

使用 SPME 分析烟污染葡萄酒中的游离挥发酚

作者

Jessica Westland 和
Vanessa Abercrombie
安捷伦科技有限公司

摘要

自从 2003 年野火席卷澳大利亚及不列颠哥伦比亚省以来，烟污染已经在全球范围内成为葡萄酒生产的关注焦点^[1]。随着野火灾害事件在世界各地频频发生，种植户和酿酒厂越来越担心烟污染对葡萄及葡萄酒的影响。安捷伦开发了固相微萃取 (SPME) 气相色谱/质谱 (GC/MS) 方法，用于分析烟污染带来的游离挥发酚。用于分析烟污染产生的游离挥发酚的安捷伦 SPME-GC/MS/MS 方法，能够实现可靠的鉴定和定量分析。

前言

研究显示，葡萄藤和葡萄会吸收烟类化合物，从而导致葡萄酒产生异味。虽然有充分证据表明此类化合物大多以非挥发物形态存在于葡萄及葡萄汁中，但人们一直将它们游离组分的分析作为筛选葡萄、评估其对葡萄酒影响的工具^[2]。在葡萄酒酿造过程中，葡萄的生长和成熟无疑是最重要的步骤。在葡萄转色期间，其酸浓度降低，糖浓度升高，同时芳香与风味化合物开始生成。许多外部因素决定了葡萄成熟和收获的时机，其中天气条件影响最大。其他与温度无关的环境条件，如附近火灾产生的烟雾也会对葡萄酒的感官品质产生严重的负面影响^[3]。

愈创木酚和 4-甲基愈创木酚已被确定为引起烟污染葡萄酒产生异味的主要挥发性芳烃。虽然葡萄酒在橡木桶中陈酿时也会导致愈创木酚和 4-甲基愈创木酚的浓度升高，这两种化合物的比例会有所不同。烟污染浆果中的愈创木酚含量是 4-甲基愈创木酚含量的四倍^[2]。橡木桶所产生的香气被视为烟和焦炭，相比之下，受到烟污染而出现这两种化合物时，气味更像是篝火和烟灰缸，这种气味是不希望在葡萄酒中出现的。

烟污染化合物的分析检测限必须足够灵敏，才能够检测低于 1 ppb 的浓度，这也是 GC/MS 分析中常用选择离子监测 (SIM) 或多反应监测 (MRM) 的原因。直接分析葡萄酒难度很大，因为糖类、有机酸和其他芳香族化合物具有较强保留性。

为简化这些挥发性化合物的提取与分析，SPME 成为了理想的提取方法。由于此技术操作简便、适用于自动化、减少有机溶剂用量以及可在气相色谱仪中直接热脱附，因此得到普遍应用。

实验部分

目标挥发物

烟中的主要挥发酚 — 愈创木酚和 4-甲基愈创木酚，是烟污染葡萄酒的常用标记物。它们的各自浓度与葡萄酒受烟污染的程度密切相关，在并未接触过熏烤橡木桶的葡萄酒中更是如此。不过，它们并不是仅有的两种在烟污染葡萄酒中发现并分析的化合物。表 1 列出了本实验分析的所有目标游离挥发酚。

表 1. 目标游离挥发酚

CAS 号	化合物
74495-69-5	愈创木酚-d3
90-05-1	愈创木酚
93-51-6	4-甲基愈创木酚
95-48-7	邻甲酚
13127-88-3	苯酚-d6
108-95-2	苯酚
95-87-4	2,5-二甲基苯酚
2785-89-9	4-乙基愈创木酚
90-00-6	2-乙基苯酚
108-68-9	3,5-二甲基苯酚
106-44-5	对甲酚
108-39-4	间甲酚
123-07-9	4-乙基苯酚
91-10-1	2,6-二甲氧基苯酚

