

氮对薄壳山核桃关键香气成分含量变化的影响

赵悦竹, 冯 英, 高 原, 丁海慧, 曹海生, 谷勋刚*

(安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036)

摘 要: 为研究氮对薄壳山核桃香气成分累积的影响, 以“波尼”为研究对象, 开展 4 水平氮肥试验 (0、0.4、0.8 和 1.2 kg·株⁻¹), 以获取氮肥最佳用量。采用同时蒸馏萃取结合气相色谱法测定关键香气成分, 验证了分析方法准确度及精密度, 由于测试成本低, 适合大量样品的测定。研究表明, 低氮环境有助于“波尼”果仁中香气成分的形成与累积, 高氮条件不利于香气成分的产生。不同施氮处理中 6 种关键香气成分含量均发生了变化, 每株施氮量 0.4 kg 时, 目标香气成分累积量处于最高水平。合理的低氮处理对薄壳山核桃香气成分的累积具有促进作用。

关键词: 氮; 薄壳山核桃; 香气成分; 蒸馏萃取; 气相色谱

中图分类号: S664.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2023)04-0570-05

Effect of nitrogen on the content of key aroma components in *Carya cathayensis*

ZHAO Yuezhu, FENG Ying, GAO Yuan, DING Haihui, CAO Haisheng, GU Xungang

(School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In order to investigate the effect of nitrogen on the accumulation of aroma components in apocarya, four levels of nitrogen fertilizers (0, 0.4, 0.8 and 1.2 kg per plant in average) were conducted using 'Pawnee' as the study subject to obtain the optimum amount of fertilizer. Simultaneous distillation extraction combined with gas chromatography was used to determine the key aroma components. The accuracy and precision of the analytical method were verified, and due to the low cost of the test, it was suitable for the determination of large number of samples. The results showed that low nitrogen conditions contributed to the formation and accumulation of aroma components in 'Pawnee' kernels, while high nitrogen conditions were not conducive to the production of aroma components. The contents of six key aroma components varied among the different nitrogen treatments, with the highest accumulation of the target aroma components occurring at 0.4 kg of nitrogen per plant. The accumulation of aroma components in apocarya was promoted by reasonable low nitrogen treatments.

Key words: nitrogen; apocarya; aroma components; distillation extraction; gas chromatography

薄壳山核桃属于胡桃科山核桃属植物, 又名碧根果、美国山核桃, 是集干果、木本油料、园林绿化、高档木材为一体的生态经济型树种^[1-2]。果仁含有丰富的油脂、蛋白质、酚类、维生素 E、甾醇等营养及保健成分而受消费者的青睐^[3], 需求量高。薄壳山核桃在我国引种推广面积很大, 种植时提高产品营养价值及特色风味极其重要, 能够显著提升产品的经济价值, 增加经济效益。其中, 特有的香气物质是重要的风味成分, 其含量的高低影响到果仁及其产品优劣等级^[4], 种植过程中能针对性地提

升香味物质的种类和含量具有重要价值。氮是薄壳山核桃生长发育过程中必须的大量营养元素, 直接影响果仁中蛋白质、脂质、维生素、酶等成分的合成, 参与光合作用、碳氮代谢等生理过程^[5-6]。碳循环与氮循环是植物体内两个重要的物质合成过程^[7], 一定量的氮素促进碳循环产物在植物体内积累, 适量的氮素供应能加快碳循环代谢, 但过量则会抑制碳循环产物的形成^[8-9]。香气成分是碳循环的次级产物, 过量的氮肥可能会抑制香气成分形成, 因此研究施氮水平对薄壳山核桃香味物质的累积具有重要

