

银杏外种皮挥发性成分分析

韩 帅, 苗志伟, 刘玉平*, 孙宝国

(北京工商大学食品学院, 食品风味化学北京市重点实验室, 北京 100048)

摘 要: 采用同时蒸馏萃取和固相微萃取两种萃取技术提取银杏外种皮的挥发性成分, 并采用气相色谱-质谱联用对其挥发性物质成分进行分离鉴定。结果共鉴定出 29 种挥发性化合物, 包括酸类 9 种、酯类 9 种、酮类 3 种、醛类 1 种、醇类 4 种、烃类 1 种、杂环类化合物 2 种, 两种萃取物中都鉴定出的挥发性成分有 12 种。经 SDE-GC-MS 分析出的相对含量较高(峰面积比 > 1%)的化合物有己酸(65.88%)、丁酸(21.46%)、棕榈酸(4.53%)、辛酸(1.15%); 经固相微萃取-气相色谱-质谱联用分析出的相对含量较高(峰面积比 > 1%)的化合物有丁酸(59.96%)、己酸(25.45%)、己酸甲酯(3.90%)、丁酸甲酯(3.59%)、乙酸(1.65%)。根据分析出的挥发性成分的香气特征可知对银杏外种皮挥发性气味贡献较大的物质有丁酸、己酸、丁酸甲酯和己酸甲酯等。

关键词: 银杏外种皮; 挥发性成分; 同时蒸馏萃取; 固相微萃取; 气相色谱-质谱联用

Extraction and Analysis of Volatile Flavor Constituents from *Ginkgo biloba* Exocarp

HAN Shuai, MIAO Zhi-wei, LIU Yu-ping*, SUN Bao-guo

(School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing 100048, China)

Abstract: The volatile constituents of *Ginkgo Biloba* exocarp were extracted by solid phase microextraction (SPME) or simultaneous distillation-extraction (SDE) and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. As a result, 29 compounds were identified, including 9 carboxylic acids, 9 esters, 3 ketones, 1 aldehyde, 4 alcohols, 1 hydrocarbon and 2 heterocyclic compounds. Both extraction methods allowed the identification of 12 volatile compounds. AS determined by SDE-GC-MS, hexanoic acid (65.88%), butanoic acid (21.46%), n-hexadecanoic acid (4.53%) and octanoic acid (1.15%) were predominant among them. The predominant compounds determined by SPME-GC-MS were butanoic acid (59.96%), hexanoic acid (25.45%), methyl hexanoate (3.90%), methyl butyrate (3.59%) and acetic acid (1.65%). Butanoic acid, hexanoic acid, methyl butyrate, methyl hexanoate, etc made a greater contribution to the odor characteristics of *Ginkgo Biloba* exocarp.

Key words: *Ginkgo biloba* exocarp; volatile constituents; simultaneous distillation-extraction (SDE); solid phase microextraction (SPME); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)14-0146-04

银杏(*Ginkgo biloba* L.), 又名白果, 为雌雄异株的落叶乔木。它是现存裸子植物中最古老的孑遗植物之一, 其叶、果、外种皮等皆具有药用开发价值^[1]。银杏外种皮, 又称假种皮, 是银杏核果外包覆的肉质果肉, 表皮外覆盖一层白粉, 成熟时呈橙黄色或淡黄色。银杏外种皮约占银杏果整果质量的 75%, 但在银杏加工过程中多采取浸泡或阴暗处堆放的方法, 使其发酵腐败

作为废料丢弃。据统计, 我国每年丢弃的银杏外种皮废料约有 2.4 万 t^[2], 而其中所含的酚酸类物质则渗入地下或进入地表水体, 这既浪费资源, 又会对环境造成污染。近年来, 国内逐步开展了对银杏外种皮所含有效成分的研究, 发现其中含有生物碱、酚酸类、黄酮类和多糖类等多种生物活性物质^[2], 但鲜见对其挥发性成分提取与分析的研究报道。目前常用的挥发性物质提

收稿日期: 2012-03-28

基金项目: “十一五” 国家科技部支撑计划项目(2011BAD23B01);

北京市教育委员会科技发展计划重点项目(KZ201110011015)

作者简介: 韩帅(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品香料香精。E-mail: hshuaihs@163.com

* 通信作者: 刘玉平(1969—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为香料化学。E-mail: liuyup@th.btbu.edu.cn

取方法有同时蒸馏萃取、溶剂辅助蒸发、顶空萃取、固相微萃取等。本实验采用同时蒸馏萃取(simultaneous distillation-extraction, SDE)和固相微萃取(solid phase microextraction, SPME)两种方法提取了银杏外种皮的挥发性成分,并结合气-质联用技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)进行分离鉴定,为准确全面地了解其挥发性成分,更好地开发利用我国的银杏资源提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

