

基于超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法的黑蒜加工过程中特征成分变化规律

吴 鹏¹, 刘平香², 王玉涛², 高 瑞², 江育荧², 毕京秀², 王正荣^{1,3,*}

(1.河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北 邯郸 056107;

2.山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 山东省食品质量安全检测技术重点实验室, 山东 济南 250100;

3.邯郸市天然产物与功能食品开发重点实验室, 河北 邯郸 056107)

摘 要: 基于超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱技术建立了黑蒜中10种风味前体物质和21种游离氨基酸同时测定的检测方法。将该方法应用于黑蒜加工过程中特征成分变化规律的研究, 结果表明, 在温度75℃、相对湿度85%条件下, 黑蒜中的特征成分含量在加工过程中发生了较大改变。其中, γ -氨基丁酸、*S*-烯丙基-*L*-半胱氨酸、异蒜氨酸、谷氨酰胺、甲基蒜氨酸、蒜氨酸、色氨酸和 γ -*L*-谷氨酰-*S*-烯丙基-*L*-半胱氨酸变化最为显著, 是黑蒜加工过程中小分子代谢物变化的化学标志物。该方法灵敏度高、准确性好, 可满足检测需求。

关键词: 黑蒜; 加工; 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱; 含硫化合物; 游离氨基酸

Changing Pattern of Characteristic Components in Black Garlic during Processing Analyzed by Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry

WU Peng¹, LIU Pingxiang², WANG Yutao², GAO Rui², JIANG Yuying², BI Jingxiu², WANG Zhengrong^{1,3,*}

(1. College of Life Science and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056107, China;

2. Shandong Provincial Key Laboratory of Test Technology on Food Quality and Safety, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China;

3. Handan City Key Laboratory of Natural Products and Functional Food Development, Handan 056107, China)

Abstract: An analytical method based on ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-TQ-MS/MS) was established for the simultaneous determination of 10 flavor precursors and 21 free amino acids in black garlic. The method was applied for exploring the changing pattern of characteristic components in black garlic during processing. The results showed that the characteristic components in black garlic changed significantly during processing at 75 °C and 85% relative humidity. Among them, γ -aminobutyric acid, *S*-allyl-*L*-cysteine, isoalliin, glutamine, methiin, alliin, tryptophan, and γ -*L*-glutamyl-*S*-allyl-*L*-cysteine changed most obviously, and were identified as the chemical markers of changes in small molecular metabolites during the processing of black garlic. The established method has high sensitivity and accuracy, and can meet the detection requirements.

Keywords: black garlic; processing; ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry; sulfur-containing compounds; free amino acids

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230329-292

中图分类号: TS255.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)01-0082-09

引文格式:

吴鹏, 刘平香, 王玉涛, 等. 基于超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法的黑蒜加工过程中特征成分变化规律[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 82-90. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230329-292. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-03-29

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32101956); 山东省重点研发计划项目(LJNY202120);

山东省农业科学院农业科技创新工程项目(CXGC2022E05; CXGC2022B04)

第一作者简介: 吴鹏(1998—)(ORCID: 0009-0007-9456-7188), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏。

E-mail: 2215648831@qq.com

*通信作者简介: 王正荣(1978—)(ORCID: 0000-0002-2451-6840), 女, 副教授, 博士, 研究方向为农产品加工与贮藏。

E-mail: wazhro@qq.com

WU Peng, LIU Pingxiang, WANG Yutao, et al. Changing pattern of characteristic components in black garlic during processing analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2024, 45(1): 82-90. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230329-292. <http://www.spkx.net.cn>

黑蒜是用新鲜大蒜带皮放在高温高湿环境自然老化一段时间制成的产品。现代黑蒜加工技术最早始于21世纪初的日本青森县^[1], 2004年韩国Scott Kim进一步改良了黑蒜加工工艺, 使其成为风靡产品^[2-3]。黑蒜在加工过程中, 自身组织被破坏, 内含物发生了一系列的酶促反应和非酶褐变反应, 包括美拉德反应、焦糖化反应等^[4]。黑蒜质地软糯, 辛辣味和臭味基本消失, 带有甜味、口感好, 可直接食用, 应用前景广阔^[5]。同时, 黑蒜具有更丰富的营养成分和更强的生理活性。研究表明, 相较于鲜蒜, 黑蒜中多酚类物质含量高5倍以上^[6], 超氧化物歧化酶活性高出10倍以上^[7], 糖、总酸和对身体有益的Mn、Cu、Zn、Se元素含量升高, 有害Pb元素含量下降^[8]。此外, 黑蒜的抗氧化能力、羟自由基清除率分别是大蒜的10倍和3倍^[9]。含硫化合物是大蒜中最重要的一类功能性成分, 主要包括蒜氨酸等风味前体物质以及大蒜细胞破碎后蒜氨酸与蒜氨酸酶反应生成的大蒜素等硫代亚磺酸酯类物质。黑蒜加工过程中, 含硫化合物在酶和高温高湿作用下发生了一系列的转化, 使其功效进一步增强, 如大蒜中的S-烯丙基半胱氨酸和蒜氨酸等含硫氨基酸在加热后生成的阿霍烯具有抗癌、预防糖尿病、降低胆固醇等作用, 大蒜素与VB₁生成的蒜硫胺素具有抗疲劳、强肝护精的作用, 且更易被肠道吸收^[10]。因此, 黑蒜的研发备受世界各地的关注与青睐。

目前, 对于黑蒜品质形成机理的研究还处于初级阶段, 尤其是针对黑蒜加工过程中营养成分转化的研究主要集中在糖类、总酚、挥发性成分等方面, 而针对大蒜中重要的含硫化合物等特征性成分变化规律的研究鲜见报道。Bae等^[11]基于高效液相色谱-紫外检测器 (high performance liquid chromatography-ultraviolet detector, HPLC-UV) 建立了黑蒜中S-烯丙基-L-半胱氨酸 (S-allyl-L-cysteine, SAC) 的测定方法。史润东东^[12]利用HPLC-UV建立了同时定量蒜氨酸和SAC的方法, 并应用于黑蒜产品的分析。Arnault等^[13]通过应用HPLC-UV将庚烷磺酸作为离子对试剂, 最终实现了SAC、蒜氨酸等3种成分的同时定量。许珂珂等^[14]基于HPLC-二极管阵列检测器实现了对蒜氨酸的快速检测。卢连登等^[15]通过建立HPLC的方法实现了黑蒜中蒜氨酸、脱氧蒜氨酸及 γ -谷氨酰半胱氨酸的同时测定。但以上报道对于黑蒜中成分变化规律的研究较少, 且大部分报道只针对一种或几种成分进行研究, 缺乏多个因素综合考虑的相关研究。

