

固相微萃取(SPME)在茶叶香气分析中的应用

邓 静,王远兴*,毛雪金,辛 贞,张 娟,胡海涛
(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室,江西南昌 330047)

摘要:茶叶香气是影响茶叶品质的重要因子之一,其组成复杂且在茶叶中的含量低。固相微萃取作为目前茶叶香气的富集手段,具有操作简便快速等优点,是茶叶香气研究的热点。本文综述了近年来茶叶香气特征和固相微萃取(SPME)技术及其在茶叶香气分析中的应用。

关键词:茶,香气成分,固相微萃取,气相色谱-质谱联用

Research progress in solid phase microextraction (SPME) in tea aroma analysis

DENG Jing, WANG Yuan-xing*, MAO Xue-jin, XIN Zhen, ZHANG Juan, HU Hai-tao

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Tea aroma was an important index of tea quality, and the content of aroma in tea was relatively low and its composition was complex. Solid phase microextraction was a simple and rapid tea aroma compounds extraction method and it was one of research hotspots of tea aroma. In this paper, these tea aroma characteristics combined with recent applications of solid phase microextraction technology in tea aroma research were reviewed.

Key words: tea; aroma compounds; solid phase microextraction; GC/MS

中图分类号: TS272

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)02-0346-05

固相微萃取(Solid Phase Microextraction, SPME)是由加拿大Waterloo大学的Pawliszyn教授等^[1]提出的一种新型样品前处理技术,一般是将吸附剂涂附在石英纤维或其他与石英纤维类似的材料表面,然后将其插入样品溶液或气样中,也可以停放在溶液上方,根据“相似相溶”原理,被测物在样品与吸附剂之间进行分配,达到平衡后,将萃取纤维直接插入色谱进样口,萃取纤维上的待测组分被溶剂或热解析后由载气送入色谱柱和检测器进行分离、鉴定^[2-3]。茶叶香气是茶叶品质的指标之一^[4-5],其组成复杂、含量少,固相微萃取集采样、萃取、浓缩、进样于一体,对于茶叶香气成分分析具有显著优势,能较真实地反映茶叶的香气特征,是近年来香气成分分析的主要富集手段^[6-10]。目前,还没有专门针对固相微萃取在茶叶香气分析中应用的综合性报道。了解固相微萃取在茶叶香气分析中的应用对于固相微萃取技术以及茶叶香气分析的研究可以起到互相推动的作用。

1 茶叶香气特征

茶叶按加工工艺可分为绿茶、黄茶、红茶、白茶、

乌龙茶(青茶)和黑茶。茶树品种、地理环境、加工工艺及发酵程度等的不同,使得不同的茶叶具有不同的香气特征^[11],如按发酵程度分:绿茶属于不发酵茶,黄茶属于微发酵茶,红茶属于全发酵茶,乌龙茶属于半发酵茶,白茶属于轻度发酵茶,黑茶属于后发酵茶。另外,再加工茶,如茉莉花茶、雨花茶、茶叶鲜汁饮料等,也是本文的研究对象。

茶叶的香型有:清香、栗香、甜香、花香、果香和陈香等。随着现代仪器分析检测技术的不断发展及茶叶香气研究的深入,茶叶香型与茶叶中香气成分的关系渐渐为人们所认识,如吡嗪、吡喃、吡咯类化合物表现为“烘炒香”或“焦糖香”;茉莉内酯及其他内酯类、紫罗酮类表现为“果味香”;芳樟醇及其氧化物表现为“鲜爽的铃兰香”;橙花叔醇等倍半萜类、4-乙烯基苯酚表现为“木香”。袁海波等^[12]对茶叶香型及特征物质进行综述,其中介绍了不同茶类的香气特征,如绿茶在制作过程中经杀青、干燥发生“美拉德”反应形成吡嗪、吡喃、吡咯类成分,使得绿茶香型表现为清香、板栗香、高火香等;红茶在发酵过程中形成以醛、酮、酸等为主的化合物,使得红茶香型表现为甜花香;乌龙茶具有独特的花果香;黑茶属于微生物发酵的渥堆紧压茶,具有典型的陈香。窦宏亮^[13]在对绿茶和绿茶鲜汁饮料香气分析的研究中,采用GC-O/RI对检测到的香气成分进行气味描述,更有

