

SDE-GC-MS 法重现性及普洱茶发酵香气变化研究

王利妍,郭天杰,石兴云,蒋 宾,念 波,焦文文,王旭东,赵 明,马 燕*

(云南农业大学龙润普洱茶学院,云南昆明 650201)

摘要:【目的】为研究同时蒸馏萃取法提取普洱茶香气物质的重现性。【方法】以2次普洱茶发酵的原料(晒青毛茶)和出堆样为材料,SDE各提取3次,应用气相色谱质谱联用仪检测。【结果】各样品中鉴定出64~82个化合物,物质鉴定重复率为50.78%~71.30%;同一样品3次重复检测物质峰面积的精密性(RSD)为0.76%~70.91%。原料以醇类物质(53.3%和50.0%)为主,发酵后1,2,3-三甲氧基苯、3,4,5-三甲氧基苯等杂氧化合物增加,出堆样以杂氧化合物(44.0%和41.5%)为主。【结论】SDE-GC-MS法研究茶叶香气需增加重复次数或改进方法。

关键词:普洱茶;香气物质;重现性;气相色谱质谱仪;同时蒸馏萃取法

中图分类号:S571 **文献标识码:**A

Study on Reproducibility of SDE-GC-MS Method and Variation of Aroma Substances in Fermented Pu-erh Tea

WANG Li-yan, GUO Tian-jie, SHI Xing-yun, JIANG Bin, NIAN Bo, JIAO Wen-wen, WANG Xu-dong, ZHAO Ming, MA Yan*

(College of Longrun Pu-erh Tea, Yunnan Agricultural University, Yunnan Kunming 650201, China)

Abstract:【Objective】The aroma substances in Pu-erh tea were studied by Simultaneous-dist extraction (SDE) previously, however, the reproducibility of these methods were not studied. 【Method】In this work, two raw materials and two Pu-erh tea fermented samples were extracted three times by Simultaneous-dist extraction method (SDE), and detected by Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS), respectively. 【Result】The 64-82 compounds were detected, and the repetition rate of substance identification were 50.78% - 71.30%. The reproducibility (RSD) of peak areas detected in the same samples for three times was 0.76% - 70.91%. The main aroma substances in raw materials (R1 and R2) were alcohol with relative contents of 53.3% and 50.0%, respectively. After fermentation, relative levels of heterocyclic compounds, such as 1, 2, 3-trimethoxy benzene and 3, 4, 5-trimethoxy benzene were increased. And main aroma substances in fermented samples (P1 and P2) were heterocyclic compounds with relative contents of 44.0% and 41.5%, respectively. 【Conclusion】It need to develop more repeats analyses or improve the extraction method in the study of aroma substances of Pu-erh tea using SDE-GC-MS method.

Key words: Pu-erh tea; Aroma substance; Reproducibility; Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); Simultaneous-dist extraction (SDE)

【研究意义】普洱茶(Pu-erh tea)是以云南大叶种茶树晒青毛茶为原料,经固态发酵(后发酵)等工序加工而成的茶叶产品^[1]。陈香显著是普洱茶的重要品质特征,也是决定其价格的重要条件^[2]。基于对品质的重要影响以及独特的香气类型,普洱茶

香气物质分析得到了学者的广泛关注。【前人研究进展】已有学者分别对普洱茶香气物质组成^[3]和微生物^[4]对普洱茶香气成分影响等进行了研究。发现普洱茶香气重要特征在于发酵过程中形成了大量的1,2,3-三甲氧基苯、1,2-二甲氧基苯等显陈香的甲氧基苯化合物^[5]。已有研究采用同时蒸馏萃取法(Simultaneous-dist extraction, SDE)、顶空固相微萃取(Headspace solid phase micro-extraction, HS-SPME)、减压蒸馏萃取(Vacuum distillation extract, VDE)和超声波辅助萃取分散液液微萃取(Ultrasound-assisted extraction-Dispersive liquid-liquid mi-

