

HS-SPME-GC-Orbitrap-MS法测定果酒中的醛酮类和呋喃类化合物

王磊^{1,2}, 王春光¹, 刘雅冉¹, 谷佩珊¹, 刘佳妮¹, 王丽卫¹, 朱保庆^{1,*}

(1.北京林业大学生物科学与技术学院, 林业食品加工与安全北京市重点实验室, 北京 100083;

2.上海可醇食品科技有限公司, 上海 201317)

摘要: 采用顶空固相微萃取-气相色谱-静电场轨道阱质谱联用法建立同时测定果酒中5种醛酮类和4种呋喃类化合物的分析方法。通过模拟酒液以及枸杞酒、蓝莓酒和山楂酒中检验表明, 上述化合物检出限在0.004~6.300 μg/L之间, 定量限在0.01~21.00 μg/L之间, 加标回收率均在81%~120%之间, 精密度不大于19.08%, 该方法准确度高, 能够满足果酒中醛酮类和呋喃类化合物定性定量的要求。

关键词: 果酒; 醛酮类化合物; 呋喃类化合物; 顶空固相微萃取; 气相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱

Accurate Determination of Aldehydes, Ketones and Furans in Non-grape Wines by Headspace-Solid-Phase Microextraction Combined with High-Resolution Gas Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry

WANG Lei^{1,2}, WANG Chunguang¹, LIU Yaran¹, GU Peishan¹, LIU Jiani¹, WANG Liwei¹, ZHU Baoqing^{1,*}

(1. Beijing Key Laboratory of Forestry Food Processing and Safety, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Shanghai Kechun Food Science and Technology Co. Ltd., Shanghai 201317, China)

Abstract: In this study, headspace-solid-phase microextraction extraction combined with gas chromatography-orbitrap-mass spectrometry (HS-SPME-GC-Orbitrap-MS) was used to establish a method for the simultaneous determination of five aldehydes and ketones and four furans in fruit wines. The method was validated on model wine, goji berry wine, blueberry wine and hawthorn wine. The limits of detection (LODs) for all target compounds ranged from 0.004 to 6.300 μg/L, and the limits of quantification (LOQs) were between 0.01 and 21.00 μg/L. The recoveries of all analytes in spiked wine samples were between 81% and 120% and the relative standard deviations (RSDs) for precision were equal to or less than 19.08%. This method is accurate and can meet the requirements for the quantification of aldehydes, ketones and furans in fruit wines.

Keywords: fruit wines; aldehydes and ketones; furans; headspace-solid-phase microextraction; gas chromatography-orbitrap mass spectrometry

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221102-013

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)16-0353-09

引文格式:

王磊, 王春光, 刘雅冉, 等. HS-SPME-GC-Orbitrap-MS法测定果酒中的醛酮类和呋喃类化合物[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 353-361. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221102-013. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Lei, WANG Chunguang, LIU Yaran, et al. Accurate determination of aldehydes, ketones and furans in non-grape wines by headspace-solid-phase microextraction combined with high-resolution gas chromatography-orbitrap mass spectrometry[J]. Food Science, 2023, 44(16): 353-361. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221102-013. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-11-02

基金项目: 北京林业大学科技创新计划项目(2021ZY65); 北京农学院2023年省部级科研平台开放课题(BUAOP202306)

第一作者简介: 王磊(1988—)(ORCID: 0000-0002-2363-9697), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为食品风味化学。

E-mail: 364788380@qq.com

*通信作者简介: 朱保庆(1982—)(ORCID: 0000-0002-9767-6888), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品风味化学、食品生物技术。E-mail: zhubaoqing@bjfu.edu.cn

果酒是由不同种类的水果经发酵后制成的含酒精饮料, 适合制作果酒水果原料包括但不限于枸杞、蓝莓、山楂、荔枝等^[1]。果酒保留了水果原料中部分营养物质, 如人体必需的多种氨基酸、矿物质、维生素、多酚等天然营养成分, 具有一定营养价值, 适当饮用能够促进消化、提高食欲^[2]。随着全球果酒消费市场的不断扩大, 果酒产品在酒精饮料消费中起着非常重要的作用。

果酒中关键挥发性化合物的组成决定果酒的香气品质, 进而影响消费者对产品的接受度。醛酮类和呋喃类均是果酒中潜在的重要呈香组分。醛酮类化合物能够赋予果酒“植物香”、“果香”、“花香”等香气属性^[3], 对果酒风味的构成有着重要的影响。然而, 由于醛类化合物可以通过相应的前体物通过氧化形成, 过度地氧化可能使果酒失去原有的“果香”香气, 给果酒带来“氧化味”^[4], 另外1-辛烯-3-酮等酮类物质浓度过高也会产生“泥土味”和“蘑菇味”等不愉悦的香气^[5]。呋喃类化合物能够贡献“甜香”、“烘烤香”、“坚果香”等香气属性^[3], 通常在发酵或陈酿过程中产生^[6], 但高含量的呋喃类化合物及其衍生物具有潜在的致癌毒性^[7]。因此, 监控果酒中醛酮类和呋喃类化合物含量有助于果酒品质的提升。

果酒中醛酮类和呋喃类化合物大多采用气相色谱-质谱联用技术进行检测。现有的研究主要集中在葡萄酒中这两类化合物的定性定量分析, 例如, Mayr等^[8]建立了衍生化结合固相萃取-气相色谱-串联质谱技术鉴定葡萄酒中包括己醛、糠醛在内的18种“氧化味”化合物的检测方法; 固相微萃取-气相色谱-质谱(solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, SPME-GC-MS)法可以用于葡萄酒中包括呋喃类化合物内的多种杂环类化合物的检测^[9]; 顶空固相微萃取(headspace-solid-phase microextraction, HS-SPME)-全二维气相色谱-飞行时间质谱技术也用于评价葡萄成熟度和浸渍对醛酮类和呋喃类化合物含量的影响^[10]。然而, 这些化合物在果酒中具有低含量、低阈值的特点, 如1-辛烯-3-酮的阈值仅有40 ng/L, 正壬醛和正辛醛的阈值也仅有1 μg/L和2.5 μg/L; 同时, 果酒往往采用不同水果发酵制成, 果酒的基质相较于葡萄酒基质而言较为复杂, 其在糖、酸、pH值等基质条件有所不同^[11-13]。较低浓度和复杂的果酒基质对醛酮和呋喃类化合物的定量分析造成一定困难, 因此需要建立适用于果酒中更准确的醛酮类和呋喃类化合物的检测方法。

自2005年Makarov发明的静电场轨道阱质谱(orbitrap-mass spectrometry, Orbitrap-MS)技术首次商业化以来, 这种具有高分辨率和高灵敏度的质谱新技术在化合物的定性和定量分析方面显示出巨大的优势^[14-17], 许多研究都集中在采用液相色谱联用的代谢组学方面^[18-19]。GC与Orbitrap-MS联用后, 其分辨率可以达到60 000 (m/z 210, FWHM), 质量精度可以达到 1×10^{-6} , 灵敏度可以达到飞秒级, 这为推进GC-MS技术的深度和广度

