



(21) 申请号 201310155967. 2

(22) 申请日 2013. 04. 28

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

(72) 发明人 徐岩 吴群 朱伟岸

(74) 专利代理机构 北京爱普纳杰专利代理事务所 (特殊普通合伙) 11419

代理人 何自刚 王玉松

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006. 01)

审查员 李倩

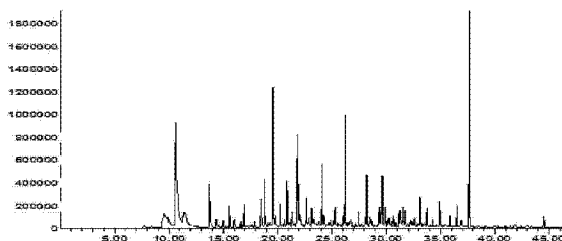
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种测定食品酿造谷物类原料结合态香气物质的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种测定食品酿造谷物类原料中结合态香气物质的方法,将酿造过程中应用的高粱、豌豆、大麦、小麦、玉米、大米、糯米等,通过研磨、浸提、旋蒸、溶解、液液萃取除去游离态香气物质,然后通过固相微萃取最终得到结合态香气物质的前体物质,再次经过旋蒸、溶解后通过高温酸处理或者 β -D-葡萄糖苷酶处理使其水解,从而使香气物质得到释放,最后通过顶空固相微萃取技术与气相色谱-质谱联用技术(HS-SPME-GC-MS),对其中香气物质进行定性定量分析。本方法中结合态前体的提取在常温下进行,既能排除原料自身游离态香气物质的影响,又能避免结合态香气物质的损失,从而实现结合态香气物质的准确测定。



1. 一种测定食品酿造谷物类原料结合态香气物质的方法,其特征在于包括如下步骤: 1) 首先将谷物磨碎,然后通过有机溶剂的反复浸提,旋蒸至干去除有机相以及挥发性香气物质;2) 用 pH4 ~ 9 的磷酸盐缓冲液溶解,并进一步分离挥发性香气物质后,通过固相微萃取最终得到结合态香气物质的前体物质;3) 旋蒸至干后,再次用 pH4 ~ 9 的磷酸盐缓冲液溶解,通过物化作用或者酶解作用使结合态香气物质释放;4) 然后通过 HS-SPME-GC-MS 测定香气物质的成分,并进行定性定量分析;所述有机溶剂浸提方法为,先用甲醇、乙醇、乙腈、丙酮单独或其复配的溶剂浸泡原料 12 ~ 36h 后,超声处理 0.5 ~ 1h,离心后取上清,然后再将残渣用甲醇、乙醇、乙腈、丙酮单独或其复配的溶剂浸泡浸泡 12 ~ 36h 后,超声处理 0.5 ~ 1h,离心后取上清,合并两次上清液备用。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述原料为高粱、豌豆、大麦、玉米、大米、糯米、小麦、黑麦、荞麦、黄米、麸皮中的一种或几种。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于旋蒸至干去除有机相以及挥发性香气物具体条件为在常温和减压的条件下进行的,既可以除去易挥发的物质,又保证了结合态物质前体不会分解。

4. 如权利要求 1-3 任一所述的方法,其特征在于进一步分离挥发性香气物质采用有机溶剂乙醚、戊烷、二氯甲烷、乙酸乙酯单独或复配反复萃取 2 ~ 5 次,以尽可能完全的将挥发性的香气物质萃取出来,排除挥发性香气物质的干扰。

5. 如权利要求 1-3 任一所述的方法,其特征在于固相微萃取的工艺为将初步得到的结合态香气物质前体溶液通过 Sep-Pak C18E 固相萃取预装柱,用 2 ~ 6 倍柱体积的超纯水冲洗后,在用 1 ~ 3 倍柱体积的甲醇将结合态物质洗脱并接收,在 30 ~ 40°C 下减压旋蒸至干后用 pH4 ~ 9 的磷酸盐缓冲液溶解。

