

核磁共振法(SNIF-NMR/RMN-FINS)测定葡萄汁、 浓缩葡萄汁、精馏浓缩葡萄汁以及葡萄酒中的糖 分发酵产生的乙醇中氘的分布情况

(决议 Oeno 426-2011)

1 简介

在葡萄汁中的糖分和水分中所含的氘原子在发酵之后被重新分配到葡萄酒的分子 I、II、III 和 IV 中。



2 范围

该方法可以测定葡萄酒中的乙醇以及由葡萄汁(葡萄汁、浓缩葡萄汁、精馏浓缩葡萄汁)发酵得到的乙醇中的氘同位素比(D/H)。

3 定义

$(D/H)_I$: 分子 I 的同位素比

$(D/H)_{II}$: 分子 II 的同位素比

$(D/H)_W$: 葡萄酒(或发酵类产品)中水的同位素比

$$R = 2(D/H)_{II} / (D/H)_I$$

R 表示氘在分子 I 和分子 II 中的相对分布; R 可通过 $R = 3h_{II} / h_I$ 来计算, h 表示峰高。

4 原理

以上所定义的几种参数 R 、 $(D/H)_I$ 和 $(D/H)_{II}$ 是通过葡萄酒或葡萄汁、浓缩葡萄汁以及精馏浓缩葡萄汁在给定条件下发酵后的产物中的乙醇进行氘的核磁共振检测得到的。

5 试剂与材料

5.1 试剂

5.1.1 按照卡尔费氏方法测水分所用的试剂(该方法也用来测定蒸馏液中的酒精度)。

5.1.2 六氟苯(C_6F_6)用作锁场物质。

5.1.3 三氟乙酸(TFA, CAS: 76-05-1)或三氟乙酸酐(TFAA, CAS: 407-25-0)。

5.2 标准物质(从基尔(B)的欧共体标准物质参考局(IRMM)购得)

5.2.1 CRM-123 NMR 标准品, 用来校准核磁共振波谱仪。

5.2.2 *N,N*-四甲基脲(TMU)标准品(通过 D/H 同位素比的校准)。

5.2.3 其余可用来测定馏出液的有证标准物(CRM)及其准备步骤:

表 1

CRM		参数	标准值	不确定度
CRM-656	葡萄酒中的乙醇, 96% vol.	t^D (乙醇)/%	94.61	0.05
		$\delta^{13}C$ (乙醇)/‰ VPDB	-26.91	0.07
		(D/H) _I (乙醇)/ppm	102.84	0.20
		(D/H) _{II} (乙醇)/ppm	132.07	0.30
		R(乙醇)	2.570	0.005
CRM-660	乙醇水溶液, 12% vol.	t^D (乙醇)/%	11.96	0.06
		$\delta^{13}C$ (乙醇)/‰ VPDB	-26.72	0.09
		(D/H) _I (乙醇)/ppm	102.90	0.16
		(D/H) _{II} (乙醇)/ppm	131.95	0.23
		R	2.567	0.005
		(D/H) _w (水)/ppm	148.68	0.14

5.3 仪器

5.3.1 NMR(核磁共振)测定仪, 配可检测“氘”的探头, 与磁场强度 B_0 的特有频率 ν_0 相配合(例如 $B_0=7.05T, \nu_0=46.05\text{ MHz}$ 或 $B_0=9.4T, \nu_0=61.4\text{ MHz}$), 具有质子(B_2)的去耦通道和氟的锁场通道。NMR 测定仪可以安装自动样品转换器和附加的数据处理软件来评价光谱和计算结果。NMR 波谱仪的性能可以用有证参考物质(CRM123)来验证。

5.3.2 10 mm 核磁样品管。

5.3.3 蒸馏装置: 图 1 中的 Cadiot 柱就是一个手动蒸馏系统的例子, 它能从葡萄酒中提取 96%~98.5% 没有同位素分馏的乙醇, 并且得到酒精质量浓度为 92%~93%(95% vol.) 的馏出物。

