

《葡萄酒中挥发性酯类的测定方法 气相色谱法》

编制说明

《葡萄酒中挥发性酯类的测定方法》行业标准

起草工作组

二〇一二年三月

一、行业标准工作简况

1、任务来源

根据工业和信息化部办公厅下达的 2010 轻工行业标准制定计划,《葡萄酒中挥发性酯类的测定方法》行业标准由中国食品发酵工业研究院等单位负责起草,全国食品发酵标准化中心归口。计划编号:2010-2868T-QB。

2、目的意义

根据葡萄酒中香气化合物的来源,可将葡萄酒的香气分为三类。源于葡萄果实的香气被称为一级香气,又称品种香或果香;源于发酵的香气被称为二级香气,又叫发酵香或酒香;源于陈酿的香气被称为三级香气,又叫陈酿香或酯香,主要为含量较高的醇类和酯类化合物。香气成分是构成葡萄酒质量的主要因素,决定着葡萄酒的风味和典型性,不同品种葡萄酒香气组分有一定的差异。研究葡萄酒中香气组分快速、准确的测定方法,对提高葡萄酒质量及建立品种葡萄酒的香气组分数据库等具有十分重要的意义。因此,全国食品发酵标准化中心提出制定《葡萄酒中挥发性酯类的测定方法》行业标准计划。

3、简要编制过程

2011 年 1 月-2011 年 7 月本标准起草工作组查阅大量国内外葡萄酒中酯类测定的方法通过对各方法的特点进行对比分析,选择顶空-气相色谱法进行葡萄酒中酯类组分的测定。对样品的处理方法、色谱分离条件等进行了优化,通过回收率、稳定性及精密度等一系列的研究,建立了顶空-气相色谱法测定乙酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸异戊酯、己酸乙酯等组分的分析方法。

2011 年 7 月-2012 年 3 月本方法经过中国食品发酵工业研究院、青岛市产品质量监督检验所、北京市产品质量监督检验所、上海金枫酒业有限公司、烟台张裕公司技术中心、中粮华夏长城葡萄酒有限公司等 6 家实验室进行验证,结果符合要求。

二、标准编制原则和主要内容

1、标准编制原则

以科学技术和实验数据为依据,结合产品实际生产情况,经过科学研究而制定。本标准的制定充分考虑葡萄酒行业发展,促进葡萄酒行业提高产品质量,增强企业的市场竞争力,确保标准的科学性、先进性、可操作性。

2、主要内容

本标准规定了葡萄酒中乙酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸异戊酯、己酸乙酯的静态-顶空气相色谱测定方法。

本标准适用于葡萄酒中乙酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸异戊酯、己酸乙酯等组分的测定。

三、主要试验（或验证）情况分析

针对葡萄酒中酯类组分含量测定方法进行了系统研究，详细的研究数据见附件一。

(1) 样品前处理条件研究：通过正交实验对样品条件进行研究，根据极差分析，几种因素对香气成分提取效率的影响主次次序为：加盐量>平衡温度>平衡时间>样品量，对这四个因素进行方差分析知，加盐量对香气成分提取效率具有显著性影响。最佳水平组合为： $A_2B_3C_2D_2$ ，虽然正交试验得出最佳平衡温度为60℃，但是考虑到平衡温度太高会导致香气成分中部分不稳定的化合物会发生反应，故选择平衡温度50℃、平衡时间30min、样品加入量为5mL、NaCl加入量为2g（浓度0.4g/mL）为最佳分析条件。**(2) 方法线性范围：**各酯类组分在线性范围内，浓度与峰面积呈良好的线性关系，相关系数 ≥ 0.99 **(3) 方法加标回收率：**在葡萄酒样品中加入3种不同浓度酯类标准测定，其大部分元素回收率在82%~116%之间。**(4) 方法精密度试验：**采用混标溶液平行测定5次，计算方法的日内重复性，组分的日内重复性RSD基本小于5.0%，表明该方法重复性较好。**(5) 不同实验室间的验证：**经过中国食品发酵工业研究院、青岛市产品质量监督检验所、北京市产品质量监督检验所、上海金枫酒业有限公司、烟台张裕公司技术中心、中粮华夏长城葡萄酒有限公司等6家实验室进行验证，结果符合要求。

