

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022968

引用格式:王娇,李玉新,赵保堂,等.优化顶空固相微萃取/气相色谱-质谱联用方法测定蜂王浆挥发性化合物[J].食品与发酵工业,2020,46(8):239-245. WANG Jiao, LI Yuxin, ZHAO Baotang, et al. Optimization of HS-SPME/GC-MS method for determination of volatile components in royal jelly[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(8): 239-245.

优化顶空固相微萃取/气相色谱-质谱联用方法测定蜂王浆挥发性化合物

王娇¹, 李玉新², 赵保堂¹, 何兴芬¹, 张俊¹, 张兆云¹, 杨富民^{1*}

1(甘肃农业大学 食品科学与工程学院, 甘肃 兰州, 730070) 2(甘肃省农业科学院 农产品贮藏加工研究所, 甘肃 兰州, 730070)

摘要 为准确测定蜂王浆中挥发性化合物的含量,对顶空固相微萃取(headspace-solid phase microextraction, HS-SPME)的萃取温度、萃取时间、样品量、饱和 NaCl 溶液的添加量在单因素试验的基础上,通过响应面设计进行了萃取条件的优化;依据优化的萃取条件,采用气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)测定了5种不同来源蜂王浆中的挥发性化合物。结果表明,萃取温度 62 ℃、萃取时间 60 min、蜂王浆 2 g、饱和 NaCl 溶液添加量为 1 mL 时,总峰面积最大,萃取效果好。5种不同来源蜂王浆共检出了48种挥发性化合物,其中共有的化合物有16种,多为酸、酯和醛类等化合物,但其含量不同,这些共有化合物可能与蜂王浆的特征风味有关。研究结果为蜂王浆挥发性化合物检测和应用提供了参考。

关键词 蜂王浆;顶空固相微萃取;气相色谱-质谱;挥发性化合物

Optimization of HS-SPME/GC-MS method for determination of volatile components in royal jelly

WANG Jiao¹, LI Yuxin², ZHAO Baotang¹, HE Xingfen¹, ZHANG Jun¹,
ZHANG Zhaoyun¹, YANG Fumin^{1*}

1 (College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

2 (Agricultural Product Storage and Processing Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT A headspace (HS)/solid phase microextraction (SPME)/gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method was developed to accurately determine the profiles of volatile compounds from royal jelly based on the single-factor tests of extraction temperature and time, sample size, saturated NaCl solution addition. The optimization of the extraction conditions was carried out by response surface methodology. According to optimized extraction conditions, volatile compounds in royal jelly from five different sources were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The analytical conditions of the optimized HS-SPME method were: extraction temperature 62 ℃, extraction time 60 min, 2 g royal jelly, 1 mL saturated NaCl solution. Under this extraction condition, the total peak area was the largest. The GC-MS analysis allowed the identification of 48 volatile compounds in five royal jelly. The 16 common volatile compounds in the samples were rich in acid, ester and aldehyde compounds, but their content was varied. These common compounds may be related to the characteristic flavor of royal jelly. The results could be used for the detection and application of volatile compounds in royal jelly.

Key words royal jelly; HS-SPME; GC-MS; volatile components

第一作者:硕士研究生(杨富民教授为通讯作者, E-mail: yfumin@163.com)

基金项目:甘肃省科技计划重点研发计划(18YF1NA076);甘肃特色农畜产品加工技术研究(GSAU-ZL2015-048);蜂产品深加工技术研发与应用

收稿日期:2019-12-04, 改回日期:2020-01-09

蜂王浆是一种淡黄色的乳脂状物质,略带刺激性气味^[1]。蜂王浆是由年轻工蜂(*Apis mellifera* L.)的下咽和下颌腺分泌的一种微酸性(pH 3.5~4.5)物质。新鲜蜂王浆含水(50%~65%)、蛋白质(11%~18%)、碳水化合物(10%~15%)、脂肪酸和脂质(4%~8%)、矿物质盐(约1.5%)以及少量的多酚和维生素^[2]。有关蜂王浆的特性、营养功能及用途已有大量报道,但不同来源蜂王浆的挥发性化合物组成和含量测定报道很少。中国是蜂王浆生产及出口大国,蜂王浆挥发性化合物的研究将有助于蜂王浆进一步利用。

