DOI:10.12441/spyswjs.20220728006 [文章编号] 1673-1689(2024)07-0151-14

分散液液微萃取法测定葡萄酒中酯类化合物

梁钰华[1,2] 李恺安[1,2] 强文乐[1,2] 牛育林[3] EUDES Sam Faisal[1,2] 蒋玉梅[1,2] 马腾臻[1,2*]

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院,甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省葡萄酒产业技术研发中心,甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃莫高实业发展股份有限公司,甘肃 武威 733008)

摘要:为优化分散液液微萃取(dispersive liquid-liquid microextraction,DLLME)测定葡萄酒中酯类化合物的方法,以模拟葡萄酒为试材,研究分散剂种类及体积、萃取剂种类及体积、样品体积、盐添加质量及萃取时间7个因素对模拟葡萄酒中16种酯类化合物萃取效果的影响,结合单因素和Box-Behnken响应面试验对萃取条件进行优化,并采用气相色谱-质谱(GC-MS)进行定性定量分析。结果表明,模拟葡萄酒中酯类化合物的最佳萃取条件为:分散剂甲醇1 200 μL,萃取剂二氯甲烷600 μL,样品体积7 mL,不添加盐,萃取时间1.0 min。在此条件下,16种待测酯类化合物的线性关系良好,R^2均高于0.995,检测限(limit of detection,LOD)和定量限(limit of quantitation,LOQ)分别为0.004~0.078 mg/L和0.012~0.261 mg/L;3个质量浓度水平的加标回收率为83.3%~111.3%,日内和日间相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)为0.02%~7.69%。对2018—2020年的'黑比诺'干红葡萄酒和'贵人香'冰白葡萄酒样品测定时,该方法表现出良好的应用效果,并印证了酯类化合物的种类和质量浓度变化与酒样类型及陈酿年份密切相关。该研究可为深入研究葡萄酒中酯类化合物的代谢提供依据。

关键词:分散液液微萃取;气相色谱-质谱;葡萄酒;酯类化合物;响应面优化

Determination of Ester Compounds in Wine Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

LIANG Yuhua[1,2] *LI Kai'an*[1,2] *QIANG Wenle*[1,2] *NIU Yulin*[3] *EUDES Sam Faisal*[1,2] *JIANG Yumei*[1,2] *MA Tengzhen*[1,2*]

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Research and Development Center of Wine Industry in Gansu Province, Lanzhou 730070, China; 3. Gansu Mogao Industrial Development Limited Company, Wuwei 733008, China)

Abstract: To optimize the method for determining ester compounds in wine using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), a simulated wine solution was used as the test material. The effects of seven factors, including type and volume of dispersant, type and volume of extractant, sample volume, salt addition amount, and extraction time, on the extraction efficiency of 16 ester compounds in simulated wine were investigated. Single-factor experiments and Box-Behnken response surface methodology were combined to optimize the extraction conditions, and qualitative and quantitative analyses were performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that the optimal extraction conditions for ester compounds in the simulated wine were 1 200 μL of methanol as the dispersant, 600 μL of dichloromethane as the extraction solvent, a sample volume

基金项目:兰州市青年科技人才创新项目(2023-QN-137);甘肃省高校教师创新基金项目(2024-A-055);甘肃省自然科学基金青年基金项目(20JR10RA551)。

通信作者:马腾臻(1989—),男,硕士,副教授,硕士研究生导师,主要从事葡萄酒、果酒酿造及品质调控研究。E-mail:mateng-zhen@hotmail.com

收稿日期:2022-07-28 **改回日期:**2022-08-25

of 7 mL, no adjustment of ionic strength, and an extraction time of 1.0 min. Under these conditions, all 16 esters compounds under investigation exhibited good linearity with R^2 exceeding 0.995, while the limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) ranged from 0.004 mg/L to 0.078 mg/L and 0.012 mg/L to 0.261 mg/L, respectively. The spiked recoveries at three mass concentration levels ranged from 83.3% to 111.3%, with intra-day and inter-day relative standard deviations (RSDs) between 0.02% to 7.69%. When applied to 'Pinot Noir' dry red wine and Italian 'Riesling' ice wine samples from 2018 to 2020, the method showed good applicability, confirming that the types and concentrations of ester compounds were closely related to the wine type and aging year. This study could provide a basis for the in-depth study of the metabolism of ester compounds in wine.

Keywords: dispersive liquid-liquid microextraction; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); wine; ester compounds; response surface optimization

香气是决定葡萄酒感官品质的重要指标[1]，根据呈香化合物结构，可分为醇类、酯类、酸类、羰基类、萜烯类、降异戊二烯和含硫化合物等[2]。其中，酯类化合物作为香气物质中的关键组成部分，可赋予酒体愉悦的花果香气，从而直接影响葡萄酒的芳香特征和人们对其的感官感知[3-4]。

葡萄酒中的酯类化合物主要在发酵和陈酿阶段产生。发酵过程中，酵母通过Ehrlich途径代谢支链氨基酸产生相应高级醇[5]，进而转化为乙酸乙酯、异戊酸乙酯、辛酸乙酯和癸酸乙酯等脂肪酸乙酯，这也是酯类化合物合成的主要途径。在苹乳发酵阶段，乳酸菌将苹果酸降解为乳酸，通过酯化反应形成乳酸乙酯、丁二酸二乙酯等物质；但随着环境pH的降低，乙酸乙酯等物质也会部分水解[6-7]。陈酿过程中，在酸和酶的催化作用下，酯化反应和酯解反应同时发生，并最终达到相对平衡，从而使葡萄酒表现出更为复杂的陈酿香气[8]。因此，建立定量准确、重复性好且操作简单的酯类化合物测定方法，有助于进一步研究其在葡萄酒中的代谢机制。

酯类化合物在酒样中的含量较低，增加了其精确定量的难度，在检测前需进行富集和浓缩处理。液液萃取（liquid-liquid extraction，LLE）和固相萃取（solid phase extraction，SPE）是传统且有效的萃取方法，但其溶剂用量大、操作烦琐[9-10]；顶空固相微萃取（headspace-solid phase microextraction，HS-SPME）具有操作方便、萃取效率高、无有机溶剂等优点，但也存在价格昂贵、萃取头易损耗等缺点[11-12]。近年来，一种基于在有机相中加入分散剂以降低水相与萃取剂之间界面张力的分散液液微萃取法受到研究者的青睐[13]，该法具有操作简单快速、成本低、回收率高、富集倍数高等优点，已广泛应用于食品、环境和生物等领域中痕量化合物的定量分析[14-17]。目前，已有学者建立了发酵型含乙醇饮料中含硫化合物、高级醇、挥发性酚类和萜烯类等物质的DLLME-GC-MS分析方法[13-15,18-20]，但其在酯类化合物分析中的应用还未见报道。

作者以分散剂种类、萃取剂种类、样品体积、盐添加质量、分散剂体积、萃取剂体积和萃取时间等因素为指标，通过单因素和Box-Behnken响应面试验设计，优化模拟葡萄酒中分散液液微萃取提取酯类化合物的条件，为葡萄酒香气测定提供科学依据，并探究不同类型和年份葡萄酒中酯类化合物的演变规律。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 葡萄酒酒样 试验酒样为甘肃莫高实业发展股份有限公司2018—2020年的'黑比诺'干红葡萄酒和'贵人香'冰白葡萄酒，并根据品种和年份分别标记为M-H-18、M-H-19、M-H-20和M-B-18、M-B-19、M-B-20。'黑比诺'干红葡萄酒基本成分：乙醇体积分数12.71%~13.12%，总酸质量浓度4.50~5.49 g/L，残糖质量浓度0.49~0.55 g/L。'贵人香'冰白葡萄酒基本成分：乙醇体积分数7.65%~9.18%，总酸质量浓度5.14~5.61 g/L，残糖质量浓度66.10~86.83 g/L。

1.1.2 标准品和试剂 乙酸异丁酯（纯度99.0%）、异戊酸乙酯（纯度98.0%）、乙酸丁酯（纯度99.0%）、己酸甲酯（纯度99.0%）、乙酸己酯（纯度99.0%）、庚酸乙酯（纯度99.0%）、己酸异戊酯（纯度99.0%）、乙酸辛酯（纯度98.5%）、癸酸乙酯（纯度99.0%）、辛酸异戊酯（纯度98.0%）、乙酸苯乙酯（纯度98.0%）：美

国 Sigma 公司；乙酸异戊酯（纯度 99.5%）、己酸乙酯（纯度 99.0%）、辛酸乙酯（纯度 99.5%）、丁二酸二乙酯（纯度 99.6%）：上海麦克林生化科技有限公司；*L*(-)-乳酸乙酯（纯度 98.0%）、4-甲基-2-戊醇（纯度 98.0%）：梯希爱（上海）化成工业发展有限公司；甲醇、乙腈、丙酮、二氯甲烷、正己烷、氯仿、无水乙醇：色谱纯，成都市诺尔施科技有限责任公司；氢氧化钠、氯化钠、无水硫酸钠：分析纯，天津市光复科技发展有限公司；酒石酸：分析纯，天津百伦斯生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

