食用酒中甲醇气相色谱分析方法研究(三)

——对所研究方法的综合评价

刘兴平[1],刘火安[1],张 超[1],张 良[2]
(1. 四川轻化工学院,四川 自贡 643033; 2. 泸州老窖股份有限公司,四川 泸州 646000)

摘 要: 对ODPN柱采用顶空取样技术分析食用酒中MeOH的气相色谱分析方法进行评价。结果表明,该方法完全可以用于食用酒中MeOH的测定; 进一个样的分析时间为7.55min, 分析速度为ODPN柱液体直接进样法的2.5倍,是DNP-Tween(快)柱液体直接进样法的2.42倍,是GDX-102柱液体直接进样法的2.28倍。该方法MeOH浓度适用范围(0.01~0.06) g/100ml〔最低检测限(1.8~9.0)×10^{-4}g/100ml〕,测定重现性好(变异系数C.V.1.14%~3.76%),准确度高(平均回收率98.48%)。对多种样品进行测定,其测定结果与GDX-102柱、DNP-Tween柱相比,差异不显著,而与品红亚硫酸比色法比,差异显著,品红亚硫酸比色法测定结果偏高。

关键词: 食用酒; 甲醇; 气相色谱法; 评价
中图分类号: TS262; O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2001)05-0076-04

Study on the Method for Determining Methanol in Edible Wine Using Gas Chromatography (Prat 3)

——Synthetic evaluation

LIU Xing-ping[1], LIU Huo-an[1] ZHANG Chao[1] and ZHANG Liang[2]
(1. Sichuan Institute of Light Ind. & Chem. Tech., Zigong, Sichuan 643033, China; 2. Luzhou Laojiao Co., Ltd., Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: We evaluate the Gas Chromatographic method of ODPN column for determining methanol in edible wine with Static-Head-Space-Sampling in the article. The results suggested that it is feasible to determine methanol in edible wine and it only need 7.55min for one sample, the analytical rate of this method is 2.5, 2.42 and 2.28 times faster than that of directly-liquid-sampling ODPN column, DNP-Tween(rapid) column and GDX-102 column respectively. Addition, the range of methanol concentrations that the method can measure is from 0.01g/100ml to 0.06g/100ml(the minimum detectable concentrations is from 1.8×10^{-4} to 9.0×10^{-4}g/100ml), the reappearance of this method is good (coefficient of varition is 1.14%~3.76%) and the accuracy is high (the average recovery rate is 98.48%). There is no significant difference among the determining results of DNP-Tween, GDX-102 and ODPN column when they were used to analyze several samples, but there is significant difference between ODPN column and magenta sulfurous acid colorimetric analysis and the result of the latter is higher than that of the former.

Key words: edible wine; methanol; gas chromatographic analysis; synthetic evaluation

前两文对ODPN柱用于食用酒中MeOH(甲醇)测定的色谱条件和顶空取样条件进行了介绍, 它们分别是: A. 色谱条件: N_2流速35ml/min, H_2流速25ml/min, Air流速300ml/min, 柱温45℃, 汽化温度100℃, 检测器温度120℃; B. 顶空取样条件: 盐析剂NaCl用量7.5g/100ml; 平衡温度室温; 平衡时间10min; 顶空气体进样量1.0ml,样品酒度和重复取样次数对测定结果无明显影响。本文对所选自制的ODPN柱用于食用酒中MeOH测定的可靠性进行综合评价; 比较它与现行分析方法间的差异性等, 以期通过该方法的研究, 为食用酒的MeOH卫生监测提供一快速、及时而准确的分析新方法。

1 试验材料来源

酒度52%(v/v)"华场春"白酒(威远康达总公司青龙酒厂)、云深大曲(富顺泸阳曲酒厂)、"枸杞补酒"(内江蔺木镇高寺酒厂)等,均市售。

2 试验方法

2.1 定量分析要求的评价

通过对该方法的浓度适用范围及精密度、准确度(回收试验)进行研究来进行评价。

2.2 两种进样方法的比较

在相同的色谱条件下,对同一样品采用液体直接进样和顶空气体进样分析, 对它们的色谱图及进一个样的分析周期进行比较,分析二者间的差异。

2.3 几种MeOH分析方法的比较

对10个不同的样品采用ODPN-GC, GDX-GC, DNP-GC和碱性品红亚硫酸比色法分析, 对分析结果进行t检验及回归相关分析。

2.4 60%无MeOH乙醇溶液的制备[1~3]