收稿日期: 2022-11-12

基金项目: 国家自然科学基金 (31470688) 和薄壳山核桃管养体系提升与研发重点项目 (KJ20200372) 共同资助。

作者简介: 赵悦竹, 硕士研究生。E-mail: 1904702754@qq.com

* 通信作者: 谷勋刚, 博士, 教授。E-mail: xggu89@ahau.edu.cn

理论意义和价值^[10]。

目前, 有关薄壳山核桃香气成分的鉴定与分析目前研究得较少, 虽有鉴定文献报道, 但由于受品种、气候、地理环境等影响, 差异很大^[11]。研究特定区域的薄壳山核桃中香气成分, 首先要针对性地鉴定其中主要的目标物。气相色谱-质谱联用(GC-MS)提供了强有力的鉴定能力, 广泛用于香味成分的分析^[12], 但 GC-MS 测试成本相对较高, 鉴定了目标物后, 直接应用气相色谱法(GC-FID)定量, 成本较低, 适合大量样品测定。

样品制备是 GC-MS 鉴定必不可缺少的关键环节, 薄壳山核桃香气成分有效提取为准确鉴定提供了保障。同时蒸馏萃取(SDE)法是香气成分的有效提取方法, 广泛地应用于多种风味产品中香气成分的样品制备过程中^[13]。本研究将 SDE 制备技术与 GC-FID 定量手段相结合, 应用到薄壳山核桃香气成分测定中, 研究不同施氮水平下香气成分累积量的变化, 探讨氮肥施用量对香气成分的影响机制, 以期研究薄壳山核桃氮肥高效利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 本试验以薄壳山核桃“波尼”品种为试验材料, 于 2020 年 2—12 月在安徽省合肥市肥西县官亭镇果园进行施肥试验, 果实完全成熟后立即采摘。样品在实验室内进行剥壳, 分离果皮、果壳和果仁, 果仁密封后在冰箱内冷藏备用。

1.1.2 仪器与试剂 气相色谱-质谱联用仪(Agilent 7890B-7000); 气相色谱仪(Agilent 7890A), 配 FID 检测器; SDE 装置(订制); 低温氮气吹扫仪(上海乔跃电子科技有限公司)。

香气标准物(壬醛、茶香酮、长叶烯、十七烷酮、丁位十四内酯、2-十九烷酮)及内标物(癸酸乙酯); 二氯甲烷(经过重新蒸馏); 超纯水。标准物及内标物用二氯甲烷溶解, 配成储备液, 再按不同比例混合配制所需浓度溶液。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验设置 4 个施氮水平, 即: T0 (0 kg·株⁻¹)、T1 (0.40 kg·株⁻¹)、T2 (0.80 kg·株⁻¹) 和 T3 (1.20 kg·株⁻¹), 所用氮肥为尿素。磷肥与钾肥用量按照当地建议的施肥量稍作修改, 为磷酸二氢钾 0.8 kg·株⁻¹。施肥前土壤中基础理化性质为: pH 值, 4.43±0.02; 有机质, (6.17±0.11) g·kg⁻¹; 全氮, (0.51±0.03) g·kg⁻¹; 碱解氮, (56.79±1.54) mg·kg⁻¹; 速效磷, (8.16±0.22) mg·kg⁻¹; 速效钾, (169.1±4.3)

mg·kg⁻¹。

1.2.2 香气成分的提取 称取 20 g 用 50 °C 烘 2 h 的果仁, 用研钵研磨粉碎后, 加入 1 000 mL 圆底烧瓶中, 依次加入 350 mL 超纯水、7 g 硫酸钠以及 150 μL 癸酸乙酯。混合均匀后将圆底烧瓶置于电热套中, 加热并保持微沸, 萃取瓶中加入已提纯的二氯甲烷 25 mL, 水浴保持在 70 °C, 从圆底烧瓶沸腾开始计时 2 h。萃取结束后加入一定量的无水硫酸钠, 过夜, 第 2 天用低温氮气吹扫仪进行浓缩至 1 mL, 温度控制在 30 °C。每种不同氮肥量下进行 3 次重复试验。