天然食品的风味和香气很大程度上取决于基质和顶空中的挥发性化合物^[3]。挥发性化合物的提取目前有同时蒸馏、动态顶空、静态顶空、超声波辅助提取以及蒸汽蒸馏、溶剂萃取、固相微萃取等。顶空固相微萃取(headspace-solid phase microextraction, HS-SPME)是一种快速无溶剂分离技术,其主要优点是简单、灵敏度高、需要的样品量少,可与气相色谱、气相色谱-质谱和高效液相色谱联用^[4]。ISIDOROV等^[5]采用HS-SPME从蜂王浆中分离出了25种挥发性化合物,其中最丰富的是2-庚酮、2-壬酮、苯甲醛和辛酸,将蜂王浆样品在-18℃和4℃下储存10个月,其挥发性化合物的成分基本不变;但在室温下储存10个月,苯酚的含量为原来的50%。ZHAO等^[6]分析了10个不同开花季节的蜂王浆样品,发现蜂王浆挥发性化合物中富含酸、酯和醛类化合物,如乙酸、苯甲酸甲酯、己酸和辛酸等。对蜂王浆挥发性化合物进行分析,可能有助于确定其来源、质量和新鲜度。

挥发性有机化合物的分析受提取和检测技术的影响^[7],不同特性的原料萃取方法不同,不同来源蜂王浆其挥发性化合物含量不同,其差异有助于质量评价。本研究采用HS-SPME方法对其萃取温度、萃取时间、样品量、加盐量在单因素试验的基础上,采用响应面设计优化试验,旨在确定蜂王浆挥发性化合物的最佳提取条件,为准确测定奠定基础;通过对不同来源蜂王浆中挥发性化合物的检测,揭示之间的差异,为其品质评定及加工利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料:蜂王浆A采自宁夏固原市泾源县,蜂王浆B、C、D、E购自市售4个不同品牌的产品。

试剂:色谱级正己烷,成都科隆化工有限公司;

2-甲基-3-庚酮,Shymax Chemicals有限公司;C7-C30系列烷烃,Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

三重四级杆气相色谱-质谱联用仪7000D(配有EI离子源和NIST MS数据处理系统),美国Agilent公司;DF-101S集热式磁力搅拌器,常州市瑞华仪器制造有限公司;VF-WAXms毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm),美国Agilent公司;手动固相微萃取装置、50/30 μm DVB/CAR/PDMS萃取纤维头,美国Supelco公司;微量进样器(1 μL),上海安亭微量进样器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 蜂王浆挥发性化合物的提取

参照任佳森等^[8]方法略作修改,准确称取2 g蜂王浆样品置于20 mL顶空瓶内,加入转子密封,在预先设置好温度的加热磁力搅拌器上平衡30 min。将SPME萃取头插入顶空瓶中,推出纤维头后吸附50 min,萃取结束后,在250℃的GC-MS进样口解吸10 min。

1.3.2 气相色谱条件

毛细管色谱柱VF-WAXms(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)初始温度40℃,保持3 min,以5℃/min升温到200℃,再以10℃/min升温至240℃,保持8 min。进样口温度250℃,载气为He,流速1 mL/min,不分流。

1.3.3 质谱条件

电离方式EI,电子能量70 eV,离子源温度230℃,传输线和四级杆温度分别为250℃和150℃,扫描质量范围 m/z 29~600。

1.3.2 单因素试验设计

按照1.3.1的方法,在样品量为2 g、萃取温度为60℃、萃取时间50 min、饱和NaCl用量2 mL、平衡30 min、解析10 min的基础条件下,保持其他条件不变,分别设置萃取温度40、50、60、70、80℃,萃取时间30、40、50、60、70 min,样品用量1、1.5、2、2.5、3 g,饱和NaCl溶液用量0、1、2、3、4 mL,以总峰面积为指标进行单因素优化试验,每个试验重复3次。

1.3.3 Box-Behnken 响应面试验

依据单因素试验结果,选取萃取温度(X_1)、萃取时间(X_2)、样品量(X_3)、饱和NaCl溶液用量(X_4)为影响因素,以总峰面积为响应值,做4因素3水平响应面试验,设计如表1所示。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平表

Table 1 Factors and levels used in Box-Behnken analysis

水平	因素			
	萃取温度(X_1)/ ℃	萃取时间(X_2)/ min	样品量(X_3)/ g	饱和 NaCl 溶液 添加量(X_4)/mL
-1	50	50	1.5	0
0	60	60	2	1
1	70	70	2.5	2

1.4 蜂王浆挥发性化合物的测定

采用试验所优化的条件,将蜂王浆置于 20 mL 顶空瓶中,加入 1 μ L 的内标(2-甲基-3-庚酮,8.16 μ g/ μ L,正己烷溶液溶解),磁力搅拌平衡 30 min,SPME 萃取 60 min,250 $^{\circ}$ C GC-MS 进样口解吸 10 min,溶剂延迟 4 min。气相色谱及质谱条件同 1.3.2 和 1.3.3。