CP214 型电子天平：上海奥豪斯仪器有限公司；18100 型超纯水机：重庆摩尔水处理设备有限公司；Vorter Mixer 型涡旋仪：美国 Scientific Industries.Inc 公司；TDZ5-WS 型台式低速离心机：湖南湘仪仪器有限公司；TRACE 1300-ISQ 型气相色谱-质谱联用仪、TRIPLUS RSH 型自动进样器：美国 Thermo Scientific 公司；DB-Wax 型色谱柱（60 m×2.5 mm×0.25 μm）：美国 Agilent Technologies 公司；1 mL 微量注射器：上海佳安分析仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 模拟酒、标准母液及标准工作液的配制 模拟酒：乙醇体积分数 12%，酒石酸 5 g/L，用饱和氢氧化钠调 pH 至 3.5[18]。

标准母液：用模拟酒制备 4 mg/L 乙酸异丁酯、4.5 mg/L 异戊酸乙酯、1.2 mg/L 乙酸丁酯、9 mg/L 乙酸异戊酯、1 mg/L 己酸甲酯、70 mg/L 己酸乙酯、5 mg/L 乙酸己酯、10 mg/L 庚酸乙酯、2 mg/L *L*(-)-乳酸乙酯、10 mg/L 辛酸乙酯、1 mg/L 己酸异戊酯、1 mg/L 乙酸辛酯、30 mg/L 癸酸乙酯、1 mg/L 辛酸异戊酯、4 mg/L 丁二酸二乙酯和 4 mg/L 乙酸苯乙酯的母液，用于条件优化和方法验证。

标准工作液：用模拟酒分别将母液稀释 10、50、100、200、500、1 000、2 000 倍，用于建立标准曲线。

1.3.2 DLLME 方法条件设置 参照文献[14，20]的方法并略加改动。取 5 mL 模拟酒酒样于 15 mL 锥形底螺旋盖玻璃离心管中，加 0.9 g 氯化钠和 10 μL 内标（18 640 mg/L 4-甲基-2-戊醇的乙醇溶液），用 1 mL 微量注射器将混合的有机溶液（1 000 μL 的甲醇和 600 μL 二氯甲烷，均用 1 mL 微量注射器吸取）快速注入酒样中，并涡旋萃取 1 min 后，以 4 000 r/min 离心 15 min，分离有机相，加入无水硫酸钠除水后移入 2 mL 样品瓶中，由自动进样器吸取 1 μL 注入 GC-MS 进行分析，所有样品均为 3 份，每份分析 3 次。

以酯类化合物质量浓度为指标，分别探讨分散剂种类（甲醇、乙腈、丙酮）、萃取剂种类（二氯甲烷、正己烷、氯仿）、样品体积（4、5、6、7、8 mL）、盐添加质量（0、0.3、0.6、0.9、1.2 g）、分散剂体积（600、800、1 000、1 200、1 400 μL）、萃取剂体积（480、600、720、840、1 000 μL）、萃取时间（0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 min）对 DLLME 效率的影响。试验中各因素的固定条件分别为甲醇 1 000 μL，二氯甲烷 600 μL，样品体积 5 mL，盐添加质量 0.9 g，萃取时间 9 min。

1.3.3 Plackett-Burman 试验设计 以单因素试验结果为基础，以酯类化合物的总质量浓度为响应值，评价样品体积（X_1）、分散剂体积（X_2）、萃取剂体积（X_3）和萃取时间（X_4）4 个因素，筛选出影响 DLLME 效率的主次因子。

1.3.4 响应面试验设计 根据 Plackett-Burman 试验结果，选取分散剂体积（*A*）、萃取剂体积（*B*）和萃取时间（*C*）3 个因素，进行三因素三水平的 Box-Behnken 响应面试验设计。对萃取条件进行优化并建立数学回归模型。

1.3.5 GC-MS 分析 GC 条件：通过自动进样器向 GC-MS 中注入体积为 1 μL 的溶液，采用 DB-Wax 型色谱柱（60 m×2.5 mm×0.25 μm）分离挥发性化合物。气相色谱进样口温度为 250 ℃，载气为氦气，流量为 1 mL/min，不分流进样。升温程序：初始温度 40 ℃，持续 5 min，然后以 4 ℃/min 的速度升至 210 ℃，保持 5 min，溶剂时间 7 min。MS 条件：EI 离子源，电子轰击能量 70 eV，离子源温度 230 ℃，扫描范围 *m/z* 为 35~350。

1.3.6 定性定量分析 定性分析：采用质谱全离子扫描图谱。根据标准品特征离子、NIST-11、Wiley 及香精香料谱库检索比对进行定性分析，谱库比对时要求匹配度大于 800。

定量分析：利用已有标准品制备的标准曲线对葡萄酒中的相应香气物质进行定量，对于没有标准品的香气物质利用化学结构相同、碳原子数相近的标准品进行定量。

1.4 数据处理与分析

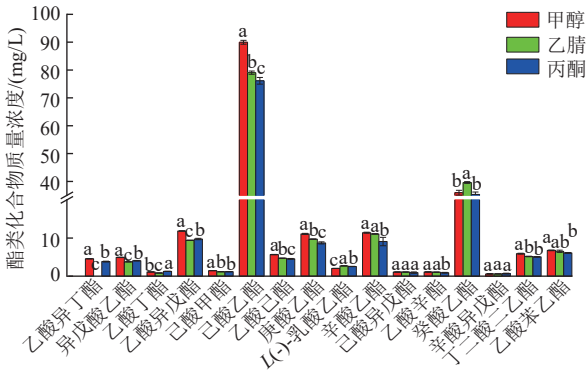
利用 Microsoft Office Excel 2010 和 Origin

2018 对试验所得数据进行处理及绘图，使用 IBM SPSS Statistics 20（Duncan 法，$P<0.05$）进行显著性分析，采用 Design-Expert 8.0.5 软件进行 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 响应面试验设计。试验结果均以平均值±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 DLLME 条件优化

2.1.1 分散剂种类的选择 DLLME 过程中，分散剂不仅要与水混溶，且要在萃取剂中的溶解性良好[21]，使萃取剂能在水相中分散成均匀的细小液滴，增加与待测物的接触面积，从而提高萃取效率[22]。根据物理性质（偶极矩、密度和水溶性），考察了甲醇、乙腈和丙酮作为分散剂的性能。结果如图 1 所示，乙腈与丙酮的萃取效果相似，其中，乙腈相较于其他分散剂对 *L*(-)-乳酸乙酯和癸酸乙酯表现出良好的萃取能力。而对于其他目标化合物，甲醇较其他分散剂提取效果显著，且重复性好。因此，选择甲醇作为分散剂。

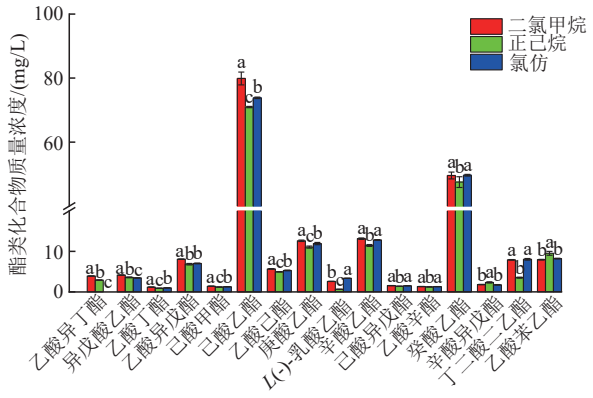


不同小写字母表示各水平间存在显著性差异（$P<0.05$）。

图 1 不同分散剂对 DLLME 萃取效率的影响

Fig. 1 Effects of different dispersants on the extraction efficiency of DLLME

2.1.2 萃取剂种类的选择 在 DLLME 过程中，萃取剂要求与分散剂混溶，不溶于水，然后通过离心将其从水溶液中分离；萃取剂需对待测物的溶解度高，并具有适应色谱分析的能力[22-23]，以此提高萃取效率。为选择合适的萃取剂，对二氯甲烷、正己烷和氯仿进行了测试和比较，结果见图 2。以正己烷为萃取剂时，得到的辛酸异戊酯和乙酸苯乙酯的质量浓度明显高于用其他萃取剂时所得的质量浓度。氯仿提取乙酸苯乙酯、辛酸乙酯、己酸异戊酯、乙酸辛酯、癸酸乙酯、辛酸异戊酯和丁二酸二乙酯的能力与二氯甲烷无显著差异。而从二氯甲烷萃取剂中得到的其他酯类化合物质量浓度均明显高于其他萃取剂中得到的。因此，二氯甲烷为最佳萃取剂。