目前, 对黑蒜中风味前体物质传统的检测方法主要为HPLC-UV法, 该方法操作简单、仪器设备成本相对较低, 但蒜氨酸等风味前体物质极性较大, 使其很难达到所需的分离效果, 导致基质干扰严重, 且该类化合物紫外吸收能力相对较弱, 很难实现多种化合物的同时分析。超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry, UPLC-QQQ-MS/MS) 的多重反应监测 (multi-reaction monitoring, MRM) 模式能极大地避免基质对目标物的干扰, 不需进行衍生化等繁琐的前处理过程^[16], 分析时间短、溶剂消耗小, 且具备更高的分离能力和高灵敏度^[17], 是化学成分定量分析的强大工具, 适合于多种成分及低含量成分的准确定量分析^[18]。目前, 该技术已成功应用于柑橘、豆类、葡萄酒、茶叶样本中特征成分的分析^[19-22]。然而, 目前基于该技术对黑蒜品质变化规律的研究鲜见报道。

因此, 本研究旨在建立一种能够同时准确测定黑蒜中31种特征成分的UPLC-QQQ-MS/MS定量分析方法, 在此基础上对不同发酵阶段黑蒜中的特征性成分含量水平进行分析, 并进一步对其转化规律进行探究。该研究一方面可为后期黑蒜功能性成分的挖掘和开发奠定坚实基础; 另一方面, 可进一步丰富黑蒜生物化学理论, 对提升黑蒜品质、增加附加值、促进我国大蒜产业经济发展具有极大帮助。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

黑蒜为本实验室自加工样品, 原料为金乡紫皮蒜, 在温度75℃、相对湿度85%条件下发酵8d, 每天取样一次, 每个样品3个重复。取样剥皮冷却至室温后于液氮中速冻, 随后置于冷冻干燥机中冷冻干燥72h, 采用冷冻研磨仪粉碎后置于-80℃冰箱中保存待测。

甲酸 (质谱级) 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 乙腈 (质谱级) 天津市康科德科技有限公司; 甲醇 (色谱级) 默克股份两合公司; 本工作共采用的32个化学标准品由上海吉至生化科技有限公司、美国USP、阿尔塔科技有限公司、日本Nacalai和北京思源勇拓科技有限公司提供; 实验用水采用Milli-Q纯化系统纯化 (18.2 M Ω)。

1.2 仪器与设备

1290 Infinity II液相色谱-G6465B Ultivo三重四极杆质谱仪 美国安捷伦科技公司; GT200振动球磨仪 北京格璃德曼仪器设备有限公司; 高低温(交变)湿热试验箱 上海蓝豹试验设备有限公司; 3K15高速冷冻离心机 曦玛离心机(扬州)有限公司; FA/JA系列电子天平 上海上平仪器有限公司; TU-1810PC紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; FreeZone台式冷冻干燥机 美国Labconco公司; KQ-250超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; HH-S数显恒温水浴锅 天津赛得利实验分析仪器制造厂; SCDEALL VX-III多管涡旋振荡仪 北京踏锦科技有限公司; 100~1 000 μL 手动移液枪 德国艾本德股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 混合标准溶液的制备

根据化合物极性等性质的不同, 分别采用不同比例的甲醇和水混合溶液对标准品进行溶解和配制。准确称取一定量的标准品(准确到0.01 mg)于10 mL容量瓶中, 将其溶解并稀释至刻度, 配制标准储备溶液, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存; 吸取适当体积的各标准品储备液, 用甲醇-水(50:50, *V/V*)稀释, 配制成质量浓度为10 mg/L的混合标准中间溶液, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮藏备用; 用0.1%甲酸溶液稀释混合标准中间溶液, 配制质量浓度为1~1 000 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作溶液, 现用现配^[23]。

1.3.2 样品前处理

准确称取200 mg黑蒜粉于50 mL离心管中, 加入20 mL的0.1% (体积分数, 下同)甲酸溶液, 涡旋2 min后于常温条件下超声10 min。将混合溶液于8 000 r/min离心5 min, 取上清液过0.22 μm 滤膜于进样小瓶中, 分别将提取液稀释20、400倍, 保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。根据需求选择合适的稀释浓度进样用于分析。

1.3.3 仪器条件

液相色谱条件: 色谱柱: Waters Xbridge C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm, 3.5 μm); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 0.1%甲酸溶液(A相)和0.1%甲酸-乙腈溶液(B相); 流速: 0.3 mL/min; 梯度洗脱: 0~2 min, 98%~2% A、2%~98% B; 2~14 min, 2% A、98% B; 14~15 min, 2%~98% A、98%~2% B; 15~15.1 min, 98% A、2% B; 15.1~18 min, 98% A、2% B; 进样量: 5 μL 。

质谱条件: 离子源: 电喷雾离子源; 检测方式: MRM; 离子源温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; 锥孔气流量: 8 L/min; 雾化气压力: 30 psi; 鞘气温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气流量: 1 L/min。

1.3.4 方法学考察

分别对方法的线性、检出限(limit of detection, LOD)、定量限(limit of quantification, LOQ)、准确度和精密度等进行考察。以目标物实际质量浓度为横坐标, 相应的峰面积为纵坐标, 通过回归拟合获得各成分的标准曲线。标准曲线的绘制至少设置7个系列质量浓度; LOD和LOQ分别为3倍和10倍的信噪比; 方法的准确度用回收率评价^[24]。设置低、中、高3个添加水平, 分别约为黑蒜中化合物原始含量的50%、100%、200%。同时, 采用外源性物质 L -色氨酸- D_5 (tryptophan- D_5 , Trp- D_5)对回收率进行进一步的验证。由于本研究中很难找到含硫化合物和氨基酸的基质空白样品, 因此, 采用斜率法对基质效应进行评估, 斜率计算公式为: 斜率=基质标准曲线斜率/溶剂标准曲线斜率。斜率为0.8~1.2时, 说明基质效应较弱, 可采用溶剂标样定量; 当斜率低于0.8或高于1.2时, 则说明存在基质抑制或基质增强效应, 应采用基质标定量^[24-25]。

1.4 数据处理

质谱采集原始数据经MRM离子对提取、峰面积计算和标准曲线拟合等步骤后, 最终获得各目标物的质量浓度。根据稀释倍数、提取溶液体积和样品质量, 将质量浓度转化为黑蒜中目标物的含量, 以干质量计算(mg/kg)。

主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)等多元数据统计分析采用SIMCA-P 14.1软件(瑞典Umetrics公司)进行分析, 聚类热图通过Mev软件进行制作; 采用Origin 96进行折线图的绘制。

2 结果与分析

2.1 分析方法建立

在前期课题组建立的大蒜中28种特征成分方法的基础上^[26], 对方法的液相色谱及质谱条件进行了进一步优化, 其中31种化合物和Trp- D_5 的监测离子对信息、碎裂电压和碰撞电压等质谱参数如表1所示。其中, 环蒜氨酸、蒜氨酸和异蒜氨酸为同分异构体, 三者相对分子质量均为177.221, 分子式均为 $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}$ 。因此, 本研究同时进行色谱条件优化, 对梯度洗脱程序进行调整, 使同分异构体能够实现基线分离, 仪器测定按照1.3.3节条件进行。在优化的程序下, 经标样确证, 环蒜氨酸、蒜氨酸和异蒜氨酸的出峰时间分别为

