

# Changes of Pyrazines in Baiyunbian Liquor

Yanyan Jing<sup>1</sup>, Maobin Chen<sup>1\*</sup>, Shangling Fang<sup>1</sup>, Yuqun Xie<sup>1</sup>, Yu Zhang<sup>1</sup>, Mingchun Zhang<sup>2</sup>, Yongwei Zhao<sup>2</sup>, Caili Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei University of Technology, Wuhan Hubei

<sup>2</sup>Hubei Baiyunbian Liquor Industry Co., Ltd., Songzi Hubei  
Email: 351844363@qq.com, \*hgchenmaobin@163.com

Received: Oct. 21<sup>st</sup>, 2017; accepted: Nov. 3<sup>rd</sup>, 2017; published: Nov. 13<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

Pyrazines are one of the most important flavors in liquor. To analyze the changes of pyrazines in Baiyunbian liquor, a technique of indirect solid phase microextraction and GC-MS was established. The contents of 2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,3,5-trimethylpyrazine, 2,3,5,6-tetramethylpyrazine in Baiyunbian liquor were detected by external standard method. Indirect solid phase microextraction: First wine was pretreated, the samples were adjusted to pH1 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporate and concentrate with a rotary evaporator, then adjusted to pH12 with NaOH. Headspace solid phase microextraction: take 1 ml of concentrate in a headspace bottle and add NaCl until the concentrate is saturated. The temperature is kept at 45°C for 15 min, and the concentrate was extracted at the same temperature for 20 min. The results show that the content of pyrazines is closely related to the year. 12 - 15 years is the turning point of the change in pyrazine content, the total content of four pyrazines increased with the year.

## Keywords

Baiyunbian Liquor, Pyrazine, Solid Phase Microextraction, GC, MS

# 吡嗪类化合物在白云边酒中的变化

景艳艳<sup>1</sup>, 陈茂彬<sup>1\*</sup>, 方尚玲<sup>1</sup>, 谢逾群<sup>1</sup>, 张 玉<sup>1</sup>, 张明春<sup>2</sup>, 赵永威<sup>2</sup>, 汪彩莉<sup>2</sup>

<sup>1</sup>湖北工业大学, 发酵工程教育部重点实验室, 工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北省工业微生物重点实验室, 湖北 武汉

<sup>2</sup>湖北白云边酒业股份有限公司, 湖北 松滋  
Email: 351844363@qq.com, \*hgchenmaobin@163.com

收稿日期: 2017年10月21日; 录用日期: 2017年11月3日; 发布日期: 2017年11月13日

\*通讯作者。

文章引用: 景艳艳, 陈茂彬, 方尚玲, 谢逾群, 张玉, 张明春, 赵永威, 汪彩莉. 吡嗪类化合物在白云边酒中的变化[J]. 食品与营养科学, 2017, 6(4): 215-222. DOI: 10.12677/hjfn.2017.64027

## 摘要

吡嗪类化合物是白酒中重要的含氮化合物,对白酒的风味有重要的影响。为分析吡嗪类化合物在白云边酒中的变化,建立了间接固相微萃取与气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术,采用外标法快速定量检测白云边酒中2-甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪的含量。间接固相微萃取:先对酒样预处理,将酒样用 $H_2SO_4$ 调节pH值为1,用旋转蒸发器蒸发浓缩,收集浓缩液用NaOH调节pH值为12。再顶空固相微萃取,取1 ml浓缩液于顶空瓶中,加入NaCl直到浓缩液饱和。 $40^\circ C$ 保持15 min,并且在相同的温度下萃取20 min。气相色谱-质谱分析结果显示:吡嗪类化合物含量与年份有着密切关系。白云边年份酒中尤其12年~15年是各类吡嗪含量变化的转折点,四种吡嗪总含量随年份增长而递增。

