

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240328003

高效液相色谱法同时测定不同年份酱香型白酒中 12 种吡嗪化合物含量

杨 沙, 罗玉航, 张 季, 侯 睿*

(遵义市产品质量检验检测院, 遵义 563099)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)同时测定不同年份酱香型白酒中 12 种吡嗪化合物含量的分析方法。**方法** 样品经碱化后用乙醚萃取, 浓缩后用甲醇定容。采用 C₆ 苯基柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 测定吡嗪类化合物的含量, 结合多元统计分析, 对不同年份酱香型白酒中吡嗪类化合物进行差异分析。**结果** 12 种吡嗪化合物线性表现良好, 在质量浓度 0.1~10.0 μg/mL 范围内, 相关系数(r^2)均大于 0.99, 检出限在 0.06~0.29 μg/mL, 重复性相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs) 范围均在 1.3%~2.8%, 在 1、2、5 μg/mL 3 个浓度水平下的加标回收率为 80.8%~108.3%, 精密度 RSDs 范围均在 0.27%~4.80%。11 种吡嗪类化合物随着酱香型白酒贮存年份的增加, 其含量均呈现上升态势。**结论** 本研究建立了一种灵敏度高、重现性好且适用于不同年份酱香型白酒中 12 种吡嗪化合物的定量分析方法。该研究表明吡嗪类化合物含量的高低与酱香型白酒储存年份的长短存在一定的关联性。

关键词: 酱香型白酒; 吡嗪类化合物; 年份酒; 高效液相色谱法

Simultaneous determination of 12 kinds of pyrazine compounds in different vintages of Maotai-flavor Baijiu by high performance liquid chromatography

YANG Sha, LUO Yu-Hang, ZHANG Ji, HOU Rui*

(Product Quality Inspection and Testing Institute in Zunyi, Zunyi 563099, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analysis method for the simultaneous determination of 12 kinds of pyrazine compounds in different vintages of Maotai-flavor Baijiu samples by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The Baijiu samples were extracted with ether after alkalization, concentrated and then fixed with methanol. The content of pyrazine compounds was determined by C₆ phenyl column (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), and the differences of pyrazine compounds in Maotai-flavor Baijiu samples of different vintages was analyzed by multivariate statistical analysis. **Results** The linear relationship of the 12 kinds of pyrazine

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2023]—一般 386)、国家市场监督管理总局科技计划项目(2022MK117)、贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2023]—一般 364)、遵义市科技创新人才团队培养计划项目(遵市科人才[2023]1 号)

Fund: Supported by the Guizhou Science and Technology Plan Project (Guizhou Science and Technology Support [2023] General 386), the State Administration for Market Supervision and Administration Science and Technology Plan Project (2022MK117), the Guizhou Science and Technology Plan Project (Guizhou Science and Technology support [2023] General 364), and the Zunyi Science and Technology Innovation talent team Training Project (Zunxi Science and Technology Talent [2023] No.1)

***通信作者:** 侯睿, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测技术。E-mail: 1964383741@qq.com

***Corresponding author:** HOU Rui, Master, Engineer, Food and Agricultural Product Inspection Department, Zunyi Product Quality Inspection and Testing Institute, Zunyi 563099, China. E-mail: 1964383741@qq.com

compounds was good in the concentration range of 0.1–10.0 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficients (r^2) were all greater than 0.99, and the detection limits were 0.06–0.29 $\mu\text{g/mL}$, with the relative standard deviations (RSDs) of reproducibility were 1.3%–2.8%. At different concentrations of 1, 2 and 5 $\mu\text{g/mL}$, the standard recoveries were 80.8%–108.3%, and the RSDs of precision were all in the range of 0.27%–4.80%. The content of the 11 kinds of pyrazine compounds showed an increasing trend with the increase of the storage year of Maotai-flavor Baijiu samples. **Conclusion** In this study, a high sensitivity and good reproducibility for the quantitative analysis of 12 kinds of pyrazine compounds in Maotai-flavor Baijiu samples of different vintages is established. This study showed that there is a correlation between the content of pyrazine compounds and the storage year of Maotai-flavor Baijiu samples.

KEY WORDS: Maotai-Flavor Baijiu; pyrazine compounds; vintage; high performance liquid chromatography

0 引言

白酒作为世界上传统的蒸馏酒之一^[1], 是中华民族智慧的结晶。在白酒的 4 大香型中, 酱香型白酒因其独特的高温制曲工艺和美拉德反应, 使得酱香型白酒中的吡嗪类化合物种类和含量明显高于其他香型的白酒^[2–4]。吡嗪是 1,4 位含氮的六元杂环类化合物^[5], 该类化合物具有类似炒坚果香、烘烤香等怡人香味^[6], 能够对其他香味物质有明显的烘托叠加作用, 可使白酒的香气更为丰满, 对白酒的风格和口感有重要贡献。此外, 吡嗪类化合物在健康功能方面有着举足轻重的地位^[7–9], 其具有促进血液循环、体外抗炎、肝脏保护等功能^[10], 是酱香型白酒中一类微量健康功能性化合物。四甲基吡嗪作为吡嗪类化合物的典型代表^[11]。目前, 针对白酒中四甲基吡嗪检测方法的研究已有很多的相关报道, 主要集中在气相色谱技术及气相色谱质谱技术^[12–17]。如任学坤等^[18]利用气相色谱外标法检测中白酒的四甲基吡嗪含量。王莉等^[19]采用气相色谱/质谱-选择离子技术, 在白酒中通过直接进样法测定 4 种吡嗪类化合物。范文来等^[20]分别用液液萃取法、顶空微萃取法结合气相色谱-质谱法及固相微萃取法结合气相色谱法的方法检测白酒中的吡嗪化合物。

大量研究表明, 白酒在贮存过程中会发生氧化、还原、酯化等多重化学反应, 从而让白酒中的醇、酸、酯等风味化学成分达到一个新的动态平衡, 使得酒体更加醇厚、柔和^[21–23], 目前针对吡嗪类化合物已有较多学者研究, 绝大多数研究集中在酱香型成品酒的含量研究^[24–25], 对于不同年份酱香型白酒中吡嗪类化合物的研究鲜少报道。研究不同年份的酱香型白酒中吡嗪类化合物含量差异, 对调控酱香型白酒的生产工艺, 进一步提高酱香型白酒的风味特征与健康功能具有重要的指导意义。