3.912、4.750 min和5.288 min。通过优化其MRM离子对发现, m/z 178.1→88.2 (图1A) 和 m/z 178.1→42.1 (图1C) 为3个化合物的共性离子对。从图1B可以看出, m/z 178.1→74.1仅在4.75 min处有较强的信号, 因此可以作为蒜氨酸的特异离子对, 用作蒜氨酸的定量离子对; 同样的, m/z 178.1→91.1 (图1D) 仅在3.912 min处有较强信号, 可用作环蒜氨酸的定量离子对。

表1 31种黑蒜特征成分和Trp- D_5 的名称、保留时间、MRM离子对及质谱检测参数

Table 1 Retention times, MRM ion pairs and mass spectrometric parameters of 31 characteristic components in black garlic and Trp- D_5

特征成分	保留时间/min	m/z		碎裂电压/V	碰撞电压/V
		母离子	子离子		
丙氨酸 (alanine, Ala)	3.619	90.1	44.0*	60	5
蒜氨酸 (alliin)	4.750	178.1	74.1/88.2*	65	21/21
精氨酸 (arginine, Arg)	3.408	175.1	70.1*/60.1	93	25/13
天冬酰胺 (asparagine, Asn)	3.563	133.1	74.3/87.1*	93	13/5
天冬氨酸 (aspartic acid, Asp)	3.627	134.0	73.4/88.2*	113	9/9
环蒜氨酸	3.912	178.1	91.1/88.2*	75	9/5
半胱氨酸 (cysteine, Cys)	3.800	122.0	58.9*/75.9	70	17/9
γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)	3.673	104.1	87.1*/45.1	78	5/21
γ -谷氨酰-半胱氨酸 (γ -glutamyl cysteine, γ -GC)	6.317	251.1	84.0*/122.0	90	25/9
谷氨酰胺 (glutamine, Gln)	3.616	147.1	84.1*/130.1	88	17/5
谷氨酸 (glutamic acid, Glu)	3.712	148.1	84.1*/102.0	78	13/9
甘氨酸 (glycine, Gly)	3.545	76.0	30.0*/48.1	78	5/5
γ -L-谷氨酰-S-烯丙基-L-半胱氨酸 (γ -L-glutamyl-S-allyl-L-cysteine, GSAC)	12.632	291.1	145.2*/73.2	80	13/25
γ -L-谷氨酰-S-甲基-L-半胱氨酸 (γ -L-glutamyl-S-methyl-L-cysteine, GSMC)	9.689	265.1	119.1*/136.2	75	13/8
组氨酸 (histidine, His)	3.345	156.1	110.1*/83.0	93	9/25
异亮氨酸 (isoleucine, Ile)	8.859	132.1	86.1*/43.1	83	5/17
异蒜氨酸	5.288	178.1	88.2/42.1*	65	17/13
亮氨酸 (leucine, Leu)	9.825	12.1	86.1*/43.1	83	5/25
赖氨酸 (lysine, Lys)	3.293	147.1	84.1*/130.1	88	13/5
蛋氨酸 (methionine, Met)	6.031	150.1	104.0*/133.1	83	5/5
甲基蒜氨酸	3.679	152.0	88.1*/42.0	65	9/17
苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe)	12.560	166.1	120.1*/77.1	88	9/45
脯氨酸 (proline, Pro)	3.941	116.1	70.1*/68.2	88	13/33
S-烯丙基-L-半胱氨酸 (S-allyl-L-cysteine, SAC)	9.618	162.1	145.0*/73.0*	70	5/13
丝氨酸 (serine, Ser)	3.565	106.1	60.0*/42.0	83	9/17
S-甲基-L-半胱氨酸 (S-methyl-L-cysteine, SMC)	4.260	136.0	119.1*/73.1	60	5/17
(反-1-丙烯基)-L-半胱氨酸 (S-(trans-L-propenyl)-L-cysteine, SPC)	12.389	162.1	145.0*/73.0	65	5/29
苏氨酸 (threonine, Thr)	12.565	120.1	103.1/77.1*	139	17/29
色氨酸 (tryptophan, Trp)	12.676	205.1	188.2*/146.1	93	5/13
Trp- D_5	11.931	210.1	150.1*/122.2	88	17/29
酪氨酸 (tyrosine, Tyr)	9.132	182.1	136.1*/91.1	83	9/29
缬氨酸 (valine, Val)	4.972	118.1	72.1*/55.0	83	5/21

注: *.定量离子对。

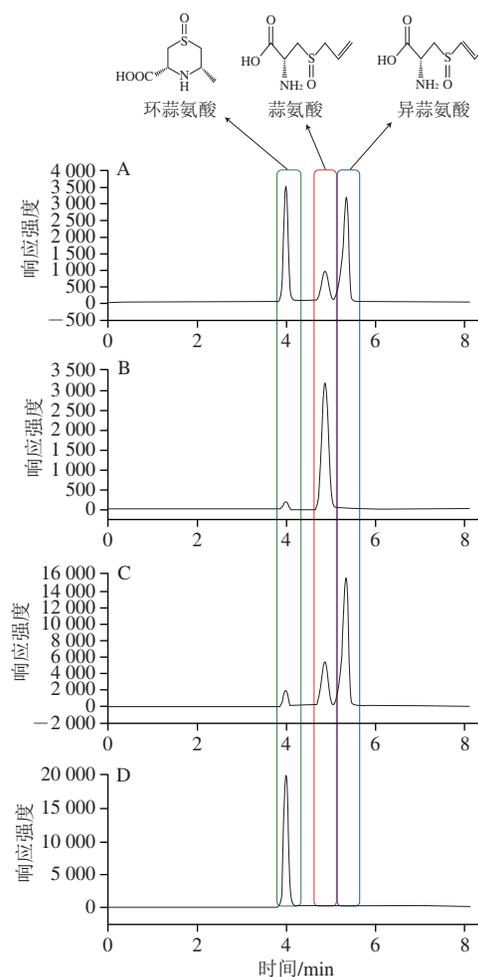


图1 m/z 178.1→88.2 (A)、 m/z 178.1→74.1 (B)、 m/z 178.1→42.1 (C) 和 m/z 178.1→91.1 (D) 的离子流色谱图

Fig. 1 Ion current chromatograms of m/z 178.1→88.2 (A), m/z 178.1→74.1 (B), m/z 178.1→42.1 (C), and m/z 178.1→91.1 (D)