6. 如权利要求 5 所述的方法,其特征在于固相微萃取参数为:样品流速为 2 ~ 10mL/min,超纯水的流速为 2 ~ 10mL/min,甲醇的流速为 0.5 ~ 5mL/min。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于物化方法为:用盐酸调节 pH 为 1 ~ 3,密闭处理后在 80 ~ 100°C 下水浴 0.5 ~ 5h。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于酶解方法为添加 β -D-葡萄糖苷酶,使得终浓度为 5 ~ 10U/mL,密闭处理后,在 25 ~ 45°C 条件下缓慢振荡 1 ~ 5d。

9. 如权利要求 7 或 8 所述的方法,其特在于 HS-SPME-GC-MS 定性定量分析的方法为:通过将未知物质的质谱与 NIST05a. L Database 中的质谱进行比较,对相似度达 70% 以上且峰形较好的物质进行初步的定性,然后通过色谱图计算得到初步定性物质的保留指数,与相应酿造产品中的常规成分的标准品的保留指数进行比对进行定性;对已定性的物质进行定量分析:先配置最大浓度的待测物质的混合标样,然后梯度稀释为 12 ~ 16 个浓度,取每种浓度的混标加到 15mL 顶空瓶中,加入内标,再加入氯化钠饱和处理,进行 HS-SPME-GC-MS 的测定,利用标准品物质和内标物质峰面积比为横坐标、浓度比为纵坐标制作标准曲线,将待测样品中物质与内标物质的峰面积比值代入相应的标准曲线方程计算出待测物质的含量。

一种测定食品酿造谷物类原料结合态香气物质的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种测定食品酿造谷物类原料香气物质的方法,特别是一种结合态香气物质的方法。

背景技术

[0002] 在中国传统酿造产品中,例如白酒、醋、酱油等,其独特的风味被认为是特有微生物的作用,其风味的研究主要集中在原酒、成品酒以及大曲、酒醅上,却缺少了原料分析这一方面。古人云:水,酒之血;曲,酒之骨;粮,酒之肉。足以看出粮食原料的重要性,粮食原料除了提供微生物生长所需的能量外,其自身香气物质不容忽视。

[0003] 香气物质分为游离态和结合态两种存在形式,只有游离态的才具有香气效果,结合态的需要释放变为游离态才是有效的香气物质,而结合态香气物质可达游离态香气物质的8倍,因此结合态香气物质的研究是重中之重。目前原料中结合态香气物质的研究并不清楚,方法的限制是一个重要的原因,因此需要建立方法去深入研究原料中香气物质的贡献。

[0004] 关于谷物类粮食的香气物质有相关学者进行过研究:杨洁等人通过100℃水浴加热的方法研究过大米中的香气物质;金邦荃等人将玉米速冻研磨后研究速冻甜玉米的香气物质;练顺才等人也研究过高粱蒸煮时产生的香气。但是上述的研究并没有考虑当粮食作为酿造原料时对产品风味的贡献,仅仅是对全部香气物质的检测,更没有将香气物质分为游离态和结合态的物质。在果酒尤其是葡萄酒的研究中,果实自身的香气物质占了很大一部分,结合态香气物质的主要的提取方法就是将水果榨汁后,通过树脂柱的吸附作用将糖苷类物质吸附,然后再用洗脱剂洗脱得到结合态香气物质的前体,经水解之后香气物质得以释放。但是,干态类原料无法榨汁,因此上述方法不适合对干态类原料结合态香气物质前体的提取,需要探索新的方法。

[0005] 本专利的发明,提供了一种提取酿造谷物类原料中结合态香气物质的提取方法。该方法不是直接去检测无风味的结合态香气前体物质,而是通过水解处理使结合态的香气物质以游离态的形式释放出来。本方法的建立,使得原料香气物质分析的体系更加完善,能够抓住关键的结合态香气物质进行分析,对提高酿造产品的品质也有重要意义;另外,提取得到的前体物质可以应用到生产过程中,提高相应香气物质的含量。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供一种提取谷物类原料中结合态香气物质的结合态前体,对其进行处理后检测香气物质,并将该方法应用于酿造食品领域中。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案为:

[0008] A: 谷物类原料中结合态香气物质前体的提取:

[0009] ①原料的预处理:将所研究的原料晾干,于研磨机中碾碎。

[0010] ②前体物质的提取:取10~50g原料于锥形瓶中,加入100~500mL的甲醇、乙醇、

乙腈、丙酮单独或按不同比例配比的溶剂浸泡 12 ~ 36h, 超声 0.5 ~ 1h 后离心(8000rpm, 15min) 取上清液, 残渣再次用 100 ~ 500mL 的甲醇、乙醇、乙腈、丙酮单独或按不同比例配比的溶剂浸泡 12 ~ 36h, 超声 0.5 ~ 1h 后离心(8000rpm, 15min) 取上清液, 合并清液, 在 30 ~ 40℃ 下减压蒸馏至干, 用 100 ~ 500mL 的磷酸盐缓冲液(pH4 ~ 9) 溶解。

[0011] ③除杂: 将上述溶液置于分液漏斗中, 用 20 ~ 100mL 的乙醚、戊烷、二氯甲烷、乙酸乙酯单独或按不同比例配比的有机溶剂反复萃取 2 ~ 5 次, 以去除溶解在水中游离态香气物质, 将最后得到的溶液放在 -20℃ 条件下备用。

[0012] ④纯化: 将上述溶液 20 ~ 100mL 以 2 ~ 10mL/min 的流速通过 Sep-Pak C₁₈E(1 ~ 10g, 6mL ~ 60mL) 固相萃取预装柱, 然后用 2 ~ 6 倍柱体积的超纯水以 2 ~ 10mL/min 冲洗杂质, 最后用 1 ~ 3 倍柱体积的甲醇(色谱纯) 以 0.5 ~ 5mL/min 的流速将结合态物质洗脱并接收, 在 30 ~ 40℃ 下减压旋蒸至干后用 pH4 ~ 9 的磷酸盐缓冲液溶解。

[0013] B: 结合态香气物质的释放:

[0014] 物化处理: 用盐酸调节上述溶液 pH 为 1 ~ 3, 将 10mL 前体物质溶液装入安瓿瓶中密封, 沸水浴加热 0.5 ~ 5h 左右, 待其冷却后打破安瓿瓶, 调节 pH 为 7。

[0015] 酶处理: 在安瓿瓶中加入 10mL 前体物质溶液, 然后加入 β-D-葡萄糖苷酶, 使得终浓度为 5 ~ 10U/mL, 密封后置于 25 ~ 35℃ 条件下震荡 24 ~ 48h, 反应完后加入 1 ~ 5% 的 CaCl₂ 抑制酶活。

[0016] C: 香气物质的检测:

[0017] 采用 HS-SPME-GC-MS 方法, 在 15mL 顶空瓶中加入 8mL 澄清溶液, 3 ~ 5g 氯化钠, 加入内标, 进行顶空固相微萃取。顶空固相微萃取的条件为: 三相 (Car/DVB/PDMS) 萃取头, 60℃ 预热 5 ~ 15min, 萃取吸附 35 ~ 55min, GC 解吸 5 ~ 15min。

[0018] 将未知成分的质谱与 NIST05a.L Database 中的质谱比对, 进行初步定性, 然后通过色谱图计算得到保留指数 RI, 与相应酿造产品(如白酒)中的常规成分的标准品的保留指数进行比对, 进行最后的确定; 制作待测物质的标准曲线, 经 GC-MS 检测后将待测物质和内标物质峰面积比代入相应的标准曲线方程计算出待测物质的含量。所有实验重复三次或以上, 取平均值做最终结果。

