107-113(1999).
- [3] 44<sup>th</sup> Session SCMA, 23-26 march 2004, Comparison of HPLC-, GC- and GC-MS-Determination of Shikimic Acid in Wine, FV 1193.



## 附录 A 葡萄酒中有机酸的色谱图

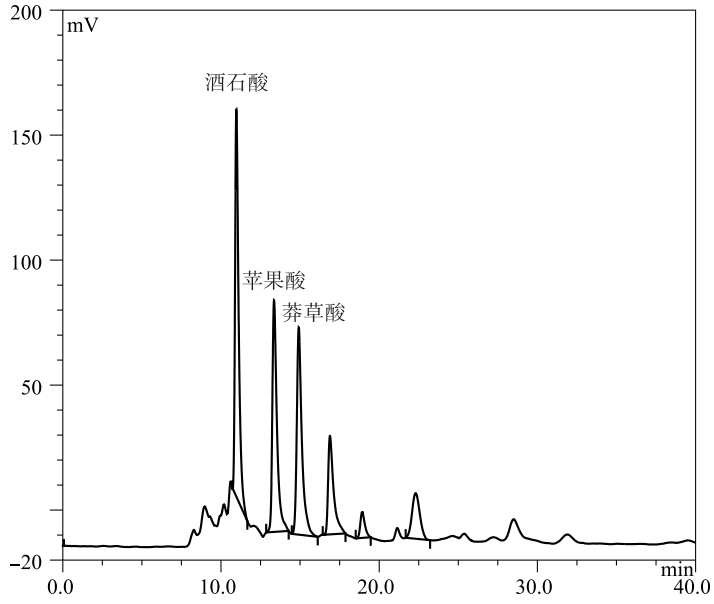


图 A.1

## 附录 B 莽草酸浓度与重现性和再现性标准差关系

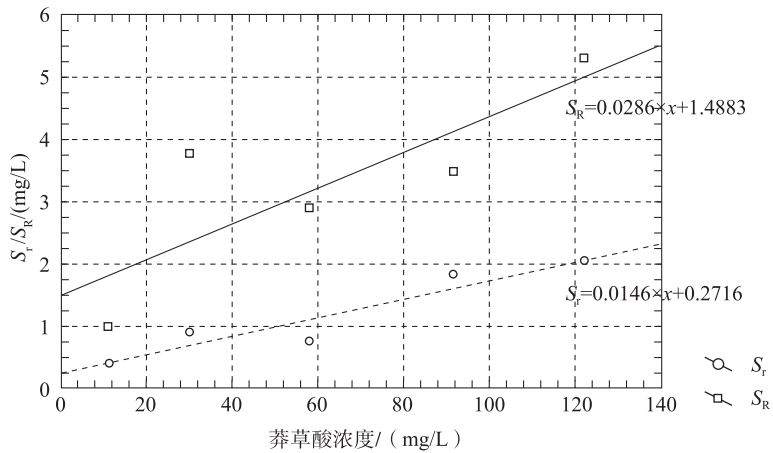


图 A.2

## 附录 C

### 方法准确度参数表

表 C.1

样品编号	A	B	C	D	E
参加比对实验室数量	19	19	19	19	19
接受实验结果的实验室数量	17	18	17	18	18
平均值	58.15	30.05	11.17	122.17	91.20
$S_r^2$	0.545 88	0.846 94	0.193 53	4.324 17	2.673 06
$S_r$	0.738 84	0.920 30	0.439 92	2.079 46	1.634 95
$RSD_r/\%$	1.27	3.06	3.93	1.70	1.79
$r$	2.07	2.58	1.23	5.82	4.58
$S_L^2$	8.452 21	13.270 78	0.730 13	24.627 37	8.555 08
$S_R^2$	8.998 09	14.117 73	0.923 66	28.951 54	11.228 14
$S_R$	2.999 68	3.757 36	0.961 07	5.380 66	3.350 84
$RSD_R/\%$	5.16	12.50	8.60	4.40	3.67
$R$	8.40	10.52	2.69	15.07	9.38
$S_r^2$ ——重复性方差。 $S_r$ ——重复性标准差。 $RSD_r$ ——重复性相对标准差, %。 $r$ ——重复性限。 $S_L^2$ ——实验室间方差。 $S_R^2$ ——再现性方差。 $S_R$ ——再现性标准差。 $RSD_R$ ——再现性相对标准差, %。 $R$ ——再现性限。					



## 山梨酸(毛细管电泳法)

(决议 Oeno 4/2006)

### 1 范围

本方法可用于测定葡萄酒中山梨酸含量,检测范围 0 mg/L~300 mg/L。

### 2 原理

带负电荷的山梨酸离子经毛细管电泳法分离,用紫外检测器在254 nm进行检测。

### 3 试剂和材料

#### 3.1 试剂

3.1.1 磷酸二氢钠,纯度>96%。

3.1.2 磷酸氢二钠,纯度>99%。

3.1.3 氢氧化钠,纯度>97%。

3.1.4 马尿酸钠,纯度>99%。

3.1.5 去离子水或双蒸水。

#### 3.2 迁移缓冲溶液

按下列方法制备迁移缓冲溶液:5 mmol/L 磷酸二氢钠;5 mmol/L 磷酸氢二钠。

#### 3.3 内标

0.5 g/L 马尿酸钠水溶液。

#### 3.4 洗脱液

3.4.1 0.1 mol/L 氢氧化钠。

3.4.2 1 mol/L 氢氧化钠。

### 4 样品制备

按照下列方法制备样品:

待分析的葡萄酒:0.5 mL;加入氢氧化钠溶液:0.5 mL,内标(3.1.4):0.5 mL,用双蒸水稀释至 10 mL。

### 5 操作条件

#### 5.1 毛细管电泳条件

首次使用之前,毛细管电泳应按照下列程序进行平衡:

5.1.1 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液在 140 kPa (20 psi)条件下冲洗 8 min。

5.1.2 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液在 140 kPa (20 psi)条件下冲洗 12 min。

5.1.3 用双蒸水在 140 kPa (20 psi)条件下冲洗 10 min。

5.1.4 用迁移缓冲溶液在 140 kPa (20 psi) 条件下冲洗 30 min。

## 5.2 迁移条件

这些条件可能根据使用设备的不同有轻微变动。

5.2.1 熔融二氧化硅毛细管长 31 cm, 直径 50  $\mu\text{m}$ 。

5.2.2 迁移温度: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.2.3 波长: 254 nm。

5.2.4 信号直读模式(山梨酸的紫外吸收)。

5.2.5 第一次预冲洗, 压力 210 kPa (30 psi), 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 30 s。

5.2.6 第二次预冲洗, 压力 210 kPa (30 psi), 缓冲溶液(3.2) 30 s。

5.2.7 进样, 压力 2.1 kPa (0.3 psi), 10 s。

5.2.8 一般极性下, 25 kV 电位差下, 迁移大约持续 1.5 min~2 min。

## 5.3 读数和结果

迁移开始 1 min~1.5 min 后, 可以检测到内标和山梨酸的吸收峰。迁移的目标物保留时间通常是固定的, 但会根据毛细管的不同有轻微变化。如果保留时间不符合要求, 则有必要修复毛细管, 如果无法修复, 则需更换毛细管。

## 6 方法的参数

按照 OIV 决议 Oeno 10/2005 规定。

### 6.1 重复性

表 1

重复性标准偏差 $S_r$	1.6 mg/L
重复性限 $r$	4.6 mg/L

### 6.2 线性

表 2

回归方程	$Y=0.994\ 91\ X+2.527\ 27$
相关系数 $r$	0.999 7
残余标准偏差 $S_{xy}$	1.6 mg/L
标准偏差斜率 $S_b$	0.008 mg/L

### 6.3 再现性

表 3

再现性标准偏差 $S_R$	2.1 mg/L
再现性限 $R$	5.8 mg/L

## 6.4 检测限和定量限

表 4

检测限 $LOD$	1.8 mg/L
定量限 $LQDV$	4.8 mg/L

## 6.5 稳定性

因方法是与标准品进行对比的,所以分析条件的轻微变化不会影响最终结果,但会影响目标物的保留时间。

## 6.6 特异性

经研究,酒类添加剂对检验结果没有影响。

## 6.7 与 OIV 推荐方法的比对

OIV 推荐方法是紫外吸收光谱法。在 256 nm 处测定通过水蒸气蒸馏出取的山梨酸的紫外吸收。

### 6.7.1 重复性对比

表 5

方法	毛细管电泳法	OIV 推荐方法
重复性标准偏差 $S_r$	1.6 mg/L	2.5 mg/L
重复性 $r$	4.6 mg/L	7.0 mg/L

### 6.7.2 与推荐方法有关的准确度参数

表 6

相关系数 $r$	0.999
平均偏差 $M_d$	0.03 mg/L
平均偏差标准偏差 $S_d$	3.1 mg/L
Z 值 ( $M_d/S_d$ )	0.01

## 有机酸和硫酸盐(毛细管电泳法)

(Oeno 5/2006, Oeno 407-2011 对其扩展)

### 1 介绍

葡萄酒样品稀释后,加入内标,用毛细管电泳法分离、检测其中的酒石酸、苹果酸、乳酸和硫酸盐等含量。

### 2 范围

毛细管电泳可以用于测定葡萄汁中的酒石酸和苹果酸,也可用于测定经稀释、脱气和过滤处理后的葡萄酒中的酒石酸、苹果酸和乳酸以及硫酸盐。

### 3 定义

#### 3.1 毛细管电泳法

使用一个直径非常小的毛细管,在高压电流作用下利用适当的缓冲溶液有效分离不同大小的带电分子。

#### 3.2 电泳缓冲溶液

包含一种或多种溶剂和水溶液,具有适当的电泳流动性,能调节 pH 的溶液。

#### 3.3 电泳迁移率

离子在电场作用下快速迁移的能力。

#### 3.4 电渗流

在二氧化硅的空间和电荷作用下,缓冲溶液中溶剂替代溶剂化离子沿着毛细管柱内壁流动。

### 4 原理

在内径  $25\ \mu\text{m}\sim 75\ \mu\text{m}$  的石英管内,混合物的水溶液受到毛细管电泳作用,利用不同化合物在缓冲溶液中迁移速度不同而达到分离目的。混合物溶液受到电场和电渗流两种驱动力,二者在同方向或反方向作用下达到分离效果。

电场以每厘米的电压来表示,即  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,可流动性是离子的特性。分子越小,电泳流动性越好。

如果毛细管的内壁无涂层,石英管固体表面的负电离子会吸附部分缓冲溶液的阳离子。根据电中性的要求,带电表面附近的液体中必有与固体表面电荷数量相等但符号相反的多余的阴离子。带电表面和反离子构成双电层,在电场力作用下形成了电渗流。可以通过改变缓冲溶液的 pH 和加入添加剂以调节电渗流的方向和强度。

通过向缓冲溶液中添加有色离子可能得到负峰,从而对那些在常用波长下没有很好吸



收的溶液进行定量。

## 5 试剂和材料

5.1 化学纯试剂,纯度至少 99%。

5.1.1 硫酸钠或硫酸钾。

5.1.2 L-酒石酸。

5.1.3 D,L-苹果酸。

5.1.4 一水合柠檬酸。

5.1.5 琥珀酸。

5.1.6 D,L-乳酸。

5.1.7 磷酸二氢钠。

5.1.8 葡萄糖酸钠。

5.1.9 氯酸钠。

5.1.10 吡啶二羧酸。

5.1.11 十六烷基三甲基溴化铵。

5.1.12 色谱用乙腈。

5.1.13 去离子超纯水。

5.1.14 氢氧化钠。

### 5.2 溶液

#### 5.2.1 标准储存溶液

配制浓度范围在 800 mg/L~1 200 mg/L 的各种酸和硫酸盐系列标准水溶液。5℃条件下,溶液最多可以保存一个月。

#### 5.2.2 内标溶液

约 2 g/L 氯酸钠水溶液。5℃时,溶液最多可以保存一个月。

#### 5.2.3 标准工作溶液

使用 A 级移液管和容量瓶,加入 2 mL 标准溶液和 1 mL 内标溶液,用去离子水定容至 50 mL。振荡使溶液均匀。溶液应当日配制。

#### 5.2.4 氢氧化钠溶液

##### 5.2.4.1 1 mol/L 氢氧化钠溶液

向 100 mL 容量瓶中放入 4 g 氢氧化钠。纯水定容。振摇直至完全溶解。

##### 5.2.4.2 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液

向 100 mL 容量瓶中移入 10 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液,用去离子水定容,摇匀。

#### 5.2.5 电泳缓冲溶液

0.668 g 吡啶二羧酸、0.364 g 十六烷基三甲基溴化铵、20 mL 乙腈和大约 160 mL 纯水加入 200 mL 容量瓶,摇振直至完全溶解(如有必要,可用超声),使用上述 1 mol/L 和 0.1 mol/L 浓度的氢氧化钠溶液调节 pH 至 5.64,加水定容至 200 mL。振荡均匀,室温保存。该溶液需每月配制。

该溶液也可以用同等效果的商业化溶剂代替。



## 6 仪器

本测定方法需要基本的毛细管电泳仪器,包含以下组件:

进样器;2个缓冲溶液瓶;

无涂层硅电泳毛细管(内径 50  $\mu\text{m}$ ,电泳毛细管进样口至检测池的长度至少 60 cm,为使毛细管出口能够浸入一个瓶子的中央,其长度需根据仪器不同额外增加 7 cm~15 cm);

高压直流电源(电压输出为一30 kV~+30 kV,电源两端分别连接毛细管所浸入的缓冲液);

压力系统(保证缓冲溶液的循环和试样的注入);

UV 检测器;数据采集系统。

## 7 样品的制备

### 7.1 脱气和过滤

富含二氧化碳的样品应使用超声脱气 2 min。

浑浊的样品应使用孔径为 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤。

### 7.2 稀释和添加内标物

量取 2 mL 样品移至 50 mL 的容量瓶,加 1 mL 内标溶液,加水定容至 50 mL,混匀备用。

## 8 步骤

### 8.1 新毛细管的活化(示例)

在压力大约为 276 kPa (2.76 bar 或 40 psi) 条件下以纯水反向冲洗 5 min,相同压力下用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液反向冲洗 5 min,相同压力下用纯水反向冲洗 5 min。重复纯水、0.1 mol/L 氢氧化钠溶液、纯水的循环。用电泳缓冲溶液反向冲洗 10 min。

### 8.2 已使用毛细管的重新活化(可选择)

当分离效率降低时,有必要对毛细管进行重新活化。如果活化后效果仍无法满足要求,更换毛细管后再活化。

### 8.3 检查毛细管的质量

在推荐的分析条件下将标准溶液测定 5 次。

### 8.4 分离和检测调节(示例)

开始检测前 1 h 打开检测器的灯,在压力约为 276 kPa(40 psi)条件下用缓冲溶液反向冲洗 3 min。在 6 s~15 s 内压力为 0.5 psi 下注入 7.1 的试样。两级固定好,保证正电极在检测器一端。电压 1 min 内由 0 kV~16 kV,然后维持 16 kV 约 18 min(分离过程会因毛细管柱的差异有轻微的不同)。保持温度 25°C,紫外检测器波长 254 nm。在 276 kPa(40 psi)压力下使用电泳缓冲溶液(5.2.5)反向冲洗 2 min。每 6 次进样需更换进口和出口瓶子中的电泳缓冲溶液。

### 8.5 分析的顺序(示例)

每一个新的分析序列均要更换电泳缓冲溶液。



分析序列的顺序包括:标准物质的分析(待测的各种酸的已知浓度的外标物)。

分析如 7.2 制备的样品,色谱图如附录 A 中所列谱图。

分析结束,用去离子水反向冲洗 10 min。

关闭检测器灯。

## 9 结果计算

用内标法进行校正,计算每种酸的响应因子。进样后,分别读取样品和内标的峰面积,并根据响应因子,计算待测物的准确浓度。可以使用自动数据处理系统,完成计算。(计算响应因子和建立标准曲线)。

样品中待测酸的浓度可按下列公式计算:

$$c_E = \frac{c_{AR} \times S_{AE} \times S_{EIR}}{S_{AR} \times S_{EIE}}$$

峰面积用积分的数值来表示:

浓度单位为 g/L(仅保留两位小数)。

表 1

项目	标准溶液	样品
酒石酸峰面积	$S_{AR}$	$S_{AE}$
内标物峰面积	$S_{EIR}$	$S_{EIE}$
浓度	$c_{AR}$	$c_E$

## 10 精密度

### 10.1 实验的组织

实验室间比对试验和结果见附录 B 和附录 C。

### 10.2 精度测量

实验室间比对实验的精密数据汇总见表 2。

参加实验室数量:5

表 2

项目	酒石酸	苹果酸	乳酸
平均浓度/(mg/L)	1 395	1 884	1 013
重复性标准偏差平均值/%	38	54	42
再现性标准偏差平均值/%	87	113	42



## 附录 A ACI 标准溶液电泳图

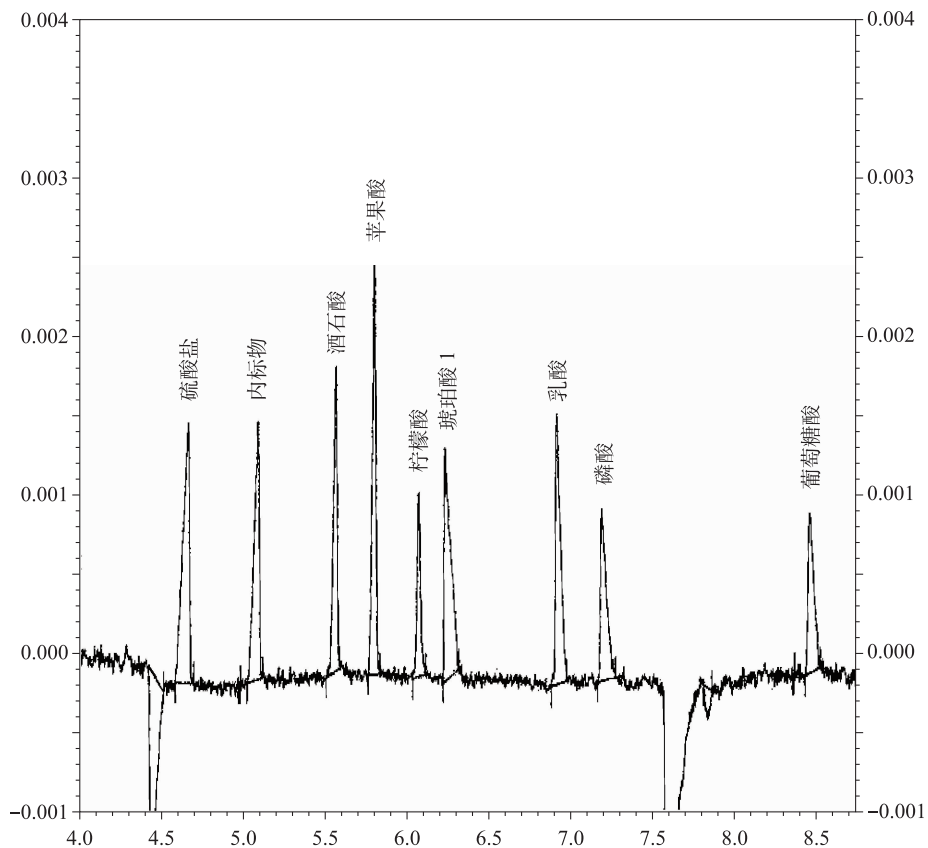


图 A.1



葡萄酒的电泳图

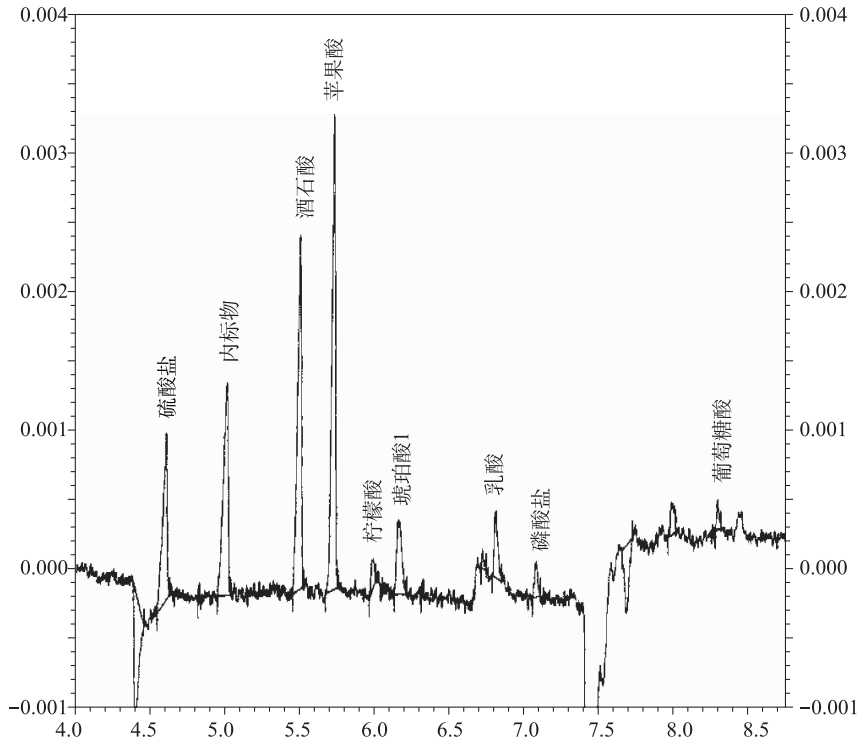


图 A.2

## 附 录 B

### 实验室间比对试验结果的统计数据(2006)

根据 ISO 5725-2:1994。参照了实验室指导《Direction Générale de la Consommation et de la Répression des Fraudes de Bordeaux(France)》，实验室间比对实验结果汇总如下：

实验年份:2006

参加实验室数量:5

样品数量:8 双盲样(2 干白,2 甜白,2 桃红酒 和 2 红酒)

样品	实验室间比对试验检测结果毛细管电泳法测定酒石酸的结果/(mg/L)							
	干白葡萄酒		白葡萄酒		桃红葡萄酒		红葡萄酒	
	A+D	B+C	E+F	G+H	I+J	K+L	M+N	O+P
参加实验室数量	5	5	5	5	5	5	5	5
可接受的结果数量	5	5	4	5	5	5	4	5
平均值/(mg/L)	1943	2563	1440	255	553	1885	1373	1148
可接受的值/(mg/L)	1943	2563	1387	2217	1877	1593	1370	1830
重复性标准偏差( $S_r$ )	27	25	106	23	40	31	25	24
重复性变异系数/%	1.4	1.0	7.7	1.0	2.2	1.9	1.8	1.3
重复性限( $r$ )	77	70	298	65	113	86	70	66
再现性标准偏差( $S_R$ )	96	128	174	80	57	55	52	53
再现性变异系数/%	4.9	5	12.6	3.6	3	3.5	3.8	2.9
再现性限( $R$ )	268	359	488	223	160	154	145	148



样品	实验室间比对检测结果毛细管电泳法则测定苹果酸的结果/ (mg/L)							
	干白葡萄酒		白葡萄酒		桃红葡萄酒		红葡萄酒	
	A+D	B+C	E+F	G+H	I+J	K+L	M+N	O+P
参加实验室数量	5	5	5	5	5	5	5	5
可接受的结果数量	5	5	5	5	5	5	4	5
平均值/ (mg/L)	2571	1602	1680	2539	3524	2109	173	869
可接受的值/ (mg/L)	2571	1602	1680	2539	3524	2109	177	869
重复性标准偏差 ( $S_r$ )	54	19	113	35	61	109	7	32
重复性变异系数/%	2.1	1.2	6.7	1.4	1.7	5.2	4.1	3.7
再现性限 ( $r$ )	151	54	315	99	170	305	20	89
再现性标准偏差 ( $S_R$ )	90	51	171	97	279	142	21	53
再现性变异系数/%	13.6	9.8	41	39.6	14.7	9	14.1	7.6
再现性限 ( $R$ )	252	142	479	273	782	397	59	148
样品	实验室间比对试验检测结果毛细管电泳法测定乳酸的结果/ (mg/L)							
	干白葡萄酒		白葡萄酒		桃红葡萄酒		红葡萄酒	
	A+D	B+C	E+F	G+H	I+J	K+L	M+N	O+P
参加实验室数量	5	5	5	5	5	5	5	5
可接受的结果数量	4	5	5	5	5	5	4	5
平均值/ (mg/L)	659	1324	258	255	553	1885	2066	1148
可接受的值/ (mg/L)	650	1324	258	255	553	1885	2036	1148
重复性标准偏差 ( $S_r$ )	20	42	20	39	27	99	75	16
重复性变异系数/%	3.1	3.2	7.8	15.1	4.8	5.3	3.7	16.0
再现性限 ( $r$ )	57	117	56	108	75	278	211	46
再现性标准偏差 ( $S_R$ )	20	42	20	39	27	99	75	16
再现性变异系数/%	13,6	9,8	41	39,6	14,7	9	14.1	7.6
再现性限 ( $R$ )	247	363	296	283	227	475	802	243



## 附录 C

### 实验室间实验结果的统计数据

(硫酸盐 2010)

根据 ISO 5725-2:1994, 参照 “Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto(Portugal)”。  
实验室间比对实验结果汇总如下:

试验年份:2010~2011

参加实验室数量:7(有一个实验室使用两台不同仪器报送了两个结果)

样品数:6 双盲样

表 1 葡萄酒

指标	白葡萄酒(A/G)	桃红葡萄酒(B/F)	桃红葡萄酒(C/O)	红葡萄酒(D/M)	白葡萄酒(E/N)	利口酒(I/K)	白葡萄酒(H/Q)	红葡萄酒(J/P)	利口酒(L)
参加实验室的数量	7	7	6	7	8	7	7	7	8
重复测量次数	2	2	2	2	2	2	2	2	2
最小值(以 $K_2SO_4$ 计)/(g/L)	0.71	0.34	0.40	0.62	1.79	1.06	1.38	1.96	2.17
最大值(以 $K_2SO_4$ 计)/(g/L)	0.88	0.54	0.52	0.75	2.40	1.35	1.70	2.30	2.85
重复性方差 $S_r^2$	0.0012	0.0011	0.0001	0.0016	0.0063	0.0013	0.0036	0.0015	0.0053
组内方差 $S_i^2$	0.00148	0.00230	0.00163	0.00055	0.01952	0.01082	0.00668	0.01744	0.03552
再现性方差 $S_R^2$	0.0027	0.0034	0.0018	0.0022	0.0258	0.0122	0.0103	0.0189	0.0408
平均值(以 $K_2SO_4$ 计)/(g/L)	0.78	0.43	0.44	0.69	2.01	1.19	1.49	2.15	2.41
重复性标准偏差(以 $K_2SO_4$ 计)/(g/L)	0.04	0.03	0.01	0.04	0.08	0.04	0.06	0.04	0.07
重复性限(以 $K_2SO_4$ 计)/(g/L)	0.100	0.093	0.031	0.115	0.224	0.103	0.170	0.109	0.206
重复性变异系数 CV	5%	8%	3%	6%	4%	3%	4%	2%	3%
再现性标准偏差(以 $K_2SO_4$ 计)/(g/L)	0.05	0.06	0.04	0.05	0.16	0.11	0.10	0.14	0.20
再现性限(以 $K_2SO_4$ 计)/(g/L)	0.148	0.165	0.118	0.132	0.454	0.312	0.287	0.389	0.572
再现性变异系数 CV	7%	14%	10%	7%	8%	9%	7%	6%	8%
HORRAT 值	1.1	2.1	1.5	1.1	1.6	1.7	1.3	1.3	1.7

## 参 考 文 献

- [1] ARELLANO M. ,COUDERC F. and PUIG . L(1997); Simultaneous separation of organic and inorganic acids by capillary zone electrophoresis. Application to wines and fruit juices. Am. J. Enol. Vitic. , 48, 408-412.
- [2] KANDL T. and KUPINA S. (1999); An improved capillary electrophoresis procedure for the determination of organics acids in grape juices and wine. Am. J. Enol. Vitic. ,50,155-161.
- [3] KLAMPF C. F. (1999); Analysis of organic acids and inorganic anions in different types of beer using capillary zone electrophoresis. J. Agric. Food Chem. ,47,987-990.



## 山梨酸、苯甲酸和水杨酸

(决议 Oeno 6/2006)

### 1 介绍

山梨酸及其钾盐作为一种防腐剂,可用于葡萄酒生产。然而,在乳酸菌作用下,山梨酸降解会生成天竺葵的气味,所以有些国家规定在葡萄酒中不得检出山梨酸。而苯甲酸和水杨酸虽然在其他饮料中允许使用,但在葡萄酒中禁止使用。

### 2 范围

本方法可用于检测各种葡萄酒、葡萄汁中的山梨酸、苯甲酸或水杨酸,尤其适用于痕量级含量的样品。

### 3 原理

样品经 HPLC 反相色谱柱分离,在 235 nm 波长进行检测,可以对防腐剂进行定量分析。

### 4 试剂

4.1 纯净水(电阻率大于  $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ )。

4.2 四氢呋喃,色谱纯。

4.3 甲醇,色谱纯。

4.4 0.1 mol/L 盐酸溶液。

4.5 pH 为 2 的水:650 mL 水中逐滴加入 0.1 mol/L 盐酸溶液,至 pH 为 2。

4.6 洗脱液:取 650 mL pH 为 2 的水、280 mL 甲醇和 7 mL 四氢呋喃,混合均匀。

注:也可以使用其他的洗脱溶液,例如:用乙酸调节 pH 为 4 的 80% 0.005 mol/L 乙酸铵+20%乙腈。

4.7 山梨酸。

4.8 苯甲酸。

4.9 水杨酸。

4.10 乙醇。

4.11 50%乙醇-水溶液:将 500 mL 乙醇转移至 1 L 的容量瓶中,用水定容至 1 L。

4.12 标准储备液:将 50 mg 山梨酸、苯甲酸和水杨酸溶解于 100 mL 的 50%乙醇-水溶液中。

4.13 标准溶液:将上述标准储备液,用 50%乙醇-水溶液分别稀释至所需浓度,例如:

——200 mg/L:将 20 mL 储备溶液稀释到 50 mL。

——20 mg/L:将 2 mL 储备溶液稀释到 50 mL。

### 5 仪器

5.1 实验室常用玻璃器皿,包括移液管和容量瓶。



- 5.2 超声清洗机。
- 5.3 大体积真空过滤装置(1 L),滤膜孔径小于1  $\mu\text{m}$ (通常 0.45  $\mu\text{m}$ )。
- 5.4 小体积样品过滤装置(1 mL~2 mL),滤膜孔径小于1  $\mu\text{m}$ (通常 0.45  $\mu\text{m}$ )。
- 5.5 pH计。
- 5.6 液相色谱仪,配备有小体积进样装置,例如 10  $\mu\text{L}$ ~20  $\mu\text{L}$  环状进样阀。
- 5.7 紫外检测器,可在 235 nm 波长处检测。
- 5.8 5  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub>柱子,长 20 cm,内径 4 mm。
- 5.9 数据采集系统。

## 6 样品和洗脱液制备

- 6.1 使用过滤装置过滤样品。
- 6.2 使用超声对洗脱液进行脱气 5 min。
- 6.3 使用过滤装置过滤其他溶剂。

## 7 步骤

- 7.1 色谱柱平衡:进样前,打开泵用流动相冲洗至少 30 min。
- 7.2 将一定浓度的标准工作液注入系统,检查仪器的灵敏度,确保色谱峰满足分析的需求。
- 7.3 将待分析样品注入系统,另外可分析一个加标样品。对比葡萄酒和加标样品中目标物的色谱峰(通常未加标样品在此区域无峰)。

## 8 计算

当确定样品中目标物出峰位置后,可以根据与标准溶液的峰面积进行对比确定样品中目标物的浓度。样品中目标物浓度按照下列公式计算:

$$X_{\text{样品}} = c \times s / S$$

- 其中: $X$ ——样品中目标物的浓度(mg/L);  
 $c$ ——标准溶液中目标物的浓度(mg/L);  
 $S$ ——标准溶液中目标物的峰面积;  
 $s$ ——样品中目标物的峰面积。

## 9 精密度参数

表 1

项目	山梨酸	苯甲酸	水杨酸
线性范围/(mg/L)	0~200	0~200	0~200
精密度(回收率)/%	>90	>90	>90
重复性 $r$ /%	2	3	8
再现性 $R$ /%	8	9	12

表 1(续)

项目	山梨酸	苯甲酸	水杨酸
检测限/(mg/L)	3	3	3
定量限/(mg/L)	5	6	7
不确定度/%	11	12	13

## 参 考 文 献

- [1] Dosage de l'acide sorbic dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. 1978. BERTRAND A. et SARRE Ch. ,Feuillets Verts O. I. V. ,654-681.
- [2] Dosage de l'acide salicylic dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. 1978. BERTRAND A. et SARRE Ch. ,Feuillets Verts O. I. V. ,655-682.
- [3] Dosage de l'acide benzoic, dans les sodas et autres produits alimentaires liquides, par chromatographie en phase gazeuse. 1978. BERTRAND A. et SARRE Ch. Ann. Fals. Exp. Chim. 71,761,35-39.



## 偏酒石酸

(决议 Oeno 10/2007)

### 1 介绍

传统方法中,为避免葡萄酒中酒石酸的析出,可以向葡萄酒中加入一定比例的偏酒石酸,本方法利用偏酒石酸水解后的总酒石酸和天然酒石酸之间溶析平衡的差异比进行测定。但有些国家并不允许添加偏酒石酸。考虑到酒石酸测定的准确度,如果葡萄酒中含有的少量的偏酒石酸的含量很少,无法用普通的方法检测,则需要使用其他方法进行测定。

### 2 范围

本方法适用于葡萄酒中含有痕量级偏酒石酸的测定。

### 3 原理

在酸性条件下,偏酒石酸可与乙酸镉形成不溶性的沉淀,这是葡萄汁或葡萄酒中唯一能够形成此类沉淀的成分。

注:酒石酸也可以与乙酸镉形成沉淀,但只有在乙醇浓度超过 25% 时才会形成,而且沉淀会在水中溶解,这点与偏酒石酸的沉淀不同。

偏酒石酸的镉沉淀和氢氧化钠共热时可以分解并释放出酒石酸,后者与偏钒酸铵结合会产生特定的橘色。

### 4 试剂

#### 4.1 乙酸镉溶液:

4.1.1 二水合乙酸钙,纯度 98%。

4.1.2 纯乙酸。

4.1.3 双蒸水或去离子水。

#### 4.1.4 乙酸镉溶液:

取 5 g 乙酸镉溶解于 99 mL 水,加 1 mL 纯乙酸。

4.2 1 mol/L 氢氧化钠。

4.3 1 mol/L 硫酸。

4.4 2% (m/V) 偏钒酸铵溶液。

4.4.1 偏钒酸铵。

4.4.2 三水合乙酸钠,纯度 99%。

4.4.3 乙酸钠溶液,将 478 g 乙酸钠溶解于 1 L 水中。

4.4.4 偏钒酸铵溶液:称取 10 g 偏钒酸铵溶解于 150 mL 氢氧化钠溶液中,加入 200 mL 乙酸钠溶液,加水定容至 500 mL。

4.5 96% 乙醇。

## 5 仪器

- 5.1 离心机,离心管容量为 50 mL。
- 5.2 分光光度计,能在可见光波长范围工作,吸收池 1 cm。

## 6 步骤

量取 50 mL 葡萄酒,以 11 000 r/min 转速离心 10 min,取 40 mL 澄清的葡萄酒,将其转移至离心管中,加 5 mL 96%乙醇,加 5 mL 乙酸镉溶液,混匀并静置 10 min。然后以 11 000 r/min 转速离心 10 min,转移澄清液。如果有偏酒石酸存在的情况下,则试管底部会出现薄片状沉淀。如果没有任何沉淀,则认为样品中不含有偏酒石酸。

如果有沉淀或疑似有沉淀将生成,需按照下面的步骤操作:用 10 mL 水冲洗沉淀,使之与离心管底部脱离。加 2 mL 乙酸镉溶液,以 11 000 r/min 转速离心 10 min,然后完全倒掉上清液。加入 1 mL 1 mol/L 的氢氧化钠溶液 100℃水浴 5 min。冷却后,加入 1 mL 1 mol/L 的硫酸溶液和 1 mL 偏钒酸铵溶液。静置 15 min 后,以 11 000 r/min 转速离心 10 min。将上清液转移至分光光度计的吸收池中,用水作空白调零后,在 530 nm 波长下测定吸光度值,即: $A_E$ 。

同时,平行取相同酒样,先以高温微波加热 2.5 min,或者 100℃水浴 5 min 后,按照相同方法进行处理,得到相应的吸光度值  $A_T$ 。

## 7 计算

若葡萄酒中含有偏酒石酸,则  $A_E - A_T > 0.050$ 。



## L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸

(决议 Oeno 11/2008)

### 1 介绍

抗坏血酸是一种广泛存在于食品中的抗氧化物质,葡萄中的抗坏血酸含量在葡萄酒的生产过程中逐渐降低,但法规允许向葡萄酒中添加一定量的抗坏血酸。

通过一系列的协同比对实验研究,OIV证实了本方法适用于葡萄酒中 L-抗坏血酸含量在 30 mg/L~150 mg/L 和 D-异抗坏血酸含量在 10 mg/L~100 mg/L 范围内的测定。

### 2 范围

本方法适用于 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸含量在 3 mg/L~150 mg/L 范围内的检测。浓度高于 150 mg/L 的,可以进行稀释后测定。

### 3 原理

样品经滤膜过滤后直接进入 HPLC 系统,经过反相柱分离后,在 266 nm 同时对目标物进行检测。用外标法确定 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸的含量。

### 4 试剂和材料

#### 4.1 试剂

正辛胺,纯度 $\geq 99.0\%$ 。

三水合乙酸钠,纯度 $\geq 99.0\%$ 。

100 %乙酸。

25 %磷酸。

草酸,纯度 $\geq 99.0\%$ 。

抗坏血酸氧化酶。

L-抗坏血酸,纯度 $\geq 99.5\%$ 。

D-异抗坏血酸,纯度 $\geq 99.0\%$ 。

双蒸水。

甲醇,分析纯 99.8%。

#### 4.2 流动相制备

##### 4.2.1 流动相组成

12.93 g 正辛胺,溶于 100 mL 甲醇;

缓冲溶液(pH 5.4):430 mL 乙酸钠溶液和 70 mL 乙酸溶液混合。

68.05 g 三水合乙酸钠,溶于 500 mL 双蒸水;

12.01 g 乙酸,溶于 200 mL 双蒸水;

#### 4.2.2 流动相制备

向大约 400 mL 双蒸水中加 5 mL 正辛胺溶液,逐滴加入 25%磷酸将溶液的 pH 调至 5.4~5.6。加入 50 mL 缓冲溶液,将混合溶液转移至 1 000 mL 容量瓶,用双蒸水定容。使用前流动相需用滤膜(再生纤维素,0.2  $\mu\text{m}$ )进行过滤,如有必要,用氮气进行脱气处理约 10 min。

#### 4.3 标准溶液的制备

注:所有的标准溶液(标准储备溶液和标准工作溶液)都应现配现用并保存在冰箱中。

##### 4.3.1 标准储备液(1 mg/mL)

制备 2%草酸水溶液,通过吹氮除去溶解氧。分别准确称量 100 mg L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸,加入 100 mL 容量瓶中,用 2%草酸水溶液定容。

##### 4.3.2 标准溶液制备

用 2%草酸水溶液将储备溶液稀释至一定浓度,推荐的浓度范围为 10 mg/L~120 mg/L,例如取 100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、400  $\mu\text{L}$ 、800  $\mu\text{L}$ 、1200  $\mu\text{L}$  储备液稀释至 10 mL,相应浓度为 10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L 和 120 mg/L。

### 5 仪器

实验室常用仪器,特殊仪器如下:

- 5.1 HPLC 泵。
- 5.2 环状进样器,20  $\mu\text{L}$ 。
- 5.3 UV-检测器。

### 6 样品制备

进样前,用孔径为 0.2  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤葡萄酒样品。  
浓度超过 150 mg/L 的样品,可将样品稀释后进样。

### 7 步骤

#### 7.1 HPLC 操作条件

向色谱系统中注射 20  $\mu\text{L}$  过滤后的葡萄酒样品;  
保护柱:例如 Nucleosil 120 C<sub>18</sub>(4 cm $\times$ 4 mm $\times$ 7  $\mu\text{m}$ );  
柱子:例如 Nucleosil 120 C<sub>18</sub>(25 cm $\times$ 4 mm $\times$ 7  $\mu\text{m}$ );  
进样体积:20  $\mu\text{L}$ ;  
流动相:见 4.2.2;  
流速:1 mL/min;  
检测波长:266 nm;  
色谱柱冲洗:先以不少于 30 mL 双蒸水冲洗,然后以 30 mL 甲醇和 30 mL 乙腈冲洗。

#### 7.2 鉴别/确证

通过对比样品峰和标准品色谱峰的保留时间来进行定性判断,图 1 色谱 A 中,L-抗坏血酸保留时间为 7.7 min,异抗坏血酸保留时间为 8.3 min。为进一步对样品中目标物确认,需要用抗坏血酸氧化酶对样品进行重新处理并检测。由于抗坏血酸氧化酶对 L-抗坏血酸和



D-异抗坏血酸的降解作用,在原出峰时间不再有色谱峰出现。如果检测到干扰峰的存在,在计算浓度时应将其考虑在内。

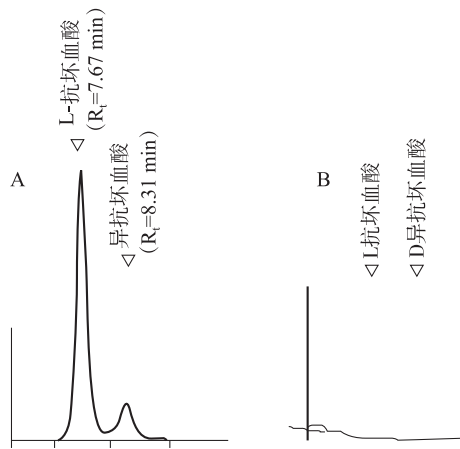


图1 白葡萄酒的色谱例图

A—抗坏血酸氧化酶处理之前;B—抗坏血酸氧化酶处理之后

注:在分析序列的最后安排经抗坏血酸氧化酶处理的样品,之后要将柱子中的抗坏血酸氧化酶冲洗干净。否则,柱子中残存的抗坏血酸氧化酶会使样品中的抗坏血酸发生作用,从而影响检测结果。

## 8 计算

利用标准溶液作出标准曲线,利用外标法,将样品中目标物峰面积和标准曲线中的峰面积比对待 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸进行定量分析。

## 9 结果表示

L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸的浓度以 mg/L 表达,保留一位小数。例如,51.3 mg/L。对于高于 150 mg/L 的样品,应对样品稀释后进行分析。

## 10 精密度

1994年,德国联邦卫生局组织了一次由27个实验室参加的协同比对实验研究,对本方法进行了验证。实验是依据德国食品法典§35进行设计的,OIV在使用新的协议(OENO 6/2000)之前,一直采用该法典。

研究包含4个样品——2个白葡萄酒和2个红葡萄酒——每个样品重复测定5次。因为不同降解率的影响,难以准备十分稳定的样品,研究中向参加者发送已知量的纯标准物质和葡萄酒样品。建议实验室将一定量的标准品加入到酒中并立即展开测定。L-抗坏血酸的测定范围为30 mg/L~150 mg/L,D-异抗坏血酸的测量范围为10 mg/L~100 mg/L。附录中列举了研究结果的详细数据。依据DIN/ISO 5725(Version 1988)进行了评估。

方法的重复性标准差( $S_r$ )和再现性标准差( $S_R$ )与L-抗坏血酸和D-异抗坏血酸的浓度相关。实际的精密度参数可以通过下列公式计算:

对于L-抗坏血酸:



$$S_r = 0.011x + 0.31$$

$$S_R = 0.064x + 1.39$$

其中,  $x$  为 L-抗坏血酸浓度(mg/L)。

对于 D-异抗坏血酸:

$$S_r = 0.014x + 0.31$$

$$S_R = 0.079x + 1.29$$

其中,  $x$  为 D-异抗坏血酸浓度(mg/L)。

例如:

D-异抗坏血酸浓度为 50 mg/L, 经计算得  $S_r = 1.0$  mg/L,  $S_R = 5.2$  mg/L。

## 11 分析的其他参数

### 11.1 检出限

本方法的检出限为 3 mg/L。

### 11.2 回收率

四个样品的比对试验研究的平均回收率计算结果如下:

L-抗坏血酸:100.6%。

D-异抗坏血酸:103.3%。

## 附录 A 协同比对实验研究

### A.1 L-抗坏血酸

表 A.1

项目	红葡萄酒 I	白葡萄酒 II	红葡萄酒 III	白葡萄酒 IV
$\bar{X}/(\text{mg/L})$	152.7	119.8	81.0	29.9
添加量/ $(\text{mg/L})$	150	120	80	30
回收率/%	101.8	99.8	101.3	99.7
$n$ 测定次数	25	23	25	23
离群数	1	3	1	3
重复性 $S_r/(\text{mg/L})$	1.92	1.55	1.25	0.58
重复性相对标准偏差 $RSD_r/\%$	1.3	1.3	1.5	1.9
HorRat	0.17	0.17	0.19	0.20
$r/(\text{mg/L})$	5.4	4.3	3.5	1.6
再现性 $S_R/(\text{mg/L})$	10.52	10.03	6.14	3.26
$RSD_R/\%$	6.9	8.4	7.6	10.9
Horwitz $RSD_R/\%$	7.5	7.8	8.3	9.6
HorRat	0.92	1.08	0.92	1.14
$R/(\text{mg/L})$	29.5	28.1	17.2	9.1

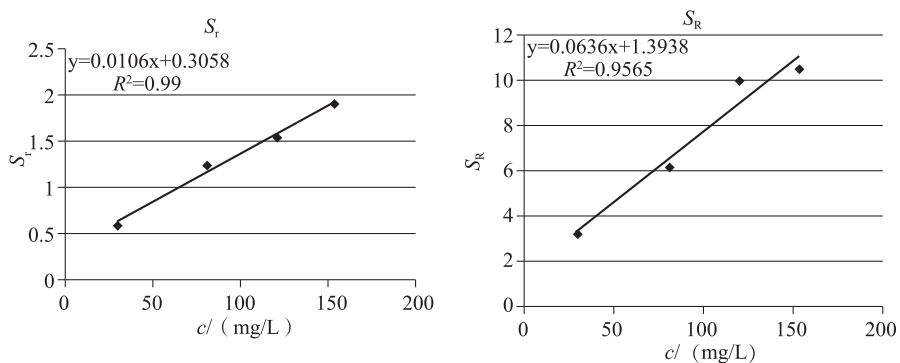


图 A.1

## A.2 D-异抗坏血酸

表 A.2

项目	红葡萄酒 I	白葡萄酒 II	红葡萄酒 III	白葡萄酒 IV
X/(mg/L)	102.4	79.8	11.3	29.4
添加量/(mg/L)	100	80	10	30
回收率/%	102.4	99.8	113.0	98.0
n	25	23	24	22
离群数	1	3	2	4
重复性 $S_r$ /(mg/L)	1.71	1.49	0.47	0.70
RSD <sub>r</sub> /%	1.7	1.9	4.1	2.4
HorRat	0.21	0.23	0.37	0.25
r/(mg/L)	4.8	4.2	1.3	2.0
重现性 $S_R$ /(mg/L)	9.18	7.96	2.394	3.23
RSD <sub>R</sub> /%	9.0	10.0	21.2	11.0
Horwitz RSD <sub>R</sub> /%	8.0	8.3	11.1	9.6
HorRat	1.12	1.21	1.91	1.14
R/(mg/L)	25.7	22.3	6.7	9.0

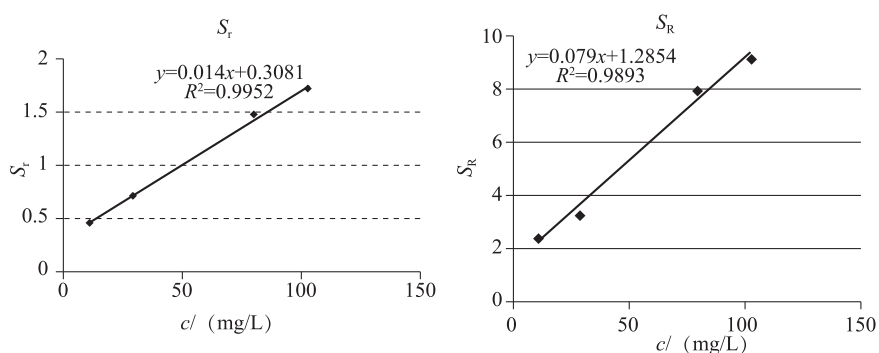


图 A.2

## 参考文献

- [1] B. Seiffert, H. Swaczyna, I. Schaefer(1992); Deutsche Lebensmittelrundschau, 88(2) p. 38-40.
- [2] C. Faulstich; Simultaneous determination of L-ascorbic acid and D-iso-ascorbic acid(erythorbic acid) in wine by HPLC and UV-detection-OIV FV 1228, 2006.



## L-酒石酸的鉴定( $^{14}\text{C}$ 活度法)

(决议 Oeno 12/2008)

### 1 目的和范围

本方法可用于鉴定植物源或无机源的酒石酸,当样品为二者混合物时,可以鉴定出二者的比例。本方法可以检测出含量低于10%的无机源L(+)-酒石酸。

### 2 原理

多数情况下,可商业化获取的植物源酒石酸大多是葡萄酒酿造的副产物,皮渣中的酒石酸氢钾以L-酒石酸的形式提取出来并在市场上销售。其酸中 $^{14}\text{C}$ 与酒中的乙醇一样,和相同年份生产葡萄酒中二氧化碳的 $^{14}\text{C}$ 浓度相关,其浓度相对较高。但由石油化工生产中合成酒石酸则含有较低甚至不含 $^{14}\text{C}$ 。因此,通过使用液体闪烁仪测量碳的DPM(每分钟衰变数) $^{14}\text{C}$ 的活度,就可以测定其来源及组成。

### 3 试剂和标准品

#### 3.1 试剂

3.1.1 闪烁液,如 Instagel Plus。

3.1.2  $^{14}\text{C}$  甲苯参比溶液,经实验室刻度证实其活度,通过建立淬灭校正曲线测试设备的灵敏度和效率。

3.1.3  $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$  标准品、用于减少背景噪声的 $^{12}\text{C}$  甲苯,用于标定闪烁计数器。

3.1.4 99%硝基甲烷。

3.1.5 超纯水( $>18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ )。

3.1.6  $^{14}\text{C}$  甲苯溶液,活度约为430 DPM/mL,通过稀释 $^{14}\text{C}$  标准储备液,参比 $^{12}\text{C}$  甲苯溶液获得。

#### 3.2 标准品

##### 3.2.1 建立淬灭校正曲线

闪烁仪经过 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$  和 $^{12}\text{C}$  甲苯标准品校正后,采用下列步骤建立淬灭校正曲线。

准备12个玻璃瓶,每个瓶中装有10 mL浓度为500 g/L的化石来源的酒石酸水溶液,然后按需要加入400 DPM/mL~1 000 DPM/mL的甲苯 $^{14}\text{C}$  标准液(如果有必要,可先配制标准溶液的中间浓度溶液)。然后向瓶中梯度加入硝基甲烷,例如:0  $\mu\text{L}$ 、0  $\mu\text{L}$ 、0  $\mu\text{L}$ 、5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、15  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、35  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$  和400  $\mu\text{L}$ ,然后加入10 mL闪烁液。系列溶液中至少有3个样品不含有硝基甲烷。

通过分析梯度增加的硝基甲烷,每年确定一次淬灭校正曲线。淬灭校正曲线可以用于确定灵敏度或平均效能。

##### 3.2.2 背景噪音的测定(测试空白)

使用化工来源的L-酒石酸,测定背景噪音,或测定空白。确定淬灭校正曲线之后应立即

进行背景噪音测定,之后大约每 3 个月进行一次测定。

### 3.2.3 确定标准曲线

在进行闪烁实验之前,应先使用 HPLC 确定植物和化石来源的 L-酒石酸的纯度。使用确定为植物源或化石源酒石酸的不同比例混合物来进行标定。

表 1

500 g/L 溶液的制备			
	空白或背景噪音	标准	内标
称重	50 mL 容量瓶		
	25 g 化石源 L-酒石酸	25 g 已知组成的化石和植物源酒石酸混合物	使用空白
溶解	密封		
	震荡,使溶液均匀化		
闪烁混合物的制备			
	塑料小瓶		
从 500 g/L 溶液中取样品	使用移液管取 10 mL		
添加浓度	—	—	100 $\mu\text{L}$
添加闪烁液	使用自动滴定管加 10 mL		
	加盖		
	等待 5 min,然后分析 500 min		

## 3.3 内部控制

### 3.3.1 内部控制物质

用 500 g/L 化石源 L-酒石酸溶液,添加一定量的甲苯 $^{14}\text{C}$ (DPM $\leq$ 100)。用相同的化石来源 L-酒石酸溶液进行背景噪音测定。

### 3.3.2 内部控制性质

通过对添加浓度的测量可以提供研究媒介中不存在干扰物质的证明。

### 3.3.3 内部控制物限量

内标控制限量与所用仪器有关:可以定为待测值的 5%。

### 3.3.4 检测频率和步骤

经常使用时每月一次或在每次分析序列中,做一次内标。每次更换闪烁液或变更曲线时,要做一次内标。

### 3.3.5 内部控制结果使用

如果结果落在内部控制限制之外,检查实验计划书之后,要对闪烁液进行校准,然后重复内控测定。

如果校准结果准确,但新的内部控制测量仍不符合要求,重新制作曲线然后进行内部控制测定。



## 4 仪器

- 4.1 配有电脑和打印机的液体闪烁光谱仪,事先用硝基甲烷进行标准曲线校准。
- 4.2 具螺旋塞的低钾瓶,要求背景噪声低。
- 4.3 10 mL 移液管。
- 4.4 适用于具塞液体闪烁瓶的自动滴定管。
- 4.5 实验室常规玻璃器皿。

## 5 样品

如果需要,在进行闪烁分析之前,可以用 HPLC 测定样品的纯度。  
用纯水制备 500 g/L 的样品溶液。

表 2

500 g/L 溶液的制备				
	测试空白或背景噪声	标准溶液	内标	样品
称重	分别用 50 mL 容量瓶			
	25 g 化石来源 L-酒石酸	25 g 已知组成的化石来源和植物源 L-酒石酸	使用空白	25 g
溶解性	密封			
	振荡使混合物混合均匀			
闪烁混合物的制备				
	分别用塑料管			
源自 500 g/L 溶液的样品	10 mL 移液管			
添加浓度	—	—	100 $\mu$ L	—
添加闪烁液	10 mL 使用自动滴定管			
	拧紧塞子,振摇			
	等待 5 min,分析 500 min			
注	每 5~10 个样品,做一个含 0% 植物源酒石酸的样品,如 10 mL 无机源酒石酸和 10 mL 闪烁液			
	在每个分析序列的最后测量背景噪声			

## 6 计算

测量结果以每分钟脉冲数(CPM)计,但应转换为 DPM/g 碳。

### 6.1 结果

计算样品的特定<sup>14</sup>C 放射性,以 DPM/g 碳表示:

$$A = \frac{(X - X') \times 100 \times 3.125^*}{R_m \times m}$$

其中:  $A$ ——每克碳的放射性(min);

$X$ ——样品的每分钟脉冲数(CPM);

$X'$ ——用于背景噪声的化石源 L-酒石酸的每分钟脉冲数(CPM);

$m$ ——来自 500 g/L 溶液的 10 mL 样品中酒石酸的质量;

$R_m$ ——以百分比表示的平均效能。

结果保留一位小数。

## 6.2 使用内标法对结果的验证

将加标后测得的值与使用 3.5.1 得到的值进行比较验证。如果差异显著( $>5\%$ ),按照下式重新计算 DPM 值:

$$\text{DPM} = \frac{\text{CPM}}{R_m}$$

其中,  $R_m$  为标准曲线得到的平均效能。

两次结果相差不超过其算术平均值的 5%。如果超出,需对样品进行重新检测,内标量加倍。对比从标准得到的 2 个结果,如果不超过其算术平均值的 5%,以平均值为结果。

注:此情况下,样品的淬灭非常明显,不适宜直接分析。

## 6.3 不确定度

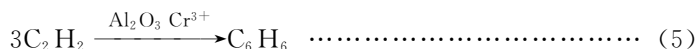
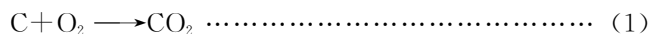
标准测试条件下不确定度值为  $\pm 0.7$  DPM/g 碳。

## 7 与参考方法对照验证

### 7.1 原理

酒石酸燃烧转化成  $\text{CO}_2$ , 然后转化成苯。使用液体闪烁仪进行检测。

前处理除去各种污染物后,  $\text{CO}_2$  按照以下步骤转化为苯。



- 1) 有机物样品:用高温氧气流冲击碳(或加压氧气存在的情况下燃烧),生成二氧化碳。
- 2) 无机样品(海洋或大陆的碳酸盐、水等):用纯盐酸处理碳以生成二氧化碳。
- 3) 二氧化碳与锂金属加热至  $600^\circ\text{C} \sim 800^\circ\text{C}$  之间,生成碳化锂和氧化锂。
- 4) 水和碳化锂作用生成乙炔和氢氧化锂,水必须无氟、氨。
- 5) 乙炔的三聚反应是在  $185^\circ\text{C}$ , 在铝基镀铬催化作用下,转换为苯。

\* 每 3.125 g 酒石酸对应 1 g 碳[酒石酸摩尔质量(150 g/mol),或以其中所含碳的质量表示( $4 \times 12 = 48$  g/mol)]。



## 7.2 步骤

通过燃烧、氧化或酸蚀等方法,由样品得到的二氧化碳均储存在一个压缩气瓶中。将足量的锂(催化剂)储存在镍容器中,置于加热反应器的底部。反应器抽真空,底部加热,顶部用水循环冷却。

### 7.2.1 碳化

加热大约 1 h 后,温度升至  $650^{\circ}\text{C}$ 。将二氧化碳导入接触熔融态的锂。锂相对于样品中的碳是过量的,根据样品来源不同,需过量  $20\% \sim 100\%$ 。此化学反应(碳化或“收集”)几乎瞬时发生,碳化过程中前几分钟的收集至关重要。此反应放热(可升温  $200^{\circ}\text{C}$ ),碳化过程非常迅速,在开始 20 min 后基本可认为碳化完成,不过为了消除痕量氦(铀的副产物,可能与二氧化碳混合),持续加热 45 min $\sim$ 50 min。

### 7.2.2 冷却

一旦完成处理过程,反应室冷却至室温( $25^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ),待进行下一步实验。

### 7.2.3 碳化锂水解

向反应室中加入水,加水量要远大于反应所需的量(1.5 L),反应会立即开始,并同时释放乙炔,该反应同样是放热反应(温度将升高  $+80^{\circ}\text{C} \sim +100^{\circ}\text{C}$ )。

生成的乙炔呈蒸气状态,并以镀铍的铝催化剂为载体。载体需要提前风干至少 3 h,然后  $380^{\circ}\text{C}$  下真空干燥 2 h。本实验干燥过程极其重要,以免催化剂载体球中残留的水分对结果造成影响。

### 7.2.4 三聚反应

乙炔在催化条件下经聚合形成苯。三聚反应前,催化剂载体的温度必须降至  $60^{\circ}\text{C} \sim 70^{\circ}\text{C}$ ,由于本反应也放热,需要自动调温维持温度。将催化剂载体加热至  $180^{\circ}\text{C}$ ,保持 1.5 h,蒸气苯将析出并收集于液氮围绕的捕集管中。在动态真空中解析持续发生。实验最后将结晶的苯加热熔解为液态,准备进行下一步脉冲计数。

## 7.3 合成苯的台式装置

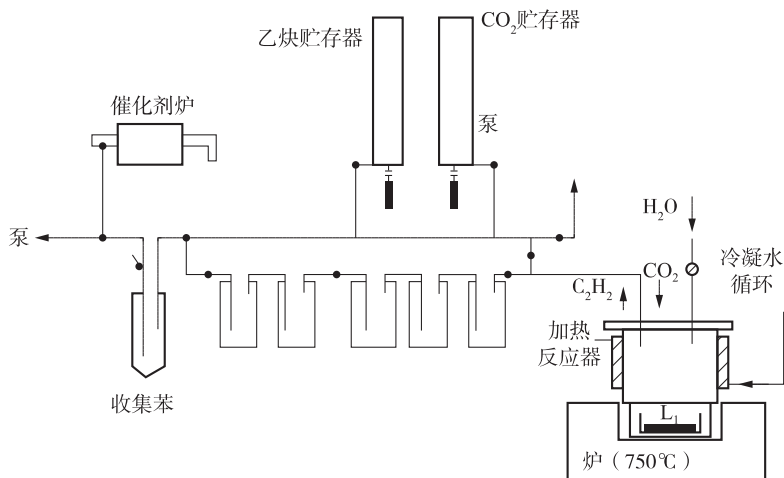


图 1



## 7.4 计数用标准化学溶液

设定液体闪烁计数的参比值为 4 mL 溶液体积。

此溶液包含 3.52 g 由样品生成的苯, 以及由主要闪烁液和辅助闪烁液组成的闪烁液。

由于苯的密度为 0.88 g/mL,  $0.88 \times 4 \text{ mL} = 3.52 \text{ g}$ 。

表 3

主要闪烁液	丁基-PBD
化学组成	2-(4-联苯基)-5-(4-叔丁基苯基)-1,3,4-恶二唑
最大荧光波长	367 nm
辅助闪烁液	对-双-邻-甲基苯-乙烯基-苯
化学组成	1,4-双-(2-甲基苯乙烯基)苯
最大荧光波长	415 nm
两种闪烁液的光学吸收和耦合辐射	
最小吸收波长	409 nm
最大吸收波长	412 nm

## 7.5 同位素分离的 $\Delta^{13}\text{C}$ 校正

使用标准 PDB $^{13}\text{C}$  25‰ 的标准化程序进行同位素分离校正。

## 8 方法的评价

### 8.1 步骤

用一个葡萄酒来源酒石酸和一个人工合成酒石酸制成 500 g/L 的酒石酸溶液。

葡萄酒来源酒石酸的浓度范围是 0~100%。

样品的来源和纯度事先使用参比方法进行鉴定。

### 8.2 结果

结果如表 4 所示:

表 4

真实浓度	来源于葡萄酒的酒石酸/%	
	替代方法的结果	参比方法的结果
0	0 和 0	0
10	3.5 和 6.0	12
20	11.4 和 12	22
30	24.6 和 25.4	31
40	34.7 和 38	40
50	41.4 和 50.6	50
60	57.8 和 58.8	63



表 4(续)

来源于葡萄酒的酒石酸/%		
真实浓度	替代方法的结果	参比方法的结果
70	60 和 63.3	70
80	81	81
85	84	86
90	88	91
95	94	96
100	100	100

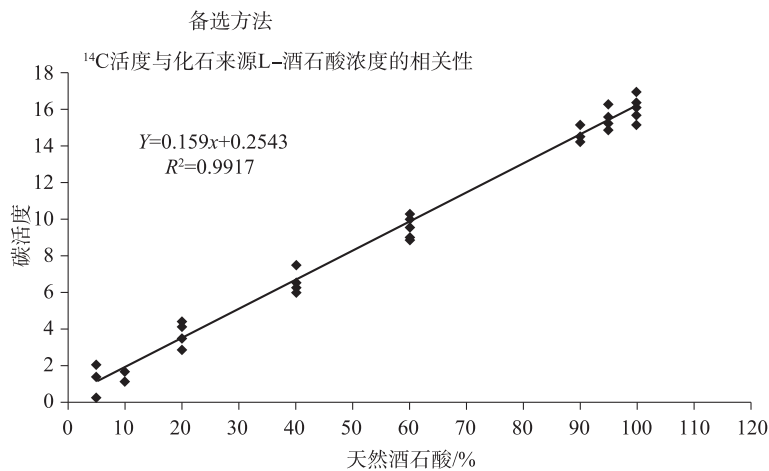


图 2

### 8.3 精密度

本方法的精密度是 6.9%。

替换方法的重复性标准偏差为:2.86%植物源酒石酸。

## 参 考 文 献

- [1] Compendium of international methods of analysis of spirits and alcohols and of the aromatic fraction of beverages, Office Internationale de la Vigne et du Vin, Edition officielle, juin 1994, page 201, 204, 210 et 307.
- [2] Methods of analysis for neutral alcohol applicable to the wine sector, EEC Regulation no. 625/2003, 2 April 2003, Journal Officiel des communautés européennes 15 May 1992, n° L130, p18. (Journal Officiel, 8 April 2003, N° L90, p4).
- [3] J. GUERAIN and S. TOURLIERE, Radioactivité carbone et tritium dans les alcools, Industries Alimentaires et Agricoles-92<sup>nd</sup> year, July-August 1975, N° 7-8.
- [4] S. COHEN, B. CRESTO, S. NACHAMPASSAK, T. PAYOT, B. MEDINA, S. CHAUVET, Détermination de l'origine de l'acide tartrique L(+): naturelle ou fossile par la détermination de son activité C<sup>14</sup>-Document OIV FV 1238, 200.

## 3.1.4 气体

方法 OIV-MA-AS314-01

方法类型 II

### 二氧化碳

(浓度上限为 1.5 g/L)

(Oeno 21/2003 对 39 进行修订,决议 Oeno 3/2006 对其进行完善)

#### 1 原理

##### 1.1 平静葡萄酒(CO<sub>2</sub> 压力小于或等于 $\leq 0.5 \times 10^5$ Pa)

将接近 0℃ 的样品加入到过量的氢氧化钠溶液中,使 pH 达到 10~11。加入碳酸脱氢酶,用酸溶液滴定,记录 pH 从 8.6(酸性碳酸盐)变到 4.0(碳酸)所用的酸溶液的量。依次计算出二氧化碳的含量。在相同的条件下对脱碳葡萄酒进行空白滴定对照,需考虑扣除被葡萄酒中的酸消耗掉的氢氧化钠溶液的量。

##### 1.2 高泡葡萄酒和低泡葡萄酒

将待分析的葡萄酒样品冷冻至近冰点。脱碳后,取出部分样品作为空白,碱化瓶中剩余的葡萄酒,使所有的二氧化碳全部固定为中性碳酸盐。加入碳酸脱氢酶,用酸溶液滴定。加入酸溶液使 pH 从 8.6(酸性碳酸盐)变到 4.0(碳酸),由加入的酸溶液计算出所含二氧化碳。在相同条件下对脱碳葡萄酒进行空白滴定对照,需考虑扣除葡萄酒中酸消耗掉的氢氧化钠溶液的量。

#### 2 方法的描述

##### 2.1 平静葡萄酒

###### 2.1.1 仪器

磁力搅拌器。

pH 计。

###### 2.1.2 试剂

0.1 mol/L 氢氧化钠溶液。

0.05 mol/L 硫酸溶液。

1 g/L 碳酸脱氢酶溶液。

###### 2.1.3 操作方法

将葡萄酒样品和 10 mL 的移液管冷却至 0℃。

取 25 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液加入到 100 mL 烧杯中,加入两滴 1 g/L 的碳酸脱氢酶溶液,用冷却至 0℃ 的移液管加入 10 mL 葡萄酒。将烧杯放在磁力搅拌器上,放入磁棒,接通电源,进行适度搅拌。

当液体温度恢复到室温时,缓慢搅拌,用 0.05 mol/L 的硫酸溶液进行滴定,直到 pH 达到 8.6。记下读数。



继续缓慢搅拌,用 0.05 mol/L 硫酸溶液滴定,直至 pH 达到 4.0。假设 pH 由 8.6 变为 4.0 所用硫酸的体积为  $n$  mL。

在真空情况下,摇动 50 mL 葡萄酒样品 3 min 以去除二氧化碳。将烧瓶在水浴中加热至 25℃ 左右。

用 10 mL 脱去二氧化碳的葡萄酒重复上述实验,所消耗硫酸的体积设为  $n'$  mL。

#### 2.1.4 结果表示

1 mL 0.05 mol/L 的氢氧化钠滴定液相当于 4.4 mg 的  $\text{CO}_2$ 。每升葡萄酒中二氧化碳表示为:

$$X=0.44(n-n')\text{g/L(结果保留两位小数)}$$

注:对于含有少量  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2 < 1 \text{ g/L}$ ) 的葡萄酒,不必加入碳酸脱氢酶来去除二氧化碳。

## 2.2 高泡葡萄酒和低泡葡萄酒

### 2.2.1 仪器

磁力搅拌器。

pH 计。

### 2.2.2 试剂

50% 氢氧化钠溶液 ( $m/m$ )。

0.05 mol/L 硫酸溶液。

1 g/L 的碳酸脱氢酶溶液。

### 2.2.3 操作方法

在待分析的葡萄酒瓶上,于液面处画上标记线,再冷却至冰点。

缓慢加热瓶子,摇动,至所有冰晶体消失。

迅速移除瓶塞,将 40 mL~50 mL 葡萄酒加入量筒,进行空白滴定对照。恢复到室温后,读取量筒的刻度,得出准确的体积为  $V$  (mL)。空白样品被移去后,迅速向 750 mL 的瓶子中加入 20 mL 50% 的氢氧化钠溶液,待葡萄酒恢复至室温。

在 100 mL 的烧杯中,加入 30 mL 沸腾的蒸馏水和两滴 1 g/L 碳酸脱氢酶溶液,再加入 10 mL 已经碱化的葡萄酒。

将烧杯放在磁力搅拌器上,放入磁棒,接通电源,进行中速搅拌。

在缓慢搅拌下用 0.05 mol/L 的硫酸溶液进行滴定,直到 pH 达到 8.6。记下读数。

继续在缓慢搅拌下用 0.05 mol/L 硫酸溶液滴定,直至 pH 达到 4.0。假设 pH 由 8.6 变为 4.0 所用硫酸的体积为  $n$  mL。

在真空情况下,摇动  $v$  mL 用于空白对照滴定的葡萄酒样品 3 min 以去除二氧化碳。将烧瓶在水浴中加热至 25℃ 左右。取 10 mL 脱碳的葡萄酒,加入 30 mL 沸腾的蒸馏水中,加 2~3 滴 50% 的氢氧化钠溶液使 pH 达到 10~11,然后依照上述方法操作,加入的 0.05 mol/L 硫酸溶液记为  $n'$  (mL)。

### 2.2.4 结果表示

1 mL 0.05 mol/L 的硫酸溶液,相当于 4.4 mg 的  $\text{CO}_2$ 。

将葡萄酒瓶中的碱化葡萄酒倒掉。再向瓶中加水至所做记号处,使之与原来的容积相差不超过 1 mL,设这一体积为  $V$  (mL)。

葡萄酒中二氧化碳含量为:

$$X=0.44(n-n')\times\frac{V-v+20}{V-v}$$

结果保留两位小数。

### 2.3 结果表示

由方程式得出 20℃ 时的压力  $P(20^\circ\text{C})(\text{Pa})$ ：

$$P=\frac{Q}{1.951\times 10^{-5}(0.86-0.01A)(1-0.00144S)}-P_0$$

其中： $Q$ ——葡萄酒中  $\text{CO}_2$  的含量(g/L)；

$A$ ——20℃ 下葡萄酒的酒精度；

$S$ ——葡萄酒的含糖量(g/L)；

$P_0$ ——大气压(Pa)。

### 2.4 说明

下面的操作方法习惯上用来测量二氧化碳含量低于 4 g/L 的葡萄酒。

测量前必须准备两份待分析的葡萄酒样品。

将其中一份样品冷却至 5℃，打开后，在 375 mL 样品中迅速加入 5 mL 50% (m/m) 氢氧化钠溶液，立即盖紧，摇匀。取该葡萄酒 10 mL，加入到盛有 40 mL 水的烧杯中，再加 3 滴 0.1 mg/mL 的碳酸脱氢酶溶液。用 0.022 75 mol/L 硫酸溶液滴定至 pH8.6，再滴定到 pH4.0，从 pH8.6~4.0 之间加入的硫酸溶液量记为  $n(\text{mL})$ 。

取第二份葡萄酒样品约 25 mL，在真空状态下摇动 1 min，除去二氧化碳，加入到有 3 滴碳酸脱氢酶溶液的 500 mL 容量瓶中，加 0.33 mL 50% (m/m) 氢氧化钠溶液。取 10 mL 脱碳葡萄酒按上述方法操作，使用的 0.022 75 mol/L 硫酸溶液体积为  $n'(\text{mL})$ ，1 mL 0.022 75 mol/L 硫酸相当于 200 mg/L 的二氧化碳。分析的葡萄酒中二氧化碳含量为：

$$(n-n')\times 200\times 1.013$$



## 附录 A

### 协同比对实验研究

### 滴定法检测高泡和低泡葡萄酒中的二氧化碳含量

### 结果报告

#### A.1 研究的目的是

此研究的目的是确定此参考方法滴定检测高泡和低泡葡萄酒中的二氧化碳含量的重复性和再现性。

OIV 在 OENO 1/2002 文件中对二氧化碳含量进行了定义和限制。

#### A.2 需求和目的

检测二氧化碳的参考方法没有精确的数据。因此有必要进行协同实验研究。

由于分析的特殊性,无法完全遵照常规验证协议。一瓶样品只做一次独立的测定。每一个样品都是独立的。因此无法在研究前进行均匀性测试。为了提供均匀的测试材料,必须要与生产商密切合作,使样本在灌装生产线上很短的时间间隔内进行灌装,以假定二氧化碳是均匀分布在所有的瓶子中。

这项研究设计的是双盲样测试。但不能保证样品的完全匿名,因为对不同的样品会使用不同类型的瓶和/或不同的瓶塞。因此我们要求参与的实验室人员诚实地独立完成数据分析,不能有任何数据修改。

#### A.3 范围和适用性

A.3.1 该方法为定量方法。

A.3.2 该方法适用于高泡和低泡葡萄酒中的二氧化碳的测定,以验证标准的可靠性。

#### A.4 材料和基质

研究包括六个不同样品。所有的样品为双盲样,总共给参与者发放 12 瓶测试样品。

表 A.1 样品和编码

样品	瓶编码	类型
样品 A	(编码 1+9)	高泡葡萄酒
样品 B	(编码 2+5)	低泡葡萄酒(气泡酒)
样品 C	(编码 3+4)	高泡葡萄酒
样品 D	(编码 6+10)	低泡葡萄酒(气泡酒)
样品 E	(编码 7+11)	低泡葡萄酒(气泡酒)
样品 F	(编码 8+12)	高泡葡萄酒(红酒)

#### A.5 控制措施

考虑到方法在实践中已经被批准,合作研究中只是缺少精密度数据,因此不需要进行预实验,因为大多数实验室已经使用常规分析的参考方法。

### A.6 应遵循的方法和配套文件

发给参加者的相关文件包括参考方法分析,样品回执表和结果表等。

测定的二氧化碳含量以 g/L 表示。

### A.7 数据分析

A.7.1 用科克伦(Cochran)、格拉布(Grubbs)和配对的格拉布斯(paired Grubbs)检验确定异常值。

A.7.2 通过统计分析获得重复性和再现性数据。

A.7.3 计算 HORRAT 值。

### A.8 参与者

来自不同国家的 13 个实验室参加了协作研究。每个实验室给出了相应的实验代码。参加的实验室在分析高泡葡萄酒中的二氧化碳方面都有丰富的经验。

表 A.2 参加者名单

Landesuntersuchungsamt D-56068 Koblenz GERMANY	Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittelprüfung D-55129 Mainz GERMANY
Landesuntersuchungsamt D-67346 Speyer GERMANY	Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen D-10557 BERLIN GERMANY
Servicio Central de Viticultura y Enologia E-08720 Villafranca Del Pendes SPAIN	Landesuntersuchungsamt D-54295 Trier GERMANY
Landesuntersuchungsamt D-85764 Oberschleißheim GERMANY	Instituto Agrario di S. Michele I-38010 S. Michele all Adige ITALIA
Chemisches Landes- u. Staatl. Veterinäruntersuchungsamt D-48151 Münster GERMANY	Ispettorato Centrale Repressione Frodi I-31015 Conegliano(Treviso) ITALY
Bundesamt für Weinbau A-7000 Eisenstadt AUTRIA	BgVV D-14195 Berlin GERMANY
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt D-70736 Fellbach GERMANY	

### A.9 结果

根据提交的二氧化碳结果,直接计算出不确定度。可以使用 Horrat-ratio(霍此比率)对

协同比对实验进行评估。对于所有的样品,如果  $r$  和  $R < 2$ ,则结果为满意。表 3 列出了每个样品的  $\text{CO}_2$  滴定结果。

表 A.3 二氧化碳测定结果汇总

$\text{CO}_2$	样品 A	样品 B	样品 C	样品 D	样品 E	样品 F
平均值/(g/L)	9.401	3.344	9.328	4.382	4.645	8.642
$r$ /(g/L)	0.626	0.180	0.560	0.407	0.365	0.327
$S_r$ /(g/L)	0.224	0.064	0.200	0.145	0.130	0.117
RSD <sub>r</sub> /%	2.379	1.921	2.145	3.314	2.803	1.352
Hor	0.893	0.617	0.804	1.109	0.946	0.501
$R$ /(g/L)	1.323	0.588	0.768	0.888	0.999	0.718
$S_R$ /(g/L)	0.473	0.210	0.274	0.317	0.357	0.256
RSD <sub>R</sub> /%	5.028	6.276	2.942	7.239	7.680	2.967
HoR	1.245	1.331	0.728	1.599	1.711	0.726

## 参 考 文 献

- [1] Caputi A, Ueda M., Walter P. & Brown T., *Amer. J. Enol. Vitic.*, 1970, 21, 140-144.
- [2] Sudraud P., *F. V., O. I. V.*, 1973, n° 350.
- [3] Goranov N., *F. V., O. I. V.*, 1983, n° 758.
- [4] Brun S. & Tep Y., *F. V., O. I. V.*, 1981, n° 736 & 1982, n° 736(bis).



