

HS-SPME-GC-MS 方法检测宫内伊予柑主要香气组分的研究

陈建新, 王丽霞*

(1. 浙江省天目山自然保护区管理局, 浙江临安 311300; 2. 浙江林学院, 浙江临安 311300)

摘要 以宫内伊予柑果实为材料, 通过正交实验确定 HS-SPME 的最佳条件为: NaCl 浓度 25%, 萃取温度 40℃, 萃取时间 40 min, 解吸时间 3 min; 然后通过 GC-MS 检测, 共鉴定出芳香组分 31 种, 其中醇类 10 种、烯炔类 12 种、酮类 4 种、酯类 2 种、醛类 2 种和酸类 1 种, 且以醇类与烯类物质居多。

关键词 HS-SPME-GC-MS; 宫内伊予柑; 香气组分

中图分类号 O658.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)33-10833-02

1 材料与方 法

1.1 实验材料 宫内伊予柑于 12 月 1 日左右采于浙江省丽水市实验林场。近熟的宫内伊予柑经挑选、清洗、榨汁后于 -18℃ 冷冻柜中冻藏待用。

1.2 仪器与设备 果汁搅拌机: 北京普析通用仪器有限公司; DHG 9070A 型电热恒温鼓风干燥箱: 上海一恒科技股份有限公司; 79-1 型磁力加热搅拌器: 常州国华电器有限公司; TD 型电子天平: 余姚市金诺天平仪器有限公司; SUV-2120 型紫外/可见分光光度计: 韩国新科公司; SPME 手动进样手柄: 美国 Supelco; DVB/CA/PDMS(2 cm, 50/30 μm) 纤维头: 上海安谱科学仪器有限公司; 15 ml 带有 PTFE 硅橡胶瓶垫及搅拌子的透明样品瓶: 上海安谱科学仪器有限公司; 气相色谱质谱联用仪: Trace MS DSQ 美国 Finnigan 质谱公司; Clarus 500 气相色谱仪: 美国 PerkinElmer 公司。

1.3 实验内容 SPME 最佳萃取条件的确定: 通过单因素实验和正交实验, 确定 SPME 最佳萃取条件; 宫内伊予柑果汁主要芳香组分的测定: 采用 HS-SPME-GC-MS 检测方法进行分析, 确定宫内伊予柑果汁中主要的芳香组分。

1.4 测定方法 香气物质的测定采用 HS-SPME-GC-MS 检测方法进行分析:

(1) 萃取头的老化。将固相微萃取装置的萃取头(选用 PDMS/DVB/CAR) 在气相色谱的进样口老化, 老化温度为 250℃, 老化时间 2 h。

(2) SPME 顶空萃取。取 1 ml 果汁于萃取瓶中, 25℃ 平衡 10 min, 将固相微萃取器的萃取头通过瓶盖的聚四氟乙烯隔垫插入样品萃取瓶的顶空, 推出吸附头使其暴露于萃取瓶中, 于 45℃ 下吸附 45 min, 注意不要使萃取头碰到果汁, 以免污染萃取头。当样品萃取完成后, 缩回纤维头, 迅速将针管插入气相色谱仪的进样口, 推出纤维头热解析 8 min, 同时启动气相色谱仪采集数据。

(3) 气相色谱和质谱条件。气相色谱(GC)条件: 杂柑的挥发成分通过纤维头萃取后转移到气相色谱仪。PerkinElmer Clarus 500 气相色谱仪配备 Total Chrom Ver 6.3.0 色谱工作站。分析工作使用 PE-5 毛细色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 固定相为 5% 联苯与 95% 二甲基硅氧烷, 为非极性毛细管柱。进样口温度保持 260℃, 采用不分流进样。初始炉温 60℃, 保持 2 min, 然后以 5℃/min 升到 170℃, 保持 2 min,

再以 5℃/min 升到 240℃, 保持 2 min。载气为高纯氮气(99.999%), 柱前压为 68.95 kPa, 在 100℃ 下流量为 0.67 ml/min。以 FID 检测器检测, 温度设为 280℃, 氢气流量为 45 ml/min, 空气流量为 450 ml/min。

