DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251021002
引用格式: 范佳莹, 国伟, 刘通, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-静电场轨道阱质谱法结合化学计量学比较分析酱油挥发性风味成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(8): 319–329.
FAN JY, GUO W, LIU T, *et al*. Comparative analysis of volatile flavor compounds in soy sauce by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-orbitrap-mass spectrometry combined with chemometrics [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(8): 319–329. (in Chinese with English abstract).

顶空固相微萃取-气相色谱-静电场轨道阱质谱法结合化学计量学比较分析酱油挥发性风味成分

范佳莹[1,2], 国 伟[1*], 刘 通[1], 陈世奇[2,3], 黄思瑜[2,3]

[1. 中国质量检验检测科学研究院, 北京 100176; 2. 重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; 3. 国家市场监督管理总局重点实验室(调味品监管技术), 重庆 401121]

摘 要: 目的 利用顶空固相微萃取-气相色谱-静电场轨道阱质谱法(headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-orbitrap-mass spectrometry, HS-SPME-GC-Orbitrap-MS), 对生抽酱油和老抽酱油中挥发性风味成分进行比较分析。**方法** 以酱油为研究对象, 优化顶空固相微萃取的温度、平衡时间、萃取时间、盐浓度、样品量, 建立 HS-SPME-GC-Orbitrap-MS 测定酱油中挥发性化合物的方法, 实现生抽酱油和老抽酱油中挥发性香气化合物的定性和半定量, 通过主成分分析、正交偏最小二乘判别分析模型等对生抽酱油和老抽酱油进行差异分析。**结果** HS-SPME-GC-Orbitrap-MS 鉴定出生抽酱油中 124 种, 老抽酱油中 88 种特征挥发性香气化合物。通过正交偏最小二乘判别分析(变量重要性投影值≥1)以及 Kruskal-Wallis *H* 检验(P<0.05)进一步筛选出 5 种香气物质, 分别为苯乙醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丁醇、戊醛和 4-乙基愈创木酚。**结论** 本研究建立了 HS-SPME-GC-Orbitrap-MS, 能够高效鉴定酱油中的挥发性成分, 应用该方法结合化学计量学筛选出了生抽酱油与老抽酱油的 5 个差异化合物, 其中苯乙醇、乙酸乙酯和 2-甲基-1-丁醇在生抽酱油中相对含量更高, 赋予了生抽酱油果香、醇香的特征。而戊醛和 4-乙基愈创木酚在老抽酱油中的相对含量更高, 贡献了老抽酱油浓郁的脂香和酱香。研究结果为酱油行业质量评价提供了参考数据, 为进一步研究不同发酵工艺、用途的酱油风味特色提供新理论依据。

关键词: 气相色谱-静电场轨道阱质谱法; 酱油; 多元统计分析; 挥发性香气

Comparative analysis of volatile flavor compounds in soy sauce by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-orbitrap-mass spectrometry combined with chemometrics

FAN Jia-Ying[1,2], GUO Wei[1*], LIU Tong[1], CHEN Shi-Qi[2,3], HUANG Si-Yu[2,3]

收稿日期: 2025-10-21
基金项目: 国家市场监督管理总局重点实验室(调味品监管技术)开放课题项目(KLCST-2023-04)
第一作者: 范佳莹(1996—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 1210534544@qq.com
***通信作者:** 国伟(1978—), 女, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 26389839@qq.com

(1. *Chinese Academy of Quality and Inspection & Testing*, *Beijing* 100176, *China*; 2. *Chongqing Institute for Food and Drug Control*, *Chongqing* 401121, *China*; 3. *Key Laboratory of Condiment Supervision Technology*, *State Administration for Market Regulation*, *Chongqing* 401121, *China*)

ABSTRACT: Objective To compare the volatile flavor compounds in light and dark soy sauce by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-orbitrap-mass spectrometry (HS-SPME-GC-Orbitrap-MS). **Methods** The study used soy sauce as the research object. Parameters such as extraction temperature, equilibration time, extraction time, salt concentration and sample volume were optimized to establish a method for determining volatile compounds in soy sauce by HS-SPME-GC-Orbitrap-MS. Based on this method, volatile aroma compounds in light and dark soy sauce were identified and semi-quantified. Principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were used to analyze the differences between the light and dark soy sauce. **Results** A total of 124 volatile aroma compounds were identified in light soy sauce, and 88 in dark soy sauce using HS-SPME-GC-Orbitrap-MS. Through orthogonal partial least squares discriminant analysis (variable importance for the projection$\geqslant$1) and the Kruskal-Wallis *H* test (P<0.05), 5 kinds of key aroma compounds were further screened: Phenethyl alcohol, ethyl acetate, 2-methyl-1-butanol, pentanal and 4-ethyl guaiacol. **Conclusion** This study establishes a HS-SPME-GC-Orbitrap-MS method that can efficiently identify volatile components in soy sauce. By applying this method combined with chemometrics, 5 differential compounds between light soy sauce and dark soy sauce are screened out. Among them, the relative content of phenyleth anol, ethyl acetate and 2-methyl-1-butanol is higher in light soy sauce, endowing it with fruity and alcoholic characteristics. Meanwhile, the relative content of pentanal and 4-ethyl guaiacol is higher in dark soy sauce, contributing to its rich fatty and soy sauce-like aroma. The findings provide reference data for quality evaluation in the soy sauce industry and offer a new theoretical basis for further research on the flavor characteristics of soy sauces produced by different fermentation processes or for different uses.

KEY WORDS: gas chromatography-orbitrap-mass spectrometry; soy sauce; multivariate statistical analysis; volatile aroma

0 引 言

酱油是一种以大豆或脱脂大豆、小麦或麦麸等为主要原料, 通过微生物发酵制成的液体调味品[1], 兼具呈色、调味和增鲜等功能, 广泛应用于烹饪和餐饮领域[2]。根据国家酿造酱油标准, 酱油可分为低盐固态酱油和高盐稀态酱油两类[3], 其中高盐稀态酱油又依据用途及“复晒”工艺差异进一步细分为生抽酱油和老抽酱油[4]。风味作为酱油品质的关键指标[5], 主要由香气和滋味两部分构成[6]。其中, 挥发性香气化合物(如醇类、醛类、酯类、酮类等)主导酱油的嗅觉特征[7], 而非挥发性成分(如游离氨基酸、糖类及肽类)则主要影响其鲜味和口感[8]。因此, 深入解析酱油中挥发性香气化合物的组成及变化, 对于酱油的品质评价与风味调控具有重要意义。

目前, 针对酱油挥发性成分的分析方法主要包括气相色谱-四极杆质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)[9]、气相色谱-离子迁移谱法(gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-IMS)[10]及气相色谱-飞行时间质谱法(gas chromatography-time of flight-mass spectrometer, GC-TOF-MS)[11]等。其中, GC-MS 因其成本较低、设备成熟且配备完善谱库, 成为挥发性成分鉴定的主流手段。GAO 等[12]利用 GC-MS 鉴定出黑酱油中的 66 种挥发性香气化合物; 王泽亮等[13]比较了不同酿造工艺酱油的风味特征, 发现酮类和 4-乙基苯酚等成分可作为不同工艺的标志物。然而, 酱油风味成分复杂且结构多样, 尤其是生抽酱油与老抽酱油这两类菌群相似但后续“复晒”等工艺显著不同的产品, 四极杆质谱质量分辨率和灵敏度的限制, 易受到基质干扰, 导致低丰度组分及同分异构体识别不足[14]。结合化学计量学方法对数据进行多变量解析, 可提升分析的准确性和效率。李阳[15]采用液相色谱-质谱法结合化学计量学, 实现了不同等级酱油的非靶向特征筛查, 为品质鉴别提供了有效工具。

