

文章编号: 1674-5566(2017)04-0629-11

DOI:10.12024/j.sou.20170301978

MAE-SAFE-GC × GC/HR-TOFMS 法鉴定熟制中华绒螯蟹挥发性风味成分

李楠¹, 王锡昌¹, 郑福平²

(1. 上海海洋大学 食品学院 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 2. 北京工商大学 北京市食品风味化学重点实验室, 北京 100048)

摘要: 采用微波辅助萃取耦合溶剂辅助风味蒸发法(MAE-SAFE)提取中华绒螯蟹两大可食部位—体肉(不含足钳肉), 性腺(含肝胰腺)的挥发性风味成分, 并应用全二维气相色谱-高分辨飞行时间质谱技术(GC × GC/HR-TOFMS)结合保留指数及精确质量数进行香气定性分析。共鉴定出 122 种挥发性成分, 60 种物质经精确质量数二次定性, 在同原料研究中检出种类最多。其中性腺检出 108 种化合物, 体肉 75 种, 性腺中具有更为丰富的醛类, 酮类及含氮类化合物。MAE-SAFE 法获得的 20 种酮类, 27 种醇类, 7 种含氮类, 4 种含硫类化合物, 使得其对该类极性热敏性挥发性成分化合物具有其他前处理方法所不具有的富集优势, 温和快速的加热萃取方式保证了所获香气成分的真实性。GC × GC/HR-TOFMS 的高分辨率和高峰容量使得(E)-2-戊烯-1-醇与(Z)-2-戊烯-1-醇等多种同分异构体实现完全分离, 甲酰胺(氨味), 麦芽酚(焙烤样香)及其前体物 4H-2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基吡喃-4-酮为首次在中华绒螯蟹中检出, 为后续进行关键香气成分的筛选提供了可靠全面的香气成分信息。

关键词: 中华绒螯蟹; 微波辅助萃取耦合溶剂辅助风味蒸发法; 全二维气相色谱-高分辨飞行时间质谱; 挥发性风味成分

中图分类号: S 985.2 文献标志码: A

香气是重要的食品品质及质量评价指标, 中华绒螯蟹(俗称大闸蟹), 经过传统烹调方法隔水蒸制后可产生诱人的香味。体肉(除足钳肉), 性腺(包括性腺及肝胰腺)是中华绒螯蟹的两大主要可食部位, 是提供特征香气的主要组织来源。挥发性风味物质的提取及分析对于进一步研究香气物质形成机理, 指导改进加工工艺, 提升消费者感官体验具有理论指导意义。

在香气富集技术上, 同时蒸馏萃取法(Simultaneous distillation extraction, SDE), 固相微萃取法(Solid phase microextraction, SPME)和整体材料吸附法(Monolithic material sorptive extraction, MMSE)被广泛用于河豚^[1]、中华绒螯蟹^[2,3]等水产品的挥发性成分提取。但 SDE 法使

样品长时间处于高温加热状态, 极易造成挥发性风味成分失真, 而 SPME 法和 MMSE 法受吸附材料的面积及极性限制, 难于获得全面的样品香气信息。用于香气成分分析鉴定的气相色谱-质谱联用技术(Gas chromatograph-Mass Spectrometer, GC-MS), 受限于其单一色谱柱的低柱效, 存在分离效果不佳导致鉴定困难的问题。

本研究首次采用微波辅助萃取法(Microwave assisted extraction, MAE)联合溶剂辅助风味蒸发法(Solvent assisted flavor evaporation, SAFE)提取中华绒螯蟹香气成分, 并应用全二维气相色谱-高分辨飞行时间质谱(Comprehensive two-dimensional gas chromatography/high resolution-time of flight mass spectrometry, GC × GC/HR-

收稿日期: 2017-03-14 修回日期: 2017-04-21

基金项目: 国家自然科学基金(31471608); “上海市中华绒螯蟹产业技术体系建设”项目(D8003100208)

作者简介: 李楠(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与品质评价。E-mail: Mila_linan@163.com

通信作者: 王锡昌, E-mail: xcwang@shou.edu.cn

TOFMS)进行鉴定。溶剂使用量低,操作时间短,样品内外快速均匀受热的微波辅助萃取法,可实现热敏性样品挥发性气味成分的快速富集^[4]。进一步联合溶剂辅助风味蒸发法,可将萃取液中含有的大量不挥发成分有效脱除,得到具有样品原有风味的气味富集液^[5]。该方法曾被用于马铃薯小吃^[6],烧鸡^[6],牛肉^[7]等的挥发性气味成分提取,而在蟹领域的相关研究则仍为空白。全二维气相色谱-高分辨飞行时间质谱具有高灵敏度、峰容量大等优势,含香气物质的分析物先后通过两根极性不同的色谱柱,实现香气成分的正交分离,已成功用于带鱼^[8],贝类^[9],烧鸡^[10]等的复杂香气成分分离鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

中华绒螯蟹(雌蟹 20 只,均重 150 g;雄蟹 20 只,均重 200 g),2015 年 10 月采于江苏省阳澄湖明澄养殖基地。活蟹捕捞出水后立即用麻绳扎紧(防止其剧烈挣扎造成营养物消耗),冷链保活 3 小时内运输至实验室。

二氯甲烷、无水硫酸钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;C7-C30 正构烷烃混标:色谱级,北京化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Ethos 微波辅助萃取仪:意大利 Milestone 公司;SAFE 装置:定制加工;XDS 复合涡轮分子泵:英国 Edwards 公司;N-EVAP111 12 位干浴氮吹仪:美国 Organomation Associates 公司;7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪:美国 Agilent 公司;全二维气相色谱-高分辨飞行时间质谱 GC × GC/HR-TOFMS 型:美国 Agilent-Zoex 公司。

1.3 方法

1.3.1 前处理方法

流水洗去中华绒螯蟹体表污垢并用毛巾擦拭干净,用专业的剥蟹工具打开头胸甲,手工剥离其体肉(不含足钳肉),性腺(含肝胰腺),将性腺和肝胰腺充分混匀后,每袋 30 g 样品分装入密封袋内,于 -20 °C 低温冰箱中贮存待用。

