



3-甲氧基丙烷-1,2-二醇和 环二甘油

(决议 Oeno 11/2007)

1 介绍

本方法用于检测葡萄酒中的 3-甲氧基-1,2-丙二醇(3-MPD)和环二甘油(CycDs)的含量,方法已经通过了国际协同实验的验证。3-MPD 和 CycDs 是不同类型葡萄酒中甘油形成过程中的副产物。众所周知,用甲醇使动植物中的甘油三酯发生酯交换反应而形成的甘油中含有大量的 3-MDP。从石油化学品合成的甘油会出现杂质 CycDs。根据 O. I. V 决议 8/2000“分析方法的验证方案”,采用已报道的一种方法,对其进行修饰、优化后,组织了协同比对实验研究。

2 适用范围

本方法适用于检测白葡萄酒、红葡萄酒、甜/干葡萄酒中 3-MPD 和 6 种环二甘油(顺式-,反式-2,6-二(羟甲基)1,4-二氧六环;顺式-,反式-2,5-二(羟甲基)1,4-二氧七环;顺式-,反式-2,-羟甲基-6-羟基-1,4-二氧环庚烷)。3-MPD 检测浓度范围为 0.1 mg/L~0.8 mg/L, CycDs 检测浓度范围为 0.5 mg/L~1.5 mg/L。

3 符号

3-MPD	3-甲氧基丙烷-1,2-二醇
ANOVA	方差分析
<i>c</i>	浓度
CycDs	环二甘油
GC-MS	气相色谱-质谱联用仪
H ₂	氢气
IS	内标
<i>m/z</i>	质量/电荷比
ML	校准水平
S ₀	1 000 ng/μL 标准液
S ₁	100 ng/μL 标准液
S ₂	10 ng/μL 标准液

4 原理

用碳酸钾(K₂CO₃)将被分析物和内标盐析,之后用乙醚提取,提取物直接通过极性柱分离,用 GC-MS 在 SIM 模式(选择离子检测模式)下进行检测。

5 试剂与材料

5.1 化学试剂

- 5.1.1 碳酸钾(K₂CO₃),分析纯。
- 5.1.2 乙醚,色谱纯。
- 5.1.3 分子筛(直径 2 mm,孔径大小 0.5 nm)。
- 5.1.4 无水乙醇。

5.2 标准品

- 5.2.1 环二甘油混合物(六种组分),纯度 89.3%。

包括:顺式-,反式-2,6-二(羟甲基)1,4-二氧杂六环;顺式-,反式-2,5-二(羟甲基)1,4-二氧六环;顺式-,反式-2-二(羟甲基)-6-羟基-1,4-二氧环庚烷。

- 5.2.2 98%3-甲氧基丙烷-1,2-二醇(3-MPD)。

- 5.2.3 98%丁烷-1,4-二醇-1,1,2,2,3,3,4,4-(²H)₈。

5.3 标准溶液制备

5.3.1 S₀ 储备液

准确称取每一种标准品 10.0 mg±0.05 mg(纯度为 89.3%,CycDs 需称 11.2 mg)。然后将每一个标准品分别转移至 10 mL 容量瓶中,向每个容量瓶准确加入 10 mL 的无水乙醇并充分混匀,溶液的浓度为 1 000 ng/μL。

5.3.2 S₁ 工作液

准确量取 1 000 μL S₀ 储备液至 10 mL 容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,充分混匀,所得溶液浓度为 100 ng/μL。

5.3.3 S₂ 工作液

准确量取 100 μL S₀ 储备液至 10 mL 容量瓶中,无水乙醇定容至刻度,充分混匀,所得溶液浓度为 10 ng/μL。

所需标准溶液,详见表 1。

CycDs 混合物(6 种组分)

表 1

名称	溶液	浓度/(ng/μL)
CycDs 混合物	S ₀	1 000
	S ₁	100
3-MPD	S ₀	1 000
	S ₁	100
	S ₂	10
内标 IS	S ₀	1 000
	S ₁	100

5.4 校准曲线制作

用未被污染的葡萄酒来配制校准溶液,使用前需通过检测确认没有受到 3-MPD 或

CycDs 的污染。如果样品中分析物的浓度超出线性范围,需要进行加标。检测中要确保内标不受到葡萄酒中各种组分的影响,同时需要准备空白样品。

表 2 校准曲线配制表

名称		加标量/ μL	编号	葡萄酒体积/mL	葡萄酒浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	葡萄酒浓度/ (mg/L)
空白	IS	—		10	0	0
	3-MPD	—				
	CycDs	—				
ML0	IS	100	S1	10	1 000	1.00
	3-MPD	—				
	CycDs	—				
ML1	IS	100	S1	10	1 000	1.00
	3-MPD	100	S2		100	0.10
	CycDs	50	S1		500	0.50
ML2	IS	100	S1	10	1 000	1.00
	3-MPD	25	S1		250	0.25
	CycDs	100	S1		1 000	1.00
ML3	IS	100	S1	10	1 000	1.00
	3-MPD	50	S1		500	0.50
	CycDs	20	S0		2 000	2.00
ML4	IS	100	S1	10	1 000	1.00
	3-MPD	100	S1		1 000	1.00
	CycDs	30	S0		3 000	3.00
ML5	IS	100	S1	10	1 000	1.00
	3-MPD	200	S1		2 000	2.00
	CycDs	40	S0		4 000	4.00

