香料与香精

云南新鲜松露和干制松露挥发性风味成分的对比分析

冯 涛[1]，水梦竹[1]，宋诗清[1]，余跃先[2]，孙 敏[1]，徐志民[3]

（1. 上海应用技术大学 香料香精技术与工程学院，上海 201418；2. 云南南华县咪依噜天然食品开发有限责任公司，云南 南华 675200；3. 美国路易斯安那州立大学 食品科学系，路易斯安那 巴吞鲁日 70802，美国）

摘要：采用顶空固相微萃取（HS-SPME）法萃取云南新鲜采摘黑松露和真空冷冻干燥黑松露中的挥发性成分，利用气相色谱-质谱联用仪（GC-MS）和气相色谱-火焰光度检测器（GC-FPD）对挥发性成分和含硫物质进行鉴定。结果表明，新鲜黑松露和干制松露中分别鉴定出 30 种和 83 种挥发性风味物质，8 种和 19 种含硫化合物。1-辛烯-3-醇、对甲酚甲醚、3-甲基丁醛、二烯丙基二硫醚和二甲基硫醚在新鲜松露中的含量较高；对甲酚甲醚、己酸、右旋柠檬烯、二甲基砜、烯丙基甲基三硫醚在干制松露中含量较高。气相色谱-嗅闻（GC-O）结合香气活力值（OAV）发现，新鲜松露中二烯丙基二硫醚、二甲基硫醚、1-辛烯-3-酮、3-甲基丁醛对香气贡献较大；干制松露中双（2-甲基-3-呋喃基）二硫醚、丙位壬内酯、己酸、1-辛烯-3-酮对伞花烃贡献较大。

关键词：云南松露；风味；顶空固相微萃取（HS-SPME）；气相色谱-质谱联用仪（GC-MS）；气相色谱-火焰光度检测器（GC-FPD）；气相色谱-嗅闻（GC-O）；香料与香精

中图分类号：TS201.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1003-5214 (2019) 02-0262-09

Comparative Analysis of Volatile Flavor Compounds of Fresh Truffles and Dried Truffles in Yunnan

FENG Tao[1], SHUI Meng-zhu[1], SONG Shi-qing[1], YU Yue-xian[2], SUN Min[1], XU Zhi-min[3]

（1. *School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai* 201418, *China*; 2. *Yunnan Nanhua Miyilu Natural Food Development Co., Ltd., Nanhua* 675200, *Yunnan, China*; 3. *Department of Food Science, Louisiana State University, Baton Rouge* 70802, *USA*）

Abstract: Volatile compounds of fresh-picked truffles and vacuum freeze-drying truffles in Yunnan were extracted by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). Volatile components and sulfur aroma compounds were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-flame photometric detector (GC-FPD). The results showed that 30 and 83 volatile flavor compounds, 8 and 19 sulfur aroma compounds were detected in fresh-picked truffles and vacuum freeze-drying truffles, respectively. 1-Octen-3-ol, *p*-cresyl methyl ether, 3-methyl butyraldehyde, diallyl disulfide and dimethyl sulfide were higher in fresh truffles. *p*-Cresyl methyl ether, hexanoic acid, *d*-limonene, dimethyl sulfone, allyl methyl trisulfide were higher in dry truffles. The results of gas chromatography-olfactory (GC-O) combined with aroma activity value (OAV) indicated that diallyl disulfide, dimethyl sulfide, 1-octen-3-one and 3-methyl butyraldehyde had larger contribution to the aroma of fresh truffles. In dried truffles, bis(2-methyl-3-furyl)disulfide, *γ*-nonalactone, hexanoic acid, 1-octen-3-one had greater contribution to the aroma.

Key words: Yunnan truffle; flavor; headspace solid phase microextraction (HS-SPME); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); gas chromatography-flame photometric detector (GC-FPD); gas chromatography-olfactory (GC-O); perfumes and essences

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31771942); Shanghai Municipal Natural

收稿日期：2018-07-10; **定用日期：**2018-11-04; **DOI:** 10.13550/j.jxhg.20180513

基金项目：国家自然科学基金面上项目（31771942）；上海市自然科学基金项目（17ZR142600）；上海市地方能力建设项目（16090503800）

作者简介：冯 涛（1978—），男，教授，博士，E-mail：fengtao@sit.edu.cn。

Science Foundation (17ZR142600); Shanghai Municipal Local Capacity Building Project (16090503800)

松露，又称块菌，是一种严格依靠其他生物来完成自己生命周期的共生真菌，一般着丝生长在植物根部，建立外生菌根，形成子实体[1]。国外许多科研工作者对松露品种有一定的研究，迄今为止，从不同品种的松露中发现超过 200 多种挥发性有机化合物[2-4]。食品风味科研工作者对松露的香气描述为性感、有诱惑力、泥土香气、麝香味、辛辣味和独特的蒜香[5-7]。虽然不同的松露品种具有不同的气味，但是在挥发性风味中含量占据比重较大的是八碳化合物，主要包括 1-辛烯-3-醇、3-辛醇、2-辛烯-1-醇、1-辛烯-3-酮、3-辛酮等[8-9]。一些含硫化合物，虽然含量较小，但对松露的风味贡献起到很大的作用，如二甲基二硫醚、二甲基三硫醚、1,2,4-三硫杂环戊烷、噻吩衍生物等，被认为是松露的特征风味物质[10-11]。新鲜采摘的松露带有泥土的清香，气味清淡宜人，干制的松露粉末则香气浓厚，馥郁绵长。新鲜松露易腐烂，不易长期储存和运输，一般经真空冷冻干燥制成干品，在加工过程中松露的风味成分发生变化，使得新鲜和干制松露的风味差异较大。