收稿日期:2018-07-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31560221,31760225);国家农业产业技术体系茶叶专项(CARS-23);云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2017HB026)

作者简介:王利妍(1993-)女,河南安阳人,硕士研究生,主要从事茶叶生物化学研究;E-mail:1565696712@qq.com,*为通讯作者;马 燕,E-mail:mayan202@163.com。

croextraction-gas chromatography-mass spectrometry, UAE-DLLME) 等方法提取普洱茶香气物质。【本研究切入点】可能由于分析成本较高, 吕才有^[3]、曹艳妮^[1,6]、赵苗苗^[7]、Xu X^[8]、Gong Z^[9] 等应用同时蒸馏萃取法 (Simultaneous-dist extraction, SDE) 只进行一次提取分析; 李建勋^[10]、陈保^[11]、张灵枝^[12] 等应用顶空固相微萃取法 (Headspace solid phase microextraction, HS-SPME) 也只进行了一次提取分析; 仅发现叶静^[4]、徐咏全^[13]、张文杰^[14] 和 Lv H^[15] 等人进行了重复提取, 其他研究只进行了 1 次分析或未明确标示, 较少关注重现性 (Reproducibility)。重现性是评判一个试验数据可信度的重要参数。由于在密闭系统以较高温度萃取时次生反应剧烈^[3], 同时蒸馏萃取法 (Simultaneous-dist extraction, SDE) 的重现性尤其值得关注。然而已有应用同时蒸馏萃取法 (Simultaneous-dist extraction, SDE) 结合气相色谱-质谱联用技术 (Gas Chromatography-mass Spectrometry, GC-MS) 对普洱茶香气物质的研究, 未进行重复实验, 因此有必要从重现性的角度考察评价该方法的准确性。【拟解决的关键问题】应用同时蒸馏萃取法 (Simultaneous-dist extraction, SDE) 结合气相色谱-质谱联用技术 (Gas Chromatography-mass Spectrometry, GC-MS) 检测了 2 次普洱茶发酵的原料 (晒青毛茶) 和出堆样的香气物质组成, 并从物质鉴定重复率 (定性) 及峰面积精密度 (定量) 考察该方法的重现性, 同时利用电子鼻分析香气变化并进行感官审评, 以期为准确认认识普洱茶香气形成提供科学知识。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 试验材料 某茶厂 2 次普洱茶发酵的原料样品 (R1、R2) 和出堆样品 (P1、P2)。

1.1.2 试验设备及试剂 美国 Agilent 7890A-5975C GC-MS 气质联用仪; 电子鼻 (PEN3), 北京盈盛恒泰科技有限责任公司; SDE 同时蒸馏萃取设备; 瑞士 BUCHI R-3 旋转蒸发仪。二氯甲烷、无水硫酸钠, 均为国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 同时蒸馏萃取法 准确称取茶样 100.0 g, 将供试茶样置于同时蒸馏萃取设备内, 用二氯甲烷 50 mL 提取 5 h。萃取液用无水硫酸钠干燥、过滤, 萃取液用旋转蒸发仪挥干溶剂, 挥发油进行称量。用二氯甲烷将挥发油溶解至 1.00 mL, 用 GC-MS 进行检测, 每个样品提取检测重复 3 次。

1.2.2 气相色谱-质谱联用技术 (Gas Chromatogra-

phy-mass Spectrometry, GC-MS) 色谱条件为色谱柱: HP7890A-5975C (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 升温程序: 100 °C 保持 2 min, 以 4 °C/min 升温至 250 °C, 保持 20 min; 载体: 氦气 (He), 进样量为 2 μl; 分流比为 25:1。

