

响应面法优化 HS-SPME-GC-MS 法 检测猪肉中挥发性风味物质

徐梓烜^{1,2}, 舒 畅³, 罗中魏^{1,4}, 吕珍珍^{1,3}, 张 文^{1,2,3,*}, 潘志明^{3,*}

(1.西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010;

2.肉类加工四川省重点实验室, 四川成都 610106;

3.德阳市食品药品安全检验检测中心, 四川德阳 618000;

4.四川华胜农业股份有限公司, 四川绵竹 618200)

摘 要:本试验采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱技术(Headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS)检测猪肉经过热处理后的挥发性风味物质。以盐度、萃取时间、萃取温度和解吸时间为影响因素进行单因素实验,采用响应面法对萃取条件进行优化,并在此基础上分析其挥发性风味物质的组成。结果表明:各因素的影响强弱顺序为:盐度>萃取温度>萃取时间>解吸时间。采用 75 μm 碳分子筛/聚二甲基硅氧烷(Carbon/Polydimethylsiloxane, CAR/PDMS)萃取头,最佳萃取条件为盐度 6%,萃取温度为 73 $^{\circ}\text{C}$ 、萃取时间为 40 min、解吸时间为 3 min。在此条件下,猪肉共检测出醛类、醇类、烃类、酮类、酯类、酸类、含硫及其它杂环化合物等 38 种挥发性风味物质,总峰面积为 3.18×10^{10} ,综合得分为 99.71 分,验证试验结果与预测值的相对误差为 0.27%,模型拟合度好。研究结果可为猪肉挥发性风味物质的分析和调控提供一定的理论依据。

关键词:顶空固相微萃取(HS-SPME), 气相色谱-质谱(GC-MS), 猪肉, 挥发性风味物质, 响应面法

Optimization of the HS-SPME-GC-MS Technique for Determination of Volatile Flavor Compounds in Pork by Response Surface Methodology

XU Zihan^{1,2}, SHU Chang³, LUO Zhongwei^{1,4}, LV Zhenzhen^{1,3}, ZHANG Wen^{1,2,3,*}, PAN Zhiming^{3,*}

(1.School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;

2.Key Laboratory of Meat Processing of Sichuan Province, Chengdu 610106, China;

3.Deyang Food and Drug Safety Inspection Center, Deyang 618000, China;

4.Sichuan Huasheng Agricultural Co., Ltd., Mianzhu 618200, China)

Abstract: In this study, the headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) was used to detect the volatile flavor compounds of heating treatment on pork. The influencing factors such as salinity, extraction time, extraction temperature and desorption time were researched by single factor experiment, and the extraction conditions were optimized by response surface methodology. On this basis, the composition of volatile flavor compounds was analyzed. The results showed the order of influence of four factors was as follows: salinity > extraction temperature > extraction time > desorption time. The 75 μm carbon/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) fiber was used and the optimum extraction conditions of pork were as follows: the salinity was 6%, extraction temperature was 73 $^{\circ}\text{C}$, extraction time was 40 min and desorption time was 3 min. Under these conditions, there were 38 kinds of main volatile flavor compounds were detected in pork, including aldehydes, alcohols, hydrocarbons, ketones, esters, acids and sulfur heterocyclics, etc. The total peak area was 3.18×10^{10} , and the comprehensive score was 99.71 with a deviation of 0.27% from the predicted value, the model fitted well. The results of study could provide some theoretical basis for the analysis and regulation of volatile flavor compounds in pork.

Key words: headspace solid phase microextraction (HS-SPME); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); pork; volatile flavor compounds; response surface methodology

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)06-0252-08

收稿日期: 2020-05-26

作者简介: 徐梓烜(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: 894088635@qq.com。

* 通信作者: 张文(1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: zhangwayne1988@163.com。

潘志明(1980-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: zhmpan@163.com。

基金项目: 肉类加工四川省重点实验室开放基金项目(19-R-07); 四川省科技厅应用基础研究计划项目(2016JY0110)。

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020050295

引文格式:徐梓焞,舒畅,罗中魏,等.响应面法优化 HS-SPME-GC-MS 法检测猪肉中挥发性风味物质[J].食品工业科技,2021,42(6):252-259.

XU Zihan, SHU Chang, LUO Zhongwei, et al. Optimization of the HS-SPME-GC-MS Technique for Determination of Volatile Flavor Compounds in Pork by Response Surface Methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6): 252-259. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

猪肉的营养价值非常丰富,是人们生活中不可缺少的食品。我国是世界上最大的猪肉生产国和消费国^[1],随着人们生活水平的不断提高,猪肉品质也越来越受到人们关注。风味是衡量肉类食品品质的重要指标,其中挥发性风味物质的产生主要是由于肌肉风味前体物质在加热后发生分解、氧化和还原等一系列化学反应^[2-3]。近年来,对猪肉挥发性风味物质的研究主要集中在肉品的新鲜度、猪种的选育及不同处理下肉品风味物质的变化等方面^[4-6],对于猪肉挥发性风味物质的萃取条件优化的研究还相对较少。

目前,食品风味物质的检测提取方法主要有固相微萃取法(Solid-phase microextraction, SPME)^[7]、同时蒸馏萃取法(Simultaneous distillation extraction, SDE)^[8]、微波辅助萃取法(Microwave-assisted extraction, MAE)^[9]及其它萃取方法^[10]。其中固相微萃取法仍然是主要的检测提取方法。顶空固相微萃取法(Headspace solid-phase microextraction, HS-SPME)与气相色谱-质谱(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用技术结合形成 HS-SPME-GC-MS 技术,它作为一种快速高效的分析提取技术,具有前处理简单、分析时间短、重视性良好及能检测到许多痕量($10^{-11} \sim 10^{-13}$ mg/L)物质等优点^[11-12],至今已在环境、工业、食品、药学等各个领域得到广泛应用^[13-16]。HS-SPME-GC-MS 技术的检测效果主要受样品用量、萃取头、萃取温度、萃取时间、盐离子浓度和解吸时间等因素的影响^[17]。因此为了准确的检测猪肉的挥发性风味物质,有必要探索最佳的萃取条件。