质谱(MS)条件: 质谱接口温度 260℃, 离子源温度 200℃, 电离方式 E1, 离子能量 70 eV, 灯丝电流为 100 μA, 电子倍增电压为 1400 V, 扫描质量范围为 33~450 amu。

(4) 定性、定量方法。定性: 利用 GC-MS 进行定性, 通过计算机检索与 NIST98 质谱库提供的标准质谱图对照, 确定鉴定结果。定量: 数据处理采用 BF2002 色谱工作站软件。根据色谱图保留峰计算出各种香气成分的相对含量。

(5) 操作方法。取适量果汁(1~2 ml) 连同一粒搅拌子放于 15 ml 透明样品瓶中, 将烘箱调至所需温度, 待温度稳定后, 将样品瓶及磁力加热搅拌器放于烘箱, 在一定转速下搅拌平衡 10 min, 然后将 SPME 针管穿过样品瓶的硅橡胶瓶垫, 伸出纤维头, 顶空萃取所需时间, 待气相色谱仪处于准备状态后, 将 SPME 纤维头迅速插入进样口, 解析一定时间。SPME 纤维头在下次萃取前在进样口 260℃ 下洗脱 10 min 后即可重复使用。

2 结果与分析

2.1 纤维头的确定 萃取头是 SPME 的核心部分, SPME 纤维的选择性提供了将微量的非极性化合物从极性基质中有效分离的基础。Yang 等^[2-3] 研究了 31 种常见风味化合物从水溶液到 PDMS 和 PA 的吸附行为, 结果显示 SPME 的选择性非常明显。因此, SPME 的涂层种类选择是关系到杂柑果汁中挥发性化合物检测的关键因素。涂层对待测物亲合力的大小遵循“相似相溶原理”, 一般分析极性化合物宜选取极性强的涂层材料, 非极性化合物宜选取非极性涂层材料。常用的 DVB 纤维头适用于挥发性成分的分析, CAR 纤维头对小分子挥发物很灵敏, 而 PDMS 纤维头对非极性挥发性化合物灵敏。Carla 等^[4] 用 PDMS、PDMS/DVB、CA/PDMS、DVB/CA/PDMS 萃取桔汁中的挥发性成分, 结果表明 DVB/CA/PDMS 萃取的物质种类最多, 效果最好。根据 Sali 等^[5] 报道, 桔子属中的香气成分包含醇、醛、酸、酯、酮等极性和非极性的化合物。因此, 实验确定采用 DVB/CA/PDMS(2 cm, 50/30 μm) 纤维头。

2.2 单因素实验

2.2.1 吸附时间 由于萃取是一个动力学过程, 包括待测物在样品基质中的对流迁移, 在涂层中的吸附、脱附和扩散, 萃取平衡所需的时间即由待分析物的扩散速度来决定。在 40℃ 条件下在装有 1 g 果汁的样品瓶分别吸附 15、20、25、30、

35、40 min, 在进样口解析后, 得到各色谱图。经方差分析, 在 20~30 min 这一阶段峰面积与峰数之比有着显著性 ($P < 0.05$), 萃取时间在小于或等于 25 min 的情况下, 色谱图出现的峰相对较少; 随着萃取时间的延长, 总峰数在相对增加, 峰面积也随之增加, 在 30、35、40 min 时变化不显著 ($P > 0.05$), 且总峰面积在 35 min 时达到最大值, 之后保持不变。因此, 35 min 作为最佳萃取时间。

2.2.2 吸附温度。吸附温度是影响吸附效果的一个极其重要的因素。萃取时体系温度的提高会使分配系数 K 增大, 加快待测物的传质速率, 而温度的提高又会导致 SPME 涂层吸附性能的下降, 所以选择最佳的吸附温度直接影响 SPME 的萃取效果。

称取 1 g 果汁放于 15 ml 的样品瓶中, 分别在 25、30、35、40、45、50 的烘箱内吸附 35 min, 在进样口解析, 得到各色谱图。经分析得到: 在 25~40 时, 随着温度的提高, 峰面积随之增加; 达到 40~50 时, 峰面积随着温度的升高有减小的趋势。这主要是由于温度升高, 加快了待测物的传质效率, 萃取效率也随之升高, 但是温度超过 40 时, 杂柑果汁中的一些低沸点的挥发性物质易损失, 从而引起了出峰数和总峰面积的下降, 影响色谱分析的准确性。同时, 由于纤维头吸附挥发物质是放热反应, 高温容易降低纤维头吸附挥发物质的能力, 而且容易缩短纤维头的使用寿命。综合以上因素考虑, 选用 40 为最佳吸附温度。

