

臭豆腐中挥发性香成分提取与分析

刘玉平, 苗志伟, 黄明泉, 陈海涛, 孙宝国

(北京工商大学食品学院, 食品风味化学北京市重点实验室, 北京 100048)

摘 要: 为分析臭豆腐中的挥发性成分, 采用固相微萃取和同时蒸馏萃取的方法对北京产老才臣臭豆腐中的挥发性成分进行提取, 提取物经气相色谱-质谱联用仪分析, 结合对比标准品保留时间和计算分离出的成分的保留指数。结果共鉴定出 43 种成分, 其中, 醇类 15 种、酸类 3 种、酯类 8 种、酮类 3 种、醛类 2 种、酚类 1 种、硫醚类 4 种、杂环类 5 种、芳香烃类 2 种, 采用面积归一化法确定相对含量; 两种方法中都鉴定出的挥发性成分有 17 种, 主要为醇类、酯类、含硫化合物和杂环类; 对臭豆腐香气特征贡献较大的有吲哚、二甲基二硫、二甲基三硫、二甲基四硫、2,3,5-三硫杂己烷、苯酚等。

关键词: 臭豆腐; 挥发性成分; 萃取; 分析

Extraction and Analysis of Volatile Flavor Constituents of Stinky Tofu

LIU Yu-ping, MIAO Zhi-wei, HUANG Ming-quan, CHEN Hai-tao, SUN Bao-guo

(Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: The volatile constituents of stinky tofu from Beijing Laocaichen Food Co., Ltd were extracted by solid phase microextraction (SPME) or simultaneous distillation-extraction (SDE) and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Based on retention time comparison with reference standards and the calculated retention indices, 43 compounds were identified, including 15 alcohols, 3 organic acids, 8 esters, 3 ketones, 2 aldehydes, 1 phenol, 4 sulfur-containing ethers, 5 heterocyclic compounds and 2 aromatic hydrocarbons. The area normalization method was used to quantify the relative contents of these compounds. Both extraction methods allowed the identification of 17 volatile compounds, which consisted mainly of alcohols, esters, sulfur-containing and heterocyclic compounds. Indole, dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, dimethyl tetrasulfide, methyl methylthiomethyl disulfide, phenol, etc made a greater contribution to the odor characteristics of stinky tofu.

Key words: stinky tofu; volatile constituents; extraction; analysis

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0228-04

臭豆腐是北京的传统特色食品之一, 它与南方盛行的采用油炸食用的非发酵型臭豆腐不同^[1], 北京产的臭豆腐属于腐乳的一种, 也称青方腐乳、青腐乳^[2]。由于在生产臭豆腐过程中经过了较长时间的发酵, 其中所含的蛋白质分解为氨基酸^[3], 更利于肠道吸收; 臭豆腐在发酵过程中还会合成出维生素 B₁₂, 而 VB₁₂ 对预防老年痴呆有一定作用^[4]; 臭豆腐中富含乳酸菌^[5-7], 具有很好的调节肠道和健胃的作用; 因此臭豆腐被称为中国的“素奶酪”, 其营养价值甚至高于奶酪。北京产的臭豆腐主要有王致和与老才臣两个品牌, 研究曾采用固相微萃取提取结合 GC-MS 分析了王致和臭豆腐中的挥发性

成分^[8], 为了对比两种北京产臭豆腐的挥发性成分之间的差别, 建立北京产臭豆腐的气味指纹图谱, 有必要对老才臣臭豆腐的挥发性成分进行提取与分析。

目前, 文献报道的提取腐乳类食品中挥发性成分的方法主要有同时蒸馏萃取法^[9-11]、顶空固相微萃取法^[8,12]、静态顶空取样^[13]、水蒸气蒸馏^[14]等。由于静态顶空取样适用于分析挥发性强的成分, 分析物的浓度越低, 需要的样品体积越大, 而气相色谱允许进样量有限; 水蒸气蒸馏适用于处理含挥发油量大的样品, 如果挥发性成分量少时, 需要用大量溶剂对馏出物进行萃取, 且易溶于水的含量低的成分难于萃取出来。同时蒸馏萃取法

收稿日期: 2011-09-01

基金项目: 北京市教育委员会科技计划面上项目(KM200910011003)