收稿日期:2013-07-02 * 通讯联系人

作者简介:邓静(1989-),女,硕士研究生,研究方向:食品化学与分析技术。

基金项目:国家自然科学基金(31160321)。

利于直观了解茶叶香气成分与茶叶香型的不关系。

茶叶香气成分在茶叶中的绝对含量很少,一般只占干物质质量的0.01%~0.05%,却是决定茶叶品质的重要因子之一。分析茶叶香气成分的组成及含量,对于茶叶香型的鉴定及茶叶品质控制具有重要的意义,是近年来茶叶研究的热点^[14-17]。

2 固相微萃取(SPME)技术及其在茶叶香气分析中的应用

目前,国内外香气物质的提取方法主要包括液-液萃取、减压蒸馏萃取法、同时蒸馏萃取法、固相微萃取法、吹扫捕集法、顶空吸附法、超临界流体萃取法等^[18-19]。

其中,固相微萃取在1993年由美国的Supelco公司实现商品化,1994年获美国匹兹堡分析仪器会议大奖^[20]。固相微萃取技术适用于气体液体固体或顶空样品的采样及分析,易于与GC、HPLC、CE等技术联用,在环境监测、食品分析及药物检测方面应用较多,检测对象多为挥发性或半挥发性有机化合物。固相微萃取因其快速简便、不使用溶剂和样品检测非破坏性、易于与其他技术在线联用等优点,成为近年来茶叶香气成分分析的主要富集手段。

以SPME-GC/MS联用为例,SPME采样过程见图1:

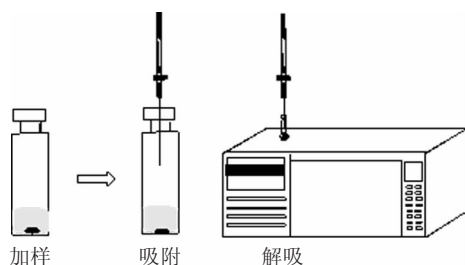


图1 固相微萃取采样过程

Fig.1 SPME sampling process

2.1 SPME涂层

SPME装置的核心是萃取头,萃取头的关键在于涂层。涂层必须满足一定的要求:对目标物有一定的富集萃取能力;有合适的结构和涂层厚度,在保证灵敏度的同时使目标物较快地从涂层上解吸下来;热稳定性好、耐溶剂、耐酸碱等。目前已经商品化的涂层有^[20]:聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚丙烯酸酯(PA)、聚二甲基硅氧烷/二乙烯基苯(PDMS/DVB)、聚二甲基硅氧烷/羧乙基(PDMS/CAR)、聚乙二醇/二乙烯基苯(CW/DVB)、聚乙二醇/模板树脂(CW/TPR)、二乙烯基苯/羧乙基/聚二甲基硅氧烷(DVB/CAR/PDMS)、二乙烯基苯/羧乙基(DVB/CAR)等。固相微萃取的基本原理是“相似相溶”原理,如非极性的PDMS萃取头对非极性的香气物质吸附力较强,极性的PA萃取头对极性的香气物质吸附力较强,DVB-CAR-PDMS因兼有极性和非极性涂层,所以吸附范围较广。影响SPME效果的因素有很多,其中影响最大的是萃取头的涂层材料,除此以外还有萃取温度、时间、解吸温度、pH、盐度等。

