

液液微萃取分析不同层酒醅原酒的挥发性成分

王 松^{1,2}, 史冬梅^{1,2}, 刘国英³, 孙金沅^{1,2*}, 张燕燕⁴, 孙宝国^{1,2}

(1. 食品质量与安全北京实验室, 北京工商大学, 北京 100048; 2. 北京市食品风味化学重点实验室, 北京工商大学, 北京 100048; 3. 安徽古井贡酒股份有限公司, 安徽 亳州 236000; 4. 霍恩海姆大学 风味化学系, 德国 斯图加特 70599)

摘要: 采用液液微萃取 (Liquid-liquid microextraction, LLME) 与气相色谱/质谱联用仪 (GC-MS) 结合的方法对古井贡酒同一窖池 5 种不同层酒醅所产原酒 A、B、C、D、E 进行分析, 选择其中 25 种经文献报道具有生物活性的化合物进行定量。25 种化合物的加标回收率在 82.22%~105.83% 之间, 5 种原酒中 25 种化合物总质量浓度大小顺序为 A>C>E>B>D, 这可能与不同层酒醅微生物种类以及原料发酵程度有关。对 25 种生物活性成分的定量结果进行主成分分析, 结果表明: 原酒 A 与其余酒样差异主要体现在第二主成分, 与之关系密切的化合物主要有亚油酸乙酯、愈创木酚、亚麻酸乙酯、乙酸糠酯、糠醇、3-甲基丙醇; B、C、D、E 4 种原酒在第二主成分上表现出一定的相似性, 在第一主成分上表现出差异性, 与之关系密切的化合物主要有 2-丙酰呋喃、5-甲基呋喃醛、2-乙酰-5-甲基呋喃、2-乙基吡嗪、二甲基三硫。

关键词: 液液微萃取; 原酒; 挥发性成分; 主成分分析; 气相色谱/质谱法; 食品用化学品

中图分类号: TS261 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2020) 05-1010-08

Analysis of volatile components of base distillates from different layers of jiupei via liquid-liquid microextraction

WANG Song^{1,2}, SHI Dongmei^{1,2}, LIU Guoying³, SUN Jinyuan^{1,2*},
ZHANG Yanyan⁴, SUN Baoguo^{1,2}

(1. Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Key Laboratory of Food Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 3. Anhui Gujing Group Co., Ltd., Bozhou 236000, Anhui, China; 4. Department of Flavor Chemistry, University of Hohenheim, Stuttgart 70599, Germany)

Abstract: Liquid-liquid microextraction (LLME) combined with gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) was used to analyze the base distillates produced from 5 different layers of Jiupei in the same cellar of Gujinggongjiu (A, B, C, D, E), and 25 biologically active compounds reported were selected for quantitative analysis. The recoveries of these compounds were between 82.22% and 105.83%, and the order of their total contents in 5 base distillates was A>C>E>B>D, which might be related to the microbial species of fermented grains in different layers and the fermentation degree of raw materials. Principal component analysis was used to analyze the quantitative results of 25 kinds of biologically active compounds. The results showed that the difference between base distillate A and other base distillates was mainly reflected on the second principal component, and the compounds closely related to it mainly included ethyl linoleate, guaiacol, ethyl linolenate, furfuryl acetate, furfuryl alcohol, and 3-methylthiopropanol. Base distillates B, C, D, and E had certain similarities on the second principal component, while they showed differences on the first principal component, and the compounds related to it included 2-propanoylfuran, 5-methylfuranal, 2-acetyl-5-methylfuran, 2-ethylpyrazine, and dimethyl trisulfide.

Key words: liquid-liquid microextraction; base distillates; volatile components; principal component analysis; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); food chemicals

收稿日期: 2019-12-05; 定用日期: 2020-02-13; DOI: 10.13550/j.jxhg.20191137

基金项目: 国家自然科学基金 (31972193); 国家重点研发计划 (2016YFD0400500)

作者简介: 王 松 (1995—), 男, 硕士生, E-mail: wangs_2278@126.com. 联系人: 孙金沅 (1983—), 女, 副研究员, 博士, E-mail: sunjinyuan@btbu.edu.cn.

白酒是中国传统文化的重要组成部分,如今,风味与健康双导向已成为白酒发展的新趋势^[1-2],白酒中的活性成分也受到更多研究者的关注^[3-5]。

冯海燕等^[6]对芝麻香不同层酒醅所产原酒的理化性质、风味成分、感官差异性进行分析,结果表明,在白酒蒸馏过程中,由于不同层酒醅所处窖内位置不同,发酵产物存在差异,在蒸酒时采用分层蒸馏,所得原酒的风味和口感也具有明显的差异性。孙金沅等^[7]对同一窖池不同层酒醅中39种挥发性生物活性成分进行分析,不同层酒醅中化合物质量浓度差异明显。然而,针对同一窖池不同层酒醅所产原酒中挥发性活性物质差异的研究还鲜有报道。

目前应用到白酒挥发性成分分析的前处理方法种类繁多^[8-10]。LLME根据相似相溶原理,利用有机溶剂将目标化合物从样品中萃取出来,同时具有高效、快速、低溶剂消耗等特点,有效地避免了传统液液萃取有机溶剂用量大、样品使用量大、操作复杂、耗时等缺点^[11-12],已成功地应用于白酒分析中^[12-13]。

本文拟采用液液微萃取前处理方法结合GC-MS对同一窖池中5种不同层酒醅所产的原酒进行分析,并对其中酚类、呋喃类、吡嗪类、萜烯类以及亚麻酸乙酯和亚油酸乙酯等25种文献报道有生物活性的化合物进行定量分析,同时结合主成分分析,探究同一窖池不同层酒醅所生产原酒的差异性和相关性,为了解不同层酒醅酒中的生物活性物质差异提供数据支持。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

酒样由安徽古井贡酒股份有限公司提供,同一窖池酒醅从上到下分为5层,分层蒸馏后所产原酒编号为A、B、C、D、E;同一层酒醅蒸完酒后,在容器中混合均匀并取样,取样后放入4℃冰箱保存,保证所取样品对每一种酒样的代表性。

2-乙酰基呋喃、2-乙酰基-5-甲基呋喃、糠醇、4-乙基愈创木酚、三甲基吡嗪、四甲基吡嗪(均为色谱纯,质量分数98%),5-甲基呋喃醛、愈创木酚、4-甲基愈创木酚、苯酚、4-甲基苯酚、乙酸糠酯、糠酸乙酯、香兰素(均为色谱纯,质量分数99%),2,4-二叔丁基苯酚(色谱纯,质量分数99.5%)、2-乙基吡嗪、3-甲硫基丙醇(均为色谱纯,质量分数98%),百灵威科技有限公司;2-丙酰呋喃、香叶基丙酮(均为色谱纯,质量分数97%),阿法埃莎(天津)化学有限公司;4-乙基苯酚、亚油酸乙酯(色谱纯,质量分数97%)、二甲基三硫(色谱纯,质量分数98%),日本东京化成工业株式会社;2,5-二甲

