

白酒中含氮类化合物定性分析方法

王莉¹, 雷良波¹, 吴建霞¹, 徐岩^{*2,3}

(1. 贵州茅台酒股份有限公司, 贵州 仁怀 564501; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 吡嗪类化合物是白酒中一类重要的含氮类风味化合物, 为了更好的剖析白酒风味物质组成尤其是茅台酒中吡嗪类化合物的分布情况, 作者对白酒中含氮类化合物的定性分析方法进行研究。该方法通过优化提取流程, 引入除酯、除多元醇等提取纯化步骤, 有效地提高了分析仪器对吡嗪类及含氮类化合物的检出率, 形成了一套更优的白酒中吡嗪类化合物及其他含氮类化合物的定性分析方法, 应用该方法共定性了茅台酒中 56 种含氮化合物, 其中 35 种吡嗪类化合物、21 种其它含氮类化合物。

关键词: 白酒; 定性分析; 茅台酒; 吡嗪类化合物; 含氮类化合物

中图分类号: O 657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)08—0891—05

Study on the Qualitative Analysis of Nitrogenous Compounds in Chinese Liquor

WANG Li¹, LEI Liangbo¹, WU Jianxia¹, XU Yan^{*2,3}

(1. Kweichow Moutai Co., Ltd, Renhuai 564501, China; 2. School of Biotechnology, Wuxi 214122, China; 3. Key laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Pyrazines are one of the most important flavors in Chinese liquor. The method was developed for determination of nitrogenous compounds in Chinese liquor, especially pyrazines composition in Moutai liquor. The method was optimized by adjusting the extraction process and introducing the purification steps for removing the esters and polyhydric alcohol, which improved the the instruments detection rate of the target components effectively. A total of 56 kinds of nitrogenous compounds were detected in Moutai liquor, including 35 kinds of pyrazines and 21 kinds of other nitrogenous compounds.

Keywords: Chinese liquor, qualitative analysis, Moutai liquor, pyrazines, nitrogenous compounds

吡嗪类化合物是白酒中一类重要的含氮类风味化合物, 该类化合物风味阈值低, 具有坚果香和焙烤香等怡人风味^[1-4], 并对其它香味物质有明显的

烘托叠加作用^[5-6]。目前国内外对酒中吡嗪类化合物的分离方法有液液萃取、真空浓缩后液液萃取、吹扫捕集、固相萃取、离子交换和 CO₂ 超临界萃取等

收稿日期: 2014-02-25

基金项目: 国家企业技术中心创新能力专项项目(07063)。

作者简介: 王莉(1972—), 女, 陕西汉中, 工学硕士, 高级工程师, 主要从事白酒酿造及品质方面的研究工作。E-mail: zmx1019@163.com

* 通信作者: 徐岩(1962—), 男, 浙江慈溪人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酿酒科学与酶技术方面的研究。

E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

[7-12]。Wobben^[13]等用减压蒸馏法除去酒中大部分乙醇和水,而后用 CH_2Cl_2 萃取,GC-MS 分离和鉴定朗姆酒和威士忌酒中的吡嗪类化合物;Liebich^[14]采用乙醚-戊烷混合溶剂抽提,再以 10% HCl 萃取分离,用 GC-MS 鉴定出朗姆酒中 7 种吡嗪类化合物;山东大学陆懋荪^[15]利用阳离子树脂富集白酒中的含氮化合物,共检出 12 种吡嗪类化合物;余晓^[16]等采用酸化萃取法对白酒中的含氮化合物进行研究分析,得出 36 种含氮化合物,其中 27 种吡嗪类化合物;徐占成^[17]等采用液液萃取结合正相色谱分离技术应用全二维气相色谱-飞行气质联用仪 (GC×GC-TOFMS) 检出剑南春酒 32 种吡嗪类化合物。

作者旨在探索一套更优的白酒中含氮类化合物的分析方法,深入分析茅台酒中含氮类化合物尤其是吡嗪类化合物,以更好地剖析茅台酒独特的风味特征。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要仪器 气相色谱质谱联用仪 (GC7890A-5975C MSD); 色谱柱 DB-Wax (30 m×250.00 μm × 0.25 μm), 美国安捷伦科技公司; R-200 型旋转蒸发仪: 瑞士 BÜCHI 公司; DC-12 型氮吹仪: 上海安谱科学仪器有限公司。