近年来，国内对于国产松露风味的研究逐渐增多。Liu[12]等用 SDE-GC-MS 法鉴定云南黑松露中的挥发性风味物质；Ning[13]等利用二维气相色谱和电子鼻比较分析了中国松露的挥发性成分；张玥琪[14]等用 SPME 法和 SDE 法结合 GC-MS 对鲜云南松露的挥发性香气成分进行了分析；方三平[15]等用 SPME 法结合 GC-MS 对 3 种不同成熟度的印度块菌进行了风味分析。SDE 法经过长时间的蒸煮，部分热敏性物质丢失，形成许多高沸点、相对分子质量较大的风味物质，不能很好地还原新鲜松露中的香气成分。目前，常用的 SPME 结合 GC-MS 能简单高效地萃取分析松露中的挥发性风味成分，但是对于松露中一些浓度较低，阈值也极低的关键含硫化合物，不能很好地对其进行定性、定量检测,从而难以筛选出国产松露中的主要呈香物质。

火焰光度检测器（FPD）是一种对含磷、含硫化合物有高选择性、高灵敏度的检测器[16]。目前，国内外科研工作者主要利用 FPD 检测器来分析大气、土壤及食品中痕量硫、磷的含量[17-18]。此外，有报道证明，FPD 能高效检测出水果中的风味硫化物[19-20]，表明 FPD 适用于分离鉴定食品中含硫含磷的关键挥发性风味物质。

本文在前人对国产松露风味研究的基础上，采用 HS-SPME 法，结合 GC-MS 和 GC-FPD 对新鲜和干制云南产松露的挥发性成分和含硫化合物进行分析比较，利用感官小组进行 GC-O 嗅闻和香气活力值（OAV）的计算，筛选出香气贡献较大的关键物质。旨在了解鲜松露与干松露风味成分的差异，为国产松露的风味研究提供一定参考，也为松露风味相关产品开发提供技术参数和指导。

1　实验部分

1.1　材料、试剂与仪器

云南产新鲜黑松露，采摘于云南省楚雄彝族自治州南华县山区，2017 年 12 月（黑松露成熟期），采集后，立即用锡箔纸包好，用冰袋将松露 24 h 内运回实验室；云南产干制黑松露，将采摘后的黑松露经过真空冷冻干燥制成干品粉末（云南南华县咪依噜天然食品开发有限责任公司提供）；邻二氯苯、2-甲基-3-四氢呋喃硫醇、C_4~C_{30} 正构烷烃（均为色谱纯），德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。

7890B-5977B 型 GC-MS 联用仪、7890B 型 GC 气相色谱仪安装 FPD 火焰光度检测器，安捷伦科技（中国）有限公司；嗅闻仪（ODP 2），德国 Gerstel 公司。

1.2　方法

1.2.1　样品预处理

将新鲜的黑松露洗净后，挑选个头大小均匀，颜色相近的松露，放入 JYL-C051 型搅拌机中，粉碎至 60 目的细小颗粒，放入–8 ℃冰箱密封保存，待用。

1.2.2　HS-SPME 法提取挥发性成分

分别准确称取 2.0 g 新鲜黑松露和 60 目干制黑松露样品,放入 20 mL 顶空固相微萃取瓶中,加 5 μL 内标物（100 mg/L 邻二氯苯），在（45±1）℃下平衡 30 min，用老化好的固相微萃取装置 75 μm DVB/CAR/PDMS(二乙烯苯/碳分子筛/聚二甲基硅烷)纤维头,顶空萃取 30 min，再将萃取装置插入 GC-MS 进样器，在 250 ℃不分流模式下解吸 5 min。

分别准确称取 2.0 g 新鲜黑松露和 60 目干制黑松露样品,放入 20 mL 顶空固相微萃取瓶中,加 5 μL 内标物（100 mg/L 2-甲基-3-四氢呋喃硫醇），在（45±1）℃下平衡 30 min，用老化好的固相微萃取装置（50/30 μm DVB/CAR/PDMS 纤维头）顶空萃取 30 min，再将萃取装置插入 GC-FPD 进样器，在 250 ℃不分流模式下解吸 5 min。

1.2.3　GC-MS 条件

采用 HP-INNOWAX（60 m × 0.25 mm × 0.25 μm）色谱柱，N_2 为载气，流量为 1.8 mL/min，

进样方式为不分流，保持 3 min。进样口温度为 250 ℃，升温程序：50 ℃保留 3 min，以 10 ℃/min 的速率升温至 100 ℃，保留 5 min，以 3 ℃/min 升温至 140 ℃，保留 10 min，以 2 ℃/min 升至 200 ℃，保留 5 min。

质谱采用 EI 离子源，电离电压为 70 eV，离子源温度为 230 ℃，接口温度为 250 ℃，采用全扫描方式（质量扫描范围为：*m/Z*=20~350）。

1.2.4　GC-FPD 条件

采用 HP-INNOWAX（30 m×0.25 mm×0.25 μm）色谱柱，柱温和升温程序与 GC-MS 的设定一致。FPD 温度设定为 250 ℃，PMT 电压设定在 500 V，进样口 250 ℃，解析 5 min，不分流进样模式。

1.2.5　GC-O 条件

GC-O 系统由气相色谱（配有 FID 检测器）及嗅闻装置（ODP2）组成。气相色谱柱末端分流比为 1∶1。嗅觉探测仪条件：空气流速 10 mL/min，加热线 250 ℃。挑选 8 名评价员进行嗅闻分析，每人嗅闻一次，记录香气特征和保留时间。一个色谱峰有 3 次以上记录时，才被用来分析。

1.2.6　OAV

通过测定香气物质的 OAV 评定松露的关键香气成分。OAV 为特定化合物样品气味的重要指标，为化合物的浓度与空气中的嗅觉阈值间的比值[21]。

1.2.7　数据分析

采用NIST08和Wiley谱库对分离出的峰进行检索，通过正构烷烃（C_4~C_{30}）在相同条件下的保留时间，按 KOVATS 保留指数公式计算挥发性物质的保留指数（RI）。将计算得到的保留指数与 Wiley7n.l 数据库进行匹配，定性得到有效挥发性物质，通过内标法进行定量计算。

RI 按公式（1）计算：

$$\mathrm{RI}_x=\left(\frac{\lg(t_x)-\lg(t_z)}{\lg(t_{z+1})-\lg(t_z)}+Z\right)\times 100 \qquad (1)$$

式中：RI_x 为待测物的保留指数；t_x 为挥发性物质的保留时间，min；t_z 为与挥发性物质碳原子数相同的正构烷烃的保留时间，min；Z 为挥发性物质的碳原子数。

