

稳定同位素比质谱仪测定葡萄汁、浓缩葡萄汁或葡萄 发酵产生乙醇¹³C/¹²C 的同位素比

(决议 Oeno 17/2001)

1 应用范围

本方法用于测定葡萄酒、葡萄发酵产品(包括葡萄汁、浓缩葡萄汁、葡萄浆果)发酵产生乙醇¹³C/¹²C 的比例。

2 参考标准

ISO 5725-2:1994 测定方法和结果的精密度(真实性和精确性) 第2部分:标准测量方法重复性和再现性检测的基本方法

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnite($R_{\text{PDB}}=0.011\ 237\ 2$)

OIV 方法:核磁共振(RMN-FINS)在葡萄汁、浓缩葡萄汁、葡萄和葡萄酒检测中的应用

3 术语和定义

¹³C/¹²C:样品中¹³C和¹²C的比例。

$\delta^{13}\text{C}$:碳13的含量,表示为千分之一(‰)。

RMN-FINS:核磁共振用于研究具体的天然同位素的比例值。

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnite, 或 PDB,是衡量¹³C含量在自然中变化的主要方法。碳酸钙来源于美国北卡罗来纳州 Pee Dee 结构的白垩纪箭石属岩石。它的¹³C/¹²C值或 R_{PDB} 为0.011 237 2。PDB的含量经过长时间的消耗,但是它的¹³C含量变化具有自然规律。维也纳(奥地利)的国际原子能机构用它的含量对标准物质进行刻度。用 V-PDB 表示¹³C的自然含量,已经成为一个惯例。

m/z :质量与电荷比。

4 原理

在光合作用中,植物吸收二氧化碳气体有两种主要机理: C_3 机理(Calvin 循环)和 C_4 机理(Hatch 和 Slsck 循环)。这两种机理呈现出一个不同类型的同位素组成。一些产物,例如糖和酒精,分别来源于 C_4 植物和发酵,它们与 C_3 植物相比,¹³C的含量更高。绝大多数植物,例如葡萄和甜菜,属于 C_3 植物类型。甘蔗和玉米属于 C_4 植物类型。通过检测¹³C的含量,能够检测出添加到葡萄酒产品(葡萄汁、葡萄酒)中来源于 C_4 植物(甘蔗或者谷物中糖的代用物)的糖。通过¹³C含量并结合来源于RMN-FINS的信息,能够量化这些添加的混合糖,以及来源于 C_3 和 C_4 植物的酒精。

¹³C的含量是用样品完全燃烧生成的二氧化碳气体来衡量。这些来源于同位素¹⁸O,¹⁷O,¹⁶O,¹³C和¹²C的不同组合方式的主要同位素 $44(^{12}\text{C}\ ^{16}\text{O}_2)$, $45(^{13}\text{C}\ ^{16}\text{O}_2$ 或 $^{12}\text{C}\ ^{17}\text{O}\ ^{16}\text{O})$ 和 $46(^{12}\text{C}\ ^{16}\text{O}\ ^{18}\text{O})$ 的丰度,可以以离子流的形式被同位素比质谱仪的三种不同捕获器测定。

由于¹³C ¹⁷O¹⁶O 或 ¹²C ¹⁷O₂的同位素组合含量比较少,有时候可以忽略。因此在同时考虑¹⁸O 或¹⁷O(Craig 校正)相对丰度的条件下,可以通过 $m/z=46$ 离子强度来校正由¹²C ¹⁷O ¹⁶O 提供的 $m/z=45$ 离子流值。通过标准值和国际标准 VPDB 推荐值的比较差值 $\delta^{13}\text{C}$,就能够计算¹³C 的含量。

5 试剂

试剂和消耗品取决于实验室所使用的仪器(6)。分析体系一般建立在元素分析的基础上。仪器装备可以放入密封在金属杯中的样品或用注射针通过隔膜注射的液体样品。

实验设备使用推荐的试剂、反应物和消耗物品:

——反应物

国际原子能机构使用的标准材料:

名称	材料	$\delta^{13}\text{C}$ 和 V-PDB
——IAEA-CH-6	蔗糖	-10.4 ‰
——IAEA-CH-7	聚乙烯	-31.8 ‰
——NBS22	石油	-29.7 ‰
——USGS24	石墨	-16.1 ‰

Geel 的 IRMM 协会使用的材料:

名称	材料	$\delta^{13}\text{C}$ 和 V-PDB
——CRM 656	葡萄酒精	-26.93 ‰
——CRM 657	葡萄糖	-10.75 ‰
——CRM 660	酒精水溶液 (TAV 12%)	-26.72 ‰

已知¹³C/¹²C 比例的国际标准物。

下面所列的是一些气体的消耗品标准:

——氦气;

——氧气;

——作为二级标准的 CO₂ 气体;

——烘箱和燃烧系统的氧化试剂:用于元素分析的氧化铜;

——用于去除燃烧中产生水的干燥剂,如:无水高氯酸镁。

设备中无需配制冷凝阱或高选择性渗透毛细管除水装置。

6 仪器和材料

6.1 同位素质谱仪(IRMS)

同位素质谱仪(IRMS)能检测出自然界中二氧化碳气体中¹³C 的相对含量或表示为相对值,内部精密度可达 0.05‰。内部精密度指对同一二氧化碳气体样品进行 2 次测定的差值。同位素质谱仪通常配置可以同时测定 m/z 分别为 44、45、46 的三个捕获器。IRMS 必须安装一个双通道的进样器,以便交替测量未知样品和参考物质,或者使用一个整体系统,可以实现样品充分燃烧,且能够在质谱检测前把二氧化碳从其他燃烧物中分离出来。

6.2 燃烧装置

燃烧装置能够把乙醇转化为二氧化碳而且能够去除其他的燃烧产物——水,而没有同位素分馏。这种装置可以是与质谱连接在一起的整体有持续气流的系统,或是一个自动燃烧系统。它的精度必须达到上述所提的要求。

6.2.1 持续气流系统

由元素分析仪,或者安装了在线燃烧系统的气相色谱构成。

系统中使用到以下材料将装在金属杯中的样品引入分析系统:

- 适量的锥形微量移液器,精度达到微克(μg)或者更高;
- 密封用的镊子;
- 液体样品用的锡杯;
- 固体样品用的锡杯。

当使用配有液体进样器的元素分析仪或燃烧色谱的前处理系统,需要使用到下面的实验材料:

- 液体注射器;
- 安装了密封系统或惰性隔片的烧瓶。

根据实验室所使用的燃烧系统类型和质谱仪,可使用其他的同类材料代替上述实验材料。

6.2.2 自动前处理系统

来源于样品燃烧后的二氧化碳气体和收集到球形管中的标样,被引入到一个双通道质谱分析系统进行同位素分析,下面是所使用的几种燃烧装置:

- 氧循环的封闭性燃烧系统;
- 氮气和氧气的元素分析仪;
- 以氧化铜为氧化剂的密封球形管。

7 样品前处理

同位素检测前必须将乙醇分离出来。具体方法可参照 3.1 中 RMN-FINS 方法中酒的蒸馏。

糖必须先发酵为乙醇,具体参照葡萄汁、精馏浓缩葡萄汁(葡萄浆果)RMN-FINS 方法进行。

8 步骤

所有的制备工作必须在无明显乙醇蒸发损耗情况下进行,否则样品中同位素的组分会改变。

下面所描述的是通常使用的商业性自动燃烧系统。所有其他方法,只有确保把乙醇定量变成二氧化碳前没有蒸发损耗,才可以进行其前处理。下面是使用元素分析仪的实验步骤:

- a) 将样品加入锡杯中
 - 准备好锡杯、镊子和干净托盘;
 - 用镊子取一个合适的锡杯;

——用微量移液器在锡杯中加入适当体积的液体。

注：3.84 mg 的纯乙醇或 4.17 g 乙醇含量为 92% (m/m) 的馏出物能够产生 2 mg 的碳。可根据质谱仪的敏感性，按照需要的碳量计算出馏出物的量。

