

一种液-液萃取测定葡萄酒中主要挥发性成分的快速定量分析方法

曾游¹, 丁怡¹, 彭程^{1, 2}

(1. 广州市酒类检测中心, 广东广州 510160) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文采用液液萃取方法, 用 3 mL 葡萄酒样、7 mL 水、4.5 g 硫酸铵和 60 μ L 0.02% (V/V) 的内标 (4-甲基-2-戊醇) 溶液混合, 再加入 0.5 mL 二氯甲烷作为萃取溶剂, 涡旋 10 min 后离心 10 min, 取下层提取物进行气相色谱分析, 以 ZB-WAX 毛细柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) 为分析用色谱柱, 柱温 40 $^{\circ}$ C 保持 5 min 后以 3 $^{\circ}$ C/min 升温至 190 $^{\circ}$ C, 保持 10 min; 载气为高纯氮气, 流速 1.5 mL/min; 进样量 0.5 μ L; 进样口 200 $^{\circ}$ C; 不分流模式进样, 以 FID 为检测器。该方法能良好分离出葡萄酒中 63 种化合物, 其中用标准物质定性了 30 种香气成分, 包括 9 种醇类, 11 种酯类, 8 种酸类, 2 种醛酮类。所定性香气成分定量结果重复性良好, 有 28 种成分 RSD% 小于 10%; 采用内标法进行定量分析, 定量准确性高, 有 28 种成分回收率在 85~120% 之间。本方法操作简便, 污染小, 前处理时间短, 且重复性良好, 定量准确度高, 符合进一步作葡萄酒指纹分析的技术要求。

关键词: 液液萃取; 气相色谱法; 葡萄酒; 挥发性成分; 定量分析; 内标法

文章编号: 1673-9078(2014)6-281-288

A Method for Fast Quantitative Analysis of Major Wine Volatile Compounds Based on Liquid-liquid Extraction

ZENG You¹, DING Yi¹, PENG Cheng^{1,2}

(1. Guangzhou Wine Analytical Centre, Guangzhou 510160, China)

(2. School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this paper, 3 mL wine was diluted with water (7 mL) and internal standard solution (60 μ L 0.02% (V/V) 4-Methyl-2-pentanol), salted with 4.5 g ammonium sulfate and then extracted with 0.5 mL dichloromethane. After scrolled for 10 min and centrifuged for 10 min, the extract was injected in a GC system. ZB-WAX capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) used with the temperature program was as follows: 40 $^{\circ}$ C for 5 min, then raised at 3 $^{\circ}$ C/min up to 190 $^{\circ}$ C for 10 min. N₂ was used as carrier gas with flow rate of 1.5 mL/min, injection volume and input temperature were 0.5 mL and 200 $^{\circ}$ C, and the injection mode was splitless. The results were detected by FID. The method could isolate 63 compounds from wine, and 30 of them were analyzed qualitatively. They included nine alcohols, eleven esters, eight organic acids, two aldoketones. Repeatability of 28 of them was less than 10% (as RSD) with the recoveries from 85% to 120%. The quantitative analysis by using internal standard solution was accurate. This method has the advantages of simple operation, little pollution, short time of pretreatment and good repeatability and accuracy, which satisfies the further demand of wine fingerprinting analysis technology.

Key words: liquid-liquid extraction; gas chromatography; wine; volatile compounds; quantitative analysis; internal standard method

葡萄酒中的香气成分是构成葡萄酒质量的主要因素, 决定着葡萄酒的风味和典型性^[1]。对葡萄酒香气成分的鉴定, 是科学评价葡萄品种和葡萄酒质量的重要依据^[2]。目前国内外很多研究通过测定葡萄酒中香

收稿日期: 2013-12-18

基金项目: 广州市科技项目基础研究专项 (11C15380690)

作者简介: 曾游 (1985-), 女, 工程师, 从事酒类质量检测

通讯作者: 丁怡 (1978-), 女, 高级工程师, 从事酒类质量检测及食品安全检测

气成分, 运用主成分分析、聚类分析等方法来对所检测出的香气物质进行分析, 进而来实现对不同原产地葡萄酒鉴别^[3]。

葡萄酒的成分十分复杂, 到目前为止, 在葡萄酒中已有 1000 多种挥发性化合物被检测出来^[4], 包括醇类、酯类、有机酸类、挥发性酚类、硫醇类、萜烯醇类等^[5], 葡萄酒的挥发性成分种类繁多, 其中主要挥发性成分以发酵类香气成分 (醇类和酯类) 和葡萄中的有机酸类为主。

