

酒中微量氰化物的测定方法研究

张文德 张光仲 郭 忠 孙仕萍 强力新
(唐山市卫生防疫站,河北 唐山 063000)

摘 要:目的 探讨国标法 GB/T 5009. 48 异烟酸 - 吡唑啉酮测定酒中氰化物产生浑浊的原因及其干扰因素,并对方法进行改进。方法 在 pH7. 0 磷酸盐缓冲溶液中,氯胺 T 将氰化物氧化生成氯化氰,然后以十二烷基硫酸钠(SLS)作增溶剂,在胶束条件下与异烟酸 - 吡唑啉酮反应生成蓝色染料。结果 方法产生浑浊的原因主要是酒中乳酸乙酯成分所致。在 2. 5 g/L SLS 胶束条件下,成功地消除了浑浊及基质成分乙醇的影响,并对方法产生增溶、增敏、增稳作用。CN⁻ 的线性范围为 0~0. 3 mg/L,相关系数 $r = 0. 999\ 5$,最低检出浓度为 0. 03 mg/L,表观摩尔吸光系数(ϵ)达 $1. 26 \times 10^5\ \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。回收率为 82. 0 %~104. 0 %,RSD 为 0. 5 %~4. 9 %,与吡啶 - 巴比妥酸法比较,结果差异无显著性。结论 改进后的国标法用于酒中氰化物的测定,抗干扰力强、稳定性好、灵敏度高、准确度高。
关键词:酒精性饮料;氰化物;分光光度法

Study on the determination of cyanide in wine
Zhang Wende , et al.

(Health and Anti-epidemic Station of Tangshan Municipal , Hebei Tangshan 063000 ,China)

Abstract : Objective To report an improved technique for determination of cyanide in wine by national standard method (GB/T 5009. 48 Isonicotinic acid-pyrazolone spectrophotometric method) and discuss the affecting factors causing turbidity and other interference factors in the matrix of the sample. **Methods** After the cyanide was oxidized into cyanogen chloride by chloramine-T in a pH 7. 0 phosphate buffer solution ,the cyanogen chloride reacted with isonicotinic acid-pyrazolone under micellar condition , forming a blue colored micellar dye. In this reaction ,sodium lauryl sulfate was used as the solubilizing agent. **Results** The turbidity was due to the existence of ethyl lactate in wine , this turbidity and other interference factors in the matrix of the sample were successfully removed in the micellar condition. The detectable range ,minimum detectable concentration , correlation coefficients were 0~0. 3 mg/L ,0. 03 mg/L and 0. 999 5 , respectively , the apparent molar absorptivity was $1. 26 \times 10^5\ \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, the recovery rate and relative standard deviation (RSD) were 82. 0 %~104. 4 % and 0. 5 %~4. 9 % respectively. These were comparable to those obtained by the pyridine-barbituric acid method. **Conclusion** The improved method behaves with higher sensitivity antiinterference , stability and accuracy than the national standard method and may be applied to the determination of cyanide in wine with satisfactory results.
Key Words : Alcoholic Beverases ; Cyanides ; Spectrophotometry

氰化物是一种有害物质,酒中氰化物主要来源于原料(如木薯、代用品、豆类及其它果核或混入一些野生植物)中含有的氰甙类配糖体在发酵过程中

水解产生(如 HCN 等)。因此,氰化物是酒类的一项重要监测指标。虽然目前市售众多白酒标识其原料多为粮食及谷物类,氰化物含量相对较低,但为了保

基金项目:唐山市科技攻关计划项目(03134601A—16)
作者简介:张文德 男 主任技师

This work was supported by the Science and Technology Plan of Tangshan of Hebei province , China. (03134601A-16)

