

## 不同香型白酒中2-羟基-3-甲基丁酸乙酯对映体的分布及感官特性

余成霞<sup>1</sup>,朱建猛<sup>2</sup>,王超<sup>2</sup>,顾莎莎<sup>2</sup>,韦朝阳<sup>1</sup>,邱树毅<sup>1</sup>,戴怡凤<sup>1,3\*</sup>

(1.贵州大学 酿酒与食品工程学院 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室,贵州 贵阳 550025;

2.贵州贵酒集团有限公司,贵州 贵阳 550020;3.北京工商大学 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心,北京 100048)

**摘要:**该研究利用液液萃取(LLE)结合气相色谱(GC)和手性气相色谱-质谱(Chiral-GC-MS)分析白酒中2-羟基-3-甲基丁酸乙酯(E2H3MB),优化其气相色谱分析条件,对12种香型白酒中E2H3MB对映体分布情况进行探究,并利用三点选配(3-AFC)阈值测定方法,评估E2H3MB对映体在纯水和体积分数46%乙醇溶液中的嗅觉阈值及感官特征。结果表明,CYCLOSIL-B色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)对E2H3MB分离效果良好,升温速率1.5 °C/min,载气流速为1.0 mL/min时,E2H3MB对映体分离情况最佳,分离度(R)=5.0>1.5。除了米香型、清香型以及豉香型白酒,其他香型白酒中均只检测到(R)-构型E2H3MB((R)-E2H3MB),且同一香型白酒中(R)-E2H3MB含量存在显著差异(P<0.05)。感官特征结果表明,在纯水和体积分数46%乙醇溶液中,(R)-E2H3MB嗅觉阈值分别是(S)-构型E2H3MB((S)-E2H3MB)的2.1倍左右((R)-构型38 μg/L;(S)-构型18 μg/L)和1.9倍左右((R)-构型322 mg/L;(S)-构型173 mg/L),两种构型均表现出令人愉悦的甜香以及果香。该研究结果有助于白酒风味轮的细化,为研究白酒中手性风味物质对映体的分布提供参考依据,丰富人们对白酒中手性风味物质的认识。

**关键词:**白酒;2-羟基-3-甲基丁酸乙酯;手性风味物质;对映体;感官特征

中图分类号:TS262.3

文章编号:0254-5071(2025)07-0058-09

doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2025.07.009

**引文格式:**余成霞,朱建猛,王超,等.不同香型白酒中2-羟基-3-甲基丁酸乙酯对映体的分布及感官特性[J].中国酿造,2025,44(7):58-66.

## Distribution and sensory characteristic of ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate enantiomers in different flavor types Baijiu

YU Chengxia<sup>1</sup>, ZHU Jianmeng<sup>2</sup>, WANG Chao<sup>2</sup>, GU Shasha<sup>2</sup>, WEI Chaoyang<sup>1</sup>, QIU Shuyi<sup>1</sup>, DAI Yifeng<sup>1,3\*</sup>

(1. Guizhou Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy, School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Guijiu Co., Ltd., Guiyang 550020, China; 3. Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

**Abstract:** In this study, the ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate (E2H3MB) in Baijiu was analyzed by liquid-liquid extraction (LLE) combined with gas chromatography (GC) and Chiral gas chromatography-mass spectrometry (Chiral-GC-MS), the gas chromatography analysis conditions were optimized, and the enantiomeric distribution of E2H3MB in 12 flavor types Baijiu was investigated. The olfactory threshold and sensory characteristics of the E2H3MB enantiomer in water and volume fraction 46% ethanol solution were evaluated by three-alternative forced-choice (3-AFC) threshold determination method. The results showed that the CYCLOSIL-B chromatography column (30 m×0.25 mm×0.25 μm) had a good separation effect on E2H3MB. When the heating rate was 1.5 °C/min and the carrier gas flow rate was 1.0 ml/min, the separation of E2H3MB enantiomer was the optimal, and the separation degree (R)=5.0>1.5. Except for rice-flavor, light-flavor (Qingxiangxing) and Chi-flavor Baijiu, only (R)-configuration E2H3MB ((R)-E2H3MB) was detected in other types of Baijiu, and there were significant differences in the (R)-E2H3MB contents in the same type of Baijiu (P<0.05). The results of sensory characteristics results indicated that in water and volume fraction 46% ethanol solution, the olfactory threshold of (R)-E2H3MB was approximately 2.1 times that of (S)-configuration E2H3MB ((S)-E2H3MB) ((R)-configuration 38 μg/L; (S)-configuration 18 μg/L, and about 1.9 times ((R)-configuration 322 mg/L; (S)-configuration 173 mg/L), both configurations exhibited pleasant sweet and fruity aromas. The research results were conducive to the refinement of Baijiu flavor wheel, providing a reference basis for studying the distribution of enantiomers of chiral flavor substances in Baijiu and enriching people's understanding of chiral flavor substances in Baijiu.

**Key words:** Baijiu; ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate; chiral flavor substance; enantiomer; sensory characteristic

收稿日期:2025-02-06

修回日期:2025-04-30

**基金项目:**国家自然科学基金地区基金项目(32260640);企业横向项目(GJ-GD 202301);国家自然科学基金青年科学基金项目(31801509);北京食品营养与人类健康高精尖创新中心开放基金项目(20182010);贵州省科技厅项目(ZK[2022]一般 114);2022年贵州省高等学校教学内容和课程体系改革项目