1.1.2 主要试剂及样品 53%(V/V) 贵州茅台酒: 贵州茅台酒股份有限公司; NaCl(分析纯)、 H_2SO_4 (分析纯)、NaOH(分析纯)、无水乙醇(分析纯)、无水乙醚(分析纯): 购自上海国药集团; 标准品: 购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 白酒样品预处理方法 取 200 mL 酒样, 用 2 mol/L 的硫酸调整酒样酸度至 $[\text{H}^+]=1 \text{ mol/L}$ 后减压蒸馏至 30 mL, 转移至 250 mL 分液漏斗中, 用 50 mL 重蒸乙醚萃取浓缩液, 收集水相, 用 10% 浓度的 NaOH 溶液调 pH 13, 静置冷却, 无水乙醇调整酒精体积分数, 适量 NaCl 过饱和, 100 mL 重蒸乙醚萃取上述溶液, 收集有机相, 用 80 mL 煮沸后冷却的去离子水洗涤萃取液, 收集有机相, 加入适量的无水 Na_2SO_4 干燥过夜后, N_2 吹浓缩至 0.1 mL, GC-MS 分析。

1.2.2 GC-MS 分析条件 进样口温度为 230 $^{\circ}\text{C}$, 载气为 He, 流速 1.3 mL/min; 分流比 5:1, 进样量 1

μL 。程序升温: 起始温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 然后以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升温到 230 $^{\circ}\text{C}$, 保留 20 min。

离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$, 四极杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$, 接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$, EI 源 70 eV, scan 方式扫描, 质量范围 30~550 Amu, 溶剂延迟 5.00 min。

1.2.3 检出物质的定性 目标组分经 NIST 08L Database (Agilent Technologies Inc.) 标准谱库检索、标准品对比以及参考文献对比进行定性。

2 结果与讨论

2.1 白酒中吡嗪类化合物分析方法的优化

吡嗪类化合物是含有两个氮原子的碱性化合物, 如: 吡嗪的 $\text{pK}_a=0.65$, 2,5-DMP 的 $\text{pK}_a=1.85$, 这说明如果要从基质中萃取出更多的吡嗪类化合物, 需要更低的 pH 值^[18]。余晓等人曾报道将酒样调酸使 $[\text{H}^+]=1 \text{ mol/L}$ 时, 有 90% 的吡嗪类化合物成盐^[16]。

作者比较了调整不同 pH 值后吡嗪类物质的萃取效率, 综合考虑调酸对提取效率的影响及方法的可操作性, 确定了用 2 mol/L 硫酸将酒样调酸至 $[\text{H}^+]=1 \text{ mol/L}$ 的调酸方案。同时在方法优化的过程中考察了调酸、旋转蒸发浓缩及萃取流程单元的先后顺序, 确定了酒样调酸、旋转蒸发浓缩、萃取的酒样预处理流程。

应用上述优化流程分析白酒样品, 在分析过程中发现: 白酒中大多数含氮类化合物的含量相对较小, 易被种类繁多且含量较高的多元醇和酯类化合物掩盖, 难以被检出定性。因此, 如何去除多元醇和酯类化合物的干扰, 是能否有效定性白酒中含氮类化合物的关键, 见图 1。作者以白酒中风味成分最为复杂的茅台酒为分析对象, 对白酒中吡嗪及含氮类化合物提取方法进一步优化探索。

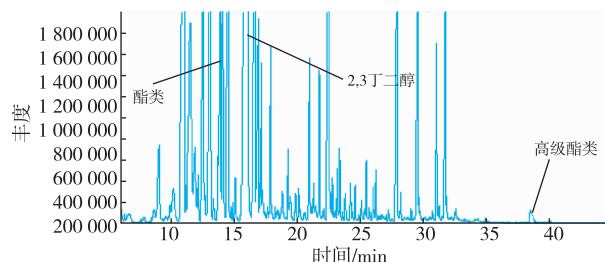


图 1 未除多元醇和酯类化合物的茅台酒提取液的 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS TIC of moutai liquor extract without removing the esters and polyhydric alcohol

根据相似相溶原理,样品预处理时,在旋转蒸发回调 pH 至碱性后,引入适当回调乙醇浓度和水洗萃取相的提取纯化步骤,达到去除多元醇类化合物的目的。结果证明,上述步骤的引入能有效的去除多元醇类物质(如 2,3-丁二醇等),含氮类化合物如:Pyrazine,3-butyl-2,5-dimethyl-,2-Isoamyl-6-methylpyrazine-等得以有效检出定性,见图 2。