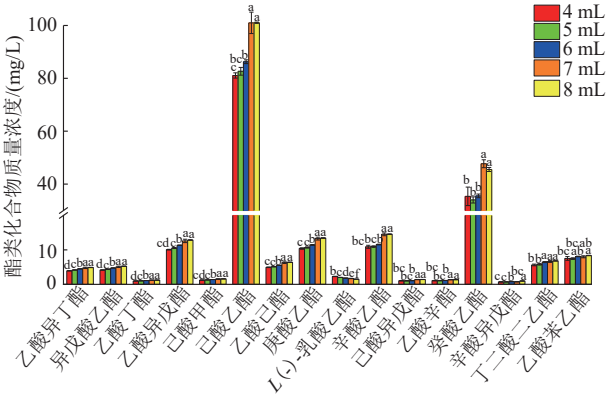


不同小写字母表示各水平间存在显著性差异（$P<0.05$）。

图 2 不同萃取剂对 DLLME 萃取效率的影响

Fig. 2 Effects of defferent extractants on the extraction efficiency of DLLME

2.1.3 样品体积的选择 样品体积是影响萃取效果的重要因素。以甲醇为分散剂，二氯甲烷为萃取剂，分别测试了 4、5、6、7、8 mL 的样品体积对 DLLME 萃取效率的影响。如图 3 所示，萃取剂体积不变，随着样品体积的增加，离心后的有机相中待测物的质量增加，待测物的质量浓度随之提高[19]。当样品体积从 7 mL 增加到 8 mL 时，各酯类化合物质量浓度的变化不显著。因此，选择 7 mL 样品体积进行后续试验。

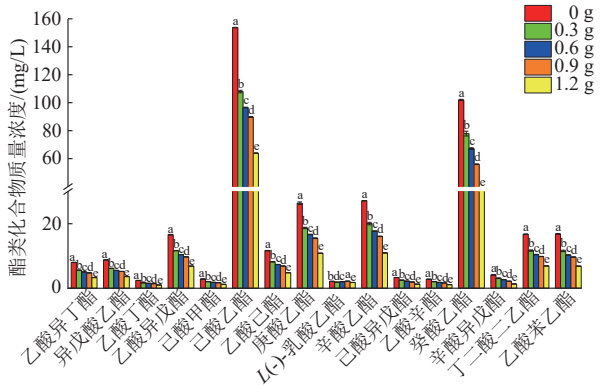


不同小写字母表示各水平间存在显著性差异（$P<0.05$）。

图 3 样品体积对 DLLME 萃取效率的影响

Fig. 3 Effects of sample volume on the extraction efficiency of DLLME

2.1.4　盐添加质量的选择　盐的加入会改变水溶液的离子强度和溶质溶解度，从而影响DLLME的萃取效率。通过在7 mL模拟酒酒样中分别加入0、0.3、0.6、0.9、1.2 g氯化钠，探究盐的添加对萃取效率的影响。如图4所示，随着盐添加质量的增加，酯类化合物的提取质量浓度逐渐降低。一般来说，随着离子强度的增加，分析物和有机萃取剂在水相中的溶解度降低，这有利于提高萃取率；同时，所得有机相的体积增加，有机相中待测物的质量浓度降低，富集倍数显著降低[21]。也可能是酯类化合物作为亲油性化合物，受氯化钠的影响，显示出相对较低的色谱响应[24]。一个例外是*L*(-)-乳酸乙酯，其质量浓度随着盐添加质量的增加整体呈先增大后降低的趋势。因此，在后续试验中选择不添加盐。



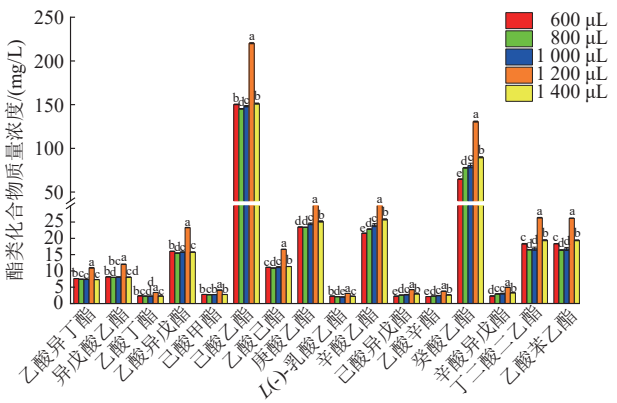
不同小写字母表示各水平间存在显著性差异（P<0.05）。

图4　盐添加质量对DLLME萃取效率的影响

Fig. 4　Effects of salt addition amounts on the extraction efficiency of DLLME

2.1.5　分散剂体积的选择　分散剂的用量直接影响三相萃取体系的形成和萃取剂在水中的分散程度，进而影响萃取效率[22]。为了评价分散剂体积对酯类化合物萃取性能的影响，比较了600、800、1 000、1 200、1 400 μL的甲醇对酯类化合物的萃取效率，结果如图5所示。多数酯类化合物的质量浓度随着分散剂体积的增加而增加，在1 200 μL时达到最大值。当分散剂体积大于1 200 μL时，酯类化合物质量浓度降低。这可能是因为使用过多分散剂会减少萃取剂中待测物的分布和传质，从而降低富集效率[25]。因此，选择分散剂甲醇的体积为1 200 μL。

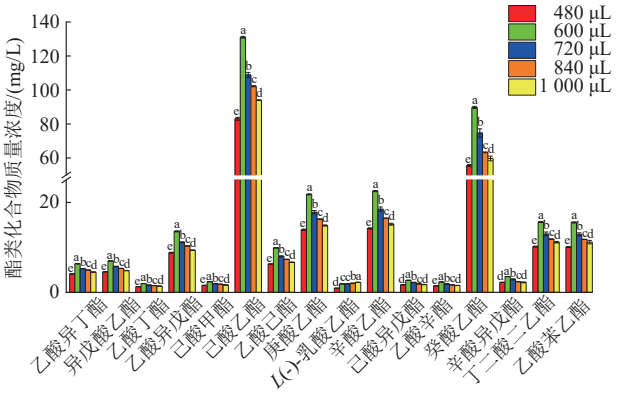
2.1.6　萃取剂体积的选择　萃取过程中所加萃取剂体积会直接影响方法的富集倍数。在水-甲醇分散剂体系中分别加入480、600、720、840、1 000 μL二氯甲烷，观察目标化合物提取量的变化，结果见图6。除*L*(-)-乳酸乙酯外，其他酯类化合物的质量浓度随着萃取剂体积的增加呈现先增加后减少的趋势，在600 μL处达到最大值。这是因为通过离心获得的有机相体积会随萃取剂体积增加而增加，这降低了有机相中待测物的质量浓度[21]。因此，选择600 μL为最佳萃取剂体积。



不同小写字母表示各水平间存在显著性差异（P<0.05）。

图5　分散剂体积对DLLME萃取效率的影响

Fig. 5　Effects of dispersant volumes on the extraction efficiency of DLLME



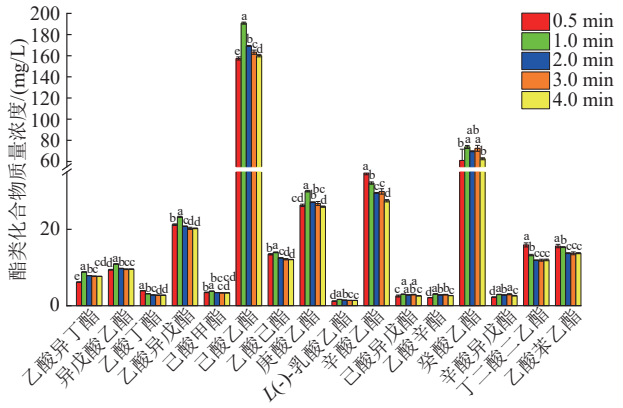
不同小写字母表示各水平间存在显著性差异（P<0.05）。

图6　萃取剂体积对DLLME萃取效率的影响

Fig. 6　Effects of extractant volumes on the extraction efficiency of DLLME

2.1.7　萃取时间的选择　在DLLME过程中，萃取时间会改变有机相液滴大小，从而影响萃取效率。在试验中，将萃取体系分别涡旋萃取0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 min。由图7可看出，涡旋萃取时间1.0 min能使大多数酯类化合物达到最佳萃取效果。由于

