气相色谱-质谱法测定软木塞中 2 种霉味物质

唐 熙¹, 梁 鸣¹, 李小晶^{1*}, 熊文明², 唐 泓¹, 姜晓黎¹, 陈佳敏¹

(1. 福建出入境检验检疫局技术中心, 福建 福州 350001; 2. 福州大学化学化工学院, 福建 福州 350002)

摘要 :建立了一种简便、快速的可同时测定软木塞中两种霉味物质(2,4- β -三氯苯甲醚(TCA)和2,4- β -三溴苯甲醚(TBA))的气相色谱-质谱联用(GC-MS)方法。软木塞样品采用甲醇超声萃取, *N*-丙基乙二胺(PSA)固相萃取柱净化, 浓缩后采用GC-MS进行分析, 外标法定量。在10~10 000 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度范围内, TCA和TBA均有较好的线性关系, 相关系数(r^2)大于0.99。通过对不同种类的软木塞空白样品进行加标回收率试验和精密度试验考察方法的可行性。结果表明TCA和TBA的回收率介于88.4%与97.6%之间, 相对标准偏差介于1.02%与4.58%之间。TCA和TBA的检出限分别为12 $\mu\text{g/L}$ 和18 $\mu\text{g/L}$, 定量限分别为40 $\mu\text{g/L}$ 和50 $\mu\text{g/L}$ 。本方法适用于市售瓶装葡萄酒软木塞中TCA和TBA的检测。

关键词 :气相色谱-质谱法 2,4- β -三氯苯甲醚 2,4- β -三溴苯甲醚 软木塞

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2012)07-0733-05

Determination of two mouldy compounds in cork by gas chromatography-mass spectrometry

TANG Xi¹, LIANG Ming¹, LI Xiaojing^{1*}, XIONG Wenming²,
TANG Hong¹, JIANG Xiaoli¹, CHEN Jiamin¹

(1. Technology Center of Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China;
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract : A simple and fast method for the simultaneous determination of two mouldy compounds, 2,4- β -trichloroanisole (TCA) and 2,4- β -tribromoanisole (TBA), in cork by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was established. The analytes were extracted by ultrasonic extraction with methanol, and purified then by solid phase extraction using primary secondary amine (PSA) as solid phase. After concentrating, the sample was analyzed by GC-MS and quantified by the external standard method. The linear ranges were from 10 $\mu\text{g/L}$ to 10 000 $\mu\text{g/L}$ for TCA and TBA, the correlation coefficients (r^2) of the calibration curves were above 0.99. The recoveries and the relative standard deviations (RSDs) of TCA and TBA in different kinds of corks were investigated. The recoveries ranged from 88.4% to 97.6% with the RSDs between 1.02% and 4.58% ($n=6$). The limits of detection (LODs) were 12 $\mu\text{g/L}$ for TCA and 18 $\mu\text{g/L}$ for TBA, and the limits of quantification (LOQs) were 40 $\mu\text{g/L}$ for TCA and 50 $\mu\text{g/L}$ for TBA. The method is suitable to the determination of TCA and TBA in corks.

Key words : gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); 2,4- β -trichloroanisole (TCA); 2,4- β -tribromoanisole (TBA); cork

葡萄酒的风味直接影响其品质优劣, 其中霉味最为人所关注, 作为目前世界上葡萄酒应用最普遍、历史最悠久、效果最好的密封材料——软木塞是其霉味产生的根源。据研究, 霉味主要是由2,4- β -三

氯苯甲醚(TCA)引起的^[1]。TCA的形成过程较为复杂, 主要是在软木塞的加工过程中引入的, 大致机理是软木在前处理过程中常加入2,4- β -三氯苯酚作为阻燃剂和杀菌剂。这种物质在后续的漂白过程或

* 通讯联系人: 李小晶, 博士, 高级工程师, 主要从事食品及食品接触材料中有毒有害物质的检测研究。E-mail: lxjciq@hotmail.com.

