



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102967669 B

(45) 授权公告日 2014.06.11

(21) 申请号 201210473395.8

(22) 申请日 2012.11.20

(73) 专利权人 中国食品发酵工业研究院
地址 100027 北京市朝阳区霄云路 32 号

(72) 发明人 钟其顶 王道兵 熊正河

(74) 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理
有限责任公司 11138

代理人 滕一斌

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101008635 A, 2007.08.01,

CN 102253136 A, 2011.11.23,

CN 102590457 A, 2012.07.18,

JP 2007033076 A, 2007.02.08,

RYOTA HATTORI et al.. Measurement of the Isotope Ratio of Acetic Acid in Vinegar by HS-SPME-GC-TC/C-IRMS. 《J. Agric. Food Chem.》. 2010, 第 58 卷

Keita Yamada et al.. On-line measurement of intramolecular carbon

isotope distribution of acetic acid by continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. 《Rapid Commun. Mass Spectrom.》. 2002, 第 16 卷 (第 11 期), GIOVANNI CALDERONE et al..

Characterization of European Wine Glycerol: Stable Carbon Isotope Approach. 《J. Agric. Food Chem.》. 2004, 第 52 卷

Freddy Thomas et al.. ²H NMR and ¹³C-IRMS analyses of acetic acid from vinegar, ¹⁸O-IRMS analysis of water in vinegar: International collaborative study report. 《Analytica Chimica Acta》. 2009, 第 649 卷

张琳 等. 固相微萃取-气相色谱/同位素质谱法测定水中挥发性有机物单体碳同位素. 《分析实验室》. 2010, 第 29 卷 (第 4 期),

审查员 黎作佳

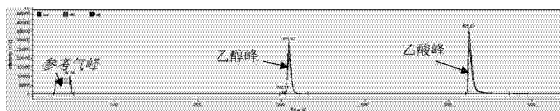
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种食醋中乙酸碳稳定同位素的快速测定方法

(57) 摘要

本发明涉及一种食醋中乙酸碳稳定同位素的快速测定方法,使用气相色谱-燃烧-同位素比值质谱法(GC-C-IRMS)进行测量,其包括采用乙醇稀释食醋样品的步骤和利用气相色谱(GC)分离稀释后样品中的乙酸的步骤。本发明利用GC-C-IRMS实现对食醋中乙酸碳稳定同位素快速测定,解决以往食醋中乙酸碳稳定同位素在测定前需纯化乙酸的系列前处理技术难题,将促进乙酸碳稳定同位素测定技术进步,也为今后粮食醋和水果醋产品真伪鉴别提供技术方法。



1. 一种食醋中乙酸碳稳定同位素的快速测定方法,包括以下步骤:

1) 采用乙醇稀释食醋样品,混匀待用;

2) 配有 Wax 色谱柱的 GC,用液体进样针进样,在载气的作用下分离乙醇、乙酸、水及其他化合物;

3) 用燃烧转化装置将乙酸转化成 CO_2 ;

4) 用 CF-IRMS 测定乙酸产生的 CO_2 中 $\delta^{13}\text{C}$;

色谱条件为 Wax 毛细管柱,规格为 $30\text{m}\times 0.25\text{mm}\times 0.25\mu\text{m}$;载气为氦气;柱流速 $1.2\text{mL}/\text{min}$;进样口温度 300°C ;升温程序为:起始温度 120°C ,保持 1min ,以 $15^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至 200°C ,保持 2min ;进样体积 $1\mu\text{L}$;分流比 20:1。

2. 根据权利要求 1 所述的测定方法,其特征在于:所述用乙醇稀释食醋样品是指用色谱纯乙醇将样品中的乙酸浓度降至 $8\text{g}/\text{L}$ 。

3. 根据权利要求 1 所述的测定方法,其特征在于:所述燃烧转化装置中配备陶瓷氧化管,填料为 CuO , NiO 和 Pt ,工作温度为 1000°C ,将乙酸转化成 CO_2 。

4. 根据权利要求 1 所述的测定方法,其特征在于:质谱条件为离子源真空 $1.8\times 10^{-6}\text{mBar}$,电压 3.06KV ,电流 1.50mA 。

