

葡萄酒中乙醛气相—质谱测定方法的建立

Determination of acetaldehyde in wine by gas chromatography-mass spectrometry

韦晓群^{1,2,3} 郑璇² 郭庆园^{2,3} 凌莉^{2,3}

WEI Xiao-qun^{1,2,3} ZHENG Xuan² GUO Qing-yuan^{2,3} LING Li^{2,3}

曾广丰^{2,3} 黄瑾² 蔡纯²

ZENG Guang-feng^{2,3} HUANG Jin² CAI Chun²

(1. 华南农业大学, 广东 广州 510642; 2. 广东出入境检验检疫局, 广东 广州 510623;
3. 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广东 广州 510623)

(1. South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 2. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China; 3. Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

摘要:建立气相色谱—质谱测定葡萄酒中乙醛含量的方法,并考察提取溶剂、解析 pH、衍生化实际用量等因素对定量结果的影响。结果表明:该方法检测限为 0.12 mg/kg,线性范围为 0.2~100.0 mg/kg($R^2=0.9994$),样品三水平加标回收率为 89.3%~113.0%,平均相对标准偏差为 1.28%~9.42% ($n=6$),适用于葡萄酒中乙醛总量的测定。

关键词:乙醛;葡萄酒;气相色谱—质谱

Abstract: A method for determination of acetaldehyde in wine by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was established, in which the influence factor on the detected results were studied, such as extraction agent, desorption pH, derivatization reagents. As a result, the limit of determination (LOD) of vanillin and ethyl-vanillin was 0.12 mg/kg. linearity range was 0.2 ~ 100.0 mg/kg ($R^2 = 0.9994$). The spiked recovery was between 89.3% ~ 113.0%, and the RSD ranged from 1.28% ~ 9.42% ($n=6$). This method was applicable for determination of acetaldehyde in wine.

Keywords: acetaldehyde; wine; GC-MS

葡萄酒中醛类物质是重要的风味物质,其中乙醛占据了 90%^[1]。葡萄酒中低含量的乙醛具有一种愉快的水果香气,但浓度较高时,会产生一种青草或类似青苹果的异味^[2]。乙醛对微生物的生长既有促进作用也会产生抑制作用,主要取决于其浓度的大小,可见乙醛对于葡萄酒具有重要意义。但

同时醛类化合物对人体健康有潜在的危害,甲醛、乙醛已被国际癌症研究机构(IARC)确定为可能会引起致癌的 2B(Group 2B)类物质^[3],但美国食品和药物管理局(FDA)将乙醛归为“一般认为安全(generally regard as safe)类物质,且目前欧盟也将乙醛列为合法的食品风味添加剂。国内外目前尚无葡萄酒中乙醛的限量标准。

在葡萄酒中,乙醛以结合态和游离态形式存在,目前中国关于葡萄酒中乙醛测定方法有多种。化学法即碘量滴定法用于测定总醛,实测总量高于乙醛含量;酶法(乙醛脱氢酶法)测定受某些金属离子影响;气质联用法和顶空气相色谱法主要用于黄酒或葡萄酒中游离态乙醛含量的检测^[4-5];高效液相色谱法主要用于乙醛总量的测定,但该方法容易受基质干扰^[6-9]。应用衍生化法可以有效提取游离态和结合态乙醛,而且气相色谱质谱法能够排除基质干扰,因而本研究拟采用衍生化—气相色谱—质谱法对葡萄酒中乙醛的含量进行测定,以期更好解决乙醛总量测定和基质干扰的问题,建立适用于酿酒行业中乙醛含量的检测和鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

气相色谱/质谱联用仪(带 EI 源):Agilent7890A-5975C 型,美国 Agilent 科技公司;

涡旋混合器:MS3 basic 型,德国 IKA 集团。

1.1.2 试验材料

5 g/L 的 2,4-二硝基苯肼溶液($C_6H_6N_4O_4$,简称

基金项目:国家质检总局科技项目(编号:2015IK065)
作者简介:韦晓群(1979—),男,华南农业大学副研究员,博士。
E-mail:weixq@iqtc.cn

收稿日期:2016—08—20

DNPH,CAS:119-26-6);准确称取 0.5 g(精确到 0.001 g)2,4-二硝基苯肼(色谱纯),加入 30 mL 盐酸(优级纯)和 30 mL 乙腈(色谱纯)溶解,然后转移到 100 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度线,此溶液现配现用;