# 起泡葡萄酒压力的测定

(决议 Oeno 21/2003)

## 1 原理

装有葡萄酒样品的瓶经搅动和热稳定后,用压力表测定样品压力。压力用 Pa 表示。

## 2 仪器

用于测量高泡葡萄酒和低泡葡萄酒的瓶内高压的装置称作压力表。根据酒瓶的瓶塞材质(金属包套、冠状塞、塑料塞或软木塞),压力表也分为不同类型。

### 2.1 螺旋盖瓶

由三部分组成(如图 1):

——上半部分(螺杆针托)由压力计、手动收紧环、能连接中间部分的螺旋杆及一个能够穿透塞子的指针构成。指针通过侧孔将压力传递给压力表。接合处能够确保在瓶子上容器的整体气密性。

——中间部分(螺母)能确保上半部分始终处于正中位置。并使下半部分紧紧固定在瓶口处。

——下半部分(固定夹)配备了一个钢针,它能穿透瓶环以使压力表和瓶子固定在一起。有能够适应各种类型瓶子的环。

### 2.2 带有软木塞的瓶子

由两部分组成(如图 2):

——顶部与前面的设备是相同的,但针状物更长。它由长空管组成,末端有一个可活动的钻头,该钻头能够帮助穿透软木塞。当软木塞被穿透后,该钻头会掉进葡萄酒里。

——下半部分由一个螺母和装有塞子的底座组成。底座上有四个可拧紧的螺母,固定住瓶塞上的所有物件。

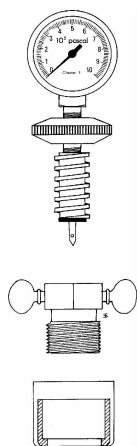


图 1 容器压力表

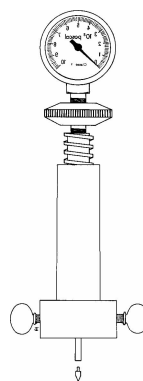


图 2 螺旋帽压力表



关于装有这两种压力计的说明：

——压力计可以是带不锈钢弹簧管的机械式或是带传感器的数字式。

——压力计的刻度为 Pa。对高泡葡萄酒来说，一般用  $10^6$  Pa 或是 kPa 作为测量单位。

——压力计有不同的等级。压力计的等级表示为读数的精度与满刻度的百分比(例如：一个 I 级 1 000 kPa 的压力计，表示它的最大量程是 1 000 kPa，其读数误差为  $\pm 10$  kPa)。精确测量推荐使用 I 级的压力计。

### 3 步骤

如果温度至少稳定了 24 h，可以在瓶子内进行测量。

在刺穿瓶冠、软木塞或塑料塞子后，瓶子必须进行剧烈的摇晃，以达到恒定的压力方便读数。

#### 3.1 螺旋盖的瓶子

在瓶子的环下，滑动夹钳的尖脚夹子。拧紧螺母直到整体紧紧固定在瓶子上。

上面的部分是用螺丝拧在螺母上的。为了避免损失气体且使接合处与瓶盖连在一起，要尽快刺穿瓶盖。同时用力摇晃瓶子使压力达到恒定值，以方便读数。

#### 3.2 有塞子的瓶子

把钻头放在针的末端。把设备固定在软木塞上。将 4 个螺丝拧在瓶盖上。

将顶端部分紧紧固定(针穿过软木塞)。为了将压力传送到压力计，钻头应该下降进入瓶子里。摇晃瓶子直到压力恒定后读数。读数后将钻头恢复。

### 4 结果表示

在 20℃ 下压力用 Pa 或 kPa 表示( $P_{20}$ )。

测量值与压力计的精度一致(例如：对 I 级量程 1 000 kPa 的压力计来说，只能精确到  $6.3 \times 10^5$  kPa 或是 630 kPa，而不是  $6.33 \times 10^5$  Pa 也不是 633 kPa)。

当测量温度不是 20℃ 时，它需要乘以一个适当的压力系数来进行校正(见表 1)。

表 1 高泡葡萄酒与低泡葡萄酒 20℃ 的压力  $P_{20}$ (20℃) 与  $t$ ℃ 下压力  $P(t)$  之比

温度/℃	压力之比	温度/ $t$ ℃	压力之比
0	1.85	8	1.45
1	1.80	9	1.40
2	1.74	10	1.36
3	1.68	11	1.32
4	1.64	12	1.28
5	1.59	13	1.24
6	1.54	14	1.20
7	1.50	15	1.16

表 1(续)

温度/°C	压力之比	温度/t°C	压力之比
16	1.13	21	0.97
17	1.09	22	0.95
18	1.06	23	0.93
18	1.03	24	0.91
20	1.00	25	0.88

## 5 结果控制

物理参数的直接测定法(1 型标准方法)。

压力计的校准:压力计应该定期校准(至少一年一次)。校准工作通过测试床来完成,以确保被测试的压力计与符合国家标准的参考压力计,或者与更高等级的压力计一致。测试是通过增加和减少两个设备的压力,检测其显示的值来进行的。如果两者之间有差异,则应该对被测试的压力计进行一些必要的调整。

实验室和授权机构配备有这样的测试床,压力计制造商的也有这样的测试床。



# 同位素比质谱仪测定起泡葡萄酒中二氧化碳 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

## 同位素比值(IRMS法)

(决议 Oeno 7/2005)

### 【前言】

本标准方法经 OIV 协同比对试验研究《 $^{13}\text{C}$ -IRMS 分析起泡葡萄酒中的  $\text{CO}_2$  (2003—2004)》已获得众实验室的认可。

### 【引言】

起泡葡萄酒瓶的瓶颈处充斥着大量气态  $\text{CO}_2$ ，与溶解在酒中的  $\text{CO}_2$  处于相对平衡状态。起泡葡萄酒的  $\text{CO}_2$  是葡萄酒经二次发酵(发酵糖来自于葡萄、甜菜、甘蔗或玉米)产生的。不过，这些  $\text{CO}_2$  也可以是人工添加的工业级  $\text{CO}_2$ 。

1997年，OIV推出了一种可以通过IRMS测定起泡葡萄酒所含的 $\text{CO}_2$ 中碳同位素 $^{13}\text{C}$ 与 $^{12}\text{C}$ 比值的离线方法。基于该方法原理，欧洲一些实验室开发了自动在线技术，其中一种已在2001年被OIV采纳。随着技术进步，新的能够快速可靠地测定大量样品 $\text{CO}_2$ 中碳同位素 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值的方法将被开发出来。下面的方法介绍了正确测量起泡葡萄酒 $\text{CO}_2$ 中 $^{13}\text{C}$ 含量的基本原理，简单说明了一些目前使用的新技术，并通过一些例子详细描述了离线和在线技术测定的操作步骤。

## 1 范围

本方法通过IRMS法测定起泡葡萄酒 $\text{CO}_2$ 中稳定碳同位素比值( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ )。本方法中包含了多个步骤，可根据实验室条件进行选择。

## 2 规范性引用文件

ISO 5725-2:1994 测量方法和结果的准确度 第2部分:标准测量方法的可重复性和可还原性基本测量方法

ISO 78-2:1999 化学 标准的编制 第2部分:化学分析方法

## 3 定义

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ :样品中碳同位素 $^{13}\text{C}$ 与 $^{12}\text{C}$ 的比值。

$\delta^{13}\text{C}$ :每毫升中碳 $^{13}\text{C}$ 的含量—表示为‰。

V-PDB:Vienna-Pee-Dee Belemnite. PDB标准品是美国南卡罗莱纳州碳酸钙化石，其同位素比值( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 或 $R_{\text{PDB}}$ )=0.011 237 2。以每毫升中‰表示的 $\delta^{13}\text{C}$ ，作为国际公认的PDB的比例以此值为参照值。

$m/z$ :质荷比。

$S_r$ :重复性标准偏差。同一操作者在同一个实验室中用相同的方法在较短的时间间隔

内完成同一个测试样品所得到的独立试验结果的标准偏差。

$r$ :重复性限。在重复条件下测得的两个结果其绝对差值小于或等于  $r$  的概率为 95%； $r=2.8 S_r$ 。

$S_R$ :再现性标准偏差。不同的操作者在不同的实验室用不同的仪器,但采用相同的方法测定同一个测试样品所得到的测试结果的标准偏差。

$R$ :再现性限。再现条件下测得的两个结果其绝对差值小于或等于  $R$  的概率为 95%； $R=2.8 S_R$ 。

## 4 原理

植物光合作用合成糖类化合物的途径可分为  $C_3$  植物和  $C_4$  植物。 $C_3$  植物(如葡萄和甜菜)的糖,<sup>13</sup>C 含量比  $C_4$  植物(如甘蔗和玉米)的低。这种<sup>13</sup>C 含量差异会表现在发酵产物(如乙醇和 CO<sub>2</sub>)中。然而,食品工业中使用的工业 CO<sub>2</sub> 以及化石燃料燃烧或碳酸盐热解产生的 CO<sub>2</sub> 中<sup>13</sup>C 含量有别于  $C_3$  植物和  $C_4$  植物。因此,可通过二氧化碳中<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C 比确定起泡酒中二氧化碳来自于二次发酵( $C_3$  或  $C_4$ )还是来自于外源添加的工业 CO<sub>2</sub>。

相关研究表明, $C_3$  植物糖进行发酵产生的 CO<sub>2</sub>,其  $\delta^{13}C$  的范围在 -17‰和 -26‰之间; $C_4$  植物糖产生的 CO<sub>2</sub> 中  $\delta^{13}C$  分布范围为 -7‰~ -10‰。充气酒中<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C 可能低于 -29‰,也可能高于 -10‰,这取决于 CO<sub>2</sub> 的来源。因此,通过测定起泡葡萄酒中 CO<sub>2</sub> 碳同位素比(<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C)是确定酒中气体来源的好方法。

<sup>13</sup>C 的含量是通过测定起泡葡萄酒中二氧化碳气体来完成的。这些来源于同位素<sup>18</sup>O、<sup>17</sup>O、<sup>16</sup>O、<sup>13</sup>C 和<sup>12</sup>C 的不同组合,<sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub> 对应的相对分子质量是 44,<sup>13</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub> 和<sup>12</sup>C<sup>17</sup>O<sup>16</sup>O 对应的相对分子质量是 45,而<sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sup>18</sup>O 的对应的相对分子质量是 46(因<sup>13</sup>C<sup>17</sup>O<sup>16</sup>O 和<sup>12</sup>C<sup>17</sup>O<sub>2</sub> 的含量很少,故忽略不计)。不同质荷比的离子流通过 3 个法拉第收集杯测定。由于<sup>12</sup>C<sup>17</sup>O<sup>16</sup>O 的存在,应当通过  $m/z=46$  离子流强度计算<sup>12</sup>C<sup>17</sup>O<sup>16</sup>O 的含量(Craig 校正),进而计算出正离子<sup>13</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub>的离子强度。由计算机软件分别计算出样品气和参考气中<sup>13</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub>与<sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub>的比值(参考气中<sup>13</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub>与<sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub>的比值经与国际参考物质 V-PDB 对比得出),二者比较即可得出样品气中  $\delta^{13}C$ (‰)。

## 5 试剂和材料

实验材料及耗材取决于实验室设备。

当通过真空管路和冷阱分离纯化 CO<sub>2</sub> 样品时,需下述试剂:

- 液氮;
- 酒精;
- 干冰 CO<sub>2</sub>。

通常,连续流动系统中(EA-IRMS 或 GC-C-IRMS)会用到下述耗材。具有相同质量的其他物质可以代替本清单中的物品:

- 氦气;
- 氧气;
- 作为二级标准的 CO<sub>2</sub> 气体(CAS 00124-38-9);
- 燃烧系统燃烧炉中所用的氧化剂:氧化铜;

——除水剂:如高氯酸镁。当 EA-IRMS 或 GC-C-IRMS 的气路中应用除水膜时不必使用干燥剂;

——毛细管柱和 Naphion 薄膜,除去 GC-C-IRMS 系统中燃烧产生的水。

测量时所用的参考气可以是经过认证的国际参考气体,也可以是以国际参考物质为基准( $\delta^{13}\text{C}$  已知)校正的工作标准气体。下面是一些可以用来标定参考气和辅助标定参考气的国际参考物质:

样品编号	物质	$^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$	
IMEP-8-A	$\text{CO}_2$	-6.40‰	来自 Messer Griesheim
ISO-TOP	$\text{CO}_2$	-25.7‰	
BCR-656	乙醇	-20.91‰乙醇 from	来自 IRMM
BCR-657	葡萄糖	-10.76‰	
SAI-692C	$\text{CO}_2$	-10.96‰	来自 Oztech Trading Coopool 贸易合作
NBS-22	油	-29.7‰	来自 IAEA
IAEA-CH-6(ANU)	果糖	-10.4‰	
NBS-18	方解石	-5.1‰	
NBS-19	TS-石灰石	+1.95‰	
FID-Mix	辛醇中的烷烃混合物	来自 Varian	
	$\text{C}_{14}$	-29.61‰	
	$\text{C}_{15}$	-25.51‰	
	$\text{C}_{16}$	-33.39‰	

## 6 仪器设备

常用的测量碳同位素比值的仪器,需满足下列要求:

同位素质谱仪(IRMS),测定自然丰度的  $\text{CO}_2$  中  $^{13}\text{C}$  含量(以  $\delta$  表示)时,其内部精密度(两次测定同一  $\text{CO}_2$  气样本时的差值)能够达到 0.05‰及以上。仪器需装备一套能同时测量  $m/z$  为 44、45、46 三种离子流强度的检测器。质谱分析仪须安装双进样系统(交替测量未知样品气和标准气)或使用连续流动技术(CF-IRMS)。

连续流动系统(CF-IRMS),可使用配有自动气体进样的连续流动系统。可以使用下列几种 CF-IRMS 技术。

GC-C-IRMS(气相色谱-燃烧-稳定同位素比值质谱仪)。

EA-IRMS(配有液体或固体进样的元素分析仪)。

这些系统均可分离纯化  $\text{CO}_2$ ,并将二氧化碳导入离子源中进行电离测定。

玻璃或不锈钢真空系统,配备除水冷阱和真空泵(真空度可达  $5 \times 10^{-3}$  mbar)。

气体进样装置,商品化或内部设计的装置(例如气体进样的注射泵),能在不发生同位素分馏的情况下从起泡葡萄酒中吸取  $\text{CO}_2$ 。

气密瓶(保存气体),与连续流进样系统的气体进样器配套。



密封瓶(保存起泡葡萄酒液体),适用于真空管路或与连续流进样系统的气体进样器配套。

## 7 步骤

分析过程主要包括3个步骤:CO<sub>2</sub>取样,CO<sub>2</sub>分离纯化,<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C比值的测量。这3个步骤可以完全独立(在离线系统中),也可以全部或部分有机整合在一起(在线系统)。各步骤中需严防碳同位素分馏。基于离线系统和连续流系统的特定步骤见附录A、附录B、附录C。

下述内容为参与实验室间协同比对实验研究的有关实验室常用的分析步骤:

### 7.1 CO<sub>2</sub> 取样程序

- a. 室温下,用一个特殊的设备插入橡木塞,从瓶子的顶部空间中抽取CO<sub>2</sub>,或者;
- b. 拔掉软木塞,与此同时迅速用连有取样器的高气密性阀门封住瓶口,然后从瓶子的顶部空间抽取CO<sub>2</sub>。拔掉软木塞换上阀门前起泡葡萄酒瓶应冷藏在0℃以下,然后使瓶体恢复室温。随后收集在取样器中的气体,用气密性注射器转移然后注入密封的GC小瓶,或者;
- c. 从起泡葡萄酒中的试样中抽取CO<sub>2</sub>。起泡葡萄酒瓶在拔掉橡木塞前应冷藏在4℃~5℃之间。酒样放在适合玻璃真空管路或自动气体进样器的特制瓶中。

### 7.2 CO<sub>2</sub> 分离纯化

将未凝结的气体以及气样中存在的水利用冷凝阱一起转移到真空管路中,或通过不同的在线系统纯化气样,分离CO<sub>2</sub>。这些在线系统通过连续流动系统或一个冷凝阱连到IRMS上。一些常用的在线系统如下:

- 连有连续流动系统的水冷凝阱在线系统;
- 气相色谱后的气水分离器(高氯酸镁);
- 直接或通过一个燃烧接口连在IRMS上的气相色谱。

### 7.3 <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C比值的测量

通过IRMS分析起泡葡萄酒中CO<sub>2</sub>中的碳同位素比值(δ<sup>13</sup>C)。

## 8 计算

采用相对测量法,即将待测样品的同位素比值与工作标准的同位素比值作比较。比较结果称为样品的δ值(两物质同位素比值间的相对偏差),其定义为:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{sam}/\text{ref}}(\text{‰}) = 1\,000 \times (R_{\text{sam}} - R_{\text{ref}}) / R_{\text{ref}}$$

其中 $R_{\text{sam}}$ 为被测样品的同位素比, $R_{\text{ref}}$ 为工作标准的同位素比。

标准样品的同位素比值通过碳同位素分析中的国际一级参考物质为PDB进行校正,用千分之<sup>13</sup>C和<sup>12</sup>C比值的相对偏差来表示。PDB是来自美国南卡罗来纳州白垩纪皮狄组拟箭石化石,其作为世界范围比较的基点(δ<sup>13</sup>C=0‰),碳同位素比值为<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C=(11 237.2±90)×10<sup>-6</sup>。

将测定结果δ<sup>13</sup>C<sub>sam/ref</sub>转化为以PDB为基准的结果,计算公式为:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{sam}/\text{V-PDB}}(\text{‰}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{sam}/\text{ref}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{ref}/\text{V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{sam}/\text{ref}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{ref}/\text{V-PDB}}) / 1\,000$$

δ<sup>13</sup>C<sub>ref/V-PDB</sub>为工作标准与PDB间的同位素相对偏差(‰)。

结果保留两位小数。



## 9 精密度

该方法参加实验室间协同比对实验研究的精密度见附录 D。

### 9.1 重复性

由同一操作员按相同的方法、使用相同的测量设备,在短时间间隔内对同一样品进行分析的两个测量结果的最终值的绝对差大于重复性限  $r$  的概率不超过 5%。

可接受重复性标准偏差( $S_r$ )及重复性限( $r$ )的平均值为:

$$S_r = 0.21\% \quad r = 0.58\%$$

### 9.2 再现性

由不同的操作员按相同的方法,使用不同的测量设备对同一样品进行分析的两个测量结果的最终值的绝对差大于再现性限  $R$  的概率不超过 5%。

可接受再现性标准偏差( $S_R$ )以及再现性限( $R$ )的平均值为:

$$S_R = 0.47\% \quad R = 1.33\%$$

## 10 实验报告

实验报告中应该包括下述内容:

样品测试清单;

引用的国际标准方法;

分析过程(包括取样和测量方法)及仪器设备;

实验结果及单位(各测定结果和平均值,以及根据第 8 章计算出的结果);

任何偏离既定分析步骤的程序;

实验中出现的反常特征;

实验日期;

核实测定结果重复性;

描述工作气体(这些气体用来监控实验方法稳定性)的校正方法。





## 附录 A

### 以离线系统为基础的抽样和测量的实验步骤 (内部抽样, 离线真空管路, 双路进样 IRMS 系统)

#### A.1 实验材料

取样设备: 该设备配备一个推柄(钢针)和三个横向导孔, 可从瓶中抽取气体。设备贮存气体的部分(贮气管)由两个阀门(阀 1 与阀 2)构成, 阀 1 连在穿孔装置上, 阀 2 连接真空管道的不锈钢接头, 阀 1 与阀 2 之间用不锈钢管连接, 气体容积为 1 mL。如果是玻璃的真空管路, 则需要一个可弯曲的不锈钢管接合器。下图显示的为气体收集装置。

离线真空管路有两个冷阱(真空度低于 0.05 mbar)。真空管道的材质可以是玻璃, 也可以是不锈钢。

双路进样系统-同位素质谱仪, 分析自然丰度的 CO<sub>2</sub> 中的<sup>13</sup>C 含量时, 其内部精密度能够达到 0.05‰ 或更高(以 δ 表示)。此处内部精密度是指用对同一 CO<sub>2</sub> 样本测量两次时的偏差。

#### A.2 步骤(见图 A.1)

##### A.2.1 CO<sub>2</sub> 取样

A.2.1.1 将取样装置连接到真空管路上并检测其密封容积。

A.2.1.2 关闭阀 1 和阀 2, 用取样装置的尖端穿透瓶塞(装置保持竖直状态)。

A.2.1.3 将取样装置连接到真空管路中, 抽尽管路中的空气, 排尽阀贮气管内的气体(阀 1 关闭, 阀 2 打开)。

A.2.1.4 真空度达到要求后, 关闭阀 2, 打开阀 1 并保持 1 min。达到平衡后关闭阀 1, 纯化贮气管内的气体。

##### A.2.2 CO<sub>2</sub> 纯化和分离

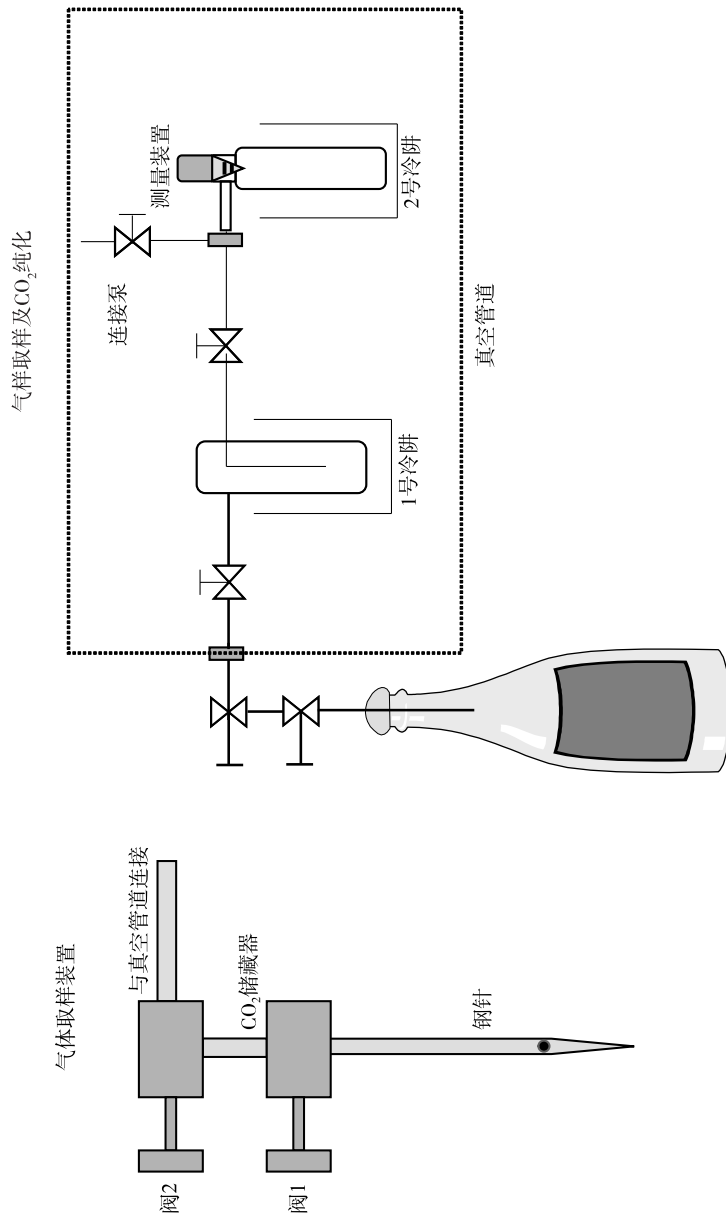
A.2.2.1 将收集的 CO<sub>2</sub> 转移至第一个液氮冷阱中保持至少 1 min 后, 用真空泵抽走不能被冻结的气体直至管道气压低于 0.05 mbar。

A.2.2.2 将第一个冷阱的液氮去掉, 改成 -80°C ± 5°C 的水阱, 将 CO<sub>2</sub> 转移至第二个液氮冷阱中, 保持 1 min。

A.2.2.3 用真空泵抽走第二个冷阱内不能被冻结的气体。

##### A.2.3 <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C 的测量

通过双路进样系统-IRMS 测定 CO<sub>2</sub> 中的碳同位素比值。



图A.1 离线系统装置示意图

## 附录 B

### 基于在线系统的取样和测量步骤 (CF-IRMS)

#### B.1 取样技术

首先将取样系统排空,用“取样设备”从酒瓶中提取二氧化碳,将一定体积的样品转移到贮气瓶中。当达到一定压力后,用限流器将少量气样转移至在线氦气流中。取样系统示意图见图 2。

包含二氧化碳的氦气流即为样品气流,不含二氧化碳的氦气流作为空白气流。每隔 2 s 切换一次四通阀,从而使样品气流和空白气流进入 IRMS 进行检测。

#### B.2 步骤(见图 B.1)

##### B.2.1 取样系统排空

将取样系统内的空气排空,使压力降至为-1mbar(V3 关闭)。

##### B.2.2 取样

将取样设备穿透瓶塞,在真空环境(最大压力约为 50mbar)中将瓶内气体转移至贮气瓶(GV)中——用针阀 VF 控制流量和流速。气体转移过程中经冷阱纯化。

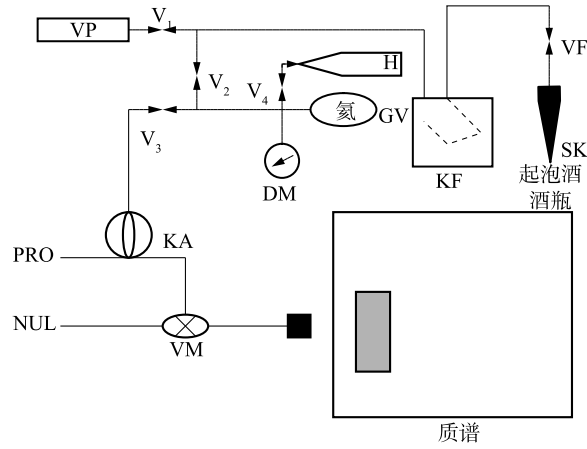
##### B.2.3 进样

取样后(V<sub>3</sub>,V<sub>2</sub> 关闭,V<sub>4</sub> 打开),通过氦气使压力超过 1.5bar。打开 V<sub>3</sub> 将待测气体输送到 CF-IRMS 系统中,通气 150 s 后进行测定。气体输送过程中经过 1 个限流器,限流器上的毛细管保证单位时间内流通很小气量(10 mL/min)。

##### B.2.4 测量

二氧化碳气流持续出现在氦样品气流(PRO)中,控制 VM 使得进入 CF-IRMS 的气流在 PRO 和空白氦气流(NUL)之间切换,从而产生二氧化碳的测定峰形。

氦样品流 PRO 停留时间:2 s(氦气流 NUL 停留时间:10 s~30 s)。



- $V_1 \sim V_4$ : 截止阀门;
- VP: 真空泵;
- VF: 针阀;
- SK: 取样器;
- PRO: 负载样品的氮气流(50 mL/min);
- NUL: 空载的氮气流(60 mL/min);
- KF: 水阱 $-90^{\circ}\text{C}$ ;
- GV: 容量为 250 mL 的气体贮瓶;
- DM: 压力表;
- KA: 限流毛细管(10 cm, 150  $\mu\text{m}$ );
- VM: 四通阀。

图 B.1 在线系统示意图



## 附录 C

### 基于 GC-C-IRMS 技术的实验步骤

#### C.1 特殊仪器

气相色谱仪:瓦里安 GC 3400。

毛细管柱:HP-INNOWax(Crosslinked Polyethylene Glycol 交联聚乙烯乙二醇),30 m×0.25 mm,膜厚 0.5 μm。

利用 ThermoFinnigan-MAT 的燃烧接口,氧化管温度设定在 940℃或室温,还原管温度为 640℃或室温。

质谱仪:DeltaPlus ThermoFinnigan-MAT。

#### C.2 步骤

##### C.2.1 CO<sub>2</sub> 取样

用 25 mL 注射器的钢针穿透橡木塞抽取一定体积的气体。

将气体转移到气相进样瓶中。进样瓶需用聚四氟乙烯/硅胶垫片密封。排出瓶内空气(防止空气中 CO<sub>2</sub> 的干扰)——在垫片上另外插一根钢针,当注射器内气体进入瓶内时,在压力作用下将瓶内原有的空气排出,见下图。

注:用较大体积的注射器(其量程不得小于进样瓶体积)以保证进样瓶内空气能够排干净。本实验中,选用了 2 mL 的气相进样瓶和 25 mL(或者更大)的注射器。

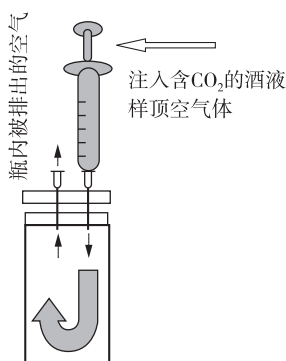


图 C.1

注:注射器应大于进样瓶的体积。

##### C.2.2 GC-IRMS 分析:CO<sub>2</sub> 进样以及<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C 比值分析

利用 10 μL 的 Hamilton 注射器将几微升的气体直接从气相色谱的进样口注入。设定好分流比,载气(氮气)的压力为 20 psi。

每个样品测定过程中注入 4 份气体。整个分析用时 6 min。色谱图见图 C.2。

##### C.2.3 结果处理

记录分析质谱仪信号的软件,版本为 Isodat NT 1.5,操作系统为 MS-Windows NT OS。每个样品 δ<sup>13</sup>C 的测定结果为最后三个峰的平均值。舍弃第一个峰的 δ<sup>13</sup>C 值。

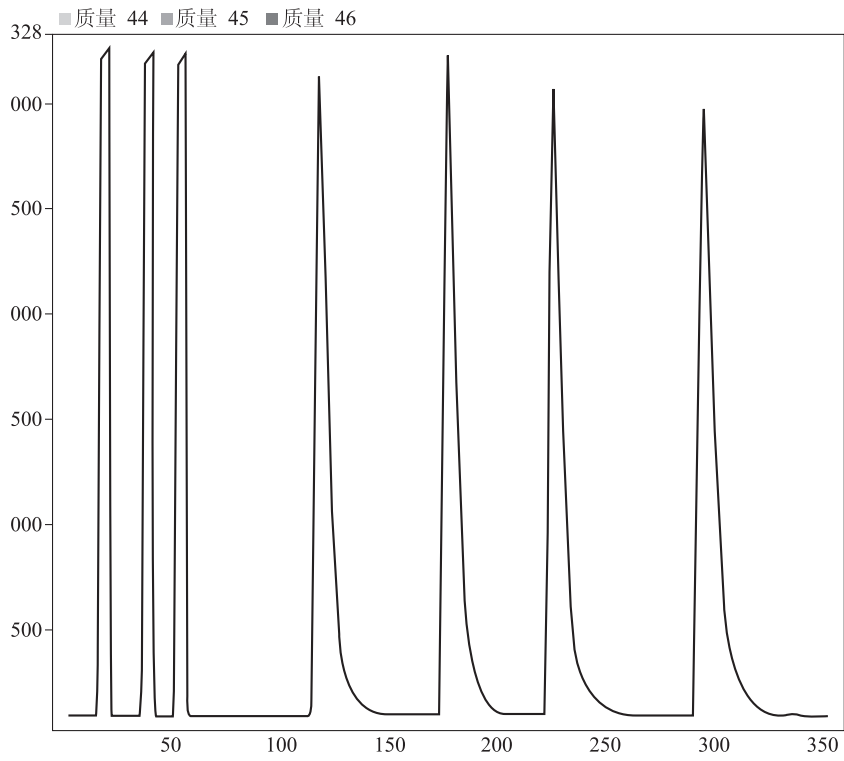


图 C.2

## 附录 D

### 实验室间比对实验的统计结果

根据 ISO 5725-2:1994, 在 11 个欧洲实验室和一个墨西哥实验室参加实验室间比对实验。

实验室间实验时间	2003—2004
实验室数量	12 个
样品数量	5 个盲样
参数	CO <sub>2</sub> 的 δ <sup>13</sup> C 值

样品号	A	B	C	D	E
参与实验室的数量	12	12	12	12	12
去掉异常值后有反馈结果的实验室的数量	12	11	12	12	12
每个实验室重复试验次数	2	2	2	2	2
可接受的测试结果数量	24	22	24	24	24
δ <sup>13</sup> C 平均值/‰	-9.92	-20.84	-23.66	-34.8	-36.43
S <sub>r</sub> <sup>2</sup>	0.057	0.031	0.119	0.006	0.044
重复性标准偏差(S <sub>r</sub> )/‰	0.24	0.18	0.35	0.08	0.21
重复性值, r(2.8×S <sub>r</sub> )/‰	0.67	0.49	0.97	0.21	0.58
S <sub>R</sub> <sup>2</sup>	0.284	0.301	0.256	0.14	0.172
再现性标准偏差(S <sub>R</sub> )/‰	0.53	0.55	0.51	0.37	0.41
再现性值, R(2.8×S <sub>R</sub> )/‰	1.49	1.54	1.42	1.05	1.16
A 表示起泡葡萄酒—C <sub>4</sub> 植物糖。 B 表示起泡葡萄酒—C <sub>3</sub> 植物糖。 C 表示起泡葡萄酒—C <sub>3</sub> 植物糖。 D 表示充气葡萄酒。 E 表示充气葡萄酒。					

### 参 考 文 献

- [1] Mesure du rapport isotopique <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C du gaz carbonique des vins mousseux et des vins gazéifiés, J. Merin and S. Minguez, Office International de la Vigne et du Vin, Paris, F. V. 1039, 2426/200297(1997).
- [2] Examination of the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotopes in sparkling and semi-sparkling wine with the aid of simple on-line sampling, M. Boner and H. Förstel, Office International de la Vigne et du Vin, Paris, F. V. 1152, (2001).
- [3] Use of <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratios for studying the origin of CO<sub>2</sub> in sparkling wines, J. Dunbar, Fresenius Z. Anal.



Chem. ,311,578-580(1982).

- [4] Contribution to the study of the origin of CO<sub>2</sub> in sparkling wines by determination of the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope ratio. I. González-Martin, C. González-Pérez, E. Marqués-Macías. J. Agric. Food Chem. 45, 1149-1151 (1997).
- [5] Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance studies. Pure Appl. Chem. ,1995, 67,331-343.



## 二氧化碳(压力计法)

(决议 Oeno 2/2006)

### 1 原理

在带有侧臂的锥形瓶中用 10 mol/L 的 NaOH 固定葡萄酒样品中的 CO<sub>2</sub>。将锥形瓶侧臂与压力计连接,然后向样品中加入硫酸以释放 CO<sub>2</sub>,用压力计可测量出因 CO<sub>2</sub> 释放而增加的压力,从而测定 CO<sub>2</sub> 含量。

### 2 试剂

- 2.1 蒸馏水或去离子水。
- 2.2 氢氧化钠(纯度>98%)。
- 2.3 硫酸(纯度>95%~97%)。
- 2.4 碳酸钠(纯度>99%)。

试剂制备:

- 2.5 10 mol/L 氢氧化钠:将 100 g 的氢氧化钠溶解到 200 mL 蒸馏水(2.1)中用容量瓶定容至 250 mL。
- 2.6 约为 50%(V/V)硫酸:小心地将硫酸(2.3)加入到等体积的蒸馏水(2.1)中,搅拌均匀后冷却至室温。
- 2.7 10 g/L 二氧化碳标准溶液:将无水碳酸钠(2.4)放在 260℃~270℃烘箱内放置一夜,然后放置在干燥器内冷却至室温。用水(2.1)溶解 6.021 g 无水碳酸钠并定容至 250 mL。
- 2.8 0.4 g/L 二氧化碳标准溶液,1 g/L,2 g/L,4 g/L,6 g/L:分别移取 2 mL;5 mL;10 mL;20 mL;和 30 mL 的标准溶液并定容到 50 mL。

### 3 仪器

- 3.1 50 mL 容量瓶、250 mL 容量瓶。
- 3.2 烘箱。
- 3.3 干燥器。
- 3.4 能精确到±0.1 mg 的天平。
- 3.5 冰箱或水-乙烯乙二醇浴(-4℃)。
- 3.6 电子密度仪或比重仪、恒温水浴锅(20℃)。
- 3.7 移液管 0.5 mL、2 mL、3 mL、5 mL、10 mL、20 mL、30 mL。
- 3.8 100 mL 锥形瓶、广口瓶。
- 3.9 数字压力计(允许的最大量程是 200 kPa,能精确到 0.1 kPa)。
- 3.10 反应瓶:带有 3 mL 侧臂和一个三通阀的 25 mL 的锥形瓶(见图 1)。
- 3.11 真空系统(例如:水泵)。
- 3.12 分液漏斗。



## 4 步骤

### 4.1 样品准备

准备两份相同的样品。将样品放在冰箱里过夜或者在 $-4^{\circ}\text{C}$ 的水-乙二醇浴锅中放置 40 min 进行冷却。吸取 3 mL 10 mol/L 的氢氧化钠到 100 mL 锥形瓶中,称量锥形瓶及内容物精确到 0.1 mg。然后将大约 75 mL 的冷却样品倒入上述锥形瓶中,再次称量锥形瓶及内容物,精确到 0.1 mg。混合后放置至室温。

### 4.2 二氧化碳含量的测定

取 2 mL 制备好的样品加入反应瓶中。通过三通阀将反应瓶和测压计连接,在锥形瓶侧臂中加入 0.5 mL 50% 的硫酸,固定好三通阀夹紧侧臂的挡板。注意气压,关闭三通阀,通过倾斜和摇晃使内容物混合。注意压力,如果有必要,制备的样品也可以加水稀释。

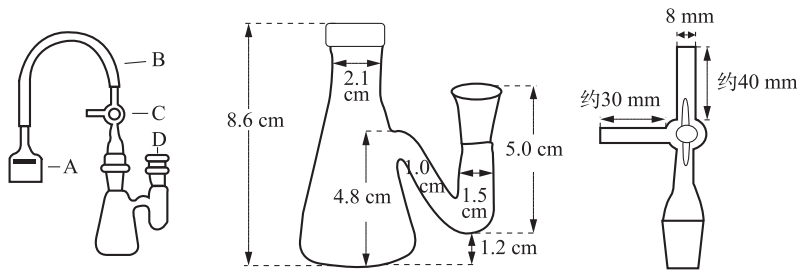


图 1 装置

A—测压计;B—橡胶管;C—三通阀;D—反应瓶(左)及合适的测量用的玻璃器皿(中间和右边)

### 4.3 校正

确定二氧化碳含量的校正方法如上所述(4.2)。在样品预期的浓度范围内进行 3 次校正,校准的溶液每个做两次平行。

### 4.4 测定样品的密度

首先将样品装于分液漏斗中摇晃,然后用水泵抽真空 3 min 以除去样品中的二氧化碳。通过电子密度仪或比重瓶测量样品的密度。

## 5 计算

计算每一个标准样品由于二氧化碳释放所引起的压力的增加量,并建立校正曲线。

计算校正图的斜率( $a$ )和截距( $b$ )。

样品的体积  $V(\text{mL})$ :

$$V = [(m_2 - m_1) \times 1000] / d \quad \dots\dots\dots (1)$$

其中: $m_1$ ——瓶的重量+3 mL NaOH 的重量(g);

$m_2$ ——瓶的重量+3 mL NaOH 的重量+样品的重量(g);

$d$ ——样品的密度( $\text{kg}/\text{m}^3$ )。

二氧化碳释放引起的压力的增加量为  $p_i$ :

$$p_i = p_s - p_{ap} \quad \dots\dots\dots (2)$$

其中： $p_s$ ——二氧化碳释放后压力计的读数；

$p_{ap}$ ——添加硫酸之前压力计的读数（即大气压力）。

样本中二氧化碳的浓度  $c$ ：

$$c = [(p_i - b) / a] \times [(V + 3) / V] \times L \dots\dots\dots (3)$$

式中： $p_i$ ——增加的压力(式 2)；

$a$ ——校正图的斜率；

$b$ ——校正图的偏差；

$V$ ——样品体积(式 1)；

$L$ ——样品制备后稀释的倍数。

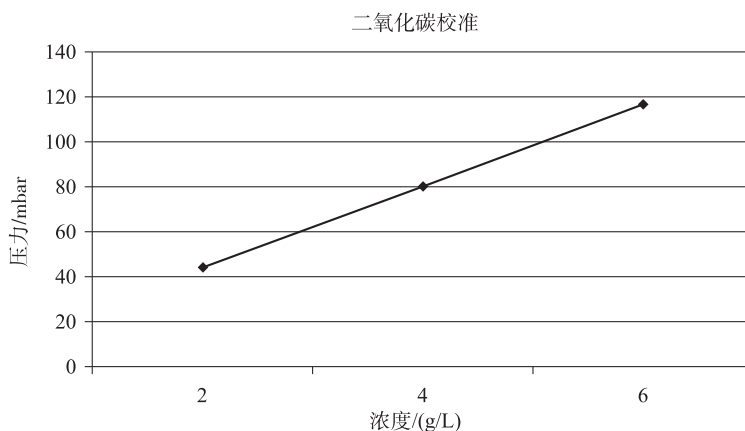
二氧化碳含量，% (m/m)：

$$\omega_{CO_2} = c \times 100 / d \dots\dots\dots (4)$$

二氧化碳含量计算的例子：

表 1 二氧化碳含量校正

标准的浓度/(g/L)	大气压力/mbar	二氧化碳释放后的压力/mbar	增加的压力/mbar
2	1021	1065	44
2	1021	1065	44
4	1021	1101	80
4	1021	1102	81
6	1021	1138	117
6	1021	1138	117



斜率:18.25000 截距:7.5000 相关系数  $R^2=0.99995$

图 2 二氧化碳浓度与压力校正曲线图

表2 二氧化碳浓度计算

样品	密度 $d$ kg/m <sup>3</sup>	瓶的重量 +NaOH /(mL/g)	瓶的重量+ NaOH+样 品/(m <sup>2</sup> /g)	大气压力 $p_{ap}$ /mbar	CO <sub>2</sub> 释放 后压力 $p_s$ / mbar	压力差 $p_s - p_{ab}$	样品 $V$ / mL	CO <sub>2</sub> 含 量/(g/L)	平均 CO <sub>2</sub> 浓度/(g/L)
起泡酒 1	1 027.2	84.628 7	156.162	1 021	1 112	91	69.64	4.77	
起泡酒 1	1 027.2	84.628 7	156.162	1 021	1 113	92	69.64	4.83	4.80
起泡酒 1	1 025.3	86.106 6	153.440 7	1 021	1 118	97	65.67	5.13	
起泡酒 1	1 025.3	86.106 6	153.440 7	1 021	1 118	97	65.67	5.13	5.13

## 6 验证

性能标准:

——两次重复测试标准偏差评估,  $s_o = 0.07$  g/L。

——相对标准偏差  $RSD = 1.9\%$ 。

——重复性  $r = 5.6\%$ 。

——扩展不确定度( $k=2$ ),  $U = 3.8\%$ 。

——校准范围 0.4 g/L~6 g/L。

——测定范围 0.3 g/L~12 g/L(样品浓度在 6 g/L 以上应该以 1:2 进行稀释, 以适应标定范围)。

——检出限 0.14 g/L。

——定量限 0.48 g/L。

## 附录 A

### 用改进的 EBC 方法检测酒精饮料中的二氧化碳 协同比对实验研究的统计结果

#### A.1 研究目的

研究目标是确定用改进的 EBC 方法检测葡萄酒、起泡葡萄酒、苹果酒和啤酒中二氧化碳的重复性和再现性。

#### A.2 研究用途和需要

酒精饮料因发酵而产生二氧化碳,在生产起泡葡萄酒的过程中,二氧化碳是最重要的产物。另外,二氧化碳也可以被加入到某些特定的酒精饮料中。酒精饮料中加入二氧化碳可以改善酒的味道和香味,而且二氧化碳也可以作为酒精饮料中的一种防腐剂。

根据《国际酿酒常规惯例》的定义,当保存在 20℃ 的密封容器中,起泡葡萄酒应该具有不少于 3 bar 的超压。相应的半起泡葡萄酒的超压应该在 1 bar 和 2.5 bar 之间。大约在 20℃ 条件下,当超压分别是 3 bar、2.5 bar 和 1 bar 时,所对应的二氧化碳浓度为 5.83 g/L、5.17 g/L 和 3.08 g/L。

目前还没有实用和可靠的方法测定酒精饮料中的二氧化碳。即便是在国际的能力验证中,也会出现二氧化碳的含量值差异很大的情况,因此需要一个可靠的检测方法。

#### A.3 范围和适用性

本方法用于定量测定酒精饮料中的二氧化碳。通过协同比对实验研究验证,测定了二氧化碳含量约为 0.4 g/L~12 g/L 的葡萄酒、啤酒、苹果酒和起泡酒。

注:实际校准水平范围从 0.4 g/L~6 g/L。如果二氧化碳的含量高于 6 g/L,样品应加水稀释到此范围内。

#### A.4 材料和设计

研究包括 6 个不同的样品,除了啤酒样品为双盲样送检外,每个参与者收到 12 瓶样品:啤酒、苹果酒、葡萄酒、白葡萄酒、珍珠酒、起泡葡萄酒各两瓶。对每个参与者的每瓶样品分别编码,所有样品均用原瓶送检,除了起泡葡萄酒,其他样品要将标签拆除。对同一批号的 10 瓶样品进行二氧化碳含量测试,以检测其均匀性。

#### A.5 实验样本

发给参与者四个控制样本使他们熟悉方法。这些样本包括啤酒、葡萄酒、珍珠酒、起泡葡萄酒各一瓶。

#### A.6 遵循的方法和支持性文件

计算结果的方法,Excel 表格。

支持性文件,包括附信、样品确认单和结果报告单。

#### A.7 数据分析

A.7.1 Cochran's 测试,Grubbs 测试 和 bilateral Grubbs 测试对异常值的确定进行评估。



A.7.2 进行统计分析以获得重复性和再现性数据。

## A.8 参与者

不同国家的9个实验室参加了此项研究. 每个实验室都有实验室代码, 参加的实验室已经证明有酒精饮料的分析经验。

Alcohol Control Laboratory  
Alko Inc.  
P. O. Box 279 Rajamäki  
FIN-01301 Vantaa  
Finland

Altia Ltd  
Valta-akseli  
  
Finland

Arcus AS  
Haslevangen 16  
P. O. Box 6764 Rodeløkka  
0503 Oslo  
Norway

ARETO Ltd  
Mere pst 8a  
10111 Tallinn  
Estonia

Bundesamt für Weinbau  
Göbeszeile 1  
A-7000 Eisenstadt  
Austria

Comité Interprofessionnel du  
Vin de Champagne  
5, rue Henri MARTIN  
BP 135

51204 EPERNAY CEDEX  
France

High-Tec Foods Ltd  
Ruomelantie 12 B  
02210 Espoo  
Finland  
52425

Institut für Radioagronomie  
Forschungszentrum  
Jülich GMBH  
Postfach 1913  
JüLICH  
Germany

Systembolagets laboratorioum  
Armaturvägen 4,  
S-136 50 HANINGE  
Sweden

## A.9 结果

10瓶相同批号的样品二氧化碳含量的均匀性测试由芬兰酒精控制实验室完成。样品及有关的批号一起发给参与者。



表 A.1

CO <sub>2</sub> 含量/ (g/L)	啤酒 1	啤酒 2	苹果酒	白葡萄酒	红葡萄酒	珍珠酒	起泡葡萄酒
平均值	5.191	5.140	4.817	1.337	0.595	5.254	7.463
方差	0.020	0.027	0.025	0.036	0.038	0.022	0.046

根据均匀性检验两瓶啤酒中的 CO<sub>2</sub> 含量是相同的,因此,他们被定为双盲样。  
所有样品和实验室协同比对实验研究的结果如表 A.2:

表 A.2

实验室 代码	啤酒 1	啤酒 2	苹果酒 1	苹果酒 2	白葡萄 酒 1	白葡萄 酒 2	红酒 1	红酒 2	珍珠酒 1	珍珠酒 2	高泡葡 萄酒 1	高泡葡 萄酒 2
A	5.39	5.08	4.75	4.91	1.25	1.11	0.54	0.54	5.15	5.22	6.93	6.91
B	4.76	5.53	4.71	4.7	1.90 <sup>3</sup>	1.78 <sup>3</sup>	0.73 <sup>2</sup>	1.19 <sup>2</sup>	5.85 <sup>3</sup>	5.93 <sup>3</sup>	7.66 <sup>3</sup>	7.72 <sup>3</sup>
C	5.15	5.14	4.93	4.94	1.36	1.41	0.51	0.48	5.25	5.53	7.33	7.36
D	3.13	3.95	4.36	0.38	1.11	1.11	0.43	0.38	4.47	4.29	5.54	5.52
E	4.87	4.73	4.96	4.78	1.52	1.52	0.78 <sup>3</sup>	0.80 <sup>3</sup>	4.98	4.94	5.83	6.17
F	5.34	4.91	4.71	5.01	1.33	1.4	0.46	0.57	5.22	4.95	6.52	6.67
G	5.18	5.15	4.82	4.86	1.37	1.36	0.56	0.59	5.22	5.27	7.54	7.47
H	5.42	5.4	5.05	5.12	1.15	1.3	0.52	0.53	5.22	5.1	7.25	7.34
I	5.14	5.13	4.65	4.76	1.16	1.19	0.47	0.61	5.16	5.06	6.88	6.48

1. 删除由于校准不佳而产生的较大的系统误差。
2. Cochran's 检验异常值。
3. Grubbs 检验异常值。

协同比对试验的统计结果汇总见表 A.3:

表 A.3

项目	啤酒	苹果酒	白葡萄酒	红葡萄酒	珍珠酒	起泡葡萄酒
平均值/(g/L)	5.145	4.859	1.316	0.532	5.139	6.906
平均值代表 1/(g/L)	5.156	4.833	1.306	0.510	5.154	6.897
平均值代表 2/(g/L)	5.134	4.885	1.327	0.553	5.124	6.914
S <sub>r</sub> /(g/L)	0.237	0.089	0.060	0.053	0.086	0.149
S <sub>R</sub> /(g/L)	0.237	0.139	0.135	0.059	0.124	0.538
SDR <sub>r</sub> (%)	4.597	1.821	4.562	9.953	1.663	2.163
RSD <sub>R</sub> (%)	4.611	2.855	10.22	11.07	2.407	7.795



表 A. 3(续)

项目	啤酒	苹果酒	白葡萄酒	红葡萄酒	珍珠酒	起泡葡萄酒
$r(2.8 \times s_r)/(g/L)$	0.662	0.248	0.168	0.148	0.239	0.418
$R(2.8 \times s_R)/(g/L)$	0.664	0.388	0.377	0.165	0.346	1.507
HORRAT <sub>R</sub>	1.043	0.640	1.883	1.779	0.544	1.843

## A. 10 结论

Horrat 值 $<2$ 时,表明是一个可接受的方法。然而,试验得出的 Horrat 值有一点偏高,参加这些测试的 9 个实验室中有 5 个之前没有经验。因此,结果还是可以被认为是非常满意的。

该方法给出的结果是 g/L,但是结果要转化为压力单位\*。

---

\* Troost, G. and Haushofer, H., *Sekt, Schaum- und Perlwein*, Eugen Ulmer GmbH & Co., 1980, Klosterneuburg am Rhein, ISBN 3-8001-5804-3, Diagram 1 on the page 13.



## 附录 B

### 低二氧化碳含量水平的方法验证

#### B.1 检测限和检出限

白葡萄酒样品重复分析 10 次,统计数据如下:

重复次数	10
平均值 CO <sub>2</sub> 浓度(g/L)	0.41
平均标准差, S(g/L)	0.048
检测限 3×S	0.14
检出限 6×S	0.48

#### B.2 标准添加

将 5 个不同浓度的标准添加到相同的葡萄酒中,用来测定检测限和检出限。将相应浓度的 CO<sub>2</sub> 也加入到水中,然后对这两个实验的线性回归进行比较。

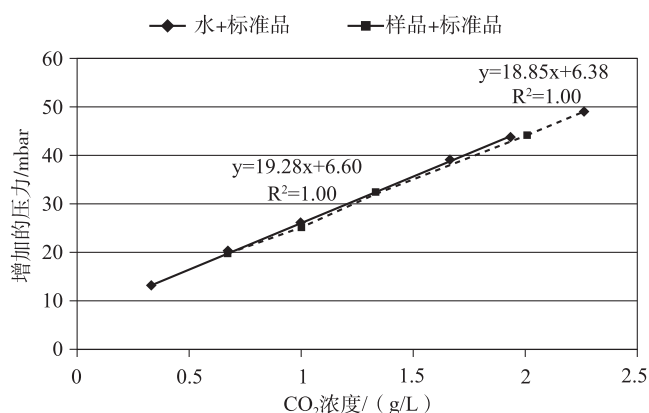


图 B.1 加入水和样品的标准产品

表 B.1 统计数据

指标	水+标准品	样品+标准品
斜率	19.3	18.9
斜率的不确定性	0.3	0.3
截距	6.6	6.4
截距的不确定性	0.4	0.5
残余标准偏差	0.4	0.3
样品的数量	15	10



根据统计数据两条回归线是相似的。

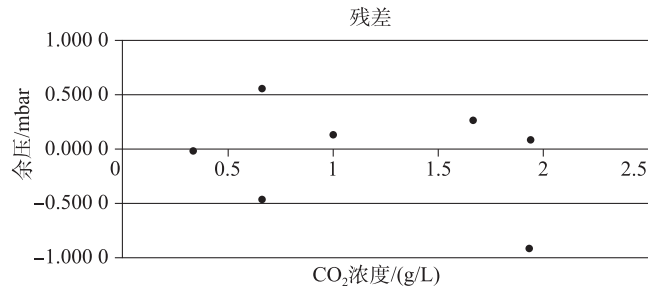


图 B.2 “水和标准品”方程的残差

残差分布在零的两侧,表明回归线是线性的。

## 参 考 文 献

- [1] European Brewery Convention Analytica-EBC, Fourth edition, 1987, 9. 15 Carbon dioxide.
- [2] OIV, SCMA 2002, FV N° 1153, determination of carbon dioxide in alcoholic beverages by a modified EBC method.
- [3] OIV, SCMA 2004, FV N° 1192, determination of carbon dioxide in alcoholic Beverages by a modified EBC method, Statistical results of the collaborative study.
- [4] OIV, SCMA 2005, FV N° 1222, comparison of the titrimetric method and the modified EBC method for the determination of carbon dioxide in alcoholic beverages.
- [5] Ali-Mattila, E. and Lehtonen, P., Determination of carbon dioxide in alcoholic beverages by a modified EBC method, Mitteilungen Klosterneuburg 52(2002):233-236.



## 附录 C 与其他技术和实验室结果比对

### C.1 优化的 EBC 方法与商业化安东帕公司 CarboQ 仪器的对比

样品	优化 EBC/(g/L)	安东帕公司方法/(g/L)	差值
起泡酒	9.14	9.35	-0.21
苹果酒	4.20	4.10	0.1
白葡萄酒	1.18	1.10	0.08
红葡萄酒	1.08	0.83	0.25
啤酒 1	5.26	5.15	0.11
啤酒 2	4.89	4.82	0.07
啤酒 3	4.90	4.92	-0.02
无醇啤酒 1	5.41	5.33	0.08
无醇啤酒 2	5.39	5.36	0.03
			平均值 0.06

根据  $t$  检验得出测量过程中没有系统误差。

### C.2 与德国 Bfr 和芬兰 ACL 之间的比较

Bfr 送 4 个样品到 ACL, ACL 送 5 个样品到 Bfr。芬兰 ACL 使用本文提到的方法,德国 Bfr 使用滴定方法分别对 9 个样品进行独立的分析。统计结果如下:

平均值的差	0.14 g/L
标准差	0.13 g/L
Z 分布	1.04

这里介绍的方法和滴定法也被奥地利 Bundesamt für Weinbau 用他们自己的 21 个样品进行了比较,统计数据如下:

平均值的差异	-0.01 g/L
标准差	0.26 g/L
Z 分布	-0.03

### C.3 结论

根据本文以及早期的实验可知本方法为通用方法。适用于测定所有类型的酒精饮料,如啤酒、葡萄酒、果酒、苹果酒、珍珠酒和起泡酒,二氧化碳含量的范围在 0.3 g/L 或更高。



## 3.1.5 其他有机类化气物

方法 OIV-MA-AS315-01

方法类型 IV

### 乙 醛

(决议 Oeno 377/2009)

#### 1 原理

葡萄酒经过活性炭脱色后,加入亚硝基铁氰化钠和吡啶与乙醛发生反应,溶液由绿色转变成紫色,该紫色化合物的最大吸收波长为 570 nm。

#### 2 仪器

可在 570 nm 处测量吸光度的分光光度计,比色皿的光程为 1 cm。

#### 3 试剂

3.1 10%(V/V)吡啶溶液( $C_5H_{11}N$ )。

取 2 mL 吡啶与 18 mL 蒸馏水混匀,现用现配。

3.2 0.4%(m/V)亚硝基铁氰化钠溶液。

称取 1 g 粉末状亚硝基铁氰化钠于 50 mL 容量瓶中,用蒸馏水溶解,然后定容至刻度线混匀。

3.3 活性炭。

3.4 25%(V/V)稀盐酸溶液。

3.5 碱性溶液:称取 8.75 g 硼酸,用 400 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液溶解,蒸馏水定容至 1 L 混匀。

#### 4 步骤

##### 4.1 试样

取约 25 mL 葡萄酒于 100 mL 锥形瓶中,加入 2 g 活性炭。用力振荡数秒,静置 2 min 后,用过滤器慢速过滤,得到澄清的滤液。

取 2 mL 澄清的滤液于 100 mL 锥形瓶中,加入 5 mL 亚硝基铁氰化钠溶液(3.2)和 5 mL 吡啶溶液(3.1),边加边进行搅拌,混匀后立即将溶液转移至 1 cm 比色皿中,溶液会立即显色,由绿色变为紫色,以空气作为参照,在波长 570 nm 下进行测定。由于这个颜色变化很快,颜色增加后会迅速减少,因此要立即测定并在约 50 s 后记录得到的吸光度最大值。所测定的乙醛浓度通过标准曲线计算得出。

注:如果所分析的溶液中有过量的游离乙醛,在测定前加入稍过量的游离二氧化硫于所待测溶液中,与乙醛相结合,1 h 后再进行实验。

##### 4.2 标准曲线的绘制

###### 4.2.1 与二氧化硫结合的乙醛标准储备溶液的制备

制备 5%~6%(m/V)二氧化硫溶液并使用 0.05 mol/L 碘液进行滴定,以确定其准确的

浓度。在 1 L 的容量瓶中,加入一定体积该溶液使二氧化硫的含量为 1 500 mg,然后加入 1 mL 新蒸馏并冷却后的乙醛于该容量瓶中,用蒸馏水定容至 1 L,混匀,放置过夜。

该溶液的准确浓度由以下方法测定:

取 50 mL 该溶液于 500 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 稀盐酸溶液和 100 mL 水,以淀粉作为指示剂,用 0.05 mol/L 碘液滴定游离二氧化硫,溶液变为浅蓝色即为滴定终点。再加入 100 mL 碱溶液,蓝色随之消失,然后用 0.05 mol/L 碘液滴定二氧化硫与乙醛的混合溶液,直到出现浅蓝色即为滴定终点。设  $n$  为所消耗的溶液体积。

与二氧化硫结合的乙醛溶液每升含有 44.05  $n$  mg 的乙醛。

#### 4.2.2 乙醛标准曲线的制备

在 5 个 100 mL 容量瓶中,分别加入 5 mL,10 mL,15 mL,20 mL 和 25 mL 的储备液。用蒸馏水定容至刻度线。这些溶液所对应的乙醛浓度分别为:40 mg/L,60 mg/L,120 mg/L,160 mg/L 和 200 mg/L,准确浓度必须通过提前测定的乙醛储备液浓度进行计算。

取 2 mL 乙醛标准溶液,按照 4.1 所述操作进行测定,绘制标准曲线,吸光度与乙醛的含量相关,标准曲线为直线但不通过原点。

## 参 考 文 献

[1] REBELEIN H., *Dtsch. Lebensmit. Rdsch.*, 1970, 66, 5-6.



## 乙酸乙酯(气相色谱法)

### 1 原理

葡萄酒经过蒸馏后,采用气相色谱内标法测定乙酸乙酯的含量。

### 2 方法

#### 2.1 仪器

见挥发酸章节。

#### 2.2 步骤

用10%(V/V)乙醇溶液配制成浓度为1 g/L的4-甲基-2-戊醇内标溶液。

取50 mL蒸馏后葡萄酒溶液(制备如酒精度章节中所示),加入5 mL内标液,混匀,作为待测溶液。

用10%(V/V)乙醇溶液配制成浓度为50 mg/L的乙酸乙酯标准溶液。将5 mL内标液加至50 mL该溶液中,混匀。

取2  $\mu$ L样品溶液和乙酸乙酯标准溶液进行测定。

气相色谱的测定条件:柱温:90℃,载气流速:25 mL/min。

#### 2.3 计算

乙酸乙酯浓度以毫克每升表示,根据下列公式计算:

$$50 \times \frac{I}{I_x} \times \frac{S_x}{S}$$

其中:S——标准溶液中乙酸乙酯的峰面积;

$S_x$ ——样品中乙酸乙酯的峰面积;

$I_x$ ——样品中内标的峰面积;

$I$ ——标准溶液中内标的峰面积。

## 乙酸乙酯(滴定法)

### 1 原理

将葡萄酒样品 pH 调至 6.5, 进行蒸馏分离乙酸乙酯, 在碱性环境中进行皂化反应和适当浓缩, 蒸馏液酸化后浓缩, 将皂化释放的乙酸分离出来, 然后用碱性溶液对其进行滴定。

### 2 方法

#### 2.1 试剂

2.1.1 1 mol/L 氢氧化钠溶液。

2.1.2 pH 6.5 缓冲溶液:

称取磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	5 g
加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液	50 mL

用水定容至 1 L 混匀。

2.1.3 结晶酒石酸。

2.1.4 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液。

2.1.5 1% 中性酚酞溶液, 用 96% (V/V) 乙醇配制。

#### 2.2 常用方法

取 100 mL 脱二氧化碳的葡萄酒于 500 mL 容量瓶中, 用  $n$  mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液中和( $n$  为滴定 10 mL 葡萄酒总酸度所消耗的 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液体积)。加入 50 mL pH 为 6.5 的缓冲溶液, 然后进行蒸馏, 蒸馏液经过锥形管导入装有 5 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液的 500 mL 圆底烧瓶中, 并在圆底烧瓶 35 mL 处做上标记, 收集 30 mL 馏出液。

将烧瓶塞紧, 静置 1 h 后, 置于沸水浴中并通入空气使溶液浓缩至约 10 mL, 冷却至室温, 加入 3 g 酒石酸, 在真空下振荡除去二氧化碳。将烧瓶中浓缩液转移至水蒸气蒸馏装置中, 用 5 mL 水冲洗烧瓶两次, 水蒸气蒸馏并至少回收 250 mL 馏出液。

以酚酞为指示剂, 用 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液滴定。

#### 2.3 计算

设  $n$  为所使用的 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液体积数(单位为毫升)。1 mL 对应 1.76 mg 乙酸乙酯。浓度(单位为毫克每升)由下式给出:

$$17.6 \times n$$

## 参考文献

通用方法:

[1] PEYNAUDE. , *Analyse et contrôle des vins*, Librairie Polytechnique Ch. -Béranger, 1958.



## 锦葵花色素二糖苷

### 1 原理

锦葵花色素二糖苷经硝酸氧化后生成的物质,在氨介质存在下,在紫外光照射下会发出鲜艳的绿色荧光。该物质的荧光强度可通过与经锦葵花色素二糖苷参考物质标定的硫酸奎宁滴定溶液的荧光强度相比较而进行测定。

游离的二氧化硫会使荧光衰减,因此必须先与过量的乙醛结合。

### 2 定性测定

#### 2.1 仪器

可在 365 nm 处进行测定的紫外灯。

#### 2.2 试剂

##### 2.2.1 乙醛溶液:

结晶的三聚乙醛	10 g
乙醇 96%(V/V)	100 mL

##### 2.2.2 1.0 mol/L 盐酸。

##### 2.2.3 10 g/L 硝酸钠溶液。

##### 2.2.4 96%(V/V)乙醇,含 5%浓氨水( $\rho_{20^{\circ}\text{C}}=0.92\text{ g/mL}$ )。

##### 2.2.5 每升含有 15 mg 锦葵花色素二糖苷的质控葡萄酒样。

##### 2.2.6 不含锦葵色素-二糖苷的葡萄酒样。

#### 2.3 方法

在试管中加入 10 mL 葡萄酒,1.5 mL 乙醛溶液,静置 20 min。取 1 mL 葡萄酒与乙醛发生反应后的溶液加到 20 mL 离心管中,加入 1 滴盐酸,1 mL 硝酸钠溶液,搅拌均匀,静置 2 min(最多 5 min),然后加入 10 mL 氨化乙醇。

以相同方法处理 10 mL 含有 15 mg/L 锦葵花色素二糖苷的质控葡萄酒样,搅拌均匀,静置 10 min 后,离心。

取上清液于校准试管中。在波长为 365 nm 的紫外光照射下,观察待测葡萄酒样和质控葡萄酒样之间绿色荧光的差异。

对于桃红葡萄酒,使用以下方法可能会增加其灵敏度:

——5 mL 葡萄酒用乙醛进行处理;

——0.2 mL 1 mol/L 盐酸;

——1 mL 10 g/L 硝酸钠溶液;

——5.8 mL 氨化乙醇。

用相同方法处理质控葡萄酒样。



## 2.4 数据分析

将待测葡萄酒样与质控葡萄酒样进行比较,无荧光或荧光明显较弱则可认为酒中不含锦葵花色素二糖苷;若待测葡萄酒样稍小于、等于或大于质控葡萄酒样,则需要该进行定量测定。

## 3 定量测定

### 3.1 仪器

3.1.1 荧光测定设备:激发波长为 365 nm;荧光发射波长为 490 nm。

3.1.2 光学石英比色皿(光程 1 cm)。

### 3.2 试剂

3.2.1 见定性检测用试剂

3.2.2 2 mg/L 硫酸奎宁溶液

用 100 mL 0.1 mol/L 的硫酸溶液制备成含有 10 mg 高纯度硫酸奎宁的溶液,取该溶液 20 mL,并用 0.1 mol/L 硫酸溶液稀释至 1 L。

### 3.3 步骤

使用上述定性测试的方法处理葡萄酒,不同之处是处理葡萄酒(红葡萄酒和桃红葡萄酒)的乙醛溶液用量为 1 mL。

将 2 mg/L 硫酸奎宁溶液置于比色皿中,通过调整狭缝的宽度和灵敏度来调整荧光至全量程(透射率  $T=100\%$ )

用一个装有待测葡萄酒样品的比色皿来替换比色皿;测得  $T_1$  值。

如果透光率的百分比  $T_1$  大于 35,则需用不含锦葵花色素二糖苷的葡萄酒(荧光必须小于 6%,需预先经过测试)来稀释该待测酒样。

注 1:在葡萄酒分析前加入水杨酸(水杨酸钠),可使其保持稳定,所引起的杂散荧光可通过乙醚萃取来消除。

注 2:杂散的荧光是由添加的焦糖引起的。

### 3.4 计算

对于不含二氧化硫没有经过乙醛处理的葡萄酒,在上述条件下,测得的荧光强度为 1 时,所对应的每升葡萄酒中含有 0.426 mg 锦葵花色素二糖苷。

红葡萄酒和桃红葡萄酒不含锦葵花色素二糖苷,测得的荧光强度为全量程  $T$  值的 6%。

每升葡萄酒中锦葵花色素二糖苷的含量(mg/L)为:

$$X = (T_1 - 6)0.426 \times \frac{11.5}{10} = (T_1 - 6) \times 0.49$$

如果葡萄酒被稀释,结果应乘以稀释倍数。

### 3.5 结果表示

锦葵花色素二糖苷的含量以最接近整数的每升葡萄酒的毫克数表示。

## 参 考 文 献

- [1] DORIER P. ,VERELLE L. ,*Ann. Fals. Exp. Chim.* ,1966,59,1.
- [2] GAROGLIO P. G. ,*Rivista Vitic. Enol.* ,1968,21,11.
- [3] BIEBER H. ,*Deutsche Lebensm. Rdsch.* ,1967,44-46.
- [4] CLERMONTMlle S. ,SUDRAUD P. ,*F. V. ,O. I. V.* ,1976 n°586.