取300ml $KMnO_4$少许,于沸水浴中蒸馏,收集馏出液,在馏出液中加入$AgNO_3$溶液(1g $AgNO_3$, 溶于少量水中)和NaOH溶液(1.5g NaOH溶于少量水中),摇匀静置过夜,取上清液蒸馏,收集中间馏出液200ml,用酒精比重计测定其酒度,然后加水配成60%

收稿日期: 2001-06-26
作者简介: 刘兴平(1966-),女,重庆人,硕士,讲师,参加课题多项,获省科技成果三等奖1项、市政府科技成果三等奖1项。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(v/v) 无 MeOH 的乙醇溶液。

2.5　样品的处理与 MeOH 的测定

标准曲线的绘制[4]: 用 60% (v/v) 无 MeOH 的乙醇溶液准确配制 0.01~ 0.06g/ 100ml 的系列 MeOH 溶液, 各取 10ml 于顶空平衡瓶中, 平衡 10min 后, 各取 1ml 顶空气体进样分析, 作峰高对浓度的关系曲线 ——标准曲线。

取样品 10ml 于 50ml 顶空取样瓶中, 按 7.5g/ 100ml 的比例加入盐析剂(NaCl), 立即压紧橡胶塞, 在室温下平衡 10min 后, 取顶空气体 1ml 进样分析, 记录响应值(峰高), 查标准曲线, 即可知样品 MeOH 浓度。

3　结果与分析

3.1　方法浓度适用范围及精密度

3.1.1　方法浓度适用范围

用 60% (v/v) 无 MeOH 的乙醇溶液准确配制含 MeOH 0.06g/ 100ml、含 CH_3CHO 0.25g/ 100ml 的标准溶液, 以此为基准, 再用 60% (v/v) 无 MeOH 的乙醇溶液依次配成含 MeOH 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05g/ 100ml 系列标准使用液, 在相同条件下, 分别测定上述 6 种浓度标准液, MeOH 峰高对浓度作图如图 1。结果表明, MeOH 含量在 0.01~ 0.06g/ 100ml 范围内, 其色谱响应值(峰高) 与浓度显著线性正相关(r= 0.9986)。国标中规定蒸馏酒及配制酒 MeOH 含量标准: ≤0.04g/ 100ml[1], 而通常食用酒中 MeOH 含量都在 0.05g/ 100ml 以内[5]。故本法可用于一般食用酒中 MeOH 的卫生检测, 其浓度适用范围 0.01~ 0.06g/ 100ml。

3.1.2　方法精密度

对图 1 所得数据进行数理统计处理, 结果如表 1。

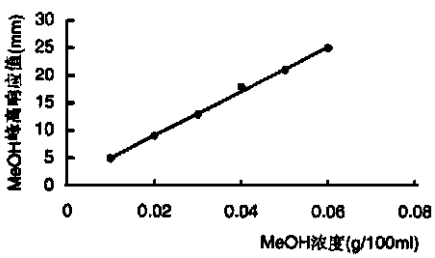

图 1　MeOH 浓度对色谱响应值的影响

回归方程: H= 0.9+ 403C, r= 0.9986, n= 6, 室温 15℃

表 1　精密度试验

MeOH 浓度(g/100ml)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
峰高均值(mm)	5	9	13	18	21	25
S.D.	0.188	0.248	0.309	0.410	0.250	0.285
C.V.(%)	3.76	2.76	2.38	2.28	1.19	1.14

从表 1 可见, C.V. 为 1.14%~ 3.76%, 精密度均能满足定量分析的要求[6]。

3.2　回收试验

向同一酒样中加入不同量的 MeOH 进行加标回收试验, 如表 2, MeOH 平均回收率为 98.48%, 符合定量分析的要求[6]。

表 2　MeOH 回收试验结果

MeOH 浓度(g/100ml)	0.01	0.02	0.04	0.06
重复测定值(g/100ml)	0.0102	0.0201	0.0400	0.0595
	0.0601	0.0089	0.2000	0.0401
	0.0599	0.0095	0.0192	0.0390
	0.0591	0.0098	0.0197	0.0404
均值(g/100ml)	0.0096	0.0198	0.0399	0.0596
回收率(%)	96.0	98.8	99.7	99.42
平均回收率(%)		98.48		

