

香稻香气特征化合物 2-乙酰基-1-吡咯啉测定方法的建立

刘洪, 饶得花, 任永浩, 邱友媚, 陈兴林, 徐振江*

(华南农业大学农学院, 广东 广州 510642)

摘要:建立了一种利用顶空固相微萃取-气相色谱法(HS-SPME-GC)检测香稻香味特征化合物 2-乙酰基-1-吡咯啉(2-acetyl-1-Pyrroline, 2-AP)的方法。在合成 2-AP 标准物质的基础上,通过正交试验得到最佳萃取条件为萃取温度 60 °C、萃取时间 45 min。在最佳萃取条件下,该检测方法的线性范围为 0.5~4.0 μg/g, 相对标准偏差 8.54%, 回收率为 96.3%~103.5%, 检出限为 0.045 5 μg/g, 定量限为 0.152 μg/g。利用该方法测定 6 种不同香稻大米 2-AP 的含量, 结果表明, 该方法能有效地检测香米的 2-AP 含量。

关键词: 香稻; 香气; 2-乙酰基-1-吡咯啉; 顶空固相微萃取; 气相色谱

中图分类号: S511.13; TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)03-0234-05

A method on determination the 2-acetyl-1-pyrroline of aromatic rice

Liu Hong, Rao Dehua, Ren Yonghao, Qiu Youmei, Chen Xinglin, Xu Zhenjiang*

(College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A method for determination 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP), an odorant compound impacting the flavor of aromatic rice, was developed by using the approach of headspace solid-phase micro extraction (HS-SPME) combined with gas chromatography (GC). The condition with SPME were optimized by orthogonal experiments (two factors and five levels), and the certified reference material was synthesized. On the basis of tests, the optimal condition for 2-AP extraction was in temperature of 60 °C for 45 minutes. In these condition, the concentration range of good linear relationship was from 0.5 to 4 μg/g with relative standard deviations below 8.54% and recovery ranged from 96.3% to 103.5%. The limit of detection and quantification were 0.045 5 μg/g and 0.152 μg/g, respectively. The result proved that the method was suitable for 2-AP determination after tested in 6 various kinds of aromatic rice species.

Keywords: aromatic rice; aroma; 2-acetyl-1-pyrroline; headspace solid-phase micro extraction; gas chromatography

香米因较普通大米多含有一种类似于爆玉米花或茉莉花型的芳香味而深受人们喜爱。水稻香气成分的研究在理论和应用上都有十分重要的价值^[1-5]。香稻香气的主要成分是易挥发和氧化的 2-乙酰基-1-吡咯啉(2-acetyl-1-Pyrroline, 以下简称 2-AP)。因 2-AP 的化学性质不稳定及合成方法较为复杂,使得香稻香气定量检测的难度增加^[6]。目前,国内主要利用溶剂萃取法^[7]、蒸馏萃取法^[8]、柱萃取法^[9]、固相萃取法^[10]和超临界流体萃取法^[11]等提取化合

物,再通过气相色谱质谱法(GCMS)来测定香米的香气。上述测定方法存在样品需要量大、有机溶剂耗费多、操作复杂、难以准确测定痕量的 2-AP 等缺点。固相微萃取(SPME)是一种新型的无溶剂样品前处理方法。它集取样、萃取、富集和进样于一体,克服了传统萃取收集方法的诸多缺点,且易与气相色谱、质谱等多种检测技术联用,其分析灵敏度和效率明显较高^[12-14]。目前,SPME 已经开始应用于食品^[15]、药品^[16] and 环境保护^[17]等方面,而在香稻

收稿日期: 2014-09-09

修回日期: 2015-04-05

基金项目: 2014 年农业部品种资源保护项目(2014-18); 华南农业大学校长基金项目(4100-K08195)

作者简介: 刘洪(1978—),男,硕士,助理研究员,主要从事作物生理生态研究,laoliuhongsc@163.com; *通信作者,徐振江,男,博士,高级实验师,主要从事作物生理生态研究,11232874@163.com