12%的乙醇溶液:量取 12 mL 无水乙醇(色谱纯)于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度线;

4 mol/L 的氢氧化钠溶液:准确称取 8 g 氢氧化钠(精确到 0.001 g,分析纯)于烧杯中,加入 40 mL 水溶解,转移到 50 mL 容量瓶中,用水定容至刻度线;

25%的硫酸溶液:准确量取 12.5 mL 浓硫酸(优级纯)于已有 35 mL 水的烧杯中,冷却后转移至 50 mL 容量瓶中,用水定容至刻度线。

乙醛标准储备液:1 000 mg/L 乙醛(溶剂为甲醇),该溶液应在-18 ℃冰箱中保存。

样品:市售红葡萄酒、白葡萄酒、起泡葡萄酒。

1.2 试验方法

1.2.1 样品测定 用移液管准确量取 0.50 mL 葡萄酒样品,于 15 mL 离心管中(起泡酒需预先脱气),加入 0.20 mL 4 mol/L 的氢氧化钠溶液,室温下静置 20 min。然后加入 0.2 mL 25%的硫酸溶液和 0.5 mL 5 g/L 的 2,4-二硝基苯肼溶液,室温避光衍生 6 h。衍生结束后,加入 5 mL 环己烷,涡旋提取 2 min,4 500 r/min 离心 5 min。下层溶液用 5 mL 环己烷重复提取 1 次。合并 2 次提取液用环己烷定容至 10 mL,过 0.22 μm 滤膜于进样瓶中,供上机分析。

脱气:将样品酒样约 300 mL 倒入 1 000 mL 锥形瓶中,盖塞(橡皮塞),在室温条件下,轻轻摇动、开塞放气(开始有“砰砰”声),盖塞。反复操作,直至无气体逸出为止。

1.2.2 乙醛 2,4-二硝基苯腙标准工作溶液的制备 分别量取 0.50 mL 标准工作液于 15 mL 离心管中,然后加入 0.5 mL 5 g/L 的 2,4-二硝基苯肼溶液,室温避光衍生 6 h。衍生结束后,加入 5 mL 环己烷,涡旋提取 2 min,4 500 r/min 离心 5 min。下层溶液用 5 mL 环己烷重复提取 1 次。合并 2 次提取液用环己烷定容至 10 mL,过 0.22 μm 滤膜于进样瓶中,供上机分析。

1.3 仪器条件

1.3.1 气相色谱条件 色谱柱:DB-5ms 毛细管柱(30.0 m×0.25 mm×0.25 μm)或性能类似的分析柱。程序升温:初始温度 130 ℃,保持 1 min,以 10 ℃/min 升至 280 ℃,保持 3 min。进样口温度:280 ℃。接口温度:280 ℃。载气:He(纯度>99.999%),1.2 mL/min,恒流。进样量:1 μL。进样方式:不分流进样。

1.3.2 质谱条件 离子源温度:230 ℃。四极杆温度:150 ℃。电离方式:EI。溶剂延迟:8 min。质谱扫描方式:选择离子采集模式(SIM)。选择监测离子(SIM):定量离子 m/z 224,定性离子 m/z 79,122,152。保留时间,第一个乙醛衍生物的保留时间为(11.386±0.200) min,第二个乙醛衍生物的保留时间为(11.626±0.200) min。

2 结果与讨论

2.1 衍生物

乙醛和 2,4-二硝基苯肼反应,生成乙醛-2,4-二硝基苯腙。由于反应产物具有异构体,在毛细管气相色谱柱中的色谱行为呈现双峰(见图 1),离子碎片完全相同。异构体在标准品以及红葡萄酒、白葡萄酒、起泡酒中的峰面积比例见表 1。由表 1 可知,在不同食品基质中这两种异构体的比例是不变的,因而可采取单峰定量法,也可采用双峰定量法。反应产物存在顺反异构^[10]。