基金项目: 福建省科技计划重点项目(2011Y0001)和国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2011IK028)。

收稿日期: 2012-03-01

葡萄酒贮存过程中被毛霉、青霉、脉胞菌等消化产生甲基化的代谢物 2,4,6-三氯苯甲醚^[2],在密封过程中逐渐迁移至葡萄酒中。TCA 对感官影响十分明显。据研究,超过 10 ng/L 的 TCA 就会对葡萄酒的风味和品质产生影响^[3],每年约有 5%~10% 的葡萄酒会因此失去原味。最近法国科学家发现一类与 TCA 结构性质相近的化合物 2,4,6-三溴苯甲醚(TBA)亦对葡萄酒的品质产生影响^[4]。其产生机理与 TCA 类似,由作为阻燃剂和杀菌剂的 2,4,6-三溴苯酚^[5]经微生物代谢产生。而且 TBA 对感官的影响比 TCA 更加明显,一般在酒中的含量高于 4 ng/L 即会影响口感^[6]。

目前国内外对 TCA 和 TBA 的检测已有研究,检测手段主要是气相色谱-质谱法(GC-MS)^[7-9]和气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)^[10,11];研究的对象主要为水^[8]等环境样品和酒类样品^[9-12]。前处理主要采用顶空固相微萃取(HS-SPME)^[10,11]和固相萃取搅拌棒(SBME)^[8,12,13]。软木塞属于加工过后的木制品,其性质与环境样品、酒类有很大差异,因此上述前处理方式不适用于软木塞。有报道采用 10%(v/v)的乙醇水溶液浸泡提取软木塞中的 TCA^[7],但此法只能反映特定条件下软木塞中 TCA 的迁移量,无法考察软木塞中残留的 TCA。本文采用超声波提取技术对软木塞样品进行前处理,并利用 *N*-丙基乙二胺(PSA)固相萃取(SPE)柱对中等极性杂质吸附性强的特点对提取液进行净化,减小了基体干扰。将前处理方法结合 GC-MS 应用于软木塞中 TCA 和 TBA 的同时定性确证和定量检测,取得了满意的结果。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Agilent 7890-5975C 气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司);KQ-500DE 超声波发生器(昆山超声仪器有限公司);Turbo Vap® II 自动浓缩工作站(美国 Caliper 公司);SC-8L-150 数控固相萃取仪(广州智真生物科技有限公司);AL204 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);PSA 固相萃取柱(Supelco,6 mL,填料 500 mg);0.45 μm 尼龙有机滤膜(津腾公司);TCA 和 TBA 标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司生产,纯度为 99.5%);甲醇(色谱纯,Merck)。无水亚硫酸钠(650 ℃烘 4 h)。

1.2 混合标准溶液的配制

分别准确称取 25 mg 的 TCA 和 TBA 标准物质,用甲醇溶解,定容至 25 mL,配制成质量浓度为

1 000 mg/L 的混合标准储备溶液,于 4 ℃ 避光保存。在使用前用甲醇将混合标准储备溶液逐级稀释得到所需浓度的混合标准工作溶液。

1.3 样品前处理

取市售瓶装葡萄酒软木塞,洗净晾干,用剪刀剪成 5 mm 大小的颗粒。准确称取 1 g 制好的样品,放入 50 mL 旋口顶空瓶中。用 50 mL 甲醇分两次超声萃取,每次 20 min,合并两次提取液,用自动浓缩工作站浓缩至 5 mL 待净化。

用 5 mL 甲醇活化 PSA 小柱。将提取液转移至已活化的 PSA 小柱,控制流速为每秒 1~2 滴;用 5 mL 甲醇淋洗 PSA 小柱。收集洗脱液,用自动浓缩工作站浓缩至近干,用 2 mL 甲醇溶解残留物,加入 2 g 无水硫酸钠脱水,过 0.45 μm 尼龙有机滤膜,滤液供分析。

1.4 色谱-质谱条件

色谱条件:HP-5MS 石英毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);进样口温度:280 ℃,不分流进样。程序升温:初始柱温 70 ℃,保持 0.5 min;以 10 ℃/min 升温至 200 ℃,保持 2 min;再以 15 ℃/min 升温至 280 ℃,保持 5 min。载气:高纯氦;流速:1.0 mL/min;进样量:1 μL。

