

杏仁油挥发性成分指纹图谱的构建及掺伪定量检测方法研究

孙亚娟^{1,2,3},王进英^{1,2,3},陈选^{1,2,3},金超^{1,2,3},钟海雁^{1,2,3},周波^{1,2,3,*}

(1.中南林业科技大学食品科学与工程学院,湖南长沙410004;

2.粮油深加工与品质控制湖南省重点实验室,湖南长沙410004;

3.经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室,湖南长沙410004)

摘要:以17种不同的杏仁油为原料,采用顶空固相微萃取(SPME)和气相色谱仪测定了其挥发性成分,建立了杏仁油挥发性成分指纹图谱,并采用向量夹角余弦法计算了指纹图谱相似度。结果表明,杏仁油挥发性成分指纹图谱由12个共有色谱峰构成,通过聚类分析和相似度分析,发现该指纹图谱重复性好,专属性强。在该方法的基础上,建立了菜籽油-杏仁油掺伪模型:Y = -2947.0X³ + 1254.9X² + 77.661X + 46.693(其中Y为菜籽油掺假比例%,X为夹角余弦cosθ),适用于掺伪量15%以上杏仁油的鉴别。

关键词:杏仁油,挥发性成分,指纹图谱,掺伪模型

Detection method research of adulteration of apricot kernel oil based on fingerprint of volatile components

SUN Ya-juan^{1,2,3}, WANG Jin-ying^{1,2,3}, CHEN Xuan^{1,2,3}, JIN Chao^{1,2,3}, ZHONG Hai-yan^{1,2,3}, ZHOU Bo^{1,2,3,*}

(1.School of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

2.Hunan Province Key Laboratory of Grain, Oil Processing and Quality Control, Changsha 410004, China;

3.Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees of

Education Ministry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: To build a fingerprint based on volatile component of apricot kernel oil, we used the headspace solid phase microextraction (SPME) and GC method to determinate the volatile components of 17 kinds of different apricot kernel oil, and the fingerprint similarity was calculated by vector included angle cosine method. The results showed that the apricot kernel oil fingerprint of volatile component consisted of 12 common chromatographic peaks, and the fingerprint was of good repeatability and strong specificity according to the similarity and cluster analysis. Based on the method, we built the adulteration model for rapeseed oil, apricot kernel oil which was that: Y = -2947.0X³ + 1254.9X² + 77.661X + 46.693 (Y for rapeseed oil adulteration ratio (%), X for cosθ), and this model could be applied to the identification of more than 15% of the amount of adulteration apricot kernel oil.

Key words: apricot kernel oil; volatile components; fingerprint; adulteration model

中图分类号:TS227

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2017)01-0296-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.01.051

杏仁(*Prunus Armeniaca L.*)分为苦杏仁和甜杏仁,为蔷薇科李属植物杏或山杏的种子^[1],具有丰富的营养价值和良好的药用价值^[2]。杏仁油不饱和脂肪酸含量高达90%以上^[3],其在营养食品、药用及轻工等方面具有很大的应用价值,可作护肤化妆品的原料、精密仪器的润滑油、医药工业用油、食品添加剂等^[4]。

由于杏仁油原料较贵,有些非法商贩销售掺假

杏仁油来牟取暴利^[5]。这些掺假商品外观和气味与纯正的杏仁油相似,仅凭人的视觉和嗅觉很难区分真伪。杏仁油的特殊香气是衡量杏仁油品质的一个重要的特征,研究杏仁油的挥发性化学成分可以确定杏仁油的香气组成,进而可以鉴别其真伪。

