

油菜蜂蜜中挥发性成分指纹图谱的建立

涂世, 徐丽嫚, 陈静, 刘睿*

(华中农业大学食品科学技术学院, 武汉市蜂产品质量控制工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070)

摘要: 分析油菜单花蜜中的挥发性成分, 建立油菜单花蜜挥发性成分的指纹图谱。采用超声波辅助萃取法提取 49 种不同产地的油菜单花蜜中的挥发性物质, 并利用气相-氢火焰离子检测(gas chromatography-flame ionization detector, GC-FID)和气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)技术分析, 对气相分析结果进行聚类分析和相似度分析。结果表明: 49 种油菜蜜分为 5 类, 能明显区分未经加工的原料油菜蜜和市售油菜蜜; 原料油菜蜜和市售油菜蜜的挥发性成分存在明显差异; 推断苯甲酸-4-羟基-3,5-二甲氧基-酰肼可能作为油菜蜜植物源标记物。

关键词: 油菜蜜; 超声波辅助萃取; 气相色谱-质谱法; 指纹图谱

Fingerprinting of Volatile Composition of Rape Honey

TU Shi, XU Li-man, CHEN Jing, LIU Rui*

(Wuhan Research Center on Quality Control Engineering of Bee Products, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to label the botanical and geographical origin of unioral rape honey and discriminate adulterated rape honey, the volatile components in 49 rape honey samples from different geographical origins were analyzed by ultrasonic-assisted extraction, gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and fingerprinted. The results indicated that 49 samples investigated could be assigned into 5 groups, with an effective discrimination between raw and commercial rape honeys. Both rape honeys exhibited an obvious difference in their volatile components. We deduce that benzoic acid-4-hydroxy-3,5-dimethoxy-hydrazide has the potential to be used as a marker of botanical origin of rape honey.

Key words: rape honey; ultrasonic-assisted solvent extraction (USE); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); fingerprint

中图分类号: S896.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)20-0136-06

我国是蜂蜜出口第一大国, 但是由于掺假造假等问题频发, 严重影响我国蜂蜜在国际上的声誉, 导致我国蜂蜜交易价值相对较低。目前国内市场蜂蜜质量也是良莠不齐, 掺假造假现象严重挫伤了消费者的购买积极性, 致使国内消费市场增长缓慢。欧盟 2001/110/EC 关于蜂蜜的指令鼓励蜂蜜按照植物源和地理源对蜂蜜进行标注以保障产品质量^[1]。阿根廷蜂业协会利用国际物品编码协会的全球统一标识系统进行蜂产品质量安全追溯, 蜂产品产量居世界第二的阿根廷在产值上却是世界第一, 与其严格控制蜂蜜质量安全有着密切的关系^[2]。我国鼓励全面开展蜂产品质量可溯源技术体系的研究,

需要对单花蜜的植物源和地理源进行标记, 建立一套可信的检测系统^[3]。单花蜜具有天然的特性和功效, 在市场上受消费者欢迎, 可以增加其商业价值。例如, 橙花蜜和洋槐蜜在世界范围内的销售价格比百花蜜高^[4]。欧美等国家已经开展了一些单花蜜的挥发性指纹图谱研究^[5-11], 我国蜜源众多、地域广泛, 开展单花蜜挥发性物质指纹图谱研究尚在起步阶段。

蜂蜜的特性、风味、颜色主要取决于花的类型或地理位置。每种单花蜜都会有自己特定的挥发性物质的指纹图谱。蜂蜜中挥发性物质众多, 目前已经鉴定出来的有 400 多种^[12]。关于蜂蜜挥发性物质在欧美等地区

收稿日期: 2011-06-29

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(2010PY015); 武汉市蜂产品质量控制工程技术研究中心项目(200920137007)

作者简介: 涂世(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为蜂产品加工及质量控制。E-mail: ts88532@126.com

*通信作者: 刘睿(1969—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为蜂产品加工及质量控制。E-mail: liurui@mail.hzau.edu.cn