静电场轨道阱质谱(orbitrap-mass spectrometry, Orbitrap-MS)以其高质量分辨率、高灵敏度及优异的质量稳定性[16], 在复杂基质样品中对痕量挥发性化合物的检测表现突出, 有效降低了背景干扰[17]。结合化学计量学对全扫描模式获得的复杂数据进行快速解析, 可实现对酱油挥发性风味成分的高效、准确分析。虽然已有研究利用 GC-MS 方法比较不同产地和发酵工艺酱油的挥发性成分[18−19], 但应用气相色谱-静电场轨道阱质谱法(gas chromatography-orbitrap-mass spectrometry, GC-Orbitrap-MS)深入探讨生抽酱油与老抽酱油挥发性风味物质差异的相关研究仍较缺乏,

亟需系统开展该方向工作以丰富该领域的研究内容。

本研究针对生抽酱油和老抽酱油的挥发性成分进行了系统分析, 首先优化了顶空固相微萃取(headspace solid-phase microextraction, HS-SPME)的参数条件, 随后建立了 HS-SPME-GC-Orbitrap-MS 结合化学计量学的分析流程。基于该优化方法, 系统解析了生抽酱油与老抽酱油在挥发性成分的组成及含量上的差异, 旨在为行业提供关于酱油品质鉴定的科学依据, 同时为政府部门制定酱油风味等级分类标准提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酱油购于线下超市, 共采购 14 种不同品牌或不同系列的酱油, 其中生抽酱油与老抽酱油各 7 种。

2-甲基-3-庚酮(色谱纯, 德国 Dr.E 公司); 正构烷烃标准品(质量浓度 1000 μg/mL, 美国 AccuStandard 公司); 氯化钠(NaCl)(分析纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); 甲醇、正己烷(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 实验室用水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 仪器与设备

Trace 1610-Orbitrap Exploris GC 型气相色谱-质谱仪(配有 TriPlus RSH SMART 全自动进样器)、TG-5SILMS 气相色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)、DVB/CAR/PDMS-80 μm (50 μm/30 μm)型固相微萃取针(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ML104/02 分析天平(精度 0.1 mg, 梅特勒-托利多上海有限公司); Milli-Q ® IQ7000 超纯水系统(德国默克公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

准确吸取 2 mL 样品于 15 mL 顶空瓶中, 加入 100 μL 内标(1 μg/mL 2-甲基-3-庚酮标准溶液)和 0.4 g NaCl, 加盖密封, 待测。

1.3.2 HS-SPME 条件

参照毛红艳等[20]的方法并略作修改。将装好样品的顶空瓶置于 45 ℃、250 r/min 转速下振摇平衡 15 min, 将 SPME 针的纤维头伸入顶空瓶上部空间, 于 45 ℃、250 r/min 转速下吸附 30 min, 而后将纤维头插入仪器进样口端, 在 250 ℃下解析 5 min, 每个样品检测后纤维头老化 10 min, 确保无残留。

1.3.3 GC-Orbitrap-MS 条件

GC 条件: TG-5SILMS 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 进样口温度: 250 ℃; 分流比 10:1; 载气(氦气)流速: 1 mL/min; 升温程序: 初始温度 40 ℃, 保持 3 min, 以 4 ℃/min 升至 150 ℃, 保持 2 min, 再以 6 ℃/min 升至 250 ℃, 保持 6 min。

Orbitrap-MS 条件: 电子电离(electron ionization, EI)源; 离子源温度 250 ℃, 传输线温度 250 ℃; 扫描模式 Full Scan, 分辨率 60000 FWHM, 扫描范围 33~450 *m*/*z*, 扫描时间 1.00~55.17 min。

1.3.4 方法优化条件

从 HS-SPME 的温度(40、45、50、55、60 ℃)、平衡时间(10、15、20、25、30 min)、萃取时间(25、30、35、40、45 min)、样品的盐质量浓度(160、210、260、360、460 g/L)、样品量(2 mL、5 mL)进行了单因素实验, 同一酱油样品在每个条件下做 3 水平实验。以内标折算出的化合物总峰面积、检出的化合物总数和酱油中 6 种重要风味活性物质(乙酸乙酯、3-甲基丁醛、3-甲硫基丙醛、1-辛烯-3-醇、麦芽酚、4-乙基愈创木酚)的相对峰面积为判断依据进行优化。

1.4 数据处理

使用 GC Deconvolution 软件对图谱进行解卷积, 结合美国国家标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)数据库, 保留相似度指数(similarity index, SI)和反向相似度指数(reverse similarity index, RSI)均大于 800 的化合物, 并结合正构烷烃标准品(C7~C40)提供的可靠信息计算保留指数定性。以 2-甲基-3-庚酮作为内标计算各组分的相对含量进行半定量。使用 Compound Discover 3.3 软件对所有样品进行保留时间比对和未知化合物检测, 使用 SIMCA-P (14.1 版)对数据进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)。使用 Excel 2019、SPSS Statistics 25.0 进行数据统计分析, Origin 9.0 作图。

2 结果与分析

2.1 HS-SPME 方法优化

2.1.1 萃取温度

萃取温度对分析物的扩散速度、分配系数以及纤维的吸附能力都有显著影响。不同萃取温度对酱油挥发性化合物总峰面积的影响如图 1(a)所示, 萃取温度对 SPME 针纤维头吸附香气的效率存在着双重作用。随着温度增加, 纤维头吸附到的酱油中化合物总峰面积整体呈现 45 ℃最大而后总体上有所降低的趋势, 当温度为 45 ℃时, 化合物总数为 130 种; 当温度继续升高至 60 ℃时, 化合物总峰面积有所下降, 化合物总数趋于稳定(131 种)。这是由于加热过程使挥发性化合物加速释放到顶空, 但萃取头的分配系数因高温影响对小分子化合物的吸附作用下降[21]。同时, 从图 1(b)不同萃取温度对酱油中 6 种重要风味活性物质的影响也可以看出, 随着温度升高, 分子量越大的化合物其相对峰面积越大, 如麦芽酚、4-乙基愈创木酚; 而小分子化合

物如乙酸乙酯、3-甲基丁醛、1-辛烯-3-醇等相对峰面积总体上有所减小。这与萃取头涂层中多孔的交联聚合物颗粒和极微孔结构的高比表面积碳材料有关，吸附量的有限和竞争性吸附会导致化合物含量的增减[22]。综合总峰面积和物质总数，45 ℃为萃取最佳温度。

