

顶空-气相色谱-四极杆质谱结合保留指数法 测定普洱茶香气成分

申明月, 刘玲玲, 聂少平*, 谢建华, 李 昌, 毛雪金, 王远兴, 谢明勇
(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 采用静态顶空-气相色谱-四极杆质谱技术对普洱茶的香气成分进行分析, 在利用NIST质谱检索库检索的基础上, 结合保留指数对化合物进行定性, 共鉴定出30种香气成分, 同时运用峰面积归一化法测得各香气组分的相对含量。结果表明: 所测普洱茶香气成分主要包括醇类、醛类、酮类、酯类和烃类5类物质, 其中醇类化合物和酯类化合物的含量最高, 分别占总香气物质成分的47.73%和40.97%。样品中含量较高的6个化合物相对标准偏差在4.11%~6.59%之间, 本法可为普洱茶香气成分的分析提供参考。

关键词: 普洱茶; 香气成分; 保留指数; 顶空分析; 气相色谱-质谱联用技术

Analysis of Aroma Components from Pu-erh Tea by Headspace-GC-MS Based on Retention Index

SHEN Ming-yue, LIU Ling-ling, NIE Shao-ping*, XIE Jian-hua, LI Chang, MAO Xue-jin, WANG Yuan-xing, XIE Ming-yong
(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: A static headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) method was used to analyze aroma components from Pu-erh tea. The separated peaks were identified by mass spectral library searching combined with retention index comparison. Thirty aroma components were identified from Pu-erh tea, mainly including alcohols (47.73%) and esters (40.97%). The precision expressed as relative standard deviation (RSD, $n = 6$) of the proposed method was in the range of 4.11%–6.59%. This method can be widely applied for the qualitative analysis of aroma components from Pu-erh tea.

Key words: Pu-erh tea; aroma components; retention index; headspace analysis; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

中图分类号: O656.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 06-0103-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201406021

普洱茶是云南省特有的地方名茶, 研究发现其具有降血脂、减肥、抗动脉硬化、防癌、抗氧化、防辐射等多种功效^[1]。普洱茶是以地理标志保护范围内的云南大叶种鲜叶为原料, 经杀青、揉捻、日晒等工序制成晒青毛茶, 再经渥堆、陈化及干燥等工序加工而成^[2]。普洱茶按发酵工艺可分为生普和熟普2个系列, 型制上又可分为散茶和紧压茶2类^[3]。普洱茶的香气成分与普洱茶的品质密切相关, 也是目前市场上决定普洱茶价格的重要因子^[4]。因此, 普洱茶特征香气成分的研究, 一直是普洱茶研究工作长期关注和研究的热点。

目前普洱茶的香气成分定性分析主要采用气相色谱-质谱法, 将各色谱峰对应的质谱图利用谱库检索, 匹配度越高, 定性的可靠性越高^[4-5]。然而在实际的样品分析过程中, 会发现普洱茶的香气成分往往含有多种同分

异构化合物, 因结构相似, 质谱图差别也不大, 采用常规质谱检索方法不易准确定性, 需要结合其他定性方法进行鉴定。1958年Kovats首次提出保留指数 (retention index, RI) 的概念^[6-7]; 在Kovats方程中, 保留指数以正构烷烃同系物作为参考标准, 所有与色谱保留行为有关的流体动力学参数在Kovats方程中被消去。所以, 保留指数与色谱分析的许多参数和条件无关, 能在定性中减少甚至消除具体实验条件 (如色谱柱、温度、升温条件、压力等) 的干扰, 具有很好的准确度和重现性^[6-7]。

本实验采用静态顶空-气相色谱-四极杆质谱 (headspace-gas chromatography-mass spectrometry, HS-GC-MS) 技术对普洱茶的香气成分进行分析, 在利用NIST质谱检索库检索的基础上, 结合保留指数对化合物进行定性, 并利用峰面积归一化法计算得到普洱茶各香

收稿日期: 2013-10-12

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目 (NCET-12-0749); 江西省高等学校科技落地计划项目 (产学研合作) (KJLD13004)

作者简介: 申明月 (1984—), 女, 博士研究生, 研究方向为食品化学与分析技术。E-mail: shenmingyue1107@163.com

*通信作者: 聂少平 (1978—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与分析、食品营养与安全、糖化学与糖生物学。

E-mail: spnie@ncu.edu.cn

气成分的相对含量,结果显示该定性分析策略和香气成分检测方法具有较大的优越性,可为普洱茶香气成分的分析提供方法参考。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