挥发性物质含量（C）按公式（2）计算：

$$C=\frac{C_0\times V_0\times A_x}{M\times A_0} \qquad (2)$$

式中：C_0 为内标物的浓度，mol/L;V_0 为内标物的体积，μL；A_x 为挥发性物质的峰面积；M 为样品质量，g；A_0 为内标物的峰面积。进行 3 次重复实验，香气物质含量数据取 3 次实验平均值。

2　结果与讨论

2.1　新鲜松露和干制松露 GC-MS 测定结果比较

采用 HS-SPME 分别萃取新鲜松露和真空冷冻干燥松露粉末的香气物质，经过 GC-MS 检测，结果如表 1 所示。新鲜采摘松露中共检测出 30 种物质，其中 4 种烃类物质，5 种醇酚类物质，14 种醛类物质，3 种酮类物质，1 种酸类物质，2 种含氮含硫物质，1 种醚类物质。干制松露粉末中共检测出 83 种物质，其中 8 种烃类物质，16 种醇酚类物质，12 种醛类物质，15 种酮类物质，9 种酸类物质，10 种酯类物质，12 种含氮含硫物质，1 种醚类物质。其中，新鲜和干制松露中都能检测出的香气物质共有 18 种，包括 3 种烃类物质（甲位蒎烯、右旋柠檬烯、乙烯基苯），4 种醇酚类物质（3-辛醇、1-辛烯-3-醇、1-辛醇、4-甲基苯酚），5 种醛类物质（乙醛、己醛、辛醛、壬醛、苯甲醛），3 种酮类物质（3-辛酮、1-辛烯-3-酮、甲基壬基酮），1 种酸类物质（乙酸），1 种含硫化合物（二甲基砜），1 种醚类物质（对甲酚甲醚）。

图 1 为新鲜松露中检测出的挥发性风味物质含量百分比，图 2 为干制松露中的挥发性风味物质含量百分比。

表 1　云南松露挥发性风味成分的 GC-MS 鉴定结果

Table 1　Analytical results for GC-MS identification of volatile compounds in Yunnan truffle

序号	化合物名称	RI 计算值	RI 文献值	鉴定方法	新鲜松露含量/（μg/g）	干制松露含量/（μg/g）
烃类						
1	甲位蒎烯 *α*-Pinene	1019	1020	MS、RI	0.066±0.004[a]	0.046±0.022[a]
2	乙位蒎烯 *β*-Pinene	1123	1120	MS、RI	—	0.026±0.014
3	右旋柠檬烯 *d*-Limonene	1176	1180	MS、RI	0.120±0.012[b]	2.389±0.202[a]
4	丙位松油烯 *γ*-Terpinene	1264	1254	MS、RI	—	0.036±0.021
5	乙烯基苯 Phenylethene	1287	1267	MS、RI	0.016±0.007[b]	0.058±0.019[a]
6	对伞花烃 *p*-Isopropyltoluene	1295	1298	MS、RI	—	0.550±0.049
7	1,3-二甲苯 1,3-Dimethyl-benzene	1145	1143	MS、RI	—	0.220±0.027
8	1,4-二甲苯　1,4-Dimethyl-benzene	1120	1125	MS、RI	—	0.035±0.021
9	3,4-二甲氧基甲苯 3,4-Dimethoxytoluene	1802	1798	MS、RI	0.111±0.023	—

续表 1

序号	化合物名称	RI 计算值	RI 文献值	鉴定方法	新鲜松露含量/（μg/g）	干制松露含量/（μg/g）
醇酚类						
10	1-丁醇 1-Butanol	1164	1150	MS、RI	—	0.147±0.027
11	2-丁醇 2-Butanol	1031	1030	MS、RI	—	0.252±0.014
12	反式-2-己烯醛 (*E*)-2-Hexenal	1216	1219	MS、RI	—	0.026±0.017
13	1-戊醇 1-Pentanol	1268	1255	MS、RI	—	0.724±0.018
14	3-辛醇 3-Octanol	1411	1400	MS、RI	0.091±0.003[a]	0.131±0.020[a]
15	1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	1453	1451	MS、RI	6.211±0.733[a]	1.274±0.07[b]
16	1-庚醇 1-Heptanol	1450	1461	MS、RI	—	0.239±0.019
17	1-辛醇 1-Octanol	1572	1564	MS、RI	0.075±0.003[a]	0.098±0.022[a]
18	香芹孟烯醇 Carvomenthenol	1153	1152	MS、RI	—	0.013±0.150
19	（反）-2-辛烯-1-醇 (*E*)-2-Octen-1-ol	1620	1621	MS、RI	—	0.088±0.130
20	苯甲醇 Benzyl alcohol	1887	1885	MS、RI	—	0.006±0.280
21	苯乙醇 Phenethyl alcohol	1934	1922	MS、RI	—	0.080±0.031
22	糠醇 Furfurol	1467	1466	MS、RI	—	0.065±0.016
23	4-甲基苯酚 4-Methylphenol	2071	2079	MS、RI	0.070±0.014[a]	0.041±0.025[b]
24	间甲酚 *m*-Cresol	2089	2099	MS、RI	—	0.024±0.021
25	2-甲基-丁醇 2-Methyl-1-butanol	1203	1208	MS、RI	—	2.002±0.843
26	（反）-2-癸烯醇 (*E*)-2-Decen-1-ol	1816	1812	MS、RI	0.839±0.021	—
醛类						
27	乙醛 Acetaldehyde	675	689	MS、RI	0.484±0.017[a]	0.158±0.011[b]
28	戊醛 Pentanal	973	979	MS、RI	—	0.192±0.017
29	异丁烯醛 2-Methylpropenal	890	893	MS、RI	—	0.108±0.022
30	己醛 Hexanal	1084	1080	MS、RI	0.458±0.150[b]	1.501±0.010[a]
31	2-甲基-2-丁醛 2-Methyl-2-butenal	1102	1104	MS、RI	—	0.201±0.021
32	庚醛 Heptanal	1180	1186	MS、RI	0.084±0.004	—
33	辛醛 Octanal	1299	1291	MS、RI	0.103±0.011[b]	0.276±0.022[a]
34	壬醛 Nonanal	1346	1390	MS、RI	0.082±0.004[a]	0.115±0.019[a]
35	（反）-2-辛醛 (*E*)-2-Octenal	1444	1434	MS、RI	—	0.029±0.012
36	顺-2-庚烯醛 (*Z*)-2-Heptenal	1320	1318	MS、RI	0.052±0.008	—
37	（反）-2-辛烯醛 (*E*)-2-Octenal	1432	1434	MS、RI	0.775±0.215	—
38	菠萝醛 （3-甲硫基丙醛）3-(Methylthio)-propionaldehyde	1476	1480	MS、RI	0.018±0.002	—
39	（反）-2-壬醛 (*E*)-2-Nonenal	1439	1437	MS、RI	0.038±0.007	—
40	苯乙醛 Phenylacetaldehyde	1653	1650	MS、RI	0.349±0.019	—
41	（反，反）-2,4-壬二烯醛 (*E,E*)-2,4-Nonadienal	1713	1712	MS、RI	0.026±0.012	—
42	2,4-癸二烯醛 2,4-Decadienal	1790	1797	MS、RI	0.043±0.018	—
43	2-丙基-2-庚烯醛 2-Propyl-2-heptenal	1563	1569	MS、RI	—	0.030±0.024
44	苯甲醛 Benzaldehyde	1643	1646	MS、RI	0.086±0.004[b]	0.355±0.021[a]
45	4-甲基苯甲醛 4-Methyl-benzaldehyde	1637	1638	MS、RI	—	0.016±0.033
46	糠醛 Furfural	1460	1466	MS、RI	—	0.068±0.035
47	3-甲基丁醛 3-Methyl-butanal	922	924	MS、RI	1.650±0.648	—
酮类						
48	2-庚酮 2-Heptanone	1186	1184	MS、RI	—	0.150±0.022
49	3-辛酮 3-Octanone	1243	1240	MS、RI	0.425±0.131[a]	0.164±0.018[b]
50	2-辛酮 2-Octanone	1289	1297	MS、RI	—	0.096±0.024
51	1-辛烯-3-酮 1-Octen-3-one	1302	1305	MS、RI	0.947±0.017[a]	0.128±0.013[b]
52	2-壬酮 2-Nonanone	1389	1398	MS、RI	—	0.036±0.029
53	3-辛烯-2-酮 3-Octen-2-one	1423	1415	MS、RI	—	0.309±0.023