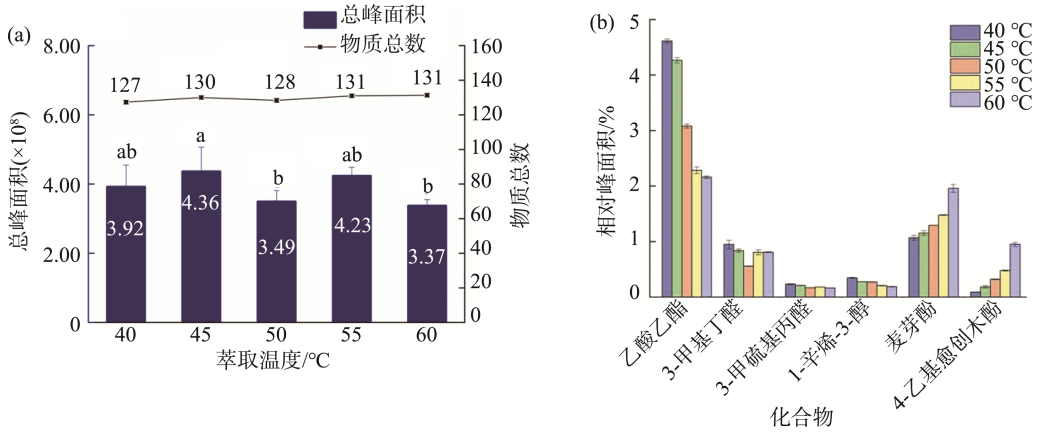
2.1.2 平衡时间

平衡时间是指样品开始加热至 SPME 针萃取前的时间。为促进目标分析物从样品向顶空转移，HS-SPME 过程首先要进行平衡[23]，使得挥发性组分在液相与气相之间达到分配平衡。本研究考察了 10、15、20、25、30 min 的平衡时间对酱油中挥发性化合物的影响，如图 2 所示。从图 2(a)中可以看出，随着平衡时间增加，物质总峰面积变化并不明显，通过单因素方差分析，不同平衡时间对总峰面积的影响没有显著性差异(P>0.05)，但物质总数在 15 min 时最高，为 133 种，从图 2(b)中可以看出，除 3-甲基丁醛的相对峰面积逐渐升高外，乙酸乙酯、3-甲基硫基丙醛、1-辛烯-3-醇、麦芽酚和 4-乙基愈创木酚均在 15 min 后趋于平衡。故综合考虑，选择检出物质总数最多的 15 min 为最佳的平衡时间。

2.1.3 萃取时间

萃取时间是指 SPME 针的纤维头在顶空气相中吸附化合物的时间，是 HS-SPME 方法优化的关键参数。不同萃取时间对酱油挥发性化合物的影响如图 3。从图 3(a)中可以看出，挥发性化合物的总峰面积随着萃取时间的增加而增大，而化合物总数在萃取 30 min 时达到最大，可见过长时间的萃取并不会再增加萃取的挥发性化合物数量。

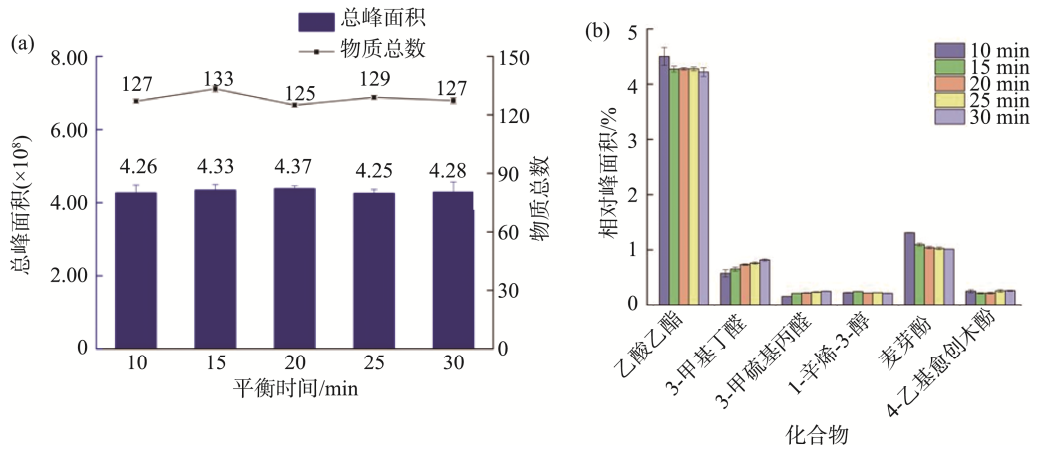
从图 3(b)中可以看出，萃取时间的增加会一定程度上改变萃取物的组成，其中，高沸点化合物(如麦芽酚、4-乙基愈创木酚)的峰面积呈增长趋势，而小分子化合物的峰面积却有所下降(如乙酸乙酯)。研究表明，在复杂体系中，影响 SPME 纤维提取分析物的主要因素是竞争吸附过程，而不仅是萃取时间，如果实验灵敏度足够高，也可以选择在平衡时间之前结束萃取过程[24]。综合考虑，选择 30 min 为最佳萃取时间。



注：(a)萃取温度对总峰面积的影响；(b)萃取温度对重要风味活性物质的影响。不同字母表示差异显著(P<0.05)，图 3~4 同。

图 1 不同萃取温度对酱油挥发性化合物的影响

Fig.1 Effects of different extraction temperature on volatile compounds in soy sauce



注：(a)平衡时间对总峰面积的影响；(b)平衡时间对重要风味活性物质的影响。

图 2 不同平衡时间对酱油挥发性化合物的影响

Fig.2 Effects of different equilibration time on volatile compounds in soy sauce

2.1.4 盐质量浓度

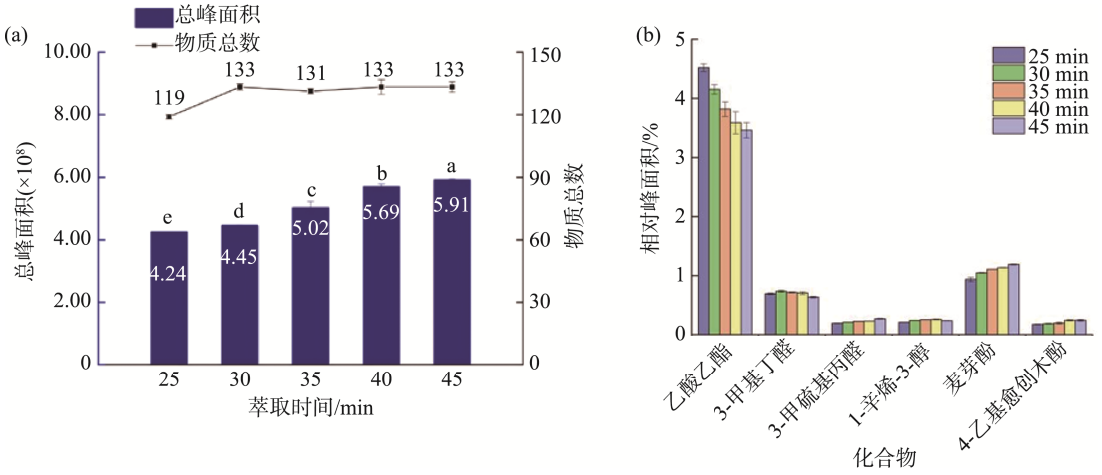
本研究通过对比化合物总峰面积和化合物总数, 研究了不同盐质量浓度(160、210、260、360、460 g/L)对 SPME 萃取酱油中挥发性化合物的影响, 结果见图 4。随着 NaCl 添加量从 160 g/L(酱油中原盐质量浓度)提高到 460 g/L, 总峰面积在盐质量浓度为 460 g/L 时达到最大, 略高于 210 g/L 和 360 g/L。这是由于盐离子的“盐析”作用改变了相界面性质, 提高了萃取效率。通过单因素方差分析, 盐质量浓度为 460 g/L 和 360 g/L 时, 总峰面积没有显著性差异, 而当盐质量浓度为 360 g/L 时, 检出的物质总数最多, 为 138 种, 因此, 选择 360 g/L 为最佳盐质量浓度。

