

气相色谱-质谱技术分析香稻特征化合物 2-乙酰基吡咯啉

应兴华^{1*}, 徐霞¹, 陈铭学¹, 欧阳由男^{2*}, 朱智伟¹, 闵捷¹

(1. 中国水稻研究所农业部稻米及制品质量监督检验测试中心, 浙江 杭州 310006;

2. 中国水稻研究所稻作技术研究与发展中心, 浙江 杭州 310006)

摘要:建立了气相色谱-质谱技术(GC-MS)分析香稻特征化合物 2-乙酰基吡咯啉的方法。在香稻中加入内标物 2, 4, 6-三甲基吡啶, 密闭, 经无水乙醇-二氯甲烷(体积比为 1:1)在 80 °C 水浴中提取 3 h。考察了温度和时间对 2-乙酰基吡咯啉提取的影响。提取液经毛细管气相色谱柱 HP-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)分离, 全扫描监测模式 GC-MS 测定。以内标物计, 方法的平均回收率为 82.57%, 相对标准偏差为 5.09%, 最低检出限为 0.01 mg/kg。将该方法应用于 11 份香稻育种材料中 2-乙酰基吡咯啉的测定, 结果表明, 清香米、泰香 R207、Texmati、桂香丝糯和中健 2 号等 5 个品种中含有 2-乙酰基吡咯啉, 含量分别为 0.097、0.098、0.699、0.045 和 0.047 mg/kg。该方法样品处理简单、快速、灵敏、样本和试剂消耗少, 尤其适合于通过测定 2-乙酰基吡咯啉含量进行香稻育种前的大批量品种筛选。

关键词:气相色谱-质谱法; 2-乙酰基吡咯啉; 香稻

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2010)08-0782-04

Determination of 2-acetyl-1-pyrroline in aroma rice using gas chromatography-mass spectrometry

YING Xinghua^{1*}, XU Xia¹, CHEN Mingxue¹, OUYANG Younan^{2*}, ZHU Zhiwei¹, MIN Jie¹

(1. Rice Product Quality Supervision and Inspection Center, Ministry of Agriculture, China National

Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; 2. Center for Rice Technology Research and

Development, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: A gas chromatography-mass spectrometry method was developed for the determination of 2-acetyl-1-pyrroline in aroma rice. 2, 4, 6-Trimethylpyridine (TMP) was added into the sample of aroma rice as internal standard, and the compound was extracted by the mixture of anhydrous ethyl alcohol and methylene chloride (1:1, v/v) at 80 °C for 3 h under sealed condition in water bath. The effects of the temperature and time on the extraction were investigated. The analyte was separated and determined using gas chromatography-mass spectrometry on an HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) in scan monitoring mode. Calculated as 2, 4, 6-trimethylpyridine, the average recovery of the method was 82.57% with the relative standard deviation of 5.09%, and the detection limit of method was 0.01 mg/kg. The method was employed for the determination of 2-acetyl-1-pyrroline in 11 aroma rice breeding varieties. The results showed that 2-acetyl-1-pyrroline was detected in 5 aroma rice varieties, including Qingxiangmi, Taixiang R207, Texmati, Guixiangsinuo and Zhongjian 2, with the contents of 0.097, 0.098, 0.699, 0.045 and 0.047 mg/kg, respectively. The method is simple, rapid and sensitive with low sample and reagent consumption. It is suitable for screening a lot of aroma rice varieties in breeding through the determination of 2-acetyl-1-pyrroline content.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); 2-acetyl-1-pyrroline; aroma rice

* 通讯联系人: 应兴华, 助理研究员, 研究方向为农产品质量安全及有机化合物解析。E-mail: yingxhpinnming@sohu.com.

欧阳由男, 副研究员, 研究方向为稻种资源创新。E-mail: younan.oy@gmail.com.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30700486)和浙江省分析测试科技计划项目(No. 2008F70016)。

收稿日期: 2010-04-02

香稻因其香味浓郁、营养价值丰富和售价高等特点,在国际稻米贸易中占有重要的地位^[1,2]。2-乙酰吡咯啉(2-acetyl-1-pyrroline, 2-AP)是一种具有浓烈爆米花香味的物质,易溶于热水、乙醇和乙醚,也是香稻香味的特征化合物和主要香气贡献物^[3,4]。因此 2-AP 含量的高低不但成为衡量香稻品质的重要指标,更成为香稻育种家们竞相追求的目标。