2.2 方法学考察结果

31种化合物的标准曲线、LOD和LOQ如表2所示, 回收率和基质效应如表3所示。结果表明, 31种化合物在各自的线性范围内均呈现出良好的线性关系 ($R^2 > 0.9943$)。除GABA (LOD和LOQ分别为2 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和4 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)外, 其他化合物的LOD和LOQ均不高于500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 可满足检测需求。样品基质在3个加标水平下的回收率在60.55%~136.23%之间, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 低于20%。因缺少这31种化合物的黑蒜空白基质样品, 可能会导致在回收率评价过程中会存在一定的偏差, 因此, 本研究进一步采用Trp的同位素 (Trp- D_5) 对方法的准确度进行验证, 从表3可以看出, Trp- D_5 在低、中、高三个添加水平下, 回收率在90%~102%之间, 进一步验证了方法的准确性。此外, 如表3所示, 31种化合物的基质效应在0.8~1.2之间, 基质效应相对较小, 可采用溶剂标样进行定量。该法绿色环保、简便快速、准确可靠, 因此, 本

实验建立的UPLC-QQQ-MS/MS定量分析方法具有良好的准确性和精密度,可用于黑蒜中31种特征成分的检测。

表2 31种特征成分和Trp- D_3 的标准曲线、LOD和LOQ

Table 2 Standard curves, limit of detection and limit of quantification of 31 characteristic components and Trp- D_3

特征成分	线性方程	线性范围/ ($\mu\text{g/L}$)	R^2	LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)
蒜氨酸	$y=368.755\ 951x+3\ 193.843\ 745$	5~2 000	0.999 8	40	200
Arg	$y=24.483\ 890x-3.788\ 215$	5~1 000	0.999 9	50	100
Asn	$y=230.666\ 087x+336.745\ 572$	2~2 000	0.999 7	40	80
Asp	$y=54.929\ 098x-40.556\ 129$	10~2 000	0.999 0	200	400
环蒜氨酸	$y=27.435\ 415x+435.119\ 973$	10~2 000	0.999 6	200	400
Cys	$y=107.558\ 786x-282.546\ 324$	5~2 000	0.999 4	200	500
GABA	$y=10.752\ 662x-121.596\ 787$	100~5 000	0.996 0	2 000	4 000
γ -GC	$y=415.340\ 799x-4\ 718.328\ 895$	2~2 000	0.999 0	40	80
Gln	$y=57.791\ 883x-440.205\ 134$	10~2 000	0.999 7	500	1 000
Glu	$y=261.859\ 925x+2\ 281.914\ 744$	2~2 000	0.998 0	40	80
Gly	$y=280.317\ 333x+2\ 011.167\ 538$	2~5 000	0.999 9	40	80
GSAC	$y=19.120\ 606x+57.208\ 514$	10~2 000	0.999 9	200	400
GSMC	$y=234.491\ 766x+481.564\ 451$	0.5~2 000	0.999 9	20	50
His	$y=70.483\ 452x-351.921\ 775$	5~1 000	0.999 9	0.1	0.3
Ile	$y=212.981\ 545x+805.283\ 301$	10~2 000	0.999 8	200	400
异蒜氨酸	$y=1\ 305.447\ 095x-1\ 124.799\ 600$	5~5 000	0.999 9	80	200
Leu	$y=30.261\ 366x+2357.162\ 995$	2~2 000	0.995 9	70	200
Lys	$y=1\ 322.941\ 547x-6\ 158.306\ 260$	5~5 000	0.999 8	80	200
Met	$y=285.193\ 278x-6\ 425.459\ 620$	5~5 000	0.994 3	80	200
甲基蒜氨酸	$y=195.385\ 979x-873.177\ 764$	5~2 000	0.999 9	80	200
Phe	$y=105.139\ 346x+1\ 600.556\ 423$	5~1 000	0.999 6	100	200
Pro	$y=795.618\ 088x+3\ 849.447\ 365$	0.1~5 000	0.999 9	2	4
SAC	$y=872.545\ 142x+753.511\ 291$	2~5 000	0.999 9	40	80
Ser	$y=248.045\ 422x-963.294\ 841$	5~1 000	0.999 9	100	200
SMC	$y=236.316\ 252x-526.875\ 051$	2~2 000	0.998 5	40	80
SPC	$y=339.450\ 194x+674.508\ 057$	5~1 000	0.999 9	0.5	1
Thr	$y=48.127\ 502x+501.591\ 851$	5~500	0.999 5	50	100
Trp	$y=288.005\ 119x+2\ 253.175\ 399$	2~2 000	0.999 9	40	80
Trp- D_3	$y=378.378\ 002x+3\ 080.333\ 845$	0.5~5 000	0.999 9	8	20
Tyr	$y=99.416\ 200x+53.231\ 660$	10~1 000	0.999 9	500	1 000
Val	$y=239.176\ 645x-376.109\ 616$	10~5 000	0.999 9	200	400
蒜氨酸	$y=771.176\ 040x+7\ 279.463\ 519$	5~2 000	0.999 4	80	200

表3 31种特征成分和Trp- D_3 在低、中、高3个加标水平下的回收率、相对标准偏差和基质效应

Table 3 Recoveries, relative standard deviations and matrix effect of 31 characteristic components and Trp- D_3 at three spiked concentration levels

特征成分	添加量/(mg/kg)			低		中		高		基质效应
	低	中	高	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	
蒜氨酸	250	500	1 000	108.35	2.04	117.90	6.12	103.53	12.08	0.9
Arg	25	50	100	111.15	3.07	113.20	8.81	96.24	5.11	1.1
Asn	2500	5 000	10 000	71.85	12.92	91.58	13.92	74.07	9.55	0.8
Asp	500	1 000	2 000	120.92	3.55	125.71	12.31	103.08	3.01	1.1
环蒜氨酸	500	1 000	2 000	112.50	7.59	114.99	17.31	117.31	3.27	1.1
Cys	1 000	2 000	4 000	136.23	7.29	118.07	8.93	97.64	2.61	1.1
GABA	5	10	20	61.48	3.59	62.67	10.00	68.63	4.20	1.1
γ -GC	50	100	200	60.55	4.74	62.67	5.15	65.18	1.49	1.1
Gln	5	10	20	93.23	9.14	108.17	2.57	108.62	1.62	1.1
Glu	5	10	20	62.09	3.98	62.00	10.50	61.03	1.84	1.0
Gly	250	500	1 000	98.85	15.71	97.80	12.87	102.13	2.56	1.2