2-AP 含量分析方面的研究较少。应兴华等^[18]采用 SPME-GCMS 联用技术通过内标法检测香稻的 2-AP 含量。该方法操作繁琐,每次分析都必须利用 GCMS 和添加内标物,使用成本相对较高。利用顶空固相微萃取气相色谱外标法测定香稻香气 2-AP 含量方面的研究尚少。笔者在合成 2-AP 标准物质的基础上,采用顶空固相微萃取气相色谱法优化萃取分析条件,旨在建立用外标法测定香稻香气物质 2-AP 含量的方法。

1 材料与方方法

1.1 材料

供试材料品种为巴太软香、粤香占、农香 18、巴斯马蒂 370、桂香占、珍汕 97B(以上由华南农业大学农学院提供)和茉莉香 105(由国家水稻种质资源中期库提供)。

1.2 主要仪器设备与试剂

主要仪器设备有 GCMS-QP2010plus 气相质谱联用仪(日本,岛津公司)、GC-2010 气相色谱仪(日本,岛津公司)、固相微萃取系统及 50/30 μm DVB/CAR/PDMS(碳分子筛/二乙烯苯/聚二甲基硅烷)萃取纤维头(美国,Supelco 公司)、20 mL 样品瓶(美国,Supelco 公司)、万分之一分析天平(德国,赛多利斯公司)、水浴加热器(上海,一恒仪器设备有限公司)、真空泵(巩义,予华仪器设备有限公司)、低温搅拌反应浴(郑州,长城科工贸有限公司)。

主要试剂有无水硫酸钠(分析纯)、无水乙醚(江苏强盛化工有限公司,分析纯)、氯化铵(天津大茂化学试剂厂,分析纯)、色谱纯二氯甲烷(天津福晨化学试剂厂)、脯氨酸甲酯盐酸盐、三乙胺、次氯酸叔丁基酯、甲基碘化镁(2 mol/L 乙醚溶液,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 2-AP 的合成及纯度鉴定

2-AP 合成及纯度鉴定参照 Pullabhatia 等^[19]的方法并加以改良。称取 2.5 g L-脯氨酸甲酯盐酸盐溶于 100 mL 50%碳酸钾溶液,在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 30 min 后用无水乙醚萃取,并干燥、过滤。将 1.7 g 次氯酸叔丁基酯加入到滤液中,于 -5 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 1 h,然后加入三乙胺 1.58 g,在室温下反应 10 h 后过滤,干

燥,得甲酯基吡咯啉。将 1.61 g 甲酯基吡咯啉溶于 45 mL、-10 $^{\circ}\text{C}$ 的无水乙醚中,滴加甲基碘化镁溶液 8 mL,在室温下搅拌 5 h 后加入氯化铵饱和溶液 10 mL,最后加入无水硫酸钠 5 g,振荡静置 30 min 后过滤,将滤液减压,干燥,过柱分离,得 2-AP 合成产物。称取 2-AP 合成产物 0.01 g 溶于 10 mL 二氯甲烷中,采用 GCMS 进行质谱分析。

1.3.2 2-AP 出峰时间的确定

将 2-AP 溶解于二氯甲烷中,分别配置成 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/mL 的标准溶液。在 4 支空白样品瓶中加入 1.000 g 珍汕 97B 精米粉,分别滴加 0.0、1.0、2.0、4.0 mg/mL 的 2-AP 标准溶液 1 μL ,旋紧密封,将已老化处理后的萃取纤维针管插入瓶中,调整并固定萃取头的位置,伸出纤维进行萃取。在 1 支空白样品瓶中直接加入 2.0 mg/mL 的 2-AP 标准溶液 1 μL 作为对照。最后在相同条件下进行 GC 分析,确定 2-AP 的出峰时间和珍汕 97B 的 2-AP 含量。

