基于气味指纹技术的牛奶香精鉴别研究

江津津[1]，姚正晓[2]，韩明[1]，刘慧娟[1]，张挺[1]，鲁玉侠[3]
（1.广州城市职业学院食品系，广东广州 510405）(2.浙江养生堂天然药物研究所有限公司，浙江杭州 310007)
（3.广州市名花香料有限公司，广东广州 510440）

摘要：奶味香精是现代食品工业非常重要且应用非常广泛的添加剂之一，不同类型牛奶香精的气味差异仅靠色谱技术和人工感官鉴别比较困难。为了建立奶味香精的气味指纹分析鉴别方法，本文以天然牛奶香精、复配牛奶香精、酶解奶油香精和实验室制牛奶香精为样品，分析了样品的挥发性化合物组成和气味指纹信息，比较了市面上常见几种奶味香精的气味差异，建立了基于气味指纹技术的奶味香精香料的鉴别研究方法。研究结果表明：气味指纹技术能准确区分和鉴别奶味香精的气味差别，识别效果显著。天然牛奶香精与实验室制牛奶香精在主要特征风味物质方面的相似度较高，复配牛奶香精的整体气味则和其他样品差异较大，分析数据表明天然牛奶香精的香味可能是酶解奶油产物经过进一步处理和修饰得到的。

关键词：挥发性风味物质；固相微萃取-气相色谱-质谱；主成分分析；电子鼻
文章篇号：1673-9078(2016)07-237-242 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.036

Identification of Milk Flavoring Essences Based on the Odor Fingerprint Technique

JIANG Jin-jin[1], YAO Zheng-xiao[2],HAN Ming[1],LIU Hui-juan[1],ZHANG Ting[1],LU Yu-xia[3]
(1.Department of food,Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510405, China) (2.Zhejiang Yangshengtang Natural Medicine Research Institute Co.,Ltd, Hangzhou 310007, China) (3.Guangzhou Flower Flavours & Fragrances Co., Ltd，Guangzhou 510440, China)

Abstract: Milk flavoring essence is one of the essential additives, which has been widely used in the modern food industry. The difference in odor between various types of milk flavoring essences is difficult to identify by using chromatographic techniques and human sensory evaluation. In order to establish the method for odor fingerprint identification of milk flavoring essences, the natural milk flavoring essence, compound milk flavoring essence, flavoring essence from the enzymatic hydrolysis of butter, and laboratory-prepared milk flavoring essence were used as samples to analyze the composition of the volatile components and to determine the odor fingerprint of the samples. The odor of several commercially available milk flavoring essences was compared, and the method to identify the milk flavoring essence based on odor fingerprint technique was developed. The results showed that the odor fingerprint technique could accurately distinguish between and identify the difference in the odor among the milk flavoring essences, showing an effective recognition performance. A high similarity in the main characteristic flavor components was detected between natural milk flavoring essence and laboratory prepared milk flavoring essence, while the overall odor of compound milk flavoring essence was significantly different from those of other samples. The analysis data indicated that the flavor of the natural milk flavoring essence may be produced by further processing and modifying the product obtained from the enzymatic hydrolysis of butter.

Key words: volatile flavor compounds; solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry; principal component analysis; electronic nose

奶味香精是现代食品工业应用最广泛的食品添加剂之一，市面上常见的奶味香精产品包括天然牛奶香精、人工复配牛奶香精、酶解奶油香精等，主要用于糖果、饮料、膨化食品等。它有香草味、炼乳味、甜牛奶味、生牛奶味、奶油味、太妃糖味等几种常用的香型，可以赋予产品更为浓郁的奶香味、改善原料的适口性，还可以延长产品的保存时间，因此具有广阔的市场前景。研究发现，奶味香精呈香的关键挥发

收稿日期：2015-09-25
基金项目：广东省部产学研项目（2012B091000036）；2014 年广州市属高校产学研结合基地项目（14CXY07）；横向项目（W14001）；校级专利项目（Ky2013002）
作者简介：江津津（1977-），女，博士，副教授，研究方向：食品科学
通讯作者：姚正晓（1987-），男，研究方向：食品生物技术