基吡嗪(色谱纯,质量分数99%),滕州香料有限公司;2-乙基-3,5-二甲基吡嗪(色谱纯,质量分数99%),上海麦克林生化科技有限公司;亚麻酸乙酯(色谱纯,质量分数98%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;无水硫酸钠(分析纯,120℃烘箱中烘烤5h,干燥器中冷却备用)、氯化钠、二氯甲烷,国药集团化学试剂有限公司。

标准溶液的配制:将标准化合物溶解在色谱级无水乙醇和超纯水配制的体积分数60%的乙醇溶液中,制备已知质量浓度的混合标准储备液,然后梯度稀释成一系列混合标准液。

Agilent GC 7890-5975 MSD气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦公司;DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司;XYJ80-1电动离心机,金坛市恒丰仪器厂;Vortex 2涡旋仪,德国IKA公司;BL-2200H电子分析天平,岛津国际贸易(上海)有限公司;N-Evap系列氮吹仪,上海思伯明仪器设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 液液微萃取法

参考文献^[12]优化结果:取一定量酒样于50 mL离心管中,加入50 μL质量浓度为10 mg/L的2-乙酰基吡嗪作为内标,加入适量的超纯水将酒样中乙醇体积分数稀释为15%,加适量氯化钠至过饱和,涡旋振荡后,加入2 mL二氯甲烷,涡旋萃取1 min,8000 r/min条件下离心5 min,收集下层有机相。重复萃取3次,合并萃取液并使用氮吹至0.5 mL,进行GC-MS分析。

1.2.2 色谱条件

色谱柱:DB-FFAP型毛细管柱(60 m×250 μm×0.25 μm);载气为He,流速为1 mL/min;不分流模式,进样量:1 μL,进样口温度250℃;柱子流速1 mL/min;升温程序:起始温度40℃;以5℃/min升温至90℃;以1℃/min升温至94℃,保持0.5 min;以3℃/min升温至205℃,保持2 min;以5℃/min升温至250℃,保持3 min。

1.2.3 质谱条件

电子轰击离子源,电子能量70 eV;离子源温度230℃;四极杆温度150℃;传输线温度250℃。定性采用全扫描模式(Full Scan),扫描范围:*m/z* 45.00~350.00;定量采用选择离子扫描模式(SIM)。

1.2.4 定性方法

采用NIST 11谱库检索(化合物匹配度大于80)、标准品比对定性。

1.2.5 定量方法

标准曲线的建立:采用选择离子扫描模式(SIM)进行定量分析,具体定量离子见表1。取1.1节中配

制的混合系列标准溶液,按照 1.2.2 节中方法进行分析,分别以目标化合物与内标质量浓度比为横坐标,

峰面积比为纵坐标,建立标准曲线。通过标准曲线定量白酒中化合物的质量浓度。以上实验均重复 3 次。

表 1 25 种化合物的定量参数
Table 1 Quantitative parameters of 25 compounds

| 编号 | CAS 号 | 化合物 | 定量离子 | 检测限 /($\mu\text{g/L}$) | 定量限 /($\mu\text{g/L}$) | 线性范围 /($\mu\text{g/L}$) | 斜率 | 截距 | R^2 | 回收率 /% |
|----|------------|----------------|------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------|---------|--------|-----------|
| 1 | 3796-70-1 | 香叶基丙酮 | 151 | 1.04 | 3.46 | 2~100 | 0.2227 | -0.0001 | 0.9993 | 95.68 |
| 2 | 3658-80-8 | 二甲基三硫 | 126 | 0.75 | 2.51 | 10~600 | 2.3392 | -0.0193 | 0.9980 | 92.32 |
| 3 | 505-10-2 | 3-甲硫基丙醇 | 106 | 36.91 | 123.06 | 150~3000 | 0.8763 | -0.0178 | 0.9995 | 100.67 |
| 4 | 544-35-4 | 亚油酸乙酯 | 151 | 18.82 | 62.73 | 5000~50000 | 0.0602 | -0.0042 | 0.9993 | 102.00 |
| 5 | 1191-41-9 | 亚麻酸乙酯 | 261 | 10.17 | 33.90 | 100~3000 | 0.0734 | -0.0035 | 0.9933 | 105.86 |
| 6 | 90-05-1 | 愈创木酚 | 109 | 2.85 | 9.51 | 10~300 | 2.2294 | -0.0074 | 0.9997 | 105.75 |
| 7 | 93-51-6 | 4-甲基愈创木酚 | 138 | 0.52 | 1.72 | 300~6000 | 1.9467 | -0.0041 | 0.9991 | 103.73 |
| 8 | 108-95-2 | 苯酚 | 94 | 0.25 | 0.83 | 15~1500 | 2.8075 | -0.0031 | 1.0000 | 82.22 |
| 9 | 2785-89-9 | 4-乙基愈创木酚 | 137 | 0.28 | 0.92 | 300~6000 | 3.8055 | -0.0441 | 0.9995 | 105.83 |
| 10 | 106-44-5 | 4-甲基苯酚 | 107 | 0.43 | 1.45 | 60~6000 | 2.8132 | -0.0222 | 1.0000 | 98.27 |
| 11 | 123-07-9 | 4-乙基苯酚 | 107 | 0.27 | 0.90 | 20~1000 | 4.8452 | -0.0315 | 0.9994 | 104.70 |
| 12 | 96-76-4 | 2,4-二叔丁基苯酚 | 191 | 0.40 | 1.33 | 20~2000 | 5.8531 | 0.1699 | 0.9974 | 113.66 |
| 13 | 121-33-5 | 香兰素 | 151 | 1.65 | 5.49 | 10~300 | 1.7615 | 0.0038 | 0.9999 | 88.02 |
| 14 | 123-32-0 | 2,5-二甲基吡嗪 | 108 | 1.00 | 3.33 | 3~300 | 2.5388 | -0.0022 | 0.9983 | 98.05 |
| 15 | 13925-00-3 | 2-乙基吡嗪 | 107 | 0.47 | 1.57 | 2~100 | 4.8594 | -0.0022 | 0.9992 | 101.43 |
| 16 | 14667-55-1 | 三甲基吡嗪 | 122 | 0.49 | 1.64 | 10~200 | 3.1786 | -0.0080 | 0.9999 | 93.19 |
| 17 | 13925-07-0 | 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪 | 135 | 0.66 | 2.20 | 2~100 | 2.4312 | -0.0006 | 0.9985 | 103.35 |
| 18 | 1124-11-4 | 2,3,5,6-四甲基吡嗪 | 136 | 1.14 | 3.79 | 10~300 | 3.0454 | -0.0070 | 0.9999 | 99.51 |
| 19 | 1192-62-7 | 2-乙酰基呋喃 | 95 | 0.72 | 2.40 | 20~400 | 3.5875 | -0.0030 | 0.9999 | 98.66 |
| 20 | 623-17-6 | 乙酸糠酯 | 140 | 5.71 | 19.04 | 20~400 | 0.9547 | -0.0027 | 0.9998 | 95.69 |
| 21 | 3194-15-8 | 2-丙酰基呋喃 | 95 | 9.52 | 19.03 | 20~400 | 6.0022 | -0.0136 | 0.9999 | 102.91 |
| 22 | 620-02-0 | 5-甲基呋喃醛 | 110 | 8.00 | 26.66 | 30~600 | 2.1636 | -0.0021 | 0.9998 | 98.74 |
| 23 | 1193-79-9 | 2-乙酰基-5-甲基呋喃 | 109 | 0.41 | 1.36 | 2~160 | 4.2932 | 0.0000 | 0.9988 | 99.93 |
| 24 | 614-99-3 | 糠酸乙酯 | 95 | 0.57 | 1.90 | 2~160 | 3.8794 | -0.0089 | 0.9999 | 93.57 |
| 25 | 98-00-0 | 糠醇 | 98 | 0.89 | 2.98 | 100~10000 | 0.7627 | -0.0093 | 0.9998 | 99.16 |