## 关键词

白云边酒, 吡嗪, 固相微萃取, 气相色谱, 质谱

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

吡嗪类化合物是白酒中重要的含氮化合物,香气强度高、阈值低,影响着白酒的风味特征[1]。在酱香型白酒中已检测出较高浓度的吡嗪类化合物,其中以四甲基吡嗪为主,含量最高[2]。吡嗪类化合物在心脑血管系统[3]、中枢神经系统[4]、呼吸系统[5]、消化系统[6]、泌尿系统[7]等方面也体现出健康功效,具有扩张血管,改善微循环及抑制血小板聚集、保护肝脏等功能。吡嗪类化合物既是白酒中重要风味物质也是健康功效因子,对其分析研究具有重要意义。

白酒中吡嗪类物质的浓度是 mg/L (ppb)级,所以对白酒中的吡嗪类物质进行分析检测时需要建立高效的富集方法[2]。主要的富集方法有液液萃取(LLE)、固相微萃取(SPME)、超临界  $CO_2$  萃取、离子交换等[1]。固相微萃取分为两个步骤:吸附和解吸。吸附过程是石英纤维表面的涂层根据相似相溶原理对待测组分进行吸附,将待测组分从基质中分离出来。固相微萃取具有样品用量小,耗时少而且不需要有毒有机溶剂、选择性强、重现性好,精确度高的优点从而得到广泛应用[8]。本研究中直接固相微萃取法即顶空固相微萃取法。间接固相微萃取法是在直接固相微萃取法基础上,多了一步对酒样的预处理。利用间接固相微萃取法对浓酱兼香型典型代表白云边年份酒中吡嗪类化合物进行分析,直观体现吡嗪类化合物的变化。

## 2. 材料与仪器

### 2.1. 材料与试剂

化学试剂: 2-甲基吡嗪(99.99%)、2,3-二甲基吡嗪(99.99%)、2,5-二甲基吡嗪(99.99%)、2,3,5-三甲基吡嗪(99.99%)、2,3,5,6-四甲基吡嗪(99.99%)、氯化钠、氢氧化钠、硫酸。

白酒样品: 3年白云边(150 mL)、12年白云边(150 mL)、白云边30年(150 mL)。

### 2.2. 仪器与设备

仪器: 旋转蒸发器(RE201D 上海精密仪器仪表有限公司)、气相色谱仪(VARIAN 3900 美国安捷伦)、

质谱仪(5975E 美国安捷伦)、50/30umDVB/CAR on PDMS 萃取头(上海安普实验科技有限公司)、SPME 手动进样柄(上海安普实验科技有限公司)。

### 2.3. 实验方法

#### 2.3.1. 吡嗪标准溶液的配制

5 种吡嗪标品用去离子水分别配制 1 mg/L 的吡嗪标准溶液, 然后依次稀释成 400 ug/L、300 ug/L、200 ug/L、150 ug/L、100 ug/L 备用。

#### 2.3.2. 间接固相微萃取法

##### 1) 酒样的处理

取 150 ml 酒样于烧杯中, 用 6 mol/L 的  $H_2SO_4$  调节其 pH 值为 1。用旋转蒸发仪 60℃ 下蒸发浓缩 30 min, 收集浓缩液并记录浓缩液体积。用 6 mol/L 的 NaOH 调节浓缩液 pH 值为 12。

##### 2) 顶空固相微萃取法

SPME 的手动进样柄和 50/30 um DVB/CAR on PDME 萃取纤维用于吡嗪的萃取。首先将 50/30 um DVB/CAR 萃取纤维在气相色谱进样口老化 30 min, 老化温度为 250℃。分别取处理好的白酒样品和标准溶液 1 mL 加入顶空瓶中, 然后在顶空瓶中加入氯化钠直到溶液饱和, 加入磁体搅拌转子, 加盖封口。磁力搅拌加热器 2800 r/min 40℃ 下稳定 15 min 达到气-液平衡, 将老化好的萃取纤维插入顶空瓶的顶空部分(萃取纤维不接触溶液), 在相同的温度下连续搅拌萃取 20 min。萃取后将萃取纤维拉入针鞘中, 将固相微萃取装置从顶空瓶中取出。