## 氨基甲酸乙酯

(决议 Oeno 8/98)

采用气相色谱-质谱法检测酒精饮料中氨基甲酸乙酯的含量,该方法适用于氨基甲酸乙酯的含量在  $10 \mu\text{g/L} \sim 200 \mu\text{g/L}$  的测定。

### 1 原理

样品中加入氨基甲酸丙酯内标物,用水稀释后移入到 50 mL 固相萃取柱。用二氯甲烷洗脱氨基甲酸乙酯和氨基甲酸丙酯,在真空下用旋转蒸发仪进行浓缩,采用气相色谱-质谱仪在选择离子模式进行测定。

### 2 仪器

#### 2.1 气相色谱-质谱仪(GC/MS):

可进行选择离子监测模式(SIM)测定和数据处理的系统,最好配自动进样器。

#### 2.2 毛细管气相色谱柱:

聚乙二醇 20 M 型气相色谱柱  $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ 。

#### 2.3 色谱操作条件:

进样口温度:  $180^\circ\text{C}$ ; 氦气载气流速:  $25^\circ\text{C}$  时  $1 \text{ mL/min}$ , 不分流进样; 升温程序: 在  $40^\circ\text{C}$  保持  $0.75 \text{ min}$ , 随后以  $10^\circ\text{C/min}$  速度升至  $60^\circ\text{C}$ , 再以  $3^\circ\text{C/min}$  升至  $150^\circ\text{C}$ , 后运行: 上升至  $220^\circ\text{C}$  并在  $220^\circ\text{C}$  保持  $4.25 \text{ min}$ 。氨基甲酸乙酯的保留时间是  $23 \text{ min} \sim 27 \text{ min}$ , 氨基甲酸丙酯的保留时间是  $27 \text{ min} \sim 31 \text{ min}$ 。

GC/MS 接口: 输送线  $220^\circ\text{C}$ , 质谱参数通过优化全氟三丁胺低质量数的灵敏度来手动设置。SIM 采集模式, 溶剂延迟  $22 \text{ min}$ , 停留时间/离子为  $100 \text{ ms}$ 。

#### 2.4 带真空条件的旋转蒸发仪或者类似的浓缩系统。

注: 在处理过程中, 待测样品中氨基甲酸乙酯(3.7)的回收率, 须在  $90\% \sim 110\%$  之间。

#### 2.5 梨形烧瓶, 300 mL, 单口, 24/40 标准锥形口。

#### 2.6 浓缩管, 4 mL, 带刻度, 带有特氟龙涂层的 19/22 标准锥形塞。

### 3 试剂

#### 3.1 丙酮(HPLC 级)。

注: 各个批次使用前, 应通过 GC/MS 确认不存在  $m/z$  分别为 62, 74 和 89 等离子。

#### 3.2 二氯甲烷。

注: 各个批次使用前, 应浓缩 200 倍, 并通过 GC/MS 确认不存在  $m/z$  分别为 62, 74 和 89 等离子。

#### 3.3 无水乙醇。

#### 3.4 氨基甲酸乙酯(EC)标准溶液:

##### 3.4.1 储备液: $1.00 \text{ mg/mL}$ 。称取 $100 \text{ mg}$ EC(纯度 $\geq 99\%$ ) 于 $100 \text{ mL}$ 容量瓶中, 用丙酮



稀释至刻度线。

3.4.2 标准工作溶液:10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。移取 1 mL EC 储备液至 100 mL 容量瓶中,用丙酮稀释至刻度线。

3.5 氨基甲酸丙酯标准溶液(PC)

3.5.1 储备液:1.00  $\text{mg}/\text{mL}$ 。称取 100 mg PC(试剂级)于 100 mL 容量瓶中,用丙酮稀释至刻度线。

3.5.2 标准工作溶液:10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。移取 1 mL PC 储备液至 100 mL 容量瓶中,用丙酮稀释至刻度线。

3.5.3 PC 内标液:400  $\text{ng}/\text{mL}$ 。移取 4 mL PC 标准工作溶液至 100 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度线。

3.6 EC-*n*PC 标准校准溶液\*

用二氯甲烷稀释 EC3.4(2)和 PC 3.5.2 标准工作溶液,从而获得\*\*:

- a) 100 ng EC 和 400 ng *n*PC/mL;
- b) 200 ng EC 和 400 ng *n*PC/mL;
- c) 400 ng EC 和 400 ng *n*PC/mL;
- d) 800 ng EC 和 400 ng *n*PC/mL;
- e) 1 600 ng EC 和 400 ng *n*PC/mL。

3.7 模拟样品制备-EC 含量为 100  $\text{ng}/\text{mL}$  的 40%乙醇溶液:移取 1 mL EC 标准工作溶液 3.4.2 至 100 mL 容量瓶中,用 40%乙醇稀释至刻度线。

3.8 固相萃取柱:一次性材料,预先填充硅藻土,容量 50 mL。

注:进行分析前,检查每批萃取柱的 EC 和 *n*PC 的回收率以及是否不存在  $m/z$  为 62,74 和 89 离子。

制备 EC 含量为 100  $\text{ng}/\text{mL}$  的待测样品 3.7。

按照 4、5 和 6 中的步骤要求,对 5 mL 待测样品进行分析,EC 的回收率在 90  $\text{ng}/\text{mL}$ ~110  $\text{ng}/\text{mL}$  之间为满意。如果吸附剂的粒径不规则,会导致流速减慢,从而影响 EC 和 *n*PC 的回收率。

若多次试验后,待测样品回收率仍未达得 90%~110%,需要更换硅藻土柱子或使用经回收率修正后的标准曲线对 EC 进行定量。

校准曲线的修正,按照 3.6,用 40%乙醇代替二氯甲烷来制备标准溶液。按照 4、5 和 6 步骤要求,对 1 mL 的标准校准溶液进行测定,以 EC 浓度为横坐标,EC/*n*PC 比为纵坐标,建立一个新的标准曲线。

## 4 待测样品制备

分别在 2 个 100 mL 烧杯中,按照下面方法进行试验:

4.1 酒精度高于 14% vol 的葡萄酒:取 5.00  $\text{mL}\pm 0.01$  mL。

4.2 酒精度不高于 14% vol 的葡萄酒:取 20.00  $\text{mL}\pm 0.01$  mL。

在每个烧杯中,加入 1 mL PC 内标溶液 3.5.3,然后加入水使其总体积达到 40 mL(或 40 g)。

\* 对于一些氨基甲酸乙酯含量高的酒,需要用 50 m 的柱子。

\*\* 对于一些氨基甲酸乙酯含量高的酒,升温梯度可以改为 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

## 5 样品提取

将步骤 4 中已稀释的待测样品转移至萃取柱中,用 10 mL 水冲洗烧杯并将洗涤液转移至柱中,让溶液在柱中吸附 4 min,用  $2 \times 80$  mL 二氯甲烷进行洗脱,收集洗脱液于 300 mL 梨形烧瓶内。

在 30°C 水浴下旋转蒸发浓缩至 2 mL~3 mL(注:不要让提取物蒸干)。将浓缩后的残留物用步骤 9 中的巴斯德吸管转移至 4 mL 带刻度的浓缩管,用 1 mL 二氯甲烷洗涤烧瓶并将洗涤液一并转移至管中,在氮气下,浓缩样品至 1 mL。如果使用自动进样器,将浓缩物转移至小瓶内,供 GC/MS 分析。

## 6 GC/MS 分析

### 6.1 标准曲线

分别取 1  $\mu$ L EC 的标准溶液(3.6)进行 GC/MS 测定,绘制标准曲线,Y 轴为 EC-*n*PC 的  $m/z=62$  离子响应面积比,X 轴为 EC 的含量(ng/mL)(例如:100 ng/mL,200 ng/mL,400 ng/mL,800 ng/mL,1 600 ng/mL)。

### 6.2 EC 的定量

取 1  $\mu$ L 步骤 5 中制备的样品,采用 GC/MS 测定并计算  $m/z=62$  离子对应的 EC-*n*PC 面积比,使用内标法确定提取物中 EC 的浓度(ng/mL),该浓度是由提取物中 EC 的含量除以待测样品体积得到的。

### 6.3 EC 的定性

如果在 EC 的保留时间测出  $m/z$  分别为 62,74 和 89 离子,这些响应特性的主要片段是  $(M-C_2H_3 \cdot)^+$ ,  $(M-CH_3 \cdot)^+$  和分子离子(M),如果这些离子的相对比例偏差不超过 EC 标准比例的 20%,即可确认存在 EC。将该提取物进一步浓缩,以获得足够的  $m/z=89$  离子的响应。

## 7 方法的特性

表 1

样品	EC 平均含量/ (ng/g)	EC 的回收率/%	$S_t$	$S_R$	$RSD_t/\%$	$RSD_R/\%$
酒精度 14% (V/V)以上的 葡萄酒	40		1.59	4.77	4.01	12.02
	80	89	3.32	7.00	4.14	8.74
	162	90	8.20	11.11	5.05	6.84
酒精度 14% (V/V)以下的 葡萄酒	11		0.43	2.03	3.94	18.47
	25	93	1.67	2.67	6.73	10.73
	48	93	1.97	4.25	4.10	8.86



## 羟甲基糠醛(比色法)

### 1 原理

醛类是由呋喃衍生得到的,羟甲基糠醛是主要的醛之一,它可与巴比妥酸和对甲苯胺发生反应,生成的红色化合物在 550 nm 下用比色法对其进行测定。

游离的亚硫酸会对检测造成干扰,当亚硫酸的含量超过 10 mg/L 时,必须先与过量乙醛结合从而消除对测定的干扰。

### 2 比色法

#### 2.1 仪器

2.1.1 测量范围在 300 nm~700 nm 的分光光度计。

2.1.2 光程为 1 cm 的比色皿。

#### 2.2 试剂

2.2.1 0.5%(m/V)巴比妥酸溶液。将 500 mg 巴比妥酸溶解于蒸馏水中,并置于 100℃ 水浴中稍微加热溶解。用蒸馏水定容至 100 mL,该溶液可保存约 1 周。

2.2.2 10%(m/V)对甲苯胺溶液。取 10 g 对甲苯胺于 100 mL 容量瓶,加入 50 mL 异丙醇和 10 mL 冰醋酸( $\rho_{20^\circ\text{C}}=1.05\text{ g/mL}$ )溶解,用异丙醇定容至 100 mL,该溶液现用现配。

2.2.3 1%(m/V)乙醛溶液。现用现配。

2.2.4 1 g/L 羟甲基糠醛标准溶液。取 1g/L 的羟甲基糠醛,通过稀释配制成一系列含有 5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L 的羟甲基糠醛标准溶液,现配现用。

#### 2.3 步骤

##### 2.3.1 样品制备

——游离二氧化硫含量不超过 10 mg/L:取 2 mL 葡萄酒或葡萄汁进行分析,必要时将葡萄酒或葡萄汁过滤后测定。

——游离二氧化硫含量超过 10 mg/L:取 15 mL 样品于 25 毫升的容量瓶中,加入 2 mL 乙醛溶液,搅拌,静置 15 min,用蒸馏水定容至刻度。如有必要进行过滤,取 2 mL 的滤液进行测试。

##### 2.3.2 比色法测定

取 2 mL 2.3.1 中制备的滤液于两个 25 mL 的烧瓶 *a* 和 *b* 中,加入 5 mL 对甲苯胺溶液,混匀后,在烧瓶 *b* 中加入 1 mL 蒸馏水(对对照样),在烧瓶 *a* 中加入 1 mL 巴比妥酸溶液摇匀。将烧瓶中的溶液转移至光程为 1 cm 的分光光度计比色皿中。在波长 550 nm 下用烧瓶 *b* 中的溶液调零。测定烧瓶 *a* 中溶液的吸光度,吸光度在 2 min~5 min 后达到最大值。

样品中羟甲基糠醛浓度超过 30 mg/L 时,分析前需进行稀释。

### 2.3.3 标准曲线的制备

取 2 mL 含有 5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L 的羟甲基糠醛标准溶液加入两组 25 mL 的烧瓶 *a* 和 *b* 中，按 2.3.2 的步骤处理。

羟甲基糠醛吸光度与浓度(mg/L)的标准曲线，应该是通过原点的一条直线。

### 2.4 结果表示

测定样品的吸光度，用外标法根据标准曲线，计算样品中羟甲基糠醛的浓度，计算时要考虑到处理过程中样品的稀释倍数。

结果以毫克每升(mg/L)表示，保留一位小数。



## 羟甲基糠醛(高效液相色谱法)

### 1 实验原理

通过反相高效液相色谱分离并在 280 nm 处进行测定。

### 2 高效液相色谱法

#### 2.1 仪器

##### 2.1.1 高效液相色谱仪配备:

5  $\mu\text{L}$  或 10  $\mu\text{L}$  进样环;

可在 280 nm 进行测定的紫外检测器;

十八烷基键合硅胶柱(例如: Bondapak C<sub>18</sub>-Corasil, Waters Ass);

记录仪,最好是集成的;

流动相流速: 1.5 mL/min。

##### 2.1.2 孔径为 0.45 $\mu\text{m}$ 的滤膜。

#### 2.2 试剂

##### 2.2.1 双蒸水。

##### 2.2.2 甲醇,蒸馏或 HPLC 级。

##### 2.2.3 乙酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.05 \text{ g/mL}$ )。

2.2.4 流动相: 水+甲醇+乙酸=(40 mL+9 mL+1 mL),经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,并在使用前脱气。

2.2.5 25 mg/L 羟甲基糠醛标准溶液。准确称取 25 mg 羟甲基糠醛于 100 mL 容量瓶,用甲醇溶解定容至刻度线。用甲醇以 1/10 的比例稀释该溶液,并用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜进行过滤。

该溶液用一个密封的褐色玻璃瓶盛装,置于冰箱内,可保存 2~3 个月。

#### 2.3 步骤

将 5  $\mu\text{L}$  或 10  $\mu\text{L}$  按上述方法制备的样品与 5  $\mu\text{L}$  或 10  $\mu\text{L}$  羟甲基糠醛标准溶液分别注入色谱仪中,记录色谱图,羟甲基糠醛的保留时间约 6 min~7 min。

#### 2.4 结果表示

结果以毫克每升(mg/L)表示,保留一位小数。



## 氰化物衍生物

(决议 Oeno 4/94)

### 1 原理

用酸水解,使总的氢氰酸(包括游离的结合态)释放出来并通过蒸馏使其分离,然后与氯胺 T 和吡啶发生反应,生成蓝色的 1,3-二甲基巴比妥酸,用比色法进行测定。

### 2 设备

- 2.1 蒸馏装置:使用测定葡萄酒酒精度的蒸馏装置。
- 2.2 带有标准锥形塞的 500 mL 圆底烧瓶。
- 2.3 20℃ 恒温水浴锅。
- 2.4 分光光度计,可在 590 nm 波长处进行测定。
- 2.5 光程为 20 mm 的玻璃比色皿或一次性比色皿。

### 3 试剂

- 3.1 100% (m/V) 磷酸( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )。
- 3.2 3% (m/V) 氯胺 T 溶液( $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNNaO}_2\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )。
- 3.3 1,3-二甲基巴比妥酸溶液:取 3.658 g 的 1,3-二甲基巴比妥酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ )溶解于 15 mL 吡啶和 3 mL 盐酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.19 \text{ g/mL}$ )中,用蒸馏水定容至 50 mL。
- 3.4 氰化钾(KCN)。
- 3.5 10% (m/V) 碘化钾溶液(KI)。
- 3.6 0.1 mol/L 硝酸银溶液( $\text{AgNO}_3$ )。

### 4 步骤

#### 4.1 蒸馏

在 500 mL 圆底烧瓶中,加入 25 mL 葡萄酒,50 mL 蒸馏水,1 mL 磷酸和一些玻璃珠,立即将圆底烧瓶装上蒸馏装置,馏出液通过一根输送管收集到装有 10 mL 水的 50 mL 容量瓶冰水浴中。收集 30 mL~35 mL 馏出液(容量瓶内总共有约 45 mL 溶液),用几毫升蒸馏水清洗输送管,待馏出液温度到 20℃ 时,用蒸馏水定容至刻度线。

#### 4.2 测定

取 25 mL 馏出液于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 1 mL 氯胺 T 溶液并塞紧塞子。60 s 后,加入 3 mL 1,3-二甲基巴比妥酸溶液(3.3),塞紧塞子静置 10 min。然后,在 590 nm 波长下,在光程为 20 mm 的比色皿中测定吸光值,参比液为 25 mL 蒸馏水。

### 5 建立标准曲线

#### 5.1 氰化钾的滴定

精确称量约 0.2 g KCN,倒入一个 300 mL 容量瓶中,加入 100 mL 蒸馏水,溶解。加入



0.2 mL 碘化钾溶液并用 0.1 mol/L 硝酸银溶液进行滴定,直至获得稳定的黄色溶液。

在计算样品中 KCN 的浓度时,1 mL 0.1 mol/L 硝酸银溶液对应 13.2 mg KCN。

## 5.2 标准曲线

### 5.2.1 标准溶液的制备

根据步骤 5.1 中确定的 KCN 浓度,制备含有 30 mg/L 氢氰酸的标准溶液(30 mg HCN=72.3 mg KCN),将该溶液稀释 10 倍。

分别吸取 1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL 和 5.0 mL 稀释后的标准溶液于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度线,所对应的氢氰酸浓度分别为 30  $\mu\text{g/L}$ 、60  $\mu\text{g/L}$ 、90  $\mu\text{g/L}$ 、120  $\mu\text{g/L}$  和 150  $\mu\text{g/L}$ 。

### 5.2.2 测定

取 25 mL 该系列的标准溶液,按照 4.1 和 4.2 中的步骤,以标准溶液的吸光值为纵坐标,浓度为横坐标,绘制通过原点的标准曲线。

## 6 结果表示

通过标准曲线计算氢氰酸的浓度,如果样品在处理过程中进行了稀释,则需将结果乘以稀释因子。氢氰酸以微克每升( $\mu\text{g/L}$ )表示,保留至整数。

方法的重复性限( $r$ )和再现性限( $R$ )

白葡萄酒: $r=3.1 \mu\text{g/L}$  即约 6% $X_i$

$R=12 \mu\text{g/L}$  即约 25% $X_i$

红葡萄酒: $r=6.4 \mu\text{g/L}$  即约 8% $X_i$

$R=23 \mu\text{g/L}$  即约 29% $X_i$

$X_i$  为葡萄酒中 HCN 的平均浓度。

## 参考文献

- [1] JUNGE C., Feuillet vert N°877(1990).
- [2] ASMUS E. GARSCHLAGEN H., Z Anal. Chem. 138,413-422(1953).
- [3] WÜRDIG G., MÜLLER TH., Die Weinwissenschaft 43,29-37(1988).



## 人工合成甜味剂(糖精、甜蜜素、甘素和 P-4000)

### 1 原理

糖精(邻磺酰苯酰亚胺)、甘素(对乙氧基苯脲)、甜蜜素(环己基氨基磺酸盐)和 P-4000(5-硝基-2-丙氧基苯胺或 1-丙氧基-2-氨基-4-硝基苯)的检测。

葡萄酒浓缩后在酸性介质中用苯萃取糖精、甘素和 P-4000;萃取后的溶液用乙酸乙酯萃取甜蜜素(注意萃取的顺序),萃取溶剂蒸发后的残留物用薄层色谱进行分析。

糖精和甜蜜素的鉴别可以通过薄层纤维素板依次进行(溶剂:丙酮-乙酸乙酯-氨水),先是苯的萃取物,接着是乙酸乙酯的萃取物,鉴别前需要用乙醚进行洗涤净化。可以用联苯胺、苯胺、醋酸铜溶液喷雾进行显色,各组分的比移值  $R_f$  值分别为:甜蜜素 0.29,糖精 0.46。

从苯中萃取出的 P-4000 和甘素可在薄层聚酰胺板上进行分离(溶剂:甲苯;甲醇;冰醋酸),可以用对二甲氨基苯甲醛溶液喷雾显色,各组分的比移值  $R_f$  分别为:甘素 0.60, P-4000 0.80。

### 2 方法

糖精、甜蜜素、甘素和 P-4000 的检测。

#### 2.1 仪器

2.1.1 薄层色谱展开槽。

2.1.2 微量注射器或移液器。

2.1.3 直径为 15 mm,长为 180 mm,配有活塞的分液器。

2.1.4 100℃水浴锅。

2.1.5 可控温烘箱,温度能够达到 125℃。

#### 2.2 试剂

2.2.1 萃取溶剂:

苯;乙酸乙酯。

2.2.2 色谱溶剂:

1号混合物:

丙酮	60份
乙酸乙酯	30份
氨水( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 0.92 \text{ g/mL}$ )	10份

2号混合物:

甲苯	90份
甲醇	10份
冰醋酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.05 \text{ g/mL}$ )	10份

2.2.3 色谱板(20×20 cm):



- 纤维素板(例如:Whatman CC 41 或者 Macherey-Nagel MN300);
- 聚酰胺板(例如:Merck)。

#### 2.2.4 糖精和甜蜜素的指示剂:

制备:

- 将 250 mg 联苯胺溶解到 100 mL 乙醇溶液;
- 醋酸铜饱和溶液( $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ );
- 新蒸馏的苯胺。

将 15 mL 联苯胺溶液、1 mL 苯胺溶液和 0.75 mL 醋酸铜饱和溶液进行混合,该溶液必须现配。配置的体积需要与 20 cm×20 cm 的色谱板使用量相符合。

2.2.5 50%(V/V)盐酸溶液。

2.2.6 25%(V/V)硝酸溶液。

2.2.7 P-4000 和甘素的指示剂:将 1g 1,4-对二甲氨基苯甲醛溶解于 50 mL 甲醇中,加入 10 mL 25%硝酸溶液,用甲醇定容至 100 mL,5 mL 该试剂可用于 20 cm×20 cm 色谱板的展开。

2.2.8 0.10 g/100 mL 环己基氨基磺酸的溶液。溶解 100 mg 环己基氨基磺酸的钠盐或者钙盐于 100 mL 水-乙醇混合溶液中(1:1)。

2.2.9 0.05 g/100 mL 糖精水溶液。

2.2.10 0.05 g/100 mL 甘素甲醇溶液。

2.2.11 0.05 g/100 mL P-4000 甲醇溶液。

### 2.3 步骤

#### 2.3.1 提取

取 100 mL 葡萄酒于烧杯中,在通入冷空气的情况下,迅速煮沸蒸发直到体积减少至 30 mL,静置冷却。用 3 mL 50%盐酸溶液酸化后,将该溶液转移至带有磨砂玻璃塞的 500 mL 锥形瓶内,加入 40 mL 苯进行萃取,用搅拌机搅拌 30 min 后,将溶液转移至分液漏斗中,分离有机相至带有磨砂玻璃塞的锥形瓶中,如果形成乳浊液,需离心分层。

将预先用苯萃取过的葡萄酒(其所对应的是分液漏斗中的下层)转入至含有 40 mL 乙酸乙酯的 500 mL 带有磨砂玻璃塞的锥形瓶中搅拌 30 min,用和之前一样的方法分离有机相,只回收有机相部分。

在直径为 50 mm~60 mm 的蒸发皿中,于 100℃水浴蒸发萃取溶剂,同时在蒸发皿的表面直接通入少量的冷空气。持续蒸发直至残留物具有糖浆的稠度后,停止蒸发以避免溶剂完全蒸发。

用 0.5 mL 乙醇-水(1:1)溶液溶解蒸发皿中的苯萃取残留物(最好是用 0.25 mL 乙醇-水溶液溶解残留物后,再用 0.25 mL 乙醇-水溶液冲洗蒸发皿一次)。将乙醇-水溶解物置于一个带磨砂玻璃塞的小管中(提取物 B)。

用 0.5 mL 的水溶解蒸发皿中的乙酸乙酯萃取残留物,水溶液倒入小的离心管中,用 10 mL 乙醚清洗蒸发皿,并将乙醚洗涤液也加入离心管中,充分混合 2 min,将分离出的下层液体转入于含有 0.5 mL 乙醇的小试管中。该 1 mL 乙醇-水溶液可能含有甜蜜素(提取物 A)。

#### 2.3.2 色谱检测

##### 2.3.2.1 糖精和甜蜜素



检测糖精和甜蜜素所使用的纤维素板,一半用于鉴定甜蜜素,另一半用于鉴定糖精。

分别在板的其中一半滴入 5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$  提取物 A 和 5  $\mu\text{L}$  甜蜜素标准溶液。在板的另一半滴入 5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$  提取物 B 和 5  $\mu\text{L}$  糖精标准溶液。将制备好的板置于含有 1 号溶剂(丙酮;乙酸乙酯;氨水)的色谱槽中;直到溶剂前沿达到 10 cm~12 cm 的高度。从槽中取出板并用暖空气烘干。然后,将联苯胺试剂均匀地、轻轻地喷在板上(每块板 17 mL~18 mL),用冷空气干燥板。将板置于烘箱中,在 120 $^{\circ}\text{C}$ ~125 $^{\circ}\text{C}$  下保持 3 min。在淡栗色的背景下,出现暗灰色斑点,随着时间的增加,斑点会变成棕色。

### 2.3.2.2 P-4000 和甘素

在聚酰胺板上滴上 5  $\mu\text{L}$  的提取物 B 以及 5  $\mu\text{L}$  甘素和 P-4000 标准溶液。将制备好的板置于含有 2 号溶剂(甲苯;甲醇;乙酸)的色谱槽中。让溶剂前沿达到 10 cm~12 cm 的高度。

从槽中取出板并用冷空气烘干。将 15 mL 对二氨基苯甲醛试剂喷在板上,并用冷空气吹干直到出现对应于甘素和 P-4000 的橙黄色斑点。

### 2.3.2.3 灵敏度

采用联苯胺试剂,糖精和甜蜜素的检出限分别为 2  $\mu\text{g}$  和 5  $\mu\text{g}$ 。采用二氨基苯甲醛试剂,甘素和 P-4000 的检出限分别为:0.3  $\mu\text{g}$  和 0.5  $\mu\text{g}$ 。

本方法的测定范围(取决于萃取的效率):

糖精	2 mg/L~3 mg/L
甜蜜素	40 mg/L~50 mg/L
甘精	1 mg/L
P-4000	1 mg/L~1.5 mg/L

## 参 考 文 献

- [1] TERCERO C., F. V., O. I. V., 1968, n°277 and F. V., O. I. V., 1970, n°352.  
 [2] Wine Analysis Commission of the Federal Health Department of Germany, 1969, F. V., O. I. V., n°316.  
 [3] International Federation of Fruit Juice Manufacturers, 1972, F. V., O. I. V., n°40.  
 [4] SALO T., ALRO E. and SALMINEN K., Z. Lebensmittel Unters. u. Forschung, 1964, 125, 20.



## 人工合成甜味剂(糖精、甜蜜素和甘素)

### 1 实验原理

用液体离子交换树脂将葡萄酒中的糖精、甘素和甜蜜素等甜味剂提取出来,然后用氨水再次提取,使用纤维素和聚酰胺粉末混合涂层薄层板进行分离(展开剂:二甲苯;正丙醇;冰醋酸;甲酸),在薄层板上喷涂了 2,7-二氯荧光黄溶液,在紫外灯的照射下,甜味剂在黄色背景上有蓝色荧光出现。

随后喷涂的 1,4-二甲氨基苯甲醛溶液可区分甘素,它仅呈现出一个橙色的斑点,比移值  $R_f$  与香草醛和对羟基苯甲酸酯相同。

### 2 方法

糖精、甜蜜素和甘素的检测。

#### 2.1 仪器

2.1.1 薄层装置。

2.1.2 玻璃板 20 cm×20 cm。

板的制备:将 9 g 干纤维素粉末和 6 g 聚酰胺粉末混匀。边振荡边加入 60 mL 甲醇。涂抹在板上,厚度为 0.25 mm。在 70℃ 下干燥 10 min。此用量能制备 5 块板。

2.1.3 可控温的水浴锅或一个旋转蒸发仪。

2.1.4 检测薄层板的紫外灯。

#### 2.2 试剂

2.2.1 石油醚(40℃~60℃)。

2.2.2 离子交换树脂,例如:苯酚甲醛离子交换树脂 LA-2。

2.2.3 20%(V/V)乙酸溶液。

2.2.4 离子交换溶液:5 mL 离子交换树脂与 95 mL 乙醚和 20 mL 20%乙酸溶液剧烈搅拌,使用上层部分。

2.2.5 1 mol/L 硝酸溶液。

2.2.6 10%(V/V)硫酸。

2.2.7 25%(V/V)氨水溶液。

2.2.8 聚酰胺粉末,例如:Macherey-Nagel 或者 Merck。

2.2.9 纤维素粉末,例如:Macherey-Nagel MN 300 AC。

2.2.10 用于色谱的溶剂:

二甲苯	45 份
正丙醇	6 份
冰醋酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.05 \text{ g/mL}$ )	7 份
甲酸(98%~100%)	2 份

### 2.2.11 显色剂

——0.2%(m/V)2,7-二氯荧光黄乙醇溶液。

——1,4-二甲氨基苯甲醛溶液:称取1g二甲氨基苯甲醛于100mL容量瓶中加入50mL乙醇溶解,加入10mL25%硝酸溶液,并用乙醇定容至刻度线。

### 2.2.12 标准溶液:

——0.1%(m/V)甘素甲醇溶液。

——糖精溶液:称取0.1g糖精溶解于100mL甲醇水溶液中(1:1,体积比)。

——甜蜜素溶液:称取1g环己基氨基酸钠盐或钙盐溶解于甲醇水溶液(1:1,体积比)。

——香草醛溶液:称取1g香草醛溶解于甲醛水溶液(1:1,体积比)。

——1g/100mL对羟基苯甲酸酯甲醇溶液。

## 2.3 步骤

取50mL葡萄酒于一个分液漏斗中,用10mL稀硫酸(2.2.6)酸化,然后用25mL离子交换溶液提取两次。50mL离子交换提取溶液用50mL蒸馏水洗涤3次,弃去洗涤液,再用15mL稀氨水洗涤3次,收集氨溶液在50℃的水浴锅内或旋转蒸发仪上小心地蒸发直至蒸干。然后加入5mL丙酮和2滴1mol/L硝酸溶液溶解,过滤后,在70℃水浴中再次蒸发至干,注意加热温度不要过长或者超过70℃,用1mL甲醇将残留物溶解。

将5 $\mu$ L~10 $\mu$ L的该溶液和2 $\mu$ L的标准溶液滴在薄层板上,展开剂(二甲苯、正丙醇、乙酸、甲酸),让溶剂前沿移至约15cm的高度,这一过程大约需要1h。

在空气中干燥后,将二氯荧光黄溶液充分地喷在薄层板上,糖精和甜蜜素会在肉色的背景下出现光点。在紫外光(254nm或360nm)下检测三种甜味剂会在黄色背景下发出蓝色的荧光。

从板的底部到顶部,甜味剂顺序依次为甜蜜素、糖精、甘素。

香草醛和对羟基苯甲酸酯与甘素的比移值相同。为鉴别甘素的存在,可在板上喷二甲氨基苯甲醛溶液,甘素显现为橙色的斑点,而其他物质不发生反应。

灵敏度:三种甜味剂在层析板上的定量限为5 $\mu$ g。

本方法检测限:

糖精	10 mg/L
甜蜜素	50 mg/L
甘素	10 mg/L

## 参 考 文 献

- [1] TERCERO C., F. V., O. I. V., 1968, n°277 and F. V., O. I. V., 1970, n°352.  
 [2] Wine Analysis Commission of the Federal Health Department of Germany, 1969, F. V., O. I. V., n°316.  
 [3] International Federation of Fruit Juice Manufacturers, 1972, F. V., O. I. V., n°40.  
 [4] SALO T., ALRO E. and SALMINEN K., Z. Lebensmittel Unters. u. Forschung, 1964, 125, 20.



## 人工着色剂

### 1 原理

将葡萄酒浓缩至原体积的  $1/3$ ,用稀氢氧化钠溶液调成碱性,然后用乙醚萃取。乙醚相经水洗涤后,再用稀乙酸溶液萃取;乙酸溶液随后用氨水碱化,将经过硫酸铝和酒石酸钾处理过的羊毛线加入到该溶液中加热至沸腾。如果溶液中含有着色剂,那么它们将会被固定在羊毛线上。将该羊毛线置于稀乙酸溶液中,加热蒸发乙酸溶液后,残留物用水-乙醇溶液溶解,并通过薄层色谱法对着色剂进行分析。

乙醚萃取后的水相中可能含有酸性着色剂,利用它们与动物纤维的亲合力,在矿物酸介质的存在下将其固定在羊毛线上。可以通过两次或多次重复上述操作使酸性着色剂浓缩。

羊毛线有颜色,说明葡萄酒中加入了人工着色剂,用薄层色谱法对着色剂进行鉴定。

### 2 仪器

2.1 20 cm×20 cm 覆有纤维素粉末的玻璃板。

2.2 色谱展开槽。

### 3 试剂

3.1 乙醚。

3.2 5% (m/V) 氢氧化钠溶液。

3.3 冰醋酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.05 \text{ g/mL}$ )。

3.4 稀乙酸溶液,1份冰乙酸溶液加入18份的水。

3.5 稀盐酸:1份盐酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.19 \text{ g/mL}$ )加入10份蒸馏水。

3.6 氨水( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 0.92 \text{ g/mL}$ )。

3.7 白色羊毛线,预先洗净,用乙醚脱脂并干燥。

3.8 白色羊毛线,预先洗净,用乙醚脱脂、干燥并酸化。

酸化剂:将1 g 硫酸铝  $\text{Al}_2(\text{SO}_4) \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  和 1.2 g 酒石酸钾溶解在 500 mL 水中,取 10 g 白色羊毛,预先洗净,用乙醚脱脂并干燥后,置于该溶液中,搅拌约 1 h,静置 2 h~3 h;除去水后,在室温下干燥。

3.9 1号展开剂,用于碱性着色剂:

正丁醇	50 mL
乙醇	25 mL
乙酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.05 \text{ g/mL}$ )	10 mL
蒸馏水	25 mL

3.10 2号展开剂,用于酸性着色剂:

正丁醇	50 mL
乙醇	25 mL



氨水( $\rho_{20^{\circ}\text{C}}=0.92\text{ g/mL}$ )	10 mL
蒸馏水	25 mL

## 4 步骤

### 4.1 碱性着色剂的检测

#### 4.1.1 着色剂的提取

取 200 mL 葡萄酒置于 500 mL 玻璃锥形瓶中,煮沸浓缩至其体积的 1/3,冷却后,用 5% 氢氧化钠溶液中和,直到葡萄酒的自然色发生显著的变化。

用 30 mL 乙醚萃取两次,收集乙醚相用于分析碱性着色剂,剩余的水相需保存好,用于酸性着色剂的分析。

乙醚相用 5 mL 水洗两次以去除氢氧化钠;然后与 5 mL 稀乙酸进行混合,如果存在碱性着色剂,则所得到的酸性水溶液有颜色。

通过将着色剂固定在酸化羊毛线上的方法来进一步确定是否存在碱性着色剂。用 5% 氨水使酸性的水相变为碱性,加入 0.5g 酸化羊毛线并煮沸约 1 min,然后在自来水(流水)下冲洗羊毛线,如果羊毛线有颜色,则说明葡萄酒中含有碱性着色剂。

#### 4.1.2 薄层色谱法检测

将含有碱性着色剂的乙酸水溶液相浓缩至 0.5 mL。如果着色剂被固定在酸化的羊毛线上,则加入 10 mL 蒸馏水和几滴乙酸( $\rho_{20^{\circ}\text{C}}=1.05\text{ g/mL}$ )和羊毛线一起煮沸,然后将液体挤出并除去羊毛线,并将溶液浓缩至 0.5 mL。

在距纤维素薄层板侧边 3 cm、下边 2 cm 处,加入 20  $\mu\text{L}$  浓缩溶液,将板置于含有 1 号展开剂的槽中,使下部边缘浸入溶剂 1 cm。当溶剂前沿的高度达到 15 cm~20 cm 时,将薄层板从槽中取出并风干。

将已知的人工碱性着色剂按照样品的操作条件同时进行展板,以鉴别样品中的着色剂。

### 4.2 酸性着色剂的检测

#### 4.2.1 着色剂的提取

将乙醚提取葡萄酒中碱性着色剂后的水相部分,浓缩至其体积的 1/3 并进行中和。如果之前没有进行碱性着色剂提取,则取 200 mL 葡萄酒于锥形瓶中,煮沸使其浓缩至原来体积的 1/3。

加入 3 mL 稀盐酸和 0.5 g 白色羊毛线,煮沸 5 min,倾倒出液体,并用流水冲洗羊毛。

加入 100 mL 水和 2 mL 稀盐酸到装有羊毛线的锥形瓶中,煮沸 5 min,倒出酸性液体并重复这一步骤,直到冲洗过的酸性液体变为无色。将羊毛线彻底清洗除去酸后,加入 50 mL 蒸馏水和几滴氨水( $\rho_{20^{\circ}\text{C}}=0.92\text{ g/mL}$ )于锥形瓶中;温和条件下煮沸 10 min,使固定在羊毛线上的着色物质溶解。从瓶中取出羊毛线,加入水使液体体积达到 100 mL 煮沸直到氨完全蒸发。随后,用 2 mL 盐酸水溶液酸化(用试纸进行测试以确保溶液为酸性)。

在该烧瓶加入 60 mg(约 20 cm 长的线)白色羊毛线煮沸 5 min,取出羊毛线并用流水冲洗。

如果经过上述处理,羊毛线浸在红葡萄酒中,被染成红色的,或者浸在白葡萄酒中被染成黄色的,就证明有酸性人工着色剂的存在。如果颜色是淡的或者不确定的,则需重新用氨



对 30 mg 羊毛线进行第二次固定。

如果在第二次固定过程中,出现的颜色较淡但有明显的粉红色,则可认为存在酸性着色剂。

如果要得到更明确的结果,可用与第二次固定相同的步骤,进行新的固定-洗脱(4 或 5 次),直到获得明显的粉红色。

#### 4.2.2 薄层色谱法检测

在装有有色羊毛线的瓶中加入 10 mL 蒸馏水和几滴氨水( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 0.92 \text{ g/mL}$ ),煮沸后挤出液体取出羊毛线。浓缩该氨溶液至 0.5 mL。

取 20  $\mu\text{L}$  加到在距纤维素板侧边 3 cm、下边 2 cm 处。将板置于展开槽中,使得下部边缘浸入溶剂 1 cm。当溶剂前沿移至 15 cm~20 cm 的高度时,将薄层板从槽中取出并风干。

将已知的人工着色剂按照样品的操作条件同时进行展板,以鉴别样品中的着色剂。

## 参 考 文 献

[1] TERCERO C., *FV, OIV*, 1970, n°356.

[2] ARATA P., SAENZ-LASCANO-RUIZ, Mme I., *FV, OIV*, 1967, n°229.

## 二 甘 醇

### 1 目的

检测葡萄酒中二甘醇( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ )的含量,定量限为 10 mg/L。

### 2 原理

葡萄酒中二甘醇经乙醚萃取之后,用气相色谱毛细管柱分离检测。

### 3 仪器

#### 3.1 气相色谱仪及相关配件:

分流-不分流进样器;

火焰离子检测器;

聚乙二醇涂层的毛细管柱(聚乙二醇,20 M),50 m×0.32 mm(内径)。

操作条件:

进样口温度:280℃。检测器温度:270℃。载气:氢气。载气流量:2 mL/min。载气流速:30 mL/min。进样模式:不分流进样。进样量:2 μL。35℃进样-气流 40 s 后关闭。控温程序:120℃~170℃,升温速度 3℃/min。

#### 3.2 离心机。

### 4 试剂

4.1 1 g/L,20%(V/V)乙醇溶液(内标)1,3-丙二醇。

4.2 20 mg/L 二甘醇水溶液。

### 5 操作步骤

于 50 mL 烧瓶中,加入:

10 mL 葡萄酒;1 mL 1,3-丙二醇溶液;25 mL 乙醚。

振摇并加入足量的中性碳酸钾,直至达到饱和状态。再次振摇后离心使其分层。

重复萃取一次,取有机相旋转蒸发近干后,残留物用 5 mL 乙醇溶解。

提取效率达到 90%以上。根据 3.1 中给出的条件进行色谱分析。

### 6 结果

相同测定条件下,通过与标准溶液的保留时间进行比较,对葡萄酒中二甘醇进行定性分析。用内标法进行定量。如果测定结果小于或等于 20 mg/L,推荐使用质谱法进行确认。

## 参 考 文 献

- [1] BANDIONF. , VALENTA M. & KOHLMANN H. , *Mitt. Klosterneuburg, Rebe und Wein* , 1985 , 35 , 89.
- [2] BERTRAND A. , *Com. vigne vins* , 1985 , 19 , 191.
- [3] Laboratoire de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité de Montpellier , *F. V. , O. I. V. , 1986 , n°807.*

## 赭曲霉毒素 A

(Oeno 16/2001 被 Oeno 349-2011 修改)

### 1 应用范围

本方法采用免疫亲和柱结合高效液相色谱法检测葡萄酒中的赭曲霉毒素 A(OTA)含量,可用于测定红葡萄酒、桃红葡萄酒、白葡萄酒以及特种葡萄酒中 OTA 含量小于  $10 \mu\text{g/L}$  的葡萄酒样品<sup>[1]</sup>。

该方法通过了国际联合试验的验证,验证中所检测的样品为经过毒素污染的天然白葡萄酒和红葡萄酒。酒中 OTA 的含量范围为  $0.01 \mu\text{g/L} \sim 3.00 \mu\text{g/L}$ 。

该方法同样适用于半起泡葡萄酒和起泡葡萄酒的检测,但需将样品预先脱气处理,如超声。

### 2 原理

葡萄酒样品用含有聚乙二醇和碳酸氢钠的溶液稀释后,通过免疫亲和柱过滤和净化。OTA 经甲醇洗脱后,用反相 HPLC 结合荧光检测器进行定量分析。

### 3 试剂

#### 3.1 分离 OTA 的免疫亲和柱用试剂

下列试剂为参考试剂。如果免疫亲和柱的供应商提供了适用于自己产品的稀释液和淋洗液,则应优先选用所提供的试剂。

3.1.1 磷酸氢二钠二水合物( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。

3.1.2 磷酸二氢钠一水合物( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )。

3.1.3 氯化钠( $\text{NaCl}$ )。

3.1.4 实验室用的纯净水,例如质量符合 EN ISO 3696《分析实验室用水 规范和试验方法》要求。

3.1.5 磷酸缓冲溶液(稀释液):

称取  $60\text{g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和  $8.8\text{g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  溶解于  $950\text{ mL}$  水中,加水至  $1\text{ L}$ 。

3.1.6 磷酸盐缓冲液(淋洗液):

称取  $2.85\text{g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.55\text{g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和  $8.7\text{g NaCl}$  溶解于  $950\text{ mL}$  水中,加水至  $1\text{ L}$ 。

3.1.7 甲醇( $\text{CH}_3\text{OH}$ )。

#### 3.2 HPLC 用试剂

3.2.1 HPLC 级乙腈( $\text{CH}_3\text{CN}$ )。

3.2.2 冰醋酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )。

3.2.3 流动相 水:乙腈:冰醋酸=99:99:2(体积比)

将  $990\text{ mL}$  乙腈(3.2.2)和  $20\text{ mL}$  冰醋酸(3.2.3)与  $990\text{ mL}$  水混合,用  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜过



滤。如果所使用的 HPLC 设备中没有脱气装置,需先进行脱气处理。

### 3.3 制备 OTA 储备液所需试剂

3.3.1 甲苯( $C_6H_5CH_3$ )。

3.3.2 混合溶液(甲苯:冰醋酸=99:1,体积比):

将 1 体积的冰醋酸与 99 体积的甲苯混合制得。

### 3.4 OTA 储备液

溶解 1 mg 或者相同含量的 OTA 于球形瓶中,如果 OTA 蒸发后以膜状形式存在,则混合溶剂中 OTA 的含量应约为  $20 \mu\text{g/mL}$ ~ $30 \mu\text{g/mL}$ 。该溶液可在  $-18^\circ\text{C}$  保存至少 4 年。

为了确定其准确浓度,应记录其在光程为 1 cm 的石英比色皿中  $300 \text{ nm}$ ~ $370 \text{ nm}$  之间的吸收光谱,同时使用混合溶剂作为空白。确定最大吸光度并使用下列公式计算 OTA 的浓度( $c$ ),单位为  $\mu\text{g/mL}$ :

$$c = A_{\max} \times M \times 100 \epsilon \times \delta$$

其中:

$A_{\max}$ ——最大吸收波长时的吸光度(约  $333 \text{ nm}$ )。

$M$ ——OTA 的摩尔质量= $403.8 \text{ g/mol}$ 。

$\epsilon$ ——在混合溶液中 OTA 的摩尔消光系数( $\epsilon=544/\text{mol}$ )。

$\delta$ ——光程( $\text{cm}$ )。

### 3.5 OTA 标准溶液( $2 \mu\text{g/L}$ 甲苯:乙酸=99:1,体积比)

将储备液用混合溶液(3.1.2)稀释成  $2 \mu\text{g/mL}$  的 OTA 标准溶液。该溶液可储存于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中。其稳定性需要定期测试。

## 4 仪器

4.1 玻璃管( $4 \text{ mL}$ )。

4.2 适用于免疫亲和柱的真空泵。

4.3 适用于免疫亲和柱的储液管。

4.4 玻璃纤维过滤器(例如 Whatman GF/A)。

4.5 OTA 专用的免疫亲和柱

该亲和柱 OTA 的总容量应至少为  $100 \text{ ng}$ 。当含有  $100 \text{ ng}$  OTA 的葡萄酒稀释溶液通过时,要求净化率至少为 85% 以上。

4.6 旋转蒸发器。

4.7 液相色谱,泵可以满足流动相以  $1 \text{ mL/min}$  的恒定流速进行等度洗脱。

4.8 进样系统必须配备  $100 \mu\text{L}$  定量环。

4.9 分析型的不锈钢 HPLC 色谱柱  $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ (内径),固定相为  $C_{18}$ ( $5 \mu\text{m}$ ),并配有预柱或者适当的预过滤器( $0.5 \mu\text{m}$ ),或其他性能相当的液相色谱柱。

4.10 荧光检测器,激发波长为  $333 \text{ nm}$ ,发射波长为  $460 \text{ nm}$ 。

4.11 信息收集系统。

4.12 紫外分光光度计。

## 5 步骤

### 5.1 样品制备

在 100 mL 锥形烧瓶中加入 10 mL 葡萄酒和 10 mL 稀释液。充分混匀,如果溶液出现混浊或者有沉淀,需用玻璃纤维过滤器进行过滤。

### 5.2 免疫亲和柱净化

在免疫亲和柱上装上真空泵,并连上储液管。

加 10 mL(相当于 5 mL 的葡萄酒)的稀释液于储液管中。使样品以每秒 1 滴的流速通过免疫亲和柱。免疫亲和柱应始终保持湿润。淋洗时,先用 5 mL 淋洗液,然后用 5 mL 水以每秒 1~2 滴的流速淋洗免疫亲和柱。

用空气将免疫亲和柱内液体吹干。用 2 mL 甲醇以每秒一滴的流速将 OTA 洗脱至玻璃烧瓶中。在 50℃下,用氮气将洗脱液吹干。立即用 250  $\mu$ L HPLC 流动相溶解,在进行 HPLC 分析前应保存在 4℃下。

### 5.3 HPLC 分析

使用定量环进样,进样量为 100  $\mu$ L(相当于 2 mL 葡萄酒)。

色谱条件:

流速:1 mL/min;

流动相:乙腈:水:冰醋酸(99:99:2,体积比);

荧光检测器:激发波长=333 nm;

发射波长=460 nm;

进样量:100  $\mu$ L。

## 6 赭曲霉毒素 A(OTA)的定量分析

通过 OTA 保留时间处的峰面积或峰高由标准曲线进行定量。

### 6.1 校正曲线

每天或者每次色谱条件改变时都需重新制备校正曲线,移取 0.5 mL 2  $\mu$ g/mL OTA 标准溶液于玻璃烧瓶中并用氮气吹干。

用经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤的 HPLC 流动相 10 mL 进行溶解,即为 100 ng/mL 的 OTA 溶液。

根据表 1 中所示使用流动相配制 5 个浓度梯度的标准溶液于 5 mL 容量瓶中用。

液相色谱每次标准溶液的进样量为 100  $\mu$ L。

表 1

指 标	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
已过滤的 HPLC 流动相体积/ $\mu$ L	4 970	4 900	4 700	4 000	2 000
100 ng/mL OTA 溶液的体积/ $\mu$ L	30	100	300	1 000	3 000
OTA 浓度/(ng/mL)	0.6	2.0	6.0	20	60
OTA 进样量/ng	0.06	0.20	0.60	2.00	6.00

注1:如果样品中 OTA 的含量超出标准曲线范围,应将样品适当稀释或减少进样量。在这种情况下,结果应进行相应的校正。

注2:由于样品中 OTA 浓度变化较大,建议校正曲线过零点以便对低浓度(低于 0.1  $\mu\text{g/L}$ )的 OTA 进行精确定量。

## 7 结果计算

被测溶液和进入高效液相色谱中试样的 OTA 浓度( $c_{\text{OTA}}$ )用以下公式计算,单位为  $\text{ng/mL}$ (相当于  $\mu\text{g/L}$ ):

$$c_{\text{OTA}} = M_{\text{A}} \times F / V_1 \times V_3 / V_2$$

其中: $M_{\text{A}}$ ——通过标准曲线得到的进样试样中 OTA 的质量( $\text{ng}$ );

$F$ ——稀释因子;

$V_1$ ——被分析样品的体积( $10 \text{ mL}$ );

$V_2$ ——进样体积( $100 \mu\text{L}$ );

$V_3$ ——洗脱液吹干后复溶的体积( $250 \mu\text{L}$ )。

## 8 方法评价

针对白葡萄酒、桃红葡萄酒、红葡萄酒中 OTA 检测方法的验证数据见表 2。

表 2 葡萄酒中 OTA 不同添加浓度的回收率

项 目	红葡萄酒		桃红葡萄酒		白葡萄酒	
	回收率 $\pm SD^a$ %	$RSD^b$ %	回收率 $\pm SD^a$ %	$RSD^b$ %	回收率 $\pm SD^a$ %	$RSD^b$ %
0.04	96.7 $\pm$ 2.2	2.3	94.1 $\pm$ 6.1	6.5	91.6 $\pm$ 8.9	9.7
0.1	90.8 $\pm$ 2.6	2.9	89.9 $\pm$ 1.0	1.1	88.4 $\pm$ 0.2	0.2
0.2	91.3 $\pm$ 0.6	0.7	88.9 $\pm$ 2.1	2.4	95.1 $\pm$ 2.4	2.5
0.5	92.3 $\pm$ 0.4	0.5	91.6 $\pm$ 0.4	0.4	93.0 $\pm$ 0.2	0.2
1.0	97.8 $\pm$ 2.6	2.6	100.6 $\pm$ 0.5	2.5	100.7 $\pm$ 1.0	1.0
2.0	96.5 $\pm$ 1.6	1.7	98.6 $\pm$ 1.8	1.8	98.0 $\pm$ 1.5	1.5
5.0	88.1 $\pm$ 1.3	1.5	—	—	—	—
10.0	88.9 $\pm$ 0.6	0.7	—	—	—	—
平均值	92.8 $\pm$ 3.5	3.8	94.5 $\pm$ 5.2	5.5	94.5 $\pm$ 4.1	4.3

<sup>a</sup> $SD$ =标准偏差(标准偏差)( $n=3$ )。  
<sup>b</sup> $RSD$ =相对标准偏差(%)。

## 9 工作组

该方法由来自 8 个国家 16 个不同实验室组成的研究小组进行了协同比对验证实验,以下为验证该分析方法的统一方案。



每个参加单位分析了 10 个白葡萄酒和 10 个红葡萄酒样品,分别来自随机抽取的 5 组双样,样品是自然污染或人为添加了 OTA 的葡萄酒样品。该方法的评价分析见附录 A、附录 B 和附录 C 中概述了该方法中的关键点。

## 10 参与实验室

Unione Italiana Vini, Verona	意大利
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti	意大利
Istituto Tecnico Agraria, S. Michele all'Adige(TN)	意大利
Università Cattolica, Piacenza	意大利
Institute for Health and Consumer Protection, JRC-Ispra	意大利
Neutron s. r. l. , S. Maria di Mugnano(MO)	意大利
Chemical Control s. r. l. , Madonna dell'Olmo(CN)	意大利
Laboratoire Toxicologie Hygiène Appliquée, UniversitéV. Segalen, Bordeaux	法国
Laboratoire de la D. G. C. C. R. F. de Bordeaux, Talence	法国
National Food Administration, Uppsala	瑞典
Systembolagets Laboratorium, Haninge	瑞典
Chemisches Untersuchungsamt, Trier	德国
State General Laboratory, Nicosia	塞浦路斯
Finnish Customs Laboratory, Espoo	芬兰
Central Science Laboratory, York	英国
E. T. S. Laboratories, St. Helena, CA	美国

## 附录 A

表 A.1 中数据是根据协同比对验证实验所推荐的统一检测方法所得到的,用来对分析的结果进行评价。

表 A.1 协同验证实验中各实验室间检测结果汇总表

白葡萄酒样品	添加的 OTA/( $\mu\text{g/L}$ )				
	空白	0.100	1.100	2.000	自然污染的样品
实验室间检测比对的年份	1999	1999	1999	1999	1999
参加实验室数目	16	16	16	16	16
剔除不合理结果后实验室数目	14 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	14	14	15
剔除的实验室数目	—	1	2	2	1
可接受结果数目	28	26	28	28	30
平均值/( $\mu\text{g/L}$ )	<0.01	0.102	1.000	1.768	0.283
重复性标准偏差/( $\mu\text{g/L}$ )	—	0.01	0.07	0.15	0.03
相对重复性标准偏差 RSD <sub>r</sub> /%	—	10.0	6.6	8.5	10.6
重复性限/( $\mu\text{g/L}$ )	—	0.028	0.196	0.420	0.084
再现性标准偏差 $S_R$ /( $\mu\text{g/L}$ )	—	0.01	0.14	0.23	0.04
相对再现性标准偏差 RSD <sub>R</sub> /%	—	14.0	13.6	13.3	14.9
再现性限 $R$ /( $\mu\text{g/L}$ )	—	0.028	0.392	0.644	0.112
萃取率/%	—	101.7	90.9	88.4	—

<sup>a</sup> 由于检出限过高(0.2  $\mu\text{g/L}$ ),有 1 家实验室的数据被从统计评价中剔除。

## 附录 B

表 B.1 数据是根据协同比对验证实验所推荐的统一检测方法所得到的,用来对分析的结果进行评价。

表 B.1 协同验证中各实验室间检测结果汇总表

红葡萄酒样品	加入的 OTA/( $\mu\text{g/L}$ )				
	空白	0.200	0.900	3.000	自然污染的样品
实验室间检测年份	1999	1999	1999	1999	1999
参加实验室数目	15	15	15	15	15
剔除不合理结果后的实验室数目	14 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	14	15	14
剔除的实验室数目	—	2	1	—	1
接受结果数目	28	24	28	30	28
平均值/( $\mu\text{g/L}$ )	<0.01	0.187	0.814	2.537	1.693
重复性标准偏差/( $\mu\text{g/L}$ )	—	0.01	0.08	0.23	0.19
相对重复性标准偏差 RSD <sub>r</sub> /%	—	5.5	9.9	8.9	10.9
重复性限 $r$ /( $\mu\text{g/L}$ )	—	0.028	0.224	0.644	0.532
再现性标准偏差/ $S_R$ /( $\mu\text{g/L}$ )	—	0.02	0.10	0.34	0.23
相对再现性标准偏差 RSD <sub>R</sub> /%	—	9.9	12.5	13.4	13.4
再现性限 $R$ /( $\mu\text{g/L}$ )	—	0.056	0.280	0.952	0.644
回收率/%	—	93.4	90.4	84.6	—

<sup>a</sup> 由于检出限高(0.2  $\mu\text{g/L}$ ),有 2 家实验室的数据被从统计评价中剔除。



## 附录 C

本附录概述了使用免疫亲和柱测定赭曲霉毒素 A 方法的关键点指南(方法类型 II)。指南中所列的检测方法的关键点仅供参考。

### C.1 应用范围

该方法适用于葡萄汁、部分发酵的葡萄汁以及仍在发酵的新葡萄酒。本方法只对葡萄酒进行了有关参数验证。

### C.2 方法原理

方法可分为两个步骤。第一步是葡萄酒或葡萄汁中 OTA 经过免疫亲和柱吸附和洗脱达到纯化和浓缩的目的。第二步是洗脱液经高效液相色谱分离用荧光检测进行定量测定分析。

### C.3 试剂

#### C.3.1 OTA 储备液

不推荐使用固态的 OTA 标准品,建议使用 OTA 标准溶液(3.5)。

#### C.3.2 OTA 标准溶液

使用有分析证书并注明参考值和不确定度的 OTA 标准溶液(浓度约 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

使用时需要用已认证的移液管进行取样,用纯乙醇或者高效液相色谱的流动相将标准溶液配制成 0.25  $\text{mg}/\text{L}$ ~1  $\text{mg}/\text{L}$  的系列工作标准储备液(方法见 3.2.3)。该溶液在  $-18^\circ\text{C}$  条件下可保存 4 年以上。

### C.4 仪器设备

#### C.4.1 免疫亲和柱性能评估(可选)

免疫亲和柱是该方法不确定度的主要来源之一。长期试验表明,市场上提供的各种免疫亲和柱的回收率在 70%~100%。因此,建议在使用亲和柱之前,先进行性能测试。这一步骤会由于供应商或者柱子的参考资料不同而有所变化。

亲和柱性能测试(回收率测定):

从实验室常用的亲和柱中,选取 10 个不同批号的代表。准备相同数量分别代表不同基质的葡萄酒,包括不含 OTA 的、已知添加 OTA 浓度为  $x_i$  介于 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ~2  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的葡萄酒。使用选定的柱子快速地分析这  $n$  个已知添加量的样品。得到含量测定值  $y_i$ 。

通过所测得的含量与已知的添加量计算回收率。

$$t_i = \frac{y_i}{x_i} \quad (\text{柱子回收率 } i)$$

$$T = \frac{\sum t_i}{n} \quad (\text{平均回收率})$$

$$S_t = \sqrt{\frac{\sum (t_i - T)^2}{n - 1}} \quad (\text{回收率的标准偏差})$$

以这种方式计算出回收率的标准偏差,不仅代表柱子回收率的变化,也代表了使用亲和柱净化后再经高效液相色谱分析整个测试方法的标准不确定度。同时还可以通过扣除高效

液相色谱系统误差的标准不确定度来建立一个合理评估亲和柱回收率标准偏差的评估方法。

严格意义上,需要评估测定方法的标准不确定度  $S_V$  (以标准偏差表示,不考虑免疫亲和柱步骤) 还需对 OTA 溶液进行准确度的研究。

以下为评估回收率的标准偏差  $S_P$  的计算公式:

$$S_P = \sqrt{S_i^2 - S_V^2}$$

对在浓度范围较大的情况下,也可以使用标准偏差的变异系数(RSDR)来表示。

$$CV(\%) = S_P \cdot 100 / \text{添加浓度}$$

### C.5 步骤

步骤的第 5 点已经举例说明,稀释液和淋洗液的组成可能会因亲和柱的不同而变化。同样葡萄酒样的稀释浓度可根据需要进行适当调整。

### C.6 赭曲霉毒素 A(OTA)的定量

每天或每次改变色谱条件时需重新配置标准曲线。用流动相稀释标准储备液配制成为不同浓度标准曲线。标准曲线的浓度范围需要考虑葡萄酒的稀释因子。

## 参 考 文 献

- [1] A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze. *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 864 (1999)89-101.
- [2] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, p. 23-51.



# 花 青 素

(决议 Oeno 22/2003, 经 Oeno 12/2007 修订)

## 1 适用范围

本方法适用于分析红葡萄酒和桃红葡萄酒中花青素的相对组成。通过反相高效液相色谱分离紫外-可见光(UV-VIS)检测器进行检测。

已经有人发表了很多类似的检测方法分析红葡萄酒中花青素成分。例如 Wulf 等已经成功检测并鉴定了 21 种不同花青素, Heier et al. 借助气相色谱-质谱法检测到近 40 种花青素。但是花青素成分构成非常复杂, 因此需要一个简单的方法来分析葡萄酒中常见的主要花青素化合物相对含量。建议各成员国继续进行该领域研究, 以避免出现不科学的评估结果。

## 2 原理

该方法主要用于分离 5 种最重要的非酰化花青素(如图 1, 峰 1~峰 5)及 4 种酰化花青素(如图 1, 峰 6~峰 9)。红葡萄酒及桃红葡萄酒中的花青素, 用水/甲酸/乙腈梯度洗脱, 经反相高效液相色谱柱直接分离, 在 518 nm 波长下进行检测<sup>[1,2]</sup>。

## 3 试剂与材料

甲酸(分析纯, 98%)。

去离子水, 色谱级。

乙腈, 色谱级。

高效液相色谱流动相:

流相 A: 去离子水: 甲酸: 乙腈=87: 10: 3(体积比);

流相 B: 去离子水: 甲酸: 乙腈=40: 10: 50(体积比)。

流动相需经滤膜过滤、脱气, 待测样品需滤膜过滤。

利用参比标准品进行色谱峰的确认。

缺少商品化高纯度的花青素标准品是使用高效液相色谱检测分析葡萄酒中花青素过程中存在的最大困难。此外, 溶液中花青素稳定性差也加大了检测的难度。

以下几种花青素色素已经商品化:

花色素-3-葡萄糖苷(或者氯化花色素);  $M=484.84$  g/mol;

花翠素-3-葡萄糖甙;  $M=498.84$  g/mol;

锦葵色素-3-葡萄糖苷(或者氯化锦葵色素-3- $\beta$ -葡萄糖苷);  $M=528.84$  g/mol;

锦葵色素-3,5-二葡萄糖苷,  $M=691.04$  g/mol。

## 4 仪器设备

高效液相色谱系统:

二元梯度输液高压泵, 样品进样体积  $10 \mu\text{L} \sim 200 \mu\text{L}$ 。

二极管阵列检测器或紫外可见光检测器。

自动积分或计算机数据采集软件。

柱温箱温度 40℃。

溶剂脱气系统。

分离色谱柱,如:LiChrospher 100 RP 18(5 μm)色谱柱以及 LiChroCart 250-4 保护柱,例如:RP 18(30 mm~40 mm)2 mm×20 mm。

## 5 步骤

### 5.1 样品制备

澄清的葡萄酒可以直接倒入进样瓶自动进样,较浑浊的样品需要用 0.45 μm 的滤膜过滤,注意弃掉最开始的滤液。

由于花青素的可检测浓度范围很广,样品进样体积可以根据葡萄酒颜色强度进行调整,范围可设置为 10 μL~200 μL。研究表明,进样体积对分析结果无明显影响。

### 5.2 分析方法

高效液相色谱仪测定条件:

进样体积:50 μL(红葡萄酒)至 200 μL(玫瑰葡萄酒);

流量:0.8 mL/min;

柱温:40℃;

运行时间:45 min;

延迟时间:5 min;

检测波长:518 nm。

表 1 梯度洗脱

时间/min	溶剂 A(V/V)/%	溶剂 B(V/V)/%
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6

为了确保色谱柱的分离效率,方法规定测定锦葵色素-3-葡萄糖苷的理论塔板数不低于 20 000,而花翠素-3-香豆酰葡萄糖苷和锦葵色素-3-香豆酰葡萄糖苷间的分离度(*R*)不低于 1.5,否则需更换新色谱柱。

图 1 中给出了花青素分离的典型色谱图,以及各峰表示的花青素。

色谱峰编号

第一组:“非酰化花青素-3-葡萄糖苷”	飞燕草素-3-葡萄糖苷(De-3-gl)	1
	花色素-3-葡萄糖苷(Cy-3-gl)	2



(续)

色谱峰编号

第一组：“非酰化花青素-3-葡萄糖苷”	矮牵牛花素-3-葡萄糖苷	3
	花翠素-3-葡萄糖苷	4
	锦葵色素-3-葡萄糖苷	5
第二组：“乙酰化花青素-3-葡萄糖苷”	花翠素-3-乙酰葡萄糖苷	6
	锦葵色素-3-乙酰葡萄糖苷	7
第三组：“香豆酰花青素-3-葡萄糖苷”	花翠素-3-香豆酰葡萄糖苷	8
	锦葵色素-3-香豆酰葡萄糖苷	9

## 6 结果表示

本方法中所检测的结果为 9 种花青素的相对含量。

## 7 检出限与定量限

方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)是根据葡萄酒工艺手册决议 OENO 7-2000 中所规定的“分析方法检测限和定量限的估算方法”进行估算的。使用 4.2.2 中“决策逻辑图”延长线  $N^{\circ}3$  图表的方法,在色谱图中,从相关的色谱峰部分画一个封闭的图框,延伸到 10 倍的半峰高的宽度( $W_{1/2}$ )。另外画两条平行线正好包含了信号窗口的最大振幅。这两条线之间的距离表示为  $h_{\max}$ ,以毫吸光单位(mAU)表示。

分析的条件和操作者所使用的方法对 LOD 和 LOQ 都有影响。附表中举例说明了这些影响因素:

$$h_{\max} = 0.208[\text{mAU}]$$

$$LOD = 3 \times 0.208[\text{mAU}] = 0.62[\text{mAU}]$$

$$LOQ = 10 \times 0.208[\text{mAU}] = 2.08[\text{mAU}]$$

建议:

如果某一组分的含量低于定量检测限(LOQ),则由总花色色素组成所得到的酰化花色色素总量或乙酰化与香豆酰化花色苷的比值计算无效。但低于定量限(LOQ)的检测值也能提供相应的信息。

## 8 精密度参数

根据峰面积值,计算出 9 种花青素的重复性限( $r$ )和再现性( $R$ )值,详见附 A 表 A.2。根据表 A.2,一个特定峰的不确定度为最接近于该峰积值所对应的  $r$  和  $R$ 。验证数据的值可以按照相关的统计规则计算。例如,乙酰化花色色素总量的总误差( $S_r$ ),特定的总误差比率的方差( $S_r^2$ ),如乙酰化花色色素与香豆酰化花色色素的相对误差的平方( $S_r/a_i$ )等。按照这些规则,表 A.2 中的数据可以用来计算所有的准确度参数。



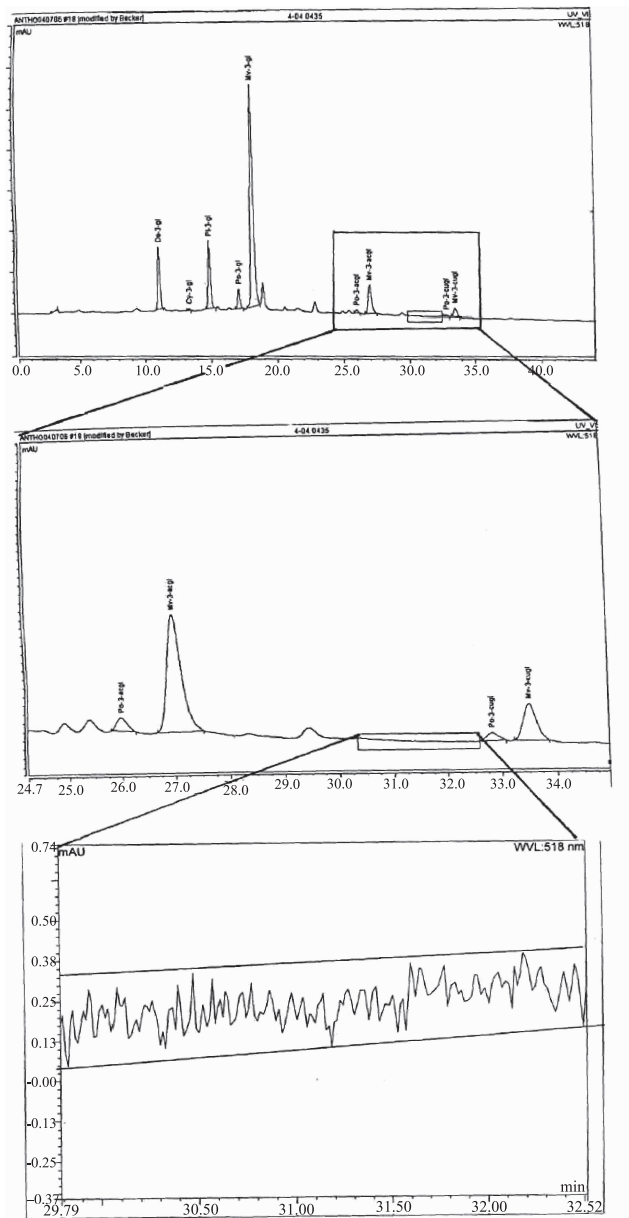


图 1



## 附录 A

### 方法准确度研究与评价数据统计结果

在德国特里尔食品化学国家实验室协助下,来自欧洲 5 个国家的 17 个实验室参与了该方法的验证工作。方法性能评价结果汇总见表 A.1。参与者名单见表 3。图 A.1 为色谱图,详细结果见表 A.2。统计评价依据为决议 6/99 和 ISO 5725-2:1994。

从实验室收回的色谱图和数据结果来看均满足分析的要求。根据“1994 IUPAC”协议和 OIV 决议 OENO 19/2002,采用 Dixon 和 Grubbs 离群值测试方法对离群值进行判定。

对 9 种主要的花青素在 5 个不同含量水平上的  $S_r$ ,  $S_R$ ,  $r$  和  $R$  值进行了计算。使用实验结果中含量水平相近的数值进行分析。为了得到该方法性能的总体概况,所有的  $RSD_r$  和  $RSD_R$  值根据相对的峰面积范围进行分组,具体如下表所示:

表 A.1 方法性能评价研究结果汇总表

相对峰面积范围*/%	$RSD_r$ 范围/%	$RSD_R$ 范围/%
>0.4~1.0	6.8~22.4	20.6~50.9
>1.1~1.5	4.2~18.1	11.8~28.1
>1.5~3.5	2.1~7.7	10.6~15.6
>3.5~5.5	2.7~5.7	18.7~7.5
>5.5~7.5	2.4~3.9	6.5~10.0
>10~14	1.1~2.9	3.7~9.2
>14~17	1.0~3.9	3.2~5.4
>50~76	0.3~1.0	2.1~3.1
*独立花青素。		

结果显示,重复性和再现性取决于相对峰面积的总和。相对峰面积值总和越高, $RSD_r$  和  $RSD_R$  越接近理想值。但当花青素的含量接近于检出限(如花青素-3-葡萄糖苷)时,相对峰面积较小(<1%), $RSD_r$  和  $RSD_R$  值会显著增大,而对于相对面积值大于 1%的花青素, $RSD_r$  和  $RSD_R$  值会趋于合理。

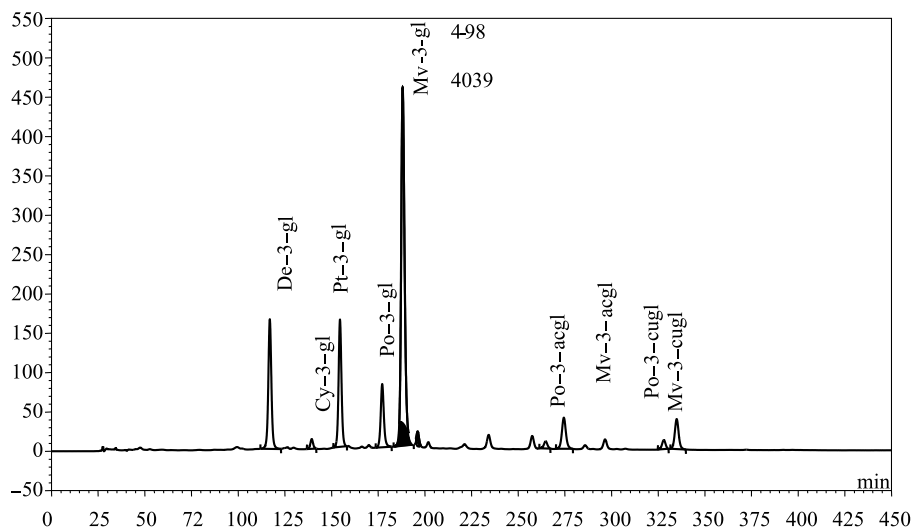


图 A.1 红酒中 9 种不同的花青素的分析图谱

表 A.2 方法评价研究结果

花青素	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
飞燕草素-3-葡萄糖苷					
$n$	14	14	16	15	16
平均值	6.75	14.14	3.45	16.68	3.54
$S_r$	0.163	0.145	0.142	0.142	0.108
RSD <sub>r</sub> /%	2.4	1.0	4.1	0.8	3.1
$r$	0.46	0.41	0.40	0.40	0.30
$S_R$	0.544	0.462	0.526	0.704	0.490
RSD <sub>R</sub> /%	8.1	3.3	15.2	4.2	13.8
$R$	1.52	1.29	1.47	1.97	1.37
花色素-3-葡萄糖苷					
$n$	16	17	16	15	14
平均值	2.18	1.23	0.61	1.46	0.34
$S_r$	0.086	0.053	0.043	0.110	0.031
RSD <sub>r</sub> /%	4.0	4.3	7.1	7.5	9.2
$r$	0.24	0.15	0.12	0.31	0.09
$S_R$	0.460	0.211	0.213	0.180	0.158
RSD <sub>R</sub> /%	21.2	17.2	34.9	12.3	46.7
$R$	1.29	0.59	0.60	0.50	0.44
矮牵牛花素-3-葡萄糖苷					
$n$	15	17	16	14	15
平均值	10.24	14.29	5.75	12.21	6.19
$S_r$	0.233	0.596	0.157	0.097	0.196
RSD <sub>r</sub> /%	2.3	4.2	2.7	0.8	3.2
$r$	0.65	1.67	0.44	0.27	0.55
$S_R$	0.431	0.996	0.495	0.469	0.404

表 A. 2(续)

花青素	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
RSD <sub>R</sub> /%	4.2	7.0	8.6	3.8	6.5
R	1.21	2.79	1.39	1.31	1.13
花翠素-3-葡萄糖苷					
<i>n</i>	16	15	17	17	16
平均值	11.88	6.23	13.75	7.44	4.12
<i>S<sub>r</sub></i>	0.241	0.166	0.144	0.232	0.174
RSD <sub>r</sub> /%	2.0	2.7	1.0	3.1	4.2
<i>r</i>	0.68	0.47	0.40	0.65	0.49
<i>S<sub>R</sub></i>	0.981	0.560	1.227	0.602	0.532
RSD <sub>R</sub> /%	8.3	9.0	8.9	8.1	12.9
R	2.75	1.57	3.44	1.69	1.49
锦葵色素-3-葡萄糖苷					
<i>n</i>	16	15	17	16	16
平均值	55.90	55.04	76.11	52.60	61.04
<i>S<sub>r</sub></i>	0.545	0.272	0.251	0.298	0.377
RSD <sub>r</sub> /%	1.0	0.5	0.3	0.6	0.6
<i>r</i>	1.53	0.76	0.70	0.83	1.06
<i>S<sub>R</sub></i>	2.026	2.649	2.291	1.606	1.986
RSD <sub>R</sub> /%	3.6	4.8	3.0	3.1	3.3
R	5.67	7.42	6.41	4.50	5.56
<p><i>n</i> = 剔除异常值后的有效数据数目</p> <p><i>S<sub>r</sub></i> = 重复性标准偏差</p> <p>RSD<sub>r</sub>/% = 相对重复性标准偏差</p> <p><i>r</i> = 重复性限</p> <p><i>S<sub>R</sub></i> = 再现性标准偏差</p> <p>RSD<sub>R</sub>/% = 相对再现性标准偏差</p> <p>R = 再现性限</p>					
Δ 花青素	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
花翠素-3-乙酰葡萄糖苷					
<i>n</i>	14	16		14	16
平均值	1.16	1.44		0.59	3.74
<i>S<sub>r</sub></i>	0.064	0.062		0.059	0.215
RSD <sub>r</sub> /%	5.5	4.3		10.1	5.8
	0.18	0.17		0.17	0.60
<i>S<sub>R</sub></i>	0.511	0.392		0.272	0.374
RSD <sub>R</sub> /%	43.9	27.2		46.4	10.0
R	1.43	1.10		0.76	1.05

表 A. 2(续)

花青素	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
锦葵色素-3-乙酰葡萄糖苷					
<i>n</i>	16	17		17	16
平均值	5.51	4.84		3.11	15.07
<i>S<sub>r</sub></i>	0.176	0.167		0.088	0.213
RSD <sub>r</sub> /%	3.2	3.4		2.8	1.4
<i>r</i>	0.49	0.47		0.25	0.60
<i>S<sub>R</sub></i>	0.395	0.366		0.496	0.617
RSD <sub>R</sub> /%	7.2	7.6		16.0	4.1
<i>R</i>	1.11	1.02		1.39	1.73
花翠素-3-香豆酰葡萄糖苷					
<i>n</i>	16	14		17	16
平均值	1.26	0.90		0.89	1.32
<i>S<sub>r</sub></i>	0.130	0.046		0.060	0.058
RSD <sub>r</sub> /%	10.3	5.1		6.8	4.4
<i>r</i>	0.36	0.13		0.17	0.16
<i>S<sub>R</sub></i>	0.309	0.109		0.204	0.156
RSD <sub>R</sub> /%	24.5	12.2		23.0	11.8
<i>R</i>	0.86	0.31		0.57	0.44
锦葵色素-3-香豆酰葡萄糖苷					
<i>n</i>	17	17		17	16
平均值	4.62	2.66		4.54	4.45
<i>S<sub>r</sub></i>	0.159	0.055		0.124	0.048
RSD <sub>r</sub> /%	3.4	2.1		2.7	1.1
<i>r</i>	0.45	0.15		0.35	0.13
<i>S<sub>R</sub></i>	0.865	0.392		0.574	0.364
RSD <sub>R</sub> /%	18.7	14.7		12.6	8.2
<i>R</i>	2.42	1.10		1.61	1.02
<p><i>n</i> = 剔除异常值后的有效数据数目  <i>S<sub>r</sub></i> = 重复性标准偏差  RSD<sub>r</sub>/% = 相对重复性标准偏差  <i>r</i> = 重复性限  <i>S<sub>R</sub></i> = 再现性标准偏差  RSD<sub>R</sub>/% = 相对再现性标准偏差  <i>R</i> = 再现性限</p>					

表 A. 3 参与研究实验室名单

ABC Labor Dahmen, Mülheim/Mosel	D
Chemisches Landes-und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster	D
Institut für Lebensmittelchemie Koblenz	D
Institut für Lebensmittelchemie Speyer	D



表 A. 3(续)

Institut für Lebensmittelchemie Trier	D
Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittel Mainz	D
Labor Dr. Haase-Aschoff, Bad Kreuznach	D
Labor Dr. Klaus Millies, Hofheim-Wildsachsen	D
Labor Heidger, Kesten	D
Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Halle	D
Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau, Neustadt/ Weinstraße	D
Staatliches Institut für Gesundheit und Umwelt, Saarbrücken	D
Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt, Wiesbaden	D
Laboratoire Interrégional de la D. G. C. C. R. F de Bordeaux, Talence/France	F
Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca/ España	E
University of Glasgow, Div. of Biochem. and Molek. Biology	UK
Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau, Klosterneuburg	A

共 17 个实验室,其中德国 13 个,奥地利 1 个,法国 1 个,西班牙 1 个,英国 1 个。

## 参 考 文 献

- [1] Marx, R., B. Holbach, H. Otteneder; Determination of nine characteristic Anthocyanins in Wine by HPLC; OIV, F. V. N°1104 2713/100200.
- [2] Holbach, B., R. Marx, M. Ackermann; Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung von Rotwein mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Lebensmittelchemie (1997) 51: 78-80.
- [3] Eder, R., S. Wendelin, J. Barna; Auftrennung der monomeren Rotweinanthocyane mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Methodenvergleich und Vorstellung einer neuen Methode. Mitt. Klosterneuburg (1990) 40: 68-75.
- [4] ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility.
- [5] Otteneder, H., Marx, R., Olschimke, D.; Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC. O. I. V. F. V. N°1130 (2001).
- [6] Mattivi F.; Scienza, A.; Failla, O.; Vika, P.; Anzani, R.; Redesco, G.; Gianazza, E.; Righetti, P. Vitis vinifera—a chemotaxonomic approach; Anthocyanins in the skin. *Vitis (special issue)* 1990, 119-133.
- [7] Roggero, I. P.; Larice, I. L.; Rocheville-Divorne, C.; Archier, P.; Coen, V. Composition Antocyanique des cepages. *Revue Francaise d'Oenologie* 1998, 112, 41-48.
- [8] Eder, R.; Wendelin, S.; Barna, J. Classification of red wine cultivars by means of anthocyanin analysis. *Mitt. Klosterneuburg* 1994, 44, 201-212.
- [9] Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *Eur. Food Res. Technol.* 2000, 212, 108-112.

- [10] Garcia-Beneytez, E. ; Revilla, E. ; Cabello, F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 215, 32-37.
- [11] Arozarena, I. ; Ayestarán, B. ; Cantalejo, M. J. ; Navarro, M. ; Vera, M. ; Abril, K. ; Casp, A. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 214, 313-309.
- [12] Revilla, E. ; Garcia-Beneytez, E. ; Cabello, F. ; Martin-Ortega, G. ; Ryan, J-M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr A* 2001, 915, 53-60.
- [13] Heier, A. ; Blaas, W. ; Droß, A. ; Wittkowski, R. ; Anthocyanin Analysis by HPLC/ESI-MS, *Am. J. Enol. Vitic*, 2002, 53, 78-86.
- [14] Arozarena, I. ; Casp, A. ; Marin, R. ; Navarro, M. Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. *J. Sci. Food Agric* , 2000, 80, 1909-1917.
- [15] Anonymous. Bekanntmachung des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz*, 2001, 44, 748.
- [16] Burns, I. ; Mullen, W. ; Landrault, N. ; Teissedre, P. -L. ; Lean, M. E. I. ; Crozier, A. Variations in the Profile and Content of Anthocyanins in Wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4096-4102.
- [17] Otteneder, H. ; Holbach, B. ; Marx, R. ; Zimmer, M. Rebsortenbestimmung in Rotwein mittels Anthocyanenspektrum. *Mitt. Klosterneuburg*, 2002, 52, 187-194.
- [18] L. W. Wulf and C. W. Nagel; High-Pressure liquid chromatographic separation of Anthocyanins of *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic* 1978, 29, 42-49.
- [19] A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze. *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 864 (1999)89-101.
- [20] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, p. 23-51.