**作者简介:**余成霞(2000-),女,硕士研究生,研究方向为白酒中手性风味物质。

**\*通讯作者:**戴怡凤(1986-),女,教授,博士,研究方向为酒类风味化学、香料化学、手性香料。

中国白酒历史悠久,是中国古代最伟大的发明之一<sup>[1]</sup>。白酒由天然混合发酵剂经过复杂发酵后蒸馏而成,与白兰地、金酒、朗姆酒、伏特加以及威士忌并称为“世界六大蒸馏酒”<sup>[2]</sup>。研究表明,立体化学往往对风味具有显著影响,不同化学结构能够产生不同的嗅觉特征<sup>[3]</sup>。手性化合物是指分子质量、分子结构相同,但左右排列相反,如实物与其镜中的对映体<sup>[4]</sup>。有机化合物是含碳的化合物,一个碳原子的最外层上有四个电子,若以单键成键时,可以形成四个共价单键,共价键指向四面体的顶点,当碳原子连接的四个基团各不相同,与这个碳原子相连接的四个基团有两种空间连接方式,这两种方式如同左右手,互为“镜像”,也是不能完全叠合在一起的,因此,这样的分子叫做“手性分子”。这种构成手性关系的分子之间,把一方称为另一方的“对映异构体”。观察这四个基团在空间的排列顺序,如果是按顺时针方向排列的,则该手性碳为R构型;如果按逆时针方向排列,则为S构型。手性风味化合物的结构-气味关系以及其构型对气味阈值和气味特性影响的相关研究越来越多<sup>[5]</sup>,白酒中手性化合物1,2-丙二醇,其(S)-构型在酱香型白酒作为主要构型存在,(S)-1,2-丙二醇纯水中嗅觉阈值为23.92 mg/L,大约是(R)-1,2-丙二醇嗅觉阈值(4.66 mg/L)的5倍,且(R)-构型相较于(S)-构型表现出显著的果香和甜香<sup>[6]</sup>。研究显示<sup>[7]</sup>,白酒中手性化合物乳酸的(R)-构型在大多数白酒中作为优势构型分布。在模型葡萄酒溶液中,(R)-Sotolon的感知阈值比(S)-Sotolon高100倍以上,且(R)-构型具有核桃和酸败的气味,而(S)-构型具有咖喱和核桃气味<sup>[8]</sup>。不仅如此,分离和定量手性化合物对映异构体还能够应用于检测掺假产品,评估发酵过程<sup>[9]</sup>等。CAPETTI F等<sup>[10]</sup>研究表明,掺加了合成香料的精油中(S)-芳樟醇百分含量从0.4%增加到24%,(S)-乙酸芳樟酯百分含量从0.3%增加到10.9%。

白酒中已报道的风味物质达2 000多种<sup>[11]</sup>,其中酯类风味物质占总风味物质的60%以上,白酒中的酯类风味物质种类丰富、阈值低,对白酒整体风味具有重要影响<sup>[12]</sup>。2-羟基-3-甲基丁酸乙酯(ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate, E2H3MB),CAS号2441-06-7,属于支链羟基化酯,具有一个手性碳原子,一对对映体,是乳酸菌酯酶活性的潜在标志物<sup>[13]</sup>。CAMPO E等<sup>[14]</sup>首次在葡萄酒中识别到草莓果香味的E2H3MB。E2H3MB在芒果酒中质量浓度为(16.5±0.5) μg/L<sup>[15]</sup>;Jambolan酒中E2H3MB占总的鉴定到化合物的0.3%<sup>[16]</sup>;E2H3MB作为白酒中“少量化合物”被列出,含量<10 mg/L<sup>[17]</sup>;E2H3MB被鉴定为酱香型白酒中果味风味物质<sup>[18]</sup>;LI H H等<sup>[19]</sup>对芝麻香型白酒中风味物质进行研究,结果表明新酒和成品酒中E2H3MB的FD分别为729、27;馥郁香型白酒基酒中E2H3MB作为主要酯类风味物质被检测到<sup>[20]</sup>。葡萄酒中E2H3MB对映体分布已有报道,红

葡萄酒和白葡萄酒中主要存在(R)-构型<sup>[21]</sup>,但鲜有研究对12种香型白酒中E2H3MB对映体分布现象进行报道。

本研究利用液液萃取(liquid-liquid extraction, LLE)结合气相色谱(gas chromatography, GC)和手性气相色谱-质谱(Chiral-GC-MS)分析白酒中2-羟基-3-甲基丁酸乙酯(E2H3MB)对映体,优化其气相色谱条件,对12种香型白酒中E2H3MB对映体分布情况进行探究。利用三点选配法(three-alternative forced-choice, 3-AFC)评估E2H3MB对映体在纯水和体积分数46%乙醇溶液中的嗅觉阈值以及感官特征。旨在进一步细化白酒风味轮,为研究白酒中手性对映体的含量及分布提供参考依据,优化分析白酒中E2H3MB对映体的方法,丰富人们对白酒中风味物质的认识,并有助于从分子构型方面更加深入了解白酒中的风味物质,为白酒风味品质提升提供一定依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 样品

12种香型白酒[酱香型20种(编号为酱-1~酱-20)、浓香型8种(编号为浓-1~酱-8)、兼香型4种(编号为兼-1~兼-4)、老白干香型5种(编号为老白干-1~老白干-5)、馥郁香型4种(编号为馥郁-1~馥郁-4)、董香型2种(编号为董-1、董-2)、凤香型3种(编号为凤-1~凤-3)、芝麻香型2种(编号为芝麻-1、芝麻-2)、特香型4种(编号为特-1~特-4)、米香型5种(编号为米-1~米-5)、清香型6种(编号为清-1~清-6)以及豉香型4种(编号为-豉1~豉-4),共67种]:采购自品牌官方超市。

#### 1.1.2 试剂

(S)-构型-2-羟基-3-甲基丁酸乙酯((S)-E2H3MB)、(R)-构型-2-羟基-3-甲基丁酸乙酯((R)-E2H3MB)(均为色谱纯):上海塞尔斯生化科技有限公司;叔戊醇(色谱纯):上海麦克林科技股份有限公司;二氯甲烷、无水乙醇(均为色谱纯):上海易恩化学技术有限公司;无水硫酸钠(分析纯):成都金山化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

Trace1300气相色谱;Thermo Fisher科技(中国)有限公司;7890A-5975C气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)仪;美国安捷伦科技有限公司;PAL RSI多功能自动进样器;瑞士斯特斯分析仪器有限公司;SZ-93A纯水蒸馏器;上海亚荣实验仪器有限公司;0.22 μm有机系滤膜;佰奥萃(天津)生物科技有限公司;TTL-DC I型氮吹仪;北京同泰联科技发展有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 液液萃取白酒中风味物质

白酒样品前处理,参考NIU Y W等<sup>[21]</sup>方法,稍做改动。取25 mL白酒样品用蒸馏水稀释至酒精体积分数10%,加

入氯化钠直至饱和后倒入分液漏斗中,加入500 μL叔戊醇(内标,质量浓度80.10 mg/L);然后,用25 mL二氯甲烷分三次(10 mL,10 mL,5 mL)萃取,收集下层萃取液;称取20 g无水硫酸钠将收集到的萃取液干燥过夜;最后将干燥后的液体过滤后用缓慢氮气流浓缩至500 μL。将浓缩液体通过0.22 μm有机滤膜过滤至2 mL进样瓶中,放置于4 °C冰箱中储存备用。