为了实现SPME良好的重现性,往往需要进行条

件的优化。杨江帆等^[21]采用固相微萃取技术提取茉莉花茶的香气成分,并对SPME的萃取条件,如萃取头类型、吸附温度、吸附时间、脱附时间和样品量等进行优化,得到茉莉花茶香气成分的最优萃取条件为:萃取头类型100 μ m PDMS萃取头、吸附温度60 $^{\circ}$ C,吸附时间2h,脱附时间5min,样品量150g。刘晓慧等^[22]采用固相微萃取技术提取黄茶香气成分,并研究了固相微萃取头种类、吸附温度、吸附时间和解吸时间对黄茶香气成分的影响,得出最佳萃取头DVB-CAR-PDMS萃取头、吸附温度80 $^{\circ}$ C、吸附时间1h、解吸时间1min,结果共检测出108种香气成分。申东等^[23]采用顶空固相微萃取法提取藤茶的香气成分,并对样品量、吸附温度、吸附时间、平衡时间、解吸时间条件进行了优化,得出最佳样品量0.5g、吸附温度50 $^{\circ}$ C、吸附时间50min、平衡时间10min、解吸时间2.5min。对固相微萃取条件的优化,有利于获得更全面的茶叶香气数据。

商品化的涂层由于种类有限、使用寿命短且价格昂贵,在一定程度上限制了其应用和推广。因此,国内外许多学者致力于新型涂层材料的研究,合成了许多性能优良、价廉易得的非商品化涂层材料,如分子印迹聚合物、碳纳米管、离子液体等^[24]。

分子印迹聚合物(MIPs)是以目标分子为模板与功能单体以共价或非共价作用结合,再与交联剂共聚得到共聚物;目标分子除去后,聚合物中形成了大量与目标分子空间互补的“空穴”,从而对目标分子的空间结构具有“记忆”,能够特异性地识别样品中的印迹分子。MIPs由于制备简单、能够反复使用、机械强度较高、耐高温和耐溶剂性好,尤其是具有高效选择特异性的优点,作为固相吸附剂用于食品中目标物的检测近年来备受关注^[25]。分子印迹固相微萃取(MI-SPME)^[26]结合了MIPs的高选择性和SPME样品用量少、操作快速简便等优点,从而实现选择性地富集复杂基质中的痕量目标分析。

碳纳米管具有独特的管状结构,良好的化学稳定性、热稳定性,高重复利用率以及较大的比表面积,在分析非极性化合物方面具有良好的应用前景。杨红丽等^[27]采用碳纳米管(CNTs)制备二楼碳纳米管固相微萃取纤维,对该纤维进行表征的结果显示:自制碳纳米管固相微萃取纤维具有和商品聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚乙二醇(PA)相当的吸附特性和重现性。

离子液体(Ionic liquids, ILs)是一种在室温或室温附近温度下完全以离子状态存在的有机液体物质,具有黏度大、蒸汽压低、不易挥发、稳定性好、环境友好等特点,是近年来最受关注的SPME涂层材料之一。离子液体-固相微萃取结合了液相微萃取和固相微萃取的特点,大大拓展了SPME的应用范围。

2.2 萃取方法

SPME的萃取模式有:纤维式的固相微萃取(Fiber-SPME)、管内固相微萃取(In-tube SPME)、搅拌棒式固相微萃取(SBSE)和固相微萃取膜(SPMEM)等^[20]。由Pawliszyn教授提出的Fiber-SPME是最早应用

的萃取模式,且应用最为广泛,有三种基本的萃取方式:直接萃取(Direct Extraction SPME)、顶空萃取(Headspace SPME)和膜保护萃取(Membrane-protected SPME)。

2.3 联用技术在茶叶香气分析中的应用

SPME易于与GC、HPLC、CE等技术联用,在茶叶香气检测方面,主要以SPME与GC-MS联用为主。此外,为得到茶叶香气更全面、更完整的信息,在香气提取方面常将SPME与同时萃取蒸馏(SDE)联用,在检测方面将气相色谱-质谱法(GC-MS)与气相色谱-嗅觉测量法(Gas chromatography-olfactometry, GC-O)联用,在数据分析方面将SPME/GC-MS与化学计量学联用。