本研究采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法建立同时测定不同年份酱香型白酒中 12 种吡嗪化合物, 首先对液相色谱条件进行优化, 同时对该方法进行方法学考察和验证, 最后对不同年份白酒

样品中化合物含量进行测定, 结合多元统计学方法对酱香型白酒样品进行分析, 进一步发掘不同年份酱香型白酒样品中吡嗪类物质的差异性, 对建立健全酱香型白酒检测体系, 促进酱香型白酒生产数字化发展, 加强酱香型白酒深层次研究有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 酱香型白酒样品

某酱香型白酒生产企业提供。不同年份酱香型白酒样品信息见表 1。

表 1 不同年份酱香型白酒样品信息
Table 1 Sample information on different vintages of Maotai-flavor Baijiu

序号	样品编号	样品名称
1	NFJ5-1	5 年 L3-0023(成品酒)
2	NFJ5-2	5 年 L3-0024(成品酒)
3	NFJ5-3	5 年 L3-0025(成品酒)
4	NFJ5-4	5 年 L3-0026(成品酒)
5	NFJ5-5	5 年 L3-0028(成品酒)
6	NFJ10-1	10 年 A04-236(成品酒)
7	NFJ10-2	10 年 13 坛号(成品酒)
8	NFJ10-3	10 年 14 坛号(成品酒)
9	NFJ10-4	10 年 15 坛号(成品酒)
10	NFJ10-5	10 年 16 坛号(成品酒)
11	NFJ15-1	15 年 B04-73 坛(成品酒)
12	NFJ15-2	15 年 B04-74 坛(成品酒)
13	NFJ15-3	15 年 B04-75 坛(成品酒)
14	NFJ15-4	15 年 B04-76 坛(成品酒)
15	NFJ15-5	15 年 B04-77 坛(成品酒)
16	NFJ15-6	15 年 B04138(成品酒)

1.1.2 试剂

乙腈(质谱纯, 德国默克公司); 2-甲基吡嗪(2-methylpyrazine, 2M)、2,5-二甲基吡嗪(2,5-dimethylpyrazine,

25DM)、2,6-二甲基吡嗪(2,6-dimethylpyrazine, 26DM)、2,3-二甲基吡嗪(2,5-dimethylpyrazine, 23DM)、2-乙基-6-甲基吡嗪(2-ethyl-6-methyl-pyrazine, 2E6M)、2,3,5-三甲基吡嗪(2,3,5-trimethylpyrazine, 235TM)、2,3,5,6-四甲基吡嗪(2,3,5,6-tetramethylpyrazine, 2356TTM)、2,3-二乙基-5-甲基吡嗪(2,3-diethyl-5-methylpyrazine, 23DM5E)、2-乙基-3,5,6-三甲基吡嗪(2-ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine, 2E356TM)、2-乙基吡嗪(2-ethylpyrazine, 2E)、3-乙基-2,5-二甲基吡嗪(3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, 3E25DM)、2,3-二乙基-5-甲基吡嗪(2,3-dimethylpyrazine-5-ethyl, 23DE5M)标准物质(纯度>99%, 北京振翔科技有限公司); 磷酸、氯化钠、乙醚(天津市科密欧试剂有限公司); 微孔滤头(孔径 0.22 μm , 上海安谱科技公司)。

1.2 仪器与设备

2695 液相色谱系统(配有荧光检测器, 美国沃特世公司); 3-30KS 型高速离心机(美国 Sigma 公司); AB265-S 型万分之一电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Milli-Q 超纯水仪(美国密理博公司); N-EVAP 112 型氮吹仪(美国 Organomation 公司); LGN-D130 氮气发生器(上海安谱科技公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件

Phenomenex Gemini C₆ 苯基柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 柱温: 40°C, 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 0.1%磷酸水溶液, 进样量: 20 μL , 梯度洗脱程序见表 2。激发波长 280 nm, 发射波长 348 nm。

表 2 梯度洗脱程序
Table 2 Gradient elution procedure

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0	0.6	3	97
20	0.6	3	97
50	0.6	18	82
60	0.6	18	82
62	0.6	3	97
65	0.6	3	97

1.3.2 标准溶液的配制

精确称取各吡嗪标准品适量, 加入甲醇溶解制成质量浓度均为 1.0 mg/mL 的标准品储备溶液, 分别吸取上述对照品贮备液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 得混合标准品溶液。

1.3.3 样品前处理

前处理参考龙四红等^[25]的方法但略有改动, 量取 10 mL 白酒样品于 50 mL 离心管中, 先用 12 mol/L NaOH 调 pH 至 12, 再用 1 mol/L NaOH 调 pH 为 14, 加入适量 NaCl 使其饱和, 用 15 mL 乙醚重复萃取 2 次, 离心合并上清液, 70°C 水浴蒸发至剩余约 0.5 mL, 再用甲醇复溶定容至 1.0 mL, 过 0.22 μm 滤膜后上机检测。

1.4 数据处理

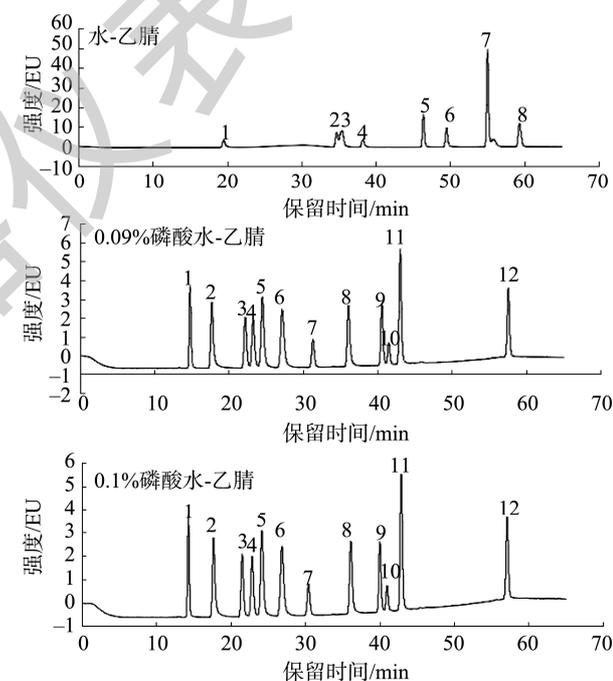
使用 SPSS 26.0 对数据进行统计学分析, 采用 SIMCA 14.1 对数据进行主成分分析(principal component analysis, PCA)与偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA), 表格采用 Excel 2019 绘制, 采用 Origin 2021 软件和 R 语言绘图。