### 1.3.2 白酒中E2H3MB对映体气相色谱(GC)分析条件优化

利用GC对E2H3MB对映体进行分离优化。从分离固定相、升温速率、载气流速3个方面优化E2H3MB对映体色谱分离条件。相同气相色谱条件下,探究不同固定相色谱柱分离能力,色谱柱详情见表1。确定固定相后,设置不同升温速率(5.0 °C/min、4.0 °C/min、3.0 °C/min、2.0 °C/min、1.5 °C/min)和载气流速(2.0 mL/min、1.5 mL/min、1.0 mL/min、0.8 mL/min)以确定最优气相色谱条件。E2H3MB消旋体溶液由等量E2H3MB对映体标品混合于无水乙醇中制备。

表1 不同手性固定相色谱柱的固定相及规格

Table 1 Stationary phases and specifications of different chiral stationary phase chromatography columns

色谱柱名称	固定相	规格	简称
CYCLOSIL-B	七-(2,3-二-O-甲基-6-叔丁基二甲基硅基)-β-环糊精	30 m×0.25 mm×0.25 μm	CY-B
Beta DEX™ 120	全甲基化β-环糊精	30 m×0.25 mm×0.25 μm	DEX120
Astec CHIRADEX® B-TA	2,6-二-O-戊基-3-三氟乙酰基衍生物-β-环糊精	30 m×0.25 mm×0.25 μm	B-TA
Astec CHIRADEX® G-TA	2,6-二-O-戊基-3-三氟乙酰基衍生物-γ-环糊精	30 m×0.25 mm×0.25 μm	G-TA
CHIRALDEXTM B-DM	2,3-二-O-甲基-6-叔丁基甲基硅烷基衍生物-β-环糊精	50 m×0.25 mm×0.12 μm	B-DM

### 1.3.3 白酒中E2H3MB的手性气相色谱-质谱分析

采用GC-MS结合1.3.2中最适气相色谱条件。GC-MS条件:电子电离(electronic ionization, EI)源,进样口温度250 °C,离子源温度230 °C,四极杆温度150 °C,扫描范围为50~350 m/z,分流比为20:1,载气为高纯氦气(99.999%),进样量1 μL。

定性方法:(S)-E2H3MB以及(R)-E2H3MB均通过美国国家标准技术研究所(National Institute of Standards and Technology, NIST)11谱库比对、标准品离子碎片比对和标准品保留时间(retention time, RT)定性。

定量方法:构建标准曲线,按照标准曲线回归方程计算白酒中(S)-E2H3MB以及(R)-E2H3MB含量。(R)-E2H3MB以及(S)-E2H3MB保留时间分别为25.713 min和26.371 min,定性离子为55 m/z、76 m/z、104 m/z、103 m/z,定量离子为73 m/z。内标叔戊醇保留时间为5.852 min,定性离子为73 m/z、55 m/z、70 m/z、51 m/z,定量离子为59 m/z。

### 1.3.4 E2H3MB对映体感官特征以及嗅觉阈值

感官小组接受相关培训,参考ZHU J C等<sup>[22]</sup>方法并做适当调整。12名感官小组成员(6名男生,6名女生,22~30岁)具有一定的嗅觉经验,在未告知实验目的的情况下进行培训,训练完成后,感官小组在25 °C,相对湿度60%,无噪音,干净明亮的品评室进行感官评价,参考XU H等<sup>[6]</sup>方法并做适当调整。实验期间,品评小组成员独立完成每一项感官测试。感官实验共包括6项,分别为(R)-E2H3MB和(S)-E2H3MB在双纯水中的感官特征描述;3-AFC法对(R)-E2H3MB以及(S)-E2H3MB在2种介质中(纯水和体积分数46%乙醇溶液)嗅觉阈值进行测定。

参考国家标准GB/T 33406—2016《白酒风味物质阈值

测定指南》<sup>[23]</sup>,利用3-AFC法对(R)-E2H3MB以及(S)-E2H3MB嗅觉阈值进行测定。向感官小组提供每组3个样本,其中一个为待测样本,另外两个是空白样本,总共7个系列的浓度进行3-AFC测试。评估人员必须从每组中正确选择样本,一旦能正确识别最低浓度样品组,则用介质溶液将样品再稀释3次,直到无法正确识别。根据最佳估计阈值(best estimate threshold, BET)方法计算(R)-E2H3MB和(S)-E2H3MB在体积分数46%乙醇溶液和水中的嗅觉阈值。质量浓度设置见表2。利用最优阈值估算法(BET)计算个人阈值( $T_{BETi}$ ),组阈值( $T_{BET}$ )为小组中所有个人阈值的几何平均值,个人阈值和组阈值计算公式如下<sup>[6]</sup>:

$$T_{BETi} = \sqrt{A_x \times A_{x+1}} \quad (i=1, 2, \dots, n); T_{BET} = \sqrt[n]{T_{BET1} \times T_{BET2} \times \dots \times T_{BETn}}$$

式中: $T_{BETi}$ 为个人阈值,mg/L; $T_{BET}$ 为组阈值,mg/L; $A_x$ 为感官小组成员嗅闻判断过程中回答错误的最大质量浓度,mg/L; $A_{x+1}$ 为相比 $A_x$ 更高一级质量浓度,mg/L。

表2 不同基质中样品嗅觉阈值测定浓度设置

Table 2 Concentration settings for olfactory threshold determination of samples in different matrices

化合物	不同介质中E2H3MB对映体质量浓度
	水中质量浓度/(μg·L <sup>-1</sup> )
(R)-E2H3MB	1.59/4.78/14.34/43.04/129.14/387.43/1162.30
(S)-E2H3MB	0.54/1.63/4.91/14.73/44.21/132.64/397.94
	体积分数46%乙醇溶液中质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )
(R)-E2H3MB	2.12/6.37/19.13/57.40/172.22/516.66/1550
(S)-E2H3MB	1.64/4.93/14.81/44.44/133.33/400/1200

