

顶空气相色谱测定白酒中氰化物方法研究

阎冠洲^{1,2}, 钟其顶^{1,2}, 李国辉^{2,3}, 高红波², 熊正河², 肖冬光¹

(1.天津科技大学生物工程学院,天津 300457;2.中国食品发酵工业研究院,北京 100027;

3.河北大学化学与环境科学学院,河北 保定 071002)

摘要: 根据游离氢氰酸与溴水反应生成溴化氰原理,采用顶空进样技术将溴化氰气体注入 GC-ECD 进行检测,建立顶空气相色谱法测定白酒中氰化物的检测方法。结果表明,该方法在 1~100 $\mu\text{g/L}$ 的线性范围内回归系数 $R^2=0.9987$,相对标准偏差 RSD% 为 4.6%($n=7$),回收率 118.9%,检出限为 0.17 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=3$),定量限为 0.56 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=10$)。该方法可准确测定白酒中痕量的氰化物,为白酒的质量安全监控提供了技术手段。

关键词: 氰化物; 白酒; 顶空气相色谱法

中图分类号:TS262.3;TS261.7;O657.71;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2013)03-0089-04

Study on the Determination of Cyanide Content in Liquor by Headspace Gas Chromatography

YAN Guanzhou^{1,2}, ZHONG Qiding^{1,2}, LI Guohui^{2,3}, GAO Hongbo^{2,3}, XIONG Zhenghe² and XIAO Dongguang¹

(1.College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457; 2.China National Institute of Food and

Fermentation Industries, Beijing 100027; 3. College of Chemistry & Environmental Science,

Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: Based on the fact that CN⁻ reacts with bromine to produce cyanogen bromide (BrCN), a determination method of headspace technology combined with GC-ECD (cyanogen bromide gas injected into GC-ECD) has been developed for the determination of cyanide content in liquor. In the range of 1~100 $\mu\text{g/L}$, the correlation coefficient was $R^2=0.9987$. The relative standard deviation (RSD) and recovery rate were 4.6% and 118.9%, respectively. The limit of the detection for cyanide was 0.17 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=3$) and the limit of quantification was 0.56 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=10$). This method could realize trace analysis of cyanide in liquor, which provided an important technical measure for quality and safety monitoring of liquor.

Key words: cyanide; liquor; headspace GC

氰化物是一类含有氰基的强毒性环境污染物质,其包括简单氰化物、络合氰化物和有机氰化物(有机腈类),广泛存在于自然界中。在植物中,氰化物通常与糖分子结合,并以含氰糖苷(cyanogenic glycoside)形式存在^[1]。氰化物可通过呼吸道或消化道进入人体,与线粒体内氧化型细胞色素氧化酶中的三价铁结合,阻止氧化酶中的三价铁还原,从而妨碍细胞正常呼吸,使机体缺氧死亡^[2]。由于氰化物对人体具有严重毒害作用,蒸馏酒及其配制酒食品安全国家标准中 GB2757—2012 规定,氰化物限量应小于 8.0 mg/L(以 HCN 计,按 100%vol 酒精度折算)。同时,氰化物也是白酒中氨基甲酸乙酯的前体物质^[3]。因此,微量氰化物的测定方法是白酒行业质量安全监控的

重要技术手段。

目前,测定食品中氰化物含量的方法较多,如异烟酸-吡啶酮法、异烟酸-巴比妥酸法、吡啶-巴比妥酸等光度法,顶空气相色谱法,电化学法及容量法等^[4-7]。其中异烟酸-巴比妥酸法为国标 GB/T5009.48 氰化物检测方法,但该方法用于白酒检测时检出限为 0.3 mg/L^[8],尚不能满足对更为微量的白酒氢氰酸的测定要求。Giorgio Nota 建立了顶空-气相色谱法测定水中氰化物的检测方法,突破了常规化学手段的限制,采用选择性强、灵敏度高的 ECD 检测器,有效提升了氰化物的检测灵敏度^[9],但白酒中高浓度的乙醇含量不适合直接使用该方法进行检测。本研究通过优化前处理技术和方法参数,避免了白