目前,咀嚼法^[5]、显色法^[6]和氢氧化钾浸泡法^[7]等传统感官鉴评方法被广泛应用于香稻育种材料的香味鉴定。应用这些方法存在人员感官差异较大,鉴定结果准确性和可靠性难以保证以及缺乏定量分析结果等缺陷。仪器分析方法具有灵敏度高、结果准确等优点,能有效弥补上述方法的缺陷。但目前应用于稻米香气收集的技术,如超临界流体萃取^[8]、顶空气体捕集^[9]、固相微萃取^[10]、同时蒸馏萃取^[11,12]和柱吸附^[13]等技术,存在设备投资高、样品及试剂消耗量大、操作步骤复杂和收集浓缩耗时等缺点,难以满足育种工作中大批量试验材料的鉴定工作。

针对以上问题,本文研究建立了气相色谱-质谱技术(GC-MS)分析香稻中特征化合物 2-AP 的方法。本方法具有设备简单、易操作、样品与试剂消耗量少、提取效率高和结果准确可靠等特点,尤其适合于通过测定 2-AP 含量进行香稻育种前的大批量品种筛选。该方法对提高香稻选育时香味鉴评结果的准确性和可靠性,为香稻香味鉴评结果由“语言描述型”向“数值定量型”转变提供了技术基础,对深入挖掘香稻的香味资源具有重要的意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent GC 7890-7000A 气相色谱-三重四极杆串联质谱仪(美国安捷伦公司);DK-S24 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)。

内标物:2,4,6-三甲基吡啶(2,4,6-trimethylpyridine, TMP 纯度 >99%,北京百灵威化学技术公司);无水乙醇和二氯甲烷均为色谱纯(美国天地试剂公司)。

提取试剂的配制:吸取 10 mg/L TMP 溶液 5 mL,以无水乙醇-二氯甲烷(体积比为 1:1)混合溶液定容至 100 mL,得到 TMP 质量浓度为 0.5 mg/L 的提取试剂。

1.2 样品预处理

称取 1 g 香稻精米粉于 5 mL 钳口瓶,加入 1

mL 提取试剂,钳紧密封,置于 80 °C 水浴中提取 3 h;取出冷却至室温后,将上清液转移至带 200 μL 内插管的进样瓶,静置 0.5 h 待测。

1.3 色谱-质谱条件

色谱条件:色谱柱为 HP-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm,美国 J&W 公司),柱温升温程序为 50 °C 保持 2 min,然后以 10 °C/min 升至 280 °C,保持 3 min;进样口压力为 34.5 kPa,进样口温度为 170 °C;载气为高纯(纯度 >99.999%)氦气;恒压不分流进样,进样量为 1 μL。

质谱条件:电子轰击(EI)离子源,离子源温度为 230 °C;离子化能量为 70 eV;连接线温度为 280 °C;四极杆温度为 150 °C;全扫描方式,扫描范围为 m/z 35 ~ 500。

1.4 定性分析和定量分析方法

2-AP 及 TMP 的定性分析采用 NIST 库检索。2-AP 标准物质极易分解,不易保存,且制备过程复杂^[14],因此 2-AP 的定量分析采用内标法。

2 结果与讨论

2.1 提取温度对 2-AP 提取量的影响

设定提取时间为 3 h,选择在 50、60、70、80 和 90 °C 等不同温度下提取,考察提取温度对 Texmati 香稻中 2-AP 提取量的影响。结果表明,上述提取温度下测得样品中 2-AP 的含量分别为 0.223、0.364、0.597、0.695 和 0.711 mg/kg。可见,随着提取温度的升高,2-AP 的提取量也随之增加;当提取温度为 80 °C 以上时,2-AP 的提取量趋于稳定。因此本实验水浴提取温度选定为 80 °C。

2.2 提取时间对 2-AP 提取量的影响

设定水浴提取温度为 80 °C,选择 0.5、1、2、3 和 4 h 等不同的提取时间,考察提取时间对 Texmati 香稻中 2-AP 提取量的影响。结果表明,在上述提取时间下 2-AP 的含量分别为 0.189、0.378、0.500、0.695 和 0.709 mg/kg。可见,随着提取时间的延长,2-AP 的提取量也随之增加;当提取时间为 3 h 以上时,2-AP 的提取量趋于稳定。因此本实验提取时间选定为 3 h。