1.3.2 MAE-SAFE 法提取中华绒螯蟹挥发性风味成分

精确称取 6 份 5.000 g 样品,装入微波辅助溶剂萃取仪的 6 个萃取罐中,隔水蒸制 15 min,冷

却至室温后每罐中加入 40 mL 二氯甲烷,进行微波辅助溶剂萃取,每种样品制备三组平行。萃取程序如下:4 °C/min 升至 80 °C,保持 10 min,排风 10 min,功率 300 W。提取结束后,待罐内温度降低至室温,打开罐体合并萃取液,经过滤得到含有挥发性风味物质的液体。

将 MAE 法得到的滤液由滴液漏斗缓慢、均匀地经滴液漏斗滴入图 1 所示的 SAFE 装置蒸馏瓶中以除去提取液中的非挥发性成分,控制在 30 min 内滴加完成,馏出液接收瓶始终浸没在液氮中保持低温。SAFE 装置蒸馏头夹层循环水温度为 50 °C,系统压力保持在 10.3×10^{-3} Pa 左右。蒸馏结束后,取下接收瓶,室温下待提取液融化后,加入无水 Na_2SO_4 静置 1 小时除去其中水分,过滤得仅含有挥发性风味成分的澄清提取液。低温旋转蒸发至 10 mL 后氮吹至 0.5 mL 用于上机分析。

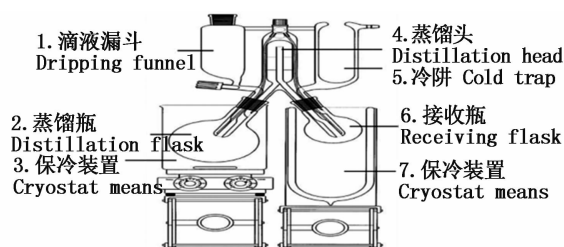


图 1 SAFE 装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of SAFE

1.3.3 GC × GC/HR-TOFMS 分析中华绒螯蟹挥发性风味成分

色谱条件:全二维气相色谱柱第一柱为 DB-WAX (15 m × 0.25 mm × 0.25 μm),第二柱为 DB-5 (1.2 m × 0.1 mm × 0.4 μm),均购于安捷伦公司,两根色谱柱处于同一柱温箱中,通过毛细管柱连接器以串联方式连接。进样口温度为 250 °C,载气为 He,纯度 99.999%,流速 1.0 mL/min,压力 30 psi。升温程序如下:起始温度 40 °C,以 1 °C/min 升到 70 °C,保持 5 min,再以 1 °C/min 升到 130 °C,保持 5 min 后以 3 °C/min 升到 230 °C,保持 5 min,分流比 20:1。辅助区升温程序为初始温度 280 °C,以 1 °C/min 升至 330 °C。调制周期 7 s,冷吹时间 300 ms。进样量为 1 μL。

HR-TOFMS 条件:电子轰击 (EI) 离子源,电子能量 70 eV,离子源温度 230 °C,传输线温度

280 °C,质量扫描范围 40 ~ 340 amu,TOFMS 采集频率 100 Hz,溶剂延迟 6.8 min。

定性方法:待测成分由系统自带的 Zoex GC-image HRMS 2.3 软件进行分析,所得总离子流图经基线校正,质量轴校准,积分后由 NIST11 谱库进行检索。对于匹配度 700 ~ 800 的化合物,进一步采用精确质量数进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 GC × GC/HR-TOFMS 分析结果

图 2 展示了通过 GC × GC/HR-TOFMS 采集到的中华绒螯蟹 4 种样品中挥发气味物质的二维图谱。在下文中,F-A,F-G,M-A,M-G 分别代

表雌蟹体肉(Female crab-Abdomen meat),雌蟹性腺(Female crab-Gonad),雄蟹体肉(Male crab-Abdomen meat),雄蟹性腺(Male crab-Gonad)。在二维图像中,水平坐标轴代表化合物在柱 1 的保留时间,化合物在该柱上基于其沸点实现分离,垂直坐标轴代表化合物在柱 2 的保留时间,化合物经冷冻聚焦后在该柱上基于化合物不同的极性实现再分离,图中的每一个斑点代表一种化合物,斑点颜色深浅代表化合物浓度,右侧条带为浓度颜色指示带,代表浓度随颜色沿垂直轴向上增大。显然,与一维气相色谱中的峰重叠相比,全二维气相色谱实现了更为清晰的分离效果。

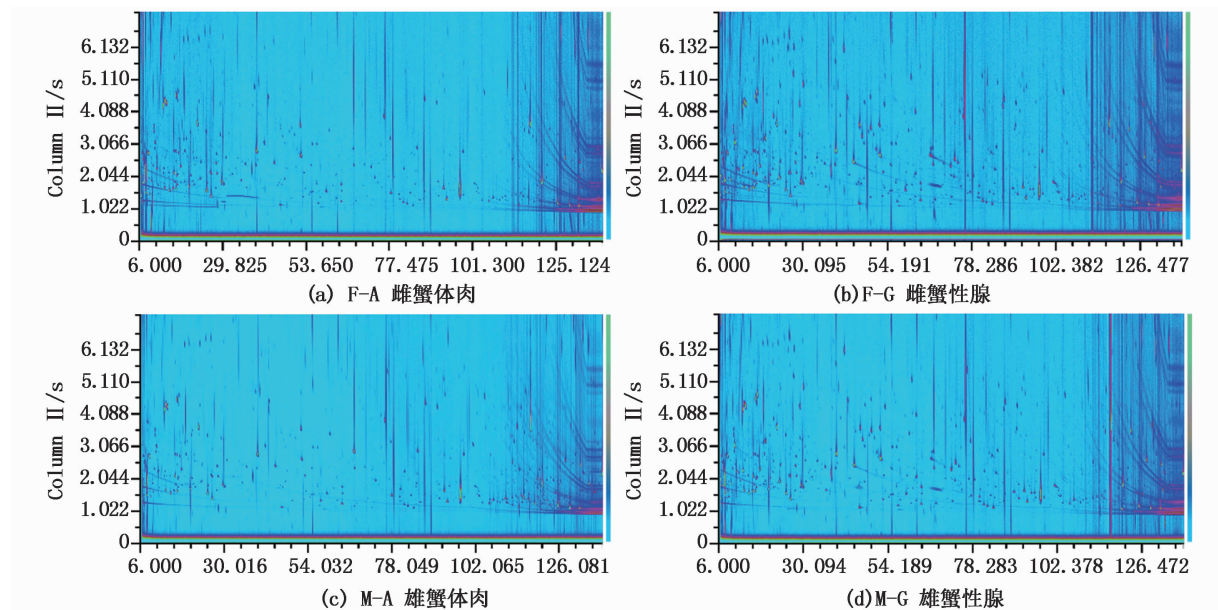


图 2 中华绒螯蟹挥发性气味物质二维图谱

Fig. 2 The 2D-image of Chinese mitten crab volatile compounds by GC × GC-HR/TOFMS

