



# 使用顶空-固相微萃取和气相色谱/三重四极杆质谱高效分析葡萄酒中亚 ng/L 级的卤代苯甲醚

## 应用简报

食品

### 作者

Anna K. Hjelmeland、Thomas S. Collins、  
Alyson E. Mitchell 和 Susan E. Ebeler  
葡萄栽培和酿酒系，食品科学与技术学院，  
农业与环境化学研究组和食品安全与计量  
设备  
加州大学  
加利福尼亚州戴维斯市  
美国

Joshua L. Miles  
Treasury Wine Estates  
600 Airpark Road  
加利福尼亚州纳帕  
美国

Philip L. Wylie  
安捷伦科技公司  
2850 Centerville Road  
特拉华州威尔明顿  
美国

### 摘要

卤代苯甲醚污染会导致软木塞变质，从而使受影响的葡萄酒散发出一种霉味。每年，软木塞污染都会使葡萄酒及其相关行业遭受重大的经济损失。本研究将顶空-固相微萃取 (HS-SPME) 与 Agilent 7890A 气相色谱和 Agilent 7000B 三重四极杆质谱联用，对葡萄酒进行测定得到定量限 (LOQ)，其中 TCA 为 0.5 ng/L。TeCA、TBA 和 PCA 的  $LOQ \leq 1.0$  ng/L。这些定量限均低于卤代苯甲醚在葡萄酒中的感觉阈值水平。本方法实现了完全自动化，仅需添加内标即可完成方法，萃取时间为 10 min，具有较高的分析通量。

## 前言

即使在痕量水平下，卤代苯甲醚（例如 2,4,6-三氯苯甲醚 (TCA)、2,3,4,6-四氯苯甲醚 (TeCA)、2,3,4,5,6-五氯苯甲醚 (PCA) 和 2,4,6-三溴苯甲醚 (TBA)）仍会使很多食品和饮料散发一种发霉的气味。在葡萄酒中，这种污染通常被称为软木塞污染，市场上大约有 1% - 5% 的葡萄酒会受此影响，从而使经济遭受巨大的损失。尽管有时会涉及到橡木桶和酒庄其他相关来源，但葡萄酒中卤代苯甲醚污染的来源仍以受污染的软木塞为主。

卤代苯甲醚具有低至 ng/L 范围的感觉阈值（葡萄酒中的 TCA 约为 3 ng/L），因此需要一种高灵敏度、高特异性的分析方法来确定分析葡萄酒中的卤代苯甲醚。大多数酒庄和软木塞供应商已建立了详细的质量控制分析程序，包括整个加工和储存过程中对软木堆和葡萄酒样品中卤代苯甲醚浓度进行的常规监测，因此需要一种高通量的分析方法。

很多卤代苯甲醚都通过 HS-SPME 方法进行分析，但因其萃取时间通常大于 20 min，极大限制了生产环境中的分析速度。另外，很多方法都未使用稳定的同位素内标来保证定量分析的准确性。由于串联质谱 (MS/MS) 对目标分析物具有低检测限 (LOD)（高灵敏度）和高选择性，因此常被用于葡萄酒成分的目标分析。本应用简报将介绍一种已发布的方法，使用 HS-SPME 和稳定的同位素内标在 Agilent 7890A 气相色谱仪和 Agilent 7000B 三重四极杆气质联用系统上对卤代苯甲醚进行快速、准确且高重现性的 MS/MS 分析。最终得到的 TCA、TeCA、PCA 和 TBA 的检测限和定量限均  $\leq 1$  ng/L [1]。

## 实验部分

### 标准品和试剂

按照现有文献所述 [1]，对卤代苯甲醚标准品进行采购并制备储备液。同时还按照现有文献准备了模拟葡萄酒，用于进行初步评估和校准样品的制备。

从当地购得 5 种市售葡萄酒（2 种红葡萄酒和 3 种白葡萄酒），用于回收实验。另外，还从当地检测实验室获得了 5 种消费者投诉有发霉气味的受污染葡萄酒 [1]。

## 仪器

利用 Agilent 7890A 气相色谱仪与 Agilent 7000B 三重四极杆气质联用系统相结合，并在气相色谱仪的进样口处安装 SPME 进样衬管，进行方法开发。将一台 Gerstel MPS2 自动进样器安装在 7890A 气相色谱仪上便于进行顶空萃取。表 1 列出了 GC/MS/MS 仪器运行条件。