1.2.3 GC-MS/GC-FID 分析条件 GC-MS 色谱条件: 色谱柱, DB-5MS 石英弹性毛细管柱(60 m × 250 μm × 0.25 μm), 程序升温条件: 初始温度 60 °C, 保持 3 min; 4 °C·min⁻¹ 升高到 200 °C, 保持 2 min; 1 °C·min⁻¹ 升高到 210 °C, 保持 2 min; 最后以 5 °C·min⁻¹ 升高到 270 °C, 保持 7 min。载气: 氦气; 不分流进样, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样口温度 260 °C; 检测器温度 280 °C。

质谱条件: EI 源; 离子源温度 230 °C, 电离电压 70 eV, 质量扫描范围 35 ~ 550 *m/z*。谱库检索: NIST17。

GC-FID Agilent 7890A GC-FID, 色谱柱, DB-5MS 石英弹性毛细管柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm), FID 检测器, 程序升温条件: 初始温度 125 °C, 保持 2 min; 1 °C·min⁻¹ 升高到 140 °C, 保持 2 min; 2 °C·min⁻¹ 升高到 200 °C, 保持 2 min; 1 °C·min⁻¹ 升高到 210 °C, 保持 2 min; 最后以 10 °C·min⁻¹ 升高到 270 °C, 保持 5 min。进样口温度 250 °C。载气: 氦气; 进样量: 2 μL; 不分流方式进样; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。

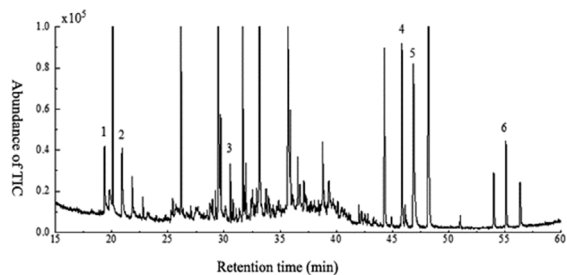
2 结果与分析

2.1 薄壳山核桃果仁中香味成分的鉴定

研究薄壳山核桃果仁中香气成分的变化, 首先要调查主要的香气成分种类。气相色谱-质谱联用法为香气成分的鉴定提供了强大的技术支持, 广泛应用于香气成分的定性分析^[12]。“波尼”在安徽省栽培面积较大, 以此为研究对象具有代表性, 果仁经二氯甲烷萃取、浓缩后, GC-MS 测定的离子流色谱图见图 1。

图 1 显示各色谱峰分离效果较好, 能够进行准确性。将图 1 中色谱峰的质谱图与 NIST17 标准图库对照, 依据相似度的排序以及我们对香气物质性质的理解, 确定了 6 种主要香气成分, 分别为壬

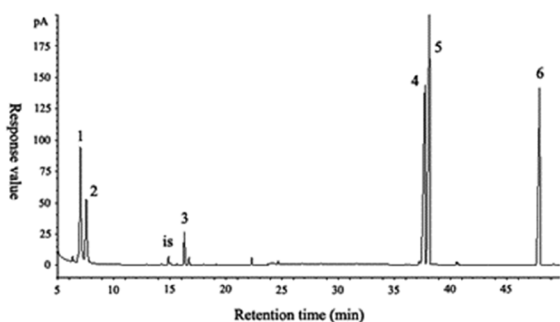
醛、茶香酮、长叶烯、十七烷酮、丁位十四内酯及2-十九烷酮，它们是典型的香气物质，具有不同的香味属性，每种成分对应的色谱峰见图1。其他色谱峰虽然也是挥发性物质，但不具典型香气属性。



