

全自动葡萄酒成分分析仪测定葡萄酒中柠檬酸

徐淑飞^{1*}, 贺丽娜¹, 王兰花², 闫宗鹏¹

(1. 蓬莱出入境检验检疫局, 蓬莱 265600; 2. 济南大学泉城学院, 蓬莱 265600)

摘要: **目的** 建立全自动葡萄酒成分分析仪测定葡萄酒中柠檬酸的方法。**方法** 仪器自动完成校准曲线的绘制、样品与试剂的混合、孵育、反应及 340 nm 波长处的比色检测。**结果** 在 0~0.5 g/L 标准溶液浓度范围内, 体系吸光度(Y)与溶液浓度(X)良好的函数关系, 二阶拟合校准方程为: $Y=0.6232X^2-0.6804X-0.00896$, 相关系数为 0.9999, 样品的加标回收率为 94%~104%, 同时与 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》的高效液相色谱法进行了对比, 相对标准偏差小于 3%。**结论** 该法灵敏度高、测定速度快、试剂使用量少, 适用于不同类型葡萄酒中柠檬酸的大批量分析。

关键词: 葡萄酒; 柠檬酸; 酶法

Determination of citric acid in wine by gallery automatic discrete analyzer

XU Shu-Fei^{1*}, HE Li-Na¹, WANG Lan-Hua², YAN Zong-Peng¹

(1. Penglai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Penglai 265600, China; 2. University of Jinan Quancheng College, Penglai 265600, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of citric acid in wine by thermo scientific gallery automatic discrete analyzer. **Methods** Some steps including calibration curve drawing, sample and reagents mixing and incubation, and colorimetric detection of 340 nm wave length were realized automatically by this instrument. **Results** In the concentration range of 0~0.5 g/L, the absorbance (Y) was well related to the concentration (X), the second-order fitting calibration equation was $Y=0.6232X^2-0.6804X-0.00896$, and the correlation coefficient was 0.9999. The standard recovery rates were 94%~104%. Meanwhile, compared with high performance liquid chromatography method from the national standard of China (GB/T 15038-2006 *General analysis method for wine and fruit wine*), the relative standard deviation was less than 3%. **Conclusion** This method has the advantages of high sensitivity, rapid determination speed and less reagent dosage, which can be used for the mass analysis of citric acid in different types of wines.

KEY WORDS: wine; citric acid; enzymic method

1 引言

柠檬酸是食品行业中广泛使用的添加剂, 具有温和爽快的酸味特征^[1-3]。在葡萄酒生产过程中, 常添加适量的

柠檬酸以改善葡萄酒的口感, 然而若过量添加柠檬酸, 不仅会使葡萄酒的口感失调, 还可能对人体产生危害^[4-6], 为此国家制定了严格的柠檬酸添加限量标准。因此, 需要探索准确且灵敏的柠檬酸检测技术, 以保证葡萄酒的质量

*通讯作者: 徐淑飞, 中级工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。E-mail: xushufei1220@126.com

*Corresponding author: XU Shu-Fei, Engineer, Penglai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.175 Beiguan Road, Penglai 265600, China. E-mail: xushufei1220@126.com

安全^[7]。

目前,柠檬酸的检测方法有高效液相色谱法、离子色谱法、毛细管电泳法及傅里叶变换红外光谱法等^[8-11],每种方法都有各自的优缺点和适应范围。国家标准 GB/T 15038-2006 中柠檬酸的检测,采用的是高效液相色谱法^[12],该法虽然灵敏度较高,但样品前处理繁琐,目标峰易受到糖类、醇类及有机酸的干扰,易造成色谱柱的寿命缩短。近几年,多篇文献报道对国标高效液相色谱法的改进,通过前处理使用活性炭固相萃取柱来消除了上机干扰^[1,2],但也增加了检测成本。目前,已有报道使用全自动葡萄酒成分分析仪测定葡萄酒中总糖、还原糖及总二氧化硫^[13-15],但用其测定葡萄酒中柠檬酸尚未有报道。Thermo 公司的全自动葡萄酒成分分析仪,通过自动把样品与试剂混合孵育后,在 340 nm 波长处比色检测,检测效率高,适合大样本量的检测。本文利用该仪器建立了测定葡萄酒中柠檬酸含量的方法,并与国标高效液相色谱法进行比对,为葡萄酒中柠檬酸的自动化检测提供实验依据,并对该方法的推广应用具有重要意义。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