2.2.3 盐析效应。在萃取体系中加入盐类, 可降低分析物在水溶液中的可溶性, 能使更多的挥发性物质挥发至溶液的顶空, 被纤维头所吸附, 从而降低该方法的检测限, 提高香气物质的响应值。加入盐类, 能极大地缩短达到萃取平衡的时间。因此, 盐析效应是影响萃取效果的又一重要因素。该研究选取了不加 NaCl、加入 5%、15%、25% 以及饱和 NaCl 5 个梯度的溶液, 在吸附温度 40 时, 吸附时间 35 min, 解吸时间 2 min 条件下, 来研究对总峰面积的影响。随着 NaCl 离子浓度从 0 增高到 5%、15%、25%, 峰面积随着盐浓度的增高而增加, 在 25% 时峰面积达到最大值, 峰面积增加了 72% ($P < 0.05$), 而当 NaCl 离子浓度饱和时, 峰面积又呈现减少的趋势。一般认为 20%~30% 的盐浓度时大多数香气的灵敏度最好^[6-7]。研究发现, 加入盐浓度为 25% 的情况下, 果汁中主要香气成分的变化情况, 无论是酯类还是醇类和烯类, 峰面积都有了较显著的提高, 这表明 NaCl 能有效提高杂柑主要挥发性物质的检测限范围, 这与吴继红^[8]的报道一致。

2.2.4 样品量的影响。果汁用量是影响 SPME 纤维头上挥发物质数量的主要因素。为保证萃取的效果, 需要对样品量、样品容器的体积进行选择, 样品量与样品容器的体积存在着匹配关系, 样品量增大的情况下, 检出量提高, 重现性也变好。在吸附温度 40 时, 吸附时间 35 min, 解吸时间 2 min, 电磁搅拌条件下, 当果汁用量从 0.5 ml 增加到 1.0 ml 时, 主要挥发物的峰面积都有了较显著的变化, 而当果汁用量达到 2.0 ml 时, 只有酯类峰面积略有增加, 烯类和醇类都没有发生变化, 因此以 1.0 ml 作为果汁用量较为合适。

2.2.5 搅拌的影响。搅拌是影响 SPME 纤维头吸附速度的重要因素。Direct-SPME 中, 在不搅拌和搅拌不足的情况下,

分析物在液相扩散速度较慢, 更主要的是在纤维表面附有一层静态水膜, 分析物通过该水膜进入固相的速度很慢。有效的搅拌可加速分析物的扩散速度并降低静态水膜的干扰, 从而大大提高分析速度。在吸附温度 40 时, 吸附时间 35 min, 解吸时间 2 min, 搅拌速度分别为 0、50、100、200 r/min 的条件下, C 色谱图(图略)中可以看出峰面积的变化情况, 不搅拌时的总峰面积看作 100%, 在搅拌速率为 50、100、200 r/min 的条件下, 峰面积分别为 234%、289%、321%, 比不搅拌时的峰面积提高了很多, 而且搅拌速率越高, 峰面积增幅却越来越小, 而且过高的速率会使果汁飞溅到瓶壁或萃取头上, 一旦污染到纤维头, 就会严重缩短纤维头的寿命。综合来看, 以 100 r/min 为最佳搅拌速率。

2.3 正交实验 SPME 方法主要包括萃取和解吸附两个过程, 在此过程中盐离子浓度(A)、萃取温度(B)、萃取时间(C)和解吸时间(D)是影响方法灵敏度的主要因素。该研究采用 $L_9(3^4)$ 实验设计, 对萃取时间、解析时间、盐离子浓度和吸附温度 4 个实验条件, 按 4 因素 3 水平正交设计进行优化。结果表明: 影响萃取效率的因素是 $A > C > B > D$, 即 NaCl 浓度(%) 和萃取时间对萃取效果的影响较大, 萃取温度和解吸时间的影响较小。从直观分析和实验结果都表明, 最佳工艺为 $A_3B_2C_3D_2$, 即最佳的工艺条件为: NaCl 浓度 25%, 萃取温度 40 时, 萃取时间 40 min, 解吸时间 3 min。