性化合物主要包括长、短链脂肪酸和酯类等[1~2]，不同类型奶味香精所含的挥发性化合物都比较复杂，成分不尽相同，含量差异较大，对风味品质的影响也不同[3~4]，奶香的气味通常包含有挥发性化合物上百种，这些化合物含量甚微，一般采用气相色谱-质谱联用（GC-MS)进行检测分析。对同一类香精香料气味差异的鉴别常常采用感官分析来进行，但由于人的嗅觉感官对气味的鉴别区分往往带有主观性和易变性，容易导致比较大的人为误差，故而对不同类型的奶味香精样品进行分类和识别存在不少困难。气味指纹技术可以模拟人和动物的嗅觉功能，“闻到”目标物的总体气味信息，又不易疲劳和失误[5]。本研究以较为常见的天然牛奶香精、复配牛奶香精、酶解奶油香精和自制牛奶香精为样品，采用 GC-MS 对样品的挥发性成分进行分析，利用金属氧化物传感器高灵敏度（μg/L 级别）的优势来检测各组样品的整体气味差异，得到不同样品在传感器矩阵中的响应强度数据并对数据进行统计分析从而识别不同样品的气味差异，为气味指纹技术在香精香料的气味分析以及鉴定领域的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 原料

香精样品：天然牛奶香精（瑞士奇华顿出品）；复配牛奶香精（广州某香精公司出品）；酶解奶油香精（膏状，实验室酶解奶油制得）；实验室自制牛奶香精（指将前述奶油酶解产物进一步稀释并调节脂肪酸比例，再经过适当风味修饰得到的样品[6~10]，液状）。

1.2 仪器

英国 Techne Dri-Block 干式加热器 DB-2D（上海珂准仪器有限公司）；

电子鼻气味指纹仪（Fox3000，HS-100 型自动进样系统，AlphaSoft12.44 软件，法国 Alpha-mos 公司），由 12 个金属氧化物传感器组成传感器阵列系统，共有 2 个独立的传感室，每个传感器腔室均有 6 个型号不同的传感器（表 1），配有空气发生器，内部机构如图 1 所示。

1.3 检测方法

1.3.1 GC-MS 的样品前处理

准确称取天然牛奶香精、人工复配香精和酶解香精样品各 2 g 于 15 mL 的样品瓶中，用塞子密封，用磁力搅拌器搅拌，置于一定温度的水浴锅中预热 15 min，直至样品达到气液平衡，将已经老化处理好的固相微萃取头固定在铁架台上并且插入样品瓶中进行萃取，萃取后取出固相微萃取纤维头，送 GC-MS 检测。

表 1 电子鼻 Fox3000 金属氧化物传感器型号

Table1 Model number of the metal oxide sensor of the electronic nose Fox 3000

传感器序列	金属氧化物传感器	
	传感器腔室 1	传感器腔室 2
1	LY2/LG	T30/1
2	LY2/G	P10/1
3	LY2/AA	P10/2
4	LY2/GH	P40/1
5	LY2/gCTL	T70/2
6	LY2/gCT	PA/2

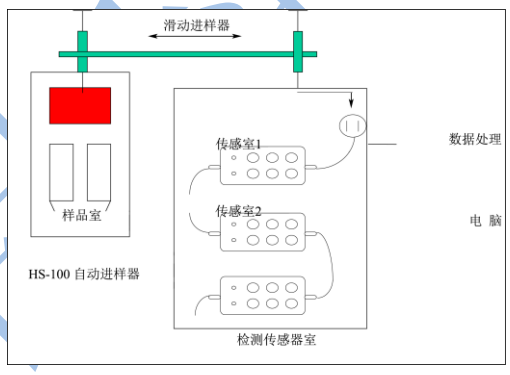


图 1 FOX 3000 型电子鼻内部结构框图

Fig.1 Schematic diagram of the internal structure of the electronic nose Fox 3000