有机相在水中的溶解度较小，随着萃取时间的增加，体积较小的有机相液滴会有明显的损失[25]。因此，选择 1.0 min 为最佳萃取时间。



不同小写字母表示各水平间存在显著性差异（P<0.05）。

图 7　萃取时间对 DLLME 萃取效率的影响

Fig. 7　Effects of extraction time on the extraction efficiency of DLLME

2.2　Plackett-Burman 试验结果及分析

Plackett-Burman 试验设计在单因素试验结果的基础上，以酯类化合物的总质量浓度为响应值，对样品体积（X_1）、分散剂体积（X_2）、萃取剂体积（X_3）和萃取时间（X_4）4 个因素设最低（−1）和最高（1）两个水平进行显著性分析。Plackett-Burman 试验的因素和水平见表 1，设计结果及显著性分析分别见表 2 和表 3。如表 3 所示，分散剂体积对 DLLME 萃取效果影响极显著（P<0.01），萃取剂体积和萃取时间影响显著（P<0.05），而样品体积对其影响不显著。因此，选取分散剂体积、萃取剂体积和萃取时间 3 个因素进行 Box-Behnken 响应面优化。Box-Behnken 响应面试验中其他参数以单因素最优水平进行，即甲醇为分散剂、二氯甲烷为萃取剂、样品体积 7 mL、不添加盐。

2.3　响应面试验结果及分析

根据 Plackett-Burman 试验设计结果，选取分散剂体积、萃取剂体积和萃取时间进行三因素三水平的 Box-Behnken 响应面试验设计，各因素和水平见表 4。Box-Behnken 响应面试验设计结果见表 5，建立数学回归模型并进行方差分析（见表 6）。由表 6 可以看出，模型的 P<0.001，说明测试误差很小，模型具有很高的统计显著性，适合数据分析；失拟项 P 为 0.153 1，大于 0.05，无统计学意义，表明测试误差对模型无显著影响。回归方程的总决定系数 R^2 = 0.968 6，表明该模型与试验拟合良好；矫正决定系数 R^2_{Adj} 为 0.928 3，大于 0.9，反映了预测值与真实值的高度相关性，表明可用该模型对试验结果进行预测。经回归建模分析，最终得到的响应面回归方程为 Y=496.74+35.20A−15.10B+17.18C−15.89AB+6.99AC+65.24BC−51.72A^2−3.17B^2−33.94C^2。由回归分析结果可知，影响萃取效率的主次因素依次为：A 分散剂体积、B 萃取剂体积、C 萃取时间。方差分析的结果

表 1　Plackett-Burman 试验设计因素和水平

Table 1　Factors and levels of Plackett-Burman experimental design

水平	因素			
	X_1 样品体积/mL	X_2 分散剂体积/μL	X_3 萃取剂体积/μL	X_4 萃取时间/min
−1	6	1 000	480	0.5
1	8	1 400	720	2.0

表 2　Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 2　Experimental design and results of Plackett-Burman test

序号	X_1 样品体积/mL	X_2 分散剂体积/μL	X_3 萃取剂体积/μL	X_4 萃取时间/min	酯类化合物总质量浓度/（mg/L）
1	6	1 400	720	2.0	403.06
2	8	1 400	720	0.5	428.98
3	8	1 000	720	2.0	362.73
4	6	1 000	720	0.5	313.03
5	6	1 400	720	0.5	398.05
6	8	1 400	480	2.0	520.78
7	6	1 000	480	0.5	360.91
8	8	1 000	480	0.5	294.39
9	6	1 000	480	2.0	478.37
10	8	1 400	480	0.5	465.24
11	6	1 400	480	2.0	509.06
12	8	1 000	720	2.0	362.73

表 3　Plackett-Burman 试验设计的显著性分析

Table 3　Significance analysis of Plackett-Burman experimental design

因素	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	48 147.39	4	12 036.85	7.13	0.013 0	*
X_1	63.62	1	63.62	0.04	0.851 6	
X_2	25 484.73	1	25 484.73	15.09	0.006 0	**
X_3	10 809.33	1	10 809.33	6.40	0.039 2	*
X_4	11 789.72	1	11 789.72	6.98	0.033 3	*

注：*表示对结果影响显著（P<0.05），**表示对结果影响极显著（P<0.01）。

也显示了一次项A、交互项BC以及二次项A^2和B^2对结果影响极显著（$P<0.01$），B对结果影响显著（$P<0.05$），C、AB、AC、C^2对结果影响均不显著。

表4 Box-Behnken响应面试验设计因素和水平

Table 4 Factors and levels of Box-Behnken response surface experimental design

水平	因素		
	A分散剂体积/μL	B萃取剂体积/μL	C萃取时间/min
−1	1 000	480	0.5
0	1 200	600	1.0
1	1 400	720	2.0

表5 Box-Behnken响应面试验设计及结果

Table 5 Experimental design and results of Box-Behnken response surface test

序号	A分散剂体积/μL	B萃取剂体积/μL	C萃取时间/min	酯类化合物总质量浓度/（mg/L）
1	1 400	600	2.0	480.33
2	1 400	480	1.0	425.03
3	1 200	480	2.0	355.48
4	1 000	480	1.0	329.47
5	1 200	720	2.0	442.81
6	1 000	600	0.5	384.16
7	1 200	600	1.0	485.37
8	1 400	720	1.0	382.45
9	1 200	720	0.5	353.51
10	1 200	600	1.0	484.27
11	1 200	600	1.0	508.65
12	1 000	720	1.0	350.44
13	1 200	480	0.5	474.81
14	1 400	600	0.5	456.40
15	1 200	600	1.0	509.44
16	1 000	600	2.0	391.53
17	1 200	600	1.0	495.98

由Design-Expert 8.0.5软件绘制各因素间交互作用的3D响应面图，如图8所示。当萃取时间一定时，随着分散剂和萃取剂体积的增大，酯类化合物的总质量浓度呈先升高后降低的趋势，且等高线接近圆形，表明AB的交互作用对结果影响不显著；当萃取剂体积一定，在不同的萃取时间下，分散剂体积对酯类化合物的萃取效果影响较小，表明AC的交互作用对结果影响也不显著；而萃取时间和萃取剂体积之间的相互作用则较强，对酯类化合物的提取效果影响显著，且与表6的方差分析结果一致。

表6 Box-Behnken响应面试验设计方差分析

Table 6 Results of variance analysis of Box-Behnken response surface test

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	60 024.17	9	6 669.35	24.00	0.000 2	**
A	9 417.87	1	9 417.87	33.89	0.000 6	**
B	1 733.45	1	1 733.45	6.24	0.041 1	*
C	504.84	1	504.84	1.82	0.219 7	
AB	1 009.75	1	1 009.75	3.63	0.098 3	
AC	116.06	1	116.06	0.42	0.538 7	
BC	10 107.06	1	10 107.06	36.37	0.000 5	**
A^2	11 263.11	1	11 263.11	40.53	0.000 4	**
B^2	22 544.09	1	22 544.09	81.13	<0.000 1	**
C^2	1 145.38	1	1 145.38	4.12	0.081 9	
残差	1 945.06	7	277.87			
失拟项	1 356.70	3	452.23	3.07	0.153 1	不显著
纯误差	588.36	4	147.09			
总和	61 969.23	16				

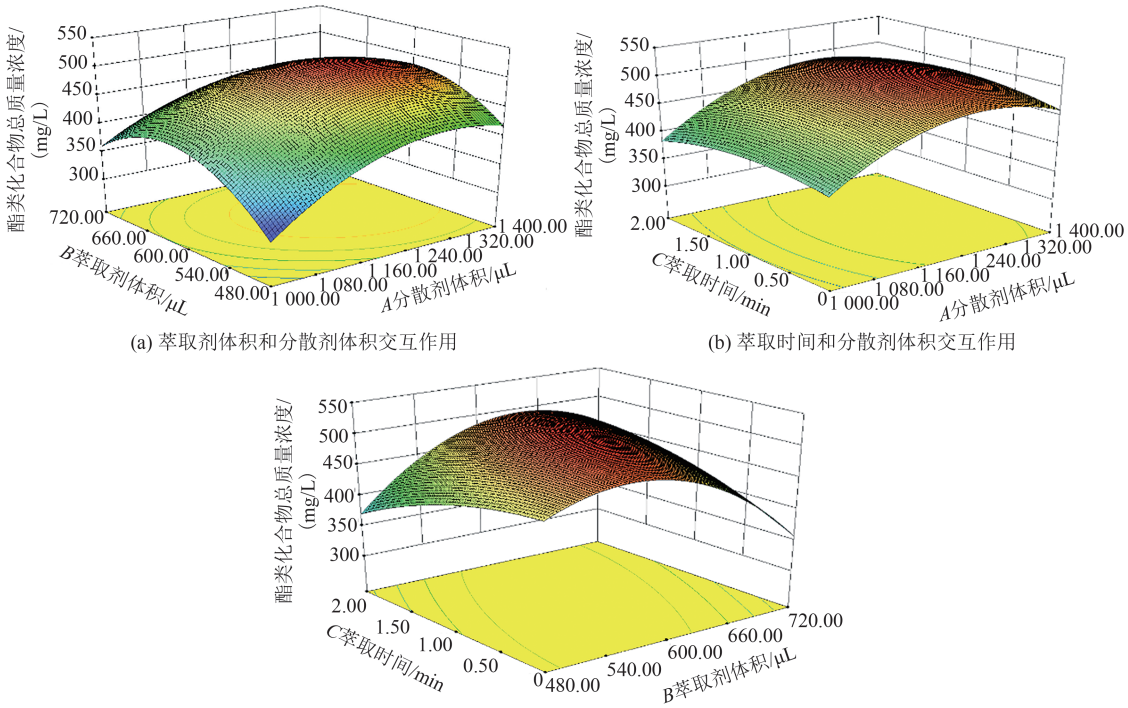
注：*表示对结果影响显著（$P<0.05$），**表示对结果影响极显著（$P<0.01$）。