2.1.5 样品量

现有研究中, 大多采用 5 mL 及以上的样品量进行 SPME 萃取, 但采用全自动进样器振荡萃取时, 样品液面过高会导致液滴污染 SPME 纤维头。实验发现, 当样品量为 2 mL 时, 液面高度刚好不会在振荡萃取时污染纤维头。故考查了 2 mL 和 5 mL 样品量对酱油中挥发性化合物萃取效果的影响。从图 5 可以看出, 与样品量 5 mL 相比, 2 mL 的酱油样品中挥发性化合物总峰面积有所降低, 通过独立样本 t 检验, 两者的总峰面积存在显著性差异(P<0.05), 这是样品量减少造成化合物峰面积降低, 但化合物总数差异不显著(P>0.05), 说明 GC-Orbitrap-MS 的高灵敏度和高分辨率并没有因为样品量的减少, 而导致化合物数量显著降低。而化合物的数量越多越有利于后续酱油样品中挥发性物质的分析, 故 2 mL 的样品量既能满足全自动萃取的要求, 也并未显著减少检出的化合物数量, 是本方法样品量的最佳选择。

2.1.6 方法的精密度

在优化好的实验条件下, 将同一酱油样品称取 6 份, 进行 6 次平行测定, 选取共有物质(52 种)进行精密度计算, 物质相对含量的精密度分布在 1.70%~14.51%, 均小于 15%。参考 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中的要求, 本方法精密度符合要求。各化合物精密度详见表 1。



注: (a)萃取时间对总峰面积的影响; (b)萃取时间对重要风味活性物质的影响。

图 3 不同萃取时间对酱油挥发性化合物的影响

Fig.3 Effects of different extraction time on volatile compounds in soy sauce

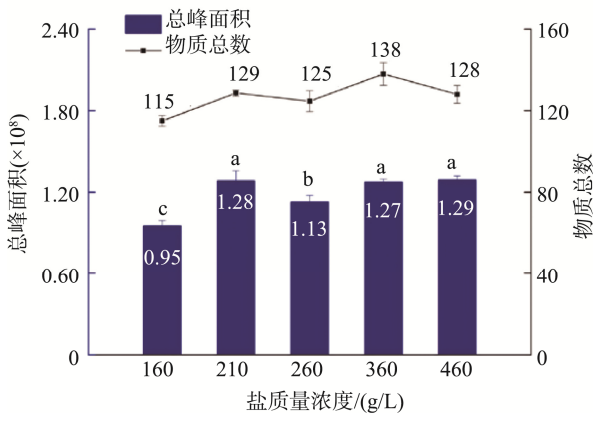


图 4 不同盐质量浓度对酱油挥发性化合物的影响

Fig.4 Effects of different salt mass concentration on volatile compounds in soy sauce

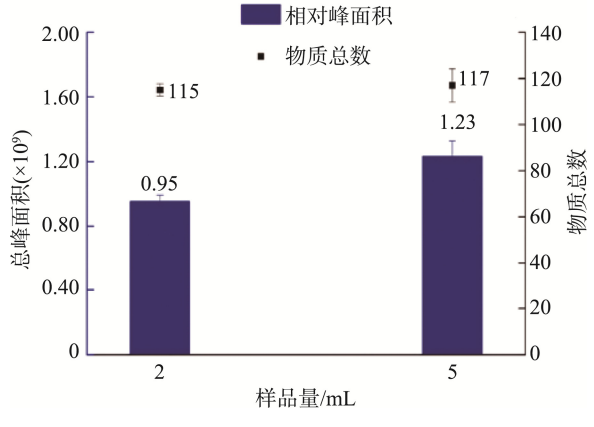


图 5 不同样品量对酱油挥发性化合物的影响

Fig.5 Effects of different sample volume on volatile compounds in soy sauce

表 1 酱油样品中共有挥发性化合物精密度

Table 1 Precision of common volatile compounds in soy sauce samples

序号	化合物名称	CAS 号	平均保留时间/min	保留时间 RSDs/%	平均相对含量/(μg/L)	相对含量 RSDs/%
1	2-丁酮	78-93-3	2.099	0.11	4.870	6.77
2	2-甲基呋喃	534-22-5	2.137	0.11	1.665	10.04
3	乙酸乙酯	141-78-6	2.210	0.07	259.203	3.42
4	异戊醛	590-86-3	2.609	0.09	27.163	10.10
5	丙醛	123-38-6	2.712	0.10	49.855	4.31
6	丙酸乙酯	105-37-3	3.375	0.12	3.877	9.53
7	二甲基二硫醚	624-92-0	4.006	0.09	6.068	5.67
8	2-甲基吡嗪	109-08-0	6.223	0.12	4.801	5.21
9	异戊酸乙酯	108-64-5	7.134	0.08	2.602	1.70
10	5-甲基-2-己酮	110-12-3	7.210	0.08	2.318	2.79
11	间二甲苯	108-38-3	7.654	0.08	3.865	2.04
12	2,2-二甲基-丙酸酐	1538-75-6	8.959	0.05	4.334	4.46
13	2,6-二甲基吡嗪	108-50-9	9.190	0.06	33.992	3.51
14	苯甲醛	100-52-7	10.969	0.05	46.812	10.91
15	二甲基三硫	3658-80-8	11.194	0.05	7.308	6.41
16	3-甲硫基丙醇	505-10-2	11.649	0.04	22.438	7.07
17	1-辛烯-3-醇	3391-86-4	11.777	0.05	12.558	2.49
18	3-辛酮	106-68-3	11.965	0.04	9.306	1.82
19	苯并呋喃	271-89-6	12.252	0.05	4.791	3.18
20	2-乙基-6-甲基吡嗪	13925-03-6	12.402	0.04	47.198	3.51
21	3-辛醇	589-98-0	12.433	0.04	10.696	2.68
22	2-丙酰呋喃	3194-15-8	12.724	0.04	9.100	2.39
23	2-乙烯基-6-甲基吡嗪	13925-09-2	13.115	0.04	2.752	3.35
24	苯甲醇	100-51-6	13.777	0.03	3.920	13.09
26	4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮	3658-77-3	14.494	0.04	5.228	14.51
27	2-乙酰基吡咯	1072-83-9	14.786	0.04	297.376	8.82
28	2,6-二乙基吡嗪	13067-27-1	15.437	0.03	17.592	5.13
29	愈创木酚	90-05-1	15.703	0.04	43.006	3.75
30	2-[(乙硫基)甲基]呋喃	13679-60-2	16.072	0.04	6.812	2.41
31	麦芽酚	118-71-8	16.532	0.03	63.140	12.31
32	苯乙醇	60-12-8	16.694	0.03	2066.175	7.26
33	2-异丁基-3-甲基吡嗪	13925-06-9	17.594	0.03	11.628	3.93
34	3,5-二乙基-2-甲基吡嗪	18138-05-1	18.390	0.03	15.729	4.72
35	苯甲酸	65-85-0	18.411	0.02	11.457	11.24
36	苯甲酸乙酯	93-89-0	18.871	0.03	69.570	4.25
37	异戊基吡嗪	40790-22-5	19.133	0.04	1.870	6.38
38	丁二酸二乙酯	123-25-1	19.226	0.03	32.363	4.97
39	3-苯基呋喃	13679-41-9	20.725	0.03	177.954	5.03
40	2-甲基-6-(3-甲基丁基)吡嗪	91010-41-2	21.387	0.02	22.297	4.89
41	苯乙酸乙酯	101-97-3	21.429	0.03	133.332	5.38
42	乙酸苯乙酯	103-45-7	21.842	0.03	75.870	5.63
44	5,5'-二甲基二-a-呋喃基甲烷	13679-43-1	22.479	0.02	2.506	8.05