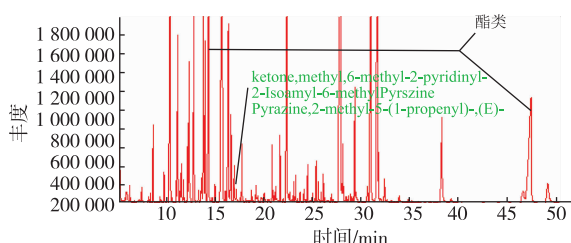


图 2 除去多元醇和未除酯类化合物的茅台酒提取液的 GC-MS 总离子流图

Fig. 2 GC-MS TIC of moutai liquor extract by removing the esters

去除了酒样中多元醇类物质的干扰后,发现酯类物质的存在仍会遮盖部分目标提取物,进一步优化提取方案,在旋转蒸发浓缩后增加乙醚萃取去除酯类物质的步骤,再进行回调 pH 值等以下操作流程,提取结果见图 3。在引入乙醚提取除酯步骤的基础上,再进行回调乙醇浓度、水洗除醇,可去除多元醇和酯类化合物的干扰,有效地降低了 GC-MS 总离子流图的基线,有利于 Pyrazine,2-ethyl-,6-methyl-,Pyrazine,trimethyl-等吡嗪类化合物的定性分析。

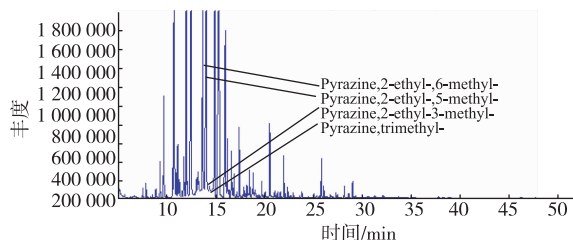


图 3 除多元醇和酯类化合物的茅台酒提取液的 GC-MS 总离子流图

Fig. 3 GC-MS TIC of moutai liquor extract by removing the esters and polyhydric alcohol

通过上述方法优化,确定了白酒中吡嗪类化合物分析的最佳提取流程:1) 酒样调酸 (2 mol/L H_2SO_4) 调酸度至 $[H^+]=1$ mol/L 强度;2) 旋转蒸发浓缩;3) 乙醚萃取除酯;4) 收集水相回调 pH;5) 调

整提取液乙醇浓度;6) 乙醚萃取;7) 收集有机相后水洗除多元醇;8) 干燥后氮吹浓缩。

2.2 茅台酒中吡嗪类及其他含氮类化合物定性结果

根据最优的白酒中吡嗪类及其它含氮类化合物定性分析方法制备茅台酒提取液,按照 1.2.2 的仪器分析条件进行 GC-MS 鉴定分析,通过对检出物的定性分析,共定性了 35 种吡嗪类化合物,分析结果较文献报道的白酒中吡嗪类化合物种类和数量均有增加,分析结果见图 4 及表 1。除此之外,还有包括吡啶类、噻唑类、噻吩类、喹啉类等 21 种其它含氮类化合物被检出。

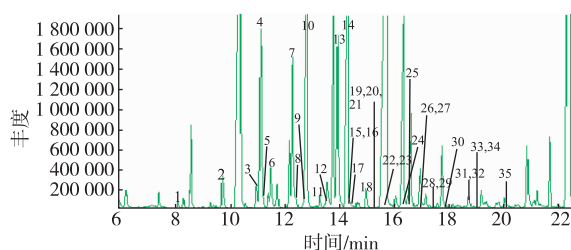


图 4 茅台酒含氮类化合物定性分析总离子流图

Fig. 4 GC-MS TIC of nitrogenous compounds in Moutai Liquor

表 1 GC-MS 鉴定出的茅台酒中的吡嗪类化合物

Table 1 Identification of pyrazines in moutai liquor by GC-MS

序号	保留时间	化合物名称
1	8.57	Pyrazine
2	9.75	Pyrazine,methyl-
3	11.00	Pyrazine,2,5-dimethyl-
4	11.14	Pyrazine,2,6-dimethyl-
5	11.20	Pyrazine,ethyl-
6	11.51	Pyrazine,2,3-dimethyl-
7	12.31	Pyrazine,2-ethyl-,6-methyl-
8	12.44	Pyrazine,2-ethyl-,5-methyl-
9	12.69	Pyrazine,2-ethyl-3-methyl-
10	12.81	Pyrazine,trimethyl-
11	13.20	Pyrazine,2,6-diethyl-
12	13.54	Pyrazine,3-ethyl-,2,5-dimethyl-
13	13.92	2,3-dimethyl-5-ethylpyrazine
14	14.29	Pyrazine,tetramethyl-
15	14.42	Pyrazine,2-ethenyl-5-methyl-
16	14.49	Pyrazine,2-ethenyl-6-methyl-
17	14.67	Pyrazine,3,5-diethyl-2-methyl-
18	14.99	2,3,5-Trimethyl-6-ethyl-pyrazine