已有多项研究, 国外学者初步确定了欧洲产栗树、桉树、石楠花、酸橙、百里香等植物的标记性物质^[5,9,13-16]。李成斌等^[17]对 8 种蜂蜜挥发性成分进行研究, 找出了它们的共有成分。孙丽阳^[18]采用固相微萃取及同时蒸馏萃取法对蜂蜜的挥发性成分进行提取, 采用 GC-MS 方法进行分离、鉴定了蜂蜜中 37 种挥发性物质。目前用于分析蜂蜜挥发性成分的方法很多, 其中超声波辅助萃取 (ultrasonic solvent extraction, USE) 具有萃取效率高、萃取时间短、重现性好、适于热敏性物质等优点^[19-20], 国外一些研究^[21-25]也证明 USE 方法萃取蜂蜜挥发性物质效果好。蜂蜜蜜源的典型分析方法, 如花粉分析、感官分析, 并不能有效对蜂蜜的来源进行归类, 而且, 花粉和感官分析需要训练有素的人员, 并且比较耗时, 主观性强^[4]。油菜蜜是我国产量最大的单花蜜, 也是出口量最大的单花蜜, 为探索和建立检测蜂蜜植物源和地理源的方法, 本实验旨在通过分析油菜单花蜜的挥发性成分, 建立单花蜜的挥发性物质指纹图谱, 期望为蜂蜜质量控制和蜂蜜产品全程跟踪和快速溯源提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

表 1 油菜蜂蜜样品产地及时间

Table 1 Geographical origins and harvest time of rape honey samples

样品 编号	批号	产地	时间	样品 编号	批号	产地	时间
1	G093	湖北襄阳市	2010 年 4 月	26	G109-1	湖北随州市	2010 年 6 月
2	G092	湖北天门市	2010 年 5 月	27	G021	湖北仙桃市	2010 年 3 月
3	G077	湖北鄂州市	2010 年 5 月	28	G048	湖北仙桃市	2010 年 4 月
4	G102	四川绵阳市	2010 年 5 月	29	G062-1	湖北仙桃市	2010 年 4 月
5	G103	湖北浠水县	2010 年 5 月	30	G107-1	湖北广水市	2010 年 5 月
6	G109	湖北广水市	2010 年 5 月	31	G053	湖北浠水县	2010 年 4 月
7	G016-1	四川	2010 年 3 月	32	G091-1	湖北浠水县	2010 年 5 月
8	G024-1	湖北浠水县	2010 年 4 月	33	G094	湖北武穴市	2010 年 4 月
9	G050-1	湖北随州市	2010 年 5 月	34	G087	湖北钟祥市	2010 年 5 月
10	G082-1	湖北襄阳市	2010 年 4 月	35	G074	湖北流芳区	2010 年 5 月
11	G092-4	湖北天门市	2010 年 5 月	36	G085-1	湖北孝感市	2010 年 5 月
12	G049	湖北随州市	2010 年 4 月	37	G051-2	湖北潜江市	2010 年 3 月
13	G052-1	湖北随州市	2010 年 4 月	38		四川	2009 年 5 月
14	G088-1	湖北随州市	2010 年 5 月	39		湖北监利县	2010 年 6 月
15	G044-1	湖北随州市	2010 年 4 月	40		青海	2010 年 6 月
16	G108-1	湖北随州市	2010 年 6 月	41		湖北黄陂区	2009 年 5 月
17	G055	湖北襄阳市	2010 年 4 月	42	F077	安徽	2009 年 5 月
18	G056	湖北襄阳市	2010 年 4 月	43	H10029-2	湖北荆州市	2010 年 5 月
19	G075-1	湖北襄阳市	2010 年 4 月	44		湖北荆州市	2010 年 4 月
20	G106-4	湖北襄阳市	2010 年 4 月	45	H10091	湖北枣阳市	2010 年 5 月
21	G019-1	四川	2010 年 3 月	46	H10087	湖北鄂州市	2010 年 5 月
22	G020-2	四川	2010 年 3 月	47	H10071	湖北黄梅县	2010 年 5 月
23	G060-1	四川	2010 年 4 月	48	H10067	湖北随州市	2010 年 5 月
24	G121-1	安徽	2010 年 6 月	49		市售江苏扬州市	2011 年 3 月
25	G022-1	安徽	2010 年 4 月				

蜂蜜样品: 其产地和采集时间见表 1。1~43、45~48 号原料油菜蜜根据质量溯源管理体系从蜂农购得, 未经任何加工; 44 号原料油菜蜜直接从蜂农购得; 49 号原料油菜蜜从超市购得, 原料储存在 -18℃ 的冰柜中。

无水乙醚 (分析纯); 正戊烷 (分析纯); 无水硫酸镁 (分析纯); 油酸乙酯 (纯度 98%)。

1.2 仪器与设备

6890N/5975B-GC/MSD 气质联用仪、6890N 气相色谱仪 美国 Agilent 公司; KQ-100DE 型超声仪 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 超声波辅助萃取提取油菜蜂蜜挥发性成分方法

