

顶空固相微萃取 - 气质联用快速测定大曲中的挥发性风味成分

张春林¹, 敖宗华², 炊伟强¹, 沈才洪², 陶文沂^{1,*}, 张宿义²

(1.江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2.泸州老窖股份有限公司, 四川 泸州 646000)

摘要:为探讨大曲中的挥发性风味成分,采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法(HS-SPME-GC-MS)分析泸州老窖中高温大曲的挥发性成分,考察萃取头、萃取时间、萃取温度对大曲样品中挥发性风味物质萃取的影响。结果表明:采用50/30 μm 碳分子筛/聚二乙烯基苯/聚二甲基硅氧烷(DVB/CAR on PDMS)纤维头在50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下对大曲样品顶空吸附30min,萃取效果最好;大曲样品的分析表明,其挥发性风味物质中含量较高的是醇类、酯类和酮类化合物,另外还含有一些吡嗪类化合物。该方法对大曲中常见挥发性风味成分的测定有良好的重复性和回收率,方便快捷。

关键词:顶空固相微萃取法;气相色谱-质谱联用;泸州老窖大曲;挥发性风味化合物

Rapid Analysis of Volatile Compounds in Daqu by Headspace Solid-phase Microextraction Coupled to Gas Chromatography-Mass Spectrometry

ZHANG Chun-lin¹, AO Zong-hua², CHUI Wei-qiang¹, SHEN Cai-hong², TAO Wen-yi^{1,*}, ZHANG Su-yi²

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Luzhou Laojiao Co. Ltd., Luzhou 646000, China)

Abstract: In order to analyze the composition of volatile compounds in the Luzhou Laojiao Daqu by headspace solid phase micro-extraction coupled with gas chromatography mass spectrometry detection (HS-SPME-GC-MS), the effects of SPME fiber type, adsorption time, and extraction temperature on volatile extraction were investigated. Using a 50/30 μm DVB/CAR on PDMS fiber for 30 min headspace adsorption at 50 $^{\circ}\text{C}$ provided optimum extraction for the Daqu. Then the fiber was introduced into the injection port of the GC-MS system (at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min). Fifty-five compounds were isolated and identified, among which alcohols, esters, and ketones were the prominent ones. In addition, some pyrazines were also found. In conclusion, the method is simple, fast and accurate with high reproducibility and sensitivity.

Key words: headspace solid-phase microextraction (HS-SPME); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); Luzhou Laojiao Daqu; volatiles

中图分类号: TS261.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)10-0137-04

大曲是以单一小麦或小麦、大麦和豌豆混合物为原料,经粗粉碎后加水压成砖状曲坯,人工控制在一定的温度、湿度条件下培育而成的粗酶制剂^[1]。它是酿酒发酵的动力,用于蒸馏酒的酿造。目前许多名优白酒就是利用大曲作为酿酒的原料。大曲微生物区系以霉菌占大多数,酵母菌和细菌比较少^[2]。在大曲制造过程中微生物的代谢产物和原料的分解产物直接或间接地构成了白酒的风味物质,使白酒具有各种不同的独特的风

味^[3]。因此,大曲还是生香剂。不少专家认为,大曲中富含大量香味前驱物质,因此,大曲本身就是一种香味物质的富集物,所谓的曲香正是一种表现^[4]。然而目前对于大曲中的香味物质研究较少。

分析样品中的香味物质,通常要对香气成分进行浓缩预处理。传统的浓缩预处理方法有液-液萃取法、顶空法、吹扫捕集法、同时蒸馏萃取法和固相萃取法^[5]。这些方法都不同程度地存在某些缺点,或费用太高,或

收稿日期: 2010-06-20

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2010SZ0032); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室 2008 年度开放课题(NJ2009-01)

作者简介: 张春林(1982—),男,博士研究生,主要从事发酵工程、风味化学研究。E-mail: zcl18075@163.com

*通信作者: 陶文沂(1946—),男,教授,博士,主要从事发酵工程研究。E-mail: wyt1946@163.com

样品量过多、耗时过长,或使用的是对人体有害的昂贵的有机溶剂,对操作者造成潜在的危害,还可能在浓缩过程中丢失挥发性物质。与传统的风味物质抽提技术相比,固相微萃取(SPME)简便、快速、经济安全、无溶剂、选择性好且灵敏度高,可直接与气相色谱-质谱、高效液相色谱、毛细管电泳仪等联用,集采样、萃取、进样于一体,大大加快了分析检测的速度^[6-7],近年来该技术在食品风味分析中应用越来越广泛^[8-12]。