表 1(续)

序号	化合物名称	CAS 号	平均保留时间/min	保留时间 RSDs/%	平均相对含量/(μg/L)	相对含量 RSDs/%
45	4-乙基-2-甲氧基苯酚	2785-89-9	22.519	0.02	27.286	7.68
46	紫罗烯(1,2,3,4-四氢-1,1,6-三甲基萘)	475-03-6	23.610	0.03	4.537	7.33
47	3,5-二甲基-2-(3-甲基丁基)吡嗪	111150-30-2	23.861	0.02	9.181	6.44
48	癸酸乙酯	110-38-3	26.598	0.02	11.955	3.99
49	3-苯基噻吩	2404-87-7	27.100	0.02	38.470	7.52
50	肉桂酸乙酯	103-36-6	28.792	0.02	3.372	7.16
51	香草酸乙酯	617-05-0	32.450	0.02	4.914	11.59
52	八硫杂环辛烷	10544-50-0	43.313	0.01	3.777	5.43

注: 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

通过优化酱油中挥发性物质的萃取条件, 建立了 HS-SPME-GC-Orbitrap-MS 测定酱油中挥发性化合物的方法, 最终确定最佳萃取条件为萃取温度 45 ℃, 平衡时间 15 min, 萃取时间 30 min, 盐质量浓度 360 g/L, 样品量 2 mL。

2.2 生抽酱油和老抽酱油挥发性风味化合物组成分析

挥发性化合物的种类和含量可作为评价酱油香气品质的特征指标[25]。在最佳固相微萃取条件下, 采用 HS-SPEM-GC-Orbitrap-MS 对生抽酱油和老抽酱油的挥发性香气成分进行分析。生抽酱油共鉴定出 193 种挥发性化合物, 其中 124 种化合物具有风味特征, 老抽酱油共鉴定出 150 种挥发性化合物, 其中 88 种化合物具有风味特征, 生抽酱油与老抽酱油中挥发性风味化合物种类如图 6 所示。生抽酱油具有果香、醇香的特征, 主要的香气物质为酯类 21 种(数量占比 16.9%)、吡嗪类 17 种(数量占比 13.7%)、醛类 16 种(数量占比 12.9%)。酯类化合物在发酵中通过酯化反应生成, 具有果香、脂香、花香味, 主要代表物质为乙酸乙酯等[26], 吡嗪类化合物由美拉德反应生成, 主要为酱油提供了坚果香、焙烤香, 主要代表物质为 2,6-二甲基吡嗪等[27]。醛类化合物主要由 Strecker 降解途径产生, 呈现清香、果香[28], 主要代表物质为 3-甲基丁醛等[29]。

老抽酱油具有焦糖香、麦芽香的特征[30]。老抽酱油中主要的香气物质为醛类 13 种(数量占比 14.8%)、酮类 12 种(数量占比 13.6%)和呋喃类 10 种(数量占比 11.4%)。酮类化合物主要由微生物合成、美拉德反应等途径产生, 呈现麦芽香、甜香气[31], 如 3-羟基-2-丁酮等。呋喃类化合物主要赋予酱油类似焦糖的香气[32], 如 4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮等。生抽酱油的酯类化合物数量占比明显高于老抽酱油, 这可能是由于老抽酱油比生抽酱油经历更长的日晒或加热熬制过程[33], 酯类物质发生水解反应生成了醇类和酸类[34]。老抽酱油的呋喃类化合物数量占比明显高于生抽酱油, 可归因于老抽酱油加热过程中美拉德反应引发的糖分脱水或裂解[35]。

2.3 生抽酱油与老抽酱油的挥发性成分差异性分析

2.3.1 主成分分析

PCA 是一种广泛应用于降维和数据可视化的统计技术。利用两种酱油挥发性化合物的相对含量进行 PCA, 提取得到 2 个主成分, 累计贡献率为 61.7%。PCA 图的每个点代表一个独立的样品, 从图 7 可以看出, 在 95%置信区间内, 生抽酱油与老抽酱油样本具有明显的区域分布特征且表现出聚类趋势。