目前,毛细管柱-气相色谱分析葡萄酒中的香气成分是葡萄酒分类鉴定、质量控制以及了解葡萄酒香气特点的重要手段^[6]。而样品前处理、数据的处理方法、色谱条件的筛选是进行分析工作的重要部分,要想达到分析的最优效果和分析工作的主要目的,开展基于气相色谱分析目的的葡萄酒香气成分前处理方法研究,在GC分析之前选择合理的葡萄酒样品前处理技术,对香气成分分析研究者来说是至关重要的^[6]。目前国内国外采用的样品前处理方法主要有液液萃取法、静态顶空萃取法、动态顶空法、固相萃取法、固相微萃取法等^[6]。其中液液萃取法至今仍被广泛应用于香气成分的分 离提取,其具有成本低、易操作、不需特别的辅助仪器,而且重现性、准确性也较好,但液-液萃取过程中所使用的大多数有机溶剂具有毒性、污染环境等。液-液萃取一般持续时间长、耗溶剂量大^[6]。我国,李艳,康俊杰^[7]等人用乙醚:正戊烷作为萃取剂,对3种酿酒酵母酿造赤霞珠干红葡萄酒的香气成分进行分析,其样品前处理方法需要大量的酒样和有机溶剂且消耗时间长。国内对葡萄酒香气成分的研究侧重在对其进行定性分析,在定量分析方面一种是以内标法半定量检测方法为主要手段,如李华^[8]曾对昌黎赤霞珠干红葡萄酒中香气成分进行半定量分析,这种分析方法基于校正因子为1的前提,其优势在于不需要待测物质的标准物质来计算待测物质含量,节省经费,但是结果的准确度仅能达到半定量的程度;另外一种 是归一化定量方法,如李华^[9]在葡萄酒详细成分的色谱分析研究进展中的描述,归一化定量方法也属于一种半定量的含量计算方法。。

本文以葡萄酒中主要香气成分为分析目标物,摸索一种采用少量萃取试剂和萃取时间较短的前处理方法,确定色谱条件,采用内标法(计算校正因子)定量计算的准确的含量结果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂

二氯甲烷(色谱纯,99.9%,上海紫晶)、硫酸铵(优级纯,≥99.5%,天津市科密欧化学试剂有限公司)、无水乙醇(色谱纯,99.8%,天津市科密欧化学试剂有限公司)、试验用水为二级水。

1.1.2 仪器设备

气相色谱仪,美国 PerkinElmer 公司,带 PSS 分流进样口、衬管 2mm 内径和 FID 检测器;TotalChrom 色谱工作站,美国 PerkinElmer 公司;ZB-WAX 毛细

柱 30 m×0.25 mm×0.25 μm, Phenomenex®, 美国; Milli-Q 纯水机,美国 Millipore 公司; SA8 涡旋混合器,英国 STUART 公司; ROTOFIX 32A 离心机,德国 Hettich 公司。

1.1.3 样品

市售干红葡萄酒

1.1.4 标准物质

标准物质来源及纯度见表 1。

表 1 试验中所用的标准物质及内标物

Table 1 Chemical standards used in this study

| 名称 | 品牌 | 纯度/% |
|-----------|----------------|------|
| 丁酸乙酯 | 天津光复 | 99.5 |
| 1-丙醇 | 天津光复 | 99.5 |
| 异戊酸乙酯 | 阿拉丁 | 99.7 |
| 异丁醇 | 天津光复 | 99.5 |
| 乙酸异戊酯 | 天津光复 | 99.5 |
| 1-丁醇 | 天津光复 | 99.5 |
| 4-甲基-2-戊醇 | Acros Organics | 99+ |
| 异戊醇 | 天津光复 | 99.5 |
| 己酸乙酯 | 天津光复 | 99.5 |
| 乙酸己酯 | 天津光复 | 99.5 |
| 3-羟基丁酮 | 天津光复 | 99 |
| 乳酸乙酯 | 天津光复 | 99.5 |
| 己醇 | 天津光复 | 99.5 |
| 顺-3-己烯醇 | 阿拉丁 | 98 |
| 辛酸乙酯 | 天津光复 | 99.5 |
| 糠醛 | 天津光复 | 99.5 |
| 乙酸 | 天津光复 | 99.5 |
| 3-羟基丁酸乙酯 | 阿拉丁 | 98 |
| 丙酸 | 天津光复 | 99.5 |
| 异丁酸 | 天津光复 | 99.5 |
| γ-丁内酯 | 天津光复 | 99.9 |
| 癸酸乙酯 | 天津光复 | 99 |
| 丁酸 | 天津光复 | 99.5 |
| 琥珀酸二乙酯 | 天津光复 | 99.6 |
| 异戊酸 | 天津光复 | 99.5 |
| 3-甲硫基丙醇 | Acros Organics | 99 |
| 苯乙醇乙酸酯 | 百灵威 | 98 |
| 己酸 | 天津光复 | 99.5 |
| 苯甲醇 | 天津光复 | 99.5 |
| β-苯乙醇 | 天津光复 | 99.5 |
| 辛酸 | 天津光复 | 99.5 |
| 癸酸 | 天津光复 | 99.5 |

1.1.5 2% (V/V)单标母液的配制

各精密吸取以上标准物质 2 mL 于 100 mL 容量瓶

中, 用无水乙醇定容至刻度。

1.1.6 0.02% (V/V)内标溶液的配制

精密吸取 1.00 mL 2% (V/V) 4-甲基-2-戊醇于 100 mL 容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度。