1.3.2 固相微萃取结合 GC-MS 检测

固相微萃取结合 GC-MS 剖析样品挥发性组分检测参数：毛细管柱采用 HP-5MS（5%苯基）-甲基硅氧烷超高惰性毛细管柱（30 m x 0.25 mm x 0.25 μm）；固相微萃取纤维头解析时间为 7 min；载气为 He（纯度在 99.999%），流速为 1.0 mL/min。

进样方式：不分流，进样量：1 μL；进样口温度 250 ℃；程序升温：初始温度 60 ℃，以 4 ℃/min 升温至 120 ℃保持 2min，然后以 6 ℃/min 升至 240 ℃保持 2 min，最后以 15 ℃/min 升至 280 ℃并且保持 5 min，检测器温度为 300 ℃。

质谱条件：电离方式为 EI，电离电压 70 eV；接口温度 300 ℃；灯丝发射电流 200 μA；四极杆温度 150 ℃；离子源温度 230 ℃，扫描质量范围为 10-550 amu。

数据处理：化合物定性及定量试验数据处理由 Agilent ChemStation Plus 及 Agilent Cerity Networked Data System（NDS）软件系统完成，按峰面积归一化

法来计算相对质量分数，未知化合物经过计算机检索与同时与 NIST Library 标准质谱库相匹配，并结合相关资料进行人工解析，仅当匹配率可达到 90%以上的鉴定结果才予以确定化合物。

1.3.3 气味指纹分析的样品前处理

准确移取 1 mL 待测样品于 10 mL 顶空瓶中，加盖封闭后放入干式加热器加热，在 55 ℃平衡 15 min。

1.3.4 电子鼻气味指纹仪检测参数

载气：合成干燥空气；

流速：150 mL/min；

顶空气产生参数：时间为 1080 s，产生温度 55 ℃，搅动速度为 500 rpm；

顶空注射参数：注射体积为 2.0 mL，注射速度为 2.0 mL，注射总体积：5.0 mL，注射温度保持在 65 ℃；

数据获取参数：获取时间为 120 s，延滞时间为 360 s，

为避免主观误差，每个样品都重复检测 4 次。

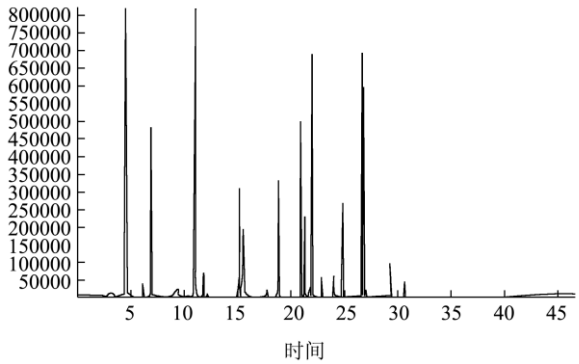
1.3.5 气味指纹技术统计分析

原始数据分析：通过原始数据分析确定检测参数，查看传感器是否有过载现象（即 T、P 型的传感器原始信号要<1），为了在样品分析中更明显地表现出差异性，通常要求 T、P 型传感器的响应值在 0.3 以上，最好在 0.6~0.8 之间。

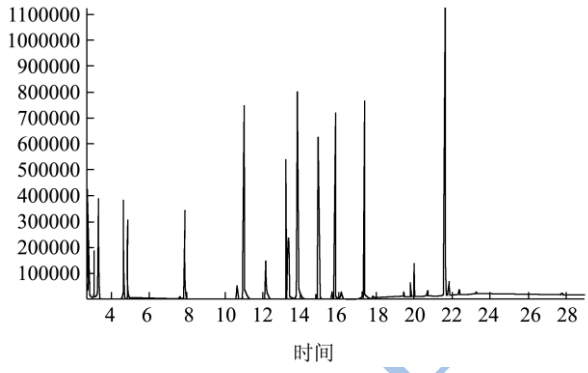
主成分分析（PCA）：PCA 区分指数（DI）是该技术区分样品程度的表征，是对判别质量的评价，它是通过计算各个组之间的表面积和每个组的表面积得到的。当样品组之间互相独立，没有叠加时，指数为正，表明样品间可以区分。当样品组之间叠加时，指数为负，表明样品不能完全区分。DI 最大值为 100，在 80~100 之间表明可以有效区分，越接近 100 表明区分效果越明显。