Gallery 全自动葡萄酒成分快速分析仪(美国赛默飞世尔科技公司); 613-UF-70 纯水/超纯水系统、CPA225D 电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); 容量瓶(100 mL, 德国 Witeg 公司)。

柠檬酸(纯度>99.5%, 美国 Supelco 试剂); 柠檬酸试剂盒(内含 BUF A、BUF B、Lyo A、Lyo B 试剂,使用前将 BUF A 与 Lyo A 混合制成 R₁ 试剂,将 BUF B 与 Lyo B 混合制成 R₂ 试剂,美国赛默飞世尔科技公司); 磷酸、磷酸二氢钾、氢氧化钠(优级纯,科密欧有限公司)。葡萄酒样品由市场购买(包括 6 种干红,4 种干白)。

2.2 实验方法

2.2.1 国标法

GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》中柠檬酸检测的高效液相色谱法^[12]。

2.2.2 全自动葡萄酒成分分析仪法

(1) 实验原理

葡萄酒中的柠檬酸在柠檬酸裂解酶(citrate lyase, CL)的作用下水解为草酰乙酸和醋酸盐,其中草酰乙酸及其脱羧产物丙酮酸,在 L-苹果酸脱氢酶(L-malate dehydrogenase, L-MDH)和 L-乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase, L-LDH)的作用下,使得还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH),转化为氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺),可通过测定 340 nm 波长处 NADH 的

吸光度,确定其消耗量,计算出样品中柠檬酸的浓度,具体反应过程见图 1:

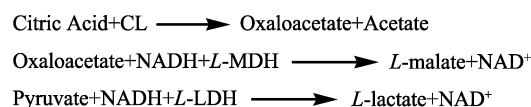


图 1 葡萄酒中柠檬酸反应机制

Fig. 1 Reaction mechanism of citric acid in wine

(2) 测定过程

仪器预热稳定后,在软件上编辑柠檬酸的检测参数。具体参数为:吸取 R₁ 试剂 200 μL,样品 5 μL,孵育 180 s,吸取 R₂ 试剂 20 μL,孵育 300 s,检测波长 340 nm。取适量 0.5 g/L 的柠檬酸标准溶液、超纯水及酒样分别置于比色杯中,仪器按照编辑的检测参数,自动完成校准曲线的绘制、样品的检测及数据处理。

3 结果与分析

3.1 全自动葡萄酒成分分析仪法测定葡萄酒中的柠檬酸

3.1.1 校准曲线

仪器按照校准程序,绘制出浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.5 g/L 的柠檬酸标准溶液的校准曲线(见图 2),体系吸光度(Y)与溶液浓度(X)二阶拟合校准方程为: $Y=0.6232X^2-0.6804X-0.00896$,相关系数为 0.9999,能用于柠檬酸的定量分析。

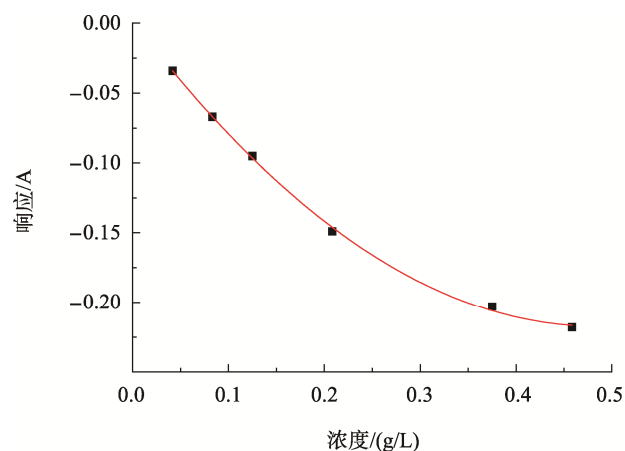


图 2 葡萄酒中柠檬酸校准曲线图

Fig. 2 Standard curve of citric acid in wine

3.1.2 精密度

取柠檬酸含量不同的葡萄酒样品 4 份,每份样品平行测定 6 次,测得结果的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 1.70%、2.25%、1.29%及 1.17%,具体结果见表 1,结果表明该方法能够满足实验室样本检测结果的可靠性和稳定性要求。