表 1. 气相色谱及质谱条件

| 气相色谱条件  |   |
|---------|---|
| 分析柱     | 30 m × 0.25 mm, 0.25 $\mu$ m DB-5 (部件号 122-5032)              |
| 进样口     | 不分流, 配置 SPME 进样口衬管  |
| 进样      | 不分流; 1.2 min 后打开分流阀, 流速 50 mL/min 保持 3 min, 然后将流速改为 20 mL/min |
| 载气      | 氮气, 恒流, 1.2 mL/min  |
| 柱温箱温控程序 | 在 40 °C 下保持 0 min<br>以 30 °C/min 升至 280 °C<br>保持 3 min        |
| 传输线温度   | 280 °C  |
| 质谱运行条件  |   |
| 溶剂延迟    | 5 min   |
| EMV 增益  | 15  |
| 采集参数    | EI, 多反应监测模式 (MRM)   |
| 扫描宽度    | $\pm 1.2$ m/z   |
| 淬灭气体    | 氮气, 2.25 mL/min   |
| 碰撞气体    | 氮气, 1.5 mL/min  |

## 样品前处理

将 10 mL 葡萄酒样品装入 20 mL 琥珀色玻璃样品瓶中，再加入 50  $\mu$ L 内标储备液。样品中内标物的最终浓度分别为 5.0 ng/L [ $^2\text{H}_5$ ] TCA 和 [ $^{13}\text{C}_6$ ] PCA, 10 ng/L [ $^2\text{H}_5$ ] TBA。萃取前，先将样品在 40 °C 下以 500 rpm 的速度搅拌 5 min。然后将 100  $\mu$ m 预老化的 PDMS SPME 纤维头迅速插入顶空瓶中，在 250 rpm 下搅拌 10 min，对样品进行萃取。之后将纤维头在 280 °C 条件下在气相色谱仪进样口处进行热解吸，解吸时间与整个柱箱循环时间 (11 min) 一致，以防止样品间残留污染。为了防止污染和样品损失，纤维头将始终置于色谱进样口处或者样品瓶中。对所有样品进行三次重复分析。

## 分析参数

表 2 列出四种卤代苯甲醚的分析参数。

表 2. 分析参数

| 分析物/内标                                 | 保留时间 (min) | 离子对 ( <i>m/z</i> ) | 碰撞能量 (V) |
|--|------------|--------------------|----------|
| 三氯苯甲醚 (TCA)                            | 5.21       | 210 → 195*         | 10       |
|  |            | 212 → 197†         | 10       |
| [ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ] 三氯苯甲醚  | 5.20       | 215 → 197          | 10       |
|  |            | 217 → 199          | 10       |
| 四氯苯甲醚 (TeCA)                           | 6.10       | 246 → 203          | 25       |
|  |            | 231 → 203          | 15       |
| 三溴苯甲醚 (TBA)                            | 6.50       | 344 → 329          | 10       |
|  |            | 346 → 331          | 10       |
| [ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ] 三溴苯甲醚  | 6.48       | 351 → 333          | 15       |
|  |            | 349 → 331          | 15       |
| 五氯苯甲醚 (PCA)                            | 6.91       | 265 → 237          | 10       |
|  |            | 280 → 237          | 25       |
| [ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ] 五氯苯甲醚 | 6.91       | 286 → 242          | 25       |
|  |            | 286 → 271          | 10       |

\* 在上表列出的所有离子对中，第一个为定量离子对

† 在上表列出的所有离子对中，第二个为定性离子对

来源: Hjelmeland 等人 [1]

## 结果与讨论

### 线性、LOD 和 LOQ

表 3 中的结果显示了模拟葡萄酒基质中每种卤代苯甲醚获得的线性响应。所得的各化合物的 LOD 和 LOQ 均比各自的感觉阈值低很多。在这种分析条件下，挥发性最弱的分析物 TBA 所测得的 LOD 和 LOQ 最高。本方法通过缩短萃取时间在最优灵敏度和高分析通量之间实现了权衡。本研究测得的 LOD 和 LOQ 均低于早期出版的 HS-SPME 法分析水、葡萄酒以及软木萃取液中卤代苯甲醚的研究结果。这些早期研究也采用 HS-SPME 方法，萃取时间 ≥ 25 min，同时使用单四极杆选择离子监测 (SIM)。

表 3. 卤代苯甲醚校准曲线以及通过模拟葡萄酒测得的线性、LOD 与 LOQ

| 分析物  | 标准曲线范围 (ng/L) | 相关系数 (R) | LOQ (ng/L) | LOD (ng/L) | 阈值* (ng/L) |
|------|---------------|----------|------------|------------|------------|
| TCA  | 0.10–50       | 0.9992   | 0.50       | 0.10       | 3.0        |
| TeCA | 0.10–50       | 0.9997   | 0.10       | < 0.10†    | 15         |
| PCA  | 0.10–50       | 0.9996   | 0.25       | 0.10       | 3.0        |
| TBA  | 0.50–50       | 0.9991   | 1.0        | 0.50       | 10000      |

