

静态顶空萃取 GC-MS 联用测定赤霞珠葡萄酒 酿造中挥发性成分

孔程仕,王 振

(青岛科技大学化工学院生物工程与技术系,山东 青岛 266042)

摘 要: 采用静态顶空技术(SHS)对赤霞珠葡萄酒酿造过程中的挥发性成分进行萃取,通过气相色谱-质谱法(GC-MS)对其进行分析。研究了不同因素(样品量、离子强度、平衡温度和平衡时间)对萃取效率的影响。结果表明,共检测到 37 种主要挥发性成分,其中酯类 17 种,醇类 8 种,醛类 6 种,酸类 4 种和酮类 2 种,醇类和酯类分别是种类最多和浓度最高的两类化合物。该方法简单快速,并且不需要有机溶剂,能较好地用于分析检测葡萄酒中的主要挥发性风味物质。

关键词: 静态顶空; 葡萄酒; 气相色谱-质谱; 风味物质

中图分类号: TS262.6; TS261.4; TS261.7; O657; O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2012)09-0112-04

Determination of Volatile Compounds in *Cabernet Sauvignon* Wine by Static Headspace Extraction Coupled with GC-MS

KONG Chengshi and WANG Zhen

(Department of Biotechnology, College of Chemical Engineering, Qingdao University
of Science & Technology, Qingdao, Shandong 266042, China)

Abstract: Volatile composition in brewing process of grape wine was analyzed by static headspace technique (SHS) coupled with gas chromatography-mass spectrometry. The effects of different factors influencing extraction efficiency including sample volume, salt concentration, equilibration temperature and time were investigated. 37 main volatile compounds were determined including 17 esters, 8 alcohols, 6 aldehydes, 4 acidities and 2 ketones, among them, esters and alcohols were the main compounds in types and concentration. The results indicated that SHS combined with GC-MS was simple without the need of organic solvent, which could be used in the determination of main volatile compounds in grape wine in practical wine-making.

Key words: static headspace; grape wine; gas chromatography-mass spectrometry; flavoring compounds

葡萄酒风味物质是葡萄酒质量的重要组成部分,也是葡萄酒香气特征的物质基础。葡萄酒组成非常复杂,含有丰富的挥发性成分。到目前为止,在葡萄酒中已有 1000 多种挥发性化合物被检测出来^[1],包括醇类、酯类、有机酸类、挥发性酚类、硫醇类、萜烯醇类等,它们的含量从 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ $\mu\text{g/L}$ 不等^[2],是葡萄酒香气的主要组成成分。

目前,葡萄酒风味物质的提取方法主要有液液萃取、静态顶空萃取、动态顶空萃取、固相萃取及固相微萃取等^[3-6],这些方法各有利弊。其中,静态顶空萃取是一种较为简单高效的方法,技术重现性好,无需有机溶剂,而且可以避免基体成分对样品分析的影响。

本试验研究分析了静态顶空技术在葡萄酒挥发性成

分测定中的应用,建立了静态顶空与 GC-MS 相结合的测定方法,对赤霞珠葡萄酒不同酿造阶段的挥发性成分进行了定性定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

试验样品: 青岛华东酿酒有限公司提供,按常规工艺进行发酵。J1:原汁;J2:添加果胶酶后的原汁;J3-J5:酒精发酵(J3:发酵前期;J4:发酵中期;J5:发酵结束)。

试剂: 内标为 4-甲基-2-戊醇(99.8%,J&K),NaCl,分析纯 AR,上海埃彼化学试剂有限公司。

仪器: 岛津 GCMS-QP2010 Plus;色谱柱:Stabilwax 30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μm ;Headspace 进样器:AOC-5000

收稿日期:2012-05-15

作者简介:孔程仕(1988-),男,硕士研究生,专业:发酵工程。

自动进样器。

1.2 实验方法

1.2.1 GC-MS 条件

GC 条件:进样口温度 250 °C;柱温采用程序升温,40 °C 保留 2 min,以 5 °C/min 升至 180 °C,再以 15 °C/min 升至 230 °C,保留 5 min;载气:He,恒流 1.6 mL/min;分流比 20:1。

