

葡萄酒香气成分固相微萃取条件的优化

陶永胜,李 华,王 华

(西北农林科技大学 葡萄酒学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了得到葡萄酒香气成分固相微萃取的萃取时间和电解质质量浓度的最优条件,在 4 个萃取时间(20,30,40,50 min)和 4 个 NaCl 质量浓度(0,1.0,2.0,3.0 g/L)条件下,用固相微萃取技术(SPME)萃取模拟酒中 9 种香气成分,然后进行 GC-MS 分析。结果表明,在萃取效果上,萃取时间与电解质质量浓度之间无交互作用;在 30~40 min 萃取时间和 2 g/L NaCl 质量浓度条件下,采用 SPME 得到的同样含量香气成分的质谱信号(峰面积)最大,并且此条件下 9 种香气成分浓度与质谱信号之间回归方程相关系数 r 为 0.964~0.995。由此得出葡萄酒香气成分采用 SPME 萃取的最佳萃取时间为 30~40 min,NaCl 最佳质量浓度是 2 g/L。

[关键词] 葡萄酒;香气;固相微萃取;萃取条件优化

[中图分类号] O659.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)12-0181-05

Optimization of wine aroma analysis by solid-phase microextraction

TAO Yong-sheng, LI Hua, WANG Hua

(College of Enology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to get the optimal extracting time and the best salt concentration of solid-phase micro-extraction (SPME) for wine aroma compounds extraction, 4 extraction times (20, 30, 40, 50 min) and 4 salt concentrations were compared in analysis of 9 aroma compounds in model wine by SPME-GC-MS. From MS signals (peak area), there was no interaction between extraction time and salt concentration. In the condition of 30—40 min and 2 g/L NaCl, MS signal of each compound was highest and the correlation coefficient (r) of regression equation between concentration and peak area for 9 compounds was from 0.964 to 0.995. Therefore, 30~40 min and 2 g/L NaCl were chosen as the best extracting time and the best salt concentration of solid-phase micro-extraction (SPME) for wine volatiles extraction.

Key words: wine; aroma; solid phase micro-extraction; optimization

葡萄酒的质量、风格和特色与其所含的化学成分紧密相关,葡萄酒香气是葡萄酒感官质量的重要组成部分,是其所含香气成分的综合表现。因此,利用气相色谱分析葡萄酒中的香气成分,是葡萄酒分类、质量控制以及了解葡萄酒香气特点的重要手段^[1-2]。

最常用的萃取葡萄酒中挥发性成分的方法,是利用低沸点的溶剂进行连续的液-液萃取,然后对

萃取液进行干燥和若干步的浓缩,以达到气相色谱分析的要求。这一方法的缺点是在溶剂萃取和浓缩步骤中,香气物质会发生变化,可能产生一些并非原始酒样特征香气的气味物质。这样,注入气相色谱的有机溶剂萃取液就会产生不同于原始酒样感官特征的结果。在这种情况下,感官分析结果与仪器分析结果没有相关性也就不足为奇了^[3-6]。

固相微萃取(Solid phase Microextraction,

* [收稿日期] 2006-11-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571281)

[作者简介] 陶永胜(1977—),男,江苏句容人,讲师,在读博士,主要从事葡萄酒酿造与质量控制研究。

[通讯作者] 李 华(1959—),男,重庆梁平人,教授,博士生导师,主要从事葡萄与葡萄酒学研究。

SPME)是 20 世纪 90 年代以来发展起来的一种样品处理方法,它无需有机溶剂,分析样品少,操作简单、快速,费用低,集采样、萃取、浓缩、GC 进样于一体,因此能够减少被分析香气成分的损失和变化,得到完整、真实的分析结果^[2,7-8]。近年来,SPME 用于葡萄酒香气成分分析的报道增多,但许多关于萃取操作的条件有很大出入,尤其是萃取时间和电解质质量浓度条件^[9-11]。不同的萃取时间和电解质质量浓度对葡萄酒香气成分的萃取影响较大,最终将影响实验结果,因此很有必要对萃取条件进行优化研究。