方法

样品前处理：

- 20 mL 顶空样品瓶和瓶盖（部件号 5188-6537 和 5188-2759）
- 10 mL 样品中加入 4 g NaCl（图 1）
- 添加 NaCl 至饱和后，烟污染葡萄酒和葡萄酒中的目标化合物响应值平均上升 95%^[4]



图 1. 20 mL 棕色顶空样品瓶，分别盛装水和葡萄酒样品

- 添加校准品和/或内标 (ISTDs) 的样品
- ISTDs 加标浓度为 10 ppb
- Agilent SPME Arrow DVB/碳 WR/PDMS, 1.10 mm, 120 μm（部件号 5191-5861）
- 选择 DVB/碳 WR/PDMS SPME 相是因为它们能够选择性提取气味和风味化合物
- 与传统 SPME 纤维头相比，SPME Arrow 的吸附相体积更大，提取效率更高，因此选择 SPME Arrow^[5]

在与 Agilent 7000D 三重四极杆 GC/MS 系统配套使用的 Agilent 8890 气相色谱系统上安装 Agilent PAL3 自动进样器（具备自动更换进样模块 (RTC) 功能）。SPME 顶空参数、GC 方法设置及 MS 条件分别列于表 2、表 3 和表 4 中。表 5 列出了用于 GC/MS/MS 分析的 MRM 离子对。

表 2. SPME 顶空参数

参数	设置
预老化时间	3 min
预老化温度	250 °C
孵化时间	5 min
Heatex 搅拌器速度	1000 rpm
Heatex 搅拌器温度	40 °C
样品萃取时间	10 min
样品脱附时间	3 min

表 3. Agilent 8890 气相色谱仪设置

参数	设置
进样口衬管	进样口衬管，超高惰性，不分流，直型，2 mm 内径（部件号 5190-6168）
进样口模式，温度	不分流，250 °C
控制模式	恒流 (1.2 mL/min)
色谱柱	Agilent J&W DB-HeavyWAX 气相色谱柱, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm（部件号 122-7132）
柱温箱升温程序	120 °C（保持 1 min）；以 10 °C/min 升至 250 °C（保持 0 min）；以 60 °C/min 升至 280 °C（保持 0 min）

表 4. Agilent 7000D 三重四极杆 GC/MS 系统条件

参数	设置
传输线	280 °C
采集模式	dMRM
溶剂延迟	3.0 min
调谐文件	Atune.eiex
增益	10
质谱离子源温度	280 °C
质谱四极杆温度	150 °C

表 5. 用于游离挥发酚的 MRM 离子对

CAS 号	化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE (V)
74495-69-5	愈创木酚-d3	127	109	15
		126.9	109	15
90-05-1	愈创木酚	124.1	109	15
		124.1	81	15
93-51-6	4-甲基愈创木酚	138.1	95	15
		138	123	15
95-48-7	邻甲酚	108.1	107.1	15
		107.1	77	15
13127-88-3	苯酚-d6	99.1	71	10
		71	69	10
108-95-2	苯酚	94	66	10
		66	65	10
95-87-4	2,5-二甲苯酚	122	107	15
		122	94	15

CAS 号	化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE (V)
2785-89-9	4-乙基愈创木酚	152	137	15
		137.1	122	15
90-00-6	2-乙基苯酚	122.1	107.1	15
		107.1	77	15
108-68-9	3,5-二甲苯酚	121.1	107.1	15
		121.1	77	15
106-44-5	对甲酚	108.1	107.1	15
		107.1	77	15
108-39-4	间甲酚	108.1	107.1	15
		107.1	77	15
123-07-9	4-乙基苯酚	122.1	107	15
		108.1	78	15
91-10-1	2,6-二甲氧基苯酚	154	139	15
		139.1	83	15

结果与讨论

校准

空白对于质量控制和定量分析方法的可靠性都很重要。本实验使用 Milli-Q (18.2 Ω) 水作为空白，模拟不带来任何干扰的洁净基质。而由于葡萄酒中含有多种会干扰目标分析物检测的组分，因此选择白葡萄酒作为基质空白。