体肉和性腺样品中共有 122 种挥发性气味物质经 NIST11 谱库和精确质量数测定后被鉴定。其中含有醛类 16 种,酮类 18 种,含氮化合物 8 种,含硫化合物 4 种,醇类 28 种。匹配度高于 800 的化合物可以被谱库检索直接鉴定,部分匹配因子高于 700 但低于 800 的挥发性物质则通过精确质量数测定进一步鉴定,精确度为 ± 2 amu。性腺样品中,雌蟹共检出 84 种,雄蟹共检出 94 种化合物,多于体肉样品中雌蟹和雄蟹均为 61 种

的检出量,可见性别对于的中华绒螯蟹性腺风味有所影响,而这一点在体肉中并不明显。研究表明,除水分以外,体肉中 19% 左右为蛋白质,而性腺则含有高达 20% 的脂肪^[11],这种成分的差异是导致两部分具有不同风味特征的主要原因,性腺因富含的脂质成分在加热熟制过程中生成更为丰富的香气物质。有 38 种化合物在中 4 个样品均有检出,对中华绒螯蟹整体基本气味轮廓的构成可能起重要作用。

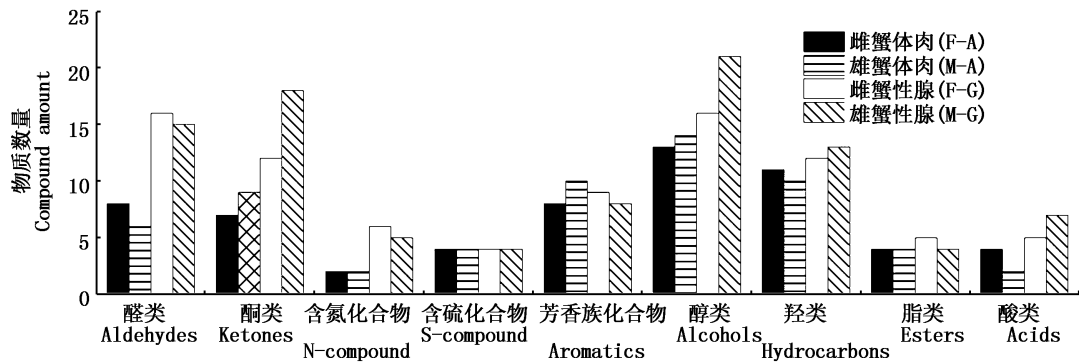


图3 中华绒螯蟹挥发性气味物质分类汇总图

Fig. 3 Summary of Chinese mitten crab volatile compounds

2.2 中华绒螯蟹挥发性风味成分分析

本节将重点讨论醛类、酮类及含硫含氮类化合物。醛类化合物(表1)可通过脂类过氧化、美拉德反应和氨基酸的 Strecker 降解反应而形成,因其香气阈值较低,是水产品香气的重要贡献物质^[12]。戊醛,己醛,庚醛,3-甲基-2-丁烯醛,壬醛,苯甲醛为四样品所共有的醛类。其中,甲基丙烯醛,(E)-2-戊烯醛,(E)-2-己烯醛,辛醛,(Z)-2-庚烯醛,(E)-2-辛烯醛,(E,E)-2,4-庚二烯醛和(E,Z)-2,6-壬二烯醛,苯乙醛仅在性腺中被检出,可能对形成熟制性腺的脂样香气有所贡献。研究表明,饱和的直连醛,烯醛,二烯醛多由多不饱和脂肪酸氧化而成,常常带有令人不愉悦的刺激性气味,是食品中氧化风味的重要来源。(E,Z)-2,6-壬二烯醛可能是由 ω -3 脂肪酸通过酶降解而产生,(E,E)-2,4-庚二烯醛通常被认为是 n-3 多不饱和脂肪酸的降解产物^[13],可提供脂肪香气,被广泛应用于肉味香精^[14],但其阈值高于(E,Z)-2,6-壬二烯醛,对香气的贡献程度可能相对较小,性腺中丰富的脂肪含量为这些化合物的形成提供了前体。与此同时,戊醛、己醛、庚醛和壬醛等给新鲜的海鲜提供了另人舒适的绿色植物般的青香和甜甜的花香^[1],也被认为是淡水鱼类土腥味的成分^[15],性腺中该类化合物的含量显著高于体肉,其较低的阈值使其成为贡献性腺整体香气的重要物质。苯甲醛具有焙烤坚果的香气,曾被鉴定为是消毒蟹肉里重要的风味挥发物^[16],其在性腺中具有更高的含量百分比。(Z)-2-庚烯醛在蟹类水产品中鲜有报道,但吉思茹^[17]的研究中表明其能在 GC-O 频率嗅闻法中以极高的检测频率(7/8)被感官员嗅闻到,其阈值较低,

是雄蟹性腺独有嗅感物质。2-甲基-2-丁烯醛曾在熟制大闸蟹钳肉和足肉中被检出^[3],具巧克力味,但阈值较高,对香气贡献有限,本研究中在雌性体肉中被检出。

酮类化合物(表2)一般具有青香气味或奶油味、果香味,其中不饱和酮是动物特征味和植物油味的来源^[18],阈值较醛类化合物一般较高。在检出的 20 种酮类化合物中,3-甲基-3-丁烯-2-酮,3-羟基丁酮,1-羟基-2-丙酮及苯乙酮,2(5H)-呋喃酮为四种样品所共有,2,3-戊二酮,2-庚酮,1-辛烯-3-酮,(E,E)-3,5-辛二烯-2-酮,2(5H)-5-乙基呋喃酮,麦芽酚为性腺独有。检出的酮类主要为支链化合物,2-庚酮等甲基酮类化合物风味强度较高,不饱和脂肪酸在加工过程中发生的氧化反应是甲基酮的主要来源^[13]。烯酮类化合物,如(E,E)-3,5-辛二烯-2-酮等有植物芳香的气味特征,曾在 3 个产地的大闸蟹(松江,崇明,阳澄湖)体肉中均有检出^[15],但本研究仅在性腺中检出。而烷基二酮,如 2,3-戊二酮,2,3-辛二酮,赋予样品强烈的奶油香和宜人的香味^[1],2,3-戊二酮的阈值较低,且含量百分比比较高,可能对性腺的脂质样香气有一定贡献。苯乙酮在大闸蟹^[19],三文鱼^[20]中均被报道过,具有蘑菇样的植物气味特征,因具有较高的气味强度值为中华绒螯蟹重要的嗅感物质^[17]。6 种呋喃酮类及吡喃酮类物质在本研究中检出,该类化合物均可由美拉德反应生成,具有焦糖样或焙烤样香气^[21]。2(3H)-4-羟基-二氢呋喃酮是含量占比最高的一种化合物,考虑其阈值无从查证,其对香气的贡献仍有待研究。其中值得注意的是,本研究首次在中华绒螯蟹中检出麦芽酚及其前体物质 4H-2,3-二氢-3,5-