——用镊子把锡杯密封，每个锡杯必须完全封闭，每个样品需要两个锡杯；

——把锡杯放入元素分析仪的样品盘上，锡杯须用数字标示以便区分；

——在实验的开始和结束时都要放入标准品；并有规律地在样品序列中添加质控样。

b) 检查和调整元素分析仪和同位素比质谱仪

——调整元素分析仪的炉温，氮和氧气流速达到样品燃烧的理想状态；

——对包括元素分析仪和同位素比质谱仪（例如用氮气检查离子流 $m/z = 28$ ）进行检漏；

——调整同位素质谱能够检测合适的离子流强度 (m/z 分别为 44, 45, 46)；

——在测定前使用标样检查系统。

c) 进行试验

将样品持续放入元素分析仪或色谱仪，每个样品燃烧后的二氧化碳气体进入质谱仪，用质谱测定离子流，使用电脑记录每个样品的离子流强度和计算 δ 值。

9 计算

本方法用于测定乙醇中同位素¹³C/¹²C的比值。这些乙醇来源于葡萄酒或葡萄产品的发酵产物。同位素¹³C/¹²C的比值可以表示为与标样比较得到的偏差 $\delta^{13}\text{C}$ 。¹³C($\delta^{13}\text{C}$)的同位素比值是通过千分之一的 δ 标度来计算的，将样品的实验结果与之前用国际标准参考物 (V-PDB) 校正的标准样品进行比较。 $\delta^{13}\text{C}$ 的值可以用样品与标准样品的比值表示：

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}}(\text{‰}) = 1000 \times (R_{\text{ech}} - R_{\text{ref}}) / R_{\text{ref}}$$

其中 R_{ech} 和 R_{ref} 分别是样品和标样的¹³C/¹²C的值

然后用 V-PDB 表示 $\delta^{13}\text{C}$ ：

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{ech/V-PDB}}(\text{‰}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}) / 1000$$

其中 $\delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}$ 是之前标准样品与 V-PDB 同位素的偏差。

由于仪器的状况可能引起微小的误差，因此，样品的 $\delta^{13}\text{C}$ 必须根据使用的标样测定值和真实值之间的差异来校正，其中真实值已通过之前标样与 V-PDB 的比较而得到。标准样品两次测定结果的偏差，对样品结果的校正可以认为是线性的。标样的测定必须安排在进样序列的开始和最后进行。对每个样品两个值（标样值的预测值和实际测量值的差异）的校正可由线性内插法来计算。

10 质量保证及控制

通过检查标样的¹³C值，使它与标准值之间的误差不超过 0.05‰，否则，必须对仪器进行检查和调整。

对每一个样品来说，两次平行实验结果之间的差异要小于 0.03‰，最终的结果是两次平行实验结果的平均值，如果两个结果之间差异大于 0.03‰，需重新进行实验。

对测定条件的监控是建立在 $m/z = 44$ 离子流强度和进入元素分析仪的二氧化碳量成比例的基础之上的。在标准状态下，进行样品分析时，离子流强度应该是稳定的。显著的偏差

可能是由于乙醇的蒸发(不完全封闭的金属杯),或是由于元素分析仪和质谱仪不稳定造成的。

11 测定方法的特性试验

对来源于葡萄酒、甘蔗或甜菜或三者的混合物含有乙醇样品的馏出物进行了比对实验研究(11.1)。这项研究没有考虑蒸馏步骤,但包括了比对实验室对葡萄酒的研究(11.2),以及同位素环形试验(11.3)的有关信息。结果显示了理想状况下,不同的蒸馏系统,特别是参照 RMN-FINS 中所述方法,在测定葡萄酒中乙醇 $\delta^{13}\text{C}$ 的量上没有显著性差异。

对葡萄酒样品的研究中所得到的精确参数与比对实验研究中对馏出物的结果一致(11.1)。

11.1 有关馏出物的比对实验研究结果

研究年份:1996

实验室数量:20

样品数量:6个样品双盲样比对

比较性分析:乙醇的 $\delta^{13}\text{C}$

表 1

样品编号	来源于葡萄酒的乙醇	来源于甜菜的乙醇	来源于甘蔗的乙醇
A 和 G	80%	10%	10%
B 和 C	90%	10%	0%
D 和 F	0%	100%	0%
E 和 I	90%	0%	10%
H 和 K	100%	0%	0%
J 和 L	0%	0%	100%

表 2

样品	A/G	B/C	D/F	E/I	H/K	J/L
去除异常结果后的实验室数量	19	18	17	19	19	19
可接受的实验结果数量	38	36	34	38	38	38
平均值($\delta^{13}\text{C}$)/‰	-25.32	-26.75	-27.79	-25.26	-26.63	-12.54
重复性方差 S_r^2	0.006 4	0.007 7	0.003 1	0.012 7	0.006 9	0.004 1
重复性标准偏差(S_r)/‰	0.08	0.09	0.06	0.11	0.08	0.06
重复性限值 $r(2.8 \times S_r)$ /‰	0.22	0.25	0.16	0.32	0.23	0.18
再现性方差 S_R^2	0.038 9	0.030 9	0.038 2	0.045 9	0.031 6	0.058 4
再现性标准偏差(S_R)/‰	0.20	0.18	0.20	0.21	0.18	0.24
再现性限值 $R(2.8 \times S_R)$ /‰	0.55	0.9	0.55	0.60	0.50	0.68