## 植物蛋白

(决议 Oeno 24/2004)

本方法可以用于测定经植物蛋白处理后可能残留在饮料中的蛋白质含量。

### 1 原理

用三氯乙酸将葡萄酒和葡萄汁中蛋白质进行沉淀。沉淀物在十二烷基硫酸钠(SDS)的作用下,在聚丙烯酰胺凝胶电泳上进行分离,分离后用考马斯亮蓝进行染色,根据颜色的强度结合已知蛋白质浓度的标准曲线进行校准,从而得到被测溶液中蛋白质的含量。葡萄汁和葡萄酒抗原的活性则由免疫印迹法检测。

### 2 方法步骤

#### 2.1 用三氯乙酸(TCA)沉淀蛋白质

##### 2.1.1 试剂

2.1.1.1 高纯度三氯乙酸(TCA)。

2.1.1.2 0.1% TCA:准确称量 0.1 g TCA 溶于 100 mL 去离子水中。

2.1.1.3 100% TCA:准确称量 100 g TCA 溶于 100 mL 去离子水中。

2.1.1.4 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液。

2.1.1.5 0.25 mol/L 缓冲溶液 Tris-HCl, pH=6.8。

称量 30.27 g 3-羟甲基-氨基甲烷(Tris)溶于 300 mL 蒸馏水中,用浓盐酸调节 pH 至 6.8,最后用蒸馏水定容至 1 L,4℃ 储存。

2.1.1.6 纯丙三醇。

2.1.1.7 十二烷基硫酸钠(DSS)。

2.1.1.8 2-巯基乙醇。

2.1.1.9 样品缓冲溶液:

——0.25 mol/L 缓冲液 Tris/HCl, pH=6.8;

——7.5% 纯丙三醇;

——2% DSS;

——5% 2-巯基乙醇。

各试剂的百分比以在缓冲液的最终浓度为准。

##### 2.1.2 实验步骤

取 24 mL 葡萄酒或葡萄汁(加工或未加工)分别置于 50 mL 的离心管中,加入 3 mL 100% TCA,此时 TCA 的浓度变为 11%。充分混合后,将离心管置于 4℃,放置 30 min 后,进行离心(10 000 r/min, 30 min, 4℃),弃上清液,沉淀物经 0.1% TCA 溶液洗涤后,再次离心,弃上清液,加入 0.24 mL 0.5 mol/L 氢氧化钠与样品缓冲溶液 1:1(体积比)的混合溶液将沉淀分散。之后将样品置于 100℃ 水浴加热 10 min。



## 2.2 十二烷基硫酸钠(DSS)聚丙烯酰胺凝胶电泳

### 2.2.1 试剂

#### 2.2.1.1 1.5 mol/L 缓冲液 Tris/HCl, pH=8.8:

称取 181.6 g 的 3-羟甲基-氨基甲烷, 溶解于 300 mL 蒸馏水中, 用浓盐酸调节 pH 至 8.8。最后用蒸馏水定容到 1 L, 4℃ 储存。

#### 2.2.1.2 30% 丙烯酰胺-0.8% 双丙烯酰胺-75% 甘油混合液:

向 600 mL 的 75% 甘油中缓慢加入 300 g 丙烯酰胺和 8 g 双丙烯酰胺, 完全溶解后, 用 75% 甘油定容到 1 L, 室温下避光储存。

#### 2.2.1.3 10% 的十二烷基硫酸钠溶液:

称取 10 g 十二烷基硫酸钠, 加入 100 mL 蒸馏水溶解, 室温下储存。

#### 2.2.1.4 *N,N,N',N'*-四亚甲基乙二胺(TEMED)用于电泳。

#### 2.2.1.5 10% 过硫酸铵溶液:

称取 1 g 过硫酸铵, 加入 10 mL 的蒸馏水溶解, 4℃ 储存。

#### 2.2.1.6 溴酚蓝溶液

称取 10 mg 溴酚蓝溶液, 加入 10 mL 蒸馏水溶解。

#### 2.2.1.7 分离凝胶溶液(15% 丙烯酰胺)

现用现配:

- 1.5 mL 1.5 mol/L Tris/HCl, pH=8.8;
- 1.5 mL 蒸馏水;
- 3 mL 甘油酰胺混合物;
- 50  $\mu$ L 10% SDS;
- 10  $\mu$ L *N,N,N',N'*-四亚甲基乙二胺(TEMED);
- 20  $\mu$ L 过硫酸铵;
- 1 滴溴酚蓝(2.2.1.6)。

#### 2.2.1.8 0.5 mol/L 缓冲液 Tris-HCl, pH=6.8

称量 60.4 g 3-羟甲基-氨基甲烷, 溶于 400 mL 的蒸馏水中。用浓盐酸调节 pH 至 6.8。用蒸馏水定容至 1 L, 4℃ 保存。

#### 2.2.1.9 30% 丙烯酰胺-0.8% 双丙烯酰胺-水混合物

向 300 mL 蒸馏水中慢慢加入 300 g 丙烯酰胺和 8 g 双丙烯酰胺。完全溶解后, 用蒸馏水定容到 1 L, 室温下避光储存。

#### 2.2.1.10 3.5% 丙烯酰胺凝胶

现用现配:

- 0.5 mol/L 0.5 mL Tris-HCl, pH=6.8;
- 1.27 mL 蒸馏水;
- 0.23 mL 丙烯酰胺水溶液;
- 20  $\mu$ L 10% SDS;
- 5  $\mu$ L *N,N,N',N'*-四亚甲基乙二胺(TEMED);
- 25  $\mu$ L 过硫酸铵;
- 1 滴溴酚蓝。

#### 2.2.1.11 电泳缓冲液



称取 30.27 g 3-羟甲基-氨基甲烷、144 g 甘氨酸及 10 g 十二烷基硫酸钠,将其混合溶于 600 mL 的蒸馏水中。此时,溶液 pH 应为 8.8 左右。否则,用浓盐酸调节 pH 至 8.8。最后用蒸馏水定容到 1 L 容量瓶中,4℃ 储存。使用时将原溶液稀释 10 倍即可。

#### 2.2.1.12 染色液

依次混合:

- 16 mL 5% 高纯度考马斯亮蓝 G-250(100 mL 蒸馏水对应 5 g 样品);
- 784 mL 硫酸铵(1 L 硫酸铵溶液:100 g 的硫酸铵和 13.8 mL 85% 正磷酸);
- 200 mL 无水乙醇。

#### 2.2.1.13 脱色液

依次混合:

- 100 mL 100% 冰醋酸;
- 200 mL 无水乙醇;
- 700 mL 蒸馏水。

#### 2.2.2 步骤

在 7 cm×10 cm 两块玻璃板之间倒入分离凝胶溶液,凝胶的上表面加入 2 滴蒸馏水使上表面平整。分离凝胶聚合并除去上层蒸馏水后,用 1 mL 移液管将 1 mL 浓缩胶加在分离胶上。然后用准备好的梳子制作点样孔。

样品需要用 0.5 mol/L 氢氧化钠和样品缓冲液混合液(1:1,体积比)进行处理。浓度范围介于 5 μg/mL 和 50 μg/mL 之间。

将 20 μL~30 μL 样品和校准溶液分别加到点样孔中。

在室温下电泳约 3 h~4 h 后(在恒定电压的 90 V),取出凝胶板并立即浸入 50 mL 20% TCA 的水溶液 30 min,然后浸泡在 50 mL 的染色液中染色。

待蛋白质蓝色条带出现。将凝胶用 50 mL 的脱色溶液脱色至凝胶底部呈透明,放置在蒸馏水中保存。

### 3 定量分析

各条带的强度使用凝胶扫描仪和图像分析软件进行处理分析。通过计算条带像素的平均密度和对条带宽度进行积分,即可确定蛋白质含量。每种样品的蛋白质含量通过校准曲线计算获得。校准曲线可通过凝胶上植物蛋白的已知浓度与相应的面积积分而得到。

在浓缩 100 倍的情况下豌豆蛋白的检测限和定量限大约是 0.030 ppm,而谷蛋白大约是 0.36 ppm。变异系数低于 5%。

### 4 免疫印迹技术研究葡萄酒和处理过葡萄汁中抗原蛋白活性

本方法对后货架期处理过的饮料中可能存在的蛋白抗原活性进行评估。

#### 4.1 原理

电泳后,对凝胶进行免疫印迹技术分析。蛋白质被转移到吸附膜上,当加入植物抗蛋白质的抗体后,将形成抗原-抗体复合物(例如,如果植物蛋白是谷蛋白,就会形成抗-谷蛋白抗体)。该方法通过加入抗体来抑制植物抗蛋白抗体与磷酸酶结合。显色底物在酶作用下着色,通过观察其显色的强度来估测免疫复合物的量。此免疫反应活性可通过已知浓度的植

物蛋白质作出的校准曲线进行定量。

## 4.2 实验方案

### 4.2.1 试剂

#### 4.2.1.1 转膜缓冲液:

称取 3.03 g Tris 及 14.4 g 甘氨酸(R),然后量取 200 mL 甲醇(R),将其混合并用蒸馏水定容至 1 L。

#### 4.2.1.2 1%明胶:

称取 8.77 g 氯化钠(R)和 18.6 g 乙二胺四乙酸(EDTA),然后与 6.06 g Tris 及 0.5 mL 的 Triton X 混合均匀并溶解到 800 mL 蒸馏水中,用浓盐酸调节 pH 至 7.5。然后加入 10 g 明胶,蒸馏水定容至 1 L。

#### 4.2.1.3 0.25%明胶:

称取 8.77 g 的氯化钠(R)和 18.6 g 的 EDTA,然后与 6.06 g Tris 及 0.5 mL 的 Triton X 混合均匀并溶解到 800 mL 蒸馏水中,浓盐酸调节 pH 至 7.5。然后加入 2.5 g 明胶,蒸馏水定容至 1 L。

#### 4.2.1.4 多克隆抗体溶液(商品化或者如附件中所述):

- 10  $\mu$ L 多克隆植物抗蛋白抗体;
- 10 mL 0.25%明胶。

#### 4.2.1.5 TBS 缓冲液:

称取 29.22 g 氯化钠(R)和 2.42 g Tris,溶解于 1 L 蒸馏水中。

#### 4.2.1.6 碱性磷酸酶缓冲液:

称取 5.84 g 氯化钠(R)、1.02 g 氯化镁(R)和 12.11 g Tris,然后溶解到 800 mL 蒸馏水中,用浓盐酸调节 pH 至 9.5,蒸馏水定容至 1 L。

#### 4.2.1.7 显影剂:

15 g 溴氯吲哚磷酸盐(BICP)和 30 g 硝基蓝四唑(NBT)溶解于 100 mL 的碱性磷酸酶缓冲液中。

### 4.2.2 步骤

电泳后,通过电泳液将蛋白质从凝胶上洗脱转移到聚偏二氟乙烯膜上:4 $^{\circ}$ C,30 V 条件下,在转膜缓冲液中转移 16 h。该膜在 1%明胶溶液中进行饱和,并使用 0.25%明胶溶液洗 3 次。明胶提供吸附位点并抑制非特异性免疫试剂吸附,然后将膜浸入 10 mL 植物抗蛋白的多克隆抗体溶液中。谷蛋白的抗-谷蛋白抗体可以购买得到,其他类型的抗体可按照附录中规定的方法进行制备。加入 10  $\mu$ L 用碱性磷酸酯酶标记的抗-免疫球蛋白,对免疫球蛋白抗体-抗原复合物进行检测。将膜用 0.25%明胶洗涤两次,用 TBS 缓冲液洗一次。在显影剂中放置一段时间,在酶附着的地方形成暗紫色沉淀。

## 4.3 定量分析

为定量计算市售的葡萄酒中免疫反应残余物的量,需要制备校准曲线:附着在凝胶上已知浓度的植物蛋白(转移到膜上)的含量,与由于所形成的免疫复合物含量不同而在位点上所显示的条带的强度相对应。所用分析设备与电泳凝胶相同。



## 附录 A 制备抗豌豆的多克隆抗体

葡萄酒和处理过的葡萄汁中的豌豆蛋白的抗原活性测定需在动物身上进行。

### A.1 原理

经过皮内注射抗原的新西兰大白兔,在其血清中获得多克隆抗体。

### A.2 方法步骤

#### A.2.1 试剂

##### A.2.1.1 PBS 磷酸盐缓冲液, pH=7.4

将 8 g NaCl、200 mg KCl、1.73 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和 200 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶于 300 mL 蒸馏水中。用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 7.4,然后蒸馏水定容至 1 L。

##### A.2.1.2 抗原

称取 10 mg 豌豆蛋白,溶解到 5 mL PBS 中。在无菌条件下将溶液用 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,滤液在  $-20^\circ\text{C}$  储存待用。

#### A.2.2 步骤

1 mL 抗原溶液,用 1 mL 弗氏完全佐剂混合。将 1 mL 该混合液皮内注射到体重约为 3 kg 新西兰兔体内。在注射的第 15 天、第 30 天及第 45 天重复注射一次。第一次注射后 60 d,从耳静脉抽取 100  $\mu\text{L}$  的血液,然后测试其抗原反应能力。如分析方法中 4.2 步骤所述,使用免疫印迹法评估从凝胶上迁移到膜上的豌豆蛋白。

确认抗原-抗体复合物形成后,从新西兰大白兔耳静脉取血液 15 mL。血液在  $37^\circ\text{C}$  下放置 30 min。3 000 r/min 离心 5 min,提取血清中含有抗豌豆蛋白的多克隆抗体。

## 溶菌酶(高效液相色谱法)

(决议 Oeno 8/2007)

### 1 简介

本方法不检测溶菌酶的活性,只用于检测葡萄酒中的溶菌酶含量。

### 2 适用范围

本方法可以在不检测酶的活性(酶的活性可能由于部分变性或者形成复杂的物质或者出现共沉淀现象而受到抑制)的情况下,单独检测红葡萄酒或白葡萄酒中具有酶活性的溶菌酶的含量(结果以每升葡萄酒中蛋白质毫克数表示)。

### 3 定义

高效液相色谱法(HPLC)是基于固定相和分析物间的空间排阻、极性反应或物质之间吸附作用的一种分析方法,与蛋白质中酶真实的活性无关。

### 4 原理

使用配有荧光检测器和紫外检测器的高效液相色谱仪进行分离,用外标法和峰面积确定待测葡萄酒样品中溶菌酶的含量。

### 5 试剂

#### 5.1 溶剂和标准溶液

色谱纯乙腈( $\text{CH}_3\text{CN}$ )。

高纯度三氟乙酸(TFA)。

去离子水,色谱级。

标准溶液:酒石酸(浓度 1 g/L),10%(V/V)乙醇,用中性的酒石酸钾调 pH 至 3.2。

#### 5.2 流动相

A:1% $\text{CH}_3\text{CN}$ ,0.2%TFA,98.8% $\text{H}_2\text{O}$ 。

B:70% $\text{CH}_3\text{CN}$ ,0.2%TFA,29.8% $\text{H}_2\text{O}$ 。

#### 5.3 参比溶液

将不同浓度的溶菌酶(浓度范围从 1 mg/L~250 mg/L)配置成标准溶液,用搅拌器搅拌至少 12 h,使其充分溶解。

### 6 仪器

6.1 能进行梯度洗脱的高效液相色谱仪。

6.2 恒温柱温箱。

6.3 荧光检测器和紫外检测器。

6.4 20  $\mu\text{L}$  进样环。



6.5 色谱柱:反相苯基柱(孔径=1 000 Å,排阻极限=1 000 000 Da),参考:Toso Bioscience 疏水层析凝胶反相色谱柱(TSK-gel Phenyl 5PW RP),7.5 cm×4.6 mm(内径)。

6.6 保护柱:参考:Toso Bioscience 疏水层析凝胶反相色谱柱(TSK-gel Phenyl 5PW RP Guardgel),1.5 cm×3.2 mm(内径)。

## 7 样品制备

用浓度为10 mol/L的盐酸将葡萄酒样品稀释10倍,进行酸化,5 min后,使用孔径为0.22 μm聚酰胺过滤器过滤;滤液可直接进行色谱分析。

## 8 色谱条件

8.1 流动相流速:1 mL/min。

8.2 柱温:30℃。

8.3 紫外检测器波长:280 nm。

8.4 荧光检测器:

激发波长( $\lambda_{ex}$ )=276 nm;

发射波长( $\lambda_{em}$ )=345 nm;

增益=10。

8.5 梯度洗脱见表1。

表1

时间/min	A/%	B/%	梯度
0	100	0	
			等梯度
3	100	0	
			线性
10	65	35	
			等梯度
15	65	35	
			线性
27	40.5	59.5	
			线性
29	0	100	
			等梯度
34	0	100	
			线性
36	100	0	
			等梯度
40	100	0	

8.6 溶菌酶平均保留时间:25.50 min。

## 9 结果计算

溶菌酶标准溶液浓度为:1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、250 mg/L,每个浓度平行分析三次。每一个色谱图中溶菌酶的峰面积与各自的浓度相对应。最后将所得数据以线性回归方程表示( $Y=ax+b$ ),相关系数( $r^2$ )必须大于 0.999。

## 10 方法验证

为评价检测方法的有效性,需要评估方法的适用性以及线性、检出限、定量限和准确度。这些参数同时也用于说明方法的精密度和真实性。

### 10.1 方法的线性

根据线性回归方程,该方法在表 2 的浓度范围内呈现线性关系:

表 2 有关方法性能的数据评价

项目	线性浓度范围/ (mg/L)	线性梯度	相关系数( $r^2$ )	检测限 LOD/ (mg/L)	定量限 LOQ/ (mg/L)	重复性 ( $n=5$ ) RSD%			再现性 ( $n=5$ ) RSD%
						Std <sup>1</sup>	V. R. <sup>2</sup>	V. B. <sup>3</sup>	Std <sup>1</sup>
UV	5-250	3 786	0.999 3	1.86	6.20	4.67	5.54	0.62	1.93
FLD	1-250	52 037	0.999 0	0.18	0.59	2.61	2.37	0.68	2.30
<sup>1</sup> 标准溶液。 <sup>2</sup> 红葡萄酒。 <sup>3</sup> 白葡萄酒。									

### 10.2 检出限和定量限

检出限(LOD)为色谱图 3 倍信噪比,定量限(LOQ)为 10 倍信噪比见表 1。

### 10.3 方法精密度

对方法进行评价要考虑其参数的重复性和再现性,详见表 1(标准溶液、红葡萄酒和白葡萄酒样品中不同浓度的溶菌酶重复测试所得到的回收率和标准方差)。

### 10.4 方法准确性

根据标准溶液中溶菌酶含量(浓度 5 mg/L 和 50 mg/L)和已知的添加量,计算回收率,如表 2 和图 1 所示:

表 3 溶菌酶回收率实验结果

项目	原始浓度/ mg/L	添加量/ mg/L	理论值/ mg/L	实际浓度	标准方差	回收率/%
UV280nm	50	13.1	63.1	62.3	3.86	99
FD	50	13.1	63.1	64.5	5.36	102
UV280nm	5	14.4	19.4	17.9	1.49	92.1
FD	5	14.4	19.4	19.0	1.61	97.7

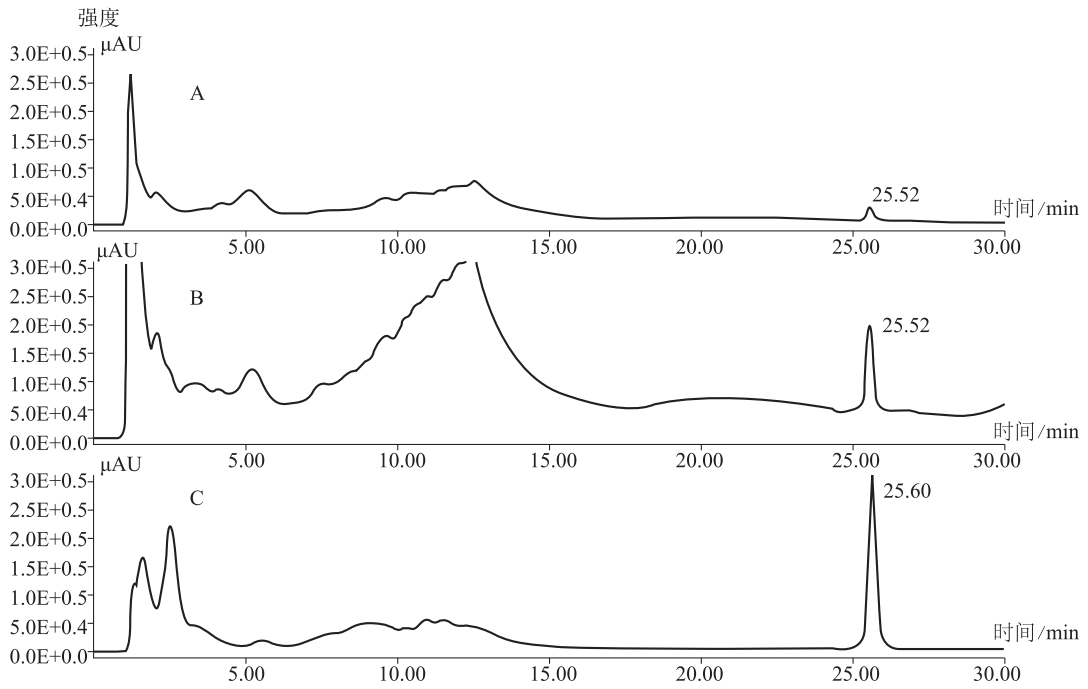


图1 含纯溶菌酶的红葡萄酒样品色谱图(葡萄酒样品中添加溶菌酶标准溶液浓度1 000mg/L,实际测得溶菌酶的浓度为125mg/L)。  
A—UV 检测器(280nm);B—UV 检测器(225nm);C—FLD 检测器( $\lambda_{\text{ex}}$ 276nm; $\lambda_{\text{em}}$ 345nm)

## 参考文献

- [1] Claudio Riponi;Nadia Natali;Fabio Chinnici. Quantitation of hen's egg white lysozyme in wines by an improved HPLC-FLD analytical method. Am. J. Enol. Vit. , in press.



# 3-甲氧基丙烷-1,2-二醇和 环二甘油

(决议 Oeno 11/2007)

## 1 介绍

本方法用于检测葡萄酒中的 3-甲氧基-1,2-丙二醇(3-MPD)和环二甘油(CycDs)的含量,方法已经通过了国际协同实验的验证。3-MPD 和 CycDs 是不同类型葡萄酒中甘油形成过程中的副产物。众所周知,用甲醇使动植物中的甘油三酯发生酯交换反应而形成的甘油中含有大量的 3-MDP。从石油化学品合成的甘油会出现杂质 CycDs。根据 O. I. V 决议 8/2000“分析方法的验证方案”,采用已报道的一种方法,对其进行修饰、优化后,组织了协同比对实验研究。

## 2 适用范围

本方法适用于检测白葡萄酒、红葡萄酒、甜/干葡萄酒中 3-MPD 和 6 种环二甘油(顺式-,反式-2,6-二(羟甲基)1,4-二氧六环;顺式-,反式-2,5-二(羟甲基)1,4-二氧七环;顺式-,反式-2,-羟甲基-6-羟基-1,4-二氧环庚烷)。3-MPD 检测浓度范围为 0.1 mg/L~0.8 mg/L, CycDs 检测浓度范围为 0.5 mg/L~1.5 mg/L。

## 3 符号

3-MPD	3-甲氧基丙烷-1,2-二醇
ANOVA	方差分析
<i>c</i>	浓度
CycDs	环二甘油
GC-MS	气相色谱-质谱联用仪
H <sub>2</sub>	氢气
IS	内标
<i>m/z</i>	质量/电荷比
ML	校准水平
S <sub>0</sub>	1 000 ng/μL 标准液
S <sub>1</sub>	100 ng/μL 标准液
S <sub>2</sub>	10 ng/μL 标准液

## 4 原理

用碳酸钾(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)将被分析物和内标盐析,之后用乙醚提取,提取物直接通过极性柱分离,用 GC-MS 在 SIM 模式(选择离子检测模式)下进行检测。



## 5 试剂与材料

### 5.1 化学试剂

- 5.1.1 碳酸钾( $K_2CO_3$ ),分析纯。  
 5.1.2 乙醚,色谱纯。  
 5.1.3 分子筛(直径 2 mm,孔径大小 0.5 nm)。  
 5.1.4 无水乙醇。

### 5.2 标准品

- 5.2.1 环二甘油混合物(六种组分),纯度 89.3%。  
 包括:顺式-,反式-2,6-二(羟甲基)1,4-二氧杂六环;顺式-,反式-2,5-二(羟甲基)1,4-二氧六环;顺式-,反式-2-二(羟甲基)-6-羟基-1,4-二氧环庚烷。  
 5.2.2 98%3-甲氧基丙烷-1,2-二醇(3-MPD)。  
 5.2.3 98%丁烷-1,4-二醇-1,1,2,2,3,3,4,4-( $^2H$ )<sub>8</sub>。

### 5.3 标准溶液制备

#### 5.3.1 $S_0$ 储备液

准确称取每一种标准品 10.0 mg $\pm$ 0.05 mg(纯度为 89.3%,CycDs 需称 11.2 mg)。然后将每一个标准品分别转移至 10 mL 容量瓶中,向每个容量瓶准确加入 10 mL 的无水乙醇并充分混匀,溶液的浓度为 1 000 ng/ $\mu$ L。

#### 5.3.2 $S_1$ 工作液

准确量取 1 000  $\mu$ L  $S_0$  储备液至 10 mL 容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,充分混匀,所得溶液浓度为 100 ng/ $\mu$ L。

#### 5.3.3 $S_2$ 工作液

准确量取 100  $\mu$ L  $S_0$  储备液至 10 mL 容量瓶中,无水乙醇定容至刻度,充分混匀,所得溶液浓度为 10 ng/ $\mu$ L。

所需标准溶液,详见表 1。

CycDs 混合物(6 种组分)

表 1

名称	溶液	浓度/(ng/ $\mu$ L)
CycDs 混合物	$S_0$	1 000
	$S_1$	100
3-MPD	$S_0$	1 000
	$S_1$	100
	$S_2$	10
内标 IS	$S_0$	1 000
	$S_1$	100

### 5.4 校准曲线制作

用未被污染的葡萄酒来配制校准溶液,使用前需通过检测确认没有受到 3-MPD 或

CycDs 的污染。如果样品中分析物的浓度超出线性范围,需要进行加标。检测中要确保内标不受到葡萄酒中各种组分的影响,同时需要准备空白样品。

表 2 校准曲线配制表

名称		加标量/ $\mu\text{L}$	编号	葡萄酒体积/mL	葡萄酒浓度/ ( $\mu\text{g/L}$ )	葡萄酒浓度/ ( $\text{mg/L}$ )		
空白	IS	—		10	0	0		
	3-MPD	—						
	CycDs	—						
ML0	IS	100	S1	10	1 000	1.00		
	3-MPD	—						
	CycDs	—						
ML1	IS	100	S1	10	1 000	1.00		
	3-MPD	100	S2				100	0.10
	CycDs	50	S1				500	0.50
ML2	IS	100	S1	10	1 000	1.00		
	3-MPD	25	S1				250	0.25
	CycDs	100	S1				1 000	1.00
ML3	IS	100	S1	10	1 000	1.00		
	3-MPD	50	S1				500	0.50
	CycDs	20	S0				2 000	2.00
ML4	IS	100	S1	10	1 000	1.00		
	3-MPD	100	S1				1 000	1.00
	CycDs	30	S0				3 000	3.00
ML5	IS	100	S1	10	1 000	1.00		
	3-MPD	200	S1				2 000	2.00
	CycDs	40	S0				4 000	4.00

## 6 仪器设备

- 6.1 天平,读数精确到 $\pm 0.0001\text{ g}$ 。
- 6.2 离心机(至少可达 $4\,000\text{ r/min}$ )。
- 6.3 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS),配置分流不分流进样器。
- 6.4 精密移液管和容量瓶。
- 6.5 巴氏吸管。
- 6.6 40 mL 离心管。
- 6.7 气相色谱进样瓶( $1.5\text{ mL}\sim 2.0\text{ mL}$ )。
- 6.8 柱温箱。
- 6.9 涡旋震荡仪。

## 7 样品制备

每次分析需葡萄酒样品 10 mL,待测葡萄酒样品应足量。用于制备校准曲线(5.4)的葡萄酒不能被待分析物(3-MPD,CycDs)污染。



## 8 步骤

### 8.1 提取

准确吸取 100  $\mu\text{L}$  内标液  $S_1$  (5.3.2) 和 10 mL 葡萄酒样品至离心管 (40 mL) (此时丁烷-1,4- $(^2\text{H})_8$  的浓度相当于 1 mg/L)。小心加入 10 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 混匀。注意添加过程中由于产生  $\text{CO}_2$  会放热。将混合液水浴降温至 20 $^\circ\text{C}$  左右, 加入 1 mL 乙醚。涡旋充分混合 5 min, 然后在 4 000 r/min 离心机上离心 5 min。为更好地移取有机相, 萃取过程可以在直径更小的管中进行。用巴氏吸管将有机层 (包含乙醚和乙醇) 转移到气相色谱进样瓶中, 加入约 120 mg 的分子筛, 加盖。至少放置 2 h, 期间不时摇匀。吸取上层清液到其他气相色谱进样瓶中, 进行 GC-MS 分析。

### 8.2 GC-MS 分析

GC-MS 分析具体参数如下: 可使用其他性能相近的系统代替, 但要求能将内标与苯乙醇及其他潜在的干扰物分开。

#### 8.2.1 通用气相分析条件

气相色谱仪: HP 5890 或性能相当的气相色谱仪

DB-Wax(J&W) 毛细管柱 60 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ , 2 m 或相同规格的毛细管柱。

载气:  $\text{H}_2$

流量: 柱前压力 60 kPa;

温升温程序: 90 $^\circ\text{C}$  保持 2 min;

以 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$  速度升至 165 $^\circ\text{C}$ , 保持 6 min;

以 4 $^\circ\text{C}/\text{min}$  速度升至 250 $^\circ\text{C}$ , 保持 5 min。

进样温度: 250 $^\circ\text{C}$ ;

进样体积: 2  $\mu\text{L}$ , 不分流进样。

#### 8.2.2 MS 工作条件

质谱仪: Finnigan SSQ 710 或性能相当

传输线温度: 280 $^\circ\text{C}$

离子源温度: 150 $^\circ\text{C}$

MS 检测器:

窗口 1: 0 min~25 min;

14.3 min 3-MPD;  $m/z$  75,  $m/z$  61

16.7 min IS;  $m/z$  78,  $m/z$  61

每个质量采集时间为 250  $\mu\text{s}$  (驻留时间)。

监测  $m/z$  91 碎片离子峰, 能将内标 (IS) 峰与苯乙醇中区分, 苯乙醇还产生  $m/z$  78 碎片峰。

窗口 2: 25 min~40 min;

32 min~34.5 min. CycDs;  $m/z$  57,  $m/z$  117

每个质量采集时间为 250  $\mu\text{s}$  (驻留时间)。

分析样品可能会降低柱效。高沸点 CycDs 的混合物会对色谱柱造成不可逆的损伤, 应尽量避免标准溶液的进样次数, 而且只进那些分析物含量低的盐析后的溶液。推荐使用 1 m~

2 m 长的前置柱来保护分析柱,同时分析柱作为耗材也应定时更换。

## 9 结果评估

### 9.1 定性

记录各分析物相对于内标的相对保留时间。使用标准溶液与被分析物的平均相对保留时间,误差应在 $\pm 0.5\%$ 范围内。

通过选择性离子监测模式(SIM)对每种被分析物的特征离子比进行确认。CycDs 为 117/57,3-MPD 为 75/61,IS 为 78/61,误差应在加标样品的 20% 范围内。同时可以使用浏览模式进行确认。

### 9.2 定量

定量可以通过校准曲线来完成,根据分析物与内标特征离子面积比与分析物浓度对应的线性回归方程来确定。CycDs 总含量为六个峰的峰面积的总和。以下为常用于定量的  $m/z$  值:

3-MPD:	$m/z$ 75
IS:	$m/z$ 78
CycDs:	$m/z$ 117

### 9.3 结果表示

3-MPD 和 CycDs 的含量以 mg/L 表示,精确到小数点后两位(如 0.85 mg/L)。

### 9.4 检出限和定量限

检出限(LOD)和定量限(LOQ)与检测条件和方法使用者有关。根据 OENO 7-2 000(E-AS1-10-LIMDET)“分析方法的检测限和定量限的评估方法”来估算本方法的 LOD 和 LOQ。

使用 4.2.2 中“决策逻辑图”延长线 N°3 图表的方法。在离子流( $m/z$ )图的相关部分画一个图框封闭延伸到分析物 10 倍半峰高处的峰宽( $W_{1/2}$ ),同时两条平行线应该正好包含了信号窗口的最大振幅。这两条线之间的距离表示为  $h_{\max}$ ,以吸收强度为单位,3 倍为 LOD,10 倍为 LOQ,最终通过各个物质的响应因子转换成浓度单位。

3-MPD:

LOD:0.02 mg/L

LOQ:0.06 mg/L

CycDs(总量):

LOD:0.08 mg/L

LOQ:0.25 mg/L

注:由于 CD 是 6 种拥有相同的响应因子化合物的混合物,由于其化学性质相同,相关部分的色谱  $h_{\max}$  不变,每个单一化合物 LOD 和 LOQ 为  $1/6 h_{\max}$ 。

## 10 准确性(实验室间比对验证)

11 个实验室参加了协同比对实验研究,所有参加实验室都具有副产物分析方面的经验,并且通过了预实验。重复性( $r$ )和再现性( $R$ )和相应的标准差( $S_r$ 和  $S_R$ )与分析物的浓度关系显著(如附表:图 A.1 和图 A.2),使用线性回归模型对每种被分析物进行分析,重复性( $r$ )的概率大于 95%、再现性( $R$ )的概率大于 99%。



3-MPD

$$S_i = 0.060 x$$

$$S_R = 0.257 x \quad x \text{ 为 3-MPD 浓度 (mg/L)}$$

$$r = 0.169 x$$

$$R = 0.720 x \quad x \text{ 为 3-MPD 浓度 (mg/L)}$$

CycDs

$$S_i = 0.082 x$$

$$S_R = 0.092 x + 0.070 \quad x \text{ 为 CycDs 浓度 (mg/L)}$$

$$r = 0.230 x$$

$$R = 0.257 x + 0.197 \quad x \text{ 为 CycDs 浓度 (mg/L)}$$

## 附录 A

### 实验间协同比对实验研究

#### A.1 参加者

11 个国际实验室参加了此次研究,各参加实验室均具有分析副产物的相关经验,并且通过了预实验。以下为参加实验室:

CSL, York, UK  
 Unione Italiana Vini, Verona, Italy  
 BfR, Berlin, Germany  
 BLGL, Würzburg, Germany  
 Istituto Sperimentale per l'enologia, Asti, Italy  
 LUA, Speyer, Germany  
 Labor Dr. Haase-Aschoff, Bad Kreuznach, Germany  
 CLUA, Münster, Germany  
 Kantonales Laboratorium, Füllinsdorf, Switzerland  
 LUA, Koblenz, Germany  
 ISMAA, S. Michele all Adige, Italy

#### A.2 样品

2002 年 11 月,11 个预先通过均匀性测试的酒样送至各实验室,包括了五组进行平行测试的盲样和一个单独测试样品,样品包括干白葡萄酒、干红葡萄酒和甜红葡萄酒。

#### A.3 数据分析

根据“方法验证的设计、实施和说明程序”对盲样平行测试模型进行统计分析。

1. 采用 Cochran, Grubbs 检验,确定异常值。
2. 由统计分析数据得出重复性和再现性。
3. 计算 Horrat 值。

表 A.1 3-MPD 检测结果汇总表

项目	样品 A 白葡萄酒	样品 B 红葡萄酒 <sup>a</sup>	样品 C 白葡萄酒	样品 F 甜红葡萄酒	样品 G 白葡萄酒
平均值/(mg/L)	0.30	0.145	0.25	0.48	0.73
加标量/(mg/L)	0.30	0.12	—	—	0.80
回收率/%	100	121	—	—	91
<i>n</i>	10	10 <sup>a</sup>	10	10	10
<i>n<sub>c</sub></i>	1	1 <sup>a</sup>	1	1	1
离群值	2	0	0	1	1
<i>n<sub>1</sub></i>	7	9 <sup>a</sup>	9	8	8



表 A.1(续)

项目	样品 A 白葡萄酒	样品 B 红葡萄酒 <sup>a</sup>	样品 C 白葡萄酒	样品 F 甜红葡萄酒	样品 G 白葡萄酒
$r$	0.03	—	0.05	0.08	0.13
$S_r$	0.01	—	0.02	0.03	0.05
RSD <sub>r</sub> %	3.20	—	7.20	5.80	6.57
Hor	0.30	—	0.60	0.50	0.59
$R$	0.13	0.13	0.15	0.31	0.59
$S_R$	0.05	0.05	0.05	0.11	0.21
RSD <sub>R</sub> %	15.50	32.67	21.20	22.70	28.91
HoR	0.80	1.53	1.10	1.30	1.72

<sup>a</sup>单独测试样品;  $n$ 、 $n_c$  和  $n_1$  为单独结果。

Mean	算术平均值
$n$	数据总数
$n_c$	有效数据数
outliers	离群值(Cochran's 或 Grubbs' 测试)
$n_1$	保留数据数
$S_r$	重复性标准偏差
RSD <sub>r</sub>	相对重复性标准偏差( $S_r \times 100 / \text{平均值}$ )
$r$	重复性限( $2.8 \times S_r$ )
Hor	重复性 Horrat 值等于 RSD <sub>r</sub> 除以 Horwitz 公式中 $r$ 等于计算所得的 RSD <sub>r</sub>
$R$	再现性限( $2.8 \times S_R$ )
$S_R$	再现性标准偏差
RSD <sub>R</sub>	相对再现性标准偏差( $S_R \times 100 / \text{平均值}$ )
HoR	再现性 Horrat 值等于 RSD <sub>R</sub> 值除以 Horwitz 公式计算所得的 RSD <sub>R</sub>

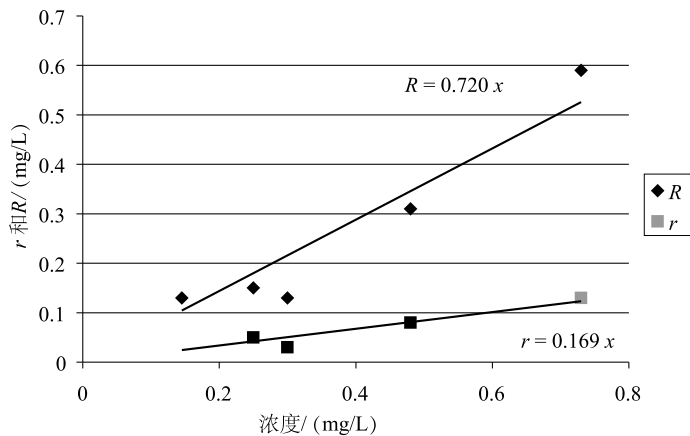
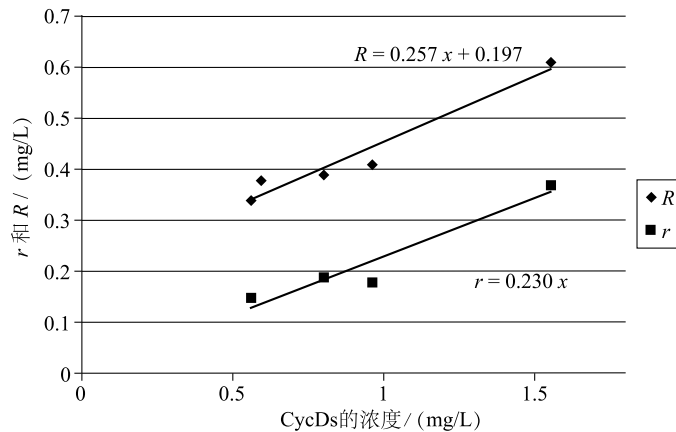
图 A.1 3-MPD 浓度和  $r$  及  $R$  之间相关性



表 A.2 CycDs 检测结果汇总表

项目	样品 A 白葡萄酒	样品 B 红葡萄酒 <sup>a</sup>	样品 D 甜葡萄酒	样品 F 甜红葡萄酒	样品 G 白葡萄酒
平均数/(mg/L)	1.55	0.593	0.80	0.96	0.56
加标量/(mg/L)	1.50	0.53			0.50
回收率/%	103	113			112
$n$	11	11 <sup>a</sup>	11	11	11
$n_c$	0	0	0	0	0
可疑值	2	0	1	2	1
$n_1$	9	11 <sup>a</sup>	10	9	10
$r$	0.37	—	0.19	0.18	0.15
$S_r$	0.13	—	0.07	0.07	0.05
RSD <sub>r</sub> /%	8.50	—	8.60	6.70	9.30
Hor	0.90	—	0.80	0.60	0.80
$R$	0.61	0.379	0.39	0.41	0.34
$S_R$	0.22	0.135	0.13	0.15	0.12
RSD <sub>R</sub> /%	14.00	22.827	17.30	15.20	21.50
HoR	0.90	1.319	1.00	0.90	1.20

<sup>a</sup> 为单独测试样品。  
 $n$  和  $n_c$  为单独结果。

图 A.2 CycDs 浓度和  $r$  及  $R$  之间相关性

## 参考文献

- [1] Bononi, M., Favale, C., Lubian, E., Tateo F. (2001) A new method for the identification of cyclic diglycerols in wine J. Int. Sci. Vigne Vin. 35, 225-229
- [2] Thompson, M. and Wood, R. (1993) International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories-J AOAC Int 76, 926-940
- [3] Horwitz, W. (1995) Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies Pure and Applied Chemistry 67, 331-343



## 2,4,6-三氯苯甲醚

(决议 OIV-Oeno 296/2009)

### 1 适用范围

本方法适用于检测乙醇水溶液浸泡软木塞而释放的 TCA 含量。本方法目的在于评估软木塞带来的风险,并为软木塞的质量控制提供了方法。

### 2 原理

在葡萄酒存放过程中,软木塞和葡萄酒之间很容易产生 2,4,6-三氯苯甲醚的迁移现象。本方法模拟该释放过程,将软木塞浸泡在葡萄酒或水-醇溶液中,直至达到平衡。通过顶空固相微萃取技术(SPME)吸附被释放的 TCA 分子,用气相色谱-质谱检测器或电子捕获检测器进行检测。

### 3 材料和试剂

3.1 白葡萄酒 酒精度介于 10%和 12%的白葡萄酒(可以用酒精度为 12%(V/V)的乙醇水溶液代替)。葡萄酒和乙醇水溶液应不含有 TCA。

3.2 氯化钠,≥99.5%。

3.3 2,4,6-三氯苯甲醚(TCA)-d<sub>5</sub>,纯度≥98% 用于 GC/MS 分析;2,6-二溴茴香醚或 2,3,6-三氯苯甲醚,纯度≥99%,用于 GC 或 ECD 分析。

3.4 2,4,6-三氯苯甲醚(TCA),纯度≥99.0%。

3.5 无水乙醇。

3.6 纯去离子水(不含 TCA)(符合标准 EN ISO 3696)。

3.7 12%(V/V)乙醇水溶液,用无水乙醇和去离子水制备。

3.8 内标储备溶液(500 mg/L):准确称取 0.050 g 2,4,6-三氯苯甲醚-d<sub>5</sub>(或 2,6-二溴茴香醚-2,3,6-三氯苯甲醚)至 60 mL 无水乙醇中,溶解后用无水乙醇定容至 100 mL,然后保存在密封的玻璃瓶中。

3.9 内标中间溶液(5.0 mg/L):准确量取 1 mL 500 mg/L 2,4,6-三氯苯甲醚-d<sub>5</sub>溶液(或 2,6-二溴茴香醚/2,3,6-三氯苯甲醚)至 60 mL 无水乙醇中,之后用无水乙醇定容至 100 mL,保存在密封的玻璃瓶中。

3.10 内标溶液(2.0 μg/L):准确量取 40 μL 5.0 mg/L 2,4,6-三氯苯甲醚-d<sub>5</sub>溶液(或 2,6-二溴茴香醚/2,3,6-三氯苯甲醚)至 60 mL 的无水乙醇中。之后用无水乙醇定容至 100 mL,保存在密封的玻璃瓶中,室温存储。

3.11 TCA 标准储备液(40 mg/L):准确称取 0.020 g 2,4,6-三氯苯甲醚至 400 mL 的无水乙醇中。溶解后用无水乙醇定容至 500 mL。

3.12 TCA 标准溶液 A(80 mg/L):准确量取 1 mL 40 mg/L 2,4,6-三氯苯甲醚标准溶液到 400 mL 的无水乙醇中。溶解后用无水乙醇定容至 500 mL。

3.13 TCA 标准溶液 B(160 ng/L):准确量取 1 mL 80 mg/L 2,4,6-三氯苯甲醚溶液至

400 mL 去离子水中。溶解后用去离子水定容至 500 mL。

3.14 用标准加入法制备系列 TCA 标准溶液,吸取不同体积的 TCA 标准液 160 ng/L 加入到 6 mL 无水乙醇中,使得系列浓度范围为 0.5 ng/L~50 ng/L。混匀后,用去离子水将体积调节至 50 mL。校准曲线应定期进行评估,在 GC/MS 或 GC/ECD 系统发生变化时也需要重新制定校正曲线。

3.15 载气:氦气,色谱纯( $\geq 99.999\ 0\%$ )。

## 4 仪器

4.1 实验用玻璃器皿:

4.1.1 100 mL 容量瓶。

4.1.2 100  $\mu$ L 微量进样器。

4.1.3 适合样品体积的具塞广口瓶,塞子材质可以是玻璃、金属或不吸附 TCA 的材料。

4.1.4 20 mL 的玻璃样品瓶,配有一侧内衬为聚四氟乙烯涂层的带孔盖子。

4.2 涂有 100  $\mu$ m 厚的聚二甲基硅氧烷纤维涂层的固相微萃取 (SPME) 装置。

4.3 样品瓶加热系统。

4.4 样品瓶搅拌装置。

4.5 气相色谱仪,配有“分流-不分流”进样器、质谱检测器 (MS) 或电子捕获检测器 (ECD)。

4.6 数据采集系统。

4.7 根据需要,可使用自动化固相微萃取装置。

4.8 毛细管分析柱

固定相为非极性的苯基甲基聚硅氧烷(例如,5%苯基甲基聚硅氧烷,30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m,或性能相当的柱子)。

## 5 样品制备

将软木塞放置在密闭的玻璃容器中。容器的容量应与葡萄酒或乙醇水溶液的容量相同,必须根据样本量的大小进行选择,以确保软木塞可以完全被浸泡。例如:在 1 L 的容器中浸泡 20 个软木塞 45 mm $\times$ 24 mm;或者在 2 L 容器中浸泡 50 个软木塞 45 mm $\times$ 24 mm。

软木塞中大部分的 TCA 在浸泡过程中会释放,但是释放率较低。为了获得一个批次软木塞中 TCA 含量有代表性的数据,需要根据抽样原则和葡萄酒污染风险进行大量的分析研究。

## 6 实验方法

### 6.1 提取分离

室温下浸泡(24 $\pm$ 2)h后,将浸泡液倒置摇匀。将浸泡溶液按 10 mL 每份转移到玻璃样品瓶中。为提高提取效率和后续方法的灵敏度,可添加大约 1 g 的氯化钠。立即加入 50  $\mu$ L 2.0 mg/L 内标溶液(3.10),然后使用聚硅氧烷/特氟隆涂层衬垫的带孔金属盖将样品瓶密封。用混合装置或自动系统将样品瓶振摇 10 min。将样品瓶放在加热装置中,在 35 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 搅拌。使用固相微萃取装置至少顶空萃取 15 min。



## 6.2 分析

不分流进样模式下,纤维萃取头需在气相色谱进样口 260℃下解析至少 2 min。使用非极性毛细管柱进行分离。载气为氦气,流量恒定为 1 mL/min。参考升温程序为 35℃保持 3 min,之后以 15℃/min 升至 265℃。

## 6.3 检测和定量

通过质谱选择离子模式(SIM)进行检测。2,4,6-三氯苯甲醚特征离子为  $m/z$  195、210、212,定量离子为  $m/z$  195,内标 2,4,6-三氯苯甲醚- $d_5$ 的特征离子为  $m/z$  199、215、217,定量离子为  $m/z$  215。如果使用 ECD 检测,可通过比较标准溶液和内标峰的保留时间在色谱图中识别 TCA 和内标(2,6-二溴苯甲醚或 2,3,6 三氯苯甲醚)。

## 7 结果计算

使用内标的峰面积对 TCA 的峰面积进行校正。通过已知系列标准(3.14)的乙醇水溶液(3.7)中 TCA 的浓度和内标浓度,由 TCA 的峰面积/内标峰面积制得标准曲线。用标准曲线计算每个样品中 TCA 的含量。浸泡液中 TCA 含量结果用 ng/L 表示,结果保留一位小数。

## 8 方法评价

该方法检出限小于 0.5 ng/L,定量限接近 1 ng/L。使用氘代的 TCA- $d_5$  内标,在 5 ng/L 时,变异系数低于 5%。

采用实验室间实验对该方法进行了验证。

## 参 考 文 献

- [1] HERVÉE. ,PRICE S. ,BURNS G. ,Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural corks. ASEV Annual Meeting. 1999.
- [2] ISO standard 20752:2007 Cork stoppers-Determination of releasable 2,4,6-trichloroanisol(TCA).
- [3] FV 1224-Résultats de l'analyse collaborative Ring test 3-TCA SPME.

## 多氯苯酚和多氯苯甲醚

(决议 OIV-Oeno 374/2009)

### 1 适用范围

适用于所有葡萄酒、软木塞、膨润土(吸附胂)和木材。

### 2 原理

葡萄酒样品用正己烷提取,固体样品用乙醚/己烷提取,气相色谱法测定 2,4,6-三氯苯甲醚(TCA)、2,4,6-三氯酚、2,3,4,6-四氯苯甲醚、2,3,4,6-四氯苯酚、五氯苯甲醚和五氯苯酚的含量。

### 3 试剂

注:所有试剂必须不含 2 中所列出的待测化合物。

3.1 己烷(纯度 $>99\%$ )。

3.2 乙醚(纯度 $>99\%$ )。

3.3 乙醚-己烷混合物(50:50;体积比)。

3.4 2,5-二溴酚纯度 $\geq 99\%$ 。

3.5 无水乙醇。

3.6 去离子水,不含 TCA,符合 ISO 3696 类型 II 要求。

3.7 50%(V/V)乙醇水溶液:

量取 100 mL 无水乙醇(3.5)倒入有刻度的 200 mL 的烧瓶中,加入去离子水(3.6)定容,并混合均匀。

3.8 内标溶液:

3.8.1 200 mg/L 储备液:精确称取 20 mg 内标物,加入 100 mL 容量瓶中,用 50%乙醇水溶液定容并混匀。

3.8.2 内标溶液(2 mg/L):量取 1 mL 储备液至 100 mL 容量瓶中,用 50%乙醇水溶液定容并混匀。

3.8.3 内标溶液(20  $\mu\text{g/L}$ ):量取 1 mL 的内标溶液(2 mg/L)(3.8.2)至 100 mL 容量瓶中,用 50%乙醇水溶液定容并混匀。

3.9 纯品

3.9.1 2,4,6-三氯苯甲醚(TCA): $\geq 99\%$ 。

3.9.2 2,4,6-三氯酚: $\geq 99.8\%$ 。

3.9.3 3,4,6-四氯苯甲醚: $\geq 99\%$ 。

注:待测分析物 3,4,6-四氯苯甲醚无市售。

3.9.4 2,2,3,4,6 四氯苯酚: $\geq 99\%$ 。

3.9.5 五氯苯甲醚: $\geq 99\%$ 。

3.9.6 五氯苯酚:99%。



3.10 衍生反应物:吡啶-乙酸酐(1:0.4)(体积比)。

3.10.1 吡啶 $\geq 99\%$ 。

3.10.2 乙酸酐 $\geq 98\%$ 。

3.11 200 mg/L 混合标准储备溶液。

在 100 mL 容量瓶中,准确称取混标各 20 mg,用无水乙醇溶解,定容至 100 mL 并混匀。

3.12 200  $\mu\text{g/L}$  混合标准溶液:在 100 mL 容量瓶中加入无水乙醇,用 100  $\mu\text{L}$  的微量移液器加入 100  $\mu\text{L}$  200 mg/L 标准储备溶液,定容并混合均匀。

3.13 4  $\mu\text{g/L}$  混合标准溶液:在装有 50%乙醇水溶液的 50 mL 容量瓶中,用 1 mL 的移液管加入 1 mL 200  $\mu\text{g/L}$  的混合标准溶液,用乙醇定容并混合均匀。

3.14 标准溶液:

可用 100  $\mu\text{L}$  微量移液器(4.9.1)配制混合标准溶液,如:量取 50  $\mu\text{L}$  4  $\mu\text{g/L}$  混合标准溶液至 50 mL 的葡萄酒,即为 4 ng/L 加标样品。

同样操作可用于制备各种浓度的混合标准溶液,通过使用乙醇水,或葡萄酒,或提取液,加入已知浓度标准品而制得。

3.15 膨润土:市售。

## 4 仪器设备

4.1 配有分流-不分流进样模式的气相色谱-电子捕获检测器(也可使用质谱检测器)。

4.2 非极性甲基苯基聚硅氧烷毛细管柱:(0.32 mm $\times$ 50 m,膜厚 0.12  $\mu\text{m}$ )。

4.3 色谱条件:

4.3.1 “分流-不分流”进样模式(阀关闭时间 30 s)。

4.3.2 载气流速:30 mL/min(也可使用氦气)。

4.3.3 辅助气流速:60 mL/min-气相用的氮气(纯度 $\geq 99.999\ 0\%$ )。也可使用氩气甲烷。

4.3.4 柱温箱升温程序:

——以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  从 40 $^{\circ}\text{C}$  升至 160 $^{\circ}\text{C}$ ;

——以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  从 160 $^{\circ}\text{C}$  升至 200 $^{\circ}\text{C}$ ;

——温度达到 220 $^{\circ}\text{C}$  后保持 10 min。

4.3.5 进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.3.6 检测器温度:250 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.4 数据处理和积分:电脑收集数据,通过与标准品比较,对所有出峰的物质进行定性和积分。

4.5 磁力搅拌器。

4.6 适用 30 mL 试剂瓶的涡旋振荡器。

4.7 分析天平(准确至 0.1 mg)。

4.8 手动或电动家用粉碎机。

4.9 实验室用具:

4.9.1 100  $\mu\text{L}$  微量移液器。

4.9.2 10  $\mu\text{L}$  微量移液器。

- 4.9.3 30 mL 螺纹盖试剂瓶,盖内侧涂层为聚四氟乙烯。
- 4.9.4 10 mL 移液管,刻度 0.1 mL。
- 4.9.5 5 mL 移液管,刻度 0.1 mL。
- 4.9.6 1 mL 移液管。
- 4.9.7 50 mL 容量瓶。
- 4.9.8 100 mL 试剂瓶。
- 4.9.9 200 mL 容量瓶。
- 4.9.10 100 mL 分液漏斗。
- 4.9.11 巴氏吸管和吸球。
- 4.9.12 家用铝箔。
- 4.9.13 离心机。

## 5 样品前处理

- 5.1 切碎软木塞或将其粉碎(<3 mm)。
- 5.2 木头用剪刀剪成木屑(<3 mm)。
- 5.3 30 g 膨润土平铺在 30 cm×20 cm 铝箔上,暴露在空气中至少 5 d。

## 6 操作方法

### 6.1 固体样品的提取

- 6.1.1 软木塞:称取约 1 g 软木塞,准确记录质量,放入 30 mL 试剂瓶中。
- 6.1.2 木质:称取约 2 g 木屑,准确记录质量,放入 30 mL 试剂瓶中。
- 6.1.3 膨润土:称取约 5 g 膨润土,准确记录质量,放入 30 mL 试剂瓶中。
- 6.1.4 膨润土样品:称取约 5 g 膨润土,准确记录质量,放入 30 mL 试剂瓶中。
- 6.1.5 用移液管加 10 mL 乙醚-己烷萃取液。
- 6.1.6 用微量移液器吸取 50  $\mu$ L 内标液。
- 6.1.7 用涡旋振荡器混匀 3 min。
- 6.1.8 吸取乙醚-己烷层液至 30 mL 试剂瓶中。
- 6.1.9 用 5 mL 乙醚-己烷混合物重复两次提取分离操作。
- 6.1.10 合并 3 次的提取液。

### 6.2 葡萄酒和混合标准溶液提取

- 6.2.1 用容量瓶量取 50 mL 的酒样品或标准溶液。
- 6.2.2 加入至 100 mL 试剂瓶中。
- 6.2.3 用微量移液器加入 50  $\mu$ L 内标液。
- 6.2.4 加入 4 mL 正己烷。
- 6.2.5 用磁力搅拌器搅拌 5 min。
- 6.2.6 将溶液转移至分液漏斗。
- 6.2.7 转移有机相(包括乳状液部分)至 30 mL 试剂瓶中,转移水相至 100 mL 试剂瓶中。
- 6.2.8 用 2 mL 正己烷重复提取步骤。
- 6.2.9 用磁力搅拌器萃取搅拌 5 min。



6.2.10 将溶液转移至分液漏斗。

6.2.11 转移有机相(包括乳状液部分)至同一个 30 mL 试剂瓶中,与第一次萃取的有机相合并。

6.2.12 通过离心使收集到的有机乳状液分层,再把下层水相用吸管吸出。

6.2.13 最后得到葡萄酒提取液和标准溶液:剩下的有机相。

### 6.3 分析

6.3.1 在最后的提取液(6.1.11 或 6.2.13)中用 100  $\mu\text{L}$  吡啶乙酸酐试剂(3.10)进行衍生。

6.3.2 用磁性搅拌器搅拌 10 min。

6.3.3 衍生后的产物进行色谱分析,进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

## 7 计算

$$\text{待测物浓度} = \frac{\text{待测物峰面积}}{\text{内标峰面积}} \times \text{响应因子}$$

$$\text{响应因子} = \text{标准溶液浓度} \times \text{内标溶液峰面积} / \text{标准溶液峰面积}$$

确保校准后响应因子在  $\pm 10\%$  范围。

## 8 结果表达

葡萄酒的结果单位为 ng/L。软木塞、膨润土和木材结果的单位为 ng/g。

## 9 方法评价

### 9.1 覆盖率

覆盖率的计算与木屑、聚氯苯甲醚和聚氯苯酚添加量相关。添加 115 ng/g 的覆盖率分别是:

——2,4,6-三氯苯甲醚:96%;

——2,4,6-三氯苯酚:96%;

——2,3,4,6-四氯苯甲醚:96%;

——2,3,4,6-四氯苯酚:97%;

——五氯苯甲醚:96%;

——五氯苯酚:97%。

### 9.2 重复性测试

计算每个产品的不确定度见表 1~表 4:

表 1

软木塞/(ng/g)	平均数	标准偏差	重复性
2,4,6-三氯苯甲醚	1.2	0.1	0.28
2,4,6-三氯苯酚	26	3.3	9.24
2,3,4,6-四氯苯甲醚	1.77	0.44	1.23
2,3,4,6-四氯苯酚	2.59	0.33	0.92
五氯苯甲醚	23.3	2.9	8.12
五氯苯酚	7.39	1.91	5.35



表 2

木材(23 ng/g)	标准偏差	重复性
2,4,6-三氯苯甲醚	1.9	5.3
2,4,6-三氯苯酚	1.9	5.3
2,3,4,6-四氯苯甲醚	2.6	7.4
2,3,4,6-四氯苯酚	3.3	9.3
五氯苯甲醚	2.7	7.5
五氯苯酚	3.6	10.1

表 3

葡萄酒(10 ng/L)	标准偏差	重复性
2,4,6-三氯苯甲醚	0.4	1.1
2,4,6-三氯苯酚	2.1	5.9
2,3,4,6-四氯苯甲醚	0.6	1.7
2,3,4,6-四氯苯酚	4	11.2
五氯苯甲醚	1.2	3.4
五氯苯酚	6.5	18.2

表 4

膨润土(15 ng/g)	标准偏差	重复性
2,4,6-三氯苯甲醚	0.9	2.5
2,4,6-三氯苯酚	4	11.2
2,3,4,6-四氯苯甲醚	1.2	3.4
2,3,4,6-四氯苯酚	5.2	14.6
五氯苯甲醚	4.3	12.0
五氯苯酚	12.1	33.9

### 9.3 用 OIV 方法计算出检出限(LOD)和定量限(LOQD)

#### 9.3.1 木材

表 5

名称	DL/(ng/L)	QL/(ng/L)
2,4,6-三氯苯甲醚	0.72	2.4
2,4,6-三氯苯酚	0.62	2.0
2,3,4,6-四氯苯甲醚	0.59	2.0
2,3,4,6-四氯苯酚	1.12	3.74
五氯苯甲醚	0.41	1.4
五氯苯酚	0.91	3.1

### 9.3.2 膨润土

表 6

名称	DL/(ng/L)	QL/(ng/L)
2,4,6-三氯苯甲醚	0.5	1
2,4,6-三氯苯酚	1	3
2,3,4,6-四氯苯甲醚	0.5	1
2,3,4,6-四氯苯酚	1	3
五氯苯甲醚	0.5	1
五氯苯酚	Not det.	Not det.

### 9.3.3 软木塞

表 7

名称	DL/(ng/L)	QL/(ng/L)
2,4,6-三氯苯甲醚	0.5	1.5
2,4,6-三氯苯酚	1	2
2,3,4,6-四氯苯甲醚	0.5	1.5
2,3,4,6-四氯苯酚	1	2
五氯苯甲醚	0.5	1.5
五氯苯酚	1	2

### 9.3.4 葡萄酒

表 8

名称	DL/(ng/L)	QL/(ng/L)
2,4,6-三氯苯甲醚	0.3	1
2,4,6-三氯苯酚	1	3
2,3,4,6-四氯苯甲醚	0.3	1
2,3,4,6-四氯苯酚	0.3	1
五氯苯甲醚	0.5	3
五氯苯酚	1	3

# 生物胺

(决议 OIV-Oeno 346/2009)

## 1 范围

此方法可应用于测定葡萄汁和葡萄酒中生物胺的最大含量为:乙醇胺:20 mg/L;组胺:15 mg/L;甲胺:10 mg/L;5-羟色胺:20 mg/L;乙胺:20 mg/L;酪胺:20 mg/L;异丙胺:20 mg/L;丙胺:通常没有;异丁胺:15 mg/L;丁胺:10 mg/L;色胺:20 mg/L;苯乙胺:20 mg/L;腐胺或 1,4-二氨基丁烷:40 mg/L;2-甲基丁胺:20 mg/L;3-甲基丁胺:20 mg/L;尸胺或 1,5-二氨基戊烷:20 mg/L;己胺:10 mg/L。

## 2 定义

可检测的生物胺包括:乙醇胺: $C_2H_7NO$ ;组胺: $C_5H_9N_3$ ;甲胺  $CH_5N$ ;5-羟色胺: $C_{10}H_{12}N_2O$ ;乙胺: $C_2H_7N$ ;酪胺: $C_8H_{11}NO$ ;异丙胺: $C_3H_9N$ ;丙胺: $C_3H_9N$ ;异丁胺: $C_4H_{11}N$ ;丁胺: $C_4H_{11}N$ ;色胺: $C_{10}H_{12}N_2$ ;苯乙胺: $C_8H_{11}N$ ;腐胺或 1,4-二氨基丁烷: $C_4H_{12}N_2$ ;2-甲基丁胺: $C_5H_{13}N$ ;3-甲基丁胺: $C_5H_{13}N$ ;尸胺或 1,5-二氨基: $C_5H_{14}N_2$ ;1,6-二胺: $C_6H_{16}N_2$ ;己胺: $C_6H_{15}N$ 。

## 3 原理

生物胺用邻苯二甲醛(OPA)衍生后,直接用  $C_{18}$  柱分离,用荧光检测器检测。

## 4 试剂

- 4.1 高纯水,电阻率  $18 M\Omega \cdot cm$ 。
- 4.2 二水合磷酸氢二钠(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.3 乙腈,最小传输量 200 nm(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.4 邻苯二甲醛(OPA)(用于荧光,纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.5 十水四硼酸二钠(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.6 甲醇(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.7 32%盐酸。
- 4.8 氢氧化钠颗粒(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.9 乙醇胺(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.10 组胺盐酸盐(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.11 乙胺盐酸盐(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.12 5-羟色胺(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.13 甲胺(纯度 $\geq 98\%$ )。
- 4.14 酪胺(纯度 $\geq 99\%$ )。



- 4.15 异丙胺(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.16 丁胺(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.17 色胺(纯度 $\geq 98\%$ )。
- 4.18 苯乙胺(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.19 腐胺(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.20 2-甲基丁胺(纯度 $\geq 98\%$ )。
- 4.21 3-甲基丁胺(纯度 $\geq 98\%$ )。
- 4.22 尸胺(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.23 1,6-二氨基己烷(纯度 $\geq 97\%$ )。
- 4.24 己胺(纯度 $\geq 99\%$ )。
- 4.25 氮气(杂质最大含量: $H_2O \leq 3 \text{ mg/L}$ ; $O_2 \leq 2 \text{ mg/L}$ ; $C_nH_m \leq 0.5 \text{ mg/L}$ )。
- 4.26 氦气(杂质最大含量: $H_2O \leq 3 \text{ mg/L}$ ; $O_2 \leq 2 \text{ mg/L}$ ; $C_nH_m \leq 0.5 \text{ mg/L}$ )。

#### 试剂的制备:

##### 4.27 淋洗液:

磷酸盐溶液 A:称取  $11.12 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$  二水合磷酸氢二钠至 50 mL 的烧杯中,将其转移到 2 L 的容量瓶中,用高纯水定容并用磁力搅拌器混匀。然后用  $0.45 \mu\text{m}$  的滤膜过滤,滤液倒入 2 L 试剂瓶,待用。

溶液 B:乙腈,直接使用。

4.28 OPA 溶液(现配现用):精确称取  $20 \text{ mg} \pm 0.1 \text{ mg}$  邻苯二甲醛(OPA)至 50 mL 的容量瓶中。用甲醇定容到 50 mL,混匀溶解。

4.29 硼酸盐缓冲液(每周制备):精确称取  $3.81 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$  十四水硼酸二钠至 25 mL 的烧杯中。用去离子水溶解后转移到 100 mL 容量瓶中,定容。用磁力搅拌器搅拌均匀,再转移到 150 mL 的烧杯中,用  $10 \text{ mol/L}$  氢氧化钠溶液调节 pH 至 10.5。

4.30  $0.1 \text{ mol/L}$  的盐酸溶液:在一个 2 L 的容量瓶中加入少许去离子水,用 10 mL 的自动移液器向容量瓶中加入 20 mL 盐酸。

##### 4.31 用 $0.1 \text{ mol/L}$ 盐酸配制标准溶液:

标准溶液的配制按下表执行(质量精确到 $\pm 0.1 \text{ mg}$ )。

标准储备液存放在 100 mL 容量瓶中。

标准检测混合溶液放在 250 mL 容量瓶中。

表 1

名称	最终混合标准溶液中的浓度/(mg/L)
乙醇胺	5
组胺	5
甲胺	1
5-羟色胺	20
乙胺	2
酪胺	7

表 1(续)

名称	最终混合标准溶液中的浓度/(mg/L)
异丙胺	4
丙胺	2.5
异丁胺	5
丁胺	5
色胺	10
苯乙胺	2
腐胺	12
2-甲基丁胺	5
3-甲基丁胺	6
尸胺	13
1,6 二胺	8
己胺	5

注:记录校准溶液的实际浓度时需同时记录其批号。  
某些生物胺以盐的形式存在,因此在记录生物胺的真实质量时,需要对这些盐的质量进行换算。

4.32 1,6-二氨基己烷内标液:准确称取 119 mg 标准品于 25 mL 锥形烧瓶中(5.1),用 0.1 mol/L 盐酸溶解后转移到 100 mL 容量瓶,定容。

4.33 2-巯基乙醇(纯度 $\geq 99\%$ )。

## 5 仪器

- 5.1 25 mL 的锥形烧瓶。
- 5.2 250 mL 的锥形烧瓶。
- 5.3 100 mL 的烧杯。
- 5.4 150 mL 的烧杯。
- 5.5 50 mL 的烧杯。
- 5.6 25 mL 的烧杯。
- 5.7 50 mL 的容量瓶。
- 5.8 100 mL 的容量瓶。
- 5.9 2 000 mL 的容量瓶。
- 5.10 250 mL 的容量瓶。
- 5.11 1 L 的试剂瓶。
- 5.12 2 L 的试剂瓶。
- 5.13 2 mL 带螺丝帽的样品转换器。
- 5.14 50 mL 的注射器。



- 5.15 移液器。
- 5.16 过滤器支架。
- 5.17 0.45  $\mu\text{m}$  纤维素膜。
- 5.18 0.8  $\mu\text{m}$  纤维素膜。
- 5.19 1.2  $\mu\text{m}$  纤维素膜。
- 5.20 5  $\mu\text{m}$  纤维素膜。
- 5.21 纤维素预过滤器。
- 5.22 1 mL 自动移液器。
- 5.23 5 mL 自动移液器。
- 5.24 10 mL 自动移液器。
- 5.25 10 mL、5 mL 和 1 mL 的自动移液器枪头。
- 5.26 过滤系统。
- 5.27 量程范围 0 g~205 g 的天平,精确到 $\pm 0.01$  mg。
- 5.28 pH 计。
- 5.29 电极。
- 5.30 磁力搅拌器。
- 5.31 HPLC 泵。
- 5.32 可调温烘箱。
- 5.33 进样环。
- 5.34 5  $\mu\text{m}$   $\text{C}_{18}$ 柱,250 mm $\times$ 4 mm(色谱图见附录 B)。
- 5.35 荧光检测器。
- 5.36 积分仪。
- 5.37 带有聚四氟乙烯塞的硼硅玻璃管。

## 6 样品的制备

样品先用氮气脱气。

### 6.1 过滤

用滤过膜过滤约 120 mL 的样本:

——葡萄酒:0.45  $\mu\text{m}$ ;

——葡萄汁或不澄清的葡萄酒:依次用 0.45  $\mu\text{m}$ (5.17)—0.8  $\mu\text{m}$ (5.18)—1.2  $\mu\text{m}$ (5.19)—5  $\mu\text{m}$  纤维素膜+预过滤器(5.21)进行过滤。

### 6.2 样品的制备

量取 100 mL 的样品到 100 mL 容量瓶(5.8)中,用 1 mL 自动移液器加入 0.5 mL 1,6-二氨基己烷(119 mg/100 mL)。用移液器吸取 5 mL 该溶液到 25 mL 锥形瓶中,用移液器加入 5 mL 甲醇,搅拌混匀,转移到容器中。启动 HPLC(5.31)泵,进样 1  $\mu\text{L}$ 。

### 6.3 衍生

在玻璃管中,依次加入 2 mL OPA 溶液(4.28),2 mL 硼酸缓冲液(4.29),0.6 mL 2-巯基乙醇,加盖混匀(5.30)。然后加入 0.4 mL 样品,再加盖并混匀。由于衍生物不稳定,打开

盖后应立即进样。进样后立即冲洗,否则会产生难闻的气味。

注:可以通过自动调温烘箱进行衍生化,但要确保自动化的衍生程序尽量与手动操作的相近。

#### 6.4 日常清洁

每个样品测试前注射器和针需用去离子水冲洗;过滤器固定器先用热水洗,再用甲醇清洗并干燥。

### 7 步骤

流动相:

——A:磷酸盐缓冲液;

——B:乙腈。

梯度洗脱,见表 2。

表 2

时间/min	A/%	B/%
0	80	20
15	70	30
23	60	40
42	50	50
55	35	65
60	35	65
70	80	20
95	80	20

注:可以调整梯度,以获得一个接近附录 B 的色谱。

流速:1 mL/min;

柱温:35°C (5.32);

探测器(5.35): $E_{XC} = 356 \text{ nm}$ ,  $E_M = 445 \text{ nm}$ (5.30);

内部校准

每组样品测试前都需要用内标溶液进行校准。

响应因子计算:

$$RF = c_{cis} \times A_i / c_{ci} \times A_{is}$$

其中: $c_{ci}$ ——校准溶液中待测物的浓度;

$c_{cis}$ ——校准溶液中内标品(1-6-二氨基己烷)的浓度;

$A_i$ ——样品中待测物峰面积;

$A_{is}$ ——样品中内标峰面积。

浓度计算:

$$c_{ci} = (XF \times A_i) / (A_{is} \times RF)$$



其中： $A_i$ ——样品中待测物峰面积；  
 $A_{is}$ ——样品中的内标峰面积；  
 $XF$ ——内标加入到样品中的量；  
 $XF$ —— $119 \times 0.5 / 100 = 5.95$ 。

## 8 结果表示

结果以 mg/L 表示,保留小数点后一位数字。

## 9 可靠性

表 3

名称	$r/(mg/L)$	$R/(mg/L)$
组胺	$0.07x + 0.23$	$0.50x + 0.36$
甲胺	$0.11x + 0.09$	$0.40x + 0.25$
乙胺	$0.34x - 0.08$	$0.33x + 0.18$
酪胺	$0.06x + 0.15$	$0.54x + 0.13$
苯乙胺	$0.06x + 0.09$	$0.34x + 0.03$
丁二胺	$0.03x + 0.71$	$0.31x + 0.23$
2-甲基丁胺	$0.38x + 0.03$	$0.38x + 0.03$
3-甲基丁胺	$0.38x + 0.03$	$0.38x + 0.03$
二氨基戊烷	$0.14x + 0.09$	$0.36x + 0.12$

附录 A 是实验室间协同比对验证实验的详细总结。

## 10 其他特性

葡萄酒中其他成分的影响:虽然氨基酸在一开始分析时就会释放出来,但不会影响生物胺的检测。方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)由实验室间验证试验得到。

表 4

名称	LOD/(mg/L)	LOQ/(mg/L)
组胺	0.01	0.03
甲胺	0.01	0.02
乙胺	0.01	0.03
酪胺	0.01	0.04
苯乙胺	0.02	0.06
丁二胺	0.02	0.06
2-甲基丁胺	0.01	0.03
3-甲基丁胺	0.03	0.10
二氨基戊烷	0.01	0.03

## 11 质量控制

质量控制包括使用有证标准品,在葡萄酒样品的分析序列中插入质控样品或者加标的样品,以及使用质控图等。



## 附录 A

实验室间协同比对验证实验的结果如下。实验在(法国)国家专业葡萄酒研究事务局(ONIVINS)的指导下由波尔多(法国)酿酒研究所承担。

实验室间试验年份:1994

实验室:7

样本数:9 个双盲样

(1994 年 11 月~12 月 OIV 研究报告,765-766,p. 916-962)数据计算符合 ISO 5725-2:1994。

样品类型:白葡萄酒(BT),加度白葡萄酒(BT)=B1,加度白葡萄酒(BT)=B2,红酒 n°1(RT),加度红葡萄酒=R1,加度红葡萄酒(RT)=R2,红酒 n°2(CT),加度红葡萄酒(CT)=C1 和加度红葡萄酒(CT)=C2。单位 mg/L。

表 A.1

名称	组胺	甲胺	乙胺	酪胺	苯乙胺	丁二胺	异戊胺	二氨基戊烷
酒 B1	酒 BT+0.5	酒 BT+0.12	酒 BT+0.13	酒 BT+0.36	藤 BT+0.15	酒 BT+0.5	酒 BT+0.28	酒 BT+0.25
酒 B2	酒 BT+2	酒 BT+0.40	酒 BT+0.50	酒 BT+1.44	酒 BT+0.60	酒 BT+2	酒 BT+0.174	酒 BT+1.04
酒 C1	酒 CT+2	酒 CT+0.1	酒 CT+0.18	酒 CT+0.72	酒 CT+0.15	酒 CT+2	酒 CT+0.29	酒 CT+0.26
酒 C2	酒 CT+4	酒 CT+0.41	酒 CT+0.50	酒 CT+2.90	酒 CT+0.58	酒 CT+8	酒 CT+1.14	酒 CT+1.04
酒 R1	酒 RT+2	酒 RT+0.14	酒 RT+0.13	酒 RT+1.45	酒 RT+0.19	酒 RT+3	酒 RT+0.57	酒 RT+0.51
酒 R2	酒 RT+5	酒 RT+0.41	酒 RT+0.50	酒 RT+2.88	酒 RT+0.59	酒 RT+10	酒 RT+2.28	酒 RT+2.08



## 附录 B 色谱图

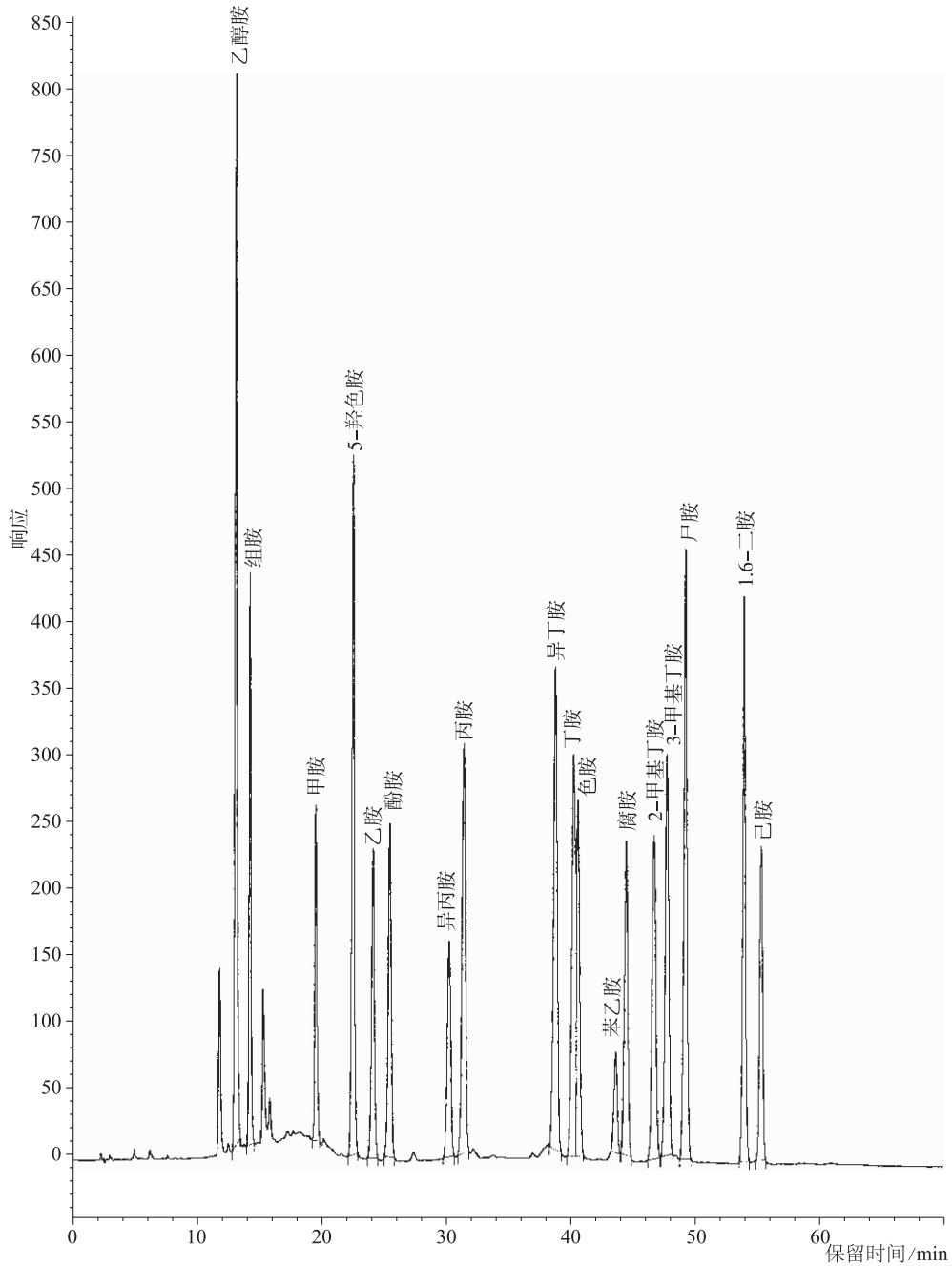


图 B.1 葡萄酒中生物胺分离的色谱图

## 参考文献

- [1] TRICARD C. ,CAZABEIL J.-M. ,SALAGOÏTI M. H. (1991) : Dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC, *Analisis*, 19, M53-M55.
- [2] PEREIRA MONTEIRO M. -J. et BERTRAND A. (1994) : validation d'une méthode de dosage-Application à l'analyse des amines biogènes du vin. *Bull. O. I. V.* , (765-766) ,916-962.



