

《起泡葡萄酒的二氧化碳中碳稳定同位素比值 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) 测定方法》

行业标准编制说明

一、工作简况

1、任务来源

根据工业和信息化部办公厅下达的 2011 轻工行业标准制定计划,《起泡葡萄酒的二氧化碳中碳稳定同位素比值($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)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:2011-2434T-QB。

2、目的意义

自然界中碳稳定同位素有 ^{13}C 和 ^{12}C , 来源不同的二氧化碳中 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 明显不同。起泡葡萄酒是由葡萄酒加工获得的酒精产品,其特征是在开瓶时具有完全由发酵形成的二氧化碳,该二氧化碳来自于糖发酵(C3 植物糖或 C4 植物糖),而充气酒中通常用的工业级二氧化碳(矿石分解或化石燃料燃烧)与酒中自身发酵产生的二氧化碳不同源,导致二者中碳稳定同位素组成不同。二氧化碳气体中碳稳定同位素比率是标准起泡葡萄酒和充气酒的重要指标,为起泡葡萄酒鉴别提供了理论依据。研究起泡葡萄酒二氧化碳中碳稳定同位素比率的测定方法,对起泡葡萄酒真实性鉴别具有重要意义,因此全国食品发酵标准化中心提出制定《起泡葡萄酒的二氧化碳中碳稳定同位素比值($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)测定方法》行业标准计划。

3、简要编制过程

2011 年 7 月-2011 年 12 月标准起草工作组查阅大量国内外测定二氧化碳中碳稳定同位素比率的方法,根据测定原理选择了两种前处理方法,通过稳定性、准确性等一系列研究,建立了起泡葡萄酒二氧化碳中碳稳定同位素的测定方法。

2012 年 10 月-2013 年 1 月本方法经中国食品发酵工业研究院、中国计量科学院、中科院地质与地球物理研究所、中国原子能科学研究院 4 家实验室分别对两种前处理方法进行验证,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起泡葡萄酒行业发展,促进起泡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

本标准规定了起泡葡萄酒二氧化碳中碳稳定同位素的分析方法。

本标准适用于起泡葡萄酒和充气酒二氧化碳中碳稳定同位素的测定。

三、主要试验（或验证）情况分析

针对起泡葡萄酒二氧化碳中碳稳定同位素的测定方法进行了系统研究，详细的研究数据见附件一。（1）**离线测定法**：起泡葡萄酒中二氧化碳经纯化后测定，连续3次测定相同样品， $SD \leq 0.2\%$ 。（2）**GC-C-IRMS 法**：将起泡葡萄酒中二氧化碳转移至顶空瓶中，用进样针取气测定，连续3次测定相同样品， $SD \leq 0.2\%$ 。（3）**GasBench 法**：取微量4℃酒样于进样瓶中，由载气将二氧化碳带入质谱仪中测定，连续3次测定相同样品， $SD \leq 0.2\%$ 。（4）**方法准确性**：参与国际实验室间方法比对项目（FIT-PTS），与国际同类实验室平均测定结果的差异均 ≤ 0.2 ，说明该方法的准确性符合国际要求。（5）不同实验室间验证：经中国食品发酵工业研究院和中国计量科学研究院同时验证上述三种前处理方法测定起泡葡萄酒二氧化碳中碳稳定同位素比率，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益等情况

该标准的实施，将填补我国起泡葡萄酒类稳定同位素测定方法标准的空白；对建立起泡葡萄酒稳定碳同位素数据库，从而鉴别起泡葡萄酒真实性具有十分重要的意义。

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。

采标：Resolution Oeno 7/2005 Sparkling wines - Determination of the carbon isotope ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of CO_2 in sparkling wines- Method using isotope ratio mass spectrometry (IRMS)

国外样品相关数据对比：见附件二。

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

该标准从我国起泡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，结合起泡葡萄酒行业的特点；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

《起泡葡萄酒的CO₂中碳稳定同位素比值（¹³C/¹²C）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

该标准从我国起泡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。

《起泡葡萄酒的CO₂中碳稳定同位素测定方法》

行业标准起草工作组

2013年8月

一、 研究背景

起泡葡萄酒（高泡葡萄酒和低泡葡萄酒）富含二氧化碳，具有起泡特性和清凉感，越来越受到各国消费者的欢迎。据有关资料，全世界起泡葡萄酒的产量约为 13 亿升，占世界葡萄酒总产量的 3.81%。起泡酒的生产工艺复杂，生产周期长，因此价格也十分昂贵，而与起泡葡萄酒具有相似物理特性的葡萄汽酒则由于工艺简单、价格低廉，市场上存在着葡萄汽酒冒充起泡葡萄酒的现象。实现起泡葡萄酒与葡萄汽酒的真实鉴别对于建立起泡葡萄酒市场、保障公平竞争、促进国际贸易具有重要意义。

