

气相色谱定量分析葡萄酒的样品处理方法

葡萄酒中一些高挥发性物质和含量足够大的物质，可用直接注射酒样的方法定量，但对分子量再大一些且含量不太大的物质来说，就必须进行样品的制备。下面简要介绍一些常用的样品处理方法。

一、用通氮气法定量酯

研究葡萄酒的芳香物质，必然要分析游离于酒液表面上的蒸气，然而这些自然挥发物质绝大部分含量很小，虽然人的嗅觉器官能感觉到它，但对采用直接注射法来进行气相色谱分析而言，不具备足够大的浓度，我们可以用一种叫“空腔”（hand space）技术，即於酒中通氮气，使那些蒸气压较高的物质被带出来，然后被收集在一个冷却捕集器中，这就有足够大的浓度进行气相色谱分析了。这种技术也称惰性气体萃取技术。

采用惰性气体技术，与惰性气体性质、气体流量、完成萃取的负压、酒样的体积、酒样的温度、捕集器的类型及数目、萃取持续的时间等因素有关。一般来说，用氮气作为载体来萃取比用氦气和二氧化碳气好；酒样的酒精度调整为 10 度；萃取时间不宜过长，半小时或一小时即可；捕集器用 0 和 - 80 两个冷阱；用磷酸氢二钠饱和酒样比用氯化钠饱和对酯类的萃取更准确；对六个碳以上的乙酯定量，需用分子量较高的第二个内标准，选用 célanèse 柱，用 2 - 甲基丙基 2 - 甲基丙酯做内标。

用氮气萃取酒中的挥发性物质是不能全部被萃取出来的，萃取物浓度和在酒中它的原始浓度之间有一个浓度系数，需要配制对照液来测定这一浓度系数。

二、用溶液分层法（Demixtion）定量高级醇

用通氮气法定量挥发性物质，对 10 个碳的乙酯来说，可以获得足够的浓度，但它不适合于定量高级醇。对高级醇还是采用老的溶液分层法，并可同时定量己酸乙酯和丁二酸二乙酯。一般溶液分层法是加入有机溶液和盐类，使酒样分成有机相和水相，其实对含有 10% 乙醇的酒，不加有机溶剂也可得到溶液分层，但要用盐来调节酒的 pH，所用盐是铵的中性硫酸盐和钠的酸性磷酸盐。

在 50ml 的直长颈容量瓶中，加入 37ml 的乙醇浓度被调为 10% 的酒，而且已加入 2% 体积的内标溶液（浓度为 5g/L 的 5 - 甲基己醇 - 2），加入 5g 无水磷酸氢二钠，溶解后，加入 20g 中性硫酸铵，用 5mm 的搅拌器在电磁搅拌下完全溶解，在这一操作过程中，容量瓶被浸入 25 的水浴中，分层从开始到结束用 2 小时，有机相聚集在容量瓶的颈部，抽取 2μl 的有机相直接注入 F.F.A.P 4 米柱进行分析。

用于制备标准液的母液成分是：

1 升 20% 的酒精水溶液中，含有 1g 2 - 甲基丙醇 - 1；3 g 2 - 甲基丁醇 - 1 + 3 - 甲基丁醇 - 1；1g 乳酸乙酯；0.2 g 丁二酸二乙酯；0.5 g 2 - 苯基乙醇。

溶液分层得到的浓度系数：2 - 甲基丙醇 - 1 32.5，2 - 甲基丁醇 - 1 + 3 - 甲基丁醇 - 1 41.0，乳酸乙酯 29.0，丁二酸二乙酯 14.5，2 - 苯基乙醇 15.5，5 - 甲基己醇 - 2（内标）42.5。

三、溶剂萃取法

约有 40 多种溶剂可以用来萃取酒中的芳香物质，其中以戊烷和乙醚及他们的混合物可以给出最好的结果。

气相色谱分析表明，用戊烷萃取可以浓缩除乙醇外的所有有机物。但在萃取液中含有太多的有机物不是一个有利条件。为了定量分析的严密准确，最好还是用多次基本的萃取，提出主要不同的物质。