GC-2010 设置条件:色谱柱为 SPB-1(美国,Supelco 公司),尺寸为 30 m \times 0.25 mm,0.25 μm ,柱温采用程序升温方式(40 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min,以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 65 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 220 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min),进样口温度为 220 $^{\circ}\text{C}$,不分流进样方式,检测器为氢火焰离子化检测器(FID),检测器温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.3 萃取优化试验和方法验证参数的确定

在 6 支装有 1.000 g 珍汕 97B 精米粉的样品瓶中加入不同浓度的标准溶液 1 μL ,制成 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ 的 2-AP 标准样品。对质量浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ 的 2-AP 标样进行萃取,以峰面积为指标,分析萃取温度和时间互作对萃取效果的影响,确定最优的萃取方案。试验设计方法见表 1。按照萃取优化方案,对 6 个不同标准样品进行 GC 分析,以 2-AP 峰面积对相应质量浓度进行线性回归。

表1 优化试验的因素和水平

水平	因素	
	萃取温度/ $^{\circ}\text{C}$	萃取时间/min
1	20	15
2	40	30
3	60	45
4	80	60
5	100	75

参照国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)^[20]和 GB/T 5009.1—2003^[21]的方法,将逐级稀释的标准样品分别萃取并进样分析,以3倍基线噪声作为检出限,10倍基线噪声作为定量限。

将2-AP标准溶液按低、中、高3个量(0.5、1.0、2.0 μg)分别添加到3个不同样品中,样品含量分别为0.5、3.0、1.0 $\mu\text{g/g}$,重复5次,计算平均回收率、相对标准偏差、评价方法的准确度和精密度。

1.3.4 样品的2-AP含量测定

在6支样品瓶中分别加入1.000 g不同香稻品种的精米粉,按照本文所建的外标法和内标法^[8,18]同时测定样品的2-AP含量,重复3次,将二者所

得检测结果进行分析比较。

2 结果与分析

2.1 2-AP的定性分析及纯度分析

图1为2-AP合成产物主要物质的质谱图,图2为2-AP标准物质的质谱图,其特征离子碎片质荷比(m/z)为111、83、69、68、55、52、43、42、41,经NIST08S图库比对可知,二者之间的相似度为90%,因此,可确定该产物的主要成分为2-AP。依据各组分峰面积所占比例,确定2-AP的相对含量为92.04%。