2.3.1 SPME与GC-MS联用 图1所示为SPME与GC-MS联用的手动操作方法,主要包括加样、吸附、解吸。该法易于操作,是目前茶叶香气成分提取与检测最常用的技术^[28]。孔维婷等^[29]采用SPME与GC-MS联用法测定信阳毛尖香气成分结果共检测出99种香气成分。王力等^[30]采用HS-SPME与GC-MS联用法测定了白毫银针和白牡丹以及同一品种新鲜茶叶制成的绿茶、红茶的香气成分,结果显示白茶的主要香气成分是 β -芳樟醇及其氧化物、香叶醇、苯乙醇、苯甲醇、水杨酸甲酯等,且白茶与绿茶、红茶的香气组成有明显差异。

除了GC/MS,SPME也可以与高效液相色谱(HPLC)或气相色谱-离子阱质谱(GC-IO)结合来对茶叶香气进行检测。Li-Fei Wang等^[31]采用高效液相色谱(HPLC)和SPME-GC对来自不同国家和市场的56个绿茶、乌龙茶和红茶样本进行分析,同时发现SPME-GC可用于区分真假茉莉花茶。

2.3.2 SPME与SDE联用 就香气成分分析来说,将固相微萃取(SPME)和同时萃取蒸馏(SDE)两种方法结合起来能更好地对得到香气成分的综合评价,SPME法萃取条件较温和,捕集到的主要是低沸点的醇类、醛酮类及弱极性的烃类;SDE法的萃取温度高,不仅捕集到低沸点的醇类、萜烯类,还有高沸点的酸、脂类等。王道平等^[32]分别采用SPME法和SDE法提取黔玉兰百花湖新鲜白茶的香气成分,运用气相色谱-质谱联用仪进行测定。结果共检测出74种化合物,其中SPME法得到41个化合物,SDE法得到39个化合物,通过比较发现两种提取方法得到的茶叶香气成分种类及相同香气成分的相对含量均有一定差异,其中茶叶香气特征成分主要集中在SPME法所富集的部分。王峰等^[33]分别采用SPME法和SDE法提取雨花茶的香气成分,通过GC-MS定性定量分析,比较两种提取方法获得的香气成分。

2.3.3 SPME/GC-MS与SPME/GC-O联用 茶叶中的挥发性组分对茶叶风味有重要影响,气相色谱-嗅觉测量法(GC-O)依靠人类鼻子的敏感嗅觉结合,在气相色谱柱末端安装分流口,当样品进入GC,经由毛细管柱分离后,将经GC毛细管柱分离后得到的流出组分分流到检测器和鼻子。窦宏亮等^[34]采用顶空固相微萃取(HS-SPME)分别提取绿茶和绿茶鲜汁饮料

中的挥发性成分,并结合气相色谱-质谱法(GC-MS)、气相色谱-嗅觉测量法(GC-O)以及挥发性化合物的保留指数(RI)对两者的香气成分进行鉴定。结果显示,对于绿茶,由GC-MS共鉴定出51种挥发性成分,GC-O/RI进一步分析确证了其香气成分为醇类、醛类、酮类、酯类等化合物;对于绿茶鲜汁饮料,由GC-MS共鉴定出55种挥发性成分,GC-O/RI进一步分析确证了其香气成分为醇类、醛类、酮类等化合物。苗爱清等^[34]采用HS-SPME-GC-MS/GC-O分析了白叶单枞茶、金萱、铁观音、黄金桂4个乌龙茶的香气成分。结果显示,白叶单枞茶主要的香气成分是芳樟醇及其氧化物 I;金萱主要香气成分是吡啶;铁观音主要香气成分是芳樟醇、水杨酸甲酯、己酸-顺-3-己烯酯和 α -法尼烯;黄金桂主要香气成分是芳樟醇氧化物 I、己酸-顺-3-己烯酯和 α -法尼烯。