1.5 定性定量分析

定性分析:检索 NIST MS 数据库比对目标化合物,进行定性分析;采用相同条件对正构系列烷烃($C_7 \sim C_{30}$)进行 GC-MS 分析,利用色谱峰的保留时间计算目标相应化合物的保留指数,并与在数据库中查询的 RI 值比对(认定范围为相差 0~100),实现化合物的辅助定性。色谱峰保留指数计算如公式(1)所示:

$$\text{保留指数} = 100 \times n + \frac{100(t_a - t_n)}{t_{n+1} - t_n} \quad (1)$$

式中: t_a 为色谱峰 a 的保留时间, t_n 为正构烷烃 C_n 的保留时间(色谱峰 a 的保留时间须在正构烷烃 C_n 和 C_{n+1} 之间)。

定量分析:根据蜂王浆样品中添加的内标化合物

含量、内标化合物色谱峰面积及目标化合物色谱峰面积,计算目标化合物的含量,计算如公式(2)所示:

$$C_x = \frac{C_A \times S_x}{S_A} \quad (2)$$

式中: C_x 为目标化合物的质量浓度, C_A 为内标的质量浓度, S_x 为目标化合物的峰面积, S_A 为内标的峰面积。

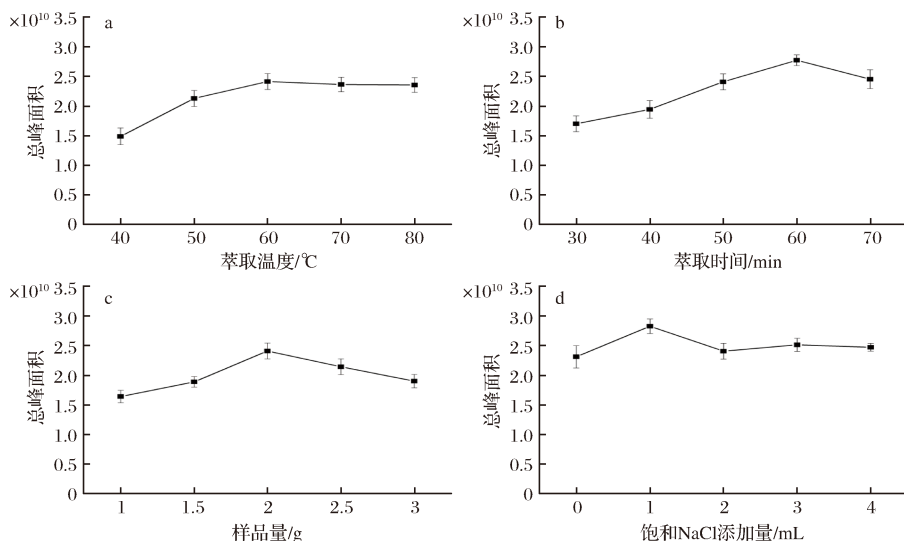
1.6 统计分析

数据采用 SPSS 25.0 软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 萃取单因素试验

由图 1-a 可见,萃取温度 40~60 $^{\circ}$ C,随着温度上升,总峰面积不断增大,60 $^{\circ}$ C 时达到最大值,之后稍有下降,70 $^{\circ}$ C 与 80 $^{\circ}$ C 的总峰面积无显著差异。因此,宜选择 60 $^{\circ}$ C 作为萃取温度。图 1-b 表明,萃取时间为 30~60 min,随时间延长,总峰面积不断增大,60 min 时,总峰面积最大,之后开始减小,其原因可能是随着萃取时间的延长部分物质会从萃取头上解析下来,进而造成总峰面积的降低。由图 1-c 可以看出,样品量对总峰面积的影响呈现出先增大再减小的趋势。在 2 g 时总峰面积最大,其原因可能是因为样品量少,吸附物的量小;样品量过大,顶空体积变小,影响吸附效果。添加适宜盐可以提高极性化合物和挥发性化合物的提取效率^[9]。由图 1-d 可知,饱和 NaCl 溶液的添加量在 1 mL 时,总峰面积最大,表明蜂王浆萃取适宜的盐添加为饱和 NaCl 溶液 1 mL。



a - 萃取温度;b - 萃取时间;c - 样品量;d - 饱和 NaCl 添加量

图 1 单因素试验结果

Fig. 1 Single-factor test results

2.2 响应曲面优化试验

利用 Design Expert 软件,对表 2 的数据进行二次多项式回归拟合,以色谱总峰面积为响应值,得到二次多元回归方程如下:

$$Y = 3.285 \times 10^{10} + 2.469 \times 10^9 X_1 - 1.857 \times 10^8 X_2 + 2.757 \times 10^8 X_3 - 3.928 \times 10^8 X_4 + 8.346 \times 10^8 X_1 X_2 - 4.472 \times 10^8 X_1 X_3 - 1.734 \times 10^9 X_1 X_4 - 8.756 \times 10^8 X_2 X_3 - 5.521 \times 10^8 X_2 X_4 - 7.175 \times 10^8 X_3 X_4 - 6.831 \times 10^9 X_1^2 - 3.730 \times 10^9 X_2^2 - 3.991 \times 10^9 X_3^2 - 4.433 \times 10^9 X_4^2$$