## 谷胱甘肽

(决议 OIV-Oeno 345/2009)

### 1 范围

该方法采用配有荧光检测器(LIF)的毛细管电泳仪(CE),能够检测葡萄汁和葡萄酒中浓度范围在 0 mg/L~40 mg/L 的谷胱甘肽含量。

### 2 原理

该方法用毛细管电泳仪替代了高效液相色谱仪,是对 Noctor 和 Foyer(1998)开发的 HPLC-荧光检测法测定杨树叶中非挥发性硫醇的改进。

毛细管电泳是根据不同物质在充满电解液的毛细管中迁移速度的不同而进行分离的。

待分离试样从毛细管的一端注入,由于电解液中电极产生了电场,被分析物的迁移速度有差异从而达到分离的目的,并在毛细管另一端以峰的形式被检测到。在同一操作条件下,迁移时间可作为定性依据,峰面积与进样浓度成正比。

### 3 试剂

#### 3.1 试剂

- 3.1.1 谷胱甘肽(GSH,>98%)。
- 3.1.2 二硫苏糖醇(DTT,>99%)。
- 3.1.3 无水磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,>99%)。
- 3.1.4 无水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,>99%)。
- 3.1.5 2-(N-环己基胺)乙基磺酸(CHES,>98%)。
- 3.1.6 单溴二胺(MBB,97%)。
- 3.1.7 乙二胺四乙酸钠盐(EDTA,>99%)。
- 3.1.8 氢氧化钠。
- 3.1.9 35%盐酸。
- 3.1.10 99.5%乙腈。
- 3.1.11 超纯水,电阻率>18  $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

#### 3.2 溶液

所有溶液在使用前需混匀。

- 3.2.1 电泳缓冲液:50 mmol/L 磷酸盐缓冲液,pH7。

该缓冲溶液需使用溶液 A 和 B 来配制。

- 3.2.1.1 溶液 A:3 mg 无水磷酸二氢钠溶于 250 mL 超纯水。
- 3.2.1.2 溶液 B:3.55 mg 无水磷酸氢二钠溶于 250 mL 超纯水。

磷酸盐缓冲溶液:量取 40 mL 溶液 A 加入 210 mL 溶液 B,超纯水定容至 500 mL,然后用盐酸调节 pH 至 7。

- 3.2.2 50 mmol/L 单溴二胺溶液(MBB)。25 mg 单溴二胺(MBB)溶于 1.850  $\mu\text{L}$  乙腈。  
-20℃避光保存,有效期 3 个月。

3.2.3 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液。取 0.4 g 氢氧化钠,用超纯水溶解并定容至 100 mL。

3.2.4 5 mol/L 氢氧化钠溶液。取 20 g 氢氧化钠,用超纯水溶解并定容至 100 mL。

3.2.5 0.5 mol/L pH 9.3 CHES 缓冲液:称取 2.58 g 2-(N-环己胺)乙基磺酸(CHES),溶于约 20 mL 超纯水中,用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 9.3,用超纯水定容至 25 mL,并混匀。取该溶液各 1 mL 分装于 1.5 mL 试管(Eppendorf 型)中。储存在  $-20^{\circ}\text{C}$ ,CHES 缓冲液可以保存数月。

3.2.6 10 mmol/L 二硫苏糖醇溶液(DTT)。称取 15.4 mg 二硫苏糖醇溶于 10 mL 超纯水,取该溶液各 1 mL 分装于 1.5 mL 试管(Eppendorf 型)中。储存在  $-20^{\circ}\text{C}$ ,DTT 缓冲液可以保存数月。

## 4 仪器

### 4.1 毛细管电泳

配备了流体静力模式注射器和激光诱导荧光检测器的毛细管电泳,可以发射与 MBB-GSH 络合物吸收波长相似的波长:例如 390 nm(如:Zetalif 检测器)。

### 4.2 毛细管

总长为 120 cm 的无接枝石英毛细管。有效长度是 105 cm,内径为 30  $\mu\text{m}$ 。

## 5 样品制备

巯基官能团-SH 经单溴二胺(MBB)(Radkowsky & Kosower,1986)衍生后进行测定。葡萄汁或未装瓶葡萄酒样品分析前需通过离心进行净化,瓶装葡萄酒则无须提前净化。

样品制备:

于 1.5 mL 试管内(Eppendorf 型)分别加入:

——200  $\mu\text{L}$  样品;

——10  $\mu\text{L}$  DTT 溶液(3.2.4)-终浓度为 0.25 mmol/L;

——145  $\mu\text{L}$  CHES(3.2.3)-终浓度为 179 mmol/L;

——50  $\mu\text{L}$  MBB(3.2.2)-终浓度为 6.2 mmol/L。

混匀后,室温避光衍生反应 20 min。该条件下,形成的 MBB-SR 衍生物是相对不稳定的,需立即进行测定。

## 6 步骤

### 6.1 毛细管柱的处理

在第一次使用前和当迁移时间增加时,应对毛细管进行以下处理:

6.1.1 0.1 mol/L 氢氧化钠冲洗 3 min。

6.1.2 超纯水冲洗 3 min。

6.1.3 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 min。

### 6.2 迁移条件

6.2.1 流体静力模式进样;3 s,50 kPa。

在注射 50 mb 电泳缓冲液提高峰值分辨率(电堆积)后再进样。

6.2.2 分析:20 s 内达到分离电压+30 kV,可产生 47  $\mu\text{A}$  电流。柱温  $21^{\circ}\text{C}$ 。



6.2.3 毛细管应在每次分析后进行清洗,依次加入:

- 0.1 mol/L 氢氧化钠(3.2.5)冲洗 3 min;
- 超纯水(3.1.12)冲洗 3 min;
- 电泳的磷酸盐缓冲溶液(3.2.1)冲洗 3 min。

## 7 结果

在样品测试的浓度下,巯基官能团不稳定,pH 为碱性时容易被酚类化合物自氧化产生的奎宁所氧化,衍生中加入 DTT 有利于其保持稳定,同时不会破坏双硫键。因此,通过添加 10 mg/L 氧化性谷胱甘肽(GSSG)来确定其对葡萄酒中还原型谷胱甘肽含量(GSH)的测定是否存在影响(见图 1)。结果表明,该方法适合测定还原型谷胱甘肽含量。

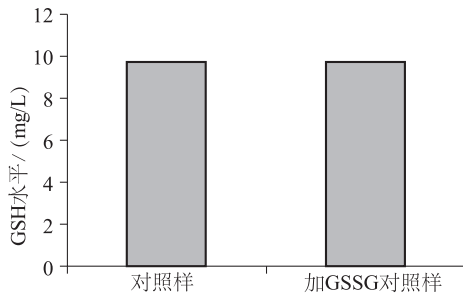


图 1 衍生条件(DTT,终浓度 0.25 mmol/L)二硫键的稳定性试验

图 2 是白葡萄汁样品(索维农葡萄)的电泳图谱。其中半胱氨酸、谷胱甘肽、*N*-乙酰半胱氨酸和二氧化硫均出峰良好。第一个峰为过量的试剂(DTT,MBB)。非挥发性硫醇的分离时间小于 20 min。只有某些峰能够被识别(图 2,A)(Newton et al.,1981)。除了二氧化硫,这些硫醇在葡萄(Cheyrier et al.,1989)、水果和蔬菜中的含量会有所变化(Mills et al.,2000)。

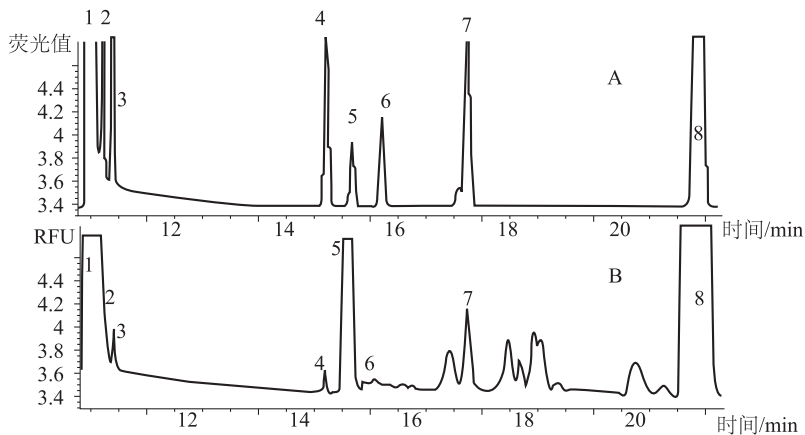


图 2 HCL/EDTA 溶液(A)和葡萄汁(B)中的已知非挥发性硫醇电泳图谱

1—DTT;2—高半胱氨酸;3—半胱氨酸;4—半胱胺酰甘氨酸;  
5—GSH;6—谷氨酸;7—NAC;8—SO<sub>2</sub>

同样条件下,MBB-RS 保留时间如下:MBB-高半胱氨酸 10.40 min;MBB-半胱氨酸

10.65 min; MBB-GSH 14.14 min; MBB-NAC 15.41 min; MBB-SO<sub>2</sub> 18.58 min。

## 8 方法评价

对本方法进行了一些非正式验证,没有完全遵循分析方法验证草案中有关设计、实施和说明的规定(OIV 6/2 000)。

用标准曲线计算各分析物的浓度,平行测定三次计算平均值,结果以 mg/L 表示。

采用最小二乘法计算线性回归和相关系数。混合硫醇储备液在 6℃ 保存于 HCl/EDTA 溶液,可数天无损失。逐级稀释测得葡萄酒中的阈值限即为检出限,或利用 3 倍或更多倍信噪比进行估算。

硫醇的线性范围(见表 1)。

表 1 谷胱甘肽等中硫醇的线性范围、线性方程和相关系数

名称	线性范围/(mg/L)	线性方程	相关系数
高半胱氨酸	0~15	$Y=0.459X-0.231$	0.998 7
半胱氨酸	0~15	$Y=0.374X-0.131$	0.997 9
谷胱甘肽	0~40	$Y=0.583X-0.948$	0.996 6
N-乙酰半胱氨酸	0-10	$Y=0.256X-0.085$	0.998 2

本方法消除了 MBB 水解产物造成的干扰,优于此前其他研究中的结果(Ivanov et al., 2 000)。

平行处理 10 份同一葡萄酒样品,计算重复性。硫醇浓度为 10 mg/L 时,谷胱甘肽变异系数(CV)为 6.0%,高半胱氨酸 3.2%,半胱氨酸 4.8%和 N-乙酰半胱氨酸 6.4%。

还原型谷胱甘肽检出限为 20 μg/L,定量限为 60 μg/L。

## 参 考 文 献

- [1] Noctor, G. and C. Foyer, 1998. Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. *Analytical Biochemistry*, 264, 98-110.
- [2] Kosower, N. S., Kosower E. M., Newton G. L., and Ranney H. M., 1979. Bimane fluorescent labels: Labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76(7), 3382-3386.
- [3] Newton, G. L., R. Dorian, and R. C. Fahey, *Analysis of biological thiols: derivatisation with monobromobimane and separation by reverse-phase high performance liquid chromatography*. *Anal. Biochem.*, 1981, 114: p. 383-387.
- [4] Cheyner, V., J. M. Souquet, and M. Moutounet, 1989. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ration in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40(4), 320-324.
- [5] Mills, B. J., Stinson C. T., Liu M. C. and Lang C. A., 1997. Glutathione and cyst(e)ine profiles of vegetables using high performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. *Journal of food composition and analysis*, 10, 90-101.
- [6] Ivanov, A. R., I. V. Nazimov, and L. Baratova, 2 000. Determination of biologically active low molecular mass thiols in human blood. *Journal of Chromatogr. A.*, 895, 167-171.

## $\alpha$ -二羰基化合物(高效液相色谱衍生化法)

(OIV-Oeno 386A-2010)

### 1 引言

葡萄酒中的二羰基化合物十分重要,它们会影响感官,并与葡萄酒中的其他组分发生化学或微生物反应。

葡萄酒中的 $\alpha$ -二羰基化合物主要有(见图1):乙二醛、丙酮醛、双乙酰和戊烷-2,3-二酮,其中 $\alpha$ -二酮在葡萄酒中的含量较为丰富。羰基化合物几乎存在于所有类型的葡萄酒中,特别是经苹果酸-乳酸发酵后的红葡萄酒。另外,用贵腐葡萄酿造的甜白葡萄酒可能含有高浓度的乙二醛和丙酮醛。

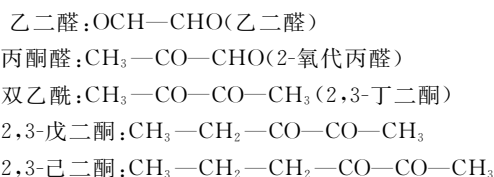


图1 葡萄酒中主要的 $\alpha$ -二羰基化合物(天然葡萄酒中不含有2,3-己二酮,但可用作内标)

### 2 适用范围

该方法适用于所有类型的葡萄酒(白葡萄酒、红葡萄酒、甜酒或烈酒)中二羰基化合物的测定,其含量范围为0.05 mg/L~20 mg/L。

### 3 原理

1,2-苯二胺与葡萄酒中的 $\alpha$ -二羰基化合物发生衍生化反应,生成喹啉类衍生物(见图2)。该反应可直接在pH=8,60℃条件下的葡萄酒中进行反应,反应时间为3 h。衍生物产物可用高效液相色谱(HPLC)-紫外检测器进行测定,检测波长为313 nm。

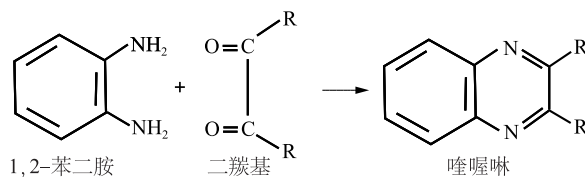


图2 衍生物的形成

### 4 试剂

#### 4.1 二羰基化合物

4.1.1 40%乙二醛溶液。

4.1.2 40%丙酮醛溶液。

4.1.3 双乙酰,纯度>99%。



- 4.1.4 2,3-戊二酮,纯度>97%。
- 4.1.5 2,3-己二酮,纯度>90%。
- 4.2 粉末状 1,2-苯二胺,纯度>97%。
- 4.3 液相用纯净水(可进行过滤且电阻率达到 18.2 MΩ·cm)。
- 4.4 色谱纯乙醇。
- 4.5 氢氧化钠。
- 4.6 纯结晶醋酸。
- 4.7 流动相 A。  
1 L 纯净水中加入 0.5 mL 乙酸,混匀,脱气(可超声处理)。
- 4.8 流动相 B 色谱甲醇。
- 4.9 50%乙醇溶液。  
50 mL 色谱纯乙醇与 50 mL 水混合。
- 4.10 2.0 g/L 2,3-己二酮内标液  
称 40 mg 2,3-己二酮于 30 mL 烧瓶中,加入 20 mL 50%乙醇溶液,搅拌均匀直至完全溶解。

## 5 仪器

- 5.1 配有紫外检测器(检测波长 313 nm)的高效液相色谱仪。
  - 5.1.1 色谱柱:5 μm 十八烷基硅胶柱,规格:250 mm×4.6 mm。
  - 5.1.2 数据采集系统。
- 5.2 pH 计。
- 5.3 磁力搅拌器。
- 5.4 精度为 0.1 mg 的天平。
- 5.5 HPLC 溶剂脱气系统(例如超声仪)。
- 5.6 60℃烘箱。
- 5.7 标准实验玻璃器皿、移液管,30 mL 带螺旋帽的烧瓶和微量注射器。

## 6 样品制备

无需制备。

## 7 步骤

取 10 mL 葡萄酒于 30 mL 烧瓶中。边加氢氧化钠边搅拌,将 pH 调至 8。加入 5 mg 1,2-苯二胺,加入 10 μL 2.0 g/L 的 2,3-己二酮(内标),用旋盖将烧瓶拧紧,充分搅拌直到完全溶解,置于 60℃烘箱中反应 3 h,冷却至室温。

### 7.1 优化和分析条件

二羰基化合物与 1,2-苯二胺在 pH=8 时反应最完全,产率最高。二羰基化合物溶液在 25℃,40℃或 60℃下衍生完全后,按 7.2 步骤所述,用 HPLC 进行分析,在不同反应时间的回收率见表 1。由于衍生试剂与长链分子(2,3-戊二酮和 2,3-己二酮)反应速度较慢,二酮类化合物需要更多的反应时间和较高的反应温度。此外,经研究表明,二氧化硫对喹啉不会

形成干扰。

表 1 反应时间和温度对乙二醛、双乙酰和 2,3-己二酮的苯二胺衍生物的影响

名称	反应温度/°C	回收率/%		
		反应 1 h	反应 2 h	反应 3 h
乙二醛	25	92	93	94
	40	95	97	98
	60	96	98	100
双乙酰	25	23	77	87
	40	64	89	94
	60	85	100	100
2,3-己二酮	25	17	67	79
	40	55	79	88
	60	69	93	100

## 7.2 HPLC 分析

——进样。冷却后直接进样,进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

——洗脱程序。对于梯度洗脱,洗脱程序见表 2。

表 2 洗脱程序

时间/min	溶剂 A	溶剂 B
0	80	20
8	50	50
26	25	75
30	0	100
32	0	100
40	100	0
45	80	20
50	80	20

流速为 0.6 mL/min。

——分离。色谱图见图 3。

——检测。所有二羰基化合物衍生物最佳检测波长为 313 nm。

——衍生物定性。通过与混合标准的保留时间进行比较对衍生物进行定性。该色谱条件下葡萄酒中所有的峰都能得到良好的分离效果。

对本方法进行了一些非正式验证,没有完全遵循分析方法验证草案中有关设计、实施和说明的规定(OIV 6/2 000)。

——重复性。平行测定同一葡萄酒 10 次,计算重复性(见表 3)。



表3 重复性研究和方法的评价

名称		平均值 <sup>a</sup>	标准偏差/%	CV/%
白葡萄酒	乙二醛	4.379	0.101	2.31
	丙酮醛	2.619	0.089	3.43
	双乙酰	5.014	0.181	3.62
	2,3-戊二酮	2.307	0.097	4.21
红葡萄酒	乙二醛	2.211	0.227	10.30
	丙酮醛	1.034	0.102	9.91
	双乙酰	1.854	0.046	2.49
	2,3-戊二酮	0.698	0.091	13.09

<sup>a</sup>分析同一葡萄酒样品 10 次,结果以 mg/L 表示。

——线性。测定系列标准溶液,确定该方法的线性〔使用 12%(V/V)乙醇溶液作为溶剂〕(见表 4)。定量分析结果表明该方法中四种化合物线性良好。

表4 标准溶液的线性相关系数

乙二醛 峰面积	丙酮醛 峰面积	双乙酰 峰面积	2,3-戊二酮 峰面积
$R=0.992$	$R=0.997$	$R=0.999$	$R=0.999$

——回收率。在红葡萄酒和白葡萄酒中的加标回收率实验表明,该方法的回收率良好。回收率范围在 92%~116%。

——定量限。二羰基化合物的定量限非常低,双乙酰检出限低于其他化合物的 10 倍(见表 5)。

表5 二羰基化合物的定量分析

名称	检出限 <sup>a</sup>	测定限 <sup>a</sup>	定量限 <sup>a</sup>
乙二醛	0.015	0.020	0.028
丙酮醛	0.015	0.020	0.027
双乙酰	0.002	0.002	0.003
2,3-戊二酮	0.003	0.004	0.006

<sup>a</sup>结果以 mg/L 表示,乙醇水溶液〔10%(V/V)〕。

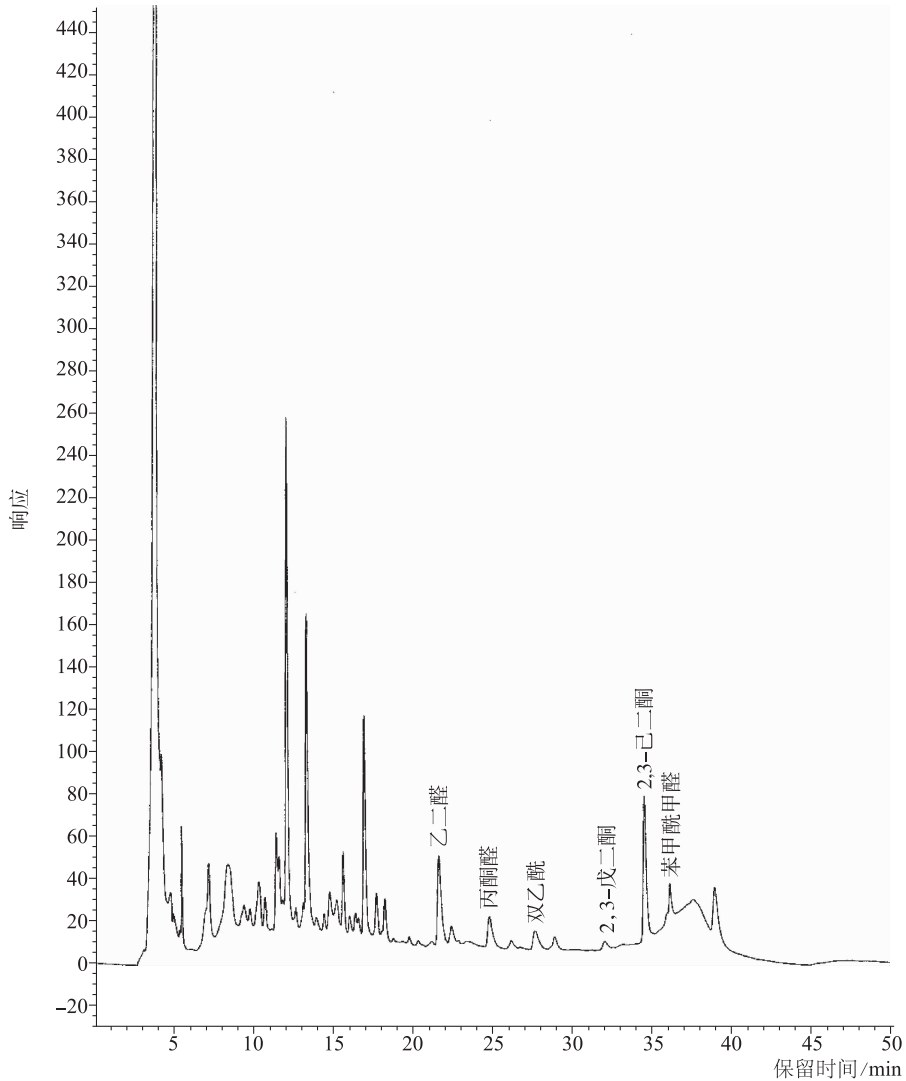


图3 1,2-苯二胺衍生白葡萄酒中的二羰基化合物高效液相色谱图

(UV 检测波长为 313 nm, Spherisorb ODS 柱 250 mm×4.6 mm×5 μm)

## 参考文献

- [1] Bartowski E. J. and Henschke P. A. , The buttery attribute of wine-diacetyl-desirability spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 96:235-252(2004).
- [2] Bednarski W. , Jedrychowski L. , Hammond E. , and Nikolov L. , A method for determination of-dicarbonyl compounds. *J. Dairy Sci.* 72:2474-2477(1989).
- [3] Leppanen O. , Ronkainen P. , Koivisto T. and Denslow J. , A semiautomatic method for the gas chromatographic determination of vicinal diketones in alcoholic beverages. *J. Inst. Brew.* 85:278-281(1979).
- [4] Martineau B. , Acree T. and Henick-Kling T. , Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Res. Int.* 28:139-143(1995).

- [5] Moree-Testa P. and Saint-Jalm Y. ,Determination of-dicarbonyl compounds in cigarette smoke. J. Chromatogr. 217;197-208(1981).
- [6] De Revel G. ,Pripis—Nicolau L. ,Barbe J. -C. and Bertrand A. ,The detection of α-dicarbonyl compounds in wine by the formation of quinoxaline derivatives. J. Sci. Food Agric. 80;102-108(2000).
- [7] De Revel G. and Bertrand A. ,Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of wine aldehydes. Proc. 7th Weurman Flavour Research Symp,Zeist,June,pp 353-361(1994).
- [8] De Revel G. and Bertrand A. ,A method for the detection of carbonyl compounds in wine;glyoxal and methylglyoxal. J. Sci. Food Agric. 61;267-272(1993).
- [9] Voulgaropoulos A. ,Soilis T. and Andricopoulos N. ,Fluorimetric determination of diacetyl in wines after condensation with 3,4-diaminoanisole. Am. J. Enol. Vitic. 42;73-75(1991).
- [10] Gilles de Revel et Alain Bertrand Analyse des composés α-dicarbonyles du vin après dérivation par le 2,3-diaminobenzène OIV FV 1275.



## $\alpha$ -二羰基化合物(气相色谱衍生化法)

(OIV-Oeno 386B-2010)

### 1 概述

葡萄酒中的二羰基化合物十分重要,它们会影响感官,并与葡萄酒中的其他组分发生化学或微生物反应。

葡萄酒中的  $\alpha$ -二羰基化合物主要有(见图 1):乙二醛、丙酮醛、双乙酰和戊烷-2,3-二酮,其中  $\alpha$ -二酮在葡萄酒中的含量较为丰富。羰基化合物几乎存在于所有类型的葡萄酒中,特别是经苹果酸-乳酸发酵后的红葡萄酒。另外,用贵腐葡萄酿造的甜口白葡萄酒可能含有高浓度的乙二醛和丙酮醛。

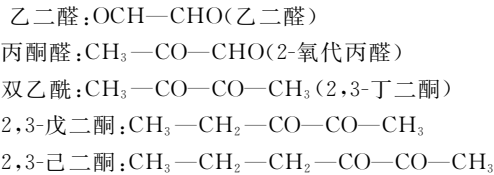


图 1 葡萄酒中主要的  $\alpha$ -二羰基化合物(天然葡萄酒中不含有 2,3-己二酮,但可用作内标)

### 2 适用范围

该方法适用于所有类型的葡萄酒(白葡萄酒、红葡萄酒、甜酒或烈酒)中二羰基化合物的测定,其含量范围为 0.05 mg/L~20 mg/L。

### 3 原理

1,2-苯二胺与葡萄酒中的  $\alpha$ -二羰基化合物发生衍生化反应,生成喹啉类衍生物(见图 2)。该反应可直接在 pH8, 60℃ 条件下的葡萄酒中进行反应,反应时间为 3 h。然后,用二氯甲烷提取衍生物,并用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)进行测定,也可用氮磷检测器。

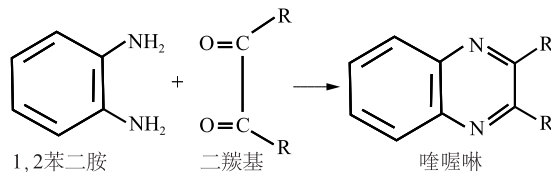


图 2 衍生物的形成

### 4 试剂

#### 4.1 二羰基化合物:

##### 4.1.1 40%乙二醛溶液。

- 4.1.2 40%丙酮醛溶液。
- 4.1.3 双乙酰,纯度>99%。
- 4.1.4 2,3-戊二酮,纯度>97%。
- 4.1.5 2,3-己二酮,纯度>90%。
- 4.2 粉末状 1,2-苯二胺,纯度>97%。
- 4.3 液相用纯净水(可进行过滤且电阻率达到 18.2 MΩ·cm)。
- 4.4 色谱纯乙醇。
- 4.5 氢氧化钠。
- 4.6 2 mol/L 硫酸。
- 4.7 二氯甲烷。
- 4.8 无水硫酸钠。
- 4.9 50%乙醇溶液:50 mL 色谱纯乙醇与 50 mL 水混合。
- 4.10 2.0 g/L 2,3-己二酮内标液:称 40 mg 2,3-己二酮于 30 mL 烧瓶中,加入 20 mL 乙醇溶液,搅拌均匀,直至完全溶解。
- 4.11 无水硫酸钠。

## 5 仪器

- 5.1 气相色谱质谱联用仪,或气相色谱氮磷检测器。
  - 5.1.1 色谱柱:相对极性,聚乙二醇毛细管柱(如 CW 20 M, BP21); 50 m×0.32 mm×0.25 μm。
  - 5.1.2 数据采集系统。
- 5.2 pH 计。
- 5.3 磁力搅拌器。
- 5.4 精度为 0.1 mg 的天平。
- 5.5 60℃烘箱。
- 5.6 标准实验玻璃器皿、移液管、30 mL 带螺旋帽的烧瓶和微量移液器。

## 6 样品制备

无需制备。

## 7 步骤

取 50 mL 葡萄酒于 30 mL 烧瓶中。边加氢氧化钠边搅拌,将 pH 调至 8。加入 25 mg 1,2-苯二胺,加入 50 μL 2.0 g/L 2,3-己二酮(内标),用旋盖将烧瓶拧紧,充分搅拌直到完全溶解,置于 60℃烘箱中反应 3 h,冷却至室温。

### 7.1 优化和分析条件(该研究将按照 HPLC 分析进行)

在 pH 为 8,60℃反应条件下反应 3 h 后,1,2-苯二胺衍生反应生成的二羰基化合物衍生物的产率最高。

此外,经研究表明,SO<sub>2</sub> 对喹喔啉不会产生干扰。

### 7.2 通过 GC 进行分析

#### 7.2.1 喹喔啉的提取

——在 7 中制备的反应液中加入 2 mol/L 硫酸溶液,调节 pH 至 2;



- 用 5 mL 二氯甲烷提取 2 次,磁力搅拌器搅拌 5 min;
- 每次取下层有机相;
- 合并 2 次萃取液;
- 用约 1 g 无水硫酸钠干燥;
- 转移,待进样。

### 7.2.2 色谱分析(仅供参考)

——检测。GC-MS 进行分析,HP 5890 气相色谱-HP 5970 质谱,配有化学工作站(电子撞击电压:70 eV,2.7 kV)。

注:亦可使用氮磷检测器。

——色谱柱。BP21(SGE,50 m×0.32 mm×0.25 μm)。

——升温程序。进样口和检测器的温度分别为 250℃ 和 280℃;柱温:60℃ 下保持 1 min;然后以 2℃/min 的速度升温至 220℃,保持 20 min。

——进样。进样量为 2 μL,不分流模式,时间为 30 s。

### 7.2.3 衍生物喹啉的测定

——分离。采用选择离子扫描模式(SIM),图 3 为葡萄酒样品色谱图。所有类型的葡萄酒样品(白葡萄酒、红葡萄酒、甜型葡萄酒和强化型葡萄酒),包括发酵葡萄汁分离效果均良好。

——定性。GC-MS 可通过全扫描模式(scan)进行峰的定性,通过与质谱库中喹啉的质谱信息进行对比来确认葡萄酒样品中由二羰基化合物衍生出的喹啉化合物;此外,可对其反应时间进行比较。表 1 为二羰基化合物衍生后主要的定性离子。

——测定。SIM 模式进行二羰基化合物的定量测定,选择质荷比  $m/z=76,77,103,117,130,144,158$  和 171。离子质荷比  $m/z=76$  和 77 作为定量离子,其他的则作为定性离子,例如乙二醛:质荷比  $m/z=103$  和 130,丙酮醛:质荷比  $m/z=117$  和 144,双乙酰:质荷比  $m/z=117$  和 158,2,3-戊二酮:质荷比  $m/z=171$  以及 2,3-己二酮:质荷比  $m/z=158$  和 171。

### 7.2.4 方法评价

对本方法进行了一些非正式验证,没有完全遵循分析方法验证草案中有关设计、实施和说明的规定(OIV 6/2 000)。

——重复性。GC-MS-SIM 法的重复性:四个二羰基化合物 CV 均在 2%~5%。

——回收率。葡萄酒中加标回收率范围在 92%~117%。

——线性。线性范围为 0.05 mg/L~20 mg/L。

——检出限。葡萄酒中衍生后二羰基化合物的检出限为 0.05 mg/L。

表 1 1,2-苯二胺衍生二羰基化合物产物的质谱(离子丰度和质荷比与基峰有关)

二羰基化合物	衍生物	衍生物质谱(离子和丰度)
乙二醛	喹啉	130(100),103(56.2),76(46.8),50(20.2),75(10.4),131(9.4)
丙酮醛	2-甲基喹啉	144(100),117(77.8),76(40.5),77(23.3),50(21.9),75(11.3),145(10.3)
双乙酰	2,3-二甲基喹啉	117(100),158(75.6),76(32.3),77(23.1),50(18.3),75(10.4)



表 1(续)

二羰基化合物	衍生物	衍生物质谱(离子和丰度)
2,3-戊二酮	2-乙基-3-甲基 噻喔啉	171(100),172(98),130(34.1),75(33.3),77(21),50(19.4),144 (19),143(14.1),103(14)
2,3-己二酮	2,3-二乙基噻喔啉	158(100),171(20.1),76(13.7),77(12.8),159(11.4),157(10.8), 50(8.1)

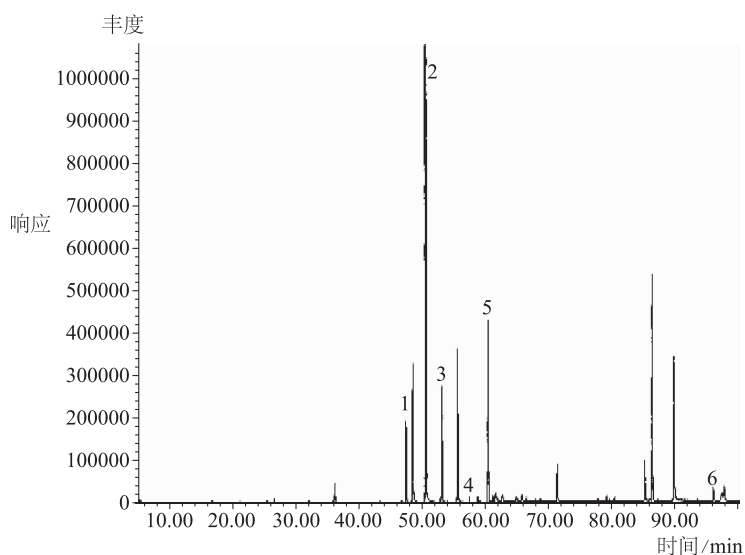


图 3 白葡萄酒样品中 1,2-苯二胺衍生二羰基化合物产物的气相色谱图

[质谱检测质荷比  $m/z=76,77,103,117,130,131,144,158,160$  和  $171$ 。BP21 色谱柱,  $50\text{ m}\times 0.32\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ ,  
升温程序:初始温度  $60^\circ\text{C}$ ,保持  $1\text{ min}$ ,然后以  $2^\circ\text{C}/\text{min}$  的速度,升至  $220^\circ\text{C}$ 。进样口温度:  $250^\circ\text{C}$ ]  
1—乙二醛;2—丙酮醛;3—双乙酰;4—2,3-戊二酮;5—2,3-己二酮(内标);6—苯肼(此方法中未研究)

## 参 考 文 献

- [1] Bartowski E. J. and Henschke P. A. The buttery attribute of wine-diacetyl-desirability spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 96:235-252(2004).
- [2] Bednarski W. ,Jedrychowski L. ,Hammond E. ,and Nikolov L. , A method for determination of-dicarbonyl compounds. *J. Dairy Sci.* 72:2474-2477(1989).
- [3] Leppanen O. ,Ronkainen P. ,Koivisto T. and Denslow J. A semiautomatic method for the gas chromatographic determination of vicinal diketones in alcoholic beverages. *J. Inst. Brew.* 85:278-281(1979).
- [4] Martineau B. ,Acree T. and Henick-Kling T. ,Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Res. Int.* 28:139-143(1995).
- [5] Moree-Testa P. and Saint-Jalm Y. ,Determination of-dicarbonyl compounds in cigarette smoke. *J. Chromatogr.* 217:197-208(1981).
- [6] De Revel G. ,Pripis-Nicolau L. ,Barbe J. -C. and Bertrand A. ,The detection of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in wine by the formation of quinoxaline derivatives. *J. Sci. Food Agric.* 80:102-108(2000).
- [7] De Revel G. and Bertrand A. Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of



- wine aldehydes. Proc 7th Weurman Flavour Research Symp. , Zeist, June, pp 353-361(1994).
- [8] De Revel G. and Bertrand A. , A method for the detection of carbonyl compounds in wine; glyoxal and methylglyoxal. J. Sci. Food Agric. 61:267-272(1993).
- [9] Voulgaropoulos A. , Soilis T. and Andricopoulos N. , Fluorimetric determination of diacetyl in wines after condensation with 3,4-diaminoanisole. Am. J. Enol. Vitic. 42:73-75(1991).
- [10] Gilles de Revel et Alain Bertrand, Analyse des composés  $\alpha$ -dicarbonyles du vin après dérivation par le 1-2-diaminobenzène OIV FV 1275.

## 羧甲基纤维素(纤维素羧甲醚)

(OIV-Oeno 404-2010)

### 1 概述

羧甲基纤维素(CMC)是一种天然纤维素的聚合物,作为食品添加剂(INS 466)已经在产品中使用多年,如冰淇淋和预加工的食品<sup>[1]</sup>,它能够使食物口感更加柔滑。白葡萄酒和发泡酒里加入 CMC 是为了稳定酒石酸<sup>[2]</sup>,最近 OIV 决议 Oeno 2/2008 采纳了这种方法,并规定了加入量应小于 100 mg/L。白葡萄酒中 CMC 的测定方法是基于 1971 年 H. D Graham 发表的测定方法。

### 2 适用范围

该方法适用于白葡萄酒(平静和起泡)。

### 3 原理

CMC 从葡萄酒中析出,在酸性介质中水解成乙醇酸,然后降解形成甲醛。在甲醛的存在下,加入 2,7-二羟基萘(DHN)可形成 2,2,7,7-四羟基二萘基甲烷,该物质在 100℃ 以及浓硫酸的作用下变为紫蓝色,并在 540 nm 处有吸光值。

### 4 试剂

羧甲基纤维素钠(21902,平均黏度 400 mPa·s~1 000 mPa·s,取代度 0.60~0.95)。

2,7-二羟基萘(OHN)(纯度>98.0%,HPLC)。

95%浓硫酸。

实验室用纯净水(质量符合:ISO 3696)。

### 5 仪器

实验室玻璃器皿。

透析袋(6 000 Da~8 000 Da)。

可控温水浴锅。

双光束紫外可见分光光度计。

### 6 步骤

#### 6.1 试剂制备

——称取 50 mg DHN(精确至 1 mg)于 100 mL 容量瓶中。

——加入浓硫酸至刻度线。

——将其置于 28℃ 的可控温水浴锅内 4 h(无需搅拌)。

——加热结束后,将试剂转移至棕色试剂瓶中,并储存于 4℃ 的冰箱内。

#### 6.2 葡萄酒样品制备

——取 20 mL 葡萄酒,脱气后,装入透析袋。



- 将含有葡萄酒的透析袋置于一个充满了蒸馏水的 6L 的烧杯中。
- 透析 24 h, 更换两次透析用水。

### 6.3 显色反应

- 取 1 mL 已透析的葡萄酒于试管中。
- 加入 9 mL 试剂。
- 将试管置于 100℃ 可控温水浴锅中水浴 2 h。
- 使用紫外-可见光分光光度计对溶液进行分析, 在 540 nm 处读取吸光值。

### 6.4 计算葡萄酒中 CMC 的含量

根据 6.3 中记录的吸光值, 按照葡萄酒标准曲线(见图 2)计算 CMC 含量。

## 7 方法评价

对本方法进行了一些非正式验证, 没有完全遵循分析方法验证草案中有关设计、实施和说明的规定(OIV 6/2 000)。

### 7.1 线性

在白葡萄酒中添加浓度介于 0 mg/L~100 mg/L 的 CMC, 并按照上述步骤中的条件进行透析处理, 浓度和响应值呈线性关系(图 1)。

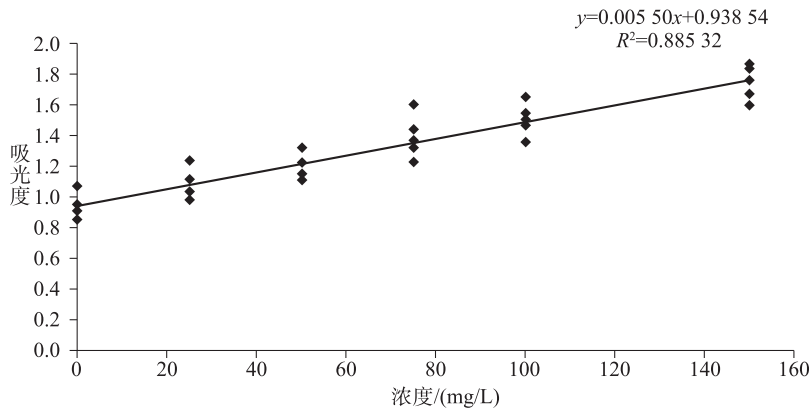


图 1 测定白葡萄酒中 CMC 的标准曲线

### 7.2 重复性

在相同的条件下, 测定 22 个白葡萄酒样品中 CMC 含量, 每个样品连续测 2 次, 结果见表 1。

表 1 测定白葡萄酒中 CMC 方法的重复性

重复性	计算结果
标准偏差	0.075
CV/%	7.2
<i>r</i>	0.21
<i>r</i> /%	20

### 7.3 再现性

在不同日期测定 12 次白葡萄酒中 CMC 含量,结果见表 2。

表 2 测定白葡萄酒中 CMC 方法的再现性

重现性	计算结果
标准偏差	0.082
CV/%	9.6
R	0.23
R/%	27

### 7.4 特异性

在白葡萄酒中加入已知量的 CMC 并测定其回收率以对其特异性进行验证。结果见表 3。

表 3 白葡萄酒中 CMC 测定方法的特异性

样品	加入浓度/(mg/L)	终浓度/(mg/L)	回收率/%
葡萄酒 1	50	33	66
葡萄酒 1	50	51	102
葡萄酒 1	50	24	77
葡萄酒 2	75	78	104
葡萄酒	75	90	121
葡萄酒 2	75	69	92
葡萄酒 3	100	109	109
葡萄酒 3	100	97	97
葡萄酒 3	100	103	103
葡萄酒 4	150	163	109
葡萄酒 4	150	149	100
葡萄酒 4	150	159	106

### 7.5 检出限和定量限

对未处理葡萄酒样品进行 10 次测定,计算其检出限(LOD)和定量限(LOQ)。该方法测定检出限为 14 mg/L,定量限为 61 mg/L。

该方法可对 CMC 浓度大于 20 mg/L 的白葡萄酒样品进行定性,当 CMC 浓度超过 60 mg/L 时,可对其进行定量测定。该方法能够满足相关规定中 CMC 最大剂量为 100 mg/L 的要求。

### 7.6 不确定度

不确定度可以通过在葡萄酒中添加 3 个不同浓度水平 CMC(25 mg/L,75 mg/L 和 150 mg/L)的测定结果的再现性标准偏差进行计算,该方法的不确定度为 40 mg/L。

## 参 考 文 献

- [1] Regulation(CE)N°1333/2008 of the 16th of December,2008 concerning food additives.
- [2] Stabilisation tartrique des vins par la carboxyméthylcellulose-Bulletin de l'OIV 2001, vol 74, n°841-842, p151-159.
- [3] Determination of carboxymethylcellulose in food products-H. D Graham, Journal of food science 1971, p 1052-1055.

## 蛋白澄清剂潜在过敏残基

(OIV-Oeno 427-2010, OIV-COMEX 502-2012 对其修订)

### 1 标准方法的定义

精度:从一系列大量测试结果中得到的平均值和可接受的参考值之间的一致程度。

$r_r$ :重复性限。重复性条件下(例如:同一样品、同一名操作员、相同的设备、相同的实验室和较短的时间间隔),在一个特定的置信区间内(通常为 95%),2 次单个测试结果之间的绝对差值的低限, $r_r=2.8 \times S_r$ 。

$S_r$ :标准偏差。用重复性条件下得到的结果进行计算。

$RSD_r$ :相对标准偏差。用重复性条件下得到的结果进行计算 $[(S_r/\bar{x}) \times 100]$ ,其中  $\bar{x}$  是所有实验室和样品的平均值。

$R$ :再现性限。再现性条件下(例如:操作员在不同的实验室,采用相同的材料,使用标准化的测试方法),在特定的置信区间内(通常为 95%),2 次单个测试结果之间的绝对差值的低限, $R=2.8 \times S_R$ 。

$S_R$ :标准偏差。用再现性条件下得到的结果进行计算。

$RSD_R$ :相对标准偏差。用再现性条件下得到的结果进行计算 $[(S_R/\bar{x}) \times 100]$ 。

$HoR$ :HORRAT 值。所获得的  $RSD_R$  值除以通过 Horwitz 公式计算出的  $RSD_R$  值。

$B_0$ :空白平均值。

LOD:检出限。计算公式为  $LOD=B_0+3 \times S_r(B_0)$ 。

LOQ:定量限。计算公式为  $LOD=B_0+10 \times S_r(B_0)$ 。

### 2 一般性质

#### 2.1 要求

分析方法必须与具体的酿酒实际工艺相结合。

#### 2.2 含有过敏性蛋白的添加剂或加工助剂

必须从化学的角度,严格控制每个产品的质量。

#### 2.3 分析方法的类别

一般来说,免疫酶法在进行致敏原日常控制最合适而且最简单的方法。

测定葡萄酒中蛋白质澄清剂过敏残留物可以使用双抗体夹心法、竞争法、直接或间接 ELISA 方法。如没有酶标记的抗体,可用生物素化抗体与抗生物素-HRP 结合物进行检测。

#### 2.4 抗体

——抗体特异性(对过敏原亲和力的评价);

——高特异性的商业加工助剂(特性描述如上);

——葡萄酒酿造中使用的蛋白质的交叉反应特性;

——对葡萄酒酿造工艺(蛋白质水解或改性分子)中形成的过敏源衍生物的检测能力



方法；

——抗体在酒样中必须有最佳的结合特性；

——对具有不同化学特性(pH 和干浸出物,红葡萄酒和白葡萄酒等)的酒样,方法必须具有最佳的性能；

——来自不同地理区域的葡萄酒(即使采取不同的酒酿造工艺)的结果要有可比性；

——即使葡萄酒成熟条件(时间、温度、变色等)不同,但抗体必须具有最佳的结合特性。

### 3 方法

测定葡萄酒中蛋白澄清剂的具体方法尚无规定。下述几个 ELISA 方法可以适用。

实验室应使用 OIV 验证的方法,这些方法符合表 1 所示的评价指标。如果可能,实验室间的协同实验材料中应包括一个有证标准物质。否则,需使用其他方法对真实性进行评估。

#### 3.1 直接或间接 ELISA 方法的基本步骤

直接的单步法仅使用一个标记抗体。样品/标准中的抗原与标记抗体孵化并在培养孔中结合。

间接的两步法使用一个标记的二级抗体检测。首先,样品/标准中的抗原与一级的抗体孵化并在培养孔中结合。随后另一个标记的二级抗体识别一级抗体并进行孵化。

##### 3.1.1 直接法

a) 准备一个已结合样品中抗原的平板。

b) 阻止板上任何非特异性结合位点。

c) 采用酶联抗体特异性结合抗原。

d) 洗板,以除去过量的(未结合)抗体-酶结合物。

e) 通过酶将加入的一种化学物质转换成有颜色或荧光或电化学信号。

f) 通过测定酶标板孔中的吸光度、荧光或电化学信号(例如:电流),以确定抗原的存在和数量。

在测定之前,抗体制剂必须被纯化并交联。

##### 3.1.2 间接法

a) 准备一个已结合样品中抗原的平板。

b) 阻止板上任何非特异性结合位点。

c) 采用一级抗体特异性结合抗原。

d) 洗板,以除去过量的(未结合)一级抗体。

e) 采用对一级抗体具有特异性的酶联二级抗体进行结合。

f) 洗板,以除去过量的(未结合)抗体-酶结合物。

g) 通过酶将加入的一种化学品转换成有颜色或荧光或电化学信号。

h) 通过测定酶标板孔中的吸光度、荧光或电化学信号(例如:电流),以确定抗原的存在和数量。

在测定之前,这两个抗体必须被纯化而且其中一个必须是交联的。



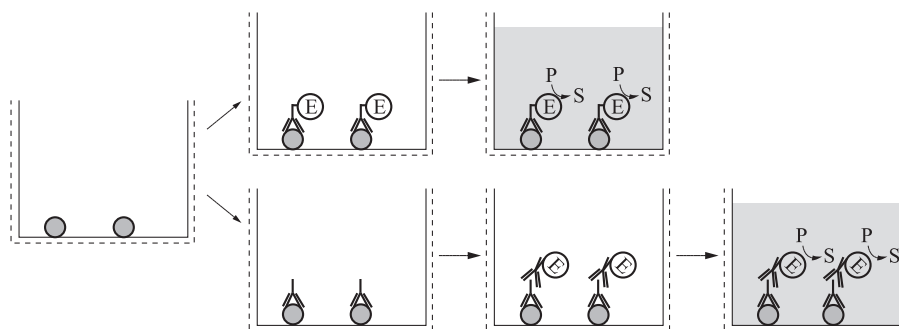


图 1 直接和间接 ELISA

大多数情况下,结合度高的聚乙烯微孔板是最好的;具体应向制造商咨询,以确定结合给定抗原最合适的酶标板类型。

直接和间接 ELISA 的最大优点是高灵敏度,用相对比较简易的设备来减少非特异性结合。但它只适用于含有少量非抗原蛋白的样品。

### 3.2 竞争 ELISA 方法的基本步骤

“竞争”是描述一种待测物质对已建立系统干扰能力的定量试验方法。该实验能够直接进行,或者通过一步法或间接的两步法进行。

#### 3.2.1 直接法

- 准备一个结合了已知量抗原的平板。
- 阻止板上任何非特异性结合位点。
- 采用样品或标准(抗原)和抗原特异性结合的酶联抗体在已包被的微孔板上进行结合。包被在微孔板上的抗原和溶液中的抗原“竞争”抗体。因此,样品中的抗原越多,结合固定抗原的抗体就越少。
- 洗板,以除去过量的(未结合)抗体和未结合的抗原-抗体复合物。
- 通过酶将加入的一种化学品转换成有颜色或荧光或电化学信号。
- 通过测定酶标板孔中的吸光度、荧光或电化学信号(例如:电流),以确定抗原的存在和数量。

在测定之前,抗体必须被纯化而且必须是交联的。

#### 3.2.2 间接法

- 准备一个结合了已知量抗原的平板。
- 阻止板上任何非特异性结合位点。
- 采用样品或标准(抗原)和抗原特异性结合的酶联抗体在已包被的微孔板上进行结合。包被在微孔板上的抗原和溶液中的抗原“竞争”抗体。因此,样品中的抗原越多,结合固定抗原的抗体就越少。
- 洗板,以除去过量的(未结合)抗体和未结合的抗原-抗体复合物。
- 采用对一级抗体具有特异性的酶联二级抗体进行结合。
- 洗板,以除去过量的(未结合)抗体-酶结合物。
- 通过酶将加入的一种化学品转换成有颜色或荧光或电化学信号。
- 通过测定酶标板孔中的吸光度、荧光或电化学信号(例如:电流),以确定抗原的存在



和数量。

在测定之前,这两级抗体必须被纯化而且其中一个必须是交联的。

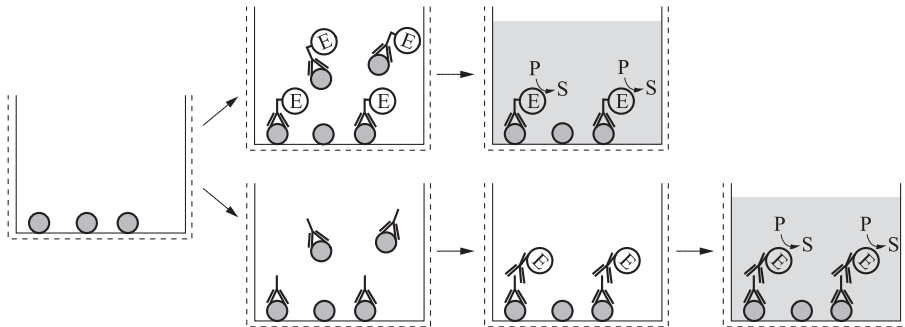


图2 直接和间接竞争 ELISA

对于竞争性 ELISA,原始的抗原浓度越高,信号就越弱。

大多数情况下,结合度高的聚乙烯微孔板是最好的;具体应向制造商咨询,从而确定结合给定抗原最合适的酶标板类型。

### 3.3 双抗体夹心 ELISA 方法的基本步骤

双抗体夹心 ELISA 法测定了两侧抗体之间的抗原含量(例如捕获和检测抗体)。被检测的抗原必须含有两种不同的抗原位点(抗原决定簇)用于结合两种不同的抗体。无论是单克隆抗体或多克隆抗体均可使用。

#### 3.3.1 直接法

- 准备一个已结合捕获抗体的平板。
- 阻止板上任何非特异性结合位点。
- 将含抗原的样品或标准结合到板上。
- 洗板,以除去未结合抗原。
- 采用酶联抗体(检测抗体)特异性结合抗原。
- 洗板,以便于除去过量的(未结合)抗体-酶结合物。
- 通过酶将加入的一种化学品转换成有颜色或荧光或电化学信号。
- 通过测定酶标板孔中的吸光度或荧光或电化学信号(例如:电流),以确定抗原的存在和数量。

在测定之前,这两个抗体必须被纯化而且其中一个必须是交联的。

#### 3.3.2 间接法

- 准备一个已结合捕获抗体的平板。
- 阻止板上任何非特异性结合位点。
- 将含抗原的样品或标准结合到板上。
- 洗板,以除去未结合抗原。
- 采用一级抗体特异性结合抗原。
- 洗板,以除去过量的(未结合)一级抗体。
- 采用酶联抗体(二级抗体)特异性结合一级抗体。
- 洗板,以除去过量的(未结合)酶联抗体。

- i) 通过酶将加入的一种化学品转换成有颜色或荧光或电化学信号。
- j) 通过测定酶标板孔中的吸光度、荧光或电化学信号(例如: 电流), 以确定抗原的存在和数量。

在测定之前, 所有的抗体必须被纯化而且其中一个必须是交联的。

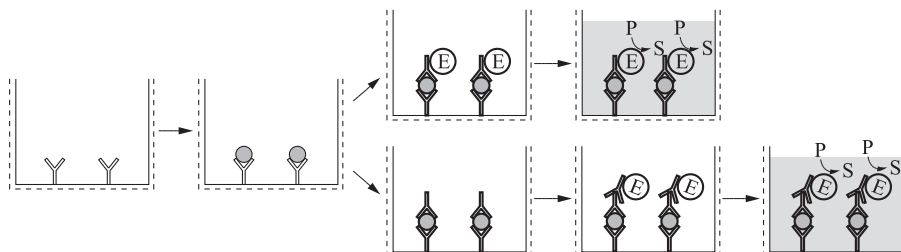


图 3 直接和间接双抗体夹心-ELISA

对于间接双抗体夹心 ELISA, 捕获抗体和检测抗体必须是不同的种类的(例如: 老鼠和兔子), 从而使酶联二级抗体特异性结合检测抗体而不结合捕获抗体。

大多数情况下, 结合度高的聚乙烯微孔板是最好的; 具体应向制造商咨询, 从而确定结合给定抗原最合适的酶标板类型。

对于双抗体夹心 ELISA, 测定与样品中的抗原含量成正比。

双抗体夹心 ELISA 的优点是粗样品在分析之前不需要进行纯化, 并且检测的灵敏度很高。

表 1 葡萄酒澄清剂中潜在过敏蛋白质分析方法的评价指标

参数	数值/注解
适用性	适用于官方测定葡萄酒中的澄清剂
检出限	(以 mg/L 表示) $\leq 0.25$
定量限	(以 mg/L 表示) $\leq 0.5$
精密度	在合作验证试验中 HORRAT 值小于或等于 2
回收率	80% ~ 105% (如合作试验中所示)
特性	无基质干扰
准确度	$ \bar{x} - m  < 1.96 \times \sqrt{S_{R(lab)}^2 - S_{r(lab)}^2 \times (1 - 1/n)}$ 其中 $m$ 是葡萄酒中标准物质的值, $\bar{x}$ 是在同一实验室葡萄酒中所含化合物中 $n$ 次测量结果的平均值。 $S_r$ (实验室) 是对同一实验室重复性条件下的测得结果进行计算的标准偏差。 $S_R$ (实验室) 是对不同实验室再现性条件下的测得结果进行计算的标准偏差。



## 溶菌酶(高效毛细管电泳法)

(Oeno 385/2012)

### 1 概述

本方法用高效毛细管电泳法(HPCE)检测葡萄酒中加入的溶菌酶含量,但并不适用于分析或测定具有致敏特性的溶菌酶。

### 2 范围

此方法适用于检测白葡萄酒中溶菌酶的浓度为 9 mg/L~100 mg/L,如果高于这个水平,需要进行稀释。

### 3 原则

酒样直接过滤,根据需要稀释后注入毛细管电泳仪,用外标法进行定量。

### 4 试剂

- 4.1 溶菌酶(从鸡蛋白提取)。
- 4.2 85%磷酸。
- 4.3 羟丙基甲基纤维素(HPMC)。
- 4.4 实验室用纯净水(例如 ISO 3696 级)。

### 5 设备

毛细管电泳仪,配紫外检测器。

### 6 样品制备

待分析的葡萄酒用蒸馏水稀释 4 倍,使之处于本检测方法的线性范围内(溶菌酶含量低于 100 mg/L)。

### 7 分析条件

毛细管:熔融二氧化硅(37 cm 长,直径 75  $\mu\text{m}$ )。  
缓冲液:磷酸羟丙基甲基纤维素(75 mm、0.1%),pH 为 1.68。  
注射时间:15 s。  
进样方式:静压进样(3447.38 Pa)。  
温度:25 $^{\circ}\text{C}$ 。  
施加电压:7 kV。  
检测波长:214 nm。

### 8 结果计算

配制溶菌酶水标准溶液 10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L,根据相应的峰面积

绘制标准曲线。采用外标法,根据葡萄酒中溶菌酶的峰面积,得出其相应的含量。

## 9 方法评价

### 9.1 线性

允许添加到葡萄酒中溶菌酶的最大剂量是 500 mg/L。配制溶菌酶标准水溶液,浓度为 5 mg/L~500 mg/L。每种进样五次,发现当浓度高于 100 mg/L,响应不再呈线性关系。因此该方法的线性范围为 5 mg/L~100 mg/L,校正曲线如图 1。

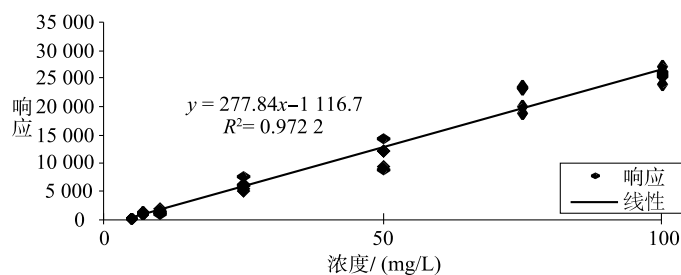


图 1 高效毛细管电泳测定溶菌酶的线性范围

### 9.2 重复性

对 20 支添加溶菌酶的白葡萄酒进行测定,每个样品在相同条件下连续分析两次。重复性见表 1。

表 1 高效毛细管电泳法测定溶菌酶重复性结果

重复性	结果
标准方差	2.63
CV/%	1.4
$r$ /(mg/L)	7.35
$r$ /%	4

### 9.3 再现性

对同一白葡萄酒,添加 200 mg/L 的溶菌酶,在不同的时间测试 8 次。再现性结果见表 2。

表 2 高效毛细管电泳法测定溶菌酶再现性结果

再现性	结果
标准方差	11.75
CV/%	5.8
$R$ /(mg/L)	32.90
$R$ /%	16

### 9.4 检出限(LOD)和定量限(LOQ)

检测限和定量限与溶菌酶标准第一个校准点,即 5 mg/L 响应值的面积和本底的噪音有关。所获得的结果如下:



$$LOD=3\times\text{噪音本底}(\text{mg/L})=3\text{ mg/L}$$

$$LOQ=10\times\text{噪音本底}(\text{mg/L})=9\text{ mg/L}$$

### 9.5 不确定度

用实验室内的再现性标准偏差确定不确定度,为12%。

## 参考文献

- [1] S. Chauvet, C. Lagrèze, A. Domec, M-H Salagoity, B. Médina: Dosage du lysozyme dans le vin par électrophorèse capillaire haute performance OIVFV 1274 ME. Barbeito, C. Coria, C. Chiconofri; Influencia del filtrado de vinos para la determinación de lisozima según oeno 8/2007 OIVFV1306.

## 3.2 非有机类化合物

### 3.2.1 阴离子

方法 OIV-MA-AS321-01

方法类型 IV

## 总 溴

### 1 原理

在过量碱石灰存在的条件下,将葡萄酒在 525℃ 下灼烧。将灰分溶解,调 pH 至 4.65,用氯胺 T 氧化释放出的溴与苯酚磺酞作用生成四溴苯酚磺酞,并在 590 nm 下对产物进行比色测定。

### 2 仪器

- 2.1 100℃ 水浴锅。
- 2.2 可控温电炉。
- 2.3 可测量 300 nm~700 nm 波长内吸光值的分光光度计。

### 3 试剂

- 3.1 50% (m/m) 的 NaOH 溶液。
- 3.2 氢氧化钙[Ca(OH)<sub>2</sub>]悬浊液,每升含 120 gCaO。
- 3.3 苯酚磺酞溶液:0.24 g 苯酚磺酞(酚红)溶解于 24 mL 0.1 mol/L 的氢氧化钠(NaOH)溶液中,加蒸馏水至 1 L。
- 3.4 缓冲溶液(pH 4.65):

2 mol/L 醋酸溶液	500 mL
2 mol/L 氢氧化钠溶液	250 mL
加蒸馏水至	1 L
- 3.5 氧化溶液:

氯胺 T	2 g
加蒸馏水至	1 L

使用前 48 h 制备此溶液,此溶液在±4℃ 能保存两个星期。
- 3.6 还原溶液:称取 25 g 硫代硫酸钠,溶解于蒸馏水中,定容至 1 L。
- 3.7 硫酸溶液:10% (V/V):将硫酸溶液( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.84 \text{ g/mL}$ )稀释至 1/10。
- 3.8 硫酸溶液:1% (V/V):纯硫酸溶液( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.84 \text{ g/mL}$ )稀释至 1/100。
- 3.9 相当于 1 g/L 溴的溴化钾溶液:用蒸馏水溶解 1.489 g 溴化钾(KBr)并定容至 1 L。

### 4 步骤

#### 4.1 制备灰分和灰分溶液

50 mL 葡萄酒置于直径 7 cm 石英蒸发皿中,加入 0.5 mL 50% 的氢氧化钠溶液和 1 mL



氢氧化钙悬浊液,  $\text{pH} \geq 10$ , 盖上玻璃盖放置 24 h, 水浴锅中蒸发至干, 可采用热空气流来加快蒸发过程。

灰分: 将蒸发皿放在  $525^{\circ}\text{C}$  电炉上 30 min, 冷却后, 用少许蒸馏水将残渣混合。在水浴锅中蒸干水分后, 再次于  $525^{\circ}\text{C}$  的电炉上灼烧。重复以上操作, 直至得到灰/白色的灰分。

向残渣中加入 5 mL 沸腾的蒸馏水, 混匀, 用滴定管先向混合物中加入 10% 的硫酸溶液, 然后加入足量的 1% 硫酸溶液, 直到将 pH 调至 4~5 之间(用试纸测量)。假设加入硫酸溶液的体积为  $x$  mL, 那么, 再加入  $10.2 - (x + 5)$  mL 的蒸馏水。用玻棒将沉淀的硫酸钙沉淀捣碎, 将蒸发皿中的溶液转移到离心管内, 离心 10 min。吸取 8 mL~9 mL 上清液, 放入试管中。

#### 4.2 定性试验

测定葡萄酒中溴含量是否在  $0 \text{ mg/L} \sim 1 \text{ mg/L}$ , 可直接对未稀释的灰分溶液进行测定。

向小试管中加入:

- 1 mL 灰分溶液;
- 1 滴 pH 4.65 的缓冲溶液;
- 1 滴苯酚磺酞溶液;
- 1 滴氯胺 T 溶液。

1 min 后, 加入 1 滴硫代硫酸钠终止反应。

如果得到溶液为黄色, 黄褐色或者黄绿色, 那么灰分溶液可不用稀释直接使用。

如果得到溶液为蓝色, 紫色或者蓝紫色, 说明葡萄酒中溴的含量超过  $1 \text{ mg/L}$ , 灰分溶液必须被稀释至  $1/12$  或  $1/5$ , 直到溶液颜色符合前述条件。

#### 4.3 定量方法

在一个试管中加入:

- 5 mL 稀释或未稀释的灰分溶液;
- 0.25 mL pH 4.65 的缓冲溶液;
- 0.25 mL 苯酚磺酞溶液;
- 0.25 mL 氯胺 T 溶液;
- 等待 1 min 后加入 0.25 mL 硫代硫酸钠。

用分光光度计在 590 nm, 用 1 cm 比色皿测定样品和空白(5 mL 蒸馏水)的吸光度。

注: 当溴含量低(溶液为黄色, 淡绿色)用 2 cm 光程的比色杯测定吸光度。

#### 4.4 建立标准曲线

在使用之前, 将  $1 \text{ g/L}$  的 KBr 标准溶液分两步稀释, 每次稀释  $1/10$ , 直至溶液中溴的含量为  $10 \text{ mg/L}$ 。

在一组 8 个试管中, 分别依次加入 0.25 mL, 0.50 mL, 0.75 mL, 1.00 mL, 1.25 mL, 1.50 mL, 2.00 mL 和 2.50 mL 浓度为  $1 \text{ g/L}$  的溴标准溶液(3.9), 用蒸馏水定容至 5 mL(以上溶液中溴的含量分别相当于葡萄酒灰分溶液稀释前  $0.05 \text{ mg/L}$ ,  $0.1 \text{ mg/L}$ ,  $0.125 \text{ mg/L}$ ,  $0.2 \text{ mg/L}$ ,  $0.25 \text{ mg/L}$ ,  $0.3 \text{ mg/L}$ ,  $0.4 \text{ mg/L}$  和  $0.5 \text{ mg/L}$ )。按 4.3 的方法进行操作, 记录这些溶液的吸光度, 吸光度对应的溴含量是一条稍微偏离原点的直线。



## 5 结果表达

根据灰分溶液的吸光度在标准曲线上查找出葡萄酒中溴的含量(要考虑比色皿的厚度和灰分溶液的稀释倍数)。总溴含量以 mg/L 表示,结果保留两位小数。

## 参 考 文 献

- [1] DAMIENS A. ,Bull. Sci. Pharmacologiques,1920,27,609;Ibid,1921,28,37,85 et 105.
- [2] BALANTRE P. ,J. Pharm. Chem. ,1936,24,409.
- [3] PERRONET M. ,ROCQUES Mme S. ,Ann. Fals. Fraudes, 1952,45,347.
- [4] CABANIS J. C. ,Le brome dans les vins,Thèse doct. Pharm. ,Montpellier,1962.
- [5] JAULMES P. ,BRUN Mme S. , Cabanis J. C. ,Chim anal. ,1962,327.
- [6] STELLA C. ,Riv. Viticolt. Enol. ,Conegliano,1967,5.



## 氯化物

### 1 方法原理

使用 Ag/AgCl 电极以电位滴定法直接测量葡萄酒中的氯化物。

### 2 仪器

- 2.1 pH 电位计, 刻度至少为 2 mV。
- 2.2 磁力搅拌器。
- 2.3 Ag/AgCl 电极, 饱和硝酸钾溶液作为电解液。
- 2.4 微量滴定管, 最小刻度为 0.01 mL。
- 2.5 精密计时器(秒表)。

### 3 试剂

#### 3.1 标准氯化物溶液:

称取已在干燥器中存放数天的氯化钾(KCl)2.1027 g,(溴含量不超过 0.005%)用蒸馏水溶解并定容至 1 L, 溶液中  $\text{Cl}^-$  浓度为 1 mg/mL。

#### 3.2 硝酸银溶液:

称取 4.7912 g 分析纯的硝酸银( $\text{AgNO}_3$ ), 溶于体积分数为 10% 的乙醇水溶液中, 并用乙醇水溶液定容至 1 L。1 mL 此溶液相当于含  $\text{Cl}^-$  1 mg。

#### 3.3 浓度不低于 65% 的硝酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.40 \text{ g/mL}$ )。

### 4 步骤

4.1 量取 5.0 mL 标准氯化物溶液(3.1)于 150 mL 的烧杯中, 置于磁力搅拌器(2.2)上, 用蒸馏水稀释至 100 mL 左右, 加入 1.0 mL 硝酸(3.3)进行酸化。插入电极后, 用微量滴定管滴加硝酸银溶液(3.2), 充分搅拌。按以下步骤添加硝酸银溶液:

先加入 4 mL, 每加入 1 mL 读取对应的电位值。再每次加 0.20 mL 直至 2 mL, 读取对应电位值。最后, 持续添加, 每次加 1 mL, 读取相应电位值, 直到加入总量为 10 mL 为止。在每次滴加硝酸银溶液之后, 至少等待 30 秒再读取相应电位值。用得到的电位值(mV)与对应的滴定试剂体积(mL)在坐标图纸上绘制曲线, 曲线上的拐点即为电位的等电点。

4.2 量取 5 mL 标准氯化物溶液到含有 95 mL 蒸馏水和 1 mL 硝酸的 150 mL 烧杯中。插入电极, 搅拌的同时进行滴定, 直到到达等电点。重复此测试, 直到得到一致的测试结果。在测量每个系列样品中氯化物含量之前都要进行该校准实验。

4.3 量取 50 mL 葡萄酒加入 150 mL 烧杯中, 加入 50 mL 蒸馏水及 1 mL 硝酸(3.3)后按 4.2 描述的步骤进行滴定, 记录达到等电点时的硝酸银的消耗体积。

### 5 结果表达

#### 5.1 计算

如果  $n$  表示滴定时硝酸银的体积, 在测试溶液中氯化物的含量为:

20n mg/L,以 Cl<sup>-</sup> 计。  
 0.563 3n mEq/L(即毫当量,相当于摩尔数×化学价×1 000)。  
 32.9n mg/L以 NaCl 计。

5.2 重复性(r):

$r=1.2$  mg/L,以 Cl<sup>-</sup> 计  
 $r=0.03$  mEq/L  
 $r=2.0$  mg/L,以 NaCl 计

5.3 再现性(R)

$R=4.1$  mg/L,以 Cl<sup>-</sup> 计  
 $R=0.12$  mEq/L  
 $R=6.8$  mg/L,以 NaCl 计

6 说明(针对精确测量)

测定样品液时完全依照滴定标准样品(4.2)时的操作进行:

a) 量取待分析的葡萄酒 50 mL 于 150 mL 烧杯中,加入 50 mL 蒸馏水和 1 mL 硝酸(3.3)。用硝酸银溶液(3.2)进行滴定,每滴入 0.5 mL 硝酸银的同时记录对应的电位值。根据第一次的滴定过程估算需要硝酸银溶液的体积。

b) 重复以上测试过程,每次滴加 0.5 mL 硝酸银溶液直到比预滴定实验 a) 中加入的硝酸银体积少 1.5 mL~2 mL 时,改为每次滴加 0.2 mL 硝酸银溶液。再均匀的滴加样液,如每次先滴加 0.2 mL 再滴加 0.5 mL 一直到超过预测的等电点为止。

滴定终点和消耗的硝酸银的准确体积可以通过以下方式得到:

- 绘制滴定曲线确定电位等电点;
- 或通过以下公式计算得出消耗的硝酸银体积:

$$V=V'+V_i \frac{\Delta E_1}{\Delta E_1+\Delta E_2}$$

其中:V——在等电点处滴定溶液的体积;  
 V'——在电位出现最大跳跃之前滴定溶液的体积;  
 $\Delta V_i$ ——所加每份滴定溶液的恒定体积,设其为 0.2 mL;  
 $\Delta E_1$ ——电位出现最大变化之前的电位差;  
 $\Delta E_2$ ——电位出现最大变化之后的电位差。

表 1

硝酸银标准溶液的体积/mL	电位值 E/mV	$\Delta E_1$	$\Delta E_2$
0	204	—	—
0.2	208	4	0
0.4	212	4	2
0.6	218	6	0
0.8	224	6	0
1.0	230	6	2
1.2	238	8	4
1.4	250	12	10
1.6	272	22	

表 1(续)

硝酸银标准溶液的体积/mL	电位值 $E$ /mV	$\Delta E_1$	$\Delta E_2$
1.8	316	44	22
2.0	350	34	10
2.2	376	26	8
2.4	396	20	6

在此例中,滴定终点在 1.6 mL~1.8 mL,最大电位变化( $E=44$  mV)发生在这个区间,此时,用于计算检测的样品中氯化物含量的硝酸银滴定液的体积为:

$$V=1.6+0.2 \frac{22}{22+10}=1.74 \text{ mL}$$

### 参 考 文 献

- [1] MIRANDA PATO C. de, F. V. ,O. I. V. ,1959,n°12.
- [2] HUBACH C. E. ,J. Ass. Off. Agric. Chem. ,1966,49,498.
- [3] Fédération internationale des Producteurs de jus de fruits,F. O. I. V. ,1968,n°37.
- [4] JUNGE Ch. , F. V. ,O. I. V. ,1973,n°440.