本研究以猪肉为研究对象,采用响应面法探究 HS-SPME-GC-MS 技术检测加热处理后猪肉的挥发性风味物质的最佳萃取条件,并在此基础上进一步分析其挥发性风味物质的组成,以期为猪肉的风味品质调控提供分析技术和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜猪肉 购自四川省德阳市某农贸市场早上宰杀的新鲜猪肉,猪背最长肌约 1 kg,低温条件下快速运回实验室,去掉表面可见脂肪、筋膜及结缔组织,按每袋约 20 g 分装于食品真空保鲜袋中封口,冷藏备用;2-甲基-3-庚酮(分析纯) 上海化学试剂公司;氯化钠(分析纯) 温州市恒顺化工有限公司。

安捷伦 7890B 气相色谱-三重四极杆串联质谱仪 美国 Agilent 公司;SAAB-57330U 型顶空固相微萃取手动进样手柄、SAAB-57318 型 75 μ m CAR/PDMS 固相微萃取头、SAAB-57333U 型固相微萃取

操作平台 成都奥泰万谱科技有限公司;MS205DU 电子天平 瑞士 Mettler-Toledo 公司;恒温水浴锅 匡贝实业(上海)有限公司;UV-R 超纯水机 法国 IKA 公司;VORTEX-5 型旋涡混合器 海门其林贝尔;QB0.9L4 型双开门冰箱 银都餐饮设备。

1.2 实验方法

1.2.1 萃取头老化 根据使用说明,75 μ m CAR/PDMS 萃取头初次使用时需在 GC 进样口 300 $^{\circ}$ C 老化 2 h。以后每次使用前活化 30 min,备用。再与加样相同的条件下不加样品做数次空白,直到 GC-MS 测定至无干扰峰出现。

1.2.2 顶空固相微萃取 参照潘见^[18]、蔡原^[19]等人方法并加以调整。称取猪肉样品(5 ± 0.05 g)(精确到 0.01 g)于 20 mL 顶空瓶中,加入 5.0 mL 纯水和一定量的氯化钠,再加入 6 μ L 内标(2-甲基-3-庚酮,质量浓度为 0.272 μ g/ μ L)后,用带有聚四氟乙烯隔垫的盖子密封,涡旋 2 min,速度为 800 r/min。随之将样品置于 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中加热处理 30 min,置于一定温度的水浴锅中平衡 10 min 后再进行萃取。将老化好的 75 μ m CAR/PDMS 萃取头迅速插入样品瓶顶空部分进行悬空富集,一定时间后取出萃取头,于 GC-MS 上机检测。同时做不加肉样的空白,重复 3 次。

1.2.3 GC-MS 分析条件 GC 条件:HP-INNOWAX 中极性柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m);整个模式采用不分流进样;升温程序:初始温度 40 $^{\circ}$ C,保持 3 min,然后以 4 $^{\circ}$ C/min 的速率升温至 170 $^{\circ}$ C,再继续以 8 $^{\circ}$ C/min 升到 230 $^{\circ}$ C,保持 5 min,共用时 48 min;进样口温度 250 $^{\circ}$ C;载气为 99.999% 高纯度氦气;流速 0.8 mL/min。

MS 条件:电离方式 EI;离子源温度 230 $^{\circ}$ C;四极杆温度 150 $^{\circ}$ C;电子能量 70 eV;扫描方式为全扫描;质量扫描范围 m/z 30~500 amu。

1.2.4 单因素实验设计 本研究在预实验基础上,选取挥发性风味物质的峰个数和总峰面积作为考察指标,分别比较盐度、萃取时间、萃取温度和解吸时间四个因素对猪肉挥发性风味物质检测的影响,并确定优化的参数。研究不同盐度(0、10%、20%、26.47%(饱和浓度)、30%)对猪肉挥发性风味物质检测的影响,此时固定萃取时间、萃取温度和解吸时间分别为 40 min、70 $^{\circ}$ C 和 3 min;研究不同萃取时间(10、20、30、40、50 min)对猪肉挥发性风味物质检测的影响,此时固定盐度、萃取温度和解吸时间分别为 10%、70 $^{\circ}$ C 和 3 min;研究不同萃取温度(40、50、60、70、80 $^{\circ}$ C)对猪肉挥发性风味物质检测的影响,此时固定盐度、萃取时间和解吸时间分别为 10%、40 min

和 3 min;研究不同解吸时间(1、3、5、7、9 min)对猪肉挥发性风味物质检测的影响,此时固定盐度、萃取时间和萃取温度分别为 10%、40 min 和 70 ℃。以上每个样品重复测定 3 次。

1.2.5 响应面试验设计结合综合评分法 在单因素实验基础上,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,以单因素试验最佳值为中心点,以检测所得挥发性风味物质的峰个数和总峰面积计算出的综合评分为响应值,设计四因素三水平的分析试验,如表 1 所示。

表 1 响应面试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of response surface methodology				
因素				
水平	A 盐度 (%)	B 萃取时间 (min)	C 萃取温度 (℃)	D 解吸时间 (min)
-1	0	30	60	1
0	10	40	70	3
1	20	50	80	5

综合评分标准为:满分为 100 分。峰个数与峰面积两个指标在大量文献中均作为优化萃取条件的重要指标,其值越大越好^[20-22]。赋予峰个数(M_i)与总峰面积(N_i)相同的权重系数 0.5。评分按公式(1)计算:

$$\text{综合评分(分)} = \left(\frac{M_i}{M_{\max}} + \frac{N_i}{N_{\max}} \right) \times 0.5 \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: M_i 为测定挥发性风味物质峰个数/个; $M_{\max}$ 为测定挥发性风味物质峰个数最大值; N_i 为测定挥发性风味物质总峰面积/(AU·min); $N_{\max}$ 为测定挥发性风味物质总峰面积最大值。