固相微萃取(SPME)技术是依靠纤维头从样品中吸附待测物,并解析于分析设备中的一种无溶剂样品预处理技术,是当今色谱分析中使用极为广泛

收稿日期:2016-07-08

作者简介:孙亚娟(1990-),女,在读硕士研究生,研究方向:木本食用油脂加工,E-mail:3062212840@qq.com。

*通讯作者:周波(1978-),男,博士,副教授,主要从事木本油脂加工研究,E-mail:zhbo78@126.com。

基金项目:油料脂质化学与营养湖北省重点实验室开放性课题(2014KF06);湖南省自然科学基金(11JJ4027);国家林业局948项目(2013-4-01)。

的样品前处理方法^[6],具有灵敏度高、重现性及线性好、操作简单的特点,与气相色谱或液相色谱联用,实验效率高^[7]。气相色谱是一种分析速度快、分离效率高的分离分析方法^[8],样品组分在流动相和固定相之间能够瞬间达到平衡,因此气相色谱对挥发性成分的分析能起到独特的作用。陈俊卿等^[9]将顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用分析并确定了白鲢鱼中的27种挥发性成分。胡国栋等^[10]采用SPME-CC-MS技术分析了啤酒的微量香味组分,共分离鉴定出41种化合物。Mildner-Szkudlarz等^[11]采用包括SPME-GC/MS在内的方法分析了榛子油掺入到橄榄油中的挥发性化合物,通过主成分分析,可以对5%~50%的掺伪量进行鉴定。秦早等^[12]采用该技术研究了两种芝麻油和另外两种芝麻香精的挥发性成分,结果表明该技术能够较好的鉴别掺伪芝麻油。Sanahuja等^[13]利用杏仁油的挥发性成分特征对两种西班牙和一种美国杏仁油进行了对比分析实验,采用石油醚浸出法制油,在优化一系列的主要实验变量后,发现美国杏仁油的挥发性成分中壬醛含量低,并认为采用HS-SPME/GC-MS技术可以实现杏仁油掺伪的鉴定。指纹图谱是利用现代仪器分析获得代表该物质特征各种图谱数据资料的一种技术,具有信息量大且简便快捷的优点,尤其适用于含有复杂组分物质的分析鉴定^[14]。已有学者将指纹图谱应用到油脂鉴定和掺伪识别中,但基本都围绕脂肪酸组成的研究^[15-20],基于油脂挥发性成分的掺伪鉴别还很少。

本研究拟借助气相色谱仪来测定17种不同原料杏仁油的挥发性成分数据,并以此来构建杏仁油挥发性成分的指纹图谱,以期为杏仁油的质量控制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

杏仁油(17种,分别编号为S₁~S₁₇),其中S₆~S₉和S₁₂为市售,其余均为实验室自榨;十二烷(Dodecane, 44010-5 mL, 纯度>99.8%)、壬醛(442719-1G, 纯度>98%)、2-反己烯醛(132659-5G, 纯度>98%),均购自美国SIGMA-ALDRICH集团Fluka公司。

RCT basic型磁力加热搅拌装置 德国IKA仪器有限公司;CP224C型电子天平 奥豪斯仪器(上海)有限公司;SB-5200 DTDN型超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司;SPME手动进样手柄、DVB/CA/PDMS(2 cm, 50/30 μm)纤维头、15 mL带有PTFE/硅橡胶瓶垫的透明样品瓶 美国Supelco公司;GC-2014型气相色谱仪 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 杏仁油挥发性成分的顶空固相微萃取(SPME) 准确称取0.2 g杏仁油油样及0.01 g内标溶液(浓度为0.03305 mg/g的十二烷油溶液,33.05 mg的十二烷溶于1000 g的精炼杏仁油)放入15 mL透明样品瓶中。将磁力加热搅拌装置调至90 °C,待温度稳定后,将SPME针管穿过样品瓶的硅橡胶瓶垫,伸

出纤维头,顶空萃取10 min。待气相色谱仪处于准备状态后,将SPME迅速穿过进样口硅胶隔垫,伸出纤维头解析10 min。SPME纤维头在下次萃取前应在进样口200 °C下洗脱10 min以上。

1.2.2 气相色谱仪(GC)分析条件 采用美国supelco公司Capillary Column色谱柱(60 m×0.25 mm×0.2 μm);氢火焰离子化检测器(FID);进样口温度为200 °C;检测器温度为250 °C;进样量为1 μL;以氮气为载气;以氢气为燃气;以无油空气为助燃气;色谱柱升温采用程序升温,起始柱温为40 °C(保持2 min),以3 °C/min的升温速度升至160 °C后保持2 min,继续以12 °C/min的升温速度升至220 °C保持5 min。

2 结果与分析

2.1 杏仁油挥发性成分指纹图谱的构建

对各杏仁油色谱峰进行分析,去除峰面积过低(浓度较小)和保留时间长于54 min的峰(此类峰一般为高沸点化合物),在此基础上筛选出匹配数大于10的12个共有色谱峰。将各挥发性成分数据导入到中药色谱指纹图谱相似度评价系统,经过多点校正得到17种杏仁油的总挥发性成分图谱叠加图(图1)。