四、标准中涉及的专利

无。

五、产业化情况、推广应用论证和预期达到的经济效果等情况

该标准的实施，将填补我国葡萄酒中酯类测定方法标准的空白；对研究葡萄酒香气组分构成，建立品种葡萄酒中香气组分数据库，从而进行不同品种葡萄酒鉴别及提高葡萄酒产品质量具有十分重要的意义，为保护我国高端品种葡萄酒提供有效技术支撑。

六、采用国际标准和国外先进标准情况，与国际、国外同类标准水平的对比情况，国内外关键指标对比分析或与测试的国外样品、样机的相关数据对比情况。

无。

七、与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性

我国出台该标准从我国葡萄酒行业的实际情况出发，参考了国内外相关资料，体现了科学性、先进性和可操作性原则，在制定过程中充分考虑国内相关的法规要求，结合葡萄酒行业的特点；与相关标准法规包括强制性标准协调一致。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

九、 标准性质的建议说明

《葡萄酒中挥发性酯类的测定方法》为推荐性行业标准。

十、 贯彻标准的要求和措施建议

在本标准通过审核、批准发布之后，由相关部门组织力量对本标准进行宣贯，在行业内进行推广。建议本标准自发布6个月之后开始实施。

十一、 废止现行相关标准的建议

无。

十二、 其它应予说明的事项

该标准从我国葡萄酒行业的实际情况出发，参考了国内外相关资料，体现了科学性、先进性和可操作性原则，综合评定达到了国际水平。

《葡萄酒中挥发性酯类的测定方法》

行业标准起草工作组

2012年3月

附件一 葡萄酒中挥发性酯类的测定方法研究

(一) 研究背景

根据葡萄酒中香气化合物的来源，可将葡萄酒的香气分为三类。源于葡萄果实的香气被称一级香气，又称品种香或果香；源于发酵的香气被称为二级香气，又叫发酵香或酒香；源于陈酿的香气被称为三级香气，又叫陈酿香或酯香，主要为含量较高的醇类和酯类化合物。香气成分是构成葡萄酒质量的主要因素，决定着葡萄酒的风味和典型性，不同品种葡萄酒香气组分有一定的差异。研究葡萄酒中香气组分快速、准确的测定方法，对提高葡萄酒质量及建立品种葡萄酒的香气组分数据库等具有十分重要的意义。

由于葡萄酒中香气物质组分较多，某些香气成分并不稳定，这对葡萄酒香气物质的分离、提取、富集前处理提出很高的要求。在气相色谱分析之前选择合理的葡萄酒样品前处理技术，对香气成分分析研究者来说是至关重要的。葡萄酒中香气组分的测定样品前处理方法主要有：液-液萃取法、静态顶空萃取法、固相微萃取法等 见表 1，与其它方法比较静态顶空法具有操作简单、重复性好、回收率高、无需溶剂、成本低等优点，采用该法测定葡萄酒中香气组分含量具有最佳经济效益，适合企业作为葡萄酒日常生产的质量控制检测方法。经过对比分析，标准起草组决定采用静态顶空法-气相色谱法测定葡萄酒中香气组分。

表 1 葡萄酒香气组分的样品前处理方法

序号	方法	原理	优缺点
1	液-液萃取法	液-液萃取法根据相似相溶原理，在两种不相溶溶液或相之间通过分配对样品进行分离而达到被测物质纯化和消除干扰物质的目的。选择不同的溶剂，可以有针对性的提取特征香气成分	(1) 优点： 成本低、易操作、适合定性分析 (2) 缺点： 方法定量方面：重现性、准确性不好。有机溶剂具有毒性、污染环境等。耗溶剂量大，还易引入外来物质
2	静态顶空法	样品置于密闭系统中，保持恒定温度，在一定时间内使其顶空的气体与样品中的组分达到相平衡，吸取系统上部的气体进行色谱分析	(1) 优点： 其装置简易、易于全自动化操作、重复性好、成本低。 (2) 缺点： 难以分析较高沸点的组分及低含量