由于起泡葡萄酒与葡萄汽酒物理特性相似，难以利用理化分析法进行有效区分。研究表明通过二氧化碳中碳稳定同位素组成可检测出是否人工掺入 CO_2 ，继而鉴别起泡葡萄酒的真实性。因此，实现起泡葡萄酒与葡萄汽酒的真实鉴别，二氧化碳中碳稳定同位素组成的稳定、准确测定至关重要。OIV 自 1997 年制定了离线法测定起泡葡萄酒中二氧化碳碳稳定同位素比率的方法标准以来，于 2005 年又收录了在线测定法。

起草工作组根据起泡葡萄酒中二氧化碳碳稳定同位素比率测定原理，通过对比分析，选择离线测定法和 GC-C-IRMS 法作为分析方法。

二、 基本原理及参数要求

1. 仪器测定原理

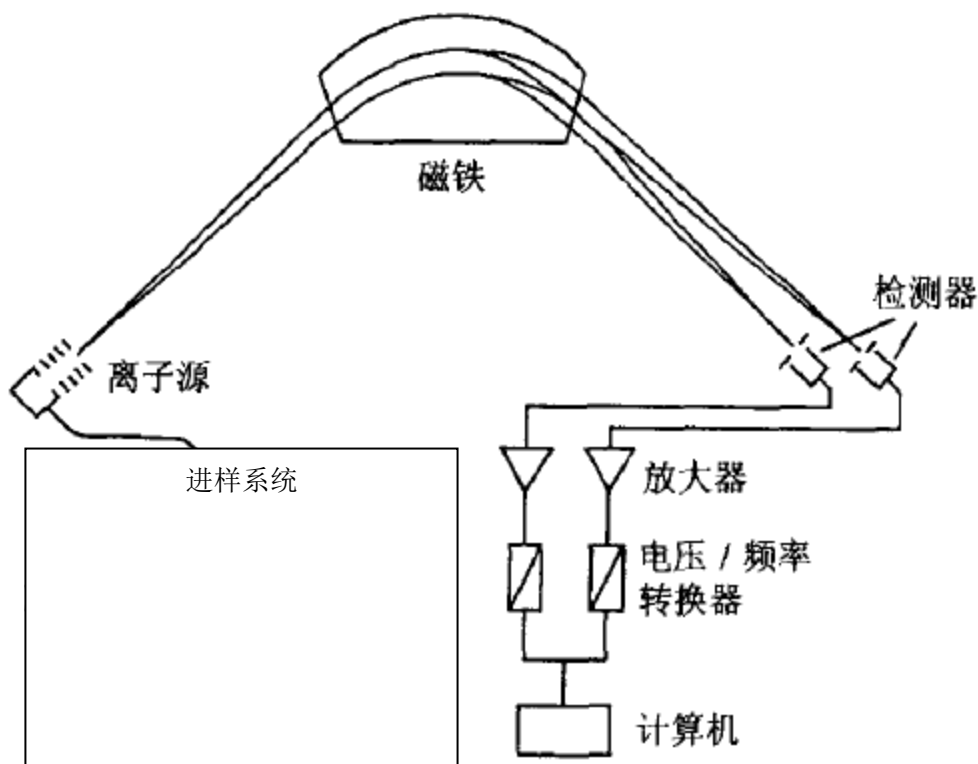
原子核由 Z 个质子和 N 个中子组成，质子数和中子数的和 $Z+N=A$ 为质量数，即组成原子核的核子数。质子数相同而中子数不同的原子称为同位素。测定稳定同位素含量（丰度）的方法很多，其中最普遍的是质谱法。

质谱仪器是利用离子光学和电磁原理，按照质荷比（ M/e ）进行分离从而测定样品的同位素质量或相对含量。

在稳定同位素分析中均以气体形式（如 CO_2 ， N_2 ， SO_2 或 H_2 ）进行质谱分析，测量过程可归结为以下步骤：

- 1.1 将被分析的样品以气体形式送入离子源；
- 1.2 把被分析的元素转变为电荷为 e 的阳离子，应用纵电场将离子束准直成为一定能量的平行离子束；
- 1.3 利用电、磁分析器将离子束分解成不同 M/e 比值的组分；
- 1.4 记录并测定离子束每一组分的强度；
- 1.5 应用计算机程序将离子束强度转化为同位素丰度；