本研究参考 Alissandrakis 等^[20]的研究方法, 对影响超声波辅助萃取的蜂蜜质量、溶剂体积、萃取时间和加水体积 4 个主要因素进行优化。固定溶剂体积 30mL、萃取时间 30min、加水体积 20mL, 蜂蜜质量选取 20、30、40、50、60g 五个梯度; 固定蜂蜜质量 40g, 萃取时间 30min、加水体积 20mL, 溶剂体积选取 10、20、30、40、50mL 五个梯度; 固定蜂蜜质量 40g、溶剂体积 30mL、加水体积 20mL, 萃取时间选取 10、20、30、40、50min 五个梯度; 固定蜂蜜质量 40g、溶剂体积 30mL、萃取时间 30min, 加水体积选取 10、20、30、40、50mL 五个梯度。通过对比以上不同单因素条件下 GC 分析的总峰面积和总峰个数, 得到 USE 的最优条件为蜂蜜质量 30g、溶剂体积 30mL、超声时间 30min、加水体积 40mL。

250mL 碘量瓶中加入 30g 油菜蜂蜜、40mL 纯净水、1.5g 无水硫酸镁、30mL 溶剂正戊烷:无水乙醚 1:2(V/V), 超声频率 40kHz、水温(25±3)℃、超声萃取 30min。有机层用分液漏斗分离, 水层回加至碘量瓶, 碘量瓶中加入一组相同溶剂 30mL、萃取 30min。共进行 3 次同样的超声萃取。混合有机层, 加入 2g 无水硫酸镁干燥, 上层澄清有机层用 0.45μm 有机相过滤器过滤, 挥干至 1mL, 用 1.5mL 安捷伦小进样瓶密封, -18℃ 冷冻保存, 待分析。

1.3.2 对照品溶液制备

准确量取 0.1mL 油酸乙酯, 置 100mL 容量瓶中, 用溶剂正戊烷:无水乙醚 1:2(V/V) 稀释至刻度, 摇匀备用。

1.3.3 气相色谱条件

HP-5 毛细管柱(30m×320μm, 0.25μm); 进样口温度 250℃, 不分流进样; FID 检测器温度 300℃, 载气高纯氮气, 流速 1.2mL/min; 初始温度 36℃, 保持 5min, 以 4℃/min 上升至 180℃保持 2min, 以 5℃/min 上升至 220℃保持 2min, 以 10℃/min 上升至 260℃, 保持 5min。

1.3.4 气相色谱质谱条件

气相色谱条件: HP-5MS 毛细管柱(30m × 250 μm, 0.25 μm); 进样口温度 250℃, 不分流进样; 载气为氮气, 流速 1.2mL/min; 程序升温同 1.3.3 节。

质谱条件: 溶剂延迟 5min; 接口温度 280℃; 离子源温度 230℃; 四极杆温度 150℃; 离子化方式: EI; 电子能量 70eV; 质量范围 35~350u/s。

1.3.5 方法学考察

精密度实验: 取同一供试蜂蜜样品, 相同 GC 条件, 连续进样 6 次, 测得各共有峰相对峰面积 RSD 小于 2.52%, 各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.24%, 表明仪器精密度良好。

重复性实验: 取同一蜂蜜样品, 按照 1.3.1 节方法平行制备 6 份供试样品溶液, 相同 GC 条件分析, 测得各共有峰相对峰面积 RSD 小于 4.56%, 各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.17%, 表明实验方法重复性良好。

稳定性实验: 取同一供试样品, 分别于 0、2、4、8、12、24h 进样, 相同 GC 条件分析, 测得各共有峰相对峰面积 RSD 小于 2.83%, 各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.08%, 表明供试样品在 24h 内稳定, 达到指纹图谱分析要求。

1.3.6 结果分析与数据处理

GC-MS 分析结果运用计算机谱库(NIST/WILEY)进行检索分析, 部分物质与标准品进行比较, 确认挥发性化合物的化学成分。化合物相对含量确定采用面积归一法。49 种样品的 GC 分析结果, 根据相对保留时间和峰面积选取共有峰, 采用 SPSS 17.0 软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 油菜蜂蜜 GC 指纹图的建立

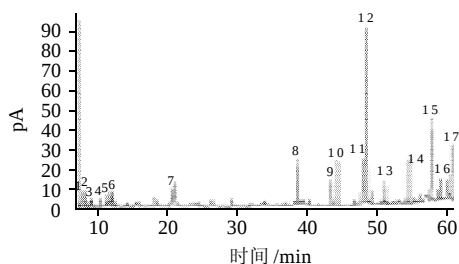


图 1 42 号油菜蜜样品的气相色谱图
Fig.1 GC chromatogram of No.42 rape honey

49 个蜂蜜样品利用 GC 分析, 通过比较 49 批样品的色谱图和相对保留时间, 发现 17 个峰为大多数样品共有, 保留时间相对稳定, 因此确定这 17 个峰为共有指纹峰^[26]。国家药品监督管理局(2000)在《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》中指出^[27]: 指纹图谱的建立必