1.2.6 方法验证

标准曲线线性以线性相关系数 (R^2) 进行评估;检测限 (LOD) 为定量化合物色谱峰信噪比 (S/N) 等于 3 对应的质量浓度;定量限 (LOQ) 为定量化合物色谱峰信噪比 (S/N) 等于 10 对应的质量浓度。以回收率评估方法的准确性。

回收率的测定:将定量化合物加到体积分数 15% 的乙醇溶液中,化合物最终质量浓度与酒样稀释后质量浓度相同,采用 1.2.1 中方法进行处理,根据标准曲线得到浓度,计算回收率,重复 3 次,取平均值。

1.2.7 数据分析

微量成分的定量数据、检测限、定量限、精密度和回收率等采用 Excel 2019 进行计算;相关图形采用 Origin 8.5.1 绘制;使用 SPSS 19.0 对化合物的定量结果进行单因素方差分析 (ANOVA) 和 T 检验,不同的字母代表同一化合物的质量浓度在不同原酒

中存在显著差异, $p < 0.05$; 采用 SPSS 对 5 种原酒中生物活性成分的定量结果进行主成分分析。

2 结果与讨论

2.1 液液微萃取结合 GC-MS 定性分析酒样中的微量成分

以同一窖池不同层酒醅所产原酒 A、B、C、D、E 为实验对象,采用 1.2.1 节中方法对原酒中挥发性成分进行分析。在全扫描模式下,5 种原酒的色谱图如图 1 所示。在原酒中共检测到 121 种微量成分,包括酯类 49 种、醇类 17 种、酸类 10 种、醛酮类 12 种、呋喃类 11 种、吡嗪类 5 种、萜烯类 2 种、酚类 9 种、6 种其他类化合物。酯类、酸类、醇类在 5 种酒中峰面积相对百分含量占比较大,其余化合物峰面积相对百分含量较低。

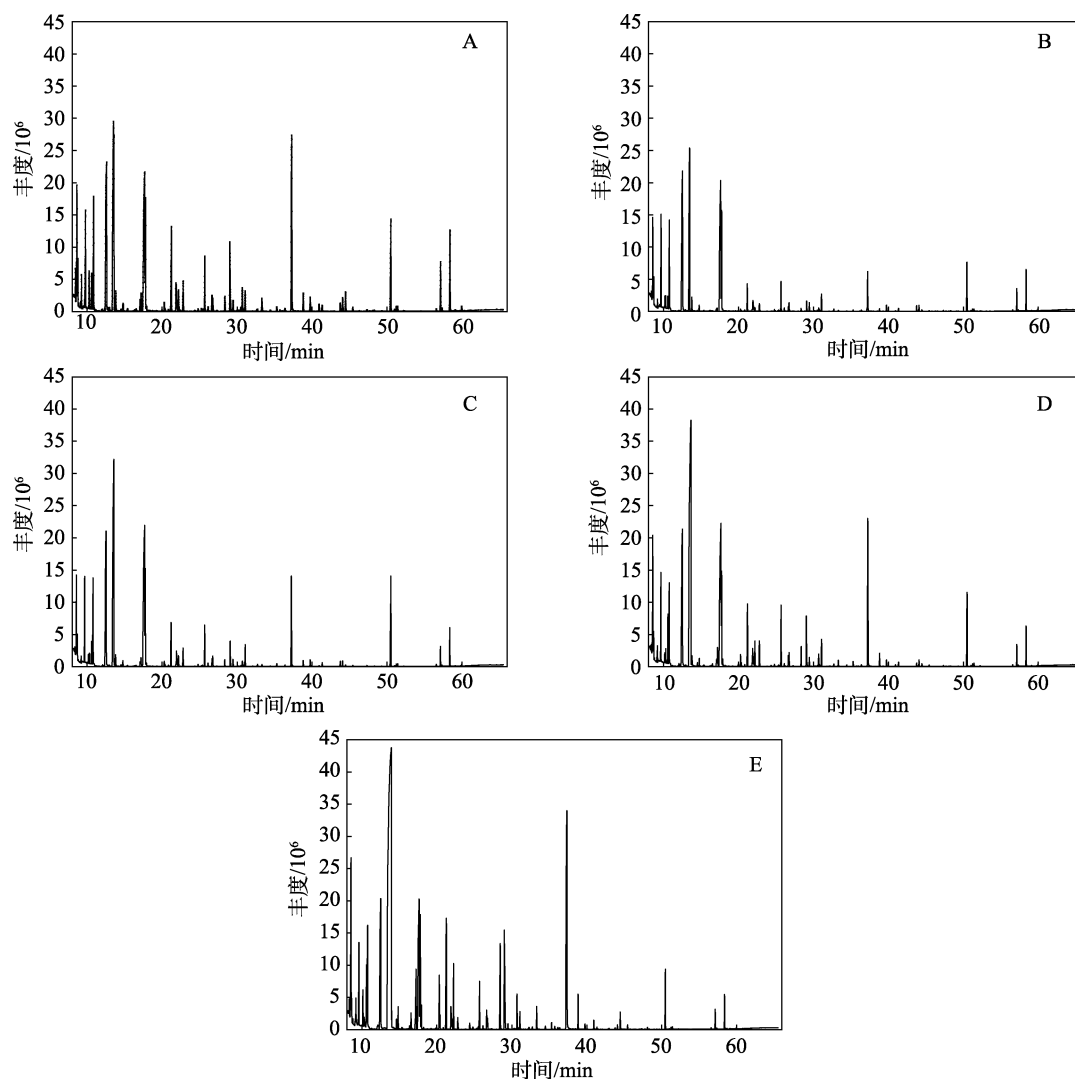


图1 5种原酒中挥发性成分的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of volatile components in 5 base distillates