2 结果与分析

2.1 HPLC 条件优化

2.1.1 流动相的优化

流动相对目标化合物的分离度、灵敏度和峰形影响较大。本研究对不同种类的流动相系统, 包括水-乙腈、0.09%磷酸水-乙腈、0.1%磷酸水-乙腈进行考察, 结果如图 1 所示, 水-乙腈洗脱效果不佳, 峰形差, 影响定量结果准确性, 磷酸比例为 0.09%和 0.1%时, 对分离度影响不大(见图 1), 因此选择 0.1%磷酸水-乙腈体系作为流动相。



注: 1: 2356TTM; 2: 2M; 3: 235TM; 4: 23DM; 5: 26DM; 6: 25DM; 7: 2E356TM; 8: 2E; 9: 23DM5E; 10: 3E25DM; 11: 2E6M; 12: 23DE5M。

图1 12种吡嗪类化合物在不同流动相下的色谱图

Fig.1 Chromatograms of 12 kinds of pyrazine compounds on different mobile phases

2.1.2 流速的优化

流速降低会引起目标物保留时间延长, 灵敏度降低。本研究对比了 0.5、0.6、0.8、1.0 mL/min 不同流速对组峰的影响。结果发现(见图 2)随着流速的降低, 分离度提高, 但出峰时间变长。因此本研究确定 0.6 mL/min 为最佳流速。

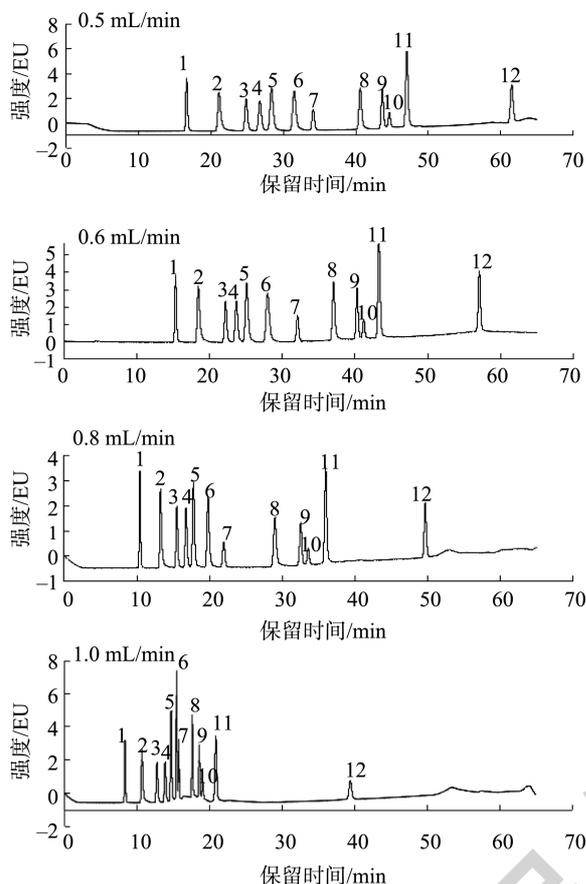


图2 12种吡嗪类化合物在不同流速下的色谱图

Fig.2 Chromatograms of 12 kinds of pyrazine compounds at different flow rates

2.1.3 柱温的优化

色谱柱温度是影响化合物峰型和分离度的重要因素之一, 试验考察了不同温度变化对目标化合物的影响。结果发现随着柱温的升高, 基线更平稳, 分离度相应提高(见图 3), 因此试验选择 40°C 作为色谱柱温度。

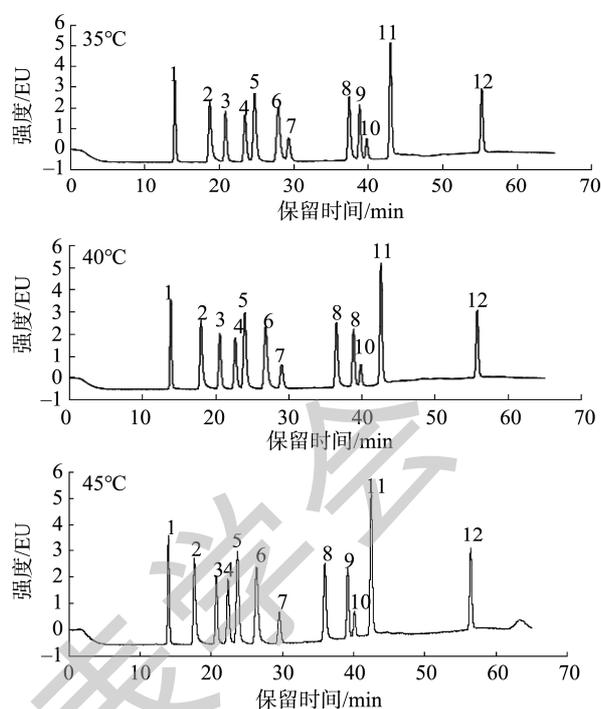


图3 12种吡嗪类化合物在不同柱温下的色谱图

Fig.3 Chromatograms of 12 kinds of pyrazine compounds at different column temperatures

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系和检出限考察

精确吸取 1.3.2 中混合标准品溶液, 制成系列混合对照品工作溶液, 按照 1.3.1 中色谱条件进样分析, 以各对照品的峰面积(Y)与其相应的质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)绘制标准曲线。以信噪比(signal-noise ratio, S/N)为 3 时各对照品的浓度作为检出限(limits of detections, LODs)。结果见表 3。结果显示 12 种吡嗪在所测试质量浓度范围内具有良好的线性关系, 相关系数(r^2)均大于 0.99, LODs 在 0.06~0.29 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 3 12 种吡嗪标准品回归方程、线性范围、LODs

Table 3 Regression equation, linear range, LODs of 12 kinds of pyrazine standards