对回归模型进行优化分析得到最优萃取条件为：分散剂体积1 272.34 μL、萃取剂体积597.29 μL、萃取时间1.27 min，预测此条件下萃取酯类化合物的总质量浓度为505.59 mg/L。考虑实际操作情况，将最优参数修订为分散剂体积1 200 μL、萃取剂体积600 μL、萃取时间1.0 min。在此条件下进行验证试验，得到酯类化合物的总质量浓度为496.74 mg/L，与预测值相对误差小于5%，证明Box-Behnken响应面试验设计的工艺优化方案准确可靠，可以满足葡萄酒中酯类化合物的萃取要求。

2.4 方法学验证

2.4.1 标准曲线、检测限和定量限的考察结果 采用上述最佳试验条件，通过分析含有已知各分析物的模拟溶液，绘制各酯类化合物的质量浓度与相应峰面积的标准曲线，考察线性系数。以3倍信噪比为检测限（LOD），10倍信噪比为定量限（LOQ）。各酯类化合物的标准曲线线性方程、相关系数、检测限、定量限以及曲线的线性范围如表7所示。在线性范围内，各酯类化合物的峰面积与质量浓度具有良好的线性关系，R^2（在0.995 4~0.999 4）均高于0.995，检测限和定量限范围分别为0.004~0.078 mg/L和0.012~0.261 mg/L。

2.4.2　加标回收率及精密度试验结果　对不同年份的‘黑比诺’干红葡萄酒（M-H-18、M-H-19和M-H-20）酒样进行3个质量浓度水平加标，按照上述最佳萃取条件进行加标酒样的测定分析。每个质量浓度样品3份，每份重复测定3次，并在一周内不同时间进行样品处理和分析，通过标准曲线定量后，参照文献



(a) 萃取剂体积和分散剂体积交互作用

(b) 萃取时间和分散剂体积交互作用

(c) 萃取时间和萃取剂体积交互作用

图 8　各因素间交互作用对DLLME萃取效率影响的3D响应面图

Fig. 8　3D response surface plots illustrating the interaction effects between various factors on the extraction efficiency of DLLME

表 7　建立的DLLME-GC-MS方法分析酯类化合物的标准曲线、检测限和定量限

Table 7　Standard curves, limits of detection, and limits of quantification for the analysis of ester compounds using the established DLLME-GC-MS method

酯类化合物	定性离子 *m/z*	标准曲线线性方程	相关系数 R^2	LOD/（mg/L）	LOQ/（mg/L）	线性范围/（μg/L）
乙酸异丁酯	43、56、73	y=8 155 331x−7 392 557	0.999 4	0.004	0.012	8~400
异戊酸乙酯	29、57、88	y=8 277 726x−8 037 797	0.996 8	0.037	0.122	9~450
乙酸丁酯	43、56、73	y=3 018 336x−2 179 054	0.997 0	0.008	0.027	2.4~120.0
乙酸异戊酯	43、55、70	y=15 927 476x−17 326 652	0.995 4	0.060	0.201	9~900
己酸甲酯	74、87、99	y=3 119 879x−2 277 730	0.996 4	0.043	0.143	2~100
己酸乙酯	71、88、99	y=96 483 692x−105 043 104	0.997 8	0.078	0.261	35~7 000
乙酸己酯	43、56、84	y=11 218 204x−10 561 897	0.998 5	0.037	0.123	10~500
庚酸乙酯	29、43、88	y=12 759 228x−12 522 485	0.997 7	0.056	0.188	10~1 000
L(-)-乳酸乙酯	29、45、75	y=1 830 909x−1 242 344	0.998 2	0.011	0.038	16~800
辛酸乙酯	57、88、101	y=7 667 634x−6 120 030	0.997 2	0.004	0.014	10~1 000
己酸异戊酯	43、70、99	y=575 274x−450 518	0.997 4	0.050	0.166	2~100
乙酸辛酯	43、56、70	y=793 921x−35 049	0.997 1	0.038	0.125	2~100
癸酸乙酯	29、88、101	y=2 501 581x+1 133 619	0.999 2	0.013	0.044	15~3 000
辛酸异戊酯	43、70、127	y=736 741x−161 420	0.996 2	0.038	0.127	2~100
丁二酸二乙酯	29、101、129	y=15 290 597x−15 130 102	0.997 5	0.011	0.035	4~400
乙酸苯乙酯	43、91、104	y=13 348 257x−14 104 700	0.998 5	0.025	0.083	2~400

[18]的方法计算加标回收率和日内、日间相对标准偏差（n=9），结果见表8。加标回收率为83.3%~111.3%，日内和日间相对标准偏差为0.02%~7.69%，表明该方法的准确度高，精密度良好，能够满足分析要求。

表8 建立的DLLME-GC-MS方法加标回收率及精密度试验结果

Table 8 Results of the spiked recovery and precision tests using the established DLLME-GC-MS method

酯类化合物	添加质量浓度/（mg/L）	M-H-18			M-H-19			M-H-20		
		加标回收率/%	RSD/%		加标回收率/%	RSD/%		加标回收率/%	RSD/%	
			日内	日间		日内	日间		日内	日间
乙酸异丁酯	10	96.2	0.31	1.84	98.3	0.70	2.39	102.0	0.02	1.38
	40	104.0	0.24	1.62	86.8	1.19	2.31	100.7	0.14	1.37
	80	111.3	0.44	1.38	99.8	0.48	4.72	101.9	3.21	2.43
异戊酸乙酯	10	103.0	1.83	3.90	83.3	1.33	2.24	90.2	0.34	7.69
	40	101.0	0.32	2.70	97.9	0.75	2.44	96.0	1.09	3.50
	80	98.6	0.71	1.23	103.0	0.54	0.63	100.0	0.24	0.22
乙酸丁酯	10	106.0	0.43	3.22	93.9	1.05	2.56	98.5	0.28	2.75
	40	98.2	0.92	2.00	101.0	0.18	0.53	107.0	0.29	5.65
	80	94.7	0.95	1.06	99.7	0.41	2.50	101.0	0.36	0.38
乙酸异戊酯	10	106.0	0.90	3.31	91.2	0.93	2.07	98.5	0.48	4.01
	40	103.8	0.56	2.23	105.0	0.57	0.44	91.9	0.52	2.27
	80	100.1	1.08	5.98	98.9	0.26	2.46	99.9	0.12	1.71
己酸甲酯	10	86.8	0.98	6.37	108.0	5.13	4.95	105.3	1.37	1.46
	40	102.0	1.52	4.11	109.0	1.02	1.97	92.3	0.94	2.64
	80	101.0	1.37	0.98	96.2	0.63	3.91	100.0	2.40	1.43
己酸乙酯	10	91.6	3.63	5.12	108.0	0.42	1.93	96.0	1.54	7.22
	40	102.0	4.02	5.57	98.2	0.42	1.26	99.9	1.00	1.09
	80	95.3	1.44	1.02	102.0	0.02	0.12	99.2	0.18	2.86
乙酸己酯	10	92.2	0.35	0.50	94.9	0.38	2.82	109.0	1.18	7.39
	40	109.0	3.61	3.54	95.0	0.92	2.18	101.3	1.70	2.63
	80	94.0	0.61	0.44	94.4	0.24	2.64	98.8	0.60	2.35
庚酸乙酯	10	100.0	0.39	3.12	107.0	1.00	2.24	102.0	5.17	4.65
	40	99.4	1.25	1.00	98.9	0.42	1.14	110.0	0.32	1.66
	80	102.0	0.75	0.56	101.0	0.37	0.93	98.6	0.44	0.42
L(-)-乳酸乙酯	10	101.0	0.77	1.24	96.0	1.30	1.98	106.0	0.50	1.22
	40	95.8	0.07	1.16	98.2	0.85	2.75	102.0	0.16	1.00
	80	94.6	1.23	0.87	100.0	0.14	0.73	97.7	0.81	1.58
辛酸乙酯	10	109.0	0.60	6.37	103.0	0.32	4.39	103.0	2.70	2.97
	40	104.0	4.67	3.48	105.0	0.15	2.96	102.0	0.19	1.54
	80	100.9	0.62	0.75	100.0	0.81	3.92	98.2	0.67	3.86
己酸异戊酯	10	102.4	5.88	6.80	94.2	0.27	1.26	100.0	2.17	5.13
	40	100.2	1.19	1.03	98.0	0.28	3.47	107.0	0.04	1.82
	80	97.6	0.42	0.46	95.1	0.29	2.21	100.1	0.50	0.46
乙酸辛酯	10	96.4	2.12	4.39	94.9	0.32	2.35	110.0	2.86	2.05
	40	99.3	6.05	6.59	98.6	0.25	3.92	106.2	0.09	4.34
	80	101.0	0.85	0.65	110.0	0.06	3.50	99.8	0.62	1.25
癸酸乙酯	10	93.4	2.38	6.29	90.5	5.35	5.09	107.0	2.03	3.48
	40	102.0	3.79	2.22	95.7	0.25	1.05	104.0	0.42	1.07
	80	103.0	1.52	1.25	97.9	6.33	2.08	94.3	0.80	1.29

