

固相微萃取和同时蒸馏萃取法 分析海南香草兰挥发性成分

董智哲^{1,2}, 谷风林^{2,3}, 徐 飞^{2,3}, 王庆煌^{2,3,*}

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070; 2. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南 万宁 571533;

3. 农业部香辛料作物遗传资源利用重点实验室, 海南 万宁 571533)

摘 要: 对固相微萃取 (solid phase micro-extraction, SPME) 技术萃取香草兰中挥发性成分的萃取条件进行优化, 并采用SPME和同时蒸馏萃取 (simultaneous distillation extraction, SDE) 两种方法对海南地区香草兰豆荚中挥发性成分进行检测分析。结果表明: SPME最优萃取条件为萃取头75 μm CAR/PDMS、萃取温度80 $^{\circ}\text{C}$ 以及萃取时间20 min。2种萃取方法共检测出105种挥发性成分, 其中利用SPME技术检测出挥发性成分73种, SDE检测出78种。结果表明: 将SPME和SDE两种方法联合使用可以更加全面地检测出香草兰中的挥发性成分。

关键词: 香草兰; 固相微萃取; 同时蒸馏萃取; 优化

Comparative Analysis of Volatile Components of Vanilla Grown in Hainan by Solid Phase Micro-Extraction and Simultaneous Distillation Extraction

DONG Zhi-zhe^{1,2}, GU Feng-lin^{2,3}, XU Fei^{2,3}, WANG Qing-huang^{2,3,*}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wanning 571533, China;

3. Key Laboratory of Genetic Resources Utilization of Spice and Beverage Crops, Ministry of Agriculture, Wanning 571533, China)

Abstract: The conditions of solid phase micro-extraction (SPME) for extraction of volatile components in vanilla grown in Hainan were optimized and its effectiveness was compared with that of simultaneous distillation extraction (SDE) for the analysis of volatile components in vanilla by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The results showed the optimal SPME conditions were established using a 75 μm carboxen[®]/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) fiber at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min. A total of 105 volatile components were identified, among which, 73 volatile compounds were extracted by SDE and 78 by SPME. This study has shown that more volatile components can be extracted and identified with a combination of SPME and SDE.

Key words: vanilla; solid phase micro-extraction; simultaneous distillation extraction; optimization

中图分类号: TQ651

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 02-0158-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201402029

香草兰原产于墨西哥, 是著名的热带兰科植物, 素有“食品香料之王”的美誉。20世纪60年代, 我国从斯里兰卡引种试种香草兰成功, 开始了对香草兰种植、病虫害以及加工生产的研究, 经过多年不懈努力, 我国海南地区香草兰已经进入产业化生产阶段^[1]。目前香草兰已作为一种高级香料广泛用于饮料、糖果、奶制品等食品工业, 在化妆品行业中也有广泛的应用^[2]。

目前, 马达加斯加、乌干达、桑坦尼亚、波旁、印度尼西亚等地区香草兰香气成分已被许多国外学者分析^[3-5],

从其分析结果可看出香草兰中香气成分及含量随着豆荚种植地区不同而有所差异。除产地影响其香气外, 加工方法同样对香草兰香气成分有着重要的影响。然而目前中国海南地区香草兰香气成分暂不明确。

挥发性成分提取分析方法较多, 提取分析方法适当与否直接影响最终结果。Brunschwig等^[4]的实验结果表明在香草兰挥发性成分鉴定方法中, 同时蒸馏萃取 (simultaneous distillation extraction, SDE) 明显优于乙醇萃取和超声波辅助萃取法。Perez-Silva等^[5]的实验结

收稿日期: 2013-01-05

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAD36B03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1630052012017)

作者简介: 董智哲 (1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为风味化学。E-mail: 372735663@qq.com

*通信作者: 王庆煌 (1963—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为农产品加工及贮藏。E-mail: kjb3687@163.com

果表明用溶剂提取法分析香草兰挥发性成分时, 戊烷-乙醚(1:1, *V/V*)混合溶剂萃取效果明显优于乙醚、戊烷-二氯甲烷(2:1, *V/V*)的萃取效果。Sostaric^[6]、De Jager^[7]等采用固相微萃取(solid phase micro-extraction, SPME)分别对香草兰豆荚和浸膏中几种挥发性成分做了定性和定量分析, 取得较好的效果。

一些学者认为SDE和SPME均存在一些优缺点, 因此可以将这2种方法联合使用、相互补充^[8-9]。吕健^[8]、Yu^[9]以及Zheng^[10]等联合使用SDE和SPME 2种方法对食品或香精中挥发性成分进行成分分析, 取得较好的效果。本实验在优化SPME萃取条件的基础上将其与SDE联合使用, 对采用单元式热空气发酵生香技术加工处理的中国海南地区香草兰豆荚中的挥发性成分进行初步探索, 为日后进一步深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