2 结果与讨论

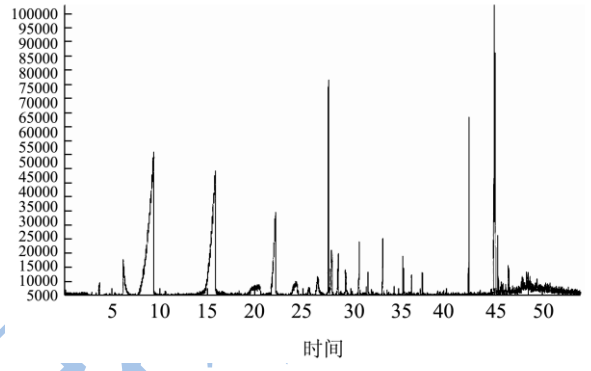
2.1 固相微萃取 GC-MS 的检测结果



a



b



c

图 2 不同类型牛奶香精挥发性组分分析总离子流色谱图

Fig.2 Total ion chromatogram of volatile compounds in different milk flavoring essences

注：a.天然牛奶香精，b.复配牛奶香精，c.实验室制酶解香精。

采用固相微萃取 GC-MS 对具有典型风味的商品天然牛奶香精、复配牛奶香精和实验室自制酶解牛奶香精的挥发性风味组分进行剖析，得出不同类型牛奶香精样品所含的主要挥发性气味化合物的种类和含量（见图 2 和表 2）。

表 2 不同类型牛奶香精主要挥发性化合物比较

Table 2 Comparison of volatile compounds in different milk flavoring essences

化合物	归一化含量（%）		
	天然牛奶香精	人工复配香精	自制酶解香精
醇			
丙二醇		0.18	
酸			
丁酸	33.18	1.13	25.01
己酸	20.94		20.27
辛酸	12.62	0.62	12.32
壬酸	0.45		
癸酸	1.85	1.85	28.18
9-癸烯酸			1.37

转下页

接上页

十二酸		0.3	0.26
亚油酸酯	0.35		
十二酸甲酯	0.03		0.06
十四酸甲酯	0.01		0.01
单丁酸甘油酯	0.39		3.51
丁酸乙酯		3.38	
乳酸乙酯		2.79	
乳酸丁酯	3.82	3.12	
丁酰乳酸丁酯	1.67		
己酸乙酯	0.64		0.03
辛酸乙酯	0.17		0.01
正己酸异丁酯	0.13		
棕榈酸乙酯		1.07	
亚油酸乙酯		1.35	
油酸乙酯	0.61	12.78	
硬脂酸乙酯		0.5	
内酯类			
丁位辛内酯			0.03
丙位壬内酯		6.77	
丁位癸内酯	0.33		0.02
丁位十一内酯		0.24	
丁位十二内酯	2.73		9.84
醛			
十四醛	3.09	9.09	
酮			
3-羟基-2-丁酮	0.27		
2-庚酮	0.62		0.32
2-十一酮	0.46		0.27
2-十三酮	0.11		
2-十四酮			0.05
芳香及杂环类			
2，3-二甲基吡嗪	0.32		
2，3,5-三甲基吡嗪	0.19		0.02
5-甲基糠醛	0.17		
乙基香兰素	0.46		
乙基麦芽酚			14.45
香兰素	9.83		15.26