本研究针对固相萃取过程中影响萃取效果的萃取时间和电解质质量浓度两个条件进行了研究,每个条件各设 4 个比较梯度,通过对模拟酒中 9 种代表性香气成分的 SPME-GC-MS 分析,探索得到最优葡萄酒香气成分的 SPME 萃取时间和电解质质量浓度条件。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

酒石酸、无水乙醇为分析纯化学试剂,由西安化学试剂厂生产;纯水,由 Millipore 纯水制备仪制备;3-辛醇、丁酸乙酯、乙酸异戊酯、异戊醇、辛酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸苯乙酯、辛酸和癸酸 9 种香气标准物质为色谱纯化学标样,美国 Sigma 公司产品。

香气成分固相微萃取条件的优化,采用 9 种香气成分的模拟酒溶液萃取分析试验进行。模拟酒溶液为含酒石酸 5 g/L, pH 3.2, 酒精度 11%(V/V)的水溶液,含有 9 种香气标准物质:丁酸乙酯 0.639 00 mg/L、乙酸异戊酯 0.676 25 mg/L、异戊醇 0.227 50 mg/L、3-辛醇 1.00 mg/L、辛酸乙酯 0.548 75 mg/L、癸酸乙酯 0.612 50 mg/L、乙酸苯乙酯 0.688 75 mg/L、辛酸 0.613 75 mg/L、癸酸 0.623 75 mg/L。

1.2 仪器设备

固相微萃取装置 SPME 手动进样手柄及 PA (85 μm) 萃取头购于北京康林科技有限责任公司(美国 Supelco. Co 制造)。

气相色谱质谱联用仪 Trace MS 美国 Finigon 质谱公司制造。

1.3 固相微萃取方法

在 15 mL 装有磁力搅拌子的顶空瓶中分别加入 0, 1.0, 2.0 和 3.0 g/L NaCl 及 10 mL 模拟酒溶液, 40 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 10 min, 插入 PA 纤维头, 40 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 20, 30, 40 和 50 min, 然后立即将萃取头在 GC 进样

口解吸 2 min, 用于 GC-MS 分析。每个条件的萃取操作重复 2 次。试验按照两因素试验设计。

1.4 色谱条件

气相色谱条件为:分流方式不分流, 色谱柱为 DB-Wax(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)。程序升温为:40 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min, 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速度升至 120 $^{\circ}\text{C}$, 再以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速度升至 230 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min。载气为 He 气, 流量 1 mL/min, 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件为:EI⁺ 电离源, 电子能量 70 eV, 灯丝流量 0.20 mA。检测器电压 350 V, 扫描范围 33~450 amu, 离子源温度 200 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 模拟酒中 9 种香气成分的峰面积

香气成分萃取条件的优化试验, 用模拟酒溶液的萃取分析来实现, 模拟酒中 9 种香气成分 GC-MS 分析的总离子流图(TIC)见图 1, 香气成分的峰面积见表 1。对香气成分的峰面积数据进行两因素方差分析发现, 萃取时间对醇、酯和酸的萃取影响均达显著水平; 加入 NaCl 对于醇和酯的萃取影响显著, 对酸的萃取影响不显著; 添加 NaCl 与萃取时间对香气成分的萃取效果没有交互作用。

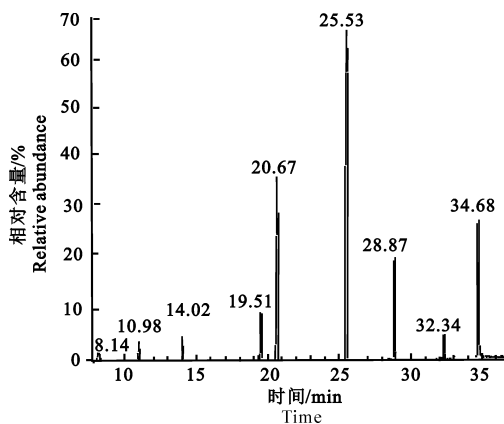


图 1 模拟酒中 9 种香气成分的总离子流图

Fig. 1 TIC of 9 aroma compounds in synthetic solution

2.2 萃取时间对模拟酒香气成分萃取效果的影响

固相微萃取是基于挥发性成分在液体顶空与萃取薄膜上平衡的原理进行定性、定量的仪器分析技术。理论上讲, 挥发性成分在两相之间吸附达到平衡后, 多余的萃取时间对萃取效果已没有帮助。挥发性成分在两相间达到平衡时, GC-MS 检测的香气成分峰面积是一常数。过长的萃取时间不但对萃取效果没有作用, 反而会增加组分发生化学反应的可