供试茶样为昆明七彩云南庆沣祥茶叶股份有限公司生产的云南普洱茶(茉莉大叶晒青茶,紧压茶),将普洱茶样品按GB/T 8303—2002《茶:磨碎试样的制备及其干物质含量测定》的要求粉碎,称取5.00 g茶样于20 mL顶空进样瓶中,压紧瓶盖,进行HS-GC-MS检测。正构烷烃($C_6 \sim C_{10}$ 、 $C_{10} \sim C_{20}$) 美国AccuStandard公司。

1.2 仪器与设备

7890A-7000B三重串联四极杆气相色谱-质谱联用仪(配有Agilent G1888A自动顶空进样器、Masshunter工作站(Version B.03.01)工作站) 美国Agilent公司。

1.3 方法

1.3.1 HS-GC-MS 分析条件

顶空条件^[8]:进样环体积1 mL,样品瓶加压压力10 psi,加压时间0.5 min,充气时间0.5 min,进样时间1 min,进样环温度110 ℃,传输线温度130 ℃,样品瓶的平衡温度和平衡时间分别在60~100 ℃和15~40 min之间进行优化。

GC条件^[9]:进样口温度:250 ℃;分流比:1:1;色谱柱为HP-5MS(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)毛细管色谱柱;升温程序:起始温度50 ℃,停留2 min,以3 ℃/min的速率升至200 ℃,保持10 min;载气为高纯氮气(纯度≥99.999%),载气流速:1 mL/min(恒流模式)。

MS条件:电子电离(electron ionization, EI)源;电子电离能量:70 eV;离子源、四极杆与传输线温度分别为230、150、250 ℃;溶剂延迟:3 min;质量扫描方式为全扫描,质量扫描范围 m/z 40~500;质谱数据运用NIST 2008(Version 2.0 f)质谱数据库进行图谱检索。

1.3.2 普洱茶香气成分保留指数的测定

单一线性程序升温的条件下保留指数计算公式^[6-7]:
 $RI = 100n + 100(T_{Rx} - T_{Rn}) / (T_{Rn+1} - T_{Rn})$; RI为待测组分的保留指数; T_{Rx} 为待测组分的保留时间; n 和 $n+1$ 分别表示正构烷烃的碳原子数; $T_{Rn} < T_{Rx} < T_{Rn+1}$ 。

2 结果与分析

2.1 顶空平衡条件的优化

将密封好的顶空瓶置于顶空进样器内,分别设置样品瓶的平衡温度为60、70、80、90、100 ℃,平衡30 min后进行测定。从图1可看出,平衡温度越高,普洱茶样品

释放出来的香气组分的数量与丰度都随之增多,而当平衡温度高于90 ℃时测得的香气组分的数量与丰度趋于稳定。为避免普洱茶样品加热过度使一些性质不稳定的香气组分发生热分解、氧化等反应而产生新的成分,选择顶空的平衡温度为90 ℃。此外,在平衡温度90 ℃的条件下,将顶空瓶密封好后分别平衡15、20、25、30、35、40 min,从图2可以看出,当平衡时间达到30 min后,测定结果趋于稳定,因此选择样品的平衡时间为30 min。

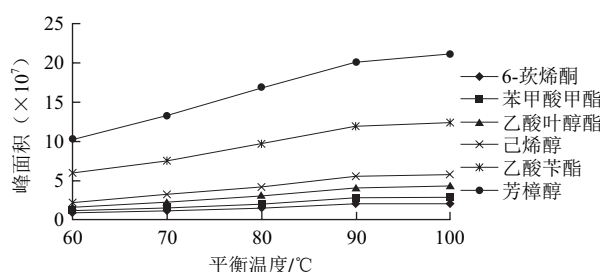


图1 顶空分析中样品平衡温度对主要香气成分的影响

Fig.1 Effect of headspace heating temperature on peak area of aroma components

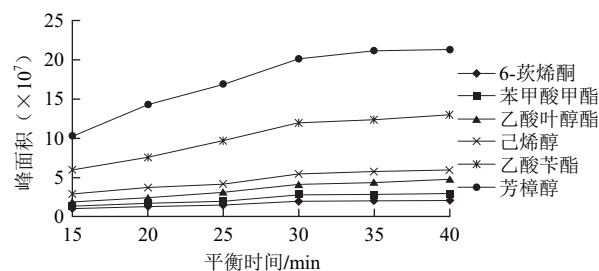


图2 顶空分析中样品平衡时间对主要香气成分的影响

Fig.2 Effect of headspace heating time on peak area of aroma components

2.2 分析方法的精密度

6次平行测定普洱茶样品中含量较高的6个化合物的相对标准偏差分别为:4.11%(芳樟醇)、5.39%(乙酸苄酯)、5.04%(己烯醇)、6.59%(乙酸乙酯)、6.27%(苯甲酸甲酯)、4.98%(6-苄烯酮)。化合物含量的相对标准偏差均小于10%,符合方法的要求。