1.2.6 定性及定量分析 定性:待测组分经 GC-MS 所带的 NIST Library 14.0 谱图库计算机检索和结合相关文献报道,确定其成分;该研究仅分析相似指数(SI)大于 80% 以上化合物的检索结果^[5,23]。

定量:参考顾赛麒等^[24]人方法,采用内标法对化合物进行半定量。待测样品中挥发性风味物质的含量按公式(2)进行计算:

$$C_x(\text{ng/g}) = \left(\frac{C_0 \times V_0 \times S_x}{S_0 \times m} \right) \times 1000 \quad \text{式(2)}$$

式中: C_x 是待测挥发性风味物质含量(ng/g); C_0 为内标化合物质量浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$); V_0 为内标化合物进样的体积(μL); S_x 为待测挥发性风味物质的峰面积(AU·min); S_0 为内标化合物峰面积(AU·min); m 为样品的质量(g)。

1.3 数据处理

采用 Origin 2018 软件对单因素实验进行分析;利用 Design Expert 10.0 软件进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 盐度对猪肉挥发性物质萃取效果的影响 不同盐度对猪肉挥发性风味物质萃取效果的影响如图 1 所示。萃取前在样品中加适量的盐离子可增强挥发性风味物质在顶空瓶上空的浓度,从而使萃取头

富集更多的挥发性物质^[25]。由图可知,在盐度从 0~10% 时,峰个数和峰面积略微上升,但盐度从 10%~20% 时,峰个数和峰面积急剧下降,且在盐度添加量为 10% 时达到最大,此时共检测出 36 种挥发性物质成分,总峰面积为 3.12×10^{10} 。超过 20% 后,峰个数和峰面积下降放缓。这是由于添加适量的盐离子可增加样品的离子强度和提高了 HS-SPME 分析的灵敏度,但盐度的过量添加反而可能会降低一些挥发性组分的扩散速度,影响基质分子基团之间的作用力^[25-26]。因此,选择最佳盐度为 10%。同时,选择盐度为 0、10%、20% 进行响应面优化试验。

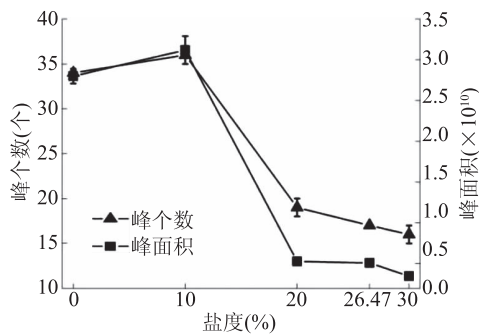


图 1 不同盐度对猪肉挥发性风味物质萃取效果的影响

Fig.1 Effect of different salinity on extraction effect of volatile flavor compounds in pork

2.1.2 萃取时间对猪肉挥发性物质萃取效果的影响 不同萃取时间对猪肉挥发性风味物质萃取效果的影响如图 2 所示。当萃取时间在 10~40 min 时,待测物的峰个数和总峰面积随萃取时间的延长整体呈增长趋势,且在 40 min 时均达到最大,此时共检测出 32 种挥发性物质成分,总峰面积为 2.99×10^{10} 。随着萃取时间的继续延长,萃取 50 min 后待测物的总峰面积略微减少,峰个数无明显变化,可认为萃取已趋于暂时平稳。其原因可能是因为在萃取过程中,平衡时间增加,萃取头吸附的挥发性组分逐渐达到饱和。因此,选择最佳萃取时间为 40 min。同时,选择萃取时间为 30、40、50 min 进行响应面优化试验。

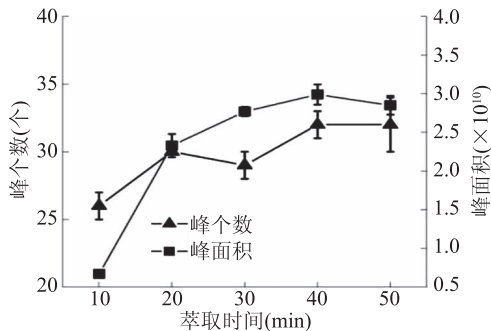


图 2 不同萃取时间对猪肉挥发性风味物质萃取效果的影响

Fig.2 Effect of different extraction time on extraction effect of volatile flavor compounds in pork

2.1.3 萃取温度对猪肉挥发性物质萃取效果的影响 不同萃取温度对猪肉挥发性风味物质萃取效果的影响如图 3 所示。在 40 ℃ 时温度较低,不利于萃取头对待测组分的吸附,此次峰个数与总峰面积均

较低。随着萃取温度的升高(40~70 ℃),待测组分的运动速度加快,挥发性物质检测出来的峰个数和总峰面积均基本呈递增的趋势。其中峰个数在70 ℃时达到最大,此时共检测出 34 种挥发性物质成分,此时总峰面积为 2.98×10^{10} 。而 80 ℃时的峰个数为 30 个,总峰面积为 2.93×10^{10} ,总峰面积无明显变化,峰个数相对 70 ℃有所减少,这可能是因为温度升高到一定程度,萃取头已经达到饱和状态。另外也有文献证实,温度升高会降低萃取头的吸附能力,这与邹英子等^[20]的研究结果一致。因此,选择最佳萃取温度为 70 ℃。同时,选择萃取温度为 60、70、80 ℃进行响应面优化试验。

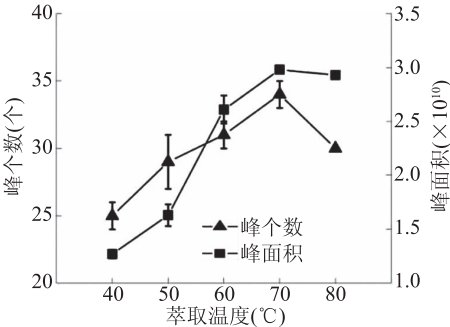


图3 不同萃取温度对猪肉挥发性风味物质萃取效果的影响
Fig.3 Effect of different extraction temperature on extraction effect of volatile flavor compounds in pork