序号	化合物	保留时间/min	线性方程	r^2	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	检出限/ $(\mu\text{g/mL})$
1	2356TTM	14.305	$Y=164388X+1791.1$	1.0000	0.1~10.0	0.09
2	2M	17.563	$Y=227528X-16623$	0.9991	0.1~10.0	0.11
3	235TM	20.739	$Y=145103X+5274$	1.0000	0.1~10.0	0.14
4	23DM	22.254	$Y=155280X-194.46$	0.9992	0.1~10.0	0.15
5	26DM	23.578	$Y=254389X-14667$	0.9989	0.1~10.0	0.11
6	25DM	26.218	$Y=243827X-9856.4$	0.9999	0.1~10.0	0.13
7	2E356TM	30.359	$Y=90023X+2845.8$	0.9999	0.1~10.0	0.25
8	2E	36.102	$Y=232090X+12.521$	0.9999	0.1~10.0	0.11
9	23DM5E	39.348	$Y=162764X-6960.4$	0.9985	0.1~10.0	0.12
10	3E25DM	40.333	$Y=68038X-8037$	0.9945	0.1~10.0	0.29
11	2E6M	42.606	$Y=363361X-21468$	0.9978	0.1~10.0	0.06
12	23DE5M	56.795	$Y=226082X+13729$	0.9997	0.1~10.0	0.09

2.2.2 重复性试验

量取同一瓶酱香型白酒样品 10 mL, 按 1.3.3 中方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 记录峰面积, 计算相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs), 结果见表 4。由表 4 可知, 2356TTM、2M、235TM、23DM、26DM、25DM、2E356TM、2E、23DM5E、3E25DM、2E6M 含量的重复性试验结果分别为 1.3%、2.4%、1.5%、2.2%、1.3%、2.8%、1.9%、2.1%、1.6%、2.4%、1.6%, RSD 范围均在 1.3%~2.8%, 表明该方法的重复性良好, 满足酱香型白酒中吡嗪类物质分析方法要求。

2.2.3 加标回收率和测定精密度

配制 53% 的乙醇溶液, 作为空白酒样, 分别添加 1、2、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个不同水平质量浓度标准品溶液进行加标回收试验, 每个添加水平做 6 个平行样品, 以 6 个平行样品的试验数据的 RSDs 作为该方法的精密度。由表 5 可知, 12 种吡嗪类物质的平均回收率在 80.8%~108.3%, RSDs 范围均在 0.27%~4.80%, 具有良好的精密度和回收率, 表明该方法的准确度良好, 能满足酱香型白酒中 12 种吡嗪化合物的检测需求。

表 4 12 种吡嗪化合物的重复性试验结果
Table 4 Repeatability test results of 12 kinds of pyrazine compounds

序号	化合物	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	峰面积 6	RSDs/%
1	2356TTM	2409785	2343273	2382199	2363820	2332838	2332247	1.3
2	2M	166139	173878	173122	164646	173434	167857	2.4
3	235TM	2289574	2247270	2252238	2248620	2244180	2326520	1.5
4	23DM	345317	353338	335845	340576	333922	335728	2.2
5	26DM	1462427	1517508	1508445	1486567	1487483	1486094	1.3
6	25DM	222001	235850	222155	235563	231513	226213	2.8
7	2E356TM	49280	50488	47833	48918	49872	48893	1.9
8	2E	30851	30709	29419	30830	30863	31325	2.1
9	23DM5E	1223243	1200074	1212398	1170518	1202078	1220021	1.6
10	3E25DM	18057	18141	17423	18764	18053	17822	2.4
11	2E6M	1000600	981173	980845	1011187	999477	969859	1.6
12	23DE5M	-	-	-	-	-	-	-

注: -表示低于检出限, 未检出。

表 5 12 种吡嗪化合物的加标回收率结果
Table 5 Results of the standard recovery of 12 kinds of pyrazine compounds

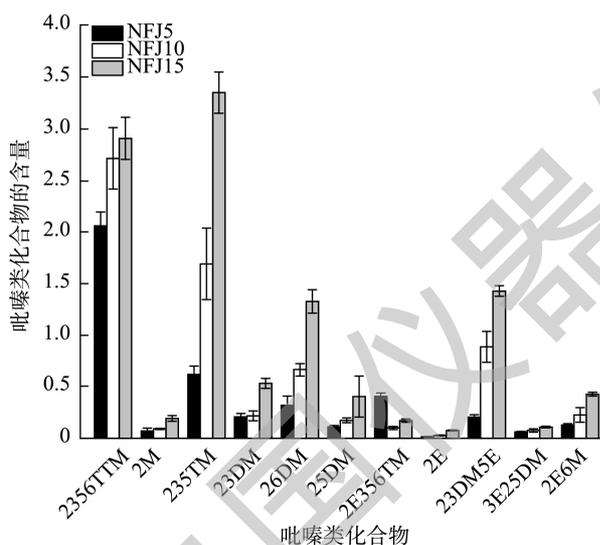
化合物	加入量/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	平均回收率/%	RSDs/%
2356TTM	1	101.2	2.44
	2	102.0	2.33
	5	98.3	1.31
	1	92.0	3.81
2M	2	100.6	3.97
	5	100.3	2.23
	1	100.3	2.25
235TM	2	101.9	0.27
	5	98.0	1.15
	1	103.5	4.28
23DM	2	108.1	2.21
	5	102.3	0.54
	1	96.4	2.75
26DM	2	108.3	1.95
	5	102.5	0.97
	1	96.0	2.46
25DM	2	103.6	0.95
	5	98.5	1.15

表 5(续)

化合物	加入量/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	平均回收率/%	RSD/%
2E356TM	1	90.3	2.89
	2	104.7	1.99
	5	99.0	1.18
2E	1	97.2	1.63
	2	100.5	0.98
	5	96.3	1.07
23DM5E	1	103.5	4.24
	2	102.7	2.42
	5	101.0	0.80
3E25DM	1	82.4	3.19
	2	80.8	3.70
	5	102.2	3.62
2E6M	1	99.6	3.78
	2	105.8	3.44
	5	103.9	3.39
23DE5M	1	99.3	4.80
	2	80.8	2.08
	5	101.4	4.42