3.3　液体直接进样和静态顶空气体进样法比较

对四川国营威远康达总公司青龙酒厂生产的“华场春”牌 52 度白酒在所研究的 ODPN 柱上采用液体直接进样和静态顶空气体进样, 在相同的色谱条件下进行分析, 色谱图如图 2, 该柱与现行使用的 GDX- 102 柱、DNP- Tween(快) 柱进一个样的全部分析时间(分析周期) 如表 3。

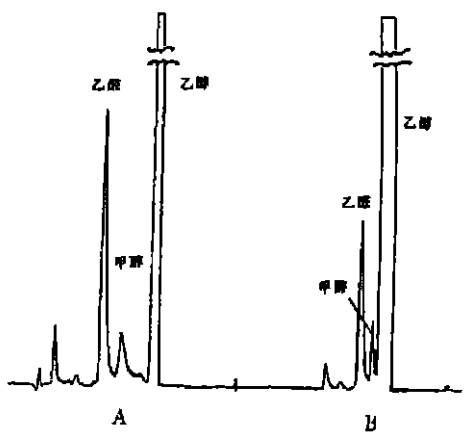

图 2　ODPN 柱顶空进样(A) 与液体直接进样(B) 色谱记录图

纸速: 2cm/ min, A 进样量 1ml, B 进样量 0.5μl

由图 2 知, 静态顶空气体进样, 其色谱分离效果较液体直接进样好, 提高了柱子的分辨率, MeOH 得到良好分离 (分离度> 1.5), 色谱峰清晰, 而且分析灵敏度较后者大大提高, 在色谱图上出现了液体直接进样色谱图上出不了的小峰。分析时间(分析周期) 如表 3, 也较液体直接进样大大缩短, 在自制的 ODPN 柱上, 顶空分析速度为液体直接进样法的 2.5 倍。与现行使用的 GDX- 102 柱、DNP- Tween 柱直接进样相比, 其分析速度为 GDX- 102 柱的 2.28 倍, 是 DNP- Tween 快速柱的 2.42 倍, 大大缩短了分析时间。

3.4　几种 MeOH 测定方法的比较

为了考察本研究方法 (简称 ODPN- GC 法) 的可靠性, 将 ODPN- GC 法与我国目前常用的 GDX- 102 柱气相色谱法 (简称 GDX- GC 法)、DNP- Tween 柱气相色谱法 (简称 DNP- GC 法)、碱性品红亚硫酸比色法(简称比色法) 进行比较[1,7]。用这 4 种方法测定 10 个不同的样品, 结果见表 4, 将 ODPN- GC 法测定结果与其他 3 种方法的测定结果进行 t 检验, 结果见表 5, 回归相关分

表 3　两种进样方法分析时间比较

进样方式	ODPN 柱		GDX- 102 柱	DNP- Tween(快)
	顶空进样	直接进样	直接进样	直接进样
分析时间(min)	7.7, 7.48, 7.52, 7.5	19, 18.5, 18.8, 19	17.4, 17.03, 17.5, 17.07	18.1, 18.45, 18.05, 18.6
均值(min)	7.55	18.83	17.25	18.3
S.D.	0.10	0.24	0.24	0.27
C.V.(%)	1.32	1.27	1.39	1.48

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

析见图 3、图 4、图 5。

表 4 几种方法测定结果 (mg/100ml)

样品号	ODPN- GC 法	GDX- GC 法	DNP- GC 法	比色法
1	12.5	13.5	12.0	13.1
2	17.8	17.0	17.3	18.5
3	15.5	15.0	14.5	17.2
4	31.7	31.0	30.2	35.2
5	11.8	12.2	11.5	13.5
6	28.5	27.3	27.0	30.1
7	22.4	22.0	20.8	23.3
8	41.8	40.9	42.0	42.3
9	30.7	30.5	30.4	33.4
10	43.5	43.0	43.5	41.3

表 5 ODPN - GC 法与其他 3 种方法测定结果差异性检验

项目	GDX - GC 法	DNP - GC 法	比色法
t_D	1.96	1.09	2.42
$T_{0.05,9}$		2.26	
差异性	不显著	不显著	显著