11.2 比对实验室对两个葡萄酒和一个乙醇样品的研究

研究年份:1996

实验室数量:14个测定葡萄酒馏出物样品,其中7个还测定了葡萄酒中乙醇的 $\delta^{13}\text{C}$;
8个测定乙醇样品的 $\delta^{13}\text{C}$

样品数量:3个(酒精度为9.3%的白葡萄酒,酒精度为9.6%的白葡萄酒,酒精质量分数93%的乙醇)

分析:乙醇的 $\delta^{13}\text{C}$

表 3

样品	红葡萄酒	白葡萄酒	乙醇
实验室数量	7	7	8
可接受的结果数量	7	7	8
平均值($\delta^{13}\text{C}$)/‰	-26.20	-26.20	-25.08
再现性方差 S_R^2	0.0525	0.0740	0.0962
再现性标准偏差(S_R)/‰	0.23	0.27	0.31
再现性限值 $R(2.8 \times S_R)$ /‰	0.64	0.76	0.87

参与的实验室使用了不同的蒸馏系统。但没有一个实验室出现对整个馏出物 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定结果离群或者与平均值有较大偏差的情况。实验结果的再现性方差($S_R^2=0.0059$)可以与来自比对实验室研究的重复性方差 S_r^2 比较。

11.3 同位素环形实验结果

从1994年12月开始国际上经常组织实验室用对葡萄酒和乙醇(酒精度96%)样品进行同位素测定的环形试验。实验结果可用于参与的实验室检测质量控制。能够对葡萄酒和乙醇馏出物 $\delta^{13}\text{C}$ 的结果总结如表4:

表 4

日期	葡萄酒				馏出物			
	N	S_R	S_R^2	R	N	S_R	S_R^2	R
1994.12	6	0.210	0.044	0.59	6	0.151	0.023	0.42
1995.6	8	0.133	0.018	0.37	8	0.147	0.021	0.41
1995.12	7	0.075	0.006	0.21	8	0.115	0.013	0.32
1996.3	9	0.249	0.062	0.70	11	0.278	0.077	0.78
1996.6	8	0.127	0.016	0.36	8	0.189	0.036	0.53
1996.9	10	0.147	0.022	0.41	11	0.224	0.050	0.63
1996.12	10	0.330	0.109	0.92	9	0.057	0.003	0.16
1997.3	10	0.069	0.005	0.19	8	0.059	0.003	0.16
1997.6	11	0.280	0.079	0.78	11	0.175	0.031	0.49

表 4(续)

日期	葡萄酒				馏出物			
	N	S_R	S_R^2	R	N	S_R	S_R^2	R
1997. 9	12	0. 237	0. 056	0. 66	11	0. 203	0. 041	0. 57
1997. 12	11	0. 127	0. 016	0. 36	12	0. 156	0. 024	0. 44
1998. 3	12	0. 285	0. 081	0. 80	13	0. 245	0. 060	0. 69
1998. 6	12	0. 182	0. 033	0. 51	12	0. 263	0. 069	0. 74
1998. 9	11	0. 264	0. 070	0. 74	12	0. 327	0. 107	0. 91
平均		0. 215	0. 046	0. 60		0. 209	0. 044	0. 59

注: N 表示参加实验的实验室数量。

参 考 文 献

- [1] Detecting enrichment of musts, concentrated musts, grape and wine sugars by application of nuclear magnetic resonance of deuterium(RMN-FINS/SNIF-NMR).
OIVRecueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des mots.
- [2] E. C. Regulation. Community analytical methods which can be applied in the wine sector, N°. 2676/90. Detecting enrichment of grape musts, concentrated grape musts, rectified concentrated grape musts and wines by application of nuclear magnetic resonance of deuterium(SNIF-NMR).
- [3] Official Journal of the European Communities, NoL 272, Vol 33, 64-73, 3 October 1990.
- [4] Inter-laboratory study about the determination of $\delta^{13}C$ in wine ethanol OIV FV No 1051.
- [5] Fidélité de la détermination du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de l'éthanol du vin OIV FV No 1116.
- [6] Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. ARossmann ; H-L Schmidt ; F. Reniero ; G. Versini ; I. Moussa ; M. - H. Merle. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 1996, 203, PP. 293-301.