本研究采用HS-SPME与气相色谱-质谱(GC-MS)联用的方法,优化顶空固相微萃取法参数,探讨HS-SPME用于分离大曲中香气物质的可行性,对大曲样品的香气物质进行定性定量测定。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大曲样品及其前处理:泸州老窖中高温大曲优级曲;将采集的到的整块大曲粉碎后并全部过40目筛,混合均匀后,取0.5g大曲样品放入顶空瓶中再加入饱和NaCl溶液5mL盖上瓶盖。

Trace MS气相色谱-质谱联用仪 美国Finnigan公司;DB-WAX弹性石英毛细管柱(30m × 0.25mm, 0.25 μm)、萃取装置:SPME手动进样手柄、萃取头(85 μm PA、100 μm PDMS、75 μm CAR/PDMS、50/30 μm DVB/CAR on PDMS) 美国Supelco公司;Turbo Matrix TD热脱附进样器 美国Perkin Elmer公司。顶空进样瓶(15mL) 中国安谱公司;RCT-Basic加热磁力搅拌器 日本岛津公司。

1.2 顶空固相微萃取条件

萃取头的老化:第一次使用时50/30 μm DVB/CAR on PDMS萃取头在气相色谱进样口270 老化1h,75 μm CAR/PDMS萃取头在气相色谱进样口300 老化1h,85 μm PA萃取头在气相色谱进样口280 老化1h,100 μm PDMS萃取头在气相色谱进样口250 老化0.5h。

萃取条件:50/30 μm DVB/CAR on PDMS萃取纤维头,于50 插入加入饱和NaCl 5mL的大曲样品(0.5g)顶空吸附30min,于250 解吸5min后进行GC-MS分离鉴定。

1.3 气相色谱-质谱分析条件

气相色谱条件:DB-WAX色谱柱(30m × 0.25mm, 0.25 μm);载气为He,流速1mL/min;程序升温:起始温度40 ,保持3min,以5 /min升温速率升至80 ,最后以10 /min升至230 /min保持7min;汽化室温度250 ;不分流。

质谱条件:电子轰击电离(EI)离子源,电子能70eV,发射电流200 μA,电子倍增器电压350V,离子源温度200 ,接口温度250 ,质量范围33~450u。

1.4 定性定量分析

定性:实验数据处理由Xcalibur软件完成,未知化合物经计算机检索的同时与NIST谱库(107000个化合物的数据)和Wiley谱库(320000个化合物的数据)相匹配,只有当正反匹配度均大于800(最大值为1000)的鉴定结果才予以确认。

定量:选择2-辛醇为内标(终质量浓度10ng/mL),大曲样品中鉴定的化合物质以与2-辛醇质量浓度之比计算。

2 结果与分析

2.1 固相微萃取纤维头的筛选

选用4种萃取头在相同的吸附条件(50 吸附30min)和解吸条件(250 解吸5min)下进行实验。从表1来看,50/30 μm DVB/CAR on PDMS的总的峰面积为 5.5×10^8 ,几乎是85 μm PA总峰面积的7.6倍,100 μm PDMS的12.0倍和75 μm CAR/PDMS的1.9倍,说明50/30 μm DVB/CAR on PDMS的吸附能力比其他的萃取头强,这和文献[13]报道一致。从检出的有效化合物的个数来看,50/30 μm DVB/CAR/PDMS检出了55种化合物,而75 μm CAR/PDMS检出了47种化合物,比单一组分涂层的85 μm PA(35种化合物)和100 μm PDMS(38种化合物)要多。这主要是因为萃取头涂层的极性不同的缘故^[14]。萃取头对所分析的化合物有选择性,对大曲样品而言,50/30 μm DVB/CAR on PDMS复合涂层的萃取头更加适合,不仅分离出的化合物比较全面,而且风味强度也很大,色谱分析响应值较高,因而选择作为实验用萃取头^[10,15]。

表1 不同萃取头的萃取效果

Table 1 Effect of fiber type on volatile extraction

萃取头	总峰面积($\times 10^7$)	化合物数目
85 μm PA	7.25	35
100 μm PDM	4.59	38
75 μm CAR/PDS	29.0	47
50/30 μm DVB/CAR on PDMS	55.0	55

2.2 萃取时间的选择

选用50/30 μm DVB/CAR on PDMS萃取头,萃取温度为50 的条件下,比较5个不同吸附时间对吸附效果的影响。由图1可知,萃取时间延长,萃取物总峰面积增加。吸附时间从10min增加到30min时峰面积增加较明显;当吸附时间继续延长到50min时,总峰面积