注: 可以使用任何乙醇抽提装置, 但要确保从葡萄酒中提取的酒精没有同位素分馏。

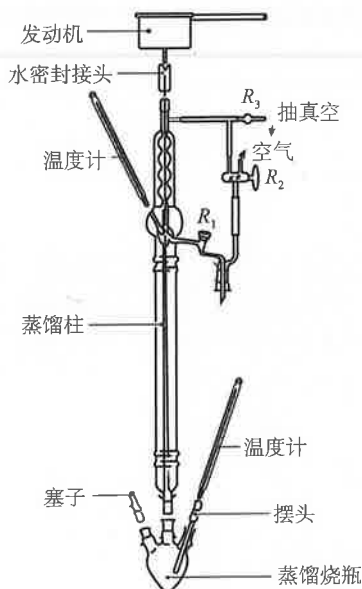


图 1 乙醇抽提装置

这个系统由以下几部分组成:

- 电热套,带压力调节器;
- 1 L 的圆底磨口烧瓶;
- 可旋转的 Cadiot 柱(可转动的部分为聚四氟乙烯材料);
- 磨口锥形瓶,用来收集蒸馏的产物。

也可以使用自动蒸馏系统。

蒸馏系统的性能需要定期进行检查,以确保提取的效率和同位素的检测的准确性。这可以通过蒸馏和测定 CRM-660 来完成。

5.3.4 实验室常用设备和消耗品:

微量移液器和枪头;

精度为 0.1 mg 或更高的天平;

精度为 0.1 g 或更高的天平;

一次性注射器;

带有准确刻度的烧瓶(50 mL, 100 mL, 250 mL……);

配备气密系统和惰性隔垫的烧瓶(测量前用来储存葡萄酒、馏出液和残留物);

其他方法中提到的设备和消耗品。

6 样品的制备

6.1 在不知道酒精度的情况下,需要检测葡萄酒或发酵产物(t_v)的酒精浓度,至少精确至 0.05% vol(可使用 OIV 方法 MA-F-AS312-01-TALVOL)。

6.2 乙醇的提取:用带刻度的烧瓶量取适当体积 V (mL)的葡萄酒或发酵产物,倒入蒸馏装置的圆底烧瓶中。用平底锥形瓶来接收馏出液。加热样品对其进行蒸馏,使冷凝器达到一个恒定的回流比。当特定的乙醇-水共沸时蒸汽达到恒定温度(78°C)时,开始收集馏出液;当温度上升时,则停止收集。收集所有乙醇-水共沸时的馏出液。

当使用手动 Cadiot 柱(图 1)时,请遵循以下步骤:

收集乙醇-水共沸时的馏出液,当温度上升时,停止收集 5 min。当温度降至 78°C 时,重新收集馏出液直到蒸汽的温度再次上升。重复这一操作,直到温度不再回到 78°C,停止收集馏出液。

也可使用市售的自动蒸馏系统来完成这一步骤。

称取收集的馏出液质量 m_D ,精确到 0.1 g。

为了防止同位素分馏,馏出液需被保存在一个密封的玻璃瓶中,以防止在测定酒精度(6.3)和制备 NMR 测试管(7.1)前蒸发。

保存少量的残留物(几毫升),需要时可测定它的同位素比(D/H)‰。

6.3 馏出物酒精度的测定:馏出物酒精度($m/m, \%$)的测定精度需高于 0.1%。

馏出物(p' g)的含水量可用卡尔费氏方法测定,用 0.5 mL 已知酒精质量(p g)的样品来测定。馏出物酒精度可由馏出物的质量用下式计算:

$$t_m^D(m/m) = 100(1 - p')/p$$

酒精度也可用密度计(如电子密度仪)来测定。



6.4 蒸馏效率

馏出液的产率可由下式推断:

$$\text{馏出液的产率}(\%) = 100 t_m^D m_D / (V \cdot t_V)$$

根据不确定度 t_V , 馏出物的产率预计在 $\pm 0.5\%$ [酒精度为 10% (V/V) 的葡萄酒]。

在使用 Cadiot 柱蒸馏时, 当产率高于 96% 时, 不会有显著的同位素分馏效应。为保证足够的蒸馏产率, 一般需量取足够体积 V mL 的葡萄酒或发酵产物来进行蒸馏。对常见的每份 750 mL、 500 mL、 400 mL 或 300 mL 的葡萄酒或发酵产物, 蒸馏产率达到 96% 以上, 其相对应的 t_V 分别为 4% vol、 6% vol、 8% vol 和 10% vol。

