

反相高效液相色谱法测定黄酒中的 β -苯乙醇

诸葛庆¹, 李博斌¹, 郑云峰¹, 葛乐勇¹, 刘兴泉^{2,*}

(1. 国家黄酒产品质量监督检验中心, 浙江 绍兴 312071; 2. 浙江林学院农业与食品科学学院, 浙江 杭州 311300)

摘 要: 建立一种采用反相高效液相色谱法测定黄酒中 β -苯乙醇的方法。采用反相C₁₈色谱柱 Synergi Hrdro-RP C₁₈ (4.6mm × 250mm, 4 μ m), 以甲醇-水为流动相(50:50, V/V), 流速 1ml/min, 紫外检测器, 检测波长 210nm, 对黄酒中的 β -苯乙醇进行检测。结果表明, 在 5.00~30.00mg/L 添加量范围内, 回收率水平在 99.5%~99.8% 之间, 相对标准偏差为 0.6% ($n=6$), 方法的检出限为 0.05mg/L, 线性范围为 0.5~50mg/L ($r=0.9999$), 测定结果与标准气相色谱方法基本相同。所建立的方法可以作为黄酒中 β -苯乙醇的检测方法。

关键词: 反相高效液相色谱法; 黄酒; β -苯乙醇

HPLC Determination of Beta-Phenylethanol in Chinese Rice Wine

ZHUGE Qing¹, LI Bo-bin¹, ZHENG Yun-feng¹, GE Le-yong¹, LIU Xing-quan^{2,*}

(1. National Center for Quality Supervision and Testing of Rice wine, Shaoxing 312071, China;

2. School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Forestry University, Hangzhou 311300, China)

Abstract: This study developed a reverse phase HPLC method for determining β -phenylethanol in Chinese rice wine. Beta-phenylethanol was separated on a Synergi Hrdro-RP C₁₈ column (4.6 × 250 mm, 4 μ m) using a mobile phase composed of CH₃OH and H₂O (50:50, V/V) at a flow rate of 1 ml/min and detected using a UV detector set at 210 nm. At the spike levels of 5.00, 15.00 and 30.00 mg/L, the average recoveries for β -phenylethanol were between 99.5% and 99.8% with the RSDs of less than 0.6% ($n=3$); the limit of detection was 1.0 ng, and the linear range was from 0.5 to 50 mg/L ($r=0.9999$). The results of β -phenylethanol determination in four different rice wine samples by this method were almost the same as those determined by gas chromatography method. Therefore, the method developed can be use to determine β -phenylethanol in Chinese rice wine.

Key words: RP-HPLC; Chinese rice wine; β -phenylethanol

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0175-03

黄酒是中国传统的酿造酒, 它的香味独特、自成风格, 以水、乙醇、糖类、氨基酸和有机酸类为主要成分, 香气成分属于微量组分, 但这一组分对黄酒的风味有很大的影响。在构成黄酒主要香气成分的醇类物质中, 含量较多的是 β -苯乙醇, 它具有玫瑰芳香^[1], 与黄酒中的酯、醛类香气组分融合成协调细腻的酒香, 给人以愉悦、柔和、优雅的感觉^[2]。在 GB/T13662—2000《黄酒》中, β -苯乙醇是判定稻米为原料酿制黄酒的质量指标之一。

测定 β -苯乙醇的方法有气相色谱法(GC)、气相色谱法-质谱联用法(GC-MS)和高效液相法(HPLC)。GB/T13662—2000《黄酒》中规定 β -苯乙醇的测定方法是 GC 法, 但是该方法是直接进样分析, 黄酒的其他成分

会污染分析系统, 含糖量高的甜型黄酒尤为明显; GC-MS 法^[3]因为使用了 MS 作为检测器, 虽然可以排除干扰, 但会提高检测成本, 并且一般实验室又难以满足要求; 目前有关使用 HPLC 测定黄酒中 β -苯乙醇的研究较少, 陈青俊等采用 KH₂PO₄ 溶液-甲醇体系作流动相对黄酒中 β -苯乙醇的 HPLC 测定进行了研究^[4]。本实验拟采用更为简单的甲醇-水作为流动相, 采用 RP-HPLC 法测定黄酒中 β -苯乙醇的含量, 以期使样品只需进行简单的稀释过滤即可进样分析, 操作简单。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄酒 市购。