表 6 列出了在 Milli-Q 水中进行校准时目标游离挥发物的校准范围和线性值。图 2 同时显示了愈创木酚和 4-甲基愈创木酚的 Milli-Q 水校准曲线。

为计入愈创木酚和 4-甲基愈创木酚定量分析中的基质效应，选择了一种盒中袋包装的白葡萄酒。选择这种基质的原因是：

- 在发酵工艺前，烟污染化合物所处的果皮部分已经与果汁分离
- 这是一种不明确的混合物，能代表组分更复杂的基质
- 这种包装消除了橡木桶和软木塞对葡萄酒的影响

表 6. Agilent 7000D 三重四极杆 GC/MS 在 Milli-Q 水中的校准范围和 R²

化合物	校准范围 (ppb)	R ²
愈创木酚	0.2–50.3	0.999
4-甲基愈创木酚	0.1–25	0.999
邻甲酚	0.2–50	0.996
苯酚	0.5–125.5	0.997
2,5-二甲基苯酚	0.1–25	0.998
4-乙基愈创木酚	0.1–25	0.998
2-乙基苯酚	0.03–7.5	0.995
3,5-二甲基苯酚	0.1–5	0.998
对甲酚	0.1–25	0.997
间甲酚	0.1–25	0.998
4-乙基苯酚	0.1–25	0.998
2,6-二甲氧基苯酚	0.1–25	0.998*