续表 1

序号	化合物名称	RI 计算值	RI 文献值	鉴定方法	新鲜松露含量/（μg/g）	干制松露含量/（μg/g）
酮类						
54	2-癸酮 2-Decanone	1494	1496	MS、RI	—	0.012±0.020
55	3-壬烯-2-酮 3-Nonen-2-one	1508	1510	MS、RI	—	0.038±0.022
56	5-壬酮 5-Nonanone	1331	1334	MS、RI	—	0.014±0.025
57	甲基壬基酮 2-Undecanone	1576	1570	MS、RI	0.045±0.017[a]	0.022±0.018[a]
58	香芹酮 Carvone	1755	1744	MS、RI	—	0.016±0.009
59	甲基苯乙酮 1-(4-Methylphenyl)-ethanone	1760	1763	MS、RI	—	0.006±0.012
60	4-羟基-4-甲基-2-戊酮 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone	1357	1352	MS、RI	—	0.010±0.017
61	2（3*H*)-呋喃酮 2(3*H*) -Furanone	1720	1726	MS、RI	—	0.096±0.024
酸类						
62	乙酸 Acetic acid	1433	1427	MS、RI	0.164±0.013[a]	0.194±0.013[a]
63	2-甲基丙酸 2-Methyl-propanoic acid	1549	1544	MS、RI	—	0.293±0.019
64	丁酸 Butanoic acid	1630	1628	MS、RI	—	0.074±0.023
65	2-甲基丁酸 2-Methyl butyric acid	1650	1655	MS、RI	—	0.391±0.027
66	戊酸 Valeric acid	1730	1734	MS、RI	—	1.009±0.036
67	己酸 Hexanoic acid	2064	2070	MS、RI	—	4.804±0.428
68	庚酸 Hepanoic acid	1843	1849	MS、RI	—	0.267±0.018
69	辛酸 Octanoic acid	2066	2070	MS、RI	—	0.098±0.017
70	壬酸 Nonanoic acid	2160	2169	MS、RI	—	0.023±0.024
酯类						
71	2-甲基丁酸异丁酯 Iso butyl-2-methyl butylate	1177	1179	MS、RI	—	0.039±0.020
72	2-甲基戊酸丙酯 2-Methylpropyl ester pentanoic acid	1250	1253	MS、RI	—	0.034±0.013
73	庚酸乙酯 Heptanoic acid ethyl ester	1349	1341	MS、RI	—	0.071±0.012
74	己酸异丁酯 Isobutyl hexanoate	1344	1347	MS、RI	—	0.360±0.008
75	辛酸乙酯 Ethyl octanoate	1429	1420	MS、RI	—	0.030±0.018
76	己酸戊酯 Amyl hexanoate	1522	1525	MS、RI	—	0.091±0.001
77	正己酸乙烯酯 *n*-Caproic acid vinyl ester	1623	1630	MS、RI	—	0.050±0.012
78	丙位丁内酯 γ-Butyrolactone	1645	1643	MS、RI	—	0.041±0.011
79	丙位己内酯 γ-Hexalactone	1683	1689	MS、RI	—	0.233±0.001
80	丙位壬内酯 γ-Nonalactone	2018	2012	MS、RI	—	0.030±0.003
含硫含氮及其他化合物						
81	二甲基硫醚 Dimethyl sulfide	721	720	MS、RI	0.425±0.131	—
82	二甲基砜 Dimethyl sulfone	1929	1921	MS、RI	0.026±0.009[b]	0.086±0.012[a]
83	二甲基亚砜 Dimethyl sulfoxide	1584	1578	MS、RI	—	0.020±0.015
84	2,3-二甲基噻吩 2,3-Dimethyl-thiophene	1221	1212	MS、RI	—	0.072±0.014
85	2-甲基吡啶 2-Methyl-pyridine	1230	1216	MS、RI	—	0.028±0.007
86	3-甲基吲哚（粪臭素）3-Methyl-indene	2512	2505	MS、RI	—	0.005±0.001
87	4-甲基噻唑 4-Methylthiazole	1280	1278	MS、RI	—	0.015±0.005
88	2-甲基吡嗪 2-Methylpyrazine	1255	1261	MS、RI	—	0.101±0.013
89	2,5-二甲基吡嗪 2,5-Dimethyl-pyrazine	1321	1320	MS、RI	—	0.065±0.015
90	2,6-二甲基吡嗪 2,6-Dimethyl-pyrazine	1326	1327	MS、RI	—	0.064±0.008
91	三甲基吡嗪 Trimethyl pyrazine	1400	1405	MS、RI	—	0.084±0.010
92	四甲基吡嗪 Tetramethyl pyrazine	1465	1466	MS、RI	—	0.031±0.006
93	2-戊基呋喃 2-Pentyl-furan	1239	1235	MS、RI	—	0.722±0.128
94	*N,N*-二甲基甲酰胺 *N,N*-dimethyl-formamide	1320	1326	MS、RI	—	0.030±0.005
醚类						
95	对甲酚甲醚 *p*-cresyl methyl ether	1445	1446	MS、RI	2.733±0.261[b]	4.813±0.054[a]