5. 根据权利要求 1 所述的测定方法,其特征在于:所述 $\delta^{13}\text{C}$ 由下式表示:

$$\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}} - 1) \times 1000$$

$R_{\text{样品}}$:样品中 ^{13}C 与 ^{12}C 的比值;

$R_{\text{标准}}$:标准物质 V-PDB 中 ^{13}C 与 ^{12}C 比值, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = (11237.2 \pm 90) \times 10^{-6}$ 。

一种食醋中乙酸碳稳定同位素的快速测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于稳定同位素分析技术领域,涉及一种食醋中乙酸碳稳定同位素的快速测定方法,具体就是通过气相色谱分离纯化乙酸并测定其碳稳定同位素的技术研究,可用于食醋(粮食醋和果醋)的质量鉴别分析。

背景技术

[0002] 醋是日常生活重要饮品之一,根据工艺不同可分为酿造醋和配制醋 [1, 2],其中酿造醋根据发酵原料不同,可以分为粮食醋和水果醋。果醋饮料由于独特的风味和保健作用在世界发达国家受到欢迎,被称作“第四代黄金饮品”。由于不同产品间呈现价格差异,市场上难免出现配制醋冒充酿造醋和果醋等现象。因此,研究醋产品真实性技术对于规范市场,促进公平竞争和保护消费者利益有重要意义。

[0003] 随着科技发展,仅仅依靠物理化学常规指标难以有效识别食醋发酵原料和生产工艺。不同来源的食醋中的乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 存在明显差异 [3],可作为醋真实性技术重要特征指标。目前,测定食醋中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 主要有两种方法,第一种方法通过微蒸馏提纯醋中乙酸,采用 EA-IRMS 进行测定;同时,也有报道采用顶空-固相微萃取技术 [4] 进行萃取浓缩食醋中乙酸,再进入 GC-C-IRMS 进行测定。第一方法采用蒸馏提纯前处理中需避免乙酸的同位素分馏,需要特殊的蒸馏装置以保证乙酸提取效果,操作费时费力;第二种方法采用固相微萃取技术提取醋中乙酸,提取过程中随着萃取头效率会造成不同程度乙酸同位素分馏,影响结果准确度。本文拟研究建立一种不需要复杂前处理技术,通过气相色谱柱分离后可稳定测定醋中乙酸的分析方法,为建立醋的真实性技术提供检测手段。

发明内容

[0004] 为了克服上述各分离提纯乙酸并测定其 $\delta^{13}\text{C}$ 方法的不足,本发明的目的是建立一种简单、快速、可靠的测定溶液中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的方法,并将乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 用于地球化学、环境、生态领域研究或鉴别食醋、果醋真伪,以便促进乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 在科学研究中的应用、为商业上高档食醋、果醋的防伪提供碳同位素指纹标签。

[0005] 简言之,本发明利用气相色谱-燃烧-同位素比值质谱法 (GC-C-IRMS) 实现对食醋中乙酸碳稳定同位素快速测定,解决以往食醋中乙酸碳稳定同位素在测定前需纯化乙酸的系列前处理技术难题。本发明将促进乙酸碳稳定同位素测定技术进步,也为今后粮食醋和水果醋产品真伪鉴别提供技术方法。

[0006] 以下对本发明方法进行详细描述。

[0007] 本发明的一个目的是提供一种食醋中乙酸碳稳定同位素的快速测定方法,所述方法使用连续流-稳定同位素比值质谱 (CF-IRMS) 法进行测量,其包括采用乙醇稀释食醋样品的步骤和利用气相色谱 (GC) 分离稀释后样品中的乙酸的步骤。

[0008] 更具体而言,本发明的溶液中乙酸碳稳定同位素的简单快速测定方法,包括以下步骤:

- [0009] 1) 采用乙醇稀释样品,混匀待用;
- [0010] 2) 配有 Wax 色谱柱的 GC,用液体进样针进样,在载气的作用下分离乙醇、乙酸、水及其他化合物;
- [0011] 3) 用在线燃烧装置将乙酸转化成 CO_2 ;
- [0012] 4) 用 CF-IRMS 测定乙酸产生的 CO_2 中 $\delta^{13}\text{C}$ 。
- [0013] 上述步骤中,所述用乙醇稀释样品是指用色谱纯乙醇将样品中的乙酸浓度降至 8g/L。
- [0014] 所述色谱条件为 Wax 毛细管柱(30m×0.25mm×0.25 μm);载气为氦气;柱流速 1.2mL/min;进样口温度 300°C;升温程序为:起始温度 120°C,保持 1min,以 15°C/min 升温至 200°C,保持 2min;进样体积 1 μL ;分流比 20:1。
- [0015] 另外,所述燃烧转化装置中配备陶瓷氧化管,填料为 CuO , NiO 和 Pt ,工作温度为 1000°C,将乙酸转化成 CO_2 。

[0016] 所述质谱条件为离子源真空 1.8×10^{-6} mBar,电压 3.06KV,电流 1.50mA。

[0017] 最后,所述 $\delta^{13}\text{C}$ 由下式表示:

$$[0018] \quad \delta^{13}\text{C} = (R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}} - 1) \times 1000$$

[0019] $R_{\text{样品}}$:样品中 ^{13}C 与 ^{12}C 的比值;

[0020] $R_{\text{标准}}$:标准物质 V-PDB 中 ^{13}C 与 ^{12}C 比值, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = (11237.2 \pm 90) \times 10^{-6}$ 。

[0021] 本发明的原理是利用乙醇降低样品中乙酸含量、减少水的体积分数,利用各种有机物质在色谱柱中的保留时间不同,经色谱柱分离后有选择性的将乙酸转移到燃烧炉中反应成 CO_2 ,从而避免了水和各种有机物对乙酸测定的影响;用同样的条件测定参考物质乙酸 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ 已知) 中 $\delta^{13}\text{C}$,然后根据参考物质乙酸测定值、真实值和样品的测定值得出样品的真实值,从而避免了碳同位素分馏的影响。

[0022] 本发明建立的方法简单、快速、准确,且样品用量少。该发明面向国内外从事乙酸碳稳定同位素分析的高等院校和科研院所,各食品检测机构,将促进乙酸碳稳定同位素测定技术进步,也为今后粮食醋和水果醋产品真伪鉴别提供技术方法。

附图说明

[0023] 图 1 乙醇与乙酸经 GC-C-IRMS 分析图谱;

[0024] 图 2 果醋样品乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 分析图谱;

具体实施方式

[0025] 为了更好的理解本发明,下面结合具体实例对本发明进一步说明。

[0026] 实施例 1

[0027] 1 材料方法

[0028] 1.1 仪器

[0029] Triplus 自动进样器(Thermofisher 公司),气相色谱仪(Trace GC, Thermofisher 公司),燃烧转化装置(IsoLink, Thermofisher 公司),稳定同位素比值质谱仪(DeltaV Advantage, Thermofisher 公司)等。

[0030] 1.2 试剂

[0031] 乙醇(国产色谱纯),冰乙酸(国产分析纯,EA-IRMS 标定得 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}=-26.41\pm 0.15\%$),果醋(2011 年 FIT-PTS 第二轮国际比对样品)。

[0032] 1.3 色谱条件

[0033] Wax 毛细管柱(30m×0.25mm×0.25 μm);载气为氦气;柱流速 1.2mL/min;进样口温度 300℃;升温程序为:起始温度 120℃,保持 1min,以 15℃/min 升温至 200℃,保持 2min;进样体积 1 μL;分流比 20:1。

[0034] 1.4 乙酸转化条件

[0035] 燃烧转化装置(IsoLink)中配备陶瓷(Al_2O_3)氧化管(填料为 CuO, NiO 和 Pt),工作温度为 1000℃,将乙酸转化成 CO_2 。

[0036] 1.5 质谱条件:

[0037] 离子源真空 1.8×10^{-6} mBar,电压 3.06KV,电流 1.50mA;

[0038] 1.6 样品稀释

[0039] 用乙醇(色谱纯)稀释食醋,至乙酸含量约 8g/L 左右于进样瓶待测。

[0040] 1.7 结果表示

[0041] $\delta^{13}\text{C}=(R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}}-1)\times 1000$