能,对固相微萃取薄膜的使用寿命也有影响。

由于萃取时间和添加 NaCl 对供试香气化合物的萃取没有交互作用,所以对表 1 中数据进行归一化处理后,对不同香气成分取每一萃取时间内峰面积转换值的平均值作柱形图(图 2)可见,供试香气化合物基本在 30~40 min 的萃取时间内已达到峰面积恒定值,该结果与汪立平等^[7]的结果相近。结合图 2 和表 1 可以认为,在 30~40 min 时,香气成分在葡萄酒顶空与固相萃取薄膜间已达到平衡,因此选择香气成分的萃取时间为 30~40 min。

表 1 模拟酒中 9 种香气成分的峰面积

Table 1 Peak area of 9 aroma compounds in synthetic solution

化合物 Compound	0 g/L NaCl				1.0 g/L NaCl			
	20 min	30 min	40 min	50 min	20 min	30 min	40 min	50 min
丁酸乙酯 Ethyl butyrate	9.32	12.06	11.56	12.07	14.03	15.64	17.41	17.25
乙酸异戊酯 Isoamyl acetate	20.11	25.67	25.71	25.39	29.34	32.46	33.02	33.06
异戊醇 Isoamyl alcohol	16.95	20.04	22.39	26.59	30.63	27.64	30.98	31.26
3-辛醇 3-octanol	29.21	29.64	30.94	31.05	35.45	40.18	43.53	44.01
辛酸乙酯 Ethyl octanoate	185.36	200.91	202.25	203.26	203.56	236.12	237.02	235.61
癸酸乙酯 Ethyl decanoate	549.06	543.31	546.06	550.56	555.69	612.37	613.54	610.92
乙酸苯乙酯 Phenyl ethyl acetate	56.32	85.29	86.04	86.91	81.03	99.36	100.56	98.67
辛酸 Octanoic acid	18.64	23.22	24.38	24.71	19.65	24.38	24.53	24.39
癸酸 Decanoic acid	96.28	110.33	110.56	112.11	98.88	111.32	108.01	109.43

化合物 Compound	3.0 g/L NaCl				2.0 g/L NaCl			
	20 min	30 min	40 min	50 min	20 min	30 min	40 min	50 min
丁酸乙酯 Ethyl butyrate	16.13	18.34	19.69	19.18	16.32	18.19	18.67	18.31
乙酸异戊酯 Isoamyl acetate	30.11	33.97	35.93	36.51	30.87	35.62	34.03	36.22
异戊醇 Isoamyl alcohol	30.20	33.10	33.23	33.41	27.31	30.26	31.02	29.47
3-辛醇 3-octanol	40.92	45.97	46.66	47.58	39.89	46.21	46.56	46.39
辛酸乙酯 Ethyl octanoate	210.34	249.44	246.49	246.03	220.98	236.48	240.31	240.16
癸酸乙酯 Ethyl decanoate	650.32	694.30	695.36	694.93	580.21	623.24	625.83	625.38
乙酸苯乙酯 Phenyl ethyl acetate	90.76	107.45	107.89	106.57	93.65	105.31	104.65	104.92
辛酸 Octanoic acid	18.89	23.78	24.60	25.67	19.69	24.98	23.75	26.67
癸酸 Decanoic acid	95.97	107.03	110.74	112.26	100.09	113.06	112.01	112.76

注:数据为实际峰面积/10⁶,所有数据均为 2 次重复的平均值。

Note: Data in the table are the peak area/10⁶,and data are the average of duplicates.