质谱条件:电子轰击离子源(EI);电离能量:70 eV;传输线温度:280 ℃;离子源温度:230 ℃;四极杆温度:150 ℃;溶剂延迟时间:3 min;选择离子监测(SIM)模式下对混合标准工作溶液及待测液进行分析,根据保留时间和定性离子进行定性,外标法定量。SIM 参数见表 1。

表 1 TCA 和 TBA 的相对分子质量及 SIM 监测的特征离子
Table 1 Relative molecular masses (M_r) and characteristic ions for TCA and TBA in selected ion monitoring (SIM) mode

Analyte	M_r	Characteristic ion (m/z)	
		Qualitative ion	Quantitative ion
TCA	211	210, 195, 167	195
TBA	345	344, 329, 301	344

TCA:2,4,6-trichloroanisole;TBA:2,4,6-tribromoanisole.

2 结果与讨论

2.1 提取条件的选择

2.1.1 提取溶剂的选择

TCA 和 TBA 易溶于甲醇、乙醇和丙酮。根据这一性质,本文选择甲醇、乙醇、丙酮 3 种溶剂做比较,不同溶剂的提取效果见图 1。结果表明软木塞样品在室温下经 3 种不同溶剂超声萃取 20 min 效果差别不大。但由于天然软木塞在切割完成后,在表面需要涂蜡防护,聚合软木塞加工中需使用黏结

剂,丙酮属于强极性的有机溶剂,能溶解蜡、黏结剂等聚合物,导致萃取液浑浊,不利于净化;甲醇及乙醇的萃取液均澄清,但乙醇的沸点较高,浓缩时间长,综合考虑,选择甲醇作为提取溶剂。

图 1 不同溶剂对软木塞中 TCA 和 TBA 的提取效率
Fig. 1 Extraction efficiencies of TCA and TBA from a cork sample with different solvents

2.1.2 提取方法的选择

文献^[14]对软木塞中的 TCA 采用微波提取(MAE)方式。本文选择了 MAE、索氏萃取(S Soxhlet extraction)、快速加压溶剂萃取(ASE)、超声波萃取(UE)4 种方式对提取效果进行了比较,结果见图 2。结果表明,虽然索氏萃取是最经典的固液萃取方法,但效果却不令人满意,尤其在低浓度时回收率很低。分析原因,主要是 TCA 和 TBA 属于半挥发性化合物,索氏萃取需经历长时间的加热回流,此过程造成了 TCA 和 TBA 的损失。快速加压溶剂萃取在高压条件下进行萃取,由于全程密闭,回收率满意;但是软木有很好的吸湿性,在高压条件下经溶剂浸泡后膨胀严重,造成系统压力过高,操作困难。微波萃取和超声波萃取效率相似,二者相比超声波萃取设备简单、操作简便,且提取过程中

图 2 不同提取方式下软木塞中 TCA 和 TBA 的提取效率
Fig. 2 Extraction efficiencies of TCA and TBA from a cork sample with different methods

MAE : microwave-assisted extraction ; UE : ultrasonic extraction ; ASE : accelerated solvent extraction.

的小幅升温不会造成目标化合物的损失,经两次提取后回收率可达 90% 以上。考虑到简单、便利的原则,我们确定采用超声波对软木塞中的 TCA 和 TBA 进行萃取,分两次萃取,每次 20 min。

2.2 净化条件的选择

采用固相萃取方式对提取液进行净化。软木等木制品中可馏出物主要有酚类、醇类和一些有机酸。根据杂质类型,研究比较了 C18、硅胶、弗罗里硅藻土、PSA 4 种填料的 SPE 柱对木制品馏出物的净化效果。实验表明硅胶、C18、PSA 的净化效果都较满意,弗罗里硅藻土的净化效果较差。在空白样品溶液中添加 50 μg/L TCA 和 TBA 混合标准工作液分别经硅胶、C18、PSA 处理,考察回收率,结果见表 2。