6 仪器设备

- 6.1 天平,读数精确到 $\pm 0.0001\text{ g}$ 。
- 6.2 离心机(至少可达 $4\,000\text{ r/min}$)。
- 6.3 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS),配置分流不分流进样器。
- 6.4 精密移液管和容量瓶。
- 6.5 巴氏吸管。
- 6.6 40 mL 离心管。
- 6.7 气相色谱进样瓶($1.5\text{ mL}\sim 2.0\text{ mL}$)。
- 6.8 柱温箱。
- 6.9 涡旋震荡仪。

7 样品制备

每次分析需葡萄酒样品 10 mL,待测葡萄酒样品应足量。用于制备校准曲线(5.4)的葡萄酒不能被待分析物(3-MPD,CycDs)污染。

8 步骤

8.1 提取

准确吸取 100 μL 内标液 S_1 (5.3.2) 和 10 mL 葡萄酒样品至离心管 (40 mL) (此时丁烷-1,4-(^2H)₈ 的浓度相当于 1 mg/L)。小心加入 10 g K_2CO_3 , 混匀。注意添加过程中由于产生 CO_2 会放热。将混合液水浴降温至 20 $^\circ\text{C}$ 左右, 加入 1 mL 乙醚。涡旋充分混合 5 min, 然后在 4 000 r/min 离心机上离心 5 min。为更好地移取有机相, 萃取过程可以在直径更小的管中进行。用巴氏吸管将有机层 (包含乙醚和乙醇) 转移到气相色谱进样瓶中, 加入约 120 mg 的分子筛, 加盖。至少放置 2 h, 期间不时摇匀。吸取上层清液到其他气相色谱进样瓶中, 进行 GC-MS 分析。

8.2 GC-MS 分析

GC-MS 分析具体参数如下: 可使用其他性能相近的系统代替, 但要求能将内标与苯乙醇及其他潜在的干扰物分开。

8.2.1 通用气相分析条件

气相色谱仪: HP 5890 或性能相当的气相色谱仪

DB-Wax (J&W) 毛细管柱 60 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm , 2 m 或相同规格的毛细管柱。

载气: H_2

流量: 柱前压力 60 kPa;

温升温程序: 90 $^\circ\text{C}$ 保持 2 min;

以 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 速度升至 165 $^\circ\text{C}$, 保持 6 min;

以 4 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 速度升至 250 $^\circ\text{C}$, 保持 5 min。

进样温度: 250 $^\circ\text{C}$;

进样体积: 2 μL , 不分流进样。

8.2.2 MS 工作条件

质谱仪: Finnigan SSQ 710 或性能相当

传输线温度: 280 $^\circ\text{C}$

离子源温度: 150 $^\circ\text{C}$

MS 检测器:

窗口 1: 0 min ~ 25 min:

14.3 min 3-MPD: m/z 75, m/z 61

16.7 min IS: m/z 78, m/z 61

每个质量采集时间为 250 μs (驻留时间)。

监测 m/z 91 碎片离子峰, 能将内标 (IS) 峰与苯乙醇中区分, 苯乙醇还产生 m/z 78 碎片峰。

窗口 2: 25 min ~ 40 min:

32 min ~ 34.5 min. CycDs: m/z 57, m/z 117

每个质量采集时间为 250 μs (驻留时间)。

分析样品可能会降低柱效。高沸点 CycDs 的混合物会对色谱柱造成不可逆的损伤, 应尽量避免标准溶液的进样次数, 而且只进那些分析物含量低的盐析后的溶液。推荐使用 1 mL ~

2 m 长的前置柱来保护分析柱,同时分析柱作为耗材也应定时更换。

9 结果评估

9.1 定性

记录各分析物相对于内标的相对保留时间。使用标准溶液与被分析物的平均相对保留时间,误差应在 $\pm 0.5\%$ 范围内。

通过选择性离子监测模式(SIM)对每种被分析物的特征离子比进行确认。CycDs 为 117/57,3-MPD 为 75/61,IS 为 78/61,误差应在加标样品的 20% 范围内。同时可以使用浏览模式进行确认。

9.2 定量

定量可以通过校准曲线来完成,根据分析物与内标特征离子面积比与分析物浓度对应的线性回归方程来确定。CycDs 总含量为六个峰的峰面积的总和。以下为常用于定量的 m/z 值:

3-MPD:	m/z 75
IS:	m/z 78
CycDs:	m/z 117

9.3 结果表示

3-MPD 和 CycDs 的含量以 mg/L 表示,精确到小数点后两位(如 0.85 mg/L)。

9.4 检出限和定量限

检出限(LOD)和定量限(LOQ)与检测条件和方法使用者有关。根据 OENO 7-2 000(E-AS1-10-LIMDET)“分析方法的检测限和定量限的评估方法”来估算本方法的 LOD 和 LOQ。

使用 4.2.2 中“决策逻辑图”延长线 N^3 图表的方法。在离子流(m/z)图的相关部分画一个图框封闭延伸到分析物 10 倍半峰高处的峰宽($W_{1/2}$),同时两条平行线应该正好包含了信号窗口的最大振幅。这两条线之间的距离表示为 h_{\max} ,以吸收强度为单位,3 倍为 LOD,10 倍为 LOQ,最终通过各个物质的响应因子转换成浓度单位。

3-MPD:

LOD:0.02 mg/L

LOQ:0.06 mg/L

CycDs(总量):

LOD:0.08 mg/L

LOQ:0.25 mg/L

注:由于 CD 是 6 种拥有相同的响应因子化合物的混合物,由于其化学性质相同,相关部分的色谱 h_{\max} 不变,每个单一化合物 LOD 和 LOQ 为 $1/6 h_{\max}$ 。

10 准确性(实验室间比对验证)

11 个实验室参加了协同比对实验研究,所有参加实验室都具有副产物分析方面的经验,并且通过了预实验。重复性(r)和再现性(R)和相应的标准差(S_r 和 S_R)与分析物的浓度关系显著(如附表:图 A.1 和图 A.2),使用线性回归模型对每种被分析物进行分析,重复性(r)的概率大于 95%、再现性(R)的概率大于 99%。

3-MPD

$$S_r = 0.060 x$$

$$S_R = 0.257 x \quad x \text{ 为 3-MPD 浓度 (mg/L)}$$

$$r = 0.169 x$$

$$R = 0.720 x \quad x \text{ 为 3-MPD 浓度 (mg/L)}$$

CycDs

$$S_r = 0.082 x$$

$$S_R = 0.092 x + 0.070 \quad x \text{ 为 CycDs 浓度 (mg/L)}$$

$$r = 0.230 x$$

$$R = 0.257 x + 0.197 \quad x \text{ 为 CycDs 浓度 (mg/L)}$$

附录 A

实验间协同比对实验研究

A.1 参加者

11 个国际实验室参加了此次研究,各参加实验室均具有分析副产物的相关经验,并且通过了预实验。以下为参加实验室:

CSL, York, UK
 Unione Italiana Vini, Verona, Italy
 BfR, Berlin, Germany
 BLGL, Würzburg, Germany
 Istituto Sperimentale per l'enologia, Asti, Italy
 LUA, Speyer, Germany
 Labor Dr. Haase-Aschoff, Bad Kreuznach, Germany
 CLUA, Münster, Germany
 Kantonales Laboratorium, Füllinsdorf, Switzerland
 LUA, Koblenz, Germany
 ISMAA, S. Michele all Adige, Italy

A.2 样品

2002 年 11 月,11 个预先通过均匀性测试的酒样送至各实验室,包括了五组进行平行测试的盲样和一个单独测试样品,样品包括干白葡萄酒、干红葡萄酒和甜红葡萄酒。

A.3 数据分析

根据“方法验证的设计、实施和说明程序”对盲样平行测试模型进行统计分析。

1. 采用 Cochran, Grubbs 检验,确定异常值。
2. 由统计分析数据得出重复性和再现性。
3. 计算 Horrat 值。

表 A.1 3-MPD 检测结果汇总表

项目	样品 A 白葡萄酒	样品 B 红葡萄酒 ^a	样品 C 白葡萄酒	样品 F 甜红葡萄酒	样品 G 白葡萄酒
平均值/(mg/L)	0.30	0.145	0.25	0.48	0.73
加标量/(mg/L)	0.30	0.12	—	—	0.80
回收率/%	100	121	—	—	91
n	10	10 ^a	10	10	10
n_c	1	1 ^a	1	1	1
离群值	2	0	0	1	1
n_1	7	9 ^a	9	8	8

表 A.1(续)

项目	样品 A 白葡萄酒	样品 B 红葡萄酒 ^a	样品 C 白葡萄酒	样品 F 甜红葡萄酒	样品 G 白葡萄酒
r	0.03	—	0.05	0.08	0.13
S_r	0.01	—	0.02	0.03	0.05
RSD _r %	3.20	—	7.20	5.80	6.57
Hor	0.30	—	0.60	0.50	0.59
R	0.13	0.13	0.15	0.31	0.59
S_R	0.05	0.05	0.05	0.11	0.21
RSD _R %	15.50	32.67	21.20	22.70	28.91
HoR	0.80	1.53	1.10	1.30	1.72