银杏外种皮,于2011年9月采自北京工商大学校内;二氯甲烷(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;无水硫酸钠(分析纯) 北京化工厂;C₇~C₃₀正构烷烃(色谱纯) 美国 Supelco 公司。

1.2 仪器与设备

6890N/5973I 气相色谱-质谱联用仪 美国安捷伦公司;75 μm Carboxen/PDMS 萃取头、手动 SPME 进样器 美国 Supelco 公司;同时蒸馏萃取装置 肯堡博美(北京)实验器皿有限公司;DF-IO1S 集热式恒温加热磁力搅拌器 河南省子华仪器有限公司;N-Evap 系列氮吹仪 美国 Organomation 公司。

1.3 方法

1.3.1 纯化二氯甲烷

将分析纯二氯甲烷进行重蒸处理,去掉前后各30mL,得中间馏分待用。

1.3.2 同时蒸馏萃取样品制备

取成熟的银杏外种皮鲜果肉50g放入500mL的圆底烧瓶中,再加入300mL去离子水和适量沸石,置于同时蒸馏装置的一端,油浴加热,温度控制在(120 ± 1)℃。另取50mL重蒸的二氯甲烷置于100mL圆底烧瓶中,加入沸石,再置于同时蒸馏装置的另一端,恒温水浴加热,温度控制在(50 ± 1)℃,连续蒸馏萃取4h。萃取结束,将萃取液用无水硫酸钠干燥,置于冰箱中冷冻脱水,过滤,滤液在52℃水浴条件下用 Vigreux 柱浓缩至约5mL,再用氮吹仪进一步浓缩至约1mL。

1.3.3 固相微萃取样品处理

将萃取头置于 GC-MS 仪的气相色谱进样口中,在250℃老化至无杂峰。称取4.96g成熟的银杏外种皮鲜果肉,剪碎后置于15mL固相微萃取样品瓶中,30℃恒温水浴条件下平衡30min,使银杏外种皮果肉的挥发性成分在顶空与果肉间达到平衡。将老化好的萃取头插入样品瓶的顶空部分,30℃萃取40min,拔出萃取头,置于气相色谱进样口,于250℃解吸10min。

1.3.4 GC-MS 分析条件

色谱条件:色谱柱为 DB-WAX(30.0m × 250 μm, 0.25 μm);色谱柱起始温度35℃,保持2min,以3℃/min的速率升至120℃,保持10min,以6℃/min的速率升至230℃,保持2min;载气 He,载气流量1.0mL/min;分流比20:1;SDE 萃取液样品进样量为1.0 μL。

质谱条件:电子电离(electron ionization, EI)源,电子能量70eV,离子源温度230℃,四极杆温度150℃,扫描模式为 Scan,扫描质量范围20~350u,同时蒸馏萃取获得的样品进样时溶剂延迟4.8min,固相微萃取进样时无溶剂延迟。

1.3.5 正构烷烃保留时间的确定

取0.2 μL C₇~C₃₀正构烷烃的混合物在1.3.4节 GC-MS 条件下进行分析,得到 C₇~C₃₀ 正构烷烃的保留时间,用于保留指数的计算。

1.4 数据处理

定性分析:挥发性物质的鉴定结果以检索 NIST 08 谱库及计算保留指数并与文献值进行比对为主,结合人工解析谱图进行确定。保留指数计算式为^[3]:

$$I = 100 \times \{n + [t(i) - t(n)] \div [t(n+1) - t(n)]\}$$

式中: $t(n)$ 为具有 n 个碳原子的正构烷烃的保留时间; $t(n+1)$ 为具有 $(n+1)$ 个碳原子的正构烷烃的保留时间; $t(i)$ 为待测组分的保留时间,且 $t(n) < t(i) < t(n+1)$ 。

定量分析:采用峰面积归一化法进行定量分析,求得各挥发性成分的相对含量。

2 结果与分析

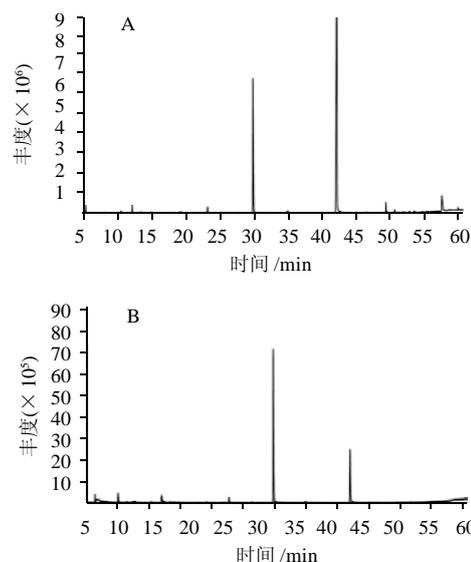


图1 银杏外种皮 SDE 提取物(A)和 SPME 提取物(B)的挥发性成分总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of volatile compounds extracted by SDE (A) and SPME (B) from *Ginkgo biloba* exocarp