续表3

特征成分	添加量/(mg/kg)			低		中		高		基质效应
	低	中	高	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	
GSAC	50	100	200	86.99	4.09	94.97	5.13	96.10	1.09	1.1
GSMC	250	500	1 000	106.20	4.09	103.96	4.05	103.57	0.90	1.2
His	500	1 000	2 000	117.96	7.56	113.12	7.09	97.50	1.09	1.1
Ile	50	100	200	81.50	6.66	79.59	1.33	77.70	3.24	0.9
异蒜氨酸	100	200	400	93.77	3.66	93.62	7.12	98.03	1.93	1.0
Leu	5	10	20	68.01	10.37	89.24	2.65	109.99	3.15	1.1
Lys	250	500	1 000	89.03	2.86	94.16	9.26	98.19	2.79	1.0
Met	250	500	1 000	107.02	1.92	122.72	9.71	106.08	1.85	1.0
甲基蒜氨酸	25	50	100	94.89	1.95	95.63	4.80	98.70	3.04	1.0
Phe	250	500	1 000	128.46	6.14	124.97	7.54	108.85	2.70	1.1
Pro	500	1 000	2 000	98.64	0.78	102.98	5.10	95.90	1.40	1.1
SAC	250	500	1 000	84.57	8.87	82.41	15.66	92.03	3.92	1.0
Ser	250	500	1 000	92.38	3.71	95.74	7.80	98.82	2.22	1.0
SMC	500	1 000	2 000	87.02	17.12	89.95	13.65	101.74	10.09	1.0
SPC	100	200	400	91.62	5.76	97.01	3.08	95.84	0.96	1.0
Thr	500	1 000	2 000	78.80	9.82	107.56	16.46	111.31	4.32	1.2
Trp	500	1 000	2 000	94.19	3.25	104.38	5.30	96.26	2.12	1.0
Trp- D_3	5	10	20	92.42	3.38	95.33	7.54	99.64	9.13	1.1
Tyr	5	10	20	98.99	2.21	90.43	6.30	102.16	9.39	1.0
Val	100	200	400	95.22	9.24	96.49	7.43	99.04	3.18	1.0
蒜氨酸	500	1 000	2 000	90.42	4.90	89.72	11.73	98.56	5.76	0.9

2.3 黑蒜加工过程中特征成分变化规律

首先,采用多元数据统计分析方法对未发酵大蒜与发酵不同天数黑蒜进行PCA,结果如图2A所示。不同加工阶段的黑蒜整体可以根据31种特征成分的含量水平分为3组,即0、1~3 d和4~8 d,尤其是0 d(鲜蒜)大蒜样品与其他样品差异较大,说明黑蒜在加工初期内含物就发生了剧烈的改变。究其原因,可能是鲜蒜受热的过程中加快了各种生物酶的反应,随后鲜蒜在高温条件下细胞由于热胀而破裂,导致大蒜中的酶与底物接触,发生蒜氨酸酶解等酶促反应。研究表明,蒜氨酸的最适温度为30℃,温度达到65℃时,酶活性基本丧失^[27]。而本研究中黑蒜的加工温度为75℃,因此,蒜氨酸酶会很快失活。除酶促反应外,在高温条件下,美拉德反应以及热分解等反应也会使大蒜中的成分发生显著改变。因此,在黑蒜加工初期阶段内含成分变化最为剧烈,后期反应强度逐渐下降。

为了直观地展现黑蒜中内含成分的变化规律,将不同发酵阶段的黑蒜中的31种特征成分进行热图的绘制,结果如图2B所示。随着发酵时间的延长,31种化合物的含量均发生了一定的变化。其中,Ala、SMC、环蒜氨酸、GABA、SAC和SPC的含量在发酵过程中先升高后下降,但最终含量均高于初始含量;Gly、Phe和Thr的含量在发酵过程中发生一系列变化后,最终含量略低于初始值;Asp在发酵过程中先下降后升高,最终含量与初始含量接近;Cys在发酵过程中其含量呈现“降-升-降”的趋势,最终其含量水平低于未发酵样品;其他化合物含量在黑蒜发酵过程中均有所下降。此结果表明黑蒜加工

过程中大蒜中的特征性含硫化合物和氨基酸均发生了剧烈的变化,是黑蒜加工过程中品质变化的重要指示性指标。在含量升高的几种化合物中,除Ala外均为含硫化合物。21种游离氨基酸除Ala外含量都有所下降,推测其原因可能是黑蒜加工过程中,蛋白质的酶水解会增加氨基酸的含量,而美拉德反应则会消耗掉大量的氨基酸,氨基酸参与美拉德反应从而生成类黑精等呈香、呈色的营养物质,这可能是黑蒜加工中大多数氨基酸含量降低的主要原因。Ala是一种甜味氨基酸,其在黑蒜加工过程中升高,可能会进一步增加大蒜的甜味,其转化机理有待进一步研究。

模型的模拟能力和预测能力较好。同时,对模型进行了 $N=200$ 的置换检验,结果表明此次OPLS-DA模型没有出现拟合现象。从图3A可以看出,未发酵大蒜与发酵1~3 d黑蒜、发酵1~3 d黑蒜与发酵4~8 d黑蒜之间均存在显著差异。为了更进一步分析黑蒜加工过程中特征成分的变化规律,采用 $P<0.05$ 、变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP) >1.5 为标准对黑蒜加工过程中的差异性成分进行了筛选, VIP值如图3B所示。最终,筛选出GABA、SAC、异蒜氨酸、Gln、甲基蒜氨酸、蒜氨酸、Trp和GSAC共8种差异性成分,它们在黑蒜发酵过程中的含量变化折线图如图4所示。

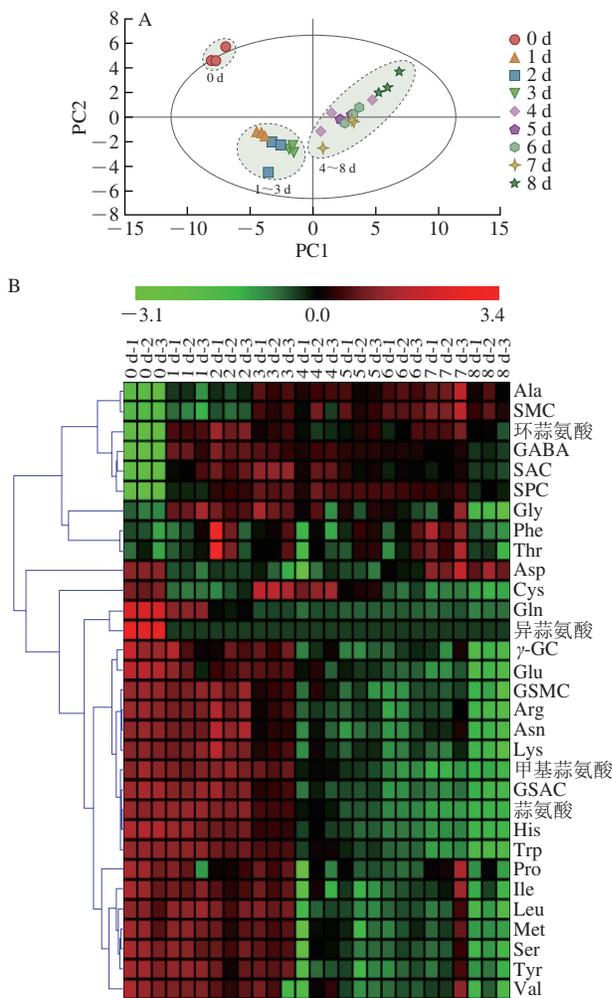


图2 不同发酵阶段黑蒜样品PCA得分图(A)和31种化合物热图(B)
Fig. 2 PCA score plot of black garlic samples (A) and heatmap of 31 compounds (B) during different fermentation stages