\* 葡萄酒中的感觉阈值

† 未分析浓度小于 0.10 ng/L 的标准品

来源: Hjelmeland 等人 [1]

### 回收率和重现性

使用我们的研究方法测定红葡萄酒和白葡萄酒基质中卤代苯甲醚的回收率在 90% - 110% 之间，多数样本的相对标准偏差 (% RSD) 小于 10% (表 4)。已有文献对类似数据进行过报道 [2,4]。据报道，基质干扰会限制亚 ng/L 级成分的检测，我们的串联质谱方法与 HS-SPME 相结合，在葡萄酒的分析中未出现基质干扰。当背景水平可被观察到时，根据离子丰度比可以确认卤代苯甲醚是否为污染源。在商用葡萄酒中检测到低浓度卤代苯甲醚并不意外，因为要彻底消除空气、水和玻璃器皿中的卤代苯甲醚污染是非常困难的。还需要对分析系统中的元器件污染进行监测。例如，使用高浓度校准溶液后，必须对系统内的塑料元件进行清洗，分析浓度超过 100 ng/L 的溶液后，应当将色谱柱前段 (约 2.5 cm 处) 切割掉，以防止残留 [1]。

表 4. 葡萄酒中卤代苯甲醚的加标回收率和重现性

| 分析物  | 葡萄酒                | 测定值        |           |            | 加标回收率 (%) | RSD (%) |
|------|--------------------|------------|-----------|------------|-----------|---------|
|      |                    | 加标量 (ng/L) | 空白 (ng/L) | 加标后 (ng/L) |           |         |
| TCA  | Petite syrah       | 1.0        | nd*       | 0.94       | 94        | 2.5     |
|      |                    | 5.0        |           | 4.7        | 94        | 4.7     |
|      | Sauvignon blanc    | 1.0        | nd        | 0.93       | 93        | 11      |
|      |                    | 5.0        |           | 4.8        | 97        | 2.2     |
|      | Gewürztraminer     | 1.0        | < LOQ     | 1.0        | 97        | 17      |
|      |                    | 5.0        |           | 5.0        | 99        | 4.8     |
|      | Riesling           | 1.0        | nd        | 1.0        | 103       | 9.1     |
|      |                    | 5.0        |           | 4.9        | 98        | 5.5     |
|      | Cabernet sauvignon | 1.0        | nd        | 1.1        | 106       | 6.1     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.1        | 102       | 1.3     |
| TeCA | Petite syrah       | 1.0        | 0.7       | 1.1        | 109       | 13      |
|      |                    | 5.0        |           | 5.5        | 110       | 4.2     |
|      | Sauvignon blanc    | 1.0        | nd        | 1.0        | 98        | 3.7     |
|      |                    | 5.0        |           | 4.6        | 91        | 2.8     |
|      | Gewürztraminer     | 1.0        | nd        | 1.0        | 103       | 5.5     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.2        | 104       | 9.9     |
|      | Riesling           | 1.0        | nd        | 1.0        | 100       | 4.1     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.2        | 104       | 3.3     |
|      | Cabernet sauvignon | 1.0        | nd        | 1.0        | 102       | 2.0     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.4        | 108       | 1.3     |
| PCA  | Petite syrah       | 1.0        | nd        | 1.0        | 96        | 9.0     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.1        | 103       | 3.6     |
|      | Sauvignon blanc    | 1.0        | nd        | 1.0        | 105       | 8.9     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.2        | 103       | 3.2     |
|      | Gewürztraminer     | 1.0        | nd        | 1.0        | 105       | 2.7     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.3        | 106       | 2.6     |
|      | Riesling           | 1.0        | nd        | 1.1        | 108       | 1.9     |
|      |                    | 5.0        |           | 4.8        | 97        | 2.2     |
|      | Cabernet sauvignon | 1.0        | nd        | 1.1        | 109       | 6.0     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.3        | 107       | 4.7     |
| TBA  | Petite syrah       | 1.0        | nd        | 1.1        | 109       | 15      |
|      |                    | 5.0        |           | 5.3        | 107       | 9.7     |
|      | Sauvignon blanc    | 1.0        | nd        | 1.0        | 104       | 11      |
|      |                    | 5.0        |           | 5.1        | 102       | 4.1     |
|      | Gewürztraminer     | 1.0        | nd        | 1.0        | 103       | 3.2     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.1        | 102       | 2.3     |
|      | Riesling           | 1.0        | nd        | 1.0        | 104       | 9.7     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.3        | 106       | 0.4     |
|      | Cabernet sauvignon | 1.0        | nd        | 1.1        | 106       | 7.7     |
|      |                    | 5.0        |           | 5.0        | 101       | 7.3     |