香草兰豆荚由中国热带农业科学院香料饮料研究所提供(一级), 采用单元式热空气技术发酵生香。

二氯甲烷(分析纯)、C₇~C₃₀烷烃标样 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

7890A气相色谱仪、5975C气相色谱-质谱仪 美国Agilent公司; 固相微萃取纤维头(100 μm PDMS、85 μm PA、65 μm PDMS/DVB、75 μm CAR/PDMS、50/30 μm DVB/CAR/PDMS)、手动固相微萃取装置 美国Supelco公司; 同时蒸馏萃取装置 天长市长城玻璃仪器制造厂。

1.3 方法

1.3.1 SDE

在文献[4]的操作条件基础上进行调整: 移取50 mL重蒸二氯甲烷于100 mL圆底烧瓶中, 再准确称取30 g经粉碎机粉碎的香草兰豆荚粉末置于500 mL圆底烧瓶中, 加入200 mL蒸馏水和少许沸石, 两烧瓶接在SDE装置的两端。用电热套对水溶液进行加热, 调节加热功率使水相保持微沸。同时用水浴锅加热有机溶液, 水浴温度保持在60 ℃, 同时蒸馏萃取2 h。萃取完成后收集有机相, 加入无水硫酸钠去除少量水分, 用旋转蒸发仪浓缩提取液至10 mL, 再吹氮浓缩至1 mL, 待分析。

1.3.2 SPME

准确称取经粉碎机粉碎的香草兰粉末2 g于15 mL固相微萃取瓶中, 加盖密封后置于指定温度的恒温水浴锅中预热20 min。将萃取头插入固相微萃取瓶并在指定温度下吸附特定时间。吸附结束后在气-质联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)仪进样口解吸, 解吸温度250 ℃、时间8 min。通过预实验分析, 选

择50、60、70、80、90 ℃ 5个温度梯度和10、20、30、40、50 min 5个时间梯度来优化萃取条件, 通过衡量萃取能力大小的萃取量(*Y*)来选择合适的萃取头:

$$Y_j = \frac{m}{n} \sum_{i=1}^n \frac{A_{ji}}{\sum_{j=1}^m A_{ji}}$$

式中: *i*为第*i*种挥发性成分; *j*为第*j*种萃取条件; *n*为挥发性成分的总数; *m*为萃取条件的总数; *A_{ij}*为第*j*种萃取条件下第*i*种挥发性成分的峰面积。

1.3.3 色谱条件

色谱柱: DB-5毛细管柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 升温程序: 起始温度40 ℃, 保持2 min, 然后以1.5 ℃/min的速率升温到65 ℃, 保持2 min, 再以0.5 ℃/min的速率升温到70 ℃, 再以5 ℃/min的速率升温到90 ℃, 再以3 ℃/min的速率升温到170 ℃, 最后以4 ℃/min的速率升温到290 ℃并保持2 min; 载气为He; 流速1 mL/min。2种萃取方法的进样方式均为不分流。

1.3.4 质谱条件

电子电离离子源; 离子源温度230 ℃; 四极杆温度150 ℃; 接口温度280 ℃; 扫描范围*m/z* 30~300。

1.3.5 定性、定量分析

各组分经仪器配置的NIST 08谱库进行检索, 再与文献报道的DB-5柱的保留指数(retention index, RI)比对进行定性分析。采用峰面积归一化法对各组分进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 SPME条件的优化

SPME条件一般包括萃取头、吸附时间、吸附温度^[11]。根据文献报道选择了香草兰中34种常见香气成分(表1)进行优化分析^[3-6,12]。

2.1.1 萃取头的筛选

萃取头涂层对香气成分的吸附具有一定的选择性, 其遵循“相似相容”的原则, 与气相色谱固定相对挥发性物质的吸附原理类似^[13], 因此萃取头材料的适当与否直接影响着最终萃取效果。本实验比较5种常用的萃取头在70 ℃、30 min条件下的萃取效果。

Tomislav等^[6]比较了PDMS、PA以及CW/DVB 3种萃取头萃取香草兰中挥发性成分的萃取效果, 结果显示PA萃取效果相对较好。然而从表1可以看出, 复合涂层萃取头DVB/CAR/PDMS、CAR/PDMS和DVB/PDMS可分别鉴定出34种常见香气成分中的25、29种和22种, 明显优于单一涂层PA(21种)和PDMS(14种)。这主要与涂层的极性有关, 不同极性的涂层选择吸附不同类型的化合物。香草兰中挥发性成分具有较广的极性范围, 而复合涂层对物质极性具有较广的选择性^[14], 因而复合涂层能检出