* 类型 = 二次拟合，原点 = 强制，加权 = 1/x

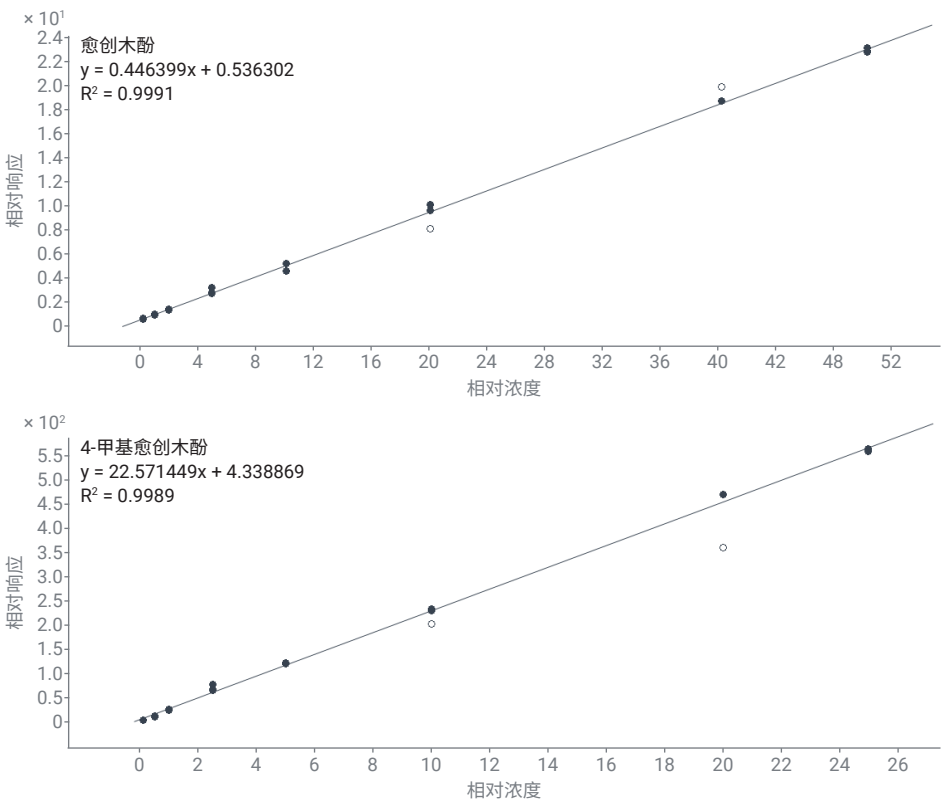


图 2. 愈创木酚和 4-甲基愈创木酚在 Milli-Q 水中的校准曲线

表 7 列出了在袋装生产白葡萄酒中进行校准时目标游离挥发物的校准范围和线性值。图 3 同时显示了愈创木酚和 4-甲基愈创木酚的白葡萄酒校准曲线。

表 7. Agilent 7000D 三重四极杆 GC/MS 在白葡萄酒中的校准范围和 R²

化合物	校准范围 (ppb)	R ²
愈创木酚	0.2–50.3	0.993
4-甲基愈创木酚	0.1–25	0.996
邻甲酚	0.2–50	0.996
苯酚	0.5–125.5	0.997
2,5-二甲基苯酚	0.1–25	0.996
4-乙基愈创木酚	0.1–25	0.996
2-乙基苯酚	0.03–7.5	0.995
3,5-二甲基苯酚	0.1–5	0.998
对甲酚	0.1–25	0.995
间甲酚	0.1–25	0.995
4-乙基苯酚	0.1–25	0.996
2,6-二甲氧基苯酚	0.1–25	0.995

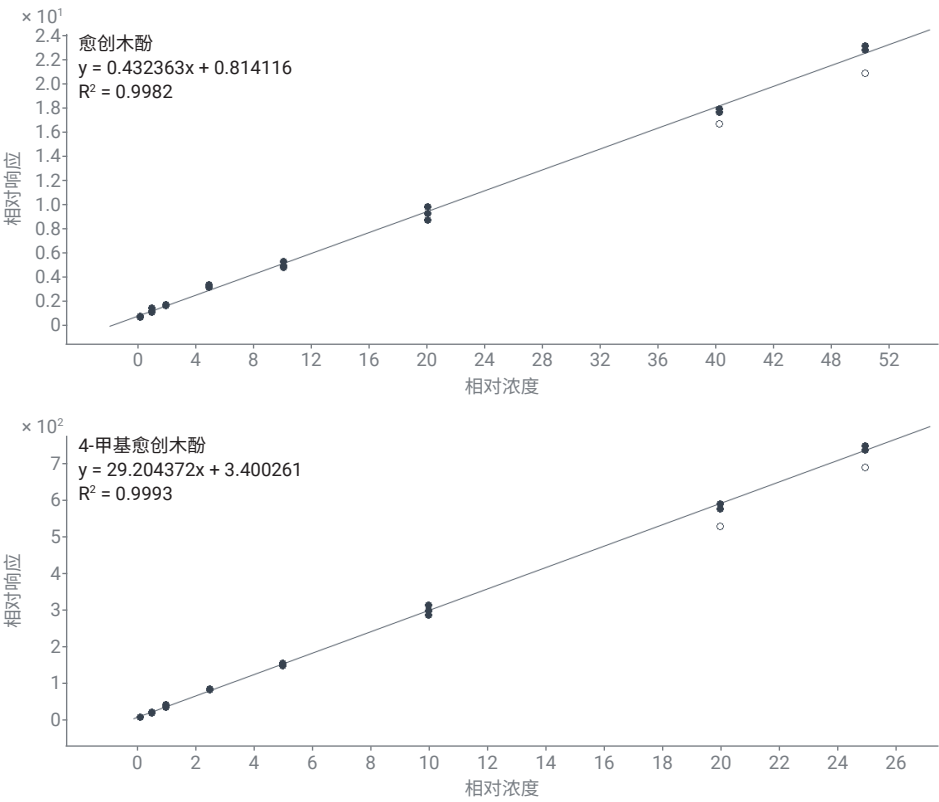


图 3. 愈创木酚和 4-甲基愈创木酚在白葡萄酒中的校准曲线

烟污染标记物的定量分析

观察到未受烟污染的葡萄中愈创木酚和 4-甲基愈创木酚的含量均在 0.1–0.3 ppb。愈创木酚的含量超过 1 ppb 即可表明葡萄受到过烟污染，而烟污染葡萄中的愈创木酚含量高达 55 ppb。通常情况下，在受到烟污染的不合格葡萄和葡萄酒中观察到愈创木酚和 4-甲基愈创木酚的比例为 3.7:1^[2]。