收稿日期: 2008-11-05

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技项目(2005QK124)

作者简介: 诸葛庆(1978—), 女, 工程师, 硕士, 主要从事食品检验研究。E-mail: zhugeqing2025@126.com

* 通讯作者: 刘兴泉(1973—), 男, 副教授, 博士, 主要从事农业化学与食品安全研究。E-mail: bolowliu@hotmail.com

甲醇(色谱纯) 天津市四友生物医学技术有限公司;
 β -苯乙醇标准品(99%) 美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

Agilent 1200 series 液相色谱仪(配有紫外检测器和 Rev.B.01.02 色谱工作站) 美国安捷伦公司。

色谱柱: ZORBAX Extend- C_{18} (4.6mm \times 250mm, 5 μ m); Gemini C_{18} (4.6mm \times 250mm, 5 μ m); Synergi Hrdro-RP C_{18} (4.6mm \times 250mm, 4 μ m); 保护柱: Analytical KJO-4282(4.0mm \times 2.0mm)。

1.3 色谱条件

色谱分离柱: Synergi Hrdro-RP C_{18} (4.6mm \times 250mm, 4 μ m); 保护柱: Analytical KJO-4282(4.0mm \times 2.0mm); 流动相: 甲醇-水=50:50(V/V); 检测波长: 210nm; 流速: 1ml/min; 进样量: 20 μ l; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

1.4 标准溶液的配制

β -苯乙醇标准储备液: 准确称取 100mg β -苯乙醇标准品于 100ml 容量瓶中, 用 20% 的乙醇水溶液定容。

β -苯乙醇工作液: 取 10ml β -苯乙醇标准储备液于 100ml 的容量瓶中, 用 20% 的乙醇水溶液定容, 其浓度为 100mg/L。再用流动相分别稀释至 50、20、10、5、1 和 0.5mg/L。

1.5 试样处理

准确移取 20ml 黄酒样品于 100ml 容量瓶中, 用 20% 乙醇水溶液定容, 摇匀, 经 0.45 μ m 滤膜过滤即可进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同色谱柱分离效果的比较

本实验选择了 3 根 C_{18} 色谱柱, 在不同的色谱分离条件下对相同的黄酒样品进行分析, 比较分析结果, 最终发现用 Synergi Hrdro-RP C_{18} (4.6mm \times 250mm, 4 μ m) 的分离效果最好。

2.2 洗脱液的选择

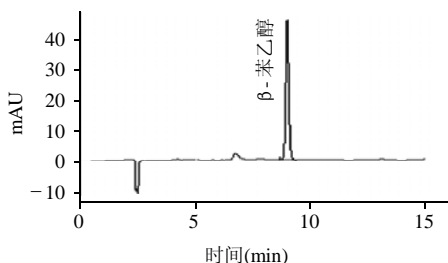


图1 β -苯乙醇标样色谱图

Fig.1 Chromatogram of β -phenylethanol standard

本实验选择用甲醇-水体系作为流动相, 分别以不同的甲醇-水比例进行实验, 结果表明, 当甲醇:水为 50:50(V/V)时, 可以获得良好的色谱峰, 样品中的杂质

与目标化合物能完全分离开来, 图 1、2 是流动相最佳比例条件下得到的 β -苯乙醇标样及样品的色谱图。

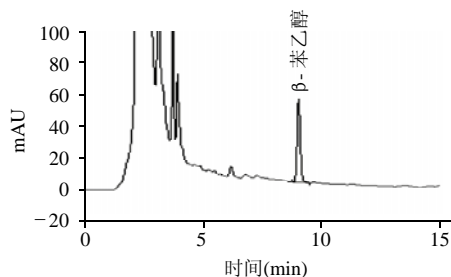


图2 黄酒样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of Chinese rice wine

2.3 线性范围和线性方程

在最佳实验条件下建立峰面积(Y)与 β -苯乙醇含量(X)的关系曲线, 得到其线性方程为 $Y=64.841X+16.543$, 相关系数 $R=0.9999$, 线性范围为 0.5~50mg/L。