## 氟化物

(决议 Oeno 22/2004)

### 1 范围

此方法可用于分析所有类型葡萄酒中的氟化物,测量范围 0.1 mg/L~10.0 mg/L。

### 2 原理

用氟电极测量加入缓冲液后样品中的氟化物浓度。缓冲液能提供较高且稳定的背景离子强度,络合铁和铝(否则,铁和铝会与氟形成络合物),同时调节 pH 使 HF·HF 缔合物含量最小。添加标准物使基质效应最小。

### 3 试剂

3.1 去离子水或蒸馏水。

3.2 纯度 $\geq 99.0\%$ 的氯化钠。

3.3 纯度 $\geq 99.0\%$ 的柠檬酸三钠。

3.4 纯度 $\geq 98.0\%$ 的 1,2-环己二胺四乙酸水合物(DTA)。

3.5 纯度 $\geq 98.0\%$ 的氢氧化钠。

3.6 用 3.5 制备的 32%(m/V)的氢氧化钠溶液。

3.7 纯度 $\geq 99.0\%$ 的冰醋酸。

3.8 纯度 $\geq 99.0\%$ 的氟化钠。

3.9 市售的总离子强度缓冲剂(TISAB),或具有同等作用的其他缓冲液(见 4.2)。

3.10 备选缓冲液:

3.10.1 向 1 L 烧杯(4.3)中加入大约 700 mL 水,再加入 58.0 g $\pm$ 0.1 g 氯化钠(3.2)和 29.4 g $\pm$ 0.1 g 柠檬酸三钠(3.3)。

3.10.2 用约 50 mL 蒸馏水中溶解 10.0 g $\pm$ 0.1 g CDTA(3.4)和 6 mL 32%(m/V)氢氧化钠溶液(3.6)。

3.10.3 以上两种溶液混合后加入 57 mL 冰醋酸(3.7),用 32%(m/V)的氢氧化钠溶液调节 pH 至 5.5,冷却至室温,将溶液转移至 1 L 容量瓶(4.10)中,用蒸馏水定容。

3.11 氟化物标准溶液:

3.11.1 配制氟化物标准储备液(100 mg/L):称量(221 $\pm$ 1)mg 氟化钠(3.8)(经 105 $^{\circ}$ C 干燥 4 h)置于 1 L 的聚乙烯容量瓶中(4.10),定容。

3.11.2 氟化物标准溶液,浓度为 1.0 mg/L,2.0 mg/L 和 5.0 mg/L:

用移液管移取 1 mL,2 mL 和 5 mL 浓度为 100 mg/L 标准储备溶液,分别置于 3 个 100 mL 聚乙烯容量瓶中,定容至刻度即得到浓度为 1.0 mg/L,2.0 mg/L 和 5.0 mg/L 标准溶液。

3.12 空白酒样:已知不含氟化物的酒样用作基质。

3.13 1 mg/L 的加标酒样:取 10 mL 浓度为 100 mg/L 氟化物标准溶液(3.11.1)置于 1 L



容量瓶中,然后用不含氟化物的酒样定容至刻度。

## 4 仪器

- 4.1 具有标准添加功能的 pH/离子分析仪(例如康宁 pH/离子分析仪 455, Cat. # 475344)或最小刻度为 1 mV 的 pH/离子分析仪。
- 4.2 氟离子选择电极和单一节点参比电极或者复合电极(例如 Corning Fluoride Electrode Cat. # 34108-490)。
- 4.3 聚乙烯烧杯 150 mL, 1 L。
- 4.4 聚乙烯量筒 50 mL。
- 4.5 电磁搅拌器。
- 4.6 PTFE(聚四氟乙烯)涂层的磁力搅拌子。
- 4.7 125 mL 带盖子的塑料瓶(Nalgene 公司产或同功能产品)。
- 4.8 500  $\mu$ L 精确移液管。
- 4.9 超声波水浴锅。
- 4.10 A 级 50 mL, 100 mL 和 1 L 容量瓶。
- 4.11 A 级 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL 和 25 mL 的定量移液管。

## 5 制备校准标样

- 5.1 分别量取 25 mL(4.11)1.0 mg/L, 2.0 mg/L 和 5.0 mg/L 标准溶液于 3 个 150 mL 的烧杯中,向每个烧杯中加入 20 mL 水和 5 mL 市售 TISAB,用磁力搅拌器进行搅拌。
- 5.2 如果使用备选的 TISAB 试剂(3.10):分别量取 25 mL 标准溶液分别置于 3 个 150 mL 烧杯中,再向其中各加入 25 mL 备选的 TISAB 试剂。用磁力搅拌器进行搅拌。

## 6 制备检测样品

在制取样品前将酒样充分摇匀。起泡酒在取样前先置于洁净烧杯中,在超声波水浴锅内超声驱除气体至酒液中不再有气泡产生。

- 6.1 如果使用市售的 TISAB 试剂:量取 25 mL 酒样置于 150 mL 烧杯中,加 20 mL 水和 5 mL 市售的 TISAB 溶液。用磁力搅拌器进行搅拌。稀释因子( $DF$ )=1。
- 6.2 若使用备选 TISAB 试剂:将 25 mL 酒样置于 150 mL 烧杯中,然后加入 25 mL 备选 TISAB 试剂。用磁力搅拌器进行搅拌。稀释因子( $DF$ )=1。

## 7 步骤

所有标样和酒样溶液必须在同一温度下进行测量。

### 7.1 校准标样

用带有氟离子选择电极和参比电极的毫伏电位计测定每一校准溶液的电位。当读数稳定时读取最终读数(稳定是指 3 min 之内电压变化在 0.2 mV~0.3 mV)。记录每个校准标样溶液的电位。

把读取的电位取 10 的对数后对相应的浓度在坐标纸上取点,以得到电极校准曲线的斜率。

## 7.2 酒样

待电压读数稳定后,记录样品的电位( $E_1$ ),以 mV 计。向样品中加入 500  $\mu\text{L}$  100 mg/L 的氟化物标样,读数稳定之后,读取并记录酒样溶液的电位( $E_2$ ),以 mV 计。

样品中加入氟化物标准溶液后氟化物最终浓度必须至少加倍。为确保加标液后样品中氟化物浓度翻倍,在第一次测定中如果样品中氟化物浓度在 2 mg/L 以上,那么将样品按稀释之后进行第二次检测。

### 7.2.1 市售 TISAB 缓冲液(3.9)

用移液管吸取 25 mL 酒样于 50 mL 容量瓶中,用水定量至刻度线。取 25 mL 稀释后的酒液置于 150 mL 的烧杯中,再加入 25 mL 市售 TISAB。用磁力搅拌器进行搅拌,然后按照 7.2 的步骤进行测量。稀释因子( $DF$ )=2。

### 7.2.2 备选 TISAB 缓冲液(3.9)

移取 25 mL 酒样置于 50 mL 容量瓶中,用水定量至刻度线。取 25 mL 稀释后的酒液于 150 mL 的烧杯中,再加入 25 mL 备选 TISAB。用磁力搅拌器进行搅拌,然后按照 7.2 的步骤进行测量。稀释因子( $DF$ )=2。

## 8 计算

用以下公式计算样品溶液中氟化物浓度(单位为 mg/L):

$$c_f = \frac{V_a \times c_a}{V_o} \times \frac{1}{(\text{anti log } \Delta E/S) - 1}$$

如果加入标准溶液  $V_{\text{std}}$  小于加入后溶液体积的 1%,那么  $V_a = V_o$ ,则

$$c_f = DF \times c_a \times \frac{1}{(\text{anti log } \Delta E/S) - 1}$$

其中: $c_f$ ——样品溶液氟化物浓度(mg/L);

$DF$ ——稀释因子。如果必要按 7.2.1 或 7.2.2 中对样品进行稀释,此时稀释液和样品的  $DF$  相同。即,对于按照 7.2.1 和 7.2.2 稀释的样品  $DF=2$ 。对于按步骤 6.1 或 6.2 没有稀释的样品  $DF=1$ ;

$V_o$ ——稀释前样品溶液的体积(mL);

$V_a$ ——稀释后样品溶液的体积(mL);

$E$ ——在(7.2)中电位  $E_2$  和  $E_1$  间的差值(mV);

$S$ ——电极校准曲线的斜率。

$$c_a = \frac{V_{\text{std}} \times c_{\text{std}}}{V_{\text{samp}}}$$

其中: $c_a$ ——加入样品( $V_o$ )中氟化物的浓度(mg/L),即标准溶液的浓度( $c_{\text{std}}$ , 3.11.1)乘以标准溶液的体积( $V_{\text{std}}$ )再除以在 6.1 或 6.2 中样品的体积(25 mL);

$V_{\text{std}}$ ——加入的标准溶液体积(3.11.1)(0.5 mL);

$V_{\text{samp}}$ ——在 6.1 或 6.2 中样品的体积, $V_{\text{samp}}=25$  mL;

$c_{\text{std}}$ ——标准溶液浓度(3.11.1)。



## 计算方法举例

(1) 样品准备按 6.2 进行,测量按照 7.2 进行。

$$DF=1$$

$$c_a = \frac{V_{\text{std}} \times c_{\text{std}}}{V_{\text{samp}}} = \frac{0.5 \text{ mL} \times 100 \text{ mg/L}}{25 \text{ mL}} = 2 \text{ mg/L}$$

$$\Delta E = 19.6 \text{ mV}$$

$$S = -58.342$$

$$c_f = DF \times c_a \times \frac{1}{(\text{anti log } \Delta E/S) - 1}$$

$$c_f = 1 \times 2 \text{ mg/L} \times \frac{1}{(\text{anti log } 19.6/58.342) - 1}$$

$$c_f = 1 \times 2 \text{ mg/L} \times 0.856 = 1.71 \text{ mg/L}$$

氟化物的含量为 1.71 mg/L。

(2) 样品准备按 7.2.2 进行,测量按照 7.2 进行。

$$DF=2$$

$$c_a = \frac{V_{\text{std}} \times c_{\text{std}}}{V_{\text{samp}}} = \frac{0.5 \text{ mL} \times 100 \text{ mg/L}}{25 \text{ mL}} = 2 \text{ mg/L}$$

$$E = 20.4 \text{ mV}$$

$$S = -55.937$$

$$c_f = DF \times c_a \times \frac{1}{(\text{anti log } \Delta E/S) - 1} \quad c_f = 2 \times 2 \text{ mg/L} \times \frac{1}{(\text{anti log } 20.4/55.937) - 1}$$

$$c_f = 2 \times 2 \text{ mg/L} \times 0.760 = 3.04 \text{ mg/L}$$

氟化物的含量为 3.04 mg/L。

## 9 精密度

在附录 B 中给出了实验室间研究的具体情况。Horrat 值(HoR)变化范围是 0.30~0.97,表明在参与者中有良好的重现性。

统计计算的结果在附录 B 的表 2 中给出。

重复性标准偏差(RDS<sub>r</sub>)由 1.94%变化至 4.88%,重现性标准偏差(RDS<sub>R</sub>)由 4.15%变化至 18.40%,目标物平均回收率在 99.8%~100.3%。

## 10 质量保证和管理

10.1 在实验开始和结束时都要对浓度为 1.0 mg/L 的标准溶液进行测定,此浓度测定结果必须为 1.0 mg/L±0.1 mg/L。

10.2 在每批次样品分析前进行空白分析,对于内部质量控制(CQI)还要测定一份氟含量超标的质控样。空白试样不能高于 0.0 mg/L±0.1 mg/L,且 CQI 不能高于 1.0 mg/L±0.2 mg/L。



## 附录 A

### 实验室间比对实验

采用氟离子选择电极,利用标准添加方法测定葡萄酒中氟化物。

#### A.1 引言

通过协作性研究以验证采用氟离子选择电极,利用标准添加方法测定葡萄酒中氟化物的实验方法。参与此次协作性研究的试验室共有 12 个,其中 6 个来自欧洲,6 个来自美洲。此次合作研究完全按照 AOAC 的 Youden 协议要求进行。

#### A.2 参与单位

参与此次比对工作的 12 个实验室分别来自于澳大利亚,法国,德国,西班牙和美国,包括 BATF Alcohol and Tobacco Laboratory-Alcohol Section, SF, Walnut Creek, CA., United States; BATF, National Laboratory Ctr., Rockville, MD, United States; Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz, Berlin, Germany; Canandaigua Winery, Madera, CA, United States; CIVC, Epernay, France; E. & J. Gallo Winery-Analytical Services Laboratory, Modesto, CA, United States; E. & J. Gallo Winery-Technical Analytical Services Laboratory, Modesto, CA, United States; ETS Labs, St. Helena, CA, United States; Höhere Bundeslehranstalt & Bundesamt für Wein und Obstbau, Klosterneuburg, Austria; Institut Catala de la Vinya i el Vi, Vilafranca del Penedes (Barcelona), Spain; Laboratorio Arbitral Agroalimentario, Madrid, Spain; and Sutter Home Winery, St. Helena, CA., United States.

#### A.3 试验中使用的样品

表 A.1 为试验中使用的样品列表。样品被分为 12 份(由三份红葡萄酒和三份白葡萄酒组成的 6 个 Youden 组样品)

样品	样品描述
1	无添加的白葡萄酒( $F^-$ 浓度为 0.6 mg/L)
2	添加量为 0.3 mg/L 白葡萄酒( $F^-$ 浓度为 0.9 mg/L)
3	添加量为 0.9 mg/L 的白葡萄酒( $F^-$ 浓度为 1.5 mg/L)
4	添加量为 1.2 mg/L 的白葡萄酒( $F^-$ 浓度为 1.8 mg/L)
5	添加量为 1.4 mg/L 的白葡萄酒( $F^-$ 浓度为 2.0 mg/L)
6	添加量为 1.7 mg/L 的白葡萄酒( $F^-$ 浓度为 2.3 mg/L)
7	无添加的红葡萄酒( $F^-$ 浓度为 0.2 mg/L)
8	添加量为 0.3 mg/L 的红葡萄酒( $F^-$ 浓度为 0.5 mg/L)
9	添加量为 0.8 mg/L 的红葡萄酒( $F^-$ 浓度为 1.0 mg/L)
10	添加量为 1.1 mg/L 的红葡萄酒( $F^-$ 浓度为 1.3 mg/L)
11	添加量为 2.5 mg/L 的红葡萄酒( $F^-$ 浓度为 2.7 mg/L)
12	添加量为 2.8 mg/L 的红葡萄酒( $F^-$ 浓度为 3.0 mg/L)

#### A.4 结果

表 A.1 列出了 12 个参与实验室得到的结果,无实验室报告在实验过程中出现困难。使



用 Cochran's 检验法得知其中一个实验室的一个 Youden 组出现离群值,这一离群数据已经在表 1 中用上标(c)做了标示,此数据在实验统计分析中不予以采用。

表 A.1 用氟离子选择电极,采用标准加入法测定葡萄酒中氟化物的实验数据<sup>a</sup>

实验室序号	白葡萄酒						红葡萄酒					
	组 1 <sup>b</sup>		组 2 <sup>b</sup>		组 3 <sup>b</sup>		组 4 <sup>b</sup>		组 5 <sup>b</sup>		组 6 <sup>b</sup>	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.55	0.80	1.33	1.56	1.86	2.24	0.19	0.45	0.89	1.17	2.54	2.77
2	0.52	0.81	1.39	1.64	1.86	2.31	0.19	0.46	0.92	1.20	2.58	2.77
3	0.52	0.81	1.40	1.70	1.92	2.25	0.14	0.42	0.96	1.22	2.64	2.95
4	0.62	0.98	1.48	1.64	1.85	2.14	0.28	0.56	1.00	1.32	2.64	2.72
5	0.48	0.78	1.34	1.64	1.84	2.11	0.12	0.39	0.88	1.16	2.56	2.82
6	0.53	0.84	1.45	1.74	1.97	2.30	0.13	0.43	0.92	1.21	2.66	2.93
7	0.53	0.76	1.27	1.64	1.89	2.06	0.14	0.40	0.88	1.12	2.44	2.83
8	0.57	0.88	1.51	1.85	2.11	2.33	0.48 <sup>c</sup>	0.48 <sup>c</sup>	1.01	1.32	2.64	3.08
9	0.51	0.81	1.40	1.71	1.90	2.20	0.13	0.42	0.90	1.19	2.60	2.86
10	0.54	0.84	1.43	1.71	1.93	2.22	0.18	0.44	0.96	1.23	2.66	2.87
11	0.60	0.93	1.48	1.75	1.98	2.32	0.25	0.57	1.06	1.31	2.68	2.82
12	0.65	0.94	1.54	1.79	2.05	2.32	0.21	0.52	1.03	1.24	2.81	3.07
试样数量	12	12	12	12	12	12	11	11	12	12	12	12
最小值	0.48	0.76	1.27	1.56	1.84	2.06	0.12	0.39	0.88	1.12	2.44	2.72
最大值	0.65	0.98	1.54	1.85	2.11	2.33	0.28	0.57	1.06	1.32	2.81	3.08
极差	0.17	0.22	0.27	0.29	0.27	0.27	0.16	0.18	0.18	0.20	0.37	0.36
平均值	0.55	0.85	1.42	1.70	1.93	2.23	0.18	0.46	0.95	1.22	2.62	2.87
中位值	0.54	0.83	1.42	1.71	1.91	2.25	0.18	0.44	0.94	1.22	2.64	2.85
标准方差	0.050	0.069	0.079	0.079	0.084	0.091	0.052	0.063	0.061	0.065	0.090	0.114
<sup>a</sup> 单位为 mg F/L。 <sup>b</sup> 尤登对(Youden pairs)。 <sup>c</sup> 经 Cochran 检验后的确认的离群数据,统计分析中不予以采用。												

表 A.2 用氟离子选择电极,以标准加入法测定葡萄酒中氟化物的实验数据的统计分析

数据统计	白葡萄酒			红葡萄酒		
	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6
实验室数量	12	12	12	11 <sup>a</sup>	12	12
每间实验室的重复测定次数	2	2	2	2	2	2
平均数	0.55 0.85	1.42 1.70	1.93 2.23	0.18 0.46	0.95 1.22	2.62 2.87
重复性方差	0.000 6	0.001 5	0.002 6	0.000 2	0.000 5	0.004 9
重复性标准偏差	0.023 5	0.038 2	0.510 6	0.015 6	0.021 1	0.070 3
重复性相对标准偏差 RSD <sub>r</sub>	3.35%	2.45%	2.45%	4.88%	1.94%	2.55%
重现性方差	0.003 9	0.007 0	0.008 9	0.003 4	0.004 2	0.013 0
重现性标准偏差	0.062 5	0.083 5	0.094 5	0.058 7	0.064 7	0.114 1
重现性相对标准偏差 RSD <sub>R</sub>	8.92%	5.36%	4.54%	18.39%	5.95%	4.15%
使用 Horwitz 方程得出的 RSD <sub>R</sub>	16.88	14.97	14.33	19.00	15.80	13.74
HORRAT 值 HoR (RSD <sub>R</sub> 测量值)/RSD <sub>R</sub> (Horwitz 方程计算值)	0.53	0.36	0.32	0.97	0.38	0.30
平均回收率/%	93.1	94.6	96.7	91.0	94.4	96.4
<sup>a</sup> 通过 Cochran's 检验后一个实验室的数据被排除。						

## 参 考 文 献

- [1] AOAC International, AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual On Development, Study, Review, and Approval Process, 1997.
- [2] Postel, W. ; Prasz, E. , Wein-Wissenschaft, (1975)30(6), 320-326.
- [3] Office International de la Vigne et du Vin, Compendium of International Methods of Wine Analysis, 255-257.
- [4] Gil Armentia, J. M. ; Arranz, J. F. ; Barrio, R. J. ; Arranz, A. , Anales de Bromatologia, (1988)40(1)71-77.
- [5] Gran, G; Analyst(1952)77, 661.
- [6] Corning fluoride ion selective electrode-Instruction Manual, 1994.
- [7] Corning Instruction Manual pH/ion analyzer 455, 109121-1 Rev. A, 11/96.
- [8] Horwitz, W. ; Albert, R. ; Journal of the Association of Official Analytical Chemists, (1991)74(5)718.



## 总 磷

### 1 方法原理

经硝酸氧化和灰化后,灰分溶解于盐酸中,磷酸与钒钼酸反应生成黄色的络合物,使用比色法测定磷酸的含量。

### 2 仪器

- 2.1 100℃的水浴锅。
- 2.2 电热板。
- 2.3 可控温电炉。
- 2.4 分光光度计(波长范围 300 nm~700 nm)。

### 3 试剂

- 3.1 硝酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.39 \text{ g/mL}$ )。
- 3.2 盐酸(约 3 mol/L):浓盐酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.15 \text{ g/mL} \sim 1.18 \text{ g/mL}$ )用蒸馏水稀释 4 倍。
- 3.3 钒钼酸试剂:

溶液 A:将 40 g 的钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 溶解于 400 mL 水中。

溶液 B:溶解 1 g 钒酸铵( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ )于 300 mL 水和 200 mL 硝酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.39 \text{ g/L}$ )混合液中(3.1),静置,自然冷却。

钒钼酸试剂:在 1 L 容量瓶中依次加入溶液 B 和溶液 A,再定容至 1 L。此试剂制备后 8 d 内使用。

- 3.4 五氧化二磷溶液(0.1 g/L):将 2.454 g 磷酸氢二钾( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )溶解于 1 L 水中,制备浓度为 1 g/L 的五氧化二磷溶液,稀释 10 倍备用。

### 4 步骤

#### 4.1 灰化

将 5 mL\* 葡萄酒或葡萄汁置于铂金或石英蒸发皿中,在水浴锅(2.1)内蒸干。当残余物近干时,加 1 mL 硝酸(3.1),将蒸发皿放置于加热板(2.2)上,加热 1 h 后,转移至 600℃~650℃的电炉中,直至灰分变为白色。

#### 4.2 测定

向灰分中加入约 3 mol/L 的盐酸(3.2)5 mL,然后将溶液转移到 100 mL 的容量瓶中,用 50 mL 蒸馏水洗涤蒸发皿,并将洗液合并到容量瓶中。准确加入 25 mL 钒钼酸试剂。摇匀,放置 15 min~20 min 使其逐渐显色。在 400 nm 波长下测量吸光度。

\* 磷的含量在 100 mg/L~500 mg/L 时取 5 mL 样品进行检测较为合适,不在上述范围需要增加或减少样品取样量。

同时,准备标准溶液。在 5 个 100 mL 容量瓶中各加入 5 mL,10 mL,15 mL,20 mL,25 mL 0.1g/L 的五氧化二磷溶液,加入蒸馏水至 50 mL,然后加入 25 mL 钒钼酸反应剂和样品放置相同的时间,使之显色。用蒸馏水定容至刻度,在 400 nm 波长下测量吸光度。

为了使吸光度保持在最佳吸收区域,不要用蒸馏水做空白调零,但需要控制分光光度计电流计在指定吸收波长下所测定浓度的误差。

## 5 结果表达

总磷含量用每升酒液中含磷酸酐( $P_2O_5$ )的毫克数计,根据试样吸光度在标准曲线上查得总磷含量,结果保留至整数。

## 参 考 文 献

- [1] A. F. N. O. R. ,Norme U,42-246, Tour Europe,Paris.
- [2] Sudraud P. ,Bull. O. I. V. ,1969,46-2463,933.



## 硫化物(重量法)

### 1 方法原理

采用重量法测定硫酸钡沉淀以测定硫酸盐的含量。磷酸钡可通过盐酸洗涤  $\text{BaSO}_4$  沉淀而除去。

当葡萄汁或葡萄酒富含二氧化硫时,建议预先在隔绝空气的情况下加热进行脱硫。

### 2 方法

#### 2.1 试剂

2.1.1 2 mol/L 的盐酸溶液。

2.1.2 200 g/L 的氯化钡( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )溶液。

#### 2.2 步骤

##### 2.2.1 步骤

向 50 mL 离心管中加入 40 mL 待测试样,再加 2 mL 2 mol/L 的盐酸(2.1.1)和 2 mL 200 g/L 的氯化钡溶液。用玻璃棒搅拌,用少量蒸馏水冲洗玻璃棒,静置 5 min。离心 5 min 后,小心倒出上层澄清液。

按下述步骤洗涤硫酸钡沉淀:加入 10 mL 2 mol/L 的盐酸,使沉淀成悬浮状,离心 5 min,然后小心倒出上层澄清液,按照以上步骤洗涤沉淀,每次用 15 mL 蒸馏水,洗涤两次。

用蒸馏水将沉淀物全部冲洗入一个预先称重的铂蒸发皿中,置于 100°C 水浴中蒸干。干燥的沉淀物在火焰上反复短暂灼烧,直到获得白色的残留物。在干燥器中进行冷却后称重,所得硫酸钡的质量为  $m$ (以 mg 计)。

##### 2.2.2 特殊情况

含有高浓度二氧化硫的葡萄汁和葡萄酒。

脱二氧化硫。

量取 25 mL 水和 1 mL 浓盐酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.15 \text{ g/mL} \sim 1.18 \text{ g/mL}$ )加入到 500 mL 配备有滴液漏斗和排气管的锥形瓶中。将此溶液煮沸以去除空气,再从滴液漏斗加入 100 mL 葡萄酒,保持沸腾直到瓶中的液体体积减少到约 75 mL,待冷却后,等量转移到 100 mL 容量瓶中。用水定容至刻度线。如 2.2.1 所述,测定 40 mL 试样中硫酸盐含量。

### 2.3 结果表示

#### 2.3.1 计算

硫酸盐含量,以每升酒液中含硫酸钾( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )的毫克数计,由以下公式算出:

$$18.67 \times m$$

最终结果保留至整数。

#### 2.3.2 重复性( $r$ )

含量小于 1 000 mg/L: $r = 27 \text{ mg/L}$

含量接近 1 500 mg/L:  $r=41$  mg/L。

### 2.3.3 重现性( $R$ )

含量小于 1 000 mg/L:  $R=51$  mg/L。

含量接近 1 500 mg/L:  $R=81$  mg/L。

## 参 考 文 献

- [1] DEIBNER L., BÉNARD P., Ind. alim. agric., 1954, 71, n°1, 23; n°5, 427; 1955, 72, n°9-10, 565 et n°11, 673.
- [2] DEIBNER L., Rév. ferm. ind. alim., 1959, 14 n°5, 179 et n°6, 227.
- [3] BLAREZ Ch., Vins et spiritueux, 1908, 149, Maloine éd., Paris.
- [4] DER HEIDE X. von, SCHITTHENNER F., Der Wein, 1922, 320, Vieweg & Sohn Verlag, Braunschweig.
- [5] JAULMES P., Analyse des vins, 1924, 73, Dubois et Poulain, éd., Montpellier; 2e édition, 1951, 112.
- [6] SIMONEAU G., Étude sur les moûts concentrés de raisins, 1946, Thèse pharm., Montpellier, 49.
- [7] RIBÉREAU GAYON J., PEYNAUD E., Analyse et contrôle des vins, 1947, 244, Ch. Béranger éd., Paris-Liège.
- [8] FROLOV-BAGREEV A., AGABALIAN TZ G., Chimie du vin, 1951, 369, Moscou, Laboratoire de chimie de l'État de Würzburg (Allemagne), F. V., O. I. V., 1969, no 321.

## 3.2.2 阳离子

方法 OIV-MA-AS322-01

方法类型Ⅳ

### 铵 离 子

#### 1 原理

通过弱阳离子交换树脂将铵离子保留在交换树脂中,然后用酸性溶液洗脱,洗脱液经过蒸馏后用标准盐酸溶液滴定测定蒸馏液中的铵含量。

#### 2 仪器

##### 2.1 阳离子交换树脂柱

采用一根带有玻璃纤维塞的带玻璃活塞滴定管,内部填充 25 g 弱阳离子交换树脂(如 Amberlite IR50,80 目~100 目)。用 1 mol/L 氢氧化钠溶液和 1 mol/L 盐酸溶液交替冲洗阳离子交换树脂,再用蒸馏水冲洗,直到洗出液中用硝酸银沉淀法检测不出氯离子为止。向玻璃柱中缓慢加入 50 mL 的中性缓冲液,再用蒸馏水冲洗直到磷酸盐开始洗出(可用饱和的乙酸铅溶液检测)。

##### 2.2 蒸馏装置

所用设备可参考有关酒精度 OIV-MA-AS 312-O1A 3.1 的章节。

冷凝物通过延长管收集到一个锥形瓶中,延长管末端要伸到锥形瓶的底部。

也可以使用挥发性酸 OIV-MA-312-02 5.2 中提及的蒸汽蒸馏装置,或其他可用于下述检测试剂纯度的实验设备。

a) 向蒸馏瓶中加入 40 mL~45 mL 30% 的氢氧化钠溶液(V/V)、50 mL 水和 50 mL 浓度为 1 mol/L 的盐酸,蒸馏一半的体积并收集馏出液到已经滴入 5 滴甲基红的 30 mL 浓度为 40 g/L 的硼酸溶液中,再用 0.1 mL 浓度为 0.1 mol/L 盐酸将颜色调整为粉红色。

b) 按步骤 a. 中的方法滴定 10 mL 浓度为 0.05 mol/L 的硫酸铵溶液(即 3.55 g/L 的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ),此过程中指示剂变色所需 0.1 mol/L 盐酸量为 10.0 mL~10.1 mL。

#### 3 试剂

3.1 盐酸溶液,1 mol/L。

3.2 氢氧化钠,1 mol/L。

3.3 冲洗阳离子交换树脂的中性缓冲溶液:

磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	15 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	3.35 g
加水定容到	1 000 mL

并测定 pH 为  $7 \pm 0.2$ 。

3.4 30% (m/m) 氢氧化钠溶液。

3.5 盐酸溶液 0.1 mol/L。



3.6 1%(*m/V*)酚酞溶液,溶剂为96%(*V/V*)的中性乙醇。

3.7 1%(*m/V*)溴甲酚绿:

溴甲酚绿	1 g
溶解于 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液	14 mL
加水定容至	100 mL

3.8 0.2%(*V/V*)甲基红乙醇-水溶液:

甲基红	0.2 g
溶于 95%乙醇	60 mL
加水定容至	100 mL

3.9 硼酸溶液

硼酸	40 g
水定容至	1 000 mL

硼酸通常会含有少量碱性杂质,可加入 5 滴指示剂,再滴加数滴 0.1 mol/L 的盐酸(最多 1 mL)使溶液变为粉红色而除去。

## 4 步骤

取 50 mL 待分析样品于 250 mL 烧杯中。加入体积为( $n \sim 0.5$ )/2 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液, $n$  为滴定 10 mL 酒样中总酸所用的 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液的体积数。保持 1 滴/2 s 的流速,让上述溶液通过阳离子交换柱。洗脱液的 pH 应该在 4~5 之间。再以相同速度用 50 mL 蒸馏水冲洗柱子。

铵离子和其他阳离子保留于柱子中,氨基化合物、寡肽以及几乎所有的氨基酸都在冲洗过程中被洗出。

用 50 mL 1 mol/L 的盐酸洗脱铵离子,并用 50 mL 蒸馏水冲洗\*,洗脱液和冲洗液合并到 1 L 的圆底蒸馏瓶中。

加入一滴 1%(*m/V*)的酚酞和足量的氢氧化钠溶液,保证碱化彻底,在加入过程中要持续地冷却蒸馏瓶。

反应完全后,将蒸馏瓶中液体蒸馏出 1/2 体积于 30 mL 4%(*m/V*)的硼酸中。

以溴甲酚绿或甲基红做指示剂,馏出物用 0.1 mol/L 盐酸滴定,到记录达反应终点时消耗盐酸的体积( $n$ )。

## 5 结果计算

铵( $\text{NH}_4$ )离子含量表示为 mg/L,并四舍五入为整数形式。

铵离子含量(mg/L):

$$36 \times n$$

当葡萄酒中铵离子含量很低时,使用 100 mL 酒样用来测定,这种情况下,铵离子的量为:

$$18 \times n$$

\* 当柱子用于另一次测定时,需用 50 mL 中性缓冲液和水冲洗之后才能够使用。

## 参 考 文 献

- [1] JAULMES P. ,Analyse des vins,1951,220, Montpellier.
- [2] KOURAKOU Mme S. ,Ann. Fals. Exp. Chim. ,1960,53,337.

## 钾(AAS法)

### 1 原理

酒样经稀释后加入离子化抑制剂氯化铯,然后通过原子吸收分光光度计直接测定。

### 2 方法

#### 2.1 仪器

带有空气-乙炔燃烧器的原子吸收分光光度计,钾空心阴极灯。

#### 2.2 试剂

##### 2.2.1 1 g/L 钾溶液

使用商品化的钾标准溶液,1 g/L。也可以自行配制,将 4.813 g 酒石酸钾( $C_4H_5KO_6$ )溶于蒸馏水中,再定容至 1 L。

##### 2.2.2 模拟液

柠檬酸	3.5 g
蔗糖	1.5 g
甘油	5.0 g
无水氯化钙( $CaCl_2$ )	50 mg
无水氯化镁( $MgCl_2$ )	50 mg
无水乙醇	50 mL
加水至	500 mL

##### 2.2.3 氯化铯溶液,含铯 5%

将 6.33 g 氯化铯( $CsCl$ )溶于 100 mL 蒸馏水中。

### 2.3 操作方法

#### 2.3.1 样品准备

移取 2.5 mL 葡萄酒(预先稀释为 10%),置于 50 mL 容量瓶中,加 1 mL 氯化铯溶液,加蒸馏水至刻度处。

#### 2.3.2 校准曲线

准备 5 个 100 mL 容量瓶,在每个容量瓶中加 5.0 mL 模拟溶液,向各个容量瓶中分别加 0 mL,2.0 mL,4.0 mL,6.0 mL 和 8.0 mL 钾溶液(1 g/L 预先稀释成 1/10),向各容量瓶加 2 mL 氯化铯溶液,再加蒸馏水定容至 100 mL。

上述制备好的校准溶液每升分别含钾 0 mg,2 mg,4 mg,6 mg 和 8 mg,每升含铯 1 g。这些溶液都保存在聚乙烯烧瓶中。

#### 2.3.3 测定

选定波长 769.9 nm,用含钾 0 g/L 的模拟溶液(2.3.2)对吸光度进行调零,直接将稀释过的葡萄酒(2.3.1)吸入光谱仪,然后依次吸入校准溶液(2.3.2),分别测定吸光度,并记录吸光度数值。重复测量。



## 2.4 结果表示

### 2.4.1 计算方法

绘制吸光度的变化与标准溶液中钾浓度的关系曲线。

根据稀释葡萄酒试样吸光度的平均值,从曲线上查出对应的钾含量,确定每升葡萄酒中钾的浓度  $c(\text{mg/L})$ ,结果保留至整数。

钾浓度  $(\text{mg/L})$ :  $F \times c$

其中,  $F$  为稀释倍数(此处为 200)。

### 2.4.2 重复性( $r$ )

$r = 35 \text{ mg/L}$

### 2.4.3 重现性( $R$ )

$R = 66 \text{ mg/L}$

### 2.4.4 结果的其他表示方式

——以  $\text{mEq/L}$  计:  $0.0256 \times F \times c$

——以酒石酸氢钾  $(\text{mg/L})$  计:  $4.813 \times F \times c$

## 钾(火焰光度法)

### 1 原理

酒样稀释后直接用火焰原子吸收法进行测定。

注:重量分析法测定从葡萄酒灰分溶液中沉淀得到的四苯基硼酸钾是测定钾的精确的方法,附录中有具体的描述。

### 2 方法

#### 2.1 仪器

火焰光度计,使用空气-丁烷混合气。

#### 2.2 试剂

##### 2.2.1 参比溶液(钾浓度为 100 mg/L):

无水乙醇	10 mL
柠檬酸 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	700 mg
蔗糖	300 mg
甘油	1 000 mg
氯化钠 NaCl	50.8 mg
无水氯化钙 $CaCl_2$	10 mg
无水酒石酸氢钾	481.3 mg
加水至	1 000 mL

先用 500 mL 热的蒸馏水溶解无水酒石酸氢钾,其他试剂用 400 mL 蒸馏水溶解,混合两种溶液并定容至 1 L。

##### 2.2.2 稀释溶液:

无水乙醇	10 mL
柠檬酸	700 mg
蔗糖	300 mg
甘油	1 000 mg
氯化钠 NaCl	50.8 mg
无水氯化钙 $CaCl_2$	10 mg
无水氯化镁 $MgCl_2$	10 mg
酒石酸	383 mg
加水至	1 000 mL

向以上这些溶液中加入 2 滴丙烯基异硫氰酸酯( $CH_2=CHCH_2NCS$ ),保存在聚乙烯制的试剂瓶内。

#### 2.3 操作方法

##### 2.3.1 标准溶液

在一系列 100 mL 容量瓶中,分别加入 25 mL,50 mL,75 mL,100 mL 参比溶液,再用稀



释溶液将容量瓶中的液体分别定容至 100 mL。分别得到含钾 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L 的溶液。

### 2.3.2 定量

在 776 nm 波长下进行测定。用蒸馏水调整至 100% 透过率。依次将各个标准溶液直接吸入光度计, 最后将用蒸馏水稀释成 1/10 的葡萄酒吸入光度计测量, 记录吸光值。必要时, 用稀释溶液将(2.2.2)已稀释成 1/10 的葡萄酒再次进行稀释。

## 2.4 结果表示

### 2.4.1 计算方法

绘制透过率与标准溶液中钾浓度关系的变化曲线, 根据试样的透过率, 由曲线查出稀释葡萄酒试样中钾的浓度  $c$ 。

原酒样中钾的浓度(mg/L)由以下公式计算, 结果保留至整数:

$$c(K^+) = c \times F$$

其中,  $F$  为稀释倍数。

### 2.4.2 重复性( $r$ )

$$r = 17 \text{ mg/L}$$

### 2.4.3 再现性( $R$ )

$$R = 66 \text{ mg/L}$$

### 2.4.4 结果的其他表示方式

——以 mEq/L 计:  $0.0256 \times F \times c$ ;

——以酒石酸氢钾(mg/L)计:  $4.813 \times F \times c$ 。

## 钠(AAS法)

### 1 实验原理

原子吸收光谱法直接测定葡萄酒中钠的含量,测定前加入氯化铯抑制钠发生电离化。

### 2 实验方法

#### 2.1 仪器

- 原子吸收光谱仪:空气-乙炔焰;
- 钠空心阴极灯。

#### 2.2 试剂

2.2.1 钠标准溶液,1 g/L:推荐使用商品化的1 g/L的钠标准溶液,或者自行配制。将2.542 g无水氯化钠溶于蒸馏水中,定容至1 L,标准液保存在聚乙烯瓶中。

2.2.2 模拟液:

柠檬酸 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	3.5 g
蔗糖	1.5 g
甘油	5.0 g
无水氯化钙 $CaCl_2$	50 mg
无水氯化镁 $MgCl_2$	50 mg
无水乙醇	50 mL
加去离子水定容至	500 mL

2.2.3 氯化铯溶液(铯含量5%):6.330 g氯化铯  $CsCl$  溶于蒸馏水中并定容至100 mL。

#### 2.3 实验过程

##### 2.3.1 样品前处理

移取2.5 mL葡萄酒至50 mL容量瓶中,加入1 mL氯化铯溶液(2.2.3),用蒸馏水定容至刻度线。

##### 2.3.2 标准曲线

准备5个装有5 mL模拟液的容量瓶,依次加入0 mL,2.5 mL,5.0 mL,7.5 mL和10.0 mL稀释100倍的1 g/L的钠标准液(2.2.1),加入2 mL氯化铯溶液,加蒸馏水定容至100 mL刻度。

此标准液浓度为0 mg/L,0.25 mg/L,0.5 mg/L,0.75 mg/L,1.00 mg/L,每升含Cs 1 g,保存于聚乙烯瓶中。

##### 2.3.3 测定

在589.0 nm的波长下,用空白液调零,测定各浓度的标准溶液以及葡萄酒制备样,并记录吸光度,平行测试两次。



## 2.4 结果计算

### 2.4.1 计算方法:

绘制吸光度和标准液中钠浓度的标准曲线。

根据样品的吸光度的平均值,在标准曲线上查出钠的含量  $c$ (mg/L)。

原酒样中钠的含量: $F \times c$ ,  $F$  为稀释倍数,结果保留至整数。

2.4.2 重复性( $r$ ): $r=1+0.24x_i$  mg/L,  $x_i$ :样品中钠的含量,单位为 mg/L。

2.4.3 再现性( $R$ ): $R=2.5+0.05x_i$  mg/L,  $x_i$ :样品中钠的含量,单位为 mg/L。



## 钠(火焰光度法)

### 1 原理

火焰分光光度计法直接测定稀释(至少 1 : 10)酒样中的钠的含量。

### 2 方法

#### 2.1 仪器

以空气-丁烷混合气为燃料的火焰光度计。

#### 2.2 试剂

##### 2.2.1 含钠 20 mg/L 的参比溶液:

无水乙醇	10 mL
柠檬酸( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ )	700 mg
蔗糖	300 mg
甘油	1 000 mg
酒石酸氢钾	481.3 mg
无水氯化钙( $CaCl_2$ )	10 mg
无水氯化镁( $MgCl_2$ )	10 mg
干燥氯化钠( $NaCl$ )	50.84 mg
加水定容至	1 000 mL

##### 2.2.2 稀释溶液:

无水乙醇	10 mL
柠檬酸( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ )	700 mg
蔗糖	300 mg
甘油	1 000 mg
酒石酸氢钾	481.3 mg
无水氯化钙( $CaCl_2$ )	10 mg
无水氯化镁( $MgCl_2$ )	10 mg
加水定容至	1 000 mL

2.2.1 和 2.2.2 所述溶液的配制:将酒石酸氢钾溶于约 500 mL 热的蒸馏水中,其他试剂用 400 mL 蒸馏水溶解,混合两份溶液,再加水定容至 1 L。

以上这些溶液中加入 2 滴丙烯基异氰酸酯,保存在聚乙烯瓶内。

### 2.3 步骤

#### 2.3.1 校准

准备 5 个 100 mL 容量瓶,向各个容量瓶中分别加 5 mL,10 mL,15 mL,20 mL 和 25 mL 参比溶液,用稀释溶液定容至 100 mL。每升标准溶液中分别含钠 1 mg,2 mg,3 mg,4 mg 和 5 mg。

#### 2.3.2 测定

在 589 nm 波长下进行测定。用蒸馏水调至 100% 透过率。将各个标准溶液依次吸入



火焰分光光度计进行测定,然后测定蒸馏水稀释成 1/10 的葡萄酒,记录透过率。必要时,已经稀释的葡萄酒可以用稀释溶液再作进一步稀释。

## 2.4 结果表示

### 2.4.1 计算方法

绘制透过率与标准溶液中钠浓度变化的曲线。根据测试稀释葡萄酒试样得出的透过率,在该条曲线上查出钠的浓度  $c$ 。以 mg/L 表示的钠的浓度为:

$$c \times F$$

其中, $F$  为稀释倍数。

### 2.4.2 重复性( $r$ )

$$r=1.4 \text{ mg/L(葡萄利口酒除外)}$$

$$r=2.0 \text{ mg/L(葡萄利口酒)}$$

### 2.4.3 再现性( $R$ )

$$R=4.7+0.08x_i$$

其中, $x_i$  为试样中的钠的质量浓度,mg/L。

## 钙(AAS法)

### 1 原理

酒样稀释后加入离子化抑制剂,直接使用原子吸收分光光度计测定钙的含量。

### 2 仪器

2.1 带有空气-乙炔燃烧器的原子吸收分光光度计。

2.2 钙空心阴极灯。

### 3 试剂

3.1 钙标准溶液 1 g/L:推荐使用商品化的 1 g/L 钙标准溶液。也可以自行配制,将 2.5 g 碳酸钙  $\text{CaCO}_3$  溶于足量的(浓盐酸稀释至 1/10)盐酸中,碳酸钙完全溶解后用蒸馏水定容至 1 L。

3.2 稀释的钙标准溶液,50 mg/L。

注:将钙标准溶液保存在聚乙烯瓶内。

3.3 经稀释的氯化镧溶液,含镧 50 g/L。

将 13.369 g 氯化镧( $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )溶于蒸馏水中,加 1 mL 稀盐酸(浓盐酸稀释至 1/10),再加蒸馏水至 100 mL。

### 4 操作方法

#### 4.1 试样准备

在 20 mL 容量瓶中,加入 1 mL 葡萄酒,2 mL 氯化镧溶液(3.3),加蒸馏水至刻度处,此时稀释后的酒样中镧的浓度为 5 g/L。

注:如为甜葡萄酒,由于稀释后糖含量低于 2.5 g/L,5 g/L 的镧浓度已足够,但是对于含糖量更高的葡萄酒,则需将镧含量增至 10 g/L。

#### 4.2 标准样品

准备 5 个 100 mL 容量瓶,分别加入 0 mL,5 mL,10 mL,15 mL 和 20 mL 的钙标准溶液(3.2),再向每个容量瓶中加 10 mL 氯化镧溶液(3.3),加蒸馏水至 100 mL。制备的标准溶液分别含钙 0 mg/L,2.5 mg/L,5 mg/L,7.5 mg/L 和 10 mg/L,含镧 5 g/L。将这些溶液保存在聚乙烯瓶中。

#### 4.3 定量

设定吸收波长为 422.7 nm。用钙浓度为 0 g/L 的标准溶液做空白调零。直接将稀释的葡萄酒试样吸入光谱仪,然后依次吸入按 4.2 所制备的 5 个标准溶液,记录各自的吸光度。每个试样做 2 次平行测定。



## 5 结果表示

### 5.1 计算方法

绘制吸光度与标准溶液中钙浓度变化的关系曲线。

按稀释葡萄酒试样测定的吸光度平均值在该曲线上查出钙浓度  $c$ ，钙浓度以 mg/L 表示：

$$20 \times c$$

计算结果保留至整数。

### 5.2 重复性( $r$ )

钙含量  $< 60$  mg/L:  $r = 2.7$  mg/L

钙含量  $> 60$  mg/L:  $r = 4$  mg/L

### 5.3 再现性( $R$ )

$$R(\text{mg/L}) = 0.114x_i - 0.5$$

其中,  $x_i$  为试样中钙的浓度, mg/L。

## 铁(AAS法)

### 1 原理

将葡萄酒适当稀释并脱除酒精后,用原子吸收光谱法直接测定铁含量。

### 2 方法

#### 2.1 仪器

- 2.1.1 旋转蒸发器,带有恒温水浴。
- 2.1.2 原子吸收光谱仪,空气、乙炔燃烧器。
- 2.1.3 铁空心阴极灯。

#### 2.2 试剂

- 2.2.1 铁(三价)标准溶液 1 g/L:使用市售的标准溶液 1 g/L。也可自行制备,将 8.634 1 g 硫酸铁铵 $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ 溶于用 1 mol/L 盐酸轻度酸化的蒸馏水中,加水定容至 1 L。
- 2.2.2 将铁标准溶液稀释至 100 mg/L。

#### 2.3 操作流程

##### 2.3.1 样品制备

用旋转蒸发器(50℃~60℃)使试样的体积浓缩至 1/2,去除葡萄酒中的酒精,再加蒸馏水至原来的体积。必要时,在测定之前再进行稀释。

##### 2.3.2 标准系列

取 5 个 100 mL 容量瓶,分别加入 1 mL,2 mL,3 mL,4 mL 和 5 mL 100 mg/L 的铁溶液(2.2.2),再加蒸馏水定容至 100 mL。这样制备的溶液中分别含铁 1 mg,2 mg,3 mg,4 mg 和 5 mg,将这些溶液保存在聚乙烯瓶中。

##### 2.3.3 测定

选定波长 248.3 nm,用蒸馏水做吸光度空白调零。直接将稀释的试样吸进光谱仪,然后依次吸进 2.3.2 中制备的各标准溶液。读取并记录各自吸光度,每个试样做 2 次测定。

#### 2.4 结果表示

绘制吸光度与各标准溶液中铁含量变化的关系曲线,按照稀释葡萄酒试样所得吸光度平均值在这条曲线上查出铁浓度  $c$ 。

铁浓度(mg/L)计算如下

$$c \times F$$

结果准确保留至 1 位小数,其中  $F$  为稀释倍数。



## 铁(比色法)

### 1 原理

用30%的双氧水消化样品,将总铁(三价铁)还原为二价铁,通过二价铁与邻二氮杂菲生成有色的络合物,通过比色即可以测得样品中铁的含量。

### 2 方法

#### 2.1 仪器

- 2.1.1 100 mL 凯氏烧瓶。
- 2.1.2 可以在波长 508 nm 进行测定的分光光度计。

#### 2.2 试剂

- 2.2.1 浓度为 30% (m/V) 的过氧化氢溶液,不含铁。
- 2.2.2 盐酸溶液 1 mol/L,不含铁。
- 2.2.3 氨水( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 0.92 \text{ g/mL}$ )。
- 2.2.4 用稀释 2 倍的盐酸处理过并经蒸馏水洗涤的浮石颗粒。
- 2.2.5 2.5% 氢醌( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ )溶液,每 100 mL 溶液用 1 mL 硫酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.84 \text{ g/mL}$ )进行酸化处理。此溶液装入棕色瓶置于冰箱中,一旦发现变成轻微的棕色时,即应更换。
- 2.2.6 20% 亚硫酸钠溶液:用中性、无水亚硫酸盐制备。
- 2.2.7 0.5% 邻二氮杂菲( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ )溶液:溶于 96% 酒精。
- 2.2.8 20% (m/V) 醋酸铵( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ )溶液。
- 2.2.9 铁(III)溶液 1 g/L:推荐使用市售的标准溶液。亦可自行制备:将 8.634 1 g 硫酸铁铵 [ $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ]溶于 100 mL 1 mol/L 盐酸溶液中,再用 1 mol/L 盐酸定容至 1 L。
- 2.2.10 铁标准溶液 100 mg/L:1 g/L 铁(III)溶液经过 10 倍稀释。

#### 2.3 操作方法

##### 2.3.1 消化

##### 2.3.1.1 含糖量低于 50 g/L 的葡萄酒

在凯氏烧瓶中加入 25 mL 葡萄酒、10 mL 双氧水和若干颗沸石。加热使液体浓缩直至 2 mL~3 mL。冷却后,向烧瓶中滴加氨水,使之碱化并使氢氧化物沉淀完全,注意勿弄湿烧瓶的内壁。冷却后,小心地向烧瓶中的碱性溶液中加入盐酸溶液以溶解氢氧化物沉淀,将得到的溶液移入 100 mL 容量瓶中,再用盐酸溶液清洗凯氏烧瓶并转移洗液至容量瓶中,定容至 100 mL 刻度。

##### 2.3.1.2 含糖量高于 50 g/L 的葡萄酒或者葡萄汁

——糖含量在 50 g/L~200 g/L 之间时,取 25 mL 葡萄汁或葡萄酒试样用 20 mL 过氧化氢溶液进行消化处理,以后操作同 2.3.1.1。

——糖含量高于 200 g/L 时,葡萄汁或葡萄酒试样应预先稀释 2 倍,甚至 4 倍,再取 25 mL 稀释试样用 20 mL 过氧化氢溶液进行处理,以后操作同 2.3.1.1。

### 2.3.2 空白实验

取 25 mL 蒸馏水代替酒样,加入与消解过程相同体积的过氧化氢,其余过程按照 3.3.1.1 所述的试验程序进行。

### 2.3.3 样品测定

取 20 mL 消解试样和 20 mL“空白试样”,将两者各加入 50 mL 容量瓶中,向每个容量瓶中加 2 mL 氢醌溶液,2 mL 亚硫酸钠溶液和 1 mL 邻二氮杂菲。静置 15 min,使三价铁还原成二价铁。加 10 mL 醋酸铵溶液,加蒸馏水定容至 50 mL,摇匀。在 508 nm 波长下用空白实验所得溶液进行吸光度的调零,测定消解样的吸光度。

### 2.3.4 标准溶液测定

取 4 个 50 mL 容量瓶,分别加入 0.5 mL,1 mL,1.5 mL 和 2 mL 浓度为 100 mg/L 的铁溶液,并加入 20 mL 蒸馏水,继续按 2.3.3 所述操作加入其他试剂,定容,并测定每一标准溶液的吸光度,每瓶标准试样中分别含 50  $\mu\text{g}$ ,100  $\mu\text{g}$ ,150  $\mu\text{g}$ ,200  $\mu\text{g}$  铁。

## 2.4 结果表示

绘制吸光度与标准溶液铁浓度变化的关系曲线。根据吸光度查出盐酸消化液的铁浓度  $c$ ,亦即待分析的酒样 5 mL 中的铁含量。

铁含量为(mg/L):

$$200 \times c$$

结果保留一位小数。

如葡萄酒(或葡萄汁)曾进行过稀释,铁含量为(mg/L):

$$200 \times c \times F$$

结果保留一位小数。

其中, $F$  为稀释倍数。



## 铜(AAS法)

### 1 原理

该方法基于原子吸收光谱法。

### 2 仪器

- 2.1 铂金蒸发皿。
- 2.2 原子吸收光谱仪。
- 2.3 铜空心阴极灯。
- 2.4 燃料气:乙炔-空气或氧化亚氮/乙炔。

### 3 试剂

- 3.1 金属铜。
- 3.2 65%浓硝酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.38 \text{ g/mL}$ )。
- 3.3 硝酸,3.2中硝酸用水稀释2倍。
- 3.4 1 g/L铜溶液:推荐使用市售的铜标准溶液,亦可自行制备:称取1.000 g金属铜,小心转移至1000 mL容量瓶中,加足量的稀硝酸使金属铜溶解,再加10 mL浓硝酸,用双蒸水定容至刻度处。
- 3.5 100 mg/L铜标准溶液:移取10 mL3.4所述溶液于100 mL容量瓶中,加双蒸水定容至,铜浓度为100 mg/L。
- 3.6 双蒸水。

### 4 操作方法

#### 4.1 试样准备及铜含量的测定

取20 mL试样,置于100 mL容量瓶中,加重蒸馏水至刻度处。必要时可以稀释样品,使样品中铜的含量在检测器的动态范围内。

选择波长324.8 nm,用双蒸水做空白调零,读取试样的吸光值。

#### 4.2 建立标准曲线

分别取0.5 mL,1.0 mL和2.0 mL的100 mg/L铜溶液,置于100 mL容量瓶中,加双蒸水至刻度处,所得的溶液每升含铜分别是0.5  $\mu\text{g}$ ,1.0  $\mu\text{g}$ 和2.0  $\mu\text{g}$ 。按4.1所述步骤进行测量,平行测定两次,记录这些溶液的吸光值,建立标准曲线。

### 5 结果表示

按读取的吸光度值,在标准曲线上查出铜浓度 $c$ ,单位mg/L。

设 $F$ 为稀释倍数,则葡萄酒中铜含量应为:

$$F \times c(\text{mg/L})$$

结果保留2位小数。



- 注 1: 建立标准曲线的溶液浓度和对试样进行稀释的倍数应根据仪器的灵敏度和试验中铜浓度来进行选择。
- 注 2: 如试样中铜含量非常低, 可按如下操作方法进行: 将 100 mL 试样置于铂金蒸发皿中, 在 100°C 水浴中蒸发, 直至呈糖浆状, 滴加 2.5 mL 浓硝酸, 使液体覆盖整个蒸发皿底部。小心地将蒸发残液置于电热板上或是在很小的火焰上灼烧灰化, 然后将蒸发皿放进 500°C ± 25°C 的马弗炉, 放置约 1 h。冷却后, 用 1 mL 浓硝酸润湿灰分, 用小玻璃棒压碎灰分, 再次按前述方法进行蒸发和灼烧。再将蒸发皿放入马弗炉 15 min; 重复硝酸处理 3 次。向蒸发皿中加 1 mL 浓硝酸和 2 mL 重蒸馏水, 使灰分溶解, 将溶液倒入 10 mL 容量瓶。用蒸馏水将蒸发皿洗涤 3 次, 每次用 2 mL 水, 洗液倒入容量瓶中, 再加重蒸馏水至刻度处。按 4.1 所述步骤, 用 10 mL 溶液测定铜含量, 计算结果时要将稀释倍数考虑在内。



## 镁(AAS法)

### 1 原理

稀释后的酒样直接进样,通过原子吸收光谱仪测定镁的含量。

### 2 仪器

2.1 配备有空气-乙炔燃烧器的原子吸收分光光度计。

2.2 镁空心阴极灯。

### 3 试剂

3.1 标准溶液 1 g/L,可用市售的镁标准溶液,也可自行制备,将 8.364 6 g 氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )溶于蒸馏水中,再加蒸馏水至 1 L。

3.2 镁标准溶液 5 mg/L,将 3.1 中镁标液适当稀释。

注:将镁标准溶液保存在聚乙烯瓶中。

### 4 操作方法

#### 4.1 试样制备

用蒸馏水将葡萄酒稀释至 1/100。

#### 4.2 校准

在 4 个 100 mL 容量瓶中,分别加入 5 mL,10 mL,15 mL 和 20 mL 稀释后的镁标液(3.2),用蒸馏水补足至 100 mL。这样制备的溶液分别含镁 0.25 mg/L,0.50 mg/L,0.75 mg/L 和 1 mg/L。将这些溶液保存在聚乙烯瓶内。

#### 4.3 测量

选择吸收波长 285 nm。用蒸馏水做空白调零,将稀释葡萄酒直接吸入光谱仪,然后依次吸入按 4.2 所制备的各标准溶液。

读出各吸光度,每个试样测定 2 次。

### 5 结果表示

#### 5.1 计算方法

绘制吸光度与各标准溶液镁含量的关系曲线。

按稀释葡萄酒试样得出的吸光度平均值在标准曲线上查出镁浓度  $c$ (mg/L),酒样中镁含量按照以下公式计算:

$$100 \times c$$

保留至整数。

#### 5.2 重复性( $r$ )

$$r = 3 \text{ mg/L.}$$

#### 5.3 再现性( $R$ )

$$R = 8 \text{ mg/L.}$$

## 锌(AAS法)

### 1 原理

去除酒精的葡萄酒用原子吸收分光光度计直接进样测定锌的含量。

### 2 仪器

- 2.1 旋转蒸发器,恒温水浴。
- 2.2 配备燃烧器的原子吸收分光光度计,以空气-乙炔为燃料。
- 2.3 锌空心阴极灯。

### 3 试剂

重蒸馏水(用硼硅玻璃装置制备)或纯度相当的水。

- 3.1 1 g/L 锌标准溶液:推荐使用市售的锌标准溶液,也可以自己配制,将 4.397 5 g 硫酸锌( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )溶于水,加水定容至 1 L。
- 3.2 稀释的锌标准溶液,100 mg/L。

### 4 操作方法

#### 4.1 样品准备

将 100 mL 葡萄酒置于旋转蒸发器中(温度  $50^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ )浓缩至 1/2 体积,脱去酒精,再加重蒸馏水至原来的体积(100 mL)。

#### 4.2 制作标准溶液

在 4 个 100 mL 容量瓶中,分别加入 0.5 mL,1.0 mL,1.5 mL 和 2.0 mL 100 mg/L 的锌标准溶液,加重蒸馏水至刻度处,这些标准溶液分别含锌 0.5 mg/L,1.0 mg/L,1.5 mg/L 和 2.0 mg/L。

#### 4.3 定量

选定吸收波长 213.9 nm,再用蒸馏水做空白调零,将葡萄酒直接吸入光谱仪,然后依次吸入各标准溶液,读取吸光度,每一试样测定两次。

### 5 结果表示

绘制吸光度与各标准溶液锌浓度变化关系曲线。按葡萄酒试样的吸光度平均值查出每升葡萄酒含锌的毫克数,结果保留 1 位小数。



## 银(AAS法)

### 1 方法原理

将样品消化处理后使用原子吸收分光光度法测定。

### 2 仪器

- 2.1 铂金蒸发皿。
- 2.2 100℃恒温水浴。
- 2.3 温度可调至 500℃~525℃的马弗炉。
- 2.4 原子吸收分光光度计。
- 2.5 银空心阴极灯。
- 2.6 燃气:空气-乙炔。

### 3 试剂

- 3.1 硝酸银  $\text{AgNO}_3$ 。
- 3.2 浓硝酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.38 \text{ g/mL}$ ), 65%。
- 3.3 蒸馏水稀释 10 倍的稀硝酸。
- 3.4 1 g/L 的银溶液:推荐使用市售的银标准溶液,也可以自己配制,将 1.575 0 g 硝酸银溶于稀硝酸中,用稀硝酸定容至 1 000 mL。
- 3.5 10 mg/L 银溶液:移取 10 mL 3.4 所述溶液用稀硝酸稀释至 1 000 mL。

### 4 操作方法

#### 4.1 试样制备和银含量测定

将 20 mL 试样置于铂金蒸发皿中,在 100℃水浴中蒸干。在马弗炉中 500℃~525℃进行灰化处理。用 1 mL 浓硝酸润湿灰分,在 100℃水浴上蒸发,再加 1 mL 硝酸,再蒸发,加 5 mL 稀释硝酸,稍微加热,直至溶解。

#### 4.2 标准曲线制作

在 5 个 100 mL 容量瓶中,分别加入 3.5 所述 10 mg/L 银溶液 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL, 10 mL 和 20 mL,再加稀硝酸至刻度处。这些溶液分别含银 0.20 mg/L, 0.40 mg/L, 0.60 mg/L, 0.80 mg/L, 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L。

4.3 选择吸收波长为 328.1 nm,用双蒸水对仪器进行调零,测量标准溶液和样品液的吸光度并重复测量一次。

### 5 结果表示

根据标准液中银元素的浓度和吸光度的关系绘制标准曲线,在标准曲线上根据样品液

的吸光度得出银的浓度  $c$ , 以 mg/L 表示。

$$0.25 \times c$$

结果保留 2 位小数。

注: 为建立标准曲线用的各标准溶液选取适当浓度, 所取试样的量以及液体的最终体积都要根据所用光谱仪的灵敏度来确定。



## 镉(AAS法)

### 1 方法原理

用石墨炉原子吸收分光光度法直接测定镉的含量。

### 2 仪器

所用玻璃器皿都要使用浓硝酸在 70℃~80℃ 洗涤,然后使用重蒸馏水进行冲洗。

- 2.1 原子吸收分光光度计配备有石墨炉,背景校正和记录仪。
- 2.2 镉空心阴极灯。
- 2.3 5 μL 微量移液器,配有原子吸收光谱测量专用针头。

### 3 试剂

制出的重蒸馏水(硼硅玻璃装置制备)或纯度相当的水。所用试剂均为分析纯级,尤其不能含有镉。

- 3.1 浓磷酸:85%( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.71 \text{ g/mL}$ )。
- 3.2 稀磷酸:取 8 mL 磷酸加水至 100 mL 制备而成。
- 3.3 EDTA 溶液:0.02 mol/L。
- 3.4 pH=9 的缓冲溶液:制备缓冲液,在 100 mL 容量瓶中,先将 5.4 g 氯化铵溶解于几毫升水中,加入 35 mL 体积分数为 25% 的氨水溶液,即得到所需缓冲液。密度  $\rho_{20^\circ\text{C}} = 0.92 \text{ g/mL}$  的氨水,稀释至体积分数为 25% 再加水到 100 mL。
- 3.5 铬黑 T 指示剂:1% ( $m/m$ ) 的氯化钠溶液。
- 3.6 硫酸镉:硫酸镉标定方法:准确称取 102.6 mg 硫酸镉到烧杯中,加水溶解;加入 5 mL pH9 的缓冲溶液和约 20 mg 的铬黑 T,使用 3.3 配置的 EDTA 溶液滴定直到指示剂变为蓝色。准确加入 20 mL EDTA 溶液,如果有少许差异,对制备标准溶液所需的硫酸镉质量进行相应调整。
- 3.7 1 g/L 镉参比溶液:首选使用市售的标准溶液,也可自行制备,方法如下所示:将 2.282 0 g 硫酸镉溶解至水中,然后定容到 1 L。将此溶液保存在具磨口塞的硼硅玻璃瓶中。

### 4 操作方法

#### 4.1 样品准备

使用如 3.2 所示的磷酸溶液将葡萄酒稀释为 1/2(V/V)。

#### 4.2 标准溶液的制备

将镉标准溶液稀释,配置为浓度 2.5 μg/L, 5 μg/L, 10 μg/L 和 15 μg/L 的标准溶液。

### 4.3 测定

#### 4.3.1 石墨炉测定条件(仅供参考)

100℃干燥 30 s;

900℃灰化 20 s;

2 250℃原子化 2 s~3 s。

氮气流量(吹扫气)6 L/min。

注意事项:操作结束后,将温度调至 2 700℃清除炉内杂质。

#### 4.3.2 原子吸收测量值

选择 228.8 nm 的吸收波长,用二次蒸馏水作为空白进行调零。用微量移液器取 5  $\mu$ L 样品或标准溶液注入石墨炉内,每个样品或标准溶液进行三次平行测定,记录吸收测量值并计算三次平行测试的平均值。

## 5 结果表示

绘制吸光度随标准溶液中铬含量变化的关系曲线。按样品溶液吸光度的平均值在标准曲线中可以得到镉含量  $c$ ,此时葡萄酒中镉含量为  $2 \times c$ ,单位 mg/L。

## 参 考 文 献

- [1] MEDINA B., Application de la spectrométrie d'absorption atomique sans flamme au dosage de quelques métaux dans les vins, Thèse Doct. en onologie, Bordeaux II, 1978.
- [2] MEDINA B. and SUDRAUD P., FV O. I. V 1979, n° 695



## 铅(标准方法)

### 1 方法标准定义

准确性是指检测结果得到的一系列测试的平均值和参考值的一致程度。

$r$ ——重复性限值,指在重复性条件下(相同样品,相同操作者,相同仪器,相同实验室与很短的时间间隔)单独测试两个平行样而得到的 2 个结果的绝对误差在某一概率(通常为 95%)内低于该数值,表达式为  $r=2.8 \times S_r$ 。

$S_r$ ——重复性标准偏差,由在重复性实验条件下测定的平行结果计算得到。

$RSD_r$ ——相对重复性标准偏差,由相同实验条件下产生的结果获得  $[(S_r/\bar{x}) \times 100]$ 。 $\bar{x}$  是所有实验室和平行样测定值的平均值。

$R$ ——再现性限指在再现性实验条件下(例如,不同实验室操作人员制备的相同材料,使用标准化的测试方法)单独测试得到结果之间的误差在某一概率(通常为 95%)内低于该数值,  $R=2.8 \times S_R$ 。

$S_R$ ——再现性标准偏差,由再现条件下产生的结果获得。

$RSD_R$ ——相对再现性标准偏差,由重现实验条件下产生的结果获得  $[(S_R/\bar{x}) \times 100]$ 。

HoR——HORRAT 值,由 Horwitz 公式得出的  $RSD_R$  值除以测试得到的  $RSD_R$  值计算所得。

### 2 实验室分析方法与实验室控制管理要求

#### 2.1 要求

葡萄酒中含铅量的测定仍未有明确法定方法。实验室将采用经过 OIV 批准的实验方法(II 型),该方法应该满足表 1 中所列的各项实验性能指标,例如可采用 GFAA 或 ICP-MS 方法,因其可满足表 1 中所列的各项实验指标。只要有可能,在确认实验的过程中应在协同实验测试的样品中加入一份经认可的标准样品,如果没有标准物质,应该采用正确度评估来代替。附录中例 1 和例 2 列举了葡萄酒中含铅量测定的方法。

#### 2.2 总则

所有与样品接触的器皿应使用惰性的材料(例如,聚丙烯,聚四氟乙烯 PTFE,等)。不建议使用陶瓷材料,因为其中可能含有铅。如不确定使用的材料中是否含有待测物质,则应该使用各种随机性测试方法来确定该材料能否使用,该步骤应该属于对分析方法评估确认的重要一环。所有塑料制品,包括样品容器应使用酸洗。如条件允许,用于样品处理的器皿应为铅检测专用。

表 1 葡萄酒中铅含量测试方法之评判准则

参数	评价
适用性	适用于法定葡萄酒中含铅量的检测
检出限	不能高于 OIV 限量值(以 $\mu\text{g/L}$ 计)的 10%



表 1(续)

参数	评价
定量限	不能高于 OIV 限量值(以 $\mu\text{g/L}$ 计)的 20%。当铅的含量小于 $100\mu\text{g/L}$ , 定量限不能高于 OIV 规定的 40%
精密度	在协作实验试验验证中 HORRAT 值应小于或等于 2
回收率	80%~105% (如协作研究所示)
特异性	不受基质和光谱影响
精密度	$ \bar{x} - m  < 1.96 \times \sqrt{S_{R(lab)}^2 - S_{r(lab)}^2 \times (1 - 1/n)}$ $m$ 代表葡萄酒标准物质中铅的含量; $\bar{x}$ 代表同一实验室内 $n$ 次测定葡萄酒铅含量的平均值; $S_{R(lab)}$ 和 $S_{r(lab)}$ 是标准偏差, 分别由在同一个实验室内再现性条件和重复性条件下由所有测定结果计算而得

### 2.3 实验可靠性的评价和回收率计算

如果条件允许,应该在实验过程中测定合适的标准样以对实验结果的准确性进行评价。实验者应该适当留意由 IUPAC/ISO/AOAC 资助发布的“分析测量中回收率使用指南”,实验回收率接近 100% 时,回收率的计算结果对实验的准确性的影响很小。



## 例 1 原子吸收光谱法测定葡萄酒中的铅

### 1 应用范围和领域

此方法可用于红葡萄酒、白葡萄酒、无泡葡萄酒、起泡酒与强化酒。

### 2 定义

酒样中的铅含量:此方法测定的铅含量单位为 mg/L。

### 3 原理

使用基质匹配混合物稀释酒样,然后直接使用石墨炉原子吸收光谱仪(GFAAS)测量铅含量。在酒样和铅校准标准溶液中加入与测试酒样基质匹配混合液,该基质匹配混合液中同时包含了 GFAAS 的基质改进剂和酒样的模拟化合物。其作用是改进基质使标准液和样品在石墨炉原子化过程中获得相同的吸光度峰值-时间曲线图。

等温原子化技术是必须的。例如:L'vov 平台(石墨平台)。

为了适用于特定的石墨炉原子吸收光谱仪,可能需要精确调整稀释液的成分。在采用此方法之前,应进行实验以检测标准溶液与样品的吸光度-时间曲线图并根据此对稀释液进行必要调整。所使用的仪器在原子化时必须具备监控吸光度-时间的功能。标准和样品的吸收谱图应表现一致,铅原子化峰应高于背景的无特征吸收值,以达到高效背景校正的目的。例 2 提供了相关曲线图。

### 4 试剂

应使用高质量的不含铅的化学试剂和去离子蒸馏水或与之纯度相当的水。除非有特别要求,所有的试剂应当现用现配。

#### 4.1 稀释溶液

注:实验采用的稀释液可能需要对成分进行精确的调整以适于特定的石墨炉模型。若推荐的改良剂的成分存在问题,则需调整磷和氮的含量,以获取:

- a) 在最佳灰化温度下获得稳定的元素信号;
- b) 能够产生单一可再现且与背景信号可以良好分离的待分析物信号峰值的原子化过程。

配备 VDU 设备的仪器使得分析者可以确认样品与背景峰的时间分离(见附录)。以下是一个测定吸光度-时间曲线图的方法的例子:

测量样品峰的峰高一一半的峰宽(半峰宽)(FWHM)并与拥有相似最大吸光度的校准品产生的半峰宽 FWHM 比较。若峰的差别明显可见,则需调整基体修正改良剂的成分。

以下列举的稀释液可用于:

- a) PE 3030 型,配有氘灯背景校正器和 HGA 500 石墨炉;
- b) 热电 12E 型;配备了 Smith-Hieftje 背景校正装置,CTF 188 炉和 FASTAC 样品沉积系统。

#### 4.1.1 3030 分光光度仪用稀释液

将 187 g 水添加到 250 mL 塑料瓶中,再加入 11 g 乙醇,1.1 g 葡萄糖,1.1 g 果糖和 0.28 g 氯化钠,震荡使固体溶解。然后加入 22 mL 硝酸和 4.4 g 磷酸二氢铵。震荡直到所有的磷酸盐溶解。最后加入 0.88 g 硝酸镁并震荡至所有固体溶解。

#### 4.1.2 热电 12E 型使用稀释液

其他试剂种类和操作同上,但需添加 0.66 g 磷酸二氢铵和 0.44 g 硝酸镁。

4.1.3 纯乙醇。

4.1.4 D-葡萄糖。

4.1.5 D(-)果糖。

4.1.6 氯化钠。

4.1.7 浓硝酸。

4.1.8 磷酸二氢铵。

4.1.9 六水合硝酸镁。

#### 4.2 10%(V/V)乙醇

向 250 mL 的塑料瓶中加入 180 mL 水,并使用移液管加入 20 mL 纯乙醇,混合摇匀。

#### 4.3 铅标准溶液

4.3.1 铅标准溶液(1 000 mg/L)。

4.3.2 铅标准溶液(10.00 mg/L)。用移液管将 1.00 mL 铅标准溶液加入到 100 mL 容量瓶中,用水稀释定容并混合均匀。

注:使用前需检查移液管校准刻度。

4.3.3 铅工作标准液(1.00 mg/L):用巴斯德吸管取 10.00 mL 的铅储备液(4.3.2)于 100 mL 容量瓶中。用水冲洗容量瓶内颈,加入 1 mL 硝酸定容,摇匀。

4.3.4 铅校正溶液:使用通用容器配置浓度从 0  $\mu\text{g/L}$ ~50  $\mu\text{g/L}$  的 8 个校准标准。分别为 0.0  $\mu\text{g/L}$ ,2.5  $\mu\text{g/L}$ ,5.0  $\mu\text{g/L}$ ,10.0  $\mu\text{g/L}$ ,20.0  $\mu\text{g/L}$ ,30.0  $\mu\text{g/L}$ ,40.0  $\mu\text{g/L}$  和 50.0  $\mu\text{g/L}$ 。使用另一个容器制作空白。

用水冲洗每个容器内壁和瓶盖 3 次并甩干;盖上盖子并正放 5 min~10 min,然后甩干瓶内剩余液体。用移液管加入以下体积的水到 9 个容器中:5.00 mL,5.00 mL,4.95 mL,4.90 mL,4.80 mL,4.60 mL,4.40 mL,4.20 mL 和 4.00 mL,并分别加入 5.00 mL 的 10%乙醇(4.2)和 2 份 5 mL 等分稀释液。

分别向 9 个容器中移取 0  $\mu\text{L}$ ,50  $\mu\text{L}$ ,100  $\mu\text{L}$ ,200  $\mu\text{L}$ ,400  $\mu\text{L}$ ,600  $\mu\text{L}$ ,800  $\mu\text{L}$  和 1 000  $\mu\text{L}$  的工作标准物。盖上盖子并摇匀。每批样品的试剂溶液均应现配现用。

#### 4.4 硝酸

1%(V/V)硝酸。

### 5 仪器

使用前,所有玻璃和塑料仪器必须要酸洗(至少在 20 %硝酸溶液中浸泡 24 h),使用前用蒸馏水彻底清洗并盖上盖子(可使用食品薄膜)以避免空气污染。

5.1 250 带盖塑料瓶(例如:Nalgene 瓶或同等级瓶子)。



- 5.2 100 mL 容量瓶(A 级)。
- 5.3 带橡胶头巴斯德吸管。
- 5.4 通用容器,20 mL(Nunc,Sterilin 公司产或同等级别产品)。
- 5.5 600 mL 玻璃烧杯。
- 5.6 40  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$  移液器\*(芬兰雷勃移液器或同等级仪器)。
- 5.7 200  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$  移液器\*(芬兰雷勃移液器或同等级仪器)。
- 5.8 0.5  $\mu\text{L}$ ~5.0 mL 移液器\*(芬兰雷勃移液器或同等级仪器)。
- 5.9 2.0  $\mu\text{L}$ ~10.0 mL 移液器\*(芬兰雷勃移液器或同等级仪器)。
- 5.10 分析天平( $\pm 1$  mg,梅特勒 PC440 或同等级产品)。
- 5.11 涡旋振荡器或同功能产品。
- 5.12 20 mL 试管。
- 5.13 适用于 5.12 的试管的试管架。
- 5.14 适合 5.4 所用容器架。
- 5.15 磁性搅拌器。
- 5.16 聚四氟乙烯磁力搅拌转子。
- 5.17 适合 5.6,5.7,5.8 和 5.9 所用的微量移液器枪头。
- 5.18 原子吸收光度计:使用的原子吸收光度计应配置有石墨炉,时间滞后原子化池,自动进样器,背景校正装置和吸光度-时间曲线图监控设备(如下列例子所示)。仪器各参数要调整到适于实验测定的状态,举例如下:

a) 原子吸收分光光度计,Perkin-Elmer 公司的 3030,配有氘灯背景校正器,用于非特异性吸收;铅空心阴极灯操作,电流 12 mA;特征谱线 283.3 nm 线;狭缝宽度为 0.7 nm;HGA500 石墨炉,配有内置热裂解石墨 L'vov 平台的热解石墨管;氩气作为保护气。HGA500 的石墨炉的条件见表 1:

表 1

步骤	1	2	3	4	5	6
温度/ $^{\circ}\text{C}$	200	1 100	1 100	1 800	2 400	20
升温梯度/s	5	20	1	0	1	1
保持时间/s	60	20	2	3	6	25
气体类型	氩气	氩气	氩气	氩气	氩气	氩气
气体流量/(mL/min)	50	50	0	0	300	300
读数间隔(2.5 s)				×		

自动进样装置 AS 40,注入样品量 20  $\mu\text{L}$ ,每个样 3 次重复。

b) Thermo-electron Video 12E 原子吸收分光光度计,带有 CTF 188 石墨炉和 FASTAC 型沉积系统,条件见表 2:

\* 移液器使用时每天都要校正。

表 2

步骤	1	2	3	4	5
温度/°C	150	350	650	1 000	2 400
升温时间/s	0	30	15	1	
保持时间/s	2	0	5	4	10
气体	氩气	氩气	氩气	氩气	氩气
气流速度/(mL/min)	50	50	0	0	300
读数间隔(2.5s)				×	

样品沉积时间为 5 s,FASTAC 延迟时间为 10 s,每个样品重复测定 3 次,特征谱线 283.3 nm 线。

## 6 步骤

### 6.1 酒样处理

在取样前彻底摇匀酒样。起泡酒在取样前应转移到一个干净的烧杯中并置于超声波清洗器内超声除尽气体。

### 6.2 测量方法

#### 6.2.1 酒样

用移液管(5.8)分别取 2.00 mL 水和 4.00 mL 稀释液(4.1)和 2.00 mL 酒样于 20 mL 的试管(5.12)中。用涡旋振荡器(5.11)彻底摇匀。

#### 6.2.2 回收率的估算

为了回收率的估算,用移液器(5.8)准确吸取 1.80 mL 水,4.00 mL 稀释液(4.1),2.00 mL 酒样再用移液器(5.7)移取 0.200 mL 铅工作标准溶液(4.3.3)于 20 mL 的试管(5.12)中。用涡旋振荡器(5.11)彻底摇匀。

注:任何浓度超过最高标液浓度的样品必须减少取样量后重新检测。另外加入 10% 的乙醇(4.2)于不足样品体积。

### 6.3 测量

测量应成批次进行。每批次样品应包含至少 4 个空白平行样和 3 个加入标样的平行样以估算回收率。在自动抽样托盘上间隔均匀放置铅校准溶液与未知样。使用巴斯德吸管(5.3)将标准与样品转移到自动进样器的样品瓶中。弃去第一次液体,测量第二次加入的样品(若样品溶液不足,则需保证样品容器的洁净度)。每次转移标准溶液与样品之间应使用 1% 硝酸(4.4)清洗巴斯德吸管 4~5 次。