#### 2.3.3. 气相色谱分析

将取出的固相微萃取装置插入气相色谱仪的进样口进行进样, 260℃ 热解吸 5 分钟, 取出固相微萃取装置。气相色谱仪条件为: 进样口温度 260℃, 采用不分流模式进样, 初始柱温 60℃, 以 20℃/min 速度 10 min 内升至 260℃, 载气为氮气, 恒定流速为 2 mL/min。

#### 2.3.4. 质谱分析

把完成固相微萃取后的固相微萃取装置插入质谱仪的进样口。质谱条件为: 电离方式 EI, 电子能量 70 eV, 接口温度 280℃, 阈值 100, 扫描/秒为 2.67, 扫描质量数 15~600 amu。

#### 2.3.5. 吡嗪定量方法

根据 5 个不同浓度吡嗪标准液对应的气相色谱图, 找到相对应吡嗪色谱峰面积, 作出吡嗪色谱峰面积-浓度标准曲线。已知被测酒样气相色谱图中吡嗪色谱峰面积, 根据对应吡嗪的标准曲线线性方程计算出处理后的酒样中吡嗪的浓度。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 固相微萃取的选择

由图 1 可以看出: 酒样直接固相微萃取得到的吡嗪组分峰重叠, 主要是因为酒样中会有大量的酸性物质影响吡嗪类化合物的萃取, 形成酸性物质屏障。对比图 1 由图 2 可以看出: 间接固相微萃取法可以消除酸性物质干扰, 吡嗪组分峰分离明显。所以本实验采用间接固相微萃取法, 先对酒样进行预处理, 将酒样调至 pH 为 1, 蒸馏除去酸性组分, 然后将剩余溶液调至 pH12。再进行顶空固相微萃取。2,5-二甲基-3-正戊基吡嗪是白云边酒的特征风味成分, 后续实验中因缺少其标准品所以未检测。