2.4 方法的精密度和检出限

表1 黄酒样品中 β -苯乙醇测定方法的精密度($n=6$)

Table 1 Determination precision for β -phenylethanol in a Chinese rice wine sample ($n=6$)

测定次数	1	2	3	4	5	6	平均值	相对标准偏差(%)
β -苯乙醇浓度(mg/L)	15.14	14.99	14.94	15.17	15.07	15.04	15.06	0.6

由表 1 的数据可以看出, 该方法的重现性比较好, 6 次重复测定的相对标准偏差仅为 0.6%。进样量为 20 μ l 时以 3 倍信噪比($S/N=3$)和 10 倍信噪比($S/N=10$)分别作为定性和定量检测下限, 结果定性检出限为 0.05mg/L、定量检出限为 0.15mg/L, 这说明了该方法对 β -苯乙醇的检测具有较低的检出限。

2.5 可靠性实验

由该方法检测得到的结果是否可靠, 本实验不仅测定了 β -苯乙醇的回收率, 同时还与标准的 GC 检测结果进行比较, 进一步确定方法的可靠性。

2.5.1 加标回收率实验

表2 黄酒中 β -苯乙醇的加标回收率实验结果

Table 2 Recoveries for β -phenylethanol in Chinese rice wine spiked at 5.00, 15.00 and 30.00 mg/L

本底值 (mg/L)	标准加入量 (mg/L)	加标后测定值 (mg/L)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
14.06	5.00	19.00	99.7	99.5	0.2
	5.00	18.95	99.4		
	5.00	18.94	99.4		
	15.00	29.02	99.9	99.8	0.3
	15.00	28.89	99.4		
	15.00	29.06	100.0		
30.00	30.00	43.96	99.8	99.5	0.6
	30.00	43.56	98.8		
	30.00	44.01	99.8		

取同一黄酒样品 20ml, 分别添加三个不同浓度的 β -苯乙醇标准溶液, 然后按照上面确定的测定方法进行测定, 结果见表 2。

对 5.00、15.00 和 30.00mg/L 三个低、中、高不同的添加量, 平均回收率为 99.5%~99.8%, 相对标准偏差为 0.2%~0.6%。

2.5.2 与标准 GC 法测定结果的比较

取四种不同的黄酒样品, 分别用本研究的 RP-HPLC 与 GB/T13662—2000 中规定的标准 GC 方法进行测定, 测定结果见表 3。

表 3 RP-HPLC 与 GC 结果的比较

Table 3 Comparison between this method and GC determination results of β -phenylethanol in four different rice wine samples

样品	1	2	3	4
RP-HPLC 测得含量(mg/L)	40.8	85.8	97.3	122.0
GC 测得含量(mg/L)	40.5	86.2	97.1	122.5

从表 3 可以看出, 两种方法所测得的结果差别甚微。但是 GC 法采取的是直接进样分析, 对仪器的污染比较严重, 依此来看本方法要优于 GC 法。

2.6 黄酒样品中 β -苯乙醇含量的测定结果

在市场上随意挑选了不同产地的 14 个黄酒样品, 用以上所确定的色谱条件分析, 结果见表 4。

表 4 黄酒中 β -苯乙醇

Table 4 Results of β -phenylethanol determination in 14 Chinese rice wine samples by this method

