

基于电子鼻、HS-GC-IMS、HS-SPME-GC-MS 技术联用分析不同发酵年份老香黄挥发性成分差异

阳丹¹, 陈小爱¹, 杨玉洁¹, 蔡舒¹, 陈树喜², 周爱梅^{1,2,3*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

(2. 广东展翠食品股份有限公司, 广东潮州 515634) (3. 华农(潮州)食品研究院有限公司, 广东潮州 521021)

摘要: 基于电子鼻、顶空气相离子迁移谱(HS-GC-IMS)和顶空固相微萃取-气相色谱-质谱技术联用(HS-SPME-GC-MS)分析不同发酵年份老香黄挥发性成分变化,并结合正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)法区分不同发酵年份老香黄。电子鼻主成分分析能明显区分发酵与未发酵的老香黄,两者风味差异较大,老香黄发酵3年和4年的风味成分最为相似,而其余发酵年份风味存在较大差异。HS-GC-IMS定性检测出39种挥发性成分,包括萜烯类、醇类、醛类、酯类、酮类、酚类、酸类、杂环化合物和其它共9类。HS-SPME-GC-MS则一共鉴别出50种挥发性成分,包括萜烯类、醇类、醛类、酚类、酯类、醚类、杂环化合物和其它共8类。 α -蒎烯、 β -蒎烯、月桂烯、萜品油烯、柠檬烯、异松油烯、1-石竹烯、巴伦西亚橘烯、芳樟醇、 α -松油醇、糠醛、麦芽酚、茴香脑、2,4-二甲苯基乙烯为14种共有挥发性成分,经OPLS-DA模型筛选出8种标志性挥发性化合物(VIP>1)。综上,未发酵和发酵1~5年的老香黄风味存在较大差异,筛选出的8种挥发性成分为区别不同年份老香黄提供一定依据。

关键词: 老香黄; 电子鼻; 顶空气相离子迁移谱; 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱; 挥发性成分; 正交偏最小二乘判别分析

文章编号: 1673-9078(2022)11-313-323

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.1406

Using E-nose, HS-GC-IMS, and HS-SPME-GC-MS to Differentiate the Volatile Components of Lao Xianghuang Fermented for Different Years

YANG Dan¹, CHEN Xiaoi¹, YANG Yujie¹, CAI Shu¹, CHEN Shuxi², ZHOU Aimei^{1,2,3*}

(1. College of Food Science, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Guangdong Zhancui Food Co. Ltd., Chaozhou 515634, China)

(3. Huanong (Chaozhou) Food Research Institute Co. Ltd., Chaozhou 521021, China)

Abstract: The variations of the volatile flavour components in Lao Xianghuang fermented for different years were investigated by electronic nose (E-nose), headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry (HS-GC-IMS), and headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). The orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) method was used to distinguish Lao Xianghuang fermented for different years. The principal component analysis of the E-nose data could clearly distinguish the fermented Lao Xianghuang from the unfermented one, as the difference in their flavors was relatively large. The volatile components of those fermented for 3 and 4 years resembled the most, with those of the other samples showing large differences. HS-GC-IMS detected 39 volatile components, including terpenes, alcohols, aldehydes, esters, ketones, phenols, acids, heterocyclic compounds and others. HS-SPME-GC-MS identified 50 volatile components, including terpenes, alcohols, aldehydes, phenols, esters, ethers, heterocyclic

引文格式:

阳丹,陈小爱,杨玉洁,等.基于电子鼻、HS-GC-IMS、HS-SPME-GC-MS 技术联用分析不同发酵年份老香黄挥发性成分差异[J].现代食品科技,2022,38(11):313-323

YANG Dan¹, CHEN Xiaoi¹, YANG Yujie, et al. Using E-nose, HS-GC-IMS, and HS-SPME-GC-MS to differentiate the volatile components of Lao Xianghuang fermented for different years [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 313-323

收稿日期: 2021-12-14

基金项目: 广东省“扬帆计划”引进创新创业团队项目(2016YT03S056); 潮州市科技项目(2020ZX03); 华农(潮州)食品研究院项目(H2019395)

作者简介: 阳丹(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与品质, E-mail: 1572239473@qq.com

通讯作者: 周爱梅(1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学与营养及农产品与水产品深加工, E-mail: zhouam@scau.edu.cn

compounds, and others. There were 14 commonly detected volatile components (which were identified 8 marked volatile compounds (VIP>1) by the OPLS-DA model), including α -Pinene, β -pinene, myrcene, terpinene, limonene, isoterpinene, 1-caryophyllene, valencia limonene, linalool, α -terpinene, furfural, maltol, anethol and 2,4-dimethylstyrene. In summary, the flavors of unfermented Lao Xianghuang and those fermented for 1~5 years old differed greatly, and the 8 volatile components screened out would provide a basis for distinguishing Lao Xianghuang fermented for different years.

Key words: Lao Xianghuang; E-nose; headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry (HS-GC-IMS); headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS); volatile components; orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA)

老香黄（也称佛手香黄、老香椽）是以新鲜佛手柑为原料经过腌制、干燥、蒸熟、浸糖液、浸中药粉液等步骤，最后再封坛发酵制成的，具有止咳化痰、去积祛风、理气开胃等功效，作为岭南特有的保健制品，它久藏不坏，且愈久药效愈佳^[1,2]。但目前，老香黄并无统一的、标准的制作工艺以及行业规范，主要依靠家庭或小作坊等生产形式进行生产，导致各家老香黄品质有差异^[3]。老香黄发酵年份不同，其品质和功能上都具有很大差别^[4]。

目前，国内外关于不同发酵年份老香黄的研究较少，且主要集中在腌制过程、不同厂家老香黄的成分变化以及食用安全性研究。严赞开等^[5]运用气相色谱-质谱联用（Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS）技术分析发现，腌制期间老香黄的(Z)-2,3-丁二醇、(E)-2,3-丁二醇的含量明显增加；林良静等^[6]运用气相离子迁移谱（Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry, GC-IMS）技术通过相对香气活度值（ROAV）计算分析得出，不同厂家老香黄的风味贡献最大的挥发性物质是甲硫基丙醛；有研究者^[7-9]从微生物、添加剂含量检测方面验证了老香黄的食用安全性。而对于不同发酵年份老香黄的成分变化的研究，目前主要集中在非挥发性成分方面。如郭舒臣等^[3]对不同年份老香黄非挥发性化学物质分析得出，贡献最大的差异化学标志物是5,7-二甲氧基香豆素。老香黄发酵年份越长，功能越好，价格越贵，且在发酵期间表现出独特的风味，但是对于不同发酵年份老香黄风味的研究鲜见报道，尤其是对挥发性风味成分研究更少。食品香气成分与食品的挥发性物质有关，作为食品风味的重要组成部分，对食品的整体评估有重要意义^[10]。此外，挥发性化合物具有芳香、抗真菌、杀虫、生物信号和治疗特性。因此，检测挥发性有机化合物对于评估食品质量、真实性、纯度和来源非常重要^[11,12]。