注：“鉴定方法”MS 为质谱定性，RI 为保留指数定性；“RI 计算值”表示实验计算的 RI 值；“RI 文献值”表示保留指数的文献值，来源于 NIST11 谱库中的参考文献；“—”表示未检测到。根据 Duncan 检验（$P < 0.05$），同一行数值上标为不同字母，说明有显著性差异。下同。

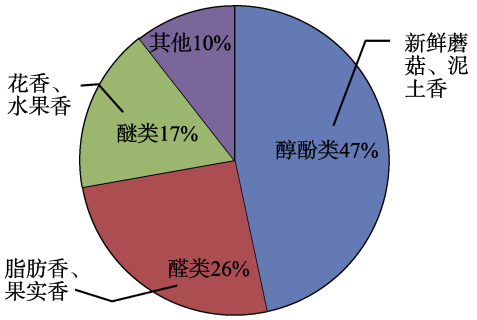


图 1　新鲜松露风味物质含量占比

Fig. 1　Proportion of flavor substances in fresh truffles

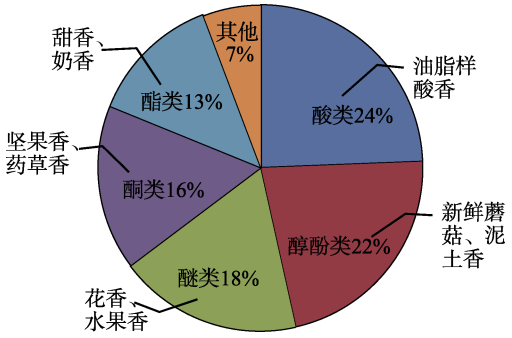


图 2　干制松露风味物质含量占比

Fig. 2　Proportion of flavor substances in dried truffles

从图 1 和图 2 可以看出，新鲜采摘和真空冷冻干燥的松露挥发性成分的含量和种类之间有明显差异。有学者研究[22-23]发现，醇类化合物是新鲜松露中含量最高的香气成分，尤其是 1-辛烯-3-醇对松露的香气有重大贡献，本文新鲜松露的测定结果与其一致。1-辛烯-3-醇在新鲜松露中的含量高达 39.42%，但由于性质不稳定[24]，易挥发，在干燥过程中损失严重，在干制松露中仅占 6.18%。而冷冻干燥松露中酮类物质的增多可能是由于冷冻干燥时间长，使得多不饱和脂肪酸充分降解以及干燥过程 Maillard 反应的中间阶段生成一些还原酮类物质。酯类是由冷冻干燥松露中脂质氧化产生的多种游离脂肪酸与醇之间相互作用产生的[25]。在有关松露的文献中较少检出高含量的酸类化合物[26-27]，但本次实验干制松露相较于新鲜松露，酸类物质比重大幅增加。值得注意和探讨的是，在新鲜和干制松露中都存在且含量分别占 17%和 18%的对甲酚甲醚，这在其他文献中并未报道过。对甲酚甲醚有依兰和紫罗兰的香气，天然存在于依兰油、干酪、芥麦和西红柿中[28]，分析可能是松露着丝生长的植物根部环境和周围土壤造成的，这也是云南产松露风味独特的原因之一。

2.2　新鲜松露和干制松露含硫化合物测定结果比较

含硫化合物在松露中的含量虽然很少，但是其阈值也极低，对松露的特征风味贡献非常大，GC-FPD 对硫化物具有高灵敏度和高选择性，可以对含硫化合物进一步检测鉴定，结果如表 2 所示。

表 2　云南松露含硫化合物的 GC-FPD 鉴定结果

Table 2　Analytical results for GC-FPD identification of sulfur compounds in Yunnan truffle