### 3.2. 吡嗪色谱峰面积-浓度标准曲线

气相色谱图可得到吡嗪 5 种浓度标准溶液对应的色谱峰面积, 分别对五种吡嗪标准样品的气相色谱

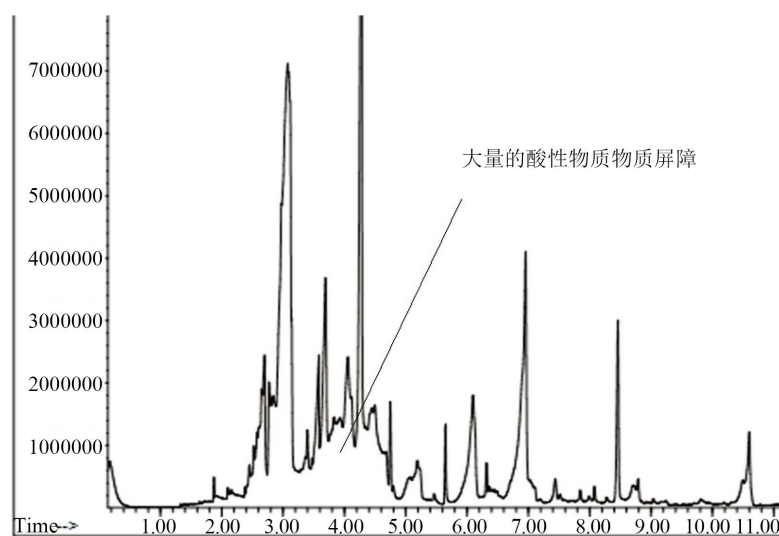


Figure 1. Direct solid phase microextraction of total ion current

图 1. 直接固相微萃取总离子流图

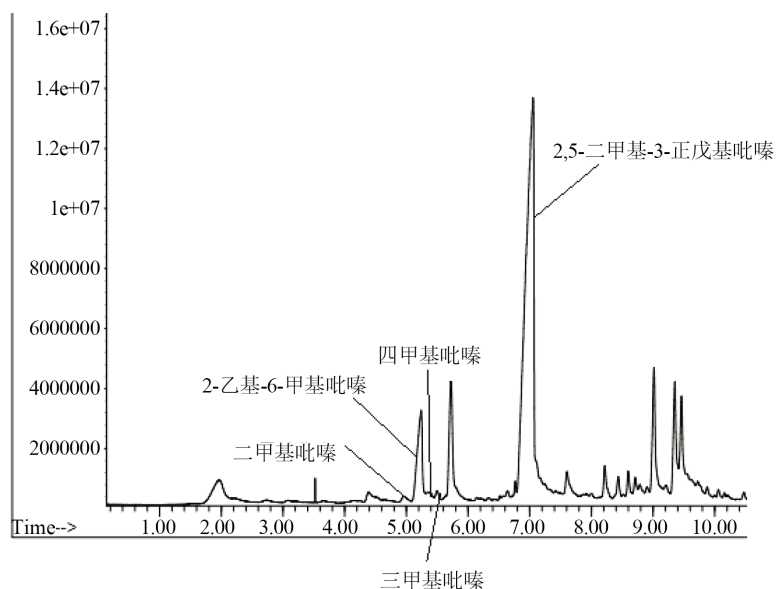


Figure 2. Indirect solid phase microextraction of total ion current

图 2. 间接固相微萃取总离子流图

峰面积与浓度作出标准曲线，见图 3。从表 1 可看出 5 种不同吡嗪标准样品的线性相关系数都在 0.97 以上，可以用于准确定量。根据线性方程可分别计算出酒样中对应吡嗪的含量。

### 3.3. 白云边年份酒中吡嗪含量变化分析

从图 4 可以看出 30 年白云边酒中含有 2-甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪，同样 3 年、12 年、15 年白云边酒中也都具有这四种吡嗪。

从表 2 中数据可以看出：3 年白云边酒中 2-甲基吡嗪含量最高，浓度为 351.503 ug/L，其次为 2,5-二甲基吡嗪，浓度为 262.288 ug/L，四种吡嗪总含量较低。12 年白云边酒中 2,3,5,6-四甲基吡嗪含量最高，浓度为 669.206 ug/L，2-甲基吡嗪和 2,5-二甲基吡嗪含量较次之，分别为 344.691 ug/L 和 368.434 ug/L，