质谱条件为电子能量 70 eV; 气质接口温度为 280 °C; 离子源温度为 230 °C; 电离方程: EI, 倍增器电压为 1894 v。

根据 GC-MS 分析得到的各色谱峰, 通过检索谱库 (NIST11.L), 结合相对保留时间, 查阅有关文献数据进行香气物质鉴定, 根据香气物质的峰面积值相对定量。

1.2.3 电子鼻与感官审评 电子鼻测定香气方法依照使用说明进行, 仪器设置测定时间 60 s, 取响应信号区间 48 ~ 51 s 进行数据分析。感官审评根据国家标准 GB/T23776-2009 中茶叶审评方法及对茶样进行感官审评。

1.3 数据处理

应用 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> 构建 VN 图, 比较物质鉴定重复率, 重复率为 3 次均鉴定的化合物数量/至少 1 次鉴定到的化合物数量。使用 IBM SPSS Statistics 及 Winmuster 软件进行主成分 (PCA) 分析, HemI 软件进行热图分析。

2 结果与分析

2.1 重现性分析

在某茶厂收集了 2 次普洱茶发酵的原料样品与出堆样品, 通过 SDE-GC-MS 法分别提取检测 3 次。GC-MS 共鉴定出 210 个化合物, R1、P1、R2、P2 的物质鉴定重复率在 50.78% ~ 71.30%。以 R1 为例, 一共鉴定到的化合物有 122 个, 3 次重复都鉴定到的化合物有 65 个, 鉴定到 2 次的化合物有 24 个, 33 个化合物仅鉴定到 1 次 (图 1)。以 3 次都鉴定到的化合物峰面积计算 RSD, R1、P1、R2、P2 的 RSD 分别为 0.85 ~ 52.08%、1.76% ~ 70.91%、1.5% ~ 67.04% 和 0.76% ~ 70.01%。RSD 在 0 ~ 5% 的化合物有 4 ~ 14 个, 在 5% ~ 10% 的化合物有 8 ~ 22 个 (图 2)。

2.2 样品香气物质组成特征与变化

以 4 个样品 3 次重复均检测到的化合物峰面积为指标进行 PCA 分析, 得到累积变量为 92.31% 的三维 PCA 图 (图 3)。为了验证 GC-MS 结果, 进一步进行电子鼻测定, 提取传感器响应信号进行 PCA 分析, 得到累积变量为 99.83% 的 PCA 图 (图 4)。2 次 PCA 分析, 各样品的分布相符。都是 R1 和 R2