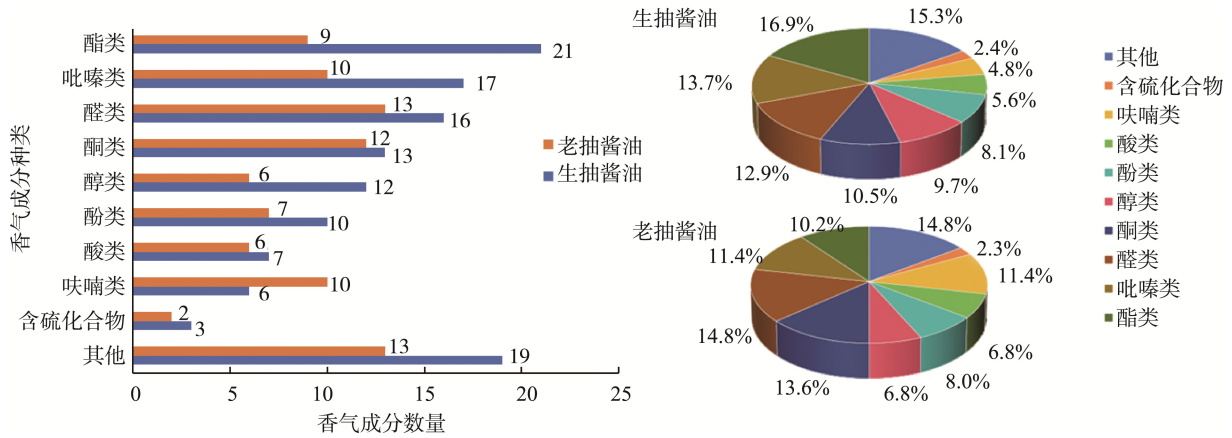


图 6 生抽酱油与老抽酱油中挥发性风味成分分布

Fig.6 Distribution of volatile flavor compounds in of light and dark soy sauce

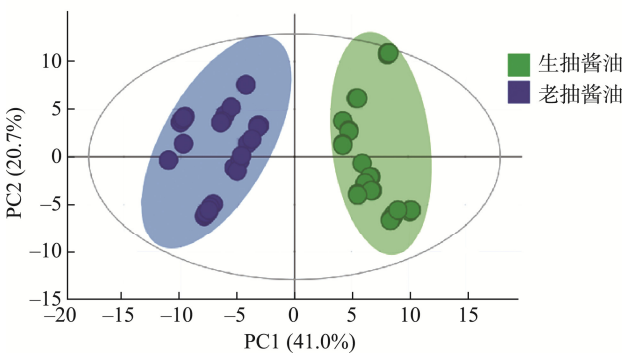


图 7 生抽酱油与老抽酱油的挥发性成分 PCA 图

Fig.7 PCA plot of volatile compounds in light and dark soy sauce

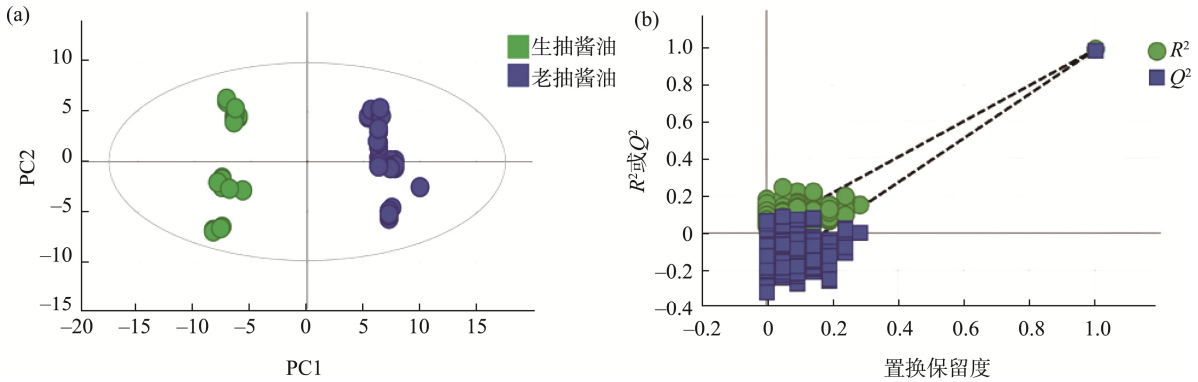
2.3.2 正交偏最小二乘判别分析

为了剖析两种酱油挥发性成分的差异特征，建立有监督的 OPLS-DA 模型。各样本组间的总体化合物差异和组内重复样本间的变异度大小，显示各组之间化合物分离趋势和样品组间化合物是否存在差异。模型(图 8)的拟合参数和预测参数分别为 R^2X=0.514、R^2Y=0.974、Q^2=0.971，表明模型稳定性和预测能力强；200 次置换检验结果显示 R^2 的截距小于 0.5、Q^2 的截距小于 0，表明模型未过拟合、可靠。

2.3.3 潜在差异物及相对含量分析

为进一步筛查出差异化合物，进行 OPLS-DA 模型的变量投影重要性(variable importance for the projection, VIP)分析、单变量方差分析和倍数变化(fold change, FC)分析。VIP>1 的化合物是导致两组产生差异的重要贡献化合物，对这些化合物进一步执行统计分析，筛选含量显著变化的差异化合物(标准: P<0.05, FC>1)，共筛选出 5 个，分别为苯乙醇、戊醛、乙酸乙酯、4-乙基愈创木酚、2-甲基-1-丁醇，见表 2。

对 5 个差异化合物进行相对含量分析，如图 9 所示，苯乙醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丁醇在生抽酱油中含量明显高于老抽酱油，其中苯乙醇的含量差异最大，其在生抽酱油、老抽酱油中的平均相对含量分别为 1327.49 μg/L、150.06 μg/L。生抽酱油中醇类和酯类物质的含量明显高于老抽酱油。在发酵初期，碳水化合物通过糖酵解(embden-meyerhof-parnas, EMP)途径、氨基酸通过埃希利希(Ehrlich)途径产生醇类物质[36]，醇类物质和酸类物质通过酯化反应生成酯类物质。醇类和酯类物质会分别随着温度升高而挥发或水解，导致多出复晒工序的老抽酱油中这两类物质含量较低。戊醛和 4-乙基愈创木酚在老抽酱油中的含量明显高于生抽酱油，尤其是 4-乙基愈创木酚在生抽酱油中含量极低，其在生抽酱油和老抽酱油中的平均相对含量分别为 1.90 μg/L、361.99 μg/L，这可能与老抽酱油的复晒工艺有关。如表 3 所示，4-乙基愈创木酚赋予酱油浓郁的酱香香气，具有烟熏、辛香等香气特征，有研究表明[42]，4-乙基愈创木酚等 3 种酚类化合物可能是构成中国传统晒露酱油中“烟熏”风味特征的重要香气化合物。



注: (a) OPLS-DA 图; (b)置换检验图。

图 8 生抽酱油与老抽酱油的挥发性成分 OPLS-DA 和置换检验图

Fig.8 OPLS-DA and permutation test plots of volatile compounds in light and dark soy sauce

表 2 生抽酱油与老抽酱油的差异化合物

Table 2 Differential compounds between light and dark soy sauce

化合物名称	CAS 号	VIP	P	匹配度 SI
苯乙醇	60-12-8	7.39167	0.0035	910
戊醛	110-62-3	2.52385	0.0001	899
乙酸乙酯	141-78-6	1.57278	0.0028	825
4-乙基愈创木酚	2785-89-9	1.37580	0.0156	880
2-甲基-1-丁醇	137-32-6	1.31209	0.0002	895

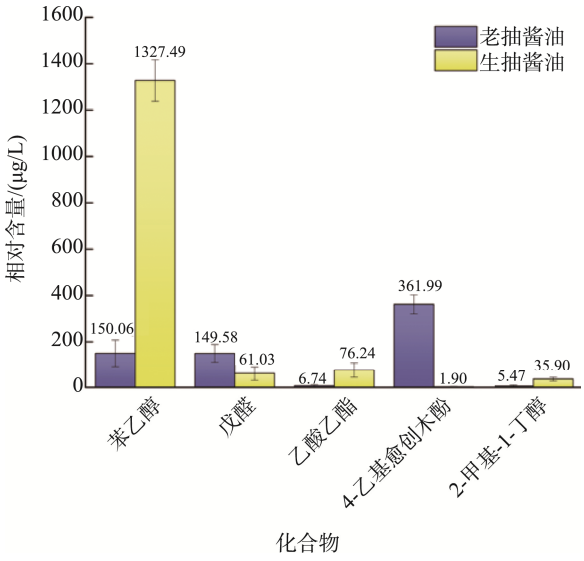


图 9 生抽酱油与老抽酱油的差异化合物含量分布情况
Fig.9 Distribution of differential compounds content between light and dark soy sauce