二羟基-6-甲基吡喃-4-酮,该前体物质脱一分子水即可转化生成麦芽酚,麦芽酚在性腺样品均有检出,而其前体物质则仅在雌蟹性腺中检出,推测可能由于不同性别的性腺样品中前体物质转化

形成麦芽酚程度不同导致,麦芽酚作为醛类化合物具有较低的阈值,在性腺中含量较高,大量麦芽酚的存在为性腺样品提供了醇厚的香气。

表 1 中华绒螯蟹可食部位醛类挥发性气味物质
Tab.1 Aldehyde volatiles in Chinese mitten crab edible parts

物质 Compounds	阈值 ^b / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	保留时间 Retention time		正/反匹配度 Library match/Reverse match factor				峰面积百分含量 Percent response%				定性方法 ^a Identification
		RT I /min	RT II /s	F-A	F-G	M-A	M-G	F-A	F-G	M-A	M-G	
醛类 Aldehydes(18)												
戊醛 Pentanal	9	6.3601	2.0500	878/896	870/884	831/879	877/892	0.502	2.468	0.117	1.909	MS, AM
2-甲基戊醛 2-Methylpentanal	0.6	6.7147	2.5935	855/922	N. I.	N. I.	N. I.	0.106	N. I.	N. I.	N. I.	MS, AM
甲基丙烯醛 Methacrolein	0.025	8.2891	1.6729	N. I.	792/883	N. I.	N. I.	N. I.	0.217	N. I.	N. I.	MS, AM
己醛 Hexanal	4.5	10.2612	3.0995	865/870	891/892	835/858	882/876	0.460	2.515	0.114	3.283	MS, AM
2-甲基-2-丁烯醛 2-Methyl-2-butenal	458.9	10.7650	2.3072	802/850	N. I.	N. I.	N. I.	0.198	N. I.	N. I.	N. I.	MS
(E)-2-戊烯醛 (E)-2-Pentenal	1500	12.6261	2.3131	N. I.	898/899	N. I.	889/890	N. I.	0.234	N. I.	0.194	MS, AM
庚醛 Heptaldehyde	2.8	16.7432	4.6892	901/887	891/898	893/911	902/906	0.092	0.526	0.042	0.667	MS, AM
3-甲基-2-丁烯醛 3-Methyl-2-butenal	-	17.4635	2.3239	931/959	933/965	895/954	920/958	0.065	0.365	0.102	0.295	MS, AM
(E)-2-己烯醛 E)-2-Hexenal	19.2	19.0112	3.2425	N. I.	900/906	N. I.	902/907	N. I.	0.005	N. I.	0.009	MS, AM
(Z)-4-庚烯醛 (Z)-4-Heptenal	4.2	21.3003	3.9447	N. I.	853/881	N. I.	782/868	N. I.	0.125	N. I.	0.038	MS
辛醛 Octanal	0.7	25.7578	6.5521	N. I.	816/853	N. I.	831/862	N. I.	0.177	N. I.	0.178	MS
(Z)-2-庚烯醛 (Z)-2-Heptenal	13.5	28.7610	4.3177	N. I.	884/951	N. I.	899/950	N. I.	0.052	N. I.	0.032	MS, AM
壬醛 Nonanal	1.1	37.7196	2.2223	817/861	856/879	820/876	877/858	0.074	0.317	0.124	0.384	MS, AM
(E)-2-辛烯醛 (E)-2-Octenal	3	41.2990	6.0822	N. I.	855/867	N. I.	845/910	N. I.	0.036	N. I.	0.202	MS, AM
(E,E)-2,4-庚二烯醛 (E, E)-2,4-Heptadienal	15.4	49.0062	3.5682	N. I.	902/910	N. I.	896/902	N. I.	0.356	N. I.	0.621	MS, AM
苯甲醛 Benzaldehyde	350	51.7036	2.6854	901/919	911/924	868/926	918/958	0.780	1.634	0.150	2.313	MS, AM
(E,Z)-2,6-壬二烯醛 (E, Z)-2,6-Nonadienal	0.8	60.4545	5.1735	N. I.	833/909	N. I.	801/917	N. I.	0.079	N. I.	0.084	MS, AM
苯乙醛 Phenylacetaldehyde	4	65.9963	2.7003	N. I.	887/916	N. I.	889/917	N. I.	0.479	N. I.	0.103	MS, AM

注:定性方法 a. MS, NIST11 谱库检索定性, AM, 精确质量数定性; 阈值 b. 查阅相关文献获得, 检测基质为水

Note: Identification method: MS, compared with NIST11 Mass Spectra Database; AM, agrees with the accurate mass determination; Threshold b; mainly obtained from literatures which applied water as the matrix