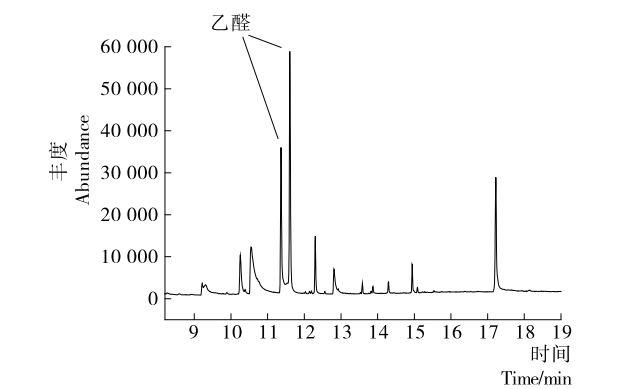


图 1 乙醛和 2,4-二硝基苯肼反应产物色谱质谱图
Figure 1 Acetaldehyde and 2,4-dinitrophenylhydrazine reaction chromatography mass spectra

表 1 两种异构体在标液以及红葡萄酒、白葡萄酒、起泡酒中的峰面积比例

Table 1 The peak area ratio of the two isomers in the standard solution,red wine, white wine and sparkling wine			%
样品	峰 1 面积	峰 2 面积	
标液	39.04	60.96	
红葡萄酒	39.45	60.55	
白葡萄酒	39.16	60.84	
起泡酒	39.23	60.77	

2.2 影响因素

2.2.1 提取溶剂的影响 试验比较了环己烷、正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、异辛烷、乙醚对衍生物乙醛-2,4-二硝基苯腙的萃取效果,结果(见图 2)表明使用环己烷作为萃取剂效果最好。故该方法确定提取溶剂为环己烷。

2.2.2 前处理 pH 的影响 在 pH 低于 3.5 时乙醛与葡萄酒中的 SO₂容易结合生成结合态的乙醛—二氧化硫加合物,该物质在碱性环境时转化为游离态的乙醛和 SO₂。试验考察了强碱性条件(即 pH 为 10~14)解离 20 min 对乙醛衍生化效率的影响,结果见图 3。由图 3 可知,当 pH 为 10 和 11 时,获得的衍生化产物峰面积相对较低;当 pH 在 12~14 时,添加等溶度乙醛可获得较高且接近的衍生物峰面积,说明在该 pH 范围内衍生化效率并无显著变化,因而选择 13 作为前处理 pH。

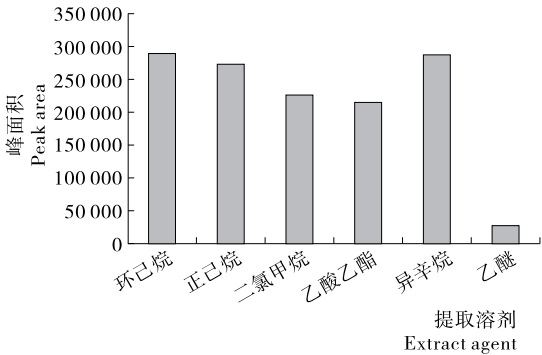


图 2 溶剂对衍生物提取效果的影响

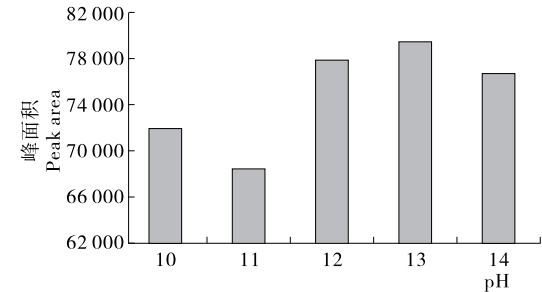


图 3 解离 pH 对乙醛衍生化效率的影响

Figure 3 Effects of different pretreatment pH on the efficiency of acetaldehyde derivatives

2.2.3 前处理时间的影响 碱性环境下,结合态乙醛释放出来需要一定的时间,对于结合态乙醛含量较高的酒样,解离时间太短会造成解离不充分,影响测定结果。试验选取解离时间分别为 5,10,20,30,40 min,结果(见图 4)表明,解离时间为 20 min 时所得的产物响应值最高。