[0042] $R_{\text{样品}}$:样品中 ^{13}C 与 ^{12}C 的比值;

[0043] $R_{\text{标准}}$:标准物质 V-PDB 中 ^{13}C 与 ^{12}C 比值, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}=(11237.2\pm 90)\times 10^{-6}$;

[0044] 2 结果与分析

[0045] 2.1 保留时间确定

[0046] 本文采用乙醇作为稀释溶剂,根据同位素质谱要求,溶剂峰应通过 Backflush 阀门控制进行排出,避免干扰乙酸有效燃烧成 CO_2 并测定其 $\delta^{13}\text{C}$ 。考虑到乙醇和乙酸的挥发性,将乙醇和乙酸标准品混合置于顶空进样瓶,取进样瓶上层的乙醇和乙酸混合气体注入 GC-C-IRMS 进行测定,得到乙醇和乙酸的 44,45 和 46 离子图,具体见图 1。

[0047] 由图 1 可知,乙醇与乙酸的可有效分离,其中乙醇和乙酸的保留时间分别为 309s 和 525s,满足采用 Backflush 阀门控制乙醇溶剂排出时间要求。

[0048] 2.2 乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 测定精密度

[0049] 模拟配置不同乙酸浓度的醋,根据以上条件进行多次重复测定,具体结果见表 1:

[0050] 表 1 不同浓度乙酸水溶液中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 测定结果

[0051]

乙酸浓度	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	标准偏差 σ (‰)	n
5%	-26.29	0.11	10
10%	-26.38	0.12	10
30%	-26.29	0.09	10
50%	-26.36	0.12	10
99.9% (冰乙酸)	-26.41	0.10	16
平均值	-26.35		
标准偏差	0.05		

[0052] 从表 1 可见,对于冰乙酸在连续 16 次测定,标准偏差 $\sigma=0.10\%$,可达到文献所述的纯乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的稳定性为标准偏差 σ 范围为 $0.1\%\sim 0.4\%$ [18]。

[0053] 不同浓度乙酸溶液测定结果稳定在 $-26.29 \sim -26.41\%$ ，标准偏差为 0.05% ，满足于同位素质谱仪器稳定性要求 $< 0.2\%$ 。因此，本文建立测定方法可有效测定不同乙酸浓度的模拟醋溶液 $\delta^{13}\text{C}$ ，且步骤简单，操作简便。

[0054] 2.3 再现性分析

[0055] 选择 5% 乙酸水溶液为试验对象，分别置于 4 个溶剂瓶 A、B、C 和 D，其中 A、B、C 和 D 分别在第 1 天、第 3 天、第 5 天和第 7 天进行测定，测定结果见表 2：

[0056] 表 2 乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 再现性分析

[0057]

样品编号	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	1σ (‰)	n
A	-26.28	0.12	3
B	-26.37	0.05	3
C	-26.39	0.14	3
D	-26.40	0.06	3
平均值	-26.36		
标准偏差 (1σ)	0.05		

[0058] 从表 2 可见 5% 乙酸溶液中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定结果稳定在 $-26.28 \sim -26.40\%$ 之间，与冰乙酸 ($\delta^{13}\text{C} = -26.41\%$) 十分接近，标准偏差 0.05% ，完全满足重复测定要求 (小于 0.2%)，说明方法再现性很好。

[0059] 2.4 醋中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 测定

[0060] 选择实际醋样品进行测定，44, 45 和 46 离子谱图见图 2。

[0061] 从图 2 可见，食醋样品分析乙酸峰对称均匀，与其他杂峰明显分离，不存在杂峰干扰。

[0062] 2.5 准确性分析

[0063] 2011 年有 8 个国际实验室参与了欧洲联合研究中心 (JRC) 食品稳定同位素实验室间比对项目，8 个实验室的测定结果见表 3：

[0064] 表 3 FIT 国际实验室比对结果

[0065]

实验室编号	测定结果 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Z-Score
D1	-27.22	-3.36
D3	-27.12	-3.06

