

基于电子鼻和 GC-MS 技术结合相对气味活度值法分析六神曲发酵过程中挥发性成分的差异

肖雅楠^{1,2}, 王爽³, 张娜², 殷晓雪², 时海燕⁴, 包华音^{1*}, 徐男^{2,3*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东省中医药研究院 中药制剂研究所, 山东 济南 250014

3. 齐鲁理工学院医学院, 山东 济南 250299

4. 山东第一医科大学第一附属医院 (山东省千佛山医院) 临床药学科, 山东 济南 250014

摘要: **目的** 比较不同发酵时间六神曲样品挥发性成分的组成和含量差异, 阐明六神曲独特气味的物质基础以及明确赋予其主体特征香味的关键成分。**方法** 以不同发酵时间的六神曲为研究对象, 采用电子鼻表征其整体气味轮廓, 结合气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 技术分析具体挥发性成分; 通过化学计量学筛选不同发酵时段的差异组分, 借助相对气味活度值 (relative odor activity value, ROAV) 揭示六神曲气味差异及其气味形成的物质基础。**结果** 根据电子鼻 W5S、W1W、W2W 传感器检测结果, 可将六神曲发酵过程明确划分为 T1~T4 (发酵初期)、T5~T8 (发酵中期)、T9~T12 (发酵后期) 3 个阶段。GC-MS 技术共鉴定出 120 个挥发性成分。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交最小偏二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 证实, 不同发酵时间六神曲的挥发性成分存在明显差异, 以变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 值 >1 且 $P < 0.05$ 为标准, 筛选得到 49 个差异性成分。结合 ROAV 法确定对主体特征性香味贡献最大的成分为 5-羟甲基糠醛; 2-己烯、反式-9-十八烯酸戊酯、3,5-二羟基-1-十九烷基苯、2-甲氧基-5-十六碳烯酸甲酯对特征性香味具有重要修饰作用。**结论** 通过电子鼻技术、GC-MS 技术结合 ROAV 法可较好地分析六神曲发酵过程中挥发性成分的差异, 为六神曲的鉴定和质量评价提供科学依据。

关键词: 六神曲; 电子鼻; GC-MS; 相对气味活度值; 香气成分; 发酵; 挥发性成分; 化学计量学; 5-羟甲基糠醛; 2-己烯; 反式-9-十八烯酸戊酯; 3,5-二羟基-1-十九烷基苯; 2-甲氧基-5-十六碳烯酸甲酯

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)07-2523-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.07.009

Analysis of volatile components differences during fermentation process of *Massa Medicata Fermentata* based on electronic nose and GC-MS combined with relative odor activity value method

XIAO Yanan^{1,2}, WANG Shuang³, ZHANG Na², YIN Xiaoxue², SHI Haiyan⁴, BAO Huayin¹, XU Nan^{2,3}

1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Research Institute of Traditional Chinese Medicine Preparation, Shandong Institute of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

3. School of medicine, Qilu Institute of Technology, Jinan 250299, China

4. Department of Clinical Pharmacy, The First Hospital Affiliated to Shandong First Medical University (Shandong Provincial Qianfoshan Hospital), Jinan 250014, China

Abstract: Objective To compare the composition and content differences of volatile components in Liushenqu (六神曲, *Massa*

收稿日期: 2025-11-05

基金项目: 国家中医药综合改革示范区中医药科技共建项目 (GZY-KJS-SD-2024-054); 山东省中医药科技面上项目 (M20242223); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程 (2022TSGC1057); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程 (2024TSGC0338); 济南市“新高校 20 条”引进创新团队项目 (202534034)

作者简介: 肖雅楠, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源学。E-mail: 18365735532@163.com

*通信作者: 包华音, 女, 博士, 教授, 从事中药质量控制、资源研究。E-mail: baohuayin@163.com

徐男, 男, 博士, 研究员, 从事中药新药开发与炮制原理研究。E-mail: 93679706@qq.com

Medicata Fermentata, MMF) samples with different fermentation times, clarify the material basis of the unique aroma of MMF, and identify the key components that give it its main characteristic aroma. **Methods** Taking MMF fermented for different durations as the research object, and electronic nose was used to characterize its overall odor profile, and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was combined to analyze the specific volatile components. Chemometrics was applied to screen the differential components at different fermentation stages, and the relative odor activity value (ROAV) was used to reveal the odor differences of MMF and the material basis for its odor formation. **Results** Based on the detection results of the W5S, W1W, and W2W sensors of the electronic nose, the fermentation process of MMF was clearly divided into three stages: T1—T4 (initial fermentation), T5—T8 (middle fermentation), and T9—T12 (late fermentation). A total of 120 volatile components were identified by GC-MS. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) confirmed that there were significant differences in the volatile components of MMF at different fermentation times. A total of 49 differential components were screened out according to the criteria of variable importance in projection (VIP) > 1 and $P < 0.05$. Combined with the relative odor activity value method, 5-hydroxymethylfurfural was identified as the component contributing the most to the characteristic aroma of the main body. 2-Hexene, pentyl (9E)-octadec-9-enoate, 3,5-dihydroxy-1-nonadecylbenzene, and methyl 2-methoxy-5-hexadecenoate played important modifying roles in the characteristic aroma. **Conclusion** The differences in volatile components during the fermentation of MMF can be effectively analyzed by electronic nose, GC-MS, combined with the relative odor activity value method, which provides a scientific basis for the identification and quality evaluation of MMF.

Key words: *Massa Medicata Fermentata*; electronic nose; GC-MS; relative odor activity value; aroma components; fermentation; volatile components; chemometrics; 5-hydroxymethylfurfural; 2-hexene; pentyl (9E)-octadec-9-enoate; 3,5-dihydroxy-1-nonadecylbenzene; methyl 2-methoxy-5-hexadecenoate

六神曲作为中医临床应用历史悠久的经典发酵中药,最早收载于唐代《药性论》^[1],被称为“中华第一曲”,核心功效为消食化积、健脾和胃,临床常用于治疗食积不化、脘腹胀满、肠鸣泄泻等病症^[2]。传统炮制经验中,六神曲的品质评价为以“芳香气浓郁、无酸败异味”为核心的感官指标^[3],这一评价标准直接指向其内在挥发性成分,部分成分还兼具抗炎、调节肠道菌群等生物活性^[4],与药效发挥存在紧密关联,因此,解析挥发性成分的组成与动态变化,是揭示六神曲传统品质评价科学内涵的关键。六神曲的传统炮制为多原料混合自然发酵过程,经典制备需以赤小豆、苦杏仁、青蒿、苍耳草、辣蓼和面粉为原料,按特定比例混匀后经微生物自然接种发酵而成^[5]。发酵过程中,微生物群落的演替与代谢是成分转化的核心驱动力,发酵初期微生物多样性较高,随发酵进程多样性显著降低,后期细菌群落以乳杆菌属、片球菌属为优势菌,真菌群落则以毛孢子菌属为核心功能菌群。微生物通过分泌淀粉酶、蛋白酶等水解酶,催化原料中大分子物质降解,同时实现活性成分的转化与合成^[6-7]。现有关于六神曲挥发性成分的研究已初步揭示部分变化规律。有研究通过 HS-SPME-GC-MS 技术检测到发酵过程中存在 33 种挥发性成分,涵盖酸类、醇类、酯类、醛类等多类化合物,且呈现显著的动态变化特征^[8]。此外,原料组成对发酵过程中挥发性成分的

形成具有影响,当缺失青蒿、辣蓼、苍耳草或苦杏仁任一原料时,挥发性成分的种类与含量均会发生变化,其中苦杏仁被证实是苯甲醛的主要来源^[8]。但现有研究多聚焦于特定发酵节点的成分对比或单一原料缺失的影响,针对不同发酵阶段挥发性成分的系统动态演变规律尚未明确。

随着现代分析技术的革新,中药挥发性成分研究已从“定性描述”转向“定量解析”。电子鼻凭借其快速捕捉整体气味轮廓的优势,已在中药产地鉴定、真伪鉴别、炮制品区分及气味差异辨识等领域得到广泛应用^[9-11];气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)技术能对挥发性成分进行定性与定量分析,常用于中药不同产地、不同处理方法的挥发性成分分析^[12-13];化学计量学方法可有效剔除冗余信息,筛选不同样品的特征差异成分^[12,14];相对气味活度值(relative odor activity value, ROAV)法^[12]通过量化成分含量和感觉阈值的关联,明确关键香气物质,这些技术的多维度融合,为中药气味品质的系统化、科学化评价提供了技术支撑。因此,本研究以不同发酵时间的六神曲为研究对象,采用电子鼻技术分析整体气味轮廓,通过 GC-MS 鉴定挥发性成分,结合 ROAV 法量化各成分对整体气味的贡献,阐明不同发酵时间六神曲的成分差异,明确六神曲芳香气味的物质基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

AE224C 型分析天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; HWS-150 型恒温恒湿发酵箱、DZF-6050 型真空干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; PEN3 型电子鼻, 北京盈盛恒泰科技有限责任公司; TSQ 9610-1610 型三重四级杆气质联用仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; N-2110 型旋转蒸发仪, 东京理化器械株式会社。