表 3 差异化合物的香气特征及对酱油整体风味的贡献
Table 3 Aroma characteristics of differentiated compounds and their contribution to the overall flavor of soy sauce

化合物名称	香气特征	对酱油风味贡献
苯乙醇	玫瑰花香[37]	清爽香气
戊醛	花果香、青草味, 脂香[38]	清香、果香、坚果香
乙酸乙酯	花香、果香[39]	花果香, 抑制其他不愉悦的气味
4-乙基愈创木酚	烟熏香[40]	酱香香气
2-甲基-1-丁醇	麦芽香[41]	醇香风味

3 结 论

本研究通过优化 HS-SPME 的前处理条件, 建立了 GC-Orbitrap-MS 测定酱油中挥发性成分的方法, 其在检出痕量物质和挖掘未知化合物上的优势, 为分析生抽酱油与老抽酱油中差异化合物提供了更为准确的定性定量结果。基于优化方法共鉴定生抽酱油中 124 种, 老抽酱油中 88 种特征挥发性风味化合物, 并利用化学计量学对酱油样品中化合物进行多元统计分析, 依据 OPLS-DA 模型筛选出了 5 个差异化合物, 分别为苯乙醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丁醇、戊醛和 4-乙基愈创木酚。通过含量分析发现, 苯乙醇、乙酸乙酯和 2-甲基-1-丁醇在生抽酱油中相对含量远高于老抽酱油, 形成了生抽酱油果香、醇香的特征。而戊醛和 4-乙基愈创木酚在老抽酱油中的含量明显高于生抽, 赋予了老抽酱油浓郁的脂香和酱香。本研究基于 GC-Orbitrap-MS 这一新型高分辨率、高灵敏度的仪器, 建立并优化了检测方法, 为酱油中超痕量未知化合物的高通量检测提供了可能, 也为丰富酱油中的香气化合物提供了新手段。通过明确生抽酱油与老抽酱油中差异香气成分, 为酱油品质标准化、风味定向调控及产品创新提供了科学依据, 为酱油行业质量评价提供参考数据, 也为进一步研究和分析不同发酵工艺、用途的酱油质量和风味特色形成提供了新理论依据。

参考文献

[1] 黄冰羽, 王淋, 刘源, 等. 电子鼻结合顶空固相微萃取-气相色谱-质谱技术分析陈酿时间对酱油挥发性风味成分的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(3): 283–292.
HUANG BY, WANG L, LIU Y, *et al*. Effects of aging time on the volatile flavor components of soy sauce using electronic nose combined with headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(3): 283–292.

[2] 郭壮, 凌霞, 王念, 等. 市售生抽酱油品质评价[J]. 中国调味品, 2017, 42(8): 90–94.
GUO Z, LING X, WANG N, *et al*. Quality evaluation of commercial light soy sauce samples [J]. China Condiment, 2017, 42(8): 90–94.

[3] 郭梦瑶, 王道君, 孟琦, 等. 老抽酱油储存期间关键气味物质分析及其风味特征的变化[J]. 食品科技, 2021, 46(3): 259–266.
GUO MY, WANG XJ, MENG Q, *et al*. Analysis of key odor compounds and changes in flavor characteristics of dark soy sauce during storage [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(3): 259–266.

[4] 梁瑞池. 广东生抽、老抽酱油的传统由来、演变用法和市场生命力[J]. 中国调味品, 2010, 35(2): 27–30.
LIANG RC. The source development,usage and makert force of guangdong light soy sauce and dark soy sauce [J]. China Condiment, 2010, 35(2): 27–30.

[5] LI JY, ZHANG ML, FENG XJ, *et al*. Characterization of fragrant compounds in different types of high-salt liquid-state fermentation soy sauce from China [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 169: 113993.

[6] 刘妙. 四季酱油滋味感官品质的季节差异及其物质基础研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2023.
LIU M. Study on the seasonal differences in the sensory quality of soy sauce and its material [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2023.

[7] 张梦丽, 廉瑞, 丁婷婷, 等. 酱油球拟酵母的安全性研究[J]. 中国调味品, 2023, 48(4): 50–54.
ZHANG ML, LIAN R, DING TT, *et al*. Safety study on torulopsis globosa in soy sauce [J]. China Condiment, 2023, 48(4): 50–54.

[8] 童星, 彭勃. 酱油的风味物质及其研究进展[J]. 中国调味品, 2018, 43(10): 195–200.
TONG X, PENG B. Flavor substances of soy sauce and its research progress [J]. China Condiment, 2018, 43(10): 195–200.

[9] XIE ZM, ZENG DQ, WANG JW, *et al*. Dispersive liquid-liquid

microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the determination of soy sauce aroma compounds [J]. Food Control, 2023, 152: 109838.

[10] 杨晓璇. 基于 GC-IMS 和 UPLC-MS/MS 代谢组学技术分析不同酱油和食醋中的差异[D]. 济南: 山东师范大学, 2020.
YANG XX. Metabonomics analysis of different soy sauce and vinegar basedon GC-IMS and UPLC-MS/MS [D]. Ji'nan: Shandong Normal University, 2020.

[11] ZOU MY, TANG HB, CHEN X, *et al*. Insights into volatile flavor compound variations and characteristic fingerprints in Longpai soy sauce moromi fermentation via HS-GC-IMS and HS-SPME-GC×GC-ToF-MS [J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 176: 114490.

[12] GAO XL, FENG T, SHENG MJ, *et al*. Characterization of the aroma-active compounds in black soybean sauce, a distinctive soy sauce [J]. Food Chemistry, 2021, 364: 130334.

[13] 王泽亮, 符怡, 李恒, 等. 四川传统酿造酱油风味品质特点解析[J]. 中国调味品, 2024, 49(3): 169–174, 192.
WANG ZL, FU Y, LI H, *et al*. Analysis of favor and quality characteristics of Sichuan traditionally brewed soy sauce [J]. China Condiment, 2024, 49(3): 169–174, 192.

[14] 冯云子, 周婷, 蔡宇, 等. 气相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法辅助鉴定酱油未知的气味活性化合物[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 218–225.
FENG YZ, ZHOU T, CAI Y, *et al*. Identification of unknown aroma-active compounds of soy sauce by gas chromatography-orbitrap-mass spectrometry [J]. Food Science, 2020, 41(18): 218–225.

[15] 李阳. 基于代谢组学技术探究酿造酱油、食醋的标志性代谢物[D]. 济南: 山东师范大学, 2020.
LI Y. Study on the marker metabolites of brewing soy sauce and vinegar basedon metabonomics [D]. Ji'nan: Shandong Normal University, 2020.

[16] 吴炎培, 原文鹏, 胡新华, 等. 气相色谱-静电场轨道阱质谱在食品和药品分析中的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2024, 44(1): 1–10.
WU YP, YUAN WP, HU XH, *et al*. Recent advances of gas chromatography-Orbitrap mass spectrometry in food and pharmaceutical analysis [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2024, 44(1): 1–10.