证饮用酒的安全,加强对这一指标的检测仍具有重要的现实意义。

氰化物的测定方法较多,有异烟酸-吡唑啉酮法、异烟酸-巴比妥酸法、吡啶-巴比妥酸等光度法,顶空气相色谱法,电化学法及容量法等。^[1~4]但作为酒中氰化物的测定,目前美国《AOAC》分析方法采用N,N-二甲基苯胺试纸法。该法需要特殊的通氮蒸馏装置,只作定性,不能定量,而且不适合含二氧化硫的酒样,操作过程中还绝对禁止乙醇产生蒸气,因此,操作条件较为苛刻。我国国标法 GB/T 5009.48 推荐异烟酸-吡唑啉酮分光光度法,^[1]是我国目前的唯一仲裁方法。该法最早是由石井惠一郎提出的,后经改进,广泛应用于水、环境及食品等中,现普遍认为是一种较好的方法。但对于酒来说,本研究对来自全国16个省(市)50份不同品牌的市售白酒和配制酒的调查发现,国标法在测定过程中产生白色浑浊,存在严重干扰问题。为了加强对这一指标的检测能力,当前急需对现行国标方法进行改进,建立与国家食品卫生标准相匹配的标准检验方法。以此为目的,本研究详细探讨了方法产生浑浊的原因,操作中所存在的问题及其他干扰因素,显色反应的最佳试验条件。对国标法进行较大改进,提出了以阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SLS)为增溶剂,在胶束体系下用异烟酸-吡唑啉酮光度法测定酒中氰化物的改进方法。经对大量酒样分析,并与经典方法吡啶-巴比妥酸法对比,得到了令人满意的结果。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 723型可见分光光度计(上海分析仪器厂);ZD-2型pH计(上海第二分析仪器厂);电热恒温水浴锅(±1℃)。

氰化物标准溶液 储备液按 GB/T 5009.48 配制及标定。使用液 将储备液用1 g/L NaOH溶液稀释1.0 μg/mL CN⁻。

50 g/L SLS溶液 称取5.0 g SLS,加10%乙醇溶解至100 mL。

乙酸溶液 1+24。

其它试剂与国标 GB/T 5009.48 方法相同。

1.2 操作步骤

1.2.1 试样的制备 吸取蒸馏酒1.0 mL于10 mL具塞比色管内,加2 g/L NaOH溶液至5 mL,放置10 min。配制酒吸取25.0 mL,按 GB/T 5009.48 步骤进行水蒸气蒸馏。然后取2.0 mL馏出液于10 mL具塞比色管内,加2 g/L NaOH溶液至5 mL。

1.2.2 测定 分别吸取0、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 μg CN⁻标准溶液于10 mL具塞比色管内,加2 g/L NaOH溶液至5 mL。

于试样管及标准管中分别加入1滴10 g/L酚酞指示剂,然后滴加乙酸(1+24)调至溶液红色恰好褪去。加1.5 mL pH7.0磷酸盐缓冲溶液,0.2 mL 10 g/L氯胺T溶液,立即盖塞摇匀,放置3 min。加2.0 mL异烟酸-吡唑啉酮溶液、0.5 mL 50 g/L SLS溶液,加水至刻度,混匀,于30℃水浴中放置30 min。取出,用1 cm比色杯,以试剂空白为参比,波长638 nm处测量吸光度,绘制校正曲线及进行定量。

2 结果与讨论

2.1 浑浊原因的探讨 试验发现,蒸馏酒及配制酒用国标法和异烟酸-巴比妥酸法^[2]测定不仅试样产生白色浑浊的严重干扰,而且试剂空白和氰化物标准系列也存在轻度浑浊问题。目前,有关国标法产生浑浊的原因很少有详细报道,有文献认为是因乙醇与NaOH类反应和磷酸盐与酒中碱土金属离子反应产生浑浊有关。^[3]为了弄清其浑浊的真正原因,首先,依照国标法操作步骤对酒样进行蒸馏前后测定对比试验,结果发现蒸馏前后均产生相同的白色浑浊。由此认为该浑浊不是因磷酸盐与酒中碱土金属离子反应所致,因通常蒸馏酒本身碱土金属离子含量甚微,试样在蒸馏处理过程中碱土金属离子不被蒸出,所以,浑浊的原因很可能与酒中的挥发性成分有关。为了进一步查明原因,我们在查阅了有关酒的成分及勾兑资料^[5]的基础上,对酒中的主要成分进行以下模拟试验。方法:先是将食用酒精(酒精含量在98%以上)用水配成40%酒精溶液作为模拟酒样,然后取1.0 mL于10 mL具塞比色管内,按一定比例加入不同量的酯类香料,加2 g/L NaOH溶液至5 mL,碱解10 min。然后再按国标法进行操作。对浑浊程度进行目视比较和判定。结果见表1。