表 2 响应面设计及结果

Table 2 Response surface design and results					
编号	X_1	X_2	X_3	X_4	总峰面积
1	1	1	0	0	$2.506\ 71 \times 10^{10}$
2	1	0	0	1	$2.189\ 22 \times 10^{10}$
3	0	1	1	0	$2.423\ 89 \times 10^{10}$
4	0	0	0	0	$3.340\ 25 \times 10^{10}$
5	0	-1	1	0	$2.566\ 12 \times 10^{10}$
6	0	1	0	1	$2.310\ 42 \times 10^{10}$
7	0	0	0	0	$3.261\ 21 \times 10^{10}$
8	0	-1	0	1	$2.443\ 62 \times 10^{10}$
9	-1	0	-1	0	$1.837\ 76 \times 10^{10}$
10	0	0	0	0	$3.460\ 4 \times 10^{10}$
11	0	-1	0	-1	$2.451\ 26 \times 10^{10}$
12	-1	0	0	-1	$1.735\ 48 \times 10^{10}$
13	-1	1	0	0	$1.937\ 79 \times 10^{10}$
14	1	0	-1	0	$2.413\ 45 \times 10^{10}$
15	1	0	0	-1	$2.675\ 31 \times 10^{10}$
16	0	0	1	-1	$2.590\ 87 \times 10^{10}$
17	0	0	1	1	$2.468\ 98 \times 10^{10}$
18	0	0	0	0	$3.190\ 42 \times 10^{10}$
19	-1	-1	0	0	$2.226\ 22 \times 10^{10}$
20	-1	0	0	1	$1.943\ 16 \times 10^{10}$
21	1	-1	0	0	$2.461\ 32 \times 10^{10}$
22	1	0	1	0	$2.413\ 21 \times 10^{10}$
23	0	0	-1	1	$2.545\ 92 \times 10^{10}$
24	0	0	0	0	$3.170\ 35 \times 10^{10}$
25	-1	0	1	0	$2.016\ 42 \times 10^{10}$
26	0	-1	-1	0	$2.381\ 35 \times 10^{10}$
27	0	1	-1	0	$2.589\ 34 \times 10^{10}$
28	0	0	-1	-1	$2.380\ 81 \times 10^{10}$
29	0	1	0	-1	$2.538\ 91 \times 10^{10}$

由表 3 可知,试验所选用的回归模型高度显著 ($P < 0.000\ 1$),失拟项 $P = 0.60 > 0.05$ 不显著;模型 $R^2_{Adj} = 0.946\ 9, R^2 = 0.973\ 4$,信噪比 $20.834 > 4$,说明该模型与实际相切合,建立较合理,实验误差小。

表 3 二次回归方程模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for the quadratic regression model					
方差来源	总方差	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	5.195E+020	14	3.711E+019	36.66	<0.000 1
X_1	7.313E+019	1	7.313E+019	72.26	<0.000 1
X_2	4.138E+017	1	4.138E+017	0.41	0.532 9
X_3	9.122E+017	1	9.122E+017	0.90	0.358 5
X_4	1.851E+018	1	1.851E+018	1.83	0.197 7
$X_1 X_2$	2.786E+018	1	2.786E+018	2.75	0.119 3
$X_1 X_3$	8.001E+017	1	8.001E+017	0.79	0.389 0
$X_1 X_4$	1.203E+019	1	1.203E+019	11.89	0.003 9
$X_2 X_3$	3.066E+018	1	3.066E+018	3.03	0.103 7
$X_2 X_4$	1.219E+018	1	1.219E+018	1.20	0.290 9
$X_3 X_4$	2.059E+018	1	2.059E+018	2.03	0.175 7
X_1^2	3.027E+020	1	3.027E+020	299.03	<0.000 1
X_2^2	9.023E+019	1	9.023E+019	89.15	<0.000 1
X_3^2	1.033E+020	1	1.033E+020	102.06	<0.000 1
X_4^2	1.275E+020	1	1.275E+020	125.96	<0.000 1
残差	1.417E+019	14	1.012E+018		
失拟项	8.522E+018	10	8.522E+017	0.60	0.764 5
纯误差	5.647E+018	4	1.412E+018		
总和	5.337E+020	28			