MS 条件:电离方式 EI 源,电子能量 70 eV;离子源温度 250 °C;接口温度 250 °C;质量扫描范围 35~500 m/z。

色谱峰通过岛津公司自带化学工作站检索标准图谱库(NIST08),并结合有关文献进行分析,确定成分。由岛津自带工作站数据处理系统,计算出各化合物的色谱峰面积,由半定量法计算出挥发性成分的相对含量。

其计算方法是:

待量化合物的浓度 = 待量化合物的峰面积 × 内标的浓度 / 内标的峰面积

1.2.2 样品处理

取 5 mL 样品置于顶空瓶中,加入 2.0 g NaCl,压紧瓶盖密封,60 °C 恒温振荡 30 min,自动进样进行 GC-MS 分析。每个样品重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 影响SHS 萃取效率的因素

从动力学和热力学分析可知,影响静态顶空萃取效率的主要因素有样品量、加盐量、平衡温度和平衡时间等。

2.1.1 样品量

样品液体体积会影响顶空瓶内挥发性成分的平衡系数,从而影响顶空瓶内挥发性物质的浓度及检测效果。本实验选取 2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL 共 5 个样品量,分别加入到 10 mL 顶空瓶中,平衡温度 50 °C,平衡时间 30 min,添加 2 g NaCl。检测分析结果见图 1。

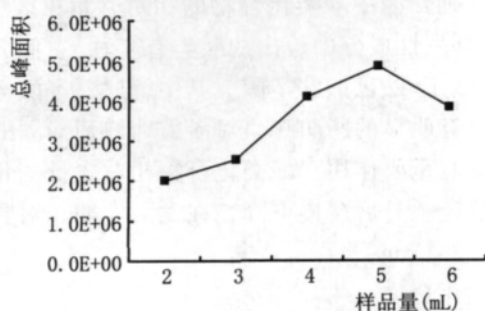


图1 样品量对挥发性成分的萃取效率影响

由图1可以看出,增加样品量可以增强对挥发性成分的萃取效率,在 5 mL 时达到最高。当样品量为 6 mL,

萃取效率有所下降,所以选用 5 mL 作为试验样品量。

2.1.2 盐添加量

在溶液中加入强电解质无机盐 NaCl,溶液的离子强度增加,使有机分析物的非极性相对增强并使其在水溶液中的溶解度下降,萃取量得到增加。NaCl 的加入还会影响基质粘度,降低分析物的扩散速度,产生盐的负效应,所以应该对 NaCl 加入量进行优化。选用 5 mL 样品,平衡温度 50 °C,平衡时间 30 min 作为实验条件,对萃取效率进行优化,结果见图 2。

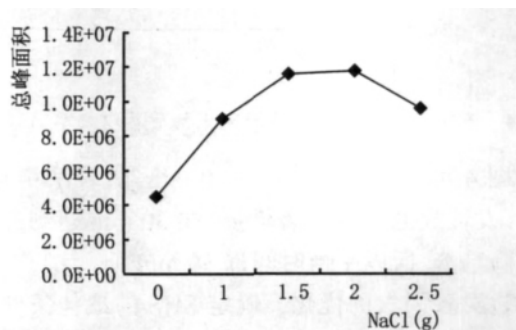


图2 NaCl 添加量对挥发性成分的萃取效率影响

由图2可以看出,顶空瓶内的挥发性物质的浓度随着 NaCl 添加量的增加先上升后下降。盐添加量在 2 g 时,顶空瓶内挥发性成分的浓度最高,所以,选用 2 g 作为最佳的添加量。

2.1.3 平衡温度

有机挥发物在溶液中的分配系数是热力学常数,而温度是直接影响分配系数的重要参数。在 10 mL 顶空瓶中加入 5 mL 样品量和 2.0 g NaCl,分别在 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、80 °C 平衡 30 min,结果见图 3。