续表

酯类化合物	添加质量浓度/（mg/L）	M-H-18			M-H-19			M-H-20		
		加标回收率/%	RSD/%		加标回收率/%	RSD/%		加标回收率/%	RSD/%	
			日内	日间		日内	日间		日内	日间
辛酸异戊酯	10	96.1	0.29	2.41	109.0	0.46	0.77	97.7	2.80	4.65
	40	100.0	0.19	2.82	97.7	0.20	2.00	98.6	0.17	1.97
	80	97.1	1.11	0.93	102.0	1.62	1.05	103.0	0.69	1.75
丁二酸二乙酯	10	99.0	0.36	3.02	90.8	0.29	1.72	97.5	0.41	1.05
	40	91.1	6.44	4.68	88.6	1.74	3.39	102.0	0.70	1.28
	80	88.7	1.64	1.17	100.0	0.49	4.29	98.2	2.63	2.78
乙酸苯乙酯	10	103.0	5.28	6.11	97.9	1.75	2.12	88.3	3.61	5.29
	40	93.8	5.74	6.80	89.3	2.07	1.82	104.0	0.52	0.87
	80	102.0	2.31	3.59	101.0	0.03	1.25	95.8	3.00	2.97

2.5 实际样品测定

将上述优化的DLLME方法应用于3个连续年份的‘黑比诺’干红葡萄酒和‘贵人香’冰白葡萄酒实际酒样测定，并进行GC-MS分析。结果如表9和表10所示，6个酒样中共检出6种乙酸酯、13种乙基酯（7种短链脂肪酸乙酯、6种中链脂肪酸乙酯）及6种其他酯类化合物。乙酸异戊酯、乙酸异丁酯是主要的乙酸酯，且阈值低，呈现苹果、香蕉、梨和甜味等，‘黑比诺’干红葡萄酒中乙酸酯仅3种，3个年份酒样的总质量浓度呈先升高后降低的趋势，‘贵人香’冰白葡萄酒中乙酸酯的质量浓度在新酒（2020年酿制）中较高，在2018年酒中较低。丁酸乙酯、*L*(-)-乳酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯等是主要的乙基酯，赋予酒体绿色水果及花香味。两款酒中短链脂肪酸乙酯总质量浓度均在2019年最高，其次是2018年和2020年，而中链脂肪酸乙酯在新酒中的总质量浓度较高，‘黑比诺’干红葡萄酒中2020年最高，2018年最低，‘贵人香’冰白葡萄酒中随年份呈先下降后升高的趋势，且显著高于‘黑比诺’干红葡萄酒中的质量浓度，使酒体更具花果香气。其他酯类化合物主要包括具有奶油和花果香的丁二酸二乙酯，在两款酒中的质量浓度均在2018年最高，2020年最低，且‘黑比诺’干红葡萄酒中质量浓度显著高于‘贵人香’冰白葡萄酒，‘贵人香’冰白葡萄酒中未检出水杨酸甲酯和乳酸丁酯。

表9 实际葡萄酒酒样中酯类化合物的测定

Table 9 Determination of ester compounds in real wine samples

类别	序号	酯类化合物	阈值/（μg/L）	香气描述	质量浓度/（μg/L）					
					M-H-18	M-H-19	M-H-20	M-B-18	M-B-19	M-B-20
乙酸酯	A1	乙酸丙酯	363	芹菜、花卉、梨、红色水果	—	—	—	87.43±0.00^{b}	61.08±0.00^{c}	171.53±0.00^{a}
	A2	乙酸异丁酯	21.1	苹果、香蕉、花卉、香草、梨汁	112.66±0.01^{c}	1 389.36±0.00^{a}	125.32±0.00^{b}	63.64±0.00^{c}	80.63±0.00^{b}	149.29±0.00^{a}
	A3	乙酸丁酯	0.01	苹果、香蕉、辛辣、甜味	—	—	—	—	13.21±0.00^{b}	28.26±0.00^{a}
	A4	乙酸异戊酯	1.95	苹果、香蕉、梨、甜味	724.70±0.01^{b}	739.04±0.00^{a}	718.55±0.00^{c}	1 834.35±0.05^{c}	2 715.67±0.03^{b}	8 633.75±0.15^{a}
	A5	乙酸己酯	73.7	苹果、香蕉、糖果、草、药草	—	—	—	75.23±0.30^{c}	170.14±0.00^{b}	885.48±0.01^{a}
	A6	乙酸苯乙酯	480	花卉、水果、蜂蜜、玫瑰、烟草	50.94±0.01^{b}	85.73±0.02^{a}	—	231.74±0.08^{c}	836.66±0.67^{b}	1 783.78±0.79^{a}
乙基酯 短链脂肪酸乙酯	B1	丙酸乙酯	10	苹果、香脂、菠萝、朗姆酒、草莓	367.47±0.00^{a}	293.65±0.00^{b}	168.64±0.00^{c}	240.60±0.01^{a}	180.48±0.00^{b}	173.31±0.00^{c}
	B2	异丁酸乙酯	25	苹果、花卉、草莓、甜味、热带水果	277.14±0.00^{a}	228.35±0.00^{b}	136.49±0.00^{c}	150.20±0.00^{a}	115.22±0.00^{b}	62.04±0.00^{c}

续表

类别		序号	酯类化合物	阈值/（μg/L）	香气描述	质量浓度/（μg/L）					
						M-H-18	M-H-19	M-H-20	M-B-18	M-B-19	M-B-20
乙基酯	短链脂肪酸乙酯	B3	丁酸乙酯	22.9	苹果、香蕉、黄油、绿色水果、菠萝	1 259.88±0.01^{b}	—	1 307.64±0.00^{a}	836.62±0.44^{c}	1 143.77±0.01^{b}	1 315.75±0.00^{a}
		B4	2-甲基丁酸乙酯	11.7	苹果、水果、猕猴桃、草莓	59.87±0.00	—	—	41.80±0.01^{a}	32.56±0.00^{b}	—
		B5	异戊酸乙酯	1	苹果、柑橘、菠萝、酸味、甜味	600.15±0.01^{b}	950.26±0.01^{a}	—	38.35±0.00^{a}	25.37±0.00^{b}	—
		B6	丙酮酸乙酯			—	—	—	55.71±0.00^{a}	55.87±0.00^{a}	24.79±0.00^{b}
		B7	*L*(-)-乳酸乙酯		黄油、奶油、花卉、水果、甜味	38 959.01±0.31^{b}	48 279.70±0.60^{a}	30 689.14±0.10^{c}	1 459.67±0.08^{b}	1 709.76±0.03^{a}	537.68±0.00^{c}
	中链脂肪酸乙酯	C1	己酸乙酯	18.1	熟苹果、香蕉、白兰地、奶酪	1 124.61±0.11^{a}	961.23±0.01^{bc}	963.30±0.00^{b}	1 899.27±0.18^{b}	1 382.74±0.01^{c}	2 281.70±0.04^{a}
		C2	庚酸乙酯	2	白兰地、水果、葡萄酒	35.39±0.15	—	—	—	—	—
		C3	辛酸乙酯	194	杏、香蕉、白兰地、梨	1 015.02±0.03^{a}	950.38±0.01^{c}	959.61±0.01^{b}	2 944.39±0.04^{b}	1 886.10±0.02^{c}	3 745.93±0.12^{a}
		C4	癸酸乙酯	6 300	白兰地、焦糖、葡萄、坚果、梨	—	—	256.44±0.01	1 007.99±0.00^{b}	445.12±0.00^{c}	1 513.43±0.09^{a}
		C5	月桂酸乙酯	5 900	花卉、水果、青苹果、叶子、坚果	—	—	—	195.68±0.00^{a}	—	170.25±0.02^{b}
		C6	香草酸乙酯	990	花果、甜味、香草	—	985.50±0.03^{b}	1 785.00±0.77^{a}	—	85.30±0.08	—
其他酯类		D1	丁酸甲酯	59	苹果、香蕉、奶酪、花卉	70.17±0.00^{b}	69.08±0.00^{bc}	75.55±0.00^{a}	81.30±0.00^{a}	66.42±0.00^{b}	63.52±0.00^{c}
		D2	3-羟基丁酸乙酯	20 000	花卉、新鲜、水果、百香果、橡胶	241.73±0.02^{a}	—	32.69±0.00^{b}	395.06±0.00^{a}	228.55±0.00^{c}	368.28±0.01^{b}
		D3	乳酸异戊酯			724.89±0.21^{b}	886.72±0.01^{a}	232.67±0.23^{c}	—	33.10±0.01	—
		D4	丁二酸二乙酯	100 000	棉花、奶油、花卉、水果、葡萄酒	34 934.56±0.28^{a}	22 317.94±0.16^{b}	16 011.11±0.05^{c}	15 352.20±0.00^{a}	2 817.59±0.01^{b}	850.03±0.00^{c}
		D5	水杨酸甲酯	40	杏仁、焦糖、药物、薄荷	—	54.05±0.00^{a}	39.27±0.00^{b}	—	—	—
		D6	乳酸丁酯			122.78±0.00^{c}	186.38±0.00^{a}	124.10±0.00^{b}	—	—	—