2.3 不同年份酱香型白酒样品中吡嗪类物质的分布规律

年份酒贮存过程中, 贮存时间的长短会影响白酒中各风味成分的含量^[26]。本研究取不同年份的酱香型白酒样品, 按 1.3.3 中方法制备供试品溶液, 并按 1.3.1 中色谱条件进样分析测定, 记录各待测成分的峰面积, 计算不同年份酱香型白酒样品中 2356TTM、2M、235TM、23DM、26DM、25DM、2E356TM、2E、23DM5E、3E25DM、2E6M、23DE5M 的含量, 结果见图 4。由图 4 可知, 除 23DE5M 外, 在不同年份酱香型白酒样品中均检出 11 种吡嗪类化合物。11 种吡嗪类化合物在不同年份酱香型白酒中含量分布均呈现上升态势, 在 15 年份酱香型白酒中含量达到最高值, 如: 235TM、2356TTM。11 种吡嗪类物质的含量均随着酱香型白酒年份的增加而逐渐上升, 说明实际测得的成分含量与酱香型白酒产品生产所标注的年份情况相符, 所测样品中 2356TTM 和 235TM 的含量较高为酱香型白酒呈现出来的共性。



注: NFJ5:5年成品酒, NFJ10:10年成品酒, NFJ15:15年成品酒。

图4 不同年份酱香型白酒样品中吡嗪类化合物的含量柱状图

Fig.4 Histogram of pyrazines compounds content in Maotai-flavor Baijiu samples of different vintages

吡嗪类化合物作为白酒中重要的含氮化合物^[27-28], 对白酒风味的形成和健康功能有举足轻重的地位^[29-30]。FAN 等^[31]对 12 种白酒样品的吡嗪类化合物进行了检测, 结果表明酱香型白酒中吡嗪类化合物种类和含量较高, 集中在 2E6M、26DM、23DE5M、235TM、2356TTM。本研究与前期学者的研究相符合, 表明该方法的准确度高, 使用优化的色谱条件测定吡嗪时可以满足试验要求。

2.4 多元统计分析

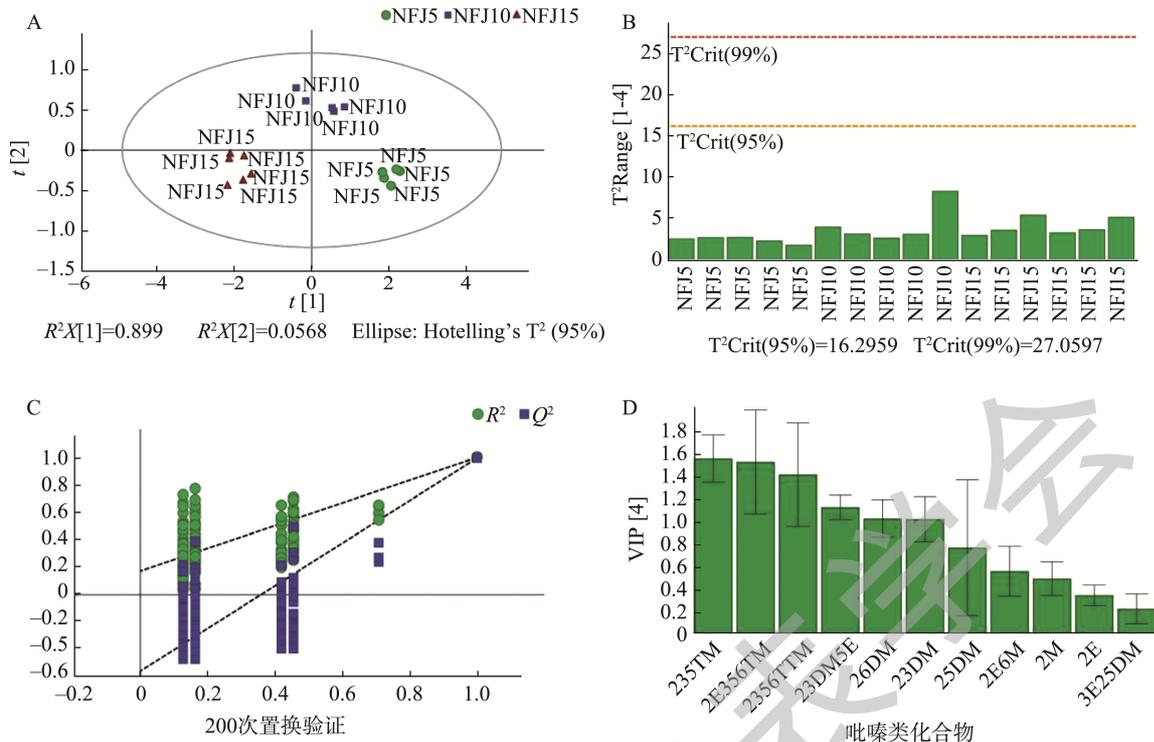
为进一步发掘不同年份酱香型白酒样品中检出的 11

种吡嗪类物质存在的差异以及使其产生差异的化学成分, 采用 SIMCA 14.1 软件对不同年份酱香型白酒样品中吡嗪类化合物含量进行 PLS-DA 构建鉴别模型并找出关键差异物质^[32], 并采用 Origin 软件绘制聚类热图, 直观的展示不同年份酒中吡嗪类物质的变化规律^[33]。

通过有监督的 PLS-DA 模型分析 11 种吡嗪类物质与年份酒的关系, 以可视化的方法客观评价年份酒品质, 结果见图 5。PLS-DA 模型的解释能力和预测能力参数均大于 0.97, 说明模型稳定可靠^[34]。结合 Hotelling's T^2 图可知, 样本均在 95% 的误差线以内, 表明样本是正常可靠的。通过 200 次的置换检验可知 $r^2=0.186$ 小于 0.3, $Q^2=-0.548$ 小于 0, 说明该模型不存在过拟合^[34]。从图 5 中模型可以看出, NFJ5 的样品相较另外两个年份的样本聚类效果好, 说明其样本内部的差异较小。在整体区分上 3 种不同年份酒的区分效果明显, 表明不同年份酒中 11 种吡嗪类物质的含量存在一定的差异, 可为年份酒的区分提供一种思路。变量投影重要性(variable important in projection, VIP)在研究中常以 VIP 值大于 1 筛选特征性物质, VIP 值越大, 说明变量在样品间的差异就越显著^[35]。以 11 种吡嗪类物质区分的不同年份酒样品中筛选出了 235TM、2E356TM、2356TTM、23DM5E 和 26DM 这 5 种特征性物质, 说明酱香型白酒历经长时间的窖藏, 这 5 种物质含量变化差异相对较大。

