

GASCHROMATOGRAFIESE ANALISE VAN GEURSTOWWE IN WYN

deur

W. W. D. Wagener.

Promotor: Prof. Dr. M. J. de Vries.



Verhandeling goedgekeur ter verkryging van die graad van Magister in
Chemie aan die Universiteit van Stellenbosch.

Maart 1965.

BEDANKINGS.

1. My dank aan die Ko-operatiewe Wynbouwers Vereniging van Zuid-Afrika Beperkt, vir die beurs aan my beskikbaar gestel.
2. My dank aan my promotor, Prof. Dr. M. J. de Vries, vir sy leiding gedurende hierdie ondersoek.

INHOUD.

	bls.
<u>INLEIDING.</u>	1
<u>DEEL I: DIE GISTINGSPROSES.</u>	
<u>HOOFSTUK I.</u>	
DIE OMSETTING VAN GLUKOSE NA ETANOL EN SOMMIGE NEWE-REAKSIES.	4
<u>HOOFSTUK II.</u>	
SOMMIGE ANDER ANAËROBIESE OMSETTINGS VAN PIRUVIEN- SUUR.	11
BIBLIOGRAFIE.	16
<u>HOOFSTUK III.</u>	
DIE ONTSTAAN VAN HOËRE VETSURE GEDURENDE GISTING.	17
<u>HOOFSTUK IV.</u>	
DIE ONTSTAAN VAN VETSUUR-ESTERS GEDURENDE GISTING.	19
<u>HOOFSTUK V.</u>	
DIE ONTSTAAN VAN ALKOHOLE GEDURENDE GISTING.	22
<u>DEEL II: EKSPERIMENTELE WERK.</u>	
<u>HOOFSTUK I.</u>	
DIE ETER-EKSTRAKSIE VAN WYN.	
A. Inleiding	24
B. Die Identifikasie van Geurstowwe.	26
C. Die Kwantitatiewe Bepaling van Esters.	
(a) Eksperimenteel.	
(i) Die Bepaling van Iso-amielasetaat.	31
(ii) Die Gelyktydige Bepaling van Vyf Esters.	36
(b) Resultate en Bespreking.	41
D. Die Kwantitatiewe Bepaling van Alkohole.	
(a) Eksperimenteel.	43
(b) Resultate en Bespreking.	44

	bls.
<u>HOOFSTUK II.</u>	
DIE TWEE VORMS VAN DIE P.E.G.-KOLOM.	48
<u>HOOFSTUK III.</u>	
DAMPFASE-INSPUITINGS VAN WYN.	
(a) Inleiding.	51
(b) Eksperimenteel.	
(i) Algemeen.	53
(ii) Die Bepaling van Etielasetaat.	54
(iii) Die Bepaling van Asetaldehyd.	57
(c) Resultate en Bespreking.	58
<u>HOOFSTUK IV.</u>	
DIE GEVOELIGHEID VAN DIE DETEKTOR.	62
<u>HOOFSTUK V.</u>	
DIE KONSENTRERING VAN DAMP IN 'N KOUE VAL.	65
OPSOMMING.	67
LITERATUUR-VERWYSINGS.	68

INLEIDING.

Die kwaliteit van 'n wyn word grootliks bepaal deur die geurstowwe daarin teenwoordig. Hierdie geurstowwe bestaan hoofsaaklik uit esters, alkohole, aldehiede en ook ketone, en in 'n mindere mate vlugtige sure.

Die geurstowwe van wyn kan as volg ingedeel word (1):-

Primêre druif-geurstowwe, wat in die druif teenwoordig is, waar hul maklik waargeneem kan word.

Sekondêre druifgeurstowwe, wat gedurende gisting gevorm word deur die gis uit geurvormende stowwe teenwoordig in die druif, waarskynlik sekere proteïene.

Geurstowwe van gisting, wat deur die gis gevorm word onafhanklik van die geurvormende stowwe reeds aanwesig. Verskillende gis-rasse vorm dan ook verskillende geurstowwe.

Geurstowwe van verandering word ensiematies gevorm gedurende veroudering deur sekere mikro-organismes.

Op die dop van 'n ryp druiwe-korrel is daar al 233,000 mikro-organismes gevind. Talle soorte is teenwoordig, en die meeste bereik later die gis-tenk, waar hulle vermenigvuldig en hulle fisiologiese aktiwiteite bedryf, elkeen volgens sy aard.

Hoofsaaklik twee klasse mikrobies kom op druiwe voor, nl. fungi en bakterieë. Die fungi word verteenwoordig deur die verskillende soorte giste, die belangrikste waarvan is die ware wyn-gis, die *Saccharomyces*, wat verantwoordelik is vir die omsetting van glukose na etanol. Daar is nog ander giste, meestal skadelik omdat hulle skadelike stowwe vorm wat die wyn bederf.

Die belangrikste bakterieë teenwoordig is die asynsuurbakterieë en melksuurbakterieë. Daar is egter bakterieë teenwoordig wat baie

ander stowwe ook kan vorm.

Tot op hede is n baie groot aantal geurstowwe in verskillende soorte wyn geïdentifiseer (2 - 9). Behalwe vir die bekende metodes vir die kwantitatiewe bepaling van totale sure, totale esters en totale aldehiede, is daar ook al heelwat werk gedoen i.v.m. die kwantitatiewe bepaling van afsonderlike verbindings wat bydra tot die geur van wyn (10 - 14).

Verskillende metodes is aangewend vir sulke analyses, o.a. papierchromatografie (15), spektrofotometrie (16, 17) en ook gaschromatografie. Laasgenoemde is uiters geskik, omdat dit sulke minimale kwantiteite akkuraat kan aantoon.

Wyn kan direk in die gaschromatograaf ingespuut word (18, 19) waarby die groot hoeveelheid water en etanol hinderlik is en daar nie eintlik kwantitatief gewerk kan word nie. Monsters van die dampfase bo wyn kan ingespuut word, wat die probleem van water uitskakel, mits daar met n detektor gewerk word wat relatief ongevoelig vir water is, soos die vlam-ionisasie detektor. Die etanol piek steur egter nog omdat dit weens die hoë konsentrasie breër word en ander kleiner pieke oorvleuel. Heelwat sukses is egter al met hierdie metode behaal (20, 21).

Ekstraksie met eter of ander stowwe (22) bring mee, behalwe dat beide die probleme van water en etanol oorkom word, die geurstowwe ook gekonsentreer kan word, wat analyses geweldig vergemaklik en temperatuur programmering moontlik maak op n enkelkolom enkeldetektor apparaat. n Ander analisemetode wat moontlikhede bied is die konsentring van die wyndamp in n koue val.

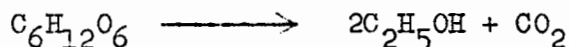
In hierdie verhandeling is 'n metode ontwikkel vir die kwantitatiewe gaschromatografiese bepaling van esters en alkohole na ekstraksie met eter, gevolg deur indamping van die ekstrak. Daar is ook kwantitatiewe bepalings volgens 'n reeds bekende metode in die dampfase van wyn gedoen.

DEEL I: DIE GISTINGSPROSES.HOOFSTUK I. DIE OMSETTING VAN GLUKOSE NA ETANOL
EN SOMMIGE NEWE-REAKSIES.

In die sap van druiwe is daar n hele aantal stowwe teenwoordig. Die hoofbestanddeel is water, maar ook koolhidrate, organiese sure, die druifgeurstowwe, stikstofbevattende stowwe soos proteïene, aminosure en ammoniak, minerale stowwe en gasse is aanwesig.

n Deel van die koolhidrate is teenwoordig as pentoses, bv. arabinose en ramnose, wat nie deur die giste verander word nie. Die grootste deel bestaan egter uit glukose en fruktose. Dit word gedurende alkoholiese gisting verander na etanol; glukose word meer gereedlik deur die gis aangeval as fruktose.

Die omsetting van druiwesuiker na etanol kan beskryf word deur die vergelyking:

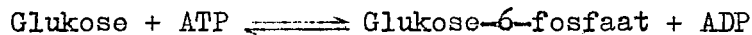


Die gistingsproses is hoofsaaklik anaërobies, behalwe in die beginstadium. Dit is ingewikkeld, en baie tussenprodukte word gevorm: asynsuur, barnsteensuur, gliserol en talle ander.

In 1905 het Harden en Young gevind dat, gedurende gisting met n gis-ekstrak, CO_2 aan die begin vinnig gevorm word, maar dat die spoed van CO_2 -formasie vinnig afneem tensy anorganiese fosfaat bygevoeg word. Hulle het ook gevind dat gedurende gisting hierdie fosfaat verdwyn, en dus afgelei dat dit tot organiese fosfaat omgesit word. Hulle het dan ook n heksose-difosfaat-ester geïsoleer, naamlik α -D-fruktofuranose-1,6,-difosfaat. Later is twee ander heksose-fosfaat esters geïsoleer: D-glukopiranos-6-fosfaat en D-fruktofuranose-6-fosfaat.

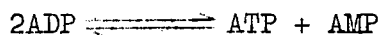
Daar is gevind dat daar sekere stowwe is waarsonder gisting nie kan plaasvind nie, nl. difosfopiridien nukleotied (DPN) en adenosien-5'-trifosfaat (ATP). In gisekstrak is ook gevind adenosien-5'-difosfaat (ADP) en adenosien-monofosfaat (AMP).

Vir die omsetting van glukose na glukose-6-fosfaat (die eerste stap in alkoholiese gisting) is nodig ATP en Mg^{++} -ione.



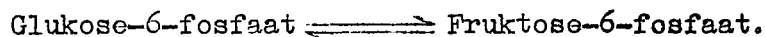
Die ensiem wat dié reaksie kataliseer is heksokinase, wat een van n groep ensieme is wat die oordra van die endfosfaatgroep van ATP na n geskikte akseptor kataliseer. Mg^{++} is noodsaaklik vir die werking van dié ensiem.

Die ADP gevorm word verander na ATP en AMP:

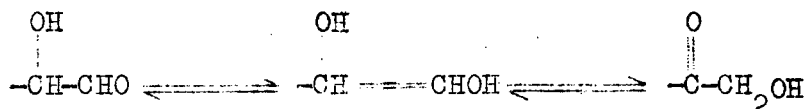


omdat daar n ensiem (miokinase) teenwoordig is wat die reaksie kataliseer.

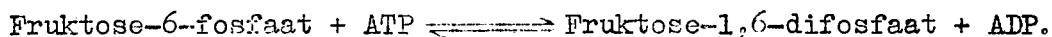
Die ensiem fosfohekso-isomerase kataliseer die volgende reaksie in die proses:



By ewewig is daar omtrent 70% glukose-6-fosfaat en 30% fruktose-6-fosfaat. Die reaksie gaan oor n een-diol tussenstap:



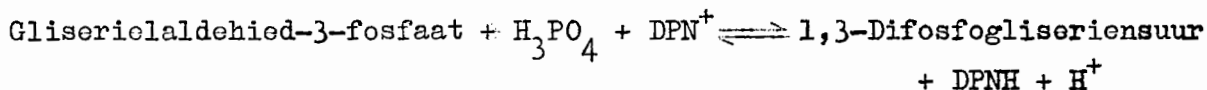
Die volgende stap is die oordra van nog n fosfaatgroep vanaf ATP na die fruktose-6-fosfaat, n reaksie wat gekataliseer word deur die ensiem fosfoheksokinase, wat ook Mg^{++} nodig het vir aktiwiteit.



Die ewewig van dié reaksie is natuurlik ver na regs.

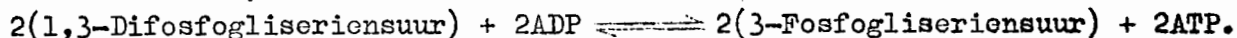
Fruktose-1,6-difosfaat word omgesit na twee molekules triosefosfaat, D-gliserielaldehyd-3-fosfaat en dihidroksi-asetoon-fosfaat. Die reaksie, 'n omgekeerde aldol kondensasie, word gekataliseer deur die ensiem aldolase.

In gis-ekstrak is 'n ensiem gevind, triosefosfaat isomerase, wat die ewewig tussen D-gliserielaldehyd-3-fosfaat en dihidroksi-asetoon-fosfaat kataliseer. So 'n ewewigmengsel bevat 4% D-gliserielaldehyd-3-fosfaat en 96% dihidroksi-asetoon-fosfaat. Eersgenoemde word egter opgebruik in die volgende stap, en word dus weer altyd gevorm.



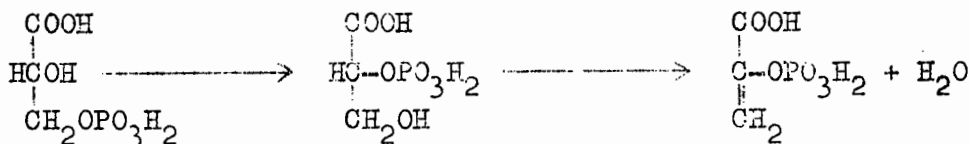
Vir hierdie reaksie is anorganiese fosfaat nodig en die reaksie word gekataliseer deur die ensiem triosefosfaat dehidrogenase.

Een fosfaatgroep word nou weer verwyder in die volgende reaksie en aan ADP gekoppel om ATP te gee (gekataliseer deur ATP-fosfogliserien-transfosforilase):



Hier word die twee ATP-molekules dus weer herwin wat in die eerste twee reaksies opgebruik is.

3-Fosfogliseriensuur word omgesit na Fosfo-enolpiruviensuur in twee stappe:

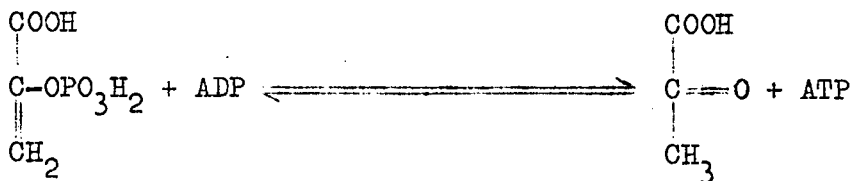


D-3-Fosfogliseriensuur D-2-Fosfogliseriensuur Fosfo-enolpiruviensuur.

Die eerste stap, n transfosforilase reaksie, word gekataliseer deur die ensiem fosfogliseromutase. Vir hierdie reaksie is ook nodig n katalitiese hoeveelheid 2,3-difosfogliseriensuur, wat moontlik ontstaan deur die teenwoordigheid van n ensiem wat die omsetting van 1,3-difosfogliseriensuur na 2,3-difosfogliseriensuur kataliseer.

Die tweede stap is n dehidrering wat gekataliseer word deur die ensiem enolase, wat Mg^{++} , Zn^{++} of Mn^{++} nodig het vir aktiwiteit.

Die volgende stap is die verwydering van die oorblywende fosfaatgroep om piruviensuur en ATP te vorm, gekataliseer deur ATP-fosfopiruvien transfosforilase, wat ook Mg^{++} benodig vir aktiwiteit.

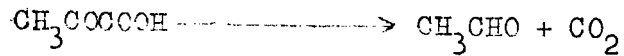


Fosfo-enolpiruviensuur

Piruviensuur

Daar is gevind dat, gedurende gisting met lewende gisselle, die gisting voortgaan totdat al die glukose opgebruik is en dat die gisting nie afhanklik is van die konsentrasie anorganiese fosfaat teenwoordig nie, soos Harden en Young met gis-ekstrak gevind het. Hierdie probleem is deur Meyerhof opgeklaar, wat bewys het dat gedurende gisting met lewende gisselle die normaal ATP wat gevorm word, gehidroliseer word na ADP en n anorganiese fosfaatgroep met behulp van die ensiem adenosien trifosfatase (ATP-ase). Daar is dus altyd anorganiese fosfaat beskikbaar om 1,3-difosfogliseriensuur te vorm.

Piruviensuur kan n groot aantal omsettings ondergaan, soos later bespreek sal word. Die hoofreaksie gedurende alkoholiese gisting is sy dekarboksilasie na aetaldehyd:



Die ensiem wat die reaksie kataliseer is karboksilase, en daar is bewys dat 'n ko-faktor ook nodig is vir dekarboksilasie. Hierdie ko-faktor is genoem kokarboksilase, en Lohmann en Schuster het dit geïdentifiseer as tiamien-pirofosfaat (TPP). Tiamien is 'n vitamien (vitamien B₁) en die fosforilasie daarvan mag chemies plaasvind, of ensiematies vanaf ATP. Mg⁺⁺ is nodig vir die aktiwiteit van karboksilase.

Die meganisme waarvolgens TPP optree by dekarboksilasie is nog onbekend. Daar is voorgestel dat 'n „geaktiveerde asetaldheid” (miskien die karbanioon CH₃CO⁻) aan die TPP vas gevorm word as tussenstap, en dat die verbinding met waterstofione reageer om vry asetaldheid en TPP te gee.

Die finale stap is die reduksie van asetaldheid na etanol, gekataliseer deur alkohol dehidrogenase:



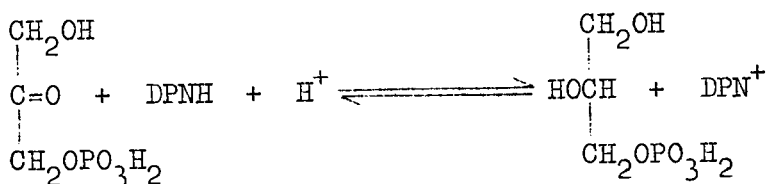
Hier word die DPN⁺ weer regeneer wat in die omsetting van gliserielaldheid-3-fosfaat tot 1,3-difosfogliseriensuur opgebruik word. Slegs 'n baie klein hoeveelheid DPN is dus nodig om 'n groot hoeveelheid gliserielaldheid-3-fosfaat om te sit na etanol.

Die omsetting van glukose na etanol is 'n ekso-energetiese reaksie en dit kan omgekeer word as die multi-ensiem sisteem gekoppel word aan reaksies wat energie lewer.

As sulfiet by die gismengsel gevoeg word, word die asetaldheid gebind in die vorm van sy bisulfietverbinding. In die geval kan

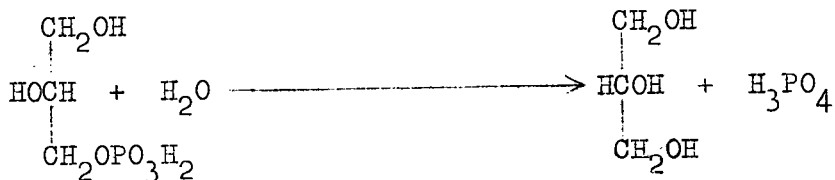
etanol nie gevorm word nie, en daar word gliserol gevorm.

As etanol nie gevorm word nie, word DPN^+ , nodig vir die oksidasie van gliserielaldehyd-3-fosfaat, nie regeneereer nie. In so n geval is daar n alternatiewe weg oop vir die oksidasie van $DPNH$, wat waarskynlik die reduksie van dihidroksi-asetoonfosfaat in die teenwoordigheid van alkohol-dehidrogenase is. Gliserolfosfaat word gevorm, en hidrolise deur fosfatases lewer gliserol.