1.用己烷萃取

挥发性比 10 个碳的乙酯更低的物质，如十二酸乙酯，十四酸乙酯，2 - 苯基乙酸乙酯，含量虽小但感官作用十分重要，可被己烷萃取后定量。

在 100ml 酒中，加入 2ml 己酸戊酯内标（浓度为 60mg/L 于 50% 的乙醇水溶液），放入一个分液漏斗中，酒样被己烷萃取三次，每次 20ml，搅拌十分钟，分离己烷萃取液，并用无水硫酸钠干燥，滤去吸水剂，蒸馏浓缩至 0.02~0.05ml，注入 2 米长的 F.F.A.P 柱，升温程序是 4 /分，由 100 ~200 。

用于制备标准溶液的母液成分：

1 升 20% 的乙醇水溶液中含有：1g 乙酸 3 - 甲基丁基酯；6g 2 - 甲基 + 3 - 甲基丁醇 - 1，0.5g 己酸乙酯；0.3g 乙酸己酯；0.5g 辛酸乙酯；0.5g 癸酸乙酯；0.1g 丁二酸二乙酯；0.1g 十二酸乙酯；0.3g 乙酸 2 - 苯基乙酯；0.1g 十四酸乙酯；2g 2 - 苯基乙醇。

2.用乙醚萃取脂肪酸

对极性小的物质用己烷萃取，对极性较大的脂肪酸可选用乙醚萃取。萃取是在一个分液漏斗中进行的。100ml 酒样和 20ml 乙醚搅拌 10 分钟，每次将乙醚相分离出来在另一容器中混合，然后蒸馏除去乙醚，残留量约为 1ml，用 2ml 的萃取液注入 F.F.A.P - H₃PO₄ 柱定量。

在萃取前酒样用 2% 三分之一的硫酸酸化，以使所有的酸呈游离态。酒样中要加入另 2% 的戊酸作为内标，浓度是 100mg/L 的乙醇水溶液。配制一个对照溶液，1 升 10% 的乙醇水溶液中含：500mg 乙酸；10mg 丙酸；2mg 丁酸；2mg 3 - 甲基丁酸；5mg 己酸；2mg 庚酸；5mg 辛酸；2mg 壬酸；2mg 癸酸。在这个溶液中加入 2% 的内标溶液后如同酒样一样萃取。

3.山梨酸（己二烯酸）的定量

山梨酸不是酒中的天然成分，但它作为防腐剂被允许应用。它的定量可能通过直接注射酒样于 D.E.G.S - H₃PO₄ 或 D.E.G.A - H₃PO₄ 或 F.F.A.P - H₃PO₄ 柱来进行。但酒中的其他成分拖带使它的小峰不是总能检出来的。最好用乙醚来萃取。

20ml 酒样被 1ml 三分之一硫酸酸化后，加入 2ml 十一酸内标，内标浓度为 1g/L 95% 的乙醇溶液，搅拌 5 分钟，用 10ml 乙醚萃取，置于小管中，盖好，用 2μl 的乙醚相注射入色谱仪中，最大相对误差在 6% 以下

四、生成衍生物定量不挥发物质

存在于酒中相当大量的叫做“固定”的物质是不挥发的，这些物质可以分为两类，一类是具有高的沸点而且是热稳定的，象丙三醇这样一些多元醇，分解温度为 290 ，可以直接被气相色谱分离。另一类是非常迅速地被热分解，象糖类或是一些醇酸等。为了用气相色谱来研究这些物质，需要使其变为可挥发性的衍生物，使氢键松散。这些衍生物基本是醇的 O - 乙基酯；酸的 O—甲酯；醚和 O—三甲基硅烷酯等。

1. 一些多元醇和糖的乙酰基衍生物的分离

一般是用氢硼酸钠溶液来还原醛或糖，过剩的试剂用乙酸或盐酸破坏，而过剩的酸又被树脂柱固定。在溶液分离后被蒸发至干，然后在硫酸存在下用乙酸酐处理，在 60 °C 下十分钟，用水收回衍生物，再被有机溶剂萃取。

也可以只用乙酸酐和吡啶混合液（5:1 V/V）处理，过剩的试剂被真空挥发简单地除去，或直接注入色谱仪中。也可以加热回馏，5g 的多元醇（或还原糖的多元醇形式），在 2ml 乙酸酐和 0.4ml 吡啶存在下回馏一小时。