基金项目:国家自然科学基金(编号:311101333);国家科技支撑计划(编号:2012BAK17B11);质检公益项目(编号:201210104)。

收稿日期:2013-01-31

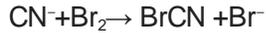
作者简介:阎冠洲(1987-),男,硕士,研究方向:现代酿造技术。

通讯作者:熊正河,女,教授,Email:cnsccf@263.net。

优先数字出版时间:2013-02-22;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20130222.0858.001.html>。

酒乙醇以及低沸点基质对测定结果的影响,采用顶空气相色谱电子捕获检测器(HS-GC/ECD)建立了白酒中微量氰化物的测定方法。

本实验设计使用旋转蒸发或稀释样品的方法去除样品中低沸点化合物,避免其对溴化氰出峰的影响。再以饱和溴水处理,溴分子将与溶液中游离的氢氰酸发生反应:



运用顶空技术,可使BrCN从溶液中分离出来,抽取顶空气体并使用毛细管气相色谱仪和电子捕获检测器进行测定,即可测得酒中氰化物含量。

1 材料与amp;方法

1.1 样品、仪器和试剂

样品:某白酒厂提供酒样。

仪器:Agilent 6890 Series气相色谱仪; μ -ECD检测器;HP-5毛细管柱(5%苯基聚硅氧烷涂层,30 m \times 320 μ m \times 0.25 μ m),AM Combi PAL顶空进样器,Alpha M.O.S;旋转蒸发仪,RE-52AA;分析天平,AB204-N;移液枪;500 mL全玻璃蒸馏器;250 mL圆底烧瓶;1000 W可调电炉;等。

试剂:氰化钾标准储备液:50 mg/L KCN,0.1 mol/L NaOH为溶剂;氰化钾标准工作液:吸取1 mL氰化钾标准储备液用0.1 mol/L NaOH定容到50 mL,终浓度为1 mg/L KCN;0.4%苯酚溶液,烘箱60 $^{\circ}$ C加热熔解苯酚,取0.4 g无色苯酚液体,加水稀释至100 mL;溴水;85%磷酸;1:5(v/v)稀硫酸;1 mol/L氢氧化钠溶液。所有试剂均为分析纯级别。

1.2 实验方法

1.2.1 实验步骤

采用衍生化处理。

处理方法一:将100 mL酒样加入250 mL圆底烧瓶中,再加入2 mL 5 mol/L NaOH溶液,摇匀后进行浓缩。浓缩时,先将水浴温度升至35 $^{\circ}$ C左右,待溶液停止沸腾后,再将温度升至45 $^{\circ}$ C左右,溶液再次停止沸腾后,升温至50 $^{\circ}$ C持续加热(切勿令水浴温度大于60 $^{\circ}$ C),使液体体积达到25 mL左右后停止浓缩。将已冷却溶液转移至100 mL容量瓶中,加水定容至100 mL。

取5 mL前处理后样品置于20 mL顶空瓶中,加入0.15 mL 85%磷酸以及0.3 mL溴水。微微振摇,静置5 min后,加入0.3 mL 0.4%苯酚溶液去除多余的溴,以聚四氟乙烯盖封口。

处理方法二:取1 mL酒样置于20 mL顶空小瓶中,加入0.1 mL 5 mol/L NaOH,用水稀释至5 mL,加入0.15 mL 85%磷酸以及0.3 mL溴水。振摇,静置5 min后,加入0.3 mL 0.4%苯酚溶液去除多余的溴,以聚四氟乙烯

盖封口。

1.2.2 仪器条件及参数设定

顶空条件:平衡温度70 $^{\circ}$ C,振摇10 min,进样针温度80 $^{\circ}$ C,充样速度500 μ L/s,进样速度500 μ L/s,进样后氮气冲洗进样针2 min。