从上表可以看出不同的牛奶香精样品所含的挥发性组分差别较大，尤其是人工复配牛奶香精与天然牛奶香精和自制香精的成分差异比较大，特征风味物质组成也有很大不同。这可能是因为人工复配牛奶香精往往是为了满足客户的需求而调配的，其风味趋向不同，具有较大的特征性，感官上其风味和口味都与天然牛奶香精有较大的区别，嗅感更为复杂。从离子流图谱也可以看出，天然牛奶香精分离效果明显，图谱简单，特征风味物质明显。从表 2 中可见，天然牛奶香精与自制奶油酶解香精的挥发性物质组分基本相同，尤其是各类挥发性脂肪酸的相对百分含量较为近似，这些挥发性脂肪酸是主要的风味物质，其中以丁酸为代表的脂肪酸分别达到 33.18 %和 25.01%。初步推测商品天然牛奶香精可能是由奶油酶解产物进一步制备得到。

2.2 气味指纹原始数据曲线

图 3 是天然牛奶香精气味响应强度的原始曲线图，图中横轴为时间轴（120s），纵轴为响应强度，共有 12 条曲线，每条曲线代表一个传感器在 120s 内的响应值变化，它代表着各个传感器相对的电阻变化率，计算公式：电阻变化率=（R_0-R）/R_0，R 为随时间变化的响应电阻值，R_0 为 t=0 时的电阻值。在进行数据分析及处理时，选择每个传感器采集样品 120 s 内且最大响应强度值进行分析。图 3 说明气味指纹技术可以对牛奶香精样品的整体气味信息进行采集。该技术显然可以避免人工感官鉴定所引起的主观误差及重复性误差，还不需要对样品进行使用有机溶剂的复杂前处理，具有操作便捷，检测速度快，响应时间短，重复性和稳定性均较好的优点，整个操作流程对周边环境无不良影响。

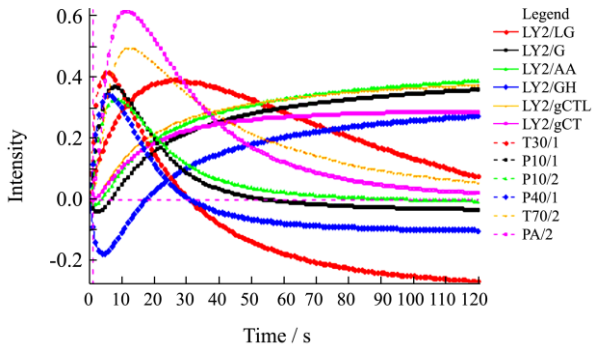


图 3 气味强度响应信号的原始数据曲线图

Fig.3 Original data curves indicating the odor-intensity response signals

2.3 不同牛奶香精气味的相似度分析

以不同牛奶香精样品及其平行样品作为矩阵的行，以电子鼻信号曲线所有的信号强度值作为矩阵的列，形成矩阵进行主成分分析（PCA）。结果如图 4 所示，图中的天然商品牛奶香精指瑞士奇华顿出品牛奶香精，自制牛奶香精指自制酶解牛奶香精（液状），

合成牛奶香精指人工复配香精样品，酶解产物指自制膏状酶解奶油香精。图中鉴别指数（DI）值为 82,区分度良好，各个组分之间都是相互独立的，样品组群没有叠加现象，表明电子鼻气味指纹技术可以有效区分样品，效果明显。不同类型的牛奶香精与酶解香精主成分 1（Principal component PC1）的累积方差贡献率为 91.096%，PC1 和 PC3 的累积方差贡献率之和为 93.115%（大于 85%），这表明不同类型的牛奶香精气味之间的差异主要是由第一主成分决定，复配香精与其他种类牛奶香精的气味存在显著的差异；以第三主成分的 0 坐标为界轴,可以看出天然牛奶香精与酶解香精的位置非常接近，说明这两种香精的气味差别较小。PCA 分析结果还表明酶解香精的气味与复配香精有较大的差异，与天然牛奶香精和自制的牛奶香精有区别。