Dihidroksi-asetoonfosfaat

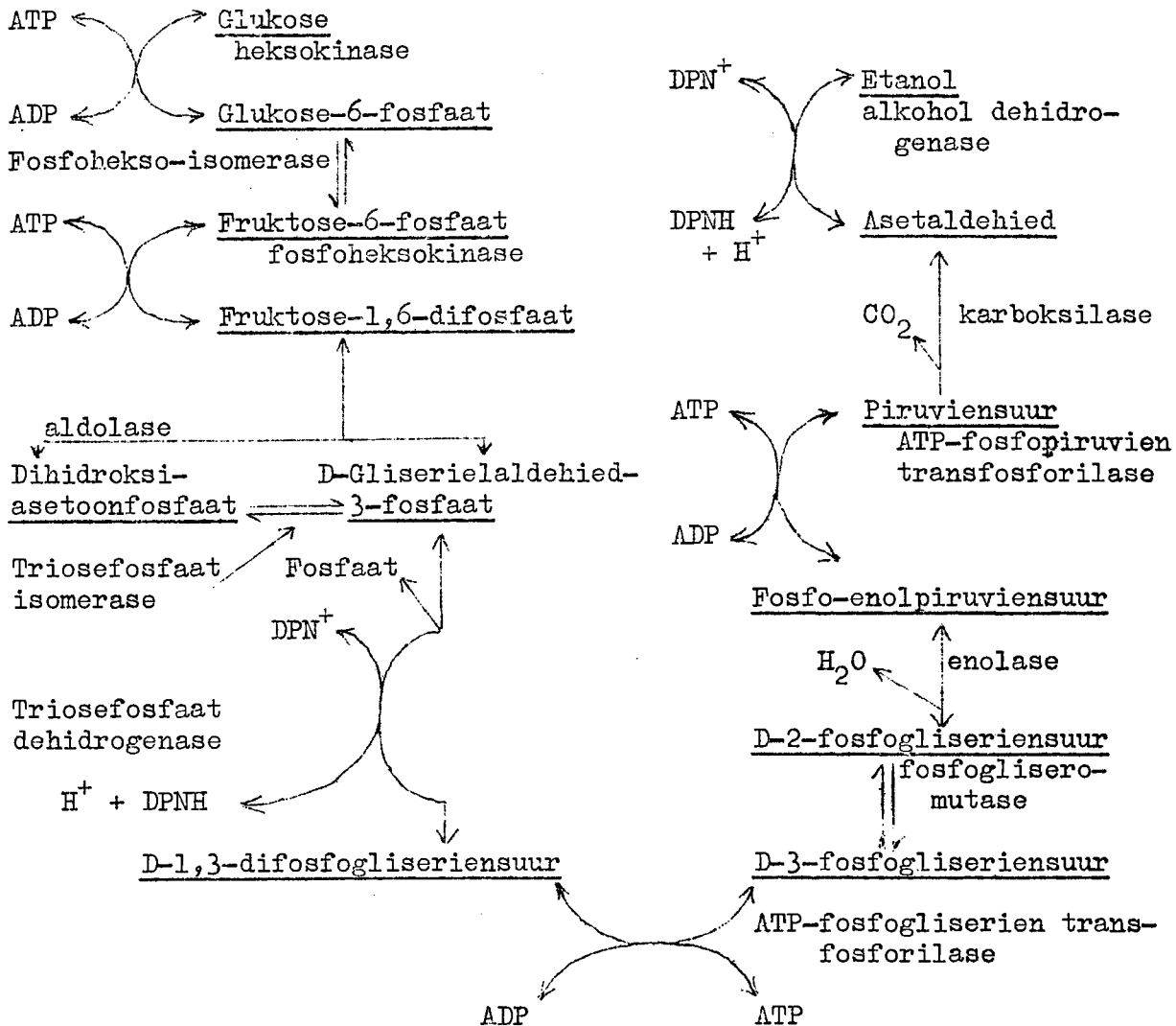
L- α -gliserolfosfaat



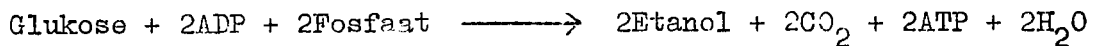
Gliserolfosfaat

Gliserol

SKEMATIESE VOORSTELLING VAN DIE ANAEROBIESE AFBREEK
VAN GLUKOSE NA ETANOL EN CO₂ GEDURENDE GISTING.



Totale reaksie:

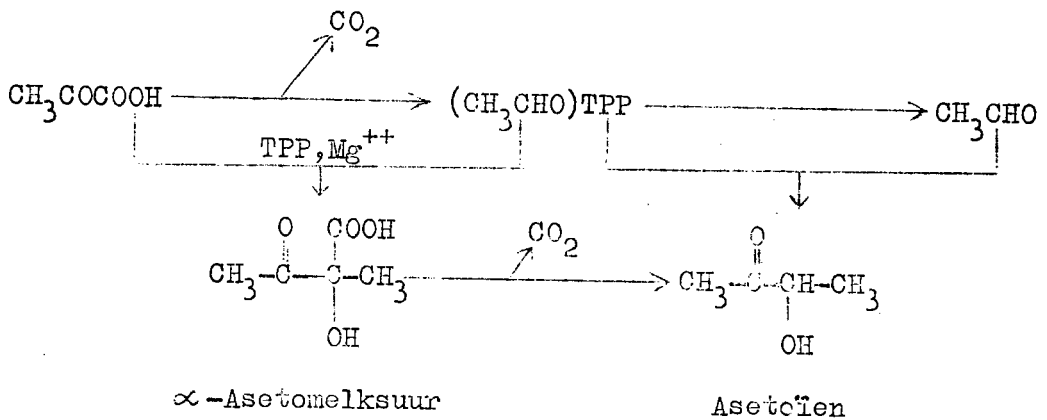


HOOFSTUK II.

SOMMIGE ANDER ANAËROBIESE OMSETTINGS VAN PIRUVIENSUUR.

Onder anaërobiese toestande is daar n hele aantal ensiematiese weë oop vir die afbreek van piruviensuur. D-melksuur (of die DL-vorm) is die enigste eindproduk by die afbreek van glukose deur n groep mikro-organismes bekend as die melksuurbakterieë. Hulle besit n melksuur dehidrogenase gekoppel aan DPN wat spesifiek is vir D-melksuur, en ook n L-melksuur dehidrogenase. Dis waarskynlik dat die formasie van DL-melksuur deur beide die ensieme veroorsaak word. Dit is ook afhanklik van die teenwoordigheid van DPN.

Piruviensuur word omgesit na asetiel-metiel-karbinol (asetoien) deur n verskeidenheid van mikro-organismes. Dit kan verklaar word deur aan te neem dat die gistingskarboksilase die formasie van n „aktiewe asetaldehyd“ (miskien aan TPP gebind) kataliseer. Hierdie „aktiewe aldehyd“ kan dan kombineer met n vry asetaldehyd, wat ontstaan uit die dekarboksilasie van piruviensuur.



n Ander verklaring is dat die „aktiewe aldehyd“ kan kombineer

met 'n molekule piruviensuur om α -aseto melksuur te vorm, wat dan dekarboksileer om asetoïen te lewer. Dit is ook moontlik dat asetoïen langs beide weë gevorm word. Ander aldehyede kan ook as akseptors dien van die „aktiewe aldehyed“, en so kan verskillende asetoïene ($\text{CH}_3\text{COCHOHR}$) ontstaan. Dié verbindings is opties aktief. Asetiel-feniel-karbinol kan bv. ontstaan uit piruviensuur en bensaldehyed.

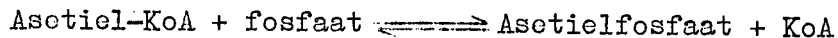
In *Acrobacter aerogenes* en *Proteus morganii* word d- α -aseto-laktaat gevorm as tussenproduk by die formasie van asetoïen. Verskeie bakterieë besit ensiemsisteme vir die reduksie van asetoïen na butaan-2,3-diol ($\text{CH}_3\text{CHOHCHOHCH}_3$). Asetoïen en butaan-2,3-diol (of 2,3-butyleenglikol) is metabolies verwant aan diasetiel ($\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$), wat as akseptor in 'n asetoïen-kondensasie kan optree om diasetielmetielkarbinol $\left[(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{C}(\text{OH})\text{CH}_3 \right]$ te vorm.

'n Ander produk wat gevorm kan word is asetaat. In sommige organismes word asetaldehyd geoksideer na asetaat deur DPN-gekoppelde asetaldehyd dehidrogenase. In ander word die „aktiewe asetaldehyd“ (waarskynlik aan TPP gebind) geoksideer deur elektron akseptor sisteme van die selle van die bakterieë.

In sommige mikro-organismes (*Escherichia coli*, *Streptococcus fecalis*) is daar ensiem-sisteme wat die omsetting van piruvaat na asetiel-koënsiem A kataliseer. Behalwe TPP, Mg^{++} en koënsiem A, is sekere kofaktore noodsaaklik bv. hier is van belang DPN en lipoïensuur.

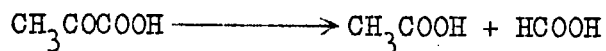
Bakterieë bevat 'n ensiem, fosfotransasetilase, wat nie in gis

voorkom nie. Dié ensiem kataliseer die omkoerbare oordrag van n asetielgroep van asetiel-koënsiem A na fosfaat:



Asetielfosfaat word gehidroliseer deur n spesifieke fosfatase na asetaat en fosfaat.

n Ander mikrobiologiese gisting wat nog nie goed verstaan word nie, is die omsetting van piruvaat na asetaat en formiaat:

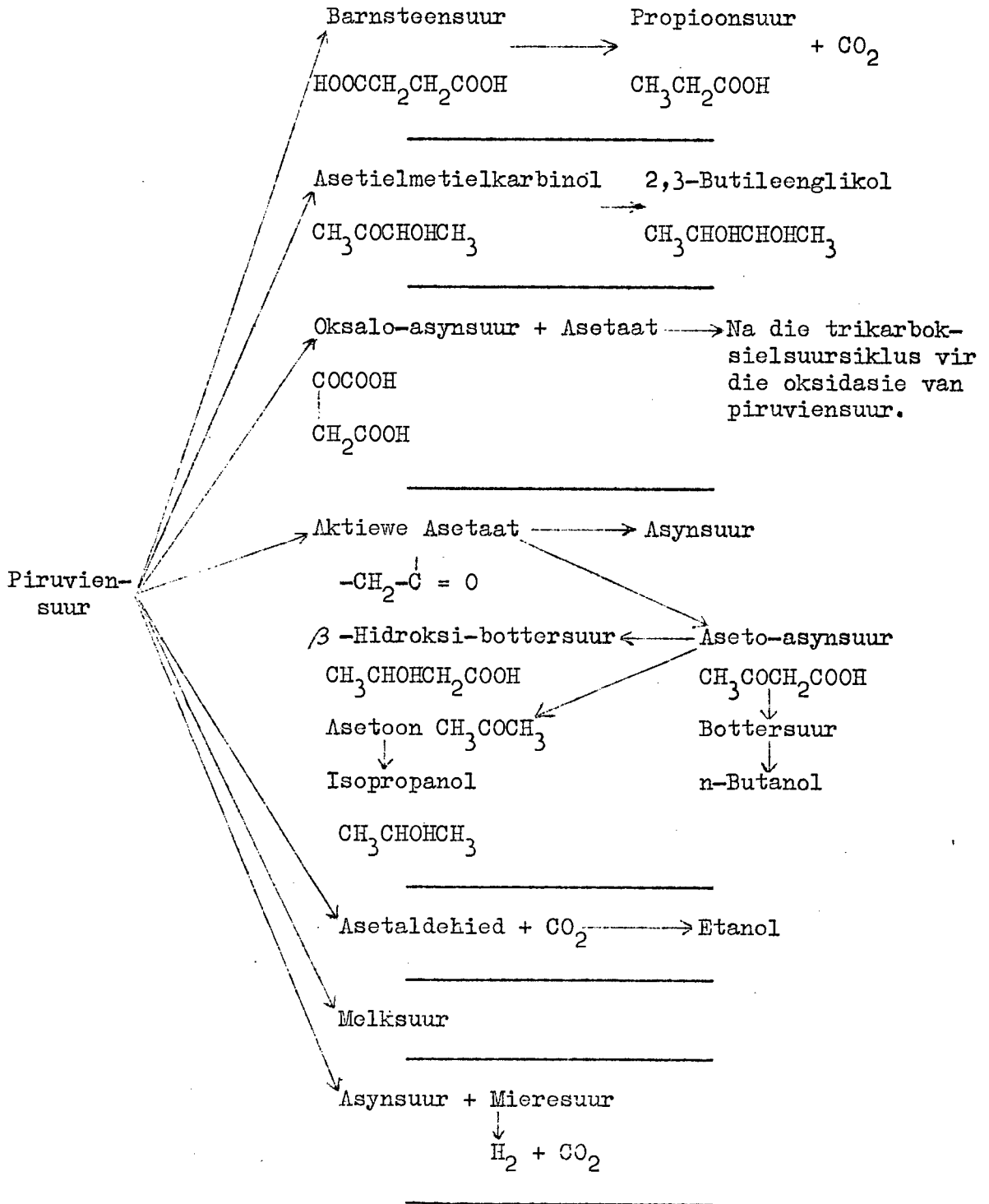


Ander verbindings wat deur mikro-organismes uit piruviensuur gevorm word, sluit in propioonsuur, isopropiel-alkohol, β -hidroksi-bottersuur en n-butil-alkohol.

Die Trikarboksielsuursiklus tree ook in werking gedurende gisting, dog dit speel n ondergeskikte rol en is nie van hoofbelang by die vorming van neweprodukte nie.

VERBINDINGS GEVORM UIT PIRUVIENSUUR

DEUR HETEROTROPIESE BAKTERIEË.



KLASSIFIKASIE VAN SOMMIGE MIKRO-ORGANISMES VOLGENSHOOF-EINDPRODUKTE BY DIE AFBREEK VAN GLUKOSE.

TIPE GISTING.	ORGANISME.	HOOF-EINDPRODUKTE.
Etanol	Sekere fungi (veral giste) Bakterieë: Zymomonas lindueri Zymosarcina ventriculi	Etanol CO ₂
Melksuur (homo-gisting)	Streptococcus Sekere spesies Lacto- bacillus	Melksuur
Melksuur (hetero-gisting)	Leuconostoc Sekere spesies Lacto- bacillus	Melksuur, asynsuur, etanol, gliserol, CO ₂
Propioonsuur	Clostridium propionicum Corynebacterium diphthe- riae Sommige spesies van: Neisseria Veillonella Micromonospora	Propioonsuur, asyn- suur, barnsteensuur, CO ₂
Butanol-bottersuur	Butyribacterium Zymosarcina maxima Sommige spesies van: Clostridium Neisseria	Butanol, bottersuur, asetoon, isopropanol, asynsuur, etanol, H ₂ , CO ₂
Gemengde suur	Escherichia Salmonella Shigella Proteus	Melksuur, asynsuur, mieresuur, barnsteen- suur, etanol, CO ₂ , H ₂
Butileenglikol	Aerobacter Aeromonas Bacillus polymyxa	Etanol, asetoïen, 2,3-butileenglikol, CO ₂ , H ₂ , melksuur, asynsuur, mieresuur
Asynsuur	Acetobacter	Asynsuur Glukoonsuur

BIBLIOGRAFIE.

- Fruton, J. S. & Simmonds, S.: General Biochemistry (Tweede Uitgawe).
John Wiley & Sons Inc., New York (1958).
- Pelczar, M. J. & Reid, R. D.: Microbiology.
McGraw-Hill, New York (1958).
- Jawetz, E., Melnick, J. L.,
& Adelberg, E. A.: Review of Medical Microbiology (Vyfde
Uitgawe); Lange Medical Publications,
Los Altos, California (1962).
- Theron, C. J. & Niehaus, C. J. G.: Wine-making (Derde Uitgawe)
Bulletin No. 191, Serie No. 130,
Goew. Drukker, Pretoria (1947).

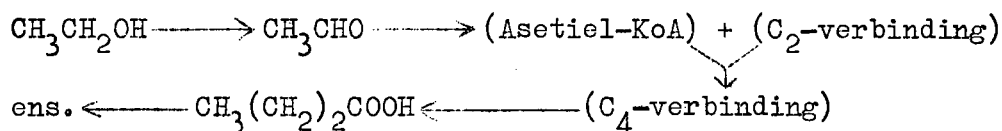
HOOFSTUK III.

DIE ONTSTAAN VAN HOËRE VETSURE GEDURENDE GISTING.

Daar word talle sure gevorm gedurende die gistingsproses. Clarke et al. (23) het byvoorbeeld 81 vlugtige sure gevind in die eter-ekstrak van bier, en Kepner en Webb (4, 24) het ook etlike sure gevind in Flor Sjerric en in die fuselolie van muskaat rosyne.

Koënsiem A speel blykbaar 'n belangrike rol in die ontstaan van hoëre vetsure. Stadtman en Barker (25, 26, 27) het gevind dat Clostridium kluyveri butiraat en heksanoaat kan vorm uit etanol met anorganiese fosfaat teenwoordig, en deur hidrolise bottersuur en heksanoësuur ontstaan.

Vetsure kan dus met eenhede van C₂ opgebou word deur sekere bakterieë. Dit geskied waarskynlik op die volgende wyse uit etanol (28):



Die etanol is gedehidrogeneer na asetaldheid, en hieruit word asetielkoënsiem A gevorm in teenwoordigheid van koënsiem A en DPN. Wat presies alles gevorm word in die tussenstappe is tot dusver nog taamlik onbekend. Die C₂-verbinding is waarskynlik 'n „aktiewe asetaat.“ As tussenproduk, verteenwoordigend van die „C₄-verbinding“, is ook geïsoleer asetoasetiel koënsiem A en buteriel koënsiem A.

Daar is ook gevind {Peynaud volgens De Vries (29)} dat, gedurende gisting, in die beginstadium 'n groot hoeveelheid asynsuur gevorm word,

wat dan later opgebruik word sodat slegs 20% van die oorspronklike oorbly. Dit dui dus ook op „asetaat-boustene" vir die opbou van hoëre vetsure.

HOOFSTUK IV.

DIE ONTSTAAN VAN VETSUUR-ESTERS GEDURENDE GISTING.