检测条件:柱温升温程序:初始温度55 $^{\circ}$ C,以4 $^{\circ}$ C/min升温至80 $^{\circ}$ C,再以20 $^{\circ}$ C/min升温至200 $^{\circ}$ C,保持3 min;进样口温度130 $^{\circ}$ C,检测器温度260 $^{\circ}$ C;进样量1000 μ L,不分流进样;流速1.0 mL/min; N_2 尾吹气:30 mL/min。

2 结果与分析

2.1 前处理对比优化

2.1.1 前处理对络合氰化物分析结果的影响

由于溴水只能与游离态的氢氰酸反应,而酒精饮料中可能存在的络合氰化物不参加反应,因此测定酒精饮料中的总氰化物时需要先将络合氰化物蒸馏转化为游离态的氢氰酸^[10]。由于白酒生产过程涉及蒸馏过程,本次实验尝试样品不经蒸馏直接进行衍生化处理检测,同时对比通过以上文献中使用的蒸馏操作后所得样品溜出液进行衍生化处理后的同一样品检测结果,验证蒸馏步骤在前处理过程中的必要性。蒸馏处理与对照样的分析对比结果见表1。

表1 蒸馏处理的结果对比

样品编号	蒸馏操作	衍生方法	峰面积
1	是	处理方法一	294619.7
2	是	处理方法一	268236.5
3	否	处理方法一	268636.4
4	否	处理方法一	278439.5

由表1可知,是否进行蒸馏操作对最终的峰面积无显著影响,说明与其他发酵酒相比,白酒样品已经过蒸馏步骤,络合氰化物含量极低,前处理中可以省去蒸馏步骤。

2.1.2 不同处理对低沸点挥发性组分的影响

本方法采用顶空进样技术,白酒中低沸点挥发性组分含量过高会降低溴化氰测定的灵敏度和稳定性。本实验分别采用旋转蒸发和稀释两种前处理方法减少白酒中的低沸点挥发性组分,选取同一酒样使用不同处理进行对比,结果见表2。

对比表2中的结果,使用处理方法一的样品回收率低于使用处理方法二的样品,且稀释与旋转蒸发相比,操作简单,样品用量少,故选择稀释(处理方法二)进行样品前处理操作。

顶空进样法在样品中乙醇含量为15%vol以下时,测定结果的灵敏度和稳定性较好。但在通过稀释降低样品乙醇含量以保证测定结果的稳定性时,还需要减少稀

表2 不同前处理方法结果对比

样品编号	衍生方法	加标浓度 (μg/L)	峰面积	回收率 (%)
1	处理方法一	0	268636.4	—
2	处理方法一	20	382972.9	63.81
3	处理方法二	0	64957.5	—
4	处理方法二	20	107332.4	118.25

释倍数以增大峰面积提高方法检出限, 综合以上条件, 比较不同稀释倍数对测定结果的影响, 最终选择稀释倍数为 1:5。

2.2 顶空条件的优化

2.2.1 氯化钠的添加

在弱电解质、难溶电解质和非电解质的水溶液中, 加入非同离子的无机盐, 可能降低溶液的活度系数, 从而降低溶解度, 这一效应称为盐析效应; 因此在被测样品溶液中, 加入氯化钠以减少可以作为“自由”溶剂的水分子, 降低待测化合物在溶液中的溶解度, 提高其在顶空环境中的浓度, 从而降低 K 值, 实现提高检测的灵敏度。设计加盐影响因素研究, 结果见表 3。

表3 氯化钠对 BrCN 响应值的影响

样品编号	氯化钠添加量(g)	峰面积	增大率 (%)
1	0	10438.8	0
2	2	10516.8	0.75

由表 3 可知, 添加氯化钠后, 衍生化合物的气相色谱出峰面积稍有提高, 但效果并不明显, 考虑到操作的简便性, 本实验选择不添加氯化钠。

2.2.2 平衡温度优化

衍生化合物 BrCN 的沸点为 61~62 °C, 样品溶剂水的沸点为 100 °C。一般情况下, 顶空平衡温度应高于被测物沸点, 并低于样品溶剂沸点 10 °C 以上。因此, 本实验设计相同酒样分别在 60 °C、70 °C、80 °C 和 90 °C 条件下平衡后进样, 结果见表 4。