由于不同层酒醅的含氧量、微生物种类和数量、酿造的发酵程度等均不同^[14],不同酒样中各种微量成分种类、相对含量存在差异性。

酯类物质是古井贡酒中种类最多、含量最大的化合物。ZHAO等^[15]通过重组缺失实验证明己酸乙酯、辛酸乙酯、丁酸乙酯是古井贡酒中关键的香气化合物。有研究者认为,浓香型白酒中丁酸乙酯和己酸乙酯的含量比低于0.1即说明酒体协调^[16]。5种酒样中丁酸乙酯与己酸乙酯含量之比分别为0.2197、0.2154、0.0997、0.1062、0.0836,说明E的酒体相对A、B、C、D更加协调。

在定性的基础上,本实验重点对原酒中25种文献报道有生物活性的化合物进行了定量分析。

2.2 方法验证

表1列出采用内标标准曲线进行定量的实验数据。标准曲线的线性相关系数(R^2)在0.9933~1.0000之间,拟合较好;LOD均低于36.91 $\mu\text{g/L}$,LOQ低于123.06 $\mu\text{g/L}$,说明此方法具有较高的灵敏度;化合物

的加标回收率在82.22%~105.83%之间,表明此法对定量的化合物具有很好的准确性,能够满足分析要求。

2.3 不同原酒中挥发性生物活性成分的定量分析

采用内标标准曲线法对5种原酒中25种生物活性成分进行定量分析,这些化合物被认为可以缓解酒精伤害,调节生理节奏,预防疾病等^[17],是对人体有益的功能性成分^[1,17]。定量结果如表2所示,其中酚类8种,呋喃类7种,吡嗪类5种,酯类2种,萜烯类1种,含硫化合物2种。25种化合物在5种原酒中总的质量浓度大小顺序为A(56088.51 \pm 1590.53 $\mu\text{g/L}$)>C(42734.01 \pm 800.36 $\mu\text{g/L}$)>E(39904.85 \pm 829.36 $\mu\text{g/L}$)>B(38897.51 \pm 1283.09 $\mu\text{g/L}$)>D(37086.93 \pm 1332.85 $\mu\text{g/L}$)。

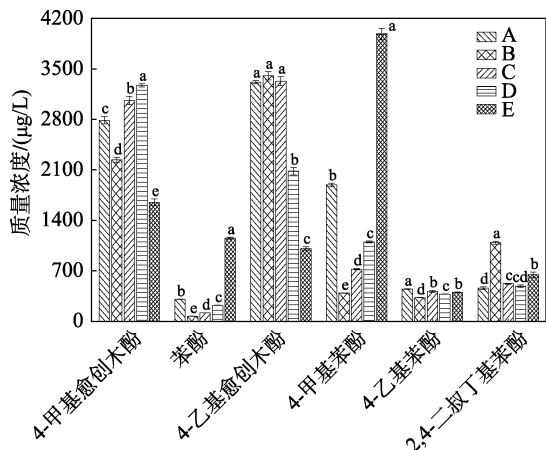
图2展现了8种酚类化合物在5种原酒中质量浓度的变化。酚类化合物是白酒中重要的香气活性成分^[18],同时也是重要的生物活性成分^[19],如愈创木酚^[17]、4-甲基愈创木酚、4-乙基愈创木酚^[20-22]等是白酒中优良的自由基清除剂。史冬梅等^[23]检测

表 2 挥发性生物活性成分在 5 种原酒中的定量结果
Table 2 Quantitative results of volatile bioactive components in 5 base distillates