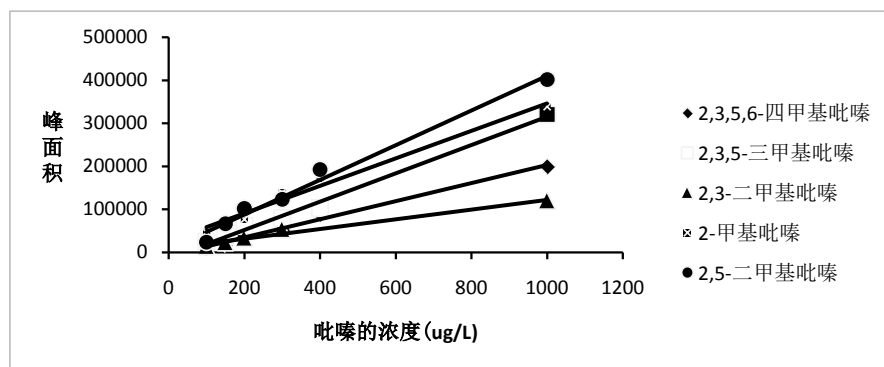


Figure 3. Five pyrazines peak area-concentration standard curve

图 3. 五种吡嗪色谱峰面积-浓度标准曲线图

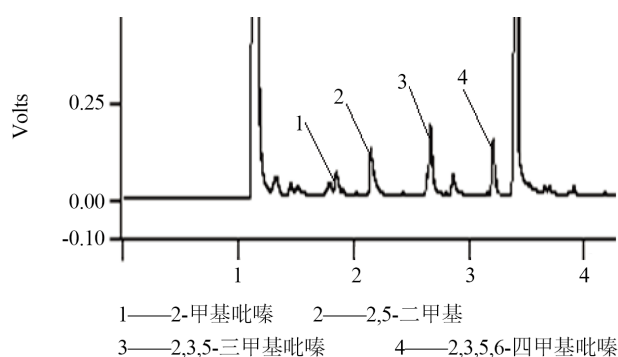


Figure 4. 30-year Baiyunbian liquor of the gas chromatogram

图 4. 30 年白云边酒的气相色谱图

Table 1. Standard curve of five pyrazines

表 1. 五种吡嗪的标准曲线表

组分名称	保留时间(min)	线性方程	线性相关系数(R <sup>2</sup> )
2-甲基吡嗪	1.756	$y = 210.06x - 6722.2$	0.99135
2,3-二甲基吡嗪	2.189	$y = 328.95x - 13403$	0.99326
2,5-二甲基吡嗪	2.149	$y = 113.01x + 9259.3$	0.97671
2,3,5-三甲基吡嗪	2.657	$y = 319.36x + 26887$	0.98351
2,3,5,6-四甲基吡嗪	3.204	$y = 402.39x + 7623$	0.98428

Table 2. Pyrene content of Baiyunbian liquor in different years

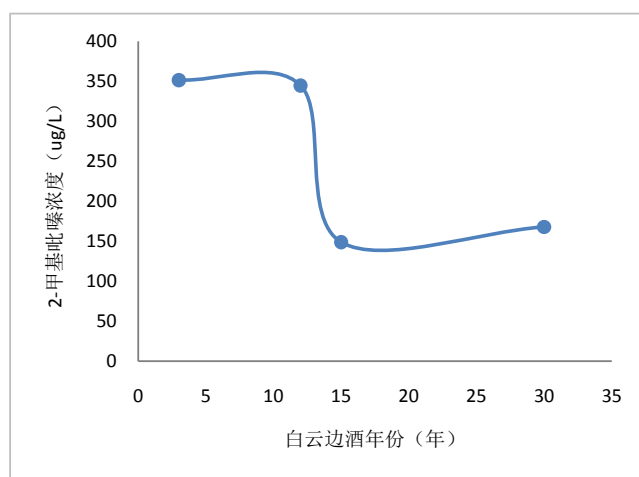
表 2. 不同年份白云边酒吡嗪含量

年份酒 组分名称	3 年白云边 (ug/L)	12 年白云边 (ug/L)	15 年白云边 (ug/L)	30 年白云边 (ug/L)
2-甲基吡嗪	351.503	344.691	148.881	167.993
2,5-二甲基吡嗪	262.288	368.434	661.238	958.422
2,3,5-三甲基吡嗪	90.891	163.937	206.169	489.196
2,3,5,6-四甲基吡嗪	67.00	669.206	681.626	257.91
四种吡嗪总含量	771.713	1546.268	1697.914	1873.521

较3年白云边酒,各吡嗪组分含量明显升高。15年白云边酒中2,3,5,6-四甲基吡嗪含量最高,浓度为681.626 ug/L, 2,5-二甲基吡嗪较次之 661.238 ug/L。30年白云边酒中2,5-二甲基吡嗪含量最高,浓度为958.422 ug/L, 2,3,5-三甲基吡嗪较次之,浓度为489.196 ug/L。不同年份白云边酒中4种吡嗪含量不断变化,总含量也不相同。