更多的物质。CAR/PDMS萃取头能测定出来的香气成分最多，而且包含了其他4种萃取头能检测出来的化合物，因此选择CAR/PDMS萃取头进行以下实验。

表1 5种萃取头的萃取效果

Table 1 Effect of five types of extraction fibers on extraction efficiency

化合物名称	萃取头				
	DVB/CAR/PDMS	CAR/PDMS	PDMS/DVB	PA	PDMS
苯甲醇 (benzyl alcohol)	+	+	+	+	-
苯乙醛 (benzeneacetaldehyde)	-	+	-	-	-
4-甲基苯酚 (phenol, 4-methyl-)	+	+	+	+	+
邻甲氧基苯酚 (phenol, 2-methoxy-)	+	+	+	+	+
苯乙醇 (phenylethyl alcohol)	+	+	+	+	-
2-甲氧基-4-甲基苯酚 (phenol, 2-methoxy-4-methyl-)	+	+	+	+	-
水杨酸甲酯 (methyl salicylate)	-	-	-	-	-
肉桂酸甲酯 (cinnamic acid methyl ester)	-	-	-	-	-
对甲氧基苯甲醛 (benzaldehyde, 4-methoxy-)	+	+	+	+	-
4-乙烯基-2-甲氧基苯酚 (2-methoxy-4-vinylphenol)	+	+	+	+	+
肉桂酸甲酯 (2-propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester)	+	+	+	+	+
4-羟基苯甲醛 (4-hydroxy benzaldehyde)	+	+	+	+	+
4-羟基-3-甲氧基苯甲醛 (vanillin)	+	+	+	+	+
4-羟基-3-甲氧基苯甲醇 (4-hydroxy-3-methoxybenzyl alcohol)	+	+	+	+	-
4-羟基-3-甲氧基苯乙酮 (ethanone, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl))	+	+	+	+	-
4-羟基-3-甲氧基苯甲酸 (benzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-)	-	-	-	-	-
4-羟基-苯甲酸 (4-hydroxy, benzoic acid)	-	-	-	-	-
正己醛 (hexanal)	+	+	+	+	+
(E)-2-庚烯醛 (2-heptenal, (E)-)	+	+	-	-	-
反式-2,4-庚二烯醛 (2,4-heptadienal, (E, E)-)	-	-	-	-	-
壬醛 (nonanal)	+	+	+	+	-
反式-2-壬烯醛 (2-nonenal, (E)-)	-	+	-	-	-
癸醛 (decanal)	-	+	-	-	-
反式-2-癸烯醛 (2-decenal, (E)-)	-	+	-	-	-
3,4-亚甲基二氧苯甲醚 (piperonal)	+	+	-	-	-
2,3-丁二醇 (结构1) (2,3-butanediol (iso1))	+	+	+	+	+
2,3-丁二醇 (结构2) (2,3-butanediol (iso2))	+	+	+	+	+
1-辛烯-3-醇 (1-octen-3-ol)	+	+	+	+	+
1-辛醇 (1-octanol)	+	+	-	-	-
2,3-丁二酮 (2,3-butanedione)	+	+	+	+	+
3-羟基-2-丁酮 (2-butanone, 3-hydroxy-)	+	+	+	+	+
1-辛烯-3-酮 (1-octen-3-one)	+	+	+	-	-
呋喃甲醛 (furfural)	+	+	+	+	+
乙酸 (acetic acid)	+	+	+	+	+
总共	25	29	22	21	14

注：+，检测到该物质；-，未能检测到该物质。

2.1.2 萃取时间和温度

萃取温度和时间直接影响吸附效果。当温度较低时样品挥发较慢，因而到达吸附平衡的时间较长，吸附的物质较少；而温度较高时，有利于快速达到吸附平衡，但会使分析物在涂层与基质中的分配系数降低，解吸速率增加，降低了萃取头吸附能力^[14-15]。另外温度太高可能会导致某些热不稳定挥发物质的分解，影响结果的准确性。当萃取时间太短时，分析物在涂层中的吸附量较少，不利于分析物的鉴定；而萃取时间太长则影响萃取效率。因此需要寻找最优的萃取温度和时间。

在探索最优萃取温度和萃取时间的实验中，通常做法是选择几种常见的挥发性成分，根据它们在不同萃取条件下的峰面积来判断^[11,15-16]，或是通过这些物质的总峰面积来选择^[4-5,17]。但是由于香草兰挥发性成分十分复杂，仅仅几种挥发性成分不具有代表性；另外由于香草兰中香气成分含量差别很大，某些微量的香气成分却对整体香气贡献非常大^[4-5,18]，若只对常见挥发性物质峰面积进行简单的加和或是通过总峰面积来选择合适的萃取条件，只能反映某些高含量挥发性物质的萃取信息。因此针对香草兰的特殊情况，通过1.3.2节的公式对CAR/PDMS检测出来的29种挥发性物质的峰面积进行转换，消除峰面积差异的影响，通过转换后的Y值来选择合适的萃取条件。