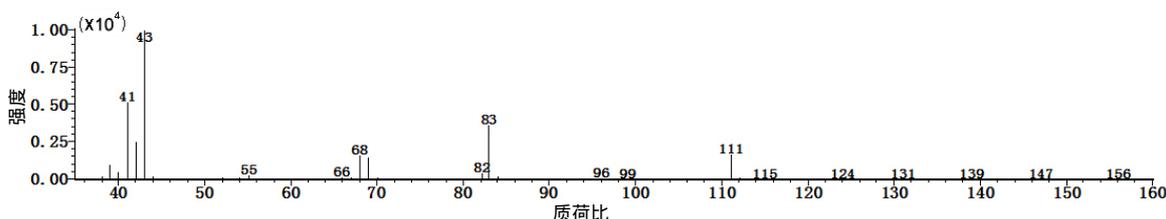


图1 2-AP合成产物主要物质的质谱图

Fig.1 Mass spectrum of main components from 2-AP synthetic products

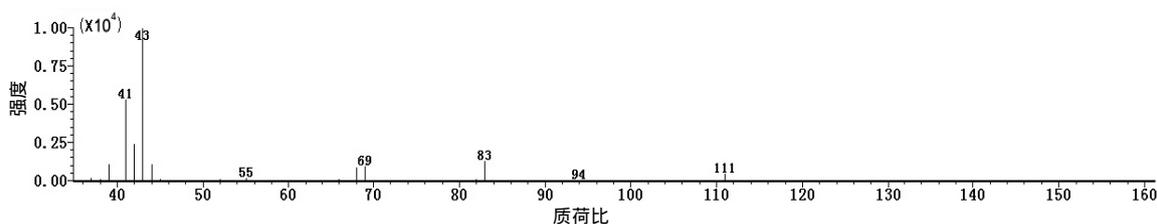
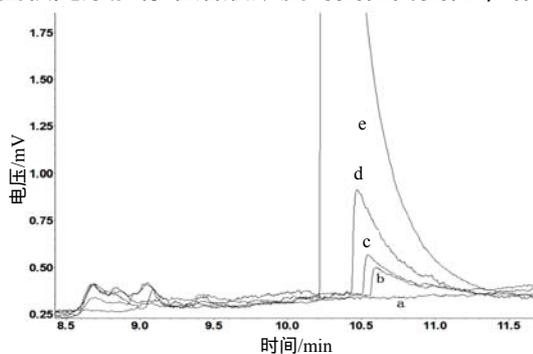


图2 2-AP标准物质的质谱图

Fig.2 Mass spectrum from standard 2-AP

2.2 2-AP在GC中的保留时间

由图3可知,样品a、b、c、d在10.50 min的峰面积随添加标准溶液浓度的变化而变化,结合对



图中a、b、c、d分别表示添加了1 μL 0.0、1.0、2.0、4.0 mg/mL标准溶液的样本,e为对照。

图3 不同含量2-AP样品保留时间的色谱图

Fig.3 Retention time of 2-AP chromatogram with various concentration

照,确定2-AP在GC中的保留时间为(10.50 \pm 0.10) min。由于样品a在10.50 min处并无明显峰出现,因此,样品a不含2-AP。对照的2-AP峰面积明显大于样本c的峰面积,且出峰时间提前了0.25 min,这可能是由于样品c中的米粉吸附了2-AP而导致其峰面积下降。

2.3 萃取温度和萃取时间对萃取效果的影响

由表2可见,当萃取温度为20 $^{\circ}\text{C}$ 时,2-AP峰面积随着萃取时间的延长而不断增大,说明2-AP还未在空气和萃取纤维间达到萃取平衡;当温度分别为40、60、80、100 $^{\circ}\text{C}$ 时,萃取分别在60、45、30 min时达到平衡,峰面积增幅开始减缓,说明温度越高,加快了2-AP分子运动,提高了萃取吸附速率,从而缩短了2-AP在空气和萃取纤维间

达到萃取平衡的时间。由表 2 还可以看出,不同萃取时间处理的峰面积随温度的升高呈先上升后下降的单峰趋势,在 60 °C 时达到最大值。以上结果表明,适当提高温度可以缩短萃取平衡时间,但温度过高也会导致萃取吸附速率低于解析速率,从而造成萃取效率下降,且还容易导致因大米热降解造成其他成分混入萃取纤维而干扰分析。综合考虑萃取效果和效率,选定 60 °C 和 45 min 作为本试验的适宜萃取温度和萃取时间。

表2 不同萃取温度和萃取时间下2-AP的峰面积

Table 2 Effect of extraction temperature and time on the extraction efficiency of 2-AP

萃取温度/°C	2-AP 峰面积				
	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
20	801.3	919.3	1 026.2	1 099.2	1 165.2
40	935.6	1 074.5	1 201.1	1 245.3	1 248.4
60	1 063.7	1 159.1	1 299.3	1 311.7	1 320.7
80	1 012.3	1 124.3	1 209.1	1 207.3	1 206.5
100	889.4	1 008.1	1 004.7	1 008.5	1 009.7

2.4 方法的线性范围和检出限及定量限

按照萃取优化方案对 6 个标准样品进行顶空萃取,以峰面积为纵坐标,以 2-AP 含量为横坐标制作标准曲线,标准曲线方程为 $y = 1 285x + 30.287$,线性相关系数 $R^2 = 0.997 9$,标准曲线线性范围为 0.5~4 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。方法的检出限为 0.045 5 $\mu\text{g}/\text{g}$,定量限为 0.152 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