2.3.4 SPME-GC-MS与化学计量学联用 茶叶香气成分复杂多样,尤其在样品量大的情况下,需要对大量数据进行分析,仅仅依靠人工检索对结果进行逐一分析会产生巨大的工作量,因此,在对大量茶样的香气成分进行研究时可以联用化学计量学方法进行数据处理,通过模型构建实现茶叶香气质量的评价、预测及茶叶产地的识别等。Lin J等^[35]采用HS-SPME/GC-MS对21个龙井茶样本进行检测,采用Pearson线性相关分析和偏最小二乘回归法(PLS)来研究茶叶香气与挥发性化合物的关系。共检测到60种挥发性化合物,主要是萜烯和酯类化合物,确定了10种对龙井茶香气有主要贡献的化合物,在这10种香气成分的基础上,构建了龙井茶香气质量预测模型(相关系数为89.4%,交叉验证的相关系数为80.4%)。陈美丽等^[36]采用SPME法分别提取大佛龙井茶、西湖龙井茶、滇红工夫、祁红工夫和茉莉花茶的香气成分,运用气相色谱-质谱联用仪进行检测,结果检测出6种共同存在的香气成分,以这六种香气成分的峰面积构成数据矩阵,利用Matlab软件进行主成分分析,结果显示建立的判别函数经10倍交叉验证的正确率和回判率均达100%,判别效果良好。郭丽等^[37]采用顶空固相微萃取-气质联用(HS-SPME-GC/MS)测定了12个白茶样本的香气成分,利用主成分分析(PCA)构建了白茶香气质量评价模型,结果显示模型检验结果与感官审评结果相同,表明该香气质量评价模型具有可行性。

Pongsuwan等^[38]采用气相色谱-飞行时间质谱(GC-TOF/MS)和多元数据分析研究不同质量绿茶样本的代谢指纹图谱,对茶叶质量进行评价,建立可靠的质量预测模型。Nengsheng Ye等^[39]采用HS-SPME/GC-MS和模式识别方法对不同产地的绿茶进行识别。

3 结论

香气是衡量茶叶品质的重要因子之一,不同的茶叶品种和加工工艺,其成品茶的香气组成和含量有一定差异,不同种类的茶因此具有不同的香气特征。香气成分在茶叶中含量低、组成复杂、不稳定等原因,给茶叶香气中的痕量或微量组分分析带来干