作者简介: 刘玉平(1969—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为香料化学。E-mail: liuyup@th.btbu.edu.cn

和顶空固相微萃取法需要的样品量相对较少,且操作简单,是提取食品中挥发性成分常用的方法。本实验采用同时蒸馏萃取(simultaneous distillation extraction, SDE)和顶空固相微萃取(solid-phase microextraction, SPME)两种方法对老才臣臭豆腐中的挥发性成分进行提取,采用气-质联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

臭豆腐(净含量 340g) 北京老才臣食品有限公司。

乙醚和无水硫酸钠(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

7890A/5975C型气相色谱-质谱联用仪 美国Agilent公司; N-Evap™111型氮吹仪 美国Organomation公司; 手动固相微萃取(SPME)装置[萃取纤维头为膜厚为75μm的Carboxen/PDMS(黑色)萃取头] 美国Supelco公司; 同时蒸馏萃取装置 肯堡博美(北京)实验器皿有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SPME提取臭豆腐中的挥发性成分

将一整瓶臭豆腐连同汤汁一起用玻璃棒搅拌均匀,呈糊状,称取20g放入40mL的固相微萃取专用瓶中,盖好盖子,在50℃的水浴中预加热20min,让顶空中的挥发性成分达到平衡;然后将装有黑色萃取头的手动手柄插入瓶中,在50℃顶空吸附30min,取出萃取头和手柄,在气相色谱仪进样口温度为280℃解析5min。

1.2.2 SDE提取臭豆腐中的挥发性成分

将一整瓶老才臣臭豆腐(340g)用玻璃棒搅拌均匀,加入1000mL单口圆底烧瓶中,再加入100mL去离子水,置于同时蒸馏装置重相一侧,采用油浴加热,温度控制在 $(125 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。另取60mL重蒸乙醚加入100mL圆底单口烧瓶中,加入沸石,置于同时蒸馏装置轻相一侧,采用恒温水浴加热,温度控制在 $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。连续萃取2h,萃取结束,将萃取液用无水硫酸钠干燥,滤去干燥剂,滤液经旋转蒸发仪浓缩至约5mL,再用氮吹仪进一步浓缩至约1mL。浓缩液具有臭豆腐的特征香气,采用气-质联用仪对浓缩液进行分析。

1.2.3 GC-MS分析条件

色谱条件: AB-5MS型色谱柱(30m × 250μm, 0.25μm), 进样口温度280℃, 载气为氦气, 流速为1.0mL/min; 升温程序: 起始温度40℃(保持2min), 然后以5℃/min的速度升到150℃, 再以15℃/min的速度升到280℃(保持2min)。采用固相微萃取进行萃取时, 分析采用不分流进样; 分析同时蒸馏萃取所得浓缩物时, 分流比为20:1, 进样量1μL。

质谱条件: 电子轰击(electron impact, EI)离子源, 电子轰击能量70eV; 离子源温度为230℃, 四极杆温度150℃; 溶剂延迟2min, 扫描模式为全扫描, 扫描质量范围15~450u; 调谐文件atune.u。

1.2.4 定性定量方法

对检测出的成分采用质谱、保留指数和标准品进行定性, 用面积归一化法对检测出的成分进行简单定量。

2 结果与分析

萃取到的挥发性成分经GC-MS分析, 通过检索NIST 08谱库、人工解析质谱图、计算保留指数以及与标准品进行对比, 对分析出的成分进行定性, 所得总离子流图见图1, 具体结果见表1。

从表1可知, 从臭豆腐中共鉴定出43种挥发性成分, 其中采用SPME-GC-MS鉴定出24种, 采用SDE-GC-MS鉴定出36种, 采用两种方法都鉴定出的成分有17种, 分别是正丙醇、正丁醇、正己醇、1-辛烯-3-醇、苯乙醇、4-松油醇、丁酸乙酯、乙酸丁酯、丁酸丙酯、苯酚、二甲基二硫、二甲基三硫、二甲基四硫、2,3,5-三硫杂己烷、2-戊基呋喃、2-戊基噻吩、吡啶。