### 1.3.5 数据处理

利用SPSS 27.0对同一香型白酒中E2H3MB对映体含量进行显著性差异分析,评估同一香型白酒中对映体含

量差异,统计学显著性水平为5%, $P < 0.05$ 表示差异显著; Origin 2022 Pro 绘制色谱图以及条形统计图。

## 2 结果与分析

### 2.1 白酒中E2H3MB气相色谱分析条件优化

#### 2.1.1 色谱柱的选择

$\beta$ -环糊精及其具有多个手性中心的衍生物在对映异构体分离领域迅速发展并被广泛应用<sup>[24]</sup>。在色谱分离技术中,两峰分离程度用分离度(resolution, R)表示,当 $R > 1.5$ 时,表示两色谱峰基本分离<sup>[25]</sup>。不同色谱柱分离结果见图1。由图1可知,相同色谱条件下,B-DM、B-TA、G-TA、DEX120手性色谱柱均未将E2H3MB消旋体(两种对映异构体含量1:1<sup>[26]</sup>)完全分离,只有CY-B手性柱将E2H3MB对映体完全分离,分离度( $R$ )=4.07 $> 1.5$ ,此柱以 $\beta$ -环糊精衍生物为固定相。GAMMACURTA M等<sup>[13]</sup>利用以 $\gamma$ -环糊精衍生物为固定相的手性柱Chiraldex Gamma-TA对葡萄酒中E2H3MB对映体分布进行探究,结果显示白葡萄酒和红葡萄酒样品中主要存在(R)-E2H3MB。本实验中选择CY-B手性柱为分离色谱柱。

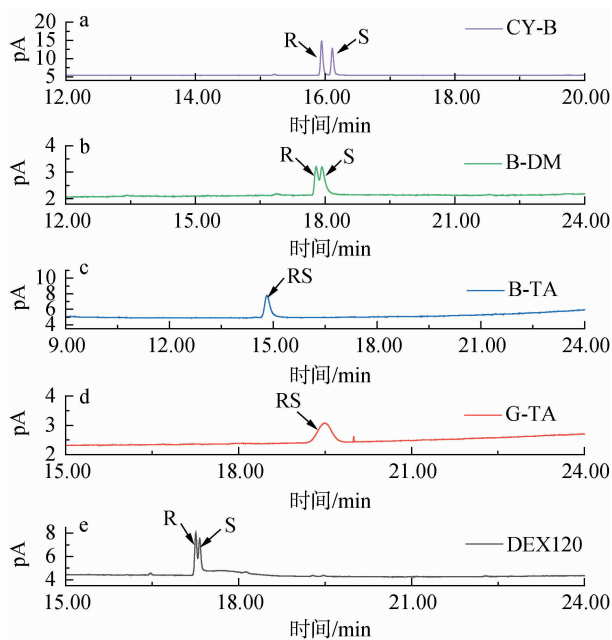


图1 不同固定相手性色谱柱分离消旋体气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatograms of racemic separation by chiral chromatography columns with different stationary phase

#### 2.1.2 升温速率的选择

设置不同升温速率计算分离度( $R$ ),结果见表3。由表3可知,随着升温速率的降低(5.0~1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ),E2H3MB对映体保留时间逐渐延长,峰宽逐渐增大。在5种升温速率下,分离度( $R$ )均 $> 1.5$ 。随着升温速率的降低,分离度逐渐增加,当升温速率为1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时,分离度( $R$ )最大,为5.60。因此,选择升温速率为1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

表3 不同升温速率下2-羟基-3-甲基丁酸乙酯消旋体分离情况

Table 3 Racemic separation of ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate under different heating rates

升温速率/ ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )	保留时间/min		峰宽/min		分离度 ( $R$ )
	(R)-E2H3MB 保留时间( $T_R$ )	(S)-E2H3MB 保留时间( $T_S$ )	(R)-E2H3MB 峰宽( $W_R$ )	(S)-E2H3MB 峰宽( $W_S$ )	
5.0	12.72	12.91	0.05	0.05	3.74
4.0	14.18	14.42	0.06	0.06	3.96
3.0	16.38	16.71	0.07	0.07	4.32
2.0	20.00	20.51	0.10	0.10	4.79
1.5	27.00	27.99	0.17	0.17	5.60

#### 2.1.3 载气流速的选择

设置不同载气流速计算分离度( $R$ ),结果见表4。由表4可知,随着系统中载气流速的减小,E2H3MB对映体保留时间与之呈现相反趋势,其保留时间逐渐延长。E2H3MB对映体的分离度( $R$ )变化趋势整体上呈先增大后减小的趋势,峰宽变化呈现先增大后减小的趋势。当载气流速为1.0 mL/min时,分离度最大为5.73。因此,选择载气流速为1.0 mL/min。

表4 不同载气流速下2-羟基-3-甲基丁酸乙酯消旋体分离情况

Table 4 Racemic separation of ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate under different carrier gas flow rates

载气流速/ ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )	保留时间/min		峰宽/min		分离度 ( $R$ )
	(R)-E2H3MB 保留时间( $T_R$ )	(S)-E2H3MB 保留时间( $T_S$ )	(R)-E2H3MB 峰宽( $W_R$ )	(S)-E2H3MB 峰宽( $W_S$ )	
2.0	14.18	14.42	0.06	0.06	3.96
1.5	25.16	25.80	0.11	0.11	5.59
1.0	28.11	28.58	0.08	0.08	5.73
0.8	29.64	30.05	0.07	0.07	5.62

当升温速率为1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,设置载气流速为1.0 mL/min情况下,分离度( $R$ )最大,为5.0 $> 1.5$ 。因此,确定GC分析升温程序为:50 $^{\circ}\text{C}$ 保持2 min,然后1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至80 $^{\circ}\text{C}$ 保持2 min,再以4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温220 $^{\circ}\text{C}$ 保持1 min。

### 2.2 Chiral-GC-MS探究白酒中E2H3MB对映体分布

采用2.1节优化的气相色谱条件,对白酒样品中E2H3MB对映体分布进行Chiral-GC-MS分析。E2H3MB消旋体溶液以及白酒样品米-3中E2H3MB对映体Chiral-GC-MS分析总离子流色谱图见图2。由图2a可知,在配制的消旋体溶液中,(R)-E2H3MB出峰时间为25.713 min,(S)-E2H3MB出峰时间为26.345 min。由图2b可知,白酒样品米-3中(R)-E2H3MB出峰时间为25.710 min,(S)-E2H3MB出峰时间为26.341 min。两者保留时间基本一致,结合谱库比对和标品离子碎片比对,完成白酒样品中E2H3MB对映体定性。