扰。固相微萃取 (SPME) 集采样、萃取、浓缩、进样于一体, 具有快速简便、不使用溶剂和样品检测非破坏性等优点, 能显著减少或避免这种干扰, 已成为近年来香气成分分析的主要富集手段之一。固相微萃取的不足在于不能实现同时大量地萃取, 且商品化涂层材料种类有限^[40]; 另外, SPME 捕集到的大多是低沸点的香气成分, 因此与其他萃取方法联用互补更有利于得到茶叶香气物质更全面、更完整的信息。随着新型 SPME 萃取涂层的研究以及 SPME 与其他提取、检测、数据分析技术的联用, SPME 作为茶叶香气分析的前处理技术, 具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] ARTHUR CL, PAWLISZYN J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers[J]. *Anal Chem*, 1990, 62(19):2145-2148.
- [2] 王俊平, 姚玉超, 王硕. 分子印迹材料萃取与高效液相色谱联用技术[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(2):171-175.
- [3] 冯国琳, 王焕英, 邢广恩. 新型萃取技术研究进展[J]. *化工中间体*, 2013(2):1-5.
- [4] 刘晓博, 鹿晓莉, 孔维婷, 等. 信阳毛尖特征赋香成分的研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(1):108-112.
- [5] 司辉清, 沈强, 鹿晓莉. 新型花茶的香气特征研究[J]. *茶叶科学*, 2010, 30(3):167-172.
- [6] 周珊, 赵立文, 马腾蛟, 等. 固相微萃取 (SPME) 技术与质谱技术联用研究进展[J]. *现代科学仪器*, 2006, 16(3):14-20.
- [7] 张来, 余正文, 杨占南, 等. SPME-GC-MS 分析瀑布毛峰茶叶的赋香成分[J]. *光谱实验室*, 2012, 29(2):672-676.
- [8] 詹家芬, 陆舍铭, 孟昭宇, 等. 固相微萃取/加速溶剂萃取-气相色谱-质谱法分析青山水茶叶的挥发性成分[J]. *色谱*, 2008, 26(3):301-305.
- [9] 欧阳石光. 茶叶香气指纹图谱及特征识别的初步研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [10] 姚姗姗. 茶叶香气化学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [11] 王力, 林智, 吕海鹏, 等. 茶叶香气影响因子的研究进展[J]. *食品科学*, 2010, 31(15):293-298.
- [12] 袁海波, 尹军锋, 叶国柱, 等. 茶叶香型及特征物质研究进展[J]. *中国茶叶*, 2009, 31(8):14-15.
- [13] 窦宏亮, 李春美, 顾海峰, 等. 采用 HS-SPME/GC-MS/GC-Olfactometry/RI 对绿茶和绿茶鲜汁饮料香气的比较分析[J]. *茶叶科学*, 2007, 27(1):51-60.
- [14] LIN J, ZHANG P, PAN ZQ, *et al.* Discrimination of oolong tea (*Camellia sinensis*) varieties based on feature extraction and selection from aromatic profiles analysed by HS-SPME/GC-MS[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(1):259-265.
- [15] 代毅, 须海荣. 采用 SPME-GC/MS 联用技术对龙井茶香气成分的测定分析[J]. *茶叶*, 2008, 34(2):85-88.
- [16] 兰欣, 汪东风, 张莉, 等. HS-SPME 法结合 GC-MS 分析崂山绿茶的香气成分[J]. *食品与机械*, 2012, 28(5):96-101.
- [17] 王家明, 王彩娇, 王超, 等. CTC 顶空固相微萃取-气质联用法分析霍山黄芽茶叶的香气成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(18):85-87.
- [18] 赵琰, 肖成杰, 蔡宝国, 等. 气相色谱-质谱法中 4 种不同捕集方式对茶叶香气成分测定的影响[J]. *食品科学*, 2011, 32(16):283-289.