1.2 材料

赤小豆(批号 221201)、苦杏仁(批号 221201)、辣蓼(批号 221107)、苍耳草(批号 221107)、青蒿(批号 230201), 均购自山东百味堂中药饮片有限公司, 经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定, 赤小豆为豆科豇豆属一年生草本植物赤小豆 *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi et Ohashi 的干燥成熟种子, 苦杏仁为蔷薇科杏属植物杏 *Prunus armeniaca* L. 的干燥成熟种子, 辣蓼为蓼科蓼属植物水蓼 *Polygonum hydropiper* L. 的干燥全草, 苍耳草为菊科苍耳属一年生草本植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. ex Widder 的干燥全草, 青蒿为菊科蒿属植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分。

正己烷, 批号 A2506124, 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 无水乙醇购自天津市富宇精细化工有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品采集

2.1.1 六神曲样品的制备 依据《山东省中药饮片炮制规范》(2012 版) 方法制备六神曲, 称取赤小豆、苦杏仁各 5 kg, 将二者研磨至粗粉, 与 100 kg 全麦粉充分混合均匀。另取干燥青蒿、干燥辣蓼及干燥苍耳草各 5 kg, 切碎处理, 加入适量水煎煮成药液, 滤去药渣, 备用。将混合后的面粉置于锅中, 加入药液, 揉合均匀制成软材(用手捏握可成团, 轻摁即散为宜)。将软材装入预设模具内, 压实成块后取出, 置于 30 °C、75% 相对湿度的恒温恒湿发酵箱中。

2.1.2 发酵期间六神曲取样 每隔 12 h 进行取样, 共取样 12 次, 发酵 6 d, 所有组别均设置生物学重复 ($n=3$), 共 36 个样品, 各样品保存于 -80 °C 冰箱中, 发酵过程中除取样外, 发酵箱门需保持关闭。

2.2 基于电子鼻的挥发性成分整体轮廓分析

2.2.1 分析方法 参考李涵等^[15]提出的检测方法

并稍作修改, 精密称取六神曲样品粉末 2.0 g, 装入 50 mL 电子鼻专用顶空瓶中, 加盖密闭, 70 °C 恒温水浴锅中加热 10 min。电子鼻检测参数: 进样量 10 mL, 体积流量 0.4 L/min, 清洗时间 120 s, 检测时间 120 s, 各样品平行测定 3 次。

2.2.2 分析结果 采用 Origin 2024 软件, 对六神曲发酵过程中不同时间点下样品的平均响应值进行统计分析, 并绘制气味信息雷达图(图 1)。由图 1 可知, W5S、W1W 及 W2W 传感器的响应值显著高于其他传感器, 依据上述传感器响应值的变化趋势, 可将六神曲发酵过程划分为 T1~T4(发酵初期)、T5~T8(发酵中期)、T9~T12(发酵后期) 3 个阶段。其他辅助传感器: 如 W2S(醇类及羰基化合物通道), 整个发酵过程响应值呈现出先逐渐上升后趋于稳定的趋势, 推测其原因可能为发酵中期微生物的糖酵解与代谢活动较为活跃, 乙醇、芳香醇等代谢产

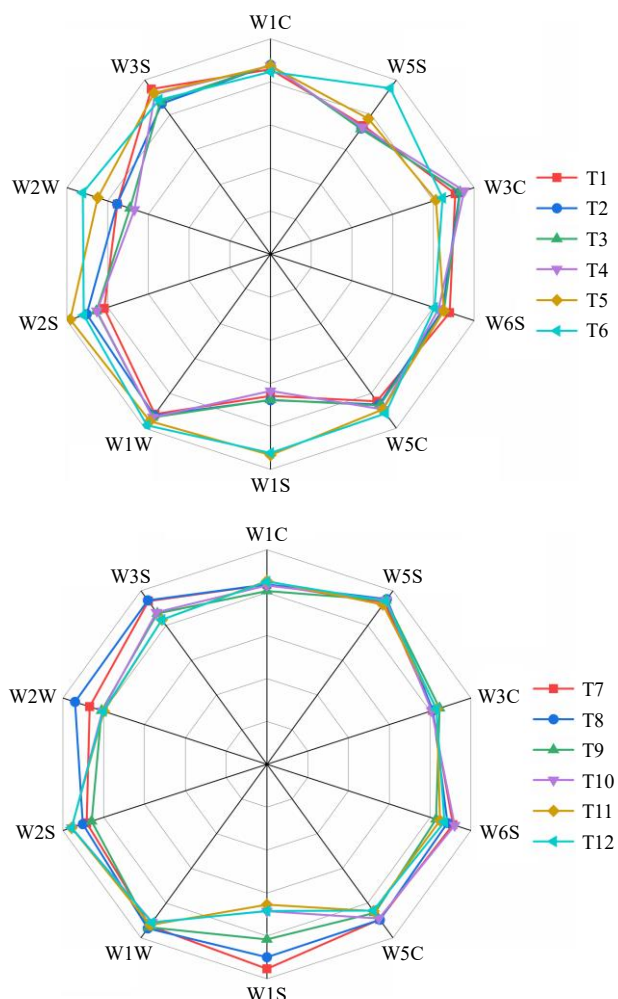


图 1 不同发酵时间六神曲气味信息雷达图

Fig. 1 Radar chart of odor information for MMF at different fermentation times

物逐步积累,驱动响应值达到峰值。W3C(氨基化合物通道)、W6S(氢化物通道),在整个发酵过程中均呈现低响应且平稳的变化特征,推测六神曲发酵过程几乎不产生氨基化合物和氢化物。此外,发酵中后期W3S(长链烷烃、脂肪族化合物通道)响应升高,推测前期原料脂质降解与微生物代谢弱,烷烃释放少;中后期微生物代谢活跃,脂质 β -氧化与脂肪酸脱羧生成长链烷烃,驱动响应值升高。

2.3 挥发性成分 GC-MS 检测与分析

2.3.1 分析样品溶液的制备 参考肖庚鹏等^[16]提出的检测方法并稍作修改,精密称取六神曲样品粉末 5.0 g 置于 150 mL 锥形瓶中,加入无水乙醇 50 mL 回流 3 h,得到无水乙醇提取液,旋蒸至近干,用正己烷复溶至 5 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.3.2 气相色谱条件 采用 TG-5 毛细管柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm)作为色谱柱,进样口温度设置为 280 $^{\circ}\text{C}$,采用分流方式进样,分流比例设定为 10:1,每次进样量为 1 μL 。载气选用高纯度氦气(He),体积流量控制在 1 mL/min。升温过程:初始温度 40 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min,随后以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 200 $^{\circ}\text{C}$,保持 3 min,再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率快速升温至 280 $^{\circ}\text{C}$,并保持 10 min。

2.3.3 质谱条件 色谱与质谱的接口温度设置为 280 $^{\circ}\text{C}$,采用电子轰击源(EI)进行电离,监测模式选择全扫描,扫描范围设定在 m/z 33~550,电离能量设定为 70 eV,溶剂延迟时间为 2 min,离子源温度保持在 280 $^{\circ}\text{C}$,四级杆温度则设定为舒适的 150 $^{\circ}\text{C}$,所用谱库为 NIST 2023。

2.3.4 分析结果 为了研究不同发酵阶段六神曲中的挥发性成分,利用 GC-MS 对六神曲挥发性成分及相对含量进行鉴定分析。依据 NIST 2023 质谱数据库检索结果结合 CAS 号对挥发性成分进行鉴定,采用面积归一法计算各组分的相对百分含量,共鉴定出 120 种挥发性成分,其中,酯类化合物 43 种、醇类化合物 15 种、烷烃类化合物 14 种、酸类化合物 13 种、醛类化合物 7 种、酚类化合物 6 种、烯炔类化合物 4 种、维生素类 3 种、酮类化合物 2 种、醚类化合物 2 种、吡喃类化合物 2 种、酰胺类化合物 2 种、其他化合物 7 种,结果见表 1。

六神曲作为经典中药发酵制剂,其发酵过程中挥发性成分的动态演变,直接影响药效物质的生成与产品质量。本研究采用 GC-MS 技术,对 T1~T12 连续发酵阶段的 120 种挥发性成分进行动态监测。

结果显示,顺式-13-十八碳烯酸在初始阶段(T1)占比最高达 55.40%,随发酵进程显著降低至 T12 的 27.22%,推测其降解与微生物 β -氧化途径有关,该过程生成短链脂肪酸及酮类代谢中间体,为后续反应提供前体物质^[17]。酯类成分呈现明显累积趋势,亚油酸甲酯与油酸甲酯分别从初始 0.94%、1.41%递增至 T12 的 10.86%、13.12%,内源性脂肪酶或微生物酯酶,可能通过底物特异性激活介导了早期酯化反应^[18]。在发酵中期,甾醇类成分显著富集,其中,麦角甾醇作为真菌细胞膜结构组分,含量激增至 0.86%,此现象与曲霉属等丝状真菌的代谢活跃期具有时间相关性^[19]。角鲨烯作为三萜类前体物质,在 T8 后含量显著提升,其生物合成可能通过甲羟戊酸途径完成,赋予终产物抗氧化特性^[20]。至发酵后期,棕榈酸含量稳定于 6.90%~8.81%,而长链酯类(如十六烷酸甲酯)占比达 1.77%,表明微生物通过酯化反应平衡游离脂肪酸的细胞毒性,同时优化产物脂溶性。