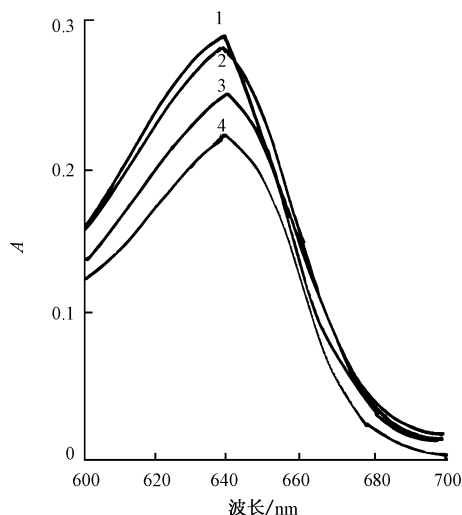
表1 浑浊试验结果

加入物		加 入 量											
40%食用酒精/mL	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
乙酸乙酯/mg	0.0	0.0	44.1	44.1	44.1	44.1	44.1	44.1	44.1	44.1	44.1	44.1	44.1
乳酸乙酯/mg	0.00	0.00	10.38	20.76	31.14	41.52	51.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
己酸乙酯/mg	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.52	17.04	25.56	34.08	42.60
浑浊程度	+	+	>+	++	+++	++++	+++++	+	+	+	+	+	+

注:浑浊程度表示,由轻度浑浊(+)→严重浑浊(+++++)。

表1说明,1) 酒中乳酸乙酯是国标法产生浑浊的主要物质,并随着其浓度的增加而浊度加大。通常在普通白酒中,乙酸乙酯与乳酸乙酯的比例约2:1。表1显示,当两者比例达2:1时,其浊度达“++”,也恰好与实样测定时所出现的浑浊程度相似。2) 表1中第一列(试剂空白)管及第二列(含乙醇)管均出现相同的浑浊“+”,说明氰化物标准系列生成的浑浊是由所用试剂在反应过程中产生的。

2.2 浑浊的消除与表面活性剂的选择 已知杏仁露中苯甲醛对异烟酸-吡唑啉酮法产生类似的干扰。^[6]然而,对酒类来说,异烟酸-吡唑啉酮法和异烟酸-巴比妥酸法都不适用。为消除其浑浊的影响,分别试验了以下表面活性剂:聚乙烯醇,聚乙烯吡咯酮 K30、Brij35、氯化十六烷基吡啶、溴化十六烷基吡啶、溴化十六烷基三甲胺、十二烷基磺酸钠、烷基苯磺酸钠、SLS、乳化剂 OP、TritonX-100 及吐温-80。结果,从活性剂的溶解性、增溶、增敏及显色反应的颜色变化分析,只有 SLS 等 4 种活性剂效果较好,结果见图1。可见,以 SLS 效果最佳,表1中出现的所有浑浊也完全消除,显色产物为澄清的正常蓝色,且波长不变, $\lambda_{\max} = 638 \text{ nm}$ 。故选 SLS。



曲线 1. SLS; 2. 乳化剂 OP; 3. Triton X-100; 4. 吐温-80

图1 表面活性剂对显色的影响

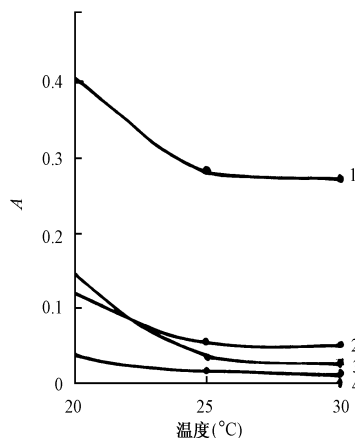
2.3 SLS 用量及加入顺序的影响 试验表明, SLS 的临界胶束浓度只有达到 2.0 g/L 以上时, 才能起到增溶、消除浑浊的效果, 故选 SLS 浓度为 2.5 g/L。

SLS 必须在氯胺 T 氧化后加入, 与加入显色剂(异烟酸-吡唑啉酮)的前后顺序无影响。

2.4 pH 值及缓冲液 在 SLS 胶束条件下, 显色反应在磷酸盐缓冲液 pH6.6~7.4 范围, 用量在 0.5~2.5 mL (pH7.6) 范围, 吸光度为最大且数值恒定, 选 pH7.0 及用量 1.5 mL。