名称	产地	类型	β -苯乙醇(mg/L)
和酒	上海市	半甜	90.1
福建老酒	福建省福州市	半甜	69.5
民天老酒	福建省福州市	半甜	67.2
闽江老酒	福建省闽侯县	清爽型黄酒	78.1
马祖黄酒	福建省连江县	清爽型黄酒	64.8
当家人老酒	福建省福州市	清爽型黄酒	71.7
绍兴花雕酒(古越龙山)	浙江绍兴市	半干	110.6
绍兴加饭酒(古越龙山)	浙江绍兴市	半干	119.9
特制塔牌花雕酒	浙江绍兴市	半干	102.2
会稽山老酒	浙江绍兴市	半干	70.8
黄中皇	浙江绍兴市	清爽型黄酒	71.9
莫干山老酒	浙江德清	清爽型黄酒	70.2
上海老酒	浙江德清	清爽型黄酒	58.7
善好酒	浙江三门	清爽型黄酒	64.8

不同的黄酒 β -苯乙醇含量的要求不同, 清爽型黄酒中 β -苯乙醇应高于 35.0mg/L, 半干型黄酒中 β -苯乙醇应高于 80.0mg/L, 半甜型黄酒中 β -苯乙醇应高于 80.0mg/L^[5-6]。

从表 4 可以看出, 不同样品 β -苯乙醇的含量差别比较大, 但是它们的含量完全符合标准要求, 绍兴黄酒由于是地域保护产品, 对 β -苯乙醇的含量不做要求, 但从测得的结果来看, 绍兴黄酒中 β -苯乙醇的含量总体也是比较高的。

β -苯乙醇是由酵母在发酵过程中自然形成, 在酵母细胞中, β -苯乙醇的生成有两个途径, 分别是苯丙酮酸途径和 1907 年 Ehrlich 发现的艾氏途径, β -苯乙醇的合成走哪一条途径取决于原料中氮源的种类^[7-9], 因此企业可以通过改善生产工艺提高黄酒中 β -苯乙醇的含量。

3 结 论

β -苯乙醇是一种重要的芳香风味化合物, 是黄酒芳香主体的重要组成物质之一。本研究采用反相高效液相色谱法对黄酒中的 β -苯乙醇进行了定性定量分析, 该检测方法只需对酒样进行简单的稀释和过滤, 即可进行分析, 操作简单, 相对标准偏差为 0.6% ($n=6$), 方法的检出限为 0.05mg/L, 线性范围为 0.5~50mg/L, 回收率为 99.5%~99.8%, 具有线性范围广、灵敏度高、重现性好的特点。结果与气相色谱法相差甚微, 说明该方法检测黄酒中的 β -苯乙醇所得到数据准确可靠, 可以作为测定黄酒中 β -苯乙醇的方法。从本次对 14 种不同黄酒中 β -苯乙醇的分析结果来看, 绍兴黄酒 β -苯乙醇的含量较高, 但是黄酒的酒香不是指某一种化合物的突出香气, 而是一种复合香, 评价黄酒酒香的好坏还需综合考虑黄酒的其他香气成分。

参考文献:

- [1] FABRE C E, BLANC P J, GOMA G. 2-Phenylethyl alcohol: an aroma profile[J]. *Perfum Flavor*, 1998, 23: 43-45.
- [2] 李家寿. 黄酒色、香、味成分来源浅析[J]. *酿酒科技*, 2001(3): 48-50.
- [3] 鲍忠定, 许荣年. 黄酒香气成分的分析[J]. *酿酒科技*, 1999(5): 66-67.
- [4] 陈青俊, 丁献荣, 汪庆旗, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法测定黄酒中 β -苯乙醇的含量[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 30(3): 94-96.
- [5] 任一平, 许容年, 杜钟, 等. GB/T 13662—2000 黄酒[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.
- [6] 崔坚, 周建明, 刘盈福, 等. QB/T2746—2005 清爽型黄酒[S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [7] AKITA O, IDA T, OBATA T, et al. Mutants of *saccharomyces cerevisiae* producing a large quantity of β -phenylethyl alcohol and β -phenylethyl acetate[J]. *Ferment Bioeng*, 1990, 69: 125-128.
- [8] 黄亚东, 印伯星. 关于啤酒酵母产生苯乙醇的研究[J]. *酿酒科技*, 2003(5): 62-63.
- [9] 梅建风, 陈虹. 生物转化法生成 β -苯乙醇[J]. *微生物学通报*, 2005, 2(2): 114-118.