须设立参照峰, 应选择指纹图谱中峰面积较大, 相对稳定的色谱峰作为参照峰。对比得到保留时间为 48.305min 的 12 号峰符合此条件, 选为参照峰。通过 GC-MS 分析以及样品溶液和对照品溶液 GC 保留时间的比对^[28], 确定 12 号峰为油酸乙酯。典型样品气相色谱图见图 1。

2.2 聚类分析结果

以参照色谱峰的保留时间和峰面积作为 1, 分别计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。利用 SPSS 软件, 采用组间联接聚类法, 计算准则为平方欧氏距离, 对 49 个样品进行聚类分析, 成功将样品分为 5 大类, 结果见表 2 和图 2。

表 2 聚类分析结果
Table 2 Results of cluster analysis

类别	样品编号
一类	19、20、21、12、15、23、13、14、4、37、1、16、3、10、6、33、11、36、8、30、34、18、32、43、22、31、26、24、25、2、17、41、42、47、45、39、9、35、7、38、48、27、29、46
二类	5、28
三类	40
四类	44
五类	49

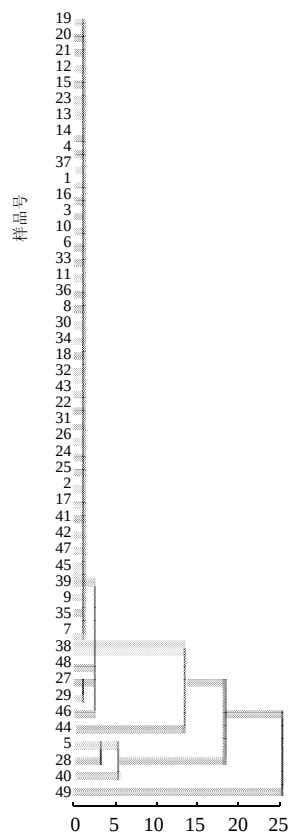


图 2 油菜蜜聚类分析结果
Fig.2 GC chromatogram of rape honey sample

根据聚类分析结果可以看出, 49种油菜蜂蜜样品被分为5类, G103湖北浠水和G048湖北仙桃样品分为一类, 产于2010年6月的青海样品分为一类, 产于2010年4月的荆州样品分为一类, 市售江苏扬州样品分为一类, 其余样品分为一大类。从表2可以看出, 49种蜂蜜样品中有44种集中于第1类, 达到了总数的89.8%, 说明单花蜜可以通过挥发性物质达到归类辨别的目的。其中5、28、40、44号样品差异于第1类, 可能与蜜源地的气候、采集时间、采集过程、盛装容器等因素相关。49号市售蜂蜜明显不同于其他蜂蜜, 初步推断其为假蜂蜜。为详细分析油菜蜂蜜中的挥发性物质和鉴别市售蜂蜜, 进一步对样品采用GC-MS分析。

2.3 相似度分析

参考聚类分析结果, 选取第1类样品采用平均矢量法建立共有模式^[28-29], 得到标准指纹图谱的相对保留时间和相对峰面积, 结果见表3。

表3 标准指纹图谱信息

Table 3 Standard fingerprint data

峰号	保留时间/min	峰面积	峰号	保留时间/min	峰面积
1	7.754	36.705	10	44.149	69.435
2	8.078	34.810	11	47.666	125.315
3	8.750	19.950	12	48.305	326.375
4	10.241	14.160	13	50.941	35.915
5	11.669	80.625	14	54.413	65.310
6	11.957	66.680	15	57.481	76.530
7	20.535	99.130	16	59.835	41.300
8	38.277	101.555	17	60.431	56.780
9	43.205	83.310			

以标准指纹图谱为对照, 计算各样品的相关系数, 聚类分析第1类样品中相关系数大于0.90的样品有30个, 占总样品数的61.22%, 大于0.8的样品有36个, 占总样品数的73.47%, 其他4类样品的匹配度均小于0.42, 其中49号样品匹配度为0.11。结果表明, 相似度分析结果与聚类分析结果一致。