此外, 国标法操作中采用乙酸(1+6)中和时, 因酸度过大, 消耗过多 NaOH(2 g/L), 最后定容超出刻度。本法改用乙酸(1+24)中和, 无需再用 NaOH(2 g/L) 反调, 加磷酸盐缓冲液后, 可完全控制溶液的 pH 值在显色的最佳范围。

2.5 磷酸盐缓冲液温度对显色的影响 国标法规定“加入磷酸盐缓冲液后, 当室温低于 20 °C 即放入 25 °C~30 °C 水浴中 10 min, ……”。而本试验却得出了相反的结论, 图 2 列出了 4 种酒样在不同温度的磷酸盐缓冲液条件下放置 10 min 与氰化物显色的关系曲线。可见, 温度越高, 导致氰化物的损失也越大, 在 25 °C~30 °C 水浴放 10 min, 与室温 20 °C 时测得的结果相比, 回收率仅为 69.6%~26.0%, 这是国标法操作中出现的关键性错误。试验表明, 加入磷酸盐缓冲液应维持较低温度, 有利于减少氰化物的损失, 提高回收率, 也无需放置 10 min, 立即加入氯胺 T 进行以下操作。



曲线 1. 原浆酒; 2~4. 样品。

图2 磷酸盐缓冲溶液的温度对显色的影响

2.6 氯胺 T 的影响 氯胺 T 是一种强氧化剂, 其用量浓度在 0.1~0.4 g/L 范围及氧化时间在 1~5 min 内, 吸光度为最高且数值恒定。当氧化时间 > 5 min, 吸光度会逐渐下降。选氯胺 T 0.2 g/L 及时间 3 min。

2.7 显色剂用量 试验表明, 显色剂用量在 1.8~3.0 mL 范围, 吸光度达最大且数值恒定。选 2.0 mL。

2.8 反应溶液的温度和时间 温度和时间是影响显色反应的重要因素。试验表明, 反应温度在 30 °C~40 °C 范围和反应时间在 25~60 min 范围内, 吸光度达最大且数值恒定。故选温度为 30 °C、时间为 30 min。在此胶束条件下, 显色产物的颜色室温下可稳定 1.5 h。

2.9 共存物质的影响 对于 1.0 $\mu\text{g CN}^-$ 标准品, 当

添加其它物质测得相对误差 ≤5 %时,酒中常见物质的允许量(mg)为:乙醇(1 000);乳酸(300);丙三醇、乙酸乙酯、己酸乙酯(50.0);正辛醇(20.0);丙酮、异丙醇、丁酮、苯甲醇(10.0);甲醇(1.0);异戊醇、异丁醇、正戊醇、正丁醇、乙酸丁酯(0.5);SO₂²⁻、山梨酸、苯甲酸(0.1);乙醛(0.05);甲醛(0.01)。可见,在SLS胶束条件下,方法的抗干扰能力显著增强,特别是酒中的基质成分乙醇对方法没有影响。

2.10 线性范围及灵敏度 本法CN⁻浓度在0~0.3 mg/L 范围内与吸光度呈良好的线性关系,其线性回归方程: $A = 0.369\ 1\ C - 0.011\ 5$ ($C = \text{mg/L}$), $r = 0.999\ 5$,表观摩尔吸光系数(ϵ)为 $1.3 \times 10^5\ \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$,检出限为 0.03 μg。

2.11 与吡啶 - 巴比妥酸法比较 因国标法及异烟酸 - 巴比妥酸法均存在浑浊干扰问题,无法进行比较,故选择吡啶 - 巴比妥酸法进行对比,结果见表 2。经过 t 检验,本法 $t = 1.61$, $t_{0.05,9} = 4.464$, $P > 0.05$,说明差异无显著性。

表 2 与吡啶 - 巴比妥酸法比较结果				mg/L
试样编号	本法	吡啶 - 巴比妥酸法	国标法	
1	0.37	0.39	+	+
2	0.41	0.39	+	+
3	0.10	0.10	+	+
4	0.41	0.48	+	+
5	0.21	0.20	+	+
6	0.41	0.40	+	+
7	1.45	1.46	+	+
8	0.11	0.11	+	+
9	0.11	0.10	+	+
10	0.10	0.10	+	+