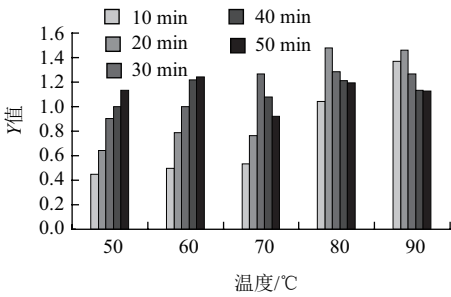


图1 萃取时间和温度对挥发性物质萃取效果的影响

Fig.1 Effects of extraction time and temperature on extraction efficiency

从图1可看出，在温度相对较低时（50、60℃），Y值随着萃取时间的延长而增加，其中在60℃条件下、吸附40 min以后Y值增长幅度较小，趋于稳定。而在温度相对较高时（70、80℃和90℃），Y值随着萃取时间的延长而呈现先增加后减少的趋势，分别在30、20、20 min达到峰值。

表2 SDE和SPME检测香草兰的挥发性成分

Table 2 The volatile compounds in vanilla identified by SDE and SPME

编号	保留时间/min	化合物名称	保留指数*		匹配度/%	相对含量/%	
			参考值	实验值		SPME	SDE
1	2.03	甲酸 (formic acid)			86	0.03	-
2	2.20	2,3-丁二酮 (2,3-butanedione)			97	1.86	0.41
3	2.70	乙酸 (acetic acid)			89	2.26	-
4	3.41	戊醛 (pentanal)			88	0.06	-
5	3.73	3-羟基-2-丁酮 (2-butanone, 3-hydroxy)	705		94	2.04	-
6	4.24	3-戊烯-2-酮 (3-penten-2-one)		719	90	0.06	-
7	5.12	2-甲基丙酸 (propanoic acid, 2-methyl-)	743	754	84	0.05	-
8	5.82	2,3-丁二醇 (结构1) (2,3-butanediol (iso1))	769	782	96	0.72	0.07
9	6.03	正己醛 (hexanal)	795	790	92	0.52	-
10	6.14	2,3-丁二醇 (结构2) (2,3-butanediol (iso2))	789	794	86	0.30	0.04
11	6.81	2-甲基四氢呋喃-3-酮 (3(2H)-furanone, dihydro-2-methyl-)		809	83	-	0.03
12	7.98	呋喃甲醛 (furfural)	830	827	96	1.19	0.73
13	8.95	反式-2-己烯醛 (2-hexenal, (E)-)	848	843	91	0.05	-
14	9.16	糠醇 (2-furanmethanol)	850	847	85	0.07	0.13
15	9.40	3-甲基丁酸 (butanoic acid, 3-methyl-)	840	850	86	0.06	0.15
16	9.79	2-甲基丁酸 (butanoic acid, 2-methyl-)	850	857	81	0.03	0.01