6.5 发酵葡萄汁、浓缩葡萄汁和精馏浓缩葡萄汁

在使用之前, 可先将酵母用少量葡萄汁进行活化。发酵容器需要装上密闭装置来防止乙醇的损失。

6.5.1 葡萄汁

将 1 L 葡萄汁放入一个供发酵的容器中, 葡萄汁中可发酵糖分的浓度已预先测定。加入 1 g 经预先活化处理过的干酵母, 装上空气隔绝装置进行发酵, 直到糖分全部被发酵为止。发酵产物经上述葡萄酒蒸馏步骤 (6.1~6.4) 进行蒸馏。

注: 经二氧化硫抑制发酵的葡萄汁需经过脱硫处理, 方法是将葡萄汁置于 $70^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$ 的水浴中在回流条件下, 进行吹氮, 注意防止水蒸发而导致的同位素分馏。或者, 通过加入少量过氧化氢 (H_2O_2) 来去除二氧化硫。

6.5.2 浓缩葡萄汁

将体积为 V mL, 已知含糖量 (170 g) 的浓缩葡萄汁移入发酵容器中, 再添加 $(1000-V)$ mL 的水, 使总容积达 1 L。加入 1 g 干酵母和 3 g 不含氨基酸的 Bacto 酵母氮基。均质后按 6.5.1 的步骤操作。

6.5.3 精馏浓缩葡萄汁

按照 6.5.2 的步骤, 加入 $(1000-V)$ mL 溶有 3 g 酒石酸的水, 使容积达 1 L。

注: 浓缩葡萄汁和精馏浓缩葡萄汁测定时, 需要加入与原始葡萄汁不同 (D/H) 比的当地水进行稀释。通常情况下, 认为葡萄汁和发酵用的水有相同的氘浓度如 V-SMOW (155.76 ppm), 则乙醇中测到的 $(D/H)_I$ 和 $(D/H)_II$ 参数应为常量。

可用以下的公式对其进行计算 (Martin et al., 1996, J. AOAC, 79, 62-72):

$$\begin{aligned} \left(\frac{D}{H}\right)_I^{\text{Norm. V-SMOW}} &= \left(\frac{D}{H}\right)_I - 0.19 \times \left[\left(\frac{D}{H}\right)_w^S - 155.76\right] \\ \left(\frac{D}{H}\right)_{II}^{\text{Norm. V-SMOW}} &= \left(\frac{D}{H}\right)_{II} - 0.78 \times \left[\left(\frac{D}{H}\right)_w^S - 155.76\right] \end{aligned}$$

其中 $\frac{D}{H}$ 是被稀释葡萄汁的氘同位素比, 这个数值可以通过全球大气水线公式来计算 (Craig, 1961):

$$\left(\frac{D}{H}\right)_w^S = 155.76 \times \left[\frac{8 \times \delta^{18}\text{O} + 10}{1000} + 1\right]$$

其中 $\delta^{18}\text{O}$ 是根据葡萄酒和葡萄汁中水的 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 同位素比的方法 [OIV-MA-AS2-12] 测定稀释的葡萄汁得到的。

保留 50 mL 葡萄汁或经二氧化硫处理的葡萄汁或浓缩葡萄汁或精馏浓缩葡萄汁作为试

样,以备测定水的含量以及同位素比(D/H)_W。

7 步骤

7.1 制备供 NMR 测定的酒精样品

10 mm 直径的核磁共振探头:在一个已称重的烧杯中,吸取 3.2 mL 馏出液(6.2),称重(m_A),精确到 0.1 mg;然后再吸取 1.3 mL 内标物 TMU(5.2.2),称重(m_{ST}),精确到 0.1 mg。

根据所使用光谱仪和探头的类型,加入足够量的六氟苯(5.1.2)作为锁场试剂:

光谱仪	10 mm 探头
7.05T	150 μ L
9.4T	35 μ L

这些数据仅作参考,实际的用量需根据 NMR 的灵敏度来调整。在准备核磁管直到 NMR 测定前,一定要注意避免乙醇和 TMU 的蒸发。因为这可能导致同位素分馏,从而导致各成分称重(m_A 和 m_{ST})和 NMR 结果错误。