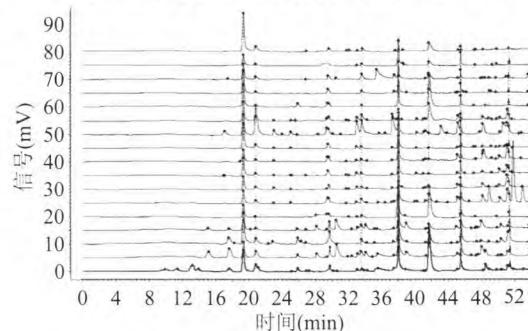


图1 不同杏仁油样品挥发性成分的GC指纹图谱

Fig.1 The GC fingerprint of volatile components of different apricot kernel oil samples

为了降低分析过程中由色谱图保留时间漂移、响应值变迁等带来的影响,确保所建立指纹图谱的准确性,选定十二烷为内标参考物,分别计算各共有峰的相对保留时间和相对保留峰面积,从而对其进行定性和定量分析。由指纹图谱相似度评价系统,得到17种杏仁油挥发性成分的共有峰色谱图,见图2。通过与对照品比较,确定3号峰、5号峰、7号峰、8号峰和10号峰分别为2-反己烯醛、壬醛、苯甲醇、苯甲醛以及苯甲酸乙酯。

2.2 杏仁油挥发性成分指纹图谱构建方法的验证

对实验2.1所建的杏仁油挥发性成分指纹图谱方法进行方法学的验证。精密度实验:取杏仁油样品(S₁),进行挥发性成分固相微萃取,按照1.2.2色谱条件重复进样5次,其色谱图中各共有指纹峰相对保留时间的RSD为0.23%~0.38%,相对峰面积的RSD为0.91%~3.63%;重现性实验:取杏仁油样品(S₁)5份,进行挥发性成分固相微萃取,按1.2.2色谱条件进样分析,其色谱图中各共有指纹峰相对峰面积的RSD为0.15%~0.62%,相对峰面积的RSD为

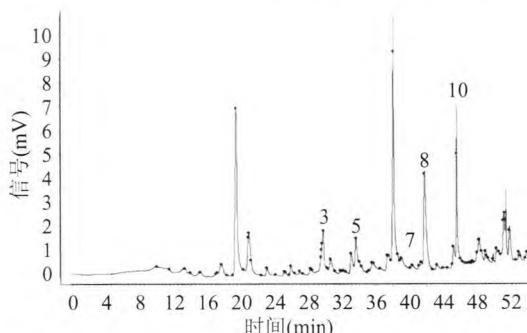


图2 各批次杏仁油挥发性成分GC共有峰色谱图

Fig.2 The GC chromatogram of volatile components common peak of apricot kernel oil samples

1.43%~4.33%;稳定性实验:取杏仁油样品(S_i)6份,与内标溶液一起加入到透明样品瓶中,于室温下放置,分别进行0、2、4、8、12、24 h不同时间的挥发性成分固相微萃取,按1.2.2色谱条件进样分析,各共有指纹峰与参比峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于4.0%。综上,本研究所构建的杏仁油挥发性成分指纹图谱在精密度、稳定性和重现性等方面满足指纹图谱构建的方法学要求^[21]。因此,所构建的指纹图谱方法能准确地应用于杏仁油挥发性成分的鉴别。

2.3 不同产地杏仁油挥发性成分的聚类分析

聚类分析的目标是要求同一类内的数据尽可能相近,而不同类之间的数据尽可能相异^[22]。使用SPSS软件,采用夹角余弦作为测度,标准化全距从0到1,按最近邻元素分析法对检测到的17个不同杏仁油样品的挥发性成分进行聚类分析,结果以树状图表示,见图3。结合表1相似度的结果将样品聚为4类:样品 S_{14} 、 S_{16} 、 S_{10} 、 S_2 、 S_4 、 S_3 、 S_1 、 S_5 、 S_{13} 、 S_9 、 S_8 、 S_7 、 S_{12} 为第一类,结合表1,相似度均大于0.8;从聚类分析看, S_6 、 S_{11} 应属于第一类,由于其相似度分别为0.571和0.602,均小于0.8,建议将其单独作为一类,即第二类; S_{15} 和 S_{17} 分别作为第三类和第四类。

此外,由图3可知,样品(S_{14})和样品(S_{16})在聚类重新标定距离约为1的最小水平上形成两个聚类,这表明 S_{14} 和 S_{16} 有最大的相似性;随着聚类重新标定距离的逐渐变大,其他样品也随之进入到不同的类别中,当聚类重新标定距离为25时,全部样品的挥发性成分数据可并为一类,聚类重新标定距离的最大值和最小值相差了接近24,可见所选的17个样品间的挥发性成分差异较大,样品具有一定的代表性,需要较大的聚类重新标定距离才能将其聚为一类,这也从一定程度上说明所建立的杏仁油挥发性指纹图谱有较广的应用范围;当聚类重新标定距离值接近16时,可聚为三类,其中样品(S_{15})和样品(S_{17})分别单独聚为一类,其余15个样品聚为同一类,进一步分析发现样品(S_{15})和样品(S_{17})均是来自新疆伊犁的原料经冷榨所制备的,这可推测杏仁油原料的产地对其的挥发性成分组成有一定影响。

