

折光率检测器离子交换 HPLC 法测定葡萄酒和葡萄汁中主要有机酸、糖、甘油和乙醇

张学俊 温州大学 325027

摘 要 提出一个利用折光率检测器、离子交换、HPIC 同时分离和测定葡萄酒和葡萄汁中主要有机酸、糖、甘油和乙醇的方法。用一个强阴离子交换的固相萃取柱消除糖对酸测定的干扰,从而实现甜葡萄酒和葡萄汁中苹果酸的准确测定,并对该法的线性范围、相关系数、标准偏差、以及不同方法进行了分析对比。

关键词 高效液相色谱 葡萄酒分析 折光率检测器

Abstract The method to determine the major Carboxylic acids, Sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must is developed using an ion-exchange column and refractive index detector. A solid-phase extraction method with a strong anion exchanger is used to determine these compounds. The method is validated by determining the repeatability, reproducibility, correlation coefficients, recovery efficiency and accuracy and was compared with different methods of analysis.

Keyword High-performance liquid chromatography Analysis of wine Refractive index detector

有机酸和糖的含量直接影响葡萄酒的感官性质,也是酒的制造和投放市场法定检测项目。官方分析家协会规定用传统的酶法和滴定法测定葡萄酒中有机酸^[1],既费时又麻烦,近年来色谱分析已成为有机酸分析的常用方法^[2],其中反效高效液相色谱法是测定葡萄酒和葡萄汁中有机酸、糖、甘油和乙醇的最好方法。

反相 HPIC 分析酒样通常又有两种方法。一种是用离子交换剂对酒样进行预处理,以消除干扰;另一种是用一种衍生化试剂进行柱后衍生化,再用紫外检测器测定。离子交换 HPIC 的优点是流动相简单和便宜,不使用甲醇、乙腈等有机溶剂作洗脱剂,只用水和稀酸、盐作洗脱剂,试样中大分子的蛋白质和多糖被排斥,与流动相一起排出,使试样前处理变得简单。使用折光率检测器主要问题是葡萄糖和果糖的存在对苹果酸的测定有严重干扰。

参照 Culull^[7]的工作,用一个强阴离子交换柱对试样进行预处理,用折光率检测器,对葡萄酒和葡萄汁中柠檬酸、酒石酸、葡萄糖、苹

果酸、果糖、琥珀酸、乳酸、甘油、乙酸、乙醇 10 个组分同时测定。

1 实验

1.1 仪器:岛津 LC-6A 液相色谱仪 岛津 SPD-6A 紫外光度检测器 RID 折光率检测器 CR-3A 数据处理机 SCL-6A 系统控制器 IoN-300 (300×6.0) 氢型阴离子交换柱

1.2 试剂和标准溶液

试剂:6 种有机酸、葡萄糖、果糖、甘油、乙醇均为分析纯 (A、R)

标准溶液用自制重蒸馏水经离子交换和 0.45 μ m 滤膜过滤后配制。有机酸、糖、甘油和乙醇标准溶液,按常见葡萄酒各组分典型浓度范围。每组分按 7 个标准系列单独配制。综合标准按:有机酸、糖、甘油为 2.5g/L,乙醇 5% (V/V) 配制。

1.3 试样

实验用酒样为温州市场上的张裕白葡萄酒、张裕红葡萄酒、丰收中国红葡萄酒、青岛

白葡萄酒、多高胎白葡萄酒, 葡萄汁为温州永嘉岩头成熟葡萄榨汁后放冰箱保存。

1.4 样品制备

不同分析试样采取不同的预处理方法

1.4.1 对酒样用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤

1.4.2 为延长柱寿命对红葡萄酒和葡萄汁用一个 C_{18} 柱(自制)分离酚类物质, C_{18} 柱先用 1ml 甲醇/水 (10/90) 活化, 再通过 1ml 酒样, 用 1.5ml $0.050\sim 0.025\text{M}$ 的 H_2SO_4 洗脱, 对白葡萄酒或白葡萄汁, 只要将酒样稀释直接进样。