从药效物质基础角度分析,脂肪酸-酯类协同机制是六神曲“消食化积”功效的核心,顺式-13-十八碳烯酸通过促进胆汁分泌增强脂质乳化,而亚油酸甲酯等中链酯类经肠道酶解生成甘油和脂肪酸,协同促进脂类消化吸收。甾醇类组分(豆甾醇、菜油甾醇)则通过核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB)通路调控等机制,调节肠道免疫与炎症反应,强化“健脾和胃”功能。气味特征方面,苯甲醇(0.20%)与油酸甲酯(13.12%)在 T12 时共同构成花果香-青草香复合气味,有效中和原料不良气味,提升制剂适口性。

2.4 化学计量学分析与差异性成分筛选

2.4.1 分析方法 采用 Origin 2024 软件和 SIMCA 14.1 软件开展主成分分析(principal component analysis, PCA)与正交最小偏二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA),以 $\text{VIP}>1$ 且 $P<0.05$ 作为筛选条件,筛选出六神曲发酵过程中的挥发性差异组分;利用 Origin 2024 软件对筛选得到的差异成分绘制聚类热图,结合 ROAV 法评价各差异组分对六神曲发酵期间气味特征的贡献能力,进而明确六神曲发酵过程中气味差异形成的物质基础。

2.4.2 分析结果 采用 Origin 2024 软件对不同发酵时间六神曲挥发性成分进行 PCA,拟合指数 R^2_x 为 0.832, Q^2 为 0.764,说明该模型较为稳定可靠(图 2),

表 1 (续)

序号	t _R / min	CAS 号	名称	化学式	化合物 类型	相对含量/%											
						T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
44	39.45	96-76-4	2,4-二叔丁基苯酚	C ₁₄ H ₂₂ O	酚类	0.022 4	0.106 7	0.055 9	0.040 4	0.047 4	0.026 5	0.020 7	0.052 1	0.042 3	0.038 6	0.021 7	0.043 0
45	39.77	4410-31-5	2-羟基-2-苯基乙酰胺	C ₈ H ₉ NO ₂	酰胺类	0.192 0	0.254 4	0.187 2	0.183 4	0.198 3	0.150 7	0.132 1	0.092 3	0.153 6	0.140 8	0.130 1	0.062 0
46	43.69	180295-27-6	三异丁基(3-苯基丙氧基)硅烷	C ₁₈ H ₃₂ OSi	有机硅类	0.006 2	0.018 8	0.031 0	0.032 0	0.030 4	0.034 6	0.025 5	0.053 2	0.033 9	0.037 2	0.023 4	0.023 6
47	47.30	2765-11-9	正十五碳醛	C ₁₅ H ₃₀ O	醛类	0.054 6	0.062 4	0.065 6	0.075 5	0.059 4	0.055 5	0.047 2	0.074 0	0.084 7	0.084 9	0.065 9	0.068 3
48	49.05	544-63-8	十四酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	羧酸类	0.031 8	0.063 9	0.052 4	0.073 8	0.057 6	0.059 7	0.033 6	0.072 4	0.058 2	0.045 3	0.025 9	0.025 6
49	52.49	1002-84-2	十五酸	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	羧酸类	0.022 4	0.033 7	0.038 9	0.050 0	0.029 9	0.058 1	0.040 1	0.091 1	0.067 3	0.049 8	0.043 2	0.044 6
50	53.61	56875-67-3	顺式-7-十六碳烯酸甲酯	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	酯类	0.039 4	0.032 7	0.071 0	0.051 2	0.061 8	0.113 2	0.222 8	0.141 0	0.145 7	0.186 3	0.179 7	0.288 0
51	54.54	112-39-0	十六烷酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	酯类	0.127 2	0.081 8	0.188 6	0.169 7	0.186 7	1.549 8	1.317 2	0.916 7	0.707 5	1.056 8	1.262 9	1.771 0
52	55.11	682751-34-4	(6Z)-13-甲基-6-十五烯酸	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	羧酸类	0.312 7	0.323 4	0.254 1	0.244 9	0.357 6	0.379 0	0.258 7	0.238 8	0.253 5	0.187 3	0.243 9	0.196 1
53	55.31	84-74-2	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	酯类	0.096 1	0.095 0	0.093 5	0.063 1	0.068 2	0.066 6	0.072 6	0.091 5	0.082 3	0.082 0	0.067 8	0.072 8
54	55.82	57-10-3	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	羧酸类	7.577 2	9.374 1	8.338 8	9.760 6	9.339 1	9.579 3	7.131 4	9.544 5	8.814 9	7.435 2	7.184 1	6.896 7
55	56.73	628-97-7	棕榈酸乙酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	酯类	0.274 9	0.303 0	0.362 9	0.337 4	0.585 7	0.668 3	0.553 7	0.508 4	0.430 9	0.520 4	0.398 3	0.513 2
56	56.93	75190-82-8	顺-10-碳烯酸甲酯	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	酯类	0.004 3	0.009 9	0.013 4	0.009 7	0.042 9	0.078 9	0.068 0	0.059 6	0.055 8	0.114 1	0.089 4	0.124 8
57	59.21	16326-32-2	γ-亚麻酸甲酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	酯类	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.064 9
58	59.86	112-63-0	亚油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	酯类	0.942 8	0.542 7	1.545 9	1.440 1	1.480 9	3.721 2	7.158 9	5.292 9	6.052 7	7.316 9	6.970 7	10.857 5
59	60.00	301-00-8	9,12,15-十八烷三烯酸甲酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	酯类	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.029 1	0.147 6	0.168 6	0.118 8	0.110 5	0.128 6	0.138 3	0.284 3
60	60.11	112-62-9	油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	酯类	1.407 4	0.787 8	1.979 3	1.645 8	2.128 3	4.296 5	11.114 6	5.916 4	5.717 3	8.488 2	10.102 6	13.115 2
61	62.13	13126-39-1	顺式-13-十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	羧酸类	55.399 8	34.815 5	30.522 3	31.157 8	42.078 9	42.048 6	43.272 6	30.790 1	33.047 4	28.883 2	42.004 3	27.217 6
62	62.49	6114-18-7	反油酸乙酯	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	酯类	2.168 8	1.737 1	1.846 7	2.080 7	2.235 5	4.413 4	3.068 7	1.398 7	1.336 0	1.593 9	1.774 8	1.149 7
63	62.62	57-11-4	硬脂酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	羧酸类	0.639 7	0.069 7	0.063 3	0.063 3	0.430 8	0.115 8	0.072 5	0.459 0	0.376 3	0.283 7	0.374 8	0.219 8
64	63.26	111-61-5	硬脂酸乙酯	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	酯类	0.030 4	0.035 1	0.042 6	0.045 6	0.080 4	0.083 2	0.072 1	0.054 4	0.042 3	0.049 4	0.047 4	0.052 6
65	64.79	10152-71-3	2-[[2-(2-乙基环丙基)甲基]环丙基]甲基-甲酯环丙烷辛酸	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	酯类	0.025 5	0.015 4	0.041 8	0.036 4	0.045 6	0.229 1	0.172 2	0.093 8	0.158 6	0.199 1	0.140 2	0.221 8
66	64.87	1826952-66-5	8-(羟甲基)-1,5,8-三甲基双环[8.1.0]十一-5-烯-2,9-二醇	C ₁₄ H ₂₆ O ₃	多元醇类	0.007 7	0.006 1	0.010 3	0.008 3	0.024 3	0.069 2	0.062 7	0.053 1	0.052 9	0.070 6	0.065 6	0.101 3
67	65.19	2566-91-8	顺式-9,10-环氧硬脂酸甲酯	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	酯类	0.017 4	0.017 2	0.028 2	0.022 3	0.026 0	0.074 3	0.056 6	0.029 0	0.037 6	0.063 2	0.043 4	0.052 8
68	65.35	2390-9-2	顺式-11-二十烯酸甲酯	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	酯类	0.030 4	0.035 1	0.035 4	0.020 5	0.030 7	0.054 7	0.044 3	0.082 2	0.108 3	0.141 7	0.148 6	0.215 3
69	65.48	220556-75-2	2-(8Z,11Z)-8,11-heptadecadien-1-yl-4,5-dihydro-oxazole	C ₂₀ H ₃₅ NO	含氮杂环类	0.333 8	0.734 6	0.921 6	0.935 2	0.490 5	0.310 5	0.205 7	0.505 3	0.519 0	0.609 1	0.327 2	0.452 9
70	65.61	34900-26-0	2-(8Z)-8-heptadecen-1-yl-4,5-dihydro-oxazole	C ₂₀ H ₃₇ NO	含氮杂环类	0.103 0	0.239 5	0.317 6	0.316 0	0.138 3	0.091 3	0.063 8	0.172 0	0.165 8	0.203 4	0.087 2	0.115 1
71	65.75	17364-34-0	6,9,12,15-二十二碳四烯酸甲酯	C ₂₃ H ₃₈ O ₂	酯类	0.070 9	0.034 9	0.081 5	0.058 3	0.089 0	0.086 0	0.074 5	0.086 1	0.122 2	0.203 5	0.170 5	0.149 3
72	65.98	17735-94-3	二十烯酸	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	羧酸类	0.089 4	0.099 8	0.099 5	0.089 7	0.186 8	0.187 3	0.152 2	0.178 3	0.107 5	0.161 2	0.241 3	0.105 9
73	66.34	105794-58-9	1-庚三醇	C ₇ H ₁₆ O	醇类	0.039 3	0.019 6	0.059 0	0.048 8	0.051 4	0.138 5	0.116 6	0.080 8	0.076 6	0.101 0	0.077 6	0.093 5
74	66.57	177746-99-5	15-羟基-9,12-十八碳二烯酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₃	酯类	0.064 9	0.149 1	0.114 8	0.042 5	0.098 3	0.113 5	0.119 0	0.057 2	0.049 6	0.089 0	0.095 9	0.055 3
75	66.87	119-47-1	抗氧化剂 2246	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	酚类	0.206 8	0.407 0	0.335 9	0.280 4	0.226 0	0.126 4	0.135 0	0.202 6	0.166 8	0.225 0	0.342 5	0.143 4
76	66.93	10103-34-7	9,12-环氧乙烷硬脂酸乙酯	C ₂₀ H ₃₆ O ₄	环氧酯类	0.023 2	0.039 3	0.025 2	0.019 9	0.074 3	0.071 1	0.014 5	0.037 2	0.029 7	0.024 0	0.009 1	0.011 7
77	67.42	116865-17-9	(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酸 2-(二甲基氨基)乙基酯	C ₂₂ H ₄₁ NO ₂	酯类	0.060 3	0.045 4	0.050 2	0.050 2	0.059 7	0.059 4	0.050 1	0.102 4	0.082 7	0.090 3	0.068 9	0.073 4
78	67.49	61790-13-8	油酸二甲氨基乙基酯	C ₂₂ H ₄₃ NO ₂	酯类	0.048 7	0.047 7	0.045 1	0.047 4	0.045 2	0.040 8	0.027 0	0.055 4	0.052 0	0.057 8	0.048 1	0.054 3
79	67.69	56630-48-9	棕榈酸 3-[(三甲基硅烷基)氧基]丙酯	C ₂₂ H ₄₆ O ₃ Si	有机硅酯类	0.092 1	0.087 2	0.074 5	0.088 5	0.076 4	0.054 6	0.053 7	0.062 6	0.046 3	0.050 3	0.044 5	0.059 5
80	67.89	57-10-3	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	羧酸类	0.012 4	0.011 1	0.022 7	0.034 4	0.031 4	0.017 1	0.009 4	0.053 7	0.041 4	0.032 6	0.019 0	0.057 9
81	68.01	629-94-7	正二十一烷	C ₂₁ H ₄₄	烷烃类	0.110 8	0.112 1	0.118 4	0.131 1	0.107 9	0.077 4	0.057 0	0.118 6	0.108 4	0.116 2	0.077 2	0.118 4
82	68.09	23470-00-0	2-单棕榈酸甘油	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	酯类	0.198 7	0.410 9	0.435 2	0.545 9	0.313 7	0.281 4	0.206 8	0.596 4	0.411 6	0.372 3	0.289 8	0.332 3