2.4 杏仁油挥发性成分相似度评价

由于指纹图谱技术具有适合从整体上分析复杂

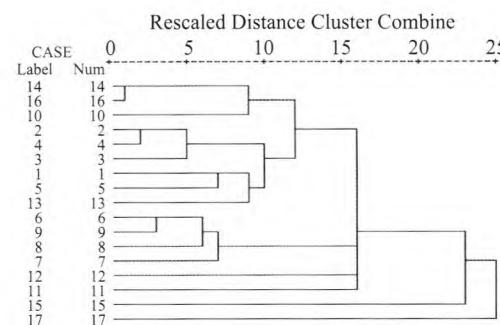


图3 17种杏仁油样品聚类分析树状图

Fig.3 The cluster analysis tree of 17 apricot kernel oil samples

物质组成的稳定性特点,近年来,已成为国内外广泛接受的中药质量评价模式^[23]。本研究以2.1杏仁油挥发性成分指纹图谱的构建数据为基础,采用样本间夹角余弦来计算相似度,结果见表1。

表1 17种杏仁油样品的相似度

Table 1 The similarity of 17 apricot kernel oil samples

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S_1	0.843	S_{10}	0.864
S_2	0.819	S_{11}	0.602
S_3	0.922	S_{12}	0.843
S_4	0.845	S_{13}	0.816
S_5	0.836	S_{14}	0.869
S_6	0.571	S_{15}	0.731
S_7	0.820	S_{16}	0.896
S_8	0.874	S_{17}	0.761
S_9	0.818		

除样品 S_6 、 S_{11} 、 S_{15} 和 S_{17} 以外,其余13批杏仁油样品的相似度均大于0.8。这表明杏仁油样品虽然在产地、榨油方法或者制备工艺上有所不同,但其的挥发性主要成分构成依然具有一定的稳定性,仅在量上存在不显著性的差异。因此,以12个共有峰构成的杏仁油挥发性成分指纹图谱,重复性好,可用于杏仁油质量评价研究。

2.5 菜籽油—杏仁油的掺伪定量检测

对10份菜籽油-杏仁油掺伪样品的挥发性成分气相色谱图数据进行直观分析与特征色谱峰分析。由于上述特征色谱峰峰面积均呈线性变化,因而选取色谱峰面积大于5%的色谱峰峰面积作为向量计算夹角余弦。利用下式^[24]来计算各掺假杏仁油对纯杏仁油的相似度,结果见表2。

$$\cos\theta = \frac{X \cdot Y}{|X| \times |Y|} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n X_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n Y_i^2}}$$

由表2可知,掺假量越多,指纹图谱相似度越小,二者呈线性递减曲线,线性方程式可拟合为 $Y = -2947.0X^3 + 1254.9X^2 + 77.661X + 46.693$ (Y 为菜籽油掺假比例%, X 为夹角余弦 $\cos\theta$)。通过线性方程式计算掺假量,与实际掺假量进行比较,并计算相对误差,相对误差平均值为4.01%;掺假量在15%~100%范围内的相对误差平均值为3.52%,且该掺假

范围内的检测相对误差均小于 10%。这从一定程度上说明,掺假量越大,相对误差越小。因而,该模型可用于检验杏仁油掺假菜籽油的比例(以 15%~100% 为宜)。

表 2 杏仁油掺菜籽油挥发性成分
指纹图谱相似度与相对误差

Table 2 The apricot kernel oil mixed with canola oil
volatile components fingerprint similarity and relative error

实际掺假量 (%)	$\cos\theta$	相似度	计算掺假量 (%)	相对误差 (%)
7.979	0.523	52.3	8.976	12.50
15.505	0.518	51.8	14.032	9.50
25.269	0.506	50.6	25.493	0.89
34.973	0.492	49.2	37.694	7.78
47.758	0.482	48.2	45.663	4.39
51.975	0.476	47.6	50.155	3.50
65.844	0.451	45.1	66.626	1.19
74.091	0.431	43.1	77.331	4.37
83.333	0.422	42.2	81.472	2.23
91.533	0.398	39.8	90.590	1.03
100	0.357	35.7	100.267	0.27
均值				4.01
掺假量在 15%~100% 范围内均值				3.52