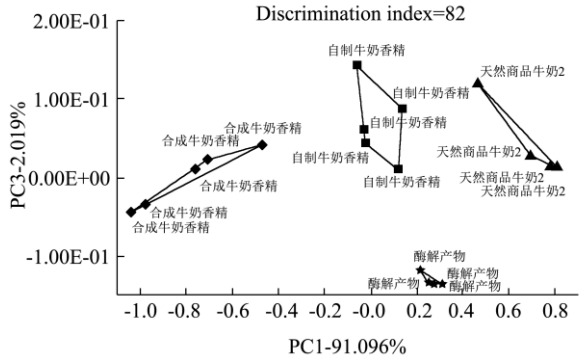


图 4 不同类型奶味香精主成分分析（PCA）图

Fig.4 PCA plot of different milk flavoring essences

2.4 天然牛奶香精与自制牛奶香精的鉴别

在 PCA 分析的基础上，提取特征传感器的响应强度值，建立特征气味指纹图及柱状图（图 5）。

上图中横轴为不同的传感器，纵轴为传感器响应强度，根据样品各气味响应强度数据构成雷达指纹图谱，可以看出商品天然牛奶香精与自制牛奶香精的雷达图的重合面积比较大，气味差别较小，利用 Alpha soft12.44 软件进行相似度比较，结果表明两者相似度可达到 88%，进一步证实这两种香精具有相似的特征风味。但各不同气味成分在各个传感器上的响应值存在一定的差异，其中传感器 LY2/LG、PA/2、T70/2 的响应值均在 0.4~0.6 之间，响应值较大；P40/1、P10/2、P10/1、T30/1 响应值都处在 0.2~0.4 范围内；而在传感器 LY2/G、LY2/AA、LY2/GH、LY2/gCTL、LY2/gCT 处的响应值明显减少。自制牛奶香精是将奶油酶解产物进一步稀释调节脂肪酸比例，再适当修饰风味得到。挥发性脂肪酸是酶解产物中最主要的挥发性物质之一，通过稀释脂肪酸可以赋予牛奶香精浓郁的奶酪香味[1]。由此推测商品天然牛奶香精可以利用脂肪酶水解无水奶油，浓缩脂肪酸类化合物的浓度，同时其中的长链不饱和脂肪酸经过一系列副反应生成具有香气贡献的酮类及酯类（包括单丁酸甘油酯），再经过适当的修饰调配出。

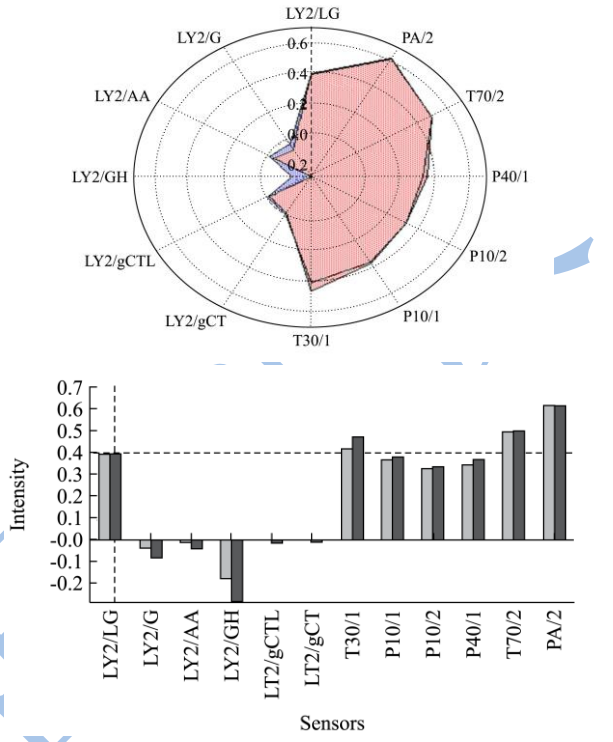


图 5 天然牛奶香精和自制牛奶香精雷达指纹图谱及柱状图

Fig.5 Radar chart and column chart of the electronic nose data for natural milk flavoring essence and self-made milk flavoring essence

2.5 天然牛奶香精与酶解奶油香精的鉴别

图 6 为天然牛奶香精与酶解奶油香精的气味柱状图及雷达图，结果表明两种样品相似度仅有 67%，气味响应值差别比较明显，其中在 PA/2、T70/2、P40/1、P10/2、P10/1、T30/1 这 6 个传感器上的响应值强度差异尤为显著，而在传感器 LY2/AA、LY2/gCTL、LY2/gCT 上响应值明显减少，可能是由于酶解奶油香精的短链脂肪酸含量较高，风味强度响应值较大导致响应强度数值明显改变。