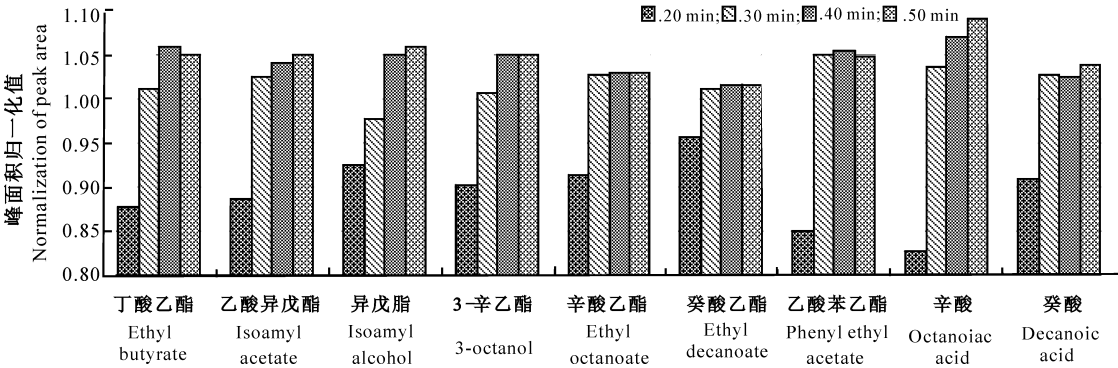


图 2 不同萃取时间萃取的香气化合物峰面积的归一化值

Fig. 2 Normalization of peak area of four extraction time

2.3 添加 NaCl 对模拟酒香气成分萃取效果的影响

添加电解质是为了降低香气成分在溶液中的溶解度,促进其挥发进入顶空。本试验设计了 0,1.0,

2.0 和 3.0 g/L 4 种 NaCl 质量浓度梯度进行香气成分的萃取效果比较。参照 2.2 分析结果,对萃取 40 min 时不同 NaCl 质量浓度的萃取数据进行比较。将表 1 中该部分数据进行归一化处理作柱形图,结

果如图 3 所示。由图 3 可见,除了辛酸和癸酸外, NaCl 质量浓度对香气成分的萃取效果有明显影响。2 g/L NaCl 处理对模拟酒溶液香气成分的萃取效

果优于 1.0 和 3.0 g/L 处理,因此选择 2 g/L NaCl 作为葡萄酒香气成分萃取时的 NaCl 添加质量浓度。

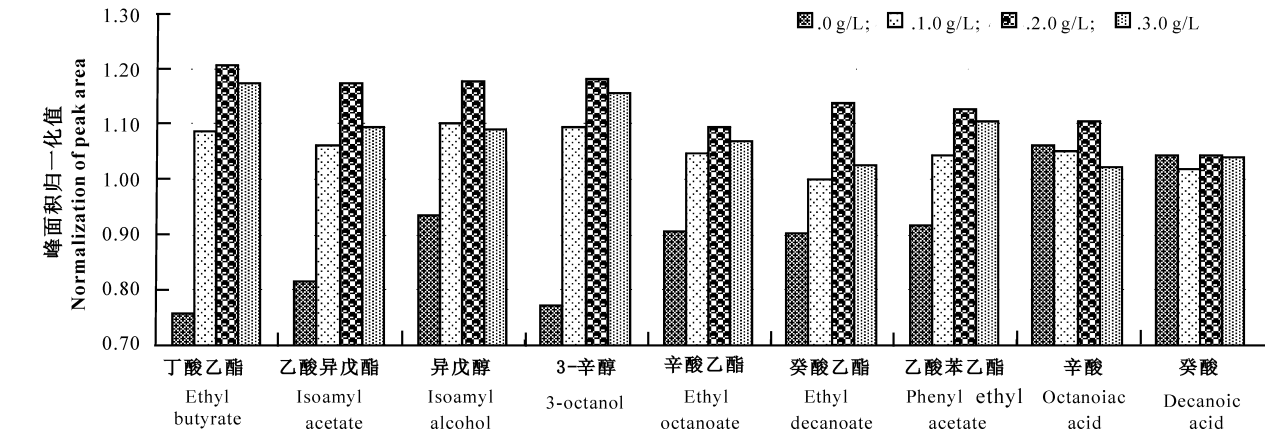


图 3 40 min 萃取时间内不同 NaCl 质量浓度萃取的香气化合物峰面积归一化值

Fig. 3 Normalization of peak area of four NaCl concentrations in 40 min extraction