响应曲面弯曲程度越大,表示影响越显著,由图 2 可见, $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_1 X_4$ 、 $X_2 X_3$ 、 $X_3 X_4$ 的响应面坡度都相对平缓,它们对总峰面积的影响均不显著,而交互项 $X_1 X_4$ 的影响极显著 ($P < 0.01$),一次项 X_1 极显著 ($P < 0.000\ 1$),其他三项不显著,二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对总峰面积的影响均极显著 ($P < 0.000\ 1$),各因素对总峰面积的影响顺序为 $X_1 > X_4 > X_3 > X_2$ 。

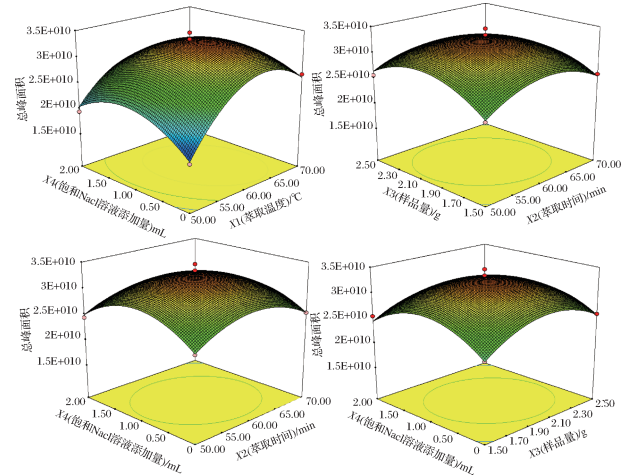


图 2 响应面三维分析图

Fig. 2 Response surface 3D analysis chart

Expert-design 软件预测的萃取条件条件为萃取温度 $61.91\ ^\circ\text{C}$,萃取时间 $59.99\ \text{min}$,样品量 $2.02\ \text{g}$,饱和 NaCl 溶液添加量为 $0.92\ \text{mL}$,总峰面积的预测

值为 $3.310\ 11 \times 10^{10}$ 。考虑到试验的实际操作情况,将萃取条件优化为萃取温度 $62\ ^\circ\text{C}$,萃取时间 $60\ \text{min}$,样品量 $2\ \text{g}$,饱和 NaCl 溶液的添加量为 $1\ \text{mL}$,在此条件下进行 3 次验证试验,得到总峰面积的平均值为 $3.247\ 99 \times 10^{10}$,试验值与预测值基本吻合。

2.3 蜂王浆挥发性风味物质测定

图 3 为样品 A 的总离子流图,其余样品与样品 A 基本相似。由图 3 可知,色谱条件适合 HS-SPME 萃取的蜂王浆挥发性化合物测定,色谱峰完全分离,很少重叠,分离效果好。

由表 4 可看出,5 个蜂王浆样品中共检出 48 种化合物,其中酸类 15 种、酯类 12 种、醛类 5 种、醇类 5 种、酮类 4 种、酚类 2 种、其他 5 种;33 种化合物是通

过保留指数和 NIST MS 数据库的双重定性,结果较为可靠。就含量而言,不同蜂王浆样品中单一挥发性化合物的含量范围为 $0.09 \sim 17.48\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。辛酸在蜂王浆的挥发性化合物中含量最高,其次是反式-2-癸烯酸、苯甲醛、(E)-2-辛烯酸、2-壬酮、己酸、2-庚酮等。

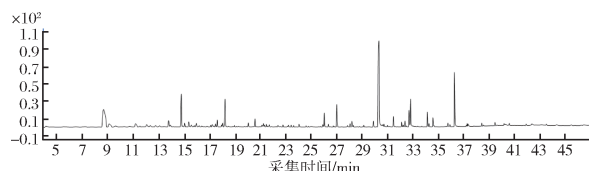


图 3 样品 A 的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of volatile components in sample A

表 4 蜂王浆样品中挥发性化合物的定性和定量分析

单位: $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Table 4 Qualitative and quantitative analysis of volatile compounds in royal jelly samples