表 2 中华绒螯蟹可食部位酮类挥发性气味物质

Tab. 2 Ketone volatiles in Chinese mitten crab edible parts

物质 Compounds	阈值 ^b / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	保留时间 Retention time		正/反匹配度 Library match/Reverse match factor				峰面积百分含量 Percent response%				定性方法 ^a Identification	
		RT I /min	RT II /s	F-A	F-G	M-A	M-G	F-A	F-G	M-A	M-G		
M-G 酮类 Ketones (20)	-												
3-甲基-3-丁烯-2-酮 3-Methyl-3-buten-2-one	-	6.7202	1.8597	825/848	846/870	783/831	847/866	1.145	0.873	0.285	0.733	MS,AM	
4-羟基-3-丙基-2-己酮 4-Hydroxy-3-propyl-2-hexanone	-	6.7223	2.5847	N. I.	840/850	841/856	837/847	N. I.	0.083	0.040	0.069	MS	
2,3-戊二酮 2,3-Pentanedione	20	9.2528	1.9155	N. I.	871/881	N. I.	865/872	N. I.	0.678	N. I.	0.665	MS,AM	
4-甲基-2-己酮 4-Methyl-2-hexanone	-	16.6015	4.399	N. I.	N. I.	N. I.	799/844	N. I.	N. I.	N. I.	0.028	MS,AM	
2-庚酮 2-Heptanone	141	16.5415	4.4197	N. I.	808/844	N. I.	817/842	N. I.	0.054	N. I.	0.025	MS,AM	
3-羟基-3-甲基-2-丁酮 3-Hydroxy-3-methyl-2-butanone	-	21.3335	1.8021	801/826	N. I.	N. I.	795/825	0.044	N. I.	N. I.	0.026	MS,AM	
2-羟基-2,4-二甲基-3-戊酮 2-Hydroxy-2,4-dimethyl-3-pentanone	-	21.3704	1.8012	N. I.	N. I.	786/892	N. I.	N. I.	N. I.	0.020	N. I.	MS	
2-甲基环戊酮 2-Methyl-cyclopentanone	-	24.7936	3.4283	N. I.	N. I.	N. I.	786/877	N. I.	N. I.	N. I.	0.047	MS,AM	
3-羟基丁酮 3-Hydroxybutanone	-	24.9357	1.5999	847/848	818/821	841/844	837/838	5.309	1.021	1.191	1.483	MS,AM	
1-羟基-2-丙酮 1-Hydroxy-2-propanone	-	26.136	1.4302	913/914	922/922	904/906	921/922	6.288	1.798	1.349	2.365	MS,AM	
1-辛烯-3-酮 1-Octen-3-one	-	26.9626	5.2819	N. I.	853/901	N. I.	790/835	N. I.	0.155	N. I.	0.074	MS	
呋喃唑酮 Furazolidone	-	52.2613	1.425	N. I.	N. I.	N. I.	796/922	N. I.	N. I.	N. I.	0.069	MS	
(E,E)-3,5-辛二烯-2-酮 (E,E)-3,5-Octadien-2-one	150	52.8646	4.3164	N. I.	805/878	N. I.	867/858	N. I.	0.066	N. I.	0.076	MS,AM	
苯乙酮 Acetophenone	65	66.641	2.9231	889/901	871/834	881/907	859/861	0.252	0.326	0.631	0.537	MS,AM	
2(5H)-呋喃酮 2(5H)-Furanone	-	77.3614	1.533	890/912	830/903	906/937	825/898	0.207	0.061	0.184	0.046	MS,AM	
2(5H)-5-乙基呋喃酮 2(5H)-5-Ethylfuranone	-	78.2847	2.0446	N. I.	836/884	N. I.	865/818	N. I.	0.042	N. I.	0.032	MS,AM	
麦芽酚 Maltol	35	101.0682	1.8418	N. I.	869/894	N. I.	866/890	N. I.	0.224	N. I.	0.179	MS,AM	
4H-2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基吡喃-4-酮 4H-2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methylpyran-4-one	-	118.1558	1.2557	N. I.	828/927	N. I.	N. I.	N. I.	0.024	N. I.	N. I.	MS,AM	
5-羟甲基二氢呋喃-2-酮 5-Hydroxymethyl dihydrofuran-2-one	-	124.7854	1.2082	N. I.	N. I.	N. I.	892/919	N. I.	N. I.	N. I.	0.543	MS,AM	
2(3H)-4-羟基-二氢呋喃酮 2(3H)-4-Hydroxy-dihydrofuranone	-	128.2077	1.151	875/904	N. I.	882/912	858/938	6.003	N. I.	5.059	2.407	MS,AM	

注:定性方法 a. MS, NIST11 谱库检索定性, AM, 精确质量数定性; 阈值 b. 查阅相关文献获得, 检测基质为水

Note: Identification method: MS, compared with NIST11 Mass Spectra Database; AM, agrees with the accurate mass determination; Threshold b: mainly obtained from literatures which applied water as the matrix

含氮化合物(表3)是中华绒螯蟹体肉肉香的重要贡献者,由于气味阈值极低(5~10 mg/kg),对整体风味的贡献很大^[22]。本研究共有7种含氮化合物检出,除两种酰胺类化合物之外,均为杂环类含氮化合物。杂环类含氮化合物,如吡嗪、呋喃、吡咯等来自于高温热加工过程中氨基酸和还原糖之间的美拉德反应、氨基酸的热解及硫胺素热降解,多数贡献烤肉样的焦香味。由于本研究加热条件为温和蒸煮模式,故产生的焦香样气味并不强烈。三甲基吡嗪为体肉中独有的风味成分,具有烤土豆味,是体肉中含量最高的含氮化合物,因其阈值较低,可以为熟制体肉提供丰富的肉香,常用于肉味香精调制^[14]。吡嗪类化合物在烤虾中含量较高,对蒸煮螃蟹风味有一定贡献,通常提供以烤肉样,坚果样的香气^[15]。

2-甲基呋喃仅在性腺样品中检测到,它是亚油酸的氧化产物,阈值较低,具有泥土及蔬菜样香气,作为脂质氧化的指标物可能对性腺的风味作用巨大。两种酰胺类物质中,甲酰胺为首次在中华绒螯蟹的性腺中检出,可能来自于脂肪、氨基酸的降解或微生物的生长代谢^[23],有研究表明它是N,N-二甲基甲酰胺的微生物降解产物^[24],由于其具有氨味、鱼腥味^[25],是四样品唯一共有的含氮化合物,体肉中含量相对较高,广泛存在于其他蟹类中,此次检出对于研究中华绒螯蟹腥味物质来源及降解途径有重要意义。本实验采用的样品为鲜活状态下熟制而成,三甲胺含量较低,在本研究中未检出。此外吡啶因具有鱼腥味,氨味特征,也在一定程度上赋予了性腺样品的海鲜样风味。

表3 中华绒螯蟹可食部位含氮含硫类挥发性气味物质

Tab.3 Nitrogen-containing and sulfur-containing volatiles in Chinese mitten crab edible parts