以二氯甲烷为溶剂, 采用同时蒸馏萃取法, 萃取时间为 4h, 所得萃取液经浓缩后进行 GC-MS 分析, 所得质谱总离子流图如图 1A 所示。采用固相微萃取法在 30℃ 水浴条件下萃取 40min 进行 GC-MS 分析, 所得质谱总离子流图如图 1B 所示。

银杏外种皮 SDE 和 SPME 萃取物的 GC-MS 分析结果通过计算保留指数和检索 NIST 08 谱库两种鉴定方法共同确定, 共鉴定出 29 种物质, 具体鉴定结果见表 1。

从表 1 可知, 银杏外种皮的 SDE 萃取物经 GC-MS 分析, 鉴定出 29 种挥发性组分, 占色谱流出组分的 97.58%,

包括酸类 9 种、酯类 9 种、酮类 3 种、醛类 1 种、烃类 1 种和杂环类化合物 2 种。酸类化合物的相对含量最高, 达到 93.50%; 其次是酯类化合物, 相对含量为 2.13%; 再次是杂环类化合物、酮类化合物和醇类化合物, 其相对含量依次为 0.74%、0.62% 和 0.47%; 烃类化合物和醛类化合物的含量最少, 均为 0.06%。银杏外种皮的 SPME 萃取物经分析共鉴定出 12 种挥发性成分物质, 占色谱流出组分的 97.52%, 包括酸类 5 种、酯类 4 种、醇类 3 种, 相对含量分别为 87.17%、9.93% 和 0.42%。

表 1 银杏外种皮的挥发性成分及相对含量

Table 1 Volatile compounds and their relative contents in *Ginkgo biloba* exocarp determined by SDE or SPME coupled to GC-MS

化合物种类	保留时间/min	化合物名称	相对含量/%		匹配度/%	保留指数 计算值/文献值	定性方法
			SDE	SPME			
酸类	22.82	乙酸acetic acid	0.04	1.65	90	1428/1402 ^[4]	MS/RI
	26.39	丙酸propanoic acid	0.03	0.13	90	1516/1502 ^[4]	MS/RI
	29.79	丁酸butanoic acid	21.46	59.96	91	1601/1580 ^[5]	MS/RI
	34.9	戊酸pentanoic acid	0.17	0.29	83	1712/1720 ^[6]	MS/RI
	42.13	己酸hexanoic acid	65.88	25.45	83	1830/1798 ^[5]	MS/RI
	46.51	庚酸heptanoic acid	0.13		86	1933/1900 ^[6]	MS/RI
	49.36	辛酸octanoic acid	1.15		93	2037/2053 ^[7]	MS/RI
	56.95	月桂酸dodecanoic acid	0.11		93	2464/2424 ^[8]	MS/RI
	57.58	棕榈酸n-hexadecanoic acid	4.53		99	2608	MS
		小计	93.50	87.17			
酯类	5.22	丁酸甲酯 methyl butyrate	0.65	3.59	91	972	MS
	6.62	丁酸乙酯 ethyl butyrate	0.04	0.20	93	1024/1018 ^[9]	MS/RI
	12.05	己酸甲酯 methyl hexanoate	0.98	3.90	95	1174/1191 ^[6]	MS/RI
	13.41	丁酸丁酯 butyl butyrate	0.09	0.24	72	1207	MS
	14.05	己酸乙酯 ethyl hexanoate	0.05		90	1222/1238 ^[6]	MS/RI
	17.62	异丁酸丙酯 propyl isobutyrate	0.03		72	1306	MS
	21.73	己酸丁酯 butyl hexanoate	0.02		64	1402/1402 ^[6]	MS/RI
	52.82	棕榈酸甲酯 methyl palmitate	0.12		94	2205	MS
	53.51	棕榈酸乙酯 ethyl palmitate	0.15		95	2245/2214 ^[8]	MS/RI
		小计	2.13	9.93			
酮类	4.99	2,3-丁二酮 2,3-butanedione	0.19		72	961/955 ^[10]	MS/RI
	48.61	3-甲基-5-乙基-2-环己烯-1-酮 3-methyl-5-propyl-2-cyclohexen-1-one	0.02		64	2005	MS
	50.63	4,5-二甲基-2-环己烯-1-酮 4,5-dimethyl-2-cyclohexen-1-one	0.41		60	2093	MS
		小计	0.62				
醛类	7.99	己醛 hexanal	0.06		72	1066/1067 ^[11]	MS/RI
		小计	0.06				
醇类	10.41	正丁醇 1-butanol	0.21	0.17	91	1133/1140 ^[12]	MS
	14.76	正戊醇 1-pentanol	0.06	0.10	78	1239/1247 ^[13]	MS
	19.16	正己醇 1-hexanol	0.13	0.15	86	1342/1311 ^[8]	MS/RI
	27.64	正辛醇 1-octanol	0.07		86	1547/1511 ^[8]	MS/RI
		小计	0.47	0.42			
烃类	12.41	柠檬烯 limonene	0.06		93	1183/1192 ^[14]	MS/RI
		小计	0.06				
杂环及含硫化合物	13.85	2-正戊基呋喃 2-pentylfuran	0.03		86	1218/1223 ^[12]	MS/RI
	23.13	糠醛 furfural	0.71		94	1436/1432 ^[15]	MS/RI
		小计	0.74				
		总计	97.58	97.52			