2.3 普洱茶香气成分检测结果

根据NIST 2008质谱图库检索结果,结合保留指数文献值^[10-26]对普洱茶香气成分进行了鉴定,共得到30种化合物,同时运用峰面积归一化法测得各香气组分的相对百分含量,结果详见表1。由鉴定结果可知,普洱茶香气成分十分复杂,并且相对含量差别也很大。通过比较分析普洱茶香气成分,可以看出它们主要包括醇类、醛类、酮类、酯类和烃类5类物质,其中醇类化合物有4种,相对含量为47.73%;酯类化合物有6种,

相对含量为40.97%；酮类化合物有2种，相对含量为6.23%；烃类化合物有16种，相对含量为4.77%。在16种烃类化合物中大部分都是单萜烯类和倍半萜烯类物质，其中单萜烯类物质有4种，相对含量为2.29%；倍半萜烯类物质有9种，相对含量为1.39%。普洱茶所含香气组分相对含量超过3%的组分有6种，依次为芳樟醇（36.71%）、乙酸苄酯（23.40%）、己烯醇（10.67%）、乙酸叶醇酯（7.96%）、苯甲酸甲酯（4.64%）、6-苄烯酮（3.99%）。

表1 普洱茶香气成分定性分析结果
Table 1 Aroma components identified from Pu-erh tea

序号	定性方式	化合物	分子式	RI _{exp}	RI _{lit}	相对含量/%
1	RI, MS	5,5-二甲基-2-乙基-1,3-环戊二烯 5,5-dimethyl-2-ethyl-1,3-cyclopentadiene	C ₉ H ₁₄	825	827 ^[10]	0.62
2	RI, MS	己烯醇 (Z)-3-hexenol	C ₈ H ₁₆ O	869	870 ^[11]	10.67
3	RI, MS	苯甲醛 benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	937	936,937 ^[10,12]	0.28
4	RI, MS	6-甲基-5-庚烯-2-酮 6-methyl-5-hepten-2-one	C ₉ H ₁₆ O	970	971 ^[10]	2.24
5	RI, MS	乙酸叶醇酯 (Z)-3-hexenyl acetate	C ₉ H ₁₆ O ₂	1010	1005 ^[13]	7.96
6	RI, MS	柠檬烯 limonene	C ₁₀ H ₁₆	1028	1029 ^[14]	1.57
7	RI, MS	顺式-β-罗勒烯 (Z)-β-ocimene	C ₁₀ H ₁₆	1039	1038,1040 ^[14,15]	0.1
8	RI, MS	反式-β-罗勒烯 (E)-β-ocimene	C ₁₀ H ₁₆	1050	1049,1048 ^[16,17]	0.4
9	RI, MS	萜品烯 γ-terpinene	C ₁₀ H ₁₆	1059	1059 ^[17,18]	0.22
10	RI, MS	反式-氧化芳樟醇 trans-linalool oxide	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	1076	1076,1074 ^[14,15]	0.32
11	RI, MS	6-苄烯酮 6-camphenone	C ₁₀ H ₁₄ O	1093	1093 ^[17]	3.99
12	RI, MS	苯甲酸甲酯 methyl benzoate	C ₈ H ₈ O ₂	1098	1097 ^[19]	4.64
13	RI, MS	芳樟醇 linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	1106	1102,1107 ^[20,21]	36.71
14	RI, MS	乙酸苄酯 benzyl acetate	C ₉ H ₁₀ O ₂	1168	1169 ^[13]	23.40
15	MS	萘 naphthalene	C ₁₀ H ₈		1182	0.42
16	RI, MS	水杨酸甲酯 methyl salicylate	C ₉ H ₈ O ₃	1195	1195 ^[22]	2.21
17	RI, MS	吲哚 indole	C ₈ H ₇ N	1294	1292,1296 ^[23,24]	0.04
18	RI, MS	邻氨基苯甲酸甲酯 methyl anthranilate	C ₉ H ₉ NO ₂	1341	1346 ^[25]	2.1
19	RI, MS	α-蒎烯 α-pinene	C ₁₀ H ₁₆	1349	1351,1347 ^[17,25]	0.03
20	RI, MS	丁香酚 eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1359	1356,1359 ^[20,26]	0.03
21	RI, MS	α-古巴烯 α-copaene	C ₁₄ H ₂₄	1375	1376,1375 ^[17,20,26]	0.04
22	MS	正十四烷 tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	1399		0.05
23	RI, MS	顺式-β-石竹烯 (Z)-β-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	1407	1408 ^[26]	0.03
24	RI, MS	α-古芸烯 α-gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	1410	1409 ^[15,20]	0.05
25	RI, MS	反式-β-石竹烯 (E)-β-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	1418	1420,1419 ^[17,26]	0.05
26	RI, MS	γ-衣兰烯 γ-muurolene	C ₁₅ H ₂₄	1476	1477,1475 ^[17,25]	0.04
27	RI, MS	(E,E)-α-法呢烯 (E,E)-α-farnesene	C ₁₅ H ₂₄	1508	1504,1508 ^[18,28]	0.95
28	RI, MS	γ-萜品烯 γ-cadinene	C ₁₅ H ₂₄	1513	1513 ^[15,17]	0.07
29	RI, MS	δ-萜品烯 δ-cadinene	C ₁₅ H ₂₄	1523	1524 ^[15,17]	0.13
30	MS	苯甲酸叶醇酯 (Z)-3-hexenyl benzoate	C ₁₃ H ₁₆ O ₂	1571		0.66