### 6.4 铅的定量

在所有情况下均使用 3 次重复进样的吸光度平均值。根据每个标准溶液的平均响应值与浓度之间的关系建立标准曲线。记录仪器检测到的每个样品的吸光度。通过查找校准曲线得到样品溶液中铅的含量。

注:若标准品吸光度有显著的减低,建议每处理 2 批次样品或更短间隔内即换炉管和平台。



## 7 结果

修正批次内平均回收率。

### 7.1 计算

所有测量溶液中铅含量可从校正图表中计算得到。使用以下公式计算酒样和加标样品中铅含量  $\rho_{P_b}$  :

$$\rho_{P_b} (\text{mg/L}) = \frac{(c_m - c_b) \times V_t}{V_m}$$

其中： $c_m$ ——测量溶液中铅含量平均值(mg/L)；

$c_b$ ——空白溶液中铅含量平均值(mg/L)；

$V_t$ ——测量溶液的最终总体积(mL)；

$V_m$ ——酒样取样量(mL)。

### 7.2 回收率计算

$$\text{回收率}(\%) = \frac{(c_s - c_a) \times V_s \times 100}{S}$$

其中： $c_s$ ——加标酒样中铅含量平均值(mg/L)；

$c_a$ ——酒样中铅含量平均值(mg/L)；

$V_s$ ——加标酒样体积(mL)；

$S$ ——加标量( $\mu\text{g}$ )。

### 7.3 计算回收率校正结果

$$\text{校正后的铅浓度}(\text{mg/L}) = \frac{c_w \times 100}{R_a}$$

其中： $c_w$ ——酒样中铅含量平均值(mg/L)；

$R_a$ ——同批次的平均回收率(%)。



## 附录 A

### 实验室间比对实验研究

表 A.1 样品组合

样品编号	样品描述
5 和 9	波尔多(甜白)
3 和 11	意大利霞多丽(白)
7 和 8	西班牙红葡萄酒(添加量 260 $\mu\text{g/L}$ )
6 和 10	罗马尼亚黑比诺
2 和 12	罗马尼亚黑比诺(添加量 150 $\mu\text{g/L}$ )
1	样品 3/11(添加量 124 $\mu\text{g/L}$ )
4	样品 3/11(添加量 134 $\mu\text{g/L}$ )

表 A.2 葡萄酒中铅含量的协作试验结果统计分析参数汇总(一个实验室的结果经评估确认不适合列入下表进行统计分析)

样品	A	B	C	D	E	F	F
编号	5,9	3,11	7,8	6,10	2,12	1	4
$n$	16	15*	16	16	16	16	
$n(-\text{outl})$	16	15	14	16	15	16	
Targ.	56	24	279	67	192	143	153
Mean	50.8	27.2	298	70.6	189	143	149
$r$	23	15	24	32	51	38	
$S_r$	8.1	5.3	8.7	11.8	18.2	13.6	
RSD <sub>r</sub>	16	19	3	17	10	9	
Hor	1.0	1.1	0.2	1.1	0.7	0.7	
$R$	42	25	83	57	154	79	
$S_R$	15.1	8.8	29.8	20.3	55.2	28.2	
RSD <sub>R</sub>	30	28	10	29	29	19	
HoR	1.2	1.2	0.5	1.2	1.4	0.9	

表 A.1~表 A.2 解析:

$N$  初始实验室数量;

$n(-\text{outl})$  列表中经剔除异常值后剩余的实验室数量。

(\*)17 号实验室测定编号为 11 的样品结果为  $<20 \mu\text{g/L}$ 。他们的研究结果并没有被包含在这个样本(B)的统计分析中。



Mean 指的是观测到的平均值,去除异常值后得到的协同试验数据的平均值。

Targ. 内部使用 ICP-MS 观测值获得的平均结果。

$r$  重复性限,指在重复性条件下(即相同样品、相同操作者、相同仪器、相同实验室与很短的时间间隔)单独 2 个结果之间的误差在某一概率(通常为 95%)内低于该数值,表达式为  $r=2.8 \times S_r$ 。

$S_r$  重复性标准差。

RSD<sub>r</sub> 相对重复性标准偏差( $S_r \times 100/\text{MEAN}$ )。

Hor 假定  $r=0.66 R$ ,通过 Horwitz 方程计算得到的 RSD<sub>r</sub> 除以观察值的 RSD<sub>r</sub>。

$R$  重现性限,指在重现性实验条件下(即,使用标准测试方法与相同材料在不同实验室中进行操作)单独测试得到结果之间的误差在某一概率(通常为 95%)内低于该数值, $R=2.8 \times S_R$ 。

$S_R$  重现性标准差(两个实验室之间的差异)。

RSD<sub>R</sub> 相对重现性标准偏差( $S_R \times 100/\text{MEAN}$ )。

HoR 通过 Horwitz 方程计算得到,假定  $\text{RSD}_R = 2^{(1-0.5 \log_{10} c)}$  ( $c$  某一物质的浓度,保留小数位)。

HORRAT 值:

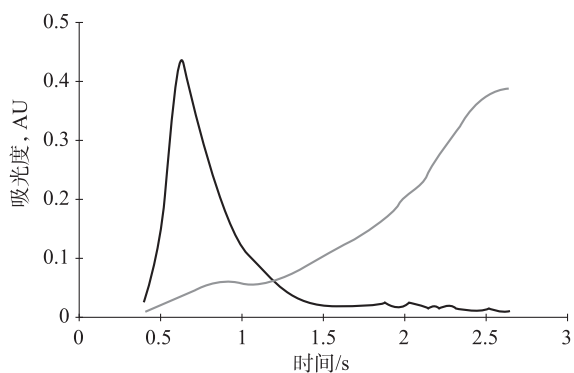
对重复性来说,假定  $r=0.66 R$ ,实验观察得到的 RSD<sub>r</sub> 除以 Horwitz 方程得到的 RSD<sub>r</sub>。

对重现性来说,HORRAT 值即观察得到的 RSD<sub>R</sub> 除以 Horwitz 方程得到的 RSD<sub>R</sub>。



**附录 B**  
**使用铂金-埃默尔 3030 型原子吸收光谱仪**  
**测定葡萄酒中的铅的吸光度随时间变化图谱**  
**(带氙灯背景校正)**

a) 30 ng/L 的酒标。



b) 葡萄酒样品

解析: 吸光度校正——背景吸光度。

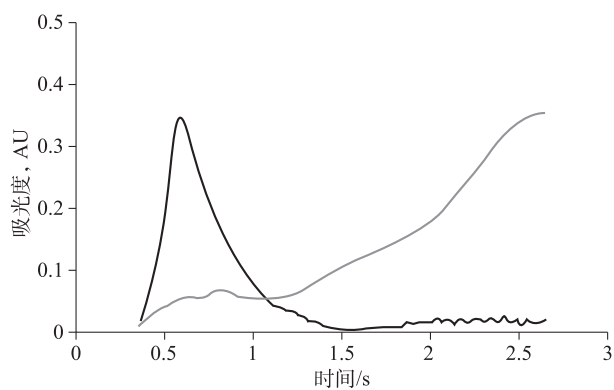


图 B.1



## 例 2 原子吸收光谱法测定葡萄酒中的铅

### 1 应用领域

考虑到由 OIV 给定的最大限量值,此分析方法适用所有类型的酒。

### 2 原理

除了甜白葡萄酒需要稀释外,其他酒样无需进行预处理。

加入磷酸二氢铵可在高温下稳定酒样中铅元素以去除干扰,并且能对标准溶液产生同样作用。

雾化器是一个使用带平台的热解石墨,利用焦耳效应加热。

特征谱线 283.3 nm。

可使用赛曼(zeeman)效应或氙灯对非特定吸收值进行校正。

该酒样中铅元素测定是使用外部曲线校准的直接定量方法。

### 3 试剂

3.1 软化水:超纯水,电阻率大于  $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

3.2 硝酸:65%,超纯酸。

3.3 磷酸二氢铵( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )分析用。

3.4 铅标准溶液  $1\ 000 \mu\text{g}/\text{mL}$ :溶于 2%硝酸(成品溶液,可直接使用)。

### 4 仪器

4.1 分析天平(感量 1 mg)。

4.2 玻璃器皿。

4.2.1 容量瓶 50 mL,100 mL(A 级)。

4.2.2 移液管 1 mL,10 mL(A 级)。

4.2.3 玻璃器皿的净化:用软化水冲洗,并用 10%硝酸浸泡至少 24 h,再用软化水清洗 2 次。

4.3 原子吸收光度计:适用于非特定吸收校正的石墨管原子化器和自动进样器(用 10%硝酸清洗进样杯)。

热解涂层石墨炉:带有钽铁层的 L'Vov 平台(石墨平台)(参考 8.1,列于下面)。

钽溶液:取 3 g 钽粉(金属钽,纯度高于 99.7%)于 100 mL 聚四氟乙烯瓶中,加入 10 mL 稀氢氟酸(1+1),3 g 无水草酸和 0.5 mL 30%过氧化氢溶液。慢慢加热使金属粉末完全溶解,反应变慢时加入过氧化氢。当完全溶解时加入 4 g 无水草酸和大约 30 mL 软化水。溶解酸后定容到 50 mL。溶液应储存在塑料瓶中。

铁钽化平台:将平台放置于石墨管中,一并放入原子化光度计的原子化器中。用自动取样器注入  $10 \mu\text{L}$  钽溶液。遵循以下步骤设置温度循环:在  $150^\circ\text{C}$  下干燥 40 s;在  $900^\circ\text{C}$  下矿

化 60 s;在 2 600℃下原子化 2.5 s。使用氩气作为保护气体。

## 5 步骤

### 5.1 测试部分

开塞前应仔细清洁有镀锡铅胶帽的酒瓶颈部。

### 5.2 样品处理

通常情况下酒样无需预处理可以直接注入自动进样瓶中。而浑浊的酒样则需过滤,为了延长平台的使用时间,甜白葡萄酒应该进行稀释,含糖量为 10 g/L~50 g/L 的甜白葡萄酒稀释至 1/2;含糖量高于 50 g/L 的甜白葡萄酒稀释至 1/4。

### 5.3 溶液制备

#### 5.3.1 甜白葡萄酒稀释液

该溶液用作注入的额外体积,由 1%硝酸水溶液组成。

#### 5.3.2 基质改进剂

在 50 mL 烧瓶(4.2.1)中加入 3 g 磷酸二氢铵(3.3),用软化水(3.1)溶解并定容。

#### 5.3.3 10 mg/L 的铅溶液

在 100 mL 长颈瓶(4.2.1)中加入 1 mL 1g/L 铅标准溶液(3.4),加入 1 mL 65%硝酸(3.2),用软化水(3.1)定容。此溶液在 4℃下可以保存一个月。

#### 5.3.4 100 μg/L 的铅溶液

在 100 mL 烧杯(4.2.1)中加入 1 mL 10 mg/L 铅标准溶液(5.3.3),用软化水定容。此溶液应该现配现用。

5.3.5 校准刻度(供参考):0 μg/L;16.7 μg/L;33.3 μg/L;50 μg/L(如表 2 所示)。

### 5.4 校准与测定

#### 5.4.1 光谱测量

5.4.1.1 波长:283.3 nm。

5.4.1.2 狭缝:0.5 nm。

5.4.1.3 空心阴极灯电流:5 mA。

5.4.1.4 背景校正:使用塞曼效应或氘灯背景校正。

5.4.1.5 用自动进样器加标准样和待测样于石墨炉中。冲洗液由 500 mL 软化水加入一滴 Triton×100 配制成。

注:为了便于在 90℃下注射液体到平台,炉温应调整为约 150℃。

5.4.1.6 信号测量:峰高。

5.4.1.7 测量时间:3 s。

5.4.1.8 标准或样品测量次数 2。

注:试验的结果为以上 2 个测量结果的平均值,若这 2 个测量的变异系数大于 15%,则需重新测量。

5.4.1.9 熔炉参数(仅供参考):见表 1。



表1 石墨熔炉参数

葡萄酒中铅含量的测定				
温度/°C	保持时间/s	气体类型	气体流量/(L/min)	读取信号
150	60	氩气	3.0	
750	10	氩气	3.0	
750	30	氩气	3.0	
750	2	氩气	0	
2 400	1	氩气	0	
2 400	2	氩气	0	
2 400	2	氩气	3.0	
40	20	氩气	3.0	

5.4.1.10 自动取样器参数(仅供参考,表2)。

表2 葡萄酒中铅含量的测定,自动进样器参数

分析物质	注入样品体积/ $\mu\text{L}$			
	样品	铅标液 100 $\mu\text{g/L}$	白葡萄酒稀释液	基质改进剂
空白	0	0	5	1
标样 1	0	1	4	1
标样 2	0	2	3	1
标样 3	0	3	2	1
待测物	2	0	3	1

#### 5.4.2 校准曲线绘制

自动分配器循环允许从 100  $\mu\text{g/L}$  铅溶液(表2)配制标准液。根据不同的铅浓度(mg/L)得到的吸光值绘制校正曲线。

## 6 结果计算

6.1 进样溶液的铅含量:查校准曲线(5.4.2)获得。

6.2 酒样中的铅含量:通过 6.1 的结果乘以 3 可以计算得出(2  $\mu\text{L}$  待测物,测试体系中最终体积为 6  $\mu\text{L}$ )。甜白葡萄酒需要把酒样稀释倍数计算进去。

6.3 结果:用每升葡萄酒中所含铅的毫克数表示(mg/L),保留小数点后两位。

## 7 多实验室测试

采用双盲实验,测定以下八种波尔多葡萄酒中铅的含量,这八种酒分别是:两瓶红葡萄酒(R1 和 R2),两瓶桃葡萄酒(Ro1 和 Ro2),两瓶干白葡萄酒(Bs1 和 Bs2),和两瓶甜白葡萄酒(D1 和 D2)。来自西班牙、葡萄牙、摩洛哥、法国 11 个实验室参加共同对这 16 个样品进行测定。

## 7.1 酒样描述

表 3 实验酒样特征

酒样	类型	酒精含量/% vol	总酸 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /(g/L)	挥发酸 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /(g/L)	还原糖/(g/L)
R1	红葡萄酒	11.86	4.43	1.57	1.2
R2	红葡萄酒	12.54	3.77	0.34	1.5
Ro1	桃葡萄酒	12.23	5.30	0.44	1.2
Ro2	桃葡萄酒	11.43	4.88	0.45	1.1
Bs1	干白葡萄酒	11.65	4.62	0.37	2.2
Bs2	干白葡萄酒	12.32	4.57	0.31	0.9
D1	甜白葡萄酒	12.94	3.72	0.67	76.4
D2	甜白葡萄酒	12.66	4.70	0.45	62.8

## 7.2 结果统计

表 4 实验室内实验结果统计分析

酒样	R1	R2	Ro1	Ro2	Bs1	Bs2	D1	D2
双盲重复	C 和 K	F 和 I	D 和 G	J 和 L	B 和 H	P 和 N	A 和 E	M 和 O
初始实验室数量	11	11	11	11	11	11	11	11
实验室数量 剔除较大差异数据	11	10	11	11	10	10	11	10
平均值/( $\mu\text{g/L}$ )	44	162	28	145	52	138	60	145
重复性限值 $r$	18	12	7	17	6	13	28	7
重复性标准偏差 $S_r$	6.4	4.3	2.5	6.1	2.1	4.6	10	2.5
相对重现性标准差 RSD <sub>r</sub> /%	14.5	2.8	9.2	4.2	4.2	3.4	16.5	1.8
Horrat 值 (Hor): 由 观察 RSD <sub>r</sub> 除以 Horwitz 计算 RSD <sub>r</sub> 得到	0.6	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.7	0.1
再现性限值 $R$	34	105	23	86	30	101	86	144
再现性标准差 $S_R$	12.3	37.5	8.2	30.8	10.7	35.9	30.6	51.6
相对再现性标准 差 RSD <sub>R</sub> /%	28	23.1	29.3	21.2	20.6	26	51	35.6
Horrat 值 (HoR): 观测得到 RSD <sub>R</sub> 除以 Horwitz 计算得 到的 RSD <sub>R</sub>	1.1	1.1	1.1	1	0.8	1.2	2.1	1.7



参加试验的 11 个实验室中有 7 个表示完全遵循规定的方法执行,其余 4 个修改了个别参数。

## 8 方法性能参数与质量控制

8.1 检出限:由重复 20 个空白分析得出,并相当于 3 倍标准差。对本方法,测量 20 次空白可得出以下结果:平均值=1.29  $\mu\text{g/L}$ ,标准差=0.44  $\mu\text{g/L}$ ,检测限=1.3  $\mu\text{g/L}$ 。

8.2 定量限:相当于 3 倍检测限。以上方法得出的定量限为 4  $\mu\text{g/L}$ ( $3 \times 1.32 = 3.96$ )。

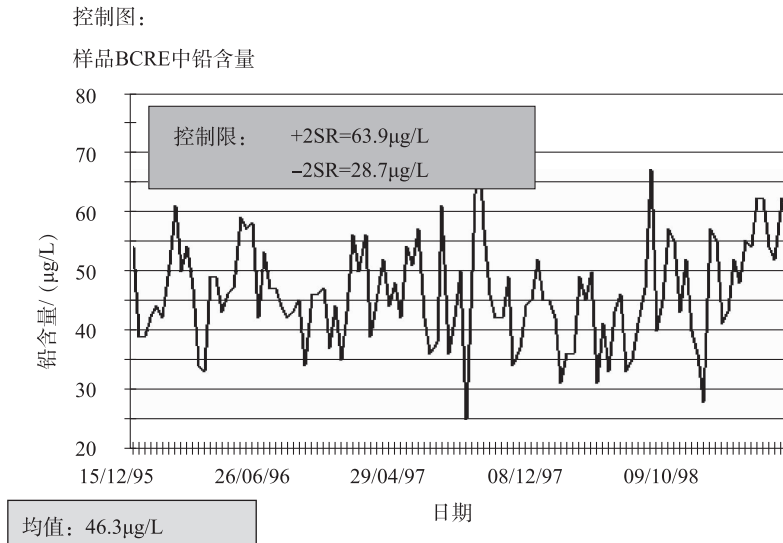
8.3 准确性:在一定置信区间内,多次重复测量的平均值与参照物质数据作比较进行判断。

使用了以下 3 种于 1992 年由 BCR(欧洲标准物质局)确认过铅浓度的葡萄酒作参考,分别是:红葡萄酒,桃红葡萄酒,甜白葡萄酒。

表 5 方法准确度

项目		红葡萄酒 BCR E	干白葡萄酒 BCR C	甜白葡萄酒 BCR D
铅浓度/ $(\mu\text{g/L})$	标准值 (BCR, 1992)	36.1 $\pm$ 4.9	65.1 $\pm$ 9.1	132.4 $\pm$ 32
	平均值 (次数:10)	41.0 $\pm$ 3.8	66.0 $\pm$ 4.4	128.3 $\pm$ 14.1

8.4 控制图:每个参考物均可绘制一张控制图。控制限介于: $\pm 2 S_R$  之间( $S_R$  再现性标准偏差)。



## 参 考 文 献

- [1] W Horwitz, "Evaluation of Analytical Methods for Regulation of Foods and Drugs", *Anal. Chem.*, 1982, 54, 67A-76A.
- [2] Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, FV 1061, OIV, 1998.
- [3] ISO 5725-6:1994, 4. 2. 3. International Organisation for Standardisation, case Postal 56, CH-1211, Genève 20, Switzerland.
- [4] ISO/AOAC/IUPAC Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement. Edited Michael Thompson, Steven L R Ellison, Ales Fajgelj, Paul Willetts and Roger Wood, *Pure Appl. Chem.*, 1999, 71, 337-348.
- [5] Paul A. Brereton, Paul Robb, Christine M Sargent, Helen M. Crews and Roger Wood. Determination of Lead in Wine by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry; Interlaboratory Study. *JAOAC Int.*, 1997, 80, No 6, 1287-1297.
- [6] "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Collaborative Studies." Editor W Horwitz, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 67, No. 2, pp. 331-343, 1995.
- [7] Horwitz W, Evaluation of Methods Used for Regulation of Foods and Drugs, *Analytical Chemistry*, 1982, 57, 67A-76A.
- [8] Peeler J T, Horwitz W and Albert R, Precision Parameters of Standard Methods of Analysis for Dairy Products, *JAOAC*, 1989, 72, No 5, 784-806.
- [9] Journal Officiel des Communautés Européennes (3 octobre 1990). Méthode de dosage du plomb dans le vin (p. 152 et 153).
- [10] Teissèdre P. L., Brun S., Médina B. (1992). Dosage du plomb dans les vins/Proposition de modifications à la méthode du Recueil. Feuille Vert de l'O. I. V., n°928, 1997/151292.
- [11] Moreira Balio da Silva M., Gaye J., Médina B. (1996). Comparaison de six méthodes de dosage du plomb dans les vins par absorption atomique en four graphite. Feuille Vert de l'O. I. V. n°1013, 2310/190196.
- [12] Brereton P., Robb P., Sargent C., Crews H., Wood R. (1996). Validation of a graphite furnace atomic absorption spectrometry method for the detection of lead in wine. Feuille Vert de l'O. I. V. n°1016, 2913/230196.
- [13] Bourguignon J. B., Douet Ch., Gaye J., Médina B. (1997). Dosage du plomb dans le vin/Interprétation des résultats de l'essai interlaboratoire. Feuille Vert 1055 de l'O. I. V. n°2456/190397.
- [14] Zátka V. (1978). Treated graphite atomizer tubes for atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry*, vol. 50, n°3.
- [15] US Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms (1991). Analysis of lead in wines and related products by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Note d'information de l'O. I. V. du 21 août 1991: Plomb dans les vins aux U. S. A.
- [16] Mindak W. R. (1994). Determination of lead in table wines by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of A. O. A. C. International*, vol. 77, n°4, p. 1023-1030.
- [17] Médina B. (1994). Apport de nouvelles techniques au dosage des métaux dans les vins. Congrès des Enologues de France à Bordeaux.



- [18] Norme française NF ISO 5725-2:1994. Application de la statistique: Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure.
- [19] Jorhem L., Sundström B. (1995). Direct determination of lead in wine using graphite furnace AAS. Atomic Spectroscopy, September/October 1995.



## ICP-AES 法测定葡萄酒中的金属元素

(决议 Oeno 478/2013)

### 1 注意事项

安全措施——当样品处理使用酸液时,操作者必须保护自己的双手和眼睛等,酸的取用必须在通风橱内进行。

### 2 适用范围

电感耦合等离子体发射光谱仪法(ICP-AES)用于检测以下几种元素在葡萄酒中的含量:

常量元素:

- 钾元素(最高可检测浓度 1 500 mg/L)。
- 钙元素(最高可检测浓度 250 mg/L)。
- 镁元素(最高可检测浓度 150 mg/L)。
- 钠元素(最高可检测浓度 100 mg/L)。

微量元素:

- 铁元素(检测浓度范围 1 mg/L~10 mg/L)。
- 铜元素(检测浓度范围 0.1 mg/L~5 mg/L)。
- 锌元素(检测浓度范围 0.5 mg/L~5mg/L)。
- 锰元素(检测浓度范围 0.5 mg/L~5 mg/L)。
- 锶元素(检测浓度范围 0.1 mg/L~3mg/L)。
- 铝元素(检测浓度范围 0.75 mg/L~7.5mg/L)。
- 钡元素(检测浓度范围 0.1 mg/L~5mg/L)。

### 3 原理

#### 3.1 同时测定常量元素和微量元素

为了同时测定常量元素和微量元素,酒样要按照 1:5 的比例进行稀释配制。

标准曲线配置时加入一定量的乙醇(2.5%),可以消除基质在雾化过程和等离子体焰温度下的基质效应,同时为了使样品液和标准曲线稳定可以加入 1%的硝酸。

在该方法中可以采用钪  $\text{Sc}_{335.372}$  (5 mg/L)和铯  $\text{Cs}_{697.327}$  (1% Cs 的  $\text{CsNO}_3$  溶液)。

谱线作为内标物以减少检测过程中非检测物谱线的干扰。

其他的内标物的选择比较宽泛,只要是能够使采用的方法达到最优即可,例如可以选钇  $\text{Y}_{371.029}$ 。

铯元素( $\text{CsNO}_3$  的形式)作为内标时,同时起到离子缓冲作用,能够使其他成分达到电离平衡。

氯化铯  $\text{CsCl}$ ,也可作为离子缓冲剂。

内标物和离子缓冲剂使用同一个容量瓶配置,配置好之后用一个蠕动泵使之与样品液混合,混合均匀再导入雾化室。



### 3.2 单独常量元素进行分析

单独对样品中的常量元素进行分析时,样品需按照 1:50 的比例进行稀释。为增加样品液和标准溶液的稳定性,需向标液和样品中加入 1% 的  $\text{HNO}_3$ 。

考虑到样品稀释倍数较大,基质的影响可以忽略不计,因此不需要再加内标物,同样的,标准曲线配置时也不需要添加乙醇。

## 4 试剂

除有特别说明,本方法所用试剂全部为分析纯。

4.1 超纯水去离子水:根据 ISO 3696 要求,水的电阻率需大于  $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

4.2 通过认证的单元元素溶液(浓度达  $1\,000 \text{ mg/L}$  或者  $10\,000 \text{ mg/L}$ ),可用于无机元素分析,也可作为内标物使用(如钪)。

4.3 内部质控:认证的参照样品(如标准葡萄酒样)或者实验室间做过元素分析相互对比的样品。

4.4 硝酸:浓度大于 60%,适于做痕量分析。

4.5 乙醇:浓度大于 95%,适于做痕量分析。

4.6 1%的硝酸溶液:移取 10 mL 硝酸(4.4)至 1 000 mL 容量瓶中,超纯水定容至刻度线,备用。

## 5 仪器设备

5.1 光电直读光谱仪系统包括等离子体装置,分光系统以及检测系统。等离子体发射装置是以氩气为工作气;分光系统(各元素分析波长见第 7 章的表格)包括垂直观察、水平观测和双向观测三种方式。

检测系统优先配置 PM 检测器、CCD 检测器、CID 检测器或 SCCD 检测器。

注 1:若多元素分析方法中使用内标时,强烈推荐使用能进行同时检测的分光光度计。

注 2:为了增加方法的灵敏性和稳定性可以选择其他合适的进样系统,如连续进样系统,微波去溶剂化系统(MWDS 等等)。

5.2 经校正的微量移液管:  $200 \mu\text{L} \sim 5 \text{ mL}$  和/或是常量移液管:A 级 1.5 mL 和 10 mL。

5.3 容量瓶:A 级。

注:用于盛取样品的容器必须在 10% 的硝酸(4.4)中至少浸泡 12h,取出后用去离子水(4.1)多次冲洗。

为了评价该方法在仪器上的重现性,建议测定  $\text{Mg}_{279.800}$  与  $\text{Mg}_{285.213}$  的发射特征光谱的强度比值,其中  $\text{Mg}_{285.213}$  为原子光谱线, $\text{Mg}_{279.800}$  为离子光谱线。

## 6 样品制备

### 6.1 配置标准曲线

根据方法的可信度确定标准曲线点的个数,每条曲线至少包括 5 个浓度点。

测定结果的可靠性和准确性可以通过测定标准物进行判断。

曲线范围要根据样品的稀释倍数进行确定,但必须确保每种待测元素浓度都在曲线范围之内。谨记处理后的样品和标准工作液中硝酸的含量需保持一致。

6.1.1 适合同时测定常量元素和微量元素的标准溶液的配制(按照 1:5 比例进行稀释)。



用微量移液管(5.2)移取一定体积的标准溶液,2.5 mL 乙醇(4.5),1 mL 硝酸(4.4)到100 mL 容量瓶(5.3)中,用超去离子水(4.1)定容至刻度线,摇匀备用。

6.1.2 用于单独测定常量元素的标准溶液的配制(按照1:50比例进行稀释)用微量移液管(5.2)移取一定体积的标准溶液于100 mL 容量瓶(5.3),用稀硝酸(4.6)定容至刻度线,摇匀,备用。

## 6.2 制备待测样品

6.2.1 制备适合同时测定常量元素和微量元素的样品液(按照1:5比例进行稀释)使用带刻度移液管或常微量移液管(5.2),移取10 mL 样品,1 mL 硝酸(4.4)于50 mL 的容量瓶(5.3)中,用去离子水(4.1)定容至刻度线,摇匀待测。

气泡酒在稀释样品之前必须用超声波超声10 min 以去除样品中的气体。

对于糖含量高的样品必须加入硝酸后进行微波消解以除去有机质。如果某一元素的含量特别高就需要考虑对样品进行更高倍稀释。该情况下,标准曲线及其他试剂中乙醇的含量要适当进行调整。

注:为了提高痕量元素测定的灵敏度,要根据所用仪器的稳定性,所选用的缓冲液溶液和内标物,可以对样品进行1:2倍数的稀释。此时标准曲线的范围、乙醇的含量、有可能包括仪器的参数(功率)都需要进行调整。

6.2.2 适合单独测定常量元素的样品液(按照1:50比例进行稀释)。使用带刻度移液管或微量移液管(5.2),移取1 mL 酒样,0.5 mL 硝酸(4.4)。于50 mL 的容量瓶(5.3)中,用去离子水(4.1)定容至刻度线,摇匀待测。

## 7 测定步骤

### 实验参数

满足本方法所需的可重复性和再现性而设置的最优仪器参数如下所述。此参数以供参考,实际试验中要根据所使用的仪器对相关参数做适当调整。

功率:1.3 kW。

工作气流量:1.5 L/min。

辅助气流量:1.5 L/min。

雾化气压:200 kPa。

稳定时间:20 s。

吸样时间:5 s。

泵速:1.5 r/min。

冲洗时间:30 s。

内标物进样管内径:0.51 mm。

样品进样管内径:0.8 mm。

启动系统单元(进样系统和等离子室),用1%的硝酸(4.6)至少清洗20 min。在测定标准曲线之前要测定空白样。使用标准物(4.3)作为内部质量控制以保证标准曲线的准确性。再次对空白样品进行测定以消除仪器的记忆效应。测定样品,且每测定10个样品及测定结束时要测定一个质控样以保证结果的稳定性。必要时可以根据质控样的测定结果制定一个



质控图,以判断结果的可接受性和在结果发生漂移的时候需采取的措施。每个元素需至少进行3次重复测定。

各元素可选择的特征谱线如表1所示(可以根据所使用的仪器选择其他谱线)。

表1

元素	一级谱线( $E_{\text{sum}} = E_{\text{exc}} + E_{\text{ion}}$ )	内标	二级谱线( $E_{\text{sum}} = E_{\text{exc}} + E_{\text{ion}}$ )	内标
K	769.897( I )(1.6 eV)	Cs 697.327	766.491( I )(1.6 eV)	Cs 697.327
Ca	317.933( II )(10 eV)	Sc 335.372	315.887( II )(10.1 eV)	Sc 335.372
Mg	285.213( I )(4.3 eV)	Cs 697.327	279.800( II )(10.6 eV)	Sc 335.372
Na	589.592( I )(2.1 eV)	Cs 697.327		
Fe	259.940( II )(12.7 eV)	Sc 335.372	239.563( II )(11.4 eV)	Sc 335.372
Cu	327.395( I )(3.8 eV)	Cs 697.327	324.754( I )(3.8 eV)	Cs 697.327
Zn	213.857( I )(5.8 eV)	Cs 697.327	206.200( II )(12.2 eV)	Sc 335.372
Mn	257.61( II )(12.3 eV)	Sc 335.372	260.568( II )(11 eV)	Sc 335.372
Sr	421.552( II )(8.6 eV)	Sc 335.372	407.771( II )(8.7 eV)	Sc 335.372
Al	396.152( I )(3.1 eV)	Cs 697.327	167.019( I )(7.4 eV)	Cs 697.327
Rb	780.026( I )(1.6 eV)	Cs 697.327		
Li	670.783( I )(1.9 eV)	Cs 697.327		
Ba	455.403( II )(7.9 eV)	Sc 335.372		
Sc	335.372( II )(10.3 eV)			
Cs	697.327( I )(1.8 eV)			

## 8 计算

按照如下公式计算样品中元素浓度:

$$c = \frac{c_m \times V_t}{V_m}$$

其中: $c$ ——元素在酒样中浓度(mg/L);

$c_m$ ——稀释样品液中元素浓度(mg/L);

$V_t$ ——稀释样品液定容体积( $V=50$  mL);

$V_m$ ——移取样品体积( $V=1$  mL 或 10 mL)。

## 9 精密度

表 2

元素	重复性 RSD <sub>r</sub> /%	再现性 RSD <sub>R</sub> /%	检出限/(mg/L)	定量限/(mg/L)	回收率
K	2.3	5.5	—	—	80%~120%
Ca	3.5	11.3	—	—	
Mg	2.4	8.9	—	—	
Na	2.6	9.1	—	—	
Fe	2.2	6.9	0.08	0.25	
Cu	13.4	15.8	0.03	0.10	
Zn	3.6	6.5	0.03	0.10	
Mn	4.7	7.0	0.03	0.10	
Al	5.6	17.0	0.03	0.10	
Sr	2.1	9.9	0.03	0.10	
Ba	8.2	20.8	0.03	0.10	

## 附录 A 实验室间比对实验结果

2011年11月进行方法评估的前期研究,2012年2月参与实验的各实验室按照ISO 5725和OENO 6/2000规定的方法完成了方法验证。

前期研究:选择3组样品(干白葡萄酒,红葡萄酒,甜白葡萄酒),对元素Al、Fe、Cu、Sr、Ba、Mn、Zn进行加标回收实验。

表 A.1

元素/(mg/L)	样品		
	红酒	干白	甜酒
K	1 258	725	841
Ca	50	75	81
Na	20	28	24
Mg	78	70	66
Al	1.29	1.33	1.97
Fe	8.12	6.91	9.29
Cu	0.86	0.86	0.94
Sr	1.07	1.08	1.07
Ba	0.77	0.72	0.63
Mn	1.6	2.01	1.77
Zn	1.51	2.53	1.69

表 A.2 样品

元素	2 白葡萄酒 1			白葡萄酒 2		
	参考值	加标/(mg/L)	回收率/%	参考值	加标/(mg/L)	回收率/%
K	754	0	98	1 080	351	96
Ca	83	11	98	76	0	102
Na	50	28	105	24	0	100
Mg	65	0	98	72	7	102
Al	0.50	0	100	1.19	1	104
Fe	2.86	1	94	1.71	0	97
Cu	0.04	0	未加	0.71	1	103
Sr	1.27	1	105	0.22	0	108
Ba	0.08	0	102	0.64	1	96
Mn	1.84	1	98	1.12	0	102
Zn	1.40	0	100	2.12	1	102

表 A.3

元素	红酒 1			红酒 2		
	参考值	加标/(mg/L)	回收率/%	参考值	加标/(mg/L)	回收率/%
K	1 160	70	100	1 371	316	95
Ca	62	1	103	67	7	101
Na	71	56	100	19	0	100
Mg	82	7	102	80	0	99
Al	0.81	0	105	1.82	1	103
Fe	4.90	0	101	4.55	0	101
Cu	0.46	0	102	0.12	0	65
Sr	0.28	0	102	1.32	1	105
Ba	0.12	0	102	0.62	1	97
Mn	1.81	1	100	1.10	0	101
Zn	0.95	0	107	1.68	1	101

表 A.4

元素	甜酒 1			甜酒 2		
	参考值	加标/(mg/L)	回收率/%	参考值	加标/(mg/L)	回收率/%
K	110 585	246	96	832	0	102
Ca	85	4	99	92	10	101
Na	68	42	98	21	0	100
Mg	63	0	97	66	6	101
Al	1.65	1	101	0.80	0	96
Fe	3.03	0	97	4.63	0	101
Cu	0.73	1	101	0.12	0	94
Sr	1.73	1	106	0.22	0	96
Ba	0.11	0	94	0.34	0	90
Mn	1.01	0	99	1.62	1	102
Zn	1.53	1	102	1.18	0	100



参与此次评估验证的实验室可以选择任何一种样品制备方式进行元素含量测定。

——两步法测定样品中元素含量:对常量元素要进行高倍稀释,对微量元素进行低倍稀释并且优先选择加内标。

——一步法测定样品中元素含量:对常量元素和微量元素都进行相同倍数的稀释并且加内标。

对任何一个样品和任何一种元素的测定都采用第一个独立测试值。如果同一实验室对同一编号的样品分成平行两份样品进行测试,每份样品为一个独立的样品。

对于可疑值的剔除,依次采用 Cochran 检验法(对方差进行检验)和 Grubbs 检验法(对均值进行检验),在 2.5% 概率下尾标为 1 的数据采用 Cochran 检验法,尾标为 2 的数据采用 Grubbs 检验法,直到没有可疑值被标记出来,或者实验室提供的原始有效数据量下降 22.2%。

在“甜葡萄酒 2”的样品中除了 Ca 元素计算所得 Horrat R 值为 2.2 之外,其他元素的值都可接受。对此样品的结果进行 Z 检验,93% 的实验室得到理想 Z 值(14 个结果),7% 的实验室 Z 值可疑(1 个结果)。因此,考虑到其他 5 个样品中,包括另一份具有同样 Ca 浓度的甜葡萄酒,Ca 的检测结果令人满意,由此可以证明此方法可行,钙的检测可以采用此方法。

对于常量元素的检测,其中有 9 个实验室使用了高倍稀释法,有 6 个实验室对常量元素和微量元素使用了相同的稀释倍数,其结果显示这两种稀释方式对测定结果没有影响。

表 A.5 钾

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
可接受量	13.00	13.00	14.00	11.00	14.00	14.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原样含量/(mg/L)	754.38	1 079.82	1 160.33	1 370.96	1 105.46	831.62
重复性限 $r$	22.45	47.32	132.68	50.64	124.78	42.92
重复性变异系数 $RSD_r/\%$	1.10	1.50	4.00	1.30	4.00	1.80
$RSD_r$ Horwitz	3.90	3.69	3.65	3.56	3.68	3.84
$r$ Horrat	0.30	0.40	1.10	0.40	1.10	0.50
再现性限 $R$	139.25	182.82	165.46	147.56	176.10	142.93
再现性变异系数 $RSD_R/\%$	6.50	6.00	5.00	3.80	5.60	6.10
$RSD_R$ Horwitz	5.90	5.59	5.53	5.39	5.57	5.82
$R$ Horrat	1.10	1.10	0.90	0.70	1.00	1.00



表 A.6 钙

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
可接受量	10.00	10.00	13.00	10.00	13.00	15.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原样含量/(mg/L)	85.37	73.43	67.68	66.00	78.35	92.39
重复性限 $r$	3.30	4.12	4.60	2.86	7.96	26.66
重复性变异系数 RSD <sub>r</sub> /%	2.10	2.00	2.40	1.50	3.60	10.20
RSD <sub>r</sub> Horwitz	5.85	5.53	5.60	5.62	5.48	5.34
$r$ Horrat	0.30	0.40	0.40	0.30	0.70	1.90
再现性限 $R$	10.68	10.45	42.58	9.51	29.85	45.60
再现性变异系数 RSD <sub>R</sub> /%	4.40	5.00	22.20	5.10	13.50	17.40
RSD <sub>R</sub> Horwitz	8.19	8.38	8.48	8.52	8.30	8.10
$R$ Horrat	0.50	0.60	2.60	0.60	0.60	2.20

表 A.7 钠

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
可接受量	15.00	13.00	12.00	12.00	14.00	15.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原样含量/(mg/L)	50.50	24.05	71.43	18.76	67.91	21.42
重复性限 $r$	3.00	1.32	2.53	1.73	5.20	1.85
重复性变异系数 RSD <sub>r</sub> /%	2.10	1.90	1.20	3.30	2.70	3.00
RSD <sub>r</sub> Horwitz	5.85	6.54	5.55	6.79	5.60	6.6
$r$ Horrat	0.30	0.30	0.20	0.50	0.50	0.50
再现性限 $R$	9.41	6.09	15.19	6.72	13.09	6.49
再现性变异系数 RSD <sub>R</sub> /%	2.10	9.90	7.50	12.70	6.80	10.70
RSD <sub>R</sub> Horwitz	5.85	6.54	8.42	10.29	8.48	10.09
$R$ Horrat	0.30	0.30	0.90	1.20	0.80	1.10

表 A.8 镁

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
可接受量	15.00	15.00	14.00	14.00	13.00	14.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原样含量/(mg/L)	65.30	72.03	82.15	80.01	62.63	65.63
重复性限 $r$	3.43	4.29	10.27	7.25	5.32	2.27
重复性变异系数 RSD <sub>r</sub> /%	1.90	2.10	4.40	3.20	3.00	1.20
RSD <sub>r</sub> Horwitz	5.63	5.55	5.44	5.46	5.67	5.63
$r$ Horrat	0.30	0.40	0.80	0.60	0.50	0.20

表 A.8(续)

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
再现性限 $R$	15.26	16.33	29.80	20.23	15.86	13.74
再现性变异系数 $RSD_R/\%$	8.30	8.00	12.80	8.90	8.90	7.40
$RSD_R$ Horwitz	8.53	8.40	8.24	8.27	8.58	8.53
$R$ Horrat	1.00	1.00	1.60	1.10	1.00	0.90

表 A.9 铝

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
可接受量	10.00	9.00	8.00	8.00	9.00	8.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原样含量/(mg/L)	0.50	1.19	0.81	1.82	1.65	0.80
重复性限 $r$	0.19	0.11	0.22	0.15	0.15	0.05
重复性变异系数 $RSD_r/\%$	13.10	3.30	9.40	2.80	3.20	2.10
$RSD_r$ Horwitz	11.71	10.29	10.89	9.65	9.79	10.93
$r$ Horrat	1.10	0.30	0.90	0.30	0.30	0.20
再现性限 $R$	0.42	0.33	0.33	0.46	0.97	0.41
再现性变异系数 $RSD_R/\%$	29.80	10.00	14.20	8.90	20.80	18.10
$RSD_R$ Horwitz	17.75	15.59	16.50	14.61	14.84	16.56
$R$ Horrat	1.70	0.60	0.90	0.60	1.40	1.10

表 A.10 铁

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
可接受量	6.00	7.00	7.00	6.00	7.00	7.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原样含量/(mg/L)	2.86	1.71	4.90	4.55	3.03	4.63
重复性限 $r$	0.19	0.06	0.57	0.33	0.21	0.70
重复性变异系数 $RSD_r/\%$	2.30	1.30	4.10	2.60	2.40	0.50
$RSD_r$ Horwitz	9.02	9.74	8.31	8.41	8.94	8.38
$r$ Horrat	0.30	0.10	0.50	0.30	0.30	0.10
再现性限 $R$	0.20	0.29	0.99	0.34	0.34	2.52
再现性变异系数 $RSD_R/\%$	2.50	6.10	7.10	2.60	3.90	19.20
$RSD_R$ Horwitz	13.66	14.76	12.59	12.74	13.54	12.70
$R$ Horrat	0.20	0.40	0.60	0.20	0.30	1.50

表 A.11 铜

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	9.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
可接受量	7.00	10.00	8.00	10.00	8.00	10.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原始样品中含量/ (mg/L)	0.04	0.71	0.46	0.12	0.73	0.12
重复性限 $r$	0.03	0.10	0.08	0.05	0.03	0.10
重复性变异系数 $RSD_r/\%$	24.30	4.80	6.00	14.40	1.70	29.00
$RSD_r$ Horwitz	16.95	11.12	11.87	14.62	11.07	14.55
$r$ Horrat	1.40	0.40	0.50	1.00	0.20	2.00
再现性限 $R$	0.03	0.21	0.09	0.05	0.14	0.10
再现性变异系数 $RSD_R/\%$	24.30	10.40	6.80	16.40	6.80	30.10
$RSD_R$ Horwitz	25.68	16.84	17.98	22.15	16.77	22.05
$R$ Horrat	0.90	0.60	0.40	0.70	0.40	1.40

表 A.12 锶

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
可接受量	7.00	7.00	7.00	6.00	7.00	6.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原始样品中含量/ (mg/L)	1.27	0.22	0.28	1.32	1.73	0.22
重复性限 $r$	0.03	0.01	0.04	0.06	0.12	0.00
重复性变异系数 $RSD_r/\%$	1.00	1.70	5.50	1.70	2.60	0.50
$RSD_r$ Horwitz	10.19	13.25	12.76	10.13	9.72	13.30
$r$ Horrat	0.01	0.10	0.40	0.20	0.30	0.00
再现性限 $R$	0.18	0.07	0.12	0.09	0.24	0.12
再现性变异系数 $RSD_R/\%$	5.10	11.40	15.30	2.50	5.00	20.00
$RSD_R$ Horwitz	15.44	20.08	19.34	15.34	14.73	22.15
$R$ Horrat	0.30	0.60	0.80	0.20	0.30	1.00

表 A.13 钡

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
可接受量	7.00	8.00	8.00	7.00	8.00	8.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原始样品中含量/ (mg/L)	0.08	0.64	0.12	0.62	0.11	0.34

表 A. 13(续)

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
重复性限 $r$	0.01	0.38	0.01	0.16	0.01	0.06
重复性变异系数 $RSD_r/\%$	5.70	21.00	3.60	9.20	3.30	6.30
$RSD_r$ Horwitz	15.33	11.30	14.52	11.34	14.73	12.41
$r$ Horrat	0.40	1.90	0.20	0.80	0.20	0.50
再现性限 $R$	0.04	0.38	0.05	0.54	0.05	0.24
再现性变异系数 $RSD_R/\%$	18.80	21.00	13.90	30.07	15.80	24.50
$RSD_R$ Horwitz	23.23	17.12	22.00	17.18	22.32	18.80
$R$ Horrat	0.80	1.20	0.60	1.80	0.70	1.30

表 A. 14 锰

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
可接受量	9.00	10.00	9.00	10.00	8.00	8.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原样含量/(mg/L)	1.84	1.12	1.81	1.10	0.11	1.62
重复性限 $r$	0.09	0.21	0.49	0.14	0.13	0.60
重复性变异系数 $RSD_r/\%$	1.60	6.50	9.60	4.50	4.60	1.30
$RSD_r$ Horwitz	9.64	10.38	9.66	10.41	10.55	9.82
$r$ Horrat	0.20	0.60	1.00	0.40	0.40	0.10
再现性限 $R$	0.25	0.21	0.49	0.22	0.22	0.38
再现性变异系数 $RSD_R/\%$	4.80	6.50	9.60	7.10	7.10	8.30
$RSD_R$ Horwitz	14.60	15.73	14.63	15.78	15.98	14.88
$R$ Horrat	0.30	0.40	0.70	0.50	0.30	0.60

表 15 锌

统计参数	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	甜葡萄酒 1	甜葡萄酒 2
结果总数	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
可接受量	7.00	8.00	9.00	8.00	7.00	7.00
重复次数	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
原样含量/(mg/L)	1.40	2.12	0.95	1.68	1.53	1.18
重复性限 $r$	0.09	0.16	0.22	0.10	0.18	0.05
重复性变异系数 $RSD_r/\%$	2.40	2.60	8.40	2.20	4.20	1.60
$RSD_r$ Horwitz	10.03	9.43	10.65	9.77	9.91	10.30
$r$ Horrat	0.20	0.30	0.80	0.20	0.40	0.20
再现性限 $R$	0.10	0.39	0.29	0.36	0.22	0.22
再现性变异系数 $RSD_R/\%$	2.40	6.50	10.70	7.60	5.10	6.70
$RSD_R$ Horwitz	15.20	14.28	16.13	14.80	15.01	15.61
$R$ Horrat	0.20	0.50	0.70	0.50	0.30	0.40

## 参与本次实验的实验室

- State General Laboratory, NMR Lab, Nicosia Chypre;
- ANALAB CHILE S. A. , Santiago Chile
- CISTA, National Reference Laboratory Brno Czech Republic;
- Laboratório de Análises-REQUIMTE-FCT/UNL, Caparica Portugal;
- Laboratório Central de Análises-Universidade de Aveiro Portugal;
- Laboratory of National Center of Alcoholic Beverages Testing, Chisinau Republic of Moldova;
- National Research Institute of Brewing, Higashihiroshima Japon
- Instituto Nacional de Vitivinicultura, Laboratorio General, Mendoza Argentine;
- LFZ Wein und Obstbau, Klosterneuburg Autriche;
- Laboratorio Arbitral Agroalimentario, Madrid Spain;
- Laboratoire SCL de Bordeaux-Pessac France。



### 3.2.3 其他非有机类化合物

方法 OIV-MA-AS323-01A

方法类型 IV

#### 砷(AAS法)

(决议 Oeno 14/2002)

#### 1 原理

葡萄酒样去除酒精,将试样中的砷元素由五价还原为三价态,生成砷氢化物并注入原子吸收光谱仪中进行测定。

#### 2 仪器设备

##### 2.1 玻璃仪器:

2.1.1 带刻度烧瓶:50 mL,100 mL,A级。

2.1.2 带刻度移液管:1 mL,5 mL,10 mL,25 mL,A级。

2.2 水浴锅:温度 100℃。

2.3 无灰过滤装置。

##### 2.4 光谱设备:

2.4.1 原子吸收光谱仪。

##### 2.4.2 仪器条件:

2.4.2.1 空气-乙炔火焰。

2.4.2.2 砷空心阴极灯。

2.4.2.3 吸收波长:193.7 nm。

2.4.2.4 狭缝宽度:1 nm。

2.4.2.5 灯电流:7 mA。

2.4.2.6 采用氙灯扣除非特性吸收干扰。

##### 2.5 附件:

2.5.1 氢化物吸收室,连接空气-乙炔燃烧器。

2.5.2 蒸气发生器(气液分离器)。

2.5.3 惰性气体(氩气)。

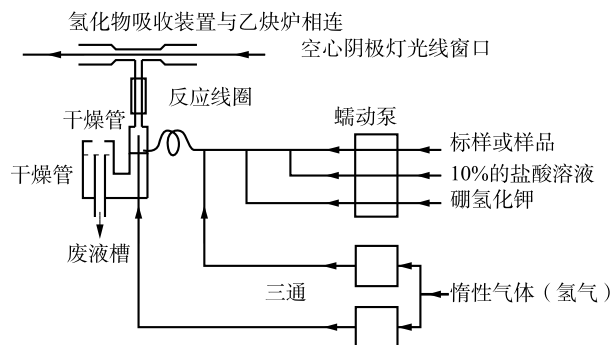


图1 氢化物发生装置

### 3 试剂

- 3.1 超纯软化水。
- 3.2 超纯硝酸:纯度 65%。
- 3.3 碘化钾(KI)。
- 3.4 10%的碘化钾( $m/V$ )。
- 3.5 浓盐酸(GR)。
- 3.6 10%的盐酸(GR)。
- 3.7 硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ )。
- 3.8 氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )。
- 3.9 0.6%的硼氢化钾〔含氢氧化钠 0.5%( $m/V$ )〕。
- 3.10 氯化钙( $\text{CaCl}_2$ ):作为干燥剂。
- 3.11 1 g/L 砷标准溶液,按照以下方法配制:

称取 1.533 9 g  $\text{As}_2\text{O}_5$ ,溶解于蒸馏水中,定容至 1 L。

- 3.12 10 mg/L 砷标准溶液:取 1 mL 砷标准溶液(3.11)于 100 mL 容量瓶中,加入 1 mL 硝酸,用超纯软化水定容至刻度线。
- 3.13 100  $\mu\text{g/L}$  砷标准使用液:取 1 mL 浓度为 10 mg/L 的砷标准溶液(3.12)于 100 mL 容量瓶中,用超纯软化水定容至刻度线。
- 3.14 砷标准工作液:浓度 0  $\mu\text{g/L}$ , 5  $\mu\text{g/L}$ , 10  $\mu\text{g/L}$ , 25  $\mu\text{g/L}$ 。依次取 0 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL 浓度为 100  $\mu\text{g/L}$  的砷标准使用液(3.13)于 4 个 100 mL 的容量瓶中,每个容量瓶中加入 10 mL 10%的碘化钾溶液和 10 mL 浓盐酸静置 1 h,软化水定容至刻度线。

### 4 样品制备

取 25 mL 样品于 100°C 水浴中蒸发,之后加入 5 mL 10%的碘化钾溶液和 5 mL 浓盐酸,定容至 50 mL,静置 1 h,用无灰过滤器过滤。同时制备空白样。

### 5 测定

用蠕动泵吸取硼氢化钠、10%的盐酸和样品。首先连续测定砷标准工作液的吸光度(3.14),吸光度读取时间为 10 s,同时做两个平行,建立校正标准曲线〔吸光度与浓度( $\mu\text{g/L}$ )关系曲线〕。

接着进行样品的测定,由曲线可以计算出样品中砷的浓度( $\mu\text{g/L}$ )。因原样品稀释了 2 倍,所以原样品中砷的浓度是测定值的 2 倍。

### 6 质量控制

通过有规律地在 5 个样品中,或者在校正溶液系列之后,或者在系列测试中,或者在测量结束时放入一份内部质量控制样品\*管理,可保证整个实验的质量控制。

两种偏差(相对标准偏差和标准偏差)与已知值相比在可接受范围内。

---

\* 样品由 Bureau Communautaire de Référence 提供,包括红葡萄酒,干白葡萄酒和甜白葡萄酒。

## 参 考 文 献

- [1] Varian Techtron,1972. Analytical methods for flame spectroscopy.
- [2] Hobbins B. ,1982. Arsenic Determination by Hydride Generation. Varian Instruments at Work.
- [3] Le Houillier R. ,1986. Use of Drierite Trap to Extend the Lifetime of Vapor Generation Absorption Cell. Varian Instruments at Work.
- [4] Varian,1994. Vapor Generation Accessory VGA-77.



# 砷

(决议 Oeno 377/2009)

## 1 原理

经硫酸和硝酸消化后,在盐酸环境中,用碘化钾把五价态的砷还原为三价态的砷,三价态的砷与硼氢化钠反应产生砷化三氢( $H_3As$ )。以氮气作为载气,砷化三氢( $H_3As$ )被带入原子吸收光谱仪中,高温条件下用无火焰原子吸收法即可测得砷的含量。

## 2 方法

### 2.1 仪器设备

2.1.1 克氏烧瓶(硼硅酸盐玻璃)

2.1.2 原子吸收光谱仪,配有砷空心阴极灯,氢化物发生器,背景校正装置和图表记录器。氢化物发生器主要部分是一个反应烧瓶,(最后可以放于磁力搅拌器上)烧瓶一个接口与氩气相连接(气流速度是 11 L/min);一个接口与石英室相连接,石英室的温度可以达到 900℃。同时,烧瓶还有用于加入反应试剂(硼氢化物)的开口。

### 2.2 试剂

所有的试剂必须确认是分析纯,绝对不含砷,所用水是使用硼硅玻璃精制的二次蒸馏水或具有相同纯度的水。

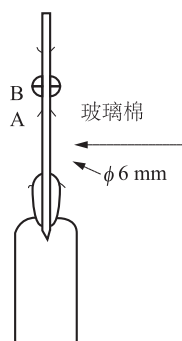


图 1 应用于砷限量测试的装置图

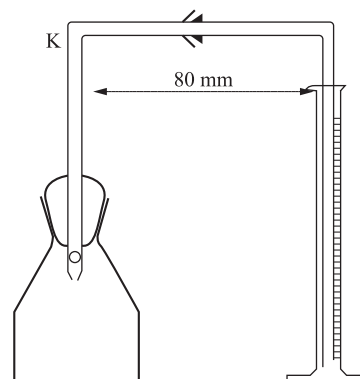


图 2 用于砷测定的装置图

2.2.1 硫酸( $\rho_{20^\circ C} = 1.84 \text{ g/mL}$ ),不含砷。

2.2.2 硝酸( $\rho_{20^\circ C} = 1.38 \text{ g/mL}$ ),不含砷。

2.2.3 盐酸( $\rho_{20^\circ C} = 1.19 \text{ g/mL}$ ),不含砷。

2.2.4 10% (m/V)碘化钾溶液。

2.2.5 2.5%硼氢化钠溶液:将 2.5 g 硼氢化钠溶于 100 mL 浓度为 4%的氢氧化钠溶液,现配现用。

2.2.6 砷参比液:推荐使用市售的砷标准液,浓度为 1 g/L,也可以自行配置,方法如下:称



取 1.320 g 三氧化二砷溶解于最少量的 20% (m/V) 的氢氧化钠溶液中,用盐酸酸化后转移到 1 000 mL 的容量瓶中,稀释约 1/2 体积,最后用蒸馏水定容至刻度线。

## 2.3 步骤

### 2.3.1 消化

取 20 mL 酒样于克氏烧瓶中,加热蒸发掉一半体积以去除酒精,冷却,加入 5 mL 硫酸,然后小心加入 5 mL 硝酸,加热消解。当溶液变为棕色时边小火加热边滴加足量硝酸直至样品变为澄清,继续加热至溶液颜色变清且上方出现白色  $\text{SO}_3$  雾气。将溶液放置冷却再加入 10 mL 蒸馏水,继续加热直至不再产生  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{SO}_3$  烟雾,冷却,重复以上步骤。

把消解好的样品放置冷却,加入数毫升蒸馏水稀释剩余的硫酸。把样品全部转移到 40 mL 的烧瓶中,反复洗涤凯氏烧瓶几次,把洗涤液与样品溶液合并,定容到刻度线。

### 2.3.2 测定

#### 2.3.2.1 样品准备

将 10 mL 消解后的样品(2.3.1)放入氢化发生器中,再加入 10 mL 盐酸和 1.5 mL 碘化钾溶液。把盛有样品的氢化发生器放置于磁力搅拌器上搅拌并接通氩气(流速:11 mL/min),10 s 之后加入 5 mL 硼氢化钠溶液。反应产生的氢化物马上被氩气带入到测量池,在那里样品发生分解和砷原子化(测量室的温度为 900°C),在此处废液被分离排出,砷元素被原子化。

#### 2.3.2.2 标准溶液的配制

利用砷参比溶液(2.2.6)配制浓度分别为 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L 和 5 mg/L 的稀释液。取各制备好的溶液 10 mL 于氢化物发生器中,按照 2.3.2.1 方法进行。

#### 2.3.2.3 测定

选取 193.7 nm 作为砷的吸收波长,用二次蒸馏水对仪器调零,所有样品进行两次重复测定,记录标准溶液及样品的吸光度并计算每个溶液的吸光度平均值。

## 2.4 结果表示

绘制标准溶液中吸光度随砷浓度变化的曲线图,吸光度与浓度之间呈线性关系,在曲线上标记样品溶液的平均吸光度就可以查出砷的浓度  $c$ 。

因酒样稀释了 2 倍,所以酒样中砷的含量为  $2c$ ,单位为 mg/L。

## 参 考 文 献

- [1] JAULMES P. et HAMELLE G. ,Trav. Soc. Pharm. Montpellier,1967,27,n°3,213-225.
- [2] JAULMES P. ,F. V. ,O. I. V. ,1967,n°238.
- [3] MEDINA B et SUDRAUD P. ,F. V. ,O. I. V. ,1983,n°770.

## 总氮(杜马法)

(决议 Oeno 13/2002)

### 1 应用范围

此方法可用于测定葡萄汁与葡萄酒中范围为 0 mg/L~1 000 mg/L 的总氮含量。

### 2 技术描述

#### 2.1 杜马斯法原理

杜马斯法(1831)应用于测定有机基质中的总氮含量。在有氧环境下,基质完全燃烧,产生的气体被铜还原后进行干燥,二氧化碳被吸附。燃烧产生的气体中的含氮物质经过还原后转化为氮气,氮气经检测器检测含量。

#### 2.2 分析原理(图 1)

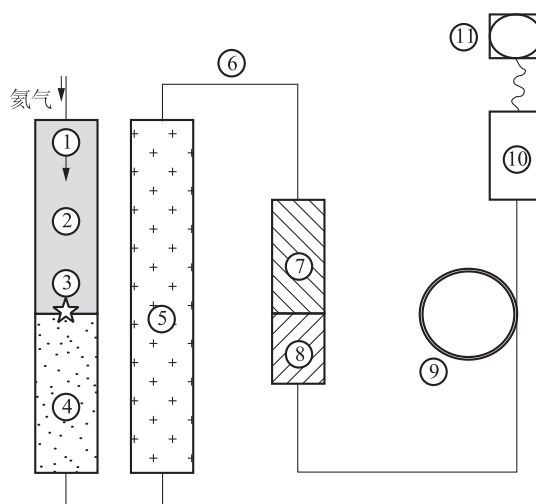


图 1 分析原理图表

- 1——在 940℃ 高温下将样品和氧气注入燃烧管中;
- 2——“瞬间”燃烧;
- 3——坩埚圈燃烧使温度升高达 1 800℃;
- 4——补充氧气氧化,使银钴合金与颗粒状三氧化二铬吸附卤素;
- 5——在 700℃ 高温下硫化物与过量的氧气被铜吸收,一氧化氮在氮气中被还原;
- 6——氮气中包含的气体有:氮气,二氧化碳和水蒸气;
- 7——非测量成分的吸附:使用吸附剂(无水高氯酸镁颗粒)吸附水蒸气(7),烧碱;
- 8——石棉(硅石与氢氧化钠结合)吸附二氧化碳;
- 9——使用色谱分离  $N_2$  和大剂量实验可能产生的甲烷;
- 10——热导气体分析仪分析(10);
- 11——信号采集和数据处理(11)。



### 3 试剂与反应溶液的准备

- 3.1 氮气(工业级)。
- 3.2 氮气(纯度 99.999 94%)。
- 3.3 氧化铬(颗粒状三氧化二铬)。
- 3.4 氧化钴(四氧化三钴银钴合金颗粒)。
- 3.5 石英棉。
- 3.6 铜(片状还原铜粒)。
- 3.7 烧碱石棉(氢氧化钠处理的硅石)。
- 3.8 颗粒状无水高氯酸镁。
- 3.9 氧气(纯度 99.995%)。
- 3.10 阿托品。
- 3.11 谷氨酸-氯化氢。
- 3.12 软化水。
- 3.13 锡舟。

### 4 仪器

- 4.1 带 25 mL 离心管的离心机。
- 4.2 氮分析器。
- 4.3 金属坩埚。
- 4.4 石英反应管。
- 4.5 精密天平(范围:0.5 mg~30 g)。
- 4.6 锅舟载体。
- 4.7 燃烧炉。
- 4.8 锡舟折叠装置。
- 4.9 样品转换器。
- 4.10 电脑和打印机。

### 5 样品处理

通氮气鼓泡 5 min~10 min 脱气,葡萄汁在 10℃下 4 200 g 离心力条件下离心(4.1)10 min。

### 6 仪器操作

打开仪器的测量程序(4.2 和 4.10)。  
仪器升温。

#### 6.1 主要分析参数

氮分析仪(4.2)需根据以下条件设定:

载气:氮气(3:2)。

金属坩埚:每 80 次分析清空一次。

氧化管(4.4):加热到 940℃,在氧化铬(3.3)与氧化钴(3.4)下面垫上石英棉(3.5)。管子和试剂需要每分析 4 000 次更换一次。

反应管(4.4):含有石英棉(3.5)支撑的铜颗粒(3.6),每分析450次后更换铜。

吸收管:包含2/3烧碱石棉(3.7)和1/3无水高氯酸镁(3.8)。每分析200个样需更换全部吸收剂。

需氧量与燃烧的有机物数量成正比:葡萄汁的氧气进样阀开启时间为15 s,而葡萄酒的为5 s。

注:使用过的金属送往特定地点进行销毁或专门回收。

## 6.2 制定标准范围

直接用锡舟称量2份4 mg~6 mg的阿托品样品。标定线需通过3个点(原点=方片净重)。

## 6.3 内标的配制

通常在分析过程的开始或中途使用内标。

使用谷氨酸(600 mg/L的盐酸盐的形式,溶于蒸馏水)进行内部测定。

谷氨酸相对分子质量为183.59。

氮相对原子质量为14.007。

$$\frac{183.59 \times 0.6}{14.007} = 7.864 \text{ g/L}$$

称量7.864 g谷氨酸并用蒸馏水稀释到600 mg/L的溶液。先将原溶液稀释以得到300 mg/L的溶液,再稀释50%得到150 mg/L的溶液。

## 6.4 样品处理

6.4.1 用精密天平(4.5)于锡舟上称量20  $\mu\text{L}$ (精确至0.01 mg)葡萄汁或200  $\mu\text{L}$ 葡萄酒。每个样品重复3次以上步骤。

6.4.2 记录质量。

6.4.3 把锡舟小心转移到锡舟架(4.6)上。

6.4.4 将锡舟放置到燃烧炉中并将温度设置到约60°C,直到液体完全蒸发(此过程至少需要1 h)。

6.4.5 使用适当的工具折叠压碎锡箔方片并按顺序放入转换器(4.9)中。

## 7 计算结果

计算结果单位为g/L并保留4位有效数字。

## 8 结果核对

通过质量、温度和体积进行综合计算。

## 9 方法性能参数

实验室数量	平均含量	重复性	重现性
11	591 mg/L	43 mg/L	43 mg/L

## 参考文献

[1] Dumas A. (1826): Annales de chimie, 33, 342.

[2] Buckee G. K. (1994): Determination of total nitrogen in Barley, Malt and Beer by Kjeldahl procedures and the Dumas combustion method. Collaborative trial. J. Inst. Brew., 100, 57-64.



## 总 氮

### 1 原理

在催化剂催化作用下用硫酸将样品湿式消解,用氢氧化钠解离出氨气,用滴定法测定。

### 2 仪器设备

#### 2.1 消解装备

300 mL 凯氏烧瓶:放置于金属电热套中,适当立起瓶子以固定设备,瓶颈倾斜 45°。

#### 2.2 蒸馏仪器

1 L 圆底烧瓶一个,配有长 30 cm,直径 2.5 cm 蒸馏管或同等功能装置。蒸汽从装置的底部产生,进入竖直放置、长 30 cm、内径 1 cm 的柱状冷凝管。冷凝液体通过底部引流管流入锥形接收瓶中。也可以使用例如总酸度章节中使用的水蒸气蒸馏装置或者与“空白与样品测试”段里面描述的装置类似的其他装置。

### 3 试剂

3.1 硫酸,不含游离氨( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.83 \text{ g/mL} \sim 1.84 \text{ g/mL}$ )。

3.2 苯甲酸。

3.3 催化剂:

硫酸铜( $\text{CuSO}_4$ )10 g。

硫酸钾( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )100 g。

3.4 30%的氢氧化钠:浓氢氧化钠溶液( $\rho_{20} = 1.33 \text{ g/mL}$ )稀释到 30% (m/V)。

3.5 0.1 mol/L 盐酸。

3.6 指示剂:

甲基红 100 mg

亚甲基蓝 5 mg

乙醇(50%) 100 mL

3.7 硼酸溶液:

硼酸 40 g

水定容至 1 000 mL

加入 5 滴甲基红和 0.1 mL 0.1 mol/L 的盐酸溶液,此溶液中将变为粉红色。

3.8 硫酸铵溶液:

硫酸铵( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 6.608 g

水定容至 1 000 mL

色氨酸( $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2$ )(理论上每 100 g 色氨酸含氮 13.72 g)。

### 4 测定步骤

在 300 mL 的凯氏烧瓶(2.1)中加入 25 mL 葡萄酒、2 g 苯甲酸(3.2)、10 mL 硫酸

(3.1), 再加入 2 g~3 g 催化剂。将凯氏烧瓶放置在金属加热套(2.1)上, 瓶颈倾斜 45°, 加热直至溶液的颜色澄清, 再继续加热 3 min。

冷却后, 把溶液转移至盛有 30 mL 蒸馏水的 1 L 圆底烧瓶中, 把凯氏烧瓶洗涤几次并将洗涤液一起转移到烧瓶中。冷却烧瓶, 加入 1 滴 1% 的酚酞溶液, 再加入约 40 mL 30% 的氢氧化钠(3.4), 使溶液呈现碱性。在加入试剂时要不断冷却溶液。将此溶液蒸馏 200 mL~250 mL 到盛有 30 mL 40 g/L 的硼酸溶液的烧瓶中。

在蒸馏液加入 5 滴指示剂(3.6), 用 0.1 mol/L 的盐酸滴定蒸馏出的氨气。

注: 可以用挥发酸章节中提到的水蒸气蒸馏装置快速蒸馏出氨气。该情况下, 依次加入 40 mL~45 mL 氢氧化钠液体和 50 mL~60 mL 加入混合器前预先在凯氏烧瓶中稀释过 10 倍的内容物。在此装置中的蒸馏管中加入 40 mL~50 mL 30% 之前稀释的样品反应 10 min。

## 5 计算

酒中的总氮量为  $0.56 \times n$ , 单位是 g/L。n 为消耗 0.1 mol/L 盐酸的体积。

## 6 空白和样品的测定

用于总氮测定的蒸馏装置必须满足如下条件:

a) 蒸馏烧瓶加入 40 mL~45 mL 的氢氧化钠溶液、50 mL 水、2 g 苯甲酸、5 g 硫酸钾和 50 mL 含 10 mL 浓硫酸的稀硫酸。将此混合液进行蒸馏, 用 30 mL 滴加 5 滴指示剂(3.6)的 40 g/L 硼酸溶液吸收 200 mL 体积的蒸馏物。加入 0.1 mL 0.1 mol/L 盐酸直到指示剂变色。

b) 在同样的条件下蒸馏 10 mL 0.1 mol/L 的硫酸铵溶液。这种情况下蒸馏液中需加入 10 mL~10.1 mL 的盐酸使指示剂变色。

c) 用最开始使用色氨酸做样品检查整个方法(包括湿式消解和蒸馏)适用性。大概需要 19.5 mL~19.7 mL 0.1 mol/L 的盐酸使其变色。



## 硼

### 1 原理

用旋转蒸发仪把样品体积浓缩一半以蒸发掉酒精,浓缩后的样品上交联聚乙烯吡咯烷酮柱,色素被吸附去除,定量收集流出液。液体中硼化合物在 pH 为 5.2 时甲亚胺-H 酸络合,络合物在 420 nm 波长下通过比色即可测得硼的含量。

### 2 仪器

- 2.1 旋转蒸发仪。
- 2.2 分光光度计:测量波长范围 300 nm~700 nm。
- 2.3 比色皿:光程 1 cm。
- 2.4 层析柱:柱内径 1 cm,长度 15 cm,交联聚乙烯吡咯烷酮填充层 8 cm。

### 3 试剂

- 3.1 甲亚胺-H(4-羟基-5-(2-羟基苄基氨基)-2,7-萘二磺酸)。
- 3.2 甲亚胺 H 溶液:称取 1 g 甲亚胺 H 和 2 g 抗坏血酸于 100 mL 容量瓶中,加入 50 mL 双蒸水,微微加热使之溶解,定容至刻度线。该溶液冷藏可保存 2 d。
- 3.3 pH5.2 的缓冲溶液:称取 3 g EDTA(乙二胺四乙酸二钠)溶解于 150 mL 双蒸水中,再加入 125 mL 乙酸( $\rho_{20}=1.05$  g/mL)和 250 g 乙酸铵( $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ),溶解后用 pH 计测定其 pH,如果 pH 不到 5.2 需进行调整。
- 3.4 100 mg/L 的硼储备标准液:推荐使用市售的 100 mg/L 的硼标准液。也可以自行配制:称取 0.571 g 在 50℃下恒重的硼酸( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )溶解于 500 mL 双蒸水,最后定容至 1 L。
- 3.5 1 mg/L 的硼标准溶液:把 100 mg/L 的硼储备液(3.4)用双蒸水稀释 100 倍,即得 1 mg/L 的硼标准溶液。
- 3.6 交联聚乙烯吡咯烷酮或 PVPP(查阅国际葡萄酒酿造法典)。

### 4 步骤

在 40℃下,用旋转蒸发仪把 50 mL 葡萄酒样品中的酒精浓缩至 25 mL,去除酒精。加双蒸水定容至 50 mL,取此溶液 5 mL 上 PVPP 层析柱(2.4),直到样品中的色素完全被吸附去除。收集流出液和水洗脱液于 50 mL 容量瓶中,用双蒸水定容至刻度线。

比色测定步骤如下:取 5 mL 洗脱液于 25 mL 的容量瓶中,加入 15 mL 双蒸水稀释,再加入 5 mL 甲胺 H 溶液(3.2)和 4 mL pH5.2 的缓冲溶液,用双蒸水定容至刻度线。

静置 30 min,测量 420 nm 波长下的吸光度  $A_s$ 。使用双蒸水对分光光度计进行调零。

取 5 mL 甲胺 H 溶液(3.2)和 4 mL pH5.2 的缓冲溶液于 25 mL 容量瓶中,用双蒸水定容至刻度线,此溶液作为空白,静置 30 min,在与样品测定一样的条件下读取吸光度  $A_b$ 。吸光度值必须在 0.20~0.24 之间,如果大于此数值则说明水中或者试剂存在硼污染物。

配制标准曲线



取 1 g~10 g 硼酸于一系列 25 mL 的容量瓶中,即对应 1 mL~10 mL 含硼 1 mg/L 的硼标准溶液,接着按 4 所述步骤操作。以吸光度( $A_s - A_b$ )对硼酸的浓度作图,校准曲线经过原点。

$A_s$ ——样品的吸光率;

$A_b$ ——空白溶液的吸光率。

## 5 结果计算

通过内插法利用测吸光度( $A_s - A_b$ ),查曲线得到样品的浓度  $E$  即 5 mL 洗脱液(相当于 0.5 mL 酒样)中硼的含量( $\mu\text{g/L}$ ),每升酒样含硼的毫克数  $B$  计算如下:

$$B(\text{mg/L}) = E/0.5$$

## 参 考 文 献

[1] WOLF B., Soil Science and Plant Analysis, 1971, 2(5), 363-374 et 1974, 5(1), 39-44.

[2] CHARLOT C. and BRUN S., F. V., O. I. V., 1983, n°771.