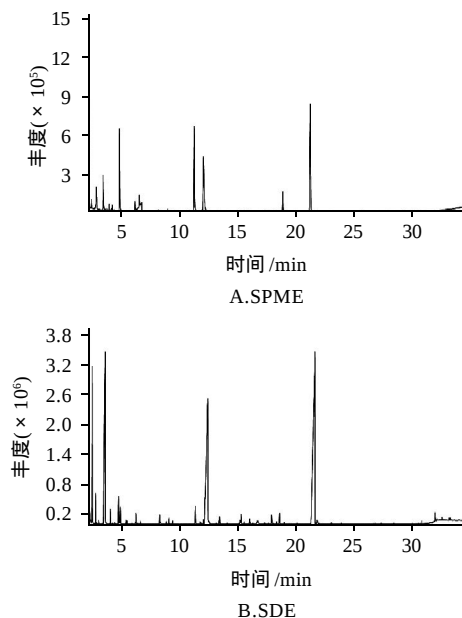


图1 臭豆腐中挥发性成分总离子流图

Fig.1 Total ion chromatograms of volatile constituents in stinky tofu

从鉴定出的挥发性成分的结构特征来看, 采用两种方法进行提取与分析时, 鉴定出醇类的种类都最多, 并且除了1-辛烯-3-醇外, 采用SDE-GC-MS鉴定出的醇的含量都高于采用SPME-GC-MS鉴定出的醇的含量; 这主要是因为采用同时蒸馏萃取的温度高于固相微萃取的温

表 1 臭豆腐中挥发性成分的气-质联用分析结果
Table 1 Results of GC-MS analysis of volatile constituents in stinky tofu

序号	保留时间/min	名称	相对含量/%		匹配度	保留指数	文献保留指数 ^[15]	鉴定方法
			SPME	SDE				
醇类	2.45	正丙醇 1-propanol	0.95	6.51	91	< 604	532	MS、S
	2.70	2-丁醇 2-butanol	—	0.92	90	604	—	MS、S
	2.97	2-甲基-1-丙醇 2-methyl-1-propanol	—	0.14	91	625	622	MS、RI、S
	3.46	正丁醇 1-butanol	5.32	18.54	94	663	662	MS、RI、S
	3.98	2-戊醇 2-pentanol	—	0.55	86	702	—	MS
	4.69	3-甲基-1-丁醇 3-methyl-1-butanol	—	1.14	90	734	734	MS、RI、S
	4.76	2-甲基-1-丁醇 2-methyl-1-butanol	—	0.26	83	737	736	MS、RI、S
	5.42	正戊醇 1-pentanol	—	0.14	90	768	768	MS、RI
	7.34	2-甲硫基乙醇 2-methylthioethanol	—	0.05	93	841	—	MS
	8.23	正己醇 1-hexanol	0.27	0.55	90	871	871	MS、RI、S
	11.70	1-辛烯-3-醇 1-octen-3-ol	0.23	0.15	83	983	983	MS、RI
	15.51	芳樟醇 linalool	—	0.17	86	1105	1105	MS、RI、S
	15.98	苯乙醇 phenylethyl alcohol	0.18	0.41	94	1120	1120	MS、RI、S
	17.88	4-松油醇 4-terpinenol	0.27	0.62	96	1183	1183	MS、RI
	18.31	α -松油醇 α -terpineol	—	0.15	90	1198	1198	MS、RI
	合计		7.22	30.30				
酸类	2.92	乙酸 acetic acid	0.83	—	83	621	637	MS、RI、S
	4.28	丙酸 propanoic acid	0.78	—	94	716	740	MS
	6.79	丁酸 butanoic acid	1.52	—	90	823	822	MS、RI、S
	合计		3.13	0				
酯类	6.21	丁酸乙酯 ethyl butanoate	1.46	0.60	93	803	803	MS、RI、S
	6.56	乙酸丁酯 butyl acetate	3.88	0.12	90	815	813	MS、RI、S
	9.02	丁酸丙酯 propyl butanoate	0.28	0.27	90	899	900	MS、RI
	9.35	丙酸丁酯 butyl propanoate	—	0.18	83	909	910	MS、RI
	12.67	乙酸己酯 hexyl acetate	0.13	—	83	1014	1015	MS、RI、S
	14.06	丁酸异戊酯 iso-pentyl butanoate	—	0.05	86	1058	1059	MS、RI
	30.83	十六酸乙酯 ethyl hexadecanoate	—	0.07	97	1999	2000	MS、RI、S
	31.98	亚油酸乙酯 ethyl linoleate	—	0.51	99	2173	2177	MS、RI
	合计		5.75	1.80				
酮类	2.72	2-丁酮 2-butanone	0.08	—	86	605	590	MS
	8.80	2-庚酮 2-heptanone	—	0.15	91	891	890	MS、RI、S
	9.29	2-甲基-2-环戊烯-1-酮 2-methyl-2-cyclopenten-1-one	—	0.03	91	907	914	MS、RI
	合计		0.08	0.18				
醛类	6.15	正己醛 hexanal	0.42	—	90	801	801	MS、RI、S
	11.02	苯甲醛 benzaldehyde	0.26	—	91	962	962	MS、RI、S
	合计		0.68	0				
酚类	12.10	苯酚 phenol	16.70	24.00	97	996	996	MS、RI、S
	合计		16.70	24.00				
硫醚类	4.88	二甲基二硫 dimethyl disulfide	10.97	0.71	96	743	742	MS、RI、S
	11.30	二甲基三硫 dimethyl trisulfide	15.41	1.00	94	970	970	MS、RI、S
	16.24	2,3,5-三硫杂己烷 methyl methylthiomethyl disulfide	0.12	0.07	90	1129	—	MS
	18.98	二甲基四硫 dimethyl tetrasulfide	3.28	0.11	87	1222	1224	MS、RI
	合计		29.78	1.89				
杂环类	7.43	2-甲基吡咯 2-methylpyrrole	—	0.04	86	845	—	MS
	12.00	2-戊基呋喃 2-pentylfuran	0.31	0.24	90	992	992	MS、RI
	13.36	桉叶素 eucalyptol	—	0.18	99	1036	1037	MS、RI、S
	17.28	2-戊基噻吩 2-pentyl thiophene	0.12	0.08	91	1164	—	MS
	21.31	吲哚 indole	27.35	36.21	97	1305	1303	MS、RI、S
	合计		27.78	36.75				
芳香烃类	5.35	甲苯 toluene	—	0.17	94	765	766	MS、RI
	18.06	萘 naphthalene	—	0.07	94	1190	1190	MS、RI
	合计		0	0.24				
总计			91.12	95.16				