为进一步研究黑蒜加工过程中特征成分的变化规律,根据PCA初步分析结果,分别对未发酵大蒜与发酵1~3 d黑蒜、发酵1~3 d黑蒜与发酵4~8 d黑蒜进行OPLS-DA分析,得分图如图3A所示。采用 R^2 和 Q^2 对OPLS-DA模型的拟合能力和预测能力进行评估,结果显示,在所有预测模型中 $R^2 \geq 0.819$, $Q^2 \geq 0.788$,表明

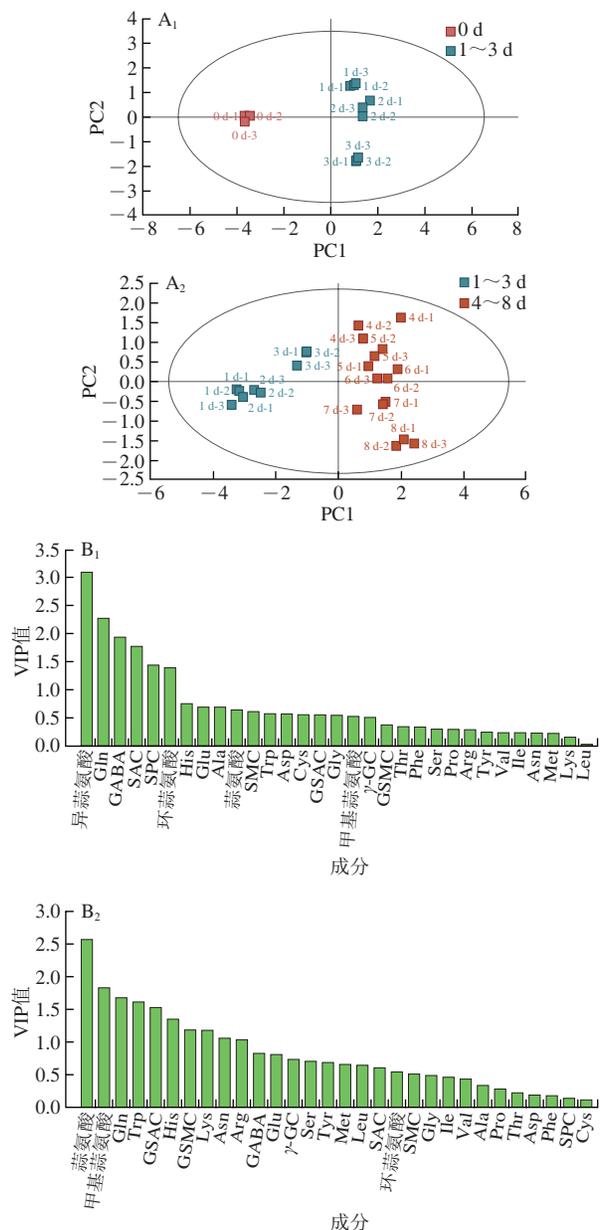


图3 第0天和1~3 d黑蒜样品、1~3 d和4~8 d黑蒜样品的OPLS-DA得分图(A)和31种化合物的VIP值图(B)
Fig. 3 OPLS-DA score plots of black garlic samples with different fermentation periods (A) and VIP scores of 31 compounds in black garlic (B)

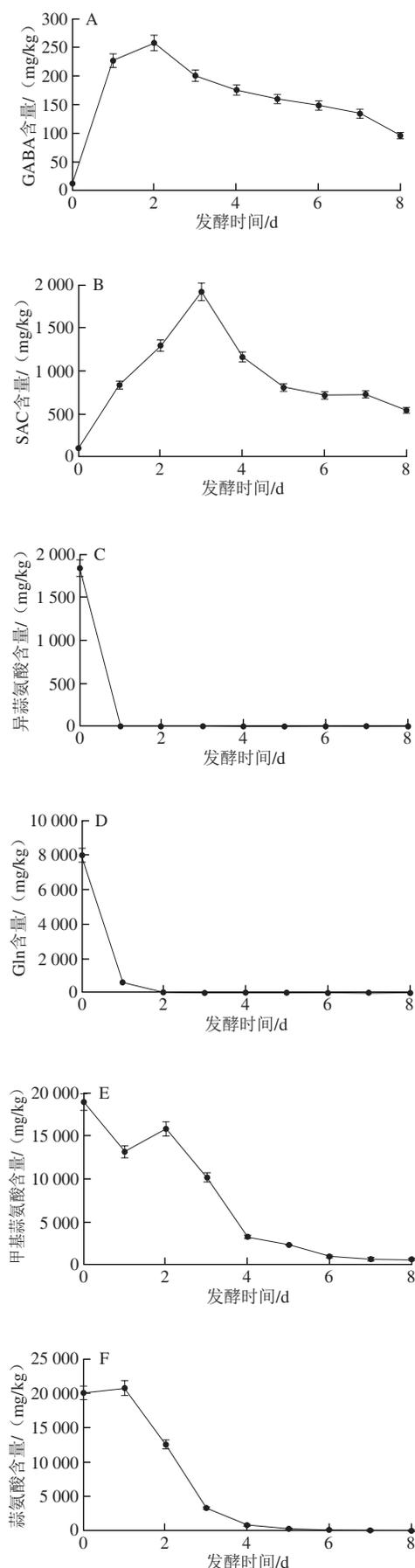


图4 GABA (A)、SAC (B)、异蒜氨酸 (C)、Gln (D)、甲基蒜氨酸 (E)、蒜氨酸 (F)、Trp (G) 和GSAC (H) 在黑蒜发酵过程中的变化趋势

Fig. 4 Changes in contents of γ -aminobutyric acid (A), SAC (B), isoalliin (C), Gln (D), methiin (E), alliin (F), Trp (G), and γ -L-glutamyl-S-allyl-L-cysteine (H) in black garlic during fermentation

从图4可以看出, 8种差异代谢物中, 除Gln、Trp和GABA外, 其余5种化合物均为含硫化合物, 说明黑蒜加工条件对含硫化合物的影响较大。其中异蒜氨酸、Gln、Trp和GSAC含量在发酵过程中逐步降低; 蒜氨酸的含量在发酵第1天内有轻微的上升趋势, 随后急剧下降; 甲基蒜氨酸含量在发酵的第1天内急剧下降, 在1~2 d内上升, 之后持续下降; 而GABA和SAC的含量在发酵过程中先增加后减少。