续表2

编号	保留时间/min	化合物名称	保留指数 ^a		匹配度/%	相对含量/%	
			参考值	实验值		SPME	SDE
17	10.55	2-烯-1,4-环戊二酮 (2-cyclopentene-1,4-dione)		869	94	—	0.08
18	11.18	2-乙酰基呋喃 (ethanone, 1-(2-furanyl)-)	904	879	95	—	0.01
19	11.66	庚醛 (heptanal)	896	887	87	0.09	—
20	12.21	(E,E)-2,4-己二烯醛 (2,4-hexadienal, (E,E)-)	909	896	90	0.07	—
21	12.63	2,3-二甲基吡嗪 (pyrazine, 2,3-dimethyl-)	916	903	88	0.01	—
22	15.57	(E)-2-庚烯醛 (2-heptenal, (E)-)	953	950	82	1.45	0.03
23	15.68	苯甲醛 (benzaldehyde)	957	952	81	0.15	0.08
24	16.73	β-蒎烯 (beta-pinene)		969	97	0.03	—
25	16.99	1-辛烯-3-酮 (1-octen-3-one)	974	974	95	0.40	0.01
26	17.48	1-辛烯-3-醇 (1-octen-3-ol)	980	981	88	0.38	0.03
27	17.90	2,2,4,6,6-五甲基庚烷 (heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl)		988	90	—	0.15
28	17.99	2-正戊基呋喃 (furan, 2-pentyl)	988	989	87	0.08	—
29	18.62	辛醛 (octanal)	1 002	999	92	0.70	—
30	19.84	己酸 (hexanoic acid)	1 001	1 000	85	0.16	0.13
31	20.00	反式-2,4-庚二烯醛 (2,4-heptadienal, (E,E)-)	996	1 000	93	0.18	—
32	21.97	2-异丙基苯 (benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-)		1 015	90	0.06	—
33	22.70	右旋萜二烯 (D-limonene)		1 023	97	0.54	—
34	23.51	苯甲醇 (benzyl alcohol)	1 032	1 033	97	0.29	0.16
35	23.89	3-辛烯-2-酮 (3-octen-2-one)	1 036	1 037	94	0.08	0.03
36	24.17	苯乙醛 (benzeneacetaldehyde)	1 039	1 040	95	0.09	0.10
37	25.96	反-2-辛烯醛 (2-octenal, (E)-)	1 062	1 061	93	0.25	—
38	27.06	2-乙酰基吡咯 (ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-)	1 069	1 074	83	—	0.02
39	27.38	2-烯-1-辛醇 (2-octen-1-ol, (Z)-)	1 069	1 077	88	0.31	0.04
40	27.99	1-辛醇 (1-octanol)	1 079	1 084	97	0.49	—
41	28.10	2-糠酸甲酯 (methyl 2-furoate)	1 084	1 086	81	—	0.04
42	28.26	4-甲基苯酚 (phenol, 4-methyl-)	1 079	1 087	97	0.63	0.47
43	28.88	邻甲氧基苯酚 (phenol, 2-methoxy-)	1 092	1 095	92	0.80	0.65
44	29.98	壬醛 (nonanal)	1 105	1 106	97	0.58	0.07
45	30.48	苯乙醇 (phenylethyl alcohol)	1 110	1 112	93	0.18	0.12
46	35.27	反式-2-壬烯醛 (2-nonenal, (E)-)	1 164	1 165	89	0.11	0.02
47	36.26	萘 (naphthalene)	1 179	1 177	90	0.25	0.01
48	37.04	2-甲氧基-4-甲基苯酚 (phenol, 2-methoxy-4-methyl-)	1 190	1 185	94	0.33	0.04
49	37.49	正辛酸 (octanoic acid)	1 183	1 188	90	0.04	0.01
50	37.54	2-癸酮 (2-decanone)	1 197	1 191	84	0.02	—
51	38.11	十二烷 (dodecane)	1 200	1 197	90	0.03	0.03
52	38.46	癸醛 (decanal)	1 204	1 202	92	0.06	—
53	38.92	反,反-2,4-壬二烯醛 (2,4-nonadienal, (E,E)-)	1 213	1 211	87	0.03	0.01
54	39.56	壬酸甲酯 (nonanoic acid, methyl ester)		1 222	89	0.06	—
55	39.62	2,3-二氢苯并呋喃 (benzofuran, 2,3-dihydro-)		1 224	85	—	0.03
56	40.69	4-糠基壬醛 (4-oxononanal)		1 243	80	—	0.02
57	41.01	对甲氧基苯甲醛 (benzaldehyde, 4-methoxy-)	1 244	1 249	90	0.06	0.04
58	41.53	4-烯丙基苯酚 (phenol, 4-(2-propenyl)-)		1 258	89	0.03	0.02
59	41.75	反式-2-癸烯醛 (2-decenal, (E)-)	1 261	1 262	84	0.84	0.06
60	42.07	3-苯基-2-丙烯醛 (cinnamaldehyde, (E)-)	1 276	1 268	93	0.01	—
61	42.84	4-甲氧基苯醇 (benzenemethanol, 4-methoxy-)	1 278	1 283	95	0.22	0.39
62	43.42	(E,Z)-2,4-癸二烯醛 (2,4-decadienal, (E,Z)-)		1 293	92	0.03	—
63	44.15	4-乙氧基-2-甲氧基苯酚 (2-methoxy-4-vinylphenol)	1 311	1 306	96	0.37	0.08
64	44.62	(E,E)-2,4-癸二烯醛 (2,4-decadienal, (E,E)-)	1 317	1 317	89	0.03	0.03
65	45.29	3,4-亚甲基二氧苯甲醛 (piperonal)	1 329	1 329	89	0.05	0.02
66	46.90	反式-2-十一碳烯醛 (2-undecenal, (E)-)	1 366	1 362	84	0.03	—
67	47.20	4-甲氧基苯甲酸甲酯 (benzoic acid, 4-methoxy-, methyl ester)	1 371	1 368	87	0.02	0.02
68	47.20	古巴烯 (copaene)		1 372	87	0.06	—
69	47.70	肉桂酸甲酯 (2-propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester)	1 380	1 378	94	0.05	0.04
70	48.02	4-羟基苯甲醛 (4-hydroxy benzaldehyde)		1 384	96	0.53	0.59
71	49.69	4-羟基-3-甲氧基苯甲醛 (vanillin)	1 403	1 421	97	78.88	89.29
72	51.75	4-羟基-3-甲氧基苯甲醇 (4-hydroxy-3-methoxybenzyl alcohol)	1 472		89	0.10	—