年份酒中吡嗪类物质的数据间数量级差异小, 不进行标准化处理, 聚类方式采用欧氏距离法, 距离越小, 两类越相似^[36]。分析结果如图 6 所示, 图中红色区域代表样本中吡嗪类物质的高表达区, 黑色区域代表样本中吡嗪类物质的中表达区, 蓝色区域代表样本中吡嗪类物质的低表达区。由图 6 可知, 由 11 种吡嗪类物质含量绘制的热图也出现了明显的聚类, 未出现样本误判, 但在 NFJ5 和 NFJ10 的样本相较 NFJ15 更相似, 说明年份酒样本中吡嗪类物质 5~10 年之间的含量变化弱于 10~15 年之间的变化。2356TTM、2M、235TM、23DM、26DM、25DM、2E、23DM5E、3E25DM 和 2E6M 的整体变化规律趋势明显, 随着年份的延长, 其含量呈增加趋势, 这与样本含量部分分析的结论一致。在 NFJ5 样品中有 10 种吡嗪类物质集中于低表达区, 2E356TM 的含量集中于高表达区, NFJ-10 中 12 种吡嗪类物质在 3 个表达区中均有体现, 以中低度表达区为主, NFJ-15 样品中 10 种吡嗪物质均集中于高表达区, 其中 2E356TM 的含量集中于中低表达区。

本研究通过 PLS-DA 的 VIP 功能, 以变量 VIP 值 > 1.0 为显著影响, 共找到酱香型白酒中 5 种差异性标志物, 分别为 235TM、2E356TM、2356TTM、23DM5E 和 26DM 这 5 种特征性物质, 根据 VIP 值大小进行排序, 分别为 235TM > 2E356TM > 2356TTM > 23DM5E > 26DM, 结果表明 235TM、2E356TM、2356TTM、23DM5E 和 26DM 可能是不同年份酱香型白酒中的差异性指标成分, 可以为区分不同年份的酱香型白酒提供参考依据。



注: A: PLS-DA模型; B: Hotelling's T^2 图; C: 200次置换验证; D: VIP图。

图5 不同年份酱香型白酒样品中吡嗪类物质的模型图

Fig.5 Modeling of pyrazines in Maotai-flavor Baijiu samples of different vintages

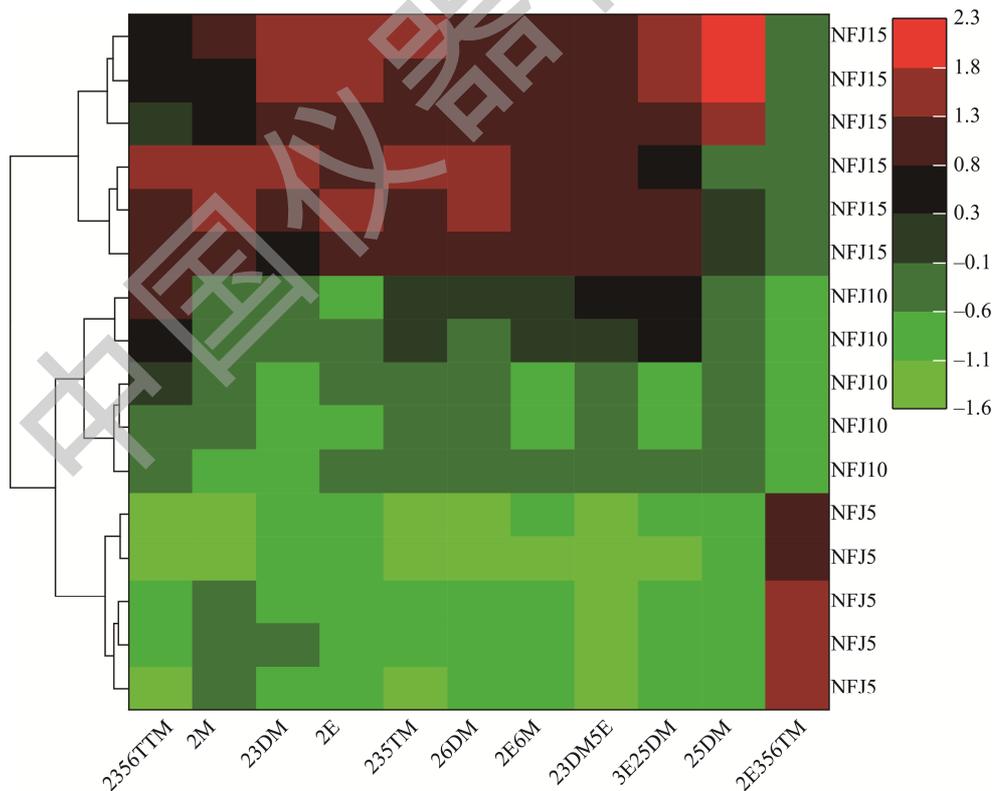


图6 不同年份酱香型白酒样品中吡嗪类物质的聚类图

Fig.6 Clustering of pyrazines in Maotai-flavor Baijiu samples of different vintages

3 讨论与结论

本研究基于 HPLC 法结合多元统计方法分析不同年份酱香型白酒中吡嗪类化合物的差异, 该方法利用外标法计算不同年份酱香型白酒中 11 种吡嗪化合物的含量, 并结合 PCA 和 PLS-DA 评价不同年份酱香型白酒中 12 种成分差异, 能快速准确检出不同年份白酒中 12 种目标成分, 各组分在质量浓度 0.1~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内均呈现良好的线性关系, 相关系数(r^2)均大于 0.99, 检出限在 0.06~0.29 $\mu\text{g/mL}$, 重复性 RSDs 范围均在 1.3%~2.8%, 在 1、2、5 $\mu\text{g/mL}$ 3 个不同水平质量浓度添加浓度水平上的回收率为 80.8%~108.3%, 精密性 RSDs 范围均在 0.27%~4.80%。

整个检测过程, 前处理简单易操作, 成本低, 检测结果稳定准确, 可用于测定酱香型白酒中 12 种吡嗪化合物。此外, 通过对其含量测定结果进行了多元统计分析, 结果表明酱香型白酒样品能够在不同的年份之间达到分类, 即这 12 种成分的含量可以有效区分不同年份的酱香型白酒, 且 235TM、2E356TM、2356TTM、23DM5E 和 26DM 可能是主要差异性指标成分。