表 2 空白样品溶液中 TCA 和 TBA(50 μg/L)经 C18、硅胶、PSA 固相萃取柱处理后的回收率

Table 2 Recoveries of TCA and TBA (50 μg/L) in a blank sample after adsorbed by C18 , silicon , PSA SPE columns				%
Analyte	C18	Silicon	PSA	
TCA	30.6	10.4	86.4	
TBA	40.3	30.0	89.8	

表 2 结果表明,C18 和硅胶对 TCA 和 TBA 均有一定的吸附,PSA 对 TCA 和 TBA 的吸附作用最弱。综合净化效果和对目标物的吸附情况,选择 PSA 对提取液进行净化。

考虑到目标物残留在 SPE 柱上造成损失,在上样后用适量甲醇淋洗 SPE 柱。考察了不同淋洗体积对回收率的影响,结果见表 3。

表 3 不同甲醇淋洗体积下 TCA 和 TBA 的回收率
Table 3 Recoveries of TCA and TBA with different elution volumes of methanol

Analyte	Spiked level/ (μg/L)	Elution volume/ mL	Recovery/ %
TCA	50	2	81.3
		5	87.6
		10	90.6
	100	2	81.9
		5	93.1
		10	95.3
	1000	2	79.0
		5	95.9
		10	97.7
TBA	50	2	84.5
		5	88.4
		10	89.7
	100	2	79.1
		5	90.8
		10	91.4
	1000	2	80.5
		5	95.3
		10	94.4

结果表明,用 5~10 mL 甲醇淋洗 SPE 柱,回收率令人满意。综合考虑,我们在上样后用 5 mL 甲醇淋洗 SPE 柱。

2.3 TCA 和 TBA 的测定

TCA 和 TBA 可采用 GC-MS、GC-MS/MS 和气相色谱-电子捕获检测法(GC-ECD)^[15] 进行分析。GC-ECD 对含卤素物质有很高的灵敏度,但无法提供目标化合物的结构信息,只能依据保留时间定性,容易出现假阳性样品。GC-MS/MS 仪器昂贵,不利于方法的推广。本文采用 GC-MS 在 SIM 方式下对 TCA 和 TBA 进行分析,既可以达到 10⁻⁹ 级别的灵敏度,又可以根据所选择离子的丰度比进行确证。TCA 和 TBA 的选择离子色谱图见图 3。

2.4 方法的线性关系和检出限

为减少基质干扰,保证定量的准确性,采用基质标准曲线法绘制标准曲线。取经检测不含 TCA 和 TBA 的软木塞作为基质样品,按照 1.3 节所述步骤制成样品处理液,用该样品处理液配成质量浓度分别为 10, 20, 40, 80, 100, 200, 500, 1 000, 3 000, 5 000, 10 000 μg/L 的系列基质标准工作溶液。以待测物定量离子提取色谱峰面积为纵坐标 Y,待测物浓度为横坐标 X 进行线性回归。其线性范围、线性方程和相关系数(r²)见表 4。由表 4 可知, TCA

图 3 TCA 和 TBA 混合标准溶液的 SIM 色谱图
Fig. 3 SIM chromatogram of a mixed standard solution of TCA and TBA

HP-5MS column :5% phenyl polysilphenylene-siloxane ,30 m ×0.25 mm ×0.25 μm ;injection mode :splitless ;injector temperature :280 ℃ ;oven temperature :70 ℃ (hold for 0.5 min) , at 10 ℃/min to 200 ℃ (hold for 2 min) , then at 15 ℃/min to 280 ℃ (hold for 5 min) ; carrier gas : He ; flow rate :1.0 mL/min.

