

气相色谱 - 质谱结合吸附萃取法测定 陈酿黄酒挥发性香气物质

于海燕¹, 张 妮², 朱建才¹

(1. 上海应用技术学院香料香精技术与工程学院, 上海 200235;

2. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

摘 要: 建立吸附法进行香气提取、气相色谱 - 质谱法测定不同酒龄黄酒中挥发性香气物质的方法。对比分析固相微萃取和搅拌棒吸附萃取对黄酒香气提取的效果, 获得优化的香气提取方法。结果表明: 采用搅拌棒吸附萃取 - 气相色谱 - 质谱法测定黄酒挥发性香气物质的平均相对标准偏差为 11.47%, 回收率为 88.6% ~ 92.3%, 说明所建方法稳定; 采用搅拌棒吸附萃取 - 气相色谱 - 质谱法共测得 60 种挥发性香气物质, 其中 15 种醇类物质、25 种酯类、6 种醛类和 5 种酸类物质; 随酒龄增加, 乙醇含量逐渐减少, 而 11 种酯类、1 种醇类、1 种酮类和 1 种醛类含量逐渐增加, 随陈酿时间增加, 部分醇、醛类物质被催化氧化成有机酸, 酸的增加促进了酯化反应。搅拌棒吸附萃取 - 气相色谱 - 质谱法具有前处理简单快捷、重复性好等优点, 可为黄酒香气分析提供准确可靠的数据。

关键词: 黄酒; 搅拌棒吸附萃取; 固相微萃取; 气相色谱 - 质谱法

Determination of Volatiles in Chinese Rice Wine by Sorptive Extraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry

YU Hai-yan¹, ZHANG Ni², ZHU Jian-cai¹

(1. School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200233, China;

2. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: A method was developed for the determination of volatiles in Chinese rice wine with different aging times by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with sorptive extraction. Solid phase microextraction (SPME) and stir bar sorptive extraction (SBSE) were compared to select the best extraction method among the two. Compared with SPME, SBSE resulted in a higher-fold enrichment and a lower limit of detection. The average relative standard deviation (RSD) of the developed SBSE/GC-MS method (6 parallel determinations) was 11.47% and the recoveries for isobutyl alcohol, furfural and ethyl acetate were in the range of 88.6% - 92.3%, suggesting its good stability. Sixty volatiles were identified and quantified, including 15 alcohols, 25 esters, 6 aldehydes and 5 acids, and others. With increasing aging time, ethanol concentration showed a gradual decrease, while the concentrations of 11 esters, 1 alcohol, 1 ketone and 1 aldehyde gradually increased. These changes may be caused by the oxidation of alcohols and aldehydes into acids followed by the esterification of acids and alcohols during storage. In conclusion, SBSE/GC-MS is a reliable method allowing the determination of volatiles in Chinese rice wine.

Key words: Chinese rice wine; stir bar sorptive extraction (SBSE); solid phase microextraction (SPME); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

中图分类号: TS262.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0179-05

挥发性香气物质是黄酒风味的重要组成部分。黄酒香气成分复杂, 既有来源于发酵原料中固有的挥发性香气物质, 又有产生于发酵过程中微生物代谢的产物, 还有陈酿阶段形成的风味物质。香气成分含量的差异, 构

成了不同黄酒的风格和特色^[1]。因此, 香气成分的测定对于评价黄酒质量、鉴别品种、产地和陈酿年份等具有重要意义。

由于香气的组分浓度远低于其他物质, 因此香气分

收稿日期: 2010-12-27

基金项目: 教育部高等学校全国优秀博士论文作者资助专项(201059); 上海市自然科学基金项目(10ZR1429600)

作者简介: 于海燕(1979—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品风味分析与食品品质快速检测。E-mail: hyyu603@yahoo.com.cn