2.4 GC-MS 鉴定

表4 GC-MS 鉴定结果

Table 4 GC-MS identification results

序号	保留时间/min	化合物名称	相对含量/%				
			5号样品	34号样品	40号样品	42号样品	49号样品
1	6.226	1-异硫氰酸根合-丙烷	—	—	0.187	—	—
2	6.701	1-丁醇-3-甲基-甲酯	—	1.527	—	—	—
3	7.519	甲苯	1.029	0.624	—	—	—
4	7.576	3-乙基-3-甲基-戊烷	—	—	1.614	1.891	2.940
5	8.909	仲丁基醚	—	—	2.455	2.789	5.069
6	11.496	乙苯	0.764	0.851	0.751	0.818	0.634
7	11.868	邻二甲苯	0.883	1.048	0.794	—	—
8	11.953	1,3-二甲苯	—	—	0.027	1.055	—
9	12.892	苯乙烯	0.324	0.794	—	—	—
10	14.128	二乙基二硫	0.415	0.788	0.194	0.293	1.052
11	15.186	4,5-二甲基-辛烷	0.107	—	—	—	—
12	15.964	乙醛仲丁基缩醛	—	—	1.679	—	—

续表 4

序号	保留时间/min	化合物名称	相对含量/%				
			5号样品	34号样品	40号样品	42号样品	49号样品
13	18.665	柠檬烯	0.051	—	—	—	—
14	20.061	苯乙醛	—	1.247	—	0.392	—
15	20.576	苯甲醇	—	—	—	0.276	—
16	21.091	2-甲基-酚	0.052	—	—	—	—
17	23.826	苯乙醇	—	0.877	—	0.483	—
18	23.981	乙基戊二硫	—	—	—	0.108	—
19	24.639	苯甲酸乙酯	—	0.058	—	—	—
20	24.851	丁二酸二乙酯	—	—	—	0.379	—
21	26.836	苯甲酸	1.994	7.240	—	1.528	—
22	28.518	2,3-二甲苯酚	—	0.305	—	—	—
23	30.653	苯丙酸乙酯	—	—	—	0.221	—
24	32.329	2-乙基-己烯醛	—	—	—	—	0.034
25	32.449	苯丙酸	—	0.337	0.004	0.383	—
26	34.669	β -甲基-苯丙醛	—	—	—	0.069	—
27	35.053	亚硫酸异丙基十一烷酯	—	—	—	0.041	—
28	35.122	十五烷	0.078	—	—	—	—
29	36.523	草酸烯丙基十三烷酯	—	—	—	—	0.022
30	36.615	苯甲酸-4-羟基-3-甲氧基-甲酯	—	—	—	0.128	—
31	37.176	3,5-二甲氧基苯甲醇	0.130	—	—	—	—
32	37.233	1,3,5-三甲氧基苯	—	0.848	—	0.368	—
33	37.428	3,5-二甲氧基苯乙醇	—	0.041	—	—	—
34	37.971	十六烷	—	—	—	0.117	—
35	39.539	1-二十六烷醇	—	0.089	—	—	—
36	39.745	草酸烯丙基十二烷酯	—	—	—	—	0.037
37	40.678	十七烷	0.181	0.239	—	0.160	—
38	41.736	苯甲酸-3,4,5-三甲氧基甲酯	0.168	0.521	—	0.200	—
39	42.474	1-二十烷醇	—	0.128	—	—	—
40	43.567	苯甲酸-4-羟基-3,5-二甲氧基-酰胺	6.775	9.529	2.784	3.962	—
41	43.722	三十六烷	—	—	—	—	0.229
42	45.095	2-癸烯二酸二乙酯	0.424	0.657	—	0.700	—
43	46.382	草酸环丁基十六烷酯	—	—	—	0.121	—
44	46.497	十九烷	0.384	0.166	0.186	—	—
45	47.017	碳酸十三烷-2,2,2-三氯乙酯	—	—	—	0.013	—
46	47.595	草酸环丁基十五烷酯	—	—	—	0.103	—
47	48.368	二丁基邻苯二甲酸酯	—	0.776	—	0.305	—
48	48.391	1,2-苯二甲酸丁基-2-甲基丙酯	—	—	0.176	—	—
49	48.397	9-十六碳烯酸乙酯	0.244	—	—	—	—
50	48.442	邻苯二甲酸丁基十一烷酯	—	—	—	—	0.415
51	48.585	棕榈酸	3.318	1.657	1.345	0.712	1.183
52	48.917	棕榈酸乙酯	5.890	3.704	1.605	1.279	1.043
53	49.175	亚硫酸十八烷-2-丙酯	—	—	—	—	0.173
54	49.301	1-(环己基甲基)-2-乙基-顺-环己烷	—	—	—	0.032	—
55	49.552	1-(甲氧基)-十二烷	0.135	—	—	—	—
56	49.924	六十九碳酸	—	—	—	—	1.405
57	49.941	1,54-二溴-五十四烷	—	1.663	—	—	—
58	50.456	草酸环丁基十五烷酯	—	—	—	—	0.489
59	50.954	草酸烯丙基十五烷酯	—	—	0.004	—	—
60	50.983	1-十九碳烯	0.079	—	—	—	—
61	51.069	2-十五烷醇	0.094	0.209	0.105	—	—
62	51.080	溴乙酸十六烷酯	—	—	—	0.129	—
63	51.120	碳酸异丁基十四烷酯	—	—	—	—	0.143
64	51.189	二十一烷	1.032	0.206	0.317	0.233	—