Volgens huidige kennis oor die ontstaan van vetsuur-esters gedurende gisting, lyk dit of hul gevorm word uit alkohol en die asiel-koënsiem A verbinding. Die asiel-koënsiem A verbinding word opgebou in eenhede van C_2 soos beskryf is vir die ontstaan van hoëre vetsure.

n Belangrike bydrae op die gebied is gelewer deur Nordström. Hy het gevind (30) dat asetielasetaat nie gevorm word deur verestering van asynsuur en etanol nie, maar dat dit n proses is wat in die sel plaasvind. Later het hy ook gevind (31, 32) dat asetiel-koënsiem A gevorm word as tussenproduk. Hierdie waarnemings het hy gedoen met gistings onder anaërobiese toestande met *Saccharomyces cerevisiae*.

Van Zyl, De Vries en Zeeman (33) het gevind dat verskillende soorte giste verskillende vermoëns besit om esters te vorm. Volgens Tabachnik en Joslyn (34, 35) is daar nie n ensiem (n esterase), wat die veresteringsreaksie tussen n suur en n alkohol kataliseer, betrokke by esterformasie nie. Esters is gevorm in die teenwoordigheid van diisopropiel fluorofosfaat, n verbinding wat esterase onaktief maak. Dit dui dus ook daarop dat esterformasie n proses is wat in die sel plaasvind.

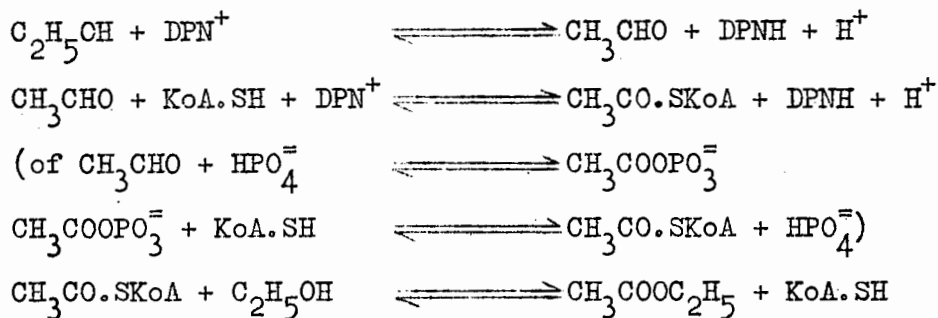
Asetiel-koënsiem A word gevorm uit piruviensuur (met lipoënsuur en TPP teenwoordig) of die piruviensuur kan eers gedekarboksileer word na asetaldheid, en dit weer geoksideer na asynsuur. Met behulp van ATP word asetiel-koënsiem A dan gevorm.

Nordström stel vas, in die werk reeds genoem, dat die byvoeging

van vetsure die formasie van etielasetaat vertraag, omdat dié sure kompeteer in die formasie van die ooreenstemmende asiel-koënsiem A verbinding.

Hy het die formasie van etiel-esters uit sekere vetsure bestudeer, ook in anaërobiese gisting met *Saccharomyces cerevisiae* (36), en vasgestel dat die meeste sure esters lewer, egter nie propioon-, isobotter-, isovaleriaansuur en waarskynlik ook nie mieresuur nie. Alle vetsure, afgesien van hul vermoë om esters te vorm, hinder die formasie van esters uit ander sure, a.g.v. kompetisie om die betrokke asiel-koënsiem A verbinding te vorm.

Cantarelli (35, 37) het die volgende meganisme voorgestel vir die formasie van etiel-asetaat slegs uit etanol:



Dieselfde meganisme soos by vetsuurformasie kan ook optree, en na die tweedelaaste stap van die reaksie kan nog 'n asetaatgroep aan die asetiel-koënsiem A vorm, wat dan verder kan reageer om 'n C₄-ester te lewer. Soortgelyk kan ook C₆, C₈ en hoëre vetsuur-esters gevorm word.

Omdat etanol en gewoonlik iso-amielalkohol in relatief hoë konsentrasies in wyn teenwoordig is, word esters van die alkohole gewoon-

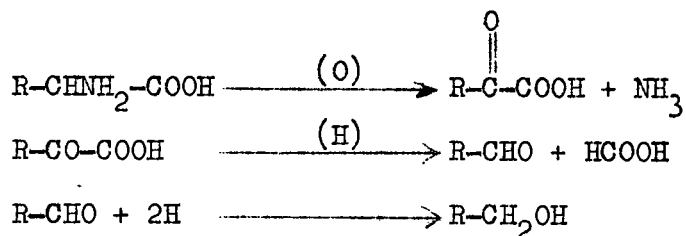
lik gevind. Esters van ander alkohole wat in laer konsentrasies teenwoordig is, soos bv. n-butanol, is egter ook al geïdentifiseer (24).

Uit die meganisme vir estervorming is dit ook duidelik dat daar verband behoort te wees tussen die konsentrasies van die verskillende esters aanwesig. Dit is dan ook noodsaaklik dat elk van die esters kwantitatief bepaal kan word, aangesien sekeres (veral die hoër vet-suuresters) uiters belangrik is by die bepaling van gour en andere minder belangrik.

HOOFSTUK V.

DIE ONTSTAAN VAN ALKOHOLE GEDURENDE GISTING.

Sommige alkohole, bv. isopropanol en n-butanol, kan gedurende gisting gevorm word deur sekere bakterieë uit piruviensuur. Belangrike werk oor die formasie van hoëre alkohole is gedoen deur Ehrlich. n Oorsig van die skema wat hy voorgestel het, word gegee deur Stevens (38), en dié skema is later bevestig (39). In kort kom dit daarop neer dat sekere alkohole gevorm word uit bepaalde aminosure met een koolstofatoom meer as die alkohol. So bv. lewer leusien iso-amielalkohol, isoleusien aktiewe amielalkohol, valien isobutanol en fenielalanien feniel-etielalkohol. Waarskynlik geskied dit volgens die volgende meganisme:



Aminosure word reeds in die druif gevorm, waar dit verder opgebou word tot proteïene, en ook gedurende gisting. Dit word ensiematies gevorm uit koolhidrate, hoofsaaklik glukose. Die trikarboksielsuursiklus is n belangrike bron van aminosure.

Bostaande is egter nie die enigste manier waarop alkohole gevorm kan word nie. Alkohole is verkry in sintetiese media waarin daar geen aminosure teenwoordig was nie (40). Ander meganismes is dan ook voorgestel vir die formasie van bv. iso-amielalkohol (38). Twee molekules

asetaat kan kondenseer om aseto-asetaat te vorm, wat dan by dekarboksilasie asetoon lewer, en dit weer by reduksie isopropanol. Een molekule asetoon kan kondenseer met een molekule asetaldohied om β,β -dimetielakroleien te lewer, wat iso-amielalkohol gee by reduksie.

Verdere maniere waarop iso-amielalkohol kan ontstaan, is uit intermedieë produkte by sterol en terpeen sintese uit β -hidroksi- β -metielglutaarsuur, wat gevorm word uit die kondensasie van n molekule asetaat met n molekule aseto-asetaat (38). (Een van die verbindings wat ook hier kan ontstaan is isovaleriaansuur). Die huidige siening is dus dat die grootste deel van die fusel-olie gevorm word uit aminosure volgens Ehrlich se skema, hoewel n kleiner deel daarvan op ander maniere gevorm word.

DEEL II: EKSPERIMENTELE WERK.

HOOFSTUK I.

DIE ETER-EKSTRAKSIE VAN WYN.

A. INLEIDING.

Ekstrahering met eter of ander vlugtige organiese oplosmiddels is baie waardevol in die kwalitatiewe analise van geurstowwe in wyn en ander alkoholiese drankke (4, 7, 24, 41, 42, 43, 44), omdat die meeste van hierdie geurstowwe (bv. alkohole en esters) so maklik hiermee ge-ekstraheer kan word, al is hulle in sulke geweldige lae konsentrasies in die wyn teenwoordig. Dit is dan, na afskeiding van die eterlaag, baie maklik om hulle te konsentreer (mits hulle nie van vergelykbare vlugtigheid met eter is nie) deur die eter af te damp. Hierdie konsentraat kan dan in die gaschromatograaf gespuit word, en selfs met 'n warmtegeleidingsdetektor word duidelike pieke verkry. Etanol word verwyder deur die was van die eterekstrak met water, en die water verwyder deur droogmaak met watervrye natriumsulfaat of ander geskikte droogmiddels sodat hulle nie hinder nie.

Eter-ekstraksies kan ook vir kwantitatiewe werk gebruik word. Die akkuraatste metode is om 'n interne standaard by die stof wat analiseer moet word, te voeg, om sodoende enige foute wat by die indamping of inspuit intree, uit te skakel (22). Hierdie standaardverbinding moet aan 'n paar vereistes voldoen:

Dit moet 'n piek gee wat nie baie oorvleuel met ander pieke wat in die chromatogram mag voorkom nie.

Dit moet goed oplosbaar wees in die medium waarin gewerk word, bv. 10% etanol is in die geval van droëwyn gebruik.

Dit moet goed deur eter geëkstraheer word.

Dit moet heelwat minder vlugtig as eter wees, sodat nie te veel verlore gaan gedurende indamping nie, anders is herhaalbare resultate onmoontlik om te verkry.

Dit moet geen reaksie ondergaan op enige tyd gedurende die proses nie.

Daar is gevind (20) dat ketone uiters geskik is vir interne standarde.

n Geskikte kolom moet vir die analise gevind word, wat goeie skeiding gee vir alkohole en esters. As vir n groot aantal verbindings analiseer word, kan daar nie isotermies gewerk word nie, aangesien die vlugtigheide van die geurstowwe wat in wyn voorkom so wyd van mekaar verskil. Temperatuur-programmering moet dus gebruik word. Daar kan dus ook nie, as gevolg van die vlugtigheid van die stasionêre fase, by te hoë gevoelighede van die vlam-ionisasie detektor gewerk word nie, tensy met n dubbelkolom dubbeldetektor gaschromatograaf gewerk word wat hierdie probleem uitskakel. Eter-ekstraksie en die daaropvolgende konsentrasie is dus ideaal vir die tipe van werk, omdat by betreklik lae gevoelighede gewerk kan word.

Mecke en de Vries (43) het n 2:1 (per volume) verhouding van eter en n-pentaan gebruik om die geurstowwe uit wyn te ekstrahere. Eter-pentaan (2:1), eter-petroleum eter (2:1) en suwew eter is op die proef gestel, en hulle het almal die geurstowwe in wyn goed geëkstraheer. Die petroleum eter het egter baie onsuiverhede bevat wat nie

deur distillasie verwyder kon word nie. Hulle het in die bepalinge groot pieke gegee wat met geurstofpieke oorvleuel het. Die eter-petroleum eter mengsel was dus nie geskik nie.

Eter het twee pieke gelewer wat na die eterpiek uitgekom het. Die groter piek hiervan het net na die etielasetaat verskyn, en die kleiner een net na dié van die interne standaard. Geen een het gehinder nie, alhoewel laasgenoemde effens oorvleuel het met die interne standaard. Eter-pentaan het ook die twee pieke gelewer. Hierdie onsuiverhede is bepaal deur 100 ml. van die betrokke ekstraheermiddel in te damp tot 0.5 ml., en dan 10 ml. hiervan in te spuit.

Die wyn wat deurgaans in hierdie werk gebruik is, is 'n wit droë-wyn, Sauvignon Blanc, wat gemaak is deur Drakenstein Koöperatiewe Wynkelders, Simondium (1964 oes). Dié wyn is gemaak uitsluitlik van die druif-variëteit Clairette Blanche (*Vitis Vinifera*). Koelgisting is by vervaardiging gebruik (gisting by ongeveer 52°C). Die gisting is gedoen met 'n mengsel van gisrasse van *Saccharomyces cerevisiae*, nl.

W.E. 1 Ras 13

W.E. 14 D 19 (a)

Champagne Epernay.

B. DIE IDENTIFIKASIE VAN GEURSTOWWE.

By die ondersoek hier is 500 ml. droëwyn drie maal geëkstraheer met 66.6 ml. per keer van 'n 2:1 (volume verhouding) mengsel eter-n-pentaan (d.w.s. altesaam 200 ml. eter). Die gekombineerde ekstrakte is ses maal gewas met 50 ml.-porsies gedeïoniseerde water (altesaam 300 ml.).

/27.....

Daarna is die ekstrak in n 250 ml. erlenmeyer oornag laat staan met 20 gm. watervrye Na_2SO_4 . Vervolgens is dit m.b.v. n waterstraal-suigpomp gefiltreer, en die Na_2SO_4 is drie keer met elke keer vyf ml. eter-pentaaan, nadat die fles ook daarmee uitgespoel is, gewas. Die filtraat plus wasvloeistof is oorgebring in n 250 ml. distilleerfles. Die suigfles is twee keer met elke keer vyf ml. eter-pentaaan gewas, en dit is ook in die distilleerfles gegooi.

Die distilleerfles is op n termostaat by 80°C geplaas, en die eter-pentaaan is afgedistilleer, hoofsaaklik by 33°C , totdat die temperatuur van die damp tot 35°C gestyg het. Daarna is die termostaat afgesit, en wanneer die temperatuur tot onder 25°C gedaal het, is dit weer op 50°C aangesit en eter-pentaaan is afgedistilleer vir omtrent 45 minute, totdat die volume van die filtraat omtrent 15 ml. was (sorg is gedra dat die temperatuur van die damp nie bo 35°C styg nie). Die ekstrak is oorgegooi in n 25 ml. peerflessie, sonder om die distilleerfles uit te was. Daarna is die ekstrak in n waterbad by kamertemperatuur m.b.v. n stroom stikstof tot 0.1 ml. ingedamp. Van hierdie ekstrak is elke keer $5\frac{1}{2}$ ml ingespuut.

Identifikasie van die verbindings is gedoen deur die retensietye op verskillende stasionêre fases te vergelyk met die van die suiwer verbinding, en ook deur die suiwer verbinding by die wyn te voeg en te kyk of daar n vergroting van die betrokke piek na ekstraksie en inspuiting was.

Van al die stasionêre fases wat uitprobeer is, naamlik Poli-etileen glikol 1500, Apiezon L, Carbowax 20 M., Neopentiel-glikol-

suksinaat, en S.E. 30 (Silicone gum rubber), het slegs die P.E.G. 1500 en die Apiezon L bevredigende skeidings gegee (sien Tabel 1).

Die belangrikste pieke is geïdentifiseer as etielasetaat, iso-butanol, iso-amielasetaat, iso-amielalkohol, etielkaproaat, n-heksanol, etielkaprielaat, etielkaprienaat, iso-amielkaproaat, etiellaurienaat, iso-amielkaprielaat en n ongeïdentifiseerde verbinding (Fig. 1) in die volgorde waarmee hulle uitkom met n een meter 20% P.E.G. 1500 kolom, met die programmeringskoma soos beskryf onder die „Bepaling van Iso-amielasetaat." (Hoofstuk I, C, (a), (i)). Heksanoë- en oktanoësuur-iso-amielster is geïdentifiseer slegs deur byvoeging van die suiwer verbinding by die wyn.

TABEL 1.

RETENSIETIPE VAN SOMMIGE GEURSTOWWE IN WYN

GEÏDENTIFISEER SOOS GEMEET OP VERSKEIE STASIONÊRE FASES.

Gaschromatograaf: Perkin-Elmer F6 met Vlam-ionisasie Detektor.

Draergas: Stikstof.

Vloeispoed van draergas: 60 ml./min.

Druk van Waterstof: 0.9 kgm./cm.²

Druk van Lug: 0.9 kgm./cm.²

No.	Kolom.	Kol.-temp. (°C)	Inspuit-temp. (°C)	Verbindings-temp. tussen kol. en detektor (°C)
1	1 meter 20% PEG 1500 op Celite	50	130	125
2	1 meter 20% PEG 1500 op Celite	100	160	180
3	2 meter 20% Apiezon L op Chromosorb	80	250	205
4	2 meter 10% Apiezon L op Celite	50	180	170
5	2 meter 10% Apiezon L op Celite	100	205	215
6	1 meter 10% Apiezon L op Celite	100	230	205
7	1 meter 10% Apiezon L op Celite	150	240	200

Verbinding.	Kolom No. 1.		Kolom No. 2.	
	Ret. tyd v. suiwer verb. (min.sek.)	Ret. tyd v. verb. in wyn (min.sek.)	Ret. tyd v. suiwer verb. (min.sek.)	Ret. tyd v. verb. in wyn (min.sek.)
Etielasetaat	2:23	2:22	1:01	1:01
Isobutanol	10:12	10:08	2:00	1:59
Iso-amielasetaat	11:28	11:54	2:29	2:28
Iso-amielalkohol	24:05	24:47	3:41	(3:46
C ₆ -etielester			4:24	(3:46
n-Heksanol			8:00	7:53
C ₈ -etielester			13:12	13:26
C ₁₀ -etielester			39:41	39:56
C ₁₂ -etielester			117:54	116:44

Verbinding.	Kolom No. 3.		Kolom No. 4.	
	Ret. tyd v. suiwer verb. (min.sek.)	Ret. tyd v. verb. in wyn (min.sek.)	Ret. tyd v. suiwer verb. (min.sek.)	Ret. tyd v. verb. in wyn (min.sek.)
Etielasetaat	4:12	4:16	2:24	2:31
Isobutanol	6:22	6:33	3:11	3:12
Iso-amielasetaat			21:08	21:00
Iso-amielalkohol	15:06	14:39	7:45	7:45
n-Heksanol			26:09	26:02

Verbinding.	Kolom No. 5.		Kolom No. 6.	
	Ret. tyd v. suiwer verb. (min.sek.)	Ret. tyd v. verb. in wyn (min.sek.)	Ret. tyd v. suiwer verb. (min.sek.)	Ret. tyd v. verb. in wyn (min.sek.)
Etielasetaat	1:22	1:21		
Isobutanol	1:34	1:38		
Iso-amiel-asetaat	4:56	5:01		
Iso-amiel-alkohol	2:29	2:14	0:56	0:53
C ₆ -etielester	10:53	10:44	3:54	4:00
n-Heksanol	5:14	5:01	1:53	1:52
C ₈ -etielester	43:07	41:22	15:30	15:06
C ₁₀ -etielester			65:41	64:18

Verbinding.	Kolom No. 7.	
	Ret. tyd v. suiwer verb. (min.sek.)	Ret. tyd v. verb. in wyn (min.sek.)
Iso-amiel-asetaat	0:48	0:48
Iso-amiel-alkohol	0:36	0:34
C ₆ -etielester	1:14	1:15
C ₁₀ -etielester	9:00	8:14

Die retensietye is aangegee direk soos gemeet, en geen korreksie is gemaak vir dooie volume nie.

C. DIE KWANTITATIEWE BEPALING VAN ESTERS.

(a) Eksperimenteel.

(i) Die Bepaling van Iso-amielasetaat.

Diisopropiel-ketoon (DIPK) is as interne standaard gebruik. Dit is goed oplosbaar in 10% etanol, en sy piek verskyn op 'n geskikte plek op die chromatogram met die programmeringskema wat gebruik is.