2.1.4 解吸时间对猪肉挥发性物质萃取效果的影响
不同解吸时间对猪肉挥发性风味物质萃取效果的影响如图 4 所示。随着解吸时间的延长,检测出的峰个数基本趋于平稳。解吸时间为 1~3 min,峰个数与总峰面积逐渐增大,峰个数分别为 32 个和 33 个,峰面积分别为 2.09×10^{10} 和 2.91×10^{10} 。而解吸时间为 5 和 7 min 检测出的峰个数和总峰面积相对 3 min 略微减少,但减少得不明显,可认为趋于暂时稳定。而 9 min 属于较长的解吸时间,检测出的峰个数和峰面积相对前面时间有所下降,这可能是因为高温下解吸时间过长使一些挥发性风味物质发生了氧化、异构化等反应^[27]。因此,选择最佳解吸时间为 3 min。同时,选择样品解吸时间为 1、3、5 min 进行响应面优化试验。

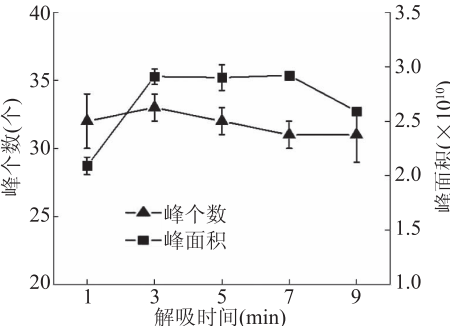


图4 不同解吸时间对猪肉挥发性风味物质萃取效果的影响
Fig.4 Effect of different desorption time on extraction effect of volatile flavor compounds in pork

2.2 响应面试验设计及结果验证

2.2.1 响应面试验优化 根据表 1 中响应面的优化设计进行试验,试验结果如表 2 所示。

表 2 响应面试验设计和结果

Table 2 Design and results of response surface methodology							
序号	A	B	C	D	M 峰个数 (个)	N 总峰面积Y ($\times 10^{10}$)	综合评分 (分)
1	-1	-1	0	0	33	2.52	82.95
2	1	-1	0	0	24	0.70	43.08
3	-1	1	0	0	31	2.47	79.52
4	1	1	0	0	27	1.45	58.50
5	0	0	-1	-1	29	2.13	71.55
6	0	0	1	-1	32	2.76	85.26
7	0	0	-1	1	30	1.94	70.06
8	0	0	1	1	35	2.55	86.14
9	-1	0	0	-1	33	2.17	77.60
10	1	0	0	-1	26	0.41	41.35
11	-1	0	0	1	36	2.30	83.66
12	1	0	0	1	30	0.99	55.53
13	0	-1	-1	0	26	2.03	65.93
14	0	1	-1	0	28	2.75	79.64
15	0	-1	1	0	28	2.57	76.88
16	0	1	1	0	29	2.56	78.06
17	-1	0	-1	0	30	2.26	74.92
18	1	0	-1	0	25	1.11	50.59
19	-1	0	1	0	33	2.93	89.10
20	1	0	1	0	29	0.80	51.36
21	0	-1	0	-1	29	2.41	75.84
22	0	1	0	-1	29	2.29	74.01
23	0	-1	0	1	31	1.73	68.20
24	0	1	0	1	33	2.24	78.68
25	0	0	0	0	34	3.02	91.80
26	0	0	0	0	35	3.04	93.58
27	0	0	0	0	37	3.22	99.02
28	0	0	0	0	35	2.99	92.85
29	0	0	0	0	37	3.29	100.00

利用 Design Expert 10.0 软件对实验数据进行多元回归分析,得到综合评分对盐度(A)、萃取时间(B)、萃取温度(C)、解吸时间(D)的二次多项回归模型: $Y = 95.45 - 15.61A + 2.96B + 4.51C + 1.39D + 4.71AB - 3.35AC + 2.03AD - 3.13BC + 3.08BD + 0.59CD - 19.97A^2 - 10.83B^2 - 8.56C^2 - 10.01D^2$ 。

由表 3 可知,模型 P 值 < 0.0001 ,说明回归模型极显著($P < 0.01$),而失拟项不显著($P = 0.4765$),表明回归方程拟合度良好;决定系数 $R^2 = 0.9676$,表明回归方程效果好,可以用此模型来对猪肉挥发性风味物质进行分析和预测。从表 3 中可以看出,A、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对结果的影响极显著($P < 0.01$),B 和 AB 对结果的影响显著($P < 0.05$)。从表 3 中的 F 值大小可知,对综合评分(Y)影响的程度的大小依次为盐度(A) > 萃取温度(C) > 萃取时间(B) > 解吸时间(D),两两交互作用的响应面及等高线如图 5 所示。

表 3 响应面试验回归方程方差分析
Table 3 Variance analysis of regression equation of response surface experiment

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	6689.15	14	477.80	29.84	<0.0001	**
A	2924.69	1	2924.69	182.67	<0.0001	**
B	105.20	1	105.20	6.57	0.0225	*
C	243.99	1	243.99	15.24	0.0016	**
D	23.13	1	23.13	1.44	0.2493	
AB	88.83	1	88.83	5.55	0.0336	*
AC	44.96	1	44.96	2.81	0.1160	
AD	16.48	1	16.48	1.03	0.3275	
BC	39.25	1	39.25	2.45	0.1397	
BD	37.88	1	37.88	2.37	0.1463	
CD	1.40	1	1.40	0.088	0.7715	
A ²	2587.36	1	2587.36	161.60	<0.0001	**
B ²	760.91	1	760.91	47.52	<0.0001	**
C ²	474.83	1	474.83	29.66	<0.0001	**
D ²	649.57	1	649.57	40.57	<0.0001	**
残差	224.15	14	16.01			
失拟项	167.13	10	16.71	1.17	0.4765	
纯误差	57.03	4	14.26			
总和	6913.30	28				