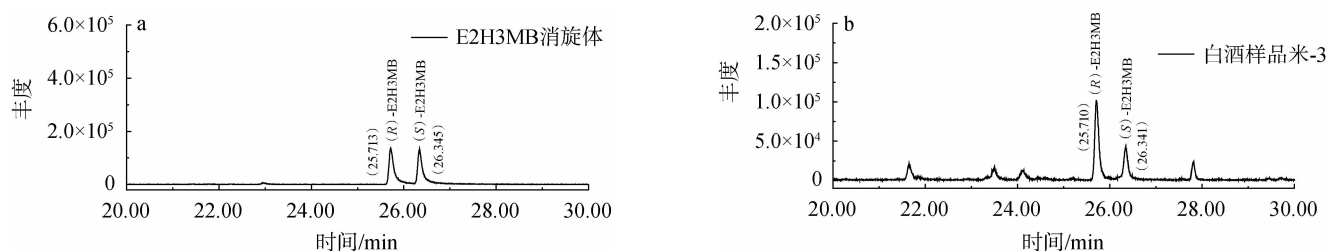


图2 2-羟基-3-甲基丁酸乙酯(E2H3MB)消旋体溶液(a)及米-3白酒样品中E2H3MB对映体(b)Chiral-GC-MS分析总离子流色谱图  
Fig. 2 Total ion chromatogram of ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate (E2H3MB) racemic solution (a) and E2H3MB enantiomer (b) in rice-3 Baijiu sample analyzed by Chiral-GC-MS

### 2.3 E2H3MB对映体标准曲线的线性范围,回归方程,相关系数,定量限及检出限

白酒样品中E2H3MB对映体标准曲线回归方程,相关系数,线性范围,定量限(limit of quantitation, LOQ)及检出限(limit of detection, LOD)见表5。由表5可知,(R)-E2H3MB标准曲线方程为 $y=75.637x-0.3336$ ,在 $0.193\sim 484.302$  mg/L

范围内具有良好的线性关系,相关系数 $R^2$ 为0.999,LOQ和LOD分别为0.073 mg/L和0.065 mg/L。(S)-E2H3MB标准曲线方程为 $y=63.714x+0.0679$ ,在 $0.198\sim 497.425$  mg/L范围内具有良好的线性关系,相关系数 $R^2$ 为0.999,LOQ和LOD分别为0.095 mg/L和0.028 mg/L。

表5 白酒样品中2-羟基-3-甲基丁酸乙酯对映体标准曲线回归方程、相关系数、线性范围、定量限及检出限  
Table 5 Standard curve regression equation, correlation coefficient, linear range, limit of quantitation and limit of detection of ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate enantiomer in Baijiu samples

化合物	回归方程	$R^2$	线性范围/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	定量限/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	检出限/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
(R)-E2H3MB	$y=75.637x-0.3336$	0.999	0.193~484.302	0.073	0.065
(S)-E2H3MB	$y=63.714x+0.0679$	0.999	0.198~497.425	0.095	0.028

### 2.4 白酒样品中E2H3MB对映体分析

白酒样品中E2H3MB对映体含量、对映体过量(enantiomeric excess, EE)(表示某一对映体在混合物中相对于另一对映体的过量百分比)、R-构型与S-构型比例以及气味活度值(odor activity values, OAV)结果见表6。

由表6可知,大部分白酒样品中只检测到(R)-E2H3MB,

其中样品米-5中(R)-E2H3MB含量最高,为 $(6\ 026.56\pm 28.65)\ \mu\text{g/L}$ ,样品浓-2含量最低,为 $(433.92\pm 12.22)\ \mu\text{g/L}$ ;含(S)-E2H3MB的白酒中,样品米-3中(S)-E2H3MB含量最低,为 $(836.59\pm 63.89)\ \mu\text{g/L}$ ,样品米-2含量最高,为 $(4\ 387.95\pm 126.21)\ \mu\text{g/L}$ 。

表6 白酒样品中2-羟基-3-甲基丁酸乙酯对映体含量、对映体过量、R-构型与S-构型比例以及气味活度值  
Table 6 Contents, enantiomer excess, ratio of R-configuration and S-configuration and odor activity values of ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate enantiomer in Baijiu samples

样品	(R)-E2H3MB含量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	(S)-E2H3MB含量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	EE/%	R-构型/S-构型	OAV	
					(R)-E2H3MB	(S)-E2H3MB
酱香型白酒						
酱-1	545.99±26i	-	100	-	14	-
酱-2	644.48±32.34i	-	100	-	17	-
酱-3	802.56±61.94h	-	100	-	21	-
酱-4	856.05±34.74gh	-	100	-	23	-
酱-5	913.13±154.96fg	-	100	-	24	-
酱-6	1 062.48±104.37ef	-	100	-	28	-
酱-7	1 064.33±107.34ef	-	100	-	28	-
酱-8	1 122.87±32.35e	-	100	-	30	-
酱-9	1 143.86±38.57e	-	100	-	30	-
酱-10	1 183.68±88.25de	-	100	-	31	-
酱-11	1 210.86±87.91de	-	100	-	32	-
酱-12	1 203.19±83.70d	-	100	-	32	-
酱-13	1 333.97±96.32cd	-	100	-	35	-
酱-14	1 336.06±31.67cd	-	100	-	35	-

续表

样品	(R)-E2H3MB含量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	(S)-E2H3MB含量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	EE/%	R-构型/S-构型	OAV	
					(R)-E2H3MB	(S)-E2H3MB
酱-15	1 385.29±61.96bc	-	100	-	36	-
酱-16	1 388.69±107.89bc	-	100	-	37	-
酱-17	1 435.91±91.72bc	-	100	-	38	-
酱-18	1 469.47±66.29bc	-	100	-	39	-
酱-19	1 526.60±102.70b	-	100	-	40	-
酱-20	2 121.05±170.99a	-	100	-	56	-
浓香型白酒						
浓-1	-	-	-	-	-	-
浓-2	433.92±12.22d	-	100	-	11	-
浓-3	490.73±20.66c	-	100	-	13	-
浓-4	496.82±12.49c	-	100	-	13	-
浓-5	506.66±14.71c	-	100	-	13	-
浓-6	654.66±25.16b	-	100	-	17	-
浓-7	703.91±39.71b	-	100	-	19	-
浓-8	764.79±63.71a	-	100	-	20	-
兼香型白酒						
兼-1	532.38±1.61c	-	100	-	14	-
兼-2	576.29±27.58c	-	100	-	15	-
兼-3	633.01±36.37b	-	100	-	17	-
兼-4	978.03±22.24a	-	100	-	26	-
老白干香型白酒						
老白干-1	543.54±24.17d	-	100	-	14	-
老白干-2	649.53±17.86c	-	100	-	17	-
老白干-3	661.75±19.03c	-	100	-	17	-
老白干-4	700.93±7.36b	-	100	-	18	-
老白干-5	901.62±8.11a	-	100	-	24	-
馥郁香型白酒						
馥郁-1	856.31±51.09c	-	100	-	23	-
馥郁-2	1 251.12±93.82b	-	100	-	33	-
馥郁-3	1 346.10±29.48ab	-	100	-	35	-
馥郁-4	1 540.20±188.45a	-	100	-	41	-
董香型白酒						
董-1	*	-	100	-	-	-
董-2	*	-	100	-	-	-
凤香型白酒						
凤-1	576.82±26.99b	-	100	-	15	-
凤-2	941.47±25.08a	-	100	-	25	-
凤-3	-	-	-	-	-	-
芝麻香型白酒						
芝麻-1	1 298.03±148.34a	-	100	-	34	-
芝麻-2	1 423.06±111.38a	-	100	-	37	-
特香型白酒						
特-1	888.93±16.23a	-	100	-	23	-
特-2	523.95±33.73c	-	100	-	14	-
特-3	713.53±20.23b	-	100	-	19	-
特-4	-	-	-	-	-	-