1.1.7 混合标液的配制

按表 2 中各标准物质质量浓度配制, 最终混合标液中含 12% 乙醇, 并用酒石酸和 0.2 M NaOH 调至 pH 3.2。

表 2 混合标液中各标准物质质量浓度

Table 2 Concentrations of mixed standard solution

| 名称 | 质量浓度/(mg/L) | 名称 | 质量浓度/(mg/L) |
|---------------|-------------|----------|-------------|
| 丁酸乙酯 | 3.5 | 乙酸 | 46.2 |
| 1-丙醇 | 35.2 | 3-羟基丁酸乙酯 | 4.1 |
| 异戊酸乙酯 | 3.5 | 丙酸 | 4.0 |
| 异丁醇 | 35.3 | 异丁酸 | 3.8 |
| 乙酸异戊酯 | 3.5 | γ-丁内酯 | 49.7 |
| 1-丁醇 | 3.2 | 癸酸乙酯 | 3.5 |
| 4-甲基-2-戊醇(内标) | 3.2 | 丁酸 | 3.8 |
| 异戊醇 | 35.6 | 琥珀酸二乙酯 | 46.1 |
| 己酸乙酯 | 3.5 | 异戊酸 | 3.7 |
| 乙酸己酯 | 3.5 | 3-甲硫基丙醇 | 4.7 |
| 3-羟基丁酮 | 22.0 | 苯乙醇乙酸酯 | 4.4 |
| 乳酸乙酯 | 44.9 | 己酸 | 3.7 |
| 己醇 | 3.3 | 苯甲醇 | 4.2 |
| 顺-3-己烯醇 | 3.4 | β-苯乙醇 | 44.9 |
| 辛酸乙酯 | 3.5 | 辛酸 | 3.6 |
| 糠醛 | 4.6 | 癸酸 | 3.7 |

1.1.8 回收率加标溶液的配制

按表 3 各标准物质质量浓度配制, 最终混合标液中含 12% 乙醇, 并用酒石酸和 0.2 M NaOH 调至 pH3.2。回收率加标溶液中标准物质质量浓度见表 3。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理方法

向 30 mL 玻璃离心管加入 3 mL 样品, 7 mL 二级水和 60 μL 0.02% (V/V) 的内标溶液 (1.1.4), 然后加入 4.5 g 优级纯硫酸铵以提高萃取效率和消除乳化现象, 然后加入 0.5 mL 二氯甲烷, 于涡旋震荡仪 1100 r/min 涡旋 10 min 后放入离心机以 2500 r/min 离心 10 min, 取下层二氯甲烷层至 300 μL 微量进样瓶中用于气相分析。

1.2.2 GC 分析条件

气相色谱仪, 美国 PerkinElmer 公司, 带 PSS 分流进样口、衬管 2 mm 内径和 FID 检测器; TotalChrom

色谱工作站, 美国 PerkinElmer 公司; ZB-WAX 毛细柱 30 m×0.25 mm×0.25 μm, Phenomenex®, 美国; 色谱条件: 40 °C 保持 5 min 后以 3 °C/min 升温至 190 °C, 保持 10 min; 载气为高纯氮气, 流速 1.5 mL/min; 进样量 0.5 μL; 进样口 200 °C; 分流模式: 不分流进样。

表 3 回收率加标溶液中标准物质质量浓度

Table 3 Concentrations of standards added into the recoveries spiked solution

| 名称 | 质量浓度/(mg/L) | 名称 | 质量浓度/(mg/L) |
|---------|-------------|----------|-------------|
| 丁酸乙酯 | 1.0 | 3-羟基丁酸乙酯 | 1.5 |
| 1-丙醇 | 16.0 | 丙酸 | 2.5 |
| 异戊酸乙酯 | 3.0 | 异丁酸 | 1.4 |
| 异丁醇 | 32.1 | γ-丁内酯 | 9.0 |
| 乙酸异戊酯 | 1.3 | 癸酸乙酯 | 4.0 |
| 1-丁醇 | 0.8 | 丁酸 | 1.0 |
| 异戊醇 | 161.8 | 琥珀酸二乙酯 | 7.3 |
| 己酸乙酯 | 4.1 | 异戊酸 | 0.9 |
| 乙酸己酯 | 3.2 | 3-甲硫基丙醇 | 2.3 |
| 3-羟基丁酮 | 20.0 | 苯乙醇乙酸酯 | 0.8 |
| 乳酸乙酯 | 102.0 | 己酸 | 1.9 |
| 己醇 | 0.8 | 苯甲醇 | 0.3 |
| 顺-3-己烯醇 | 1.0 | β-苯乙醇 | 40.8 |
| 辛酸乙酯 | 3.6 | 辛酸 | 0.5 |
| 糠醛 | 0.3 | 癸酸 | 2.0 |
| 乙酸 | 419.6 | | |

1.2.3 定性定量分析

GC 定性分析: 试样中组分与标准物质在相同操作条件下测得的保留时间相比较, 数值在 1% 误差范围之内确定为该香气成分。

内标法定量分析: 在样品中再加入纯物质作内标物 (本试验加入 4-甲基-2-戊醇为内标), 根据内标物与待测组分的定量校正因子, 内标物与样品的峰面积, 求出样品中待测组分含量。

待测组分含量=校正因子×待测样品中各组分的峰面积×内标样浓度/内标样的峰面积

校正因子=内标峰面积/待测组分标样峰面积×待测组分标样密度/内标密度

1.2.4 重复性试验

将市售葡萄酒样品按方法 (1.2.1) 制备, 同时制备 6 个平行样进行气相色谱分析, 计算 6 组平行样各组分峰面积 RSD%。

1.2.5 回收率实验

对照品的制备: 取 3 mL 混合标液 (1.1.7), 按照样品处理方法 (1.2.1) 加入 7 mL 二级水和 4.5 g 硫酸

铵, 涡旋离心后移取下层有机相进样。葡萄酒样品质量浓度测定液的制备: 按方法(1.2.1)制备, 样品为市售葡萄酒。回收率测定液的制备: 精确吸取 1.5 mL 市售葡萄酒样品和 1.5 mL 回收率加标溶液(1.1.8), 按照样品处理方法(1.2.1)加入 7 mL 二级水、60 μ L 0.02%的内标溶液(1.1.6)和 4.5 g 硫酸铵, 涡旋离心后移取下层有机相进样。