续表 4

序号	保留时间/min	化合物名称	相对含量/%				
			5号样品	34号样品	40号样品	42号样品	49号样品
65	51.252	1-氯-二十七烷	—	—	—	—	0.196
66	51.578	2-己基-1-癸醇	—	—	—	0.139	—
67	52.545	油酸	1.525	0.865	—	0.198	—
68	52.608	反-9-十八碳烯酸	—	—	0.693	0.361	—
69	52.745	9,12-十八碳二烯酸乙酯	—	1.288	—	—	—
70	52.766	亚油酸乙酯	2.060	—	0.909	0.399	—
71	52.900	油酸乙酯	20.026	18.980	3.882	4.982	1.780
72	53.174	(ZZZ)-十八碳三烯酸乙酯	0.536	—	—	—	—
73	53.466	十八酸乙酯	1.188	0.894	0.406	0.416	—
74	53.535	十七碳酸 15-甲基-乙酯	—	—	—	—	0.635
75	54.153	十四烷基环氧乙烷	0.080	—	—	—	—
76	54.576	顺-7-十六碳烯醛	—	—	0.445	—	—
77	54.599	2-乙基-1-十二醇	—	0.053	—	—	—
78	54.656	二十四酸乙酯	—	—	—	1.849	—
79	54.673	亚硫酸丁基十四烷酯	—	—	—	—	1.391
80	54.994	顺-9-二十三碳烯	1.329	0.224	0.694	0.206	—
81	55.166	1-二十三碳烯	—	—	0.037	—	—
82	55.389	17-三十五碳烯	—	0.650	0.181	1.106	—
83	55.412	碳酸十八烷-2,2,2-三氯乙酯	—	—	—	0.284	—
84	55.469	2,6,10,14-四甲基-十六烷	7.179	—	—	—	—
85	55.492	亚硫酸丁基十七烷酯	—	—	—	—	0.370
86	55.503	十八烷	—	—	2.189	—	—
87	55.789	顺-5-十九碳烯	0.217	—	—	—	—
88	56.190	十六碳酸(3-溴-2-丙炔基)酯	—	—	—	0.118	—
89	56.259	八氢-4a-甲基-7-(1-甲基乙基)-2-萘酮	0.098	—	—	—	—
90	56.430	二十二烷	—	—	—	0.928	—
91	56.917	二十四烷	0.714	—	0.320	0.345	—
92	56.939	1-溴二十二烷	—	0.364	—	—	0.696
93	57.225	二十八烷	—	1.241	0.738	0.735	—
94	57.420	1-二十二碳烯	—	—	—	0.537	—
95	57.486	七氟丁酸十七烷酯	—	0.174	—	—	—
96	57.964	1-十九碳烯	—	0.397	—	1.062	—
97	57.975	1-二十五烷醇	—	—	—	0.302	—
98	58.078	三氯乙酸十四烷酯	—	—	—	0.369	—
99	58.336	二十五烷	11.207	2.538	7.582	9.843	—
100	59.211	1,2-苯二甲酸(2-乙基己基)酯	—	0.624	0.295	0.555	1.785
101	59.635	二十二碳酸	—	—	0.367	—	—
102	59.886	2,6,10,14-四甲基-十八烷	—	0.307	—	—	—
103	59.903	二十六烷	—	—	1.032	0.478	—
104	60.596	二氯乙酸十七烷酯	—	—	0.047	—	—
105	61.305	三氯乙酸十八烷酯	—	—	0.328	0.468	—
106	61.753	二十七烷	2.561	1.391	21.317	1.248	—