| 保留时间/s | CAS号 | 化合物 | 化合物质量浓度/($\mu\text{g/L}$) | | | | |
|--------|------------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | | | A | B | C | D | E |
| 38.041 | 90-05-1 | 愈创木酚 | 54.69 \pm 0.75 ^a | 46.96 \pm 0.77 ^b | 48.47 \pm 1.54 ^b | 42.89 \pm 0.75 ^c | 47.14 \pm 0.44 ^b |
| 41.349 | 93-51-6 | 4-甲基愈创木酚 | 2787.97 \pm 53.14 ^c | 2238.38 \pm 33.76 ^d | 3061.51 \pm 56.40 ^b | 3271.11 \pm 21.83 ^a | 1649.66 \pm 45.90 ^c |
| 42.959 | 108-95-2 | 苯酚 | 306.49 \pm 1.73 ^b | 71.53 \pm 1.68 ^e | 120.18 \pm 0.95 ^d | 222.57 \pm 2.62 ^c | 1154.77 \pm 11.20 ^a |
| 43.774 | 2785-89-9 | 4-乙基愈创木酚 | 3316.71 \pm 21.79 ^a | 3403.36 \pm 56.58 ^a | 3329.50 \pm 61.54 ^a | 2081.86 \pm 49.23 ^b | 1010.44 \pm 23.70 ^c |
| 45.437 | 106-44-5 | 4-甲基苯酚 | 1890.85 \pm 22.99 ^b | 393.12 \pm 1.52 ^e | 723.34 \pm 11.04 ^d | 1100.61 \pm 13.11 ^c | 3982.71 \pm 79.70 ^a |
| 48.316 | 123-07-9 | 4-乙基苯酚 | 447.20 \pm 4.99 ^a | 329.01 \pm 3.03 ^d | 417.65 \pm 14.10 ^b | 377.94 \pm 3.93 ^c | 405.05 \pm 5.34 ^b |
| 52.225 | 96-76-4 | 2,4-二叔丁基苯酚 | 459.58 \pm 20.19 ^d | 1091.06 \pm 19.74 ^a | 520.59 \pm 8.48 ^e | 486.53 \pm 16.49 ^{ad} | 647.01 \pm 37.44 ^b |
| 59.681 | 121-33-5 | 香兰素 | 22.01 \pm 1.64 ^e | 33.68 \pm 2.13 ^b | 13.80 \pm 0.50 ^e | 7.49 \pm 0.50 ^d | 54.37 \pm 3.02 ^a |
| 24.481 | 1192-62-7 | 2-乙酰基呋喃 | 247.12 \pm 2.78 ^a | 88.34 \pm 1.04 ^e | 159.27 \pm 2.59 ^d | 204.42 \pm 2.29 ^b | 164.67 \pm 2.19 ^c |
| 25.584 | 623-17-6 | 乙醇糖甙 | 206.45 \pm 0.94 ^a | 73.16 \pm 0.61 ^e | 93.07 \pm 2.58 ^e | 83.18 \pm 0.42 ^d | 98.82 \pm 0.43 ^b |
| 27.307 | 3194-15-8 | 2-丙酰呋喃 | 155.38 \pm 0.62 ^c | 63.91 \pm 0.17 ^d | 152.33 \pm 1.87 ^c | 230.83 \pm 0.91 ^a | 209.70 \pm 1.86 ^b |
| 27.289 | 620-02-0 | 5-甲基呋喃醛 | 257.76 \pm 1.62 ^b | 101.03 \pm 0.66 ^e | 227.11 \pm 6.10 ^c | 348.37 \pm 0.89 ^a | 203.77 \pm 0.66 ^d |
| 29.127 | 614-99-3 | 糠酸乙酯 | 54.80 \pm 1.19 ^d | 38.82 \pm 0.55 ^e | 61.10 \pm 0.18 ^e | 75.60 \pm 0.32 ^b | 137.09 \pm 1.19 ^a |
| 28.902 | 1193-79-9 | 2-乙酰基-5-甲基呋喃 | 34.64 \pm 0.35 ^e | 25.08 \pm 0.15 ^d | 34.82 \pm 0.40 ^e | 40.76 \pm 0.16 ^b | 41.17 \pm 0.45 ^a |
| 30.521 | 98-00-0 | 糠醇 | 5501.85 \pm 55.72 ^a | 2023.54 \pm 25.87 ^c | 2438.40 \pm 10.33 ^b | 1767.83 \pm 4.57 ^d | 1660.80 \pm 8.30 ^c |
| 16.875 | 123-32-0 | 2,5-二甲基吡嗪 | 33.52 \pm 0.34 ^e | 35.76 \pm 0.46 ^d | 49.77 \pm 0.61 ^a | 41.42 \pm 0.66 ^b | 40.40 \pm 0.54 ^c |
| 17.336 | 13925-00-3 | 2-乙基吡嗪 | 20.96 \pm 2.96 ^b | 18.60 \pm 0.16 ^b | 21.02 \pm 1.65 ^b | 24.33 \pm 0.51 ^a | 23.79 \pm 0.29 ^a |
| 20.066 | 14667-55-1 | 三甲基吡嗪 | 80.44 \pm 0.25 ^d | 75.13 \pm 0.49 ^e | 96.35 \pm 0.81 ^b | 87.39 \pm 1.21 ^c | 104.46 \pm 1.01 ^a |
| 22.359 | 13925-07-0 | 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪 | 39.42 \pm 0.40 ^e | 31.12 \pm 0.28 ^d | 47.85 \pm 0.57 ^b | 48.24 \pm 0.06 ^b | 54.72 \pm 0.56 ^a |
| 22.891 | 1124-11-4 | 2,3,5,6-四甲基吡嗪 | 71.05 \pm 0.34 ^c | 121.01 \pm 1.47 ^a | 109.18 \pm 0.92 ^b | 50.02 \pm 0.30 ^d | 49.13 \pm 0.53 ^d |
| 37.645 | 3796-70-1 | 香叶基丙酮 | 50.89 \pm 2.22 ^b | 80.72 \pm 4.56 ^e | 44.50 \pm 4.82 ^e | 38.78 \pm 2.29 ^e | 43.79 \pm 2.17 ^e |
| 19.343 | 3658-80-8 | 二甲基三硫 | 257.67 \pm 2.04 ^c | 71.39 \pm 2.01 ^e | 310.15 \pm 6.50 ^a | 123.56 \pm 3.32 ^d | 278.49 \pm 1.06 ^b |
| 32.615 | 505-10-2 | 3-甲基基丙醇 | 2166.57 \pm 36.16 ^c | 1179.16 \pm 6.88 ^d | 1550.38 \pm 43.27 ^b | 1436.11 \pm 21.99 ^c | 1600.81 \pm 20.4 ^b |
| 58.372 | 544-35-4 | 亚油酸乙酯 | 36213.26 \pm 1267.74 ^a | 26214.66 \pm 1077.13 ^c | 28037.10 \pm 538.63 ^b | 23970.04 \pm 1137.01 ^d | 25284.57 \pm 561.49 ^{ad} |
| 59.958 | 1191-41-9 | 亚麻酸乙酯 | 1411.23 \pm 87.66 ^a | 1058.98 \pm 41.39 ^b | 1066.57 \pm 23.96 ^b | 925.05 \pm 47.48 ^c | 957.52 \pm 19.16 ^c |

注：表中数据表示为：“av \pm SD”；av表示同一酒样经3次平行实验定量的平均值；SD为定量平均值的标准偏差；上标不同字母代表不同酒样中化合物质量浓度存在显著差异（ $p < 0.05$ ）。

103 种白酒中 6 种酚类化合物, 其中 4-甲基愈创木酚、苯酚、4-乙基愈创木酚、4-甲基苯酚和 4-乙基苯酚在 103 种白酒中均被检出, 质量浓度在 2.95~3018.98 $\mu\text{g/L}$, 而香兰素只在其中 94 种白酒中检测到, 且质量浓度在 0.54~279.18 $\mu\text{g/L}$ 之间。4-甲基愈创木酚和 4-乙基愈创木酚在 5 种酒样中质量浓度较高, 均超过 1000 $\mu\text{g/L}$ 。由表 2 可知, 香兰素在 5 种原酒中质量浓度较低, 小于 54.37 $\mu\text{g/L}$ 。4-甲基愈创木酚在 D 中质量浓度显著高于其他酒; 4-乙基愈创木酚在 A、B 和 C 中质量浓度较高, 且无显著性差异, 但均显著高于 D、E 中 ($p < 0.05$) 的质量浓度。4-乙基愈创木酚与枯草芽孢杆菌密切相关^[24], 枯草芽孢杆菌是好气细菌, 而 A、B 和 C 酒对应的酒醅在窖池上层, 含氧量较大, 有利于枯草芽孢杆菌的生长, 产生较多的 4-乙基愈创木酚。4-甲基苯酚是窖香香气的主要成分之一, 主要由窖泥中的微生物代谢产生^[25], 其在酒醅中的增长主要发生在池底醅中, 因此, E 中 4-甲基苯酚质量浓度显著高于其他酒 ($p < 0.05$)。



