

顶空-固相微萃取测定大曲香气组分的条件优化

郭兆阳^{1,2},高洪波²,钟其顶²,刘 明²,李敬龙¹,熊正河²

(1. 山东轻工业学院食品与生物工程学院, 山东 济南 250353; 2. 中国食品发酵工业研究院, 北京 100027)

摘 要: 采用顶空-固相微萃取方法测定大曲中的香气组分,以出峰数量和面积为指标比较,对影响萃取平衡的 6 个因素 萃取头、溶剂、大曲用量、萃取温度、萃取时间和盐离子浓度(NaCl) 分别进行优化。结果表明,最佳的萃取方法为,以 PA 为萃取头,5 mL 12 %vol 乙醇为溶剂,0.2 g 大曲取样量,不加入盐离子,经 60 °C 超声平衡,在 60 °C 搅拌萃取 60 min。利用该条件从 1 种清香型大曲样品中共检出 56 种组分。

关键词: 分析方法; 顶空-固相微萃取; 香气组分; 优化

中图分类号: TS262.3; TS261.7; O652

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2011)04-0099-04

Optimization of HS-SPME to Determine Daqu Flavoring Components

GUO Zhao-yang^{1,2}, GAO Hong-bo², ZHONG Qi-ding², LIU Ming², LI Jing-long¹ and XIONG Zheng-he²

(1. School of Food Science and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Ji'nan, Shandong 250353;

2. China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

Abstract: Head space solid-phase micro-extraction (HS-SPME) is an effective method for the detection of flavoring components of Daqu. In this study, six factors, including SPME fiber, the solvent, the use level of Daqu, the extraction temperature and time, and NaCl concentration, influencing the equilibrium of flavoring components between the samples and SPME fiber had been optimized respectively (each factor was contrasted based on the numbers and the area of peaks). The optimum results were summed as follows: PA fiber used, 12 % (v/v) ethanol as solvent, sample weight was 0.2 g, and sample was equaled with ultrasonic treatment at 60 °C and extracted at 60 °C for 60 min with stirring prior to injection into GC. The optimized HS-SPME method was then applied to detect a Fen-flavor Daqu sample and 56 flavoring components were detected finally.

Key words: analytic methods; HS-SPME; flavoring components; optimization

大曲是以小麦或小麦、大麦、豌豆为原料,经粉碎后加水压成砖坯状形成曲坯,人工控制在一定的温度、湿度下培育而成。大曲既是白酒生产的糖化、发酵剂,也在大曲酒生产过程直接或间接地形成了白酒的风味物质,使白酒具有各种不同的独特的风味,但目前对于白酒大曲中的香味物质研究颇少^[1]。

固相微萃取技术(Solid-Phase Micro-extraction, 简称 SPME)是基于 20 世纪 70 年代固相萃取技术发展起来的一种新的样品预处理方法,在此基础上发展的顶空-固相微萃取(HS-SPME)技术特别适合于微量挥发性成分的检测,操作简便,不用或少用有机溶剂,能有效减少底物及液态基质中干扰物质的影响,因而广泛应用于环境、医学、农残、食品和具有挥发性组分的检测分析中^[2]。Panseri^[3]运用顶空法分析奶酪中的香气成分;Potter^[4]采用 HS-SPME 测定水中的苯及同系物,检测限达到 ng/L;在大曲的研究方面,2006 年,赵东等^[5]采用顶空-固相微萃取气相色谱质谱法测定曲药中的微量挥发性成分,发

现酒曲中的微量挥发性成分主要以杂环类化合物为主,有近 30 种吡嗪类化合物;2007 年,范文来^[1]对 HS-SPME 与气相色谱-质谱(GC-MS)联用方法测定白酒大曲的微量挥发性组分的影响因素进行优化,包括溶剂、超声时间、大曲用量和是否添加氯化钠。最佳萃取条件为,大曲粉用量 0.2 g,用 5 mL 去离子溶解水,50 °C 超声振荡 30 min,质谱检测器共定性 112 种成分;2008 年,范文来^[6]介绍采用 HS-SPME 与气相色谱-质谱(GC-MS)联用的方法,快速测定白酒酒醅中微量挥发性成分,共检出组分 100 多种。2010 年,范文来^[7]运用 HS-SPME 测定浓香型大曲白酒生产用窖泥,共检测到 184 种微量挥发性成分,大部分为第一次检测到。