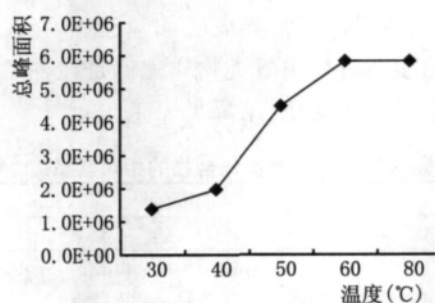


图3 平衡温度对葡萄酒香气风味物质萃取效率的影响

由图3可以看出,从 30~60 °C,随着温度的升高,挥发性成分的萃取效率逐渐增加,升至 80 °C 时有所降低。综合考虑到温度过高可能会引起葡萄酒香气物质发生变化,所以将 60 °C 作为最佳平衡温度。

2.1.4 平衡时间

平衡时间取决于被测香气物质组分从样品基质到气相的扩散速度。当样品达到平衡时,平衡时间的延长会使一些性质不稳定挥发性成分发生热分解、氧化等副

作用^[7]。在实际操作中,搅拌或振荡样品在一定程度上可减少平衡时间。试验选取 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min 共 5 个水平,其他条件不变,结果见图 4。

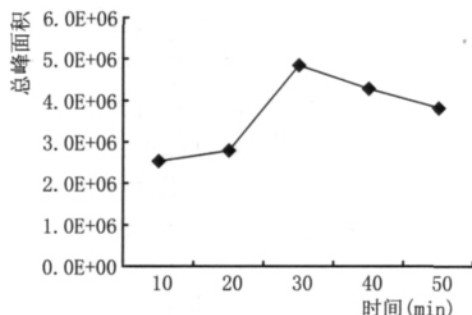


图4 不同平衡时间对葡萄酒风味物质萃取效率的影响

由图4可以看出,从10~30 min,随着平衡时间的增加,挥发性成分浓度显著增加,在30 min达到最高,之后呈下降趋势,所以平衡时间选30 min。

通过对各因素的优化,确定SHS的最佳条件为:在10 mL顶空瓶中加入5 mL酒样,2.0 g NaCl,平衡温度60℃,平衡时间30 min。

2.2 赤霞珠葡萄酒挥发性成分的比较分析

从葡萄酒酿造过程的5个阶段(J1~J5)中共检测到37种主要挥发性风味物质。其中,酯类物质的种类最多,有17种,其次是醇类化合物8种,6种醛类物质,4种酸类物质和2种酮类物质。醇类和酯类化合物是葡萄酒中含量较高的香气成分,它们主要是发酵工程的副产物,是葡萄酒的第2类香气(发酵香)成分。

2.2.1 醇类化合物

高级醇是葡萄酒中重要的挥发性成分,是酒精发酵的副产物,如丙醇、异丁醇、异戊醇和苯乙醇等。在赤霞珠干红葡萄酒的酿造过程中醇类物质无论是在种类上还是含量上都发生了显著变化,结果见表1。

表1 赤霞珠葡萄酒中醇类化合物的相对含量 (mg/L)

化合物名称	不同阶段				
	1	2	3	4	5
丙醇	—	—	1.658	4.426	9.134
异丁醇	0.074	0.085	10.392	22.763	31.118
正丁醇	0.356	0.521	0.059	—	—
异戊醇	0.072	0.221	75.085	130.481	140.347
正己醇	0.142	0.226	0.602	0.365	0.320
2,3-丁二醇	—	—	1.830	0.537	—
苯乙醇	0.032	0.075	1.083	10.113	15.106
丙三醇	—	0.443	0.156	0.065	—
总计	0.676	1.571	90.865	168.751	196.025

由表1可知,随着发酵的进行,醇类物质的相对含量变化呈明显的上升趋势,由原汁中的0.676 mg/L增加到发酵结束时的96.025 mg/L,尤其是异丁醇、异戊醇和苯

乙醇的变化非常明显,其中异戊醇的相对含量最高,在发酵结束时,达到140.347 mg/L。据报道,葡萄酒中的醇类化合物(除乙醇外)浓度低于300 mg/L时,会使葡萄酒宜人的复杂风味更加突出^[8]。