a~e 字母表示同一化合物的质量浓度在不同原酒中存在显著差异, $p < 0.05$, 下同

图 2 酚类在古井贡酒原酒中的定量结果

Fig. 2 Quantitative results of phenols in Gujinggongjiu

吡嗪类化合物主要通过美拉德反应和微生物的代谢途径生成^[26], 是白酒中重要的生物活性成分, 如四甲基吡嗪^[1]、三甲基吡嗪^[27]等均具有一定的抗氧化活性。王松等^[28]通过多次顶空固相微萃取定量了古井贡酒大曲中 8 种吡嗪类化合物, 质量浓度在 12.93~432.66 $\mu\text{g/kg}$ 之间。本实验在 5 种原酒中共检测到 5 种吡嗪类化合物, 其质量浓度差异如图 3 所示。其中, 三甲基吡嗪和四甲基吡嗪在 5 种酒中质量浓度较高, 2-乙基吡嗪质量浓度较低。四甲基吡嗪在 B 中质量浓度显著高于其他酒 ($p < 0.05$); 三甲基吡嗪和 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪在 E 中质量浓度显著高于其他酒 ($p < 0.05$)。

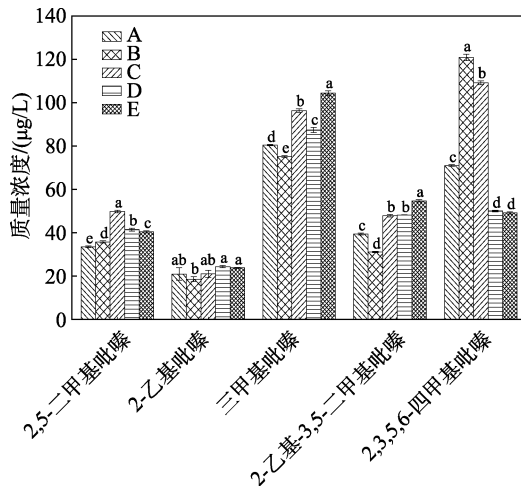


图 3 吡嗪类在古井贡酒原酒中的定量结果

Fig. 3 Quantitative results of pyrazines in Gujinggongjiu

萜烯类化合物是以异戊二烯为单位倍数的烃类及其含氧衍生物, 是白酒中生物活性成分^[1]。相对于周庆伍等^[29]采用全二维气相色谱的检测方法, 本实验采用液液微萃取结合 GC-MS 的检测方法, 未能在酒样中检测到更多的萜烯类化合物^[29], 仅对香叶基丙酮进行了定量分析, 其在 B 中质量浓度显著高于其他酒 ($p < 0.05$)。张倩等^[3]研究发现, 在与白酒中质量浓度相同的范围内, 香叶基丙酮对氧化损伤细胞内的活性氧具有清除作用, 可以提高细胞的抗氧化能力。

呋喃类化合物具有呋喃杂环结构, 有很强的药理学活性, 在各类药物中发挥着重要作用^[30]。该实验对 5 种酒中检测到的 7 种呋喃类化合物进行定量分析。糠醇在 5 种酒中质量浓度最高, 并且 2-乙酰基呋喃、乙酸糠酯、糠醇在 A 中质量浓度均显著高于其他酒 ($p < 0.05$); 糠酸乙酯和 2-乙酰基-5-甲基呋喃在 E 中质量浓度均显著高于其他酒。

除此之外, 二甲基三硫^[19]、3-甲硫基丙醇^[27,31]具有抗氧化的作用。亚油酸乙酯和亚麻酸乙酯在人体内水解为脂肪酸, 可以抑制胆固醇的合成。其中亚油酸是人体必需的脂肪酸^[32]; 亚麻酸等高级脂肪酸具有降血压、抗氧化、抗癌等功效^[33]。二甲基三硫、3-甲硫基丙醇、亚麻酸乙酯和亚油酸乙酯在 5 种酒样中质量浓度如图 4 所示。3-甲硫基丙醇、亚油酸乙酯和亚麻酸乙酯在 A 中质量浓度显著高于其他酒 ($p < 0.05$), 二甲基三硫在 C 中质量浓度最高。

2.4 5 种原酒中生物活性成分的主成分分析

采用 SPSS 软件, 对 5 种原酒样品中 25 种生物活性成分的定量结果进行主成分分析, 得到主成分的特征值和贡献率如表 3 所示。图 5 为 25 种生物活性物质主成分载荷图, 图 5 中化合物编号与表 1 中化合物编号相同, 图 6 为 5 种原酒的主成分散点图。

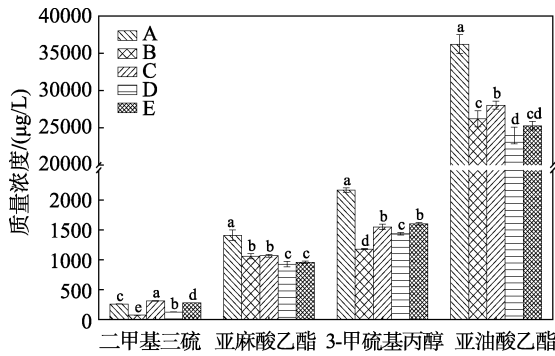


图 4 二甲基三硫、3-甲硫基丙醇、亚油酸乙酯和亚麻酸乙酯在 5 种原酒中的定量结果

Fig. 4 Quantitative results of dimethyl trisulfide, 3-methylthiopropanol, ethyl linoleate and ethyl linolenate in 5 base distillates

表 3 主成分的特征值和贡献率

Table 3 Characteristic values, contribution and cumulative contribution of principal components

| 主成分 | 特征值 | 贡献率/% | 累计贡献率/% |
|-----|-------|--------|---------|
| 1 | 8.718 | 34.872 | 34.872 |
| 2 | 7.464 | 29.854 | 64.727 |
| 3 | 5.794 | 23.175 | 87.902 |
| 4 | 3.025 | 12.098 | 100.000 |