注：“—”表示未检出；71号化合物是与标准品比较而鉴定的。

通过 GC 分析、SPSS 聚类分析和相似度分析情况，选取 5、34、40、42 号油菜蜜和 49 号市售油菜蜜的 GC-MS 结果进行对比分析。

从表 4 可以看出，49 号市售油菜蜜和原料油菜蜜存在明显差异，49 号样品总离子流图的总峰少、峰值都很低，挥发性物质较少，该分析结果与气相色谱的分类结果一致，初步推断该市售蜜为掺假或造假蜜。分

析其他 4 种样品可以看出，5 号样品主要含有油酸乙酯(20.026%)、二十五烷(11.207%)、2,6,10,14-四甲基-十六烷(7.179%)、苯甲酸-4-羟基-3,5-二甲氧基-酰肼(6.775%)，34 号样品主要含有油酸乙酯(18.980%)、苯甲酸-4-羟基-3,5-二甲氧基-酰肼(9.529%)、苯甲酸(7.240%)、棕榈酸乙酯(3.704%)，40 号样品主要含有二十七烷(21.317%)、二十五烷(7.582%)、油酸乙酯(3.882%)、苯甲酸-4-羟基-3,5-二甲氧基-酰肼(2.784%)，42 号样品主要含有二十五烷(9.843%)、油酸乙酯(4.312%)、苯甲酸-4-羟基-3,5-二甲氧基-酰肼(3.962%)、仲丁基醚(2.789%)。5 号油菜蜜含有较多的 2,6,10,14-四甲基-十六烷(7.179%)，40 号油菜蜜中二十七烷(21.317%)含量最多，这也可能是这两种油菜蜜差异于第 1 大类油菜蜜的主要原因，也证明了 GC 和 GC-MS 分析结果的一致性。以上 4 种油菜蜜存在一些含量较高的共有组分：油酸乙酯、苯甲酸-4-羟基-3,5-二甲氧基-酰肼、棕榈酸乙酯、顺-9-二十三碳烯、二十五烷、二十七烷，这也证明蜜源是决定蜂蜜挥发性物质组成的主要因素之一^[30]。苯甲酸-4-羟基-3,5-二甲氧基-酰肼在 4 种油菜蜜中含量较高，综合其他一些原料蜜的分析结果可以得出，苯甲酸-4-羟基-3,5-二甲氧基-酰肼含量在 1.18%~16.37% 之间，并且该物质在市售油菜蜜中没有被检出，因此其可能为油菜蜜的植物源标记物之一。Radovic 等^[11]报道过二甲基二硫和二甲基丙醇可以作为欧洲地区油菜蜜的植物源标记物。Kaškonienė 等^[12]研究发现油菜蜜中普遍都含有一定量的苯乙醛，本研究发现 34、42 号两种油菜蜜中含有苯乙醛。本研究结果与他们的结果不同可能在于地理源不同和萃取方法的差异，这也说明了地理源对蜂蜜挥发性物质影响的重要性。4 种样品中含有许多烃类物质，可能主要与采取超声波辅助萃取的方法有关，Jerković 等^[23]指出 USE 方法提取的主要物质是挥发性和低分子质量的半挥发性物质。

3 结 论

本研究利用 GC 和 GC-MS 分析了超声波辅助萃取的 49 种油菜蜜中的挥发性物质，成功将 49 种油菜蜜分为 5 大类，并且第 1 大类占 87.76%；市售油菜蜜与其他油菜蜜样品相比其挥发性成分明显不同，自成一类，结合 GC-MS 分析结果，可以推断市售油菜蜜可能为掺假或造假蜜。进一步发现苯甲酸-4-羟基-3,5-二甲氧基-酰肼可能作为油菜蜜植物源标记物，这还需要对比不同植物源蜂蜜进行确证。本研究与欧洲发现的油菜蜜标记物有所不同，但是没有发现国内不同地区油菜蜜地域之间的明显差异。