1, 壬醛; 2, 茶香酮; 3, 长叶烯; 4, 十七烷酮; 5, 丁位十四内酯; 6, 2-十九烷酮。

图1 同时蒸馏萃取气相色谱图

Figure 1 GC-FID of SDE



1, 壬醛; 2, 茶香酮; is, 内标; 3, 长叶烯; 4, 丁位十四内酯; 5, 十七烷酮; 6, 2-十九烷酮。

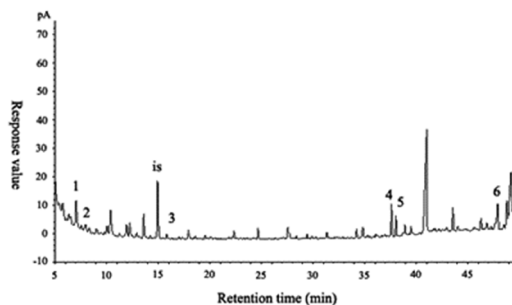
图2 香气标准物质色谱图

Figure 2 Chromatogram of the aroma standard components

2.2 薄壳山核桃果仁中香味成分的定量

以 GC-MS 的香气成分定性基础为指示作用，

购置了相应的标准品，与内标癸酸乙酯混合配制成混合标准品，按照 1.2.3 节中 GC-FID 条件进行了测定，结果如图 2。同时按这种色谱条件也测定样品提取及浓缩溶液，色谱图见图 3。图 3 的分离结果表明，目标香气成分与干扰物能够有效分离，可以对目标成分进行准确定量。



1, 壬醛; 2, 茶香酮; is, 内标; 3, 长叶烯; 4, 丁位十四内酯; 5, 十七烷酮; 6, 2-十九烷酮

图3 香气标准物质色谱图

Figure 3 Chromatogram of the aroma standard components

根据混合标样中各成分峰面积及相应的浓度，计算了相关因子，结果见表 1。在样品测试中，均采用内标法定量。

2.3 测定方法的有效性研究

为确定 SDE 结合 GC 测定薄壳山核桃果仁中 6 种香气成分的有效性，试验中进行了加标回收试验及重复性试验，以确定测定方法的准确度及精密度。回收率和相对标准偏差 (RSD) 结果 (表 2) 表明，香气成分回收率超过 75%，唯丁位十四内酯的回收率较低，主要与其不稳定的环状结构有关。RSD 均小于 26%，表明该方法测定的结果可靠性高。

表 1 标准物质的相关因子

Table 1 Correlation factors of standard substances

序号	标准物质	峰面积	标准品浓度/(mg·mL ⁻¹)	相关因子
1	壬醛	70 978 639	79.92	1.172 4
2	茶香酮	44 859 721	48.45	1.124 5
is	癸酸乙酯	3 748 086	3.60	1.000 0
3	长叶烯	18 847 792	16.04	0.885 8
4	丁位十四内酯	21 465 267	79.37	3.849 8
5	十七烷酮	34 090 073	86.24	2.633 8

表 2 不同香气成分对应回收率和 RSD

Table 2 Different aroma components correspond to recovery and RSD

序号	香气成分	加入量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/%	RSD/% *
1	壬醛	30.28	125.93	7.01
2	茶香酮	30.07	100.36	14.17
3	长叶烯	59.53	82.66	4.47
4	丁位十四内酯	32.34	40.67	25.92
5	十七烷酮	119.89	76.17	24.10
6	2-十九烷酮	30.00	85.42	16.02

注: *代表 5 次重复。

表 3 不同处理下各香气含量
Table 3 Aroma components under different treatments ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

化合物	不同施肥处理			
	T0	T1	T2	T3
壬醛	0.355 ^a	0.276 ^a	0.284 ^a	0.249 ^a
茶香酮	0.056 ^a	0.056 ^a	0.071 ^a	0.058 ^a
长叶烯	0.325 ^{ab}	0.536 ^a	0.510 ^{ab}	0.310 ^b
丁位十四内酯	0.672 ^a	0.620 ^a	0.356 ^a	0.456 ^a
十七烷酮	0.311 ^a	0.301 ^a	0.247 ^a	0.251 ^a
2-十九烷酮	1.119 ^b	3.254 ^a	1.135 ^b	0.459 ^b
总量	2.838	5.043	2.603	1.783

注: 字母表示处理间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

2.4 氮对薄壳山核桃香味成分产生的影响

不同施氮水平下收集的薄壳山核桃样品, 按照 1.2.2 及 1.2.3 中 GC-FID 步骤进行处理和测定, 得到不同目标香气成分在样品中的含量, 结果见表 3。