注：RI，通过文献保留指数与实测保留指数比对定性；MS，通过 NIST 质谱库检索定性；RI_{exp}，实测保留指数值；RI_{lit}，文献保留指数值。

3 结论

普洱茶香气成分中含有多组同分异构体，分子式为C₁₀H₁₆的组分有4个（均为单萜烯），分子式为C₁₅H₂₄的组分有9个（均为倍半萜烯）。由于结构相似，其在 NIST 质谱数据库中的图谱非常相似，因此仅依靠谱库检索结果来定性有可能会出现错误的鉴定结果。如图

3所示，峰8、9具有几乎相同的质谱图，且谱图直接检索的结果皆为3-萜烯；参考保留指数文献值^[17]可发现，3-萜烯的保留指数为1010，而峰8、9的保留指数分别为1050和1059，这说明谱图直接检索的结果是不可靠的。此时将峰8、9的保留指数值与文献[16-18]对比就很容易确定两峰所对应的化合物，即峰8应为反式-β-罗勒烯，峰9应为萜品烯。

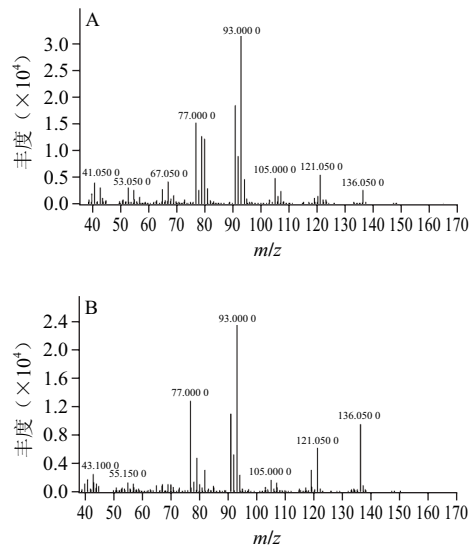


图3 峰8 (A) 与峰9 (B) 电子电离质谱图
Fig.3 Mass spectra of Peak 8 (A) and Peak 9 (B)

采用保留指数结合NIST质谱谱库检索对普洱茶香气成分进行了定性分析，共鉴定出30种香气成分，主要包括醇类、醛类、酮类、酯类和烃类5类物质，同时运用峰面积归一化法测得各香气组分的相对百分含量。实验结果表明静态顶空-气相色谱-保留指数-质谱分析是一种快速有效分析普洱茶香气成分的方法，该分析策略弥补了常规GC-MS谱库检索定性方法的不足，大大提高了定性分析的准确性和效率，使定性结果更加可靠。该定性分析思路应用在其他复杂样品挥发性成分检测中也拥有巨大的潜力和独特的优势，值得进一步研究推广。