变化幅度不大, 趋于平衡, 可能此时存在吸附 - 解吸附平衡。因此选择吸附时间为 30min, 此时间正好与 GC-MS 分析样品所需的时间比较接近, 从而提高了单位时间内样品分析的效率。

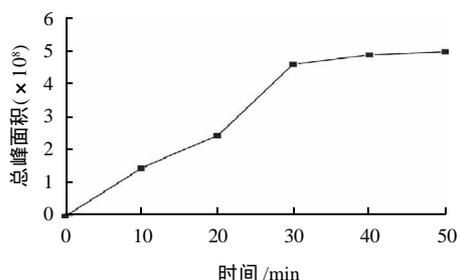


图 1 萃取时间对萃取效果的影响

Fig.1 Effect of time on volatile extraction

2.3 萃取温度的选择

萃取温度对萃取效果的影响具有两面性: 一方面, 温度升高有利于吸附, 尤其对顶空固相微萃取; 另一方面, 温度升高又会增加萃取头固有组分的解吸, 从而降低萃取头对被分析组分的吸附能力。选用 50/30 μm DVB/CAR on PDMS 萃取头, 萃取时间为 30min 的条件下, 由图 2 可明显看到, 吸附温度升高时吸附量有所增加, 但是, 萃取温度由 50 提高到 60 时总峰面积增加幅度不大, 而检出的有效化合物数目在减少, 所以选择 50 作为吸附温度, 此时检出的化合物最多, 所吸附的样品量足够用于 GC-MS 分析。

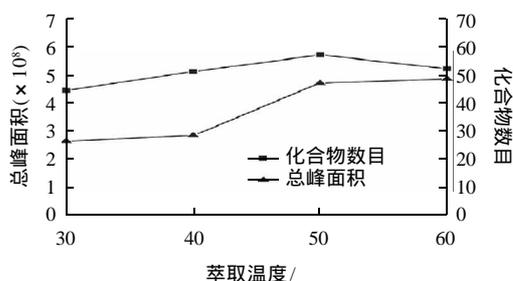


图 2 萃取温度对萃取效果的影响

Fig.2 Effect of temperature on volatile extraction

2.4 萃取方法的有效性验证

采用上述优化的分析操作条件, 重复 3 次实验, 考察顶空固相微萃取法在分析大曲样品中挥发性风味物质时的重复性和回收率。结果见表 2, 经计算, 组分峰面积的相对标准偏差(RSD)最大为 39.4%, 最小为 1.9%, 平均相对标准偏差为 10.9%, 说明将顶空固相微萃取技术用于大曲风味物质的分析重复性良好。

表 2 大曲样品中鉴定的挥发性风味成分和含量(n=3)

Table 2 Identified volatiles and their contents in Daqu sample (n=3)