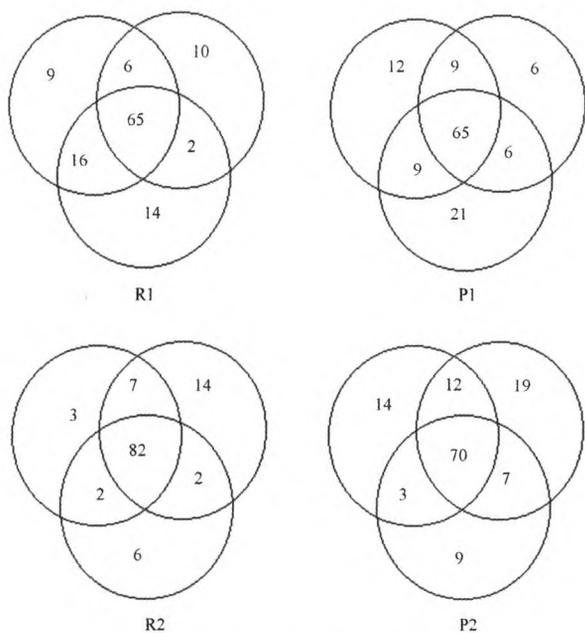


图1 重复鉴定化合物的VN图比较

Fig.1 VN diagrams of compounds identified in replicated tests

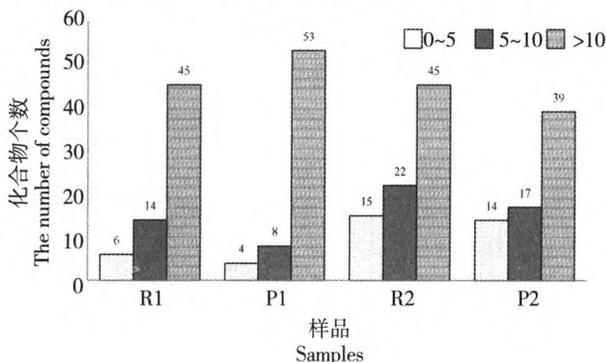


图2 重复鉴定化合物的峰面积RSD分布

Fig.2 RSD of peak areas of compounds identified in replicated tests

相聚较近成为1簇, P1和P2聚成不同的簇。说明经过发酵香气物质组成发生显著变化, 且该厂2次发酵出堆样品的香气存在差异。

本研究一共鉴定到210个化合物, 其中3次重复均检测到的有118个, 后续以此118个化合物进行分析。从化合物类别看, 主要包括醇类、酮类、酯类、醛类等(图5)。原料样以醇类化合物为主, R1、

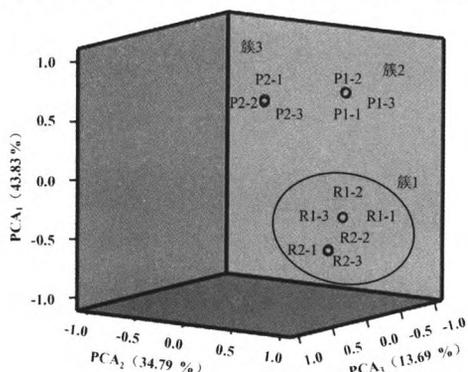


图3 基于峰面积的PCA分析

Fig.3 PCA analysis of peak area

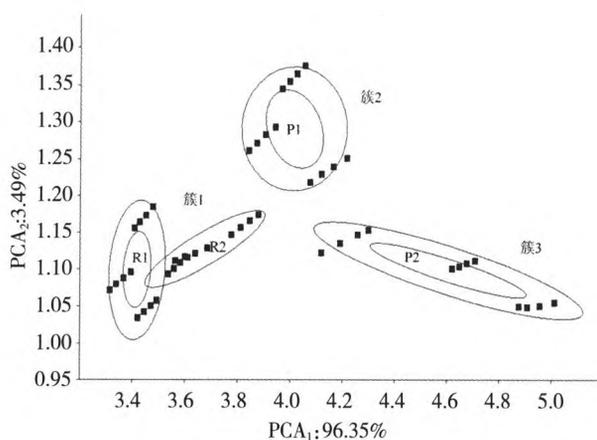


图4 基于电子鼻提取数据的PCA分析

Fig.4 PCA analysis of data of electronic nose

R2相对含量分别为53.3%和50.0%, 主要包括芳樟醇及其氧化产物、植物醇及 α -松油醇等物质; 其次是酯类化合物, R1、R2的相对含量分别为14.8%和12.2%, 主要有二氢猕猴桃内酯、邻苯二甲酸二异丁酯、邻苯二甲酸二辛酯等物质。出堆样品以杂氧化合物为主, P1、P2相对含量分别为44.0%和41.5%, 包括1,2,3-甲氧基苯、3,4,5-三甲氧基甲苯及1,2,4-三甲氧基甲苯等; 其次是醇类化合物, 相对含量分别为24.7%(P1)和25.7%(P2), 主要包括芳樟醇氧化物(反式吡喃型)反式芳樟醇氧化物(呋喃)顺式芳樟醇氧化物(呋喃)等物质。

对118个化合物峰面积进行热图分析(图6), 发酵前后芳樟醇、邻苯二甲酸二异丁酯等68个物质含量降低, 1,2,3-三甲氧基苯及1,2,3,4-四甲氧基苯等50个物质含量增加。其中仅在原料中鉴定到香叶醇、2,6-二甲基环己醇、邻苯二甲酸二异丁酯、二十六烷等32个物质, 仅在出堆样品中鉴定到2,6-二甲氧基苯酚、亚油酸、1,2,3,4-四甲氧基苯、庚烯醛等25个化合物。