影响顶空固相微萃取过程的因素主要有:萃取头的种类、萃取剂的选择、样品用量、萃取时间、萃取温度、盐离子浓度等。本文以以上研究为基础,全面考察每个因素对萃取结果的影响,确定出最优的萃取条件,使分析更加高效、灵敏、准确,为分析大曲的香气物质打下基础^[8-9]。

收稿日期:2010-12-27

作者简介:郭兆阳(1986-),男,山东省日照市莒县人,在读硕士研究生,研究方向:现代酿酒技术。

1 试剂与方法

1.1 试剂与材料

某清香型大曲,无水乙醇(色谱纯)、氯化钠(分析纯)、香气物质标准品(色谱纯),大曲组分测定结果见表3。

1.2 实验方法

首先确定两种萃取头 PA(85 μ m)和 PDMS(100 μ m)(购于 Supelco),这两种萃取头更适合大曲中香气组分的检测。在分析时,萃取头在 GC(Agilent 6890)进样口 280 $^{\circ}$ C 解吸附 5 min,下次使用前在 GC 进样口 290 $^{\circ}$ C 老化 10 min。

分别考察萃取溶剂、大曲用量、萃取温度、萃取时间和盐离子浓度对萃取结果的影响。在萃取过程中要持续搅拌,使液体与上层空气中物质分布充分平衡。实验中影响因素参数设置见表1。

表1 影响因素参数设置表

因素	参数
萃取头	PA(85 μ m)、PDMS(100 μ m)
萃取溶剂	水、12%vol 乙醇、16%vol 乙醇
大曲用量(g)	0.1、0.2、0.5、1
萃取温度($^{\circ}$ C)	40、50、60、70
萃取时间(min)	30、40、60、70
盐离子浓度	是否添加 NaCl

顶空-固相微萃取过程:曲块粉碎后过 20 目筛,在 25 mL 顶空瓶中加入曲粉、5 mL 溶剂,超声平衡后,插入萃取头萃取吸附,然后进入气相色谱分析,计算组分的出峰数目和总峰面积^[10]。

1.3 气相色谱条件

Waxms 色谱柱(60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.50 μ m);美国瓦立安公司;载气条件:氮气,恒流,0.8 mL/min;进样模式:不分流。

升温程序:初温 35 $^{\circ}$ C,保持 1 min,以 3.50 $^{\circ}$ C/min 升至 230 $^{\circ}$ C,保持 8 min。

检测器(FID):温度 250 $^{\circ}$ C;氢气流速:30 mL/min;空气流速:300 mL/min。

2 结果与分析

2.1 萃取条件对萃取结果的影响

2.1.1 萃取头对大曲中成分萃取结果的影响

由于萃取头材料成分不同,导致萃取头的极性不同,造成对不同物质吸附能力的不同。选用 PA(85 μ m)萃取头、PDMS(100 μ m)萃取头对比萃取效果,结果见图1。

从图1分析可知,PA 萃取得到的组分数目较 PDMS 少,但峰面积较大。PA 对异戊醇、正戊醇、叔戊醇、醛类、2-苯乙醇吸附效果好,峰面积几乎是 PDMS 的 2

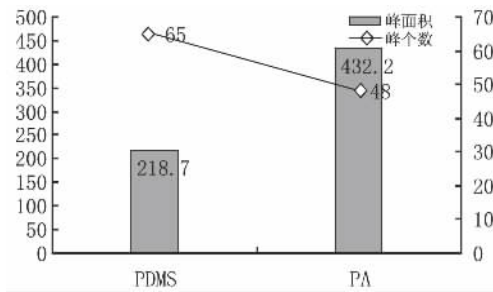


图1 不同萃取头对萃取结果的影响

倍;PDMS 对 3-辛醇、1,2-丙二醇、异戊酸、十六酸、油酸乙酯等高沸点物质吸附效果好,与萃取头的极性恰好相吻合。对比分析,PDMS 虽出峰多,但某些物质的峰面积很小,虽能定性,但定量测定时准确性显著降低,因此,后期实验均以 PA 萃取头进行萃取。