1.4.3 为将酒样中中性和酸性组分分开, 用一个强阴离子交换柱(SAX), SAX 柱是用一种强阴离子交换剂(硅键合四胺基)装填在一个 3ml 塑料或玻璃管中, 先用 3ml 蒸馏水清洗, 将已用 10M NaOH 调节 $\text{pH}=7\sim 8$ 并以 1:2 稀释的酒样 0.5ml 通过该柱, 对葡萄酒样用 1ml 水洗脱, 收集中性组分 1.5ml。对葡萄汁样用 2ml 水洗脱, 收集中性组分 2.5ml; 为洗脱酸性组分, 用 2 份 0.5ml 体积的 $0.5\text{MH}_2\text{SO}_4$ 洗脱。

2 结果和讨论

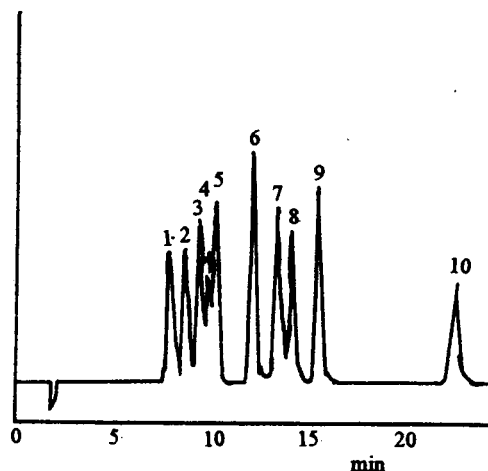
2.1 色谱分析条件的选择

参照 Calull 的工作选择柱温: 40°C (高于室温)至 80°C (柱能承受最高温度), 流动相流速: $0.2\sim 1\text{ml}/\text{min}$ 流动相浓度: $0.005\sim 0.05\text{M}$ 的 H_2SO_4 。根据连续和同时性原则, 应用单一法和模式响应表面法^[8]确定最佳色谱分析条件为: 流动相浓度: $0.01\text{MH}_2\text{SO}_4$, 流动相流速: $0.7\text{ml}/\text{min}$, 柱温 65°C , 在以上色谱条件下用综合标准进样得到标准色谱图 (图 1)。

从图 1 看出: 除葡萄糖、苹果酸、果糖外, 其他各组分分离较好, 在分析高糖的甜葡萄酒和葡萄汁时苹果酸的峰可以完全被葡萄糖和果糖的峰所淹没, 不可能测定苹果酸。测定葡萄汁时因糖含量太高超过方法的线性范围, 如要准确测定葡萄汁含量一般将试样稀释 50 倍, 但有机酸的测定又因灵敏度太低而无法测定, 这一问题用柱和色谱条件的调节无法解决, 只能通过试样预处理解决。

2.2 SAX 预处理

在选定的色谱分析条件下, 用一个低糖的张裕白葡萄酒未经 SAX 处理直接进样, 称为直接法, 测得色谱图 2。直接法对柠檬酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、乙酸、甘油和乙醇有好的分离, 对葡萄糖、苹果酸和果糖分离较差, 测定准确度差些。同一酒样经 SAX 处理后进样, 称为间接法, 间接法酸性部分色谱图 (图 3) 在相当于葡萄糖、苹果酸和果糖 3 个峰出现的位置, 只有一个相当苹果酸的峰出现。



峰: 1=柠檬酸, 2=酒石酸, 3=葡萄糖, 4=苹果酸, 5=果糖, 6=琥珀酸, 7=乳酸, 8=甘油, 9=乙酸, 10=乙醇

图 1 综合标准样色谱图

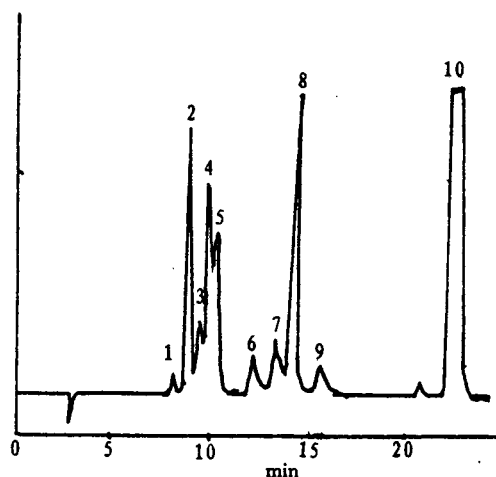


图 2 未经 SAX 处理的葡萄酒样色谱图

(峰号同图 1)