1.6 将待测样品与工作标准相比较，得到相对于国际标准的同位素比值。



稳定同位素比值质谱仪结构示意图

2. 主要性能指标

2.1. 分辨率：定义 $M/\Delta M$ ， M 为离子的质量， ΔM 为恰好能分开的两种（同电荷）离子的质量差，即在质量数 M 附近，能分辨的最小质量差。是衡量质谱仪性能好坏的一个物理量。该值越大表示质谱仪性能越好。

2.2. 灵敏度：可检测的最小样品量，要求愈灵敏愈好。可表示为气体分压强灵敏度（安/毫巴）或丰度灵敏度（ $\Delta I_M/I_M$ ），其中 I_M 为质量数 M 的质谱峰的离子流强度， ΔI_M 为该峰拖尾对质量数为 $M \pm 1$ 峰的贡献。

2.3. 内精度：一段时间内连续测定同一气体所得测定值的重复性，表达为

$$\sigma = \sqrt{\sum(\sigma_x)^2 / (n - 1)}$$

式中 σ 为标准偏差， σ_x 为每个测定值对于平均值的偏差， n 为测定次数。精密度要求愈小愈好。一般双路进样系统 $\leq 0.01\%$ ，连续流进样系统 $\leq 0.06\%$ 。

2.4. 线性范围：仅针对于连续流进样系统-稳定同位素比值质谱仪，指离子流强度在一定范围内时，同位素比值的测定值相对稳定，线性范围愈宽愈好。

样品在多大的质量范围内的同位素是一个相对稳定的值，线性范围大，其操作会更加方

便。

2.5. 重复性：同一实验人员利用相同仪器设备在最短时间间隔测定同一样品得到两个测定值，绝对差值超出重复性限 r 的置信概率不超过 5%。

2.6. 再现性：对于同一测试样品，两个实验室测定值的绝对差值超过再现性 R 的置信概率不超过 5%。

3. 起泡葡萄酒二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ 测定

稳定同位素比值质谱仪可直接测定气体二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ ，然而起泡葡萄酒气体中除二氧化碳外还有大量水汽，因此需前处理对二氧化碳进行纯化以防止混杂的水分进入质谱仪。目前已报道的测定方法有四种：离线处理-双路法、离线处理-连续流法、GC-C-IRMS法和 GasBench-IRMS 法。其中离线处理-双路法、离线处理-连续流法和 GC-C-IRMS 法已被 OIV 作为标准方法（RESOLUTION OENO 7/2005）用于测定起泡葡萄酒二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ 。

三、方法验证

1 离线法

1.1 双路进样系统内精度

设定信号强度 6V（储气仓自动调整压力），双路进样系统的左右储气仓中气体交替进入离子源，测定 8 次，见表 1：

表 1 双路进样系统内精度测定 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	1 σ
$\delta^{13}\text{C}$	0.033	0.017	0.010	0.001	0.012	0.034	0.008	0.001	0.013

表 1 数据表明，连续 8 次交替进样测定， $1\sigma < 0.015\text{‰}$ ，符合测定要求。

1.2 线性范围

离线法采用双路进样系统，向进样系统的两个储气仓中导入高纯气体，分别验证其导入的气体信号强度连续变化时测定值变化，见表 2：

表 2 双路进样系统线性范围测定

	信号强度变化范围	测定稳定性
储气仓 1	2V~10V	-0.035‰/V
储气仓 2	2V~10V	-0.028‰/V

由表 2 可知，两个储气仓中气体进样时，信号强度在 2V~10V 范围内波动时， $\delta^{13}\text{C}$ 都是稳定的。

1.3 影响因素分析

1.3.1 顶空瓶中空气的影响

该法测定起泡葡萄酒/葡萄汽酒二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ 时将酒样（4 ~5℃）转移至顶空瓶中，然后再进行纯化处理。为验证顶空瓶中空气（含有 0.3%二氧化碳）是否影响测定，向 5 个顶空瓶中直接加入酒样；作为对照，用充氮仪向 5 个顶空瓶中充入高纯氮气（充气时间 5min）以置换掉瓶内空气，然后加入约 15mL 酒样，上述 10 个样品纯化后测定二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ ，结果见表 3：