			组分。
3	固相微萃取	是当被分析的有机物在萃取头与萃取体系之间达到平衡，分析物与萃取头之间存在分配系数 k ，不同成分的分配系数不同，在萃取头表面上的吸附量不同，吸附量与分析物在萃取体系中的浓度存在线性关系。	<p>(1) 优点：其装置简易、易于全自动化操作、灵敏度高可分析低沸点到高沸点组分。(2) 缺点：成本高，萃取头寿命会随着试验次数增加而减少，其成本和稳定性不如静态顶空方法</p>

二、样品前处理条件优化

2.1、样品量对测定结果的影响

顶空样品瓶中的样品量对静态顶空色谱分析具有一定影响，因为它直接决定气液两相的分配平衡。采用往 20 mL 顶空瓶里添加 3mL、5mL、8mL 的同一浓度标准样品混标溶液，平衡时间 20min、平衡温度 50℃，进行测定。结果见图 1，随顶空瓶中样品量的增加，香气成分峰面积增大，样品量在超过 5mL 时，大部分香气成分无显著变化，从试验需求和样品需求量综合考虑，采用 5mL 作为试验样品量。

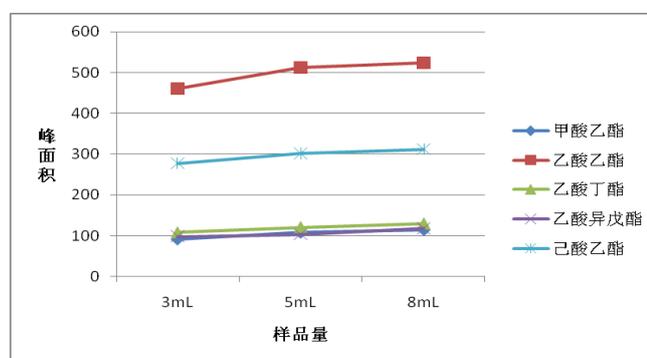


图 1 不同样品量下酯类物质的提取效率

2.2 平衡温度对测定结果的影响

样品的平衡温度与蒸汽压直接相关，影响香气成分在气液两相中的分配系数。一般来说，温度越高，蒸汽压越高，顶空气体的浓度越高，分析灵敏度就越高。平衡温度高对低沸点物质分析有利，可以缩短平衡时间。但是过高的温度可能导致某些组分的分解和氧化，生成新的物质或者失去某些香气物质。本试验选择 30℃、40℃、50℃、60℃ 四个因素水平，在其他条件不变的情况下进行分析（见图 2）。升高温度可以增强香气成分