表 1 (续)

序号	R/ min	CAS 号	名称	化学式	化合物 类型	相对含量/%											
						T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
83	68.10	5431-33-4	丙烯酸-2,3-环氧丙酯十八烯酸	C ₂₁ H ₃₈ O ₃	环氧酯类	0.080 6	0.120 8	0.024 3	0.000 0	0.000 0	0.034 4	0.026 4	0.109 9	0.023 3	0.020 8	0.289 8	0.332 3
84	68.14	761-35-3	(±)-1,2-二棕榈精	C ₃₅ H ₆₈ O ₅	甘油二酯类	0.007 2	0.004 5	0.038 5	0.057 8	0.035 1	0.016 7	0.010 7	0.117 2	0.059 5	0.060 1	0.022 4	0.021 3
85	68.30	117-84-0	邻苯二甲酸二(2-丙基戊基)酯	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	邻苯二甲酸酯类	0.200 8	0.157 4	0.128 7	0.130 7	0.159 9	0.231 1	0.299 7	0.230 6	0.104 7	0.140 1	0.090 2	0.161 1
86	68.54	10517-80-3	反式-9-十八烯酸戊酯	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	酯类	0.039 1	0.067 1	0.051 2	0.094 5	0.050 6	0.046 5	0.033 7	0.058 0	0.011 4	0.042 5	0.041 9	0.032 1
87	68.79	41755-60-6	棕榈酸苯酯	C ₂₃ H ₃₈ O ₂	酯类	0.133 7	0.159 6	0.140 8	0.165 5	0.176 6	0.175 9	0.111 0	0.203 0	0.185 8	0.165 5	0.119 1	0.065 1
88	69.14	537-39-3	三反油酸甘油酯	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	甘油三酯类	0.068 0	0.056 9	0.111 3	0.025 7	0.002 8	0.020 2	0.027 1	0.007 9	0.019 0	0.011 6	0.013 1	0.012 4
89	69.42	—	3-十六碳-15-烯-7-炔基-4-羟基-5-甲基氧杂戊环-2-酮 9	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	内酯类	0.045 4	0.032 2	0.042 6	0.028 2	0.054 4	0.046 6	0.036 1	0.051 6	0.056 6	0.055 4	0.054 9	0.074 9
90	69.47	—	1,5-萘二醇-10-氢-2-(1-羟基-1-甲基乙基)-4a,8-二甲基	C ₁₅ H ₂₈ O ₃	萘酚类	0.036 4	0.041 1	0.054 4	0.058 6	0.067 1	0.022 6	0.050 7	0.047 3	0.064 4	0.070 3	0.049 3	0.067 4
91	69.59	—	9(E),11(E)-共轭亚油酸三甲基硅酯	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si	硅烷化酯类	0.014 3	0.019 2	0.027 8	0.025 5	0.004 8	0.017 2	0.005 4	0.068 9	0.052 2	0.040 9	0.040 4	0.057 8
92	69.63	—	(E)-4-羟基-4-[4-羟基-2-[(E)-6-羟基庚-1-烯基]环戊基]丁-2-烯酸	C ₁₆ H ₂₆ O ₄	羧酸类	0.014 9	0.021 2	0.012 3	0.035 4	0.031 3	0.025 1	0.017 3	0.085 1	0.090 4	0.072 4	0.037 0	0.060 5
93	69.84	2277-28-3	1-亚油酸单甘油酯	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	酯类	0.418 4	0.574 6	0.706 1	0.882 9	0.666 1	0.544 4	0.396 5	0.988 8	0.788 7	0.705 5	0.575 1	0.650 8
94	69.89	3443-84-3	2-十八烯酸单甘油酯	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	酯类	0.907 4	1.158 3	1.397 3	1.600 6	1.142 1	0.923 0	0.696 6	1.427 9	1.317 5	1.239 2	0.834 5	0.978 2
95	69.95	—	反式-9-十八烯酸戊酯	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	酯类	0.204 4	0.245 9	0.358 1	0.399 7	0.338 2	0.270 4	0.222 0	0.532 2	0.547 0	0.482 2	0.337 9	0.354 2
96	70.50	53950-59-7	(2E,7R,11R)-3,7,11,15-四甲基-2-十六碳烯-1-基(9Z,12Z)-9,12-十八碳二烯酸酯	C ₃₈ H ₇₀ O ₂	酯类	0.299 4	0.304 5	0.384 0	0.606 6	0.529 4	0.529 3	0.288 1	0.481 4	0.553 9	0.445 9	0.286 9	0.176 3
97	70.57	77509-01-4	9-十六碳烯酸,苯甲酯,(Z)-(9Cl)	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	酯类	1.230 9	0.941 2	0.907 7	0.975 3	1.647 4	1.452 5	0.958 2	1.171 9	1.104 6	0.906 9	0.808 7	0.000 0
98	70.71	500-67-4	5-庚基苯-1,3-二醇	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	酚类	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.065 9	0.095 5	0.406 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
99	70.55	112-84-5	芥酸酰胺	C ₂₂ H ₄₃ NO	酰胺类	0.055 1	0.076 9	0.098 4	0.087 1	0.066 5	0.061 2	0.074 8	0.172 0	0.226 5	0.000 0	0.000 0	0.378 2
100	71.11	111-02-4	角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	三萜烯类	0.122 7	0.227 9	0.203 4	0.218 2	0.166 7	0.240 2	0.256 5	0.591 3	0.507 6	0.382 9	0.321 4	0.686 1
101	71.69	—	2-甲氧基-5-十六碳烯酸甲酯	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	酯类	0.000 0	0.023 7	0.037 2	0.044 3	0.041 3	0.039 6	0.035 4	0.055 3	0.081 8	0.057 8	0.037 4	0.061 6
102	72.13	630-04-6	三十一烷	C ₃₁ H ₆₄	烷烃类	0.132 4	0.177 8	0.182 3	0.204 0	0.129 0	0.103 5	0.077 6	0.144 1	0.157 5	0.156 1	0.082 8	0.117 8
103	73.42	55282-12-7	3-乙基-5-(2-乙基丁基)十八烷	C ₂₆ H ₅₄	烷烃类	0.056 6	0.052 3	0.062 5	0.068 5	0.034 7	0.006 9	0.023 8	0.030 7	0.025 8	0.025 7	0.027 7	0.007 2
104	73.81	103462-06-2	5-(庚十二-烯基)间苯二酚	C ₂₃ H ₃₈ O ₂	酚类	0.045 7	0.066 8	0.055 6	0.059 9	0.050 4	0.026 3	0.022 8	0.097 0	0.089 0	0.089 5	0.055 7	0.084 1
105	73.80	2598-99-4	棕榈酸十八烷醇酯	C ₃₄ H ₆₈ O ₂	酯类	0.018 9	0.057 2	0.052 7	0.058 8	0.013 2	0.007 1	0.062 0	0.005 6	0.089 0	0.089 5	0.055 7	0.073 9
106	73.89	1116113-36-0	δ-生育酚甲基醚	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	苯并吡喃类	0.018 7	0.056 9	0.063 6	0.064 4	0.029 6	0.016 6	0.009 0	0.018 2	0.008 4	0.005 9	0.009 6	0.023 0
107	74.17	7616-22-0	γ-生育酚	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	苯并吡喃类	0.036 7	0.081 3	0.093 1	0.088 9	0.024 6	0.010 1	0.016 4	0.017 5	0.025 2	0.021 8	0.025 3	0.035 8
108	74.34	148-03-8	β-生育酚	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	维生素 E 类	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.038 4	0.027 9	0.016 1	0.053 2	0.017 5	0.045 0	0.014 8	0.025 4
109	74.54	14214-69-8	4,6-胆甾二烯-3β-醇	C ₂₇ H ₄₄ O	甾体类	0.035 8	0.056 3	0.058 4	0.058 7	0.007 5	0.027 4	0.025 2	0.047 7	0.039 1	0.029 9	0.014 8	0.016 2
110	75.06	4970-37-0	豆甾-3,5-二烯	C ₂₉ H ₄₈	甾体类	0.036 2	0.072 8	0.099 1	0.099 7	0.032 4	0.030 7	0.031 6	0.072 1	0.077 1	0.085 4	0.044 1	0.083 7
111	75.17	629-99-2	正二十五烷	C ₂₅ H ₅₂	烷烃类	0.098 0	0.075 3	0.084 6	0.111 2	0.054 0	0.047 9	0.034 4	0.043 3	0.064 3	0.057 5	0.050 8	0.046 5
112	75.75	10191-41-0	维生素 E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	维生素类	0.025 7	0.035 5	0.042 7	0.045 6	0.042 1	0.027 5	0.030 9	0.048 3	0.043 7	0.048 9	0.042 2	0.021 7
113	76.11	490-23-3	生育三萜酚	C ₂₈ H ₄₂ O ₂	维生素 E 类	0.048 2	0.125 4	0.113 7	0.130 2	0.101 3	0.039 1	0.042 6	0.144 6	0.099 6	0.120 6	0.079 7	0.127 8
114	77.00	57-87-4	麦角甾醇	C ₂₈ H ₄₄ O	甾醇类	0.015 4	0.025 7	0.104 7	0.057 2	0.022 1	0.171 5	0.205 3	0.864 8	0.467 7	0.235 7	0.353 6	1.202 1
115	77.74	474-62-4	菜油甾醇	C ₂₈ H ₄₈ O	甾醇类	0.627 0	1.293 7	1.328 0	1.365 6	0.576 4	0.468 6	0.385 5	0.527 7	0.589 6	0.512 8	0.424 0	0.572 2
116	77.81	35176-46-6	3,5-二羟基-1-十九烷基苯	C ₂₅ H ₄₄ O ₂	酚类	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.274 3	0.254 0	0.271 5	0.345 4	1.229 5	1.052 7	1.026 5	0.614 8	0.839 7
117	78.00	6538-2-9	5α(H)-樟脑醇	C ₂₈ H ₅₀ O	甾烷醇类	0.125 2	0.350 8	0.293 4	0.354 7	0.160 2	0.172 2	0.176 9	0.386 2	0.341 3	0.325 9	0.213 3	0.307 1
118	78.37	83-48-7	豆甾醇	C ₂₉ H ₄₈ O	甾醇类	0.152 6	0.348 5	0.363 7	0.388 8	0.219 8	0.204 3	0.155 6	0.365 6	0.324 3	0.267 6	0.146 8	0.242 6
119	79.08	516-78-9	5α-麦角甾-7-烯-3β-醇	C ₂₈ H ₄₈ O	甾醇类	0.000 0	0.000 0	0.015 6	0.023 1	0.006 2	0.005 7	0.035 6	0.038 4	0.043 2	0.051 2	0.040 0	0.102 0
120	79.86	83-47-6	β-谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	甾醇类	2.205 4	4.083 0	3.974 2	4.203 2	2.742 9	2.024 8	1.569 0	3.654 8	3.195 2	2.794 0	1.640 0	1.964 7