D2	-25.97	0.43
D8	-25.97	0.43
D9	-25.87	0.73
D5	-25.68	1.31
D6	-25.66	1.37
D4	-25.40	2.16

[0066] 由表 3 可知,编号为 D1、D3 和 D4 的实验室测定结果与其他实验室差异较大,从 Z-Score 看明显离群,可见醋中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定是一个世界性难题。剔除上述三个离散数据后,其余数据的平均值为 -25.83% , $1\sigma = 0.15\%$ 。

[0067] 本文以 FIT-PTS 项目的果醋为试验对象,将其分成 a、b、c 和 d 四份,分别稀释后进行测定,测定结果见表 4:

[0068] 表 4 果醋乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 重复性测定结果

[0069]

样品编号	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	1σ (‰)	n
a	-25.63	0.02	3
b	-25.62	0.02	3
c	-25.70	0.02	3
d	-25.72	0.03	3
平均值	-25.65		
标准偏差 (1σ)	0.06		

[0070] 表 4 数据表明,本文方法测定乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的平均结果为 -25.65% (与 -25.83% 的差异小于 0.2%),并且此次测定值的标准偏差仅为 0.06% 。

[0071] 3 结论

[0072] 本研究建立了基于色谱分离技术快速、简单测定乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的方法,将样品至乙酸浓度 8g/L 左右,直接液体进样并以 GC-C-IRMS 测定乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 。该方法操作简便,消耗样品少,稳定性好,准确性高,便于推广,为应用碳稳定同位素开展果醋真实性鉴别研究、检测奠定了方法基础。

[0073] 最后应当说明的是,以上实施例仅用于说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对发明的

技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围内。

[0074] 参考文献

[0075] [1]GB 18187-2000 酿造食醋.

[0076] [2]SB 10337-2000 配制食醋.

[0077] [3]RYOTA HATTORI, EITA YAMADA, HIROKI SHIBATA, et al. Measurement of the isotope ratio of acetic acid in vinegar by HS-SPME-GC-TC/C-IRMS[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2010, 5(1) :7115-7118.

[0078] [4]YASUHIRO OBA, HIROSHI NARAOKA. Carbon and hydrogen isotope fractionation of acetic acid during degradation by ultraviolet light[J]. Geochemical Journal, 2007, 41 :103-110.

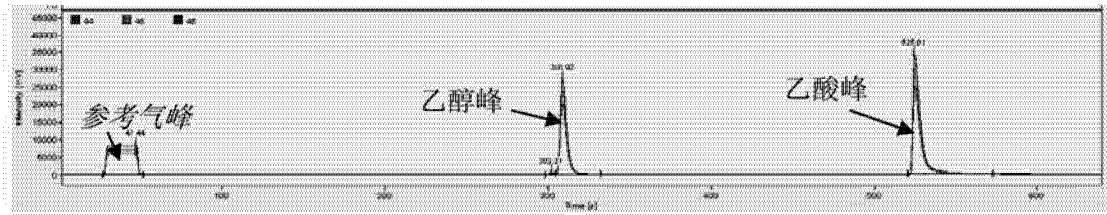


图 1

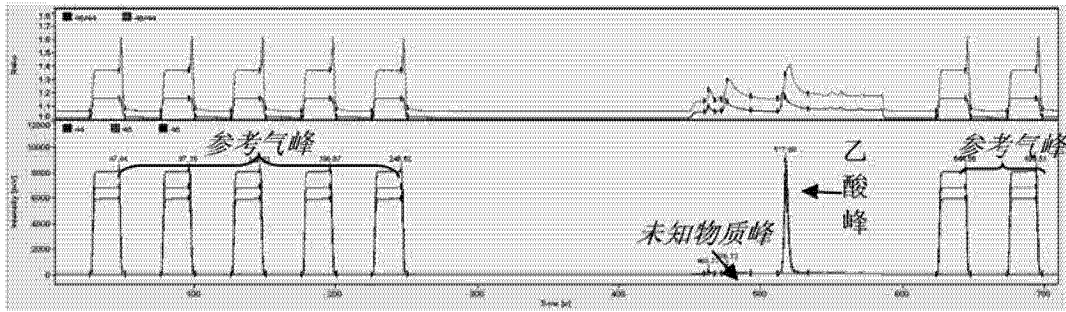


图 2