Alle organiese verbindings se stamoplossings is as volg opgemaak: 'n geskikte gewig van die suiwer verbinding is oorgebring met behulp van 'n mikro-pipet in 'n weegbuis, wat dadelik verseël en geweeg is. Dit is dan so gou moontlik oorgebring in 'n 100, 250 of 500 ml. maatfles, m.b.v. 'n geskikte oplosmiddel, gewoonlik 10% etanol, maar soms is 96% etanol gebruik. Die maatfles is dan verder tot op die merk met die oplosmiddel gevul. Alle organiese verbindings wat gebruik is, is eers gaschromatografies ondersoek om te verseker dat dit geen onsuiverhede bevat nie.

Drie ml. van 'n $\frac{1}{500}$ d.p.m. oplossing van diisopropiel-ketoon in 10% etanol is in 'n 250 ml. maatfles getap, en dit is tot op die merk met wyn gevul. Die 250 ml. is nou drie keer met 33.3 ml.-porsies skoon diëtiel eter geëkstraheer (altesaam dus 100 ml.), en die gekombineerde ekstrakte is ses keer met 25 ml. porsies gedeïoniseerde water gewas.

Daar is opgemerk dat, nadat die eerste 33.3 ml. eter by die 250 ml. wyn in die skeitregter gevoeg en geskud is, al die eter blykbaar in die wyn opgelos het, sodat daar nie twee duidelike lae verkry is nie. As

egter die tweede 33.3 ml. eter bygevoeg en geskud is, het die eterlaag goed afgeskei en kon dit van die waterige fase geskei word. So ook met die byvoeging van die derde 33.3 ml. eter.

Dié verskynsel het ook voorgekom as slegs met 10% etanol gewerk is. Eter-pentaaan het nie dié verskynsel getoon nie, en kon na die oerste byvoeging afgeskei word.

Die gekombineerde ekstrakte is oornag in 'n 250 ml. erlenmeyer oor 20 gm. watervrye Na_2SO_4 gedroog, en is verder presies net so behandel soos beskryf onder „Identifikasie van Geurstowwe.“ (Hoofstuk I, B). (Daar is met suiwer eter gewas en uitgespoel i.p.v. eter-pentaaan). Die ekstrak is vervolgens tot 'n volume van 0.5 ml. ingedamp in 'n peerflessie. Hiervan is elke keer $\pm 10 \mu\text{l}$. ingespuut.

Die konsentrasie van die standaard is só gekies dat die grootte van sy piek min of meer van dieselfde grootte-orde was as dié van die pieke wat bepaal moes word, en 'n hoeveelheid van $10 \mu\text{l}$. is gerieflik gevind om in te spuit omdat die meeste pieke dan net mooi op die registreerkaart ingepas het by die gevoeligheid waarby gewerk is. Hierdie gevoeligheid was 64 maal kleiner as die hoogste gevoeligheid waartoe die vlamionisasie detektor in staat was, omdat by 'n groter gevoeligheid die basislyn te veel gedryf het met die temperatuurprogrammering.

As tot 'n kleiner volume as 0.5 ml. ingedamp is, kon daar minder as $10 \mu\text{l}$. ingespuut word, maar daar het dan meer vlugtige stowwe verlore gegaan en die resultate was minder herhaalbaar. As minder as $10 \mu\text{l}$. ingespuut is, moes by 'n hoër gevoeligheid gewerk word, en dan het die basislyn te veel gevariëer.

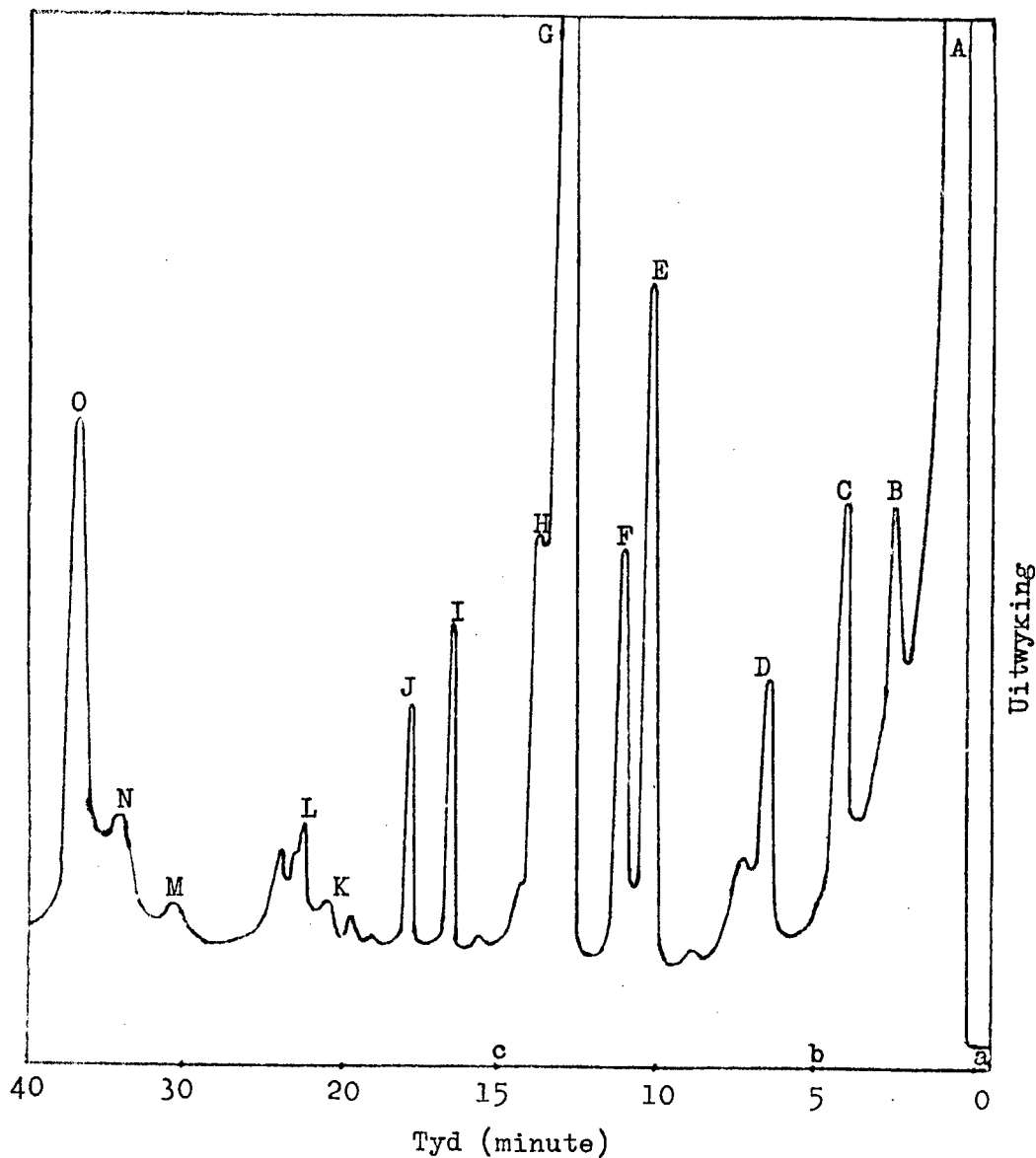
Die kondisies waaronder gewerk is, was as volg:

Gaschromatograaf: Perkin-Elmer F6 met vlamionisasie detektor.
Kolom: 1 meter 20% Felietileen Glikol 1500 op Celite.
Draergas: Stikstof.
Vloeispoed van Draergas: 60 ml./min.
Druk van Waterstof: 1 kgm./cm.²
Druk van Lug: 1 kgm./cm.²
Inspuit temperatuur: 210°C.
Verbindingstemperatuur tussen kolom en detektor: 200°C.

Programmeringskema: By inspuit was die kolomtemperatuur 25°C, en dit is so gehou tot presies 5 min. na inspuiting. Toe is temperatuur-programmering begin teen 10°C/min. tot 100°C, wat bereik is 12.5 min. na inspuiting. Presies 15 min. na inspuiting is die temperatuurprogrammering weer begin teen 10°C/min. tot 140°C, en na bereiking van dié temperatuur is isotermies daar gewerk. Op hierdie manier is in een chromatogram duidelike pieke verkry van verbindings vanaf etielasetaat tot iso-amieloktanoaat. (Sien Fig. I).

Om 'n verhoging in die iso-amielasetaat konsentrasie te verkry, is die hele proses drie keer herhaal, behalwe dat in die 250 ml. maatflesse elke keer saam met die standaard 0.5, 1.0 en 1.5 ml. van 'n ± 500 d.p.m. oplossing van iso-amielasetaat in 10% etanol gevoeg is voor tot op die merk met wyn opgemaak is (dus 'n konsentrasie-verhoging van $\pm 1, 2$ en 3 d.p.m.) (Tabel 2).

Vir elke iso-amielasetaat konsentrasie is drie inspuitings van $\pm 10 \mu\text{l.}$ elk gedoen, alhoewel slegs dié resultate gebruik is waar die kolom in sy „aktiewe vorm“ was (sien Hoofstuk II: „Die Twee Vorms van

FIG. I. CHROMATOGRAM VAN DIE ETER-EKSTRAK KONSENTRAAT VAN DROËWYN.

- | | | |
|--------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| A. Oplosmiddel (eter). | I. n-heksanol. | (a) 10 μ l ingesluit (25°C). |
| B. Etielasetaat. | J. C ₈ -etielester. | (b) Temp. Prog. begin: |
| C. Onsuiverheid. | K. C ₆ -iso-amielester. | 10°C/min. (25° → 100°C) |
| D. Interne Standaard. | L. C ₁₀ -etielester. | (c) Temp. Prog. begin: |
| E. Isobutanol. | M. C ₁₂ -etielester. | 10°C/min. (100° → 140°C) |
| F. Iso-amielasetaat. | N. C ₈ -iso-amielester. | |
| G. Iso-amielalkohol. | O. Ongeïdentifiseerde | |
| H. C ₆ -etielester. | verbinding. | |

die P.E.G. Kolom"). Die resultate behaal word in Tabel 2 gegee.

By die verwerking van die resultate is gebruik gemaak van die meting van piekhoogte maal retensietyd, wat volgens Carrol (45) en Dijkstra (46) beter herhaalbare resultate lewer as die konvensionele oppervlaktometings. Dit was ook meer gerieflik om dit hier te gebruik, aangesien daar heelwat oorvleueling was (sien veral die oorvleueling van die C₆-otielester se piek met dié van iso-amielalkohol). Alhoewel oorvleueling nie die piekhoogte baie beïnvloed nie, het dit tog 'n baie groot invloed op die piekbreedte en dus op die oppervlakte van die piek (47). Oorvleueling het ook nie 'n groot invloed op die retensietyd nie.

Daar is 'n grafiek getrek van die verhouding piekhoogte maal retensietyd (P x R) van iso-amielasetaat tot P x R van diisopropiel-ketoon (DIPK) teen die konsentrasie iso-amielasetaat teenwoordig, en 'n reguit lyn is verkry (sien Fig. II en Tabel 2).

By die trek van die grafiek is die verdunning in ag geneem (daar is elke keer minder wyn bygevoeg omdat meer iso-amielasetaat bygevoeg is) as volg: die grafiek is eers getrek sonder om die verdunning in ag te neem. Toe is 'n punt wat op die grafiek lê, egter nie die punt naaste aan die oorsprong nie, geneem, en, met die eerste punt as korrek aanvaar, is die verskuiwing van dié punt as gevolg van die verdunning uitgewerk. Die nuwe grafiek is deur die nuwe punt en die oorsprong getrek, en so is 'n nuwe eerste punt (naaste aan die oorsprong) dus ook verkry. Dié proses is toe herhaal, met die nuwe eerste punt as korrek aanvaar. In geen geval was meer as vier herhalings nodig voordat die verskuiwing van die eerste punt weglaatbaar klein geword het nie, en

TABEL 2.

DIE BEPALING VAN ISO-AMIELASETAAT IN WYN.

Stamoplossings (in 10% Etanol): Iso-amielasetaat: 456 d.p.m.
Diisopropiel-ketoon: 511 d.p.m.

Monster	Verbng. bygevoeg	Aantal ml. opgemaak tot 250 ml. met wyn	Kons.-toename (d.p.m.)
ABCD	DIPK	3	6.13
A			
B	Iso-amielasetaat	0.5	0.91
C	Iso-amielasetaat	1.0	1.82
D	Iso-amielasetaat	1.5	2.73

Monster	Diisopropiel-ketoon			Iso-amielasetaat			$\frac{(P \times R)_{IAA}}{(P \times R)_{DIPK}}$
	Piekhoogte (mm.)	Ret. tyd (sek.)	P x R	Piekhoogte (mm.)	Ret. tyd (sek.)	P x R	
A 1	101.0	437	44140	193.0	684	132000	2.991
2	157.9	394	62210	282.0	674	190100	3.057
						Gem.	3.02
B 1	139.5	429	59850	300.3	678	203600	3.402
						Gem.	3.40
C 1	143.5	418	59980	367.6	670	246300	4.106
2	168.7	434	73220	410.5	677	277900	3.796
						Gem.	3.95
D 1	93.3	412	38440	283.8	665	188700	4.908
2	143.0	399	57060	420.8	664	279400	4.895
						Gem.	4.90

die finale grafiek is toe getrek nadat die verskuiwings van al die punte van die grafiek a.g.v. verdunning uitgewerk is deur gebruik te maak van die oorspronklike konsentrasie van die verbinding in die wyn, soos afgelees van die gekorrigeerde eerste punt.

By die meting van retensietye is vir die dooie volume gekorrigeer deur die retensietyd van die etorpick af te trek van die retensietye soos gemeet. Vir die een meter 20% P.E.G. 1500 kolom was hierdie retensietyd 20 sek., of dus 'n dooie volume van 20 ml. teen 'n draergas-vloeispoed van 60 ml./min.

(ii) Die Gelyktydige Bepaling van Vyf Esters.

De Vries (22) het etielpelargonaat met groot sukses gebruik as interne standaard by die bepaling van esters. Die verbinding is dus ook op die proef gestel as interne standaard.

Daar is stamoplossings opgemaak, almal van ± 500 d.p.m., van C_6 -etielester, C_8 -etielester, C_9 -etielester, C_{10} -etielester en C_{12} -etielester, almal in 10% etanol. Daarbenewens is dieselfde stamoplossings van DIPK en iso-amielasetaat in 10% etanol gebruik wat in die vorige bepaling gebruik is.

Daar is opgemerk dat die C_9 -, C_{10} - en C_{12} -etielesters blykbaar nie baie goed oplosbaar is in 10% etanol nie, want, alhoewel by die opmaak vir 10 min. goed geskud is, het daar, nadat die oplossing vir 'n rukkie gestaan het, weer klein esterdruppeltjies op die oppervlakte verskyn. Dit het altyd weer verskyn na die oplossing geskud is, en het so gebly oor 'n tydperk van drie maande.

In vier 250 ml. maatflesse is oplossings van verskillende konsentrasies van die iso-amielasetaat, etielkaproaat (C_6), etielkaprielaat (C_8), etielkaprienaat (C_{10}) en etiellaurienaat (C_{12}) opgemaak in 10% etanol terwyl konstante hoeveelhede DIPK (± 6 d.p.m.) en etielpelargonaat (C_9) (± 6 d.p.m.) bygevoeg is as interne standaarde. Alle stamoplossings is baie goed geskud voordat dit in die buret gegooi is, en is dan dadelik in die maatfles getap. (Tabel 3).

Hierdie oplossings is, dadelik na opmaak, geëkstraheer met skoon eter, ingedamp en ingespuut onder presies dieselfde kondisies soos voorheen beskryf.

Daar is grafieke getrek van die P x R verhoudings van die iso-amielasetaat, C_6^- , C_8^- , C_{10}^- en C_{12}^- -etielesters tot DIPK teen hul konsentrasies, asook die P x R verhoudings van die betrokke esters tot C -etielester teen hul konsentrasies. (Fige. II en III).

Nuwe stamoplossings van ± 1000 d.p.m. is opgemaak van C_8^- , C_9^- , C_{10}^- en C_{12}^- -esters in 96% etanol. Almal was blykbaar goed oplosbaar daarin.

In n 250 ml. maatfles is DIPK (in 10% etanol) en C_9 -etielester (in 96% etanol) gevoeg en verder tot op die merk met wyn gevul, sodat die konsentrasies van die DIPK en C_9 -ester beide ± 6 d.p.m. was. In drie ander 250 ml maatflesse is dieselfde gedoen, behalwe dat, voor tot op die merk met wyn opgemaak is, verskillende hoeveelhede iso-amielasetaat, C_6 -etielester (albei in 10% etanol), C_8^- , C_{10}^- en C_{12}^- -etielesters (al drie in 96% etanol) bygevoeg is om drie verskillende verhogings in die ester-konsentrasies te verkry. (Tabel 4).

ESTERKONSENTRASIES IN 10% ETANOL.

Stamoplossings (in 10% Etanol):

Diisopropiel-ketoon:	511 d.p.m.
C ₉ -etielester:	532 d.p.m.
Iso-amielasetaat:	456 d.p.m.
C ₆ -etielester:	584 d.p.m.
C ₈ -etielester:	427 d.p.m.
C ₁₀ -etielester:	666 d.p.m.
C ₁₂ -etielester:	505 d.p.m.