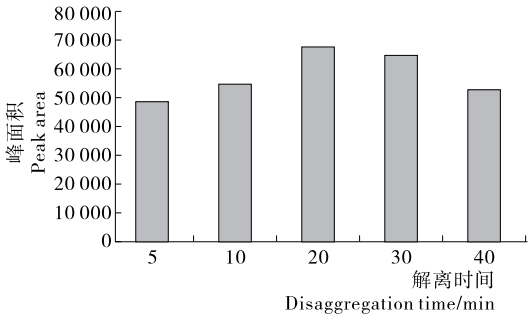


图 4 前处理时间对乙醛衍生化效率的影响

Figure 4 Effect of different pretreatment time on the efficiency of acetaldehyde derivatives

2.2.4 衍生剂用量的影响 分别使用 0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 mL,浓度为 5 g/L 的 2,4-二硝基苯肼溶液对衍生化效率的影响,结果(见图 5)显示,随着衍生化实际使用量的升高,衍生化效率越高,当衍生化试剂超过 0.5 mL 后,衍生化效率趋于平稳,说明在该试验条件下衍生试剂最佳用量为 0.5 mL。

2.2.5 基质的影响 表 2、3 比较了标准加入法和标准曲线法的定量差异,结果发现用标准加入法测定的结果扣除本底

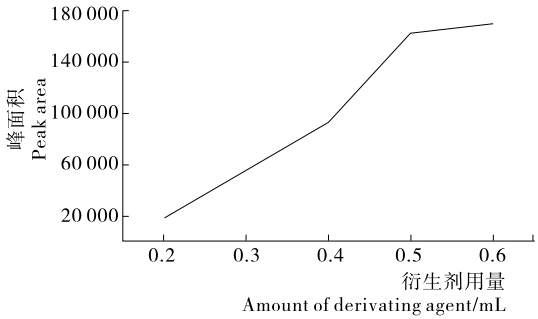


图 5 衍生试剂用量对衍生化效率的影响

Figure 5 Influence of the amount of derivatization reagent on the efficiency of acetaldehyde derivatives

表 2 红葡萄酒基质加标与空白加标测定对比

Table 2 Comparison of red wine matrix and blank with Standard addition

标准加入量/ (mg · L ⁻¹)	标准加入法曲 线响应峰面积	标准曲线响 应峰面积
1.0	13 063	6 575
2.0	19 569	13 018
10.0	71 702	65 190
样品基质峰面积		6 519

表 3 白葡萄酒基质加标与空白加标测定对比

Table 3 Comparison of white wine matrix and blank with Standard addition

标准加入量/ (mg · L ⁻¹)	标准加入法曲 线响应峰面积	标准曲线响 应峰面积
1.0	32 691	6 595
2.0	38 656	13 064
10.0	91 005	65 398
样品基质峰面积		25 602

后与标准曲线测定结果差别不大。这是因为该方法稀释倍数较大,稀释后基质影响可忽略。因此,在确定方法检出限时,可使用标准溶液逐级稀释,以 3 倍信噪比(S/N=3)对应的浓度乘以稀释倍数换算为方法的检出限。

2.3 方法的线性范围和回收率

该方法的检出限采用试剂空白添加标准溶液逐级稀释进行测定得到,以 3 倍信噪比(S/N=3)对应的浓度确定为方法的检出限,因而该方法葡萄酒中乙醛的检出限为 0.06 mg/L。

该方法的稀释倍数为 20 倍,方法测定的线性范围为: 0.2~100.0 mg/L,线性相关系数为 0.999 4,校准曲线方程为 $y=7.194 \times 10^4 x + 2.929 \times 10^3$ 。

该方法通过在样品基质中加标的方法测定回收率的方法来验证方法的正确度。因为无法找到空白基质,且样品中乙醛含量不一,故在 3 种葡萄酒基质加标回收时选择了约 10%~20%常见含量、常见含量、2 倍常见含量和 5 倍常见含量进行回收率试验,加标时每个水平重复进行 6 次平行单独

测定,结果表明方法的总体平均回收率为 89.3%~113.0%,方法的相对标准偏差为 1.28%~9.42%,能够满足日常检测需要。

2.4 实际样品的测定

使用该方法对通过进口法检委托的 27 个葡萄酒样品进行了检测,检测结果见表 4。由表 4 可知,不同类型的葡萄酒中乙醛的本底差别较大,其中葡萄酒中乙醛的含量在 1~3 mg/kg,白葡萄酒和起泡葡萄酒的含量在 20 mg/kg 以上,当检测结果超过检测限时需要增大稀释倍数,使之落在线性范围之内。