析前的首要任务是将其从基体中提取出来。香气成分的提取方法主要有蒸馏法(共水蒸气蒸馏法、水蒸气蒸馏法和分子蒸馏法)、萃取法(溶剂蒸馏法、索氏萃取和超临界流体萃取法)、顶空法(静态和动态),以及吸附法(固相微萃取和搅拌棒吸附萃取)等^[2]。固相微萃取(solid phase microextraction, SPME)是选择性地萃取气、液、固相物质的常用方法,是将有固定相涂层的熔融石英纤维插入待测物中,使纤维与气相或溶液达到平衡,被测物选择性地富集到纤维上,将纤维收回到注射器针头并转移到气相色谱加热的进样口,热解吸被分析物。此方法优点为:可降低检测限,方法使用简单,可自动化操作^[3]。搅拌棒吸附萃取(stir bar sorptive extraction, SBSE),是一种自身搅拌吸附萃取的固相萃取技术,用涂有25 μL 聚二甲基硅氧烷涂层的10mm长的搅拌棒代替了固相微萃取的聚合物涂层纤维^[4]。搅拌棒萃取技术具有富集倍数高、重复性好和操作简单等优点,可以将食品稀释一定的倍数以减少甚至消除食品的基质效应,并且能够保证较低的检出限^[5]。

随着气相色谱-质谱联用(gas chromatograph-mass spectrometry, GC-MS)技术的发展,GC-MS技术已广泛应用在饮料酒香气分析。固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(SPME-GC-MS)在白酒^[6]、啤酒^[7-8]和果酒^[9-12]香气分析中的应用已有研究报道;搅拌棒吸附萃取-气相色谱-质谱法(SBSE-GC-MS)在白酒^[13-16]和果酒^[17-18]的香气分析中亦有相关报道;对于黄酒香气的分析,胡健等^[19]采用静态顶空方法对黄酒的机械化大罐发酵过程进行了跟踪检测;李博斌等^[20]采用SPME-GC-MS分析了黄酒的挥发性香气物质,并结合感官评分进行了回归分析,苯甲酸乙酯、丁二酸二乙酯和苯乙酸乙酯香气与评分呈正相关;罗涛等^[1]采用SPME-GC-MS分析了不同产地黄酒的挥发性香气物质,从香气活力值比较来看,苯乙醛、丁酸乙酯、乙酸乙酯、己酸乙酯、异丁酸乙酯、苯乙醇、异戊醇和辛酸乙酯对不同产地黄酒的香气有不同程度的贡献。目前尚未见有关采用吸附法结合GC-MS测定不同酒龄黄酒的挥发性香气物质的报道。

本实验将对比分析SPME和SBSE在黄酒香气提取中的效果,确定最优香气提取方法;将最优香气提取方法和GC-MS联用检测黄酒挥发性物质,定量分析挥发性物质含量;对比分析不同酒龄黄酒样品的挥发性香气物质差异。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验选用上海某酿酒有限公司的加饭黄酒1年陈、3年陈和5年陈样品各1瓶。

外标乙酸乙酯、糠醛、异丁醇(均为色谱纯) 上

海试剂一厂;内标2-辛醇(99.0%) 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。

1.2 仪器与设备

7890A/5975C 气相色谱-质谱联用仪(配有 Gerstel MPS2 多功能进样系统、气相色谱进样口的热解析单元和冷进样系统)、HP-INNOWax 毛细管柱(50m $\times$ 200 μm , 0.2 μm) 美国 Agilent 公司;Twister 吸附萃取磁力搅拌棒[涂层材料为 polydimethylsiloxane(PDMS), 吸附涂层厚度 1mm, 搅拌棒长度 10mm] 德国 Gerstel 公司;90-3 型磁力搅拌器 上海青浦沪西仪器厂;固相微萃取纤维头(涂层材料为 100 μm PDMS) 美国 Supelco 公司。