Monster	Verbinding bygevoeg	Aantal ml. opgemaak na 250 ml. met 10% etanol.	Kons. teenwoordig (d.p.m.)
ABCD	Diisopropiel-ketoon	3	6.13
ABCD	C ₉ -etielester	3	6.39
A	Iso-amielasetaat	2	3.65
	C ₆ -etielester	1	2.34
	C ₈ -etielester	1	1.71
	C ₁₀ -etielester	1	2.66
	C ₁₂ -etielester	1	2.02
B	Iso-amielasetaat	3	5.47
	C ₆ -etielester	2	4.68
	C ₈ -etielester	2	3.42
	C ₁₀ -etielester	1.5	3.99
	C ₁₂ -etielester	1.5	3.03
C	Iso-amielasetaat	4	7.30
	C ₆ -etielester	3	7.02
	C ₈ -etielester	3	5.13
	C ₁₀ -etielester	2.25	5.99
	C ₁₂ -etielester	2.25	4.55
D	Iso-amielasetaat	5	9.12
	C ₆ -etielester	4	9.36
	C ₈ -etielester	4	6.84
	C ₁₀ -etielester	3	7.98
	C ₁₂ -etielester	3	6.06

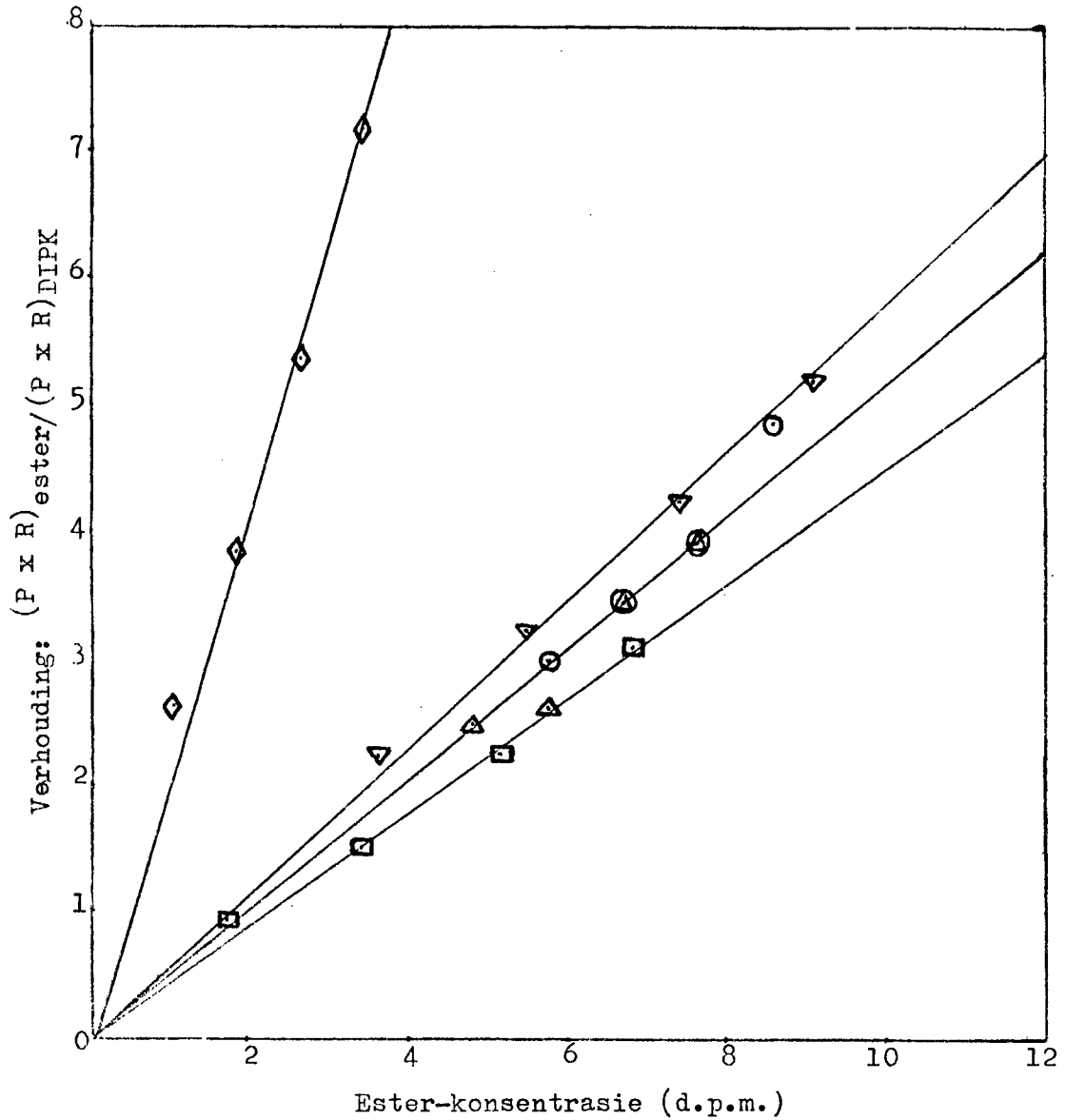
TABEL 4.

ESTERKONSENTRASIES IN WYN.

Stamoplossings (in 96% Etanol):
 C_9 -etielester: 974 d.p.m.
 C_8 -etielester: 822 d.p.m.
 C_{10} -etielester: 834 d.p.m.
 C_{12} -etielester: 884 d.p.m.

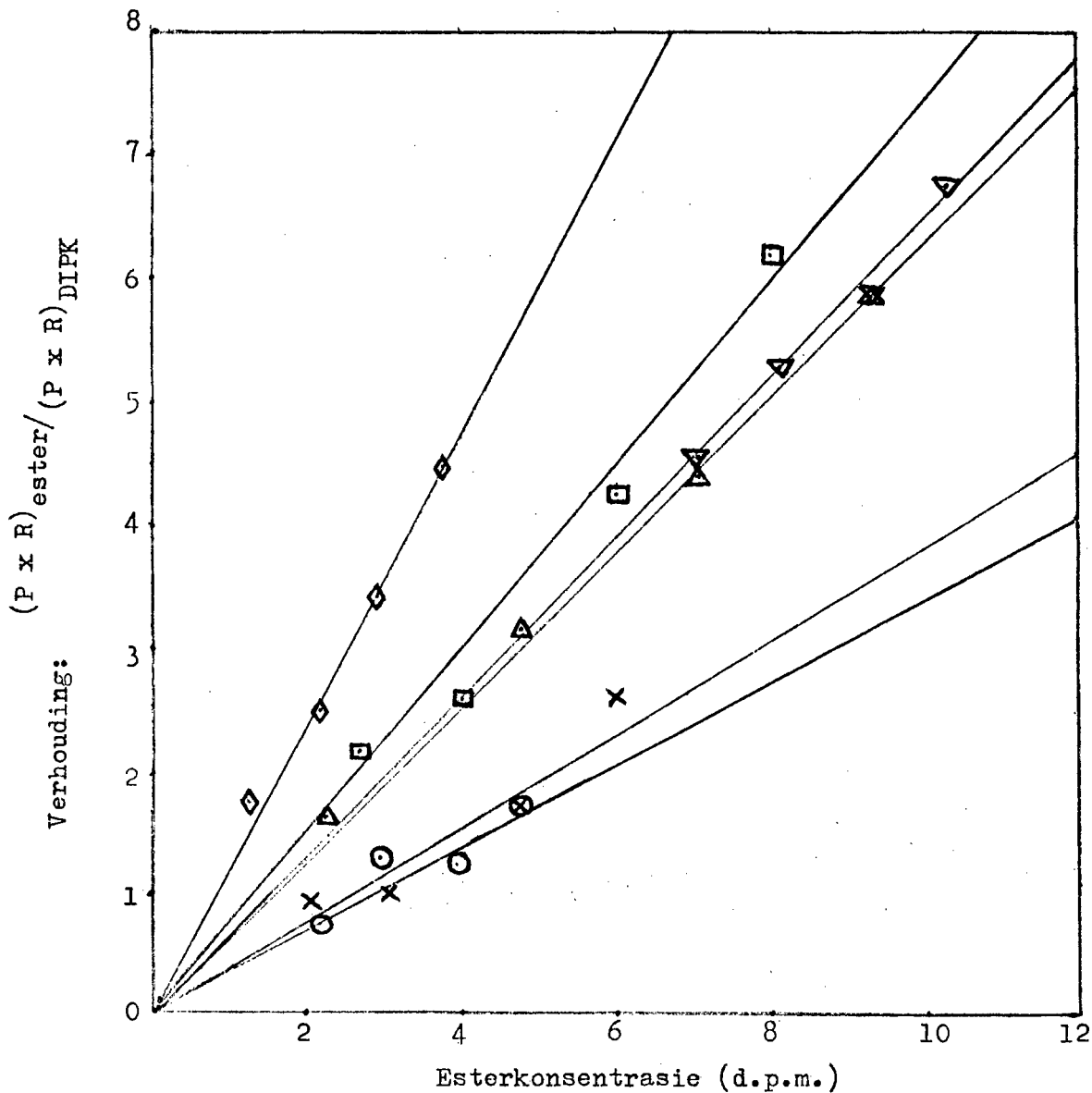
Monster	Verbinding bygevoeg	Aantal ml. opgemaak na 250 ml. met wyn.	Kons.-toename (d.p.m.)
ABCD	Diisopropiel-ketoon	3	6.13
ABCD	C_9 -etielester	1.64	6.39
A	-		
B	Iso-amielasetaat	0.5	0.91
	C_6 -etielester	0.5	1.71
	C_8 -etielester	0.25	0.82
	C_{10} -etielester	0.25	0.83
	C_{12} -etielester	0.25	0.88
C	Iso-amielasetaat	1.0	1.82
	C_6 -etielester	1.0	2.34
	C_8 -etielester	0.5	1.64
	C_{10} -etielester	0.5	1.66
	C_{12} -etielester	0.5	1.76
D	Iso-amielasetaat	1.5	2.73
	C_6 -etielester	1.5	3.51
	C_8 -etielester	0.75	2.46
	C_{10} -etielester	0.75	2.49
	C_{12} -etielester	0.75	2.64

FIG. II. KALIBRASIEKURWES VAN ESTERS IN WYN EN 10% ETANOL
 (DIPK as Interne Standaard).



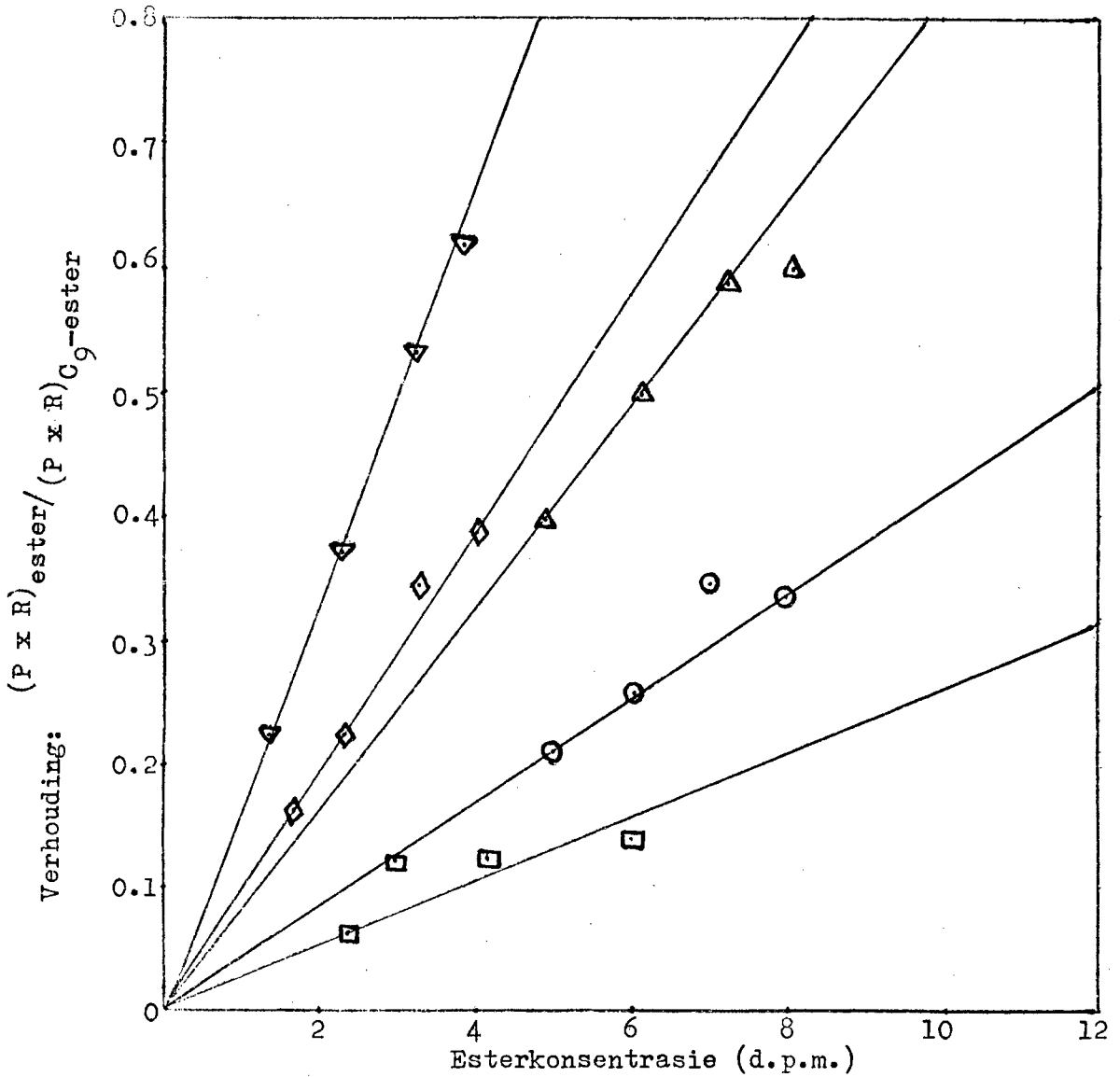
- Iso-amielasetaat in Wyn (alleen bepaal).
- △ Iso-amielasetaat in Wyn (saam met 4 ander esters bepaal).
- ▽ Iso-amielasetaat in 10% Etanol.
- ◇ C₈-etielester in Wyn.
- C₈-etielester in 10% Etanol.

FIG. III. KALIBRASIEKURWES VAN ESTERS IN WYN EN 10% ETANOL
(DIPK as Interne Standaard).



- ▽ C₆-ester in Wyn.
- △ C₆-etelester in 10% Etanol.
- ◇ C₁₀-etelester in Wyn.
- C₁₀-etelester in 10% Etanol.
- C₁₂-etelester in Wyn.
- × C₁₂-etelester in 10% Etanol.

FIG. IV. KALIBRASIEKURWES VAN ESTERS IN WYN
 (C₉-etielester as Interne Standaard).



- Iso-amielasetaat.
- △ C₆-etielester.
- ▽ C₈-etielester.
- ◇ C₁₀-etielester.
- C₁₂-etielester.

TABEL 5.

ESTERKONSENTRASIES IN DROÛWYN

SOOS BEPAAL MET DIPK EN C₉-ETIELESTER ONDERSKEIDELIK

AS INTERNE STANDAARDE.

Ester	Konsentrasie (d.p.m.)	
	DIPK as Standaard	C ₉ -etielester as Standaard
Iso-amielasetaat (alleen bep.)	5.77	
Iso-amielasetaat (met 4 esters)	4.98	5.21
C ₆ -etielester	7.01	4.97
C ₈ -etielester	1.30	1.39
C ₁₀ -etielester	1.59	1.72
C ₁₂ -etielester	2.11	2.40

Hierdie oplossings is op presies dieselfde manier as vantevore ge-
ekstraheer (met skoon eter), ingedamp en ingespuut onder dieselfde kon-
disies, met dieselfde programmeringskoma.

Grafieke is getrek van die P x R verhoudings van die vyf esters tot
DIPK teen die konsentrasies van die esters, en ook van die P x R ver-
houdings van die vyf esters tot C₉-etielester teen die konsentrasies
(Fige. II, III en IV).

(b) Resultate en Bespreking.

Bepaling van Esters in 10% Etanol:

Met DIPK as interne standaard lewer iso-amielasetaat, C₆- en C₈-
etielesters goeie reguit lyne, dog die punte vir die C₁₀- en C₁₂-esters
toon nie dieselfde nie. Dit is ook te verwag, omdat hulle nie goed op-
losbaar was in 10% etanol, waarmee hulle stamoplossings opgemaak was,
nie. (Fige. I en II).

Met C₉-etielester (stamoplossing opgemaak met 10% etanol) as stan-
daard kon glad nie goeie reguit lyne verkry word nie, ook as gevolg van
sy klein oplosbaarheid in 10% etanol in die 500 d.p.m. konsentrasie-
gebied.

Bepaling van Esters in Wyn:

Stamoplossings van C₈-, C₉-, C₁₀- en C₁₂-etielesters is nou in 96%
etanol opgemaak, en met sowel DIPK as C₉-etielester as interne standaar-
de is goeie reguit lyne verkry vir al vyf esters. Die punte wat ver af-
gewyk het van die reguit lyne kon aan eksperimentele foute toegeskryf
word.

Die grafieke wat verkry is by die bepaling van iso-amielasetaat alleen in wyn en by die bepaling van iso-amielasetaat saam met vier ander esters (met C_9 -etielester ook nog bygevoeg), was presies identies, alhoewel die oorspronklike konsentrasie iso-amielasetaat in die wyn soos volgens die onderskeie grafieke bepaal verskil het met 0.79 d.p.m. (Tabel 5). Hierdie verskil kan toegeskryf word aan foute wat gemaak word by die meting van die piekhoogtes. Die byvoeging van ander esters het dus blykbaar glad nie die helling van die kalibrasiekurwe van iso-amielasetaat in wyn beïnvloed nie.

Die grafieke verkry vir esters in 10% etanol en vir die ooreenstemmende esters in wyn, wyk van mekaar af in verskillende grade, afhangende van die betrokke ester. Dieselfde verskynsel is waargeneem by inspuittings in die dampfase.

Die C_8 -etielester wyk geweldig baie af, wat miskien toegeskryf kan word aan die feit dat in die 10% etanol bepaling sy stamoplossing met 10% etanol opgemaak was, terwyl by die wyn bepaling die stamoplossing met 96% etanol opgemaak was. Dieselfde geld natuurlik vir C_{10} - en C_{12} -etielester, en hulle grafieke wyk nie so baie van mekaar af nie. Omdat die C_{10} - en C_{12} -etielester egter sleg oplosbaar was in 10% etanol (in die 500 d.p.m. konsentrasie gebied) kan n mens nie baie vertrouwe hê in hul kalibrasiekurwes soos bepaal in 10% etanol nie. C_8 -etielester was egter goed oplosbaar in beide 10% en 96% etanol in die 500 d.p.m. konsentrasie gebied, soos ook blyk uit die punte verkry. (Sien ook Hoofstuk IV: „Gevoeligheid van die Detektor“).

Dit is natuurlik wenslik om kondisies so na as moontlik identies

aan die in wyn te hou waar bepalinge in wyn gedoen word. Dus moet die stamoplossings van verbindings waar moontlik in 10% etanol opgelos word. Dit skyn dus wenslik om meer waarde te heg aan bepalinge waar DIPK as interne standaard gebruik word as waar C₉-etielester gebruik word, alhoewel die verskil nie baie groot is nie, met die uitsondering van C₆-etielester.

Waar die betrokke kolom en programmeringskema gebruik word, word die piek van die C₆-etielester amper heeltemal doodgemaak deur die piek van iso-amielalkohol. Die C₆-etielester verskyn slegs as 'n klein skouertjie aan die iso-amielalkohol piek, hoewel daar egter goeie kalibrasiekurwes verkry is waar gebruik gemaak is van piekhoogte maal retensietyd metings. Dit was natuurlik nie moontlik om die oppervlakte van die C₆-etielester piek te meet nie.

Daar is ook probeer om etielasetaat op hierdie manier (eter ekstraksie) te bepaal, maar dit was onsuksesvol, hoofsaaklik om twee redes. Etielasetaat is relatief vlugtig, en daar gaan baie verlore by die indampingsproses. Ook kom die etielasetaat piek direk na die eterpiek wat dit gevolglik oorvleuel, en dit kon nie baie akkuraat gemeet word nie.