2.6 天然牛奶香精与复配牛奶香精的鉴别

人工合成的复配牛奶香精主要是以丙二醇为溶剂，添加不同特征风味的单体原料，再辅以一定含量的定香剂、增香剂、稳定剂等复配而成，这种香精产品在香气协调性、强度及持久性等方面与天然牛奶香精有本质的区别。图 7 为天然牛奶香精与复配牛奶香精的柱状图及雷达指纹图谱。如图所示，两种样品的

响应值差别比较突出，由雷达图可见天然牛奶香精的面积覆盖率明显高于复配牛奶香精，其相似程度仅为46.1%，表明这两种香精在特征风味上的差异更为显著，柱状图可见天然牛奶香精的气味在传感器 PA/2、T70/2、P40/1、P10/2、P10/1、T30/1 上的响应值接近1.0，而复配香精在这些传感器上的响应值则很小，此外在 LY2/LG 及 LY2/GH 传感器上的区别也很明显，结果进一步验证了天然牛奶香精与复配牛奶香精的气味差异非常大。

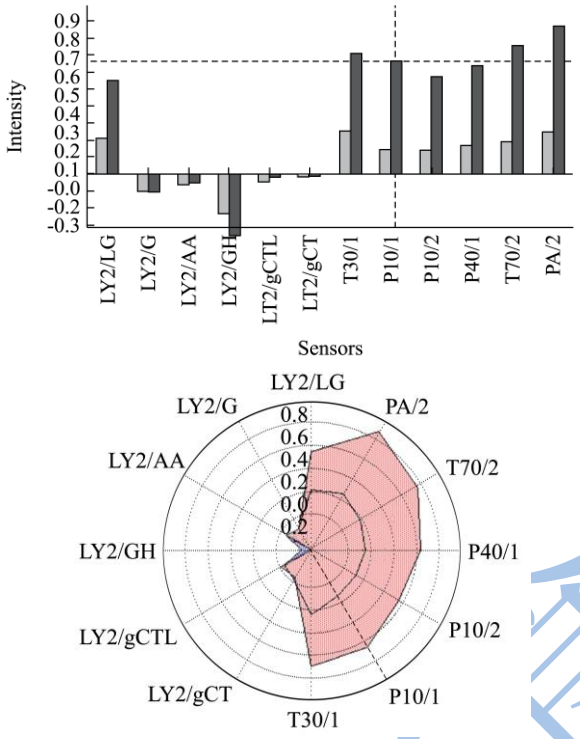


图 6 天然牛奶香精和酶解奶油香精的柱状图及雷达指纹图谱

Fig.6 Radar chart and column chart of the electronic nose data of natural milk flavoring essence and product obtained from enzymatic hydrolysis of butter

3 结论

利用气味指纹技术对牛奶香精进行鉴别分析可以避免由感官鉴定引起的主观误差及重复性误差，而且不需要对样品进行前处理，具有便捷，重复性和稳定性好的优点，同时也避免了其他仪器分析检测周期长，污染环境等缺陷，对环境和健康影响小，因此实用又环保。研究结果表明，气味指纹技术能准确区分和鉴别天然牛奶香精、复配牛奶香精、自制牛奶香精以及酶解奶油香精的气味差别，识别效果显著。固相微萃取 GC-MS 的分析结果和气味指纹图谱都显示出天然牛奶香精与自制酶解牛奶香精在主要特征风味物质方面的相似度较高，说明酶解奶油产物经过进一步处理和修饰可以制得香气柔和，底蕴丰润的天然牛奶香精。