注：空白表示未查到相关物质阈值及香气描述；—表示未检测到该物质；不同小写字母表示同一品种不同年份间的差异显著（P<0.05）。

表10　实际葡萄酒酒样中各酯类化合物的质量浓度

Table 10　The mass concentrations of various ester compounds in real wine samples

类别		质量浓度/（μg/L）					
		M-H-18	M-H-19	M-H-20	M-B-18	M-B-19	M-B-20
乙酸酯		888.30^{b}	2 214.10^{a}	843.86^{c}	2 292.39^{c}	3 877.39^{b}	11 652.09^{a}
乙基酯	短链脂肪酸乙酯	41 523.53^{b}	49 751.97^{a}	32 301.91^{c}	2 858.95^{b}	3 263.02^{a}	2 113.58^{c}
	中链脂肪酸乙酯	2 175.02^{c}	2 897.11^{b}	3 964.34^{a}	6 047.33^{b}	3 799.26^{c}	7 711.30^{a}
其他酯类		36 094.13^{a}	23 514.17^{b}	16 282.72^{c}	15 828.56^{a}	3 145.66^{b}	1 281.83^{c}

注：不同小写字母表示同一品种不同年份间的差异显著（P<0. 05）。

2.6 讨论

DLLME基于“相似相溶”原理，使分析物在微体积的有机溶剂中分配平衡，实现目标化合物的萃取、富集和浓缩，是近年来新兴的样品制备技术。Zhou等采用DLLME、顶空-固相微萃取（HS-SPME）和静态顶空（SHS）3种萃取方法与GC-MS结合测定黄酒中的主要高级醇，结果表明，3种方法的准确度均较高，DLLME的重复性最好，且总离子流图中化合物的分离度和峰形更佳[14]。在DLLME过程中，由于萃取剂的用量很小，因此需要萃取剂对目标化合物具有良好的溶解效果。二氯甲烷作为传统方法（LLE、SPE等）中最常使用的萃取剂，对中等极性化合物的提取具有良好效果，也广泛用于DLLME方法中。本试验结果也表明，二氯甲烷作为萃取剂时效果最佳，与其他研究中观察到的结果一致[14,18,20]，且其用量远远低于LLE和SPE[9-10]。然而，微量二氯甲烷依然具有毒性，存在污染环境的潜在可能，未来应进一步开发绿色环保的替代试剂[23,26]。

分散剂也是影响DLLME萃取效果的重要因素，分散剂的使用增加了萃取剂和分析物在水相中的溶解度，提高萃取效率的同时缩短了平衡时间，常用的分散剂包括甲醇、丙酮、乙腈及四氢呋喃等[26]。Fontana等以$CHCl_3$为萃取剂，采用DLLME-GC-MS方法测定果渣白兰地中挥发性和半挥发性化合物，并对甲醇、丙酮和乙腈3种分散剂进行了优化，结果表明乙腈作为分散剂时萃取效果最好[24]。但本试验结果表明，甲醇是葡萄酒样品中提取酯类化合物的最佳分散剂。萃取时间是指从萃取剂和分散剂注入水相到混合物开始离心的时间[27]，与传统液液萃取法相比，DLLME所需要的萃取时间更短，效率更高。有研究表明萃取时间在20~40 s的萃取效果较好[13,20]，与本研究中的结果（1.0 min）接近。

葡萄酒中酯类化合物的含量和种类受葡萄品种、产地、发酵条件和陈酿工艺等因素的影响[4-8]。在陈酿过程中，葡萄酒中酯类化合物的合成和水解反应共同赋予葡萄酒复杂的陈酿香气。有研究者在关于酵母、葡萄品种和陈酿时间对‘贵人香’起泡葡萄酒品质影响的研究中发现，随着陈酿时间的延长，葡萄酒中蛋白质、氨基酸、多糖等化学成分的改变会导致酒样中乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯等高级醇乙酸酯和小分子乙酯的含量降低，丁二酸二乙酯等大分子支链脂肪酸乙酯的含量增加[28-29]，这与本试验在实际样品中的测定结果相似。丁酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯等的变化趋势与郭松年等[30]在不同年份‘赤霞珠’干红葡萄酒中的研究结果相似，表明香气特征与年份相关。Sumby等研究阐明了葡萄酒中主要的酯类化合物在陈酿时期的降解形成与酵母细胞自溶释放胞内酶有关[31]。左俊伟等发现宁夏产区‘贵人香’干白葡萄酒经陈酿后具有香蕉、椰子等热带水果及奶酪等乳制品的特征香气，此类香气与乙酸苯乙酯、庚酸乙酯等有关，而且乙酸己酯、2-甲基丁酸乙酯在‘贵人香’干白葡萄酒酒样中含量都较高，表现出青苹果、愉快的水果香等特点[32]，与本试验‘贵人香’冰白葡萄酒的结果一致。此外，本试验‘黑比诺’干红葡萄酒中具有香气活性的癸酸乙酯只在2020年酿造的酒样中检测到，而其在3个年份的‘贵人香’冰白葡萄酒中均检测到，2020年最高，2019年最低；且乙酸丁酯、乙酸己酯、庚酸乙酯分别只在‘贵人香’冰白葡萄酒和‘黑比诺’干红葡萄酒中检出，这可能与原料品种、酿造和陈酿工艺有关[33]。

3 结论

葡萄酒中酯类化合物DLLME的最佳萃取条件为：1 200 μL甲醇分散剂、600 μL二氯甲烷萃取剂、7 mL酒样、不添加盐、涡旋萃取1.0 min，影响萃取效果的主要因素有分散剂体积、萃取剂体积和萃取时间。方法学验证结果表明该方法的线性良好、精密度高且定量准确。

对3个连续年份的‘黑比诺’干红葡萄酒和‘贵人香’冰白葡萄酒分析表明，酯类化合物的种类和含量与酒样类型密切相关。‘黑比诺’干红葡萄酒中的短链脂肪酸乙酯和其他酯类化合物质量浓度较高，‘贵人香’冰白葡萄酒中的乙酸酯和中链脂肪酸乙酯质量浓度较高。随着陈酿年份的增加，两种酒样中其他酯类化合物质量浓度呈升高趋势，短链脂肪酸乙酯质量浓度呈先升高后降低趋势；‘贵人香’冰白葡萄酒中乙酸酯质量浓度和‘黑比诺’干红葡萄酒中中链脂肪酸乙酯质量浓度呈降低趋势。

参考文献

[1] 周继亘，杨学山，祝霞，等．不同浸渍工艺对‘赤霞珠’干红葡萄酒香气的影响[J]．食品与生物技术学报，2019，38(9)：50-59．
ZHOU J G，YANG X S，ZHU X，et al．Influence of different impregnation process of ‘Cabernet Sauvignon’ dry red wine aroma[J]．Journal of Food Science and Biotechnology，2019，38(9)：50-59．(in Chinese)

[2] ARCARI S G，CALIARI V，SGANZERLA M，et al．Volatile composition of Merlot red wine and its contribution to the aroma：optimization and validation of analytical method[J]．Talanta，2017，174：752-766．