2.12 回收率和精密度 取 20 个酒样各 1.0 mL,并添加不同量 CN⁻ 标准液,依方法操作,结果见表 3。可见,本法有较好的准确度和精密度。

表 3 回收率和精密度试验结果						CN ⁻ μg
试样编号	本法($n = 4$)	RSD %	加标量	测得量	回收率	
1	0.05	0.5	0.5	0.54	98.0	
			1.5	1.56	100.9	
2	0.10	2.5	0.5	0.58	96.0	
			1.0	1.06	96.0	
3	0.36	1.0	0.5	0.80	88.0	
			2.0	2.11	87.5	
4	0.07	3.0	0.5	5.03	99.2	
			1.0	1.02	95.0	
5	0.41	4.9	0.5	0.93	104.0	
			2.0	2.35	97.0	
6	0.10	2.7	0.5	0.57	94.0	
			1.0	1.03	93.0	
7	0.06	3.6	0.5	0.52	92.0	
			1.0	0.98	92.0	
8	0.03	3.5	0.5	0.45	84.0	

续表 3					
样品编号	本法($n = 4$)	RSD %	加标量	测得量	回收率
9	<0.03	-	2.5	2.20	86.8
			0.5	0.46	92.0
			1.0	0.90	90.0
10	0.16	2.7	0.5	0.57	82.0
			1.0	0.99	83.0
11	0.06	4.2	0.5	0.52	92.0
			1.0	1.02	96.0
12	0.14	2.0	0.5	0.59	90.0
			1.0	1.07	93.0
13	<0.03	-	0.5	0.44	88.0
			1.0	0.94	94.0
14	0.06	4.0	0.5	0.54	96.0
			1.0	1.03	97.0
15	0.38	1.3	0.5	0.81	86.0
			2.0	2.10	86.0
16	0.21	4.9	0.5	0.68	94.0
			1.0	1.16	95.0
17	1.45	3.0	0.5	1.92	94.0
			1.0	2.40	95.0
18	0.05	2.8	0.5	0.48	86.0
			1.0	0.90	85.0
19	0.06	3.8	0.5	0.53	94.0
			1.0	1.02	96.0
20	0.40	1.8	0.5	0.88	96.0
			1.0	1.36	96.0

2.13 市售酒类的调查分析结果 用本法随机调查了来自全国 16 个省(市)50 份不同品牌的市售白酒和配制酒,结果,氰化物含量在 < 0.03~1.45 mg/L 范围。依 GB 2757 —1981 酒类卫生标准判定,合格率为 100 %。调查还显示,35 份样品检出了氰化物,占总样本数的 70 %;15 份样品未检出(CN⁻ 的含量 < 0.03 mg/L),占总样本数的 30 %。但值得提及的是,一些中、高档价格的酒中检出了一定量的氰化物,其氰化物的来源与酿酒的原料有关,^[7]而低档次的酒,氰化物的含量几乎都检不出(< 0.03 mg/L),有可能与食用酒精兑制有关。此外,配制酒中的氰化物的含量也 < 0.03 mg/L。

参考文献:

[1] GB/ T 5009. 48 —1996. 蒸馏酒及配制酒卫生标准分析方法[S].
[2] 陈亚妍. 生活饮用水检验规范注解[M]. 北京:科学技术出版社,2001,57.
[3] 杨惠芬,李明元,沈文. 食品卫生理化检验标准手册[M]. 北京:中国标准出版社,1997,601.
[4] 孟凡昌,李升宪,赵丕虹. 极谱络合物吸附波催化波[M]. 武汉:武汉大学出版社,2001,210.
[5] 王建新,王嘉兴,风耀华. 实用香精配方[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999,197.
[6] 徐向阳,翟凤兰. 杏仁露中氰化物测定方法的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2002,14(6): 20 —22.
[7] 夏金池,牟文俐,译. 食品中的有害物质[M]. 北京:中国轻工业出版社,1992,10 —13.

[收稿日期:2003 - 09 - 08]

中图分类号:R15;O657. 32 文献标识码:B 文章编号:1004 - 8456(2004)03 - 0232 - 04