表4 顶空平衡温度对结果的影响

样品编号	平衡温度(°C)	平衡时间(min)	峰面积
1	60	10	13153.8
2	70	10	17212.8
3	80	10	19813.2
4	90	10	21093.0

表 4 结果表明, 峰面积响应值随温度升高而增高, 提高顶空进样温度有利于提高检测灵敏度, 但响应值增高趋势逐渐平缓。考虑高温会造成顶空气体压力过高, 采样时注射器离开样品瓶的瞬间针尖的压力降为大气压, 会造成一部分样品从针尖遗失, 反而使灵敏度下降, 分析误差增大, 而且在 70 °C 下对同一样品进行测定, 相对标准偏差 RSD(n=5) 为 4.6 %, 符合测定灵敏度和重复性要求。因此, 本实验选择 70 °C 为顶空平衡温度。

2.2.3 顶空平衡时间的优化

顶空平衡时间是在一定温度下溶液达到气液平衡状态所需的时间, 一般通过测定顶空时间与顶空气体浓度的 C-t 曲线来确定。为确定在本实验条件下 BrCN 在顶空瓶中所需的平衡时间, 同一酒样衍生化处理后, 在 70 °C 下分别平衡 5 min、10 min、15 min 后进样, 结果见表 5。

表5 顶空平衡时间对结果的影响

平衡温度(°C)	平衡时间(min)	峰面积
70	5	11379.6
70	10	11721.6
70	15	12850.2

表 5 结果表明, 峰面积响应值随平衡时间升高而增高, 但增大趋势不明显, 可认为体系在 70 °C 平衡 5 min 时, 已达到气液平衡。为保证气-液两相有足够的时间达到平衡, 又避免顶空时间过长引起顶空瓶气密性变差而导致定量准确性的降低, 同时, 为提高检测效率, 本实验选择的顶空平衡时间为 10 min。实验结果表明, 相同样品在 70 °C 下平衡 10 min, 测得 BrCN 含量的相对标准偏差 RSD(n=5) 为 4.6 %, 符合测定灵敏度和重复性要求。

2.3 方法评价

2.3.1 色谱条件优化

经过对气相色谱条件的优化, 氰化物衍生物与其他组分分离度良好, 结果见图 1。

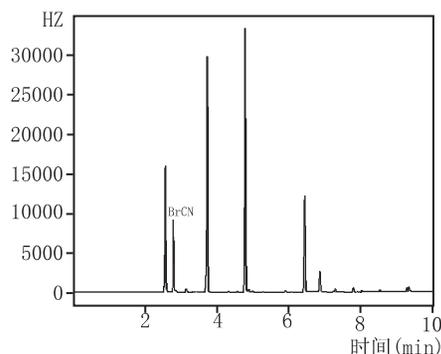


图1 氰化物衍生物气相色谱图

2.3.2 线性范围和检出限

配制得到不同浓度的 KCN 标样, 按 1.2.1 所述处理方法二进行衍生处理, 以对应 HCN 浓度(μg/L) 为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果表明, 在 1~100 μg/L 范围内线性关系良好, 可得回归方程 $y = 1781.6x + 2660.7$, 回归系数 $R^2 = 0.9987$ 。以信噪比 $S/N = 3$ 计算氰化物的检出限为 0.17 μg/L; 以信噪比 $S/N = 10$ 计算氰化物的定量限为 0.56 μg/L, 工作曲线见图 2。

2.3.3 精密度和回收率

①精密度实验

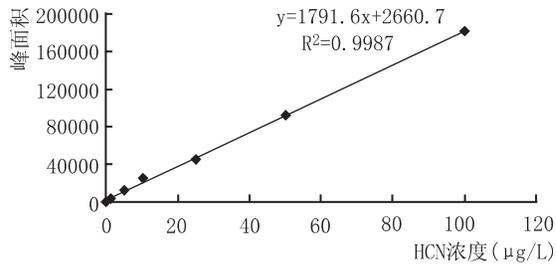


图2 HCN标准工作曲线

同一样品按照本方法重复衍生检测5次,结果见表6。相对标准偏差的RSD为4.6%,精密度良好,符合测定要求。

表6 样品重复性

样品编号	峰面积	样品编号	峰面积
1	11859.3	5	11128
2	10629.6	平均值	11053.1
3	10592.1	RSD%	4.6
4	11056.6		