在所有葡萄酒样品及白葡萄酒空白中的愈创木酚和 4-甲基愈创木酚含量的信号值均根据 Milli-Q 水校准曲线进行定量（表 8）。没有样品测出 4-甲基愈创木酚的含量。

使用白葡萄酒校准曲线对每种红酒样品三次重复进样中的目标游离挥发酚进行定量（表 9）。注意，4-甲基愈创木酚和 3,5-二甲基苯酚在所有样品中含量均低于定量限 (LOQ)，因此未列入表中。从使用 Milli-Q 水校准曲线到使用白葡萄酒校准曲线，愈创木酚的浓度略有降低（标准偏差 = 0.82，RSD = 9.35%），这显示了葡萄酒在定量分析中的基质效应。

表 8. 葡萄酒基质中检出的愈创木酚浓度

愈创木酚	Franzia 白葡萄酒	Franzia 红酒	CA 黑比诺	OR 黑比诺	红酒样品
平均浓度，n = 3 (ppb)	0.64	6.74	10.27	5.16	9.15
标准偏差	0.33	0.65	1.17	0.42	0.80
% RSD	51.80	9.57	11.40	8.13	8.72

表 9. 红酒样品中检出的目标分析物平均浓度 (ppb)

样品	愈创木酚	邻甲酚	苯酚	2,5-二甲基苯酚	4-乙基愈创木酚	2-乙基苯酚	对甲酚	间甲酚	4-乙基苯酚	2,6-二甲氧基苯酚
Franzia 红酒	6.32	0.41	2.73	< LOQ	0.09	< LOQ	1.61	0.38	< LOQ	0.77
CA 黑比诺	9.97	1.90	5.58	0.23	0.22	0.01	0.75	0.68	0.08	1.05
OR 黑比诺	4.68	2.05	6.20	16.23	10.81	< LOQ	1.73	1.44	24.81	0.60
红酒样品	8.81	5.70	16.35	< LOQ	< LOQ	0.03	4.61	2.30	0.16	0.57

结论

消费者一般不乐意购买受到烟污染的葡萄酒。由于没有有效方式去除葡萄或葡萄酒中的烟类化合物，烟污染对葡萄园而言就会是一个主要问题。没有收成就没有收入，所以，这种污染会给葡萄种植户带来沉重的财务打击。还有可能对葡萄种植户以及整个地区带来信誉风险^[6]。用于分析烟污染产生的游离挥发酚的安捷伦 SPME-GC/MS/MS 方法，能够实现可靠的鉴定和定量分析。

参考文献

1. Smoke Impact in Grapes and Wine. ETS Laboratories, **2020**
2. Herve, E.; Price, S.; Burns, G. Free Guaiacol and 4-Methylguaiacol as Markers of Smoke Taint in Grapes and Wines: Observations from the 2008 Vintage in California. ETS Laboratories, **2011**
3. Abercrombie, V. 使用 Agilent J&W DB-HeavyWax 气相色谱柱快速分析葡萄酒中的烟污染化合物, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-0081ZHCN, **2018**
4. Westland, J. 在 SPME 顶空应用中使用盐提高分析物浓度, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-3159ZHCN, **2021**
5. Westland, J. 比较使用 DVB/碳 WR/ PDMS 固定相的 Agilent SPME Arrows 和 Agilent SPME 纤维头对游离挥发酚的响应, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-3160ZHCN, **2021**
6. Stubble burning – a Possible Source of Smoke Taint in Grapes – Fact Sheet. The Australian Wine Research Institute, **2021**

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE44288.3933217593

本文中的信息、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，2021，2023
2023 年 4 月 27 日，中国出版
5994-3161ZHCN