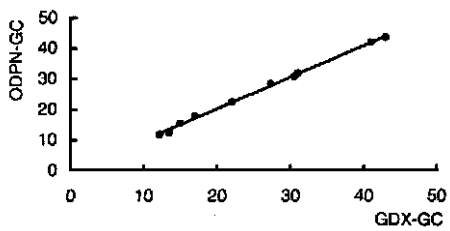

图 3 ODPN- GC 法与 GDX- GC 法测定值之回归相关图
回归方程: $y = 1.031x - 0.402$, $r = 0.9991$, $n = 10$

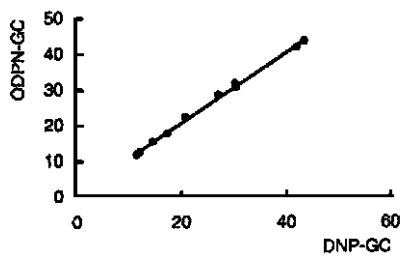

图 4 ODPN- GC 法与 DNP- GC 法测定值之回归相关图
回归方程: $y = 3.646 + 0.889x$, $r = 0.8773$, $n = 10$

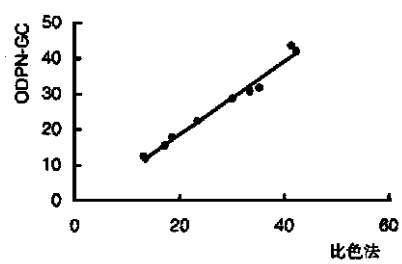

图 5 ODPN- GC 法与比色法测定值之回归相关图
回归方程: $y = 1.025x - 1.84$, $r = 0.9917$, $n = 10$

由以上图表可见, ODPN - GC 法与 GDX - GC 法、DNP - GC 法之间差异不显著, 相关性均达极显著水平($r_{0.01,8} = 0.765$[8], $r > r_{0.01,8}$)。由此说明, ODPN - GC 法与 GDX - GC 法及 DNP - GC 法的测定结果是一致的, 具有同样的可靠性。

ODPN - GC 法与比色法间差异显著, 也就是说二者测定结果是不一致的。但从图 5 可知, 二者测定结果间的相关性较好($r = 0.9917$), 回归方程截距为- 1.84, 二者测定值差的平均值为 1.17。因此, 比色法测定结果比 ODPN - GC 法平均值偏高 1.50 左右。

我们知道, 比色法测定 MeOH 的原理是 MeOH 在 $KMnO_4$ 作用下氧化为 HCHO, HCHO 与品红亚硫酸溶液生成有色化合物, 进行比色而测定的[1,2]。该方法测定步骤多, 影响的因素也很多, 因而引入误差的机会就多。本次测定造成 ODPN - GC 法与比色法间差异显著的原因可能来自如下几个方面: ①配制 $KMnO_4$—磷酸溶液时, 因操作等原因造成 $KMnO_4$ 氧化力下降。氧化力弱, 造成分析结果偏高[5]; ②配制草酸—硫酸溶液时, 如果草酸过量, 则过量的草酸会将亚硫酸品红还原成红色, 但它并不代表真正的 MeOH 含量。因此, 比色时, 造成结果偏高[9]; ③测定过程中, 向样品中加水时, 样品 4, 6, 9 号形成乳白色混浊。据朗伯- 比尔定律, A= ECL(A: 吸光度; E: 吸收系数; L: 样品的光程长度, cm) , 用 721 分光光度计比色时, L 是一定的, 故 A 与 C 相关, 但乳白色混浊的形成, 使溶液的浓度增大, 吸光度增加, 通过计算, MeOH 含量就会增高[5]; ④另外, 我国目前酒类市场上的产品, 随食用酒精改制白酒的推进, 用食用酒精为酒基生产的配制酒品种和数量越来越多[8]。生产配制酒时, 加入一些成分, 如甘油、蔗糖和各类香精及其他一些成分, 这些成分与检测 MeOH 的试剂反应, 出现干扰, 直接测定时, 往往使测定结果偏高[9,10]。

但实验中也发现, 第 10 号样品比色法测定值较 ODPN - GC 法低, 第 10 号酒样为一小型酒厂生产的枸杞酒, 该酒带色, 是经过重蒸后进行比色测定的。重蒸过程往往是造成 MeOH 这一低沸点组分回收不完全而致结果偏低的重要原因[11]。

4 结论

本文对已建立的用 ODPN 柱、顶空取样技术分析食用酒中 MeOH 的气相色谱分析方法进行评价的结果表明:

4.1 该方法测定重现性好(变异系数 C.V. 1.14% ~ 3.76%) , 准确度高(平均回收率 98.48%) 。

4.2 进一个样的分析时间 7.55min(MeOH 响应时间 1′8″) , 分析速度为 ODPN 柱液体直接进样法的 2.5 倍, 是 DNP- Tween(快) 柱液体直接进样法的 2.42 倍, 是 GDX- 102 柱液体直接进样法的 2.28 倍, 仪器占用时间缩短, 利于快速分析及大批样品的分析测定。

4.3 该方法 MeOH 浓度适用范围(0.01~ 0.06) g/ 100ml[最低检测限(1.8~ 9.0) $\times 10^{-4}$ g/ 100ml] 。

4.4 对多种实际样品进行测定, 其测定结果与 GDX- 102 柱、DNP- Tween 柱相比, 差异不显著, 而与品红亚硫酸比色法比, 差异显著, 品红亚硫酸比色法测定结果偏高。

4.5 采用顶空气体进样, 进入柱中成分简单, 柱子污染减小, 利于柱子性能稳定; 对 MeOH 分离良好($R > 1.5$) , 色谱峰清晰, 基线平直。

5 讨论

5.1 平衡时间与样品粘度的关系

哈亨伯特·史密斯认为, 平衡时间与样品粘度的关系很大[12]。粘度高的样品通常比粘度低的样品需要较长的平衡时间。当平衡时间不足时, 则各个物质进入气相后的扩散速度的差异可给测定结果造成一定误差[13]。Binder 在液面上安装一旋转叶轮, 旋

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

转叶轮安装在作为塞子使用的盖子上, 避免了这一问题[13]。本研究未考虑这一点, 略显不足。

5.2 样品酒度对测定结果的影响

H. Miethke 认为, 样品酒度对与乙醇共存的其他低沸点组分的溶解度有影响, 因而影响其平衡蒸汽分压, 即醇制饮料中乙醇浓度对 MeOH 测定结果有影响[14]。本研究取得的结论与此不一致。原因有待进一步研究。

5.3 对本研究确立的 ODPN 柱 MeOH 测定方法的综合评价

本研究确立的食用酒中 MeOH ODPN 柱顶空气体进样分析法, 柱子一经装填好, 其性能即已确定。由于样品和标样均在同样的条件下进行分析, 因此, 本方法同其他的方法相比, 样品处理和进样操作成为误差的主要原因。样品平衡时间是否达到, 进样量的重复性及进样速度均可给 MeOH 测定结果造成一定误差, 但整个操作由同一操作者完成, 进样量和进样速度可基本保持衡定, 由进样带来的误差可大大减少, 而样品平衡时间可根据样品的差异 (如粘度) 适当延长或缩短来避免它可能带来的误差。总的来看, 本方法的准确性是令人满意的。

从结果看, 该柱分辨率高, 基线平直, 样品酒度高低均适用 (不需浓缩或重蒸) , 重复取样次数少于 4 次也不必制备多个样品, 在整个样品测定过程中, 无需配制特别的溶剂, 操作简单, 易于掌握。取顶空气体分析, 进入柱中成分简单, 避免了柱子的污染, 利于色谱柱性能稳定和延长使用寿命, 同时, 出峰时间缩短, 利于快速分析。在该方法中, 进一个酒样的出峰时间平均 7.55min, 按每个样重复 4 次计, 测定一个样约需 30 min, 而 GDX- 102 则需 69 min, 每天仪器使用时间按 7h 计, 则前者每天可分析 14 个样, 后者只能分析 6 个样, 若 2 个或 2 个以上样品交互进样, 本方法可节约更多的时间。对于卫生检测部门对商品酒市场监督时大批样品的分析, 便显示出其优越性。另外, 对有色酒、高固形物含量食用酒中 MeOH 的测定, 经重蒸后直接进样, 操作繁琐、费时, 采用本方法可避免这一点, 尤其能体现它的快速之优点。

综上所述, 本方法基本达到简便、快速、灵敏、准确的目的, 且基本不增加分析成本。可以预料, 本方法大有应用前景, 随着酿酒工业向节约用粮方向转变, 其前景更加广阔, 如能与标准的自动取样、进样系统配合使用, 则更加完善。

5.4 有待进一步研究的问题

平衡时间与样品粘度的关系; 样品酒度对测定结果的影响等有待进一步研究。另外, 顶空取样瓶系自制, 不标准, 有待改进或采用标准的顶空取样瓶与取样、进样系统, 研究采样时间对结果的影响等。(完)