注：—, 在含量中表示未检测出, 在文献保留值中表示未查到; MS, 质谱鉴定; RI, 保留指数鉴定; S, 标准品鉴定。

度,更有利于挥发性物质的提取;1-辛烯-3-醇分子结构中含有不饱和键,温度高时发生了变化,使其含量降低。其次是酯类的种类较多,采用同时蒸馏萃取进行提取挥发性成分时,由于其温度高于固相微萃取的温度,沸点低易挥发的成分含量降低,而一些沸点高不易挥发的酯(如十六酸乙酯、亚油酸乙酯等)被提取出来。酸类和醛类采用固相微萃取时被鉴定出来,而采用同时蒸馏萃取时没有被鉴定出来,主要原因是两类物质较活泼,在同时蒸馏萃取时转变成了其他物质,使得它们的含量降低,以至于没有被鉴定出来。酮类共鉴定出3种,其中采用固相微萃取时鉴定出了沸点较低的2-丁酮,而采用同时蒸馏萃取时鉴定出了沸点较高的另外两种酮类,没有鉴定出2-丁酮。采用同时蒸馏萃取时鉴定出的杂环类化合物的数量要高于采用固相微萃取时鉴定出的数量;采用同时蒸馏萃取时鉴定了芳香烃类化合物,它们可能是同时蒸馏萃取时加热分解的产物;两种方法鉴定出的酚类和硫醚类的数量相同。

从鉴定出的挥发性成分的浓度和阈值来看,对臭豆腐香气特征贡献较大的有吡嗪、二甲基二硫、二甲基三硫、二甲基四硫、2,3,5-三硫杂己烷、苯酚等。采用两种方法进行提取与分析时,吡嗪的含量都在30%左右,而吡嗪在浓度高时具有很强烈的动物粪便气息,它对臭豆腐的臭气起到了主要贡献;二甲基二硫、二甲基三硫、二甲基四硫、2,3,5-三硫杂己烷属于含硫化合物,其本身阈值就低,浓度高时具有强烈的臭萝卜、洋葱气息,从分析的数据来看,它们在顶空中含量高,它们使得臭豆腐的特征香气增强,香气更透发,给人留下臭豆腐很臭的感觉;纯的苯酚具有强烈的酚香气息,而它在臭豆腐中的含量在20%左右,它对臭豆腐的香气也起到增强作用,并且能起到杀菌和防腐作用。醇类使得臭豆腐的整体香气醇厚,酯类赋予臭豆腐果甜气息,对整体香气起到柔和作用。