续表 1

序号	保留时间	化合物名称
19	15.18	Pyrazine,3,5-dimethyl-2-propyl-
20	15.37	Pyrazine,2,5-dimethyl-3-(2-methylpropyl)-
21	15.47	3,5-Dimethyl-2-isobutylpyrazine
22	15.52	Pyrazine,3-butyl-2,5-dimethyl-
23	15.63	Pyrazine,2,3-dimethyl-5-(2-methylpropyl)
24	16.38	2,3,5-trimethyl-6-propylpyrazine
25	16.60	2-(2-methylpropyl)-3,5,6-trimethylpyrazine
26	16.97	Pyrazine,3-butyl-2,5-dimethyl-
27	17.12	2-Isoamyl-6-methylpyrazine
28	17.77	Pyrazine,2-methyl-5-(1-propenyl)-(E)-
29	17.88	Pyrazine,2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-
30	18.32	Pyrazine,2,3-dimethyl-5-(1-propenyl)-(E)-
31	18.66	2,3-Dimethyl-5-isopentylPyrazine
32	18.82	2,5-Dimethyl-3-n-pentylPyrazine
33	19.28	Pyrazine,2,5-dimethyl-3-(2-propenyl)-
34	19.35	Pyrazine,2,3-dimethyl-5-(1-propenyl)- (Z)
35	20.04	Pyrazine,2-methoxy-3-(1-methylethyl)-

3 结 语

作者在充分分析酒体风味物质组成并了解各类风味化合物性质的基础上,将白酒提取步骤的各个提取单元有机串联整合,并巧妙的引入除酯和除多元醇的提取纯化步骤,有效的提高了分析仪器对吡嗪类及含氮类化合物的检出率,形成了一套适用于白酒中吡嗪类化合物及其他含氮类化合物的有效定性分析方法。应用该方法共定性了茅台酒中 56 种含氮化合物,其中 35 种吡嗪类化合物、21 种其它含氮类化合物,定性的结果较前人文献报道的茅台酒中的含氮类物质的种类、数量上均有所增加。本方法操作简单、易行,不需要特殊的仪器设备,为白酒中吡嗪及含氮类化合物的分析提供了新方法,为白酒风味物质分析提供了新思路。

参考文献:

- [1] 晁建平. 重要的食品杂环香料—吡嗪类化合物[J]. 精细石油化工, 1994, 4: 44-47.
- CHAO Jianping. Pyrazines as important heterocyclic flavors[J]. **Speciality Petrochemicals**, 1994, 4: 44-47. (in Chinese)
- [2] Rudolf M, Sugima R. Pyrazines: occurrence, formation and biodegradation [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010, 85: 1315-1320.
- [3] Lenka L, Katerina R, Jana H, et al. Alternative GC-MS approaches in the analysis of substituted pyrazines and other volatile aromatic compounds formed during Maillard reaction in potato chips[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2009, 641: 101-109.
- [4] Hassan S, Jacinthe F, Nathalie M. Identification of pyrazine derivatives in a typical maple syrup using headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry[J]. **Food Chemistry**, 2012, 133: 1006-1010.
- [5] Wagner R, Czerny M, Bielnradsky J, et al. Structure-odour-activity relationships of alkylpyrazines [J]. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, 1999, 208: 308-316.
- [6] Ya SH, Takayuki S. Heterocyclic compounds such as pyrroles, pyridines, pyrrolidines, piperdines, indoles, imidazol and pyrazins[J]. **Applied Catalysis A: General**, 2001, 221: 197-207.
- [7] Lluís B, Rosalia T, Anna G, et al. Mass spectrometry identification of alkyl-substituted pyrazines produced by *Pseudomonas* spp. isolates obtained from wine corks[J]. **Food Chemistry**, 2013, 138: 2382-2389.
- [8] Laura C, Ana E, Eva C, et al. Multidimensional gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must: a comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods[J]. **Journal of Chromatography A**, 2009, 1216: 4040-4045.
- [9] Philippus A, Maria A S, Sylvia O P, et al. Survey of 3-Alkyl-2-methoxypyrazine content of south african sauvignon blanc wines using a novel LC-APCI-MS/MS method[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009, 57: 9347-9355.
- [10] Wu JF, Xu Y. Comparison of pyrazine compounds in seven Chinese liquors using headspace solid-phase micro-extraction and GC-Nitrogen phosphorus detection[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2013, 22(5): 1253-1258.
- [11] Fan W L, Xu Y, Zhong Y H. Characterization of pyrazines in some Chinese liquors and their approximate concentrations[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007, 55(24): 9956-9962.
- [12] Tae Y K, Ji S P, Mun Y J. Headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-tandem mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS2) method for the determination of pyrazines in perilla seed oils: impact of roasting on the pyrazines in perilla seed oils