1.3 标准溶液配制

准确取一定量外标(乙酸乙酯、糠醛和异丁醇)溶解到无水乙醇中,再加入到模拟黄酒中配制一系列质量浓度的标准溶液。模拟黄酒采用去离子水配制,其中含有 2.5g/L 乳酸和体积分数 16% 的乙醇。内标 2-辛醇的质量浓度为 1g/L,每次测样取 20 μL 。

1.4 香气成分提取

SPME 操作:于 20mL 顶空瓶中准确加入 5mL 黄酒样品、5mL 去离子水和 20 μL 内标,加盖密封垫和铝帽,50 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5min,萃取吸附 30min,转速 500r/min,250 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 GC 解析 3min,用于 GC-MS 分析。

SBSE 操作:准确量取 5mL 黄酒、5mL 去离子水于 20mL 样品瓶中,并加入 20 μL 内标,放入搅拌棒,室温 500r/min 搅拌 30min,萃取结束后,取出搅拌棒,用少许去离子水冲洗棒表面后再用擦镜纸吸干表面水分,将搅拌棒转移到玻璃热脱附管中进行热解析和 GC-MS 分析。

1.5 GC-MS 条件

GC 进样口条件:将吸附萃取过黄酒的 Twister 放在玻璃热解析管中进行热解析。TDS 的初始温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,保持 3min,以 60 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 200 $^{\circ}\text{C}$,保持 1min,再以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 260 $^{\circ}\text{C}$,保持 3min。从 TDS 中解析下来的分析物在 CIS 中进行冷凝再富集,CIS 使用液氮制冷,其冷凝聚集温度为 -90 $^{\circ}\text{C}$,保持 0.5min,以 12 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 升温至 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 0.5min 使分析物进入色谱柱。TDS 与 CIS 之间的接口温度设置为 280 $^{\circ}\text{C}$ 。

GC 条件:以氦气(99.999%)为载气,恒定流速为 1.0mL/min;进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$,不分流进样;柱温箱采用程序升温,初始温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温到 120 $^{\circ}\text{C}$,保持 5min,再以 1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温到 190 $^{\circ}\text{C}$ 。

MS 条件:电子轰击离子源,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,电离电压 70eV,全扫描模式采集数据,扫描范围为 10~450u。

表 2 基于 SBSE-GC-MS 测定的不同陈酿年份黄酒样品挥发性香气物质成分及其含量

Table 2 Volatiles and their contents in Chinese rice wine determined by SBSE/GC-MS