2.2.2 酯类化合物

赤霞珠葡萄酒中酯类化合物的相对含量分析结果见表2。从表2可知,挥发性成分的酯类物质种类最多,共检测到17种,酯类化合物在整个酿造过程中的相对含量呈上升趋势。酯类也主要是在酒精发酵过程中形成,由原汁的8种上升到酒精发酵过程的17种,乙酯类物质是葡萄酒中重要的酯类物质。其中,乙酸乙酯的含量最高(85.260 mg/L),其次是乙酸异戊酯和癸酸乙酯。酯类化合物赋予葡萄酒类似水果的风味,而且不同的酯类物质之间具有风味协同作用,可以协同影响葡萄酒的风味^[9]。

表2 赤霞珠葡萄酒中酯类化合物的相对含量 (mg/L)

化合物名称	不同阶段				
	1	2	3	4	5
乙酸甲酯	—	—	0.268	0.458	1.205
乙酸乙酯	0.937	2.810	26.246	53.320	85.260
丙酸乙酯	0.329	0.373	0.209	0.554	0.758
异丁酸乙酯	—	—	0.112	0.372	1.835
乙酸丙酯	—	—	0.162	0.201	0.228
乙酸异丁酯	—	—	0.763	1.394	2.070
丁酸乙酯	0.090	1.217	3.555	4.957	8.557
戊酸乙酯	—	—	0.096	0.135	0.169
乙酸丁酯	0.291	0.246	0.253	0.228	0.254
乙酸异戊酯	0.115	0.184	3.735	10.080	16.987
己酸乙酯	0.126	0.071	1.111	2.271	2.802
乙酸己酯	—	—	0.203	0.245	0.267
2-羟基丙酸乙酯	—	—	1.750	2.201	3.043
辛酸乙酯	0.210	0.818	1.906	2.762	3.044
癸酸乙酯	0.201	0.333	1.677	3.854	5.717
丁二酸二乙酯	—	—	0.016	0.085	0.107
十一酸乙酯	—	0.170	0.582	0.964	1.435
总计	2.300	6.223	42.644	84.082	133.738

2.2.3 酸类化合物

赤霞珠葡萄酒中酸类化合物的相对含量见表3。从表3可知,挥发性成分中检出的酸类有4种,它们分别是乙酸、3-羟基丁酸、己酸和辛酸。其中,己酸、辛酸等低级脂肪酸都具有明显的脂肪味,对赤霞珠红葡萄酒的整体风味结构具有重要作用。酸类化合物相对含量变化趋势表现为先稳定上升后缓慢下降,在发酵中期相对含量最高,达到14.731 mg/L。

2.2.4 醛酮化合物

在酿造阶段共检测出6种醛类物质和2种酮类物质,其中含量最高的分别是乙醛(5.301 mg/L)和2,3-丁二酮(5.562 mg/L)。醛类物质的种类由原汁(J1和J2)的6种下降为发酵结束时的2种。葡萄酒中含有丁二酮,当含

表3 赤霞珠葡萄酒中酸类化合物的相对含量 (mg/L)

化合物名称	不同阶段				
	1	2	3	4	5
乙酸	2.887	3.025	5.164	2.873	1.996
3-羟基丁酸	0.152	0.304	0.507	—	—
己酸	0.557	0.768	1.257	1.802	1.015
辛酸	5.142	5.558	7.163	10.056	7.475
总计	8.738	9.655	14.091	14.731	10.486

量在 2~4 mg/L 时能增加香气强度,尤其当与微量 2,3-戊二酮共存时,可使葡萄酒的香气更加浓郁芬芳,但丁二酮的含量超过这个范围则会导致香气劣化^[8]。

表4 赤霞珠葡萄酒中醛酮类化合物的相对含量 (mg/L)

化合物名称	不同阶段				
	1	2	3	4	5
乙醛	0.508	0.728	3.299	5.293	5.301
丁醛	0.066	0.055	0.056	0.098	0.117
异戊醛	0.036	0.040	0.046	0.053	—
2,3-丁二酮	—	—	1.633	2.225	3.562
2,3-戊二酮	—	—	0.531	1.124	1.049
正己醛	1.049	0.299	0.085	—	—
2-烯基己醛	0.076	0.463	—	—	—
壬醛	0.189	0.135	—	—	—
总计	1.924	1.720	5.652	8.792	10.029