续表

样品	(R)-E2H3MB含量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	(S)-E2H3MB含量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	EE/%	R-构型/S-构型	OAV	
					(R)-E2H3MB	(S)-E2H3MB
米香型白酒						
米-1	-	1 474.97±34.25b	100(S)	-	-	82
米-2	1 162.03±52.88d	4 387.95±126.21a	58.12(S)	21:79	31	244
米-3	2 164.37±41.46c	836.59±63.89c	44.25	72:28	57	46
米-4	4 665.73±177.06b	-	100	-	123	-
米-5	6 026.56±28.65a	-	100	-	159	-
清香型白酒						
清-1	-	1 457.46±121.78	100(S)	-	-	81
清-2	662.89±10.28d	-	100	-	17	-
清-3	750.29±31.99c	-	100	-	20	-
清-4	920.40±30.42b	-	100	-	24	-
清-5	956.78±39.69b	-	100	-	25	-
清-6	1 191.52±34.92a	-	100	-	31	-
豉香型白酒						
豉-1	877.58±37.46b	4 184.39±194.64a	65.33(S)	17:83	23	232
豉-2	889.77±32.43b	2 177.99±63.45b	41.99(S)	29:71	23	121
豉-3	903.07±8.28b	2 122.15±34.47b	40.30(S)	30:70	24	118
豉-4	1 576.12±47.27a	-	100	-	41	-

注：“-”表示未检出；不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )；“\*”表示检测到(R)-E2H3MB,但无法精确定量； $EE\%=(R-S)/(R+S)$ ；计算OAV使用纯水中所测得嗅觉阈值。

由表6可知,在除了豉香型、清香型以及米香型白酒样品的其余9种香型白酒样品中,EE(R)为100%。豉香型、清香型以及米香型白酒样品中存在(S)-构型对映体过量的白酒样品,米香型白酒(样品米-1)和(样品米-2)EE(S)分别为100%和58.12%;清香型白酒(样品清-1)EE(S)为100%;豉香型白酒(样品豉-1)、(样品豉-2)以及(样品豉-3)EE(S)分别为65.33%、41.99%以及40.30%。

由表6可知,白酒样品米-3、豉-3中(R)-构型/(S)-构型不同,分别为72:28、30:70;豉香型白酒样品豉-2、豉-3中(R)-构型/(S)-构型相似,分别为29:71、30:70。

香气活度值(odor activity value, OAV)常被用于描述某一香气的贡献大小,等于风味化合物浓度与其嗅觉阈值的比值。当 $OAV>1$ 时,表明香气具有贡献<sup>[7]</sup>。由表6可知,在检测到E2H3MB对映体的白酒中, OAV均 $>1$ ,表明E2H3MB对映体对白酒风味具有一定贡献。米-5样品中(R)-E2H3MB的OAV最大,为159。米-2样品中(S)-E2H3MB的OAV最大,为244。OAV计算结果显示,(R)-E2H3MB与(S)-E2H3MB均对白酒风味具有一定影响,但其是否与其他风味化合物相互作用对白酒风味造成另外的间接影响尚待进一步研究。

## 2.5 各香型白酒样品中E2H3MB对映体分布

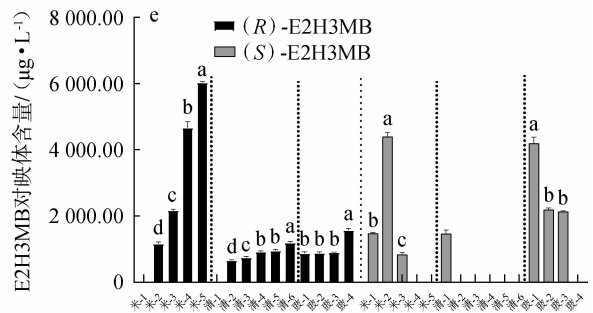
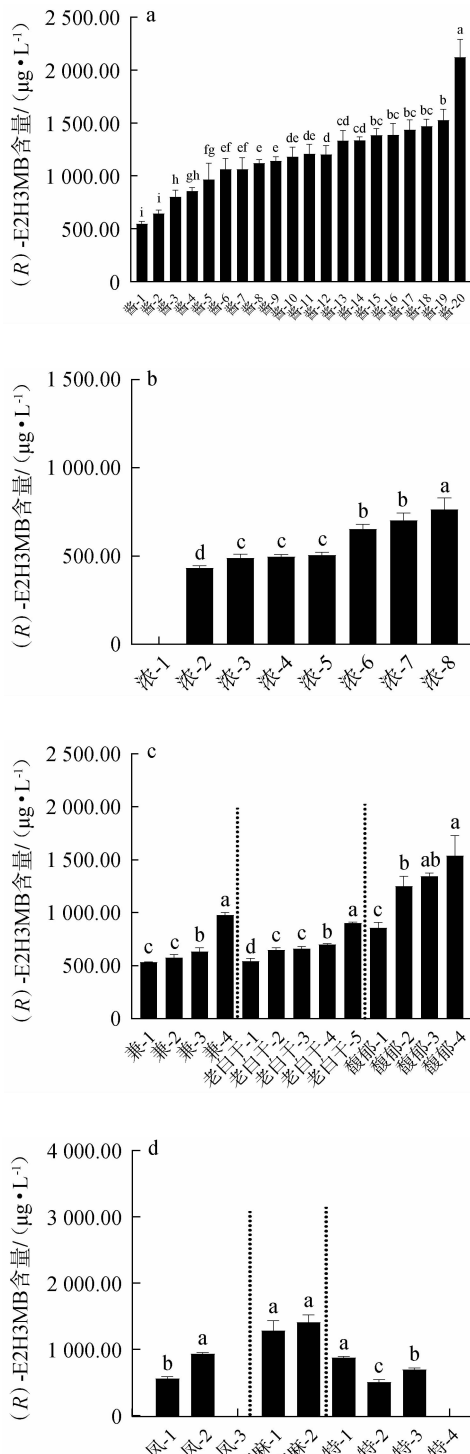
分别对11种香型白酒中E2H3MB对映体含量统计分析,结果见图3。由图3可知,酱香型、浓香型、兼香型、老白干