2.4 固相微萃取优化条件的有效性验证

按以上试验数据分析的固相微萃取优化条件进行模拟酒中 9 种葡萄酒香气成分的分析测定,通过变化这 9 种香气成分的浓度,测定该方法的线性关系。模拟酒中 9 种香气成分的质量浓度按照其在葡萄酒中的一般质量浓度范围设计。香气成分质量浓度取 4 个梯度,用不含香气成分的模拟酒稀释含有

9 种香气成分的模拟酒样品,稀释度为 4,2 和 4/3 倍,因此质量浓度分别为原来的 1/4,1/2 和 3/4。经 SPME-GC-MS 萃取分析之后,建立了检测峰面积与实际浓度之间的线性回归方程(表 2),回归方程相关系数 r 为 0.964~0.995,说明该法能较为准确地进行葡萄酒中香气成分的定量分析。

表 2 模拟酒中 9 种葡萄酒香气成分线性范围的 SPME-GC-MS 测定

Table 2 Linear range of nine aroma components in synthetic wine detected by SPME-GC-MS

化合物 Compound	质量浓度/(mg · L ⁻¹) Concentration range	r	回归方程 Regression equation
丁酸乙酯 Ethyl butyrate	0.159 8~0.639 0	0.982	$Y = -0.059\ 28 + 0.039\ 58X$
乙酸异戊酯 Isoamyl acetate	0.169 1~0.676 3	0.983	$Y = -0.031\ 02 + 0.020\ 2X$
异戊醇 Isoamyl alcohol	0.056 9~0.227 5	0.964	$Y = 0.000\ 83 + 0.006\ 63X$
3-辛醇 3-octanol	0.250 0~1.000 0	0.995	$Y = 0.000\ 04 + 0.021\ 57X$
辛酸乙酯 Ethyl octanoate	0.137 2~0.548 8	0.984	$Y = -0.032\ 69 + 0.002\ 38X$
癸酸乙酯 Ethyl decanoate	0.153 1~0.612 5	0.994	$Y = 0.012\ 53 + 0.000\ 81X$
乙酸苯乙酯 Phenyl ethyl acetate	0.172 2~0.688 8	0.993	$Y = -0.013\ 85 + 0.006\ 56X$
辛酸 Octanoic acid	0.153 4~0.613 8	0.980	$Y = -0.003\ 71 + 0.024\ 67X$
癸酸 Decanoic acid	0.155 9~0.623 8	0.991	$Y = -0.015\ 54 + 0.005\ 9X$

注: X 为香气成分峰面积值/ 10^6 ; Y 为香气成分在模拟酒中的质量浓度(mg/L)。
Note: X is (peak area)/ 10^6 ; Y is the concentration of aroma compounds in synthetic wine(mg/L).

3 讨 论

Tat 等^[8]在研究不同萃取头在萃取葡萄酒香气成分的效果中提到,固相微萃取装置的萃取效果受多种因素影响,如微萃取过程中的搅拌过程、电解质、温度、萃取时间、样品体积、分析物质的化学特性及乙醇浓度等。本研究对固相微萃取技术萃取葡萄酒中香气成分的萃取时间和电解质质量浓度进行了

优化,因此选择葡萄酒中代表醇、酯和酸的 9 种典型香气成分为萃取分析对象,模拟葡萄酒溶液为香气成分溶解基质,目的是尽量减小分析物质化学特性、溶液和乙醇浓度的影响。汪立平等^[7]曾对苹果酒香气成分的固相微萃取条件进行了优化,研究分析了萃取温度、萃取时间以及 NaCl 质量浓度对萃取效果的影响,但并未进行 3 因素的交互作用分析,并且其研究结果在葡萄酒香气成分的分析上效果不是最