$R^2=0.9676$

$R^2_{adj}=0.9352$

CV=5.33%

注：“**”表示差异极显著(P<0.01)；“*”表示差异显著(P<0.05)。

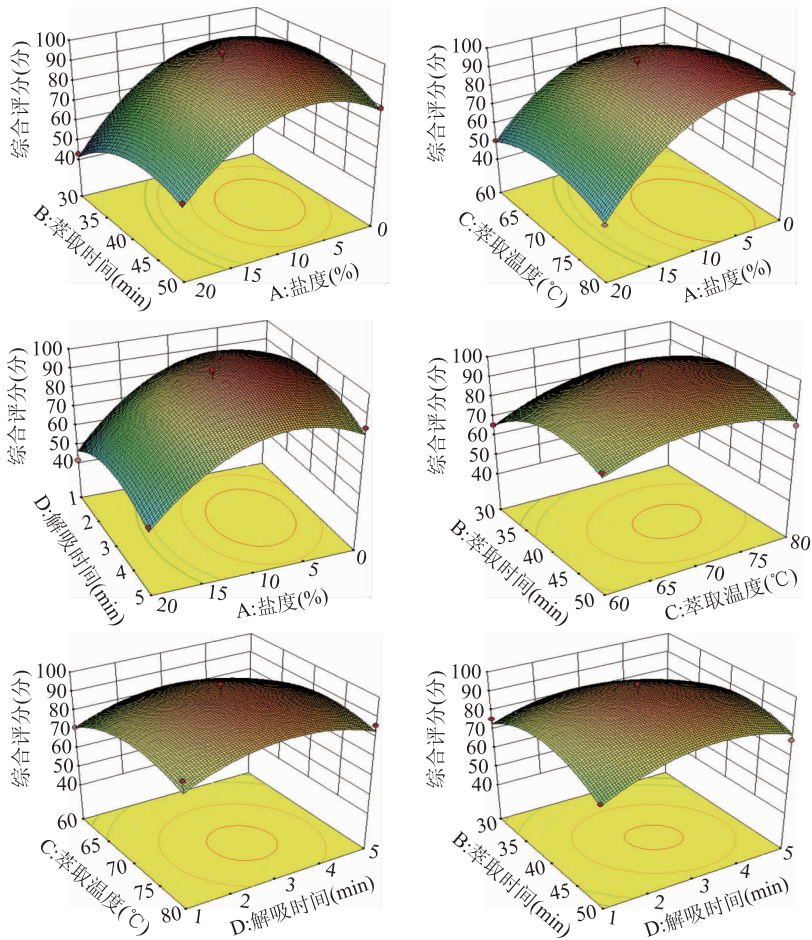


图 5 盐度、萃取时间、萃取温度、解析时间两两交互作用对萃取效果的影响
Fig.5 Effect of extraction conditions on extraction effect of volatile flavor compounds

对回归模型进行预测得到顶空固相微萃取法分析猪肉挥发性物质的最佳条件为盐度 5.90%、萃取时间 40.05 min、萃取温度 72.82 ℃、解析时间 3.21 min,预测猪肉挥发性物质峰个数为 36.58 个,峰面积为 3.26×10^{10} ,综合评分为 99.44 分。

2.2.2 模型验证 在响应面试验基础上根据实际条件,选择盐度为 6%、萃取时间 40 min、萃取温度 73 ℃、解吸时间 3 min 进行模型验证。此条件下,最终测得猪肉挥发性风味物质共 38 种,总峰面积为 3.18×10^{10} ,综合得分为 99.71 分,与预测值的相对误

差为 0.27%,说明建立的数学模型具有良好的预测性和准确性。

2.3 猪肉的挥发性风味物质分析

萃取条件优化后的 HS-SPME-GC-MS 技术分析猪肉挥发性成分,经 80% 以上相似度筛选,共获得 38 种挥发性风味物质,其结果如表 4 所示。

2.3.1 醛酮类化合物 醛酮类化合物主要来源于脂肪的氧化^[34]和美拉德反应^[35]。该试验中,猪肉中醛类化合物共检测出 12 种,其中己醛的含量最高,达 597.23 ng/g,呈青草香味,是猪肉中重要的风味贡献