②回收率实验

分别在3份相同的1 mL白酒中添加0 mL、0.050 mL、0.100 mL水-氰标准工作液(相当于0 μg/L、10 μg/L、20 μg/L HCN),用水稀释到5 mL,计算回收率,结果见表7。

表7 样品加标回收率

样品编号	KCN添加量(μg/L)	计算HCN含量(μg/L)	回收率(%)
1	0	34.77	—
2	10	45.74	109.68
3	20	58.42	118.25

计算平均回收率为113.9%,符合μg/L级别检测方法要求标准。

2.3.4 样品检测

应用建立的方法对6种白酒样品进行分析测定,结果见表8。

3 结论

本实验采用直接稀释法消除了白酒中低沸点挥发性组分对氰化物测定结果的影响,优化了顶空进样参数,建立了顶空气相色谱法测定白酒中氰化物的检测

表8 白酒中氰化物含量检测结果

样品编号	氰化物含量(μg/L)
1	17.11±0.53
2	31.24±0.86
3	31.49±0.64
4	51.26±1.58
5	19.53±0.33
6	24.73±0.65

方法。其中,方法在1~100 μg/L的线性范围内回归系数 $R^2 = 0.9987$,相对标准偏差RSD%为4.6%($n=7$),回收率为118.9%,检出限为0.17 μg/L($S/N = 3$),定量限为0.56 μg/L($S/N = 10$)。相比已有的方法,该法检出限显著提高。该方法实现了对白酒中痕量氰化物的准确测定,为今后开展白酒质量安全监控提供重要的技术手段。

参考文献:

- [1] Abigale J Curtis, C Charles Grayless, et al. Simultaneous determination of cyanide and carbonyls in cyanogenic plants by gas chromatography-electron capture/photoionization detection [J]. Analyst, 2002, 127: 1446-1449.
- [2] 杜兴旗. 氰化物的毒性及其解毒方法[J]. 渭南师范学院学报, 2005, 20(S2): 55-57.
- [3] Efsa. Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages[R]. 2007.
- [4] GB/T 5009148—1996, 蒸馏酒及配制酒卫生标准分析方法[S].
- [5] 陈亚妍. 生活饮用水检验规范注解[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001: 57.
- [6] 杨惠芬, 李明元, 沈文. 食品卫生理化检验标准手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 601.
- [7] 孟凡昌, 李升宪, 赵丕虹. 极谱络合物吸附波催化波[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2001: 210.
- [8] 周庆龙, 王绍杰, 张文德. 高档名酒中微量氰化物的测定方法[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(8): 950-969.
- [9] Giorgio Nota, Carlo Improta, Vito Rocco Miraglia. Determination of cyanides and thiocyanates in water as cyanogen bromine by headspace gas chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1982, 242: 359-363.
- [10] Brian L Bates, Donald R Buick. Gas chromatographic determination of micro amounts of cyanide residues in wines, distilled liquors, and other alcoholic beverages [J]. Journal of the AOAC, 1976, 59(6): 1390-1395.

美国成为最大葡萄酒消费国

本刊讯:据《糖酒快讯-葡萄酒》报道,美国如今是世界上最大的葡萄酒消费国,占全球总量的13%。在本月的葡萄酒与葡萄联合座谈会上,Jon Fredrikson向美国葡萄酒行业的各执行人表示,2012年美国葡萄酒产量增长了2%,进一步满足了日益增长的需求。法国和意大利的葡萄酒消费量正在下滑,越来越多的生产商转向美国市场。进口葡萄酒占美国葡萄酒消费总量的35%。(小小荐)

来源:糖酒快讯-葡萄酒 2013-03-01