参考文献:

[1] 宋顺达. 食品标准大全[M]. 沈阳: 辽宁大学出版社, 1992.
[2] 王福荣. 白酒生产分析检验[M]. 北京: 轻工业出版社, 1985.
[3] Hagman G. ; Reereade J. ; J. [J]. High Resolut Chromatogr. , 1990, 13, (2) : 99.
[4] 李永军译. 顶隙气相色谱法分析酒类香气成分的改进[J]. 日本酿协. 1992, 39(3) : 264.
[5] 王兰英. 对白酒甲醇检测中获得准确结果的探讨[J]. 辽宁食品与发酵, 1991, (4) : 53.
[6] 王叔淳. 食品分析数理统计与质量控制[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
[7] 曾祖训. 白酒中醇酯主要成分气相色谱分析—DNP- Tween 色谱柱的应用[J]. 酿酒, 1986, (5) : 33.
[8] 龚文昌. 节约用粮提倡酒精改制白酒[J]. 酿酒科技, 1996, (3) : 79.
[9] 李文奇. 标准曲线法在食用酒中甲醇含量测定上的运用[J] . 酿酒科技, 1995, (6) : 37.
[10] 凌树阁. 白酒甲醇测定法的改进[J]. 酿酒, 1986, (5) : 33.
[11] 贡献, 陈周平. 气相色谱法与白酒分析[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1989.
[12] Hachenberg H., Schmidt A. P., Gas Chromatographic Headspace[M]. Heyden 1981.
[13] Binder, H. , Z. [J]. Anal. Chem. , 1969, 244: 353.
[14] Miethke, H. [J]. Deat. Lebensm. —Rdsch. , 1969, 65: 379.

(上接第 82 页)

后虽然也增加, 但因投料时酶制剂的 ACPase 活力不同, 氨基酸含量的幅度也不一样。成品酒中氨基酸的组成与清酒相同, 香气成分如表 13 所示, 高级醇含量比清酒高。

表 13 生米投料制成酒的香气成分(总投米 100kg) (× 10^{-6})

发酵时间(天)	乙醛	乙酸	正丙醇	异丁醇	异戊醇	异戊酸	E/A
11	10.1	91	202	247	258	12.7	4.9
15	12.9	89	168	245	255	13.5	5.3
25	11.0	100	225	242	266	2.5	0.9
原酒	20~ 40	150~ 200	100~ 150	100~ 150	100~ 200	0~ 8	

使用糖化酶 100 的试样, 投料后 15 天与 42 天的成分比较, 日本酒度、还原糖、氨基酸度都不同, 感官品评, 前者类似干型清酒, 后者的口味类似 6 个月陈酿的绍兴酒。

醪液中还原糖集聚少, 糖化酶用量低, 糖化后即刻酒精发酵, 发酵停止即上槽, 制成的酒为干型。若要制成甜型酒, 则应采用 4 段投料法。生料酿酒可节省能源。

6 生料酿酒的可行性

生料酿酒的酒质可分两大类, 一类是以清酒为目标的生料酒, 一类则是与清酒无关的新酒种。

在清酒酿造中, 现行酒税法规定对米曲的使用和酶制剂的使用都有限制。但以清酒为目标时, 制曲中现在常用曲霉与保藏的曲霉的酶含量和平衡还存在一定问题, 有必要对曲霉加以改良, 要求酶制剂的酶活力更高。

无论酒质定位在何种标准, 从生米酿酒的实用化出发, 都必须充分考虑酿造的安全性和经济性。

米的蒸煮工程的重要意义在于淀粉糊化和对米粒的杀菌, 而对生米酿酒则有人提出了相应的安全性问题。在秋山裕一等的小试中, 添加酵母活菌数少, 5 天左右投料 25 次, 没有一次发现细菌污染, 仅有 3 次受到根霉污染。但根霉污染的投料随发酵开始其繁殖亦停止, 与其他投料试验一样顺利发酵, 酿制的酒香味无异。此外, 作了低温发酵试验, 由于冷库装置出故障, 最后投料 8 天品温降至 5℃左右, 恢复到原品温 11℃后无异常, 顺利终止发酵。试验证明, 生米酿酒是可行的。

节译自日本醸造协会志. 1982, 77, (6) : 352~ 360.

一平校

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net