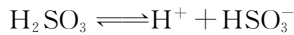


## 二氧化硫(滴定法)

(决议 Oneo 377/2009)

### 1 定义

游离二氧化硫是葡萄汁或葡萄酒中以  $\text{H}_2\text{SO}_3$  和  $\text{HSO}_3^-$  形式存在的二氧化硫,其电离平衡取决于 pH 和温度。



$\text{H}_2\text{SO}_3$  表示分子态的二氧化硫。

总二氧化硫是指葡萄酒中所有状态的二氧化硫,包括游离态的二氧化硫和与其他成分结合的二氧化硫。

### 2 游离态和总二氧化硫

#### 2.1 原理

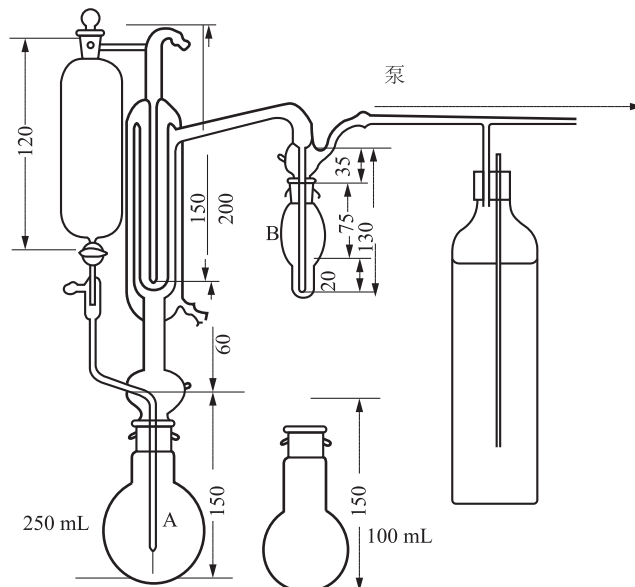
样品中通入空气或氮气把二氧化硫带出,再通入到中性过氧化氢的稀溶液中,二氧化硫被氧化固定下来。用氢氧化钠标准溶液滴定生成硫酸即可得到游离二氧化硫的含量。游离态二氧化硫在低温( $10^\circ\text{C}$ )时从葡萄酒中被气体夹带出来。

葡萄酒中总二氧化硫是在高温下被气体夹带出来(约为  $100^\circ\text{C}$ )。

#### 2.2 方法

##### 2.2.1 设备

所用设备应与图 1 所示的一致,特别是冷凝管部分。



注:仪器测量单位为毫米(mm)。冷凝管内部4条同心管直径分别为45 mm,34 mm,27 mm和10 mm。

图 1

连接起泡器 B 的供气管路末端是一个 1 cm 直径的小圆球,围绕球面最大周长处,有 20 个直径为 0.2 mm 小孔。供气管路的末端也可连接烧结玻璃盘以产生大量非常小的气泡,保证气体与液体的充分接触。

流经装置的气体速率应约为 40 L/h。仪器右侧缓冲瓶用于限制由抽水泵射水 20 cm~30 cm 时产生的负压。在气泡发生器与烧瓶之间设有半微毛细管的流量表以控制流速。

## 2.2.2 试剂

2.2.2.1 磷酸:85%的磷酸( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.71 \text{ g/mL}$ )。

2.2.2.2 9.1 g/L 的过氧化氢溶液。

2.2.2.3 指示剂:

甲基红	100 mg
次甲基蓝	50 mg
50%(V/V)酒精	100 mL

2.2.2.4 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液

## 2.2.3 游离二氧化硫含量的测定

测定前酒样要装满容器,密封,在 20°C 下储存 2 d。

### 2.2.3.1 步骤

取 50 mL 样品和 15 mL 磷酸缓冲液于 250 mL 圆底烧瓶(A)中,将烧瓶连接到冷凝管上。

在气体发生器(B)中加入 2 mL~3 mL 过氧化氢溶液(2.2.2.2),2 滴指示剂(2.2.2.3),并用 0.01 mol/L 的氢氧化钠(2.2.2.4)中和过氧化氢,把气体发生瓶(B)连接到装置上。

通入空气(或氮气)15 min,二氧化硫被带出并被氧化为硫酸,取下梨型瓶用 0.01 mol/L 的氢氧化钠(2.2.2.4)滴定生成的酸,记录消耗的氢氧化钠的体积  $n$  mL。

### 2.2.3.2 结果表示

游离二氧化硫结果以整数表示,单位 mg/L。

$n$  为消耗的 0.01 mol/L 氢氧化钠的体积,单位 mL,游离二氧化硫的量为  $6.4 n$ 。

## 2.2.4 总二氧化硫的测定

### 2.2.4.1 步骤

对于总二氧化硫的含量  $\leq 50 \text{ mg/L}$  的样品:

取 50 mL 样品和 15 mL 磷酸溶液(2.2.2.1)于 250 mL 圆底烧瓶(A)中,连接到装置上。

注:如果是葡萄汁应该继续采用 1978 年出版的汇编中的方法。

对于总二氧化硫的含量  $> 50 \text{ mg/L}$  的样品:

取 20 mL 样品和 5 mL 磷酸(2.2.2.1)于 250 mL 圆底烧瓶(A)中,连接到装置上。

在起泡瓶(B)中加入 2 mL 或 3 mL 过氧化氢溶液(2.2.2.2),并用 0.01 mol/L 的氢氧化钠(2.2.2.4)中和过氧化氢。使用高度为 4 cm~5 cm 的小火直接加热圆底烧瓶,使瓶中的酒样沸腾,瓶底不要放金属丝网,要放置在中间有直径 30 mm 空心的圆盘上以防沉积在瓶壁的提取物过度受热焦化。

在沸腾的状态下通空气(或氮气)15 min,总二氧化硫被带出并被氧化为硫酸,用 0.01 mol/L 的氢氧化钠(2.2.2.4)滴定生成的酸,记录消耗的氢氧化钠的体积  $n$  mL。



#### 2.2.4.2 结果表示

每升样品中总二氧化硫的含量:

低含量的样品中的二氧化硫: $6.4 \times n$

其他样品中的二氧化硫: $16 \times n$

#### 2.2.4.3 重现性

50 mL 测试样( $<50$  mg/L),  $r=1$  mg/L

20 mL 测试样( $>50$  mg/L),  $r=6$  mg/L

#### 2.2.4.4 再现性( $R$ )

50 mL 测定样( $<50$  mg/L),  $R=9$  mg/L

20 mL 测定样( $>50$  mg/L),  $R=15$  mg/L

## 参 考 文 献

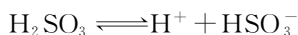
[1] PAUL F., Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein, 1958, ser. A, 821.

## 二氧化硫(碘量法)

(决议 Oeno 377/2009)

### 1 定义

游离二氧化硫是葡萄汁或葡萄酒中以  $\text{H}_2\text{SO}_3$  和  $\text{HSO}_3^-$  形式存在的二氧化硫,其电离平衡取决于 pH 和温度。



$\text{H}_2\text{SO}_3$  表示分子态的二氧化硫。

总二氧化硫是指葡萄酒中所有状态的二氧化硫,包括游离态的二氧化硫和结合态二氧化硫。

### 2 游离态和总二氧化硫

2.1 游离二氧化硫浓度通过碘直接滴定得到。结合态二氧化硫浓度通过把样品加碱水解后滴定得到。游离态二氧化硫和结合态二氧化硫相加所得即为总二氧化硫的浓度。

#### 2.2 快速法

##### 2.2.1 试剂

2.2.1.1 EDTA:乙二胺四乙酸二钠。

2.2.1.2 4 mol/L 氢氧化钠溶液(160 g/L)

2.2.1.3 10%(V/V)稀硫酸:取适量的浓硫酸( $\rho_{20}=1.84$  g/mL)稀释到所需体积。

2.2.1.4 5 g/L 淀粉溶液:取 5 g 淀粉于 500 mL 水中,搅拌同时加热使之沸腾 10 min,再加入 200 g 氯化钠,冷却,定容至 1 L。

2.2.1.5 0.025 mol/L 的碘溶液

##### 2.2.2 游离态二氧化硫

取 50 mL 葡萄酒、5 mL 淀粉溶液、30 mg EDTA、3 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  于 500 mL 锥形瓶中,摇匀,马上用 0.025 mol/L 的碘溶液进行滴定,等溶液颜色变为蓝色,并保持 10 s~15 s 不变色,记录消耗的碘溶液体积  $n$  mL。

##### 2.2.3 结合态二氧化硫

加入 8 mL 浓度为 4 mol/L 的氢氧化钠,摇匀,静置 5 min。在剧烈搅拌的同时将样液一次性倒入一个盛有 10 mL 硫酸的烧杯内,摇匀。马上用 0.025 mol/L 的碘溶液进行滴定,记录消耗的体积  $n'$  mL。

再加入 20 mL 氢氧化钠溶液,摇晃一次,静置 5 min,用 200 mL 冰水稀释,在剧烈搅拌下一次性将液体迅速转移到盛有 30 mL 硫酸的试管中,马上用 0.025 mol/L 的碘溶液滴定游离态二氧化硫,记录消耗的碘溶液体积  $n''$ 。

### 3 结果计算

每升葡萄酒中游离态二氧化硫的含量: $32n$ 。

每升葡萄酒中总二氧化硫含量: $32(n+n'+n'')$



注1:二氧化硫浓度含量低的红葡萄酒,需要对0.025 mol/L的碘溶液进行稀释(如稀释到0.01 mol/L),这时二氧化硫计算公式中的系数由32改为12.8.

注2:滴定终点的判断可以借助普通电灯发出的灯光透射过铬酸钾溶液后形成的黄光,或直接用钠灯发出的黄光,照射葡萄酒容器底部,滴定反应应该在暗室中进行,观察酒液的透明性:当淀粉指示终点到达时样品立刻变的不透明。

注3:当二氧化硫的含量接近或者超过限量值时,总二氧化硫的测定最好用标准方法。

注4:如果特别要求测定游离态二氧化硫,在测试前需把样品密封置于20℃条件下存储2 d,之后在20℃下进行测定。

注5:因为在酸性环境中碘能够氧化一些物质,对于准确度要求更高的实验,用于滴定的碘溶液必须进行准确的测定。为保证准确性,所以在滴定前游离态二氧化硫必须与过量乙醛或丙醛合并。取50 mL酒样放入300 mL的锥形瓶中,并加入5 mL浓度为7 g/L的乙醇或5 mL浓度为10 g/L的丙醛。

盖好锥形瓶,静置至少30 min。加入3 mL硫酸溶液,并加入足量的0.025 mol/L的碘溶液至淀粉变色,记录碘溶液的体积为 $n''$  mL。此体积需要从 $n$ (测定游离二氧化硫用的碘体积)和 $n+n'+n''$ (测定总二氧化硫的碘的体积)中减去。 $n''$ 一般很小,大约为0.2 mL~0.3 mL浓度为0.025 mol/L的碘液。如果葡萄酒中加入了抗坏血酸,则 $n''$ 要大很多,至少可以通过此 $n''$ 值大概测算抗坏血酸的含量,因为1 mL浓度为0.025 mol/L碘液可以氧化4.4 g抗坏血酸。当葡萄酒中的抗坏血酸的添加量大于20 mg/L时,通过 $n''$ 的大小可以很容易测定出残余抗坏血酸的含量。

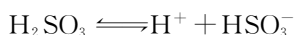
## 参 考 文 献

- [1] RIPPER M., J. Prakt. Chem., 1892, 46, 428.
- [2] JAULMES, P., DIEUZEIDE J.-C., Ann. Fals. Fraudes, 1954, 46, 9; Bull. O. I. V., 1953, 26, n°274, 52.
- [3] KIELHOFER E., AUMANN H., Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein, 1957, 7, 289.
- [4] JAULMES P., HAMELLE M<sup>me</sup> G., Ann. Fals. Exp. Chim., 1961, 54, 338.

## 二氧化硫(分子量法)

### 1 定义

游离二氧化硫是葡萄汁或葡萄酒中以  $\text{H}_2\text{SO}_3$  和  $\text{HSO}_3^-$  形式存在的二氧化硫,其电离平衡取决于 pH 和温度。



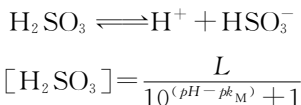
$\text{H}_2\text{SO}_3$  表示分子态的二氧化硫。

总二氧化硫是指葡萄酒中所有状态的二氧化硫,包括游离态的二氧化硫和结合态二氧化硫。

### 2 分子态二氧化硫

#### 2.1 方法原理

分子态二氧化硫  $\text{H}_2\text{SO}_3$  在游离态二氧化硫中的百分比可以通过它本身的浓度与 pH、酒精度以及温度之间的关系计算得出,在特定的温度和酒精度下,分子态二氧化硫存在如下平衡:



其中:  $L = [\text{H}_2\text{SO}_3] + [\text{HSO}_3^-]$ ; .....(1)

$$\text{pk}_M = \text{pk}_T - \frac{A\sqrt{I}}{I + B\sqrt{I}}$$

$I$ ——离子强度;

$A$ 、 $B$ ——随温度和酒精度变化的系数;

$k_T$ ——热力学解离常数;表 1 中给出了一定温度和酒精度下的  $\text{pk}_T$ ;

$k_M$ ——混合解离常数。

取离子强度平均值为 0.038,表 2 给出了一定温度和酒精度下的  $\text{pk}_M$ 。

表 3 列出了不同 pH、温度和酒精度条件下,通过式(1)计算出的分子态二氧化硫的含量。

#### 2.2 计算

已知葡萄酒的 pH 和温度,表 3 给出了一定温度下的分子态二氧化硫的百分含量  $x(\%)$ ,分子态二氧化硫的含量(mg/L)为:  $x \cdot c$

其中, $c$  为游离态二氧化硫的含量(mg/L)。

表1 热力学常数  $pK_T$  值

酒精度/% (V/V)	温度/°C				
	20	25	30	35	40
0	1.798	2.000	2.219	2.334	2.493
5	1.897	2.098	2.299	2.397	2.527
10	1.997	2.198	2.394	2.488	2.606
15	2.099	2.301	2.503	2.607	2.728
20	2.203	2.406	2.628	2.754	2.895

表2 混合解离常数  $pK_M(I=0.038)$  值

酒精度/% (V/V)	温度/°C				
	20	25	30	35	40
0	1.723	1.925	2.143	2.257	2.416
5	1.819	2.020	2.220	2.317	2.446
10	1.916	2.116	2.311	2.405	2.522
15	2.014	2.216	2.417	2.520	2.640
20	2.114	2.317	2.538	2.663	2.803

表3 分子态二氧化硫在游离态二氧化硫中的百分比( $I=0.038$ )

pH	$T=20^\circ\text{C}$				
	酒精含量/(V/V)				
	0	5	10	15	20
2.8	7.73	9.46	11.55	14.07	17.09
2.9	6.24	7.66	9.40	11.51	14.07
3.0	5.02	6.18	7.61	9.36	11.51
3.1	4.03	4.98	6.14	7.58	9.36
3.2	3.22	3.99	4.94	6.12	7.58
3.3	2.58	3.20	3.98	4.92	6.12
3.4	2.06	2.56	3.18	3.95	4.92
3.5	1.64	2.04	2.54	3.16	3.95
3.6	1.31	1.63	2.03	2.53	3.16
3.7	1.04	1.30	1.62	2.02	2.53
3.8	0.83	1.03	1.29	1.61	2.02
$T=25^\circ\text{C}$ 酒精含量/(V/V)					
2.8	11.47	14.23	17.15	20.67	24.75
2.9	9.57	11.65	14.12	17.15	22.71
3.0	7.76	9.48	11.55	14.12	17.18
3.1	6.27	7.68	9.40	11.55	14.15
3.2	5.04	6.20	7.61	9.40	11.58
3.3	4.05	4.99	6.14	7.61	9.42
3.4	3.24	4.00	4.94	6.14	7.63
3.5	2.60	3.20	3.97	4.94	6.16
3.6	2.07	2.56	3.18	3.97	4.55
3.7	1.65	2.05	2.54	3.18	3.98
3.8	1.32	1.63	2.03	2.54	3.18



表 3(续)

pH	T=20℃ 酒精含量/%(V/V)				
	0	5	10	15	20
T=30℃					
2.8	18.05	20.83	24.49	29.28	35.36
2.9	14.89	17.28	20.48	24.75	30.29
3.0	12.20	14.23	16.98	20.71	25.66
3.1	9.94	11.65	13.98	17.18	21.52
3.2	8.06	9.48	11.44	14.15	17.88
3.3	6.51	7.68	9.30	11.58	14.75
3.4	5.24	6.20	7.53	9.42	12.08
3.5	4.21	4.99	6.08	7.63	9.84
3.6	3.37	4.00	4.89	6.16	7.98
3.7	2.69	3.21	3.92	4.95	6.44
3.8	2.16	2.56	3.14	3.98	5.19
pH	T=35℃ 酒精/%(V/V)				
	0	5	10	15	20
2.8	22.27	24.75	28.71	34.42	42.18
2.9	18.53	20.71	24.24	29.42	36.69
3.0	15.31	17.18	20.26	24.88	31.52
3.1	12.55	14.15	16.79	20.83	26.77
3.2	10.24	11.58	13.82	17.28	22.51
3.3	8.31	9.42	11.30	14.23	18.74
3.4	6.71	7.63	9.19	11.65	15.49
3.5	5.44	6.16	7.44	9.48	12.71
3.6	4.34	4.95	6.00	7.68	10.36
3.7	3.48	3.98	4.88	6.20	8.41
3.8	2.78	3.18	3.87	4.99	6.80
T=40℃					
2.8	29.23	30.68	34.52	40.89	50.14
2.9	24.70	26.01	29.52	35.47	44.74
3.0	20.67	21.83	24.96	30.39	38.85
3.1	17.15	18.16	20.90	25.75	33.54
3.2	14.12	14.98	17.35	21.60	28.62
3.3	11.55	12.28	14.29	17.96	24.15
3.4	9.40	10.00	11.70	14.81	20.19
3.5	7.61	8.11	9.52	12.13	16.73
3.6	6.14	6.56	7.71	9.88	13.77
3.7	4.94	5.28	6.22	8.01	11.25
3.8	3.97	4.24	5.01	6.47	9.15

## 参 考 文 献

- [1] BEECH F. W. & TOMAS M<sup>me</sup> S. ,Bull. O. I. V. ,1985,58,564-581.
- [2] USSEGLIO-TOMASSET L. & BOSIA P. D. ,F. V. ,O. I. V. ,1984,n°784.

## 二氧化硫(葡萄汁)

(参考方法:用于葡萄汁样品的步骤)  
(决议 Oneo 377/2009)

### 1 仪器

见 2.2.1 OIV-MA-AS323-04A。

### 2 试剂

磷酸( $\rho_{20} = 1.71 \text{ g/mL}$ )稀释到 25% ( $m/V$ )。

其他试剂见 OIV-MA-AS323-04A 中 2.2.2。

### 3 步骤

向控制器的球型瓶 A 中加入 50 mL 葡萄汁和 5 mL 25% ( $m/V$ ) 磷酸,安装妥当。

下面步骤如 OIV-MA-AS323-04A 中 2.2.4.1。

### 4 结果计算

消耗的 0.01 mol/L 氢氧化钠标准溶液的体积为  $n$  (mL), 则总的二氧化硫的含量为  
6.4  $n$  (mg/L)



## 汞(原子荧光法)

(决议 Oeno 377/2009)

### 1 适用范围

该方法适用于葡萄酒中浓度范围在  $0 \mu\text{g/L} \sim 10 \mu\text{g/L}$  汞的分析测定。

### 2 方法说明

#### 2.1 方法原理

2.1.1 在酸性条件和高锰酸钾作用下,加热回流消化葡萄酒。

2.1.2 未消耗完的高锰酸钾用羟胺盐酸盐还原。

2.1.3 还原二价汞(氯化亚锡还原二价汞生成单质汞)。

2.1.4 室温条件下,汞蒸汽由载气(氙气)带出。

2.1.5 使用原子荧光分光光度计在  $254 \text{ nm}$  波长下测定单原子态的 Hg 含量。一定量的单原子汞蒸汽在汞灯照射下被激发,当原子从激发态回到基态时发出荧光,通过光电检测器定量检测汞的含量,为了得到好的线性,需要消除记忆效应的影响。

#### 2.2 分析原理(图 1)

蠕动泵吸取氯化亚锡溶液、空白溶液(含 1%硝酸的去离子水)及消化处理的葡萄酒样。

汞随着氙气被带到一个气液分离器中,再经过干燥管后,通过荧光可以检测到汞的存在。然后,气体流过高锰酸钾溶液以吸收汞。

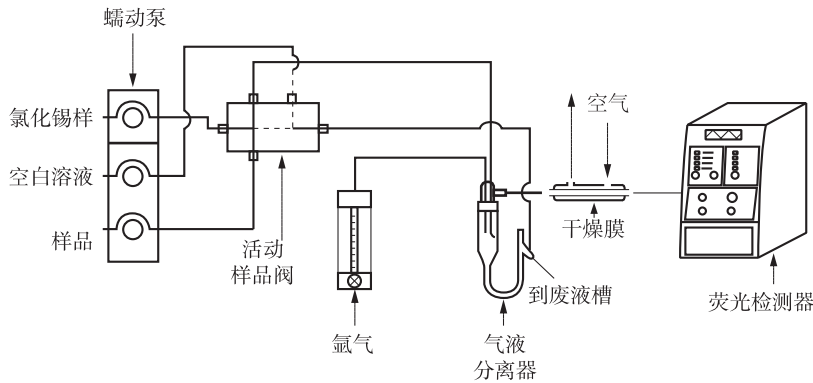


图 1 汞含量分析装置

### 3 试剂准备

3.1 超纯软化水。

3.2 65%的超纯硝酸。

3.3 空白:含 1%硝酸的超纯软化水。

- 3.4 硝酸溶液 5.6 mol/L:量取 400 mL 硝酸,加入到 1 000 mL 容量瓶中,用软化水定容至刻度。
- 3.5 硫酸( $d=1.84$ )。
- 3.6 硫酸溶液 9 mol/L:取 48.91 mL 98%的浓硫酸加入装有一定的蒸馏水的烧杯中,转移液体至 1 000 mL 的容量瓶中,反复清洗烧杯 3 次及以上,将洗涤液导入容量瓶中,定容至 1 000 mL 备用。
- 3.7 高锰酸钾。
- 3.8 5%高锰酸钾溶液:50 g 高锰酸钾溶于水,再用水定容至 1 000 mL。
- 3.9 盐酸羟胺。
- 3.10 还原溶液:称取 12 g 羟胺盐酸溶于 100 mL 软化水中。
- 3.11 氯化亚锡( $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )。
- 3.12 浓盐酸。
- 3.13 氯化亚锡溶液:称取 40 g 氯化亚锡溶于 50 mL 盐酸中,再用水定容到 200 mL。
- 3.14 1 g/L 的汞标准溶液:在 12%的硝酸溶液中溶解 1 708 g 的  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。
- 3.15 10 mg/L 的汞参比溶液:取 1 mL 汞标准溶液于 100 mL 的容量瓶中,添加 5 mL 硝酸,用水定容至刻度。
- 3.16 50 mg/L 的汞溶液:取 1 mL 10 mg/L 的汞参比溶液于 200 mL 的容量瓶中,加入 2 mL 硝酸,用水定容至刻度。

## 4 仪器

### 4.1 玻璃器皿:

- 4.1.1 100 mL、200 mL 及 1 000 mL 容量瓶(A 级)。
- 4.1.2 0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、5 mL、10 mL 及 20 mL 的移液管(A 级)。
- 4.1.3 注意事项:玻璃器皿在使用前必须用 10%硝酸浸泡 24 h,然后再用去离子水冲洗干净。

### 4.2 消化装置(图 2)。

### 4.3 可控温电热套。

### 4.4 蠕动泵。

### 4.5 冷蒸汽发生器、气液分离器。

### 4.6 干燥管(吸湿膜):置于检测器前面并被空气(由压缩机提供)全覆盖。

### 4.7 分光荧光计:

#### 4.7.1 发射 254 nm 波长的汞灯。

#### 4.7.2 原子荧光检测器。

### 4.8 计算机系统:

#### 4.8.1 具有调整蒸汽发生器和原子荧光检测器性能参数及校准和结果计算功能的软件。

#### 4.8.2 打印机。

### 4.9 惰性气体气瓶(氩气)。



## 5 校准溶液及样品的制备

### 5.1 校准溶液系列(0 $\mu\text{g/L}$ 、0.25 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ )

分别取 0 mL、0.5 mL、1.0 mL 和 2.0 mL 50  $\mu\text{g/L}$  的汞溶液于 4 个 100 mL 的容量瓶中,加入 1% 的硝酸,用水定容到刻度。

### 5.2 样品准备(图 2)

酒样的消化在硼硅酸盐耐热玻璃装置中进行。酒样蒸馏玻璃装置由三部分组成,250 mL 的圆底烧瓶,蒸气回流室,冷却系统。

移液管移取 20 mL 葡萄酒样于 250 mL 的反应瓶中,安装好消化装置。

缓慢加入 5 mL 硫酸和 10 mL 硝酸,放置过夜。

在回流条件下缓慢加热直到氮化物蒸汽消失,冷却。收集冷凝蒸汽到反应瓶中,并用去离子水冲洗反应瓶。将反应烧瓶中的液体倒入 100 mL 的容量瓶中。加入硼氢化钾溶液直到颜色保持不变。用还原溶液溶解二氧化锰沉淀( $\text{MnO}_2$ )。再用水定容。

用软化水做一次空白实验。

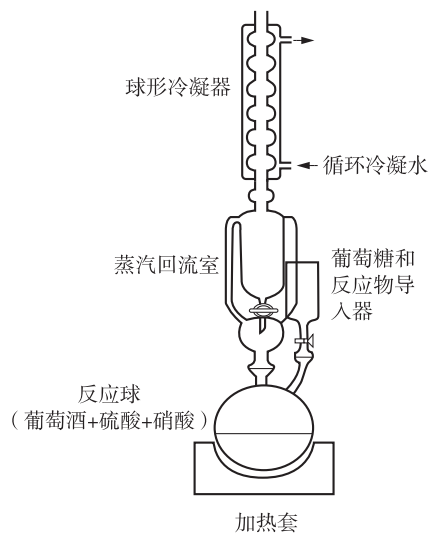


图 2 消化装置示意图

## 6 操作程序

### 6.1 分析方法

打开原子荧光光度计,预热 15 min 使之稳定。蠕动泵依次吸入空白、氯化亚锡、测试液(5.1 或者 5.2),检查确保液汽发生器中有气泡产生。继续依次吸入标准溶液(5.1),打开蒸汽发生程序。电脑软件绘制出校准曲线[根据汞的含量( $\mu\text{g/L}$ )而发出的荧光百分比]。然后开始测试样品(5.2)。

### 6.2 自检

每 5 个测试完成后会自动进行一次空白分析和校准分析,用来校正荧光分光计。

## 7 结果表示

结果由计算机软件计算并以浓度( $\mu\text{g/L}$ )表示,稀释5倍酒样也应该计算在内,进一步得出酒样中汞含量。

## 8 结果验证

做出校准曲线和每5个样品之后,通过测定已知汞含量的参比溶液来进行质量控制。参考物质可以选用红葡萄酒、干白葡萄酒或者甜白葡萄酒。

控制限为 $\pm 2S_R$ ( $2S_R$ :重现性范围)。

不确定度计算,红葡萄酒: $3.4 \mu\text{g/L} \pm 0.8 \mu\text{g/L}$ ;干白葡萄酒: $2.8 \mu\text{g/L} \pm 0.9 \mu\text{g/L}$ 。

## 参 考 文 献

- [1] CAYROL M. ,BRUN S. ,1975. Dosage du mercure dans les vins. Feuille Vert de l'O. I. V. n°371.
- [2] REVUELTA D. ,GOMEZ R. ,BARDON A. ,1976. Dosage du mercure dans le vin par la méthode des vapeurs froides et spectrométrie d'absorption atomique. Feuille Vert de l'O. I. V. n°494.
- [3] CACHO J. ,CASTELLS J. E. ,1989. Determination of mercury in wine by flameless atomic absorption spectrophotometry. Atomic Spectroscopy, vol. 10, n°3.
- [4] STOCKWELL P. B. ,CORNS W. T. ,1993. The role of atomic fluorescence spectrometry in the automatic environmental monitoring of trace element analysis. Journal of Automatic Chemistry, vol. 15, n°3, p 79-84.
- [5] SANJUAN J. ,COSSA D. ,1993. Dosage automatique du mercure total dans les organismes marins par fluorescence atomique. IFREMER, Rapport d'activité.
- [6] AFNOR,1997. Dosage du mercure total dans les eaux par spectrométrie de fluorescence atomique. XPT 90-113-2.
- [7] GAYE J. , MEDINA B. , 1998. Dosage du mercure dans le vin par analyse en flux continu et spectrofluorimétrie. Feuille Vert de l'O. I. V. n°1070.

## ICP-MS 法进行多元素分析

(OIV-Oeno 344 – 2010)

## 1 适用范围

该方法适用于分析葡萄酒中存在的多种金属元素,其含量如下表所示。

元素	铝	硼	溴	镉	钴	铜	锶	铁	锂
浓度/ (mg/L)	0.25~ 0.5	10~ 40	0.20~ 2.5	0.001~ 0.040	0.002~ 0.050	0.10~ 2.0	0.30~ 1.0	0.80~ 5.0	0.010~ 0.050
元素	镁	锰	镍	铅	铷	钠	钒	锌	
浓度/ (mg/L)	50~ 300	0.50~ 1.5	0.010~ 0.20	0.010~ 0.20	0.50~ 1.2	5~ 30	0.003~ 0.20	0.30~ 1.0	

本方法也可用来分析其他元素。

有时样品需要消化处理,如葡萄酒中糖含量在 100 g/L 之上时,就需要对样品进行前消化处理。这种情况下,通常推荐采用硝酸微波消化。

该方法可以运用于消化处理后的葡萄汁。

## 2 原理

电感耦合等离子质谱或称 ICP-MS 可用于多元素的定量测定。

在高频等离子体中吸入样品并使样品气化,等离子体使样品中的元素去溶剂化,原子化和离子化。离子被吸入一个装有离子透镜的真空系统,在质谱仪,例如四级杆质谱根据荷质比将不同而分离分开。使用一个电子倍增器系统来检测和定量不同离子的浓度。

## 3 试剂和溶液

- 3.1 超纯软化水(电阻率 $\geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ),符合 ISO 3696 标准。
- 3.2 具有认证证书的金属标准溶液(例如:100 mg/L):多元素混标或者单标溶液。
- 3.3 铟或者铯溶液作为内标物质(一般为 1 g/L)。
- 3.4 硝酸 $\geq 60\%$ (金属杂质 $\leq 0.1 \mu\text{g/L}$ )。
- 3.5 氩气,最低纯度 99.999%。
- 3.6 氮气(最大杂质含量: $\text{H}_2\text{O} \leq 3 \text{ mg/L}$ , $\text{O}_2 \leq 2 \text{ mg/L}$ , $\text{C}_n\text{H}_m \leq 0.5 \text{ mg/L}$ )。

溶液浓度及内标可参照参考文献。

配制标准溶液:标准溶液和最终的稀释酒样中的酸的浓度应该保持一致,不超过 5%。下面举出一个例子。

- 3.7 储备液(5 mg/L):取 0.5 mL 标准物质溶液(3.2)于 10 mL 试管中,加入 0.1 mL 硝酸(3.4)。用软化水(3.1)定容至刻度,混匀。保存期:1 个月。



- 3.8 内标溶液(1 mg/L):用微量移液管(4.4)取 50  $\mu\text{g/L}$  铟或者铈溶液(3.3)和 0.5 mL 硝酸(3.4)于50 mL 试管(4.6)中。水(3.1)定容至刻度并混匀。保存期:1 个月。
- 3.9 校正曲线用标准溶液:根据样品的稀释倍数和仪器的特性来配制标准溶液曲线。用 1 000  $\mu\text{L}$  和 100  $\mu\text{L}$  移液管(4.4)移取标液。  
标准溶液保存期:1 d。  
标准溶液也可以通过重量法配制,向溶液中加入与样品中相同浓度的内标物质。
- 3.10 已知浓度的酒样(MRC, MRE, MRI 等)作为内部质控样。

## 4 材料和设备

- 4.1 带有/无碰撞/反应池的电感耦合质谱仪。
- 4.2 带有数据处理软件和打印机的电脑。
- 4.3 自动进样器(可选项)。
- 4.4 1 000  $\mu\text{L}$  和 100  $\mu\text{L}$  移液管。
- 4.5 10 mL 带刻度的具塞刻度试管或玻璃容量瓶。
- 4.6 50 mL 带刻度的具塞刻度试管或玻璃容量瓶。

所有量取物品(移液枪和试管)必须按时校准。

注意事项:所有接触样品的器具,例如试管和移液管,使用前必须用 10%硝酸浸泡 24 h 后,再用水冲洗干净。

## 5 样品准备

起泡酒样品必须去除酒中气体,可以通入氮气(3.6)鼓泡 10 min 或者使用超声水浴完成。

小心开启酒塞确保酒不被污染。用 2%硝酸清洗瓶子的颈部。直接从瓶中移取酒样。

用微型移液管(4.4)吸取 0.5 mL 酒样、0.1 mL~0.5 mL 的硝酸(3.4)以及 100  $\mu\text{L}$  内标溶液(3.8)于 10 mL 试管中(3.5),水(3.1)定容至刻度并且混匀。

某些元素在原始样品中浓度很高,酒样需要更高的稀释倍数。

Br 具有很高的电离电位,在葡萄酒中由于其他一些含量高的低电离电位元素的存在导致 Br 的电离不完全。这样可能导致对溴的定量不够准确,因此一般推荐稀释 50 倍,以避免这种影响(如果采用其他的稀释倍数,那么要在加标后测定回收率对结果进行确认)。

当通过重量分析来添加标准物质,那么样品的最终稀释倍数必须通过称重获得。

## 6 步骤

打开仪器(泵工作和等离子都开启)。

用 2%硝酸(3.4)清洗系统 20 min。

检查仪器是否运行正常。

按浓度从低到高顺序测试空白和系列标准溶液,用标准曲线对结果进行校正。每个样品平行测试两次。也可使用质控(3.10)对结果进行确认。



表 1

元素	<i>m/z</i>
铝	27
硼	11
溴	79
镉	114
钴	59
铜	63
锶	88
铁	56/57
锂	7
镁	24
锰	55
镍	60
铅	206, 207 和 208 的平均
铷	85
钠	23
钒	51
锌	64

表 1 只是举例说明,针对不同的仪器,上表对同位素需求也不一样。对于无碰撞/反应池的仪器设备,部分元素的计算结果可能需要修正。

## 7 结果

元素浓度单位为 mg/L,结果保留两位小数。

通过校准曲线上进行插值,可以算出稀释了的样品中各种元素的浓度,计算公式如下:

$$c = \frac{c_m \times V_t}{V_m}$$

其中:*c*——样品中元素的浓度;

*c<sub>m</sub>*——稀释了的样品中元素的浓度;

*V<sub>t</sub>*——最终测量时溶液的体积(mL);

*V<sub>m</sub>*——酒样体积(mL)。

## 8 质量控制

为了确保可追溯性必须使用具有证书的标准溶液。

对于每个分析系列,需要使用 CRM(有证标准物)作内部质控或者采用经多个实验室检测确定的酒样作为质控样。

一般推荐采用质量控制分析结果作控制图。

参与实验室间测试比对。

## 9 精密度

协同试验数据统计参数结果记录于附录 A 中。

### 9.1 重复性( $r$ )

同一实验者在同一实验室里,在间隔很短的时间里使用同一台仪器,采用同一种方法测量同一样品,两次独立测量的不同实验结果的差异。 $r$  值如附录 A 中表 A.1~表 A.17 所示。

### 9.2 重现性( $R$ )

不同实验者在不同实验室里,使用不同的仪器,采用同一种方法测量同一样品所得的不同结果间的差异。 $R$  值如附录表 A.1~表 A.17 所示。

表 2 重复性和重现性的相对标准偏差

元素	浓度/(mg/L)	重复性 $RSD_r/\%$	再现性 $RSD_R/\%$
铝	0.25~5.0	4	10
硼	10~40	3.8	6.3
溴	0.20~1.0	4.1	16.3
	$\geq 1.0\sim 2.5$	2.1	8.0
镉	0.001~0.020	$0.06 c^a + 0.18$	10
	$\geq 0.020\sim 0.040$	1.5	10
钴	0.002~0.050	3.2	13.2
铜	0.10~0.50	3.8	11.4
	$\geq 0.50\sim 2.0$	2.0	11.4
锶	0.30~1.0	2.5	7.5
铁	0.80~1.0	4.2	15.7
	$\geq 1.0\sim 5.0$	4.2	7.8
铝	0.010~0.050	7	12
镁	50~300	2	6
锰	0.50~1.5	3	7
镍	0.010~0.20	5	8
铅	0.010~0.050	8	7
	$\geq 0.050\sim 0.20$	2	7
铷	0.50~1.2	3	6
钠	5~10	2	10
	$\geq 10\sim 30$	$0.3 c^a \sim 2.5$	10
钒	0.003~0.010	8	10
	$\geq 0.010\sim 0.20$	3	10
锌	0.30~1.0	5	12

<sup>a</sup>  $c$  表示浓度。

## 参 考 文 献

- [1] ISO 5725:1994, Precision of test methods-Determination of repeatability and reproducibility for a Standard test method by interlaboratory test.
- [2] ISO 17294:2004.
- [3] ALMEIDA M. R, VASCONCELOS T, BARBASTE M. y MEDINA B. (2002), *Anal. Bioanal. Chem.* , 374, 314-322.
- [4] CASTIÑEIRA et al. (2001), *Frenesius J. Anal. Chem.* , 370, 553-558.
- [5] DEL MAR CASTIÑEIRA GOMEZ et al. (2004), *J. Agric. Food Chem.* , 52, 2962-2974.
- [6] MARISA C. , ALMEIDA M. et VASCONCELOS T. (2003), *J. Agric. Food Chem.* , 51, 3012-3023.
- [7] MARISA et al. , (2003), *J. Agric. Food Chem.* , 51, 4788-4798.
- [8] PÉREZ-JORDAN M. Y. , SOLDEVILLA J. , SALVADOR A. , PASTOR A y de la GURDIA M. (1998), *J. Anat. At. Spectrom.* , 13, 33-39.
- [9] PEREZ-TRUJILLO J. -P. , BARBASTE M. y MEDINA B. (2003), *Anal. Lett.* , 36(3), 679-697.
- [10] TAYLOR et al. (2003), *J. Agric. Food Chem.* , 51, 856-860.
- [11] THIEL et al. (2004), *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 1630-1636.

## 附录 A

### 协同试验结果

通过两个协同实验来检验该方法的精密度是否符合 ISO 5725 的要求,方法的准确度需要通过回收率实验来验证。

#### 第一个协同试验

测试了 8 个样品(A,B,C,D,E,F,MH1 和 MH2):

三个红葡萄酒样品,加标和未加标。

三个白葡萄酒样品,加标和未加标。

两个合成乙醇混合物,由酒精和水混合而成的样。

酒精混合物样品 MH1 稳定性不好,直接将数据剔除。

表 A.1

元素/(mg/L)	MH2	A	B	C	D	E	F
	水醇混合物	RW2	RW3	WW2	WW3	原红酒	原白酒
铝	5	0.5	2	2	1	未加标	未加标
镉	0.001	0.005	0.02	0.05	0.01	未加标	未加标
锶	0.300	未加标	未加标	未加标	未加标	未加标	未加标
锂	0.020	0.01	0.02	0.04	0.01	未加标	未加标
镁	50	100	200	50	25	未加标	未加标
锰	0.500	0.5	1	1	0.5	未加标	未加标
镍	0.070	0.025	0.2	0.1	0.1	未加标	未加标
铅	0.010	0.05	0.1	0.15	0.05	未加标	未加标
铷	1.0	未加标	未加标	未加标	未加标	未加标	未加标
钠	20	10	10	20	5	未加标	未加标
钒	0.010	0.05	0.2	0.1	0.1	未加标	未加标
锌	0.500	0.1	1	0.5	0.5	未加标	未加标

#### 第二个协同试验

测试 16 个样品(A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N,O,P)。

四个红葡萄酒样品,加标和不加标。

四个波特酒样品,加标和不加标。

六个白葡萄酒样品,加标和不加标。

两个香槟酒样品。

酒样加标量如表 A.2 所示:



表 A.2

样品	组合	添加	B/(mg/L)	Co/( $\mu\text{g/L}$ )	Cu/(mg/L)	Fe/(mg/L)
白葡萄酒	F-N	无添加	0.0	0.0	0.0	0.0
	C-I	添加 1	5.0	5.0	5.0	1.0
	A-O	添加 2	10.0	10.0	1.0	2.0
利口酒	B-K	无添加	0.0	0.0	0.0	0.0
	E-L	添加 3	15.0	20.0	1.5	3.0
红葡萄酒	D-M	无添加	0.0	0.0	0.0	0.0
	H-J	添加 4	20.0	50.0	2.0	5.0
汽酒	G-P	无添加	0.0	0.0	0.0	0.0

精确度参数(表 A. 4~表 A. 20)

$\text{Horrat}_r$  和  $\text{Horrat}_R$  值通过使用 Horwitz 等式得到,采用 Thompson 修正浓度在  $120 \mu\text{g/L}$  以下的样品。

表 A.3 铝(mg/L)

样品	实验室编号	认可的实验结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$\text{RSD}_r/\%$	Horwitz $\text{RSD}_r/\%$	$\text{Horrat}_r$	$S_R$	$R$	$\text{RSD}_R/\%$	Horwitz $\text{RSD}_R/\%$	$\text{Horrat}_R$
A	11	10	0.68	0.020	0.06	2.9	11	0.26	0.077	0.22	11	17	0.66
B	11	9	2.1	0.043	0.12	2.0	9.4	0.22	0.21	0.61	10	14	0.71
C	11	9	2.1	0.032	0.09	1.5	9.5	0.16	0.21	0.59	10	14	0.69
D	11	10	1.2	0.041	0.12	3.4	10	0.34	0.10	0.29	8.3	16	0.56
E	11	10	0.34	0.014	0.04	4.1	12	0.34	0.029	0.08	8.5	19	0.46
F	11	10	0.27	0.006	0.02	2.2	13	0.17	0.028	0.08	10	20	0.52
MH2	11	8	5.2	0.26	0.73	5.0	8.2	0.60	0.56	1.6	11	13	0.86

表 A.4 硼(mg/L)

样品	实验室编号	认可的实验结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$\text{RSD}_r/\%$	Horwitz $\text{RSD}_r/\%$	$\text{Horrat}_r$	$S_R$	$R$	$\text{RSD}_R/\%$	Horwitz $\text{RSD}_R/\%$	$\text{Horrat}_R$
A-O	8	6	18	0.77	2.2	4.3	6.8	0.62	0.94	2.69	5.2	10	0.50
B-K	8	4	4.5	0.27	0.76	6.0	8.4	0.72	0.40	1.14	8.9	13	0.70
C-I	8	4	13	0.31	0.89	2.4	7.2	0.33	0.33	0.94	2.5	11	0.24
D-M	8	7	11	0.26	0.74	2.4	7.4	0.31	1.1	3.11	10	11	0.90
E-L	8	5	21	0.47	1.3	2.2	6.7	0.33	0.85	2.43	4.0	10	0.40
F-N	8	5	8.3	0.43	1.2	5.2	7.7	0.68	0.47	1.34	5.7	12	0.48
G-P	7	4	3.1	0.094	0.27	3.0	8.9	0.34	0.18	0.51	5.8	14	0.43
H-J	8	5	31	1.0	3.0	3.2	6.3	0.54	1.6	4.43	5.2	9.6	0.52

表 A.5 溴(mg/L)

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	Horrat <sub>r</sub>	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz <sub>R</sub> $RSD_R/\%$	Horrat <sub>R</sub>
A-O	6	2	1.21	0.028	0.08	2.3	10.3	0.22	0.041	0.12	3.4	15.6	0.22
B-K	5	2	0.19	0.006	0.02	2.9	13.6	0.21	0.0043	0.012	2.3	20.5	0.11
C-I	6	3	0.81	0.017	0.05	2.1	10.9	0.19	0.062	0.18	7.7	16.5	0.47
D-M	6	4	0.38	0.017	0.05	4.5	12.2	0.37	0.066	0.19	17.4	18.5	0.94
E-L	6	3	1.72	0.030	0.09	1.7	9.7	0.17	0.22	0.62	12.8	14.8	0.86
F-N	6	3	0.22	0.014	0.04	6.4	13.3	0.48	0.046	0.13	20.9	20.1	1
H-J	6	2	2.30	0.061	0.17	2.7	9.3	0.28	0.092	0.26	4	14.1	0.28

表 A.6 镉( $\mu\text{g/L}$ )

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	Horrat <sub>r</sub>	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz <sub>R</sub> $RSD_R/\%$	Horrat <sub>R</sub>
A	12	11	6	0.2	0.6	3.3	15	0.22	1	3	17	22	0.77
B	12	11	16	0.4	1	2.5	15	0.17	2	6	13	22	0.59
C	12	9	40	0.4	1	1.0	15	0.07	3	8	7.5	22	0.34
D	12	10	10	0.3	0.8	3.0	15	0.20	0.9	3	9.0	22	0.41
E	8	7	0.3	0.20	0.6	67	15	4.47	0.20	0.67	67	22	3.05
F	8	6	0.3	0.04	0.1	13	15	0.87	0.20	0.45	67	22	3.05
MH2	9	5	0.9	0.08	0.2	8.9	15	0.59	0.10	0.29	11	22	0.50

表 A.7 钴( $\mu\text{g/L}$ )

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	Horrat <sub>r</sub>	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz <sub>R</sub> $RSD_R/\%$	Horrat <sub>R</sub>
A-O	10	6	22	0.5	1	2.3	15	0.15	2	6	9.1	22	0.41
B-K	10	6	8	0.3	0.9	3.8	15	0.25	1	4	13	22	0.59
C-I	10	8	19	0.4	1	2.1	15	0.14	3	7	16	22	0.73
D-M	10	3	3	0.07	0.2	2.3	15	0.15	0.1	0.3	3.3	22	0.15
E-L	10	8	27	1	3	3.7	15	0.25	3	9	11	22	0.50
F-N	10	7	12	0.5	2	4.2	15	0.28	1	4	8.3	22	0.38
G-P	9	5	2	0.2	0.5	10	15	0.67	0.3	0.8	15	22	0.68
H-J	10	6	49	0.5	1	2.3	15	0.15	6	18	12	22	0.55

表 A.8 铜(mg/L)

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	RSD <sub>r</sub> / %	Horwitz RSD <sub>r</sub> / %	Horrat <sub>r</sub>	$S_R$	$R$	RSD <sub>R</sub> / %	Horwitz <sub>R</sub> RSD <sub>R</sub> / %	Horrat <sub>R</sub>
A-O	10	8	1.1	0.013	0.040	1.2	10	0.12	0.11	0.32	10	16	0.63
B-K	10	8	0.21	0.006	0.020	2.9	13	0.22	0.021	0.060	10	20	0.50
C-I	10	7	0.74	0.009	0.030	1.2	10	0.12	0.046	0.13	6.2	17	0.36
D-M	10	8	0.14	0.007	0.020	5.0	14	0.36	0.015	0.043	11	22	0.50
E-L	10	9	1.7	0.061	0.17	3.6	7.8	0.5	0.16	0.46	9.0	15	0.60
F-N	10	7	0.16	0.006	0.020	3.8	14	0.27	0.029	0.083	18	21	0.86
G-P	9	4	0.042	0.004	0.010	9.5	15	0.63	0.006	0.017	14	22	0.64
H-J	10	7	2.1	0.018	0.050	0.86	9.5	0.09	0.24	0.69	11	14	0.79

表 A.9 锶(μg/L)

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	RSD <sub>r</sub> / %	Horwitz RSD <sub>r</sub> / %	Horrat <sub>r</sub>	$S_R$	$R$	RSD <sub>R</sub> / %	Horwitz <sub>R</sub> RSD <sub>R</sub> / %	Horrat <sub>R</sub>
A	12	11	1 091	33	93	3.0	10	0.30	78	222	7.2	16	0.45
B	12	8	1 139	66	188	5.8	10	0.58	69	195	6.1	16	0.38
C	12	9	328	6	18	1.8	13	0.14	19	54	5.8	19	0.31
D	12	10	313	7	20	2.2	13	0.17	22	61	7.0	19	0.37
E	12	10	1 176	28	80	2.4	10	0.24	86	243	7.3	16	0.46
F	12	10	293	3	9	1.0	13	0.08	22	62	7.5	19	0.39
MH2	12	9	352	7	19	2.0	12	0.17	24	69	6.8	19	0.36

表 A.10 铁(mg/L)

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	RSD <sub>r</sub> / %	Horwitz RSD <sub>r</sub> / %	Horrat <sub>r</sub>	$S_R$	$R$	RSD <sub>R</sub> / %	Horwitz <sub>R</sub> RSD <sub>R</sub> / %	Horrat <sub>R</sub>
A-O	10	6	3.2	0.017	0.05	0.53	8.9	0.06	0.23	0.66	7.2	13	0.55
B-K	10	6	1.5	0.085	0.24	5.7	9.9	0.58	0.11	0.31	7.3	15	0.49
C-I	10	5	2.1	0.036	0.10	1.7	9.4	0.18	0.18	0.51	8.6	14	0.61
D-M	10	5	3.1	0.033	0.094	1.1	8.9	0.12	0.29	0.83	9.4	14	0.67
E-L	10	5	4.3	0.120	0.34	2.8	8.5	0.33	0.29	0.83	6.7	13	0.52
F-N	10	6	1.1	0.051	0.15	4.6	10	0.46	0.16	0.46	15	16	0.94
G-P	9	6	0.83	0.024	0.07	2.9	11	0.26	0.14	0.40	17	16	1.06
H-J	10	7	7.8	0.180	0.52	2.3	7.8	0.29	1.2	3.52	15	12	1.25



表 A.11 锂( $\mu\text{g/L}$ )

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	$Horrat_r$	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz <sub>R</sub> $RSD_R/\%$	$Horrat_R$
A	11	10	34	2	5	5.9	15	0.39	4	11	11	22	0.50
B	11	11	42	3	8	7.1	15	0.47	4	12	10	22	0.45
C	11	11	47	1	4	2.1	15	0.14	5	13	9.8	22	0.45
D	11	11	18	1	4	5.6	15	0.37	2	7	14	22	0.64
E	11	11	25	1	3	4.0	15	0.27	3	9	12	22	0.55
F	11	9	9	0.3	1	3.8	15	0.25	0.6	2	7.2	22	0.33
MH2	11	7	22	1	3	4.6	15	0.31	1	3	5.3	22	0.24

表 A.12 镁( $\text{mg/L}$ )

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	$Horrat_r$	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz <sub>R</sub> $RSD_R/\%$	$Horrat_R$
A	10	7	182	2.9	8.1	1.6	4.3	0.37	9.3	26	5.1	7.3	0.70
B	10	6	280	3.9	11	1.4	4.5	0.31	6.0	17	2.1	6.9	0.30
C	10	7	104	2.4	6.9	2.3	5.3	0.43	6.8	19.25	6.5	8.0	0.81
D	10	6	85	1.4	4.0	1.7	5.4	0.31	2.2	6.1	2.6	8.2	0.32
E	10	7	94	2.2	6.2	2.3	5.3	0.43	5.5	16	5.9	8.1	0.73
F	10	7	65	0.95	2.7	1.5	5.6	0.27	3.8	11	5.9	8.5	0.69
MH2	10	7	51	0.90	2.5	1.8	5.8	0.31	2.4	6.9	4.7	8.9	0.53

表 A.13 锰( $\text{mg/L}$ )

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	$Horrat_r$	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz <sub>R</sub> $RSD_R/\%$	$Horrat_R$
A	11	10	1.3	0.014	0.040	1.1	10	0.11	0.13	0.37	10	15	0.67
B	11	9	1.8	0.14	0.40	7.8	9.7	0.80	0.20	0.56	11	15	0.73
C	11	8	1.5	0.028	0.080	1.9	9.9	0.19	0.084	0.24	5.6	15	0.37
D	11	8	1.0	0.035	0.10	3.5	11	0.32	0.049	0.14	4.9	16	0.31
E	11	9	0.84	0.019	0.050	2.3	11	0.21	0.057	0.16	6.8	16	0.43
F	11	9	0.59	0.015	0.040	2.5	11	0.23	0.031	0.090	5.3	17	0.31
MH2	11	8	0.52	0.029	0.080	5.6	12	0.47	0.037	0.10	7.1	18	0.39

表 A.14 镍( $\mu\text{g/L}$ )

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	$Horrat_r$	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz $_R$ $RSD_R/\%$	$Horrat_R$
A	11	10	40	2	6	5.0	15	0.33	5	13.90	13	22	0.59
B	12	10	194	7	20	3.6	14	0.26	17	48.96	8.8	21	0.42
C	12	8	148	4	10	2.7	14	0.19	5	15.12	3.4	21	0.16
D	12	8	157	4	12	2.6	14	0.19	8	23.10	5.1	21	0.24
E	11	8	15	0.6	2	4.0	15	0.27	1	3.33	6.7	22	0.30
F	12	9	66	1	4	1.5	15	0.10	4	10.58	6.1	22	0.28
MH2	11	7	71	5	14	7.0	15	0.47	4	11.41	5.6	22	0.25

表 A.15 铅( $\mu\text{g/L}$ )

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	$Horrat_r$	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz $_R$ $RSD_R/\%$	$Horrat_R$
A	12	9	59	1	4	1.7	15	0.11	3	9	5.1	22	0.23
B	12	10	109	2	6	1.8	15	0.12	8	23	7.3	22	0.33
C	12	9	136	3	9	2.2	14	0.16	13	37	9.6	22	0.44
D	12	9	119	2	6	1.7	15	0.11	5	13	4.2	22	0.19
E	12	10	13	1	3	7.7	15	0.51	1	4	7.7	22	0.35
F	12	9	92	1	4	1.1	15	0.07	4	11	4.4	22	0.20
MH2	12	10	13	1	3	7.7	15	0.51	1	3	7.7	22	0.35

表 A.16 铷( $\mu\text{g/L}$ )

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	$Horrat_r$	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz $_R$ $RSD_R/\%$	$Horrat_R$
A	11	6	717	14	41	2.0	11	0.18	13	36	1.8	17	0.11
B	11	7	799	25	70	3.1	11	0.28	30	86	3.8	17	0.22
C	11	8	677	10	27	1.5	11	0.14	34	96	5.0	17	0.29
D	11	7	612	18	51	2.9	11	0.26	18	50	2.9	17	0.17
E	11	9	741	19	53	2.6	11	0.24	66	187	8.9	17	0.52
F	11	9	617	10	28	1.6	11	0.15	43	123	7.0	17	0.41
MH2	11	7	1 128	10	28	0.89	10	0.09	64	181	5.7	16	0.36

表 A. 17 钠(mg/L)

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	Horrat <sub>r</sub>	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz <sub>R</sub> $RSD_R/\%$	Horrat <sub>R</sub>
A	10	9	19	0.59	1.7	3.1	6.8	0.46	2.2	5.7	12	10	1.20
B	10	9	20	1.3	3.6	6.5	6.7	0.97	2.2	6.3	11	10	1.10
C	10	7	28	0.33	0.93	1.2	6.4	0.19	1.9	5.4	6.8	9.7	0.70
D	10	8	11	0.24	0.68	2.2	7.4	0.30	1.1	3.0	10	11	0.91
E	10	8	9.8	0.19	0.53	1.9	7.5	0.25	0.89	2.5	9.1	11	0.83
F	10	8	6.1	0.093	0.26	1.5	8.1	0.19	0.74	2.1	12	12	1.00
MH2	10	8	24	1.8	5.0	7.5	6.6	1.14	2.6	7.2	11	9.9	1.11

表 A. 18 钒( $\mu\text{g/L}$ )

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	Horrat <sub>r</sub>	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz <sub>R</sub> $RSD_R/\%$	Horrat <sub>R</sub>
A	12	11	46	1	3	2.2	15	0.15	5	13	11	22	0.50
B	12	11	167	5	15	3.0	14	0.21	19	54	11	21	0.52
C	12	11	93	3	8	3.2	15	0.21	12	33	13	22	0.59
D	12	9	96	3	8	3.1	15	0.21	8	22	8.3	22	0.38
E	10	7	3	0.2	0.7	6.7	15	0.45	0.3	0.9	10	22	0.45
F	10	8	3	0.2	0.6	6.7	15	0.45	0.2	0.7	6.7	22	0.30
MH2	12	9	1	0.3	1	2.7	15	0.18	0.9	3	8.2	22	0.37

表 A. 19 锌( $\mu\text{g/L}$ )

样品	实验室编号	认可的结果个数	参考值	$S_r$	$r$	$RSD_r/\%$	Horwitz $RSD_r/\%$	Horrat <sub>r</sub>	$S_R$	$R$	$RSD_R/\%$	Horwitz <sub>R</sub> $RSD_R/\%$	Horrat <sub>R</sub>
A	11	8	405	22	61	5.4	12	0.45	45	128	11	18	0.61
B	11	9	1 327	49	138	3.7	10	0.37	152	429	11	15	0.73
C	11	9	990	14	41	1.4	11	0.13	86	243	8.7	16	0.54
D	11	9	1 002	28	79	2.8	11	0.25	110	310	11	16	0.69
E	11	9	328	13	37	4.0	13	0.31	79	224	24	19	1.26
F	11	9	539	15	42	2.8	12	0.23	61	172	11	18	0.61
MH2	11	8	604	72	204	12	11	1.09	89	251	15	17	0.88



## QuEChERS 法测定葡萄酒中的农药残留

(决议 Oeno 436/2012)

### 1 引言

该方法引用了数份被实验室验证通过的参考文献。

### 2 适用范围

该方法规定了使用 QuEChERS(Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe)方法提取葡萄酒中的残留农药,并使用 GC/MS 和(或)LC/MS-MS 来测定分析提取物。

### 3 原理

使用乙腈萃取样品,然后加入硫酸镁、氯化钠和含有柠檬酸盐的缓冲溶液作为诱导剂进行液-液萃取分离。提取物通过氨基吸附剂(使用带被测物保护剂及硫酸镁的分散型固相萃取)纯化,为了提高样品储存时的稳定性,需向提取物中加入一定量的甲酸酸化。最终的提取物可以通过 GC/MS 和 LC/MS-MS 直接进样测定。

如果仅仅用 LC/MS-MS 测定分析样品,前处理不一定需要使用基质分散固相萃取。

### 4 试剂和材料

#### 4.1 一般原则和安全事项:

农药具有潜在毒性,尤其是在用市售的活性标准品配制储备溶液时,在操作过程中分析人员必须采取安全防护措施。

采取必要的措施防止农药对水、溶剂和其他产品造成污染。

除特殊标注外,所有使用的试剂必须达到经过认可的分析纯级质量级别。

#### 4.2 水,色谱纯。

#### 4.3 乙腈,HPLC 级。

#### 4.4 甲醇,HPLC 级。

#### 4.5 无水硫酸镁,粒状。

#### 4.6 无水硫酸镁,细粉末状。

#### 4.7 氯化钠。

#### 4.8 柠檬酸氢二钠。

#### 4.9 二水合柠檬酸三钠。

4.10 提取步骤用的盐缓冲液混合物:称取 4 g 微粒状无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 二水合柠檬酸三钠和 0.5 g 柠檬酸氢二钠倍半水合物于一个容量瓶中。预先混合这些盐可避免形成结晶。

4.11 甲酸的乙腈溶液:取 0.5 mL 甲酸用乙腈稀释到 10 mL。

4.12 伯胺和仲胺(PSA)吸附剂:例如,Bondesil-PSA<sup>®</sup> 40 μm Varian N<sup>°</sup>122130231。

4.13 内标液和质量控制标准溶液。



数种物质可以作为内标液使用,例如磷酸三苯酯和三苯甲烷。

使用质量控制标准,以指示样品残留物的提取效率:例如,磷酸三(1,3-二氯异丙基)酯或 TCPP。

应提前备好合适浓度的标准溶液。

示例:配制 10 mg/L 的 TCPP 溶液:

取 1 mL 500 mg/L 的磷酸三酯(1,3-二氯异丙基)的储备溶液于 50 mL 的容量瓶中,用乙腈定容至刻度。

4.14 校准范围(含不同活性成分的标准溶液):

4.14.1 标准储备溶液:

用适当溶剂(如:丙酮)配制 500 mg/L 的活性成分储备溶液, -18℃ 保存。

4.14.2 替代溶液:

适合仪器使用(GC 或 LC)和校准范围限制的活性成分混合溶液。

4.14.3 校准范围:

含乙腈的标准溶液:

以达到 20  $\mu\text{g/L}$ ~500  $\mu\text{g/L}$  的校正曲线为目的,使用替代溶液所准备的校准范围。

葡萄酒作为基质的标准溶液:

依照协议 6.1.1 使用不含任何活性成分的葡萄酒配制空白基质,然后依次增加活性成分的含量,获得 20  $\mu\text{g/L}$ ~500  $\mu\text{g/L}$  范围的标准曲线。

## 5 仪器

5.1 玻璃器皿和实验室容量设备:

5.1.1 100 mL 具塞容量瓶。

5.1.2 50 mL 和 12 mL 带螺口塞的一次性离心管。

5.1.3 10 mL A 级带有刻度的试管。

5.1.4 10 mL、50 mL 和 100 mL A 级容量瓶。

5.1.5 经过 ISO 8655-6 验证的 30  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$  活塞式容量测量仪器。

5.1.6 2 mL 样品注射器。

5.2 0.45  $\mu\text{m}$  尼龙微孔过滤膜。

5.3 分析天平。

5.4 高速混匀器(比如:漩涡振荡器)。

5.5 50 mL 和 12 mL 的离心机,最大离心力 3 000  $g$ 。

5.6 带有电喷雾接口的 LC/MS-MS 系统。

5.7 配备有合适的进样和检测设备(离子阱或者三重四级杆)的 GC/MS 系统。

## 6 步骤

6.1 样品的准备

6.1.1 QuEChERS 法提取:

称 10 g 或者量取 10 mL 酒样于离心管中,加入 10 mL 乙腈和 100  $\mu\text{L}$  10 mg/L 的磷酸三酯(1,3-二氯异丙基)溶液。剧烈震荡 1 min,加入盐混合液(4.10),剧烈震荡



1 min, 3 000 g 离心 5 min。

用 25 mm/45  $\mu$ m 的尼龙过滤器过滤大约 1 mL 的溶液用于 LC-MS 分析。

#### 6.1.2 利用氨基吸附剂纯化提取物(带 PSA 的分散固相萃取剂)。

取 6 mL 乙腈相溶液于离心管中,加入 900 mg 粒状硫酸镁和 150 mg ASP。旋紧盖子剧烈震荡 30 s,然后 3 000 g 离心 5 min,马上分离并且加入 50  $\mu$ L 甲酸酸化纯化的样品(4.11)。

然后可进行 GC-MS 分析测定。

注:为了降低基质效应的影响,需要向样品和校准曲线溶液中加入基体改进剂溶液。

10 mL 基体改进剂溶液配制:称取 15 mg 山梨醇,300 mg 甘油乙酯和 100 mg 葡萄糖酸内酯,加入 2 mL 水,乙腈定容至 10 mL。

向每个含 1 mL 校准溶液和 1 mL 提取的样品溶液容器中加入 20  $\mu$ L 保护剂溶液。

### 6.2 结果及计算

#### 6.2.1 残留物的鉴定

通过考察某些参数来鉴定残留物:

——保留时间;

——质谱图;

——离子片段的相对丰度(建议选择做 1 或 2MS/MS“跃迁”和 2 或 3 MS 中的离子)。

#### 6.2.2 定量

6.1.1 和 6.1.2 得到的提取物可以使用各种仪器、参数和柱子进行分析,然而,为了获得最好的灵敏度,要根据使用的仪器去设定每个物质的检测条件。

运用标准溶液做 5 点校准来检验每一种活性成分的校准曲线的线性。

从校准曲线直接得到的每一种待鉴定物质的浓度,单位为 mg/kg(或者 mg/L)。

#### 6.2.3 提取率

可以通过向样品中加入定量标准物质来检验提取效率,例如:TCPP(见 6.1.1)。

提取效率必须在 70%~120%之间。

葡萄酒中残留物水平校正过程中不需考虑到提取效率的影响,但是在验证的过程中需要考虑。

## 7 方法的可靠性

按照 MA-F-AS1-08-FIDMET 和 MA-F-AS1-09-PROPER 实施的结果确认如表 1 所示。

平均回收率在 70%~120%(加标水平覆盖了 0.020 mg/L~0.200 mg/L 的浓度范围)。

### 7.1 重复性( $CV_r$ )

重复性平均等于 10%。

### 7.2 重现性( $CV_R$ )

重现性平均等于 30%。

表 1

农药	回收率 %	$CV_r/\%$	$CV_R/\%$	HorRat
甲霜林	89	7	26	1.1
乙烷基毒死蜱	81	13	23	1.0
戊唑醇	99	9	32	1.3
环丙嘧啶	93	9	29	1.1
虫酰肼	102	11	28	1.2
咯菌腈	101	7	40	1.4
苯双灵	98	9	29	1.1
环丙唑醇	92	11	31	1.3
吡螨胺	95	10	31	1.2
唑菌胺酯	116	6	29	1.2
乙烯菌核利	84	9	28	1.1
嘧菌胺	82	11	30	1.1
啶酰菌胺	95	7	28	1.1
异丙菌胺	106	7	33	1.2
异菌脲	108	10	27	1.1
腐霉利	100	11	34	1.2
二甲嘧菌胺	75	12	27	1.0
多菌灵	113	11	41	1.6
腈苯唑	94	6	48	2.0
杀螟硫磷	90	13	36	0.7
苯菌酮	93	8	19	0.7
戊菌唑	109	8	35	1.1
氟硅唑	93	8	37	1.3
恶霜灵	86	8	37	1.3
嘧菌酯	84	8	30	1.2
烯酰吗啉	90	9	36	1.4
环酰菌胺	87	8	22	0.8

实验室间测量的可靠性数据结果见附录 A。



## 附录 A

### A.1 可靠性研究结果

本文件展示了运用 QuEChERS(FV 1340)方法测定葡萄酒中农药残留的方法验证研究。

研究按照 OIV 文件 MA-F-AS1-08-FIDMET 和 MA-F-AS1-09-PROPER 方法执行。

### A.2 参与实验室

16 个实验室参与了该项研究。

LABORATOIRE INTER RHONE	France
INSTITUT FUR HYGIENE UND UMWELT	Germany
LABORATORIO AGROENOLÓGICO UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL MAULE	Chile
AGRICULTURAL OFFICE OF BORSOD-ABAUJ-ZEMPLEN COUNTY	Hungary
PESTICIDE RESIDUE ANALYTICAL LABORATORY	Hungary
AUSTRIAN AGENCY FOR HEALTH AND FOOD SAFETY	Austria
COMPETENCE CENTER FOR PLANT PROTECTION PRODUCTS	Austria
LABORATOIRE DEPARTEMENTAL DE LA SARTHE	France
LABORATOIRE PHYTOCONTROL	France
BENAKI PHYTOPATHOLOGICAL INST. PESTICIDES RESIDUES LAB.	Greece
LABORATOIRE DUBERNET OENOLOGIE	France
ARPAL DIPARTIMENTO LA SPEZIA	Italy
ARPA VENETO-SERVIZIO LABORATORI VERONA	Italy
ARPALAZIO-SEZIONE DI LATINA	Italy
ANALAB CHILE S. A.	Chile
LABORATORIO REGIONAL DE LA CCAA DE LA RIOJA	Spain
SCL LABORATOIRE DE BORDEAUX	France
ARPA-FVG DIP. DI PORDENONE	Italy

### A.3 样品有效成分分析

该研究中,推荐使用 12 个酒样

4 个红葡萄酒样:A、B、G、H;

4 个白葡萄酒样:C、D、I、J;

2 个波特酒样:E、K;

2 个麝香葡萄酒样:F、L。

通过 12 个酒样的测定共检测到 27 中活性物质,浓度范围为 0.015 mg/L~0.200 mg/L,如表 A.1 所示。



表 A.1

项目	A~G/(mg/L)	B~H/(mg/L)	C~I/(mg/L)	D~J/(mg/L)	E~K/(mg/L)	F~L/(mg/L)
甲霜林	0.050	0.040	0.100	0.020		
乙烷基毒死蜱	0.100	0.040	0.200	0.020		
戊唑醇	0.025	0.080	0.050	0.040		
环丙嘧啶	0.050	0.040	0.100	0.020		
虫酰肼	0.050		0.100			
咯菌腈	0.025		0.050			
苯双灵	0.052	0.041	0.104	0.021		
环丙唑醇	0.054	0.086	0.108	0.043		
吡螨胺	0.050	0.040	0.100	0.020		
啶菌胺酯	0.050		0.100			
乙烯菌核利		0.040		0.020	0.050	0.100
啞菌胺		0.080		0.040	0.025	0.050
啞酰菌胺		0.080		0.040	0.100	0.200
异丙菌胺					0.050	0.100
异菌脉		0.076		0.038	0.047	0.094
腐霉利		0.020		0.010		
二甲啞菌胺		0.040		0.020		
多菌灵				0.054		0.027
腈苯唑		0.080		0.040		
杀螟硫磷		0.040		0.020		
苯菌酮		0.040		0.020		
戊菌唑		0.016		0.008		
氟硅唑		0.040		0.020		
恶霜灵	0.050				0.025	
啞菌酯	0.100				0.050	
烯酰吗啉	0.100				0.050	
环酰菌胺	0.100				0.050	

#### A.4 统计分析

所有数据如 FV 1410。

每一个表中,用不同的字体标出被去除和无意义的数值。



#### A.4.1 被去除的数值

许多数值在评估前由于以下原因被去除：

——为了评估方法的重复性，我们使用了双盲样品的原理：一些实验室对于成对的样品仅仅给出了单一结果。这些值被去除掉(表中标记为“×××”)；

——当结果表示为“少于”的形式，(表格中标记为“×××”)，

在成对样品中使用 COCHRAN 和 GRUBBS 测试一方面是为了消除异常方差，另一方面是消除异常平均值，两个测试中都被去除的数值在表格中表示为“×××”。

#### A.4.2 重复性-重现性

重复性和重现性参数见表 A.1。

这个表解释了每个项目的含义。

—— $n$ : 选择测试的次数；

——average: 结果平均值；

—— $TR$ : 平均回收率；

—— $CV_r$ : 平均重复性；

—— $CV_R$ : 平均重现性；

—— $PRCV_R$ : 用 Horwitz 公式( $PRCV = 2C^{-0.1505}$ ) 计算得到的平均重现性；

——HoR: HorRaT 值( $CV_R/PRCV_R$ )。

评定标准的选择：

——回收率在 70%~120%；

——重现性条件下获得的结果与通过 Horwitz 模型预测值之比，即 HorRat 值小于等于 2 时，重现性值被认为是满意的；

——重复性值不超过 Horwitz 重现性的 0.66 倍才被视为合格。

表 A.2 可靠性

项目	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	波特酒	麝香葡萄酒
甲霜林	$n$	12	13	13	11	8
	平均	0.051	0.041	0.105	0.033	0.014
	$TR/\%$	102	103	82	69	
	$CV_r/\%$	6	8	6	9	5
	$CV_R/\%$	26	26	17	26	33
	$PRCV_R/\%$	25	26	22	27	30
	HoR	1.1	1	0.9	0.6	1.1
乙烷基毒死蜱	$n$	9	12	11	11	
	平均	0.073	0.031	0.166	0.018	
	$TR/\%$	73	78	83	90	
	$CV_r/\%$	11	16	11	15	
	$CV_R/\%$	30	27	18	18	
	$PRCV_R/\%$	24	27	21	29	
	HoR	1.3	1	0.9	0.6	

表 A. 2(续)

项目	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	波特酒	麝香葡萄酒
戊唑醇	<i>n</i>	12	14	15	14	
	平均	0.025	0.078	0.05	0.04	
	<i>TR</i> /%	100	98	100	100	
	<i>CV<sub>r</sub></i> /%	6	10	10	9	
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	37	30	30	31	
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	28	23	25	26	
	HoR	1.3	1.3	1.2	1.2	
环丙嘧啶	<i>n</i>	15	14	13	14	
	平均	0.045	0.036	0.098	0.023	
	<i>TR</i> /%	90	90	94	96	
	<i>CV<sub>r</sub></i> /%	19	6	3	3	
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	36	34	13	31	
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	26	26	23	28	
	HoR	1.4	1.3	0.6	1.1	
虫酰肼	<i>n</i>	10		11		
	平均	0.049		0.106		
	<i>TR</i> /%	98		106		
	<i>CV<sub>r</sub></i> /%	16		6		
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	25		30		
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	25		22		
	HoR	1		1.3		
咯菌腈	<i>n</i>	10		11	10	
	平均	0.026		0.064	0.015	
	<i>TR</i> /%	104		98	100	
	<i>CV<sub>r</sub></i> /%	4		8	10	
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	47		30	43	
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	28		24	30	
	HoR	1.7		1.2	1.4	
苯双灵	<i>n</i>	12	12	12	12	
	平均	0.046	0.04	0.099	0.023	
	<i>TR</i> /%	88	98	95	110	
	<i>CV<sub>r</sub></i> /%	8	7	7	14	
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	37	32	25	21	
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	25	26	23	28	
	HoR	1.4	1.2	1.1	0.8	
环丙唑醇	<i>n</i>	14	15	14	14	
	平均	0.049	0.08	0.095	0.042	
	<i>TR</i> /%	91	93	95	98	
	<i>CV<sub>r</sub></i> /%	23	7	7	7	
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	36	32	25	33	
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	25	23	23	26	
	HoR	1.4	1.4	1.1	1.3	

表 A. 2(续)

项目	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	波特酒	麝香葡萄酒
吡 螨 胺	<i>n</i>	15	14	14	12	
	平均	0.042	0.038	0.094	0.021	
	<i>TR</i> /%	84	95	94	105	
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%	21	6	5	6	
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	33	31	26	32	
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	26	31	26	32	
	HoR	1.3	1.2	1.1	1.1	
唑 菌 胺 酯	<i>n</i>	8		9		
	平均	0.055		0.121		
	<i>TR</i> /%	110		121		
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%	6		5		
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	31		26		
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	25		22		
	HoR	1.2		1.2		
乙 烯 菌 核 利	<i>n</i>		10		9	11
	平均		0.031		0.020	0.039
	<i>TR</i> /%		78		100	78
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%		8		10	14
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%		35		26	27
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%		24		29	26
	HoR		1.4		0.9	1
噻 菌 胺	<i>n</i>		12		13	10
	平均		0.063		0.028	0.022
	<i>TR</i> /%		79		70	88
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%		8		24	5
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%		35		36	20
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%		24		27	29
	HoR		1.4		1.3	0.7
啶 酰 菌 胺	<i>n</i>	11	12		11	12
	平均	0.022	0.097		0.034	0.083
	<i>TR</i> /%	105	121		85	83
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%	12	7		6	6
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	45	30		26	16
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	28	23		27	23
	HoR	1.6	1.3		1	0.7
异 丙 菌 胺	<i>n</i>	11	12		13	13
	平均	0.016	0.016		0.052	0.1
	<i>TR</i> /%	107	114		104	100
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%	9	8		5	6
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	39	38		28	27
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	30	30		25	23
	HoR	1.3	1.3		1.1	1.2

表 A. 2(续)

项目	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	波特酒	麝香葡萄酒
异菌脲	<i>n</i>		10		10	8
	平均		0.079		0.039	0.101
	TR/%		104		103	107
	CV <sub>r</sub> /%		10		7	13
	CV <sub>R</sub> /%		35		24	25
	PRCV <sub>R</sub> /%		23		26	25
	HoR		1.5		0.9	1
腐霉利	<i>n</i>		11		11	
	平均		0.018		0.011	
	TR/%		90		110	
	CV <sub>r</sub> /%		12		10	
	CV <sub>R</sub> /%		34		34	
	PRCV <sub>R</sub> /%		29		31	
	HoR		1.2		1.1	
二甲嘧啶胺	<i>n</i>		15	10	14	
	平均		0.036	0.011	0.027	
	TR/%		60	46	120	
	CV <sub>r</sub> /%		9	20	7	
	CV <sub>R</sub> /%		26	31	25	
	PRCV <sub>R</sub> /%		26	31	28	
	HoR		1	1	0.9	
多菌灵	<i>n</i>				8	9
	平均				0.057	0.033
	TR/%				106	120
	CV <sub>r</sub> /%				11	10
	CV <sub>R</sub> /%				36	45
	PRCV <sub>R</sub> /%				25	27
	HoR				1.5	1.7
腈苯唑	<i>n</i>		8		7	
	平均		0.067		0.042	
	TR/%		84		105	
	CV <sub>r</sub> /%		6		5	
	CV <sub>R</sub> /%		45		50	
	PRCV <sub>R</sub> /%		24		26	
	HoR		1.9		2	
杀螟硫磷	<i>n</i>		11		10	
	平均		0.034		0.019	
	TR/%		85		95	
	CV <sub>r</sub> /%		16		10	
	CV <sub>R</sub> /%		31		40	
	PRCV <sub>R</sub> /%		27		29	
	HoR		1.2		1.4	

表 A. 2(续)

项目	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	波特酒	麝香葡萄酒
苯 菌 酮	<i>n</i>		7		7	
	平均		0.038		0.018	
	<i>TR</i> /%		95		90	
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%		8		7	
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%		18		19	
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%		26		29	
	HoR		0.7		0.6	
戊 菌 唑	<i>n</i>		14		13	
	平均		0.017		0.009	
	<i>TR</i> /%		106		113	
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%		8		8	
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%		31		38	
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%		30		33	
	HoR		1		1.2	
氟 硅 唑	<i>n</i>		13		13	
	平均		0.035		0.019	
	<i>TR</i> /%		88		95	
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%		6		9	
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%		37		36	
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%		26		29	
	HoR		1.4		1.2	
恶 霜 灵	<i>n</i>	7				10
	平均	0.04				0.023
	<i>TR</i> /%	80				92
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%	10				5
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	18				31
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	26				28
	HoR	0.7				1.1
噻 菌 酯	<i>n</i>	12				13
	平均	0.078				0.045
	<i>TR</i> /%	78				90
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%	10				6
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	29				31
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	23				26
	HoR	1.2				1.2
烯 酰 吗 啉	<i>n</i>	12		9	9	13
	平均	0.086		0.019	0.019	0.047
	<i>TR</i> /%	86				94
	<i>CV<sub>T</sub></i> /%	6		8	14	8
	<i>CV<sub>R</sub></i> /%	30		41	44	29
	<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%			29	29	25
	HoR			1.4	1.5	1.2

表 A. 2(续)

项目	红葡萄酒 1	红葡萄酒 2	白葡萄酒 1	白葡萄酒 2	波特酒	麝香葡萄酒
<i>n</i>	11		11	10	11	
平均	0.083		0.026	0.025	0.039	
<i>TR</i> /%	83		96	93	78	
<i>CV<sub>r</sub></i> /%	7		9	10	7	
<i>CV<sub>R</sub></i> /%	31		18	19	18	
<i>PRCV<sub>R</sub></i> /%	23		28	28	26	
HoR	1.3		0.6	0.7	0.7	

## 参 考 文 献

- [1] P. Paya, J. Oliva, A. Barba, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen; “Analysis of pesticides residues using the Quick Easy Cheap Affective Rugged and Safe(QuEChERS)pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectroscopy detection”. Anal Bioanal Chem, 2007.
- [2] EN 15662:2008-Foods of plant origin-Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS method; January 2009; AFNOR.
- [3] K. Mastovska, Steven J. Lehotay, and M. Anastassiades; “Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticides residues in food matrixes”. Anal. Chem, 2005, 77, 8129-8137.
- [4] MA-F-AS1-08-FIDMET, OIV; Reliability of Analytical Methods(resolution oeno 5/99).
- [5] MA-F-AS1-09-PROPER, OIV; Protocol for the planning, performance and interpretation of performance studies pertaining to methods of analysis(resolution 6/2000).  
FV 1410; Results of the inter-laboratory study.