本课题组前期对发酵不同月份老香黄的挥发性成分进行了检测，发现6~12个月老香黄挥发性成分差异较大^[13]，本研究是在前期研究的基础上，进一步研究不同发酵年份老香黄挥发性成分的变化。研究采用电

子鼻、顶空-气相色谱-离子迁移谱（Headspace-Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry, HS-GC-IMS）和顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用（Headspace Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry, HS-SPME-GC-MS）三项技术联用，发挥它们在便捷性、高效性以及灵敏性等方面的互补优势^[14]，更加全面分析不同发酵年份挥发性成分变化。同时利用主成分分析（Principal Component Analysis, PCA）、正交偏最小二乘判别分析（Orthogonal Partial Least Squares Regression Discriminant Analysis, OPLS-DA）法筛选出发酵不同年份期间老香黄差异性化学标志物，为判别不同年份老香黄提供依据，为建立一套不同年份老香黄质量评价体系提供一定理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

老香黄由广州展翠食品股份有限公司提供，为相同工艺下常温密封发酵0、1、2、3、4、5年的样品，将其分别命名为0Y、1Y、2Y、3Y、4Y、5Y。

PEN3 型便携式电子鼻系统，德国 Airsense 公司；Flavour Spec 1H1-00053 型气相离子迁移谱联用仪，德国 G.A.S 公司；HP6890-5973 气相色谱-质谱联用仪，美国 Aglient 公司；固相微萃取 SPME 进样手柄，美国 SUPELCO 公司；75 μ m CAR/PDMS 固相微萃取纤维，美国 SUPELCO 公司；四氟乙烯橡胶盖顶空瓶，广州市丛源仪器有限公司；AL104 万分之一电子天平，梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 电子鼻分析

(1) 样品处理

精确称量 3.0 g 老香黄，充分研磨后，立即装入 50 mL 密封进样瓶中，室温平衡 30 min 后检测，每个样品做 3 个平行。

(2) 检测条件

电子鼻运行参数: 分析采样时间 120 s, 采样时间间隔 1 s, 清洗时间为 120 s, 归零时间 10 s, 准备进样时间 5 s, 传感器和样品流速均为 400 mL/min, 载气为空气, 清洗传感器后进样^[13]。本研究选取数据较平稳的 111 s 为信采集时间。PEN3 型电子鼻由 10 个金属氧化物传感器 (MOS) 组成, 传感器所代表的物质种类及性能描述如表 1 所示。

表 1 PEN3 传感器性能描述

Table 1 PEN3 sensor performance description

阵列序号	传感器名称	性能描述
1	W1C	芳香成分, 苯类
2	W5S	灵敏度高, 对氮氧化物很灵敏
3	W3C	芳香成分灵敏, 氨类
4	W6S	主要对氢化物有选择性
5	W5C	短链烷烃芳香成分
6	W1S	对甲基类灵敏
7	W1W	对硫化物灵敏
8	W2S	对醇类、醛酮类灵敏
9	W2W	芳香成分, 对有机硫化物灵敏
10	W3S	对长链烷烃灵敏

1.2.2 HS-GC-IMS 分析

顶空进样条件: 称取 2 g 细磨样品放入 20 mL 玻璃瓶中; 孵化温度: 60 °C; 孵化时间: 15 min; 孵化转速: 500 r/min; 进样针温度: 65 °C; 进样体积: 500 μ L。

GC 条件: 色谱柱 (FS-SE-54-CB-1, 15 m \times 0.53 mm, 1 μ m); 色谱柱温: 60 °C; 运行时间: 30 min; 载气为高纯度 N₂ (纯度 \geq 99.999%); 载气流量: 2.00 mL/min, 保持 2 min, 在 2~20 min 线性增至 100.00 mL/min, 然后保持 10 min。

IMS 条件: 离子源为氙源 (6.5 keV), 正离子模式, 漂移管长度 9.8 cm, 管内线性电压 500 V/cm, 漂移气流量: 150 mL/min; 漂移气: 高纯氮气 (纯度 \geq 99.999%); IMS 温度: 45 °C。外标为 n-酮 C4-C9, 计算各化合物的保留指数 (RI)。

1.2.3 HS-SPME-GC-MS 分析条件

顶空固相微萃取 (HS-SPME) 条件: 老香黄研碎后密封, 取 6.0 g 样品到 30 mL 萃取瓶中, 使用微量注射器向萃取瓶内加入 1 μ L 2-辛醇 (500 μ g/mL) 标品溶液, 然后在 70 °C 的恒温磁力搅拌器上平衡 15 min, 用活化的固相微萃取针萃取 30 min, 然后插入 GC 进样口, 解析 3 min。

GC 条件: DB-WAX 毛细管色谱柱 (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m); 升温程序: 70 °C 保持 2 min, 以 3 °C/min 升到 120 °C, 最后以 4 °C/min 升高至 230 °C,

保持 5 min; 进样口温度 260 °C; 不分流进样; 载气 (He) 流速 1 mL/min。

MS 条件: 电子轰击离子源; 电子能量 70 eV; 离子源温度 230 °C; 传输线温度 280 °C; 四极杆温度 150 °C; 质量扫描范围为 m/z 35~600 u。

1.3 数据处理

GC-MS 内置 NIST08.L 化学工作站标准谱库鉴定挥发性成分, 辅以内标法确定各种成分的含量。使用 GC-IMS 设备自带的仪器分析软件, 包括 LAV 和插件 (Gallery Plot、Reporter) 对样品挥发性成分进行采集和分析, 通过保留指数 (RI) 和漂移时间与 GC-IMS 文库以及峰面积归一化处理进行化合物定性定量分析。使用正交偏最小二乘法判别分析 (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA) 筛选化学差异物; SPSS 23.0 软件做主成分分析 (PCA), 采用 t 检验进行组间的差异显著性分析, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 基于电子鼻分析不同发酵年份老香黄的挥发性成分