2.5 方法的准确度与精密度

表 3 结果表明,本方法的平均回收率为 96.3%~103.5%, RSD 最大值 8.54%,说明方法的重复性较好,准确度和精密度符合分析要求。

表3 2-AP测定方法的回收率和精密度($n=5$)Table 3 Recovery and precision of the method for determination of 2-AP ($n=5$)

序号	样本含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	添加量/ μg	检测值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	平均回收率/ %	$RSD/\%$
1	0.5	0.5	0.97	97.2	7.06
2	3.0	1.0	4.14	103.5	7.50
3	1.0	2.0	2.89	96.3	8.54

2.6 香稻品种 2-AP 含量的测定结果

表 4 结果表明,不同香米品种的 2-AP 含量存在明显差异,其中茉莉香 105 的最高,巴太软香的最低,2 种方法的检测结果差异不大。此外,外标

法测定结果的 RSD 7.57%,内标法测定结果的 RSD 7.29%,说明 2 种方法都能有效应用于对 2-AP 含量差异明显的香稻品种进行检测。

表4 6个香稻品种的2-AP含量($n=3$)Table 4 Determination of 2-AP in aromatic rice ($n=3$)

香稻品种	2-AP含量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		$RSD/\%$	
	外标法	内标法	外标法	内标法
茉莉香105	3.23	3.17	5.93	5.17
巴斯马蒂370	2.29	2.38	6.79	5.33
桂香占	1.47	1.39	7.57	4.57
巴太软香	0.97	0.93	5.07	3.89
粤香占	2.07	2.16	3.39	7.29
农香18	1.10	1.16	4.51	5.09

3 结论与讨论

目前,国内测定水稻香气 2-AP 的方法主要是利用内标法,通过 GCMS 对样品中的内标物 2,4,6-三甲基吡啶(TMP)和 2-AP 进行定性分析,然后依据 2-AP 和 TMP 的峰面积之比,再乘以校正因子及对应内标物加入量,最后确定样品中 2-AP 的含量^[8,18]。该方法操作程序较为麻烦,每次测试都需要准确加入内标物,且在缺乏 2-AP 标准物质时必须依靠 GCMS 确定 2-AP 的出峰时间,使用成本相对较高。本研究中,在 Pullabhatia 等^[19]合成 2-AP 方法的基础上,直接利用脯氨酸甲酯盐酸盐作为原料,通过卤化、消除和格氏等反应,合成出纯度为 92.04%的 2-AP。与原合成方法相比,本方法简化了反应流程,缩短了反应时间,并避免直接使用剧毒物质甲基碘,所合成出的 2-AP 纯度高,适合作为标准物质。利用该标准物质,本文确定了 2-AP 在 GC 中的保留时间。

温度对萃取的影响具有双重性。适当提高温度可以加快样品分子的运动,导致蒸气压增大,缩短萃取平衡时间,对萃取有利;温度过高使分析组分更易从纤维头解吸附,不利于萃取。萃取平衡时间是待测物在各相达到或接近平衡所需的时间,是由涂层厚度及理化性质、分配系数、扩散速率等多种因素决定的^[22-23]。本研究中,温度过高或过低都会影响萃取效果,且随着时间的延长,萃取富集越来越慢,当超过平衡时间时,对萃取效果影响不大。

在 Pullabhatia 等^[19]研究的基础上优化反应流程,合成出纯度为 92.04%的 2-AP 标准物质,并通过正交试验确定出最优萃取温度和萃取时间分别

为 60 °C 和 45 min, 最终建立了顶空固相微萃取-气相色谱检测香米 2-AP 含量的方法。该方法的 *RSD* 8.54%, 回收率为 96.3%~103.5%, 检出限为 0.045 5 μg/g, 定量限为 0.152 μg/g。对 6 个不同香稻品种 2-AP 含量的测定结果表明, 对于 2-AP 含量差异明显的香稻品种, 本方法能有效进行检测。