“—”表示未查到相关数据。

“—” indicates that no relevant data were found.

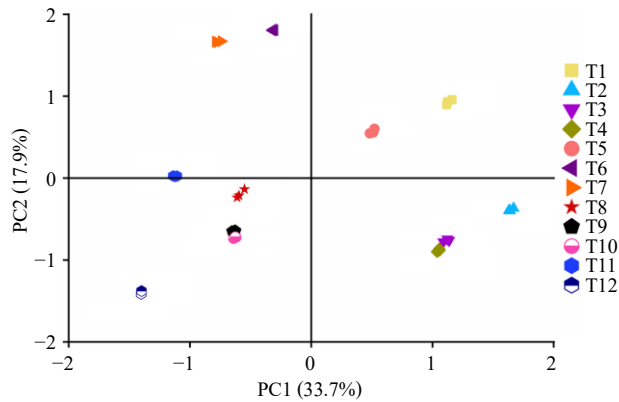


图2 不同发酵时间六神曲的 PCA 图

Fig. 2 PCA diagram of MMF with different fermentation times

可以直观的看出不同样品的差异情况，样本间的距离越近差异性越小，距离越远则差异越大。结果显示，各发酵时间点平行样品之间距离较为紧密，说明样品平行性和仪器精密度较好，不同发酵时间点六神曲样品区分效果较好，说明挥发性成分存在差异。根据 PCA 得分图，可以把不同发酵时间点样品大致分为 A (T1)、B (T2~T4)、C (T5)、D (T6、T7) 和 E (T8~T12) 5 个阶段。

OPLS-DA 是一种高效的样本分类和判别模型构建方法，能够精准剔除与分类无关的变量，筛选出样本中的特征变量，进而对观测值进行解读和预测。在基于 PCA 结果的基础上，运用 OPLS-DA 进一步分析不同发酵阶段六神曲的差异性成分。将不同发酵程度下挥发性成分的相对含量数据导入 SIMCA 14.1 软件，建立 OPLS-DA 模型。在该模型中， R^2_X 表示 X 矩阵的解释率， R^2_Y 表示 Y 矩阵的解释率， Q^2 表示模型的预测能力。本实验模型中 $R^2_X=0.981$ 、 $R^2_Y=0.996$ 、 $Q^2=0.991$ ，表明 OPLS-DA 模型具有较好的预测能力。由图 3 可知，六神曲不同发

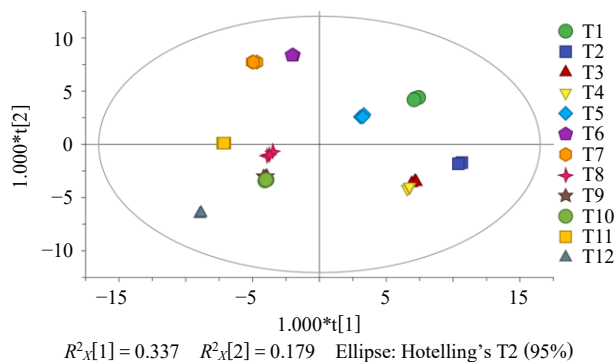


图3 六神曲不同发酵时间 OPLS-DA 图

Fig. 3 OPLS-DA diagram of MMF with different fermentation times

酵阶段的样品在 OPLS-DA 得分图中可以被很好地区分，证明该模型能够有效获取组间差异信息，实现对不同发酵阶段六神曲挥发性成分的区别。为了验证 OPLS-DA 模型的可靠性，对其进行 200 次交叉验证，置换检验结果如图 4 所示， $R^2=0.28$ ， $Q^2=-0.638$ ，且 Q^2 的回归线与纵轴相交点小于 0，说明此模型无过拟合现象，验证了模型的可靠性。因此，此结果可以用于区分不同发酵阶段六神曲的挥发性成分。

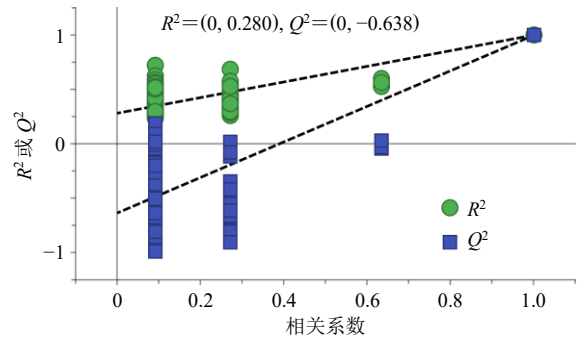
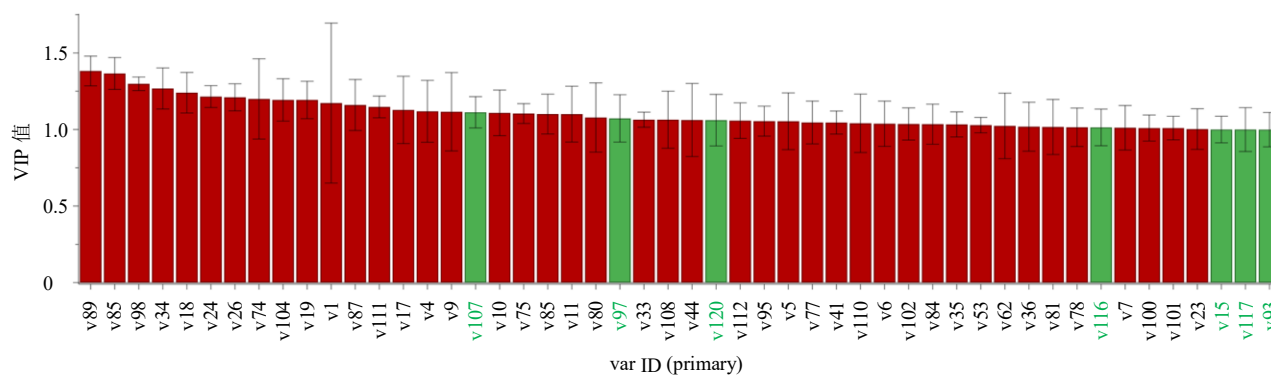