回收率计算公式/%=(回收率测定液质量浓度(mg/L) \times 3.0-样品质量浓度 \times 1.5)/(回收率加标溶液质量浓度(mg/L) \times 1.5) \times 100

2 结果与讨论

2.1 方法优化

有报道研究不同溶剂提取酒中挥发性成分的能力^[10], 结果显示二氯甲烷是最有效的萃取溶剂, 因此本文选用其作为萃取溶剂。另外, 在萃取时, 加入硫酸铵是为了进一步在有机相中富集香气成分, 提高萃取效率和消除乳化。但据国外有关研究^[11], 如果加入盐的量不合适, 会使样品和二氯甲烷的密度更加接近, 加大分离难度, 因此, 本方法萃取时, 按 3 mL 葡萄酒、7 mL 二级水和 4.5 g 优级纯硫酸铵的比例混合, 文献^[11]报道此条件下萃取效率最佳。同时, 本文从涡旋时间、萃取容器、试剂、载气流速和分流模式等方面对样品前处理以及气相色谱条件进行条件优化。

2.1.1 样品前处理的优化

涡旋时间对香味成分的提取效果影响较大, 因此, 本实验分别考察了涡旋 5 min、10 min、15 min 各组分的精密度, 结果显示涡旋 5 min 各组分的精密度非常差, 而涡旋 15 min 有 6 种已知成分 RSD% 超过了 15%, 精密度比涡旋 10 min 的效果差, 因此本文选定了涡旋 10 min, 对样品进行前处理。对涡旋时间进行选择的同时, 发现使用 PP 离心管为容器进行萃取时, 会给样品带来很大的干扰, 因此最后决定使用玻璃离心管进行萃取。另外也排除了优级纯的硫酸铵和二级水的干扰。

2.1.2 气相色谱条件的优化

载气流速的优化: 通过对流速为 1.5 mL/min 和 2.0 mL/min 的比较, 流速 1.5 mL/min 对样品各峰位分离更好, 且流速 2.0 mL/min 保留时间只比 1.5 mL/min 快 1~2 min, 综合考虑分离效果和分析时间, 选定流速为 1.5 mL/min。

分流模式的优化: 使用分流进样对样品和混合标样进行检测, 进样 0.5 μ L, 检测结果显示在分流模式

下含量低的组分大多数没有响应, 只测得 5 个色谱峰。使用不分流进样模式, 对样品进行检测可以很好的分离 60 多个峰, 混合标样的结果显示不分流模式的响应强度是不分流模式的 20 倍以上, 大大提高了检测灵敏度, 对于样品中低浓度的香味物质的检测非常具有优势。

2.2 方法精密度考察

葡萄酒样品的典型色谱图见图 1。

表 4 葡萄酒中香气成分精密度测定结果 (n=6)

Table 4 The repeatability of wine volatile compounds (n=6)

| 序号 | 保留时间/min | 香气成分名称 | 葡萄酒中平均含量/(mg/L) | 峰面积 RSD% |
|----|----------|---------------|-----------------|----------|
| 1 | 6.12 | 丁酸乙酯 | 0.10 | 13.8 |
| 2 | 6.31 | 1-丙醇 | 19.17 | 2.8 |
| 3 | 7.09 | 异戊酸乙酯 | 0.04 | 12.0 |
| 4 | 7.98 | 异丁醇 | 29.50 | 3.5 |
| 5 | 8.90 | 乙酸异戊酯 | 0.05 | 5.7 |
| 6 | 9.89 | 1-丁醇 | 0.47 | 3.8 |
| 7 | 10.82 | 4-甲基-2-戊醇(内标) | 3.20 | 5.9 |
| 8 | 12.53 | 异戊醇 | 121.50 | 3.2 |
| 9 | 13.36 | 己酸乙酯 | 0.26 | 6.1 |
| 10 | 15.60 | 3-羟基丁酮 | 17.26 | 3.1 |
| 11 | 18.31 | 乳酸乙酯 | 109.45 | 4.7 |
| 12 | 18.65 | 己醇 | 0.90 | 5.9 |
| 13 | 19.93 | 顺-3-己烯醇 | 0.03 | 8.2 |
| 14 | 21.80 | 辛酸乙酯 | 0.04 | 8.7 |
| 15 | 23.26 | 糠醛 | 0.39 | 5.2 |
| 16 | 23.80 | 乙酸 | 240.41 | 4.2 |
| 17 | 25.37 | 3-羟基丁酸乙酯 | 0.10 | 6.2 |
| 18 | 27.15 | 丙酸 | 0.99 | 4.2 |
| 19 | 28.19 | 异丁酸 | 2.00 | 4.7 |
| 20 | 29.31 | γ -丁内酯 | 9.25 | 4.8 |
| 21 | 29.93 | 癸酸乙酯 | 0.00 | 9.0 |
| 22 | 30.45 | 丁酸 | 0.45 | 4.4 |
| 23 | 31.45 | 琥珀酸二乙酯 | 7.76 | 6.0 |
| 24 | 31.92 | 异戊酸 | 0.76 | 5.5 |
| 25 | 32.91 | 3-甲硫基丙醇 | 1.85 | 4.3 |
| 26 | 36.21 | 苯乙醇乙酸酯 | 0.26 | 6.5 |
| 27 | 38.06 | 己酸 | 1.79 | 6.6 |
| 28 | 38.49 | 苯甲醇 | 0.26 | 5.5 |
| 29 | 39.59 | β -苯乙醇 | 26.89 | 5.9 |
| 30 | 44.91 | 辛酸 | 0.63 | 5.3 |
| 31 | 51.17 | 癸酸 | 0.11 | 5.2 |