表 4 猪肉中挥发性成分及含量
Table 4 Volatile components and contents in pork

序号	保留时间 (min)	化合物名称	分子式	相似匹配度 (%)	气味描述	绝对含量 (ng/g)
醛类(12)						
1	4.849	戊醛 Pentanal	C ₅ H ₁₀ O	83.48	生草味,辛辣刺激味 ^[20]	14.46
2	7.329	己醛 Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	89.44	青草香味 ^[28-29]	597.23
3	10.736	庚醛 Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	89.38	油脂香,果香 ^[18,29]	157.26
4	12.041	(E,E)-2,4-壬二烯醛(E,E)-2,4-Nonadienal	C ₉ H ₁₄ O	85.26	油脂香,鸡汤香气 ^[20]	4.17
5	14.219	辛醛 Octanal	C ₈ H ₁₆ O	95.87	脂肪香味,果香 ^[28]	99.03
6	14.938	十二醛(月桂醛)Dodecanal	C ₁₂ H ₂₄ O	82.38	百合味,脂肪味,蜡香 ^[30]	0.07
7	11.822	(E)-2-己烯醛(E)-2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	85.69	浓郁水果香,绿叶清香 ^[20]	3.96
8	17.665	壬醛 Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	95.87	青味,油脂味 ^[31]	61.08
9	18.307	5-乙基环戊烯-1-甲醛 5-Ethylcyclopent-1-enecarboxaldehyde	C ₈ H ₁₂ O	92.46		8.68
10	18.779	(E)-2-辛烯醛(E)-2-Octenal	C ₈ H ₁₄ O	84.19	油脂香和肉类香气 ^[20]	5.69
11	20.995	癸醛 Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	86.97	甜香,柑橘香 ^[20]	1.79
12	21.790	苯甲醛 Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	96.09	杏仁香、坚果香、水果香 ^[32]	78.48
醇类(8)						
13	4.328	(E)-3-辛烯-2-醇(E)-3-Octen-2-ol	C ₈ H ₁₆ O	87.60		78.66
14	4.739	(Z)-2-辛烯-1-醇(Z)-2-Octen-1-ol	C ₈ H ₁₆ O	83.58		18.77
15	9.145	4-(1-甲基乙基)-环己醇 Cyclohexanol,4-(1-methylethyl)-	C ₉ H ₁₈ O	84.09		18.20
16	11.300	1-辛炔-3-醇 1-Octyn-3-ol	C ₈ H ₁₄ O	81.03		2.13
17	12.936	1-戊醇 1-Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	81.38	面包香,酒香,果香 ^[20]	6.15
18	17.774	1α,4αβ,8αα-十氢-1-萘酚 1.alpha.,4.alpha.beta.,8.alpha.-Decahydro-1-naphthalenol	C ₁₀ H ₁₈ O	88.35		13.52
19	19.535	1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	87.26	熟蘑菇味,青草味 ^[31]	3.58
20	20.841	4-乙基环己醇 4-Ethylcyclohexanol	C ₈ H ₁₆ O	80.39		1.10
烃类(4)						
21	3.691	3-乙基-环己烯 Cyclohexene,3-ethyl-	C ₈ H ₁₄	84.09		0.72
22	12.908	2-(1,1-二甲基乙基)-3-甲基-环氧乙烷 Oxirane,2-(1,1-dimethylethyl)-3-methyl-	C ₇ H ₁₄ O	84.42		34.88
23	14.631	3-亚甲基-十一烷 Undecane,3-methylene-	C ₁₂ H ₂₄	80.89		6.56
24	16.348	2-甲基-4-壬烯-4-Nonene,2-methyl-	C ₁₀ H ₂₀	83.70		16.64
酮类(2)						
25	14.008	3-羟基-2-丁酮 Acetoin	C ₄ H ₈ O ₂	87.26	奶香味,黄油味 ^[23,29]	2.08
26	26.986	二氢-5-戊基-2(3H)-呋喃酮 2(3H)-Furanone,dihydro-5-pentyl-	C ₉ H ₁₆ O ₂	81.77		0.75
酯类(5)						
27	6.187	3-氯丙酸-2-乙基环己酯 3-Chloropropanoic acid,2-ethylcyclohexyl ester	C ₁₁ H ₁₉ ClO ₂	80.34		17.93
28	15.525	n-己酸乙烯基酯 n-Caproic acid vinyl ester	C ₈ H ₁₄ O ₂	85.66		15.83
29	19.656	甲酸庚酯 Formic acid,heptyl ester	C ₈ H ₁₆ O ₂	90.72	类似梨、苹果果香,花香,略带脂香 ^[18]	23.31
30	22.828	甲酸辛酯 Formic acid,octyl ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	94.03		17.05
31	35.188	豚基甲酸酯 Allophanic acid,phenyl ester	C ₈ H ₈ N ₂ O ₃	80.92		1.46
酸类(1)						
32	31.227	己酸 Hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	83.24	奶酪、水果香 ^[33]	8.70
含硫及其它杂环化合物(6)						
33	9.276	2-n-丁基呋喃 2-n-Butyl furan	C ₈ H ₁₂ O	87.40		1.81
34	12.343	2-戊基呋喃 Furan,2-pentyl-	C ₉ H ₁₄ O	94.13	豆香,蔬菜芳香,肉香味 ^[28,33]	254.20
35	16.946	(Z)-2-(1-戊烯)呋喃 Furan,2-(1-pentenyl)-,(Z)-	C ₉ H ₁₂ O	84.86		3.21
36	17.165	二甲基三硫 Dimethyl trisulfide	C ₂ H ₆ S ₃	90.68	浓烈辛香香气,类似新鲜洋葱气味,肉香味	5.28
37	24.594	二氢异苯并呋喃 Phthalan	C ₈ H ₈ O	86.85		2.31
38	25.515	2-乙酰基噻唑 2-Acetylthiazole	C ₅ H ₅ NOS	88.74		1.79

物质^[5,28,31]。其次是庚醛、辛醛、苯甲醛和壬醛,含量分别为 157.26、99.03、78.48、61.08 ng/g,它们基本都呈油脂香和果香,是猪肉重要的呈味物质。试验中检测出的酮类化合物个数和含量都远低于醛类化合物,蔡原^[19]、蒋强^[36]等指出酮类化合物对猪肉风味物质的贡献要小于醛类物质,在猪肉整体香气中酮类化合物能起到微妙的作用。

2.3.2 醇类化合物和酸类化合物 试验中检测出醇类化合物有 8 种,其中(E)-3-辛烯-2-醇含量最高,达 78.66 ng/g。其次是(Z)-2-辛烯-1-醇、4-(1-甲基乙基)-环己醇,含量分别为 18.77、18.20 ng/g。而被认为对猪肉风味有较大贡献作用的 1-戊醇、1-辛烯-3-醇^[20,31],在本试验中检测到的含量却较低,仅有 6.15、3.58 ng/g,猜想可能是因为醇类化合物与其它醛类化合物和脂肪酸等发生了反应,又或者是样品萃取条件不同所致。另外,通常认为酸类物质对肉品的风味影响不大^[37],本试验中仅检测出己酸一种酸类化合物,且含量也不高,仅 8.70 ng/g。但酸类是生成其他挥发性风味物质的重要中间体,认为其对猪肉的风味的直接贡献作用较小^[38]。