图4 六神曲不同发酵时间 OPLS-DA 模型置换检验图

Fig. 4 Permutation test diagram of OPLS-DA model for MMF at different fermentation times

为进一步体现六神曲不同发酵阶段挥发性物质的差异，对 OPLS-DA 模型的 VIP 值进行计算（图 5），挥发性成分的 VIP 值越大，说明在不同发酵阶段此挥发性成分的差异越显著。以 $VIP>1$ 且 $P<0.05$ 为筛选标准，筛选不同阶段六神曲的差异性挥发性成分共 49 种，包括酯类 15 种、烷烃类 8 种、酚类 5 种、醇类 5 种、烯炔类 4 种、羧酸类 3 种、维生素类 2 种、醚类 1 种、醛类 1 种、芳香烃类 1 种、含氮杂环类 1 种、苯并吡喃类 1 种、醚醇类 1 种、甾体类 1 种，酯类和烷烃类是不同阶段六神曲差异性成分的主要类别，这与电子鼻数据结果相一致。其中，棕榈酸被研究证实存在胃肠道积极作用，以 SN-2 位结合形式存在时，可促进肠道内益生菌的增殖，同时助力肠道对脂肪的高效吸收，并能为肠道上皮细胞提供能量，支持肠道黏膜屏障功能的维持^[21]。

椰子醛具有芳香特性，能通过嗅觉刺激反射性增强消化功能。角鲨烯在黏膜保护、炎症缓解及肠道功能维护方面都具有一定的辅助作用。维生素 E 作为强抗氧化剂，减少胃肠道氧化损伤，促进黏膜修复。15-羟基-9,12-十八碳二烯酸甲酯及其衍生物，可以通过增强肠道上皮细胞间紧密连接蛋白的表达与组装，减少肠道通透性，从而维护肠道黏膜屏障的完整性；同时，能通过抑制肠道黏膜局部促炎



红色代表关键差异性物质；绿色代表未达到标准的物质。

Red represents key differential substances; green represents substances that do not meet the screening criteria.

图5 OPLS-DA模型的VIP图

Fig. 5 VIP diagram of OPLS-DA model

信号通路的过度激活，降低促炎细胞因子的释放，对化学诱导的小鼠实验性结肠炎模型具有一定的炎症缓解作用，且可促进受损肠道上皮细胞的增殖与迁移，辅助肠道黏膜损伤后的修复过程^[22]。

利用 Origin 2024 软件对六神曲在不同发酵程度下的主要差异性成分及发酵时间进行聚类热图分析（图6）。图中，横坐标为不同发酵时间点的样品，纵坐标为主要差异性成分，其中红色代表高表达，蓝色代表低表达。从成分聚类维度看，差异性成分可大致分为2大表达群：一簇以棕榈酸、反油酸乙酯等为代表，在发酵前期高表达，随发酵进程逐渐下调，其变化反映了发酵初期微生物分泌脂肪酶、蛋白酶等胞外酶，分解原料中的脂类与蛋白质，为自身生长提供碳源与氮源；另一簇以角鲨烯、2-单棕榈酸甘油等为代表，在发酵中后期持续上调并趋于稳定，属于微生物代谢合成成分，体现了优势菌群代谢主导的成分积累规律。

从样品聚集维度看，T1、T2的相对独立聚集对应原料未充分发酵阶段，酸类、酯类化合物占主导；T3、T4的过渡性聚集可能与发酵中期微生物群落演替相关；T5~T8的紧密聚集对应代谢活跃阶段，特征成分逐渐合成；T9~T12的稳定聚集对应代谢成熟阶段，成分体系与气味品质趋于稳定。该聚类结果与PCA形成相互印证，进一步证实了不同发酵阶段挥发性成分的阶段性差异。

2.5 ROAV分析与关键香气成分鉴定

2.5.1 分析方法 本研究参考刘登勇等^[23]建立的分析思路，采用ROAV法，对不同发酵时间的六神曲中各挥发性成分的气味贡献能力进行量化评估，进而筛选出关键香气组分。该评价体系中，定义

ROAV = 100 的挥发性成分为样品气味的核心贡献组分，其余挥发性成分的ROAV值通过以下近似公式计算得出： $ROAV_i \approx 100 \times C_i / C_{max} \times T_{max} / T_i$ ，公式中各参数含义如下： C_i 表示某挥发性成分的相对百分含量， T_i 表示某挥发性成分对应的感觉阈值（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）， C_{max} 表示对样品气味贡献程度最大的挥发性成分的相对质量分数， T_{max} 表示对样品气味贡献程度最大的挥发性成分对应的感觉阈值（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）。所有挥发性成分的ROAV值均不超过100，其数值大小与该成分对样品气味的贡献程度呈正相关。ROAV ≥ 1 的挥发性成分为样品关键香气组分，直接决定样品整体气味特征； $0.1 \leq ROAV < 1$ 的挥发性成分则对样品气味起到辅助修饰作用，可丰富气味层次。

2.5.2 分析结果 虽然在六神曲发酵过程中筛选了多种差异性挥发性成分，但并不是所有的挥发性成分都是六神曲发酵过程中气味差异的物质基础。因此，利用ROAV法明确各挥发性成分对六神曲发酵过程中整体气味的贡献程度，进而确定六神曲发酵过程中气味差异的关键香气成分。

通过查阅书籍及相关文献报道^[24-27]，获得了差异性成分的感觉阈值，由于5-羟甲基糠醛的含量高和阈值低，对样品的气味贡献程度最大，故定义5-羟甲基糠醛的 $ROAV_{max} = 100$ ，计算其余差异性成分的ROAV值，结果见表2。当ROAV ≥ 1 时，认为该组分对整体风味贡献极大。由表2可知，六神曲发酵过程中共含20种关键性气味物质，其中酯类成分居多，有椰子醛、反油酸乙酯、2,4-二羟基-2,5-二甲基-3(2H)-咪喃等，在六神曲发酵过程中ROAV值逐渐升高，对六神曲特征性香味具有一定的贡献作