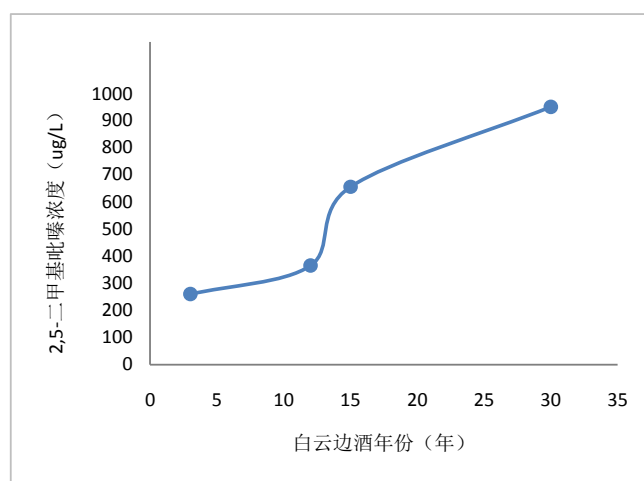
从图5~9可以看出2-甲基吡嗪含量总体呈下降趋势,12年~15年下降迅速,后又有上升趋势。2,5-二甲基吡嗪含量呈上升趋势,12年~15年上升迅速。2,3,5-三甲基吡嗪含量呈稳步上升趋势,12年~15年上升速度略有增加。2,3,5,6-四甲基吡嗪含量总体趋势为先上升后下降,3年~12年迅速上升,12年~15年上升缓慢,15年~30年迅速下降。4种吡嗪的总体含量呈上升趋势,3年~15年间上升迅速,15年后上升缓慢。

由此可见白云边酒中吡嗪类化合物的含量不断变化,与年份有着密切关系,尤其12年~15年是各类吡嗪含量变化的转折点。吡嗪总含量随年份增长而递增,30年后吡嗪总含量缓慢上升的同时趋于平衡状态。



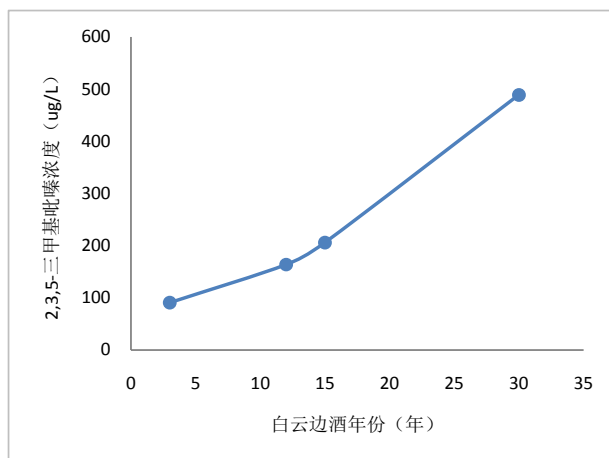
**Figure 5.** Variation of 2-Methylpyrazine Concentration in Baiyunbian liquor

**图 5.** 白云边酒中 2-甲基吡嗪浓度变化图



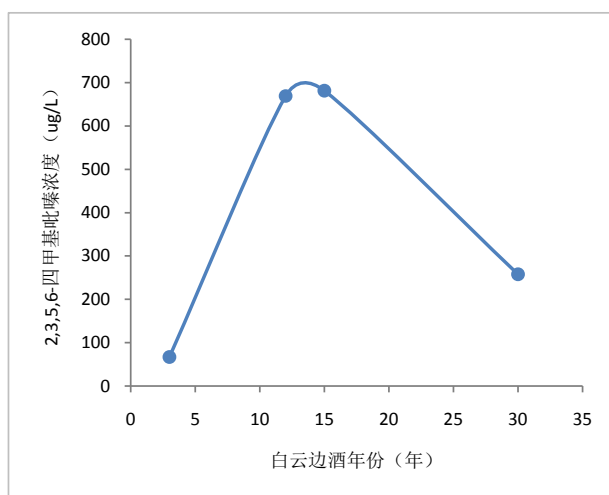
**Figure 6.** Variation of 2,5-dimethylpyrazine concentration in Baiyunbian liquor