提供了更多的可能性^[20-21]。目前, GC-Orbitrap-MS开始用于检测农药残留^[22]、儿童用品中的亚硝胺^[23]、环境中的持久性有机污染物^[24]、尿液中的兴奋剂和违禁物质^[25]以及代谢组学^[26]。已有研究报道, GC-Orbitrap-MS可以对辣椒中的苯环化合物进行准确的定性定量^[27]; 前期使用HS-SPME-GC-Orbitrap-MS方法检测果酒中内酯和挥发性酚类化合物的方法^[28]。因此, GC-Orbitrap-MS是鉴定果酒中痕量香气化合物的一种潜在技术。

以往的研究采用衍生化或固相萃取法对果酒中的醛酮类和呋喃类化合物进行提取制备, 然而这些方法不易操作且较为耗时^[8,29-30]。而HS-SPME法是一种无溶剂的样品制备程序, 具有快速、样本量小的优点, 适合于直接分析复杂基质中的挥发性化合物^[31]。

本实验在前期研究的基础上, 尝试使用HS-SPME-GC-Orbitrap-MS检测果酒中醛酮类和呋喃类化合物, 并分别在模拟酒溶液、枸杞酒、蓝莓酒和山楂酒中进行方法验证, 并利用此方法对不同果酒中这两类化合物进行检测, 旨在建立一种适用果酒中醛酮类和呋喃类化合物的检测方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

3款“北域时代”的蓝莓酒, 生产于2019年的干酒(B1), 生产于2017年的干酒(B2)和生产于2019年的半干酒(B3); 1款“生桦”的生产于2019年的蓝莓干酒(B4); 1款“伊村山野”的生产于2019年的蓝莓干酒(B5), 蓝莓酒的乙醇体积分数均为12%, 产自黑龙江。1款“宁夏红”2019年生产的枸杞半干酒, 乙醇体积分数为7%(G1); 4款“森淼”2017年生产的不同批次的乙醇体积分数11%枸杞干酒(G2~G5), 枸杞酒产自宁夏; 1款“森淼”2016年生产的乙醇体积分数11%枸杞干酒(G6)。2款“圣八礼”2019年生产的不同类型的乙醇体积分数12%山楂半干酒(H1、H2); 3款“圣八礼”2020年生产的不同类型的乙醇体积分数13%山楂半干酒(H3~H5), 山楂酒产自中国山东。模拟酒溶液参考Liu Yaran等^[32]研究配制: 20 g/L葡萄糖、6 g/L酒石酸、12%乙醇溶于纯水中, 并使用NaOH调pH值至3.0。所有实验样品均进行3次重复测定。

1.2 仪器与设备

50/30 μm DVB/CAR/PDMS固相微萃取头 美国Supelco公司; TriPlus RSH自动进样器、Trace 1300气相色谱仪、Q Exactive静电场轨道阱高分辨质谱德国Thermo Fisher Scientific公司; DB-WAX色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm) 美国J&W Scientific公司。

1.3 方法

1.3.1 高分辨质谱数据库的建立

表1 HS-SPME-GC-Orbitrap-MS方法中5种醛酮类和4种呋喃类化合物标准品信息及添加量

Table 1 Information about standards of five aldehydes and ketones and four furans and their spiked concentrations for HS-SPME-GC-Orbitrap-MS analysis

化合物名称	标准品品牌	标准品纯度/%	建立质谱数据库标准品添加量/($\mu\text{g/L}$)	加标回收率标准品添加量/($\mu\text{g/L}$)	重现性/重复性标准品添加量/($\mu\text{g/L}$)
醛酮类					
正己醛	麦克林	99.0	156 800	10	140
正辛醛	麦克林	99.0	6 880	10	9
正壬醛	麦克林	96.0	120 000	10	117
1-辛烯-3-酮	麦克林	95.0	15 000	10	16
2-壬酮	麦克林	99.0	3 240	10	4
呋喃类					
糠醛	阿拉丁	99.5	874 400	1 000	840
乙酰呋喃	毕得	99.0	111 700	100	98
2-糠酸乙酯	阿拉丁	97.0	36 980	50	43
糠醇	阿达玛斯	97.0	112 800	2 000	433

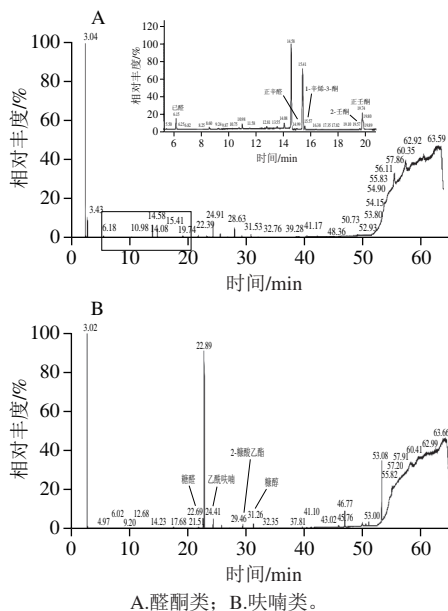


图1 使用GC-Orbitrap-MS分析标准品混合溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard mixtures analyzed by GC-Orbitrap-MS

表2 5种醛酮类和4种呋喃类化合物的信息

Table 2 Information about five aldehydes and ketones, and four furans

中文名称	英文名称	分子式	保留指数 ^a	香气阈值 ^b ($\mu\text{g/L}$)	香气描述 ^b	定量离子碎片 (m/z)	定性离子碎片 (m/z)
醛酮类							
正己醛	hexanal	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$	1 066	20	青草, 果香	44.025 66	41.038 36 57.033 52
正辛醛	octanal	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}$	1 269	2.5	柠檬, 橘子, 青草	69.069 93	56.062 08 81.069 96
正壬醛	nonanal	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$	1 371	1	脂香, 玫瑰, 橘子	67.054 26	41.038 38 81.069 94
1-辛烯-3-酮	1-octen-3-one	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$	1 281	0.04	蘑菇味	55.017 89	70.041 38 43.054 17
2-壬酮	2-nonanone	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$	1 365	15	果香, 花香, 脂香	58.041 33	43.017 72 71.049 16
呋喃类							
糠醛	furfural	$\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$	1 431	14 100	甜香, 烘烤香, 木香, 面包香	95.012 79	96.020 53 39.022 77
乙酰呋喃	acetylfuran	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	1 468	—	坚果香, 甜香, 烘烤香	95.012 81	110.036 37 —
2-糠酸乙酯	ethyl 2-furoate	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3$	1 581	—	冰激凌香	95.012 79	112.015 54 140.046 97
糠醇	furfuryl alcohol	$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$	1 622	—	甜香, 霉味	97.028 51	98.036 29 81.033 60