续表2

编号	保留时间/min	化合物名称	保留指数 ^a		匹配度/%	相对含量/%	
			参考值	实验值		SPME	SDE
73	52.98	4-羟基-3-甲氧基苯乙酮 (ethanone, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-)		1 501	92	0.06	0.13
74	53.99	4-乙酰氧基-3-甲氧基苯甲醛 (benzaldehyde, 4-(acetoxy)-3-methoxy-)	1 524	1 533	92	0.08	0.07
75	55.80	正十二酸 (dodecanoic acid)	1 566	1 567	88	—	0.12
76	56.12	4-羟基-3-甲氧基苯甲酸 (benzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-)		1 575	83	0.06	0.08
77	56.99	十六烷 (hexadecane)	1 600	1 596	95	0.08	0.04
78	59.63	1,6-二甲苯-4-异丙基萘 (naphthalene, 1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-)		1 659	86	—	0.03
79	63.24	十四酸 (tetradecanoic acid)	1 770	1 769	96	—	0.25
80	64.21	正十八烷 (octadecane)	1 800	1 796	94	—	0.03
81	64.97	十五碳酸甲酯 (pentadecanoic acid, methyl ester)		1 821	98	—	0.02
82	65.48	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮 (2-pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-)	1 848	1 840	92	0.06	0.30
83	66.31	十五酸 (pentadecanoic acid)	1 871	1 868	93	0.01	0.24
84	67.22	正十九烷 (nonadecane)	1 900	1 900	95	—	0.02
85	67.92	十六酸甲酯 (hexadecanoic acid, methyl ester)	1 927	1 925	92	0.02	0.16
86	68.48	3,7,11,15-四甲基-1-十六碳烯-3-醇 (isophytol)		1 945	87	—	0.03
87	69.33	十六酸 (n-hexadecanoic acid)	1 961	1 974	96	0.07	1.38
88	69.76	十六酸乙酯 (hexadecanoic acid, ethyl ester)	1 996	1 989	99	—	0.07
89	69.95	二十烷 (eicosane)	2 000	1 996	98	—	0.04
90	71.54	十七酸 (heptadecanoic acid)		2 061	99	—	0.02
91	72.22	亚油酸甲酯 (9,12-octadecadienoic acid, methyl ester)	2 101	2 089	97	—	0.17
92	72.36	亚麻酸甲酯 (9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester)		2 095	97	—	0.04
93	72.46	二十一烷 (heneicosane)	2 100	2 099	95	—	0.14
94	72.66	叶绿醇 (phytol)	2 104	2 108	90	—	0.10
95	73.30	亚油酸 (9,12-octadecadienoic acid)		2 134	99	—	0.29
96	73.42	亚麻酸 (9,12,15-octadecatrienoic acid)		2 139	98	—	0.16
97	73.95	十八酸 (octadecanoic acid)	2 167	2 161	91	—	0.04
98	74.80	二十二烷 (docosane)	2 200	2 196	93	—	0.15
99	76.40	二十四醇 (eicosanol)	2 273	2 270	94	—	0.12
100	77.05	二十三烷 (tricosane)	2 300	2 300	90	0.02	0.58
101	79.11	二十四烷 (tetracosane)	2 400	2 396	92	—	0.18
102	80.47	1-二十四醇 (1-tetracosanol)	2 456	2 465	98	—	0.12
103	80.96	二十五烷 (pentacosane)	2 500	2 490	99	—	0.19
104	83.02	二十六烷 (hexacosane)	2 600	2 595	90	—	0.03
105	84.87	二十七烷 (heptacosane)	2 700	2 698	94	—	0.04

注: *. 保留指数参考值通过数据库 (www.odour.org.uk) 和文献[20-24]报道确定; —. 未检测到。

高温条件下萃取效果随时间延长先上升后下降原因可能有2点: 一是所测物质挥发性相对较好, 在萃取头刚开始吸附时, 由于温度较高, 易挥发性成分从基质中快速挥发出来, 而半挥发性成分挥发较慢, 顶空中易挥发性成分浓度较高, 萃取头涂层对其快速吸附, 使易挥发性成分在基质、顶空和涂层中快速达到平衡; 然而随着时间的延长, 半挥发性香气成分逐渐挥发到顶空中, 与易挥发性成分竞争吸附萃取涂层, 导致已经吸附在涂层表面的易挥发性成分解吸, 最终导致吸附量的下降。二是随着时间延长, 基质中自由水和结合水蒸发析出, 使纤维头凝结水滴, 从而大大降低了纤维头对挥发性物质的吸附^[19]。因此综合上面的分析, 从萃取温度和时间方面综合考虑, 选择 80 ℃、20 min 作为最优的萃取条件进行以下实验。

2.2 SDE和SPME检测结果

在SPME条件优化的基础上, 将其与SDE联合使用, 对中国海南地区香草兰挥发性香气成分进行GC-MS分析, 两种方法检测结果见表3。两种方法共检测出105种挥发性成分, 其中SPME检测出73种, 同时SDE检测出78种。

表3 SDE和SPME检测结果的比较
Table 3 Comparisons of analytical results obtained for volatile compounds in vanilla by SDE and SPME

类型	相对含量/%		化合物种类		总计
	SPME	SDE	SPME	SDE	
芳香族	83.24	92.53	22	20	23
醛	5.04	0.24	16	6	17
酮	4.46	0.47	6	3	6
酸	2.76	2.71	10	13	16
醇	2.20	0.55	5	8	9
杂环	2.02	1.11	8	9	14
烷烃	0.19	1.93	4	14	14
酯	0.09	0.47	2	5	6