- [19] WU F, LU WP, CHEN JH, *et al.* Single-walled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometric determination of pesticides in tea samples[J]. *Talanta*, 2010, 82(3):1038-1043.
- [20] 梁永津. 新型固相微萃取涂层的制备和表征[D]. 广州: 中山大学, 2010.
- [21] 杨江帆, 杨广, 梁小虾, 等. 茉莉花茶香气的 SPME/GC-MS 检测方法[J]. *热带作物学报*, 2009, 30(11):1698-1704.
- [22] 刘晓慧, 张丽霞, 王日为, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法分析黄茶香气成分[J]. *食品科学*, 2010, 31(16):239-243.
- [23] 申东, 沈强, 潘科, 等. 基于 HS-SPME/GC-MS 定性半定量分析藤茶特征香气[J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(11):67-70.
- [24] 蒋生祥, 冯娟娟. 固相微萃取研究进展[J]. *色谱*, 2012, 30(3):219-221.
- [25] MARTIN-ESTEBAN A. Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 45:169-181.
- [26] MULLETT WM, MARTIN P, PAWLISZYN J. In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(11):2383-2389.
- [27] 杨红丽, 王锴, 王翊如, 等. 两种新型固相微萃取纤维的研制和表征[J]. *浙江大学学报: 工学版*, 2008, 42(7):1276-1280.
- [28] 刘学, 刘飞, 黄先智, 等. 桑叶绿茶香气成分的 SPME-GC-MS 分析[J]. *食品科学*, 2012, 33(20):238-242.
- [29] 孔维婷, 刘建军, 司辉清. 固相微萃取与气相色谱-质谱联用分析信阳毛尖香气成分[J]. *食品科学*, 2012, 33(12):185-189.
- [30] 王力, 蔡良绥, 林智, 等. 顶空固相微萃取-气质联用法分析白茶的香气成分[J]. *茶叶科学*, 2010, 30(2):115-123.
- [31] WANG LF, LEE JY, CHUNG JO, *et al.* Discrimination of teas with different degrees of fermentation by SPME-GC analysis of the characteristic volatile flavour compounds[J]. *Food Chemistry*, 2008, 109(1):196-206.
- [32] 王道平, 甘秀梅, 梁致远, 等. 固相微萃取法与同时蒸馏萃取法提取茶叶香气成分[J]. *西南农业学报*, 2013, 26(1):131-135.
- [33] 王峰, 曹福亮, 张洪娟. SPME 法与 SDE 法测定雨花茶香气成分比较[J]. *林业科技开发*, 2010, 24(3):123-125.
- [34] 苗爱清, 吕海鹏, 孙世利, 等. 乌龙茶香气的 HS-SPME-GC-MS/GC-O 研究[J]. *茶叶科学*, 2010, 30(增刊1):583-587.
- [35] LIN J, DAI Y, GUO YN, *et al.* Volatile profile analysis and quality prediction of Longjing tea (*Camellia sinensis*) by HS-SPME/GC-MS[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(12):972-980.
- [36] 陈美丽, 唐德松, 张颖彬, 等. GC-MS 结合化学计量学对茶叶品质的判别研究[J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2013, 39(1):84-91.
- [37] 郭丽, 蔡良绥, 林智, 等. 基于主成分分析法的白茶香气质量评价模型构建[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(9):1606-1610.