图 4 表示经 SAX 萃取后中性组分的色谱

图。甘油和乙醇出现很强的峰,在相当葡萄糖、苹果酸和果糖峰的位置出现3个峰,峰3是葡萄糖,峰5是果糖,★峰经与不同色图谱方法比较研究,不是苹果酸,是另一个与苹果酸共洗脱的未知中性组分,所以萃取后的中性部分能够准确测定葡萄糖、果糖、甘油和乙醇。

2.3 线性响应

在葡萄酒中有机酸、糖、醇和乙醇的典型含量范围内,每组分选7个浓度级,以峰面积对浓度作标准曲线、按实验数据求各组分的保留时间(t_R),回归方程的相关系数(r)和检测限(LOD)(表1)。

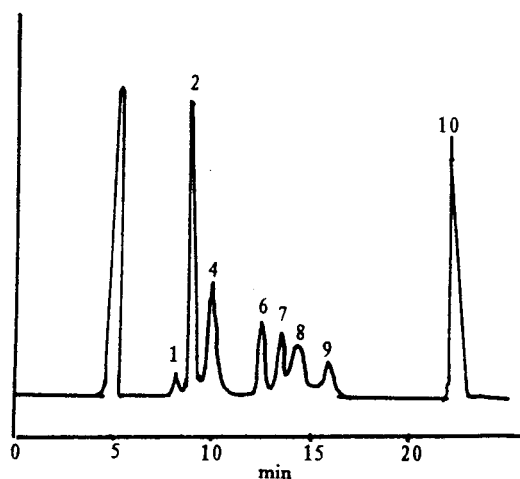


图3 经SAX处理后的葡萄酒酸性部分色谱图
(峰号同图1)

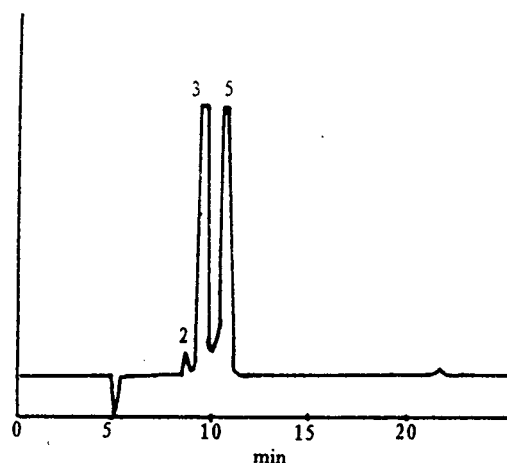


图5 葡萄汁经1:50稀释后色谱图
(峰号同图1)

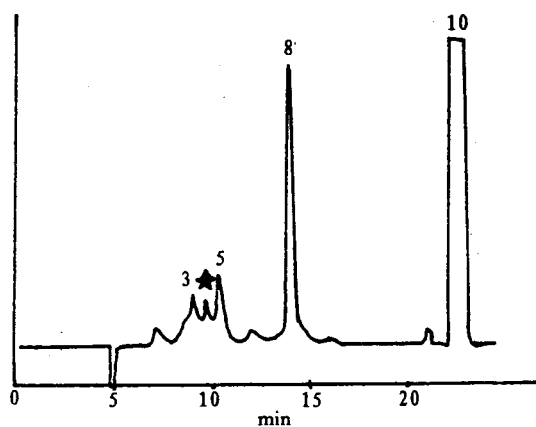


图4 经SAX处理后葡萄酒中性部分色谱图
(★=未知峰,其他峰与图1相同)

分析葡萄汁试样只要将试样稀释就能准确测定葡萄糖和果糖(图5)在主峰葡萄糖和果糖峰之前有一个小的酒石酸峰2出现,其他组分均未出峰。葡萄汁经SAX萃取后(图6)的酸性部分能够用来测定柠檬酸、酒石酸和苹果酸。

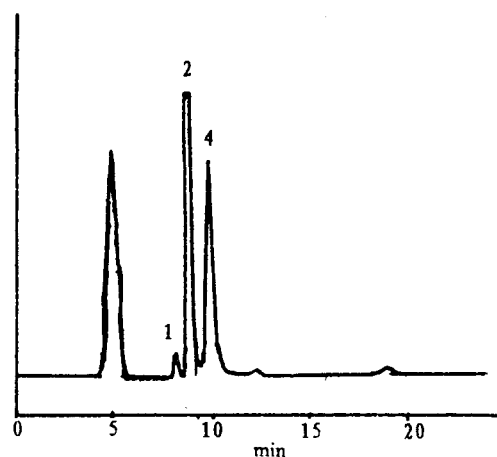


图6 葡萄汁经SAX处理后酸性部分色谱图
(峰号同图1)