2.1.2 不同溶剂对大曲中成分萃取结果的影响

分别用水、12%vol、16%vol 的乙醇做萃取剂,研究不同溶剂对萃取效果的影响,结果见图2。图2结果表明,从峰面积和出峰数目来看,溶剂对峰面积和出峰数目的影响不是很大,但从检测物质来说,以水做溶剂萃取出的物质中醇类较多,且峰面积大;以 16%vol 乙醇为溶剂萃取出的酯类物质较多,醇类物质较少。综上考虑,选用 12%vol 乙醇作为萃取溶剂。

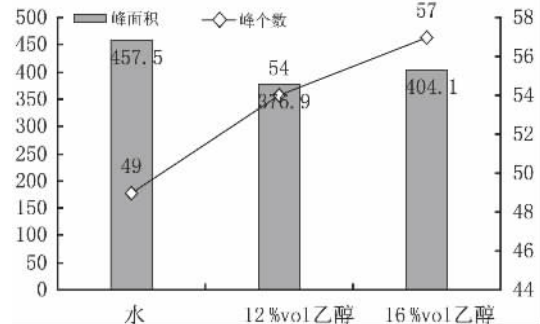


图2 萃取溶剂对萃取结果的影响

2.1.3 大曲用量对大曲中成分萃取结果的影响

选用 0.1 g、0.2 g、0.5 g、1 g 作样品对象,研究大曲用量对大曲成分萃取结果的影响,结果见图3。

从图3可以看出,大曲用量为 0.2 g 时的结果优于其他实验条件,大曲用量对峰面积影响较大,出峰数目与大曲用量的关系不大。

2.1.4 萃取时间对大曲中成分萃取结果的影响

在萃取初始阶段,挥发性组分能很容易地富集到固定相涂层中,因此萃取头中物质浓度增加得很快。随着萃取时间延长,富集速度逐渐缓慢,进而接近吸附平衡。萃取时间对大曲中成分萃取结果的影响结果见图4。

从图4实验结果分析可知,当萃取时间为 60 min 时,峰面积明显大于 40 min 和 30 min 的结果,且检测到

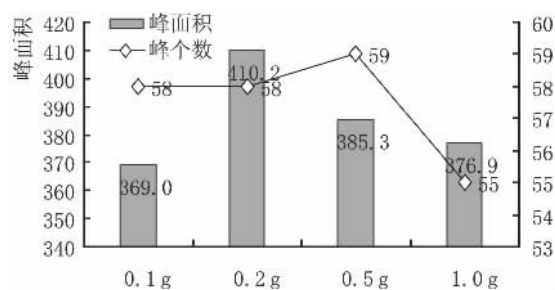


图3 大曲用量对萃取结果的影响

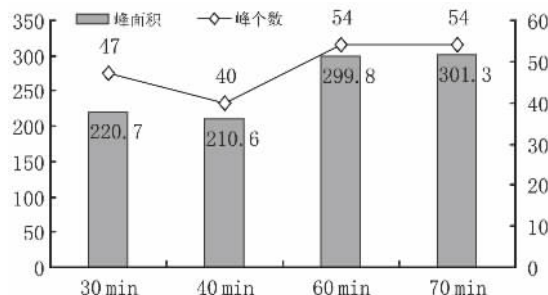


图4 萃取时间对萃取结果的影响

组分7~10个。萃取时间的延长会吸附更多的组分,且时间越长,吸附的量也会增加;从实验的分析时间上考虑,选用60 min为最佳萃取时间。

2.1.5 萃取温度对大曲中成分萃取结果的影响

萃取温度的影响具有两面性:一方面,温度升高会使物质的蒸汽压升高,使气相中的组分含量升高,有利于提高吸附效率,同时,温度升高加强了扩散和对流,能缩短平衡时间,加快分析速度,对萃取有利;另一方面,温度升高也会令组分在顶空气相与涂层间的分配系数下降,从而降低萃取头的吸附能力。萃取温度对大曲中成分萃取结果的影响见图5。