RT	RI	鉴定方式	化合物名称	A	B	C	D	E
酸类								
17.222	1 442	RI, MS	乙酸	0.35 ± 0.01^a	—	0.25 ± 0.01^c	0.27 ± 0.02^b	0.11 ± 0.09^d
21.33	1 625	RI, MS	丁酸	0.19 ± 0.01^a	—	0.14 ± 0.01^b	0.14 ± 0.00^b	—
22.246	1 757	RI, MS	2-甲基-己酸	—	—	—	0.15 ± 0.00	—
23.415	—	MS	反式-13-十八碳烯酸	—	—	0.16 ± 0.02	—	—
26.042	1 846	RI, MS	己酸	1.10 ± 0.04^a	0.43 ± 0.03^d	0.66 ± 0.03^c	0.92 ± 0.02^b	0.46 ± 0.04^d
28.222	1 930	RI, MS	(E)-3-己烯酸	0.45 ± 0.03^a	0.22 ± 0.02^c	0.34 ± 0.02^b	0.34 ± 0.01^b	0.18 ± 0.02^c
30.324	2 060	RI, MS	辛酸	17.48 ± 0.98^a	7.98 ± 0.08^d	13.13 ± 0.44^b	12.52 ± 0.51^b	8.92 ± 0.07^c
31.484	—	MS	7-辛烯酸	0.83 ± 0.01^a	0.23 ± 0.03^c	0.45 ± 0.02^c	0.49 ± 0.01^b	0.31 ± 0.01^d
32.128	—	MS	顺式-2-辛烯酸	0.35 ± 0.01^a	0.14 ± 0.01^d	0.29 ± 0.01^b	0.21 ± 0.01^c	0.13 ± 0.01^d
32.261	2 171	RI, MS	壬酸	—	0.12 ± 0.02^b	0.15 ± 0.01^a	—	—
32.713	2 182	RI, MS	(E)-2-辛烯酸	1.56 ± 0.14^a	0.36 ± 0.02^d	1.00 ± 0.07^b	1.02 ± 0.01^b	0.51 ± 0.01^c
34.148	2 276	RI, MS	正癸酸	1.12 ± 0.04^a	0.28 ± 0.02^d	0.66 ± 0.04^b	0.71 ± 0.01^b	0.43 ± 0.03^c
36.283	2 428	RI, MS	反式-2-癸烯酸	5.12 ± 0.66^a	1.45 ± 0.11^d	3.76 ± 0.06^b	3.70 ± 0.09^b	2.25 ± 0.06^c
37.29	2 412	RI, MS	苯甲酸	—	—	0.48 ± 0.02	—	—
38.55	—	MS	苯基-丙二酸	—	—	0.13 ± 0.01	—	—
酯类								
13.81	—	MS	亚硫酸, 环己基甲基异丁酯	—	0.46 ± 0.02^b	—	0.89 ± 0.02^a	—
18.98	—	MS	硬脂酸, 3-(十八烷氧基)丙酯	—	—	—	0.16 ± 0.01	—
20.6	1 612	RI, MS	苯甲酸甲酯	0.97 ± 0.06^a	0.30 ± 0.01^d	0.42 ± 0.02^b	0.36 ± 0.02^c	0.23 ± 0.01^c
21.718	—	MS	亚硫酸, 丁基环己基甲酯	—	—	—	—	0.11 ± 0.01
21.722	—	MS	亚硫酸, 环己基甲基十四烷基酯	—	—	—	0.15 ± 0.00	—
23.64	—	MS	丁基-9-二甲酸酯	0.16 ± 0.02	—	—	—	—
24.059	1 765	RI, MS	水杨酸甲酯	0.25 ± 0.02^a	—	—	0.18 ± 0.00^b	0.10 ± 0.01^c
28.075	1 976	RI, MS	丁位辛内酯	0.26 ± 0.02^a	0.13 ± 0.03^d	0.22 ± 0.01^b	0.18 ± 0.01^c	0.09 ± 0.00^c
32.39	2 194	RI, MS	丁位癸内酯	0.26 ± 0.02^a	0.11 ± 0.01^c	0.22 ± 0.01^b	0.28 ± 0.01^a	0.09 ± 0.00^c
37.8	2 536	RI, MS	1,2-苯二甲酸, 双(2-甲基丙基)酯	—	—	—	0.52 ± 0.01^a	0.19 ± 0.01^c
39.479	—	MS	1,2-苯二甲酸, 丁基-8-甲基壬基酯	—	0.32 ± 0.02^b	—	0.60 ± 0.01^a	—
39.493	—	MS	邻苯二甲酸, 丁基十一烷基酯	—	—	0.25 ± 0.02^b	—	0.28 ± 0.01^a
醛类								
17.485	1 495	RI, MS	(E,E)-2,4-庚二烯醛	0.24 ± 0.00^a	0.11 ± 0.01^c	0.14 ± 0.01^b	0.13 ± 0.02^b	0.11 ± 0.00^c
18.235	1 520	RI, MS	苯甲醛	2.33 ± 0.14^a	1.26 ± 0.05^c	2.26 ± 0.04^a	2.09 ± 0.11^b	1.34 ± 0.03^c
21.133	1 640	RI, MS	苯乙醛	0.18 ± 0.01^a	—	0.14 ± 0.01^b	—	0.09 ± 0.01^c
21.497	—	MS	3-环己-1-烯基-丙-2-烯醛	0.16 ± 0.01^a	—	0.15 ± 0.01^a	—	0.09 ± 0.01^b
24.818	1 683	RI, MS	2,5-二甲基-1-苯甲醛	—	—	—	0.16 ± 0.00	—
醇类								
22.798	—	MS	13-十七炔-1-醇	0.48 ± 0.01^a	—	0.17 ± 0.01^b	0.15 ± 0.00^b	—
22.803	1 664	RI, MS	10-十一烯-1-醇	—	0.12 ± 0.01	—	—	—