注: a.保留指数为DB-WAX极性柱条件下计算; b.香气阈值和香气描述引用自<http://foodflavorlab.cn/>[35]。

参考Liu Yaran等^[32]的方法建立高分辨质谱数据库。

目标分析物的高分辨质谱图是通过直接液体进样的进样方式获得。以二氯甲烷为溶剂, 目标化合物根据化合物结构, 添加制成不同标准品混合溶液, 分别记为醛酮类和呋喃类, 目标化合物的加标量见表1。标准品混合溶液采用不分流的进样方式, 以1 μL 的进样量进样, 色谱图如图1所示。目标化合物的高分辨率质谱由软件TraceFinder Software (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) 导出为MSP文件, 随后用于鉴定分析果酒样品中的目标化合物。液体进样是在TriPlus RSH自动进样器 (Thermo Fisher Scientific, Bermen, Germany) 上进行的。

1.3.2 HS-SPME

采用前期优化好的HS-SPME方法^[32]提取样品中的目标化合物。在15 mL顶空进样瓶中加入1.00 g NaCl, 再加入5 mL样品和2种内标化合物各10 μL (0.590 g/L薄荷醇、0.133 g/L对氟苯甲醛)。使用50/30 μm 条件DVB/CAR/PDMS萃取头进行萃取, 在加热台60 $^\circ\text{C}$ 条件下, 搅拌30 min, 然后使用活化后的萃取头插入小瓶的顶部空间, 吸附30 min。萃取后取出萃取头, 立即插入GC进样口在250 $^\circ\text{C}$ 下解吸10 min。

1.3.3 GC-Orbitrap-MS测定

采用DB-WAX色谱柱 (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm), 设定GC-Orbitrap-MS的条件如下^[32]: 载气为高纯氦气, 流速为1.2 mL/min; 升温程序: 40 $^\circ\text{C}$ 保持5 min, 然后以3 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至180 $^\circ\text{C}$, 最后以3 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 从180 $^\circ\text{C}$ 升温至250 $^\circ\text{C}$ 并保持10 min, 总时间为64 min; 离子源温度280 $^\circ\text{C}$; 电子电离源; 电离能为70 eV; 质谱接口温度230 $^\circ\text{C}$, 质量扫描范围 m/z 33~300, 质谱分辨率为60 000 (m/z 200, FWHM)。

$\text{C}_6\sim\text{C}_{24}$ 正构烷烃用于计算目标化合物的保留指数。使用软件TraceFinder Software (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) 进行质谱解卷积, Xcalibur version

4.1 中的Processing setup, Quan browser and Qual browser (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) 对目标化合物进行定量。通过对比目标化合物的保留指数和离子碎片, 对未加标果酒样品中的目标化合物进行鉴定, 其中每个目标化合物具有1个定量离子碎片, 1个以上定性离子碎片用于定性, 定量和定性离子碎片详见表2。

1.3.4 方法评价

参考Liu Yaran等^[32]的方法对所建立的方法进行评价, 评价的指标包括: 线性关系、基质效应(matrix effect, ME)、检出限(limit of detection, LOD)、定量限(limit of quantitation, LOQ)、准确度、重复性和重现性。

线性关系是在4种不同的果酒基质中进行评价, 包括模拟酒溶液、枸杞酒(G2)、蓝莓酒(B1)和山楂酒(H1)。根据果酒中目标化合物的浓度, 将这些化合物分别添加到模拟酒溶液和真实果酒中, 共稀释得到12个浓度梯度, 涵盖果酒样品中各物质的浓度范围。各浓度梯度的上述样品经过与酒样相同的前处理方法和GC-Orbitrap-MS分析后, 构建目标化合物浓度和定量离子碎片峰面积比的校准曲线。ME是通过比较各目标化合物在不同基质中校准曲线的斜率得到, 按式(1)计算:

$$ME/\% = \frac{\text{真实果酒中的斜率}}{\text{模拟酒溶液中的斜率} - 1} \times 100 \quad (1)$$

通过分析上述各浓度梯度样品的信号强度, 随着目标化合物的浓度不断降低, 直到在3种果酒基质(枸杞酒G2、蓝莓酒B1和山楂酒H1)中, 连续稀释浓度之间目标化合物的峰面积无显著差异($P < 0.05$)确定物质在各基质中的LOD。然后根据LOD和LOQ的信噪比分别为3和10计算得到LOQ。

方法的准确度通过各目标化合物在不同果酒基质中的加标回收率进行评价。根据果酒中目标化合物的浓度, 在3种不同果酒基质中添加目标化合物, 目标化合物的加标量见表1。然后利用各基质对应的校准曲线计算加标和未加标的果酒样品, 对目标化合物进行定量分析。最后, 按式(2)计算加标回收率:

$$\text{加标回收率}/\% = \frac{\text{加标样品测定质量浓度} - \text{未加标样品测定质量浓度}}{\text{实际加标质量浓度}} \times 100 \quad (2)$$

方法的重复性和重现性, 在果酒(枸杞酒G2)样品中, 添加目标化合物进行测定, 目标化合物的添加量见表1。方法的重复性(日内精密性)是在1 d之内连续重复6次测定上述加标酒样, 方法的重现性(日间精密性)是6 d之内重复6次测定上述加标酒样。方法的重复性和重现性均以相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示最终结果。

1.4 数据统计与分析

高分辨质谱图的绘制使用Origin 8.0完成。果酒中目标化合物含量的对数值和气味活度值(odor active value, OAV)的气泡图采用R语言中的“ggplot”包完成。

2 结果与分析

2.1 高分辨质谱数据库的建立

NIST和Wiley等商业质谱数据库中, 大部分挥发性化合物的质谱是通过气相色谱-单四极杆质谱联用仪(GC-quadrupole-MS)获得的低分辨率质谱图。然而, 根据本实验的结果发现GC-Orbitrap-MS和GC-quadrupole-MS获得的质谱信息在某些特定化合物上有很大的差异。