[0019] 本发明首次将谷物中结合态香气物质作为研究对象, 丰富了原料香气物质的研究。本发明所建立的方法简便有效: 既能排除自身游离态香气物质的影响, 又可以有效的提取谷物类原料中的结合态香气物质前体并防止其分解; 采用的酸解或酶解的方法可以有效的使结合态的香气物质释放出来变成挥发性物质。该发明的有益效果还有: 提取得到的结合态物质可以用在工业生产过程, 提高相应香气物质的含量; 本发明完善了酿造产品风味分析体系, 用于原料品质评价以及原料等级分类, 对提高酿造产品的品质有重要意义。

附图说明

[0020] 图 1: 物化处理玉米中结合态香气物质气相色谱图

[0021] 图 2: 酶处理小麦中结合态香气物质气相色谱图

具体实施方式

[0022] 实施例 1: 高粱中结合态香气物质前体物质的提取以纯化

[0023] 将高粱晾干后粉碎,取 10g 于锥形瓶中,加入 20mL 的乙腈 / 乙醇(v/v3:7),常温下浸泡 12h,超声 0.5h 后,将浸提液装在 50mL 离心管中,在 4℃ 下 8000rpm 离心 15min,保存上清液,将残渣再次用 20mL 乙腈 / 甲醇(v/v3:7)浸泡 12h,超声 0.5h 后,将浸提液装在 50mL 离心管中,在 4℃ 下 8000rpm 离心 15min,将得到上清液与上一步得到的清液合并一起,装于 500mL 的旋蒸瓶中,于旋蒸装置上减压蒸发至干,用 100mL 柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液(pH7)溶解,然后将溶液置于 250mL 分液漏斗中,用 20mL 的重蒸乙醚 / 戊烷 / 二氯甲烷(v/v/v : 1/1/3)重复萃取 3 次,以去除挥发性的香气物质。取 20mL 得到的溶液以 5mL/min 的流速通过 Sep-Pak C₁₈E (1g,6mL) 固相萃取预装柱,用 20mL 的超纯水以 5mL/min 的流速冲洗杂质,然后用 10mL 的甲醇(色谱纯)洗脱,在 30℃ 下减压旋蒸至干后,用 20mL 柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液(pH7)溶解。

[0024] 实施例 2 :豌豆中结合态香气物质前体物质的提取及纯化

[0025] 将豌豆晾干后粉碎,取 10g 于锥形瓶中,加入 20mL 的丙酮 / 乙醇(v/v3:7),常温下浸泡 12h,超声 0.5h 后,将浸提液装在 50mL 离心管中,后在 4℃ 下 8000rpm 离心 15min,保存上清液,将残渣再次用 20mL 丙酮 / 乙腈(v/v3:7)浸泡 12h,超声 0.5h 后,将浸提液装在 50mL 离心管中,在 4℃ 下 8000rpm 离心 15min,将得到上清液与前一步得到的清液合并一起,装于 500mL 的旋蒸瓶中,于旋蒸装置上减压蒸发至干,用 100mL 柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液(pH5)溶解,然后将溶液置于 250mL 分液漏斗中,用 20mL 的重蒸乙醚 / 戊烷 / 乙酸乙酯(v/v/v :1/1/3)重复萃取 3 次,以去除挥发性的香气物质。取 20mL 得到的溶液以 5mL/min 的流速通过 Sep-PakC₁₈E (1g,6mL)固相萃取预装柱,用 20mL 的超纯水以 5mL/min 的流速冲洗杂质,然后用 10mL 的甲醇(色谱纯)洗脱,在 30℃ 下减压旋蒸至干后,用 20mL 柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液(pH5)溶解。