(下转第 353 页)

- [7] 熊亚红,高敬忠,郑坚鹏. 提高漆酶稳定性的化学修饰方法的研究[J]. 化学研究与应用, 2011, 23(8):1004-1006.
- [8] Dis tel K, Thu GY, Wang P. Autocatalysis using an organic-soluble enzyme for the preparation of poly(lactic acid) in organic solvents[J]. Bio resource Tech, 2005(96):617-623.
- [9] 翁琛,王志武,刘菟. 酶化学修饰的研究进展[J]. 成都大学学报:自然科学版, 2003, 22(8):10-15.
- [10] 罗九甫,李志勇. 生物工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社, 2006:53-63.
- [11] 马建标. 高分子对酶、抗体、DNA的修饰、固定化及其生物医学应用[J]. 高等学校化学学报, 1997, 18(7):1227-1235.
- [12] Locoman, Combes D. Thermoscopically of modified enzymes: a detailed study[J]. J Chemical Tech Biotechnical, 1999(74): 25-321.
- [13] Ken-ichi Mogi, Mitsutoshi Nakajima. Selection of Surfactant-Modified Lipases for Interesterification of Triglyceride and Fatty Acid[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996, 73(11):1505-1511.
- [14] 曾俊,杨国龙,毕艳兰,等. 无溶剂体系中Span修饰的猪胰脂酶催化茶油与亚油酸酯交换 [J]. 河南工业大学:自然科学版, 2011, 32(1):10-13.
- [15] 张洁,杨国龙,毕艳兰,等. 乙醇溶液中Tweens对猪胰脂酶的修饰作用[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4):44-47.
- [16] Gomez L, Ramirez HL, Billabong R. Stabilization of invertase by modification of sugar chains with chitosan[J]. Biotechnology Letters, 2000(22):347-350.
- [17] Gomez L, Billabong R. Functional stabilization of invertase by covalent modification with pectin[J]. Biotechnology Letters, 2000(22):1191-1195.
- [18] 郭勇. 酶工程[M]. 北京:科学出版社, 2009, 122-133.
- [19] 肖连冬,张彩莹. 酶工程[M]. 北京:化学工业出版社, 2008, 11-130.
- [20] 黎春怡,黄卓烈. 化学修饰法在酶分子改造中的应用[J]. 生物技术通报, 2011(9):39-34.
- [21] Khumtaveeporn K, Ullmann A, Matsumoto K, *et al.* Expanding the utility of protease in synthesis: broadening the substrate acceptance in non-coded amide bond formation using chemically modified mutant of subtilisin[J]. Tetrahedron Asymm, 2001(12): 249-261.
- [22] 杨璇,孙建和,罗时蕾. 修饰的弹性酶在保健食品中的应用[J]. 贵州师范大学学报, 2003(3):143-147.
- [23] Paulo Waldir Tardioli, Marcelo Fernandes Vieira. Immobilization stabilization of glucoamylase: Chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1):409-412.
- [24] Yong Xue, Cheng-Yao Wu, Christopher J Branford-White, *et al.* Chemical modification of stem bromelain with anhydride groups to enhance its stability and catalytic activity[J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2010, 63(3-4):188-193.
- [25] Jessica Forde, Alex Vakurov, Tim D Gibson, *et al.* Chemical modification and immobilisation of lipase B from *Candida antarctica* onto mesoporous silicates [J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2010, 66(1-2):203-209.
- [26] Oveimar Barbosa, Monica Ruiz, Claudia Ortiz, *et al.* Modulation of the properties of immobilized CALB by chemical modification with 2,3,4-trinitrobenzenesulfonate or ethylenediamine [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(5):867-876.
- [27] 张松平, 王平. 化学修饰提高酶催化性能的重要工具[J]. 生物加工过程, 2006, 4(1):4-8.
- [28] Kodera Y, Matsushima A, Hiroto M, *et al.* Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications[J]. Prog Polym Sci, 1998(23):233-239.
- [29] Stephen Zano, Radhika Malik, Sylvia Szucs, *et al.* Modification of aspartoacylase for potential use in enzyme replacement therapy for the treatment of Canavan disease[J]. Molecular Genetics and Metabolism, 2011, 102(2):176-180.
- [30] Leila Hassani. Chemical modification of Horseradish peroxidase with carboxylic anhydrides: Effect of negative charge and hydrophilicity of the modifiers on thermal stability [J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2012, 80:15-19.
- [31] 施巧琴. 酶工程[M]. 北京:科学出版社, 2005:321-322.
- [32] Jene Q, Pearson JC, Lowe CR. Surfactant modified enzymes: Solubility and activity of surfactant-modified catalase in organic solvents[J]. Enzyme Microb Technol, 1997(20):69-74.
- [33] Jessica Forde, Elizabeth Tully, Alex Vakurov, *et al.* Chemical modification and immobilisation of laccase from *Trametes hirsuta* and from *Myceliophthora thermophila* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(6):430-437.
- [34] Mourad Bekhouche, Bastien Doumèche, Loïc J Blum. Chemical modifications by ionic liquid-inspired cations improve the activity and the stability of formate dehydrogenase in [MMIm][Me₂PO₄][J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2010, 65(1-4):73-78.
- [35] 池政豪,陈吉祥,杨慧,等. 鳃弧菌胞外金属蛋白酶的化学修饰研究[J]. 生物技术通报, 2006(增刊):434-437.
- [36] 马晓建,吴勇,祝春进,等. 化学修饰酶的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2004(6):7-9.

(上接第349页)

- [38] PONGSUWAN W, FUKUSAKI E, BAMBA T, *et al.* Prediction of Japanese Green Tea Ranking by Gas Chromatography/Mass Spectrometry-Based Hydrophilic Metabolite Fingerprinting[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(2):231-236.
- [39] YE NS, ZHANG LQ, GU XX. Discrimination of Green Teas from Different Geographical Origins by Using HS-SPME/GC-MS and Pattern Recognition Methods[J]. Food Analytical Methods, 2012, 5(4):856-860.
- [40] 陈金美,曾景斌,陈文峰,等. 新型固相萃取涂层的研究进展[J]. 化学进展, 2009, 21(9):1922-1929.