香型、馥郁香型、凤香型、芝麻香型以及特香型白酒中均只检测出(R)-E2H3MB。GAMMACURTA M等<sup>[13]</sup>对葡萄酒中E2H3MB对映体分布研究结果显示,在研究样品中主要存在(R)-构型,这与本研究结果一致。白酒发酵过程需要众多微生物参与,对于支链羟基化乙酯,乳酸菌的(R)-对映体途径是优先的<sup>[28]</sup>,也许能够解释白酒中E2H3MB对映体分布的现象。

由图3a可知,酱香型白酒样品中,酱-20中(R)-E2H3MB含量 $>2\ 000\ \mu\text{g/L}$ ,显著高于其他酱香型白酒样品( $P<0.05$ )。由图3b可知,浓香型白酒样品中,浓-1中未检测到(R)-E2H3MB,且检测到(R)-E2H3MB的白酒样品中,含量均 $<1\ 000\ \mu\text{g/L}$ 。浓-3、浓-4和浓-5中(R)-E2H3MB含量差异不显著( $P>0.05$ )。由图3c可知,兼香型、老白干香型和馥郁香型白酒中(R)-E2H3MB含量均 $<2\ 000\ \mu\text{g/L}$ ,其中兼-4和老白干-5中(R)-E2H3MB的含量与其他同种香型白酒样品中(R)-E2H3MB含量差异显著( $P<0.05$ )。由图3d可知,凤香型白酒样品(凤-3)和特香型白酒样品(特-4)中未检出(R)-E2H3MB。芝麻香型白酒样品中,(R)-E2H3MB的含量差异不显著( $P>0.05$ )。由图3e可知,米香型白酒样品(米-5)中(R)-E2H3MB含量最高,接近( $6\ 000\ \mu\text{g/L}$ ),与其他米香型白酒样品中(R)-E2H3MB的含量存在显著差异( $P<0.05$ )。清香型和豉香型白酒样品中(R)-E2H3MB的含量均 $<2\ 000\ \mu\text{g/L}$ 。米香型(米-2)和豉香型(豉-1)白酒样品

中,(S)-E2H3MB含量均>4 000 μg/L;清香型白酒样品中,清-1中(S)-E2H3MB含量<2 000 μg/L。

米香型、清香型和豉香型白酒中检测出(S)-E2H3MB。除了芝麻香型白酒样品,其他同一香型中(R)-E2H3MB含量均存在显著差异( $P<0.05$ ),造成这种差异的原因或许是白酒在开放环境中生产,不同水源、原料以及酿造环境等因素均能对白酒品质产生影响。在浓-1、凤-3、特-4、米-1以及清-1中均未检测出(R)-E2H3MB。



不同字母表示含量差异显著( $P<0.05$ )。

图3 11种香型白酒样品中2-羟基-3-甲基丁酸乙酯对映体分布  
Fig. 3 Distribution of ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate enantiomers in 11 flavor types Baijiu samples

### 2.6 E2H3MB对映体的感官特性及嗅觉阈值分析

感官小组成员描述双纯水中E2H3MB对映体嗅觉特征,取出现频率最高的四个描述词,作为E2H3MB对映体的嗅觉特征。经过统计,12名感官小组成员将(R)-E2H3MB在双纯水中感官描述为“甜香”、“苹果香”、“草莓香”以及“猕猴桃香”;(S)-E2H3MB在双纯水中感官描述为“甜香”、“葡萄香”、“梨香”以及“奶油香”,两者均以果香为主,表现为令人愉悦的香气特征。

利用3-AFC法对(R)-E2H3MB以及(S)-E2H3MB嗅觉阈值进行测定。统计个人阈值( $T_{BETi}$ )后计算组阈值( $T_{BET}$ ),结果见表7。由表7可知,感官小组评估(R)-E2H3MB与(S)-E2H3MB在纯水中的嗅觉阈值分别为38 μg/L和18 μg/L,(R)-构型阈值为(S)-构型的2.1倍左右;(R)-E2H3MB与(S)-E2H3MB在体积分数为46%乙醇溶液中的阈值分别为322 mg/L和173 mg/L,(R)-构型表现为(S)-构型的1.9倍左右。此结果与GAMMACURTA M等<sup>[13]</sup>研究结果存在差异,可能是研究人员嗅觉灵敏度,实验配备基质不同等方面存在差异造成的。

表7 2-羟基-3-甲基丁酸乙酯对映体嗅觉阈值  
Table 7 Olfactory threshold of 2-hydroxy-3-methylbutyrate enantiomers

化合物	嗅觉阈值		文献报道 <sup>[13]</sup>	
	水中/ (μg·L <sup>-1</sup> )	体积分数46%乙醇 溶液中/(mg·L <sup>-1</sup> )	水中/ (μg·L <sup>-1</sup> )	波尔多红葡萄酒 中/(mg·L <sup>-1</sup> )
(R)-E2H3MB	38	322	4	51
(S)-E2H3MB	18	173	1.5	21

### 3 结论

本研究利用液液萃取(LLE)结合气相色谱(GC)和手性气相色谱-质谱(Chiral-GC-MS)研究白酒中2-羟基-3-甲基丁酸乙酯(E2H3MB)对映体,优化其气相色谱分析条件,对12种香型白酒中E2H3MB对映体分布情况进行探究。通过3-AFC实验对E2H3MB一对对映体嗅觉阈值和感官特征进行评估。结果表明,CY-B手性柱在升温速率为1.5 °C/min,