序号	含硫化合物	RI 计算值	RI 文献值	鉴定方法	新鲜松露含量/（μg/g）	干制松露含量/（μg/g）
1	二甲基硫醚 Dimethyl sulfide	711	720	FPD、RI	1.407±0.126[a]	0.227±0.025[b]
2	烯丙基甲基硫醚 Allyl methyl sulfide	984	956	FPD、RI	—	0.056±0.004
3	二丙基硫醚 Diplopy sulfide	1071	1071	FPD、RI	0.004±0.001[a]	0.003±0.001[a]
4	二甲基二硫醚 Dimethyl disulfide	1095	1086	FPD、RI	—	1.901±0.310
5	2-甲基噻唑 2-Methylthiazole	1241	1239	FPD、RI	—	0.005±0.002
6	噻唑 Thiazole	1262	1265	FPD、RI	—	0.017±0.006
7	甲基-2-丙烯基二硫醚 Methyl 2-propenyl disulfide	1275	1296	FPD、RI	0.004±0.002[b]	0.016±0.008[a]
8	2-乙基噻唑 2-Ethylthiazole	1302	1304	FPD、RI	—	0.026±0.002
9	二甲基三硫醚 Dimethyl trisulfide	1404	1391	FPD、RI	—	2.025±0.080
10	二烯丙基二硫醚 Diallyl disulfide	1479	1475	FPD、RI	2.164±0.371	—
11	二甲基亚砜 Dimethyl sulfoxide	1575	1578	FPD、RI	0.007±0.002[b]	0.018±0.003[a]
12	烯丙基甲基三硫醚 Allyl methyl trisulfide	1588	1584	FPD、RI	—	2.448±0.112
13	2-乙酰基噻唑 2-Acetylthiazole	1655	1652	FPD、RI	—	0.002±0.001
14	二丙基三硫醚 Dipropyl trisulfide	1659	1658	FPD、RI	—	0.006±0.002
15	2-丙基-4-甲基噻唑 2-Propyl-4-methylthiazole	1695	1695	FPD、RI	0.334±0.085[a]	0.078±0.006[b]
16	4-（甲硫基）吡啶 4-(Methylthio)pyridine	1792	1796	FPD、RI	—	0.002±0.001
17	糠基甲基二硫醚 Furfuryl methyl disufide	1810	1806	FPD、RI	—	0.004±0.001
18	1，2，4-三硫杂环戊烷 1,2,4-Trithiolane	1819	1815	FPD、RI	—	0.002±0.001
19	二甲基砜 Dimethyl sulfone	1921	1912	FPD、RI	0.281±0.078[b]	6.492±0.457[a]
20	双(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚 Bis(2-methyl-3-furyl)disulfide	2157	2156	FPD、RI	0.002±0.001[b]	0.013±0.005[a]

由表 2 可知，新鲜松露中共检测出 8 种含硫化合物，真空冷冻干燥的松露中共检测出 19 种含硫化合物，真空冷冻干燥松露中种类和含量明显高于新鲜采摘的松露。这也是干制松露较新鲜松露香气更为浓烈馥郁的主要原因。其中，新鲜松露中含量较高的是二烯丙基二硫醚（2.164±0.371）μg/g 和二甲基硫醚（1.407±0.126）μg/g；真空冷冻干燥松露中含量较高的硫化物是二甲基砜（6.492±0.457）μg/g、烯丙基甲基三硫醚（2.448±0.112）μg/g 和二甲基三硫醚（2.025±0.08）μg/g，这与 Piloni[29]等研究的意大利白松露（Tuber magnatum）的香气成分相似。

2.3　新鲜松露和干制松露中特征香气物质的确定

从 GC-MS 的分析中可以得到松露中挥发性香气物质的种类及含量，但是物质含量的高低并不能说明其对香气贡献的大小。通过 GC-O 嗅闻结合 OAV 筛选出对整体香气有主要贡献的物质。OAV 是由物质的含量和阈值决定的，OAV<1，表示对整体的香气贡献较小，对整体香气起到辅助修饰的作用；OAV>1，表示对整体香气贡献较大，OAV 越高表示贡献越大，为特征香气物质。

如表 3 所示，新鲜松露中共有 20 种物质的 OAV 大于 1，其中有 12 种物质大于 10，8 种物质大于 100，而 1-辛烯-3-酮和二甲基硫醚的 OAV 超过 1000。真空冷冻干燥的松露粉末中共有 46 种物质的 OAV 值大于 1，其中有 16 种物质的 OAV 大于 10，6 种物质的 OAV 大于 100，而丙位壬内酯的 OAV 值大于 1000，这些物质被认为对松露香气有较大贡献。其中，新鲜松露中二甲基硫醚、二烯丙基二硫醚、1-辛烯-3-醇、1-辛烯-3-酮和 3-甲基丁醛具有较高的 OAV；而干制松露中双（2-甲基-3-呋喃基）二硫醚、丙位壬内酯、己酸、1-辛烯-3-酮和对伞花烃具有较高 OAV。

表 3　云南松露中挥发性物质的 OAV

Table 3　Odor activity values of volatile compounds in Yunnan truffle

序号	化合物名称	阈值/（mg/L）	香气描述	新鲜松露 OAV	干制松露 OAV
烃类					
1	右旋柠檬烯 *d*-limonene	0.700000	柠檬样香气	0.17	3.41
2	对伞花烃 4-Isopropyltoluene	0.004000	木香	—	137.50
醇酚类					
3	2-丁醇 2-Butanol	0.130000	葡萄酒香	—	1.94
4	3-辛醇 3-Octanol	0.022000	蘑菇香、干酪香	4.14	5.96
5	1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	0.026000	强烈蘑菇气味、干草香	238.89	49.00
6	1-辛醇 1-Octanol	0.037000	果香	2.03	2.65
7	苯乙醇 Phenethyl alcohol	0.080000	玫瑰花香	—	1.00
8	4-甲基苯酚 4-Methylphenol	0.002700	酚类、青香	25.93	15.19
9	间甲酚 *m*-Cresol	0.011000	有苯酚气味	—	2.18
10	2-甲基-1-丁醇 2-Methyl-1-butanol	0.140000	樟脑气味	—	14.30
醛类					
11	己醛 Hexanal	0.330000	青香	1.39	4.55
12	辛醛 Octanal	0.010000	脂肪蜜香、果香	10.30	27.60
13	壬醛 Nonanal	0.020000	脂肪香、皮香	4.10	5.75
14	反-2-辛醛 （*E*）-2-Octenal	0.021000	脂肪香、青香、药草香	—	1.38
15	菠萝醛 （3-甲硫基丙醛）3-(Methylthio)-propionaldehyde	0.000100	肉香、酱香	285.71	—
16	反-2-壬醛（*E*）-2-Nonenal	0.020000	脂肪香、青香	1.90	—
17	苯乙醛 Phenylacetaldehyde	0.000700	花香、果香	484.72	—
18	反,反-2,4-壬二烯醛 (*E,E*)-2,4-Nonadienal	0.000400	肉香、烤香	65.00	—
19	2,4-癸二烯醛 2,4-Decadienal	0.000200	青香、脂肪香、果香	238.889	—
20	苯甲醛 Benzaldehyde	0.100000	杏仁香、坚果	0.86	3.55
21	4-甲基苯甲醛 4-Methyl-benzaldehyde	0.001200	果香	—	13.33
22	糠醛 Furfural	0.250000	木香、烤面包香	—	2.72
23	3-甲基丁醛 3-Methyl-butanal	0.002000	果香	825.00	—