物质 Compounds	阈值 ^b / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	保留时间 Retention time		正/反匹配度 Library match/Reverse match factor				峰面积百分含量 Percent response%				定性方法 ^a Identification	
		RT I /min	RT II /s	F-A	F-G	M-A	M-G	F-A	F-G	M-A	M-G		
含氮化合物 Nitrogen-containing compounds(7)													
吡啶 Pyridine	2000	16.3618	2.0712	N. I.	869/907	N. I.	810/891	N. I.	0.176	N. I.	0.122	MS,AM	
3-甲基呋喃 3-Methylfuran	-	19.0112	1.993	N. I.	820/865	N. I.	813/858	N. I.	0.078	N. I.	0.036	MS,AM	
反式-2-(2-戊烯基)呋喃 trans-2-(2-Pentenyl) furan	-	27.083	6.1339	N. I.	799/891	N. I.	801/866	N. I.	0.095	N. I.	0.072	MS,AM	
2,5-二甲基吡嗪 2,5-Dimethylpyrazine	800	28.7528	3.3389	N. I.	781/841	N. I.	N. I.	N. I.	0.051	N. I.	N. I.	MS	
N,N-二甲基甲酰胺 N,N-Dimethylformamide	100000	29.1968	1.87	894/914	890/920	891/930	875/905	0.861	0.477	0.207	0.346	MS,AM	
三甲基吡嗪 Trimethylpyrazine	350.12	38.5315	4.7926	831/872	N. I.	801/872	N. I.	0.088	N. I.	0.032	N. I.	MS,AM	
甲酰胺 Formamide	-	83.5856	1.1566	N. I.	798/931	N. I.	913/930	N. I.	0.123	N. I.	0.202	MS,AM	
含硫化合物 Sulfur-containing compounds(4)													
二甲基二硫 Dimethyl disulfide	-	9.7212	2.3819	832/849	823/815	834/879	813/813	0.049	0.033	0.035	0.033	MS,AM	
甲硫基丙醛 Methylthiopropional	0.45	44.1237	2.4777	881/903	917/923	862/906	916/921	0.159	1.630	0.124	1.255	MS,AM	
2-乙酰噻唑 2-Acetyl thiazole	4	66.7306	2.4073	799/862	877/912	831/897	863/868	0.061	0.134	0.042	0.099	MS,AM	
二甲基砜 Dimethyl sulfone	-	93.2363	1.3427	923/927	914/922	909/930	921/931	0.610	0.498	0.341	0.395	MS,AM	

注:定性方法 a. MS,NIST11 谱库检索定性,AM,精确质量数定性;阈值 b. 查阅相关文献获得,检测基质为水

Note: Identification method: MS, compared with NIST11 Mass Spectra Database;AM, agrees with the accurate mass determination; Threshold b. mainly obtained from literatures which applied water as the matrix

含硫化合物(表3)常见于各类甲壳类动物肉的挥发性成分,通常具有极低的阈值,在水产品肉香味形成过程中起至关重要的作用,多来自于含硫氨基酸及核苷酸的热反应。本研究共检出4种含硫化合物,二甲基二硫,甲硫基丙醛,2-乙酰基噻唑,二甲基砷,在四种样品中均有所检出。二甲基二硫被认为具有类似洋葱或白菜的香气,是乙硫醇的氧化产物或蛋氨酸的细菌降解产物^[19]。甲硫基丙醛在四种样品中含量最高,阈值极低,对气味贡献最大,具有烤土豆味,曾被鉴定为雄蟹性腺的独有嗅感物质^[17]。2-乙酰基噻唑具有坚果香和爆玉米花般的香气,被大量报道存在于其它蟹和水产品中^[1],其在体肉样品中的百分含量高于性腺,对体肉的风味贡献有一定作用。二甲基砷存在于动物各组织中,在肉类中含量高且挥发性强,对肉香风味有一定贡献^[26]。

此外,芳香族化合物的来源可能与蟹所处的生活环境相关,二甲基苯和苯酚具有某种药味^[27],对其风味有负面的影响,萘具有樟脑球的气味,在龙虾中也有检出^[15]。乙基苯具有坚果香气,因在气味强度实验中具有较高的气味强度值对整体风味具有一定贡献^[28],对甲基苯酚仅在雄蟹蟹肉中被检出,具有烧烤味,是构成咖啡、葡萄酒香气的重要成分^[13]。烃类,醇类,酯类和酸类化合物香味阈值较高,对于香气特征贡献有限。其中十一烷可以通过烷基自由基的脂质自氧化或类胡萝卜素分解生成,曾在小龙虾中被检出,在吉思茹的研究中首次被鉴定为大闸蟹性腺的嗅感物质^[24],具有清香味和奶香味,在体肉中含量丰富。十二烷在大闸蟹中曾被报道为对香气有贡献作用的挥发性物质^[1],具有较弱的坚果味和烤肉味。具有甲基支链的化合物是重要的肉品风味化合物^[29],具有清甜香味的长支链烷烃2,6,10,14-四甲基十五烷多次在中华绒螯蟹,小龙虾及其加工废弃物的样品中检出^[15]。1-戊烯-3-醇,1-戊醇,1-辛烯-3-醇是醇类检出化合物中阈值较低的三种。可见,相比而言,不饱和醇的风味阈值较低,对风味贡献较大。1-辛烯-3-醇是一种亚油酸的氢过氧化物的降解产物,本研究中仅在性腺中检出,多次在前人研究中检出具有蘑菇样的香气,广泛存在于淡水及海水鱼类中^[15,30]。