可以使用 CRM-656 来验证检测结果和制备步骤的准确性。

注:六氟苯中可加入 10%(V/V)的三氟乙酸(5.1.3)来催化羟基键上的快速氢交换,从而产生羟基和残留水的 NMR 信号峰。

7.2 记录乙醇的²H核磁共振谱

样品中磁场 B_0 的均匀性通过“匀场”步骤来完成,通过观察使六氟苯中¹⁹F NMR 最大化锁定信号进行优化。现代 NMR 光谱仪能自动完成“匀场”步骤,可以对按 7.1 制备的乙醇样品,提供初始最接近优化的均匀的磁场。这个步骤的有效性可以通过检查不使用指数倍增而得到谱图的分辨率来完成[如:LB=0,图 2b)],理想状态下,乙醇中甲基、亚甲基以及 TMU 中甲基信号半峰宽的必须小于 0.5 Hz。使用指数倍增处理[LB=2,图 2a)],对于 95% vol(质量分数为 93.5%)的酒精样品,其甲基信号灵敏度应高于或等于 150。

检查仪器设置:

根据说明书,完成常规的均匀性和灵敏度校准。

使用密封的 CRM123 试管(H:高,M:中,L:低)。

根据 7.3 中的步骤,测定这些酒精的同位素值,标以 Hmeas, Mmeas, Lmeas。

比较相应的参考值,标以 Hst, Mst, Lst。

每个谱重复 10 次测试所得到的标准偏差 R 应低于 0.01, (D/H)_I 为 0.5 ppm, (D/H)_{II} 为 1 ppm。

各个同位素参数[R , (D/H)_I, (D/H)_{II}]的平均值应处在 CRM123 相应参数的重复性标准偏差范围内。如果达不到要求,则应再进行调整。

优化完成参数设置后,可使用其他 CRM 材料对日常检测进行质量监控。

7.3 确定核磁共振波谱的条件

将 7.1 中所制备的乙醇试样置于 10 mm 核磁试管中,放进探头处。

建议条件如下:

——恒定的探头温度,根据去耦合产生的加热功率,设置温度变化范围在 302 K~306 K,



温度变化在±0.5 K 内;

——对于 1200 Hz 的波谱宽度(存储 16 K)下,其采集时间至少为 6.8 s(即在 61.4 MHz 为 20 ppm 或在 46.1 MHz 为 27 ppm);

——90°脉冲;

——抛物线探测:参照乙醇的信号,调整补偿 01 在 OD 和 CHD 之间;参照水的信号,调整补偿 01 在 HOD 和 TMU 之间;

——通过同一根核磁管上的解耦线圈所测得的质子谱,可以测定去耦补偿 02 的值。当 02 处在 CH₃ 和 CH₂ 频率间隔的中位时,就能得到好的去耦效果。使用宽带去耦或复合脉冲序列(例如 WALTZ16)以确保去耦的均匀性。

每个谱均需作一定次数的 NS 累加,才能使信噪比达到 7.2 的要求,重复 NE 次累积。NS 的值与核磁共振仪的类型以及所用探头的类型有关。例如:

质谱仪	10mm 探头
7.05 T	NS=304
9.4 T	NS=200

NE 的重复次数应有统计学意义并且满足该方法的精密度,见第 9 部分。

取两个按照 7.1 步骤进行制备的 NMR 样品管,每个管记录 5 次重复测试的 NMR 谱 (NE=5)。各同位素参数的最终结果与两个 NMR 样品管测得的平均值相对应。此时,对两个样品管测试结果的评价标准是:

$$|Mes1(D/H)_I - Mes2(D/H)_I| < 0.5 \text{ ppm}, |Mes1(D/H)_{II} - Mes2(D/H)_{II}| < 0.8 \text{ ppm}$$

8 结果表示

对于每一个 NE 波谱(见乙醇的 NMR 光谱,图 2a)

$$R = 3 \cdot \frac{h_{II}}{h_I} = 3 \cdot \frac{\text{信号高度 II (CH}_3 \text{ CH}_D \text{ OH)}}{\text{信号高度 I (CH}_2 \text{D CH}_2 \text{ OH)}}$$