2.3 色谱分离及定性分析

在选定的预处理条件及色谱-质谱条件下,对香稻 Texmati 进行测定。图 1 为香稻 Texmati 的 GC-MS 总离子流色谱图,其中,峰 1 为 2-AP,峰 2 为 TMP。由图 1 可见,2-AP 和 TMP 能获得有效的分离,保留时间分别为 6.288 min 和 7.551 min。图 2a 为 2-AP 的质谱图,分子离子峰为 m/z 111,特征

碎片离子峰为 m/z 68 和 83,经 NIST 库检索,与 2-AP 标准质谱图匹配。图 2b 为 TMP 的质谱图,分子离子峰为 m/z 121,特征碎片离子峰为 m/z 79 和 106,经 NIST 库检索,与 TMP 的标准质谱图匹配。

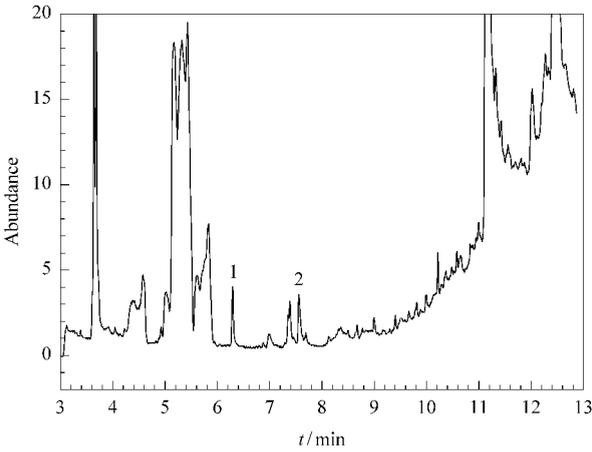


图 1 香稻 Texmati 的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of Texmati aroma rice

Peaks : 1. 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP); 2. 2,4,6-trimethylpyridine (TMP).

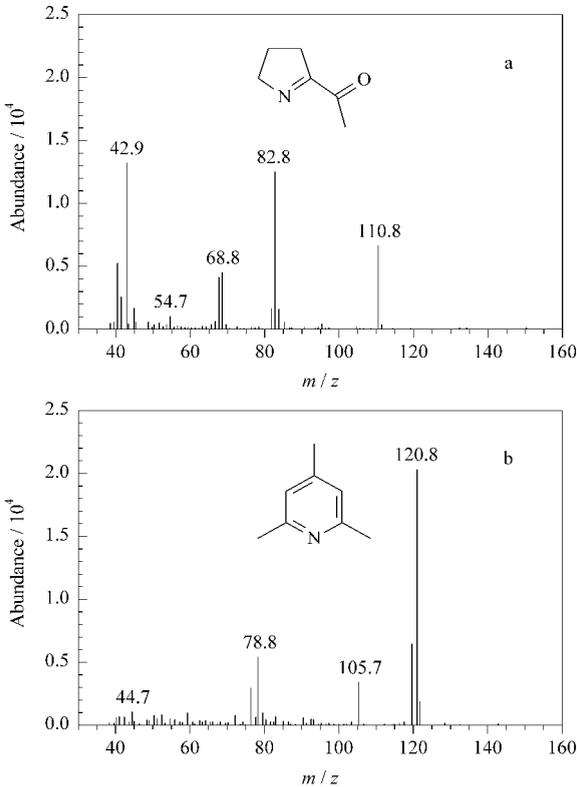


图 2 (a) 2-AP 和 (b) TMP 的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of (a) 2-AP and (b) TMP

2.4 方法的精密度、回收率和灵敏度

平行配制 5 份供试样品,在上述选定条件下测定香稻 Texmati 中 2-AP 的含量,以考察方法的精密度。结果表明 5 份供试样品中 2-AP 的含量分别

为 0.609、0.707、0.768、0.696 和 0.713 mg/kg,相对标准偏差(RSD , $n = 5$)为 8.18%。

TMP 是待测样品中不存在的纯物质,而且 TMP 与 2AP 的相对分子质量相近,性质相似,不与 2AP 发生化学反应,和 2-AP 的色谱保留时间相近,但能完全分离。因此本方法选用 TMP 作为内标物^[15]。以内标物 TMP 的回收率来考察方法的回收率(以峰面积计)。上述 5 份供试样品的 TMP 峰面积分别为 129 123、129 699、143 950、142 181 和 138 899,TMP 直接进样分析的峰面积为 165 652,因此方法的平均回收率为 82.57%。以内标物 TMP 计,方法的检出限($S/N = 3$)为 0.01 mg/kg。