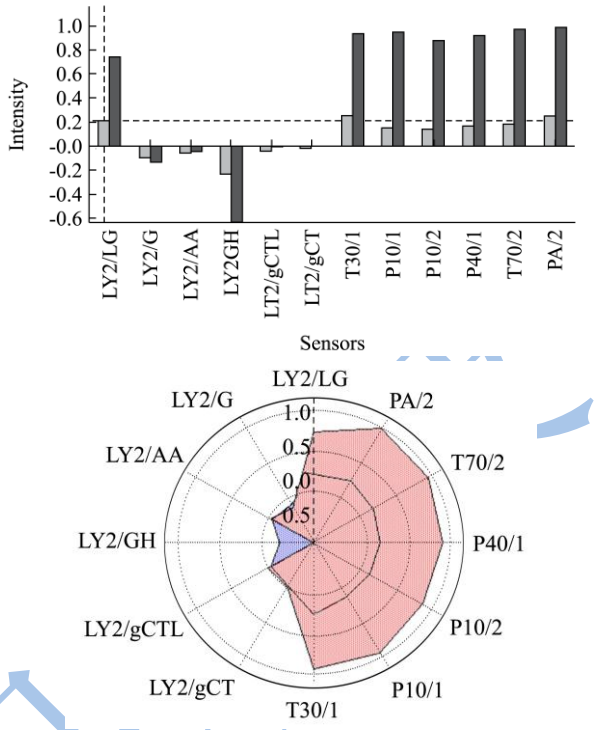


图 7 天然牛奶香精和复配牛奶香精的柱状图及雷达图

Fig.7 Radar chart and column chart of the electronic nose data of natural milk flavoring essence and compound milk flavoring essence

参考文献

[1] Vyletelova,M.,Ficnar,J.,Hanus,O.The effec of Pseudomonas fluorescens lipolytic enzymes on releaseof fatty acids from milk fat [J]. Food Sci., 2000, 18(5), 175-182

[2] QIN Zi-han, PANG Xue-li, CHEN Dong, et al. Evaluation of Chinese tea by the electronic nose and gas chromatography–mass spectrometry: Correlation with sensory properties and classification according to grade level [J]. Food Research International, 2013, 53(2):864-874

[3] WANG Dan-feng, WANG Xi-chang, LIU Tai-ang, et al. Prediction of total viable counts on chilled pork using an electronic nose combined with support vector machine [J]. Meat Science, 2012, 90(2): 373-377

[4] PROSEN H, KOKALJ M, JANES D, et al. Comparison of isolation methods for the determination of buckwheat volatile compounds [J]. Food Chem., 2010, 121: 298-306

[5] Ai J. Anal. Headspace solid phase microextraction dynamics and quantitative analysis before reaching a partition equilibrium [J]. Food Chemistry, 1997, 69(16): 3260-3266

[6] 鲁玉侠,李香莉,卢六美.基于 SDE/GC-MS 制备的藏酥油香精及其应用[J].现代食品科技,2014,30(2):255-258

LU Yu-xia, LI Xiang-li, LU Liu-mei. Preparation and application of Tibet butter flavor based on SDE/GC-MS analysis [J]. Modern Food Science & Technology, 2014, 30(2): 255-258

[7] Collier W A, Baird D B, Park-Ng Z A ,et. al. Discrimination among milks and cultured dairy products using screen-printed electrochemical arrays and an electronic nose [J]. Sensors and Actuators B：Chemica,2003,92：232-239

[8] Rodriguez S D，Monge M F. Time dependence of the aroma pattern emitted by an encapsulated essence studied by means of electronic noses and chemometric analysis [J]. Food Research International，2010,43:797-804

[9] ANDUJAR-ORTIZ, MORENO-ARRIBAS M V, POZO-BAYON M A. Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gaschromatography mass spectrometry analysis of wine volatile compounds [J]. J. Chromatography, 2009, 1216: 7351-7357

[10] 鲁玉侠.胰脂肪酶固定化及其水解天然黄油制备奶香底料的研究[J].现代食品科技,2011,27(6):655-657
LU Yu-xia. Immobilization of lipase and its application in hydrolysis of the natural butter to prepare the milk spice [J]. Modern Food Science & Technology, 2011, 27 (6): 655-657

现代食品科技