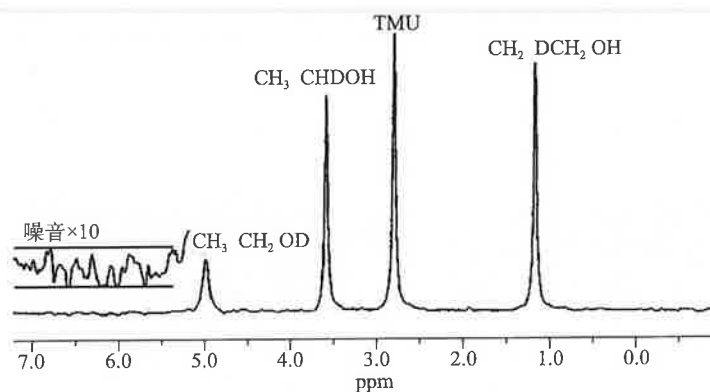


图 2a) 葡萄酒中乙醇的²H NMR(内标 TMU: N,N-四甲基脒)

$$(D/H)_I = 1.5866 \cdot T_I \cdot \frac{m_{ST}}{m_A} \cdot \frac{(D/H)_{ST}}{t_m^D}$$

$$(D/H)_{II} = 2.3799 \cdot T_{II} \cdot \frac{m_{ST}}{m_A} \cdot \frac{(D/H)_{ST}}{t_m^D}$$

其中

$$T_I = \frac{\text{信号高度 I (CH}_2\text{D CH}_2\text{ OH)}}{\text{内标信号高度 (TMU)}}$$

$$T_{II} = \frac{\text{信号高度 II (CH}_3\text{ CHD OH)}}{\text{内标信号高度 (TMU)}}$$

—— m_{ST} 和 m_A 见 7.1;

—— t_D^0 见 6.3;

—— $(D/H)_{ST}$ = 内标(TMU)的同位素比,由欧共体参考标准局提供。

假设半峰宽是确定的并且有合理的近似值,用信号的高度来代替信号的峰面积计算,计算的精密度较低[图 2b)]。

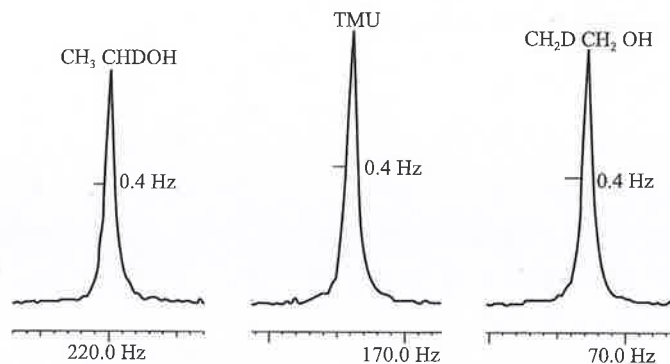


图 2b) 乙醇的²H-NMR(未经指数倍增)(LB=0)

通过对一个指定样品的多次测量,来计算每一个同位素参数的平均值和置信区间。

9 精密度

SNIF-NMR 方法重复性和再现性研究,是通过果汁的联合比对实验研究完成的,已经列在参考文献中。由于这些研究只考虑了 $(D/H)_I$ 参数。因此,采用了多个实验室提供的内部葡萄酒研究数据,来进行重复性的标准偏差和重复性限值的研究,见附录 A。附录 B 中能力验证结果提供的数据可用于计算葡萄酒的再现性的标准偏差和再现性限值。

总结如下:

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
S_r	0.26	0.30	0.005
r	0.72	0.84	0.015
S_R	0.35	0.62	0.006
R	0.99	1.75	0.017

其中: S_r 为重复性标准偏差;

r 为重复性限值;

S_R 为再现性标准偏差;