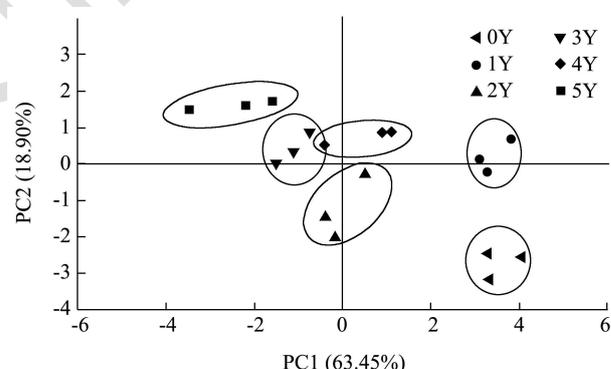


图 1 电子鼻不同发酵年份老香黄挥发性成分的 PCA 图

Fig.1 PCA diagram of volatile components of Lao Xianghuang in different fermentation years of electron nose

注: 图中 0Y、1Y、2Y、3Y、4Y、5Y 分别代表发酵 0、1、2、3、4、5 年的老香黄样品, 下同。

电子鼻是一种气味检测技术, 它模仿人类的嗅觉系统, 为食品的新鲜度评价、过程监测和质量控制提供低成本、快速的感官信息^[15]。PCA 是一种生成主成分 (PC) 变量的方法, 以消除原始特征变量之间的相关性^[16]。由 PCA (图 1) 得知, 总贡献率为 82.35% (PC1 63.45% 和 PC2 18.90%), 说明这两个主成分可以解释不同样本的主要特征信息。从对主成分 1 的贡献度来看, PC1 值按 5Y < 3Y < 2Y < 4Y < 1Y < 0Y 的顺序增加, 而 PC2

值则按 0Y<2Y<1Y<3Y<4Y<5Y 的顺序递增。Wang 等^[17]将黄酒陈酿年份与其风味物质的变化结合,用以区分黄酒年龄,不同发酵年份老香黄的 PCA 空间分布区域显示,除了3年和4年样品的置信区间有所重合之外,其余年份的样品分布较为独立,可以大致区分不同发酵年份老香黄。其中,发酵3年和4年的老香黄风味成分最为相似,其余发酵年份风味存在较大差异,未发酵的老香黄与其他样品相比,分布距离最远,差异较大,说明发酵工艺对风味的影响较大^[18-20]。

2.2 基于 HS-GC-IMS 分析不同发酵年份老香黄的挥发性风味成分变化

顶空-气相色谱-离子迁移谱(HS-GC-IMS)是一种相对较新的技术,利用不同离子漂移时间的差异进行物质分析,对于一些挥发性有机化合物的痕量检测非常适用^[21]。采用 GC-IMS 对其进行风味捕捉,仪器自带的软件生成离子迁移指纹图谱(图2)。横轴为检测出挥发性成分,纵轴为发酵0、1、2、3、4、5年的老香黄,图中颜色的深浅代表浓度高低,由于单体离子和中性分子可能在漂移区形成附属物,因此一种化合物可能会产生多个信号或点(单体和二聚体,在文中

分别以 M 和 D 表示)。结合图2和表2来看,GC-IMS 共检测出39种挥发性成分,包括萜烯类8种、醇类5种、醛类9种、酯类4种、酮类4种、酚类1种、酸类2种、杂环化合物5种以及其它1种。

从指纹图谱(图2)可以看出,0Y样品中反式-β-罗勒烯、戊酸乙酯、糠醛、乙酸丁酯、丙酮、2-呋喃甲醇等物质的含量较高;1Y样品中α-松油烯、壬醛、戊醛、丙酸、4-甲基愈创木酚、乙酸乙酯等物质的含量较高;2Y样品中3-萜烯、月桂烯、β-蒎烯、α-蒎烯、芳樟醇、庚醛、2-乙酰基呋喃、3-甲基丁酸、反式-橙花叔醇、2-丁酮、2-乙基呋喃等物质的含量较高;3Y样品中异松油烯、茨烯、异戊醛、二乙酰等物质的含量较高;4Y样品中柠檬烯、己醛等物质的含量较高;5Y样品中香茅醛、桉叶油醇、丁醛、2-乙酰基噻唑等物质的含量较高。结合图2和表2看,α-蒎烯、反式-β-罗勒烯、芳樟醇、香茅醛、糠醛的含量在发酵期间较为稳定。异戊酸在未发酵样品中的含量为0.32%,显著高于其余阶段,其在发酵5年后含量达到最低值,为0.02%。2-乙基呋喃、2-丁酮、反式-橙花叔醇、2-乙酰基呋喃等物质在发酵3年时含量明显增加,达到整个发酵阶段的最大值,分别为1.33%、10.33%、22.17%、1.82%,在3年以后含量均呈现下降趋势。

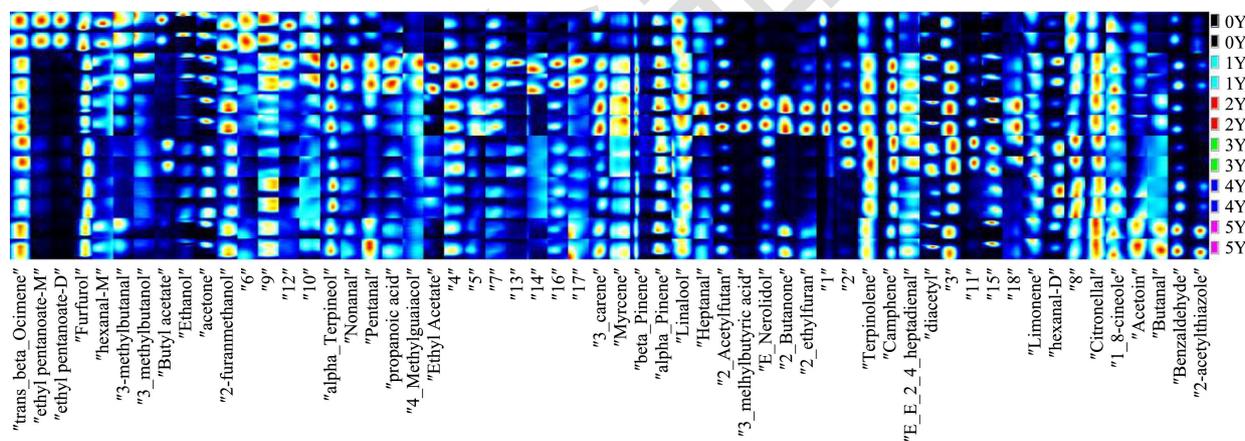


图2 不同发酵年份老香黄挥发性组分 GC-IMS 指纹图谱

Fig.2 GC-IMS fingerprint of volatile components in Lao Xianghuang in different fermentation years