在黑蒜加工过程中, 高温会破坏大蒜细胞及其液泡结构, 使蒜氨酸酶与S-烷(烯)基-L-半胱氨酸亚砜类化合物接触, 生成以二烯丙基硫代亚磺酸酯为主的挥发性硫化物, 硫代亚磺酸酯类化合物极不稳定, 在高温条件下可短时间内转化为其他含硫衍生物, 并导致辛辣味降低^[28]。因此, 大蒜中的异蒜氨酸、蒜氨酸和甲基蒜氨酸均发生了明显的下降, 尤其是异蒜氨酸, 在开始加工的第1天便由1 834 mg/kg迅速下降并稳定在0 mg/kg。Lawson^[29]等研究证明异蒜氨酸在一定的高温等条件下可以转化为环蒜氨酸, 这可能是黑蒜加工过程中异蒜氨酸急剧下降的原因。此外, 蒜氨酸、异蒜氨酸、甲基蒜氨酸的热稳定性差, 持续的高温易使其发生热降解从而含量降低^[30]。值得注意的是, 蒜氨酸和甲基蒜氨酸分别在加工的第1天和第2天后才开始急剧下降, 这可能是大蒜细胞结构在加工一定时间后才被破坏或者在高温条件下酶被钝化导致, 但其具体原因有待进一步研究。

GSAC在黑蒜加工过程中呈现下降趋势, 在加工的前4 d内由6 600 mg/kg迅速下降至1 426 mg/kg, 随后逐渐下降至616 mg/kg。Molina-Calle等^[31]研究发现, 黑蒜在加工

过程中GSAC含量水平下降了约90%，与本研究结果较为一致。GSAC是大蒜中最主要的含硫物质之一，也是SAC的前体物质^[32]，Sasaki等^[33]研究发现，鲜蒜经过加工成黑蒜后，GSAC部分转化成了SAC，可能是由于 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, γ -GTP)催化GSAC发生了水解反应；此外，GSAC还可能发生热分解反应^[34]，但转化机理有待进一步研究。

本研究还发现，随发酵时间延长，SAC呈现先上升后下降的趋势，但SAC的最终含量为541 mg/kg，大于鲜蒜中的103 mg/kg，在加工第3天时，其含量达到最高，为1 917 mg/kg。目前，大部分研究发现黑蒜加工过程中SAC含量增加^[35]，也有少部分研究发现SAC含量降低^[36]，其原因有待进一步研究。其中，升高的SAC可能是由于大蒜中的蒜氨酸在加热过程中降解生成，也可能是GSAC在 γ -GTP的催化下形成，该研究结果与Liu Chunfeng等^[35]研究结果一致；SAC在高温下也存在一定程度的热降解，但由于其稳定性高于蒜氨酸，降解速率相对较慢^[11]，因此，后期SAC的降低可能是由于SAC的热降解导致。

此外，在筛选到的3种氨基酸中，Gln和Trp在黑蒜加工过程中分别由7 973 mg/kg和402 mg/kg下降至11 mg/kg和17 mg/kg。Gln和Trp减少的原因可能与美拉德反应有关，美拉德反应发生在胺（通常是氨基酸）和羰基化合物（通常是还原糖）之间^[37]。黑蒜加工过程中，蛋白质的酶水解会增加氨基酸的含量，而美拉德反应则会消耗掉大量的氨基酸^[38]。不同的是，Gln在黑蒜加工的第1天内迅速由7 973 mg/kg下降至625 mg/kg，随后下降速度减慢，从第3天到发酵结束，Gln的变化趋势较为平缓。而Trp呈现逐渐下降的趋势，其原因还有待进一步分析。GABA是一种非蛋白质氨基酸，对人体具有抗糖尿病、抗高血压、促进睡眠等功能^[39]，GABA含量在发酵后期不断降低可能是由于后期氨基酸的破坏和参与非酶褐变反应^[40]，Lamberts等^[41]研究认为GABA能够在美拉德反应中与各种糖溶液（木糖、葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖）反应产生中间色素，导致糖和氨基酸的损失。但发酵前期GABA剧烈上升的原因还有待进一步研究。

3 结论

本实验建立了一种UPLC-QQQ-MS/MS同时测定黑蒜中31种特征成分的分析方法。该方法灵敏度高、准确性好、绿色环保，适用于黑蒜中风味前体物质及游离氨基酸的检测。将上述方法应用于温度75℃、相对湿度85%发酵8d的黑蒜研究中，通过分析黑蒜加工过程中31种特征成分的变化规律发现，发现黑蒜的品质在加工过程中发

生了明显变化，大部分化合物的含量下降，如蒜氨酸等S-烷(烯)基-L-半胱氨酸亚砷类化合物，但该类化合物的降低并不代表黑蒜功能活性的减弱，在黑蒜加工过程中风味前体物质会转化为二烯丙基二硫化物、二烯丙基三硫化物和阿霍烯等生理活性更强的物质。同样地，氨基酸在黑蒜加工过程中会与糖类化合物反应生成Heyns化合物等美拉德反应中间产物^[42]。本研究不仅掌握了黑蒜加工过程中31种特征成分的变化规律，还发现了一些目前鲜见报道并值得进一步研究的问题，如黑蒜加工过程中Gln和Trp均发生下降，但下降模式存在极大差异，又如Ala在黑蒜加工过程中发生上升的原因尚不明确，其具体的转化机理还有待进一步研究。综上所述，该研究不仅为黑蒜品质的分析及研究提供了方法基础，并在解析关键特征成分变化规律的基础上为后期黑蒜品质的调控和功能性成分的挖掘和开发奠定了坚实基础。

参考文献:

- [1] 刘宇峰, 孙宇峰, 姬妍茹, 等. 黑蒜的药食功能研究[J]. 中国调味品, 2015, 40(9): 125-129. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2015.09.032.
- [2] 杨国力. 黑蒜, 异军突起的新兴食品[J]. 生命世界, 2015(1): 76-79.
- [3] YANG P, SONG H L, WANG L J, et al. Characterization of key aroma-active compounds in black garlic by sensory-directed flavor analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(28): 7926-7934. DOI:10.1021/acs.jafc.9b03269.
- [4] BEVERIDGE T, FRANZE K, HARRISON J. Clarified natural apple juice: production and storage stability of juice and concentrate[J]. Journal of Food Science, 1986, 51(2): 411-414. DOI:10.1111/J.1365-2621.1986.tb11143.x.
- [5] 黄敏欣, 赵文红, 白卫东, 等. 黑蒜保健功能及加工技术的研究进展[J]. 中国调味品, 2015, 40(8): 136-140. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2015.08.032.
- [6] 王雪梅, 沈颂东, 连玉官, 等. 大蒜超氧化物歧化酶的分离纯化及其性质的研究[J]. 安徽农业科学, 2001, 29(3): 408-409. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2001.03.062.
- [7] KARINA L. Physicochemical changes and sensorial properties during black garlic elaboration: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 88: 459-467.
- [8] RYU J H, KANG D. Physicochemical properties, biological activity, health benefits, and general limitations of aged black garlic: a review[J]. Molecules, 2017, 22(6): 919. DOI:10.3390/molecules22060919.
- [9] 周广勇, 缪冶炼, 陈介余, 等. 黑大蒜贮藏中主要成分和自由基清除能力的变化[J]. 中国食品学报, 2010, 10(6): 64-71. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2010.06.011.
- [10] 王卫东, 王滢, 王超, 等. 美拉德反应对大蒜营养成分和抗氧化性的影响[J]. 食品科技, 2013(4): 42-44.
- [11] BAE S E, CHO S Y, WON Y D, et al. A comparative study of the different analytical methods for analysis of S-allyl cysteine in black garlic by HPLC[J]. LWT-Food Science and Technology, 2012, 46(2): 532-535. DOI:10.1016/j.lwt.2011.11.013.
- [12] 史润东东. 黑蒜制备中功能成分变化与产品品质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [13] ARNAULT I, CHRISTIDES J P, MANDON N, et al. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous

- analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 991(1): 69-75. DOI:10.1016/S0021-9673(03)00214-0.
- [14] 许珂珂, 胡京枝, 郝学飞, 等. HPLC法快速检测大蒜中的蒜氨酸含量[J]. *中国调味品*, 2016, 41(1): 124-127. DOI:969/j.issn.1000-9973.2016.01.027.
- [15] 卢连登, 周御, 黄振荣, 等. 高效液相色谱法同时测定黑蒜中蒜氨酸、脱氧蒜氨酸及 γ -谷氨酰半胱氨酸含量[J]. *东北农业大学学报*, 2020, 51(7): 36-43. DOI:10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2020.07.005.
- [16] 刘平香, 邱静, 翁瑞, 等. 大蒜中主要功效成分分析研究进展[J]. *农产品质量与安全*, 2021(2): 67-73.
- [17] 秦慧彬, 田翔, 王海岗. 超高效液相色谱法测定传统发酵酸粥的游离氨基酸含量[J]. *食品科技*, 2021, 46(4): 273-279.
- [18] 施丽娟, 陈宁, 王丹, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法定量分析云南大叶种茶酚类成分[J]. *食品科学*, 2022, 43(8): 271-280. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210616-176.
- [19] XU M L, RAN L, CHEN N, et al. Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent[J]. *Food Chemistry*, 2019, 297: 124970. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.124970.
- [20] GAI Q Y, JIAO J, WANG X, et al. Simultaneous quantification of eleven bioactive phenolic compounds in pigeon pea natural resources and *in vitro* cultures by ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS)[J]. *Food Chemistry*, 2021, 335: 127602. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127602.
- [21] WILLEMSE C M, STANDER MA, VESTNER J, et al. Comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction chromatography (HILIC) reversed-phase liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (RP-LC-UV-MS) analysis of anthocyanins and derived pigments in red wine[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(24): 12006-12015. DOI:10.1021/acs.analchem.5b03615.
- [22] GE Y H, BIAN X Q, SUN B Q, et al. Dynamic profiling of phenolic acids during Pu-erh tea fermentation using derivatization LC-MS approach[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(16): 4568-4577. DOI:10.1021/acs.jafc.9b00789.
- [23] 郑杰, 赵其阳, 张耀海, 等. 超高效液相色谱法同时测定柑橘中主要酚酸和类黄酮物质[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(23): 4706-4717. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2014.23.015.
- [24] 刘平香. 基于代谢组学的大蒜生长贮藏过程中特征成分变化研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [25] GUO S, DUAN J A, QIAN D W, et al. Rapid determination of amino acids in fruits of *Ziziphus jujuba* by hydrophilic interaction ultra-high-performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(11): 2709-2719. DOI:10.1021/jf305497r.
- [26] LIU P X, WENG R, SHENG X J, et al. Profiling of organosulfur compounds and amino acids in garlic from different regions of China[J]. *Food Chemistry*, 2020, 305: 125-499. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125499.
- [27] 乔旭光, 张振华, 韩雅珊. 蒜氨酸酶动力学特性研究[J]. *山东农业大学学报*, 1999(1): 44-48.
- [28] BENAVIDES G A, SQUADRITO G L, MILLS R W, et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104: 17977-17982. DOI:10.1073/pnas.0705710104.
- [29] LAWSON L D, WOOD S G, HUGHES B G. HPLC analysis of allicin and other thiosulfonates in garlic clove homogenates[J]. *Planta Medica*, 1991, 57(3): 263-270. DOI:10.1055/s-2006-960087.
- [30] 张华敏, 张新岭, 尹守恒, 等. 葱属植物S-烷(烯)基半胱氨酸亚砷代谢途径研究进展[J]. *广西植物*, 2023(2): 221-233. DOI:10.11931/guizha.gxzw.202201023.
- [31] MOLINA-CALLE M, DE MEDINA V S, PRIEGO-CAPOTE F, et al. Establishing compositional differences between fresh and black garlic by a metabolomics approach based on LC-QTOF MS/MS analysis[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2017, 62: 155-163. DOI:10.1016/j.jfca.2017.05.004.
- [32] 王育红, 汤高奇, 郑其良, 等. 黑蒜的加工、组分及生物活性研究进展[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(35): 91-96.
- [33] SASAKI J, LU C, MACHIYA E, et al. Processed black garlic (*Alliums ativum* L.) extracts enhance anti-tumor potency against mousetumors[J]. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2007, 1(2): 278-281.
- [34] ZHANG M, LEI N, ZHU T Z, et al. Thermal processing effects on the chemical constituent and antioxidant activity of S-alk(en)ylcysteine S-oxides (alliin) extract[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, 51(1): 309-313. DOI:10.1016/j.lwt.2012.09.024.
- [35] LIU C F, LU L D, YANG C J, et al. Effects of thermal treatment on alliin and its related sulfides during black garlic processing[J]. *Food Science & Technology*, 2022, 159: 113-158.
- [36] 叶淼, 刘春风, 李梓语, 等. 黑蒜的营养功能及其加工工艺研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(1): 292-300. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.027624.
- [37] 邱志常. 黑蒜加工过程中微生物群落结构变化及其对品质形成的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [38] 陈炳. 发酵大蒜特征组分的分析及发酵工艺的研究[D]. 北京: 中国矿业大学, 2017.
- [39] 刘鹭驹, 张东星, 晏仁义, 等. γ -氨基丁酸的生物活性研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2022, 37(9): 2167-2172. DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2022.09.046.
- [40] MOLINA-CALLE M, DE MEDINA V S. Establishing compositional differences between fresh and black garlic by a metabolomics approach based on LC-QTOFMS/MS analysis[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2017, 62: 155-163. DOI:10.1016/j.jfca.2017.05.004.
- [41] LAMBERTS L, ROMBOUITS I, DELCOUR J A. Study of non-enzymic browning in amino acid and aminobutyric acid/sugar model systems[J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(3): 738-744. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.04.051.
- [42] 苑蓁. Heyns化合物的质谱碎裂规律及其在Maillard反应中含量与变化研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.