2.4 精密度

用一个张裕白葡萄酒样经SAX处理的中性部分测定葡萄糖、果糖、甘油、乙醇,酸性部分测定各有机酸。进行日内和日间重复测定,

计算日内 10 次重复测定的相对标准偏差和 10 天内每天重复 10 次测定平均值的相对标准偏差 (表 2)。

表 1 单标准溶液的保留时间 (t_R)、相关系数 (r) 和检测限 (LOD)

组分	浓度 (g/L)	t_R (min)	r	LOD (g/L)
柠檬酸	0.04~0.60	8.45	0.9991	0.045
酒石酸	0.20~2.22	9.21	0.9993	0.060
葡萄糖	0.08~1.00	9.65	0.9992	0.055
苹果酸	0.060~3.400	10.35	0.9995	0.210
果糖	0.30~6.00	10.52	0.9998	0.250
琥珀酸	0.20~2.00	12.48	0.9996	0.065
乳酸	0.10~1.90	13.53	0.9990	0.150
甘油	0.50~8.50	14.41	0.9999	0.25
乙酸	0.005~0.15	15.88	0.9992	0.002
乙醇	0.60~14	22.55	0.9995	0.35

*: 用 % (V/V) 表示

表 2 白葡萄酒日内和日间重复性和重现性实验

组 分	重复性 (n=10)		重现性 (n=10)	
	平均 (g/L)	RSD (%)	平均性 (g/L)	RSD (%)
柠檬酸	0.30	2.15	0.30	2.01
酒石酸	1.46	2.53	1.47	1.35
葡萄糖	0.60	1.28	0.59	0.98
苹果酸	1.18	1.85	1.15	2.01
果糖	0.65	2.10	0.69	2.35
琥珀酸	0.33	2.15	0.38	2.42
乳酸	0.40	2.61	0.40	2.15
甘油	4.07	1.05	4.12	0.95
乙酸	0.09	3.80	0.08	4.01
乙醇 *	11.28	1.02	11.28	1.56

*: 用 % (V/V) 表示

2.5 准确度

选用一个准确测定浓度的张裕白葡萄酒为基准, 用 SAX 处理后定量添加单标准组分, 由其测定值和计算值计算回收率 (表 3)。用一个张裕白葡萄酒样, 用直接法、间接法和折光率和紫外检测器结合法^[9] 3 种方法测定 (表 4), 从结果看出: 3 种方法的测定结果除苹果酸外, 其它 9 个组分具有好的一致性, 直接法测定苹果酸结果比其他 2 种方法明显偏高; 这是一个未知中性组分与苹果酸共洗脱引起的, 所以准确

测定苹果酸只能用间接法, 测定除苹果酸外的其他组分可以用直接法。

表 3 白葡萄酒的回收率实验

组 分	浓 度 (g/L)				回收率 %
	酒样	加入量	计算值	测定值	
柠檬酸	0.30	0.5	0.80	0.79	98.8
酒石酸	1.46	0.5	1.96	1.94	99.0
葡萄糖	0.60	0.5	1.10	1.14	103.6
苹果酸	1.18	0.5	1.68	1.61	95.8
果糖	0.65	0.5	1.15	1.16	100.9
琥珀酸	0.33	0.5	0.83	0.84	101.2
乳酸	0.40	0.5	0.90	0.88	97.8
甘油	4.07	0.5	4.57	4.56	99.8
乙酸	0.09	0.1	0.19	0.18	94.7
乙醇 *	11.28	2	13.28	13.35	100.5

*: % (v/v) 表示浓度

表 4 直接法 (A)、间接法 (B)、紫外折光率检测法 (C) 葡萄酒样测定结果

组 分	浓 度 (g/L)		
	A	B	C
柠檬酸	0.31	0.30	0.31
酒石酸	1.49	1.46	1.48
葡萄糖	0.57	0.60	0.58
苹果酸	1.54	1.18	1.15
果糖	0.70	0.65	0.68
琥珀酸	0.37	0.33	0.35
乳酸	0.42	0.40	0.42
甘油	4.13	4.07	4.10
乙酸	0.11	0.09	0.10
乙醇 *	11.32	11.28	11.28