此外, 研究还发现 11 种吡嗪类化合物随着酱香型白酒贮存年份的增加, 其含量均呈现上升态势, 在 15 年酱香型白酒中含量达到最高值, 同时相关文献表明不同轮次酱香型白酒中吡嗪类化合物含量存在差异, 刘家欢等^[27]研究发现不同轮次酒中吡嗪类化合物含量呈规律性变化, 在一、二轮次酒中较低, 三轮次开始升高, 在中间轮次(三、四、五、六轮次酒)中均维持较高含量。本研究与前期学者的研究相符合, 吡嗪类化合物含量的高低与酱香型白酒存放年份的长短存在一定的关联性, 通过监控不同年份的酱香型白酒样品中吡嗪类化合物含量, 可进一步实现工艺参数的监控与调控, 进而实现提升酱香型白酒的酒质, 驱动酱香型白酒产业的发展。由于本研究所测的酒样数量有限, 后期会增加酒样并结合感官评定进一步佐证试验结果, 使该方法能更有效、客观地反映不同年份酱香型白酒中吡嗪类化合物的差异。

参考文献

- [1] YANG L, FAN WL, XU Y. GC×GC-TOF/MS and UPLC-Q-TOF/MS based untargeted metabolomics coupled with physicochemical properties to reveal the characteristics of different type daqus for making soy sauce aroma and flavor type Baijiu [J]. LWT, 2021, (146): 111–416.
- [2] 朱艳美, 陈亨业, 邓高琼, 等. 高温大曲白酒中吡嗪类化合物的检测、来源、香气和功能活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(5): 420–428.

- ZHU YM, CHEN HY, DENG GQ, *et al.* Research progress of the detection, source, aroma and functional activity of pyrazine compounds in high temperature Daqu Baijiu [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(5): 420–428.
- [3] ZHU Q, CHEN L, PENG Z, *et al.* Analysis of environmental driving factors on core functional community during Daqu fermentation [J]. Food Res Int, 2022, (157): 111286.
- [4] WANG WH, XU YQ, HUANG HQ, *et al.* Correlation between microbial communities and flavor compounds during the fifth and sixth rounds of sauce-flavor baijiu fermentation[J]. Food Res Int, 2021, 150: 110741.
- [5] 范文来, 徐岩. 白酒 79 个风味化合物嗅觉阈值测定[J]. 酿酒, 2011, 38(4): 80–84.
FAN WL, XU Y. Determination of olfactory threshold of 79 flavor compounds in white wine [J]. J Brew, 2011, 38(4): 80–84.
- [6] ZHANG YH, YANG RY, XIE FW, *et al.* Control strategies of pyrazines generation from Maillard reaction [J]. Trend Food Sci Technol, 2021, 112: 795–807.
- [7] 郭学武, 范恩帝, 马冰涛, 等. 中国白酒中微量成分研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(11): 267–276.
GUO XW, FAN END, MA BT, *et al.* Research progress of trace components in Chinese liquor [J]. Food Sci, 2020, 41(11): 267–276.
- [8] ZHOU R, CHEN X, XIA Y, *et al.* Research on the application of liquid-liquid extract-on-gas chromatography-mass spectrometry (LLE-GC-MS) and headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry (HS-GC-IMS) in distinguishing the Baiyunbian aged liquors [J]. Int J Food Eng, 2020, 17(2): 83–96.
- [9] DENG SB, CUI HP, HAYAT K, *et al.* Comparison of pyrazines formation in methio-nine/glucose and corresponding amadori rearrangement product model [J]. Food Chem, 2022, 382: 132520.
- [10] 吴建峰. 中国白酒中健康功能性成份四甲基吡嗪的研究综述[J]. 酿酒, 2006, 33(6): 13–16.
WU JF. Research review on the healthy functional component tetramethylpyrazine in Chinese liquor [J]. J Brew, 2006, 33(6): 13–16.
- [11] 王婧, 王晓丹, 邱树毅, 等. 酱香型白酒酿造体系风格特征形成探究[J]. 酿酒, 2015, 42(4): 99–104.
WANG J, WANG XD, QIU SY, *et al.* Exploration on the formation of style characteristics of soy sauce-type liquor brewing system [J]. J Brew, 2015, 42(4): 99–104.
- [12] 乔慧, 高晓娟. GC-NPD 快速测定吡嗪类物质方法研究[J]. 酿酒, 2011, 38(6): 45–46.
QIAO H, GAO XJ. Study on the method of rapid determination of pyrazines by GC-NPD [J]. J Brew, 2011, 38(6): 45–46.
- [13] 梅明明, 朱婧, 李妍, 等. 气相色谱-质谱法测定白酒中 3 种吡嗪类化合物[J]. 现代预防医学, 2015, 42(14): 107–109.