2.3.3 烃类和酯类化合物 烃类物质主要来自脂肪酸烷氧自由基的均裂,基本无香气^[39]。本试验中,检测出烃类化合物有 4 种,其中 2-(1,1-二甲基乙基)-3-甲基-环氧乙烷的含量最高,达 34.88 ng/g,其次是 2-甲基-4-壬烯,含量有 16.64 ng/g。剩余两种物质含量均较低。本试验中检测出的杂环化合物种类和含量均高于烃类化合物。王霞等^[40]指出烃类化合物对猪肉风味的直接贡献作用较小,它是形成对肉的风味有贡献的杂环化合物的重要中间体。酯类化合物主要来源于酸和醇之间发生的酯化反应^[41]。本试验中检测出的酯类化合物有 5 种,有甲酸庚酯、甲酸辛酯、3-氯丙酸-2-乙基环己酯、n-己酸乙烯基酯和脲基甲酸酯,酯类化合物的总含量为 75.58 ng/g。酯类化合物多为食品提供水果香、花香和蜂蜜香的气味^[42],对丰富猪肉的风味有一定的作用。

2.3.4 含硫及其它杂环类化合物 含硫化合物是含硫氨基酸热降解产生的,试验中检测到的含硫化合物有二甲基三硫和 2-乙酰基噻唑,含量分别为 5.28 和 1.79 ng/g。其中的二甲基三硫呈肉香和类似新鲜洋葱气味,虽然含量较低,但对猪肉的风味有一定贡献。杂环类化合物通常被认为是肉类中特征香味的重要来源之一^[35]。试验中检测到的杂环化合物中属 2-戊基呋喃含量最高,为 254.20 ng/g,它是由亚油酸直接氧化产生的,具有豆香和蔬菜芳香^[43],对猪肉风味有重要贡献,这与周慧敏等^[28]人研究食盐用量对风干猪肉挥发性风味物质的影响结论相似。其它呋喃类化合物含量虽较低,但对猪肉风味也有一定的贡献。

综上所述,通过顶空固相微萃取和气质联用(HS-SPME-GC-MS)技术并结合响应面优化,检测出特定熟制条件下猪肉的挥发性风味物质主要包括醛类、醇类、烃类、酮类、酯类、酸类和含硫及其它杂环化合物。其中检测出来的醛类化合物最多,有 12 种,且含量也最高,达到了 1031.90 ng/g;其次是含硫及其它杂环化合物,有 6 种,总含量为 268.60 ng/g,

其中 2-戊基呋喃的含量最高,含量为 254.20 ng/g;醇类化合物、酯类化合物和烃类化合物分别有 8、5 和 4 种,含量分别为 142.11、75.58 和 58.80 ng/g;检测出的酮类化合物和酸类化合物较少,含量分别也仅有 7.92 和 8.70 ng/g。因此,认为醛类、醇类和含硫及其它杂环化合物中的呋喃类为猪肉熟化的主要挥发性风味物质。

3 结论

本研究在单因素实验基础上,通过顶空固相微萃取-气质联用(HS-SPME-GC-MS)技术结合响应面优化探讨了经过加热处理后猪肉的挥发性风味物质的最佳萃取条件。采用 75 μm CAR/PDMS 萃取头,最佳萃取条件为盐度 6%,萃取温度为 73 $^{\circ}\text{C}$ 、萃取时间为 40 min、解吸时间为 3 min。此条件下,检测出猪肉挥发性风味物质共 38 种,总峰面积为 3.18×10^{10} ,综合得分为 99.71 分。其中醛类化合物和含硫及其它杂环化合物中的呋喃类化合物的含量较高,其次为醇类、酯类和烃类化合物,酮类和酸类化合物的含量较少。验证试验结果与预测值综合评分的相对误差为 0.27%,说明该模型可行,利用响应面法优化得到的 HS-SPME-GC-MS 技术萃取猪肉挥发性风味物质的方法可靠性高、具有应用价值。

参考文献

- [1] 农秋雲,刘嘉琪,单体中.猪肉中脂肪酸组成的品种差异及脂肪酸沉积的调控机制[J].动物营养学报,2019,31(6):2507-2514.
- [2] 黄业传,李婷婷,龚道楷,等.高压结合热处理对猪肉风味的影响[J].食品科学,2018,39(2):227-232.
- [3] 周慧敏,张顺亮,赵冰,等.吹扫/捕集-热脱附-气质联用比较分析长白山山黑猪和瘦肉型猪肉的挥发性风味物质[J].肉类研究,2017,31(3):45-50.
- [4] Sun Y W, Fu M J, Li Z C, et al. Evaluation of freshness in determination of volatile organic compounds released from pork by HS-SPME-GC-MS[J]. Food Analytical Methods, 2018, 11(5): 1321-1329.
- [5] 刘诗瑶,徐宏,邓杰,等.基于巴克夏和杜洛克猪选育猪肉风味物质的 HS/SPME-GC/MS 对比分析[J].肉类研究,2018,32(1):52-57.
- [6] Yang Y, Ye Y F, Wang Y, et al. Effect of high pressure treatment on metabolite profile of marinated meat in soy sauce[J]. Food Chemistry, 2018, 240:662-669.
- [7] Li J W, Wang Y L, Yan S, et al. Molecularly imprinted calixarene fiber for solid-phase microextraction of four organophosphorous pesticides in fruits[J]. Food Chemistry, 2016, 192:260-267.
- [8] Riu-Aumatell M, Vargas L, Vichi S, et al. Characterisation of volatile composition of white salsify (*Tragopogon porrifolius* L.) by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and simultaneous distillation-extraction (SDE) coupled to GC-MS[J]. Food Chemistry, 2011, 129(2):557-564.
- [9] 薛宏坤,刘成海,刘钊,等.响应面法和遗传算法-神经网络模型优化微波萃取蓝莓中花青素工艺[J].食品科学,2018,39(16):280-288.