[17] 何润茗, 方珂, 刘娟, 等. 气相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法测定人血浆中 7 种甲基硅氧烷[J]. 环境卫生学杂志, 2025, 15(5): 434–440, 458.
HE RM, FANG K, LIU J, *et al*. Determination of seven methylsiloxanes in human plasma by gas chromatography-Orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. Journal of Environmental Hygiene, 2025, 15(5): 434–440, 458.

[18] 刘奇付, 赵俊芳, 吴晓宗, 等. 不同产地和发酵方式的酱油中挥发性成分差异研究[J]. 中国调味品, 2023, 48(5): 179–182, 188.
LIU QF, ZHAO JF, WU XZ, *et al*. Study on the difference of volatile components in soy sauce from different places of origin and fermentation methods [J]. China Condiment, 2023, 48(5): 179–182, 188.

[19] GAO X, HAN XM, TANG Y, *et al*. Exploring changes in key aroma-active compounds of soy sauce due to different fermentation processes [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2024, 133: 106393.

[20] 毛红艳, 祖力皮牙·买买提, 王佳敏, 等. 电子感官技术结合 HS-SPME-GC-MS 分析芝麻馕关键挥发性物质[J]. 新疆农业科学, 2025, 62(7): 1803–1811.
MAO HY, ZULIPIYA MMT, WANG JM, *et al*. Analysis of key volatile flavor compounds of sesame nann by HS-SPME-GC-MS coupled with electric-sense technology [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2025, 62(7): 1803–1811.

[21] 冯云子. 高盐稀态酱油关键香气物质的变化规律及形成机理的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
FENG YZ. The evolution and formation mechanism of key aroma compounds during the process of high-salt liquid fermentation soy sauce [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015.

[22] FENG YZ, SU GW, SUN DX, *et al*. Optimization of headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) for analyzing soy sauce aroma compounds via coupling with direct GC-Olfactometry (D-GC-O) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [J]. Food Analytical Methods, 2017, 10.3: 713–726.

[23] LASHGARI M, YAMINI Y. An overview of the most common lab-made coating materials in solid phase microextraction [J]. Talanta, 2019, 191: 283–306.

[24] 王子宜, 马国秀, 高新月, 等. 基于吸附剂的顶空萃取技术研究进展[J]. 化学试剂, 2024, 46(11): 1–9.
WANG ZY, MA GX, GAO XY, *et al*. Research progress in adsorbent-based headspace extraction [J]. Chemical Reagents, 2024, 46(11): 1–9.

[25] LI PP, GOU R, ZHANG XL, *et al*. Flavoromics of maize from major maize production regions of northern China during storage [J]. Talanta, 2026, 296: 128374.

[26] HUANG J, CHEN HT, ZHANG ZM, *et al*. Investigations on the key odorants contributing to the aroma of children soy sauce by molecular sensory science approaches [J]. Foods: Basel, Switzerland, 2021, 10(7): 1492.

[27] DIEZ-SIMON C, EICHELSHEIM C, JACOBS DM, *et al*. Stir bar sorptive extraction of aroma compounds in soy sauce: Revealing the chemical diversity [J]. Food Research International, 2021, 144: 110348.

[28] LEE SM, KIM SB, KIM YS. Determination of key volatile compounds related to long-term fermentation of soy sauce [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(10): 2758–2776.

[29] 陈臣, 周文雅, 袁佳杰, 等. 3-甲基丁醛对奶酪坚果风味的贡献及其生物合成的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 228–233.
CHEN C, ZHOU WY, YUAN JJ, *et al*. Recent progress in biosynthesis of 3-methylbutanal and its contribution to nutty flavor in cheese [J]. Food Science, 2020, 41(7): 228–233.

[30] DIEZ-SIMON C, MUMM R, HALL RD. Mass spectrometry-based metabolomics of volatiles as a new tool for understanding aroma and flavour chemistry in processed food products [J]. Metabolomics, 2019, 15.3: 41.

[31] BOLKVADZE N, GVIDANI S, URIDIA R, *et al*. Formation of taste and aroma compounds by Maillard reaction during processing of food products [J]. Georgian Scientists, 2024, 6(1): 112–119.

[32] 王培培, 曹庸, 符姜燕, 等. 美拉德反应对传统发酵酱油香气影响的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(6): 337–345.
WANG PP, CAO Y, FU JY, *et al*. Progress of research on the effect of Millard reaction on the aroma of traditional fermented soy sauce [J]. China Food Additives, 2023, 34(6): 337–345.

[33] DIEZ-SIMON C, EICHELSHEIM C, MUMM R, *et al*. Chemical and sensory characteristics of soy sauce: A review [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68 (42): 11612–11630.

[34] ZHU L, HE SY, LU Y, *et al*. Metabolomics mechanism of traditional soy sauce associated with fermentation time [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11.2: 297–304.

[35] HUANG XS, BARRINGER SA. Kinetics of furan formation during pasteurization of soy sauce [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 67: 200–205.

[36] GIRI A, OSAKO K, OKAMOTO A, *et al*. Olfactometric characterization of aroma active compounds in fermented fish paste in comparison with fish sauce, fermented soy paste and sauce products [J]. Food Research International, 2010, 43.4: 1027–1040.

[37] 庄海宁, 许滢, 李明明, 等. 高盐稀态酱油酱渣的挥发性风味成分分析[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(12): 225–232.
ZHUANG HN, XU Y, LI MM, *et al*. Analysis of volatile flavor compounds of sauce residue of high-salt liquid-state soy sauce [J]. China Food Additives, 2022, 33(12): 225–232.

[38] 兰明路, 张浩, 胡金祥, 等. 年份醋对鱼香调味汁挥发性物质的影响[J/OL]. 食品工业科技, 1–19. [2025-09-15]. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050077
LAN ML, ZHANG H, HU JX, *et al*. Impact of vintage vinegar on volatile substances in fish-flavor seasoning sauce [J/OL]. Science and Technology of Food Industry, 1–19. [2025-09-15]. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306. 2025050077

[39] 卢钰琳. 酵母抽提物对高盐稀态酱油发酵特性的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2022.
LU YL. Effect of yeast extract on fermentation characteristics of high-saltliquid-state soy sauce [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.

[40] 张颖超, 于鑫, 赵祥颖, 等. 产愈创木酚菌株筛选及其在酱油酿造中的应用[J]. 中国调味品, 2024, 49(2): 42–48, 61.
ZHANG YC, YU X, ZHAO XY, *et al*. Screening of guaiacol-producing strains and their application in soy sauce brewing [J]. China Condiment, 2024, 49(2): 42–48, 61.

[41] 高苏娟, 涂世伟, 赵文红, 等. 酱油风味影响因素的研究进展[J]. 中国调味品, 2025, 50(7): 235–240.
GAO SJ, TU SW, ZHAO WH, *et al*. Research progress on influencing factors of soy sauce flavor [J]. China Condiment, 2025, 50(7): 235–240.

[42] 周莉, 陈双, 王栋, 等. 正相色谱技术结合气相色谱-闻香技术解析中国传统晒露酱油香气活性成分[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(16): 237–244.
ZHOU L, CHEN S, WANG D, *et al*. Identification of aroma compounds in traditional Chinese soy sauce by normal phase chromatography fractionation combined with gas chromatography-olfactometry [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(16): 237–244.

(责任编辑: 安香玉 韩晓红)