D. DIE KWANTITATIEWE BEPALING VAN ALKOHOLE.

(a) Eksperimenteel.

Stamoplossings is opgemaak van isobutanol, iso-amielalkohol en n-heksanol in 10% etanol (±500 d.p.m.). Hulle was almal goed oplosbaar daarin.

In vier 250 ml. maatflesse is oplossings van verskillende konsen-

trasies van die drie alkohole in 10% etanol opgemaak, met ook in elke fles n konstante hoeveelheid (± 6 d.p.m.) DIPK in 10% etanol (dieselfde stamoplossing as by die ester bepaling gebruik) as interne standaard (Tabel 6).

Hierdie oplossings is met suiwer eter geëkstraheer, ingedamp en ingespuut onder dieselfde kondisies soos by die ester bepaling.

In n 250 ml. maatfles is 3 ml. van die ± 500 d.p.m. stamoplossing DIPK in 10% etanol gevoeg, en verder tot op die merk met droëwyn gevul. In drie ander 250 ml. maatflesse is dieselfde hoeveelheid DIPK gevoeg asook verskillende hoeveelhede van die drie alkohole voor tot op die merk met droëwyn gevul is, om sodoende verskillende verhogings in die konsentrasies van die alkohole in die wyn te verkry. (Tabel 7).

Hierdie vier oplossings is ook met suiwer eter geëkstraheer, ingedamp en ingespuut onder dieselfde kondisies as vantevore. Grafieke is getrek van die piekhoogte maal rotensietyd verhoudings van elke alkohol tot DIPK teen die konsentrasie van die betrokke alkohol teenwoordig in sowel die wyn as die 10% etanol. (Fig. V).

(b) Resultate en Bespreking.

Isobutanol en n-heksanol het goeie reguit lyne gegee. Die grafieke vir isobutanol in 10% etanol en wyn het taamlik van mekaar afgewyk. Vir n-heksanol was die hellings van die grafieke vir 10% etanol en wyn egter dieselfde. (Fig. V).

Iso-amielalkohol het onder hierdie kondisies nie n goeie reguit lyn gelewer nie. Dit is miskien omrede dat die piek van die standaard glad nie van dieselfde grootte-orde was as die van die iso-amielalkohol

nie (die piekhoogte van die iso-amielalkohol was \pm 32 maal so groot as dié van die DIPK).

Stamoplossings van \pm 10,000 d.p.m. is opgemaak van iso-amielalkohol en DIPK in 96% etanol. (In hierdie konsentrasiegebied is gevind dat hulle glad nie oplos in 10% etanol nie).

Daar is weer verskillende konsentrasies iso-amielalkohol in 10% etanol opgemaak (in 250 ml. maatflesse), en ook in wyn, terwyl deurgaans n DIPK konsentrasie van \pm 95 d.p.m. bygevoeg is as interne standaard. Hierdie oplossings is met suiwer eter geëkstraheer, ingedamp en ingespuut net soos voorheen.

Grafieke is getrek van die P x R verhoudings van iso-amielalkohol tot DIPK teen die konsentrasie iso-amielalkohol teenwoordig. Vir sowel 10% etanol as wyn is nie goeie grafieke verkry nie. Moontlik kan dit toegeskryf word aan die feit dat hier met relatief gekonsentreerde stamoplossings in 96% etanol gewerk is.

Daar is ook probeer om die drie alkohole in sowel 10% etanol as wyn te bepaal met C₉-etielester (opgelos in 10% etanol) as interne standaard. Dit was egter glad nie suksesvol nie.

TABEL 6.ALKOHOLKONSENTRASIES IN 10% ETANOL.

Stamoplossings: Diisopropiel-ketoon: 511 d.p.m.
 (in 10% Etanol) Isobutanol : 621 d.p.m.
 Iso-amielalkohol : 484 d.p.m.
 n-Heksanol : 438 d.p.m.

Monster	Verbinding bygevoeg	Aantal ml. opgemaak na 250 ml. met 10% etanol.	Kons. teenwoordig (d.p.m.)
ABCD	Diisopropiel-ketoon	3	6.13
A	Isobutanol	2	4.97
	Iso-amielalkohol	10	19.35
	n-Heksanol	1	1.75
B	Isobutanol	3	7.46
	Iso-amielalkohol	11	21.29
	n-Heksanol	2	3.50
C	Isobutanol	4	9.94
	Iso-amielalkohol	12	23.22
	n-Heksanol	3	5.25
D	Isobutanol	5	12.43
	Iso-amielalkohol	13	25.16
	n-Heksanol	4	7.00

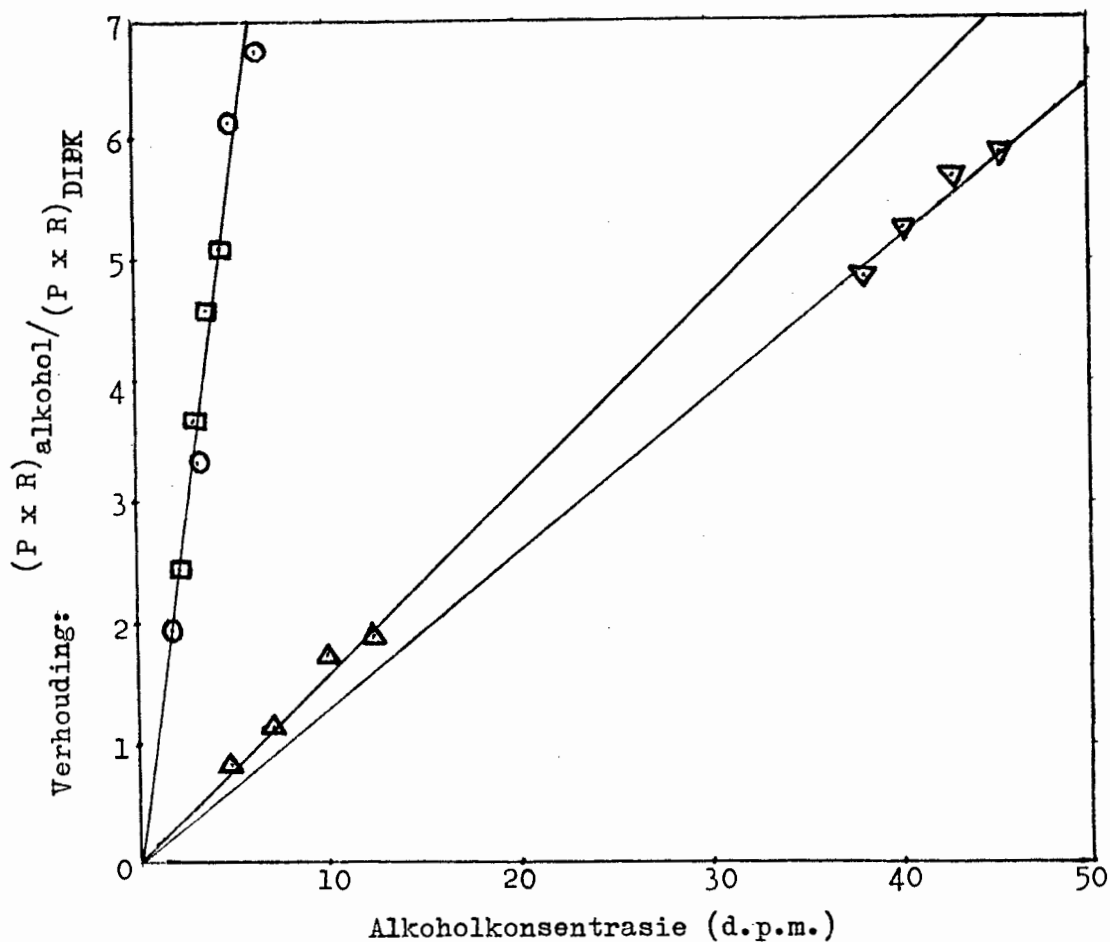
TABEL 7.

ALKOHOLKONSENTRASIES IN WYN.

Monster	Verbinding bygevoeg	Aantal ml. opgemaak na 250 ml. met wyn.	Konsentrasie-toename (d.p.m.)
ABCD	Diisopropiel-ketoon	3	6.13
A	-		
B	Isobutanol	1	2.49
	Iso-amielalkohol	1	1.94
	n-Heksanol	0.5	0.88
C	Isobutanol	2	4.97
	Iso-amielalkohol	2	3.87
	n-Heksanol	1.0	1.75
D	Isobutanol	3	7.46
	Iso-amielalkohol	3	5.81
	n-Heksanol	1.5	2.63

FIG. V. KALIBRASIEKURWES VAN ALKOHOLE IN WYN EN 10% ETANOL

(DIPK as Interne Standaard).



- ▽ Isobutanol in Wyn.
- △ Isobutanol in 10% Etanol.
- n-heksanol in Wyn.
- n-heksanol in 10% Etanol.

Oorspronklike Konsentrasies van die Alkohole in Droëwyn:

Isobutanol: 38.60 d.p.m.

n-heksanol: 2.15 d.p.m.

HOOFSTUK II.

DIE TWEE VORMS VAN DIE P.E.G.-KOLOM.

Die kolom wat by die eter ekstraksie bepalings gebruik is, was n een meter 20% P.E.G. (poli-etileenglikol) 1500 op Celite koperkolom.

Soos reeds genoem, het die eter wat vir ekstraksie gebruik is n onsuiverheid bevat wat n klein piek gegee het wat effens oorvleuel het met die piek van die DIPK. Daar is opgemerk dat, wannecr aan die begin van n reeks lesings vir die eerste keer ingespuut is, die twee pieke so te sê glad nie geskei was nie en die onsuiverheid slegs as n klein skouertjie aan die DIPK piek verskyn het. Nadat een maal geprogrammeer is tot by 140°C en die kolom weer afgekoel is na 25°C en die proses herhaal is, is die twee pieke gewoonlik baie beter geskei, en in die geval was die DIPK piek dan ook baie smaller en hoër as eers. Ook het dit gelyk asof die retensietyd van DIPK heelwat toegeneem het toe die kolom „geaktiveer" was. Soms het dit egter gebeur dat sonder waarskuwing in die middel van n reeks waarnemings, die onsuiverheid so piek weer „ingetrek" is in die DIPK piek en n broër, kleiner piek verkry is. (Sien Fig. VI en Tabel 8).

Hiordie verskynsel kan nie slegs aan onvolledige skoiding toegeskryf word nie, aangesien verwag sou word dat, waar twee pieke onvolledig geskei word, die gesamentlike piek eerder effens hoër sou word (47) terwyl die hoogte van die gesamentlike piek in die geval beslis afgeneem het.

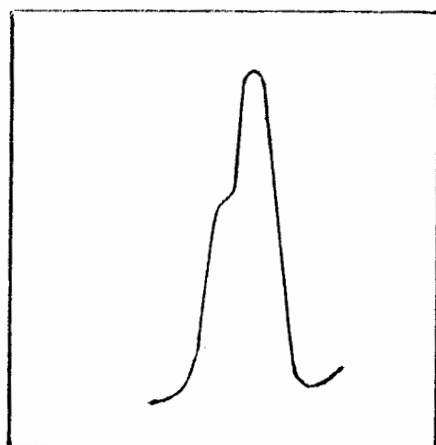
Keller et al. (48) het sulke „onredelike" gedrag van gaschromatografiese kolomme ondersoek en gevind dit word veroorsaak deur chemiese

veranderinge en fisiese verdamping en 'n herrangskikking van die stasionêre fase op die draermateriaal.

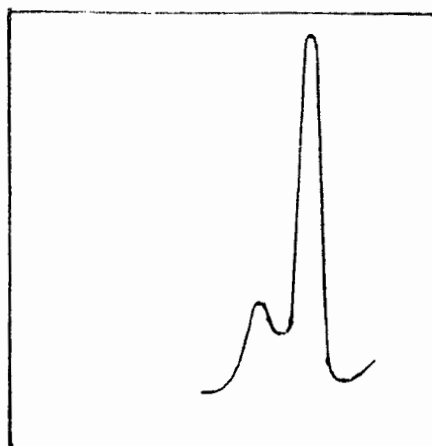
Chen en Gacke (49) het 'n soortgelyke verskynsel ondersoek. As stasionêre fase het hulle gebruik hoogkokende silikon vette (polêr) en hulle het gevind dat die retensietye van vetsuuresters verminder het nadat die kolom een maal tot 200°C verhit is, en dat die vorm van die pieke ook verander het (die skeidingseffektiwiteit is goeffekter). Hulle het hierdie verskynsel toegeskryf aan 'n herrangskikking van die polimere van die stasionêre fase by verhitting, en ook die dissosiasie van waterstofbande tussen die stasionêre vloeistoffase en die draermateriaal. Anders egter as by die silikon vette wat hulle gebruik het, het by die P.E.G. hier gebruik die retensietyd van die DIPK meer geword en die skeidingseffektiwiteit groter geword by die „geaktiveerde” vorm van die kolom.

Uit Tabel 8 blyk dat, alhoewel probeer is om elke keer min of meer dieselfde hoeveelheid in te spuit, die piekhoogtes van die DIPK met die kolom in sy „ongeaktiveerde” vorm oor die algemeen heelwat laer was as met die kolom in sy „geaktiveerde” toestand. Die gemiddelde retensietye van die DIPK (wat by $\pm 40^{\circ}\text{C}$ verskyn het), was omtrent 20 sekondes meer met die kolom in sy „geaktiveerde” toestand as met die onaktiewe kolom. By die C_9 -otiolester (wat by 140°C verskyn het) was daar so te sê geen verskil in piekhoogtes of retensietye tussen die aktiewe en onaktiewe vorms van die kolom nie. Die verskil blyk ook duidelik uit die gemiddelde piekhoogte maal retensietyd verhoudings van C_9 -otiolester tot DIPK vir die twee vorms van die kolom.

FIG. VI. CHROMATOGRAMME VERKRY VAN DIPK EN ONSUIWERHEID IN
ETER ONDER IDENTIESE KONDISIES.



„Onaktiewe" kolom.



„Aktiewe" kolom.

TABEL 8.

KOLOM IN ONGEAKTIVEERDE TOESTAND (volgens vorm van Pieke):

Diisopropiel-ketoon			C ₉ -etielester			(P x R) _{C₉}
Piekhoopte (mm.)	Ret. tyd (sek.)	P x R	Piekhoopte (mm.)	Ret. tyd (sek.)	P x R	(P x R) _{DIPK}
113.7	357	40590	313.0	1264	395600	9.748
71.1	402	28580	217.4	1263	274600	9.608
80.0	386	30880	256.7	1262	324000	10.490
83.9	388	32550	268.9	1268	341000	10.480
84.4	362	30550	289.5	1257	363900	11.910
<u>Gem.</u> 86.6	<u>375</u>		<u>269.1</u>	<u>1263</u>		<u>10.447</u>

KOLOM IN GEAKTIVEERDE TOESTAND (volgens vorm van Pieke):

133.1	400	53240	295.1	1258	371200	6.975
123.1	419	51580	268.6	1263	339200	6.577
120.1	341	40950	218.2	1259	244700	6.708
95.4	357	34060	178.0	1264	225000	6.606
171.4	413	70830	377.9	1266	478400	6.750
103.1	394	40620	255.6	1258	321500	7.915
93.5	429	40110	215.8	1257	271300	6.764
<u>Gem.</u> 120.0	<u>393</u>		<u>258.5</u>	<u>1261</u>		<u>6.899</u>

Die retensietye van verbindings wat by temperature hoër as 100°C verskyn het, is blykbaar glad nie geaffekteer deur die twee vorms van die kolom nie, miskien omdat die kolom by sulke hoë temperature slegs in een vorm bestaan. Dit blyk ook duidelik uit die vergelyking van die pickhoogte maal retensityd verhoudings van C_9 -etielester tot DIPK vir die twee vorms van die kolom.

Die gegewens in die tabel is verkry by die bepaling van osters in 10% etanol. Soos reeds genoem, is drie inspuitings gedoen vir elke bepaling, maar slegs verhoudings is gebruik by die verwerking van resultate waar die kolom in sy „geaktiveerde” vorm was.

Om die kolom dus in die aktiewe vorm te kry moes dit eers verhit word tot ongeveer 100°C , en die temperatuur moes ook nie te lank onder 30°C gehou word nie, anders het die kolom teruggekeer na sy onaktiewe vorm.

HOOFSTUK III.

DAMPFASE-INSPUITINGS VAN WYN.(a) Inleiding.

Met die ontwikkeling van die vlam-ionisasie detektor is daar 'n detektor gevind wat gevoelig genoeg was om geurstowwe, aanwesig in die afgeslote ruimte bokant wyn, aan te toon. Hierdie damp kan direk ingespuut word, en die pieke só verkry kan gebruik word vir kwalitatiewe en kwantitatiewe werk (21, 50, 51, 52, 53, 54). Ook kan die „patroon" van pieke só verkry gebruik word net om vas te stel of bv. 'n produk vars of oud is (50, 55).

Wanneer kwantitatief gewerk word in die dampfase, is daar etlike probleme wat oorkom moet word. Die pieke is gewoonlik nie baie groot nie, en soms hinder die agtergrondgeraas van die detektor omdat daar by sulke hoë gevoelighede gewerk moet word. Hierdie probleem, as dit voorkom, kan te bowe gekom word deur die betrokke oplossing of vloeistof te versadig met 'n geskikte anorganiese sout soos NaCl of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, waardeur die dampdruk van sommige verbindings verhoog word en daar dus 'n vergroting van die pieke verkry word (20, 51).

Verder is daar die probleem van herhaalbaarheid. As inspuittings van die damp onder identiese kondisies herhaal word, is daar gevind dat verskille in piekhoogtes en piekoppervlakte van tot 20% voorkom. Hier was die byvoeging van 'n interne standaard dus noodsaaklik.

Dampfase-analise is die beste geskik vir stowwe wat taamlik vlugtig is, omdat ninder vlugtige stowwe se dampdruk laag is by bv. kamertemperatuur. Hulle lewer dus nie groot pieke nie, en ook neem hulle gewoon-

lik taamlik lank om te verskyn (as isotermies gewerk word) sodat die betrokke pieke dan taamlik plat is. Deur die stof te verhit, kan n minder vlugtige stof se dampdruk verhoog word, maar in n komplekse mengsel soos wyn kan dit komplikasies veroorsaak, omdat méér vlugtige stowwe se dampdruk móór verhoog word en hulle dus groter pieke gee, sodat groot oorvloueling van pieke plaasvind. Deur by n hoë kolomtemperatuur te werk, kan egter bv. een piek van n taamlik nie-vlugtige verbinding goed „uitgehaal" word, maar die pieke van vlugtige verbinding val dan baie op mekaar.