从表3可看出, SDE和SPME两种方法对芳香族化合物萃取能力均较强, 芳香族化合物的相对含量最高。

对于醛和酮类化合物, 在化合物相对含量和化合物种类两方面SPME的萃取效果均优于SDE, 而对于烷烃和酯类物质则正好相反。这可能是由于不同类型化合物挥发能力和水溶性的差异造成的。由表2可知, 香草兰中醛、酮类化合物主要是一些小分子化合物, 其挥发性优于分子质量相对较大烷烃和酯类化合物, 因而更易被SPME萃取涂层吸附。另外, 对鉴定出来的大分子烷烃和酯类化合物, 由于其水溶性比醛、酮类化合物要弱, 因此更易从水溶液中蒸馏出来, 被SDE检测到。

对于酸、醇以及杂环类物质, SDE萃取的化合物种类多于SPME, 但其相对含量小于或接近SPME。可能是由于这类化合物沸点分布范围比较广, 而SPME易受待测物质沸点的影响, 沸点较高的酸、醇及杂环类物质难以被检测, 因此SPME鉴别化合物种类比SDE少。但是SPME对低沸点物质有更好的亲和能力, 同时酸、醇类物质, 特别是小分子酸、醇类物质具有较强的水溶性, 不易从水中蒸馏出来, 因此导致SDE检测出来的这类物质相对含量较小。

由以上分析可知, SDE和SPME两种方法均存在一定的选择性, SPME侧重于萃取分子质量小、易挥发的物质, 而同时SDE则更侧重于萃取水溶较差物质, 而往往一些大分子物质极性较弱、水溶性较差。因此, 将两种方法联合使用则能相互弥补不足, 取得较好的萃取效果。

2.3 香草兰挥发性成分分析

在所有检测出来的物质中, 芳香族化合物在相对含量和数量方面均有明显的优势, 它们对香草兰香味贡献最大^[4-5]。在这些芳香族化合物中, 香兰素相对含量最

高, 是香草兰中最主要香气物质, 它主要来源于加工过程中香草兰内源 β -糖苷酶对其糖苷的水解作用^[25]。除香兰素外, 其他某些芳香族化合物含量虽然较低, 但对香草兰整体香气贡献较大。Perez-Silva等^[5]报道墨西哥地区的香草兰中邻甲氧基愈创木酚、愈创木酚、香草乙酮、香草醇含量低, 但其香气强度接近于香兰素。Dignum等^[26]报道邻甲氧基愈创木酚、愈创木酚、苯乙醇、4-甲基苯酚对香草兰整体香气有着非常重要的影响。Brunschwig等^[4]认为茴香醛和愈创木酚是塔西提岛地区香草兰关键香气成分, 这些香气成分在中国海南地区香草兰中均能检测到。

醛类化合物在香料香味中占有重要地位, 具有令人愉快的香气。由表3可知, 醛类化合物数量仅低于芳香族化合物的数量。Brunschwig等^[4]的研究表明, 在香草兰中, 醛类物质主要呈现水果、巧克力以及脂肪的香味, 其香气强度也仅低于以芳香族化合物为代表的茴香味和酚香味。这些醛类物质主要来源于脂肪酸的氧化, 其中以2-庚烯醛为代表的单烯醛主要来自油酸的自动氧化, 而以2,4-二癸烯醛两种异构体为代表的二烯醛则主要来自亚油酸的自动氧化^[12]。

香草兰中杂环类物质对香草兰整体香味也有一定的贡献。2-甲基四氢呋喃-3-酮、2-乙酰基吡咯等具有坚果类香气, 柠檬烯具有柠檬的味道, 但还有些物质, 如糠醛和糠醇具有苦味, 对香草兰整体香味产生不良影响。

香草兰中某些小分子酸、酮、醇类物质呈现出黄油味或植物味, 如2,3-丁二酮、3-羟基丁酮、2-甲基丁酸、异戊酸灯和1-辛烯-3-醇^[4-5]。这类物质主要来源于脂肪酸的受热氧化或耐热细菌, 如枯草芽孢杆菌的作用^[12]。醇类物质中的重要香味成分2,3-丁二醇则主要来源于加工过程中某些3-羟基丁酮的转化。酯类则主要来源于香草兰中酸与醇的相互作用。鉴定出来的烷烃主要是大分子类物质, 不易挥发, 因而对香草兰香气贡献不大。

3 结 论

本研究对SPME技术萃取香草兰挥发性成分的萃取条件进行优化, 得出最优条件为: 萃取头75 μm CAR/PDMS、萃取温度80 $^{\circ}\text{C}$ 以及萃取时间20 min。利用SPME和SDE两种方法对中国海南地区香草兰挥发性成分进行检测, 共检测出来105种挥发性成分, 其中利用SPME检测挥发性成分73种, 利用SDE检测出78种, 将这两种方法联合使用, 能相互补充各自的不足, 取得较好的萃取效果。