表 1 精密度结果(n=6)
Table 1 Result of precision (n=6)

项目	样品	1	2	3	4	5	6	RSD/%
柠檬酸 /(mg/L)	干红 1	128	132	129	134	127	130	1.70
	干红 2	62	63	60	63	59	61	2.25
	干白 1	430	434	429	437	445	427	1.29
	干白 2	507	522	511	524	509	518	1.17

3.1.3 回收率

取柠檬酸含量不同的葡萄酒样品 10 份, 依次向每份样品中加入柠檬酸标液, 添加浓度水平为 100 mg/L, 具体数据见表 2。结果表明, 所有样品的加标回收率介于 94%~104%之间, 说明该方法能准确测定样品中的柠檬酸含量, 可用于日常检测。

表 2 不同类型葡萄酒柠檬酸的加标回收率(n=10)
Table 2 Recovery of citric acid in different type of wine at spiked levels (n=10)

样品	原始浓度 /(mg/L)	加入浓度 /(mg/L)	测得浓度 /(mg/L)	回收率 /%
干红 1	130	100	234	104.0
干红 2	61	100	159	98.0
干红 3	256	100	351	95.0
干红 4	178	100	272	94.0
干红 5	355	100	453	98.0
干红 6	401	100	503	102.0
干白 1	434	100	532	98.0
干白 2	515	100	610	95.0
干白 3	482	100	579	97.0
干白 4	615	100	716	101.0

3.2 全自动葡萄酒成分分析法与国标高效液相色谱法的比较

取柠檬酸含量不同的葡萄酒样品 10 份, 采用全自动葡萄酒成分分析法和国标高效液相色谱法分别测定柠檬酸含量, 2 种方法测得结果的相对标准偏差处于 0.55%~2.36%之间, 符合理化分析标准的质量控制要求^[16], 详细数据见表 3。通过结果比较发现, 分析仪的数据要略高于高效液相色谱法, 主要由于分析仪检测过程中, 在比色时易受葡萄酒中颜色的干扰, 并且干红葡萄酒要比干白葡萄酒的干扰更强。

4 结 论

全自动葡萄酒成分分析仪检测葡萄酒中柠檬酸, 实现了上机测试及数据处理的自动化, 且该仪器操作简单,

表 3 2 种方法测定不同类型葡萄酒中柠檬酸的结果对比(n=10)
Table 3 Comparison of the determination results for citric acid by two methods (n=10)

样品	全自动葡萄酒分析法 /(mg/L)	高效液相色谱法 /(mg/L)	RSD/%
干红 1	130	126	2.21
干红 2	61	59	2.36
干红 3	256	250	1.68
干红 4	178	173	2.01
干红 5	355	347	1.61
干红 6	401	392	1.61
干白 1	434	430	0.65
干白 2	515	511	0.55
干白 3	482	475	1.03
干白 4	615	609	0.69

容易维护, 能满足大规模样品的快速检测^[15]; 该检测技术无需样品前处理, 试剂配制过程简单, 标准溶液实现自动稀释, 可节省人力物力, 节约成本; 该法灵敏度高, 与国标高效液相色谱法测定结果的相对标准偏差小于 3%, 满足理化分析标准的质量控制要求。

参考文献

[1] 何军风. 高效液相色谱法检测葡萄酒中柠檬酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(10): 2512–2515.
He JF. Determination of citric acid in wine by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(10): 2512–2515.

[2] 张延超, 刘帅, 王春天. 高效液相色谱法测定葡萄酒中的柠檬酸[J]. 农业科技与信息, 2017, (16): 31–33.
Zhang YC, Liu S, Wang CT. Determination of citric acid in wine by high performance liquid chromatography [J]. Inf Agric Sci Technol, 2017, (16): 31–33.

[3] 周海波, 陈林, 闫永利. 离子色谱-质谱联用(IC/MS)法检测葡萄酒样品中的柠檬酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(6): 1835–1840.
Zhou HB, Chen L, Yan YL. Determination of citric acid in wine samples by ion chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (IC/MS) [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(6): 1835–1840.