表 3 空气对二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ （‰）测定的影响

处理方式	1	2	3	4	5	平均值	1 σ
直接加酒样	-29.75	-29.55	-29.72	-29.66	-29.58	-29.65	0.09
充氮后加酒样	-29.79	-29.67	-29.54	-29.73	-29.67	-29.68	0.09

由表 3 结果可知，顶空瓶中直接加入酒样的平均测定结果与充氮后再加入酒样结果一致，且两种处理方法的标准偏差相近，由此可说明顶空瓶内空气不会影响二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定，为简化实验步骤，后续试验中均选择顶空瓶内直接加入酒样，然后进行纯化处理。

1.3.2 收集时间

离线法纯化起泡葡萄酒中二氧化碳时需将分装瓶（3.1.3.1）内的气体转移到气体收集管中，二者之间通过冷阱连接并固化水汽。收集时间太短可能气体收集不完全，进而产生同位素分馏，收集时间太长则会加大操作难度。本研究分析了收集时间对二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ 测定的影响，结果见表 4：

表 4 收集时间二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ （‰）测定的影响

收集时间 测定次数	2min	3min	4min	5min
1	-29.73	-29.62	-29.65	-29.67
2	-29.50	-29.73	-29.73	-29.54
3	-28.96	-29.63	-29.56	-29.73
4	-29.63	-29.66	-29.58	-29.67

样品气压 (mbar)	15~18	25~30	33~34	30~35
平均值	-29.46	-29.66	-29.63	-29.65
1 σ	0.35	0.05	0.08	0.08

由表中可知，当纯化时间在 3~5min 范围内时，二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定结果很稳定；纯化时间为 2min 时，有一个数据和其他数据差异显著，这可能是由于此时集气瓶收集到的样品气压较小（15~18mbar），影响 IRMS 分析；而纯化 3~5min 所得的结果差异很小，因此，后续试验中，纯化时间 3~5min 时均可。

1.4 稳定性分析

对同一样品按照标准方法平行处理 5 次并测定以研究方法重复性，之后每隔两天处理 5 次并测定以研究方法的再现性，结果见表 5：

表 5 方法稳定性分析 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

	测定次数 n	$\delta^{13}\text{C}$	1 σ
重复性测定结果	5	-29.65	0.09
再现性测定结果	15	-29.62	0.09

实验结果表明该法的重复性和再现性均很理想，能够满足日常测定样品的稳定性要求。

2 GC-C-IRMS法

2.1 IRMS 内精度

设定参考气体信号强度 6V，通过连续流系统接口 Conflo IV 连续 10 次进气测定，结果见表 6：

表 6 IRMS 系统内精度 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1 σ
$\delta^{13}\text{C}$	0.043	0.000	-0.033	-0.044	-0.060	-0.081	-0.118	-0.107	-0.132	-0.151	0.06

表 6 数据表明，参考气体通过 Conflo IV 连续 10 次进样测定， $1\sigma \leq 0.06\text{‰}$ ，符合测定要求。

2.2 IRMS 线性范围

连续流系统进样测定时样品进样量多少会有差异，研究信号强度在某个范围内波动时测定值稳定，连续 8 次通过接口 Conflo IV 接口将参考气体导入 IRMS 中，与此同时不断更改氮气的流量以使得进入 IRMS 的信号强度逐渐增加（或减少），测定结果见表 7：

表 7 IRMS 系统内精度 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

信号强度 (mV)	627	1116	3365	4235	5156	7120	9191	14245	变化率 Slop (δ/V)
$\delta^{13}\text{C}$	0.154	0.000	-0.257	-0.371	-0.443	-0.515	-0.538	-0.516	-0.053

表 7 数据表明，信号强度在 3V~10V 变化时，变化率仅为-0.05/V，符合仪器要求，满足实验需求。

2.3 GC-C-IRMS 内精度

CO₂ 气体经气密针采气由进样口注入，经色谱柱和燃烧管导入 IRMS 中，连续 10 次进气测定，结果见表 8：

表 8 GC-C-IRMS 系统内精度 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1 σ
$\delta^{13}\text{C}$	-26.530	-26.571	-26.587	-26.512	-26.516	-26.556	-26.541	-26.488	-26.500	-26.541	0.039

表 8 数据表明，气密针采气经气相色谱柱和燃烧管导入 IRMS 中，连续 10 次进样测定的 1 σ <0.06‰，符合测定要求。

2.4 影响因素分析

2.4.1 顶空进样瓶中空气的影响

根据 GC-C-IRMS 的测定原理，从一空顶空进样瓶中取样（取空气）测定，结果见图 1.