[3] LAMBRECHTS M G，PRETORIUS I S．Yeast and its importance to wine aroma：a review[J]．South African Journal of Enology & Viticulture，2019，21(1):97-129．

[4] DE-LA-FUENTE-BLANCO A，SÁENZ-NAVAJAS M P，VALENTIN D，et al．Fourteen ethyl esters of wine can be replaced by simpler ester vectors without compromising quality but at the expense of increasing aroma concentration[J]．Food Chemistry，2020，307：125553．

[5] 朱子健，陈思雨，粟俊，等．刺葡萄酒酒精发酵过程中氨基酸组成与果香酯类物质生成的关联分析[J]．中国农业科学，2020，53(11)：2272-2284．
ZHU Z J，CHEN S Y，SU J，et al．Correlation analysis between amino acids and fruity esters during spine grape fermentation[J]．Scientia Agricultura Sinica，2020，53(11)：2272-2284．(in Chinese)

[6] IZQUIERDO C P M，GARCÍA R E，GÓMEZ A S，et al．Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation[J]．Journal of Food Composition and Analysis，2008，21(8)：724-730．

[7] SAERENS S M，DELVAUX F，VERSTREPEN K J，et al．Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation[J]．Applied and Environmental Microbiology，2008，74(2)：454-461．

[8] 刘迪，张也，兰义宾，等．干白葡萄酒瓶储过程香气物质变化及其与感官品质演变的相关性[J]．中国食品学报，2017，17(4)：228-240．
LIU D，ZHANG Y，LAN Y B，et al．Evolution of volatile compounds and sensory in bottled white wines and their correspondence[J]．Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2017，17(4)：228-240．(in Chinese)

[9] 曾游，丁怡，彭程．一种液液萃取测定葡萄酒中主要挥发性成分的快速定量分析方法[J]．现代食品科技，2014，30(6)：281-288．
ZENG Y，DING Y，PENG C．A method for fast quantitative analysis of major wine volatile compounds based on liquid-liquid extraction[J]．Modern Food Science and Technology，2014，30(6)：281-288．(in Chinese)

[10] HERNANZ D，GALLO V，RECAMALES Á F，et al．Comparison of the effectiveness of solid-phase and ultrasound-mediated liquid-liquid extractions to determine the volatile compounds of wine[J]．Talanta，2008，76(4)：929-935．

[11] MUÑOZ-REDONDO J M，RUIZ-MORENO M J，PUERTAS B，et al．Multivariate optimization of headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of terpenoids in sparkling wines[J]．Talanta，2020，208：120483．

[12] MARÍN-SAN R S，RUBIO-BRETÓN P，PÉREZ-ÁLVAREZ E P，et al．Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds[J]．Food Research International，2020，137：109712．

[13] JOFRÉ V P，ASSOF M V，FANZONE M L，et al．Optimization of ultrasound assisted-emulsification-dispersive liquid-liquid microextraction by experimental design methodologies for the determination of sulfur compounds in wines by gas chromatography-mass spectrometry[J]．Analytica Chimica Acta，2010，683(1)：126-135．

[14] ZHOU Z L，NI W，JI Z W，et al．Development of a rapid method for determination of main higher alcohols in fermented alcoholic beverages based on dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]．Food Analytical Methods，2020，13(3)：591-600．

[15] 孙细珍，熊亚青，唐娟，等．液液微萃取结合气相色谱-串联质谱测定饮料酒中挥发性酚类化合物[J]．食品与发酵工业，2022，48(3)：257-265．
SUN X Z，XIONG Y Q，TANG J，et al．Analysis of phenols in alcoholic beverages by liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]．Food and Fermentation Industries，2022，48(3)：257-265．(in Chinese)

[16] REZAEE M，ASSADI Y，MILANI H M R，et al．Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction[J]．Journal of Chromatography A，2006，1116(1/2)：1-9．

[17] CABARCOS-FERNÁNDEZ P，TABERNERO-DUQUE M J，ÁLVAREZ-FREIRE I，et al．Determination of seven antidepressants in pericardial fluid by means of dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]．Journal of Analytical Toxicology，2022，46(2)：146-156．

[18] BERGLER G，NOLLEAU V，PICOU C，et al．Dispersive

liquid-liquid microextraction for the quantitation of terpenes in wine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2020，68(47)：13302-13309.

[19] 倪伟，周志磊，姬中伟，等. 分散液液微萃取和气质联用测定葡萄酒中的主要高级醇[J]. 食品科技，2018，43(6)：283-291.
NI W，ZHOU Z L，JI Z W，et al. Determination of higher alcohols in wine by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Science and Technology，2018，43(6)：283-291. (in Chinese)

[20] 范三红，李颖星，白宝清. 涡旋辅助分散液液微萃取-气相色谱法测定清香型白酒中5种高级醇[J]. 中国酿造，2020，39(4)：194-200.
FAN S H，LI Y X，BAI B Q. Determination of 5 higher alcohols in light-flavor Baijiu by vortex-assisted dispersion liquid-liquid microextraction-gas chromatography[J]. China Brewing，2020，39(4)：194-200. (in Chinese)

[21] SERESHTI H，KHORRAM P，NOURI N. Recent trends in replacement of disperser solvent in dispersive liquid-liquid microextraction methods[J]. Separation & Purification Reviews，2019，48(2)：159-178.

[22] ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK A，GRZEŚKOWIAK T. Dispersive liquid-liquid microextraction[J]. Trends in Analytical Chemistry，2011，30(9)：1382-1399.

[23] TAN Y H，CHAI M K，WONG L S. A review on extraction solvents in the dispersive liquid-liquid microextraction[J]. Malaysian Journal of Analytical Sciences，2018，22(2):166-174.

[24] FONTANA A，RODRÍGUEZ I，CELA R. Dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography accurate mass spectrometry for extraction and non-targeted profiling of volatile and semi-volatile compounds in grape marc distillates[J]. Journal of Chromatography A，2018，1546：36-45.

[25] MAKAHLEH A，YAP H F，SAAD B. Vortex-assisted liquid-liquid-liquid microextraction (VALLLME) technique：a new microextraction approach for direct liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis[J]. Talanta，2015，143：394-401.

[26] YILMAZ E，SOYLAK M. Latest trends，green aspects，and innovations in liquid-phase-based microextraction techniques：a review[J]. Turkish Journal of Chemistry，2016，40：868-893.

[27] MATIAS-GUIU P，RODRÍGUEZ-BENCOMO J J，PÉREZ-CORREA J R，et al. Aroma profile design of wine spirits：multi-objective optimization using response surface methodology[J]. Food Chemistry，2018，245：1087-1097.

[28] 马腾臻，鲁榕榕，浩楠，等. 酵母菌株及陈酿时间对‘贵人香’起泡葡萄酒品质的影响[J]. 食品与发酵科技，2018，54(6)：26-35.
MA T Z，LU R R，HAO N，et al. Effects of yeast strains and aging on lees on the quality of Italian ‘Riesling’ sparkling wine[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology，2018，54(6)：26-35. (in Chinese)

[29] PÉREZ-MAGARIÑO S，ORTEGA-HERAS M，BUENO-HERRERA M，et al. Grape variety，aging on lees and aging in bottle after disgorging influence on volatile composition and foamability of sparkling wines[J]. LWT - Food Science and Technology，2015，61(1)：47-55.

[30] 郭松年，孙海燕，房俊芳，等. 气质联用仪对不同年份‘赤霞珠’干红葡萄酒香气的测定分析[J]. 保鲜与加工，2018，18(4)：101-107.
GUO S N，SUN H Y，FANG J F，et al. Detection and analysis of the aroma of ‘Cabernet Sauvignon’ dry red wine in different years by GC-MS[J]. Storage and Process，2018，18(4)：101-107. (in Chinese)

[31] SUMBY K M，GRBIN P R，JIRANEK V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects[J]. Food Chemistry，2010，121(1): 1-16.

[32] 左俊伟，亓相媛，赵彩云，等. 宁夏贺兰山东麓产区‘霞多丽’‘贵人香’干白葡萄酒香气成分分析[J]. 食品与发酵工业，2016，42(10)：149-155.
ZUO J W，QI X Y，ZHAO C Y，et al. Analysis on aroma composition in ‘Chardonnay’ and ‘Riesling’ dry white wines from eastern region of Ningxia Helan mountain[J]. Food and Fermentation Industries，2016，42(10)：149-155. (in Chinese)

[33] 韦广鑫，杨笑天，周永文，等. 葡萄酒中酯类化合物研究进展[J]. 食品工业科技，2015，36(14)：394-399.
WEI G X，YANG X T，ZHOU Y W，et al. Review on research progress of esters in wine[J]. Science and Technology of Food Industry，2015，36(14)：394-399. (in Chinese)

（责任编辑：许艳超）