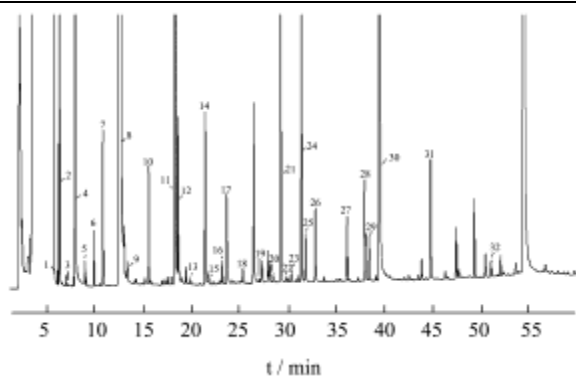


图1 干红葡萄酒液萃取-气相色谱分析图谱

Fig.1 Chromatogram of a wine extract obtained from a dry wine by liquid-liquid extraction and the GC analysis

用二氯甲烷作为萃取溶剂,采用液液萃取—气相色谱技术良好分离出63种化合物,其中用标准物质定性了30种香气成分,主要包括9种醇类,11种酯类,8种酸类,2种醛酮类,它们是葡萄酒中重要香气成分。

按照1.2.1样品前处理方法,在相同条件下,制备6个平行样品萃取溶液,进行气相色谱分析,按照各成分的峰面积进行计算得到结果大多数成分峰面积RSD小于10%,丁酸乙酯和异戊酸乙酯RSD较高,分别为13.8%和12.0%,这可能与其峰面积较小有关。

色谱峰标注:1、丁酸乙酯;2、1-丙醇;3、异戊酸乙酯;4、异丁醇;5、乙酸异戊酯;6、1-丁醇;7、4-甲基-2-戊醇(内标);8、异戊醇;9、己酸乙酯;10、

3-羟基丁酮;11、乳酸乙酯;12、己醇;13、顺-3己烯醇;15、辛酸乙酯;16、糠醛;17、乙酸;18、3-羟基丁酸乙酯;19、丙酸;20、异丁酸;21、 γ -丁内酯;22、癸酸乙酯;23、丁酸;24、琥珀酸二乙酯;25、异戊酸;26、3-甲硫基丙醇;27、苯乙醇乙酸酯;28、己酸;29、苯甲醇;30、 β -苯乙醇;31、辛酸;32、癸酸。

2.3 回收率测定

从表5可知,加入31种香味成分进行回收率试验,大部分物质回收率在85%~120%之间,只有相对含量很小的丁酸乙酯,1-丁醇和含量很高的乙酸回收率偏差较大,分别为78.0%、124.7%、121.5%。事实上,用二氯甲烷作为萃取溶剂,不同种类物质的提取率相差很大,有研究^[11]发现,对于醇类和酸类物质绝对回收率只有20~70%,而对于非极性物质(如酯类)绝对回收率可高达80~100%^[10]。

另外本实验发现不同葡萄酒样品回收率也有所不同,可能由于基质的不同,对回收率造成影响,具体原因需进一步考察。

本实验要注意标液的pH一定要调至与样品接近,即pH 3.2左右,由于pH的不同,标液和样品中各种香气成分的萃取率也不同,而导致回收率结果不理想,尤其是酸类物质。

表5 葡萄酒回收率测定结果(n=6)

Table 5 Recoveries of different compounds in wine (n=6)

| 名称 | 葡萄酒中香气成分质量浓度/(mg/L) | 加标量/(mg/L) | 测得量/(mg/L) | 回收率/% | 回收率RSD/% |
|---------|---------------------|------------|------------|-------|----------|
| 丁酸乙酯 | 0.10 | 1.00 | 0.78 | 78.0 | 7.1 |
| 1-丙醇 | 19.17 | 16.00 | 18.50 | 115.6 | 4.7 |
| 异戊酸乙酯 | 0.04 | 3.03 | 2.74 | 90.4 | 8.9 |
| 异丁醇 | 29.50 | 32.08 | 30.67 | 95.6 | 3.7 |
| 乙酸异戊酯 | 0.05 | 1.30 | 1.11 | 85.4 | 7.3 |
| 1-丁醇 | 0.47 | 0.81 | 1.01 | 124.7 | 2.9 |
| 异戊醇 | 121.50 | 161.80 | 150.47 | 93.0 | 2.5 |
| 己酸乙酯 | 0.26 | 4.08 | 3.62 | 88.8 | 9.1 |
| 乙酸己酯 | 0.00 | 3.18 | 2.75 | 86.4 | 9.1 |
| 3-羟基丁酮 | 17.26 | 20.00 | 21.66 | 108.3 | 4.4 |
| 乳酸乙酯 | 109.45 | 102.00 | 114.85 | 112.6 | 3.6 |
| 己醇 | 0.90 | 0.82 | 0.89 | 108.5 | 5.5 |
| 顺-3-己烯醇 | 0.03 | 0.98 | 1.02 | 104.1 | 3.8 |
| 辛酸乙酯 | 0.04 | 3.64 | 3.18 | 87.4 | 9.7 |
| 糠醛 | 0.39 | 0.35 | 0.32 | 91.4 | 2.2 |
| 乙酸 | 240.41 | 419.60 | 509.81 | 121.5 | 5.5 |