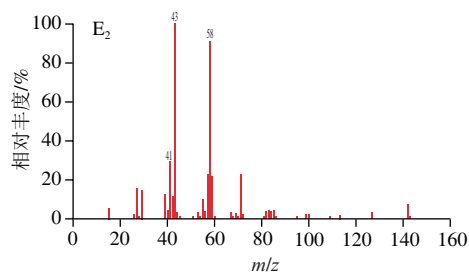
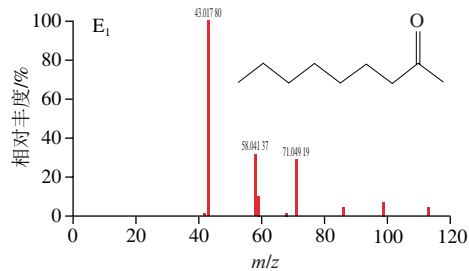
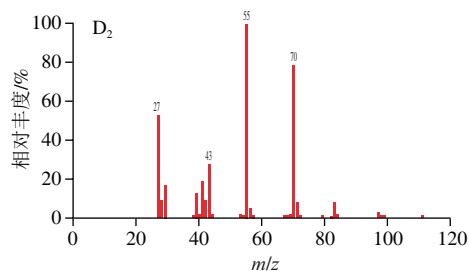
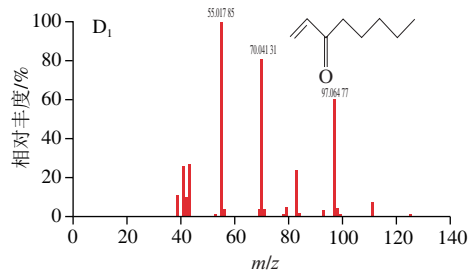
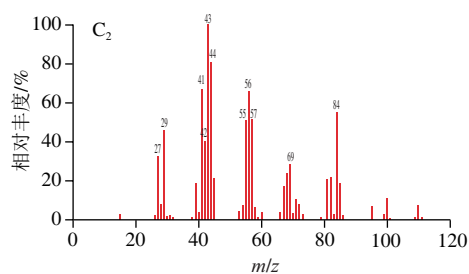
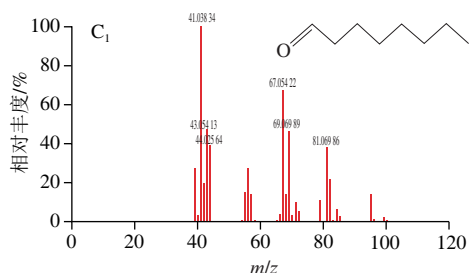
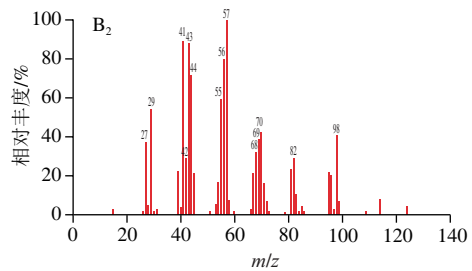
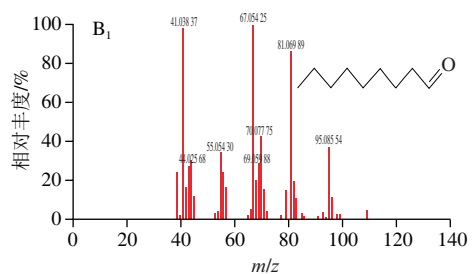
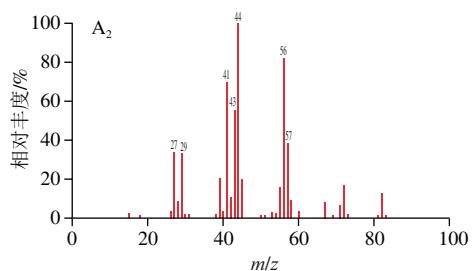
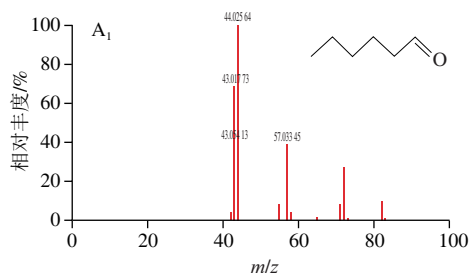
醛酮类化合物如正己醛、正壬醛、正辛醛和2-壬酮在高/低分辨质谱图的离子丰度具有明显差异(图2)。正己醛在高分辨质谱图中, m/z 57.033 45的丰度较高, 然而在低分辨率质谱图中 m/z 56的丰度明显高于 m/z 57; 正壬醛的低分辨率质谱图中丰度较高的离子碎片有 m/z 41、46、44、56、57, 然而在高分辨率质谱图中丰度较高点的离子碎片仅有 m/z 41.038 37、67.054 25和 m/z 81.069 89; 正辛醛中高分辨率质谱图中丰度最高的离子碎片是 m/z 41.038 34, 在低分辨率质谱图中丰度最高的离子碎片则是 m/z 43; 在2-壬酮的高分辨率质谱图中 m/z 58.041 37的丰度远低于 m/z 43.017 8, 然而在低分辨率质谱图中 m/z 43和 m/z 58的丰度接近。另外, 1-辛烯-3-酮在高分辨率质谱图中检测到 m/z 97.064 77, 然而在低分辨率质谱图中未检测到 m/z 97的碎片。

呋喃类化合物中乙酰呋喃和2-糠酸乙酯在高/低分辨率质谱图中检测到的离子碎片及其丰度差异不明显, 然而在糠醛和糠醇的高/低分辨率质谱图中具有明显差异(图3)。虽然高分辨率质谱扫描的范围是 m/z 33~300, 但是在糠醇的高分辨率质谱图中未检测到 m/z 33~80的离子碎片, 在糠醇的低分辨率质谱图中 m/z 41、53、69、70和其他 m/z 33~80的离子碎片; 在糠醛的低分辨率质谱图中主要检测到的离子碎片是 m/z 95、96和 m/z 39, 然而在高分辨率质谱图中, 检测到的主要离子碎片是 m/z 43.017 8、58.041 37和 m/z 71.049 19。

高分辨率质谱和低分辨率质谱存在明显差异的现象与前人研究结果一致^[33]。有研究发现在70 eV的电子电离源下, Orbitrap-MS会改变部分化合物的质谱信息, 如产生不同离子碎片、改变离子碎片的相对丰度^[34]。在本实验中, 也发现了相同的现象, 这可能是由于这些离子碎片在静电场轨道阱中的捕获效率较低所导致^[20]。当与NIST、Wiley等常见质谱数据库进行比对时, Orbitrap-MS产生的质谱信息的改变可能直接影响这些化合物定性的准确性。因此, 使用GC-Orbitrap-MS检测挥发性香气化合物需建立目标化合物的高分辨质谱信息数据库, 方可保证定性的准确性。

本实验在先前的研究基础上, 在香气化合物索引数据库^[35](<http://foodflavorlab.cn/>)中, 补充5种醛酮类和4种呋喃类化合物的相关信息。该数据库不仅提供目标化合物的高分辨质谱信息(离子碎片和相对丰度), 还