Die meeste kolomme se temperature kan egter nie baie hoog gemaak word nie, aangesien dit soveel lek dat n te hoë detektorimpuls selfs sonder aanwesigheid van n monster gelewer word, en die agtergrondgeraas raak ook te groot, sodat geen konstante basislyn verkry kan word nie. Bv. maksimum temperature by die hoogste gevoeligheid van die detektor soos gevind vir die volgende kolomme:

1 meter 20% P.E.G. 1500 op Celite:	80°C
2 meter 20% P.E.G. 1500 op Celite:	70°C
2 meter 10% Apiezon L op Celite:	100°C
1 meter 5% S.E.30 op Celite:	150°C

Tensy daar van n dubbel-kolom dubbel-detektor apparaat gebruik gemaak word, kan temperatuurprogrammering nie toegepas word by dampinspuitings nie, weens die hoë gevoelighede waarby gewerk moet word. By dié gevoelighede is geen kolom gevind wat n redelik konstante basislyn gegee het by temperatuurverhoging nie, en daar moes dus isotermies gewerk word. Met n dubbeldetektor gaschromatograaf kan vir dié lokkasie van die sta-

sionêre fase kompenseer word, en temperatuurprogrammering by dampfaso-
inspuitings is reeds met so n apparaat gedoen (56).

n Probleem wat spesifiek by wyn opduik is die aanwesigheid van n
groot hoeveelheid etanol, wat n geweldige groot piek gee en deur oor-
vleueling die bepaling van ander pieke hinder. Dit kan deels verhelp
word deur verdunning van die wyn (20), maar dit bly n probleem by die
bepaling van stowwe met n retensie tyd soortgelyk aan dié van etanol.
Vir stowwe wat vóór etanol verskyn is dié probleem tot n groot mate uit-
geskakel.

Ten spyte van al die probleme is daar al groot sukses behaal in
die kwantitatiewe analise van die dampfase van alkoholiese drankes, veral
deur Kepner, Maarse en Strating (20), wat o.a. isobutanol, iso-amiel-
asetaat en iso-amielalkohol in die dampfase bepaal het.

(b) Eksperimenteel.

(i) Algemeen.

Van al die stasionêre fases wat uitprobeer is, was poli-etileen-
glikol die beste geskik vir dampfase analise. Sowel P.E.G. 1500 as
P.E.G. 400 het goeie resultate gelever. Ander stasionêre fases wat
probeer is, was Apiezon L, Carbowax 20 M., Neopentiel glikol suksinaat
en S.E.30 (Silicone Gum Rubber).

Met behulp van n spuitjie is 10 ml. damp ingespuut, en met gebruik
van n gaspiet 25 ml. in die apparaat ingelaat. Die groottes van die
pieke verkry het egter nie baie verskil nie, waarskynlik omdat dit moeilik
was om die maksimum hoeveelheid damp in die gaspiet te kry.

Die kondisies waaronder gewerk was as volg:

Gaschromatograaf: Perkin-Elmer F6 met vlam-ionisasie detektor.

Kolom: 2 meter 20% P.E.G. 1500 op Celito.

Draergas: Stikstof.

Vloeispoed van Draergas: 60 ml./min.

Druk van Waterstof: 1 kgm./cm².

Druk van Lug: 1 kgm./cm².

Inspuit-temperatuur: 160°C.

Verbindingstemperatuur tussen kolom en detektor: 160°C.

Kolomtemperatuur: Vir bepaling van Etielasetaat: 40°C.

Vir bepaling van Asetaldehyd: 70°C.

Pieke van die volgende verbinding is verkry by die inspuiting van 10 ml. damp en 'n kolomtemperatuur van 70°C: Asetaldehyd, metielasetaat, etielasetaat, etanol, isobutanol, iso-anielasetaat, iso-amielalkohol, in die volgorde waarin hul uitkom. (Fig. VII). Laasgenoemde vier is reeds vroeër geïdentifiseer, en eersgenoemde drie is identifiseer deur byvoeging van die suiwer verbinding by die wyn, waardeur vergroting van die pieke verkry is, asook die meting van die retensietyd van die suiwer verbinding op die P.E.G. 1500 kolom.

(ii) Die Bepaling van Etielasetaat.

As interne standaard by die bepaling van etielasetaat is gebruik gemaak van asetoon, wat by 40°C 'n retensietyd het van 15 sekondes minder as dié van etielasetaat. Die metode wat gevolg is, is in hoofsaak dié van Kepner, Maarse en Strating (20). Hiervolgens word 5 ml. van 'n \pm 1000 d.p.m. oplossing van asetoon in 10% etanol in 'n 100 ml. maatfles geneem, en die fles verder tot op merk gevul met droëwyn; die

- 55 -

konsentrasie van die asotoon was dus \pm 50 d.p.m. Die inhoud van die fles is alles oorgevoer na n 250 ml. erlenmeyer wat dig gesluit is met n dun rubberprop, gemaak deur n rubberprop in skywe van vyf tot sewe millimeter te sny sodat die naald van n spuitjie maklik daardeur kon gaan. Omdat die pick van die etielasetaat so groot was, was dit nie nodig om die dampdruk te verhoog deur byvoeging van n anorganiese sout nie.

Die erlenmeyer is in n waterbad by 25°C geplaas, waar dit vir ten minste 20 minute voor inspuiting gelaat is. Die fles is ook van tyd tot tyd effens geskud. Toe is die punt van n 10 ml. spuitjie (Socorex Calibra 200°C) deur die prop gesteek en die spuitjie is twee keer vol damp getrek en weer leeg gemaak voor dit vol getrek en die punt uitgetrek is. Sos milliliter damp is toe in die gaschromatograaf ingespuit. Vir elke konsentrasie etielasetaat is daar drie inspuitings gedoen, en tussen elke inspuiting is die spuitjie met seep-oplossing en water gewas en in n oond by 100°C gedroog vir ten minste 30 minute.

Om n verhoging in die etielasetaat konsentrasie te verkry, is bo- staande prosedure drie keer herhaal, nadat saam met die asotoon in die 100 ml. maatfles agtereenvolgens een, twee en drie milliliter van n \pm 500 d.p.m. oplossing van etielasetaat in 10% etanol bygevoeg is en tot op die merk met wyn gevul is. Die etielasetaat konsentrasie is dus met \pm 5, 10, en 15 d.p.m. elke keer verhoog. Omdat daar dus elke keer 1, 2 en 3 ml. wyn minder bygevoeg is, is hiervoor gekorrigeer in die verwerking van die resultate (soortgelyk soos by eter-okstraksie). (Tabel 9).

TABEL 9.

DIE BEPALING VAN ETIELASETAAT IN WYN.

Stamoplossings: Asetoon: 1023 d.p.m.
 (in 10% etanol) Eticlasetaat: 528.5 d.p.m.

Monster	Verbinding bygevoeg	Aantal ml. opgemaak na 100 ml. met wyn	Kons.-toename (d.p.m.)
ABCD	Asetoon	5	51.15
A	---		
B	Eticlasetaat	1	5.29
C	Eticlasetaat	2	10.57
D	Eticlasetaat	3	15.86

DIE BEPALING VAN ETIELASETAAT IN 10% ETANOL.

Monster	Verbinding bygevoeg	Aantal ml. opgemaak na 100 ml. met 10% Etanol.	Kons. teenwoordig (d.p.m.)
ABCD	Asetoon	5	51.15
A	Eticlasetaat	5	26.43
B	Eticlasetaat	10	52.85
C	Eticlasetaat	12	63.42
D	Eticlasetaat	14	73.99

Die hele prosedure is herhaal met 'n 10% etanol oplossing waarin elke keer \pm 50 d.p.m. aseton teenwoordig was, terwyl die etielasetaat konsentrasie agtereenvolgens \pm 25, 50, 60 en 70 d.p.m. gemaak is. (Tabel 9).

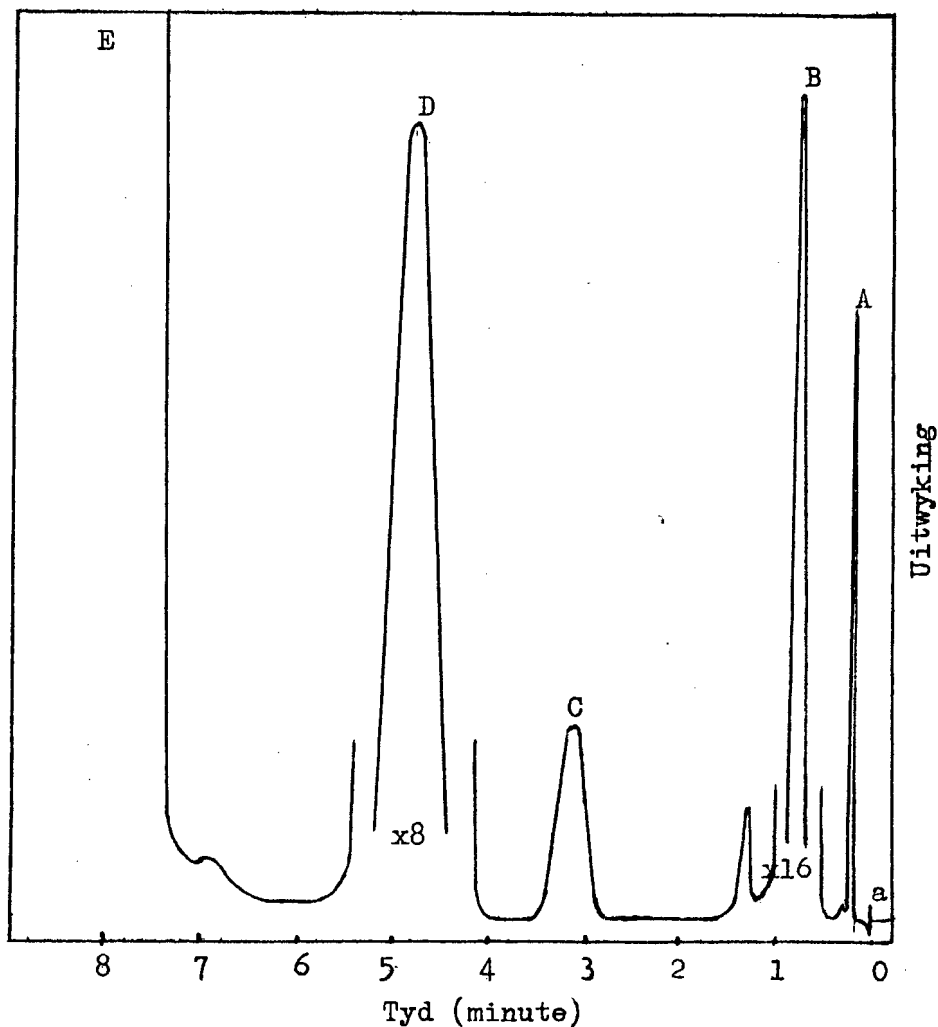
By die verwerking van die resultate is gebruik gemaak van die meting van piekhoogte maal retensietyd, wat volgens Carrol (45) en Dijkstra (46) beter herhaalbare resultate lower as die konvensionele oppervlaktometings. Vir 'n toets is egter by die bepaling van etielasetaat in wyn ook oppervlaktometings gedoen (piekhoogte maal piekbreedte op halfhoogte), en daar is gevind dat vir die betrokke doel daar so te sê geen verskil is tussen die twee metodes nie. (Fig. VIII).

As korreksie vir die dooie volume waar die retensietyd gemeet is, is die tyd geneem vir die verskyning van die „lugpiek;” 'n piek wat by uiters hoë gevoelighede van die vlam-ionisasie detektor verskyn as gevolg van die drukverandering in die draergas by die inspuiting van so 'n groot volume soos bv. 6 ml. Die tydsverloop vanaf inspuiting tot die verskyning van die piek was vir die betrokke twee meter kolom 36 sek., of teen 'n draergas vloeiensnelheid van 60 ml./min. was die dooie volume dus 36 ml.

(iii) Die Bepaling van Asetaldehyd.

By die bepaling van asetaldheid is in hooftrouke dieselfde prosedure gevolg as by die bepaling van etielasetaat, egter met 'n paar verskille. Aangesien die konsentrasie van asetaldheid in die wyn baie laer is as die van etielasetaat, en ook omdat die vlam-ionisasie detek-

FIG. VII. CHROMATOGRAM VAN DIE DAMPFASE VAN DROËWYN.



2 meter Polietileenglikol 1500 kolom (40°C)

a 10 ml. damp ingespuut (100 ml. wyn vers. met 50 gm. NaCl).

A „Lugpiek.“

B Asetaldehyd.

C Metielasetaat.

D. Etilasetaat.

E Etanol.

Die piek van die interne standaard (asetoon) val op dié van metielasetaat.

tor relatief ongevoelig is vir asetaldehyd weens die min koolstof-atome daarin, is dit nodig om 'n vergroting van die piek te verkry deur byvoeging van 'n anorganiese sout. Daar is gevind dat 'n vergroting van die piekhoogtes van omtrent vyf maal verkry kan word deur die wyn te versadig met NaCl. Dié verskynsel is reeds vroeër gerapporteer. (20, 51).

In 'n 100 ml. maatfles is eers een milliliter van die ± 1000 d.p.m. aseton-10% etanol oplossing getap (dus ± 10 d.p.m. aseton teenwoordig) as 'n interne standaard. Daarna is tot op die merk gevul met wyn (of 10% etanol) nadat die regte hoeveelhede asetaldehyd bygevoeg is. In die wyn is die asetaldehyd-konsentrasie agtoreenvolgens verhoog met 50, 100 en 150 d.p.m., terwyl die asetaldehyd-konsentrasie in 10% etanol $\pm 50, 100, 150$ en 200 d.p.m. gemaak is. Die 100 ml. wyn (of 10% etanol) is in die 250 ml. erlenmeyer versadig met NaCl (50 gm. is gebruik). Vervolgens is 10 ml. damp ingespuut (drie maal vir elke konsentrasie asetaldehyd) met die kolomtemperatuur 70°C . Die resultate behaal met hierdie metode word in Tabel 10 aangegee en Fig.VII toon 'n tipiese chromatogram verkry volgens die bostaande prosedure.

(c) Resultate en Bespreking.

Bepaling van Etielasetaat:

In die geval van etielasetaat is uitstekende resultate verkry. Daar was 'n baie duidelike reglynige verband tussen die verhouding van die piekhoogte maal retensietye van etielasetaat en aseton en die konsentrasie etielasetaat teenwoordig. (Fig. VIII).

TABEL 10.

DIE BEPALING VAN ASETALDEHIED IN WYN.

Stamoplossings: Asetoon: 1023 d.p.m.
(in 10% etanol) Asetaldehyd: 9633 d.p.m.

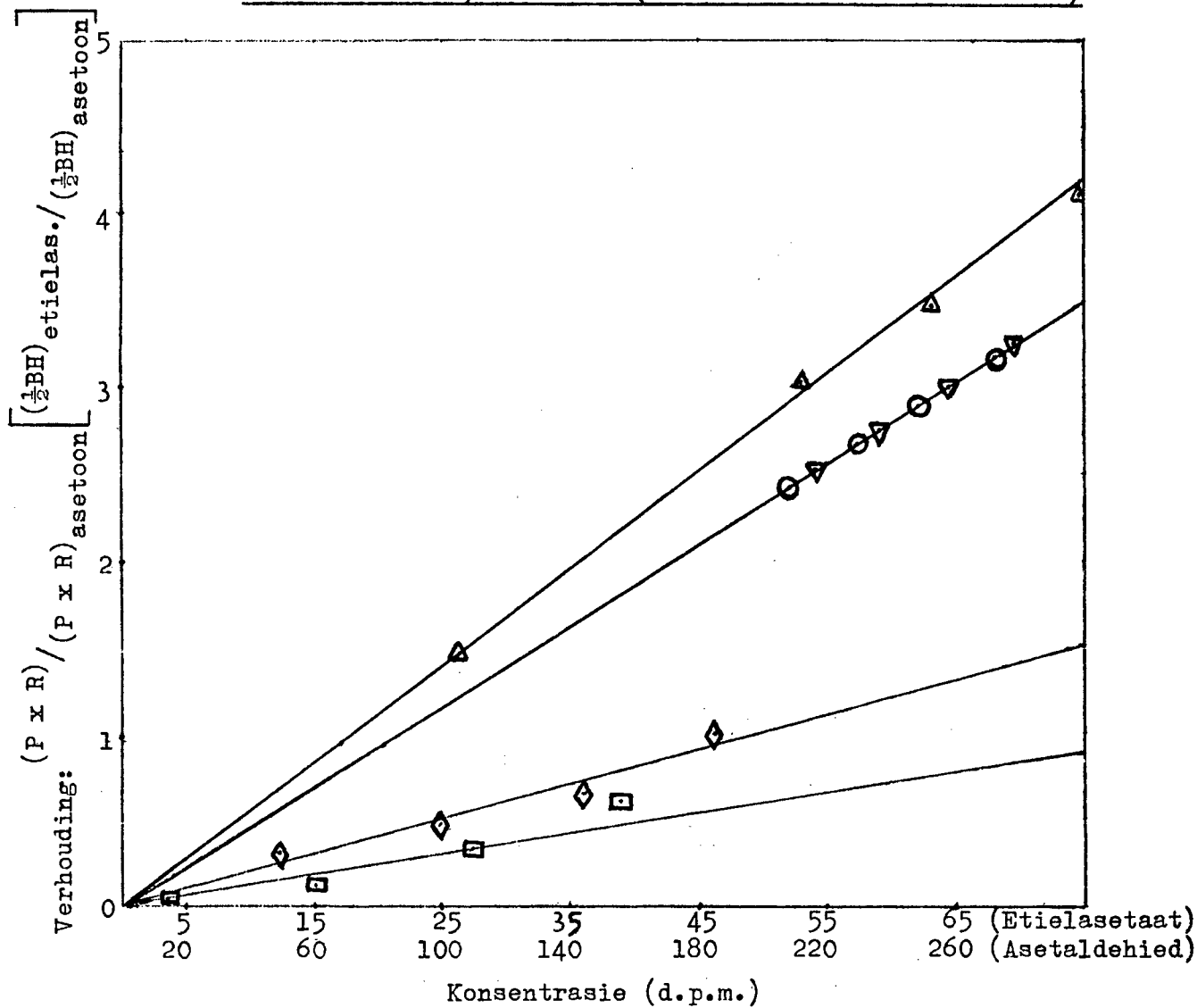
Monster	Verbinding bygevoeg	Aantal ml. opgemaak na 100 ml. met wyn.	Kons.-toename (d.p.m.)
ABCD	Asetoon	1	10.23
A	---		
B	Asetaldehyd	0.5	48.17
C	Asetaldehyd	1.0	96.33
D	Asetaldehyd	1.5	144.50

DIE BEPALING VAN ASETALDEHIED IN 10% ETANOL.