转下页

接上页

| | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------|------|
| 3-羟基丁酸乙酯 | 0.10 | 1.53 | 1.54 | 100.7 | 4.2 |
| 丙酸 | 0.99 | 2.48 | 2.65 | 106.9 | 5.2 |
| 异丁酸 | 2.00 | 1.42 | 1.70 | 119.7 | 5.2 |
| γ-丁内酯 | 9.25 | 9.04 | 9.42 | 104.2 | 2.6 |
| 癸酸乙酯 | 0.00 | 4.02 | 3.76 | 93.6 | 11.2 |
| 丁酸 | 0.45 | 0.96 | 0.99 | 103.1 | 3.5 |
| 琥珀酸二乙酯 | 7.76 | 7.33 | 7.90 | 107.8 | 4.5 |
| 异戊酸 | 0.76 | 0.93 | 1.00 | 107.5 | 4.3 |
| 3-甲硫基丙醇 | 1.85 | 2.34 | 2.45 | 104.7 | 3.8 |
| 苯乙醇乙酸酯 | 0.26 | 0.78 | 0.79 | 101.3 | 4.2 |
| 己酸 | 1.79 | 1.86 | 1.97 | 105.9 | 4.8 |
| 苯甲醇 | 0.26 | 0.31 | 0.33 | 106.5 | 4.3 |
| β-苯乙醇 | 26.89 | 40.80 | 44.68 | 109.5 | 3.9 |
| 辛酸 | 0.63 | 0.55 | 0.56 | 101.8 | 4.4 |
| 癸酸 | 0.11 | 1.98 | 1.82 | 91.9 | 4.7 |

注：结果以4-甲基-2-戊醇为内标计算质量浓度。

用二氯甲烷作为萃取溶剂，定量了葡萄酒样品中30种香味成分，其中相对含量前十名组分排列图如图2。

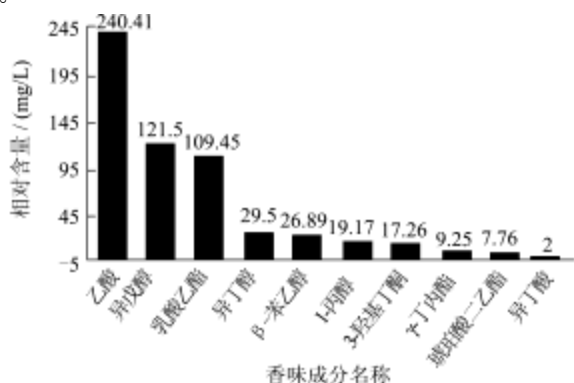


图2 葡萄酒样品中被定性香气成分中相对含量前十名组分

Fig.2 The top ten aroma compounds in wine after qualitative analysis

本试验所选用的葡萄酒样品，采用本文的分析方法定性了30种已知成分，其中相对含量前十名的为乙酸、异戊醇、乳酸乙酯、异丁醇、β-苯乙醇、1-丙醇、3-羟基丁醇、γ-丁内酯、琥珀酸二乙酯、异丁酸，如β-苯乙醇、异戊醇、琥珀酸二乙酯与文献^[12-14]报道的葡萄酒中含量较高的香气物质一致，它们的存在对于葡萄酒的风味特征有着重要的作用。但是，一些相对含量略低的香气成分对葡萄酒的风味特征也有着不可忽视的作用，例如己酸乙酯、异戊酸乙酯等，由于这些香气成分的嗅觉阈值都较低，这些香气成分对葡萄酒的整体风格特征也有重要贡献，因此，对葡萄酒中微量香气活性成分（含量高于其阈值的成分）的研究是葡萄酒风味研究的下一步工作。

2.4 10个著名产区葡萄酒中香味成分含量分析结果

有研究已对昌黎、贺兰山东麓产区的赤霞珠干红葡萄酒进行了香气分析，但由于仅是峰面积归一化法的相对含量(%), 无法进行相互之间的量化比较^[15-16], 本文以4-甲基-2-戊醇为内标，定量结果重复性良好，准确度高。采用本文建立的前处理方法和分析方法，对10个不同产区不同葡萄品种的葡萄酒中31种香味成分进行分析和测定，结果显示不同产区的葡萄酒中香味成分的含量差异较大。10个不同产区葡萄酒中香味成分含量测定结果见表6。

3 结论

3.1 本文建立了一种以少量萃取试剂和萃取时间较短的前处理方法、优化的气相色谱条件进行分析、内标法（使用标准物质计算校正因子）定量计算葡萄酒中主要挥发性成分，用3 mL葡萄酒样、7 mL水、4.5 g硫酸铵和60 μL 0.02% (V/V)的内标溶液混合，再以0.5 mL二氯甲烷为萃取溶剂，以1100 r/min涡旋10 min后，2500 r/min离心10 min，取下层提取物进行气相色谱分析，结果良好分离出63种化合物，大部分化合物精密度良好。以标准物质定性了31种香气成分，所定性成分重复性良好，有28种成分重复性实验RSD%小于10%；并且采用内标法进行定量分析，结果准确度高，有28种成分回收率在85%~120%之间。对10个不同产区不同葡萄品种的葡萄酒中31种香味成分进行定量分析，结果