实验对中国海南地区香草兰挥发性成分进行初步的鉴定分析, 并给出每种物质的相对含量。但是并不能从其含量来准确判断哪些挥发性成分对香草兰整体香气贡献较大, 因为有些香味物质含量低却对整体香气贡献较

大, 此外有些香味物质在低含量时呈现香气, 但高浓度时则会表现出相反的效果。因此, 在今后的研究中, 有必要在本研究的基础上利用气相色谱-嗅辨仪联用等先进技术, 对各挥发性成分进行感官分析, 确定中国海南地区香草兰中特征香气成分。

参考文献:

- [1] 朱自慧. 海南发展香草兰种植模式初探[J]. 热带农业科学, 2003, 23(5): 27-29.
- [2] 魏来, 初众, 赵建平. 香草兰的药用保健价值[J]. 中国农学通报, 2009, 25(6): 249-251.
- [3] TOTH S J. Comparison and integration of analytical methods for the characterization of vanilla chemistry[D]. New Brunswick: The State University of New Jersey, 2012: 1-149.
- [4] BRUNSCHWIG C, SENGHER-EMONMOT P, AUBANEL M L, et al. Odor-active compounds of Tahitian vanilla flavor[J]. Food Research International, 2012, 46(1): 148-157.
- [5] PEREZ-SILVA A, ODOUX E, BART P, et al. GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans[J]. Food Chemistry, 2006, 99(4): 728-735.
- [6] SOSTARIC T, BOYCE M C, SPICKETT E E. Analysis of the volatile components in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(12): 5802-5807.
- [7] de JAGER L S, PERFETTI G A, DIACHENKO G W. Comparison of headspace-SPME-GC-MS and LC-MS for the detection and quantification of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products[J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1701-1709.
- [8] 吕健, 阮晓明, 盛志艺, 等. 固相微萃取与同时蒸馏萃取法分析香精成分比较[J]. 烟草科技, 2003(2): 25-28.
- [9] YU E J, KIM T H, KIM H K, et al. Aroma-active compounds of *Pinus densiflora* (red pine) needles[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2004, 19(6): 532-537.
- [10] ZHENG C H, KIM K H, KIM T H, et al. Analysis and characterization of aroma-active compounds of *Schizandra chinensis* (Omi) leaves[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(1): 161-166.
- [11] 汪立平. 苹果酒酿造中香气物质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004: 22-36.
- [12] SILVA A P, GUNATE Z, LEPOUTRE J P, et al. New insight on the genesis and fate of odor-active compounds in vanilla beans (*Vanilla planifolia* G.Jackson) during traditional curing[J]. Food Research International, 2011, 44(9): 2930-2937.
- [13] HIROYUKI K, HEATHER L, JANUSE P. Applications of solid-phase microextraction in food analysis[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 380(1/2): 35-62.
- [14] 张春林. 泸州老窖大曲的质量、微生物与香气成分关系[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 11-36.
- [15] 钟秋生. 普洱茶香气特征成分的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009: 11-17.
- [16] 陈计彦. 梨香气成分分析、变化及理化特征指标的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005: 29-40.
- [17] 左俊. 芒果香气成分分析及加工过程中芒果香气变化的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2008: 21-35.
- [18] DIGNUM M J W, VAN D H R, KERLER J, et al. Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla β -glucosidase[J]. Food Chemistry, 2004, 85(2): 199-205.
- [19] 戴水平, 肖作兵, 马双双, 等. 基于GC-MS/GC-O的新疆烤羊肉香气成分分析[J]. 食品工业, 2010(4): 89-92.
- [20] NOGUNIRA P C L, BITTRICH V, SHEPHERD G J, et al. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae)[J]. Phytochemistry, 2001, 56(5): 443-452.
- [21] LIU Jingke, TANG Xia, ZHANG Yuzong, et al. Determination of the volatile composition in brown millet, milled millet and millet bran by gas chromatography/mass spectrometry[J]. Molecules, 2012, 17(3): 2271-2282.
- [22] ANSORENA D, ASTIASARAN I, BELLO J. Influence of the simultaneous addition of the protease flavourzyme and the lipase novozym 677bg on dry fermented sausage compounds extracted by SDE and analyzed by GC-MS[J]. Food Chemistry, 2000, 48(6): 2395-2400.
- [23] ELAMRANI A, BENAÏSSA M. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ononis natrix* from Morocco[J]. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2010, 13(4): 165-171.
- [24] 田怀香, 王璋, 许时婴. GC-O法鉴别金华火腿中的风味活性物质[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(12): 117-123.
- [25] ODOUX E, CHAUWIN A, BRILLOUET J M. Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -D-glucosidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(10): 3168-3173.
- [26] DIGNUM M J W, KERLER J, VERPOORTE R. Vanilla curing under laboratory conditions[J]. Food Chemistry, 2002, 79(2): 165-171.