- MEI MM, ZHU J, LI Y, *et al.* Determination of 3 kinds of pyrazines in liquor by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Mod Pre Med*, 2015, 42(14): 107–109.
- [14] 孙玉婷, 郑晓卫, 叶力, 等. 白酒中四甲基吡嗪形成机制及相关应用的研究进展[J]. *酿酒科技*, 2023, (1): 130–136.
- SUN YT, ZHENG XW, YE L, *et al.* Research progress on formation mechanism and related applications of tetramethylpyrazine in liquor [J]. *Brew Sci Technol*, 2023, (1): 130–136.
- [15] WANG Z, WANG S, LIAO PF, *et al.* HS-SPME combined with GC-MS/O to analyze the flavor of strong aroma Baijiu Daqu [J]. *Foods*, 2022, 11(1): 116.
- [16] MU X, LU J, GAO M, *et al.* Optimization and validation of a headspace solid-phase microextraction with comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection for quantification of trace aroma compounds in Chinese liquor (Baijiu) [J]. *Molecules*, 2021, 26(22): 6910.
- [17] HE YX, LIU ZP, QIAN M, *et al.* Unraveling the chemosensory characteristics of strong-aroma type Baijiu from different regions using comprehensive two-dimensional gas Chromatography-time-of-flight mass spectrometry and descriptive sensory analysis [J]. *Food Chem*, 2022, 331, 127335.
- [18] 任学坤, 殷微微, 徐文平, 等. 气相色谱法测定白酒功能性成分四甲基吡嗪[J]. *酿酒科技*, 2011, (10): 89–92.
- REN XK, YIN WW, XU WP, *et al.* Determination of tetramethylpyrazine as a functional constituent of liquor by gas chromatography [J]. *Brew Sci Technol*, 2011, (10): 89–92.
- [19] 王莉, 吴建霞, 雷良波. 气相色谱-质谱-离子扫描联用法快速检测白酒中 4 种吡嗪类化合物[J]. *中国酿造*, 2009, (3): 148–150.
- WANG L, WU JX, LEI LB. Rapid determination of four pyrazines in liquor by gas chromatography-mass spectrometry-ion scanning [J]. *China Brew*, 2009, (3): 148–150.
- [20] 范文来, 张艳红, 徐岩. 应用 HS-SPME 和 GC-MS 分析白酒大曲中微量挥发性成分[J]. *酿酒科技*, 2007, (12): 74–78.
- FAN WL, ZHANG YH, XU Y. Application of HS-SPME and GC-MS to analyze the trace volatile components in white wine dacquoise [J]. *Brew Sci Technol*, 2007, (12): 74–78.
- [21] ZHAO G, FENG Y, HADIATULLAH H, *et al.* Chemical characteristics of three kinds of Japanese soy sauce based on electronic senses and GC-MS analyses [J]. *Fro Micr*, 2021, 11: 579808.
- [22] 王奕芳, 周容, 张明春, 等. 白酒中重要的功能化合物吡嗪的研究进展[J]. *酿酒*, 2018, 45(6): 20–24.
- WANG YF, ZHOU R, ZHANG MC, *et al.* Research progress of important functional compounds pyrazine in liquor [J]. *J Brew*, 2018, 45(6): 20–24.
- [23] 刘家欢, 孙细珍, 熊亚青, 等. 不同轮次酱香型白酒中吡嗪类化合物含量分析[J]. *食品与发酵科技*, 2023, 59(3): 103–110.
- LIU JH, SUN XZ, XIONG YQ, *et al.* Analysis of pyrazine compounds in different rounds of sauce-flavor liquor [J]. *Food Ferment Technol*, 2023, 59(3): 103–110.
- [24] 李正涛, 孙跃, 孙海燕, 等. GC-MS/MS-SRM 技术在检测白酒中 5 种吡嗪类化合物的应用研究[J]. *酿酒科技*, 2020, (5): 17–26.
- LI ZT, SUN Y, SUN HY, *et al.* Application of GC-MS/MS-SRM technique in the detection of 5 kinds of pyrazines in liquor [J]. *Brew Sci Technol*, 2020, (5): 17–26.
- [25] 龙四红, 廖妍俨, 孙棣, 等. 高效液相色谱法快速测定白酒中 8 种吡嗪类化合物[J]. *中国酿造*, 2021, 40(1): 176–182.
- LONG SH, LIAO YY, SUN D, *et al.* Rapid determination of 8 kinds of pyrazines in liquor by high performance liquid chromatography [J]. *China Brew*, 2021, 40(1): 176–182.
- [26] YAN Y, CHEN S, NIE Y, *et al.* Quantitative analysis of pyrazines and their perceptual interactions in soy sauce aroma type Baijiu [J]. *Foods*, 2021, 10(2): 1–12.
- [27] 孙细珍, 熊亚青, 倪兴婷, 等. 吡嗪类化合物对酱香型白酒香气特征的影响分析[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 10(2): 1–9.
- SUN XZ, XIONG YQ, NI XT, *et al.* Effect of pyrazine compounds on aroma characteristics of Maotai-flavored liquor [J]. *Food Ferment Ind*, 2021, 10(2): 1–9.
- [28] 孙棣, 赵贵斌, 杨波. 酱香型白酒中吡嗪类化合物的检测及特点[J]. *中国酿造*, 2015, 34(12): 162–166.
- SUN D, ZHAO GB, YANG B. Detection and characteristics of pyrazine compounds in Maotai-flavor liquor [J]. *China Brew*, 2015, 34(12): 162–166.
- [29] WEI J, DU H, ZHANG H, *et al.* Mannitol and erythritol reduce the ethanol yield during Chinese Baijiu production [J]. *Int J Food Microl*, 2021, 337, 108–133.
- [30] FAN W, XU Y, QIAN MC. Identification of aroma compounds in Chinese “Moutai” and “Langjiu” liquors by normal phase liquid chromatography fractionation followed by gas chromatography/olfactometry [J]. *Flav Chem Alco Bev*, 2012, 1104: 303–338.
- [31] FAN WL, XU Y, ZHANG Y. Characterization of pyrazines in some Chinese liquors and their approximate concentrations [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(24): 9956–9962.
- [32] 黄河, 陈昊, 武亚帅, 等. 北派浓香型白酒年份标记物的非靶向鉴定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(20): 171–182.
- HUANG H, CHEN H, WU YS, *et al.* Non-targeted identification of vintage markers of Beipai Luzhou-flavor liquor [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(20): 171–182.
- [33] 郑灿杰, 孙仁杰, 赵亚文, 等. 不同前处理温度对酱香型高温大曲风味的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(23): 163–171.

ZHENG CJ, SUN RJ, ZHAO YW *et al.* Effects of different pretreatment temperatures on flavor of Maotai-flavored high temperature Daqu [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(23): 163–171.

- [34] 徐春晖, 王远兴. 基于 GC-MS 结合化学计量学方法鉴别 3 种江西名茶[J]. *食品科学*, 2020, 41(20): 141–150.

XU CH, WANG YX. Identification of three famous teas in Jiangxi Province based on GC-MS combined with chemometrics [J]. *Food Sci*, 2020, 41(20): 141–150.

- [35] 张萌, 田真, 魏建平, 等. 基于气相色谱-离子迁移谱法和固相微萃取-气相色谱-质谱法分析 6 种香型白酒挥发性风味物质[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(5): 226–235.

ZHANG M, TIAN Z, WEI JP, *et al.* Analysis of volatile flavor substances of 6 kinds of fragrant liquor based on gas chromatography-ion migration spectrometry and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(5): 226–235.

- [36] 霍霏霖, 梁志森, 陈玉珍, 等. 多元素含量分析结合化学计量学对陈皮进行产地溯源[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(23): 227–233.

HUO PL, LIANG ZS, CHEN YZ, *et al.* Origin tracing of orange peel by multi-element analysis combined with chemometrics [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(23): 227–233.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)

作者简介



杨 沙, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测技术。

E-mail: 2459637593@qq.com



侯 睿, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测技术。

E-mail: 1964383741@qq.com

中国仪器仪表学会