3 讨论

本研究耦合利用了MAE与SAFE法对中华

绒螯蟹两大可食部位的挥发性香气成分进行提取,利用全二维气相色谱-飞行时间质谱进行了香气成分的分析鉴定。结果表明,本研究建立的方法较传统方法获得的香气成分更为全面,鉴定效果更为理想。从数量来看,本研究从两大可食部位共分析获得122种化合物,显著多于前人的研究结果。于慧子^[16]采用SDE-GC-MS法在中华绒螯蟹蟹肉中鉴定出59种挥发性化合物,包括醛类化合物18种、酮类化合物8种、醇类化合物8种、含硫化合物7种、含氮化合物6种,未见酸类检出,顾赛麒^[31]采用MMSE-GC-MS法从崇明雄性中华绒螯蟹可食部位(体肉,钳肉,足肉,性腺)得到71种挥发性化合物,其中醛类21种,酮类9种,醇类5种,呋喃类6种,含氮化合物10种,运用HS-SPME-GC-MS法从松江雌性中华绒螯蟹可食部位(体肉,钳肉,足肉,性腺)中共鉴定得到48种化合物,其中醛类21种、酮类5种、醇类3种、呋喃类5种、含氮类2种^[3]。从物质分类来看,本方法得到醛类18种,酮类20种,醇类27种,含氮类7种,含硫类4种,芳香族类14种,烃类14种,酸类9种,酯类9种,对酮类,醇类,含氮含硫类等一些挥发性低、极性大、热敏性化合物富集效果较传统方法更优,张逸君等人采用MAE-SAFE-GC-MS法对道口烧鸡的香气研究中得出相似结论:MAE法对于极性化合物有更高的萃取效率,SAFE法对低挥发性和极性较高的香气组分萃取更有效^[32]。因醛酮类及含氮含硫化合物对风味贡献较大,故本研究采用的方法适于复杂水产品品基质中进行极性热敏挥发性成分的萃取。

在分离鉴定效果方面,全二维气相色谱质谱联用将两种不同性质的色谱柱串联起来,使样品中所有组分在二维平面达到正交分离,本研究中成功实现了同分异构体的鉴定,极性相近的同分异构体(E)-2-戊烯-1-醇与(Z)-2-戊烯-1-醇具有相近的第二维保留时间(1.8072s和1.8071s),但在二维柱上根据其沸点高低实现完全分离(28.8906min和29.3118min)。全二维气相色谱较好的解决了一维气相色谱中峰重叠的问题,使得鉴定效果更准确可信。同时,GC×GC/HR-TOFMS所使用的精确质量数鉴定法,对于弥补NIST谱库检索正反匹配度较低时鉴定准确度低有一定效果,其根据鉴定化合物的特征分子离子

峰实现再次定性,有60种物质经过精确质量数鉴定,定性效果更为可靠。

与此同时,在技术操作方面 MAE-SAFE 法在进行香气富集操作时克服了传统液体萃取 SDE 法对原料长时间高温萃取的缺点,借助微波的辅助加热,使原料快速均匀受热,实现了高效快速的香气成分富集,同时 SAFE 法的耦合有效地去除非挥发成分对气相色谱检测的干扰,对水产品类复杂基质的原料有很好的适应性。全二维气相色谱高分辨飞行时间质谱具有高分辨率,高峰容量的特点,适合于中华绒螯蟹样品中复杂香气的分析,至此,本研究获得了较为全面真实的中华绒螯蟹挥发性成分信息,建立起一套适于水产品类复杂基质的香气分析方法。

参考文献:

- [1] 秦晓,王锡昌,陶宁萍. 养殖暗纹东方鲀蒸制鱼肝中特征气味物质的鉴定[J]. 食品工业科技, 2015, 36(14): 57-62, 68.
QIN X, WANG X C, TAO N P. Characterization of odor-active compounds in steamed liver of farmed puffer fish (*Takifugu obscurus*) [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(14): 57-62, 68.
- [2] JI S R, GU S Q, WANG X C, et al. Comparison of olfactometrically detected compounds and aroma properties of four different edible parts of Chinese mitten crab [J]. Fisheries Science, 2015, 81(6): 1157-1167.
- [3] 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.
GU S Q, WANG X C, TAO N P, et al. Analysis of aroma compounds from different edible parts of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by HS-SPME-GC-MS and E-Nose [J]. Food Science, 2013, 34(18): 239-244.
- [4] AMARNI F, KADI H. Kinetics study of microwave-assisted solvent extraction of oil from olive cake using hexane: comparison with the conventional extraction [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(2): 322-327.
- [5] 张文静. 德州扒鸡挥发性香成分分析[D]. 北京:北京工商大学, 2009.
ZHANG W J. Analysis on flavoring volatiles in Dezhou braised chicken [D]. Beijing: Beijing Technology and Business University, 2009.
- [6] MAJCHER M, JELEŃ H H. Comparison of suitability of SPME, SAFE and SDE methods for isolation of flavor compounds from extruded potato snacks [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22(6): 606-612.
- [7] 陈海涛,张宁,刘洋,等. ASE-SAFE 和 SDE-GC-MS 分析贾永信腊牛肉的挥发性香气成分[J]. 精细化工, 2013, 30(2): 166-173.
CHEN H T, ZHANG N, LIU Y, et al. Analysis and simulation of volatile aroma constituents of Jiayongxin preserved beef by ASE-SAFE and SDE-GC-MS [J]. Fine Chemicals, 2013, 30(2): 166-173.
- [8] 谢诚,欧昌荣,曹锦轩,等. 全二维气相色谱-飞行时间质谱法分析糟带鱼挥发性风味成分[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 234-243.
XIE C, OU C R, CAO J X, et al. Analysis of the volatile compounds of vinasse Hairtail through two-comprehensive dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(2): 234-243.
- [9] ROCHA S M, FREITAS R, CARDOSO P, et al. Exploring the potentialities of comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry to distinguish bivalve species: comparison of two clam species (*Venerupis decussata* and *Venerupis philippinarum*) [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1315: 152-161.
- [10] DUAN Y, ZHENG F P, CHEN H T, et al. Analysis of volatiles in Dezhou Braised Chicken by comprehensive two-dimensional gas chromatography/high resolution-time of flight mass spectrometry [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 60(2): 1235-1242.
- [11] 陈德慰. 熟制大闸蟹风味及冷冻加工技术的研究[D]. 无锡:江南大学, 2007.
CHEN D W. Flavor and freezing technology of cooked Chinese mitten crab [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007.
- [12] GIRI A, OSAKO K, OHSHIMA T. Identification and characterisation of headspace volatiles of fish miso, a Japanese fish meat based fermented paste, with special emphasis on effect of fish species and meat washing [J]. Food Chemistry, 2010, 120(2): 621-631.
- [13] SEÉOT T, REGOST C, PROST C, et al. Effect of dietary lipid sources on odour-active compounds in muscle of turbot (*Psetta maxima*) [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, 81(14): 1339-1346.
- [14] 方元超. 肉味及海鲜味香精调香中常用的香原料[J]. 中国食品添加剂, 2003, (3): 35-41, 48.
FANG Y C. Flavoring materials used in meat and seafood flavors [J]. China Food Additives, 2003, (3): 35-41, 48.
- [15] 顾赛麒,张晶晶,王锡昌,等. 不同产地熟制中华绒螯蟹肉挥发性成分分析[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 289-293, 313.
GU S Q, ZHANG J J, WANG X C, et al. Analysis of volatile components in meat of steamed Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) farmed in different regions [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 289-293, 313.
- [16] 于慧子. 中华绒螯蟹与锯缘青蟹中关键气味活性化合物的鉴定[D]. 上海:上海海洋大学, 2011.