Monster	Verbinding bygevoeg	Aantal ml. opgemaak na 100 ml. met 10% etanol.	Kons. teenwoordig (d.p.m.)
ABCD	Asetoon	1	10.23
A	Asetaldehyd	0.5	48.17
B	Asetaldehyd	1.0	96.33
C	Asetaldehyd	1.5	144.50
D	Asetaldehyd	2.0	192.66

FIG. VIII. KALIBRASIEKURWES VAN ETIELASETAAT EN ASETALDEHIED

IN WYN EN 10% ETANOL (Asetoon as Interne Standaard).



- Etielasetaat in Wyn ($\frac{1}{2}$ BH verhouding).
- ▼ Etielasetaat in Wyn (P x R verhouding).
- ▲ Etielasetaat in 10% Etanol.
- Asetaldehyd in Wyn.
- ◇ Asetaldehyd in 10% Etanol.

Daar is egter verskillende hellings van die reguit lyn verkry vir wyn en 10% etanol. Vir 'n gegewe konsentrasie etielasetaat was sy piek-hoogte groter in 10% etanol as in wyn. Hierdie verskil in hellings is verstaanbaar as in gedagte gehou word hoe 'n komplekse mengsel van verbindings wyn is, en ook dat die etanol konsentrasie van die wyn ietwat verskil van 10%.

Die verskil in hellings van kurwes verteenwoordigend van 'n hele aantal verbindings in alkoholiese drankte, en die grafieke soos bepaal in etanol-oplossings van min of meer dieselfde konsentrasie, is reeds vantevore gevind (20).

Bepaling van Asetaldehyd:

By asetaldehyd was die resultate nie so goed as by etielasetaat nie. Ten spyte van die byvoeging van NaCl was die asetaldehyd piek nog relatief klein in die wyn, dog met byvoeging van asetaldehyd is hierdie fout verminder. (Fig. VII).

Daar kon egter nog altyd 'n redelik goeie reguit lyn deur die punte verkry getrek word, en, omdat die oorspronklike konsentrasie van die asetaldehyd in die wyn so laag was, veroorsaak 'n taamlike fout in die helling van die grafiek 'n relatief klein fout in die oorspronklike asetaldehyd konsentrasie.

Die hellings van die lyn verkry in wyn en in 10% etanol het hier ook verskil, soortgelyk soos by etielasetaat. (Fig. VIII).

ETIELASETAAT EN ASETALDEHIED KONSENTRASIES IN DROÛWYN
SOOS BEPAAL MET ASETOON AS INTERNE STANDAARD.

Verbinding	Konsentrasie in Wyn
Etielasetaat (soos bepaal met $\frac{1}{2}$ BH verhoudings)	51.8 d.p.m.
Etielasetaat (soos bepaal met P x R verhoudings)	54.0 d.p.m.
Asetaldehyd (soos bepaal met P x R verhoudings)	13.0 d.p.m.

Die verskil in konsentrasies van die etielasetaat soos bepaal op die twee maniere van meet, moet toegeskryf word aan foute wat by die meting van die piekhoogtes insluip.

HOOFSTUK IV.

DIE GEVOELIGHEID VAN DIE DETEKTOR.

Waar daar 'n verskil in die hellings van die kalibrasiekurwes verkry word vir dieselfde verbinding, waar gewerk word in die twee media wyn en 10% etanol, kom dit daarop neer dat die vlam-ionisasie detektor nie ewe gevoelig is vir dieselfde verbinding in die twee media nie. Daarom is dit interessant om 'n vergelyking te tref van die verskillende gevoelighede relatief tot die standaard verbinding, nl. diisopropielkotoon of asetoon.

Die gevoelighede, soos in Tabel 11 as syfers uitgedruk, is bereken deur die P x R verhouding van die betrokke verbinding tot die standaard (DIPK of Asetoon) te vermenigvuldig met die konsentrasie standaard teenwoordig gedeel deur die konsentrasie van die betrokke verbinding.

M.a.w. die P x R verhoudings is uitgewerk vir die geval wanneer die konsentrasies van al die verbindings dieselfde is as dié van die standaard. Waar gemiddeldes van die gevoelighede uitgewerk is, is punte wat ver van die kalibrasiekurve gelê het, weggelaat, mits die ander punte op of naby die reguit lyn gelê het. Waar die punte egter aan weerskante van die lyn gelê het (soos bv. by asetaldhid), is die gemiddelde van almal geneem.

Die stamoplossings van iso-amielasetaat, C₆-etielester, etielasetaat, asetaldhid, isobutanol en n-heksanol is deurgaans opgemaak in 10% etanol. Alhoewel daar 'n verskil was in die detektor se gevoeligheid vir hulle in 10% etanol en in wyn, was die verskil nie baie groot nie, soos uit die tabel blyk.

TABEL 11.

GEMIDDELDE GEVOELIGHEDE VAN VERBINDINGS
SOOS BEPAAL RELATIEF TOT DIPK OF ASETOON.

Verbinding	Gemiddelde Gevoeligheid relatief tot DIPK	
	In 10% Etanol	In Wyn
Iso-amielasetaat (alleen)		3.14
Iso-amielasetaat (+ 4 esters)	3.57	3.12
C ₆ -etielester	4.01	4.04
C ₈ -etielester	2.76	12.79
C ₉ -etielester	6.64	10.39
C ₁₀ -etielester	4.54	7.27
C ₁₂ -etielester	2.41	2.08
Isobutanol	1.01	0.80
n-Heksanol	6.50	7.11

Verbinding	Gemiddelde Gevoeligheid relatief tot Asetoon	
	In 10% Etanol	In Wyn
Etielasetaat	2.87	2.43
Asetaldehyd	0.052	0.031

Die stamoplossings van C_8 -etielester, C_9 -etielester, C_{10} -etielester en C_{12} -etielester is opgemaak in 10% etanol toe die kalibrasiekurwes bepaal is in 10% etanol. Soos reeds genoem, was hierdie verbindings met die uitsondering van die C_8 -etielester, nie baie goed oplosbaar hierin nie. Waar die kalibrasiekurwes in wyn bepaal is, is die stamoplossings van bostaande verbindings opgemaak in 96% etanol.

Soos uit Tabel 11 duidelik is, lyk dit of hierdie feit die gevoeligheid van die detektor t.o.v. die betrokke verbindings beïnvloed het, want daar was 'n groot verskil in die gevoeligheid van die detektor vir die verbindings by kalibrasiekurve bepalinge in wyn en in 10% etanol. Slegs by die C_{12} -etielester was die verskil in gevoeligheid van dieselfde grootte-orde as by die verbindings waar deurgaans in 10% etanol medium gewerk is.

Dit kan ook wees dat die groot verskil 'n gevolg was van onvolledige oplosbaarheid van die verbindings in 10% etanol, dog hierdie argument geld nie in die geval van die C_8 -etielester nie, wie se gevoeligheid die meeste verskil het van al die verbindings.

Geen definitiewe gevolgtrekkings kon egter hier gemaak word nie, omdat daar te min resultate verkry is.

HOOFSTUK V.

DIE KONSENTRERING VAN DAMP IN 'N KOUE VAL.

Verskeie persone (57, 58, 59, 66), het al werk gedoen i.v.m. die koue val konsentrering van verbindings wat in uiters lae konsentrasies voorkom. Sulke valle wat afgekoel word deur droë ys of vloeibare stikstof is ook al meermale beskryf (60, 61, 62, 63, 64). Kwantitatiewe werk is reeds op dié manier gedoen. Rhoades (66) het geurstowwe van koffie so bepaal, terwyl Lawrey en Cerato (65) metaan in lug so bepaal het. Koue val konsentrering vind dan ook baie toepassings in studies van lugbesoedeling.

Die moontlikheid om die damp van wyn in so 'n val te konsentreer is ondersoek. 'n U-vormige koperkolommetjie, 50 cm. in totale lengte en 0.5 cm. in deursnee, is aan die ente van kraantjies voorsien, wat dit dig kon afsluit. Dit is gepak (verskeie soorte materiale is probeer) en in 'n droë ys-aseton mengsel by -80°C afgekoel terwyl stikstof, wat oers deur wyn gaborrel is, daardeur gelei is. Daarna is die kraantjies van die kolom toegedraai, die kolom verhit en dan met stikstof direk in die gaschromatograaf in, uitgespoel.

Die kolommetjie is gepak met 10% digliserol op chromosorb, skoon chromosorb en glaspêrels agtereenvolgens. Ook is die leë kolommetjie probeer. Vir skeiding is gebruik 'n een meter 5% S.E.30 kolom, en ook 'n een meter 20% P.E.G. 1500 kolom. Beide isotermiese en temperatuur-geprogrammeerde skeidings is ondersoek. In alle gevalle is pieke verkry, dog die etanolpiek het baie gehinder en baie oorvleuel, en die

meeste pieke het dan ook op sy onsimmetriese rugkant uitgekom. Die meeste picke is verkry by programmering. Hierby het die verskuiwing van die basislyn a.g.v. toenemende lekkasie van stasionêre fase die verkryging van goeie resultate nog verder bemoeilik. Kwantitatiewe uitmeet van die picke kon sodoende nie deurgevoer word nie.

Die stikstof is, nadat dit deur die wyn geborrel is, deur water gelei voordat dit deur die afgekoelde kolommetjie gelei is. Dit het die meeste van die etanol verwyder, dog daarmee saam ook die grootste gedeelte van die ander verbindings. Die lei van die gasfase deur 'n droë CaCl_2 -buis het die grootte van die etanolpiek nie merkbaar geaffekteer nie.

Dit was baie moeilik om die koperkolommetjie heeltemal skoon te kry nadat dit verhit en uitgespoel is. Die stowwe in die kolommetjie is nooit volledig uitgespoel nie, en dit moes herhaalde male uitgespoel word met stikstof voordat dit weer gebruik kon word. In die geval van die leë kolom is dit met water uitgespoel en in 'n oond gedroog. 'n Vlekvrye staal-kolommetjie, wat ook uitprobeer is, was geen verbetering in die opsig nie. Hierdie metode bied 'n moontlikheid vir die analise van wyn, mits 'n manier gevind kan word om die etanolkonsentrasie baie kleiner te maak sonder om die konsentrasie van die ander geurstowwe te affekteer.

OPSOMMING.

In hierdie ondersoek is 'n metode ontwikkel vir die analise van geurstowwe in wyn waarby gebruik gemaak word van ekstraksie. As ekstrahermiddel is eter gebruik. Goeie resultate is verkry vir die analise van 'n reeks verbindings, nl. iso-amielasetaat, otielkaproaat, otielkaprielaat, otielkaprienaat, otiellaurienaat, isobutanol en n-heksanol. Die metode behels die ekstraksie van die wyn met eter na die byvoeging van 'n interne standaard, indamping van die ekstrak en gaschromatografiese skeiding van die komponente. Kalibrasiekurwes van die betrokke verbindings is verkry deur verhoging van hul konsentrasies deur byvoeging van die suiwer verbinding by die wyn. Daar kan heel waarskynlik nog op die metode verbeter word, veral in die opsig dat dit moontlik behoort te wees om minder wyn vir die analyses te gebruik.

Die grootste enkele bron van foute was waarskynlik die uitmeet van die piekhoogtes. Dit was soms moeilik om die basislyn presies vas te stel, veral by temperatuur-programmering, en ook waar pieke uitgekom het op die onsimmetriese rugkant van die ekstraermiddel (eter). 'n Dubbeldetektor gaschromatograaf sal die fout waarskynlik verminder.

Verder is analises in die dampfase van wyn gedoen op 'n reeds bekende metode (otielasetaat en asetaldied is so bepaal). Daar is waarnemings gedoen oor die twee vorms waarin die stasionêre vloeistoffase kan bestaan, en waaroor tot dusver nog betreklik min bekend is. Ook is opgemerk dat die vlam-ionisasie detektor nie altyd ewe gevoelig was vir sekere verbindings nie, afhangende daarvan of in 10% etanol of in wyn gewerk is.

LITERATUUR-VERWYSINGS.

1. Theron, C.J. & Niehaus, C.J.G.: Winomaking (Derde Uitgawe)
Bulletin No. 191, Serie No. 130, Goew. Drukker Pretoria (1947).
2. Webb, A.D.: Food Technology 16 (11) 56 (1962).
3. Webb, A.D. & Kepner, R.E.: Am. J. Enol Viticult., 12 51 (1961).
4. Webb, A.D. & Kepner, R.E.: Ibid. 12 159 (1961).
5. Lipis, B.V. & Mamakova, Z.A.: Vinodolie i Vinogradarstvo SSSR 23
(3) 7 (1963) Chemical Abstracts 59 4516 (1963).
6. Bayer, E.: Vitis 1 93 (1957).
7. Rodopulo & Pisarnitskii Vinodolie i Vinogradarstvo SSSR 23 (8)
9 (1963) Chemical Abstracts 61 16465 (1964).
8. Matthews, J.S., Sugisawa, H. & MacGregor, D.R.: Food Research 27
435 (1962).
9. Webb, A.D., Kepner, R.E. & Galetto, W.G.: Am. J. Enol. Viticult
15 1 (1964).
10. Ribereau-Gayon, P.: Chim. Anal. 43 (4) 161 (1961).
Chemical Abstracts 59 15923 (1963).
11. Tomotsuno Taira Nippon Nogeikagaku Kaishi 35 298 (1961)
Chemical Abstracts 59 13315 (1963).
12. Morrison: Am. J. Enol. Viticult. 13 159 (1962).
13. Johns, T. & Lawson, R.H.: Referaat gelewer by die Pittsburgh Konf.
oor Anal. Chem. & Toeg. Spektroskopie Maart 1960.
14. Drawort, F.: Vitis 2 172 (1960).
15. Venter, P.J.: D.Sc.(Agric.) Tesis, U.S. (1958).
16. Schmitt, A.: Zeiss Informationen 54 133 (1964).
17. Äyräpää, T.J.: Inst. Browing 68 504 (1962).
18. Carrol, R.B. & O'Brien, L.C.: Referaat gelewer voor die Amer.
Chem. Soc., Boston, Mass. 8 Apr. 1959.
19. Bober, A. & Haddaway, L.W.: J. Gas Chrom. 1 (12) 8 (1963).
20. Kepner, R.E., Maarse, H. & Strating, J.: Anal. Chem. 36 77 (1964).
21. Wucerman, C.: Food Technology 15 531 (1961).
22. De Vries, M.J.: S. Afr. J. Agric. Sci. 5 395 (1962).
23. Clarke, B.J., Harold, F.V., Hildebrand, R.P. & Morieson, A.A.:
J. Inst. Browing 68 179 (1962)

24. Webb, R.E. & Kepner, A.D.: *Am. J. Enol. Viticult.* 13 1 (1962).
25. Stadtman, E.R. & Barker, H.A.: *J. Biol. Chem.* 180 1085, 1095, 1117 (1949).
26. Stadtman, E.R. & Barker, H.A.: *Ibid.* 184 769 (1950).
27. Stadtman, E.R., Novelli G.D. & Lipmann, F.: *Ibid.* 191 365 (1951).
28. Fruton, J.S. & Simmonds, S.: *General Biochemistry (Tweede Uitgawe)* John Wiley & Sons Inc. N.Y. (1958) Bls. 611.
29. De Vries, M.J.: *S. Afr. J. Agric. Sci.* 5 401 (1962).
30. Nordström, K.: *J. Inst. Brewing* 67 173 (1961).
31. Nordström, K.: *Ibid.* 68 398 (1962).
32. Nordström, K.: *Ibid.* 69 142 (1963).
33. Van Zyl, J.A., De Vries, M.J. & Zeeman, A.S.: *S. Afr. J. Agric. Sci.* 6 165 (1963).
34. Tabachnik, J. & Joslyn, M.A.: *Jour. Bact.* 65 1 (1953).
35. Prescott, S.C. & Dunn, C.G.: *Industrial Microbiology (Derde Uitgawe)* McGraw-Hill N.Y. (1959) Bls. 242.
36. Nordström, K.: *J. Inst. Brewing* 70 42 (1964).
37. Cantarelli, C.: *Ann. Microbiol.* 6 219 (1955).
38. Stevens, R.: *J. Inst. Brewing* 66 453 (1960).
39. Suomalainen, H. & Kahanpää, H.: *Ibid.* 69 473 (1963).
40. Hough, J.S. & Stevens, R.: *Ibid.* 67 488 (1961).
41. Suomalainen, H. & Nykaenen: *Teknillisen Komian Aikakauslehti* 20 (19 - 20) 789 (1963) (in Engels).
Chemical Abstracts 61 2437 (1964).
42. Matthews, J.S., Sugisawa, H. & MacGregor, D.R.: *Food Research* 27 355 (1962).
43. Mecke, R. & De Vries, M.J.: *Z. Anal. Chem.* 170 326 (1959)
44. Mecke, R., Schindler, R & De Vries, M.J.: *Weinwissenschaft* 10 (Okt. 1960).
45. Carrol, K.K.: *Nature* 191 377 (1961).
46. Dijkstra, A.: *Ibid.* 192 965 (1961).
47. Bartlet, J.C. & Smith, D. M.: *Canad. J. Chem.* 38 2057 (1960)
48. Keller, R.A., Bate, R., Costa, B. & Forman, P.: *J. Chrom.* 8 157 (1962).

49. Chen, C. & Gacko, D.: *Anal. Chem.* 36 72 (1964).
50. Mackay, D.A.M., Lang, D.A. & Berdick, M.: *Ibid.* 33 1369 (1961).
51. Bassette, R., Özeris, S. & Whitnah, C.H.: *Ibid.* 34 1540 (1962)
52. Bassette, R. & Özeris, S.: *Ibid.* 35 1091 (1963).
53. Brennan, M.J. & Bernhard, R.A.: *Food Technology* 18 (5) 149 (1964).
54. Bengtsson, B. & Bosund, I.: *Ibid.* 18 (5) 179 (1964).
55. BATTERY, R.G. & Teranishi, R.: *Anal. Chem.* 33 1439 (1961).
56. BATTERY, R.G., Teranishi, R. & Lundin, R.E.: *Ibid.* 34 1033 (1962).
57. Farrington, P.S., Pecsok, R.L., Mecker, R.L. & Olson, T.J.:
Ibid. 31 1512 (1959).
58. Kramlich, W.E. & Pearson, A.M.: *Food Research* 25 712 (1960).
59. Brenner, N. & Ettore, L.S.: *Anal. Chem.* 31 1815 (1959).
60. Hornstein, I. & Crowe, P.F.: *Ibid.* 34 1354 (1962).
61. Nawar, W.W., Sawyer, F.M., Beltran, E.G. & Fagerson, I.S.:
Ibid. 32 1534 (1960).
62. Nawar, W.W. & Fagerson, I.S.: *Ibid.* 32 1534 (1960).
63. Forss, D.A., Bazinet, M.L. & Swift, S.M.: *J. Gas Chrom.* 2 134
(1964).
64. Boggus & Adams: *Anal. Chem.* 30 1471 (1958).
65. Lawrey, D.M.G. & Cerato, C.C.: *Ibid.* 31 1011 (1959).
66. Rhoades, J.W.: *Food Research.* 23 254 (1958).