表2 GC-IMS 检测不同发酵年份老香黄挥发性成分含量

Table 2 GC-IMS detects the volatile component content of Lao Xianghuang in different fermentation years

序号	化合物名称	迁移时间/min	保留指数	保留时间/s	相对含量/%					
					0Y	1Y	2Y	3Y	4Y	5Y
1	α-蒎烯	1.68	927.90	277.29	6.02	6.25	6.22	9.36	5.58	5.53
2	茨烯	1.21	948.50	293.47	2.27	2.90	2.15	3.76	2.42	1.69
3	β-蒎烯	1.68	972.90	315.32	3.91	4.74	3.30	2.92	4.78	4.01
4	月桂烯	2.14	990.90	333.84	1.00	1.55	1.66	0.73	1.21	1.45
5	3-萜烯	1.73	1010.40	356.46	2.52	2.70	2.51	1.54	2.12	2.66
6	柠檬烯	1.22	1033.20	385.91	1.13	0.97	0.69	1.14	1.18	0.88

续表2

序号	化合物名称	迁移时间 /min	保留指数	保留时间 /s	相对含量/%						
					0Y	1Y	2Y	3Y	4Y	5Y	
7	反式- β -罗勒烯	1.70	1052.30	412.43	12.12	6.98	6.44	7.28	7.09	7.64	
8	萜品油烯	1.22	1111.90	501.15	3.03	3.56	2.50	5.16	4.64	3.62	
	峰面积和				32.00	29.66	25.47	31.90	29.02	27.48	
9	乙醇	1.05	475.60	106.86	5.33	4.07	2.28	3.82	4.48	2.60	
10	异戊醇	1.49	733.60	175.69	0.11	0.07	0.03	0.05	0.04	0.03	
11	醇类	芳樟醇	1.22	1089.30	467.22	2.62	1.56	1.80	2.09	1.95	1.88
12	α -松油醇	1.79	1227.60	675.48	9.41	11.28	9.82	8.58	12.92	11.11	
13	反式-橙花叔醇	1.44	1764.10	1483.56	4.59	17.95	22.34	20.51	13.04	13.95	
	峰面积和				22.06	34.93	36.26	35.04	32.43	29.57	
14	正丁醛	1.29	625.70	142.16	0.18	0.19	0.39	0.15	0.23	0.77	
15	异戊醛	1.19	1008.40	353.93	0.07	0.12	0.10	0.21	0.11	0.09	
16	戊醛	1.16	688.80	159.51	0.40	0.64	0.39	0.20	0.23	0.63	
17	己醛-D	1.27	797.40	203.39	0.22	0.32	0.10	0.37	0.48	0.20	
18	己醛-M	1.56	796.10	202.80	0.33	0.17	0.17	0.09	0.14	0.19	
19	醛类	糠醛	1.33	842.00	225.03	11.52	5.05	4.40	6.71	7.18	6.67
20	庚醛	1.33	905.50	261.69	0.56	0.29	0.41	0.18	0.28	0.40	
21	壬醛	1.49	1107.60	494.72	1.01	1.00	0.48	0.70	0.90	0.72	
22	香茅醛	1.22	1149.00	557.12	9.21	9.86	7.09	8.96	12.04	10.65	
	峰面积和				23.50	17.63	13.53	17.57	21.59	20.32	
23	乙酸乙酯	1.34	630.50	143.33	0.48	1.39	0.39	0.83	1.15	0.41	
24	乙酸丁酯	1.62	807.40	208.06	0.14	0.03	0.02	0.13	0.03	0.03	
25	酯类	戊酸乙酯-D	1.26	897.30	256.43	0.53	0.03	0.01	0.06	0.03	0.01
26	戊酸乙酯-M	1.69	896.70	256.04	0.32	0.02	0.02	0.05	0.03	0.02	
	峰面积和				1.47	1.47	0.43	1.07	1.24	0.47	
27	丙酮	1.12	528.00	119.15	6.63	4.51	2.96	4.00	5.47	2.75	
28	2,3-丁二酮	1.41	663.90	152.10	1.15	0.87	10.41	0.62	0.83	7.04	
29	酮类	2-丁酮	1.24	615.20	139.62	0.42	0.26	0.20	0.20	0.37	0.62
30	3-羟基-2-丁酮	1.33	725.70	172.58	0.23	0.44	0.20	0.25	0.17	0.18	
	峰面积和				8.43	6.08	13.77	5.07	6.83	10.58	
31	酚类	4-甲基愈创木酚	1.19	1192.10	622.05	0.33	0.86	0.37	0.36	0.25	0.51
	峰面积和				0.33	0.86	0.37	0.36	0.25	0.51	
32	丙酸	1.28	726.70	172.97	2.02	2.66	1.44	4.64	1.88	2.12	
33	酸类	异戊酸	1.26	897.30	256.43	0.58	0.68	1.34	0.16	0.30	1.07
	峰面积和				2.61	3.34	2.78	4.80	2.18	3.18	
34	二乙酰	1.19	582.10	131.82	3.84	1.50	2.05	1.88	1.56	2.49	
35	杂环化合物	2-乙基呋喃	1.34	755.80	184.86	1.38	1.61	1.83	0.77	1.77	1.71
36	2-呋喃甲醇	1.36	878.00	244.72	0.51	0.31	0.10	0.10	0.46	0.97	
37	2-乙酰基呋喃	1.44	915.10	268.13	3.08	2.14	1.65	1.28	2.55	2.34	
38	2-乙酰基噻唑	1.48	981.60	324.09	0.68	0.30	0.15	0.04	0.04	0.26	
	峰面积和				9.49	5.86	5.78	4.08	6.38	7.77	
39	其它	桉叶油醇	1.74	1033.10	385.71	0.13	0.15	1.60	0.12	0.08	0.12
	峰面积和				0.13	0.15	1.60	0.12	0.08	0.12	