序号	保留时间/min	化合物	挥发性成分含量/(mg/kg)		
			1 年陈黄酒	3 年陈黄酒	5 年陈黄酒
1	5.62	乙酸乙酯	12.599	16.436	17.385
2	6.419	乙醇	888.243	807.256	757.921
3	6.747	丙酸乙酯	0.292	0.394	0.343
4	6.915	异丁酸乙酯	0.598	0.839	0.856
5	7.908	乙酸异丁酯	0.281	0.221	0.271
6	8.497	丁酸乙酯	0.462	0.392	0.507
7	9.351	异戊酸乙酯	0.059	0.192	0.222
8	9.494	二甲基二硫醚	0.474	0.421	0.282
9	9.773	己醛	0.044	0.031	0.041
10	10.042	异丁醇	44.514	35.504	43.027
11	11.028	乙酸-2-甲基丁酯	0.173	0.197	0.141
12	11.061	乙酸异戊酯	1.864	0.907	1.390
13	11.478	戊酸乙酯	0.340	0.121	0.254
14	11.679	1,2-二甲基苯	0.098	0.157	0.146
15	12.492	2-丁烯酸乙酯	0.071	0.008	0.031
16	12.822	异戊醇	25.114	21.133	24.497
17	13.181	2-庚酮	0.062	0.130	0.143
18	13.264	1,3-二甲基苯	0.111	0.014	0.056
19	14.123	2-甲基丁醇	253.475	193.474	228.853
20	15.193	己酸乙酯	1.246	0.797	1.098
21	19.276	庚酸乙酯	0.077	0.069	0.086
22	19.582	乳酸乙酯	2.769	4.109	4.136
23	19.911	己醇	2.188	1.791	2.227
24	21.151	二甲基三硫醚	0.153	0.213	0.489
25	21.56	2-壬酮	0.569	0.667	0.433
26	21.767	壬醛	0.046	0.045	0.070
27	23.034	2-羟基-3-甲基丁酸乙酯	0.042	0.187	0.223
28	23.502	辛酸乙酯	0.490	0.501	0.487
39	24.011	1-辛烯-3-醇	1.501	1.567	2.042
30	24.158	乙酸	0.980	0.853	1.608
31	24.411	乳酸异丁酯	0.051	0.071	0.097
32	24.661	糠醛	0.324	0.293	0.330
33	25.623	2-乙基-1-己醇	1.760	1.317	2.096
34	26.11	癸醛	0.051	0.040	0.122
35	26.852	2-壬醇	1.886	2.144	2.019
36	27.061	苯甲醛	1.204	1.180	1.633
37	27.581	2,3-丁二醇	1.584	1.493	3.427
38	27.893	2,6-二甲基-4-庚醇	7.042	12.844	12.325
39	28.064	芳樟醇	1.378	1.267	1.839
40	28.471	1-辛醇	2.017	1.710	2.566
41	30.655	2-十一酮	0.303	0.375	0.371
42	32.102	丙位丁内酯	0.227	0.319	0.406
43	33.009	癸酸乙酯	0.082	0.171	0.181
44	34.081	1-壬醇	2.221	1.839	2.494
45	34.406	苯甲酸乙酯	0.978	0.689	1.095
46	35.195	丁二酸二乙酯	3.243	12.145	10.499
47	37.835	2-十一醇	1.629	1.644	2.541
48	41.727	苯乙酸乙酯	0.371	0.512	0.507
49	43.322	尼古丁酸乙酯	0.185	0.266	0.272
50	43.549	乙酸苯乙酯	0.706	0.644	0.623
51	45.701	己酸	0.316	0.116	0.166
52	47.802	双丁酯	0.692	1.030	3.413
53	49.535	苯乙醇	162.658	156.859	168.112
54	50.637	2-苯基-2-丁烯醛	0.130	0.164	0.221
55	51.793	1,2-苯并噻唑	0.411	0.072	0.225
56	52.357	2-乙基己酸	0.193	0.054	0.844
57	55.681	苯酚	1.108	0.329	0.848
58	56.57	丙位壬内酯	1.702	1.314	2.340
59	59.28	辛酸	0.600	0.523	0.764
60	72.06	癸酸	0.759	0.587	1.008

采用 Wiley 和 Nist 05 标准图谱库进行数据检索。

1.6 定量分析

将标样配制成已知含量的乙醇标准溶液后, 稀释分别取 5 个质量浓度梯度的乙酸乙酯、糠醛和异丁醇标准物质混合液, 其中均含有 1g/L 内标 2- 辛醇, 分别加入到黄酒样品中, 在相同的 SBSE 和 GC 条件下进行萃取。由此方法得到 6 条标准曲线, 根据标准曲线进行定量, 对于黄酒中的其他芳香组分采取就近原则, 即以离组分最近的标样进行定量^[21]。