的提取效果，从 30-60℃之间各香气成分峰面积随温度升高而升高，考虑到温度过高可能会引起葡萄酒香气物质发生变化，50℃可作为最佳平衡温度。

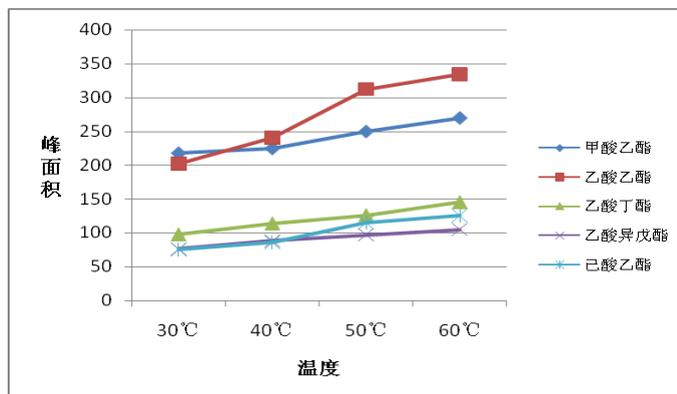


图 2 不同平衡温度下酯类物质的提取效率

2.3 平衡时间对测定结果的影响

平衡时间取决于被测香气物质从样品基质到气相的扩散速度。扩散速度越快，分析扩散系数越大，所需平衡时间越少。由于样品的性质差异，固定的平衡时间不能适用于所有的样品分析，当样品达到平衡时，平衡时间的延长会使一些性质不稳定挥发性成分发生热分解、氧化等副反应。从图 3 可看出，随着平衡时间增加，香气物质提取效率显著增加，但是平衡时间超过 30min 后，香气成分提取效率有趋于平衡，平衡时间的持续增加对此香气成分提取变化不大。

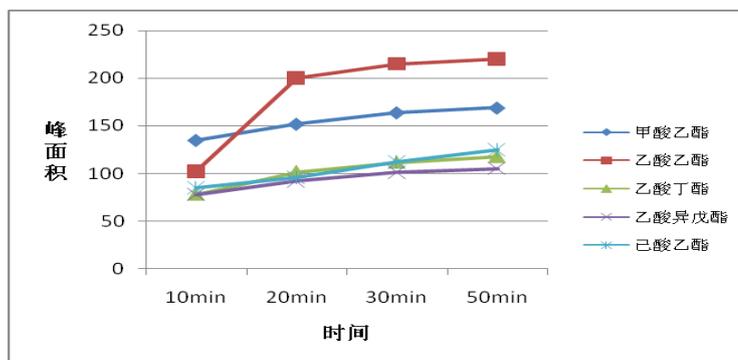


图 3 不同平衡时间下酯类物质的提取效率

2.4 离子强度对测定结果的影响

通常在顶空分析中添加无机盐（如氯化钠）增强溶液中的离子强度，改变挥发性组分的分配系数，有机物的非极性相对增强并使其在水溶液中的溶解度下降，降低基体对挥发性物质的束缚，提高有机物质的逸出活度，促使其从液态基质中挥发出来，吸附到萃取纤维头上，利于香气成分提取。但是 NaCl 的加入还会影响样品基质的黏度，降低分

析物的扩散速度，产生盐的负效应，因此，需对添加 NaCl 进行优化选择。从图 4 可以看出，在添加 2gNaCl 时，酯类物质提取效率达到最佳效果，添加 3gNaCl 时提取效率未有明显增高。

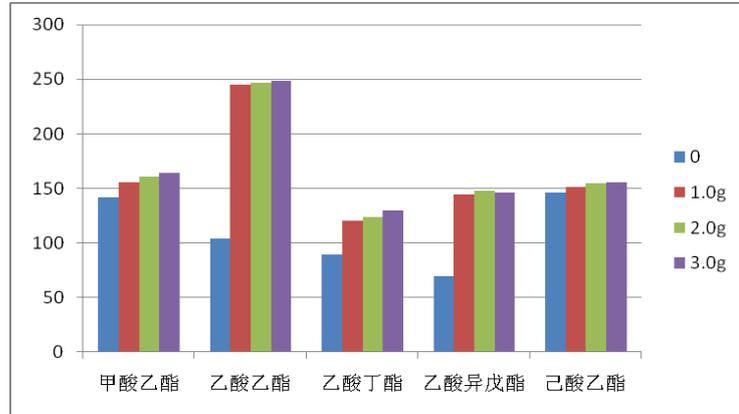


图 4 不同 NaCl 添加量下酯类物质的提取效率

2.5 静态顶空-气相色谱法最佳试验参数的确立

在单因素试验基础上，以顶空瓶中样品量、平衡温度、平衡时间、加盐量为考察因素，三个水平，进行 L9 (3⁴) 正交试验，以各香气成分的峰面积之和作为参考指标，筛选最佳分析条件，结果见表 2。

表 2 正交试验结果表 (3⁴)