载气流速为1.0 mL/min 时E2H3MB分离效果最佳,分离度( $R$ )=5.0>1.5。在酱香型、浓香型、兼香型、老白干香型、馥郁香型、董香型、凤香型、芝麻香型白酒以及特香型白酒中只检测到( $R$ )-E2H3MB,且同一香型白酒中( $R$ )-E2H3MB含量存在显著差异( $P<0.05$ )。仅在清香型、米香型和豉香型白酒中检测到( $S$ )-E2H3MB;在浓-1、凤-3、特-4、米-1以及清-1白酒中未检测到( $R$ )-E2H3MB。在检测到E2H3MB对映体的白酒中,OAV均>1,表明( $R$ )-E2H3MB与( $S$ )-E2H3MB对白酒风味具有一定影响。3-AFC实验结果显示,不论是在纯水中还是体积分数为46%乙醇溶液中的嗅觉阈值, ( $R$ )-构型都比( $S$ )-构型高2倍左右,且一对对映体均表现出令人愉悦的甜香和果香。对白酒中E2H3MB对映体分布探究有助于白酒风味轮的细化,丰富人们对白酒中E2H3MB对映体分布的认知,为白酒风味品质提升提供一定的参考依据。

#### 参考文献:

- [1] TU W, CAO X, CHENG J, et al. Chinese *Baijiu*: The perfect works of microorganisms[J]. **Front Microbiol**, 2022, 13: 919044.
- [2] ZHENG X W, HAN B Z. *Baijiu* (白酒), Chinese liquor: History, classification and manufacture[J]. **J Ethnic Foods**, 2016, 3(1): 19-25.
- [3] CRETIN B N, SALLEMBIEN Q, SINDT L, et al. How stereochemistry influences the taste of wine: Isolation, characterization and sensory evaluation of lyoniresinol stereoisomers[J]. **Anal Chim Acta**, 2015, 888: 191-198.
- [4] KISHINE J I, KUSUNOSE H, YAMAMOTO H M. On the definition of chirality and enantioselective fields[J]. **Isr J Chem**, 2022, 62: 11-12.
- [5] ENGEL K H. Chirality: An Important phenomenon regarding biosynthesis, perception, and authenticity of flavor compounds[J]. **J Agr Food Chem**, 2020, 68(38): 10265-10274.
- [6] XU H, DAI Y F, QIU S Y, et al. Distribution and quantification of 1,2-propylene glycol enantiomers in *Baijiu*[J]. **Foods**, 2021, 10(12): 3039.
- [7] XU H, QIU S Y, DAI Y F, et al. Distribution and quantification of lactic acid enantiomers in *Baijiu*[J]. **Foods**, 2022, 11(17): 2607.
- [8] PONS A, LAVIGNE V, LANDAIS Y, et al. Distribution and organoleptic impact of sotolon enantiomers in dry white wines[J]. **J Agr Food Chem**, 2008, 56(5): 1606-1610.
- [9] 徐浩,戴怡凤,田露琴,等. 饮料酒中手性风味物质研究进展[J]. **食品科学**, 2022, 43(7): 281-288.
- [10] CAPETTI F, MARENGO A, CAGLIERO C, et al. Adulteration of essential oils: A multitask issue for quality control. Three case studies: *Lavandula angustifolia* Mill., *Citrus limon* (L.) Osbeck and *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel[J]. **Molecules**, 2021, 26(18): 5610.
- [11] HONG J X, TIAN W J, ZHAO D R. Research progress of trace components in sesame-aroma type of *Baijiu*[J]. **Food Res Int**, 2020, 137: 109695.
- [12] XU Y Q, ZHAO J R, LIU X, et al. Flavor mystery of Chinese traditional fermented *Baijiu*: The great contribution of ester compounds[J]. **Food Chem**, 2022, 369: 130920.
- [13] GAMMACURTA M, TEMPERE S, MARCHAND S, et al. Ethyl 2-hydroxy-3-methylbutanoate enantiomers: quantitation and sensory evaluation in wine[J]. **OENO One**, 2018, 52(1): 57-65.
- [14] CAMPO E, CACHO J, FERREIRA V. Multidimensional chromatographic approach applied to the identification of novel aroma compounds in wine: Identification of ethyl cyclohexanoate, ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate and ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate[J]. **J Chromatogr A**, 2006, 1137(2): 223-230.
- [15] PINO J A, QUERIS O. Analysis of volatile compounds of mango wine[J]. **Food Chem**, 2011, 125(4): 1141-1146.
- [16] PINO J A, ESPINOSA S, DUARTE C. Characterization of odor-active volatile compounds of jambolan [*Syzygium cumini* (L.) Skeels] wine[J]. **J Food Sci Technol**, 2022, 59(4): 1529-1537.
- [17] XUE F, ZHOU J, YANG L. A comprehensive review of quantified flavour components in Chinese *Baijiu*[J]. **Int Food Res J**, 2024, 31(2): 276-305.
- [18] WANG M Y, YANG J G, ZHAO Q S, et al. Research progress on flavor compounds and microorganisms of Maotai flavor *Baijiu*[J]. **J Food Sci**, 2019, 84(1): 6-18.
- [19] LI H H, QIN D, WU Z Y, et al. Characterization of key aroma compounds in Chinese Guojing sesame-flavor *Baijiu* by means of molecular sensory science[J]. **Food Chem**, 2019, 284: 100-107.
- [20] 常宇桐,罗云敬,钱承敬,等. 全二维气质技术解析馥郁香型白酒风味与质量品评关系[J]. **食品科学技术学报**, 2019, 37(6): 64-70, 93.
- [21] NIU Y W, YAO Z M, XIAO Q, et al. Characterization of the key aroma compounds in different light aroma type Chinese liquors by GC-olfactometry, GC-FPD, quantitative measurements, and aroma recombination[J]. **Food Chem**, 2017, 233: 204-215.
- [22] ZHU J C, NIU Y W, HUANG M Q, et al. Characterization of key sulfur aroma compounds and enantiomer distribution in Yingjia Gongjiu[J]. **LWT-Food Sci Technol**, 2022, 167: 113799.
- [23] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 33406—2016 白酒风味物质阈值测定指南[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [24] WU Y, ZHANG N, LUO K X, et al. Recent advances of innovative and high-efficiency stationary phases for chromatographic separations [J]. **TrAC Trends Anal Chem**, 2022, 153: 116647.
- [25] 于世林. 图解气相色谱技术与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 199-211.
- [26] SUN J, WANG Y P, GAO Z G, et al. Additive-assisted preferential crystallization of racemic component: A case of norvaline[J]. **J Ind Eng Chem**, 2022, 110: 206-216.
- [27] 胡丽莎,戴怡凤,邱树毅. 感官分析在白酒风味物质研究中的应用进展[J]. **食品与发酵科技**, 2022, 58(5): 101-106.
- [28] GAMMACURTA M, LYTRA G, MARCHAL A, et al. Influence of lactic acid bacteria strains on ester concentrations in red wines: Specific impact on branched hydroxylated compounds[J]. **Food Chem**, 2018, 239: 252-259.