显示不同产区葡萄酒中31种香味成分含量差异较大。大减少对环境的污染。为葡萄酒香气成分研究提供一个简单快速、准确的定量方法。
 3.2 该方法操作简便,前处理时间短(约22 min),并且解决了液液萃取需要使用大量有机溶剂的缺点,大

表6 10个著名葡萄酒产区葡萄酒中香味成分的含量

Table 6 Aroma compounds of wines from ten origins

| 序号 | 名称 | 含量/(mg/L) | | | | | | | | | |
|----|----------|-------------|-------------|-------------|----------------------|---------------|--------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|
| | | 昌黎 (赤霞珠) | 沙城 (赤霞珠) | 烟台 (赤霞珠) | 法国 1 (赤霞珠、梅洛、品丽珠) | 法国 2 (蛇龙珠) | 意大利 (赤霞珠) | 西班牙 1 (唐普尼罗) | 西班牙 2 (赤霞珠) | 澳大利亚 (色拉子、梅洛) | 智利 (赤霞珠、佳美娜) |
| 1 | 丁酸乙酯 | 0.099 | 0.282 | 0.210 | 0.151 | 0.160 | 0.247 | 0.236 | 0.196 | 0.320 | 0.288 |
| 2 | 1-丙醇 | 10.193 | 31.769 | 11.887 | 47.366 | 20.376 | 28.276 | 36.447 | 29.466 | 36.019 | 22.619 |
| 3 | 异戊酸乙酯 | 0.023 | 0.049 | ND | 0.002 | 0.050 | 0.051 | 0.143 | 0.141 | 0.046 | 0.165 |
| 4 | 异丁醇 | 30.989 | 42.842 | 19.600 | 43.468 | 47.343 | 41.717 | 58.721 | 89.038 | 49.319 | 68.814 |
| 5 | 乙酸异戊酯 | ND | 0.240 | ND | 0.289 | 0.003 | 0.826 | 0.595 | 0.741 | 1.146 | 1.118 |
| 6 | 1-丁醇 | 0.175 | 1.180 | 0.374 | 0.931 | 0.696 | 1.182 | 1.711 | 1.079 | 1.345 | 1.098 |
| 7 | 异戊醇 | 80.073 | 176.261 | 53.459 | 115.431 | 83.257 | 169.478 | 191.600 | 247.130 | 194.340 | 218.333 |
| 8 | 己酸乙酯 | 0.066 | 0.359 | 0.198 | 0.239 | 0.145 | 0.285 | 0.716 | 1.442 | 1.101 | 0.488 |
| 9 | 乙酸己酯 | 0.095 | 0.057 | 0.058 | 0.254 | 0.352 | 0.226 | 0.003 | 0.158 | 0.003 | ND |
| 10 | 3-羟基丁酮 | 1.422 | 15.533 | 3.627 | 16.800 | 2.326 | 13.307 | 33.277 | 24.830 | 11.783 | 40.327 |
| 11 | 乳酸乙酯 | 26.279 | 288.527 | 114.433 | 362.049 | 173.603 | 193.771 | 273.185 | 338.287 | 299.046 | 300.582 |
| 12 | 己醇 | 0.540 | 1.594 | 0.339 | 1.766 | 0.414 | 1.494 | 1.889 | 2.140 | 1.387 | 2.257 |
| 13 | 顺-3-己烯醇 | 0.001 | 0.136 | 0.002 | 0.083 | 0.003 | 0.110 | 0.187 | 0.106 | 0.164 | 0.096 |
| 14 | 辛酸乙酯 | 0.004 | 0.009 | 0.130 | 0.353 | 0.009 | 0.31 | 0.264 | 0.328 | 0.440 | 0.299 |
| 15 | 糠醛 | 0.279 | 0.654 | 0.743 | 4.433 | 0.511 | 0.354 | 5.200 | 0.533 | 0.288 | ND |
| 16 | 乙酸 | 64.870 | 546.861 | 153.127 | 428.521 | 312.580 | 536.869 | 685.214 | 785.374 | 471.807 | 355.344 |
| 17 | 3-羟基丁酸乙酯 | 0.010 | 0.554 | 0.007 | 0.172 | 0.005 | 0.345 | 0.388 | 0.391 | 0.499 | 0.301 |
| 18 | 丙酸 | ND | 0.059 | ND | 1.809 | 0.069 | 2.027 | 2.109 | 1.554 | 1.312 | 0.846 |
| 19 | 异丁酸 | ND | 1.133 | 1.383 | 1.233 | 1.092 | 1.421 | 2.254 | 3.088 | 1.585 | 2.229 |
| 20 | γ-丁内酯 | 3.750 | 20.564 | 5.896 | 23.817 | 8.511 | 19.188 | 31.680 | 31.292 | 40.644 | 64.202 |
| 21 | 癸酸乙酯 | ND | ND | ND | 0.007 | ND | ND | ND | 0.013 | 0.004 | 0.197 |
| 22 | 丁酸 | 0.146 | 2.129 | 0.301 | 0.742 | 0.581 | 1.61 | 1.962 | 1.407 | 2.165 | 1.375 |
| 23 | 琥珀酸二乙酯 | 3.702 | 18.321 | 4.901 | 11.578 | 6.595 | 12.383 | 35.107 | 18.703 | 19.961 | 22.161 |
| 24 | 异戊酸 | 0.277 | 1.0720 | 0.220 | 0.803 | 0.670 | 1.351 | 2.206 | 2.574 | 1.418 | ND |
| 25 | 3-甲硫基丙醇 | 1.094 | 1.725 | 0.835 | 1.448 | 2.802 | 2.336 | 4.758 | 4.092 | 2.256 | 4.084 |
| 26 | 苯乙醇乙酸酯 | 0.066 | 0.494 | 0.059 | 0.571 | 0.200 | 0.504 | 1.058 | 0.807 | 1.214 | 1.768 |
| 27 | 己酸 | 0.302 | 2.123 | 1.437 | 1.234 | 0.701 | 1.660 | 1.481 | 1.461 | 2.416 | 2.149 |
| 28 | 苯甲醇 | 0.111 | 0.687 | 0.004 | 0.230 | 0.117 | 0.342 | 0.560 | 0.694 | 0.353 | 1.030 |
| 29 | β-苯乙醇 | 8.221 | 23.542 | 10.154 | 16.964 | 13.213 | 31.491 | 55.509 | 54.207 | 32.173 | 67.280 |
| 30 | 辛酸 | 0.294 | 1.611 | 1.128 | 1.663 | 0.939 | 1.661 | 1.522 | 1.372 | 1.966 | 1.946 |
| 31 | 癸酸 | 0.059 | 0.240 | 0.084 | 0.320 | 0.114 | 0.210 | 0.292 | 0.365 | 0.296 | 0.248 |