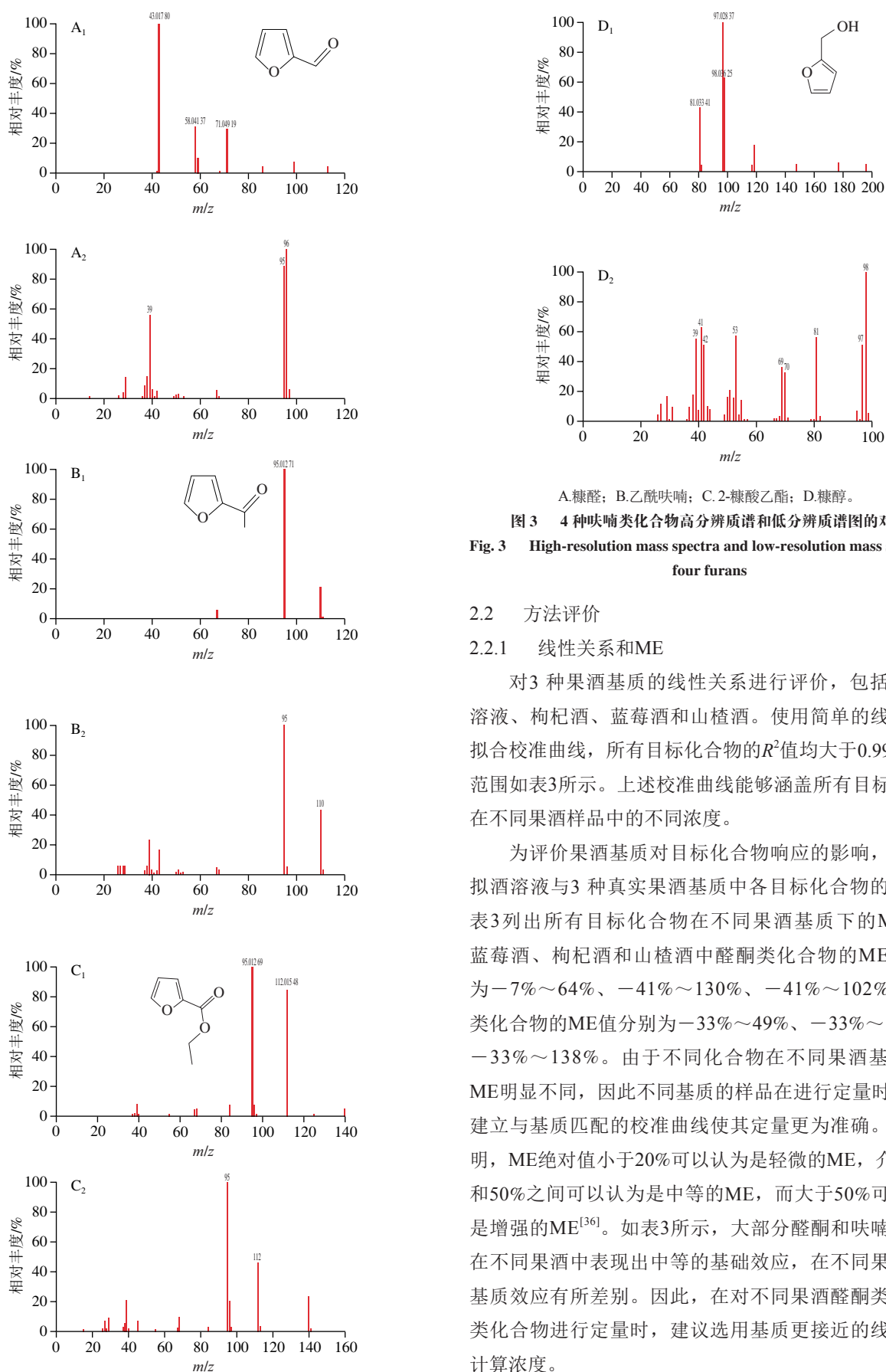
提供香气化合物的基本信息,如:保留指数、CAS号、化学结构图、香气描述和葡萄酒的香气阈值。为鉴定果酒中的目标化合物,选用高分辨质谱中质量偏差小于 5×10^{-6} 的定量和定性离子碎片进行比对。在使用Orbitrap-MS进行定性定量时,可参考该数据库中的高分辨质谱信息,从而保证定性定量的准确性,目标化合物的定量和定性离子碎片信息见表2。



A. 正己醛; B. 正壬醛; C. 正辛醛; D. 1-辛烯-3-酮; E. 2-壬酮。下标1.高分辨质谱; 2.低分辨质谱; 低分辨质谱图引用自NIST 20谱库; 高分辨质谱图质量扫描范围为 m/z 30~330; 下同。

图2 5种醛酮类化合物高分辨质谱和低分辨质谱图的对比

Fig. 2 High-resolution mass spectra and low-resolution mass spectra of five aldehydes and ketones



A.糠醛; B.乙酰呋喃; C.2-糠酸乙酯; D.糠醇。

图3 4种呋喃类化合物高分辨质谱和低分辨质谱图的对比

Fig. 3 High-resolution mass spectra and low-resolution mass spectra of four furans

2.2 方法评价

2.2.1 线性关系和ME

对3种果酒基质的线性关系进行评价,包括模拟酒溶液、枸杞酒、蓝莓酒和山楂酒。使用简单的线性回归拟合校准曲线,所有目标化合物的 R^2 值均大于0.99,线性范围如表3所示。上述校准曲线能够涵盖所有目标化合物在不同果酒样品中的不同浓度。

为评价果酒基质对目标化合物响应的影响,比较模拟酒溶液与3种真实果酒基质中各目标化合物的斜率。表3列出所有目标化合物在不同果酒基质下的ME值。蓝莓酒、枸杞酒和山楂酒中醛酮类化合物的ME值分别为-7%~64%、-41%~130%、-41%~102%;呋喃类化合物的ME值分别为-33%~49%、-33%~117%、-33%~138%。由于不同化合物在不同果酒基质中的ME明显不同,因此不同基质的样品在进行定量时,需要建立与基质匹配的校准曲线使其定量更为准确。研究表明,ME绝对值小于20%可以认为是轻微的ME,介于20%和50%之间可以认为是中等的ME,而大于50%可以认为是增强的ME^[36]。如表3所示,大部分醛酮和呋喃化合物在不同果酒中表现出中等的基础效应,在不同果酒中的基质效应有所差别。因此,在对不同果酒醛酮类和呋喃类化合物进行定量时,建议选用基质更接近的线性关系计算浓度。

表3 HS-SPME-GC-Orbitrap-MS方法中5种醛酮类和4种呋喃类化合物的线性范围和ME

Table 3 Linearity ranges and matrix effects for optimized HS-SPME-GC-Orbitrap-MS analysis of five aldehydes and ketones, and four furans