- [10] Nguyen H N, Gaspollo P A D, Maridable J B, et al. Extraction of oil from *Moringa oleifera* kernels using supercritical carbon dioxide with ethanol for pretreatment: Optimization of the extraction process [J]. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2011, 50(11/12): 1207-1213.
- [11] 李耀光, 侯鹏娟, 李皓, 等. 基于顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法分析黄茶香气成分[J]. 食品科技, 2016, 41(4): 293-297.
- [12] Bhattacharjee P, Panigrahi S, Lin D Q, et al. A comparative qualitative study of the profile of volatile organic compounds associated with *Salmonella* contamination of packaged aged and fresh beef by HS-SPME/GC-MS[J]. Journal of Food Science and Technology, 2011, 48(1): 1-13.
- [13] 钟秀华, 周丽辉, 余胜兵, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱/质谱法测定饮水中 2-甲基异莰醇和土臭素[J]. 环境卫生学杂志, 2015, 5(3): 279-282.
- [14] Moreira N, Lopes P, Cabral M, et al. HS-SPME/GC-MS methodologies for the analysis of volatile compounds in cork material[J]. European Food Research and Technology, 2016, 242(4): 457-466.
- [15] Wang X, Rogers K M, Li Y, et al. Untargeted and targeted discrimination of honey collected by *Apis cerana* and *Apis mellifera* based on volatiles using HS-GC-IMS and HS-SPME-GC-MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(43): 12144-12152.
- [16] Li Cao, Jinjing Lu, Xin Ye. HS-SPME-GC-MS analysis on volatile components in different cultivars and different parts of *Artemisia argyi* [J]. Medicinal Plant, 2017, 8(4): 1-5, 9.
- [17] 张芳, 朱志胜, 王鹏, 等. 基于 BP 神经网络和遗传算法的库尔勒香梨挥发性物质萃取条件的优化[J]. 中国农业科学, 2018, 51(23): 4535-4547.
- [18] 潘见, 杨俊杰, 邹英子. 不同涂层 SPME 与 GC-MS 联用比较分析两种猪肉挥发性风味成分[J]. 食品科学, 2012, 33(12): 169-172.
- [19] 蔡原, 赵有璋, 蒋玉梅, 等. 顶空固相微萃取-气-质联用检测合作猪肉挥发性风味成分[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2006, 42(4): 74-78, 91.
- [20] 邹英子. 传统良种猪肉与瘦肉型猪肉挥发性风味成分的差异分析[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012.
- [21] Li A, Ha Y M, Wang F, et al. Detection of hydrocarbons in irradiated chilled beef by HS-SPME-GC-MS and optimization of the method[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2010, 87(7): 731-736.
- [22] 张鹏云, 李蓉, 陈丽斯, 等. 顶空固相微萃取-气质联用法结合自动解卷积技术分析葛根中的挥发性成分[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 220-225.
- [23] 李娟, 韩东, 米思, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 法优化酱牛肉中挥发性风味物质萃取条件[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 266-273.
- [24] 顾赛麒, 王锡昌, 陶宁萍, 等. 顶空固相微萃取-气质联用及电子鼻技术检测中华绒螯蟹不同可食部位中的香气成分[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 239-244.
- [25] 艾对, 张富新, 于玲玲, 等. 羊奶中挥发性成分顶空固相微萃取条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(1): 40-46.
- [26] Pérez-González M, Gallardo-Chacón J J, D V. Optimization of a headspace SPME GC-MS methodology for the analysis of processed almond beverage[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(3): 612-623.
- [27] 刘晓慧, 张丽霞, 王日为, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法分析黄茶香气成分[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 239-243.
- [28] 周慧敏, 张顺亮, 成晓瑜, 等. 食盐用量对风干猪肉挥发性风味物质的影响[J]. 肉类研究, 2017, 31(4): 23-28.
- [29] 杨凯, 李迎楠, 李享, 等. 基于计算机视觉技术分析猪肉对清酱肉挥发性风味成分的影响[J]. 肉类研究, 2018, 32(4): 39-43.
- [30] 刘琳琳, 秦小明, 刘亚, 等. 香港牡蛎挥发性成分及其加热处理变化[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(5): 41-49.
- [31] 鲍伟, 刘雅婷, 王小凤, 等. 基于电子鼻、电子舌和 GC-MS 分析饲料中添加金枪鱼蒸煮液对巴马香猪猪肉气味和滋味的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 229-234.
- [32] 薛雁, 周芳伊, 黄峰, 等. 毛氏红烧肉特征风味成分分析[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(11): 153-158.
- [33] 黄忠白, 明庭红, 董丽莎, 等. 金枪鱼鱼白的植物乳杆菌发酵脱腥增香作用研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 147-154.
- [34] MacLeod G, Seyyedain-Ardebili M. Natural and simulated meat flavors (with particular reference to beef) [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1981, 14(4): 309-437.
- [35] Mottram D S. Flavour formation in meat and meat products: A review[J]. Food Chemistry, 1998, 62(4): 415-424.
- [36] 蒋强, 郑丽敏, 田立军, 等. 电子鼻应用于猪肉丸子香味预测[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 228-233.
- [37] 王惠惠, 马纪兵, 刘小波, 等. 甘肃牧区传统风干牦牛肉加工过程中挥发性风味物质变化分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(4): 200-205.
- [38] 刘勇. 牦牛肉用品质、脂肪酸及挥发性风味物质研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [39] 王勇勤, 郭新, 黄笠原, 等. 基于电子鼻和气相色谱-质谱联用技术分析不同贮藏时间羊肉火腿香气成分[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 215-221.
- [40] 王霞, 黄健, 侯云丹, 等. 电子鼻结合气相色谱-质谱联用技术分析黄鳍金枪鱼肉的挥发性成分[J]. 食品科学, 2012, 33(12): 268-272.
- [41] Jin G F, Zhang J H, Yu X, et al. Lipolysis and lipid oxidation in bacon during curing and drying-ripening[J]. Food Chemistry, 2010, 123(2): 465-471.
- [42] Khairy H L, Saadoon A F, Zzaman W, et al. Identification of flavor compounds in rambutan seed fat and its mixture with cocoa butter determined by SPME-GCMS[J]. Journal of King Saud University-Science, 2018, 30(3): 316-323.
- [43] Ventanas S, Mustonen S, Puolanne E, et al. Odour and flavour perception in flavoured model systems: Influence of sodium chloride, umami compounds and serving temperature [J]. Food Quality and Preference, 2010, 21(5): 453-462.