参考文献：

- [1] 张新富, 龚加顺, 周红杰, 等. 云南普洱茶中多酚类物质与品质的关系研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 230-233.
- [2] 罗龙新, 吴小崇, 邓余良, 等. 云南普洱茶渥堆过程中生化成分的变化及其与品质形成的关系[J]. 茶叶科学, 1998, 18(1): 53-60.
- [3] 周健, 成浩, 叶阳, 等. 滇青、青饼和普洱茶(熟饼)近红外指纹图谱分析[J]. 核农学报, 2009, 23(1): 110-113.
- [4] 张灵枝, 陈维信, 王登良, 等. 不同干燥方式对普洱茶香气的影响研究[J]. 茶叶科学, 2007, 27(1): 71-75.
- [5] 卢红, 李庆龙, 王明凡, 等. 陈化普洱茶与原料绿茶的挥发性成分比较分析[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28(5): 820-824.
- [6] BIANCHI F, CARERI M, MANGIA A, et al. Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-

- programmed gas chromatography: database creation and evaluation of precision and robustness[J]. Journal of Separation Science, 2007, 30(4): 563-572.
- [7] GONZALEZ F R, NARDILLO A M. Retention index in temperature-programmed gas chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 842(1/2): 29-49.
- [8] 张雅楠, 黄军根, 聂少平, 等. 顶空气相色谱-质谱法检测市售热加工食品中的呋喃[J]. 南昌大学学报: 工科版, 2012, 34(2): 107-119.
- [9] 杨莉, 于生, 丁安伟, 等. GC-MS联用技术分析鉴定薄荷中挥发性成分[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(2): 22-24.
- [10] le ROUX M, CRONJE J C, BURGER B V, et al. Characterization of volatiles and aroma-active compounds in honeybush (*Cyclopia subternata*) by GC-MS and GC-O analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(10): 2657-2664.
- [11] TAN W N, WONG K C, KHAIRUDDEAN M, et al. Volatile constituents of the fruit of *Garcinia atroviridis* and their antibacterial and anti-inflammatory activities[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2013, 28(1): 2-9.
- [12] DJABOU N, ANDREANI S, VARESI L, et al. Analysis of the volatile fraction of *Teucrium marum* L.[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2013, 28(1): 14-24.
- [13] ALAGARMALAI J, NESTEL D, DRAGUSHICH D, et al. Identification of host attractants for the Ethiopian fruit fly, *Dacus ciliatus* Loew[J]. Journal of Chemical Ecology, 2009, 35(5): 542-551.
- [14] MAIETTI S, ROSSI D, GUERRINI A, et al. A multivariate analysis approach to the study of chemical and functional properties of chemodiverse plant derivatives: lavender essential oils[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2013, 28(3): 144-154.
- [15] YAMINI Y, KHAJEH M, GHASEMI E, et al. Comparison of essential oil compositions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydro distillation methods[J]. Food Chemistry, 2008, 108(1): 341-346.
- [16] LIN Jianming, ROUSEFF R L, BARROS S, et al. Aroma composition changes in early season grapefruit juice produced from thermal concentration[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(4): 813-819.
- [17] SALIDO S, ALTAREJOS J, NOGUERAS M, et al. Chemical studies of essential oils of *Juniperus oxycedrus* ssp. *badia*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 81(1): 129-134.
- [18] FIRUZI O, ASADOLLAHI M, GHOLAMI M, et al. Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species[J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 117-122.
- [19] ROUT P K, NAIK S N, RAO Y R. Composition of the concrete, absolute, headspace and essential oil, of the flowers of *Michelia champaca* Linn.[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2006, 21(6): 906-911.
- [20] JAVIDNIA K, MIRI R, JAMALIAN A. Composition of the essential oil of *Salvia macrosiphon* Boiss. from Iran[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2005, 20(5): 542-543.
- [21] HOGNADOTTIR A, ROUSEFF R L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 998(1/2): 201-211.
- [22] FOREROR M D, QUIJANO C E, PINO J A. Volatile compounds of chile pepper (*Capsicum annum* L. var. *glabrusculum*) at two ripening stages[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2009, 24(1): 25-30.
- [23] IBRAHIM M A, EGIGU M C, KASURINEN A, et al. Diversity of volatile organic compound emissions from flowering and vegetative branches of Yeheb, *Cordeauxia edulis* (Caesalpiniaceae), a threatened evergreen desert shrub[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2010, 25(2): 83-92.
- [24] FERNANDO L N, GRUN I U. Headspace-SPME analysis of volatiles of the ridge gourd (*Luffa acutangula*) and bitter gourd (*Momordica charantia*) flowers[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2001, 16(4): 289-293.
- [25] HAMM S, LESELLIER E, BLETON J, et al. Optimization of headspace solid phase microextraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1018(1): 73-83.
- [26] BENKACI-ALI F, BAALIOUAMER A, MEKLATI B Y, et al. Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2007, 22(2): 148-153.