R 为再现性限值。

附 录 A

内部重复性研究评价

采用 4 个实验室提供的内部实验数据,来进行 SNIF-NMR 方法重复性的评价研究。

实验室 1、实验室 2 和实验室 3 分别完成了 10 个、9 个和 15 个不同葡萄酒样品蒸馏和测定的平行分析。

实验室 4 完成了短期内对同一个葡萄酒样品 16 次蒸馏和重复的测定。

表 A.1 实验室 1:10 个葡萄酒样品的平行分析结果

样品	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R	(D/H) _I 差值	差值平方	(D/H) _{II} 差值	差值平方	R 差值	差值平方
1	103.97	130.11	2.503	0.55	0.302	0.68	0.462	0.000	0.000 00
	104.52	130.79	2.503						
2	103.53	130.89	2.529	0.41	0.168	0.32	0.102	0.016	0.000 26
	103.94	130.57	2.513						
3	102.72	130.00	2.531	0.32	0.102	0.20	0.040	0.004	0.000 02
	103.04	130.20	2.527						
4	105.38	132.39	2.513	0.14	0.020	0.20	0.040	0.000	0.000 00
	105.52	132.59	2.513						
5	101.59	127.94	2.519	0.48	0.230	0.20	0.040	0.016	0.000 26
	101.11	128.14	2.535						
6	103.23	132.14	2.560	0.30	0.090	0.36	0.130	0.001	0.000 00
	102.93	131.78	2.561						
7	103.68	130.95	2.526	0.15	0.023	0.75	0.563	0.011	0.000 12
	103.53	130.20	2.515						
8	101.76	128.86	2.533	0.24	0.058	0.42	0.176	0.003	0.000 01
	101.52	128.44	2.530						
9	103.05	129.59	2.515	0.04	0.002	0.44	0.194	0.007	0.000 05
	103.01	129.15	2.508						
10	101.47	132.63	2.614	0.50	0.250	0.18	0.032	0.010	0.000 10
	100.97	132.45	2.624						
				差值平方和	1.245		1.779		0.000 81
				S _r	0.25		0.30		0.006
				r _r	0.71		0.84		0.018

表 A.2 实验室 2:9 个葡萄酒样品的平行分析结果

样品	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R	(D/H) _I 差值	差值平方	(D/H) _{II} 差值	差值平方	R 差值	差值平方
1	105.02	133.78	2.548	0.26	0.068	0.10	0.010	0.008	0.000 07
	104.76	133.88	2.556						
2	102.38	130.00	2.540	0.73	0.533	0.40	0.160	0.010	0.000 11
	101.65	129.60	2.550						
3	100.26	126.08	2.515	0.84	0.706	0.64	0.410	0.008	0.000 07
	99.42	125.44	2.523						
4	101.17	128.83	2.547	0.51	0.260	0.45	0.203	0.004	0.000 02
	100.66	128.38	2.551						
5	101.47	128.78	2.538	0.00	0.000	0.26	0.068	0.005	0.000 03
	101.47	128.52	2.533						
6	106.14	134.37	2.532	0.12	0.014	0.04	0.002	0.002	0.000 00
	106.26	134.41	2.530						
7	103.62	130.55	2.520	0.05	0.003	0.11	0.012	0.003	0.000 01
	103.57	130.66	2.523						
8	103.66	129.88	2.506	0.28	0.078	0.55	0.302	0.004	0.000 01
	103.38	129.33	2.502						
9	103.50	129.66	2.506	0.43	0.185	0.22	0.048	0.015	0.000 21
	103.93	129.44	2.491						
				差值平方和	1.846		1.214		0.000 53
				S _r	0.32		0.26		0.005
				r	0.91		0.74		0.015

表 A.3 实验室 3:15 个葡萄酒样品的平行分析结果

样品	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R	(D/H) _I 差值	差值平方	(D/H) _{II} 差值	差值平方	R 差值	差值平方
1	101.63	125.87	2.477	0.06	0.004	0.46	0.212	0.007	0.000 05
	101.57	125.41	2.470						
2	99.24	124.41	2.507	0.05	0.002	0.04	0.002	0.001	0.000 00
	99.19	124.37	2.508						
3	101.23	125.07	2.471	0.06	0.004	0.16	0.026	0.005	0.000 02
	101.17	125.23	2.476						
4	100.71	125.29	2.488	0.07	0.005	1.16	1.346	0.024	0.000 58
	100.78	124.13	2.464						

表 A. 3(续)