续表 4

RT	RI	鉴定方式	化合物名称	A	B	C	D	E
26.369	1 870	RI,MS	苯甲醇	0.22 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.02 ^c	0.29 ± 0.01 ^a	--	0.09 ± 0.00 ^d
33.715	2 304	RI,MS	2-十六醇	--	--	0.15 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.01 ^a	--
37.207	--	MS	12 甲基-E,E-2,13 十八碳二烯-1-醇	--	--	0.17 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01 ^b	--
酮类								
9.108	1 182	RI,MS	2-庚酮	0.41 ± 0.03 ^d	0.37 ± 0.03 ^d	0.49 ± 0.02 ^c	0.87 ± 0.07 ^a	0.58 ± 0.05 ^b
14.776	1 390	RI,MS	2-壬酮	0.95 ± 0.15 ^b	0.38 ± 0.01 ^c	0.82 ± 0.01 ^c	0.53 ± 0.02 ^d	1.25 ± 0.03 ^a
17.122	1 468	RI,MS	2-壬烯-4-酮	0.20 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.02 ^b	--	--	0.09 ± 0.01 ^c
21.266	1 647	RI,MS	苯乙酮	0.21 ± 0.01 ^a	--	0.156 ± 0.01 ^b	0.13 ± 0.01 ^c	--
酚类								
29.151	2 000	RI,MS	苯酚	0.37 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.02 ^c	0.50 ± 0.02 ^a	0.15 ± 0.00 ^d	0.23 ± 0.01 ^c
34.672	2 318	RI,MS	2,4-二叔丁基苯酚	--	--	--	0.17 ± 0.01	--
其他								
10.524	1 251	RI,MS	均三甲苯	--	0.27 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.00 ^b	--	--
11.205	1 261	RI,MS	苯乙烯	0.10 ± 0.01	--	--	--	--
15.589	--	MS	苯并吡喃	0.21 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^d	0.17 ± 0.01 ^b	--	0.15 ± 0.00 ^c
17.266	--	MS	反式苯甲酰	--	0.09 ± 0.01	--	--	--
23.226	1 746	RI,MS	萘	0.26 ± 0.04 ^a	0.16 ± 0.01 ^b	--	--	0.10 ± 0.01 ^c

注:同一行不同小写字母表示具有显著性差异($P < 0.05$);--表示未检出或未检索到

由图 4 可知,5 个蜂王浆样品中挥发性化合物含量较高的是酸类、酯类、醛类和酮类,其中酸类远高于其他类别。不同样品间,A 样品酸类、醛类、酮类和其他类的含量最高,分别为(26.16 ± 0.43)、(3.37 ± 0.03)、(5.45 ± 0.08)、(1.16 ± 0.01) μg/μL;B 样品除酯类和其他类外,均低于其他样品;C 样品醇类和酚类最高;D 样品酯类最高,其他类未检出;E 样品除酯类、醇类、其他类低于其他样品外,其余类别高低不一。不同来源蜂王浆挥发性化合物种类含量的不同,可能与蜜源、新鲜度及贮藏条件有关。

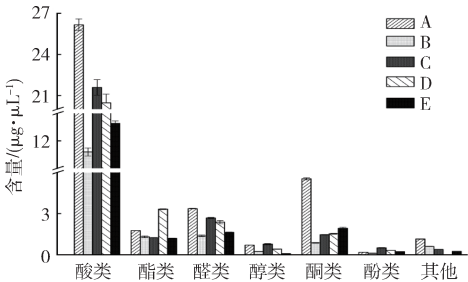


图 4 不同蜂王浆中各类挥发性化合物的含量变化
Fig.4 Contents of various volatile components of different royal jelly samples

3 讨论

HS-SPME 是从固体或液体样品的顶部空间中提取挥发性化合物到涂覆有聚合物相的萃取纤维头上。因此,HS-SPME 萃取条件会影响其分析的灵敏度和准确性^[10]。由于 HS-SPME 的机理是建立在三相析物(纤维涂层、顶空、样品)之间平衡的基础上,因此 HS-SPME 对顶空挥发性化合物的分析在很大程度