^a单独测试样品; n 、 n_c 和 n_1 为单独结果。

- Mean 算术平均值
- n 数据总数
- n_c 有效数据数
- outliers 离群值(Cochran's 或 Grubbs' 测试)
- n_1 保留数据数
- S_r 重复性标准偏差
- RSD_r 相对重复性标准偏差($S_r \times 100$ /平均值)
- r 重复性限($2.8 \times S_r$)
- Hor 重复性 Horrat 值等于 RSD_r除以 Horwitz 公式中 r 等于计算所得的 RSD_r
- R 再现性限($2.8 \times S_R$)
- S_R 再现性标准偏差
- RSD_R 相对再现性标准偏差($S_R \times 100$ /平均值)
- HoR 再现性 Horrat 值等于 RSD_R除以 Horwitz 公式计算所得的 RSD_R

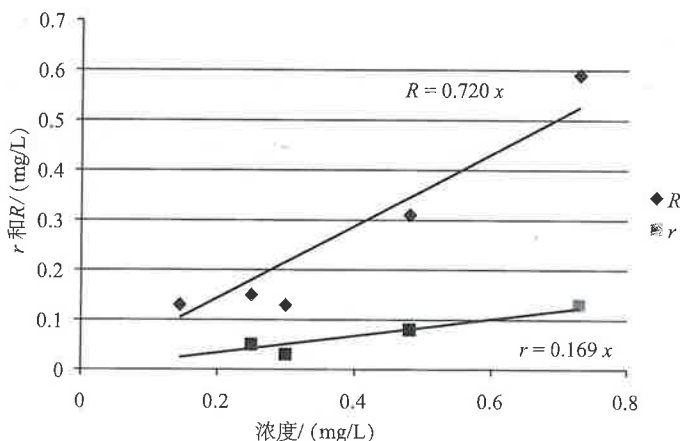
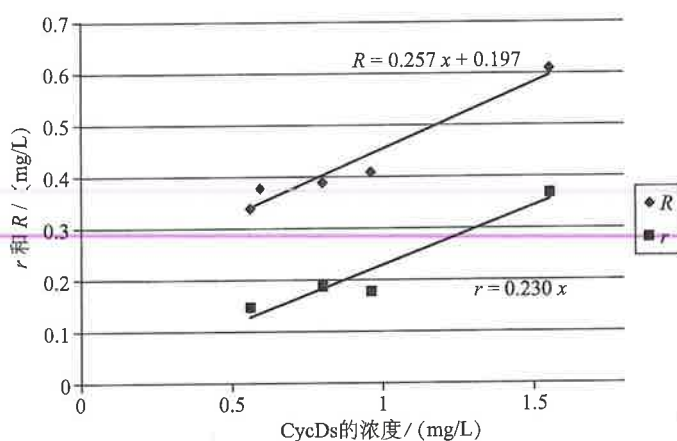


图 A.1 3-MPD 浓度和 r 及 R 之间相关性

表 A.2 CycDs 检测结果汇总表

项目	样品 A 白葡萄酒	样品 B 红葡萄酒 ^a	样品 D 甜葡萄酒	样品 F 甜红葡萄酒	样品 G 白葡萄酒
平均数/(mg/L)	1.55	0.593	0.80	0.96	0.56
加标量/(mg/L)	1.50	0.53			0.50
回收率/%	103	113			112
n	11	11 ^a	11	11	11
n_c	0	0	0	0	0
可疑值	2	0	1	2	1
n_j	9	11 ^a	10	9	10
r	0.37	—	0.19	0.18	0.15
S_r	0.13	—	0.07	0.07	0.05
RSD _r %	8.50	—	8.60	6.70	9.30
Hor	0.90	—	0.80	0.60	0.80
R	0.61	0.379	0.39	0.41	0.34
S_R	0.22	0.135	0.13	0.15	0.12
RSD _R %	14.00	22.827	17.30	15.20	21.50
HoR	0.90	1.319	1.00	0.90	1.20

^a 为单独测试样品。
 n 和 n_c 为单独结果。

图 A.2 CycDs 浓度和 r 及 R 之间相关性

参考文献

- [1] Bononi, M., Favale, C., Lubian, E., Tateo F. (2001) A new method for the identification of cyclic diglycerols in wine J. Int. Sci. Vigne Vin. 35, 225-229
- [2] Thompson, M. and Wood, R. (1993) International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories-J AOAC Int 76, 926-940
- [3] Horwitz, W. (1995) Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies Pure and Applied Chemistry 67, 331-343