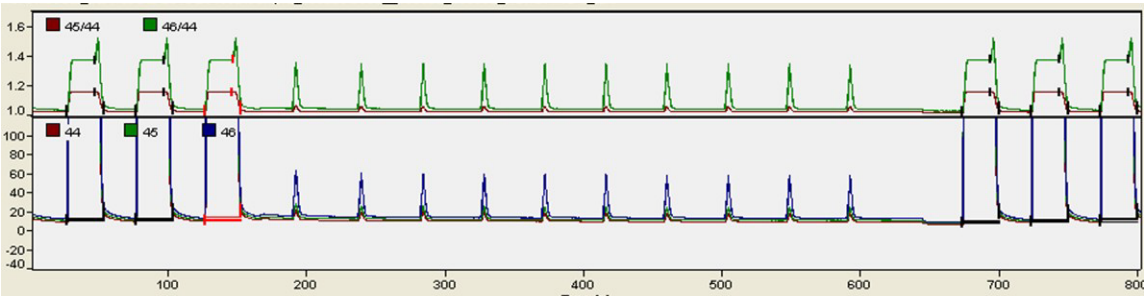


图 1 空气中 CO₂ 的 GC-G-IRMS 分析图谱

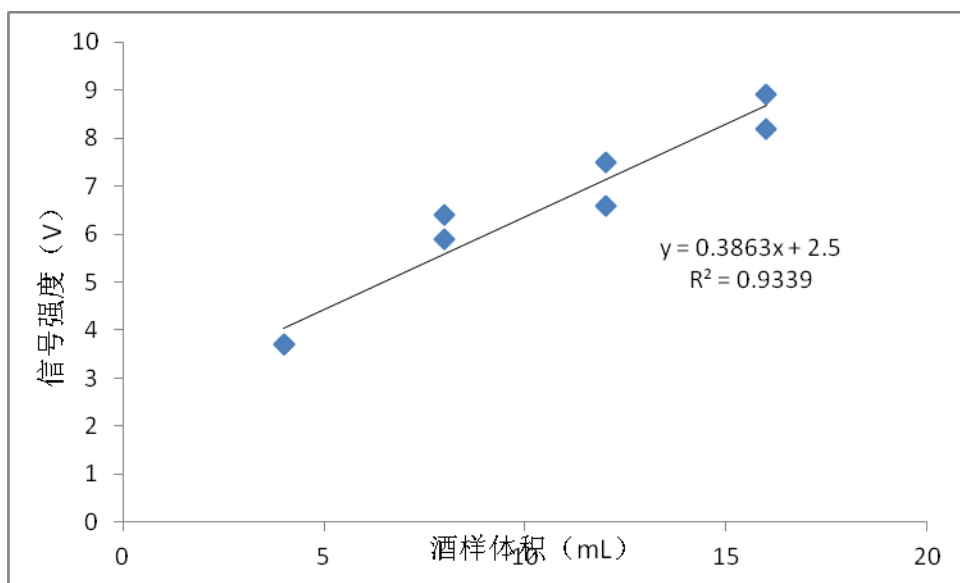
由图 1 可知，取空气 5 μ L 进样测定时 CO₂ 产生的信号强度约有 80mV，这是因为空气中含有 0.3%的二氧化碳。从图中可看出，由于浓度太低，CO₂ 未能达到 IRMS 的检测限，但这不代表这部分二氧化碳不影响酒样二氧化碳的测定。

为验证空气对样品测定的影响，分别向顶空进样瓶装入 4mL、8mL、12mL 和 16mL 酒样（4℃），测定结果见表 1

表 1 不同体积酒样二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

体积 mL	信号强度 V	$\delta^{13}\text{C}$
4	3.7	-26.30
4	3.7	-26.04
8	6.4	-26.37
8	5.9	-26.40
12	7.5	-26.37
12	6.6	-26.30
16	8.2	-26.26
16	8.9	-26.21

由表 1 可知,该处理方式下二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定值重复性相对较好(极差 0.36‰)，然而信号强度与酒样体积呈现显著正相关（见图 2），这是因为在超声震荡前顶空瓶中空气为正常大气压，密闭条件下震荡时酒样中的二氧化碳释放后只能以大于一个大气压的形式存在。然而对比双路测定的结果（校正后约为-26.5‰），可知此种处理方式下测定结果偏正，原因有两方面：一是进样瓶空气中二氧化碳的影响，二是由于超声震荡后瓶内气压高于一个大气压，进样针取气后转移至 GC 进样口的过程中（暴露在空气中）有一部分样品气逸散，从而造成了同位素分馏。