上受到小瓶中挥发性化合物蒸气压的影响。据报道,影响蒸气压力和顶部空间中挥发性成分平衡的主要变量是萃取温度、平衡时间和萃取时间^[11-12]。添加 NaCl 用于挥发物的提取,主要是利用盐析效应增加分析物进入顶空及纤维涂层的量^[13]。因此,可以通过优化所涉及的参数来获得灵敏度和萃取率之间平衡良好的方法^[14]。

基于试验获得的蜂王浆挥发性化合物的萃取条件,检测出了符合条件的 48 种物质,酸类物质和酯类占比最高,分别是 31%、25%。其次为醛类、醇类各占 10%、酮类 8%。挥发性化合物对香气及某些成分的味道有着很大的影响^[15-16],5 个样品中酸类物质最多,含量也最高,这与蜂王浆自身的酸味相吻合。5 个样品中共有的化合物有 16 种,如辛酸、己酸、苯甲醛、苯酚和苯甲酸甲酯等,这些共有化合物可能与蜂王浆的特征风味有关。

4 结论

蜂王浆组成与特性显著不同于其他食品原料,其挥发性化合物的提取需要依据其特性采用适宜的方法及条件。采用 HS-SPME 方法,在萃取温度 62 ℃、萃取时间 60 min、样品量 2 g、饱和 NaCl 溶液的添加量为 1 mL 的条件下,总峰面积的平均值可达到 3.247 99 × 10¹⁰,提取分离效果好。不同蜂王浆因蜜蜂品种、蜜源等条件不同,挥发性化合物存在差异,但其共有的辛酸、己酸、苯甲醛、苯酚和苯甲酸甲酯等可能与蜂王浆的特征风味有关。本实验仅测定了 5 个不同样品的挥发性化合物,应对不同蜜源、不同贮存

条件的蜂王浆进行进一步的测定,挥发性化合物的测定有助于评价蜂王浆的新鲜度,而对贮存条件、方式、时间等方面进行深入研究将是未来蜂王浆挥发性物质的研究方向之一。

参 考 文 献

- [1] LIU J R, YUAN Y C, SHI L S, et al. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest[J]. Agric Food Chem. 2008, 56 (23): 11 447 - 11 452.
- [2] SCARSELLI R, DONADIO E, GIUFFRIDA M G. Towards royal jelly proteome[J]. Proteomics, 2005, 5: 769 - 776.
- [3] ANKLAM E, RADOVIC B. Suitable analytical methods for determining the origin of European honey[J]. American Laboratory, 2001, 33: 60 - 62.
- [4] WALDMAR, WARDENLKL, MAGDLENA, et al. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis[J]. Institute of Food Science Technology, 2004, 39: 703 - 717.
- [5] ISIDOROV V A, BAKIER S, GRZECH I. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of volatile and extractable compounds of crude royal jelly[J]. Journal of Chromatography B, 2012, 885: 109 - 116.
- [6] ZHAO Y Z, LI Z G, TIAN W L, et al. Differential volatile organic compounds in royal jelly associated with different nectar plants[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(5): 1 157 - 1 165.
- [7] BOSELLI E, CABONI M F, SABATINI A G, et al. Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage[J]. Apidologie, 2003, 34(2): 129 - 138.
- [8] 任佳森, 彭文君, 田文礼, 等. 加工工艺对蜂蜜挥发性成分的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 41 - 45.
- [9] CEBALLOS LIENA, PINO JORGE A, DAGO ANGEL, et al. Optimization of a HS-SPME/GC-MS method for determination of volatile compounds in some cuban unifloral honeys[J]. Food Quality, 2010, 33(4): 507 - 528.
- [10] MIRHOSSEINI H, SALMAH Y, NAZIMAH S A H, et al. Solid-phase microextraction for headspace analysis of key volatile compounds in orange beverage emulsion[J]. Food Chemistry, 2007, 105: 1 659 - 1 670.
- [11] ZHANG Y, GAO B, ZHANG M, et al. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile components of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. European Food Research and Technology, 2009, 229: 457 - 465.
- [12] KING A J, READMAN J W, ZHOU J L. The application of solid-phase micro-extraction (SPME) to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [J]. Environ Geochem Health, 2003, 25: 69 - 75.
- [13] MOREIRA N, MEIRELES S, BRANDÃO T, et al. Optimization of the HS-SPME-GC-IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers[J]. Talanta, 2013, 117: 523 - 531.
- [14] BALASUBRAMANIAN S, PANIGRAHI S. Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: a review[J]. Food Bioprocess Technology, 2011, 4: 1 - 26.
- [15] BARONI M V, NORES M L, DIAZ M D P, et al. Determination of volatile organic compound patterns characteristics of five unifloral honeys by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(19): 7 235 - 7 241.
- [16] MANYI-LOH C E, NDIP R N, CLARKE A M. Volatile compounds in honey: A review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(12): 9 514 - 9 532.