和 TBA 在 10~10 000 μg/L 范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.99。

采用在空白基质中添加待测物的方法,按照定量离子提取色谱峰的信噪比(S/N)等于 3 确定检出限(LOD), S/N = 10 确定定量限(LOQ), TCA 和 TBA 的 LOD 和 LOQ 见表 4。

表 4 TCA 和 TBA 的线性关系、检出限和定量限

Table 4 Linear relationships , limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) for TCA and TBA					
Analyte	Linear range/(μg/L)	Calibration equation	Correlation coefficient (r ²)	LOD/(μg/L)	LOQ/(μg/L)
TCA	10 - 100	Y = 66651X - 42287	0.9978	12	40
	100 - 1000	Y = 64416X - 891.51	0.9999		
	1000 - 10000	Y = 62.98X - 78.668	0.9980		
TBA	10 - 100	Y = 30175X - 26165	0.9928	18	50
	100 - 1000	Y = 30630X - 2518.1	0.9996		
	1000 - 10000	Y = 31.02X - 245.3	0.9943		

Y : peak area ; X : mass concentration , μg/L.

2.5 方法的回收率和精密度

在不含目标化合物的软木塞样品中添加 3 个浓度水平的 TCA 和 TBA 混合标准工作溶液,按上述前处理方法和优化的仪器条件进行回收率试验,每个水平重复 6 次,结果见表 5。

表 5 TCA 和 TBA 的回收率及其相对标准偏差(RSD)(n = 6)

Table 5 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of TCA and TBA (n = 6)			
Analyte	Added/(μg/kg)	Recovery/%	RSD/%
TCA	50	88.4	3.18
	250	96.6	1.28
	500	97.6	1.17
TBA	50	89.4	4.58
	250	96.3	1.76
	500	97.1	1.02

2.6 实际样品检测

采用所建立的方法测定了购自本地超市的 25 份不同品牌的瓶装葡萄酒的软木塞样品,检测结果均为阴性。

3 结论

建立了固相萃取-气相色谱-质谱联用法同时测定软木塞中两种霉味物质 TCA 和 TBA 的方法,研究了提取条件、固相萃取条件对检测结果的影响,并进行了方法学评价。结果表明,该法快速、简便,适用于市售瓶装葡萄酒软木塞中 TCA 和 TBA 的测试,为酒类生产企业或消费者了解葡萄酒品质提供了一种新型、灵敏的检测手段。

参考文献：

[1] Prak S , Gunata Z , Guiraud J P , et al. Food Microbiol , 2007 , 24 : 271

[2] Gram L , Ravn L , Rasch M , et al. Int J Food Microbiol , 2002 , 78 : 79

[3] Taylor M K , Young T M , Butzke C E , et al. J Agric Food Chem , 2000 , 48 : 2208

[4] Chatonnet P , Bonnet S , Boutou S , et al. J Agric Food Chem , 2004 , 52 : 1255

[5] Koschier F , Gallo M A , Feng X , et al. Food Chem Toxicol , 2011 , 49 : 2074

[6] Whitfield F B , Hill J L , Shaw K J. J Agric Food Chem , 1997 , 45 : 889

[7] Wei X H , Li Y , Zhang Y , et al. Liquor-Making Science & Technology (卫晓红 , 李燕 , 张燕 , 等. 酿酒科技) , 2010 (4) : 92

[8] Zhang D M , Xu R , Lin X P , et al. China Water & Waste-water (张德明 , 徐荣 , 林细萍 , 等. 中国给水排水) , 2006 , 22(10) : 81

[9] Zapata J , Mateo-Vivaracho L , Cacho J , et al. Anal Chim Acta , 2010 , 660 : 197

[10] Deng X J , Guo D H , Li B , et al. Journal of Instrumental Analysis (邓晓军 , 郭德华 , 李波 , 等. 分析测试学报) , 2008 , 27(12) : 1375

[11] Patil S H , Banerjee K , Utture S C , et al. Food Chem , 2011 , 124 : 1734

[12] Sanvicens N , Moore E J , Guilbault G G , et al. J Agric Food Chem , 2006 , 54 : 9176

[13] Jonsson S , Uusitalo T , van Bavel B , et al. J Chromatogr A , 2006 , 1111 : 71

[14] Vestner J , Fritsch S , Rauhut D. Anal Chim Acta , 2010 , 660 : 76

[15] Riu M , Mestres M , Busto O , et al. J Chromatogr A , 2002 , 977 : 1