2.4.2 排除空气的干扰

为排除空气的干扰，改进前处理方法：超声震荡前在顶空进样瓶的瓶盖上插一根注射器针头以便排气，分别向顶空进样瓶装入 8mL、12mL 和 16mL 酒样（4℃），测定结果见表 2

表 2 排气状态下不同体积酒样二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

体积 mL	信号强度 V	$\delta^{13}\text{C}$
8	6.4	-26.46
8	6.6	-26.42
12	8.7	-26.45
12	8.9	-26.43
16	9.3	-26.57
16	9.3	-26.53

表 2 数据表明，信号强度与酒样体积也呈现同步增加的趋势，与 2.1 比较接近，但 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定值更加稳定（极差仅 0.15‰），且与双路测定结果几乎一致，由此可说明改进的前处理方法更适合 GC-C-IRMS 测定起泡酒/葡萄汽酒二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定，至于 2.1 中测定值偏正的原因，可能是瓶内气压过高，取气-进样过程中气体逸散导致碳同位素分馏的结果。

该法中，酒样体积在 12mL 和 16mL 时，信号强度比较接近，因此后续试验中酒样体积在 12~16mL 范围内即可。

2.4.3 超声时间的影响

根据 2.2 的结论，采用超声震荡+排气法处理酒样，向顶空进样瓶中加入 12mL 体积酒样，分别超声处理 2min、4min 和 6min 后测定，结果见表 3

表 3 不同超声时间下酒样二氧化碳中 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

超声时间	信号强度 V	$\delta^{13}\text{C}$
2min	8.7	-26.45
	8.9	-26.43
4min	9	-26.5
	9.3	-26.5
6min	9	-26.44
	8.9	-26.42

表 3 数据显示，超声处理时间不同的样品，信号强度无明显变化，而 $\delta^{13}\text{C}$ 测定结果无差异，这说明超声时间在 2~6min 时并不影响结果准确性。为简化实验，后续实验中选择超声 2min。

2.5 稳定性分析

对同一样品按照标准方法平行处理 5 次并测定以研究方法重复性，之后每隔两天处理 5 次并测定以研究方法的再现性，结果见表 12：

表 12 方法稳定性分析 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

	测定次数 n	$\delta^{13}\text{C}$	1 σ
重复性测定结果	5	-26.48	0.056
再现性测定结果	15	-26.50	0.048

表 12 数据表明，该法采集瓶内二氧化碳，GC-C-IRMS 导气并测定二氧化碳 $\delta^{13}\text{C}$ 的稳定性很好，满足实验要求。

四、实验室验证结果

本方法经过中国食品发酵工业研究院、中国科学院地质与地球物理研究所、中国计量科学研究院、中国原子能科学研究院等 4 家实验室的进行了方法验证（8 个数据）；制备了充气酒和起泡葡萄酒两种对照样品，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 实验室协同试验数据统计表（‰）

实验室	家乐福高泡干葡萄酒		杰卡斯 起泡葡萄酒	
1	-30.10	-30.35	-13.11	-13.19
2	-30.19	-30.41	-13.26	-13.11
3	-30.28	-30.31	-13.08	-13.12
4	-30.27	-30.22	-13.16	-13.17
5	-30.14	-30.06	-12.81	-12.78
6	-30.03	-30.10	-12.87	-12.84
7	-30.06	-30.13	-13.35	-13.12
8	-29.98	-30.04	-13.15	-13.09
平均值	-30.17		-13.08	
重复性标准差 Sr	0.09		0.07	
重复性 r	0.25		0.21	
再现性标准差 SR	0.13		0.17	
再现性限 R	0.37		0.47	

Round:
2011\Round 3

Product:
Sparkling Wine

Parameter:
C13 CO2

Size :	8
Mean :	-23.06
Robust Mean :	-23.12
Standard Deviation :	0.80
Robust SD :	0.61
Target SD :	0.47
Min :	-24.31
Max :	-21.47

Laboratory Code	Sample	Z-scores
F6	-24.31	-2.54
F1	-23.42	-0.65
F7	-23.28	-0.35
F9	-23.20	-0.18
F5	-23.14	-0.05
F2	-23.00	0.24
F10	-22.65	0.99
F8	-21.47	3.50