注: 定性方法中, MS 表示质谱定性, RI 表示保留指数定性。

从两种方法获得的萃取物中鉴定出的物质种类上看: SPME 所得到的物质种类较少, 且鉴定出的 12 种组分均可在 SDE 萃取物中鉴定出来。

从鉴定出的物质含量上看: 第一, 同种物质在这两种萃取物中的相对含量有较大差异, 如丁酸在 SDE 萃取物中相对含量为 21.46%, 而在 SPME 萃取物中相对含量为 59.96%, 这可能是由于丁酸易溶于水且分子质量小、易挥发, 采用 SDE 提取时损失较多, 所以在 SDE 萃取物中相对含量较低。己酸与之相反, 在 SDE 萃取物中相对含量为 65.88%, 而在 SPME 萃取物中相对含量为 25.45%, 这可能是由于己酸微溶于水且分子质量较大, 挥发性较弱, 由于采用 SDE 提取时经过了较高温度的蒸煮, 使得它容易被萃取出来, 所以在 SDE 萃取物中含量较高。第二, 酯类化合物在这两种萃取物中的相对含量有较大差异, 在 SDE 萃取物中相对含量为 2.13%, 而在 SPME 萃取物中相对含量为 9.93%, 出现这种情况的主要原因可能是酯类物质在进行 SDE 提取时发生了水解; 此外, 采用 SDE 提取时鉴定出的酯类化合物种类较多, 主要原因是其采用的温度高于 SPME, 使得一些高沸点的酯类被萃取出来。

从鉴定出的物质的香气特征来看, 丁酸具有持久、刺鼻、酸败的奶油气息, 己酸具有强烈的腐臭奶酪味道^[16], 它们是构成银杏外种皮气味的主要组分。乙酸、丙酸、辛酸等虽含量较少, 但也普遍具有刺激、尖酸的气息与前者共同形成了银杏外种皮独特的酸臭气味。棕榈酸有轻微的脂肪香和蜡香, 通常具有定香作用。酯类化合物中含量最高的物质是丁酸甲酯和己酸甲酯; 丁酸甲酯和丁酸乙酯都具有醚香、果香、杏仁香, 并伴有淡淡的玫瑰香气和奶油底韵^[17], 构成了银杏外种皮的水果香气。C₆脂肪酸形成的酯, 如己酸甲酯、己酸乙酯和己酸丁酯等, 多是以脂肪酸为前体通过脂氧化而产生的风味物质^[18], 这些物质通常具有酒香和果香, 对银杏外种皮的气味构成具有一定作用。己醛具有青草和苹果香气^[19], 糠醛具有甜香、木香, 2-戊基呋喃具有豆香、果香、清香^[20], 醇类有酒香和辛辣气息, 酮类具有奶香; 这些物质虽然含量较少, 但也使银杏外种皮的整体气味更加丰富。

从银杏外种皮的挥发性成分中鉴定出的物质大多数是我国食品添加剂使用卫生标准(GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》)中规定的允许使用的食用香料, 可采用不同的提取方法将这些成分提取出来, 用于调配食用香精; 由于提取物直接来自银杏外种皮, 属于天然香料, 在香料香精行业有着广泛的应用前景; 而去除了挥发性成分的银杏外种皮果肉不再具有刺鼻气味, 可作为原料进行进一步深加工。