参考文献：

- [1] The Council of the European Union. 2001/110/EC — 2001 Council

- directives[S].
- [2] 徐风. 我国蜂产品质量安全监管水平显著提升[N]. 中国质量报, 2010-08-04(001).
- [3] 赵静. 与时俱进开展我国蜂产品可追溯体系研究[J]. 中国蜂业, 2010, 61(5): 19.
- [4] AMPUERO S, BOGDANOV S, BOSSET J. Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose using different sampling modes: SHS, SPME and INDEX[J]. Eur Food Res Technol, 2004, 218(2): 198-207.
- [5] ALIFERIS K A, TARANTILIS P A, HARIZANIS P C, et al. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds[J]. Food Chemistry, 2010, 121(3): 856-862.
- [6] SORIA A C, MARTINEZ-CASTRO I, SANZ J. Study of the precision in the purge-and-trap/gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile compounds in honey[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(15): 3300-3304.
- [7] TANANAKI C, THRASYVOULOU A, GIRADEL J L, et al. Determination of volatile characteristics of Greek and Turkish pine honey samples and their classification by using Kohonen self organising maps [J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1687-1693.
- [8] BIANCHI F, CARERI MARIA, MUSCI M. Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2005, 89(4): 527-532.
- [9] FUENTE E, VALENCIA-BARRERA R, MARTÍNEZ-CASTRO I, et al. Occurrence of 2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone and 3-hydroxy-5-methyl-2-hexanone as indicators of botanic origin in eucalyptus honeys[J]. Food Chemistry, 2007, 103(4): 1176-1180.
- [10] CASTRO-VAZQUEZ L, DIAZ-MAROTO M C, PEREZ-COELLO M S. Aroma composition and new chemical markers of Spanish *Citrus* honeys[J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 601-606.
- [11] RADOVIC B S, CARERI M, MANGIA A, et al. Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey[J]. Food Chemistry, 2001, 72(4): 511-520.
- [12] KAŠKONIENĖ V, VENSKUTONIS P R, ČEKŠTERYTĖ V. Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania[J]. Food Chemistry, 2008, 111(4): 988-997.
- [13] SORIR A C, GONZÁLEZ M, SANZ J, et al. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data [J]. Food Chemistry, 2004, 85(1): 121-130.
- [14] BERTELLI D, PAPOTTI G, LOLLI M, et al. Development of an HS-SPME-GC method to determine the methyl anthranilate in *Citrus* honeys[J]. Food Chemistry, 2008, 108(1): 297-303.
- [15] ALISSANDRAKIS E, TARANTILIS P A, HARIZANIS P C, et al. Aroma investigation of unifloral Greek *Citrus* honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis[J]. Food Chemistry, 2007, 100(1): 396-404.
- [16] PONTES M, MARQUES J C, CAMARA J S. Screening of volatile composition from *Portuguese multifloral* honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography/quadrupole mass spectrometry [J]. Talanta, 2007, 74(1): 91-103.
- [17] 李成斌, 林瑜, 邓国宾, 等. 八种蜂蜜挥发性成分分析[J]. 精细化工, 2006, 23(11): 1082-1088.
- [18] 孙丽阳. 蜂蜜挥发性成分的 SPME-GC/MS 分析[J]. 鞍山师范学院学报, 2007, 9(6): 33-35.
- [19] 谢建春. 现代香味分析技术及应用[M]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 69.
- [20] ALISSANDRAKIS E, DAFFERERAB D, TARANTILIS P A, et al. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from *Citrus* flowers and *Citrus* honey[J]. Food Chemistry, 2003, 82(4): 575-582.
- [21] JERKOVIĆ I, MASTELIĆ J, MARIJANOVIĆ Z. A variety of volatile compounds as markers in unifloral honey from Dalmatian sage[J]. Chemistry and Biodiversity, 2006, 3(12): 1307-1315.
- [22] JERKOVIĆ I, TUBEROSO C, MARIJANOVIĆ Z. Headspace, volatile and semi-volatile patterns of *Paliurus spina-christi* unifloral honey as markers of botanical origin[J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 239-245.
- [23] JERKOVIĆ I, MASTELIĆ J, MARIJANOVIĆ Z. Comparison of hydrodistillation and ultrasonic solvent extraction for the isolation of volatile compounds from two unifloral honeys of *Robinia pseudoacacia* L. and *Castanea sativa* L.[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2007, 14(6): 750-756.
- [24] RIAL-OTERO R, GASPARE M, MOURA I, et al. Gas chromatography mass spectrometry determination of acaricides from honey after a new fast ultrasonic-based solid phase micro-extraction sample treatment [J]. Talanta, 2007, 71(5): 1906-1914.
- [25] ALISSANDRAKIS E, TARANTILIS P A, HARIZANIS P C. Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(1): 91-97.
- [26] 吕美红, 严启新, 梁慧, 等. 苍术 GC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1652-1656.
- [27] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行) [J]. 中成药, 2000, 22(10): 671-675.
- [28] 王婷婷, 李清, 宋爱华, 等. 白芷挥发油 GC 指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(9): 1340-1343.
- [29] 苗爱东, 孙殿甲. Excel 2002 在中药指纹图谱相似度计算中的应用 [J]. 药学进展, 2003, 27(1): 51-54.
- [30] CUEVAS-GLORY L F, PINO J A, SANTIAGO L S, et al. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey [J]. Food Chemistry, 2007, 103(3): 1032-1043.