在老香黄发酵期间, 萜烯类物质逐渐减少。醇类物质呈现先上升后下降趋势。醛类物质呈现先下降后上升趋势。酯类、酮类和杂环化合物呈现整体上升趋势。总体而言, 随着发酵时间的延长, 老香黄中的一部分挥发性物质不断减少, 而又有一部分物质不断增多, 甚至从无到有, 说明挥发性物质成分种类越来越丰富, 这可能与老香黄发酵过程中氨基酸和蛋白质、脂质的相互作用以及有机酸与醇类物质发生酯化反应^[22,23]有关, 且从种类和含量来看, 发酵3年的老香黄挥发性成分种类较为丰富且含量偏高。

2.3 基于HS-SPME-GC-MS分析不同发酵年份老香黄的挥发性成分

顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用(HS-SPME-GC-MS)是一种常用于检测食品风味的萃取分离检测技术, 它综合了气相色谱和顶空固相微萃取的安全性、准确性和高分离能力, 以及质谱在物质鉴定方面的优越性^[24]。采用HS-SPME-GC-MS对发酵0年、1年、2年、3年、4年、5年的老香黄挥发性成分进行定性定量分析, 结果如表3、图3所示。

在不同发酵年份的老香黄样品中, 一共鉴定出50种挥发性物质, 包括萜烯类、醇类、醛类、酚类、酯类、醚类、杂环化合物和其它种类与HS-GC-IMS检测出来的大类物质大致相同。其中, 不同发酵年份样品中发现共有化合物14种, 分别为 α -蒎烯、 β -蒎烯、月桂烯、萜品油烯、柠檬烯、异松油烯、1-石竹烯、巴伦西亚橘烯、芳樟醇、 α -松油醇、糠醛、麦芽酚、茴香脑、2,4-二甲基苯乙烯, 与陈小爱等^[13]不同月份老香黄结果相似。

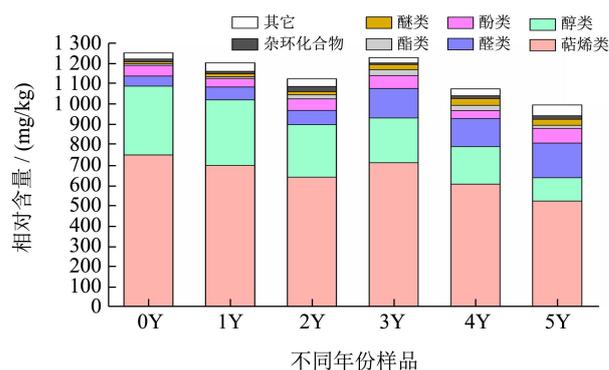


图3 不同年份老香黄挥发性成分种类含量图

Fig.3 Type content diagram of Lao Xianghuang volatile components in different years

表3 HS-SPME-GC-MS分析发酵不同年份的挥发性成分含量变化

Table 3 HS-SPME-GC-MS analyzed changes in volatile component content in different years of fermentation

名称	保留时间/min	相对含量/(mg/kg)						气味特征 ^[25-35]
		0Y	1Y	2Y	3Y	4Y	5Y	
萜烯类								
α -蒎烯	16.59	32.4±2.69 ^a	34.72±2.33 ^a	20.2±1.89 ^c	28.37±0.98 ^b	16.23±0.40 _d	14.43±0.94 ^d	新鲜樟脑、木香
左旋- α -蒎烯	16.61	ND	ND	ND	2.68±0.31 ^a	2.57±0.13 ^a	ND	NDC
β -蒎烯	16.7	23.08±0.41 ^a	21.63±1.98 ^a	22.56±1.44 ^a	15.48±1.07 ^b	23.67±0.89 ^a	16.62±2.44 ^b	干木、树脂样气息
左旋- β -蒎烯	17.72	ND	ND	ND	ND	6.05±0.34 ^a	5.12±0.43 ^b	NDC
月桂烯	17.93	131.41±2.41 _a	128.32±1.42 _a	117.74±5.56 _b	125.4±1.75 ^a	90.96±1.43 ^c	84.95±4.43 ^d	胡椒香、辛香
萜品油烯	18.03	71.87±2.44 ^c	78.4±0.92 ^b	91.35±1.83 ^a	88.54±1.44 ^a	67.26±1.00 _d	69.22±1.47 _d	松木香
α -萜品烯	18.14	ND	ND	ND	3.72±0.22 ^a	ND	ND	NDC
柠檬烯	18.55	205±0.38 ^a	181.63±5.11 _b	169.36±5.28 _c	180.19±6.41 _b	153.5±2.48 _d	119.82±2.96 _e	柑橘香、药草香
异松油烯	19.67	73.04±3.19 ^a	66.23±1.51 ^b	58.09±1.86 ^c	58.64±1.44 ^c	49.64±1.47 _d	49.5±1.09 ^d	木香、柠檬香气
1-石竹烯	20.8	34.11±1.51 ^a	35.24±4.37 ^a	37.12±1.39 ^a	34.56±0.97 ^a	38.87±6.46 ^a	30.47±2.64 ^a	木香、丁香
(E)- β -金合欢烯	30.36	12.91±2.21 ^a	15.37±1.17 ^a	ND	13.8±0.62 ^a	15.59±1.17 ^a	12.53±0.62 ^a	青香、花香、甜香
法尼烯	30.37	ND	ND	ND	23.08±0.41 ^b	30.57±6.52 ^a	27.32±0.88 ^{ab}	樟脑、薰衣草香
巴伦西亚橘烯	31.8	51.55±3.33 ^c	55.32±1.47 ^c	44.26±1.53 ^d	54.03±0.19 ^c	64.13±1.42 _b	69.73±1.9 ^a	柑橘香
3-萜烯	32.32	24.58±1.1 ^c	ND	28.45±2.11 ^b	25.72±0.48 ^{bc}	43.62±2.87 ^a	ND	松木香
杜松烯	35.66	47.29±1.52 ^b	51.25±0.96 ^a	33.4±2.8 ^c	53.37±1.53 ^a	ND	22.95±1.61 ^d	NDC
1-卡拉烯	35.67	31.18±1.06 ^a	29.94±1.31 ^a	17.94±0.84 ^b	ND	ND	ND	NDC