由表 3 可知, 不施用氮肥即 T0 处理时, 壬醛含量最高, 氮肥用量过高会抑制壬醛合成, 因为供试土壤中本身含有较高量的有效氮 (碱解氮含量 $56.79 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 在此基础上继续施用氮肥对壬醛的形成而言可能会出现养分不均衡; 茶香酮整体含量较低, T0 和 T1 基本保持一致, 随着氮肥用量增加而降低; 长叶烯含量先增后减, T1 含量达到最高, T3 与 T0、T1、T2 有显著性差异, T1 与 T0、T2、T3 有显著性差异; 丁位十四内酯的含量下降, T0 到 T1 含量变化幅度不大, T1 到 T2 含量下降幅度增大, T2 与 T3 相比含量相差不大; 十七烷酮的含量随氮用量增加总体呈递减趋势, 数据显示 T0 处理含量最高, T2 含量最低; 2-十九烷酮在 6 种香气成分中含量最高, 可能对薄壳山核桃风味影响最大, T1 处理时含量最大, T2 至 T3 处理含量迅速降低, 表明适量的氮促进该物质的形成, 过高或过低均会产生抑制效应。

从总含量上看, T1 施氮处理中的 6 种香气成分的总含量最高, 在现有的土壤环境条件下, 不施用氮肥 (T0), 或施用适量的氮肥 (T1) 有助于香气成分的产生, 氮肥用量过高 (T2 及 T3), 会不同程度地抑制香气成分的合成。各挥发性物质含量随氮肥用量水平的增加表现为先上升后下降。综合比较, T1 处理的氮肥用量能够使 6 种目标香气成分含量处在较高水平, 可不同程度地提高薄壳山核桃产品的风味。

3 讨论与结论

香气成分含量高低是影响薄壳山核桃风味的重要要素, 不同品种、不同种植条件下成分的含量及种类均有所不同。GC-MS 鉴定香气成分技术成熟,

先用此方法鉴定出特征的香气成分, 再购置相应的标准物进行验证, 最后用气相色谱法进行定量测定, 能够降低测试的成本, 便于推广应用。

氮肥是植物生长必须的大量元素之一, 合理用量能提升果实的品质, 并能调节土壤养分平衡^[14-15]。氮肥平衡施用能够提高经济作物植株中香气成分的含量, 烟草盆栽试验结果显示, 较贫瘠的土壤中施氮肥可显著增加烟草中致香物质的含量, 其中的类西柏烷类、苯丙氨酸、棕色化产物类和类胡萝卜素类增幅分别达 107.31%、152.35%、84.49% 和 72.18%, 而用量增加, 每盆超过 3 g 时, 致香物质含量降低^[16]。草莓盆栽试验结果也证实, 随着氮肥用量增加, 果实特征香气成分相对含量及总量有下降的趋势, 每盆超过 0.5 g 时显著降低^[17]。已有的研究表明, 氮肥能够提升农产品中香气成分的含量并改善分配状况, 但超过了一定的范围则起反作用。本试验中薄壳山核桃每株施用 0.4 g 氮 (T1 水平) 时, 特征的香气成分茶香酮、长叶烯、2-十九烷酮等含量较高, 6 种香气成分的总量也最大, 继续增加氮肥的用量, 每株达到 0.8 g 时 (T2 水平), 这些成分的含量及总量均显著下降。

多数香气成分是碳代谢的次级产物, 植物体内碳代谢与氮代谢既有协调作用又存在竞争作用, 其理论支持可追溯到 Bryant 等提出了“碳-营养平衡”假说^[18], 认为植物体内以碳为基础的次生代谢物, 如萜类、酚类等 C、H、O 物质与以 N 为基础的次生代谢物质保持一种平衡关系, 一种代谢速度增加似乎抑制了另一种代谢水平。在薄壳山核桃生长过程中, 当土壤氮供给量的增加导致以碳为基础的次生代谢物含量的减少, 旺盛的氮循环会抑制碳循环。本研究结果显示, 每株氮肥施用量超过 0.8 g 时 (T2 和 T3 水平), “波尼”果仁中的香气成分显著降低。