[4] 张燕, 闫磊, 戴洋洋, 等. 葡萄酒中柠檬酸的液相色谱检测[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(6): 125–127.
Zhang Y, Yan L, Dai YY, et al. Wine of citric acid by liquid

- chromatography detection method [J]. Food Res Dev, 2012, 33(6): 125–127.
- [5] 孙倩倩, 姜子涛, 李荣, 等. 钛胶反相高效液相色谱法测定饮料中的柠檬酸[J]. 中国酿造, 2012, 34(7): 151–155.
- Sun QQ, Jiang ZT, Li R, *et al.* Titania based reverse phase high performance liquid chromatographic method for determination of citric acid in beverage [J]. China Brew, 2012, 34(7): 151–155.
- [6] 杨春霞, 苟春林, 单巧玲, 等. 葡萄酒酿造过程中有机酸变化规律研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(4): 83–86.
- Yang CX, Gou CL, Shan QL, *et al.* Organic acids variation in wine brewing process [J]. China Brew, 2017, 36(4): 83–86.
- [7] 黄伟, 杨悠悠, 苗雨田, 等. 二维高效液相色谱法测定葡萄酒样品中的柠檬酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2285–2289.
- Huang W, Yang YY, Miao YT, *et al.* Determination of citric acid in wine by two-dimensional high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(6): 2285–2289.
- [8] 刘怡君, 曲宝成, 边海涛, 等. 高效液相色谱法高通量筛查葡萄酒中添加剂研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(22): 158–161.
- Liu YJ, Qu BC, Bian HT, *et al.* High performance liquid chromatography high-throughput screening for additive research in wine [J]. Food Res Dev, 2016, 37(22): 158–161.
- [9] 宋卫得, 李兆杰, 刘冰涛, 等. 离子色谱法同时测定葡萄酒中 26 种有机酸和阴离子[J]. 酿酒科技, 2018, (4): 106–111.
- Song WD, Li ZJ, Liu BT, *et al.* Simultaneous determination of 26 organic acids and anions in grape wine by ion chromatography [J]. Brew Technol, 2018, (4): 106–111.
- [10] 李永库, 刘衣男, 吕琳琳, 等. 毛细管电泳-质谱联用法测定葡萄酒中 8 种有机酸含量[J]. 质谱学报, 2013, 34(5): 288–293.
- Li YK, Liu YN, Lv LL, *et al.* Simultaneous determination of eight organic acids in grape wines by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Chin Mass Spectr Soc, 2013, 34(5): 288–293.
- [11] Regmi U, Palma M, Barroso CG, *et al.* Direct determination of organic acids in wine and wine-derived products by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometric techniques [J]. Anal Chim Acta, 2012, 732(30): 137–144.
- [12] GB/T 15038-2006 葡萄酒、果酒通用分析方法[S].
- GB/T 15038-2006 Analytical methods of wine and fruit wine [S].
- [13] 高红波, 杨艳娥, 钟其顶, 等. 己糖激酶法测定葡萄酒中葡萄糖的含量[J]. 酿酒科技, 2010, (12): 84–86.
- Gao HB, Yang YE, Zhong QD, *et al.* Determination of glucose content in grape wine by hexokinase [J]. Liquor-Mak Sci Technol, 2010, (12): 84–86.
- [14] 杨艳娥, 高红波, 钟其顶, 等. 己糖激酶-磷酸葡萄糖异构酶法测定葡萄酒中还原糖的含量[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2011, 32(4): 47–49.
- Yang YE, Gao HB, Zhong QD, *et al.* Enzymatic determination of reducing sugar in wine with automatic discrete analyzer [J]. J Cap Norm Univ (Nat Sci Ed), 2011, 32(4): 47–49.
- [15] 徐淑飞, 贺丽娜, 王兰花, 等. 全自动葡萄酒成分分析仪快速测定葡萄酒中总糖[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4208–4211.
- Xu SF, Hi N, Wang LH, *et al.* Determination of total sugar in wine by gallery automatic discrete analyzer [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8 (11): 4208–4211.
- [16] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范: 食品理化检测[S].
- GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories: Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介



徐淑飞, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: xushufei1220@126.com