2.3 感官审评

发酵原料与出堆样品感官审评如表1所示, R1

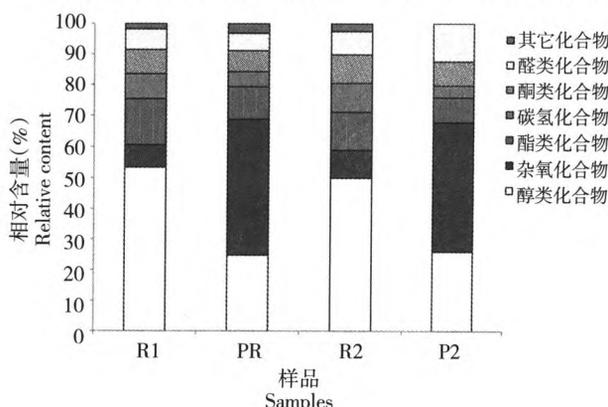


图5 香气物质类别的相对含量

Fig.5 Relative content of classification of aroma substances

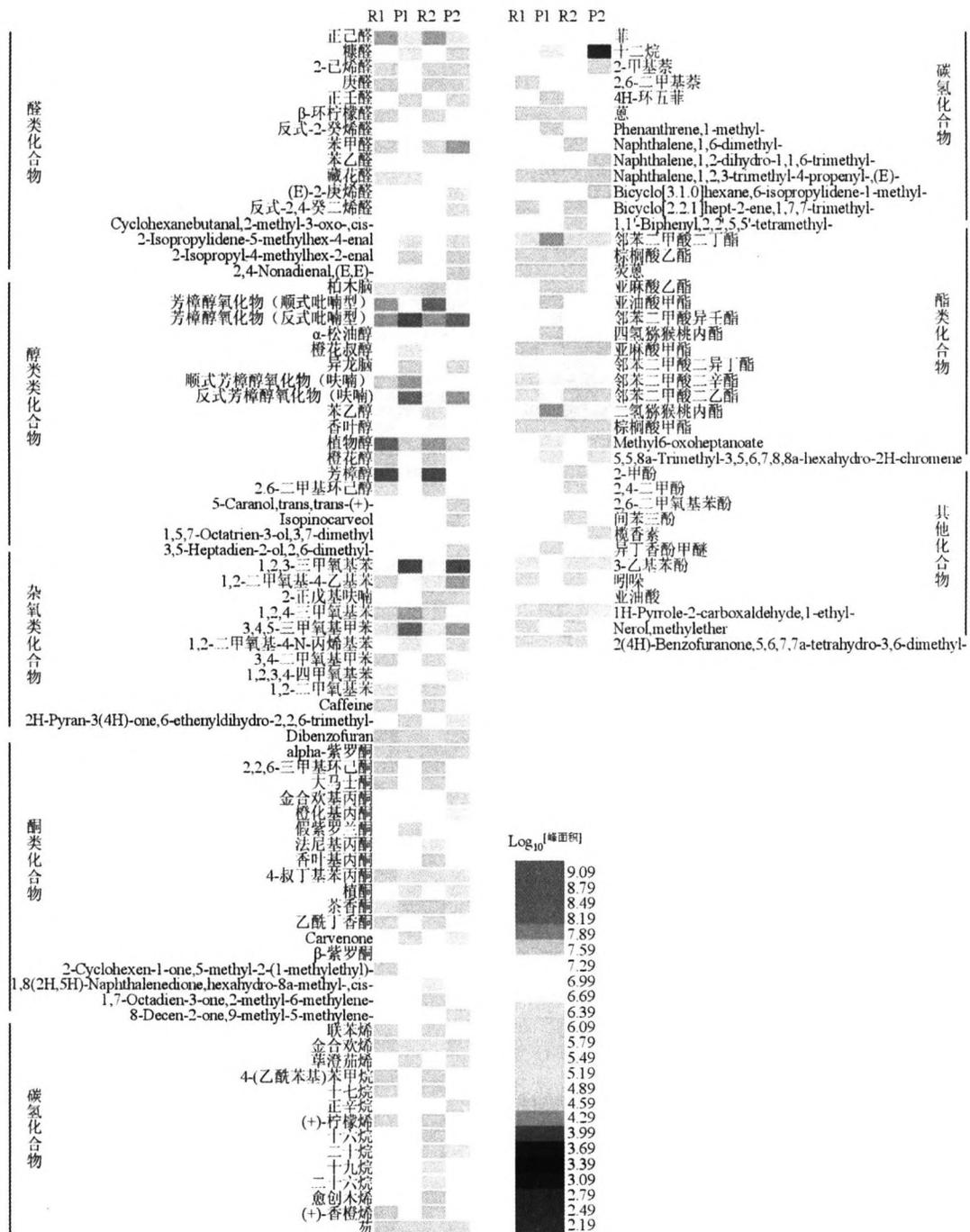


图 6 鉴定物质峰面积的热图

Fig. 6 Heat map of peak area of identified compounds

汤色黄明亮,滋味醇正回甘,R2 汤色橙黄,滋味浓醇回甘,香气均清香持久;经过发酵,出堆样品汤色转变为红褐(图 7),滋味变为醇和或平和,香气以陈香

为主。发酵原料与出堆样品差异显著。该结果与 GC-MS 和电子鼻分析相符,都表明经过发酵,茶叶内含物质成分及含量发生剧烈变化,从而导致原料

表 1 茶样感官审评结果

Table 1 Sensory evaluations of tea samples

茶样 Tea samples	外形 Appearance	汤色 Liquor color	香气 Aroma	滋味 Taste	叶底 Infused leaf
R1	条索粗壮较润	黄明亮	清香持久	醇正回甘	绿润
R2	条索粗壮较润	橙黄明亮	清香持久	浓醇回甘	绿润欠匀
P1	条索紧结较匀	红褐明亮	陈香显著	醇和	黑褐亮
P2	条索紧结	红褐浓明亮	陈香欠纯	平和	黑褐较亮