应用气相色谱-质谱联用技术鉴定了薄壳山核桃果仁中的关键香气成分, 采用同时蒸馏萃取结合气相色谱法测定了这些成分, 该测定方法准确度高、

回收率好、测试成本低,便于推广。研究了不同施氮水平下薄壳山核桃香气成分变化,总体趋势是低水平的施氮条件有助于香气成分的形成与累积,高水平施氮条件不利于香气成分的形成。6种不同的香气含量在不同的施氮量下均发生了变化。本研究环境条件下,薄壳山核桃“波尼”每株施氮量0.4 kg时,6种目标香气成分累积量处于较高水平,合理的氮肥用量对提高香气成分含量有重要作用。

参考文献:

- [1] 贾晓东,王涛,张计育,等.美国山核桃的研究进展[J].中国农学通报,2012,28(4):74-78.
- [2] 李健,凌骅,杨先裕,等.美国引进的6个薄壳山核桃品种光合生理特性比较[J].安徽农业大学学报,2018,45(2):258-262.
- [3] 罗会婷,贾晓东,翟敏,等.薄壳山核桃营养成分的研究进展[J].中国农学通报,2017,33(8):39-46.
- [4] 芮汉明,郭凯.食品香气的综合评价技术[J].食品工业科技,2008,29(7):277-280.
- [5] KRAPP A. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces[J]. Curr Opin Plant Biol, 2015, 25: 115-122.
- [6] 邓秋菊,李小飞,陈文静,等.环剥、环割对薄壳山核桃新梢生长和叶片碳氮代谢物积累影响[J].安徽农业大学学报,2017,44(5):790-795.
- [7] 张嘉雯,卢绍浩,赵铭钦,等.施氮量对四川雪茄烟叶碳氮代谢及品质的影响[J].作物杂志,2021(4):159-165.
- [8] 李银科,王正银,杨光宇,等.不同施氮水平对红花大金元烟叶香味物质和感官评吸质量的影响[J].植物营养与肥料学报,2017,23(2):539-547.
- [9] 周樊,陈文静,曹凡,等.配比施肥对薄壳山核桃幼苗生长和生理特性的影响[J].中南林业科技大学学报,2020,40(9):96-103.
- [10] 潜宗伟,陈海丽,刘明池.不同氮素水平对甜瓜芳香物质和营养品质的影响[J].植物营养与肥料学报,2011,17(6):1451-1458.
- [11] 乜兰春,孙建设,黄瑞虹.果实香气形成及其影响因素[J].植物学通报,2004,39(5):631-637.
- [12] 王绍梅,宋文明,冷燕,等.花香型古树滇红茶挥发物质气相色谱分析[J].江苏农业学报,2021,37(4):1010-1015.
- [13] 廖素兰,翁器林,唐云云,等.不同萃取方式分析武夷水仙茶挥发性成分[J].食品工业科技,2017,38(12):7-16.
- [14] 刘杜玲,张博勇,彭少兵,等.氮磷钾配方施肥对核桃产量和品质指标的影响[J].西北林学院学报,2018,33(6):113-117.
- [15] 丁立忠,潘伟华,马闪闪,等.测土配方施肥对临安山核桃生长和产量的影响[J].经济林研究,2018,36(4):33-39.
- [16] 刘霞,张毅,刘国顺,等.施氮量对烤烟中性致香物质含量的影响[J].中国农学通报,2008,24(3):200-204.
- [17] 刘松忠,姜远茂,彭福田,等.不同氮素水平对棚栽草莓果实芳香成分的影响[J].植物营养与肥料学报,2004,10(6):638-641.
- [18] BRYANT J P, STUART CHAPIN F, KLEIN D R. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory[J]. Oikos, 1983, 40(3): 357.