\* 未检出, 低于 LOD

来源: Hjelmeland 等人 [1]

## 受污染葡萄酒分析

对消费者投诉的受污染葡萄酒进行分析，结果表明 TCA 是检测到的最主要的卤代苯甲醚，其浓度水平接近或者超过报告的感觉阈值（表 5，图 1）。其他种类的卤代苯甲醚未被检出，或者检出浓度比 TCA 低 10 倍左右。

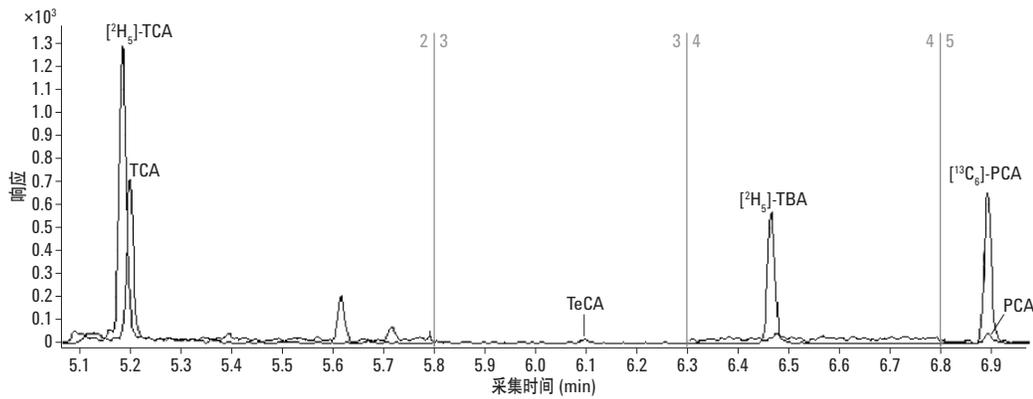


图 1. 消费者所投诉的葡萄酒 A 的色谱图（表 6）。TCA 的计算值为 2.3 ng/L，来源：Hjelmeland 等人 [1]

表 5. 三种受污染葡萄酒中卤代苯甲醚的浓度

| 分析物  | 测得浓度 (ng/L) 和 (%RSD) |            |            |
|------|----------------------|------------|------------|
|      | 葡萄酒 A                | 葡萄酒 B      | 葡萄酒 C      |
| TCA  | 2.3 (4.5)            | 9.9 (3.4)  | 6.8 (5.6)  |
| TeCA | 0.18 (6.9)           | 0.16 (0.7) | 0.17 (3.5) |
| PCA  | 0.41 (18)            | nd*        | 0.26 (9.0) |
| TBA  | nd*                  | 0.65 (1.8) | 0.73 (1.8) |

† 来自商业实验室

\* 未检出，低于 LOD

来源：Hjelmeland 等人 [1]

## 结论

使用 HS-HPME 和 Agilent 7000B 三重四极杆质谱开发了一种能快速、高通量分析葡萄酒中 TCA、TeCA、PCA 和 TBA 的方法。TCA、TeCA 和 PCA 的 LOD 和 LOQ 均低于 1 ng/L，TBA 的 LOD 和 LOQ  $\leq 1$  ng/L。这些浓度均低于报告的感觉阈值，这对于葡萄酒生产的全程监测具有重要作用，可确保生产和储存过程中不会引入污染源导致葡萄酒产生霉味。方法优化后，HS-SPME 的萃取时间共计 15 min，其中包括 5 min 的预搅拌时间。气相色谱分析时间为 11 min。

## 参考文献

1. A. K. Hjelmeland, T. S. Collins, J. L. Miles, P. L. Wylie, A. E. Mitchell, S. E. Ebeler. "Determination of 2,4,6-Trichloroanisole and 2,4,6-Tribromoanisole in Wine Using Microextraction in Packed Syringe and Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Am. J. Enol. Viticult.* **63**, 494-499 (2012).
2. T.J. Evans, C.E. Butzke, S.E. Ebeler. "Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry." *J. Chromatogr., A* **786**, 293-298 (1997).
3. C. Fischer and U. Fischer. "Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction." *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1995-1997. (1997).
4. T.S. Collins, A. Hjelmeland, and S.E. Ebeler. "Analysis of haloanisoles in corks and wines." In *Recent Advances in Analysis of Food and Flavors*. S. Toth and C.J. Mussinan (eds.), pp. 1091-1097. *Am. Chemical Society*, Washington, DC. (2012).

## 更多信息

这些数据仅代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013  
2013 年 12 月 31 日，中国印刷  
5991-3812CHCN



**Agilent Technologies**