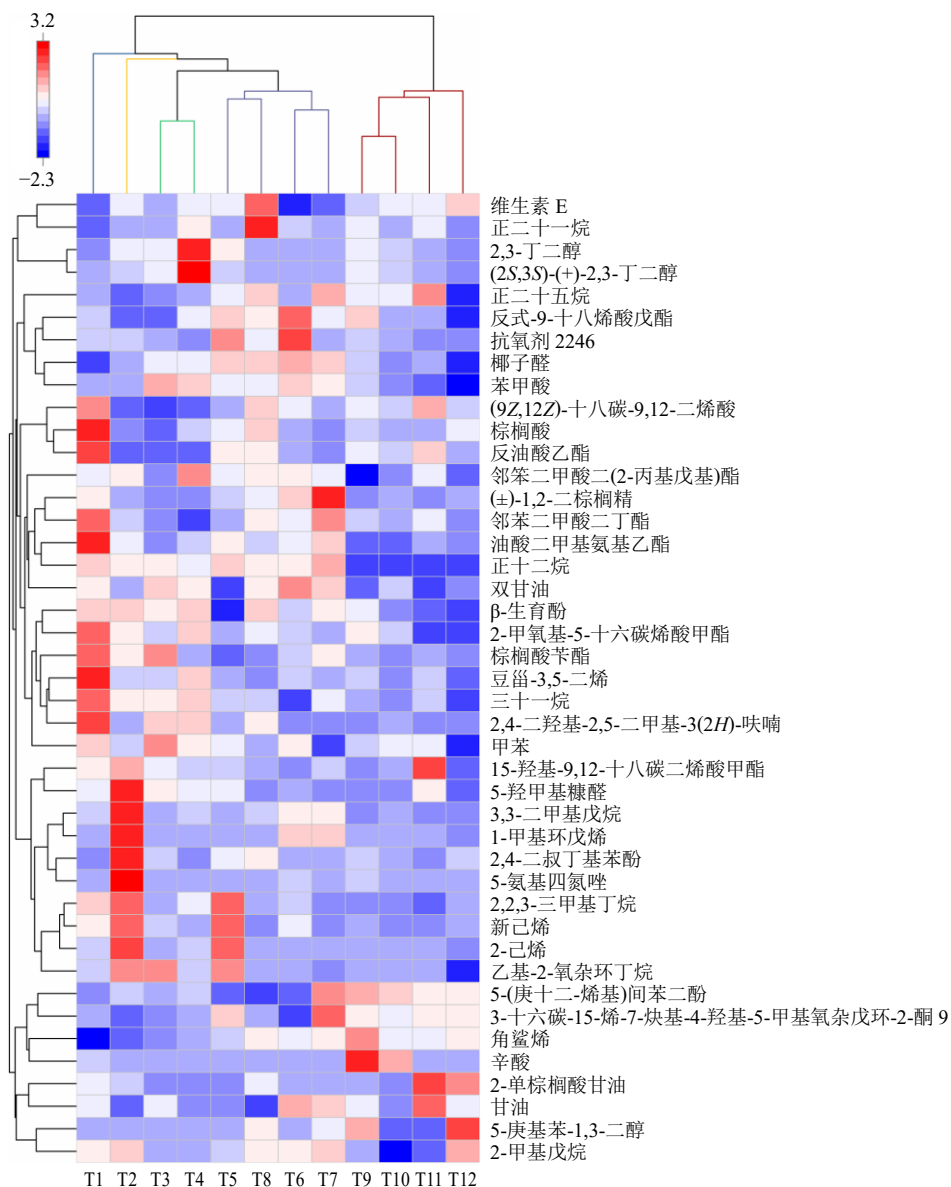


图 6 差异性成分聚类分析热图

Fig. 6 Heatmap of differential component clustering analysis

用。另外，2-己烯、反式-9-十八烯酸戊酯、3,5-二羟基-1-十九烷基苯、5-十六碳烯酸、2-甲氧基、甲酯等化合物 ROAV 值均>1，对六神曲特征性香味具有一定的修饰作用。

3 讨论

六神曲作为中医消食导滞领域的经典发酵神曲，其“芳香气浓郁、无酸败异味”的传统品质评价标准，本质是对发酵过程中挥发性成分组成与含量的直观反映。从现代药典收载情况来看，《中国药典》2025 年版与《部颁标准》共收载含发酵类中药成方制剂 400 个，其中涉及六神曲的成方制剂达 204 个，占比超 50%^[28]，其应用广度与临床需求可见一

斑。现有研究虽已初步揭示六神曲挥发性成分的类别特征，但针对发酵全过程挥发性成分的动态演变规律、关键香气物质的识别等问题尚未明确。本研究通过电子鼻技术实现了六神曲发酵过程的阶段划分，W5S、W1W、W2W 传感器的显著响应差异是阶段划分的关键依据，这与 GC-MS 检测结果形成了“宏观气味-微观成分”的交叉印证。另外，电子鼻 W2S 传感器的响应值先升后稳，对应 GC-MS 中亚油酸甲酯、油酸甲酯等酯类成分的持续累积；W3C、W6S 传感器的低响应特征，这表明六神曲发酵过程中氨类化合物、氢化物等不良产物的生成量极低，从气味学角度验证了其炮制工艺的合理性。

表2 六神曲发酵过程中差异性成分的感觉阈值和 ROAVs

Table 2 Sensory thresholds and ROAVs of differential compounds during fermentation of MMF

类别	化合物	感觉阈值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	气味特征	不同发酵时间 ROAV 值											
				T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
内酯类	3-十六碳-15-烯-7-炔基-4-羟基-5-甲基氧杂戊环-2-酮	50	椰子香、奶香	0.15	0.18	0.22	0.25	0.19	0.21	0.30	0.28	0.24	0.27	0.32	0.35
邻苯二甲酸酯类	邻苯二甲酸二(2-丙基戊基)酯	100 000	微弱塑料味	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
酚类	5-庚基苯-1,3-二醇	80	药香、酚醛味	0.88	0.92	1.05	1.12	1.20	1.18	1.25	1.30	1.15	1.22	1.28	1.35
羧酸类	辛酸	3 000	奶酪酸败味、汗味	0.12	0.15	0.18	0.20	0.22	0.25	0.28	0.30	0.26	0.32	0.35	0.38
二醇类	(2S,3S)-(+)-2,3-丁二醇	4 500	甜味、奶油味	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.72	0.78	0.82	0.85
醚醇类	双甘油	20 000	微弱甜味	0.02	0.03	0.04	0.05	0.04	0.05	0.06	0.07	0.05	0.06	0.07	0.08
多元醇类	甘油	100 000	无味	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
酯类	15-羟基-9,12-十八碳二烯酸甲酯	200	青草香、脂肪香	1.25	1.30	1.40	1.50	1.60	1.55	1.65	1.70	1.58	1.68	1.75	1.80
酚类	5-(庚十二-烯基)间苯二酚	70	酚类药香	1.50	1.60	1.75	1.85	2.00	1.95	2.10	2.20	1.98	2.15	2.25	2.35
二醇类	2,3-丁二醇	5 000	甜味、醇香	0.40	0.45	0.48	0.52	0.55	0.58	0.62	0.65	0.59	0.63	0.66	0.70
酯类	棕榈酸苄酯	500	微弱花香、蜡香	0.30	0.35	0.38	0.42	0.45	0.48	0.52	0.55	0.50	0.53	0.56	0.60
烷烃类	正二十五烷	100 000	蜡味	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
芳香烃类	甲苯	10 000	刺激性气味	0.05	0.06	0.07	0.08	0.07	0.08	0.09	0.10	0.08	0.09	0.10	0.11
环醚类	乙基-2-氧杂环丁烷	1 000	醚香	0.25	0.28	0.30	0.33	0.35	0.38	0.40	0.43	0.39	0.42	0.44	0.47
含氮杂环类	5-氨基四氮唑	150	含氮杂环味、焦味	0.80	0.85	0.95	1.05	1.10	1.15	1.25	1.30	1.18	1.28	1.35	1.40
苯并吡喃类	γ -生育酚	1 000	微弱坚果香	2.50	2.60	2.80	3.00	3.20	3.10	3.30	3.50	3.15	3.40	3.55	3.70
环烯烃类	1-甲基环戊烯	100	烃类气味	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.88	0.92	0.95	0.90	0.94	0.97	1.00
酚类	抗氧化剂 2246	100	酚类气味	3.50	3.70	4.00	4.30	4.50	4.40	4.70	4.90	4.45	4.80	5.00	5.20
酯类	2-单棕榈酸甘油	400	脂肪香、蜡香	0.75	0.80	0.88	0.95	1.02	1.05	1.12	1.18	1.08	1.15	1.20	1.25
烷烃类	3,3-二甲基戊烷	50 000	溶剂味	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03
羧酸类	棕榈酸	5 000	脂肪酸味、蜡味	0.18	0.20	0.22	0.25	0.27	0.30	0.32	0.35	0.31	0.34	0.36	0.38
酯类	(Z)-9-十六碳烯酸,苯甲酯(9CI)	150	花果香	4.50	4.80	5.20	5.60	6.00	5.90	6.30	6.60	5.95	6.40	6.70	7.00
羧酸类	苯甲酸	10 000	苯甲酸特有气味	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14	0.15	0.13	0.14	0.15	0.16
维生素 E 类	β -生育酚	1 200	微弱油脂香	2.10	2.20	2.40	2.60	2.80	2.75	2.90	3.05	2.78	3.00	3.10	3.25
酚类	2,4-二叔丁基苯酚	90	酚类、塑料味	5.50	5.80	6.30	6.80	7.20	7.10	7.50	7.80	7.15	7.60	7.90	8.20
甾醇类	β -谷甾醇	2 000	无显著气味	0.45	0.48	0.52	0.56	0.60	0.62	0.65	0.68	0.63	0.67	0.70	0.73
维生素类	维生素 E	1 500	微弱油脂气味	1.85	1.95	2.10	2.25	2.40	2.35	2.50	2.65	2.38	2.55	2.68	2.80
酯类	反式-9-十八烯酸戊酯	180	果香、脂肪香	6.80	7.20	7.80	8.40	9.00	8.80	9.40	9.80	8.85	9.50	9.90	10.30
烯烃类	2-己烯	50	青叶味	15.50	16.50	18.00	19.50	21.00	20.50	22.00	23.00	20.80	22.50	23.50	24.50
酯类	(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酸 2-(二甲基氨基)乙基酯	300	脂肪香、青香	3.20	3.40	3.70	4.00	4.30	4.20	4.50	4.70	4.25	4.60	4.80	5.00
内酯类	椰子醛	30	强烈椰子香、奶香	25.80	27.50	30.00	32.50	35.00	34.00	36.50	38.00	34.50	37.00	38.50	40.00
甾体类	豆甾-3,5-二烯	5 000	无显著气味	0.22	0.24	0.26	0.28	0.30	0.31	0.33	0.35	0.32	0.34	0.36	0.38
烯烃类	新己烯	80	烯烃气味	1.10	1.20	1.30	1.40	1.50	1.45	1.55	1.65	1.48	1.58	1.68	1.75
烷烃类	三十一烷	100 000	蜡味	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
甘油二酯类	(\pm)-1,2-二棕榈精	8 000	微弱脂肪味	0.12	0.13	0.14	0.15	0.16	0.17	0.18	0.18	0.17	0.18	0.19	0.20
烷烃类	正十二烷	10 000	煤油味	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14	0.15	0.16	0.17	0.15	0.16	0.17	0.18
酯类	邻苯二甲酸二丁酯	20 000	微弱芳香	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.10	0.11	0.12	0.13
酯类	反油酸乙酯	100	果香、脂肪香	85.00	88.00	95.00	100.00	100.00	98.00	95.00	92.00	99.00	96.00	93.00	90.00
醛类	5-羟甲基糠醛	5	焦糖香、烤香	100.00	95.00	88.00	82.00	78.00	85.00	92.00	98.00	86.00	90.00	95.00	100.00
烷烃类	正二十一烷	80 000	蜡味	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03
酯类	油酸二甲基氨基乙酯	250	脂肪香、青香	4.00	4.20	4.50	4.80	5.10	5.00	5.30	5.50	5.05	5.40	5.60	5.80