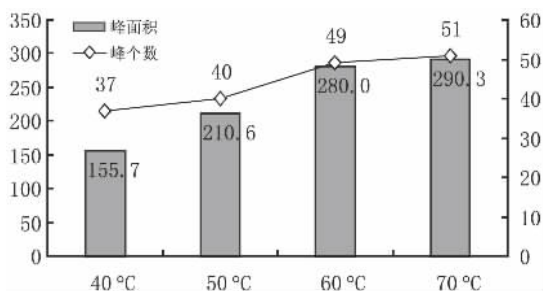


图5 萃取温度对萃取结果的影响

从图5可看出,随着萃取温度的升高,峰面积和出峰数目也在增加,温度在60 °C时达到平衡,70 °C下结果与60 °C下无明显差异。

2.1.6 盐离子浓度对大曲成分萃取结果的影响

溶液的离子强度改变会改变挥发性组分在液相和气相中的分配系数,通常有机物的非极性相对增强,使其在溶液中的溶解度下降,有利于物质从液相向气相中

转移。因此,添加氯化钠至饱和,测定离子强度对萃取结果的影响^[11]。盐离子浓度对大曲成分萃取结果的影响见图6。

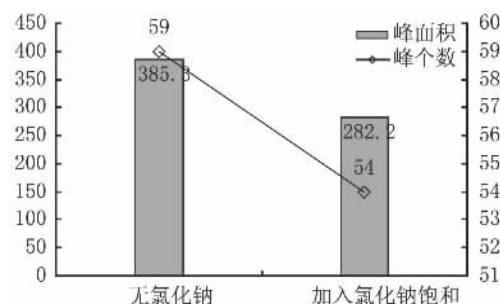


图6 离子强度对萃取结果的影响

图6的实验结果与理论分析结果恰好相反,添加氯化钠后萃取效果反而变差。但值得注意的是,添加氯化钠后,所加的内标的峰面积明显升高,叔戊醇、乙酸正戊酯、2-乙基丁酸的多次测定的平均面积由10.02、35.50、4.94增加到38.08、54.30、27.26。由此可得出,添加氯化钠会对液体基质中组分的吸附有促进作用,但不利于大曲中的组分溶解到溶剂中。

2.2 方法的稳定性

将同一样品在相同的实验条件下连续测定5次,根据物质的性质(醇、酸、酯等)和挥发性选取3种醇、酸、酯进行方法的稳定性研究,结果见表2。

表2 稳定性测定结果

物质	RSD (%)	物质	RSD (%)
2-乙基丁酸	9.88	十二酸乙酯	9.75
4-甲基戊酸	16.08	甲醇	15.67
己酸	14.31	异丁醇	16.74
苯乙酸乙酯	6.29	2-戊醇	13.23
丁酸乙酯	15.2		

由表2可以看出,RSD大多数在15%左右,对于顶空固相微萃取进样方法而言,方法的稳定性较好,满足实验测定要求^[12]。

2.3 样品测定

在上述选定的条件下对某清香型大曲进行测定,共检出56种组分,定性46种,包括9种醇、14种酯、8种酸、5种醛、1种酚,结果见表3。

3 结论与展望

运用顶空固相微萃取分析大曲中的香气成分,最终优化的结果为:萃取头为PA(85 μm),萃取的条件为:溶剂12%vol乙醇;大曲用量0.2 g;萃取时间60 min;萃取温度60 °C;不添加氯化钠。研究同时得出,萃取头性质、萃取时间和温度对萃取的结果有很大的影响;溶剂的选择、添加氯化钠对萃取结果的影响与之前的研究^[1]结论

表 3 大曲 HS-SPME 测定结果

种类	成分
醇类	甲醇、异丁醇、正丁醇、异戊醇、正戊醇、正己醇、糠醇、苯甲醇、β-苯乙醇
酯类	乙酸乙酯、异丁酸乙酯、乙酸丙酯、丁酸乙酯、己酸甲酯、庚酸乙酯、乳酸乙酯、癸酸乙酯、丁二酸二乙酯、苯乙酸乙酯、十四酸乙酯、十六酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯
醛类	乙醛、正丙醛、异丁醛、2-戊酮、正己醛
酸类	丁酸、异戊酸、戊酸、己酸、辛酸、壬酸、癸酸、十二酸
其他	愈创木酚