样品	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R	(D/H) _I 差值	差值平方	(D/H) _{II} 差值	差值平方	R 差值	差值平方
5	99.89	124.02	2.483	0.18	0.032	0.56	0.314	0.007	0.000 05
	99.71	123.46	2.476						
6	100.60	124.14	2.468	0.19	0.036	0.66	0.436	0.018	0.000 32
	100.41	124.80	2.486						
7	101.47	125.60	2.476	0.23	0.053	0.14	0.020	0.003	0.000 01
	101.70	125.74	2.473						
8	102.02	124.00	2.431	0.13	0.017	0.07	0.005	0.005	0.000 02
	102.15	123.93	2.426						
9	99.69	124.60	2.500	0.40	0.160	0.53	0.281	0.000	0.000 00
	100.09	125.13	2.500						
10	99.17	123.71	2.495	0.30	0.090	0.19	0.036	0.004	0.000 02
	99.47	123.90	2.491						
11	100.60	123.89	2.463	0.40	0.160	0.54	0.292	0.001	0.000 00
	101.00	124.43	2.464						
12	99.38	124.88	2.513	0.33	0.109	0.55	0.302	0.002	0.000 00
	99.05	124.33	2.511						
13	99.51	125.24	2.517	0.44	0.194	0.01	0.000	0.011	0.000 12
	99.95	125.25	2.506						
15	101.34	124.68	2.460	0.43	0.185	0.41	0.168	0.002	0.000 00
	101.77	125.09	2.458						
				差值平方和	1.050		3.437		0.001 20
				S _r	0.19		0.34		0.006
				r	0.53		0.96		0.018

表 A. 4 实验室 4: 一个葡萄酒样品的 16 次分析结果

重复测量次数 n	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R
1	101.38	126.87	2.503
2	101.30	126.22	2.492
3	100.98	125.86	2.493
4	100.94	126.00	2.497
5	100.71	125.79	2.498
6	100.95	126.05	2.497

表 A. 4(续)

重复测量次数 n	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
7	101.17	126.30	2.497
8	101.22	126.22	2.494
9	100.99	125.91	2.494
10	101.29	126.24	2.493
11	100.78	126.07	2.502
12	100.65	125.65	2.497
13	101.01	126.17	2.498
14	100.89	126.05	2.499
15	101.66	126.52	2.489
16	100.98	126.11	2.498
方差	0.0703	0.0840	0.000 013
S_r	0.27	0.29	0.004
r	0.75	0.82	0.010

数据统计后重复性标准偏差和限值可以估算为:

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
S_r	0.26	0.30	0.005
重复性限 r	0.72	0.84	0.015

内部重复性研究数据由以下单位提供:(按字母顺序)

——Bundesinstitut für Risikobewertung,

Thielallee 88-92 PF 330013 D-14195 柏林-德国

——Fondazione E. Mach-Istituto Agrario di San Michele all'Adige,

Via E. Mach,1-38010 San Michele all'Adige(TN),意大利

——Joint Research Centre-Institute for Health and Consumer Protection,

I-21020 ISPRA(VA)-意大利

——Laboratorio Arbitral Agroalimentario, Carretera de la Coruña, km 10,7

E-28023 MADRID-西班牙

附录 B 再现性研究

1994 年到 2010 年间多个实验室对不同类型(红、白、玫瑰、干、甜和气泡)葡萄酒的 40 次能力测试结果总结于表 B. 1。

对 $(D/H)_I$ 和 $(D/H)_II$, 合并的 S_R 可以用以下公式来计算:

$$\sqrt{\frac{\sum_i^K (N_i - 1) S_{R,i}^2}{\sum_i^K (N_i - 1)}}$$

其中 N_i 和 $S_{R,i}$ 是第 i 次中再现性的标准偏差, K 是次数。

根据 R 的定义, 运用标准误差传递规则假设 $(D/H)_I$ 和 $(D/H)_II$ 为不相关(协方差为零), 对此参数的再现性标准偏差进行评价。

计算结果如下:

	$(D/H)_I$	$(D/H)_II$	R
S_R	0.35	0.62	0.006
R	0.99	1.75	0.01

表 B. 1 FIT 能力测试——葡萄酒样品的统计学结果汇总

样品	年份	循环	$(D/H)_I$			$(D/H)_II$		
			N	平均数	S_R	N	平均数	S_R
红葡萄酒	1994	R1	10	102.50	0.362	10	130.72	0.33
玫瑰葡萄酒	1995	R1	10	102.27	0.333	10	128.61	0.35
红葡萄酒	1995	R2	11	101.45	0.389	11	127.00	0.55
红葡萄酒	1996	R1	11	101.57	0.289	11	132.23	0.34
玫瑰葡萄酒	1996	R2	12	102.81	0.322	12	128.20	0.60
白葡萄酒	1996	R3	15	103.42	0.362	15	127.97	0.51
红葡萄酒	1996	R4	15	102.02	0.377	13	131.28	0.30
玫瑰葡萄酒	1997	R1	16	103.36	0.247	16	126.33	0.44
白葡萄酒	1997	R2	16	103.42	0.444	15	127.96	0.53
甜白葡萄酒	1997	R2	14	99.16	0.419	15	130.02	0.88
葡萄酒	1997	R3	13	101.87	0.258	15	132.03	0.61
甜葡萄酒	1997	R3	12	102.66	0.214	12	128.48	0.48
玫瑰葡萄酒	1997	R4	16	102.29	0.324	16	129.29	0.63
甜葡萄酒	1997	R4	15	102.04	0.269	13	131.27	0.30
白葡萄酒	1998	R1	16	105.15	0.302	16	127.59	0.59

表 B.1(续)

样品	年份	循环	$(D/H)_I$			$(D/H)_{II}$		
			N	平均数	S_R	N	平均数	S_R
甜葡萄酒	1998	R3	16	102.17	0.326	16	129.60	0.56
红葡萄酒	1998	R4	17	102.44	0.306	17	131.60	0.47
白葡萄酒	1999	R1	14	102.93	0.404	13	129.64	0.46
甜葡萄酒	2000	R2	15	103.19	0.315	14	129.43	0.60
葡萄酒	2001	R1	12	105.28	0.264	16	131.32	0.68
甜葡萄酒	2001	R2	14	101.96	0.249	15	128.99	1.05
葡萄酒	2002	R1	17	101.01	0.365	16	129.02	0.74
葡萄酒	2002	R2	17	101.30	0.531	17	129.28	0.93
葡萄酒	2003	R1	18	100.08	0.335	18	128.98	0.77
甜葡萄酒	2003	R2	17	100.51	0.399	18	128.31	0.80
葡萄酒	2004	R1	18	102.88	0.485	19	128.06	0.81
甜葡萄酒	2004	R3	16	101.47	0.423	16	130.10	0.71
葡萄酒	2005	R1	19	101.33	0.447	19	129.88	0.76
甜葡萄酒	2005	R2	15	102.53	0.395	15	131.36	0.38
干葡萄酒	2006	R1	18	101.55	0.348	18	131.30	0.51
甜葡萄酒	2006	R2	18	100.31	0.299	18	127.79	0.55
葡萄酒	2007	R1	18	103.36	0.403	18	130.90	0.90
甜葡萄酒	2007	R2	19	102.78	0.437	19	130.72	0.55
葡萄酒	2008	R1	24	103.20	0.261	23	131.29	0.59
甜葡萄酒	2008	R2	20	101.79	0.265	19	129.73	0.34
干葡萄酒	2009	R1	24	102.96	0.280	23	130.25	0.49
甜葡萄酒	2009	R2	21	101.31	0.310	21	127.07	0.50
干葡萄酒	2010	R1	21	101.80	0.350	20	129.65	0.40
气泡葡萄酒	2010	R1	11	101.51	0.310	11	129.09	0.68
干葡萄酒	2010	R2	20	104.05	0.290	19	133.31	0.58

参考文献

- [1] Martin G. J., Martin M. L., MABON F., Anal. Chem., 1982, 54, 2380-2382.
- [2] Martin G. J., Martin M. L., J. Chim. Phys., 1983, 80, 294-297.
- [3] Martin G. J., Guillou C., NAULET N., BRUN S., Tep Y., Cabanis J. C..
- [4] Cabanis M. T., Sudraud P., Sci. Alim., 1986, 6, 385-405.

[5]
[6]
[7]
[8]
[9]

- [5] Martin G. J. , Zhang B. L. , NAULET N. and MARTIN M. L. , J. Amer. Chem. Soc. , 1986, 108, 5116-5122.
- [6] Martin G. J. , Guillou C. , Martin M. L. , Cabanis M. T. , TEP Y. et AERNY J. , J. Agric. Food Chem. , 1988, 36, 316.
- [7] MARTIN G. G. , WOOD R. , MARTIN, G. J. , J. AOAC Int. , 1996, 79(4), 917-928.
- [8] MARTIN G. G. , HANOTE V. , LEES M. , MARTIN Y-L. , J. Assoc Off Anal Chem, 1996, 79, 62-72.
- [9] CRAIG H. , Science, 1961, 133, . 1702-1703.