由于本方法简化了前处理步骤,样品未净化,为了减少样品对离子源的污染,本方法在前处理阶段中对待测液采用静置 0.5 h 再分析的处理;仪器分析阶段中采用在气相色谱仪进样口衬管中填装少量玻璃毛的处理。实验结果表明,这些处理方法能较为有效地减少样品对离子源的污染。

2.5 香稻育种中的应用

应用本方法对中国水稻研究所稻作技术研究与发展中心 的 11 份香稻育种材料进行筛选,其中 5 份材料检出 2-AP,分别为清香米、泰香 R207、Texmati、桂香丝糯和中健 2 号,具体结果见表 1。由此可见,不同品种香稻中 2-AP 含量存在显著差异, Texmati 中含量最高,清香米和泰香 R207 次之,桂香丝糯和中健 2 号最低。2-AP 含量分布范围为 0.045 ~ 0.699 mg/kg,与前人研究结论^[16]一致。而胜泰 1 号、泰 18、泰引 1 号、五丰占、兰稻、和丰两优香 1 号等 6 份材料未检出 2-AP,原因可能是这 6 份材料香味特征化合物不是 2-AP 或者 2-AP 含量低于本方法检出限,相关研究工作有待进一步深入开展。

表 1 5 个香稻品种中 2-乙酰吡咯啉的含量($n = 3$)
Table 1 Content of 2-acetyl-1-pyrroline in five varieties of aroma rice ($n = 3$)

2-AP	Content/(mg/kg)	RSD/%
Qingxiangmi (清香米)	0.097	1.53
Taixiang R207 (泰香 R207)	0.098	9.51
Texmati	0.699	8.18
Guixiangsinuo (桂香丝糯)	0.045	5.12
Zhongjian 2 (中健 2 号)	0.047	8.83

3 结论

建立了气相色谱-质谱技术分析香稻特征化合物 2-AP 的方法。该方法前处理简单、快速、灵敏,样本和试剂消耗少,尤其适合于通过测定 2-AP 含量进行香稻育种前的大批量品种筛选。

参考文献:

- [1] Sikdar M S I , Rahman M M , Islam M S , et al. *Int J Sustain Crop Prod* , 2008 , 3(3) : 49
- [2] Chaudhary R C. *Food Agric Environ* , 2003 , 1(2) : 34
- [3] Wanchana S , Kamolsukyonyong W , Ruengphayak S , et al. *Science Asia* , 2005 , 31 : 299
- [4] Bradbury L M T , Gillies S A , Brushett D J , et al. *Plant Mol Biol* , 2008 , 68 : 439
- [5] NY/T 596-2002
- [6] Nadaf A B , Krishnan S , Wakte K V. *Curr Sci* , 2006 , 91 (11) : 1533
- [7] Hien N L , Yoshihashi T , Sarhadi W A. *Plant Prod Sci* , 2006 , 9(3) : 294
- [8] Cheetangdee V , Chaiseri S. *Kasetsart J(Nat Sci)* , 2006 , 40 (Suppl) : 67
- [9] Direct Analysis of 2-Acetyl-1-Pyrroline in Rice Seed Using Headspace-Gas Chromatography. [2010-03-02]. http://www.scisoc.or.th/stt/30/sec_c/paper/stt30_C0089.pdf
- [10] Grimm C C , Bergman C , Delgado J T , et al. *J Agric Food Chem* , 2001 , 49 : 245
- [11] Thimmaraju R , Bhagyalakshmi N , Narayan M S , et al. *J Sci Food Agric* , 2005 , 85 : 2527
- [12] Tao S M , Wang L P , Zhang J H , et al. *Chinese Journal of Chromatography* (陶绍木 , 王利平 , 张建华 , 等. 色谱) , 2004 , 22(2) : 189
- [13] Yang D S , Lee K S , Jeong O Y , et al. *J Agric Food Chem* , 2008 , 56 : 235
- [14] Mahatheeranont S , Promdang S , Chiampiriyakul A. *Kasetsart J : Nat Sci* , 1995 , 29 : 508
- [15] Laohakunjit N , Kerdchoechuen. *Food Chem* , 2007 , 101 : 339
- [16] Bounphanousay C , Jaisil P , Sanitchon J , et al. *Asian J Plant Sci* , 2008 , 7(1) : 1