存在差异。

在优化的条件下测定某清香型大曲,一次检出 56 种组分,定性 46 种。定性组分中包括 9 种醇,14 种酯,8 种酸,5 种醛和 1 种酚。这些香气组分在白酒中均含有,证明了大曲曲香的感官特性;这些物质可能随发酵过程带入到白酒中,对白酒的风味产生影响。因此,大曲的香气组分对白酒的风味影响应受到重视。不同香型白酒的制曲工艺各有特点,香气组分的种类和含量也会有差异。若将大曲的香气组分做到准确定量,以大曲的香气组分构成和组分含量作为大曲质量和种类的判别依据也是可行的。

参考文献:

- [1] 范文来,张艳红,徐岩.应用 HS-SPME 和 GC-MS 分析白酒大曲中微量挥发性成分[J].酿酒科技,2007,(12):74-78.
- [2] 胡国栋.固相微萃取技术的进展及其在食品分析中应用现状[J].色谱,2009,(1):1-8.
- [3] Panseri S, Giani I, Mentasti T. Determination of flavour compounds in a mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spec-

trometry[J]. LWT-Food Science and Technology. 2008, 41(2): 185-192.

- [4] Potter D W, Pawliszyn J. Detection of substituted benzenes in water at the pg/ml level using solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry[J].Journal of Chromatography A.1992, 625(2):247-255.
- [5] 赵东,李扬华,向双全.顶空固相微萃取气相色谱质谱法测定曲药中的香味成分[J].酿酒科技,2006,(5):92-94.
- [6] 范文来,徐岩.应用 HS-SPME 技术测定固态发酵浓香型酒醋微量成分[J].酿酒,2008,35(5):94-98.
- [7] 范文来,徐岩.白酒窖泥挥发性成分研究[J].酿酒,2010,(3):24-31.
- [8] Lambropoulou D A, Albanis T A. Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in natural waters[J]. Journal of Chromatography A. 2001, 922(1-2):243-255.
- [9] Chai M, Pawliszyn J. Analysis of environmental air samples by solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry[J]. Environmental Science & Technology. 1995, 29(3):693-701.
- [10] Fan W, Qian M C. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography- Olfactometry dilution analysis of young and aged chinese “Yanghe Daqu” Liquors[J]. J. Agric. Food Chem. 2005, 53(20):7931-7938.
- [11] 李颖,李宗.顶空固相微萃取技术及其在中药分析领域的应用[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(7):76-79.
- [12] Zamboni C G, Quinto M, De Vietro N. Solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices[J]. Food Chemistry. 2004, 86(2): 269-274.

酿酒科技杂志社邮购书刊

书刊名	邮购价	书刊名	邮购价
《酿酒科技精选（1980～1985）》	20 元/册	《酿酒科技》2008 年合订本	200 元/套
《酿酒科技》2000 年合订本	65 元/册	《酿酒科技》2009 年合订本	230 元/套
《酿酒科技》2001 年合订本	70 元/册	《酿酒科技》2010 年合订本	230 元/套
《酿酒科技》2002 年合订本	75 元/册	《酿酒科技》2011 年（月刊）	180 元/年
《酿酒科技》2003 年合订本	80 元/册	《世界蒸馏酒的风味》	6 元/册
《酿酒科技》2004 年合订本	80 元/册	《中国酒曲》	35 元/册
《酿酒科技》2005 年合订本	120 元/套	《酿酒科技》世纪光盘（1980～2000 年）	380 元/套
《酿酒科技》2006 年合订本	150 元/套	《白酒的品评》	26.5 元/册
《酿酒科技》2007 年合订本	190 元/套	《中国名酒鉴赏》	64 元/册

需订阅以上书刊者,请直接汇款到本社邮购。地址:贵州省贵阳市沙冲中路 58 号(550007);电话:(0851)5796163;传真:(0851)5776394;联系人:姜莹。