续表 2

序号	化合物名称	阈值/（mg/L）	香气描述	新鲜松露 OAV	干制松露 OAV
酮类					
24	2-庚酮 2-Heptanone	0.045000	梨样水果香	—	3.333
25	3-辛酮 3-Octanone	0.001300	果实香	323.08	116.15
26	1-辛烯-3-酮 1-Octen-3-one	0.000800	蘑菇、泥土香	1183.75	160.00
27	3-辛烯-2-酮 3-Octen-2-one	0.020000	壤香、蘑菇、药草香	—	15.45
28	3-壬烯-2-酮 3-Nonen-2-one	0.030000	花香、果香、蘑菇香	—	1.27
29	甲基苯乙酮 1-(4-Methylphenyl)-ethanone	0.002000	花香、果香	—	3.00
30	2（3*H*）-呋喃酮 2(3*H*) –Furanone	0.002000	果香、焦香、焦糖	—	48.00
酸类					
31	乙酸 Acetic acid	0.025000	刺鼻的醋酸味	6.56	7.76
32	丁酸 Butanoic acid	0.013000	腐臭的酸味	—	5.69
33	2-甲基丁酸 2-Methyl butyric acid	0.020000	果香、酒香	—	19.55
34	戊酸 Valeric acid	0.080000	强烈酸味	—	12.61
35	己酸 Octanoic acid	0.012000	油样酸味	—	400.33
36	庚酸 Hexanoic acid	0.022000	脂肪样酸味	—	12.14
酯类					
37	2-甲基戊酸丙酯 2-Methylpropyl ester pentanoic acid	0.026000	果香	—	1.31
38	庚酸乙酯 Ethyl heptanate	0.039000	苹果、菠萝果香	—	1.82
39	己酸异丁酯 Hexanoic acid,	0.003000	青香、蜡香、果香	—	120.00
40	辛酸乙酯 Ethyl octanoate	0.022000	白兰地酒香	—	1.36
41	丙位己内酯 γ-Hexalactone	0.005000	香豆素、椰子和干草香	—	46.60
42	丙位壬内酯 γ-Nonalactone	0.000008	椰子奶香	—	3750.00
醚类					
43	对甲酚甲醚 *p*-cresyl methyl ether	0.560000	花香、果香、动物香	4.88	8.60
含氮物质					
44	2-甲基吡啶 2-Methyl-pyridine	0.010000	榛子、坚果香	—	2.80
45	3-甲基吲哚（粪臭素）3-Methyl-indene	0.000500	动物香、臭味	—	10.00
46	2-甲基吡嗪 2-Methyl pyrazine	0.060000	烘烤香	—	1.68
47	三甲基-吡嗪 Trimethyl pyrazine	0.050000	烤香、肉香	—	1.68
含硫物质					
48	二甲基硫醚 Dimethyl sulfide	0.000300	海鲜的腥臭味	1416.67	—
49	二甲基砜 Dimethyl sulfone	NF	淡淡的臭味	NF	NF
50	二甲基亚砜 Dimethyl sulfoxide	NF	油脂、乳酪、蘑菇、大蒜	—	NF
51	2-乙基噻唑 2-Ethylthiazole	0.005000	烤肉香、霉样	—	5.20
52	二甲基二硫醚 Dimethyl disulfide	0.007000	蒜香、辛香	—	271.42
53	二甲基三硫醚 Dimethyl trisulfide	0.190000	强烈蒜香气	—	10.65
54	二烯丙基二硫醚 Diallyl disulfide	0.004300	咸味，肉香	503.26	—
55	糠基甲基二硫醚 Furfuryl methyl disufide	0.000018	大蒜、洋葱	—	222.22
56	双（2-甲基-3-呋喃基）二硫醚 Bis(2-methyl-3-furyl)disulfide	0.000014	硫磺、肉香	142.87	928.57
其他物质					
57	2-戊基呋喃 2-Pentyl-furan	0.270000	豆香、泥土香、蔬菜香	—	2.67

注：“—”表示未检测到；“NF”表示无法查到该化合物的阈值而未作分析。

3　结论

（1）经 SPME 萃取结合 GC-MS，在新鲜采摘松露中共检测出 30 种物质，干制松露粉末中共检测出 83 种物质。干制松露中醇酚类，酮类物质和含氮含硫物质的增多使得新鲜和干制松露的风味差异很

大。通过计算 OAV 发现，新鲜松露中共有 20 种物质 OAV 大于 1，干制松露中共有 46 种物质的 OAV 大于 1。说明干制松露相比清淡的新鲜松露，香气构成更加复杂和多样，气味浓郁。值得探究的是，对甲酚甲醚在新鲜和干制松露中的含量都很高，OAV 大于 1，且在其他文献中并未见到报道，它赋予了松露带有鲜韵的花香和清甜气息，这也是云南松露风味独特的原因之一。

（2）经过 SPME 萃取结合 GC-FPD 从新鲜松露中共检测出 8 种含硫化合物，真空冷冻干燥的松露中共检测出 19 种含硫化合物，由于硫化物阈值低且通常具有硫磺、洋葱、大蒜等特殊风味气味，可以在松露中形成烤香、肉香、蒜香和辛辣的味道，这也是干制松露香气复杂，而相较之下新鲜松露气味清淡的原因。本文对于云南松露中含硫物质（硫醚、噻唑、噻吩、吡啶和含硫杂环化合物）种类和含量鉴定之多是前人在云南松露检测未曾报道过的。

（3）通过对新鲜和干制松露的香气分析发现，新鲜松露更偏向于洋葱、蘑菇、泥土和海鲜腥臭味，适合加工成天然松露酱和松露食用油等相关产品；干制松露则有硫样、烤香、奶香、油样酸味、蘑菇味和木香，可以开发咖啡伴侣或奶制品，其中含量较高的二甲基砜是一种天然有机硫化物，松露含片等产品在保健品市场也有很大的发展前景。

参考文献：

[1] Splivallo R, Ottonello S, Mello A, *et al*. Truffle volatiles: From chemical ecology to aroma biosynthesis[J]. New Phytologist, 2011, 189(3): 688-699.