3 结 论

3.1 采用同时蒸馏萃取和顶空固相微萃取两种萃取技术提取银杏外种皮的挥发性成分, 经 GC-MS 分析共鉴定出 29 种挥发性化合物, 包括酯类 9 种、酸类 9 种、酮类 3 种、醛类 1 种、醇类 4 种、烃类 1 种、杂环类化合物 2 种。其中相对含量较大的组分有丁酸(59.96%)、己酸(25.45%)、丁酸甲酯(3.59%)、己酸甲酯(3.90%)等。

3.2 在银杏外种皮中低碳数羧酸的种类和含量较多, 它们是银杏外种皮酸臭刺鼻气味的主要成分, 对其整体气味起到重要作用; 酯类化合物也是重要的呈香物质, 赋予了银杏外种皮水果香气; 醇类提供了酒香和辛辣气息, 酮类使得银杏外种皮带有淡淡的奶油香气, 醛类和杂环类物质使其气味更加丰富, 这些物质共同作用, 构成了银杏外种皮独特的气味。

参 考 文 献:

- [1] 张丽娇, 费瑞, 高立宏, 等. 银杏多糖的生物活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(32): 16185.
- [2] 梁立兴. 银杏外种皮的研究现状及开发利用前景[J]. 中国资源综合利用, 2003(10): 12-14.
- [3] 谢建春. 现代香味分析技术及应用[M]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 17-18.
- [4] 苗志伟, 刘玉平, 陈海涛, 等. 两种陈酿期山西老陈醋挥发性成分分析[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 380-384.
- [5] 苗志伟, 刘玉平, 孙宝国. SDE-GC-MS 分析乌梅中挥发性成分[J]. 食品科学, 2011, 32(24): 270-273.
- [6] FAN Wenlai, QIAN M C. Identification of aroma compounds in Chinese 'Yanghe Daqu' liquor by normal phase chromatography fraction followed by gas chromatography/olfactometry[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2006, 21(2): 333-342.
- [7] LI Ning, ZHENG Fuping, LIANG Menglan, et al. Identification of volatile flavor compounds in Chinese Sinkiang camel-naizi using different solid phase microextraction fibers[J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(4): 993-998.
- [8] 徐晓兰, 陈海涛, 孙宝国. SDE-GC-MS 分析胡同坊北京酱鸭的挥发性风味成分[J]. 食品科学, 2011, 32(22): 237-242.
- [9] 乔宇, 谢笔钧, 柴倩, 等. 血橙果实香气的气相色谱-质谱分析[J]. 质谱学报, 2008, 29(1): 1-5.
- [10] SHIMODA M, SHIGEMATSU H, SHIRATSUCHI H, et al. Comparison of the odor concentrate by SDE and adsorptive column method from green tea infusion[J]. J Agric Food Chem, 1995, 43(6): 1616-1620.
- [11] 张书香, 谢建春, 孙宝国. 固相微萃取/气-质联用分析香菇挥发性香味成分[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2010, 28(2): 1-5.
- [12] 慕艳梅, 孙宝国, 黄明泉, 等. 同时蒸馏萃取-气质联用分析月盛斋酱牛肉的挥发性风味成分[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 370-374.
- [13] YU T H, WU C M, CHEN S Y, et al. Effects of pH adjustment and heat treatment on the stability and the formation of volatile compounds of garlic[J]. J Agric Food Chem, 1989, 37(3): 730-734.
- [14] UMANO K, SHIBAMOTO T. Analysis of headspace volatiles from overheated beef fat[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1987, 35(1): 14-18.
- [15] 张宁, 陈海涛, 孙宝国, 等. SDE-GC-MS 分析肯德基吮指原味鸡的挥发性风味成分[J]. 食品科学, 2011, 32(22): 268-272.
- [16] 孙宝国, 刘玉平. 食用香料手册[M]. 北京: 中国石化出版社, 2004: 180; 186.
- [17] 孙菲菲. 优良猕猴桃酒酵母优选及猕猴桃酒香气调控技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006: 32-33.
- [18] 潘咏梅. 菠萝汁及加工、发酵过程中的风味变化[D]. 北京: 北京化工大学, 2007: 2.
- [19] 曾慧英, 谢建春, 卢立晃. 南方红豆杉叶挥发性成分[J]. 精细化工, 2008, 28(11): 1112-1116.
- [20] 孙培培, 黄明泉, 孙宝国, 等. 同时蒸馏萃取-气质联用分析燕麦片挥发性成分的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 479-483.