化合物	线性范围/ ($\mu\text{g/L}$)	模拟酒溶液 斜率	蓝莓酒				枸杞酒				山楂酒			
			斜率	R^2	ME/%		斜率	R^2	ME/%		斜率	R^2	ME/%	
醛酮类														
正己醛	700.00~0.28	1.59×10^3	1.93×10^3	0.9993	22	1.68×10^3	0.9856	5	1.99×10^3	0.9982	25			
正辛醛	46.80~0.09	2.27×10^3	3.07×10^3	0.9994	35	2.30×10^3	0.9798	1	2.92×10^3	0.9991	28			
正壬醛	585.00~0.59	8.35×10^3	7.74×10^3	0.9999	-7	4.89×10^3	0.9925	-41	4.93×10^3	0.9994	-4			
1-辛烯-3-酮	77.50~0.03	1.35×10^3	1.85×10^3	0.9903	37	3.11×10^3	0.9868	130	2.73×10^3	0.9993	102			
2-壬酮	18.80~0.04	6.36×10^3	1.05×10^3	0.9997	64	7.66×10^3	0.9754	20	6.85×10^3	0.9997	8			
呋喃类														
糠醛	4.2000~8.40	2.54×10^4	3.79×10^4	0.9943	49	4.34×10^4	0.9997	71	5.07×10^4	0.9929	99			
乙酰呋喃	492.00~0.20	1.67×10^4	2.34×10^4	0.9999	40	3.63×10^4	0.9993	117	3.98×10^4	0.9999	138			
2-糠酸乙酯	170.00~0.43	3.11×10^3	3.98×10^3	0.9985	28	5.61×10^3	0.9999	80	5.72×10^3	0.9989	84			
糠醇	2.164.00~2.16	3.00×10^3	2.00×10^3	0.9999	-33	2.00×10^3	0.9988	-33	2.00×10^3	0.9981	-33			

2.2.2 LOD和LOQ

如表4所示，醛酮类化合物的LOD范围为0.004~0.88 $\mu\text{g/L}$ ，呋喃类化合物LOD的范围为0.13~6.30 $\mu\text{g/L}$ ；醛酮类化合物LOQ的范围为0.01~2.93 $\mu\text{g/L}$ ，呋喃类化合物LOQ的范围为0.20~21.00 $\mu\text{g/L}$ 。所有目标化合物的LOD在3种果酒中都具有差异，这可能是ME所导致。研究结果表明，除乙酰呋喃、2-糠酸乙酯和糠醇未检索到香气阈值外，其他目标化合物的LOD都远低于其相应的香气阈值，因此，本实验建立的方法能够成功地评价目标化合物对果酒香气的贡献。

表4 不同果酒基质中5种醛酮类和4种呋喃类化合物的LOQ、LOD、准确度和精确度

Table 4 Accuracy, precision, LOQ and LOD of five aldehydes and ketones, and four furans in different wine matrices

化合物	重复性/%	重现性/%	蓝莓酒		枸杞酒			山楂酒			
			回收率/%	LOQ/ ($\mu\text{g/L}$)	LOD/ ($\mu\text{g/L}$)	回收率/%	LOQ/ ($\mu\text{g/L}$)	LOD/ ($\mu\text{g/L}$)	回收率/%	LOQ/ ($\mu\text{g/L}$)	LOD/ ($\mu\text{g/L}$)
醛酮类											
正己醛	14.67	3.93	119±13	0.28	0.08	84±7	0.70	0.21	118±1	0.28	0.08
正辛醛	11.68	1.74	115±6	0.02	0.01	89±9	0.23	0.07	109±9	0.09	0.03
正壬醛	17.58	6.27	113±1	0.12	0.04	84±1	2.93	0.88	98±10	0.59	0.18
1-辛烯-3-酮	13.02	19.08	106±9	0.02	0.01	81±6	0.03	0.01	98±0	0.03	0.01
2-壬酮	18.49	6.90	113±13	0.04	0.01	110±15	0.01	0.004	107±6	0.04	0.01
呋喃类											
糠醛	17.14	16.25	118±10	21.00	6.30	113±1	8.40	2.52	111±2	8.40	2.52
乙酰呋喃	17.96	7.82	90±3	0.49	0.15	113±4	0.98	0.29	110±1	0.20	0.06
2-糠酸乙酯	9.48	8.91	88±5	1.06	0.32	112±4	0.43	0.13	112±0	0.43	0.13
糠醇	8.80	15.96	104±3	4.33	1.30	120±1	10.82	3.25	108±2	2.16	0.65

2.2.3 准确度、重复性与重现性

如表4所示，3种果酒中所有目标化合物的加标回收率均在81%~120%之间，说明该方法准确可靠。该方法的重复性和重现性（精密度）通过计算RSD评价，重复性在1d之内重复检测6次，RSD在8.80%~18.49%之间；重现性在不同日期进行检测，共进行6次重复，RSD在

1.74%~19.08%之间。稳定的实验室环境对提高方法的准确度和精密度至关重要，上述实验都是在稳定的实验室环境温度下进行检测。通过上述指标可以证明，本实验所开发的HS-SPME-GC-Orbitrap-MS方法准确且稳定，可以满足果酒中醛酮类和呋喃类化合物的检测要求。

2.3 果酒中醛酮类和呋喃类化合物的浓度分析

将所优化建立的方法应用于检测不同种类果酒的目标化合物，包括6种枸杞酒、5种蓝莓酒和5种山楂酒。

2.3.1 5种醛酮类化合物

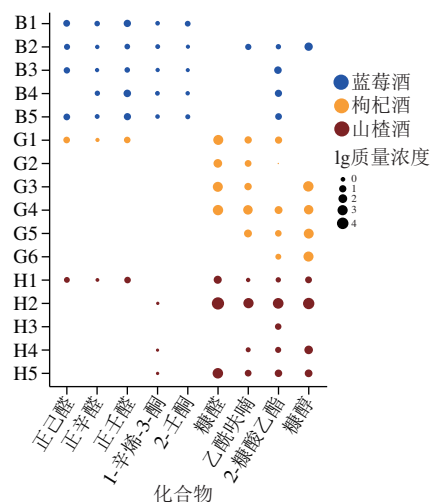
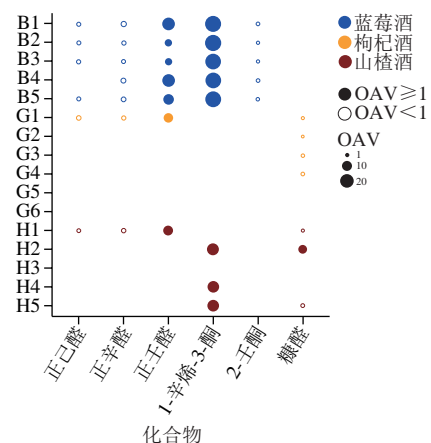


图4 不同果酒中目标化合物质量浓度气泡图

Fig. 4 Bubble plot of contents of analytes in blueberry wine



OAV ≥ 1, 实心圆圈; OAV < 1, 空心圆圈。

图5 不同果酒中目标化合物OAV气泡图

Fig. 5 Bubble plot of OAVs of analytes in blueberry wine

如表5和图4所示，醛类化合物在3种果酒中的质量浓度范围分别为：枸杞酒0.72~7.72 $\mu\text{g/L}$ ，蓝莓酒0.77~12.22 $\mu\text{g/L}$ ，山楂酒0.58~6.15 $\mu\text{g/L}$ 。酮类化合物在枸杞酒和山楂酒中的质量浓度范围分别为0.63~1.86 $\mu\text{g/L}$ 和0.42~0.44 $\mu\text{g/L}$ ，蓝莓酒中不含有酮类