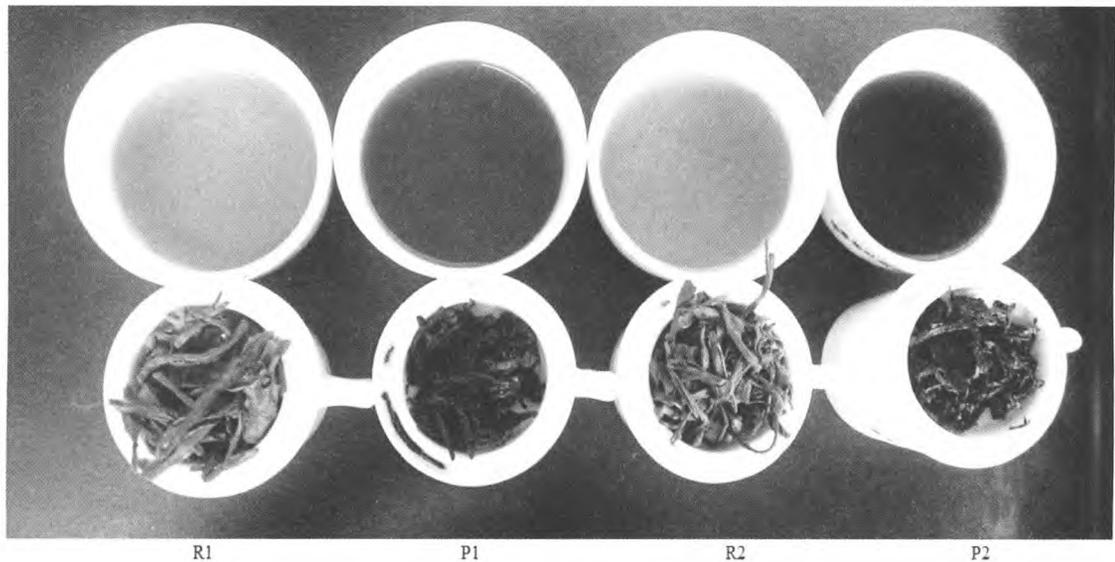


图7 茶样审评图

Fig. 7 Photography of sensory evaluation of tea leaves

与出堆样品在色、香、味等方面的显著差异。

3 讨论

3.1 SDE-GC-MS 重现性

经测定分析,4组样品的物质鉴定重复率为50.78%~71.30%,RSD在0.85%~70.91%。徐咏全^[13]和张文杰^[14]利用HS-SPME鉴定化合物的RSD均小于10%,谷勋刚^[16]应用SDE重复6次RSD均小于12%。本文章峰面积的RSD与已有结果差距较大,推测SDE提取中次生反应剧烈,香气成分发生变化。李艳清^[17]等研究发现SDE存在长时间高温致物质转化,提取效率低且不能按比例提取,因此该方法得到的精油与实际香气有一定的差距。李建勋^[18]研究表明,HS-SPME优于SDE方法用于普洱茶香气物质提取。这些结论与本文章基本一致,表明SDE-GC-MS分析茶叶香气物质时需要增加重复或改进提取方法。但是吕世懂等人^[19]发现,不同香气提取方法均存在一定缺陷,今后有待开发灵敏度更高、次生反应更小的方法,研究茶叶香气物质。

3.2 发酵前后香气物质组成与变化

经分析发现,原料样品以醇类和酯类化合物等为主,出堆样品以杂氧和醇类化合物等为主。曹艳妮^[6]研究表明,熟茶主要的香气化合物为芳樟醇吡喃氧化物及 α -松油醇等物质。赵苗苗^[7]发现,晒青毛茶香气物质以醇类及烯炔类物质为主。本文章结果与吕海鹏^[20]及等研究的普洱茶香气以甲氧基苯类化合物,醛酮类和醇类为主基本一致。

通过热图分析,经过发酵芳樟醇等68个物质含量降低,1,2,3-三甲氧基苯等50个物质含量增加。

张灵枝^[12]发现在发酵过程中,醇类和碳氢化合物剧烈减少,酯类和杂氧类化合物成分显著增加。曹艳妮^[6]结果表明, α -松油醇、香叶醇及芳樟醇等经过发酵显著下降。其中仅在原料样品中鉴定到香叶醇等32个物质,仅在出堆样品中鉴定到1,2,3,4-四甲氧基苯等25个化合物。与曹艳妮^[6]等发现熟茶中独有的1,2,3,4-四甲氧基苯的结论相似。Xu^[8]与Gong^[9]等发现在发酵过程中,醇类和碳氢化合物剧烈减少,酯类和杂氧类化合物成分显著增加。这些变化规律与以上研究结果近似,即普洱茶发酵过程,醇酯类物质显著减少,甲氧基苯等杂环化合物显著增加。推测这些化合物在发酵过程中或提取过程中发生了降解、转化或新生成,可能与普洱茶发酵过程中剧烈的氧化有关。

4 结论

本文章研究发现SDE-GC-MS法测定茶叶香气物质的重现性较低,建议增加重复实验次数,或更换提取方法。本文章共检测到118个化合物,从香气物质类别来看,普洱茶发酵原料以醇类为主,发酵后样品甲氧基苯等杂氧化合物相对含量较高;峰面积比较发现,发酵中芳樟醇、植物醇及香叶醇等68个物质含量降低,1,2,3-三甲氧基苯、1,2,4-三甲氧基苯及1,2,3,4-四甲氧基苯等50个物质含量增加。总之,发酵中醇类物质减少,甲氧基苯等杂氧化合物含量增加,进而形成了普洱茶陈香显著的特征。