2.3 酿造工艺对赤霞珠葡萄酒香气挥发性成分变化的影响

2.3.1 浸渍

赤霞珠葡萄原料在经过除梗破碎后要进行一次一段时间的浸渍,其主要目的是为了将葡萄皮中的色素物质充分溶解出来,赋予酒良好的色泽。在浸渍过程中会加入果胶酶以增强色素物质的溶出。通过对赤霞珠原汁与添加果胶酶的原汁两个酿造阶段样品的比较分析后的得出:添加果胶酶的酒样中,酯类、酸类、醇类物质的相对含量均有所上升,这是否是对香气成分的释放也有一定的促进作用,还有待于进一步研究。

2.3.2 酒精发酵

酒精发酵是一种较为复杂的生物化学现象,有许多连续反应和不少的中间产物^[10]。试验结果表明,在赤霞珠干红葡萄酒的酿造过程中,醇类、酯类、醛酮类化合物的相对含量均呈上升趋势。

醇类化合物相对含量的增加主要是葡萄酒酵母酒精发酵及其代谢产物作用的结果^[11]。酯化作用是造成葡萄酒中酯类化合物种类和相对含量均有增加的主要原因,同时它也是形成葡萄酒浓郁香气的重要因素。酒精发酵过程中中酸类化合物的相对含量呈先上升后缓慢下降趋势,其原因可能主要是由于在葡萄酒酿造过程中微生物

的代谢产物发生了氧化、还原、酯化等复杂的化学反应所致^[12]。

3 结论

采用 SHS-GC-MS 法分析测定葡萄酒酿造过程中挥发性风味物质,该方法操作简便易行,省时且无污染,是一种适合葡萄酒主要挥发性成分检测的研究方法。通过该方法从赤霞珠酿造过程中共检测出 37 种挥发性成分,其中醇类和酯类物质是主要的风味物质。与原汁相比,赤霞珠葡萄酒发酵结束后,醇、酯、酸类化合物的相对含量均有所增加。此该分析结果对赤霞珠干红葡萄酒酿造阶段的挥发性物质组分确定和对葡萄酒感官质量评价具有重要的意义。

参考文献:

- [1] M.Jose'Gomez-Mguez.Volatile components of Zalema white wines[J].Food Chemistry,2007,100:1464-1473.
- [2] Rapp,A.,Mendery,H.Wine aroma[J].Experientia,1986,42:873-884.
- [3] Castro,R.,Natera,R.Benitez,P,Barroso,C,G.Comparative analysis of volatile compounds of 'fino' sherry wine by rotatory and continuous liquid-liquid extraction and solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography-mass spectrometry[J].Analytical Chimica Acta,2004,513:141-150.
- [4] Mestres.M.,Busto.O.,Guasch,J.Chromatographic analysis of volatile sulphur compounds in wines using the static headspace technique with flame photometric detection[J].Journal of Chromatography A,1997,773:261-269.
- [5] 魏云慧,齐刚.动态顶空气相色谱质谱法测定葡萄酒中微量成分[J].酿酒,2004,32(3):90-91.
- [6] Ortega-Heras M, González-SanJosé, M.L, Beltrán, S.Aroma composition of wine studied by different extraction methods[J].Analytical Chimica Acta,2002,458:85-93.
- [7] NEU HJ, ZIEMER W, MERZ W.A novel derivatization procedure for the determination of trace8 of polar organic compounds in water using static headspace gas chromatography[J].J Anal Chem,1991,340(2):65-70.
- [8] Selli S.,Cabaroğlu T.,et al.Volatile composition of red wine from cv.Kalecik Karast grown in central Anatolia[J].Food Chemistry,2004,85(2):207-213.
- [9] Clarke,R.J.,Bakker J.,InterScience W.,Wine flavour chemistry [M].Oxford:Blackwell Pub,2004.
- [10] 李华.葡萄酒工艺学[M].西安:陕西人民出版社,1999.
- [11] Rapp A.Aroma compounds of wine[J].Food Research International.1989,1125:23-227.
- [12] 耐克.食品风味化学[M].北京:中国轻工业出版社,1996.