参考文献:

- [1] 姚方印, 李广贤. 水稻香味的遗传分析[J]. 山东农业科学, 2001(2): 28.
- [2] 应存山. 我国稻种资源研究概况[J]. 作物研究, 1995, 9(2): 3-6.
- [3] 陈成斌. 我国特稻种研究概述[J]. 广西农业科学, 1993(2): 58-61.
- [4] Khush G S. Rice grain quality evaluation and improvement at IRRI[C]/IRRI. Proceeding of the Workshop on Chemical Aspects of Rice Grain Quality. Los Banos: IRRI Press, 1979: 21-30.
- [5] Buttery R G, Ling L C. 2-acetyl-1-pyrroline: An important aroma component of cooked rice[J]. Chem Ind(London), 1982, 23: 958-959.
- [6] Buttery R G, Ling L C, Juliano B O. 2-acetyl-1-pyrroline and its use for flavoring foods. U.S., 4522838[P]. 1985-06-11.
- [7] Desideri P G, Lepri L, Checchini L. A new apparatus for the extraction of organic compounds from aqueous solutions[J]. Mikrochim Acta, 1992, 107(1/2): 55-63.
- [8] 黄忠林, 唐湘如, 王玉良, 等. 增香栽培对香稻香气和产量的影响及其相关生理机制[J]. 中国农业科学, 2012, 45(6): 1054-1065.
- [9] 朱旗, 黄怀生, 李拥军, 等. 不同分析方法对香米香气测定结果的影响[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2005, 31(6): 681-684.
- [10] Conte E D, Conway S C, Miller D W, et al. Determination of methylisoborneol in channel catfish pond water by solid phase extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Water Res, 1996, 30(9): 2125-2127.
- [11] Aro T, Brede C, Manninen P. Determination of semivolatile compounds in Baltic herring by supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(7): 1970-1975.
- [12] Zhao Y, Xu Y, Li J, et al. Profile of volatile compounds in 11 Brandies by headspace solid-phase micro extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(2): 90-99.
- [13] Xiao Z B, Dai S P, Niu Y W, et al. Discrimination of Chinese vinegars based on headspace solid-phase micro extraction-gas chromatography mass spectrometry of volatile compounds and multivariate analysis[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(8): 1125-1135.
- [14] Stoppacher N, Kluger B, Zeilinger S, et al. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 81(2): 187-193.
- [15] 刘敬科, 赵巍, 刘莹莹, 等. 不同萃取头的固相微萃取提取小米粥中挥发性成分的研究[J]. 河北农业科学, 2010, 14(11): 142-144.
- [16] 曾栋, 陈波, 姚守拙. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用分析干柴胡药材中有机挥发物[J]. 分析化学, 2005, 4(4): 491-494.
- [17] 葛奇, 赵素丽. 固相微萃取和气质联用分析测定土壤中 13 种挥发性芳香烃[J]. 分析测试技术与仪器, 2014, 20(1): 47-51.
- [18] 应兴华, 徐霞, 陈铭学, 等. 气相色谱-质谱技术分析香稻特征化合物 2-乙酰基吡咯啉[J]. 色谱, 2010, 28(8): 782-785.
- [19] Pullabhatia Srinivas, Kambadoor nagarajarao gurudutt. Process for the preparation of 2-acetyl-1-pyrroline, the basmati rice flavorant: U.S., 6723856 B1[P]. 2004-04-20.
- [20] Compendium of Analytical Nomenclature[EB/OL]. (2012-07-02)[2014-03-05]. http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium.
- [21] GB/T 5009.1—2003 食品卫生检验方法(理化部分)总则[S].
- [22] 王锡昌, 陈俊卿. 固相微萃取技术及其应用[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(4): 348-352.
- [23] 王海滨, 徐骅, 李芸. 固相微萃取技术及其应用现状综述[J]. 上海环境科学, 2006, 25(6): 260-262.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库