[0026] 实施例 3 :物化处理检测玉米中的结合态香气物质

[0027] 将玉米晾干后粉碎,取 10g 于锥形瓶中,加入 20mL 的乙腈 / 乙醇(v/v3:7),常温下浸泡 12h,超声 0.5h 后,将浸提液装在 50mL 离心管中,后在 4℃ 下 8000rpm 离心 15min,保存上清液,将残渣再次用 20mL 乙腈 / 甲醇(v/v3:7)浸泡 12h,超声 0.5h 后,将浸提液装在 50mL 离心管中,在 4℃ 下 8000rpm 离心 15min,将得到上清液与前一步得到的清液合并一起,装于 500mL 的旋蒸瓶中,于旋蒸装置上减压蒸发至干,用 100mL 柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液(pH5)溶解,然后将溶液置于 250mL 分液漏斗中,用 20mL 的重蒸乙醚 / 戊烷 / 二氯甲烷(v/v/v :1/1/3)重复萃取 3 次,以去除挥发性的香气物质。将得到的 100mL 溶液以 10mL/min 的流速通过 Sep-Pak C₁₈E (10g,60mL) 固相萃取预装柱,用 200mL 的超纯水以 10mL/min 的流速冲洗杂质,然后用 60mL 的甲醇(色谱纯)洗脱,在 30℃ 下减压旋蒸至干后,用 100mL 柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液(pH5)溶解。

[0028] 将得到的结合态前体物质溶液用盐酸调节 pH 为 1,装入安瓿瓶中密封,沸水浴加热 0.5h,迅速冷却后打破安瓿瓶,调节 pH 为 5,加 8mL 的澄清液于 15mL 的顶空瓶中,再加入 3g 氯化钠以及内标,设定程序通过 HS-SPME-GC-MS 检测。顶空固相微萃取的条件为 :三相(Car/DVB/PDMS) 萃取头,60℃ 预热 5min,萃取吸附 30min,GC 解吸 10min。其结果见表 1。

[0029] 表 1 物化处理玉米中结合态香气物质

	保留指数	物质名称	浓度 (ug/L)
	芳香类		
[0030]	1501	苯甲醛	16.37
	1620	苯乙醛	8.76
	1900	苯乙醇	95.85
	2223	4-乙烯基愈创木酚	
	醛酮类		
	1090	己醛	8.81
	1167	2-庚酮	2.45
	1292	辛醛	2.35
	1420	壬醛	10.63
	杂环类		
[0031]	1230	2-戊基咪喃	159.07
	1330	2, 6-二甲基吡嗪	4.97
	1489	2-乙酰咪喃	31.12
	萜烯类		
	1804	大马酮	2.78
	1857	香叶基丙酮	13.64

[0032] 实施例 4:酶处理检测小麦中的结合态香气物质

[0033] 将小麦晾干后粉碎,取 10g 于锥形瓶中,加入 20mL 的乙醇,常温下浸泡 12h,超声 0.5h 后,将浸提液装在 50mL 离心管中,后在 4℃ 下 8000rpm 离心 15min,保存上清液,将残渣再次用 20mL 的甲醇浸泡 12h,超声 0.5h 后,将浸提液装在 50mL 离心管中,在 4℃ 下 8000rpm 离心 15min,将得到上清液与前一步得到的清液合并一起,装于 500mL 的旋蒸瓶中,于旋蒸装置上减压蒸发至干,用 100mL 柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH5) 溶解,然后将溶液置于 250mL 分液漏斗中,用 20mL 的重蒸乙醚/戊烷 (v/v/v :1/1) 重复萃取 3 次,以去除挥发性的香气物质。将得到的 100mL 溶液以 10mL/min 的流速通过 Sep-Pak C₁₈E (10g, 60mL) 固相萃取预装柱,用 200mL 的超纯水以 10mL/min 的流速冲洗杂质,然后用 60mL 的甲醇 (色谱纯) 洗脱,在 30℃ 下减压旋蒸至干后,用 100mL 柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH5) 溶解。

[0034] 取小麦结合态前体物质溶液 100mL,加入 β-D-葡萄糖苷酶使得终浓度为 6.98U/mL,然后分装入安瓿瓶中密封,在 30℃ 下处理 1 天,打破安瓿瓶后,加入 1% 的 Ca₂ 抑制酶活,然后加 8mL 的澄清液于 15mL 的顶空瓶中,再加入 3gNaCl 以及内标,设定程序通过 HS-SPME-GC-MS 测定。顶空固相微萃取的条件为:三相 (Car/DVB/PDMS) 萃取头,60℃ 预热 5min,萃取吸附 30min,GC 解吸 10min。其结果见表 2。