保留时间/min	化合物名称	相对峰面积%	含量/(ng/g)	相对标准偏差%
4.05	乙酸乙酯	9.27	441.43	9.2
5.94	2-戊酮	1.67	79.52	6.0
6.13	丁酸甲酯	1.82	86.66	2.0
8.79	己醛	3.46	164.76	6.7
9.17	2-甲基-1-丙醇	0.69	32.85	18.9
10.00	2-戊醇	13.18	627.63	13.3
10.71	丁醇	0.61	29.04	24.4
11.85	2-庚酮	0.36	17.14	12.7
12.03	己酸甲酯	0.39	18.57	7.7
12.55	3-甲基丁醇	3.35	159.52	17.8
12.90	1-甲基戊醇	0.63	30.00	20.0
13.62	1-戊醇	1.40	66.66	15.2
14.01	2-甲基吡嗪	0.31	14.76	17.8
14.57	辛醛	0.17	8.09	18.5
15.20	2,5-二甲基吡嗪	1.00	47.62	9.0
15.33	2,6-二甲基吡嗪	1.29	61.42	15.6
15.47	2-乙基吡嗪	0.17	8.09	39.4
15.54	6-甲基-5-庚烯-2-酮	0.32	15.23	5.1
15.68	2,3-二甲基吡嗪	0.53	25.23	4.4
15.76	正己醇	3.08	146.66	3.6
16.39	2-乙基-6-甲基吡嗪	0.64	30.47	9.9
16.50	4-二甲氨基吡啶	0.28	13.33	12.7
16.56	壬醛	0.37	17.61	13.3
16.71	三甲基吡嗪	3.04	144.76	6.7
16.90	2-辛醇	0.21	10.00	0
17.25	3-乙基-1,2-苯二酚	0.23	10.95	2.4
17.40	1-辛烯-3-醇	0.56	26.66	20.5
17.47	庚醇	0.34	16.19	14.3
17.62	2,3-二甲基-5-乙基吡嗪	1.06	50.47	2.8
17.83	四甲基吡嗪	4.93	234.76	5.8
18.00	2-乙基己醇	0.43	20.47	7.3
18.14	2-乙基-6-甲基吡嗪	1.42	67.62	4.1
18.41	2,5,6-三甲基-4-乙基吡啶	0.26	12.38	10.1
18.69	苯甲醛	1.15	54.76	4.8
18.96	辛醇	0.27	12.85	1.9
19.53	十四烷	0.19	9.04	12.0
20.31	壬醇	0.65	30.95	8.9
20.37	呋喃甲醇	0.38	18.09	9.5
20.42	苯乙酮	0.16	7.61	17.7
20.51	3-甲基-丁酸	0.57	27.14	6.2
20.72	3-甲氧基-1-丁烯	0.25	11.90	13.6
20.79	十五烷	0.15	7.143	10.5
21.59	萘	1.54	73.33	2.5
22.58	己酸	0.17	8.09	14.9
22.97	苯甲醇	0.43	20.47	7.8
23.38	苯乙醇	10.46	498.10	10.9
24.02	2-乙酰基吡咯	0.28	13.33	3.7
24.33	苯酚	0.50	23.81	5.0
24.63	4-乙基愈创木酚	0.50	23.81	12.4
25.16	(Z)-氧化环十七碳-8-烯-2-酮	0.81	38.57	8.8
26.34	十六酸甲酯	3.39	161.43	5.5
27.18	2,4-二叔丁基苯酚	0.30	14.28	14.0
27.83	二十二烷酸甲酯	0.41	19.52	8.0
28.69	(Z)-9-十八烯酸甲酯	1.35	64.28	7.7
29.32	亚油酸甲酯	2.10	100.00	6.3

在大曲样品中加入几种具有代表性的挥发性风味成分, 与不加入的大曲样品同时测定, 按照加标回收率的方法计算, 结果见表 3。大曲样品中几种具有代表性的

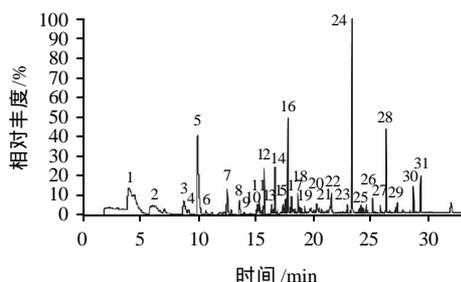
风味组分回收率范围在 87.5% ~ 114.0%，几种代表性化合物的回收率都较高，说明该法具有很好可靠性和准确性。

表 3 大曲样品中部分挥发性风味成分的回收率

Table 3 Recoveries of several of identified volatiles from spiked Daqu sample

化合物名称	加样量/(ng/mL)	检测量/(ng/mL)	回收率/%
乙酸乙酯	202.55	195.78	96.7
己醛	51.13	53.11	103.9
苯乙醇	10.82	9.47	87.5
四甲基吡嗪	103.23	110.74	107.3
2-戊醇	118.96	135.64	114.0
4-乙基愈创木酚	10.15	9.43	92.9

2.5 大曲样品中挥发性风味成分的分析



主要化合物峰标记: 1. 乙酸乙酯; 2. 2-戊醇; 3. 己醛; 4. 2-甲基-1-丙醇; 5. 2-戊醇; 6. 丁醇; 7. 3-甲基丁醇; 8. 1-戊醇; 9. 2-甲基吡嗪; 10. 2,5-二甲基吡嗪; 11. 2,6-二甲基吡嗪; 12. 正己醇; 13. 2-乙基-6-甲基吡嗪; 14. 三甲基吡嗪; 15. 2,3-二甲基-5-乙基吡嗪; 16. 四甲基吡嗪; 17. 2-乙基-6-甲基吡嗪; 18. 苯甲醛; 19. 十四烷; 20. 壬醇; 21. 3-甲基-丁酸; 22. 萘; 23. 苯甲醇; 24. 苯乙醇; 25. 苯酚; 26. 4-乙基愈创木酚; 27. (Z)-氧化环十七碳-8-烯-2-酮; 28. 十六酸甲酯; 29. 2,4-二叔丁基苯酚; 30. (Z)-9-十八烯酸甲酯; 31. 亚油酸甲酯。