**图 6.** 白云边酒中 2,5-二甲基吡嗪浓度变化图



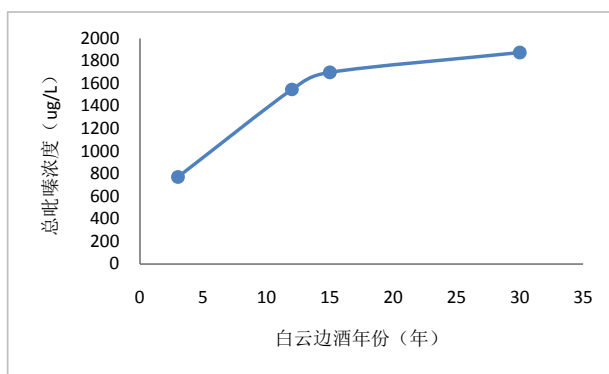
**Figure 7.** Variation of 2,3,5-trimethylpyrazine concentration in Baiyunbian liquor

**图 7.** 白云边酒中 2,3,5 三甲基吡嗪浓度变化图



**Figure 8.** Variation of 2,3,5,6-tetramethylpyrazine concentration in Baiyunbian liquor

**图 8.** 白云边酒中 2,3,5,6-四甲基吡嗪浓度变化图



**Figure 9.** Trends in the total concentration of four pyrazines in Baiyunbian liquor

**图 9.** 白云边酒中四种吡嗪总浓度变化趋势图

## 4. 结论

本实验采用间接固相微萃取法富集白酒中吡嗪类化合物,联合气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术进行检测,采用外标法对白云边酒中吡嗪类化合物的含量进行定量计算。先对酒样进行预处理再进行顶空固相微萃取的间接固相微萃取法消除了酸性物质干扰。数据分析发现:各年份白云边酒中都含有 2-甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪。白云边年份酒中这四种吡嗪的含量不断变化,与年份有着密切关系。尤其 12 年~15 年是吡嗪含量变化的转折点,四种吡嗪总含量随年份增长而递增,30 年后吡嗪总含量缓慢上升的同时趋于平衡状态。从吡嗪类化合物角度体现出“酒是陈的香”。

## 基金项目

国家重点研发计划资助(2016YFD0400501);湖北省科技支撑计划项目(2015BAA154);武汉市科技局应用基础研究计划项目(2015020101010074)。

## 参考文献 (References)

- [1] 王莉,雷良波,等. 白酒中含氮类化合物定性分析方法[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(8): 891-895.
- [2] 吴建峰. 白酒中四甲基吡嗪全程代谢机理研究[D]: [博士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [3] 孙建华. 脑梗死患者脑循环动力学改变和川芎嗪对急性缺血性脑损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(4): 249-250.
- [4] 阮琴,何新霞,等. 川芎中阿魏酸、川芎嗪对小鼠神经系统的影响[J]. 中国医院药科学杂志, 2007, 27(8): 1088-1090.
- [5] 段国贤,门秀丽,等. 川芎嗪对脑缺血/再灌注后所致肺损伤的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2006, 22(3): 361-362.
- [6] 王丽娟,王键,等. 川芎对实验室胃溃疡的影响[J]. 天津商业大学学报, 2008, 28(3): 7-8.
- [7] 王桂彬. 诺和灵联合川芎嗪治疗早期糖尿病肾病的临床观察[J]. 药物与临床, 2012, 33(16): 3431-3432.
- [8] 沈海月. 酱香型白酒香气物质研究[D]: [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2010.

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2166-613X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>  
期刊邮箱: [hjfn@hanspub.org](mailto:hjfn@hanspub.org)