表5 不同果酒中5种醛酮类和4种呋喃类化合物的平均质量浓度、质量浓度范围和OAV

化合物	蓝莓酒			枸杞酒			山楂酒		
	平均质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$) (检出率 ^a)	质量浓度范围/ ($\mu\text{g/L}$)	OAV ^b	平均质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$) (检出率)	质量浓度范围/ ($\mu\text{g/L}$)	OAV	平均质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$) (检出率)	质量浓度范围/ ($\mu\text{g/L}$)	OAV
醛酮类									
正己醛	6.06 (4)	5.45~6.43	<1	7.72 (1)	7.72~7.72	<1	2.71 (1)	2.71~2.71	<1
正辛醛	1.41 (5)	0.77~2.30	<1	0.72 (1)	0.72~0.72	<1	0.58 (1)	0.58~0.58	<1
正壬醛	7.35 (5)	2.13~12.22	2.13~12.22	5.95 (1)	5.95~5.95	5.95	6.15 (1)	6.15~6.15	6.15
1-辛烯-3-酮	0.89 (5)	0.86~0.95	21.54~23.63	tr/ndc (0)	0.00~0.00	<1	0.43 (3)	0.42~0.44	10.51~10.91
2-壬酮	1.00 (5)	0.63~1.86	<1	tr (0)	0.00~0.00	<1	tr (0)	0.00~0.00	<1
呋喃类									
糠醛	tr (0)	0.00~0.00	<1	1 044.13 (4)	64.07~1 573.47	<1	20 534.50 (3)	51.16~59 492.99	0.00~4.22
乙酰呋喃	3.24 (1)	3.24~3.24		76.56 (5)	6.13~309.09		281.23 (4)	0.89~1 113.55	
2-糠酸乙酯	11.10 (4)	1.69~17.50		13.97 (5)	0.26~46.86		551.96 (5)	2.12~2726.66	
糠醇	39.00 (1)	39.00~39.00		1 814.33 (4)	369.63~4 238.37		1 985.03 (4)	8.61~7 830.46	

注: a. 检出率表示化合物质量浓度高于LOQ的果酒样品数量; b. OAV通过香气化合物的浓度与感官之比计算, 香气化合物的香气阈值见表1; c. nd表示目标化合物未检出, tr表示目标化合物质量浓度未达到LOQ。

化合物。如表5和图5所示, 该方法所检测到的3种醛类化合物中, 仅有壬醛在果酒中达到香气阈值。在蓝莓酒中OAV的分布范围是2.13~12.22; 而在枸杞酒和山楂酒中, 各仅有1款果酒壬醛的质量浓度能够达到香气阈值, 其OAV值分别为5.95和6.15。壬醛在果酒中能够贡献“脂香”、“玫瑰”和“橘子”的香气。2种酮类化合物中仅有1-辛烯-3-酮在蓝莓酒和山楂酒的OAV大于1, 其在所有蓝莓酒中均达到香气阈值, 其OAV值的分布范围是21.54~23.63, 在3种达到香气阈值的山楂酒中OAV的分布范围是10.51~10.91。

2.3.2 4种呋喃类化合物

如表5和图4所示, 山楂酒中呋喃类化合物的含量较高, 质量浓度范围是0.89~59 492.99 $\mu\text{g/L}$, 其次是枸杞酒, 其呋喃化合物的质量浓度范围为0.26~4 238.37 $\mu\text{g/L}$, 蓝莓酒中呋喃类化合物的含量最少, 质量浓度范围仅为1.69~39 $\mu\text{g/L}$ 。山楂酒中4种呋喃类化合物的含量都较高, 特别是糠醛的含量能够达到50 mg/L, 其他3种呋喃类化合物在部分山楂酒酒样中也能够达到1 mg/L。枸杞酒中糠醛和糠醇的含量较高, 能够达到1.5 mg/L。如图5所示, 仅有H2酒样中糠醛的质量浓度能够达到香气阈值(OAV=4.22), 糠醛在果酒中能够贡献“甜香”、“烘烤香”、“木香”和“烤面包”的香气^[3]。

3 结论

建立一种利用HS-SPME-GC-Orbitrap-MS同时测定果酒中5种醛酮类和4种呋喃类化合物的方法, 并建立高分辨质谱数据库用于准确性。该方法具有较高的灵敏度, 能够有效对上述化合物进行定量。同时, 样品制备简单, 仅需要少量的样品即可进行检测。由于ME的影响, 针对不同果酒样品, 需要建立与基质匹配的校准曲

线。使用该方法确定了蓝莓酒、枸杞酒和山楂酒中目标化合物的浓度范围, 为后续果酒品质的提升奠定基础。本研究的开展能够快速、准确、高效地完成果酒中醛酮类和呋喃类化合物的定性定量分析, 对评价这些化合物对果酒香气的贡献具有重要意义。

参考文献:

- [1] JOSHI V, PANESAR P, RANA V, et al. Science and technology of fruit wines[M]//Science and technology of fruit wine production. 2017: 1-72. DOI:10.1016/B978-0-12-800850-8.00001-6.
- [2] MAKSIMOVIĆ V, DRAGIŠIĆ MAKSIMOVIĆ J. Chapter 4-Composition, nutritional, and therapeutic values of fruit and berry wines[M]//Science and technology of fruit wine production. San Diego: Academic Press, 2017: 177-226. DOI:10.1016/B978-0-12-800850-8.00004-1.
- [3] WATERHOUSE A, SACKS G L, JEFFREY D W. Understanding wine chemistry[M]. 1 ed. Davis, CA, USA: John Wiley & Sons, 2017. DOI:10.1002/9781118730720.
- [4] KARBOWIAK T, GOUGEON R D, ALINC J B, et al. Wine oxidation and the role of cork[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2009, 50(1): 20-52. DOI:10.1080/10408398.2010.526854.
- [5] SWIEGERS J H, PRETORIUS I S. Yeast modulation of wine flavor[M]//Advances in applied microbiology. San Diego: Academic Press, 2005: 131-175. DOI:10.1016/S0065-2164(05)57005-9.
- [6] GIORDANO L, CALABRESE R, DAVOLI E, et al. Quantitative analysis of 2-furfural and 5-methylfurfural in different Italian vinegars by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry using isotope dilution[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1017(1): 141-149. DOI:10.1016/j.chroma.2003.08.029.
- [7] DONG H, GILL S, CURRAN I H, et al. Toxicogenomic assessment of liver responses following subchronic exposure to furan in Fischer F344 rats[J]. Archives of Toxicology, 2016, 90(6): 1351-1367. DOI:10.1007/s00204-015-1561-2.
- [8] MAYR C M, CAPONE D L, PARDON K H, et al. Quantitative analysis by GC-MS/MS of 18 aroma compounds related to oxidative off-flavor in wines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(13): 3394-3401. DOI:10.1021/jf505803u.