2 结果与分析

2.1 SPME 与 SBSE 对比分析

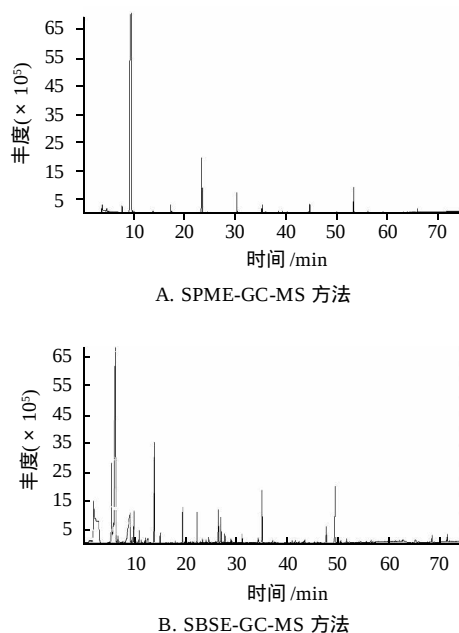


图 1 基于两种方法的黄酒挥发性香气物质的总离子流色谱图
Fig.1 Total ion current chromatograms of volatiles in Chinese rice wine determined by GC-MS with SBSE or SPME

由图 1 可知, 采用 SPME-GC-MS 方法检测到 40 种挥发性香气物质, 这与罗涛等^[1]的研究结果一致, 在其实验结果中, 上海产黄酒样品的检测到的挥发性香气物质为 41 种; 采用 SBSE-GC-MS 方法检测到 60 种挥发性香气物质。由该结果可以看出, 相对于 SPME, SBSE 富集倍数高、检出限低。

2.2 SBSE 方法的线性范围、回收率和精密度

采用基质加标法进行定量分析, 以分析物峰面积对其质量浓度作图, 得出线性方程, 结果见表 1。选取某一样品, 在其线性范围内, 添加一定量混合标准溶液, 采用 SBSE-GC-MS 方法进行测定, 计算所得回收率如表 1 所示。

表 1 SBSE-GC-MS 方法的线性实验结果和回收率
Table 1 Linearity and recovery rate of SBSE-GC-MS method

标准品	线性方程	相关系数	回收率/%
异丁醇	$y = 9 \times 10^3 x - 1 \times 10^6$	0.999	88.6
糠醛	$y = 2 \times 10^3 x - 356118$	0.999	91.2
乙酸乙酯	$y = 9 \times 10^3 x - 46288$	0.996	92.3

对同一样品平行测定 6 次, 结果 61 个组分的峰面积相对标准偏差最大为 21.53%, 平均相对标准偏差为 11.47%。

线性范围、回收率和精密度实验结果表明, SBSE-GC-MS 可用于黄酒挥发性香气物质的检测。

2.3 基于 SBSE-GC-MS 的黄酒挥发性香气物质分析

由表 2 可知, 采用 SBSE-GC-MS 法测得 15 种醇类物质、25 种酯类、6 种醛类和 5 种酸类物质等, 其中含量最高的是乙醇, 其次是 2- 甲基丁醇、苯乙醇、异丁醇和异戊醇等。随酒龄增加, 乙醇和二甲基二硫醚含量逐渐减少, 而乙酸乙酯、异丁酸乙酯、异戊酸乙酯、2- 庚酮、乳酸乙酯、2- 羟基-3- 甲基丁酸乙酯、1- 辛烯-3- 醇、2- 羟基丙酸异丁酯、丙位丁内酯、癸酸乙酯、尼古丁酸乙酯、双丁酯和 2- 苯基-2- 丁烯醛的含量则逐渐减少。其原因为, 随陈酿时间延长, 部分醇、醛类物质被催化氧化成有机酸, 酸的增加促进了酯化反应。

以上结果表明, SBSE-GC-MS 方法具有前处理简单快捷和重复性好等优点, 可为黄酒香气分析提供准确可靠的数据。

3 结 论

本研究确定了 SBSE 与 GC-MS 联用测定黄酒中挥发性香气物质含量的方法, 该方法精密度高、重复性好、回收率稳定; 对比不同酒龄黄酒样品挥发性香气物质含量差异发现, 随酒龄增加, 乙醇含量逐渐减少, 11 种酯类、1 种醇类、1 种酮类和 1 种醛类含量逐渐增加, 随陈酿时间延长, 部分醇、醛类物质被催化氧化成有机酸, 酸的增加促进了酯化反应, 可为黄酒陈酿机理探讨提供基础数据。