好。在其研究基础上,本研究确定 40 ℃ 为萃取温度,因为温度过高会引起某些化合物发生反应,太低又不利于香气成分的挥发。本试验设计了 4 个 NaCl 质量浓度梯度模拟酒溶液和 4 个不同萃取时间,研究其对 9 种香气成分的萃取效果,结果表明,萃取时间与 NaCl 质量浓度对 9 种香气成分的萃取效果没有交互作用,最佳萃取时间为 30~40 min,并认为此时香气成分在葡萄酒顶空和固相萃取薄膜之间已建立了平衡,更长时间的萃取不但不会增加萃取效果,还有增加香气成分发生化学变化的可能,汪立平等^[7]在苹果酒香气成分的研究中确定萃取时间为 35 min。本研究中,NaCl 质量浓度对 9 种香气成分中醇和酯的萃取效果影响显著,对酸影响不明显,综合比较分析认为,2.0 g/L NaCl 对香气成分萃取效果最好。

确定了最佳固相微萃取条件后,需要对方法的有效性进行分析,Ortega 等^[12]在建立二氯甲烷液-液萃取快速分析葡萄酒香气成分的方法时,对优化的方法进行了典型香气成分分析结果的线性范围研究。本研究在已知香气成分质量浓度的情况下,对优化的萃取方法进行了 9 种香气成分萃取结果的线性分析,结果表明,9 种香气成分检测峰面积与实际质量浓度之间线性回归效果良好,相关系数 r 均在 0.96 以上,说明在葡萄酒香气成分质量浓度范围内,该方法能够较为准确地进行定量分析。

葡萄酒中的香气成分复杂多样,化学特性各异,很少有哪种方法能够同时满足所有香气成分最优萃取的要求,所以本研究以具代表性的 9 种香气成分为研究对象,进行了葡萄酒香气成分的萃取方法优化试验,研究结果认为,30~40 min 和 2.0 g/L NaCl 是葡萄酒香气成分 SPME 萃取分析的最佳萃

取时间和 NaCl 质量浓度。

[参考文献]

- [1] 李 华. 葡萄酒品尝学[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 29-65.
- [2] 李 华, 陶永胜, 康文怀, 等. 葡萄酒香气的气相色谱分析研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 99-104.
- [3] Moio L, Chambellant E, Lesschaevae I. Production of representative wine extracts for chemical and olfactory analysis[J]. Itat J Food Sci, 1995(3): 265-278.
- [4] 李 华, 胡博然, 杨新元, 等. 蛇龙珠干红葡萄酒香气成分的 GC-MS 分析[J]. 分析测试学报, 2004, 23(1): 85-87.
- [5] 李 华, 胡博然, 张予林. 贺兰山东麓地区霞多丽干白葡萄酒香气成分的 GC/MS 分析[J]. 中国食品学报, 2004, 4(3): 72-75.
- [6] 李 华, 王 华, 刘拉平, 等. 爱格丽白葡萄酒香气成分的 GC/MS 分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(6): 1250-1254.
- [7] 汪立平, 徐 岩, 赵光鳌, 等. 顶空固相微萃取快速测定苹果酒中的香味物质[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(1): 1-6.
- [8] Tat L, Comuzzo P, Stolfo I, et al. Optimization of wine head-space analysis by solid-phase micro-extraction capillary gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection[J]. Food Chemistry, 2005, 93: 361-369.
- [9] Bonino M, Schellino R, Rizzi C, et al. Aroma compounds of an Italian wine (Ruche') by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS[J]. Food Chemistry, 2003, 80: 125-133.
- [10] 赵新节, 束怀瑞, 刘杨名, 等. 固相微萃取-气质色谱法测定玫瑰香葡萄酒中的香气成分[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2005(6): 4-6.
- [11] 于 静, 李景明, 吴继红, 等. 顶空固相微萃取法 (SPME) 在红葡萄酒香气成分测定中的应用研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2006(3): 4-9.
- [12] Ortega C, Lopez R, Cacho J, et al. Fast analysis of important wine volatile compounds development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionization detection analysis of dichloromethane micro-extracts[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 923: 205-214.