[2] Torregiani E, Lorier S, Sagratini G, *et al*. Comparative analysis of the volatile profile of 20 commercial samples of truffles, truffle sauces, and truffle-flavored oils by using HS-SPME-GC-MS[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(6): 1-13.

[3] Bellesia F, Pinetti A, Bianchi A, *et al.* Volatile compounds of the white truffle (tuber magnatum pico) from middle italy[J]. Flavour & Fragrance Journal, 2015, 11(4): 239-243.

[4] Cullere L, Ferreira V, Chevret B, *et al*. Characterisation of aroma active compounds in black truffles (tuber melanosporum) and summer truffles (tuber aestivum) by gas chromatography olfactometry[J]. Food Chemistry, 2010, 122 (1) : 300-306.

[5] Mauriello G, Marino R, D'Auria M, *et al*. Determination of volatile organic compounds from truffles *via* SPME-GC-MS[J]. Journal of Chromatographic Science, 2004, 42(6): 299-305.

[6] Paloma D, Elena I, Guillermo R, *et al*. Optimization of summer truffle aroma analysis by spme: Comparison of extraction with different polarity fibres. [J]. Food Science and Technology, 2009, 42(7): 1253-1259.

[7] Laura C, Vicente F, María E V, *et al*. Evaluation of gamma and electron-beam irradiation on the aromatic profile of black truffle (tuber melanosporum) and summer truffle (tuberaestivum)[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012, 13(1): 151-157.

[8] Li Xiaolin (李小林), Chen Cheng (陈诚), Qing Yuan (清源), *et al*. Analysis of volatile aroma components in different species of truffle in huidong county by GC-MS [J]. Food Science (食品科学), 2015, 36(18): 132-136.

[9] Splivallo R, Ebeler S E. Sulfur volatiles of microbial origin are key contributors to human-sensed truffle aroma[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2015, 99(6): 2583-2592.

[10] Inglis T J, Hahne D R, Merritt A J, *et al*. Volatile-sulfur-compound profile distinguishes Burkholderia pseudomallei from Burkholderia thailandensis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(3): 1009-1011.

[11] Pacioni G, Cerretani L, Procida G, *et al.* Composition of commercial truffle flavored oils with GC-MS analysis and discrimination with an electronic nose[J]. Food Chemistry, 2014, 146(7): 30-35.

[12] Liu T, Feng T, Chen W. Identification of volatile flavour components of Tuber melanosporum using simultaneous distillation-extraction[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2017, 35(6): 483-487.

[13] Ning Z, Chen H, Sun B, *et al.* Comparative analysis of volatile composition in chinese truffles *via* GC × GC/HR-TOF/MS and electronic nose[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(4): 412-416.

[14] Zhang Yueqi (张玥琪), Zhang Ning (张宁), Zhou Ying (周颖), *et al.* Analysis of volatile flavor compounds in fresh yunnan truffle [J]. Fine Chemicals (精细化工), 2015, 32(7): 756-761.

[15] Fang Sanping (方三平), Pu Biao (蒲彪), Chen Anjun (陈安均), *et al*. Effects of maturity degree on the aroma compounds of tuber indicum [J]. Mycosystema (菌物学报), 2013, 32(6): 1020-1027.

[16] Cao Fumin (曹福民), Zuo Xiangqun (左向群), Wu Zhongke (吴仲可). Principle and related problems of flame photometric detector [J]. Spectroscopic Instruments and Analysis (光谱仪器与分析), 2002, 50(2): 46-48.

[17] Gaines K K, Chatham W H, Farwell S O. Comparison of the SCD and FPD for HRGC determination of atmospheric sulfur gases[J]. Journal of Separation Science, 2015, 13(7): 489-493.

[18] Zhu R, Zhang H H, Yang G P. Determination of volatile sulfur compounds in seawater and atmosphere[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2017, 45(10): 1504-1510.

[19] Zhu J, Wang L, Xiao Z, *et al*. Characterization of the key aroma compounds in mulberry fruits by application of gas chromatography-olfactometry (GC-O), odor activity value (OAV), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and flame photometric detection (FPD) [J]. Food Chemistry, 2018, 245: 775-782.

[20] Du X, Rouseff R. Aroma active volatiles in four southern highbush blueberry cultivars determined by gas chromatography olfactometry (GC-O) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62: 4537-4543.

[21] Caliari V, Burin V M, Rosier J P, *et al.* Aromatic profile of brazilian sparkling wines produced with classical and innovative grape varieties [J]. Food Research International, 2014, 62(8): 965-973.

[22] Culleré L, Ferreira V, Venturini M E, *et al*. Potential aromatic compounds as markers to differentiate between tuber melanosporum and tuber indicum truffles[J]. Food Chemistry, 2013, 141(1): 105-110.

[23] Barros L, Baptista P, Correia D M, *et al*. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(12): 4781-4788.

[24] Rui Hanming (芮汉明), He Fengxia (贺丰霞), Guo Kai (郭凯). Analysis of volatile components in lentinus edodes during drying process[J]. Food Science(食品科学), 2009, 30(8): 255-259.

[25] An Jingjing (安晶晶), Wang Chengtao (王成涛), Liu Guorong (刘国荣), *et al.* Analysis of volatile aroma components of fresh and dry lentinus edodes with gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2012, 33(14): 68-71.

[26] Splivallo R, Bossi S, Maffei M, *et al.* Discrimination of truffle fruiting body versus mycelial aromas by stir bar sorptive extraction[J]. Phytochemistry, 2007, 68: 2584-2598.

[27] Giovanni P, Lorenzo C, Giuseppe P, *et al.* Composition of commercial truffle flavored oils with GC-MS analysis and discrimination with an electronic nose[J]. Food Chemistry, 2014, 146(7): 30-35.

[28] Sun Baoguo (孙宝国). Flavoring[M]. Beijing：Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2010: 66-78.

[29] Piloni M, Tat L, Tonizzo A, *et al.* Aroma characterisation of white truffle by GC-MS and GC-O[J]. Italian Journal of Food Science, 2005, 17(4): 463-468.