注:结果以4-甲基-2-戊醇为内标计算含量;ND表示未检出。

参考文献

[1] 李华.葡萄酒品尝学[M].北京:中国青年出版社,1992

[2] Bintsis T, Robins on R K. Study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese [J]. Food Chemistry, 2004, 88: 435-441

- [3] 高培钧,程劲松,王承明.葡萄酒原产地判定技术研究进展[J].中外葡萄与葡萄酒,2012,5:58-63
GAO Pei-jun, CHENG Jin-song, WANG Cheng-ming. The progress of research on distinguish the original production place of grape wine [J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2012, 5: 58-63
- [4] Jose M, Gomez M. Volatile components of zalema white wines [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1464-1473
- [5] Rapp A, Memdery H. Wine aroma [J]. Experientia, 1986, 42: 873-884
- [6] 雷安亮,钟其顶,刘长江,等.葡萄酒香气分析方法研究现状及应用展望[J].酿酒,2008,35(6):27-28
LEI An-liang, ZHONG Qi-ding, LIU Chang-jiang, et al. A study of analytic techniques of arama compounds in wines and prospects for its application [J]. Liquor Making, 2008, 35(6): 27-28
- [7] 李艳,康俊杰,成晓玲,等.3种酿酒酵母酿造赤霞珠干红葡萄酒的香气成分分析[J].食品科学,2010,31(22):378-382
LI Yan, KANG Jun-jie, CHENG Xiao-ling, et al. Aroma components in cabernet sauvignon dry red fermented with three species of yeast strains [J]. Food Science, 2010, 31(22): 378-382
- [8] 李华,李佳,王华,等.昌黎原产地域赤霞珠干红葡萄酒香气成分研究[J].西北农林科技大学学报,2007,35(6):94-98
LI Hua, LI Jia, WANG Hua, et al. Study on aroma components in cabernet sauvignon wines from changli original producing area [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat.Sci.Ed), 2007, 35(6): 94-98
- [9] 李华,陶永胜,康文怀,等.葡萄酒香气成分的气相色谱分析研究进展[J].食品与生物技术学报,2006,25(1):99-104.
LI Hua, TAO Yong-sheng, KANG Wen-huai, et al. Wine aroma analytical investigation progress on GC [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2006, 25(1): 99-104
- [10] V Ferreira, L Ortega, A Escudero, J Cacho, J Chromatogr. A comparative study of the ability of different solvents and adsorbents to extract aroma compounds from alcoholic beverages [J]. Sci, 2000, 38: 469-476
- [11] Catalina Ortega, Ricardo Lo'pez, Juan Cacho. Fast analysis of important wine volatile compounds development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 923: 205-214
- [12] 李华,胡博然,杨新元,等.蛇龙珠干红葡萄酒香气成分的GC-MS分析[J].分析测试学报,2004,23(1):85-87
LI Hua, HU Bo-ran, YANG Yin-yuan, et al. Analysis of aromatic composition in the dry red wine of cabernet gernischt by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2004, 23(1): 85-87
- [13] 李华,胡博然,张予林,贺兰山东麓地区霞多丽干白葡萄酒香气成分的GC/MS分析[J].中国食品学报,2004,4(3):72-75
LI Hua, HU Bo-ran, ZHANG Yu-lin. Analysis of aromatic composition in the dry white wine of chardonnay by gas chromatography/mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2004, 4(3): 72-75
- [14] 李华,王华,刘拉平,等.爱格丽白葡萄酒香气成分的GCMS分析[J].中国农业科学,2005,38(6):1250-1254
LI Hua, WANG Hua, LIU La-ping, et al. Analysis of aroma components of ecolly dry white wine by gas chromatography /mass spectrometry [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(6): 1250-1254
- [15] 胡博然,杨新元,汪志君,等.贺兰山东麓地区葡萄酒香气成分分析研究[J].农业机械学报,2005,36(12):87-90,113
HU Bo-ran, YANG Xin-yuan, WANG Zhi-jun, et al. Analysis of aromatic composition in different mono-varietal dry wines from eastern region of ningxia helan mountain [J]. Transactions of Chinese Society for Agriculture Machinery, 2005, 36(12): 87-90, 113