参考文献:

- [1]曹艳妮,刘通讯.不同储存时间普洱生茶和熟茶香气成分分析[J].食品工业,2011(10):64-67.
- [2]吕世懂,孟庆雄,徐咏全,等.普洱茶香气分析方法及香气活性物质研究进展[J].食品科学,2014,35(11):292-298.

- [3] 吕才有, 单治国, 刘勤晋. 普洱茶后发酵中的香气成分变化分析[J]. 食品科学, 2009(10):252-256.
- [4] 叶静, 王文光, 李军, 等. 四种曲霉属真菌发酵对普洱茶香气成分的影响(英文)[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2016(4):284-290.
- [5] 施梦南, 龚淑英. 茶叶香气研究进展[J]. 茶叶, 2012,38(1):19-23.
- [6] 曹艳妮, 刘通讯. 普洱生茶和熟茶香气中萜烯类和甲氧基苯类成分分析[J]. 食品工业科技, 2012(5):128-130.
- [7] 赵苗苗, 杨如兵, 吕才有. 基于电子鼻及 GC-MS 技术对临沧晒青毛茶香气成分的对比研究[J]. 中国农学通报, 2018,34(2):113-122.
- [8] Xu X, Yan M, Zhu Y. Influence of Fungal Fermentation on the Development of Volatile Compounds in the Puer Tea Manufacturing Process[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2005,5(4):382-386.
- [9] Gong Z, Watanabe N, Yagi A, et al. Compositional Change of Tea during Processing[J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2014,57(10):1745-1746.
- [10] 李建勋, 杜丽平, 王超, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法分析黑茶香气成分[J]. 食品科学, 2014,35(2):191-195.
- [11] 陈保, 徐明发, 姜东华, 等. 不同普洱茶原料湿堆发酵过程中香气成分的变化研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018,9(2):284-293.
- [12] 张灵枝, 王登良, 陈维信, 等. 不同贮藏时间的普洱茶香气成分分析[J]. 园艺学报, 2007,34(2):504-506.
- [13] 徐咏全, 张晨霞, 孔雅雯, 等. HS-SPME-GC-MS-GC-O 分析普洱茶粉中的关键性香气组分[J]. 食品研究与开发, 2017(20):152-159.
- [14] 张文杰, 刘聪, 严亮, 等. HS-SPME 结合 GC-MS 分析普洱茶花及茶花粉香气成分[J]. 食品工业科技, 2017(16):257-262.
- [15] Lv H, Zhong Q, Lin Z, et al. Aroma characterisation of Pu-erh tea using headspace-solid phase microextraction combined with GC/MS and GC-olfactometry[J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(4):1074-1081.
- [16] 谷勋刚, 张正竹, 宁井铭, 等. 普洱茶渥堆阶段游离态香气成分分析及含量变化[J]. 食品与发酵工业, 2010(4):161-164.
- [17] 李艳清, 付大友, 王蓉. 茶叶香气成分测定方法研究进展[J]. 茶叶科学技术, 2009(1):8-10.
- [18] 李建勋, 杜丽平, 王超, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法分析黑茶香气成分[J]. 食品科学, 2014,35(2):191-195.
- [19] 吕世懂, 孟庆雄, 徐咏全, 等. 普洱茶香气分析方法及香气活性物质研究进展[J]. 食品科学, 2014(11):292-298.
- [20] 吕海鹏, 张悦, 杨停, 等. 影响普洱熟茶香气品质的关键香气成分分析[J]. 现代食品科技, 2015,31(12):394-399.

(责任编辑 赵丹丹)