续表 3

名称	保留 时间/min	相对含量/(mg/kg)						气味特征 ^[25-35]
		0Y	1Y	2Y	3Y	4Y	5Y	
醇类								
3-己烯-1-醇	20.44	49.55±1.04 ^a	44.18±3.25 ^h	41.26±1.63 ^c	23.46±1.33 ^d	ND	ND	NDC
芳樟醇	21.13	102.69±1.68 ^a	94.65±3.14 ^h	71.46±1.62 ^d	76.1±1.09 ^c	69.54±1.39 ^d	60.61±1.98 ^e	木青气息、花香
(-)-4-萜品醇	28.36	ND	ND	ND	18.75±0.43 ^h	22.08±1.35 ^e	ND	霉味
4-萜烯醇	28.65	16.91±0.91 ^a	14.01±0.69 ^h	8.53±0.46 ^d	ND	ND	12.14±0.52 ^c	脂肪、柑橘香气
1-壬醇	29.87	16.29±0.17 ^a	15.24±2.08 ^a	ND	ND	ND	ND	茴芹、薄荷味
α -松油醇	31.5	30.84±0.75 ^b	32.45±5.01 ^h	22.96±3.01 ^c	20.09±3.13 ^c	33.12±2.11 ^b	42.02±3.01 ^a	紫丁香花香、木香
松油醇	31.52	22.82±0.44 ^a	21.76±1.23 ^a	16.93±1.12 ^h	8.4±0.35 ^c	ND	ND	柚香味
香茅醇	33.01	65.82±1.61 ^a	66.54±2.62 ^a	54.37±0.60 ^h	25.44±1.28 ^c	11.12±2.02 ^d	ND	柑橘、木兰香气
橙花醇	34.06	33.86±1.87 ^a	33.45±2.08 ^a	27.87±0.32 ^h	26.46±1.06 ^b	16.77±0.94 ^c	ND	苹果香
3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇	35.3	ND	ND	15.66±0.64 ^c	21.74±5.99 ^b	32.05±1.66 ^a	ND	
醛类								
糠醛	31.76	22.6±3.7 ^d	29.89±2.89 ^c	37.8±0.25 ^b	40.87±0.75 ^b	41.95±2.4 ^b	48.29±0.83 ^a	焦甜香
3-糠醛	32.76	16.36±5.21 ^b	ND	25.39±2.57 ^a	26.52±1.1 ^a	ND	ND	NDC
5-甲基呋喃醛	37.62	ND	17.4±1.56 ^d	ND	31.42±1.06 ^b	37.65±2.52 ^c	40.83±1.73 ^a	焦甜味
5-羟甲基糠醛	39.05	ND	16.14±1.03 ^c	ND	30.91±5.80 ^b	28.16±1.21 ^b	35.85±0.33 ^a	焦糖味、清新味
肉桂醛	40.99	10.36±0.64 ^d	ND	ND	15.27±0.60 ^b	13.43±0.64 ^c	34.29±0.75 ^a	桂皮、肉桂油味
反式肉桂醛	40.99	ND	ND	6.78±0.43 ^c	ND	16.47±0.92 ^a	11.6±1.36 ^b	肉桂芳香
酚类								
麦芽酚	40.32	25.56±0.89 ^d	28.27±1.54 ^d	56.31±2.49 ^a	36.59±0.89 ^c	26.69±1.68 ^d	46.44±1.25 ^h	焦甜香
3-烯丙基愈创木酚	43.77	ND	ND	ND	15.42±1.15 ^a	ND	14.25±0.96 ^b	辛香
丁香酚	43.8	12.98±3.28 ^a	14.20±2.51 ^a	ND	ND	12.79±1.29 ^a	11.41±1.29 ^a	丁香、辛香
香芹酚	43.9	13.97±1.41 ^a	ND	ND	11.99±1.28 ^b	ND	ND	麝香味
酯类								
2-糠酸甲酯	40.16	7.83±0.37 ^b	8.16±1.74 ^b	15.30±0.77 ^a	14.4±0.75 ^a	14.67±2.84 ^a	ND	NDC
3-呋喃甲酸甲酯	40.2	ND	ND	5.55±0.79 ^b	10.23±2.18 ^a	6.42±0.59 ^b	12.57±2.85 ^a	NDC
肉豆蔻酸异丙酯	40.45	ND	ND	ND	4.20±1.59 ^a	4.47±0.41 ^a	2.97±0.29 ^b	焦糖味
醚类								
茴香脑	35.33	9.94±3.48 ^c	14.95±1.34 ^d	14.96±0.71 ^d	25.23±0.71 ^c	33.43±3.02 ^a	29.09±1.64 ^h	甘草味、茴香味
杂环化合物								
2,5-二甲酰基呋喃	39.2	6.68±1.38 ^a	ND	8.80±0.29 ^a	8.00±1.46 ^a	7.73±1.30 ^a	8.34±0.88 ^a	坚果香、甜香
2-(羟基乙酰基)呋喃	39.43	6.71±1.81 ^b	ND	ND	ND	6.80±0.51 ^b	8.84±0.95 ^a	可可、巧克力香
4-氨基吡嗪	40.2	ND	12.21±1.23 ^b	16.47±0.79 ^a	ND	ND	ND	NDC
其它								
1,5-二甲基-1,5-环辛二烯	24.2	ND	ND	5.84±0.85 ^a	3.92±0.34 ^c	ND	4.93±0.62 ^b	NDC
(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-十八烷三烯	24.54	ND	ND	ND	ND	ND	5.85±0.62 ^a	NDC
桉叶油醇	34.86	9.03±0.41 ^b	9.89±0.19 ^b	ND	ND	10.1±1.45 ^b	17.97±1.22 ^a	薄荷糖味
2-氯樟脑	31.94	ND	ND	ND	ND	8.55±0.42 ^a	8.17±0.81 ^a	NDC

年后相对含量呈现升高趋势; 萜品油烯和 2,4-二甲基苯乙烯在发酵 0-2 年相对含量升高, 但是 2 年后相对含量

发生下降; 麦芽酚发酵期间呈现升-降-升趋势。

2.3.3 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 不同年份共有挥发性成分

OPLS-DA 是在偏最小二乘判别 (Partial Least Squares Regression Discriminant Analysis, PLS-DA) 的基础上进一步发展起来的, 通过正交化, 排除与分类无关的自变量, 减少误差, 从而达到筛选不同样本的特征变量的目的^[46]。一般认为, 变量投影重要性 (VIP) 大于 1 时, 则表明该变量对于模型中各个类别的区分有重要意义。