图 3 大曲中挥发性成分的总离子流图

Fig.3 GC-MS total ion chromatograms of volatiles in Daqu sample

从表 2 分析结果来看，大曲的挥发性风味物质主要为醇类(28.6%)、酯类(16.0%)、酮类(8.9%)、醛类(7.1%)，另外吡嗪类(17.9%)在大曲中占有很高的含量。从单个化合物的含量上看，含量最高的化合物是 2-戊醇，其次是苯乙醇，其他的重要微量挥发性化合物依次是乙酸乙酯、四甲基吡嗪、己醛、十六酸甲酯、3-甲基丁醇、正己醇、三甲基吡嗪、亚油酸甲酯、丁酸甲酯等。醇类可以产生使人愉快的气味，3-甲基丁醇、苯乙醇本身还具有花草和水果的香气；酯类物质一般都具有水果香，乙酸乙酯在大曲中含量较高，可能对曲香形成有较大贡献；吡嗪类物质一般都具有烘焙和坚果香，可能与大曲发酵过程中顶温会超过 50℃，由美拉德反应产生；分析对曲香形成有较大贡献的风味物质，还需要利用 GC-O 法进一步研究^[16-17]。范文来等^[15]曾研究过酱香型白酒生产大曲，由于大曲生产工艺的明显不同，特别是生产工艺的温度和时间不同，浓香型

白酒大曲中检测到的挥发性成分要显著少于酱香型白酒大曲。图 3 为泸州老窖中高温大曲在最佳条件下使用 HS-SPME 检测到的微量挥发性成分的 GC-MS 图。

3 结论

本实验建立了一种快速、简单、样品用量少的测定大曲样品中挥发性成分的顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法，用该法能较好地萃取大曲样品中的醇类、酯类、醛类、酮类、吡嗪等挥发性风味成分。对其中心醇类、酯类和吡嗪类等具有代表性的挥发性成分测定的重复性良好，加标回收率也较高。说明该法可较准确地用于大曲样品中挥发性风味成分的定量分析。为研究大曲风味，提高其质量提供了科学依据，并为浓香型白酒香味成分的来源提供参考依据。

参考文献：

- [1] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [2] 罗惠波, 黄治国, 李浩, 等. 浓香型大曲微生物群落多样性研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009(7): 180-184.
- [3] FAN Wenlai, MICHAEL Q. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese "Yanghe Daqu" liquors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(20): 7931-7938.
- [4] 赵东, 李扬华, 向双全, 等. 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.
- [5] ZOCOLILLO L, AMENDOLA L, CAFARO C, et al. Improved analysis of volatile halogenated hydrocarbons in water by purge-and-trap with gas chromatography and mass spectrometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1077(2): 181-187.
- [6] PROSEN H, ZUPAN L. Solid-phase microextraction[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1999, 18(4): 272-282.
- [7] RISTICVIC S, NIRI V H, VUCKOVIC D, et al. Recent developments in solid-phase microextraction[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 393(3): 781-795.
- [8] 辛广, 张博, 冯帆, 等. 软枣猕猴桃果实香气成分分析[J]. 食品科学, 2009, 30(4): 230-232.
- [9] BOSCH J, RIU M, GUADAYOL J, et al. Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis[J]. Food Chemistry, 2007, 105(1): 428-435.
- [10] 郭方道, 黄兰芳, 周邵云. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法用于白术中挥发性成分的分析[J]. 色谱, 2007(1): 43-47.
- [11] UZIR, MEITAL E, CHENI Z, et al. Authenticity assessment of natural fruit flavour compounds in foods and beverages by auto-HS-SPME stereoselective GC-MS[J]. Flavor and Fragrance Journal, 2009, 25(1): 20-27.
- [12] 宋廷宇, 吴春燕, 侯喜林, 等. 薑菜风味物质的顶空固相微萃取-气质联用分析[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 185-188.
- [13] LUO Tao, FAN Wenlai, XU Yan. Characterization of volatile and semi-volatile compounds in chinese rice wines by headspace solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2008, 114(2): 172-179.
- [14] PETER P, PETRA K, MONIKA M, et al. Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in solid wastes[J]. Journal of Chromatography A, 1997, 774(1/2): 203-211.
- [15] 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.
- [16] 张青, 王锡昌, 刘源. GC-O 法在食品风味分析中的应用[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 284-287.
- [17] BEATA P, WALDEMAR W. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages: a review[J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 449-463.