- [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61:8514–8523.
- [13] Worben H J, Timmer R, Heide R, et al. Nitrogen compounds in rum and whiskey [J]. *Journal of Food Science*, 1971, 36(3): 464–465.
- [14] Liebich H M, Koenig W A, Bayer E. Analysis of the flavor of rum by gas–liquid chromatography and mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 1970, 8(9): 527–533.
- [15] 陆懋荪, 关家锐, 尹佩玉, 等. 大孔径阳离子交换树脂用于富集白酒中碱性含氮化合物的研究[J]. 色谱, 1989, 7(6): 334–337.
LU Maosun, GUAN Jiayue, YIN Peiyu, et al. A study on separation and enrichment of basic nitrogen-containing compounds in Chinese liquors using macroporous cation exchange resin [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 1989, 7 (6): 334–337. (in Chinese)
- [16] 余晓, 尹建军, 胡国栋. 白酒中含氮化合物的研究[J]. 酿酒, 1992, 1: 71–75.
YU Xiao, YIN Jianjun, HU Guodong, et al. The research of the nitrogen compounds in liquor [J]. *Liquor Making*, 1992, 1: 71–75. (in Chinese)
- [17] 徐占成, 陈勇, 周泽华, 等. 中国名酒剑南春中有益于人体健康的物质种类和作用[J]. 酿酒, 2008, 35(3): 108–110.
XU Zhancheng, CHEN Yong, ZHOU Zehua, et al. Types and roles of substances beneficial to human health in Chinese famous Jiannanchun liquor [J]. *Liquor Making*, 2008, 35(3): 108–110. (in Chinese)
- [18] Yu A N, Tan Z W, Shi B A. Influence of the pH on the formation of pyrazine compounds by the maillard reaction of L–ascorbic acid with acidic, basic and neutral amino acids [J]. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 2012, 7: 455–462.

科技信息

美国发布新标准保障婴幼儿配方食品

日前,美国 FDA 发布“婴儿配方食品标准”(最终稿),生效日期为 2014 年 9 月 8 日。标准包括以下内容:婴儿配方食品实施现行良好生产规范(cGMP),并要求针对沙门氏菌、阪崎肠杆菌类细菌性致病菌进行检测;婴儿配方食品生产商要对其产品的使用说明;婴儿配方食品在销售前及产品保质期结束前要检测产品营养成分。

尽管美国婴儿配方食品在销售前不需要履行审批程序,但新的婴儿配方食品销售前需要向 FDA 注册、并履行通知 FDA 的程序。FDA 每年会对相关工厂进行检查,并对其产品进行抽样检测。另外,如果 FDA 确认某款婴儿配方食品存在健康危害,生产商必须对其产品召回。

此外,美国市场婴儿配方食品必须满足 FDA 的最低营养需求。婴儿配方食品铁含量约为 12 毫克/升的产品,属于“强化铁”产品;产品中铁含量约为 2 毫克/升的产品,属于“低铁”产品。强化铁产品主要用来降低“低铁性”贫血症状。

标准中还提到婴儿配方食品的安全注意事项:冲调水温度,36.7 摄氏度为最佳温度;奶瓶、奶嘴卫生条件,用完的奶瓶、奶嘴及时清洗,保持卫生条件;切记使用保质期内产品,以保证婴儿配方食品营养;婴儿配方食品保存温度,要按照产品要求使用合适的保存温度存放婴儿配方食品。

[信息来源] 国家质量监督检验检疫总局. 美国发布新标准保障婴幼儿配方食品. [EB/OL]. (2014–6–30) <http://search.aqsic.gov.cn>.