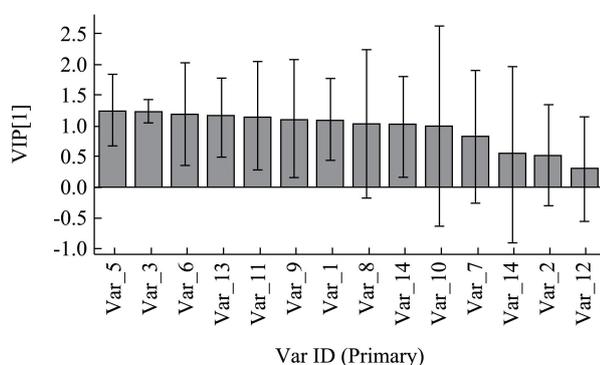


图 5 OPLS-DA 分析不同发酵年份老香黄共有成分差异贡献度图

Fig.5 OPLS-DA Analysis of the difference contribution of common components in different fermentation years Lao Xianghuang

将不同发酵年份 14 个共有挥发性成分进行正交偏最小二乘判别分析, 经 OPLS-DA 分析 R^2 为 0.593, Q^2 为 0.679, R^2 和 Q^2 均大于 0.500, 说明此模型构建成功, 具有很好的拟合度和预测能力。对化学标志物含量的 VIP 值大小进行排序。Var1~Var14 分别代表 α -蒎烯、 β -蒎烯、月桂烯、萜品油烯、柠檬烯、异松油烯、1-石竹烯、巴伦西亚橘烯、芳樟醇、 α -松油醇、糠醛、麦芽酚、茴香脑、2,4-二甲基苯乙烯。由图 5 可知, 老香黄 VIP 值大于 1 的差异化学标志物有 8 种, 其中有 6 种萜烯类差异物质分别为, Var5 (柠檬烯)、Var3 (月桂烯)、Var6 (异松油烯)、Var13 (1-石竹烯)、Var1 (α -蒎烯) 以及 Var8 (巴伦西亚橘烯), 萜烯类物质是芸香科植物中含量较高的物质, 具有香甜花草香, 有研究报道佛手在腌制放置过程中萜烯类物质持续下降^[5]; 另外两种分别为 Var11 (糠醛)、Var9 (芳樟醇), 糠醛是在发酵过程中含量持续上升的焦甜香物质, 主要是多糖降解产生的^[45], 芳樟醇随着发酵时间越长含量逐渐降低, 一般在生佛手中含量较高^[47]。以上 8 种化学成分对 6 个发酵阶段的老香黄的分类有显著影响,

这些成分是引起不同发酵年份老香黄挥发性物质变化的主要差异性化学标志物, 可为区分不同发酵年份老香黄提供一定依据。

3 结论

本文主要利用电子鼻、HS-GC-IMS、HS-SPME-GC-MS 三种不同的技术联用对不同发酵年份老香黄挥发性成分变化进行分析, 并结合 OPLS-DA 分析不同发酵年份老香黄特征性成分。电子鼻分析结果得知, PCA 能明显区分发酵与未发酵老香黄, 未发酵的老香黄风味与发酵的差异较大, 其中发酵 3、4 年老香黄风味成分相似, 而发酵 1 年、2 年、5 年老香黄风味差异较大, 说明发酵工艺对老香黄风味的影响较大。HS-GC-IMS 和 HS-SPME-GC-MS 所测出的基础风味物质种类基本一致, 且鉴定出物质变化趋势也大致相同, 萜烯类以及醇类含量总体呈现下降趋势, 醛类化合物含量总体呈现上升趋势, 但是, 酸类物质是 HS-GC-IMS 技术优于 HS-SPME-GC-MS 技术检测到的小分子 (C2~C10)、低含量的物质。HS-GC-IMS 定性检测出 39 中挥发性成分, 包括萜烯类 8 种、醇类 5 种、醛类 9 种、酯类 4 种、酮类 4 种、酚类 1 种、酸类 2 种、杂环化合物 5 种以及其他 1 种。离子迁移指纹图可以直观的看出老香黄在不同发酵年份期间各种挥发性成分的变化情况, 且伴有部分物质的消失和新物质的形成。HS-SPME-GC-MS 的结果中一共鉴别出 50 种挥发性成分, 包括萜烯类 16 种、醇类 10 种、醛类 6 种、酚类 4 种、酯类 3 种、醚类 1 种、杂环化合物 3 种和其它类 7 种。不同发酵年份样品中发现共有化合物 14 种, 然后结合 OPLS-DA 分析挥发性化合物的变化, 共筛选出 8 种差异性化学标志物, 分别为柠檬烯、月桂烯、异松油烯、1-石竹烯、糠醛、芳樟醇、 α -蒎烯、巴伦西亚橘烯, 可为鉴别不同年份老香黄提供一定理论依据。

参考文献

- [1] 郑玉忠, 郭守军, 杨永利, 等. 药食凉果老香黄制作工艺的研究 [J]. 农产品加工(学刊), 2014, 1: 44-45
- [2] 罗思敏, 吴孟华, 周宇, 等. 佛手的品种源流及药用食用考 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3997-4003
- [3] 郭舒臣, 郑玉忠, 郭瑞, 等. 不同年份老香黄定量分析及其化学模式识别研究 [J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 10-18
- [4] 王强. 老香黄袋泡茶和老药桔袋泡茶制备工艺的研究 [D]. 乌