试验号 Number	A 样品量 (mL) A Volume (mL)	B 平衡温度 B Incubation temperature (°C)	C 平衡时间 C Incubation time (min)	D 加盐量 D Addition of NaCl (g)	峰面积 Peak area
1	1	1	1	1	315.68
2	1	2	2	2	606.77
3	1	3	3	3	874.22
4	2	1	2	3	653.04
5	2	2	3	1	390.84
6	2	3	1	2	976.21
7	3	1	3	2	648.69
8	3	2	1	3	851.75
9	3	3	2	1	445.23
均值 1	199.63	179.71	238.18	127.97	
均值 2	224.45	205.48	259.45	277.96	
均值 3	216.19	255.07	212.64	264.33	
极差	24.82	75.36	48.73	136.36	

根据极差分析，几种因素对香气成分提取效率的影响主次次序为：加盐量 > 平衡温度 > 平衡时间 > 样品量，对这四个因素进行方差分析知，加盐量对香气成分提取效率具

有显著性影响。最佳水平组合为： $A_2B_3C_2D_2$ ，虽然正交试验得出最佳平衡温度为 60°C ，但是考虑到平衡温度太高会导致香气成分中部分不稳定的化合物会发生反应，故选择平衡温度 50°C 、平衡时间 30min 、样品加入量为 5mL 、 NaCl 加入量为 2g （浓度 0.4g/mL ）为最佳分析条件，依此条件进行三次重复试验，结果平均峰面积为：987.67。

三、方法学验证

1 标准曲线和线性回归方程的建立

本试验以葡萄酒酒样为本底，分别添加梯度浓度的混标溶液和叔戊酯（内标）溶液，进样分析。以组分峰面积为 Y ，组分浓度 X 做线性回归，计算各香气物质的回归方程和相关系数。试验结果见表3，采用本方法时所测定的组分在具有良好的线性，回归系数 R^2 多在 0.99 以上。

表3 线性范围、回归方程、相关系数

化合物	线性范围 (mg L^{-1})	回归方程	相关系数 R^2
乙酸乙酯	50.0 ~200.0	$y = 3.0138x$	0.9931
乙酸丁酯	0.50 ~5.0	$y = 2.6546x$	0.9994
乙酸异戊酯	0.50 ~5.0	$y = 4.9636x$	0.9980
己酸乙酯	0.50 ~5.0	$y = 10.258x$	0.9964

2 方法回收率试验

分别取 5mL 葡萄酒加入到 5 个顶空瓶中，其中一份作为本底，加入 $100\mu\text{L}$ 0.25% 叔戊酯内标溶液；另外 4 份分别加入不同浓度的酯混标工作液及内标溶液，进样分析，回收率测定结果见表 4，各香气物质加标回收率较好，基本在 $82\% \sim 116\%$ 之间。

表4 回收率测定结果

化合物	加标回收率 (%)		
	浓度 1 (mg/L)	浓度 2 (mg/L)	浓度 3 (mg/L)
乙酸乙酯	82.22	107.54	116.26
乙酸丁酯	92.34	105.38	94.55
乙酸异戊酯	107.34	94.32	96.33
己酸乙酯	114.5	97.45	90.31

3 方法精密度试验

取相同浓度的混标溶液，连续测定计算方法的日内精密度，各组分的峰面积的 RSD 基本小于 5.98%，见表 5。

表5 日内精密度测定结果

组分名称	峰面积					面积平均值	RSD%
乙酸乙酯	531.54	533.57	560.00	561.18	558.11	548.88	2.73
乙酸丁酯	2.88	2.61	2.83	2.88	2.68	2.77	4.41
乙酸异戊酯	8.16	7.03	7.19	7.42	7.22	7.40	5.98
己酸乙酯	12.30	11.82	12.30	12.14	12.39	12.19	1.85