参考文献:

- [1] 罗涛, 范文来, 徐岩, 等. 我国江浙沪黄酒中特征挥发性物质香气活力研究[J]. 中国酿造, 2009(2): 14-19.
- [2] 宋国新, 余应新, 王林祥, 等. 香气分析技术与实例[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 84-85.
- [3] 郭翔. 黄酒风味物质分析与控制的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [4] 侯英, 杨蕾, 王保兴, 等. 应用搅拌棒吸附萃取-热脱附-气相色谱-质谱分析烟用香料的化学成分[J]. 色谱, 2006, 24(6): 601-605.

- [5] 陈琦, 凌云, 张峰, 等. 搅拌棒吸附萃取结合气相色谱/质谱/质谱法同时测定饮料和果酱中的7种防腐剂[J]. 分析化学, 2010, 38(8): 1156-1160.
- [6] CAMARA J S, MARQUES J C, PERESTRELO R M, et al. Comparative study of the whisky aroma profile based on headspace solid phase microextraction using different fibre coatings[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1150(1/2): 198-207.
- [7] SILVA G A, AUGUSTO F, POPPI R J. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC[J]. Food Chemistry, 2008, 111(4): 1057-1063.
- [8] PIZARRO C, PEREZ-DEL-NOTARIO N, GONZALEZ-SAIZ J M. Optimization of a simple and reliable method based on headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile phenols in beer [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(39): 6013-6021.
- [9] CARRILLO J D, GARRIDO-LOPEZ A, TENA M T. Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1102(1/2): 25-36.
- [10] TAO Yongsheng, LI Hua, WANG Hua, et al. Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China)[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, 21(8): 689-694.
- [11] 姜文广, 吴训伦, 尹雷, 等. 张裕酒庄级蛇龙珠干红葡萄酒香气成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(6): 125-131.
- [12] 盖禹含, 辛秀兰, 杨国伟, 等. 不同酵母发酵的蓝莓酒香气成分 GC-MS 分析[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 171-174.
- [13] ZALACAIN A, MARIN J, ALONSO G L, et al. Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction[J]. Talanta, 2007, 71(4): 1610-1615.
- [14] COELHO E, PERESTRELO R, NENG N R, et al. Optimisation of stir bar sorptive extraction and liquid desorption combined with large volume injection-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry for the determination of volatile compounds in wines[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 624(1): 79-89.
- [15] FRANC C, DAVID F, De REVEL G. Multi-residue off-flavour profiling in wine using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(15): 3318-3327.
- [16] DELGADO R, DURÁN E, CASTRO R, et al. Development of a stir bar sorptive extraction method coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile compounds in Sherry brandy[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 672(1/2): 130-136.
- [17] PERESTRELO R, NOGUEIRA J M F, CAMARA J S. Potentialities of two solventless extraction approaches—Stir bar sorptive extraction and headspace solid-phase microextraction for determination of higher alcohol acetates, isoamyl esters and ethyl esters in wines[J]. Talanta, 2009, 80(2): 622-630.
- [18] 杨丽丽, 王方, 张岱, 等. 搅拌棒吸附萃取 - 气质联机分析(SBSE-GC/MS)在葡萄酒香气分析中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 153-157.
- [19] 胡健, 池国红, 何喜红. 黄酒发酵过程中主要香气成分的变化[J]. 酿酒科技, 2007(12): 60-62.
- [20] 李博斌, 李祖光, 刘兴泉, 等. 黄酒风味物质与黄酒香气感官评分的定量关系[J]. 酿酒科技, 2008(11): 90-93.
- [21] 吴继红, 张美莉, 陈芳, 等. 固相微萃取 GC-MS 法测定苹果不同品种中主要芳香成分的研究[J]. 分析测试学报, 2005, 24(4): 101-104.