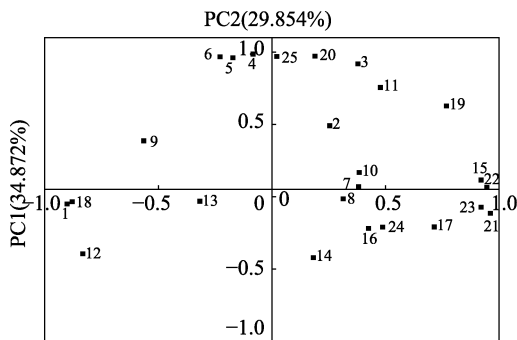


图 5 25 种生物活性物质主成分载荷图

Fig. 5 Principal component analysis biplot for 25 bioactive components

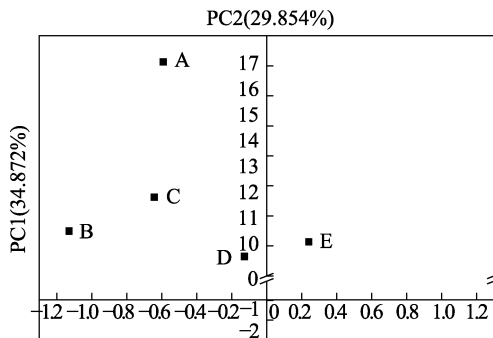


图 6 5 种原酒样品的主成分散点图

Fig.6 Principal component analysis biplot for 5 base distillates

由表 3 可得，前 3 个主成分累计方差贡献率达到 87.902%，因此选前 3 个主成分代替 25 种挥发性成分进行分析，达到了降维的目的。

由图 5 可知，第一主成分反映的指标主要有香叶基丙酮、二甲基三硫、2,3,5,6-四甲基吡嗪、2,4-二叔丁基苯酚、2-乙基-3,5-二甲基吡嗪、2-乙酰基呋喃、2-乙基吡嗪、2-乙酰-5-甲基呋喃、5-甲基呋喃醛、2-丙酰呋喃，主要指向吡嗪类和呋喃类；第二主成分反映的指标主要有 4-乙基苯酚、3-甲硫基丙醇、亚麻酸乙酯、愈创木酚、糠醇、乙酸糠酯、亚油酸乙酯，主要指向酚类和酯类。

由图 5、图 6 可知，E 分布在第一象限，与第一、二主成分呈正相关，与之关系密切的化合物主要有二甲基三硫、4-乙基苯酚、3-甲硫基丙醇、乙酸糠酯；其余 4 种酒均位于第二象限，A 与 B、C、D 差异明显，其中与 A 关系密切的化合物主要有亚油酸乙酯、亚麻酸乙酯、愈创木酚。

由主成分分析结果可知，同一窖池酒醅通过分层起窖，所得原酒中生物活性成分及其质量浓度具有一定的差异性，E 与其余 4 种酒处于不同象限，差异较大；同时 B、C、D 与 A 虽处于同一象限，但距离较远，差异明显。其中，B、C、D、E 与 A 的差异主要体现在第二主成分，与之关系密切的化合物主要有亚油酸乙酯、愈创木酚、亚麻酸乙酯、糠醇、乙酸糠酯、3-甲硫基丙醇；而 B、C、D、E 的差异主要体现在第一主成分，与之关系密切的化合物主要有 2-丙酰呋喃、5-甲基呋喃醛、2-乙酰-5-甲基呋喃、2-乙基吡嗪、二甲基三硫，这可能与酒醅中原料的利用度和发酵程度不同有关。

3 结论

采用液液微萃取法结合 GC-MS 对古井贡酒厂同一窖池不同层酒醅生产的 5 种原酒进行分析，共检测到 121 种微量成分，包括酯类 49 种、醇类 17 种、酸类 10 种、醛酮类 12 种、呋喃类 11 种、吡嗪类 5 种、萜烯类 2 种、酚类 9 种、6 种其他类化合物。

采用内标标准曲线对其中 25 种文献报道具有生物活性的化合物进行定量分析，不同化合物在 5 种原酒中质量浓度不同，其中质量浓度较高的化合物有 3-甲硫基丙醇、亚油酸乙酯、亚麻酸乙酯、糠醇、4-乙基愈创木酚。由于这些化合物在原酒 A 中远高于其他酒样，因此 25 种化合物总质量浓度大小为 A > C > E > B > D，这可能与不同层酒醅微生物种类以及原料发酵程度有关。

采用主成分分析法对不同酒样中生物活性成分的定量结果进行相关性分析。结果表明，不同酒样之间具有一定的差异性，最上层酒醅生产的原酒 A 与其余酒样差异较大，体现在第二主成分上，与之关系密切的化合物主要有亚油酸乙酯、愈创木酚、亚麻酸乙酯、乙酸糠酯、糠醇、3-甲硫基丙醇；其

余4层酒醅生产的原酒,在第二主成分上表现出一定的相似性,在第一主成分上表现出差异性,与之关系密切的化合物主要有2-丙酰呋喃、5-甲基呋喃醛、2-乙酰-5-甲基呋喃、2-乙基吡嗪、二甲基三硫。

对同一窖池不同层酒醅所产原酒进行分析,并对其中生物活性成分进行定量,对于探索不同空间位置酒醅产酒的差异性提供帮助,也为企业进行酒醅和原酒品质的鉴定和评价提供数据支持。

参考文献:

- [1] SUN Baoguo (孙宝国), LI Hehe (李贺贺), HU Xiaomei (胡萧梅), *et al.* The development trend of healthy baijiu[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2016, 16(8): 1-6.
- [2] WU Jihong (吴继红), HUANG Mingquan (黄明泉), ZHENG Fuping (郑福平) *et al.* Baijiu health and healthy baijiu[J]. Journal of Food Science and Technology (食品科学技术学报), 2019,37(2): 17-23.
- [3] ZHANG Qian (张倩), ZHU Tingting (朱婷婷), HUANG Mingquan (黄明泉), *et al.* Study on antioxidant activity of two terpenoids in baijiu[J/OL]. Food Science (食品科学), 1-14 [2019-12-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20190815.1123.002.html>.
- [4] HUANG M, HUO J, WU J, *et al.* Structural characterization of a tetrapeptide from sesame flavor-type baijiu and its interactions with aroma compounds[J]. Food Research International, 2019, 119: 733-740.
- [5] ZHAO D, JIANG Y, SUN J, *et al.* Amelioration of 4-methylguaiacol on LPS-induced inflammation in THP-1 cells through NF- κ B/I κ B α /AP-1 and Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 55: 95-103.
- [6] FENG Haiyan (冯海燕), LI Zhe (李喆), SONG Bao (宋宝), *et al.* Difference in the flavoring components and taste of zhimaxiang baijiu produced by fermented grains at different layer[J]. Liquor-Making Science and Technology (酿酒科技), 2019, (4): 88-95.
- [7] SUN Jinyuan (孙金沅), WANG Song (王松), CHEN Lu (陈璐), *et al.* SAFE combined with GC-MS to quantify 39 volatile bioactive components in jiupei analysis of flavor compounds in the production of luzhou-flavor liquor[J]. China Brewing (中国酿造), 2019, 38(12): 140-147.
- [8] WU J, ZHENG Y, SUN B, *et al.* The occurrence of propyl lactate in Chinese baijiu (Chinese liquors) detected by direct injection coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Molecules, 2015, 20(10): 19002-19013.
- [9] FAN H Y, FAN W L, XU Y. Characterization of key odorants in Chinese chixiang aroma-type liquor by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(14): 3660-3668.
- [10] LI Hehe (李贺贺), HU Xiaomei (胡萧梅), LI Anjun (李安军), *et al.* Comparative analysis of volatile components in Gujingong liquor by headspace solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction[J]. Food Science (食品科学), 2017, 38(4): 155-164.
- [11] LI H H, QIN D, WU Z Y, *et al.* Characterization of key aroma compounds in Chinese Guojing sesame-flavor Baijiu by means of molecular sensory science [J]. Food chemistry, 2019, 284:100-107.
- [12] SUN Xiaotao (孙啸涛), WANG Zongyuan (王宗元), LIU Miao (刘淼), *et al.* Determination of tetramethylpyrazine-4-methyl guaiacol and 4-ethyl guaiacol in 67 Chinese baijiu samples by vortex assisted liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Science (食品科学), 2017, 38(18): 73-79.
- [13] DONG Wei (董蔚), ZHAO Dongrui (赵东瑞), SUN Xiaotao (孙啸涛), *et al.* Determination of plasticizer of phthalate esters in Chinese liquor by nonionic surfactant/vortex liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety and Quality (食品安全质量检测学报), 2015, 6(7): 2639-2650.
- [14] DUAN Mingsong (段明松), HU Xiaolong (胡晓龙), ZENG Tian (曾田), *et al.* Analysis of the difference in flavoring components in luzhou-flavor base liquor from different spatial positions[J]. Liquor-making Science and Technology (酿酒科技), 2019, (1): 117-121, 126.
- [15] ZHAO D R, SHI D M, SUN J Y, *et al.* Characterization of key aroma compounds in Gujingong Chinese Baijiu by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, and sensory evaluation[J]. Food Research International, 2018, 105: 616-627.
- [16] YIN Wanqiang (尹婉婧), SHANG Liyun (商丽云), LIU Haiming (刘海明), *et al.* Analysis of flavoring compounds in nongxiang shanzhuang laojiu by HS-SPME-GC-MS[J]. Liquor-making Science and Technology (酿酒科技), 2015, (7): 94-97.
- [17] XU Yan (徐岩), FAN Wenlai (范文来), GE Xiangyang (葛向阳), *et al.* Scientific recognition of biofunctional components in Chinese liquors[J]. Liquor-making Science and Technology (酿酒科技), 2013, (9): 1-6.
- [18] ZHENG Y, SUN B, ZHAO M, *et al.* Characterization of the key odorants in Chinese zhima aroma-type baijiu by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(26): 5367-5374.
- [19] HUO Jiaying (霍嘉颖), HUANG Mingquan (黄明泉), SUN Baoguo (孙宝国), *et al.* Research progress in functional factors in baijiu[J]. Liquor-making Science and Technology (酿酒科技), 2017,(9): 17-23.
- [20] ZHAO D R, SHI D M, SUN J Y, *et al.* Quantification and cytoprotection by vanillin, 4-methylguaiacol and 4-ethylguaiacol against AAPH-induced abnormal oxidative stress in HepG2 cells[J]. RSC Advances, 2018, 8(62): 35474-35484.
- [21] ZHAO D R, SUN J Y, SUN B G, *et al.* Intracellular antioxidant effect of vanillin, 4-methylguaiacol and 4-ethylguaiacol: three components in Chinese baijiu[J]. RSC Advances, 2017, 7(73): 46395-46405.
- [22] ZHAO D R, JIANG Y S, SUN J Y, *et al.* Anti-inflammatory mechanism involved in 4-ethylguaiacol-mediated inhibition of LPS-induced inflammation in THP-1 cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(4): 1230-1243.
- [23] SHI Dongmei(史冬梅), WANG Song(王松), ZHAO Dongrui(赵东瑞), *et al.* Determination of 6 phenols in 103 kinds of Chinese baijiu by GC-MS/SIM [J]. Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2019, 19(4): 235-248.
- [24] WU Qiuxia (吴秋霞), HUANG Jun (黄钧), JIANG Dongcai (江东材), *et al.* Exploring the improvement of contents of pyrazines and 4-EG in luzhou-flavor daqu based on fortifying by co-culture[J]. Food Science and Technology (食品科技), 2017, 42(5): 2-6.
- [25] NIE Yuanhao (聂元皓). Study on the influencing factors of *p*-resol and its precursor in strong aroma type Chinese liquor[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2018.
- [26] WANG Yifang (王奕芳), ZHOU Rong (周容), ZHANG Mingchun (张明春), *et al.* Research progress in important function pyrazine compounds in baijiu (Chinese liquor)[J]. Liquor Making (酿酒), 2018, 45(6): 20-24.
- [27] SUN Xishi (孙惜时), LI Wenhua (李文华), LI Rong (李荣), *et al.* The antioxidative activity of sulfide and pyrazine compositions in sesame-flavor liquor[J]. Liquor Making (酿酒), 2013, 40(4): 57-60.
- [28] WANG Song (王松), CHEN Lu (陈璐), LIU Guoying (刘国英), *et al.* Application of multiple headspace solid phase microextraction in quantification of volatile compounds in Daqu[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2020, 37(2):346-355,390.
- [29] ZHOU Qingwu (周庆伍), LI Anjun (李安军), TANG Youhong (汤有宏), *et al.* Research on volatile flavor components in Gujing Gongjiu liquor by two comprehensive dimensional gas chromatography- time of flight mass[J].Liquor Making (酿酒), 2016, 43(2): 75-81.
- [30] PENG Yi (彭懿). Research on The synthesis of furan derivatives with various biological activity[D]. Chongqing : Chongqing Medical University (重庆医科大学), 2017.
- [31] GAO Chuanqiang (高传强), TAN Tiantian (谈甜甜), XIN Yawei (信亚伟), *et al.* The activities of the extracts of zhimaxiang baijiu (sesame-flavor liquor) and the 4 kinds of characteristic compounds[J]. Liquor-making Science and Technology (酿酒科技),2015,(4): 58-60.
- [32] WU Tingting (吴婷婷), ZHU Shuangliang (朱双良), SUN Xishi (孙惜时), *et al.* Analysis of health factors of meilanchun sesame-flavor liquor[J]. Liquor-making Science and Technology (酿酒科技), 2013, (8): 125-130.
- [33] CABR E, MAOSA M, GASSULL M A. Omega-3 fatty acids and inflammatory bowel diseases-a systematic review[J]. British Journal of Nutrition, 2012, 107(S2): S240-S252.