注：峰面积经内标校正

四、本方法的验证结果

本方法经过中国食品发酵工业研究院、青岛市产品质量监督检验所、北京市产品质量监督检验所、上海金枫酒业有限公司、烟台张裕公司技术中心、中粮华夏长城葡萄酒有限公司等6家实验室进行验证。葡萄酒加入不同浓度的酯混标制备了1#，2#，3#，4#，5#对照样品，不同实验室严格按照标准文本进行检测，并及时反馈数据，具体验证结果见附表A

附表 A： 实验室间验证结果

表1 6个实验室验证数据统计表 (mg/L)

验证单位	乙酸乙酯 (mg/L)									
	1#样品		2#样品		3#样品		4#样品		5#样品	
Lab1	66.58	59.35	107.19	102.45	148.76	156.11	209.58	205.25	241.16	244.05
Lab2	67.14	66.57	106.28	106.90	149.09	148.05	224.16	202.72	241.84	258.02
Lab3	59.39	62.73	98.90	102.17	151.21	148.93	198.85	202.17	223.40	236.84
Lab4	74.35	76.73	125.40	124.47	169.42	176.18	189.79	202.10	236.56	254.06
Lab5	59.10	61.30	104.00	105.00	155.00	154.00	198.00	198.00	242.00	246.00
Lab6	56.02		94.36		135.23		201.04		246.23	
平均值	62.02		107.01		153.82		202.88		242.74	
RSD%	6.43		9.00		7.14		4.25		3.77	

验证单位	乙酸丁酯 (mg/L)									
	1#样品		2#样品		3#样品		4#样品		5#样品	
Lab1	0.27	0.27	3.82	3.73	7.55	7.66	11.45	11.02	13.42	13.01
Lab2	0.28	0.29	3.65	3.48	7.92	6.95	12.11	10.33	14.16	14.76
Lab3	0.23	0.23	3.52	3.75	7.84	7.36	10.42	11.06	14.02	12.25
Lab4	0.22	0.22	3.69	3.73	7.35	7.66	10.73	11.01	12.87	14.42
Lab5	0.22	0.24	3.45	3.69	7.77	7.76	11.30	11.20	14.10	14.50
Lab6	0.24		2.95		7.53		12.31	1	16.27	
平均值	0.25		3.59		7.58		11.18		13.98	
RSD%	10.41		6.73		3.65		5.52		7.78	

验证单位	乙酸异戊酯 (mg/L)									
	1#样品		2#样品		3#样品		4#样品		5#样品	
Lab1	0.68	0.72	2.53	2.53	4.39	4.43	6.15	5.84	6.87	6.62
Lab2	0.66	0.68	2.37	2.23	4.50	3.95	6.13	5.93	7.92	8.03
Lab3	0.67	0.68	2.29	2.43	4.44	4.19	5.83	6.05	7.54	7.41
Lab4	0.68	0.68	2.46	2.47	4.16	4.35	5.85	5.98	7.57	7.66
Lab5	0.60	0.65	2.21	2.38	4.39	4.38	6.14	6.01	7.40	7.64
Lab6			1.92		4.19		6.33		8.30	
平均值	0.67		2.35		4.31		6.02		7.54	
RSD%	4.56		7.70		3.79		2.62		6.39	

验证单位	己酸乙酯 (mg/L)									
	1#样品		2#样品		3#样品		4#样品		5#样品	
Lab1	0.45	0.54	2.36	2.41	4.25	4.30	5.57	5.50	6.42	6.84
Lab2	0.47	0.45	2.25	1.94	4.09	3.98	6.02	5.58	7.96	7.71
Lab3	0.38	0.41	2.13	2.23	4.25	3.99	5.79	5.94	7.57	7.25
Lab4	0.47	0.47	2.25	2.29	3.94	4.03	5.65	5.91	6.68	7.41
Lab5	0.41	0.43	2.22	2.17	4.09	4.12	5.44	5.91	7.18	7.40
Lab6	0.39		1.84		4.19		5.94		7.79	
平均值	0.44		2.19		4.11		5.75		7.29	
RSD%	10.48		7.75		2.95		3.58		6.61	