3 结论

该研究建立了气相色谱—质谱测定葡萄酒中乙醛含量的方法,研究了两个衍生化产物、提取溶剂、解析 pH、衍生化

表 4 葡萄酒样品的测定结果与信息

Table 4 The measurement results and sample information and of wine

产品名称	产地	酒精度/%	含量/ (mg·kg ⁻¹)
干红葡萄酒	河北	12.0	72.50
葡萄酒	澳大利亚	13.5	10.81
红葡萄酒	澳大利亚	13.5	4.16
干红葡萄酒	法国	13.5	3.24
红葡萄酒	西班牙	12.5	2.74
干红葡萄酒	山东	12.0	2.17
红葡萄酒	西班牙	13.5	2.10
干红葡萄酒	河北	12.5	2.04
红葡萄酒	澳大利亚	14.0	1.91
干红葡萄酒	法国	12.0	1.86
红葡萄酒	西班牙	12.5	1.78
红葡萄酒	美国	11.5	1.65
干红葡萄酒	河北	12.0	1.59
红葡萄酒	法国	11.0	1.34
干红葡萄酒 2011	法国	12.0	1.32
干红葡萄酒	澳大利亚	15.0	1.27
干红葡萄酒	西班牙	13.5	1.27
红葡萄酒	澳大利亚	14.0	1.21
干红葡萄酒	山东	12.0	1.16
红葡萄酒	澳大利亚	13.5	1.02
红葡萄酒	澳大利亚	13.5	1.02
干红葡萄酒	葡萄牙	13.5	1.00
干白葡萄酒	河北	11.5	38.80
白兰地	山东	38.0	21.62
白葡萄酒	美国	9.5	20.35
白葡萄酒	南非	12.0	5.78
起泡葡萄酒	澳大利亚	8.5	27.00

实际用量等因素对定量结果的影响。结果表明,该方法检测限为 0.12 mg/kg,线性范围为 0.2~100.0 mg/kg, $r^2=0.999\ 4$,样品加标回收率为 89.3%~113.0%,平均相对标准偏差为 1.28%~9.42%($n=6$),适用于红葡萄酒、白葡萄酒、起泡葡萄酒中乙醛含量的测定,该方法可用于其它酒类中乙醛含量的测定。本研究的不足之处在于操作略嫌繁琐。

参考文献

[1] 郝瑞颖,赵洁,刘延琳.葡萄酒酿造过程中酿酒酵母乙醛代谢特征的研究[J].食品科学,2013(7):175-179.

[2] 魏运平.葡萄酒酿造中乙醛的形成及其重要作用[J].酿酒科技,2003(2):77-78.

[3] 王光冲.葡萄酒中生物胺、乙醛及矿质元素检测方法研究[D].保定:河北大学,2014:4-5.

[4] 王鹏,戴飞飞,柯灵珠,等.气质联用仪对黄酒陈酿中乙醛含量的检测[J].浙江树人大学学报:自然科学版,2008,8(4):23-25.

[5] 梁瑞娥,韩菊,李铁军,等.顶空气相色谱法测定葡萄酒中微量甲醇、乙醛的方法研究[J].河北化工,1992(2):54-57.

[6] CRUZ M P, VALENTE I M, GONCLAVES L M, et al. Application of gas-diffusion microextraction to the analysis of free and bound acetaldehyde in wines by HPLC-UV and characterization of the extracted compounds by MS/MS detection [J]. Anal Bioanal Chem., 2012(403): 1 031-1 037.

[7] TSAI S W, CHANG C M. Analysis of aldehydes in water by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization[J]. Journal of Chromatography A, 2003(1 015): 143-150.

[8] VESELY P, LUSK L, BASAROVA G, et al. Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(24): 6 941-6 944.

[9] MA Ji-ping, XIAO Rong-hui, LI Jie, et al. Determination of aldehydes in diatoms by headspace solid-phase microextraction coupled with GC-MS[J]. Journal of Chromatographic Science, 2011, 49(1): 15-18.

[10] 张婷婷,谭培功,单红,等.气相色谱法测定地表水中醛酮类化合物[J].岩矿测试,2007,26(5):363-366.