表 2 (续)

类别	化合物	感觉阈值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	气味特征	不同发酵时间 ROAV 值											
				T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
酚类	3,5-二羟基-1-十九烷基苯	60	酚类药香	8.50	9.00	9.80	10.50	11.20	11.00	11.70	12.20	11.10	11.80	12.30	12.80
烷烃类	2,2,3-三甲基丁烷	40 000	溶剂味	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.07
三萜烯炔类	角鲨烯	1 000	微弱油脂气味	2.80	2.90	3.10	3.30	3.50	3.40	3.60	3.80	3.45	3.70	3.85	4.00
酯类	5-十六碳烯酸,2-甲氧基,甲酯	220	果香、脂肪香	5.20	5.50	5.90	6.30	6.70	6.60	7.00	7.30	6.65	7.10	7.40	7.70
内酯类	2,4-二羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃	40	焦糖香、甜香	18.50	19.50	21.00	22.50	24.00	23.50	25.00	26.00	23.80	25.50	26.50	27.50
烷烃类	3-甲基己烷	30 000	烃类气味	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.11	0.09	0.10	0.11	0.12
甾烷醇类	5 α (H)-樟脑醇	3 000	微弱蜡味	0.30	0.32	0.35	0.38	0.41	0.43	0.46	0.48	0.44	0.47	0.49	0.51

从 GC-MS 分析结果来看,发酵过程是“原料成分降解-中间产物生成-终产物富集”的动态平衡:初始阶段,原料中高含量的顺式-13-十八碳烯酸逐步降解,为后续酯类合成提供前体;中期微生物代谢活跃,实现物质成分的转化;后期则形成以酯类、甾醇类为核心的稳定体系。这一过程通过发酵降低原料中可能存在的燥性成分,同时生成具有温和香气与明确药效的特征成分。ROAV 法作为量化香气贡献的核心手段,明确了六神曲特征气味的物质基础——5-羟甲基糠醛,该成分作为美拉德反应的特征产物^[29],不仅是六神曲芳香气的核心来源,且具有抗炎、抗氧化等生物活性^[30-31]。5-羟甲基糠醛虽非六神曲消食化积、健脾和胃的核心药效成分,但与其与六神曲的药效存在一定的科学关联:其一,5-羟甲基糠醛的生成与六神曲发酵的核心工艺高度耦合,可作为发酵工艺的特征性标志物,其含量可反映发酵过程中淀粉酶解效率与微生物代谢活性,间接关联药效的稳定性与一致性;其二,5-羟甲基糠醛具有肠道黏膜保护与肠道微生态调节的药理活性^[32-33],可协同核心药效成分发挥作用。这一现象在其他发酵食品中也有类似发现,推测美拉德反应可能是发酵类产物“风味-功效”协同提升的共性机制。

本研究虽系统揭示了六神曲发酵过程中挥发性成分的变化规律,但对水溶性成分的动态变化及贡献缺乏研究,后续可通过 UPLC-Q-TOF-MS 等技术补充水溶性成分分析,结合网络药理学构建“成分-靶点-功效”关联网络。此外,整合微生物组学与代谢组学技术,明确优势菌群对特征成分的合成调控机制,填补传统发酵中药“菌群-成分”关联机制的研究空白,为六神曲发酵的物质基础研究提供机制性的科学解释。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 甄权. 药性论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 12-15.
- [2] 付婷婷, 尹兴斌, 蔡梦如, 等. 曲类中药的品种整理和标准现状分析 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(10): 2699-2712.
- [3] 赵志君, 杨莹莹, 张璐, 等. 麸炒六神曲炮制工艺及质量标准研究 [J]. 山西医科大学学报, 2024, 55(1): 113-117.
- [4] 庄肇滕. 鞭毛蛋白调控 IBS-D 内脏敏感性的机制及六神曲的干预作用研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2024.
- [5] 于大猛, 周一奇, 李惠芳, 等. 六神曲传统制作工艺考证 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(7): 1288-1293.
- [6] 殷娴, 曹爽, 郭慧敏, 等. 六神曲两步法发酵微生物群落结构及功能分析 [J]. 中国酿造, 2023, 42(12): 54-61.
- [7] 丁海玲, 时海燕, 王爽, 等. 六神曲发酵过程中酶学性质与微生物群落变化相关性研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(17): 1980-1986.
- [8] 殷娴, 曹爽, 郭慧敏, 等. 六神曲发酵过程挥发性风味成分的变化及中药组分缺失对其风味的影响 [J]. 中国酿造, 2024, 43(1): 222-229.
- [9] 冯文豪, 田亮玉, 施钧瀚, 等. 电子鼻技术应用于川贝母真伪及规格辨识的可行性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(13): 108-118.
- [10] 代悦, 于定荣, 刘颖, 等. 基于智能感官分析技术探讨古代经典方法炮制过程中苦参的气味和味道变化规律 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(24): 6410-6416.
- [11] 黄得栋, 何微微, 晋玲, 等. 基于电子鼻技术区分不同产地的南五味子 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(23): 22-26.
- [12] 刘万丽, 高建梅, 鲁道旺, 等. 基于 GC-MS 及主成分分析评价不同产地宽叶缬草挥发油成分差异 [J]. 中药材, 2025, 48(6): 1467-1472.

- [13] 吴东源, 林海生, 陆大鹏, 等. 基于电子鼻、GC-IMS 和 GC-MS 分析干燥方式对墨西哥湾扇贝挥发性成分的影响 [J/OL]. 食品工业科技, (2025-10-17) [2026-02-25]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2025070209>.
- [14] 叶雨, 康传志, 张际昭, 等. 基于非靶向组学结合化学计量学方法分析新疆紫草差异成分 [J]. 中国现代中药, 2025, 27(2): 248-257.
- [15] 李涵, 王艳丽, 范雪花, 等. 电子鼻技术应用于白及其近似饮片快速辨识的可行性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(13): 157-165.
- [16] 肖庚鹏, 廖丹丹, 李桂生, 等. 气相色谱-串联质谱法测定食用油中角鲨烯和氧化角鲨烯及角鲨烯热稳定性评价 [J]. 色谱, 2025, 43(7): 815-822.
- [17] Schiaffi V, Barras F, Bouveret E. Matching the β -oxidation gene repertoire with the wide diversity of fatty acids [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2024, 77: 102402.
- [18] Stergiou P Y, Foukis A, Filippou M, *et al*. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions [J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1846-1859.
- [19] Evans J L, Gealt M A. The sterols of growth and stationary phases of *Aspergillus nidulans* cultures [J]. *J Gen Microbiol*, 1985, 131(2): 279-284.
- [20] 雷茜茜. 角鲨烯的抗氧化活性及其脂质体制备研究 [D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [21] Yaron S, Shachar D, Abramam L, *et al*. Effect of high β -palmitate content in infant formula on the intestinal microbiota of term infants [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2013, 56(4): 376-381.
- [22] Miyamoto J, Mizukure T, Park S B, *et al*. A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(5): 2902-2918.
- [23] 刘登勇, 周光宏, 徐幸莲. 确定食品关键风味化合物的一种新方法: “ROAV”法 [J]. 食品科学, 2008, 29(7): 370-374.
- [24] 孙宝国, 陈海涛. 食用调香术 [M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2010: 330.
- [25] 刘登勇, 赵志南, 吴金城, 等. 基于 SPME-GC-MS 分析熏制材料对熏鸡腿挥发性风味物质的影响 [J]. 食品科学, 2019, 40(24): 220-227.
- [26] 刘登勇, 吴金城, 王继业, 等. 沟帮子熏鸡主体风味成分分析 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 237-242.
- [27] 沈菲, 罗瑞明, 丁丹, 等. 基于相对气味活度值法的新疆大盘鸡中主要挥发性风味物质分析 [J]. 肉类研究, 2020, 34(8): 46-50.
- [28] 齐英, 曾元宁, 王长福, 等. 六神曲的现代研究进展 [J/OL]. 中华中医药学刊, (2025-09-12) [2026-02-25]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20250912.1255.012>.
- [29] 苑彬, 金慧, 骈琳, 等. 美拉德反应对食品品质与安全的影响及其产物检测研究进展 [J]. 轻工学报, 2024, 39(2): 60-68.
- [30] 刘月新, 潘雪, 邹茜, 等. 探讨 5-羟甲基糠醛在中药及复方中的存在意义 [J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(15): 3-5.
- [31] 傅紫琴, 王明艳, 蔡宝昌. 5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 在中药中的研究现状探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 508-510.
- [32] 冯元, 周鹤庭, 徐永江, 等. 5-HMF 对黄条鲷生长、肠道组织结构及生理特性的影响 [J]. 中国水产科学, 2024, 31(2): 185-196.
- [33] 赵玲, 周臣清, 朱婉清, 等. 5-羟甲基糠醛的生物安全性和生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(11): 372-377.

[责任编辑 郑礼胜]