通过与从王致和臭豆腐中鉴定出的挥发性成分进行对比发现,两者所含的挥发性成分接近,尤其是对臭豆腐香气特征贡献较大的吡嗪、二甲基二硫、二甲基三硫、二甲基四硫、2,3,5-三硫杂己烷、苯酚等的含量接近,在一定程度上可以用它们的相对含量来衡量臭豆腐的香气特征指标,确定臭豆腐的最佳食用期。

3 结 论

3.1 采用固相微萃取和同时蒸馏萃取的方法,对北京

产老才臣臭豆腐中的挥发性成分进行了提取,经分析从中共鉴定出43种成分,醇类有15种、酸类3种、酯类8种、酮类3种、醛类2种、酚类1种、硫醚类4种、杂环类5种、芳香烃类2种。

3.2 采用固相微萃取,经分析鉴定出24种挥发性成分;采用同时蒸馏萃取,经分析鉴定出36种挥发性成分;两种方法都鉴定出的挥发性成分有17种,含量较高(>1%)的有正丁醇、苯酚、二甲基三硫、吡嗪;对臭豆腐香气贡献较大的有吡嗪、二甲基二硫、二甲基三硫、二甲基四硫、2,3,5-三硫杂己烷、苯酚等。

参 考 文 献:

- [1] 元顺平,翁新楚.非发酵臭豆腐挥发性风味物质的研究[J].食品科学,2007,28(12):400-403.
- [2] 鲁维,孙君社,韩北忠,等.青方腐乳酿造过程内部微细结构的扫描电镜观察[J].四川大学学报:工程科学版,2004,36(5):40-43.
- [3] HAN Beizhong, ROMBOUTS F M, NOUT M T. Amino acid profiles of sufu, a Chinese fermented soybean food[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2004, 17(6): 689-698.
- [4] 郭华,廖兴华,周建平,等.臭豆腐菌种分离鉴定与酿造工艺研究[J].食品科学,2004,25(4):109-115.
- [5] 卢义伯,潘超,祝义亮.臭豆腐发酵菌种的筛选与鉴定[J].食品科学,2007,28(6):246-248.
- [6] CHAO S H, TOMII Y, WATANABE K, et al. Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 123(1/2): 134-141.
- [7] 徐寅,陈露,顾瑞霞.臭豆腐乳酸菌多样性及耐酸乳酸菌的筛选分离[J].中国酿造,2010,(2):22-24.
- [8] 刘玉平,陈海涛,孙宝国,等.固相微萃取与GC-MS法分析发酵型臭豆腐中挥发性成分[J].食品工业科技,2009,30(12):403-405.
- [9] LEE S H, KIM Y T, SHON M Y, et al. Major components of fermented tofu prepared with different molds and coagulants[J]. Food Science and Biotechnology, 2002, 11(2): 93-984.
- [10] 黄明泉,陈海涛,刘玉平,等.北京地区不同品牌腐乳挥发性成分比较分析[J].中国调味品,2011,36(6):80-85.
- [11] 黄明泉,孙宝国,陈海涛,等.同时蒸馏萃取结合气质联机分析北京地区红腐乳挥发性成分分析[J].食品工业科技,2010,31(7):150-156.
- [12] 蒋丽婷,李理.HS-SPME结合GC-MS测定白腐乳中挥发性风味成分[J].中国酿造,2011(3):150-155.
- [13] KIM J S, CHUNG H Y. GC-MS analysis of volatile components in a fermenting chaw-tofu modle broth[J]. Food Science and Biotechnology, 2002, 11(4): 417-420.
- [14] 黄香华,蒋立文,易灿.臭豆腐菌种鉴定、发酵及气味成分分析[J].农产品加工,2009,(4):76-78.
- [15] NIST Chemisty webBook: NIST Standard Reference Detebase Number 69[DB/OL]. <http://webbook.nist.gov/chemistry>.