- 鲁木齐:新疆农业大学,2013
- [5] 严赞开,严奉伟.佛手挥发性物质在腌制过程中的变化[J].食品科学,2012,33(2):181-184
- [6] 林良静,蔡惠钿,包涵,等.潮汕特色佛手香黄的特征挥发性风味成分分析[J].现代食品科技,2021,37(7):238-249
- [7] 戈子龙,张泽金,周爱梅,等.基于高通量测序与培养方法分析新鲜佛手与老香黄中的细菌多样性[J].食品与发酵工业,2020,46(3):250-256
- [8] 谢璧珠,杜光文,吴洪声,等.2016年市售“潮州三宝”凉果微生物与食品添加剂监测结果分析[J].中国卫生检验杂志,2017,27(14):2086-2088
- [9] 赖宣,杨启财,张振霞.潮汕老香黄亚硝酸盐含量的调查分析[J].轻工科技,2016,32(5):4-5
- [10] Kai Hu, Linlin Zeng, Ye Pan, et al. Change in aromatic components of banana during the preparation process of juice and microcapsule powder [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(7): 1398-1405
- [11] Caja M D M, Herraiz M. Rapid screening of volatile compounds in edible plants by direct chromatographic analysis [J]. Food Chemistry, 2009, 117(3): 456-460
- [12] Abd E A M, Kim I, Kim M, et al. Determination of volatile organic compounds generated from fresh, white and red *Panax ginseng* (C. A. Meyer) using a direct sample injection technique [J]. Biomedical Chromatography: BMC, 2008, 22(5): 556-562
- [13] 陈小爱,蔡惠钿,刘静宜,等.基于电子鼻、GC-MS和GC-IMS技术分析老香黄发酵期间的挥发性成分变化[J].食品工业科技,2021,42(12):70-80
- [14] 汤酿,刘静宜,陈小爱,等.基于GC-MS和GC-IMS联用法分析不同采收期广佛手精油挥发性成分[J].食品科学,2021,42(16):193-202
- [15] Aparicio R, Rocha S M, Delgadillo I, et al. Detection of rancid defect in virgin olive oil by the electronic nose [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(3): 853-860
- [16] Yin Y, Zhao Y. A feature selection strategy of E-nose data based on PCA coupled with Wilks Λ -statistic for discrimination of vinegar samples [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(3): 2406-2416
- [17] Wang N, Chen S, Zhou Z. Characterization of volatile organic compounds as potential aging markers in Chinese rice wine using multivariable statistics [J]. Journal of The Science of Food and Agriculture, 2019, 99(14): 6444-6454
- [18] 周杏荣,陈晓艺,蒋立文,等.竹笋自然发酵过程中风味物质变化规律[J].中国酿造,2019,38(8):20-24
- [19] 裴鹏正,贡建民,贾琦,等.软儿梨果酒发酵过程中挥发性风味物质变化分析[J].生物技术进展,2021,11(6):758-769
- [20] 王炳宇,杨宇驰,许立伟,等.四种不同发酵基质柑橘果醋挥发性成分分析[J].中国酿造,2021,40(10):144-151
- [21] Armenta S, Alcalá M, Blanco M. A review of recent, unconventional applications of ion mobility spectrometry (IMS) [J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 703(2): 114-123
- [22] Deng Y, Luo Y, Wang Y, et al. Effect of different drying methods on the myosin structure, amino acid composition, protein digestibility and volatile profile of squid fillets [J]. Food Chemistry, 2015, 171: 168-176
- [23] Jin G, Zhu Y, Xu Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 63: 18-28
- [24] Ruiz Del Castillo M L, Rodríguez-Valenciano M, Flores G, et al. New method based on solid phase microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry to determine pesticides in strawberry jam [J]. LWT, 2019, 99: 283-290
- [25] 胡梓妍,刘伟,何双,等.基于HS-SPME-GC-MS法分析3种金橘的香气挥发性成分[J].食品科学,2021,42(16):176-184
- [26] 宋诗清,童彦尊,冯涛,等.金佛手香气物质的多维分析及其特征香气物质的确定[J].食品科学,2017,38(24):94-100
- [27] 曹艳妮,刘通讯.普洱生茶和熟茶香气中萜烯类和甲氧基苯类成分分析[J].食品工业科技,2012,33(5):128-130
- [28] 刘阳,邓静,吴华昌,等.柑橘果皮中生香酵母的筛选及挥发性香气成分分析[J].食品安全质量检测学报,2014,5(12):4050-4055
- [29] 王越,王连,王愈.基于GC-IMS和HS-SPME-GC-MS的不同处理方式黑枣的挥发性成分分析[J].食品科学,2021:1-17
- [30] 李欢康,杨佳玮,刘文玉,等.不同工艺核桃油挥发性物质对比及关键香气成分表征[J].食品科学,2021,42(16):185-192
- [31] 李艳,康俊杰,成晓玲,等.3种酿酒酵母酿造赤霞珠干葡萄酒的香气成分分析[J].食品科学,2010,31(22):378-382
- [32] 赵祥颖,刘丽萍,张家祥,等.基于气相色谱-离子迁移谱联用技术分析甘薯块根不同组别对甘薯特征风味剂香气的贡献[J].食品与发酵工业,2021,47(12):236-243
- [33] A Escudero, Juan Cacho, V Ferreira. Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study [J]. European Food Research & Technology, 2000, 211(2): 105-110
- [34] 周琦,谈安群,欧阳祝,等.橙汁与宽皮橘汁关键香气的比较及其在各自主体风味呈现中的作用[J].食品与发酵工业,2021,21:259-267

- [35] 樊艳.SPME-GC-MS 结合 ROAV 分析腐乳中的主体风味物质[J].食品工业科技,2021,42(8):227-234
- [36] 梅明鑫.沃尔卡姆柠檬酒酿造工艺研究[D].重庆:西南大学,2018
- [37] 蒲璐璐,戴怡凤,李豆南,等.电子鼻和气质联用技术分析不同酒龄酱香型白酒挥发性成分[J].中国酿造,2021,40(7):171-175
- [38] 张卜升,高杏,闫昕,等.基于 GC-IMS 技术分析石榴果酒酿制过程中挥发性风味成分的变化[J].食品与发酵工业,2022,48(7):252-257
- [39] 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):281-287
- [40] Vespermann K A C, Paulino B N, Barcelos M C S, et al. Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(5): 1805-1817
- [41] Busi Siddhardha, M Vijay Kumar, U S N Murty, et al. Biotransformation of α - pinene to terpineol by resting cell suspension of *Absidia corulea* [J]. Indian Journal of Microbiology, 2012, 52(2): 292-294
- [42] 张璐璐,范刚,何进,等.柠檬烯微生物转化及其相关酶的研究进展[J].食品工业科技,2019,12:317-325
- [43] Duetz W A, Fjällman A H, Ren S, et al. Biotransformation of D-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6): 2829-2832
- [44] Bicas J L, Fontanille P, Pastore G M, et al. A bioprocess for the production of high concentrations of R-(+)- α -terpineol from R-(+)-limonene [J]. Process Biochemistry, 2010, 45(4): 481-486
- [45] 赵芷言,丁佳晶,夏斐斐,等.生物质制备糠醛及其研究进展[J].广州化工,2020,48(22):1-3
- [46] 赵梦瑶,张立攀,王春杰,等.HS-SPME-GC/MS 分析 3 种牡丹花瓣挥发性成分[J].食品工业科技,2021,42(16):294-302
- [47] 汪金玉,张秋霞,陈康,等.基于 GC-MS 技术分析广佛手蒸制前后挥发性成分的差异[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(13):126-132