3 宫内伊予柑主要香气组分的测定

按照实验得到的 SPME 最佳萃取参数和适宜的气相色谱、质谱条件, 测定宫内伊予柑果汁中主要香气组分及其相对含量, 根据测得的总离子色谱图(图略)作出分析, 得到宫内伊予柑果汁中含有的主要香气成分醇类: 戊醇、1-丙醇、环丙基甲醇、2-庚醇、双环己-2-醇、2,6-辛二烯-1-醇、己二醇、2-戊醇、1,6-辛二烯-3-醇、环戊醇; 酯类: 1,2,4-三羧基安息酸二甲酯、癸酸甲酯; 酮类: 乙酮、2,5-呋二酮、1,2-丙二烯-1,3-二酮、环异己-3-酮; 醛类: 安息香醛、己醛; 烯类: 乙烯、环丙烯、4-亚甲基环己烯、香叶烯、双环己-2-烯、丙二烯-2-丁烯、D-柠檬烯、水芹烯; 炔类: 丙烷、2-乙基-3-乙烯基氧化烷、环丙烷; 酸类: 乙酸。

研究结果, 共鉴定出芳香组分 31 种, 其中醇类 10 种、烯炔类 12 种、酮类 4 种、酯类 2 种、醛类 2 种和酸类 1 种, 且以醇类与烯炔类物质居多, 这与甜橙芳香组分的比例较相似^[9], 因为伊予柑是蜜柑与甜橙的自然杂交种^[10]。

4 结论

(1) 单因素实验表明: 杂柑挥发性成分的萃取效率随着搅拌速度、吸附时间、解吸时间、吸附温度、盐离子浓度的增加而增加, 但在吸附 35 min 时峰面积达到最大值, 之后保持不变; 温度超过 40 后, 萃取的效率呈下降趋势; 同时盐离子能有效地提高宫内伊予柑主要挥发性物质的灵敏度。

(2) 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验, 结果表明, 萃取的最佳工艺条件为: NaCl 浓度 25%, 萃取温度 40 时, 萃取时间 40 min, 解吸时间 3 min。

(3) 采用 HS-SPME-GC-MS 方法测定宫内伊予柑果汁中的

(下转第 10844 页)

(上接第10834页)

主要芳香成分,共鉴定出芳香组分31种,其中以醇类、烯类、酮类为主,酯类、醛类和酸类则较少。

参考文献

- [1] 蔡同一,张吉福.超滤技术在苹果汁澄清上的应用研究[J].食品工业科技,1989(3):8-14.
- [2] YANG X, PEPPARD T L. Solid Phase Microextraction of flavor compounds: a comparison of two fiber coatings and a discussion of the rule of thumb for absorption[J]. J. GC, 1995, 13:882-886.
- [3] YANG X, PEPPARD T L. For flavor analysis[J]. Agr Food Chem, 1994, 42:1925-1930.
- [4] CARLA DA PORTO, LORENA HZZALE. Analyses of orange spirit flavour by direct-injection gas chromatography-mass spectrometry and headspace Solid phase microextraction/ GC MS[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2003(18):66-72.
- [5] SELL S, CABAROGLU T, CANBAS A. Volatile flavour components of orange juice obtained from the cv. Kozan of Turkey[J]. Journal of Composition and Analysis, 2004(17):789-796.
- [6] 栾天罡,李攻科,张展霞.固相微萃取-衍生化法与气相色谱-质谱联用分析葡萄酒中多酚类化合物[J].中山大学学报:自然科学版,2001,40(1):54-57.
- [7] 周菊珍,周培庆.固相微萃取实验条件的优化[J].华东师范大学学报,2000(1):103-106.
- [8] 吴继红.苹果汁加工中典型芳香成分的形态变化及增香调控的研究[D].北京:中国农业大学,2004:21.
- [9] 胡小松.我国橙汁加工[R].湖南永州:“中国柑橘加工技术与产业发展”会议,2005.
- [10] 林大盛,杨家栋,钱皆兵.宫内伊予柑引种研究[J].中国南方果树,1994,23(3):9.