- YU H Z. Identification of key aroma-active compounds from Chinese mitten crab and Mangrove crab [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011.
- [17] 吉思茹, 钱婷, 王锡昌, 等. 熟制中华绒螯蟹性腺中关键性嗅感物质的鉴定[J]. 现代食品科技, 2016, 32(2): 323-329.
- JI S R, QIAN T, WANG X C, et al. Identification of the key odorant compounds in the gonad of steamed Chinese mitten crab [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(2): 323-329.
- [18] FORSS D A. Odor and flavor compounds from lipids [J]. Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids, 1973, 13: 177-258.
- [19] TANCHOTIKUL U, HSIEH T C Y. Analysis of volatile flavor components in steamed rangia clam by dynamic headspace sampling and simultaneous distillation and extraction [J]. Journal of Food Science, 1991, 56(2): 327-331.
- [20] VARLET V, KNOCKAERT C, PROST C, et al. Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(9): 3391-3401.
- [21] 胡国栋, 程劲松. 酱香型白酒味喃酮和吡喃酮类化合物的分析研究[J]. 酿酒科技, 1997(4): 31-34.
- HU G D, CHENG J S. Analysis furaneol and pyranones compounds in Maotai-flavor liquor [J]. Liquor-Making Science & Technology, 1997(4): 31-34.
- [22] 党亚丽. 金华火腿和巴马火腿风味的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- DANG Y L. Study on the flavor of Jinhua ham and Parma ham [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009.
- [23] 高韶婷. 基于多指纹图谱技术的我国三大干腌火腿风味品质级评价研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- GAO S T. Flavor and quality grade Evaluation of three main dry-cured hams in China by multiple fingerprints technology [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [24] 杨帅. 一株 N, N-二甲基甲酰胺降解菌的特性及其在 SBR 系统中的生物强化作用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- YANG S. Characteristics of DMF-Degrading bacterium and its applicate in the bioaugmentation SBR system [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [25] MORITA K, KUBOTA K, AISHIMA T. Comparison of aroma characteristics of 16 fish species by sensory evaluation and gas chromatographic analysis [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003, 83(4): 289-297.
- [26] 刘欣. 肉桂在卤鸡肉风味形成中的作用研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2013.
- LIU X. Study on the effect of cinnamon on flavor formation of stewed chicken [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2013.
- [27] KUBOTA K, KOBAYASHIA, YAMANISHI T. Basic and neutral compounds in the cooked odor from Antarctic krill [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1982, 46(11): 2835-2839.
- [28] 王锡昌, 吴娜, 顾赛麒, 等. MMSE-GC-MS/GC-O 法鉴定熟制阳澄湖大闸蟹关键嗅感物质 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(4): 245-254.
- WANG X C, WU N, GU S Q, et al. Identification of odor-active compounds in Chinese mitten crab from Yangcheng Lake by MMSE-GC-MS/GC-O [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(4): 245-254.
- [29] MOTTRAM D S. Flavour formation in meat and meat products; a review [J]. Food Chemistry, 1998, 62(4): 415-424.
- [30] 金燕. 蟹肉风味的研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2011.
- JIN Y. Study on flavor of crab meat [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2011.
- [31] 张逸君, 郑福平, 张玉玉, 等. MAE-SAFE-GC-MS 法分析道口烧鸡挥发性成分 [J]. 食品科学, 2014, 35(22): 130-134.
- ZHANG Y J, ZHENG F P, ZHANG Y Y, et al. Analysis of volatile components in Daokou roasted chicken by MAE-SAFE-GC-MS [J]. Food Science, 2014, 35(22): 130-134.
- [32] 顾赛麒, 吴娜, 张晶晶, 等. MMSE-GC-O 结合 OAV 法鉴定蒸制崇明地区中华绒螯蟹中关键气味物质 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(3): 877-888.
- GU S Q, WU N, ZHANG J J, et al. Characterization of key odor compounds in steamed Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) farmed in Chongming region by monolithic material sorptive extraction-gas chromatography-olfatometry and odor activity value methods [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2014, 5(3): 877-888.

Identification of Chinese mitten crab volatile compounds based on MAE-SAFE-GC × GC/HR-TOFMS

LI Nan¹, WANG Xichang¹, ZHENG Fuping²

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Engineering Research Center of Aquatic – Product Processing & Preservation, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Microwave-assisted extraction combined with solvent assisted flavor evaporation (MAE-SAFE) was applied to extract the volatiles from two edible parts of Chinese mitten crab, abdomen meat and gonad part. The volatiles were quantitatively analyzed by the comprehensive two-dimensional gas chromatography/high resolution-time of flight mass spectrometry (GC × GC/HR-TOFMS), and identified by the retention index with an aid of the NIST11 library. A total of 122 volatile compounds were identified, which is the largest identification number among similar researches of same material, and 60 compounds were double identified by the accurate mass (AM) determination. More aldehydes, ketones, nitrogen-containing compounds in gonad part with total of 108 compounds were identified, while only 75 volatiles were identified in abdomen meat. MAE-SAFE has a better effect on the extraction of polar thermo-sensitive volatile compounds than other volatile enrichment method, and 20 ketones, 27 alcohols, 7 nitrogen-containing compounds, 4 sulfur-containing compounds were identified. The gentle and rapid heating method ensures the authenticity of the aroma components. GC × GC / HR-TOFMS with high resolution and high peak capacities enabled isomeric compounds like (E) -2-penten-1-ol and (Z) -2-penten-1-ol to achieve full separation. Compounds like formamide (ammonia flavor), maltol (baking-like flavor) and its precursor 4H-2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methylpyran-4-one were first detected in Chinese mitten crab. Therefore, this study provides comprehensive and reliable volatile component information for subsequent screening of key aroma compounds.

Key words: Chinese mitten crab; microwave-assisted extraction-solvent assisted flavor evaporation (MAE-SAFE); comprehensive two-dimensional gas chromatography/high resolution-time of flight mass spectrometry (GC × GC/HR-TOFMS); volatile compounds