*: % (v/v) 表示浓度

3 结论

折光率检测器离子交换色谱法是测定葡萄酒和葡萄汁中羧酸、糖、甘油和乙醇的好方法, 酒样经 SAX 处理后其方法回归方程的线性相关系数: 0.9990~0.9999, 日内的重复测定 RSD: 1.02~3.80%, 日间重现性测定的 RSD: 0.95~4.01%, 回收率: 94.7~103.6%, 检测限能满足一般葡萄酒样的测定。直接法、间接法和紫外折光率检测器结合的方法比较, 除苹果酸外的其他主要组分测定具有好的一致性, 对一般葡萄酒样在 30min 内能同时测定除苹果

酸外的其它 9 个主要组分, 是一个既准确又快速的葡萄酒中主要组分的测定方法, 本方法能有效地应用于制酒工业的质量控制和市场酒类的质量监测。

参考文献

- 1 official Methods of Analysis. 14th Association of official Analytical chemists, Arlington, VA 1984.
2. S. C. Churms. J. Chromatogr. 1990, 500, 555~83.
- 3 D Tusseau and C. Benoit. J. Chromatogr. 1987, 395, 323~33
- 4 E. Mentasti. M. c. Gennaro, C. sarzanini, C. Baiocch, and M. savigliano. J. Chromatogr. 1985, 322, 177~89.
- 5 F. Caccamo, G. Carfagnini, A. Corlia, and R. Samperi. J. Chromator 1986, 362, 47~53.
- 6 关家锐, 邓丛蕊, 王吉顺, 王叔仁. 色谱. 1993, 11 (5): 262.
- 7 M. Calull, R. M. Marce, and F. Borrull. J. chromatogr. 1992, 590, 215~222.
- 8 M. Caull et al. J. Chromatogr. 1992, 589, 151~158.
- 9 张学俊. 温州大学学报, 1997, 1, 1~5.

原子吸收光谱法测定鱼体总汞的研究

吕加平 东北农业大学 150030

摘 要 采用 IL 公司产 Video22 原子吸收分光光度计及氢化物吸收池, 利用冷原子吸收光谱法测定鱼体总汞, 并进行了条件优化和样品预处理方法的研究。结果表明: 该方法灵敏度为 0.51ppb, 精密密度为 5.56%, 回收率平均为 89.11%。样品消解采用了硝酸——过氧化氢 (2:1) 高压密封溶样法。实验表明: 该方法消解样品完全、快速, 样液无色透明, 无刺激性气味, 测定重现性好, 优于常规使用的硝酸——高氯酸, 硝酸——硫酸消化法。

关键词 原子吸收光谱法 鱼汞

关于汞的测定方法报道较多^[1~3], 国内大多采用国产专用测汞仪。随着分析仪器的现代化, 痕量分析日趋精确、快速。本实验采用了两端具石英窗的氢化物吸收池(如测砷时采用, 而汞吸收池无石英窗)进行汞测定方法的研究, 以便找出最佳的仪器工作条件及优选出较理想的样品消解方法。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 Video22 原子吸收分光光度计: 美国实验仪器公司生产 (包含氢化物吸收池)。

1.1.2 高压密封溶样罐 (聚四氟乙烯): 沈阳 81947 部队生产。

1.1.3 试剂: 所用消解试剂盐酸、硝酸等均为优级纯。分析用水为去离子水。氯化亚锡为分析纯。

1.1.4 汞标准贮备液: 准确称取干燥后的氯化汞 (HgCl_2 : 光谱纯) 0.1354g, 加浓硝酸 5ml 溶解后用去离子水定容至 100ml, 此溶液即为 1mg/ml。

1.1.5 鱼样: 采自农贸市场。

1.2 方法

1.2.1 样品处理方法

称取 1.00g 鱼肌肉于聚四氟乙稀高压密封溶样罐中, 分别采用硝酸——过氧化氢 (2:1), $\text{HNO}_3-\text{HClO}_4$ (2:1), $\text{HNO}_3-\text{H}_2\text{SO}_4$ (1:2) 来进行消解, 消解温度为 110~120℃, 消