3 结论

建立了 17 种杏仁油挥发性成分的指纹图谱,通过聚类分析和相似度分析,表明该指纹图谱专属性强,重复性好,可应用于杏仁油质量评价研究。建立了菜籽油-杏仁油的掺伪模型: $Y = -2947.0X^3 + 1254.9X^2 + 77.661X + 46.693$, 可应用于检验菜籽油掺伪量 15% 以上的杏仁油。

参考文献

- [1] 张慧敏, 孙容芳, 于同泉, 等. 超临界 CO_2 流体萃取杏仁油的研究 [J]. 粮油食品科技, 2001, 1(9): 29~41.
- [2] 中国科学院西北植物研究所编. 秦岭植物志第一卷(第二册) [M]. 科学出版社, 1974.
- [3] 赵文彬, 刘金荣, 但建明, 等. 用均匀设计法优选苦杏仁油的超声提取工艺 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(4): 303~304.
- [4] 张华, 于森. 仁用杏发展及综合利用现状与潜力 [J]. 辽宁农业科学, 2005, 6: 40~42.
- [5] 林丽敏. 气相色谱法测定芝麻油掺伪的研究 [J]. 粮食储藏, 2006, 35(3): 43~45.
- [6] 黄永辉, 钟海雁, 李忠海. 固相微萃取及其在食用植物油香气研究中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(8): 192~196.
- [7] 吴继红, 胡小松, 周珊, 等. 固相微萃取和气-质联用技术在快速测定苹果中挥发性成分中的应用 [J]. 饮料工业, 2003, 6(3): 39~41.
- [8] 邢丽红, 冷凯良, 孙伟红, 等. 气相色谱法检测鱼和虾中复硝酚钠残留量 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2013, 52(6): 104~109.
- [9] 陈俊卿, 王锡昌. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法分析白鲢鱼中的挥发性成分 [J]. 质谱学报, 2005, 26(2): 76~80.
- [10] 胡国栋, 张晓磊. 顶空固相微萃取-气相色谱/质谱分析啤酒微量香味组分的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 1~5.
- [11] Mildner-Szkudlarz S, Jeleń H H. The potential of different techniques for volatile compounds analysis coupled with PCA for the detection of the adulteration of olive oil with hazelnut oil [J]. Food Chemistry, 2008, 110(3): 751~761.
- [12] 秦早, 杨冉, 高桂园, 等. 顶空固相微萃取结合气质联用分析芝麻油和芝麻香精的挥发性成分 [J]. 食品科学, 2012, 33(24): 263~268.
- [13] Sanahuja AB, Santonja MR, Teruel NG, et al. Classification of almond cultivars using oil volatile compound determination by HS-SPME-GC-MS [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2011, 88(3): 329~336.
- [14] 陈辉, 汤道权, 戚建良, 等. 基于指纹图谱技术快速检测掺伪花生油的方法探究 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(22): 7325~7326.
- [15] 黄娇丽. 山茶油掺伪检验方法研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2014.
- [16] 喻凤香. 米糠油指纹图谱的构建及掺伪定量检测技术研究 [J]. 中国油脂, 2015, 40(2): 61~65.
- [17] 李雪琴, 黎海红, 苗笑亮. 指纹图谱相似度在芝麻油掺伪检测中的应用 [J]. 食品科技, 2009, 34(3): 259~264.
- [18] 王明清. 食用油气相色谱指纹图谱鉴定技术及其应用研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [19] 喻凤香, 林亲录, 黄中培, 等. 基于指纹图谱相似度的米糠油掺伪检测方法研究 [J]. 中国粮油学报, 2013, 28(10): 118~122.
- [20] Seo H Y, Ha J, Shin D B, et al. Detection of corn oil in adulterated sesame oil by chromatography and carbon isotope analysis [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2010, 87(6): 621~626.
- [21] 国家药品监督管理局. 关于印发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的通知 [J]. 中成药, 2000, 22(10): 671.
- [22] 邓冠男. 聚类分析中的相似度研究 [J]. 东北电力大学学报, 2013(1): 156~161.
- [23] 关洪月, 李林, 刘晓, 等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 282~287.
- [24] 谷瑞敏, 涂洪谊, 孙鹤. 中药色谱指纹图谱相似度计算方法的探讨 [J]. 中成药, 2009, 31(7): 988~990.