[0035] 表 2 酶处理小麦中结合态香气物质

	保留指数	物质名称	浓度 (ug/L)
[0036]	芳香族		
	1501	苯甲醛	4.36
	1900	苯乙醇	74.98
	1842	愈创木酚	5.51
	2007	苯酚	4.19
	醛酮类		
	1167	2-庚酮	1.25
	1280	2-辛酮	0.27
	1420	壬醛	12.34
	杂环类		
	1397	三甲基吡嗪	8.49
	1461	四甲基吡嗪	46.75
	1489	2-乙酰呋喃	15.77
萜烯类			
1804	大马酮	0.37	
1857	香叶基丙酮	10.44	
1866	香叶醇	4.41	

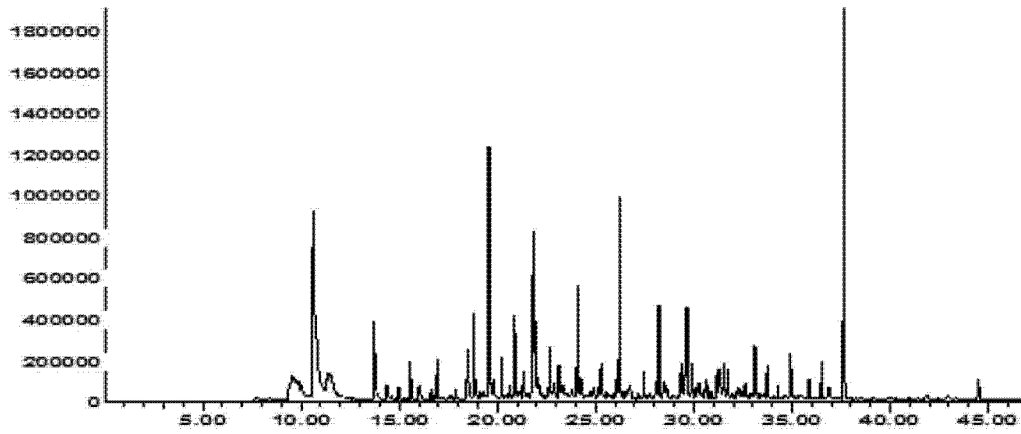


图 1

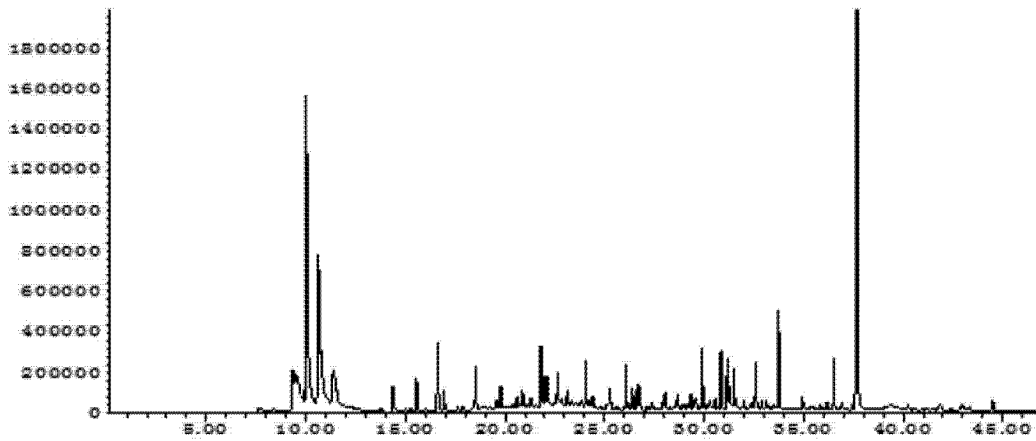


图 2