- [9] BURIN V M, MARCHAND S, DE REVEL G, et al. Development and validation of method for heterocyclic compounds in wine: optimization of HS-SPME conditions applying a response surface methodology[J]. *Talanta*, 2013, 117: 87-93. DOI:10.1016/j.talanta.2013.08.037.
- [10] LAGO L O, NICOLLI K P, MARQUES A B, et al. Influence of ripeness and maceration of the grapes on levels of furan and carbonyl compounds in wine-simultaneous quantitative determination and assessment of the exposure risk to these compounds[J]. *Food Chemistry*, 2017, 230: 594-603. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.03.090.
- [11] REN J, WANG S, NING Y, et al. The impact of over-maturation on the sensory and nutritional quality of Gouqi (Chinese wolfberry) wine[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2018, 124(1): 57-67. DOI:10.1002/jib.469.
- [12] YIN L, WANG C, ZHU X, et al. A multi-step screening approach of suitable non-*Saccharomyces* yeast for the fermentation of hawthorn wine[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 127: 109432. DOI:10.1016/j.lwt.2020.109432.
- [13] KRAUJALYTĖ V, VENSKUTONIS P R, PUKALSKAS A, et al. Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes[J]. *Food Chemistry*, 2015, 188: 583-590. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.05.031.
- [14] CHEN Y, TU Z, WANG H, et al. LC-Orbitrap MS analysis of the glycation modification effects of ovalbumin during freeze-drying with three reducing sugar additives[J]. *Food Chemistry*, 2018, 268: 171-178. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.06.092.
- [15] ELIUK S, MAKAROV A. Evolution of orbitrap mass spectrometry instrumentation[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2015, 8(1): 61-80. DOI:10.1146/annurev-anchem-071114-040325.
- [16] PETERSON A C, BALLOON A J, WESTPHALL M S, et al. Development of a GC/quadrupole-orbitrap mass spectrometer, part II: new approaches for discovery metabolomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(20): 10044-10051. DOI:10.1021/ac5014755.
- [17] PETERSON A C, HAUSCHILD J P, QUARMBY S T, et al. Development of a GC/quadrupole-orbitrap mass spectrometer, part I: design and characterization[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(20): 10036-10043. DOI:10.1021/ac5014767.
- [18] PIMPÃO R C, DEW T, FIGUEIRA M E, et al. Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(7): 1414-1425. DOI:10.1002/mnfr.201300822.
- [19] GÓMEZ-RAMOS M M, FERRER C, MALATO O, et al. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: screening and quantitative studies[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1287: 24-37.
- [20] MOL H G J, TIENSTRA M, ZOMER P. Evaluation of gas chromatography-electron ionization-full scan high resolution Orbitrap mass spectrometry for pesticide residue analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 935: 161-172. DOI:10.1016/j.chroma.2013.02.065.
- [21] PETERSON A C, MCALISTER G C, QUARMBY S T, et al. Development and characterization of a GC-enabled QLT-Orbitrap for high-resolution and high-mass accuracy GC/MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(20): 8618-8628. DOI:10.1021/ac101757m.
- [22] LOZANO A, UCLÉS S, UCLÉS A, et al. Pesticide residue analysis in fruit- and vegetable-based baby foods using GC-Orbitrap MS[J]. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2018, 101(2): 374-382. DOI:10.5740/jaoacint.17-0413.
- [23] LI R, LIU Y, WANG Z, et al. High resolution GC-Orbitrap MS for nitrosamines analysis: method performance, exploration of solid phase extraction regularity, and screening of children's products[J]. *Microchemical Journal*, 2021, 162: 105878. DOI:10.1016/j.microc.2020.105878.
- [24] GÓMEZ-RAMOS M M, UCLES S, FERRER C, et al. Exploration of environmental contaminants in honeybees using GC-TOF-MS and GC-Orbitrap-MS[J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 647: 232-244. DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.08.009.
- [25] DE ALBUQUERQUE CAVALCANTI G, RODRIGUES L M, DOS SANTOS L, et al. Non-targeted acquisition strategy for screening doping compounds based on GC-EI-hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometry: a focus on exogenous anabolic steroids[J]. *Drug Testing and Analysis*, 2018, 10(3): 507-517. DOI:10.1002/dta.2227.
- [26] WEIDT S, HAGGARTY J, KEAN R, et al. A novel targeted/untargeted GC-Orbitrap metabolomics methodology applied to *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. *Metabolomics*, 2016, 12(12): 189. DOI:10.1007/s11306-016-1134-2.
- [27] RIVERA-PÉREZ A, LÓPEZ-RUIZ R, ROMERO-GONZÁLEZ R, et al. A new strategy based on gas chromatography-high resolution mass spectrometry (GC-HRMS-Q-Orbitrap) for the determination of alkenylbenzenes in pepper and its varieties[J]. *Food Chemistry*, 2020, 321: 126727. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126727.
- [28] LIN Y, LIU Y, LIU S, et al. Sensory and chemical characterization of Chinese bog bilberry wines using Check-all-that-apply method and GC-Quadrupole-MS and GC-Orbitrap-MS analyses[J]. *Food Research International*, 2022, 151: 110809. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110809.
- [29] CULLERÉ L, CACHO J, FERREIRA V. Analysis for wine C₅-C₈ aldehydes through the determination of their *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 524(1): 201-206. DOI:10.1016/j.aca.2004.03.025.
- [30] QIAN X, LAN Y, HAN S, et al. Comprehensive investigation of lactones and furanones in icewines and dry wines using gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109650. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109650.
- [31] CARRILLO J D, GARRIDO-LÓPEZ Á, TENA M T. Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1102(1): 25-36. DOI:10.1016/j.chroma.2005.10.038.
- [32] LIU Y R, QIAN X, XING J T, et al. Accurate determination of 12 lactones and 11 volatile phenols in nongrape wines through headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME) combined with high-resolution gas chromatography-orbitrap mass spectrometry (GC-Orbitrap-MS)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(6): 1971-1983. DOI:10.1021/acs.jafc.1c06981.
- [33] BELARBI S, VIVIER M, ZAGHOUBANI W, et al. Comparison of new approach of GC-HRMS (Q-Orbitrap) to GC-MS/MS (triple-quadrupole) in analyzing the pesticide residues and contaminants in complex food matrices[J]. *Food Chemistry*, 2021, 359: 129932. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129932.
- [34] MERLIER F, OCTAVE S, TSE SUM BUI B, et al. Evaluation of performance and validity limits of gas chromatography electron ionisation with Orbitrap detection for fatty acid methyl ester analyses[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2019: e8609. DOI:10.1002/rcm.8609.
- [35] 朱保庆, 刘雅冉, 李娜, 等. 风味化合物信息共享系统[DB/OL]. 北京: 北京林业大学食品风味实验室, 2021. <http://foodflavorlab.cn/>.
- [36] KMELLÁR B, FODOR P, PAREJA L, et al. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1215(1): 37-50. DOI:10.1016/j.chroma.2008.10.121.