在操作酒样时，糖应当通过树脂 Amberlite IRA400(OH) 被定量地除去（3ml 酒用 15ml 树脂），流出液和树脂的水溶液（100ml）被在真空下蒸干，干的残留物含有被定量的多元醇，按照前面叙述的方法处理。

2. 三甲基硅烷衍生物

三甲基硅烷衍生物（T·M·S）的形成（醇生成三甲基硅醚，酸生成三甲基硅酯），被应用于气相色谱来分析多元醇和酸。从六甲基撑二硅氮烷（H·M·D·S）出发，经氮的质子化作用，生成三甲基硅氮，再经羟基上的氧与硅反应生成 T·M·S 衍生物。这一反应是很迅速很完全的，但总会有一些过剩的 H·M·D·S 存在。后来人们用三甲基氯硅烷（H·M·C·S）和 H·M·C·S 在吡啶溶液中混合，（5 分钟即可），得到多糖的 T·M·S 衍生物。

应用操作模型：10mg 糖被 1 ml 无水吡啶、0.2 ml 的 H·M·D·S 和 0.1 ml 的 H·N·D·S 处理，糖溶液被转动瓶分离或在 80 °C 下加热挥发 2—3 分钟。

另一种生成 T·M·S 衍生物的方法是，在反应混合物中，T·M·C·S 象反应催化剂一样被给出质子的三氟乙酸代替，这样尽管存在着水，仍然可以得到稳定的衍生物。

这一技术被用来研究酒和葡萄中的其他单一有机酸、黄酮类化合物和苯酚酸、糖和不挥发的多元醇等。

典型操作：

将酒样放入 9 ml 的盘尼西林小瓶中，在回转蒸发器上，45 °C 真空下被蒸干。在分析糖和多元醇时，蒸发剩下的残渣用 1 ml 水加 1 ml 甲醇回收，在定量酸时用 3 次 1 ml 水，最后一次用甲醇代替，然后转移到 9 ml 盘尼西林小瓶中蒸干。如果蒸发残留物呈糖浆状，可用苯或甲醇溶解，在真空下除去水。

于盘尼西林瓶中加入 0.2 ml 新蒸的吡啶，0.7 ml 新蒸的 H·M·D·S，0.1 ml 三氟乙酸（T·F·A），瓶口直接用橡胶盖塞住，橡胶盖上涂一层 Téflon 膜，避免被硅烷混合物侵蚀，盖帽上再用铝盖紧压在瓶口上，随后将小瓶放在 60 °C 的加热器上加热 30 分钟。样品在注入气相色谱前，至少要放置 3 小时，使反应完全。

在这样的条件下，酸的衍生物在数周内是稳定的，糖和多元醇的衍生物可以保存几个月甚至数年不变。瓶盖上的铝帽有可撕开的部分，用时撕开铝帽，微量注射器的针头穿过橡胶插入瓶中就可以抽取样品进行注射。

内标：对酸用 20g/L 的 50% 的乙醇水溶液的香草酸；

对多元醇和糖用 1.5g/L 或 15g/L 的季戊四醇水溶液。

3. 生成甲酯的三甲基硅烷醚后定量酸

用重氮甲烷使酸甲酯化，接着生成 T·M·S 衍生物，酸的甲酯比三甲硅烷酯更稳定，但重氮甲烷不与羟基反应，该羟基应转化为三甲基硅烷醚。

在同时存在着甲酯和三甲硅烷酯的情况下，T·M·S 衍生物的分析是很复杂的，因此需要通过树脂进行酸的预分离。

香草酸不能做为内标使用，因为它的官能团酚基可与重氮甲烷起反应。实际上，酒中的有机酸是分两步进行定量的，首先是乳酸、丁二酸、磷酸、苹果酸和酒石酸等，按先前描述的方法生成 T·M·S 衍生物被定量。其次是柠苹果酸和柠檬酸被定量，用预先测定过含量的苹果酸作为内标准，如酒中不含有苹果酸，要人工加入一个已知量的苹果酸。