

鹅掌柴蜂蜜中特征性成分鉴定及真实性评价

王琪琦, 黄忠连, 王莉, 董捷, 林珣, 张根生

Characteristic Compounds Identification and Authenticity Evaluation of Heptapleurum Honey

WANG Qiqi, HUANG Zhonglian, WANG Li, DONG Jie, LIN Xun, and ZHANG Gensheng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100052>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

稳定同位素技术在蜂蜜真实性溯源中的研究进展

Research Progress of Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry for Authenticity and Traceability in Honey

食品工业科技. 2018, 39(17): 300-304,308 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.17.050>

基于HS-SPME-GC/MS指纹图谱及化学计量学的野坝子蜂蜜鉴别

Research on *Elsholtzia rugulosa* Hems L. Honey via HS-SPME-GC/MS Fingerprint and Chemometrics Analysis

食品工业科技. 2020, 41(3): 221-227 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.03.037>

基于肽生物标志物技术鉴别肉品的真实性研究进展

Research Progress in Identification of Meat Authenticity based on Peptide Biomarker Technology

食品工业科技. 2019, 40(5): 300-305 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.05.051>

火龙果的功能及其作用机制研究进展

Research Progress on the Function of Pitaya and Its Mechanism

食品工业科技. 2019, 40(21): 352-360 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.21.057>

指纹图谱在食品分析中的应用研究进展

Advances in Application of Fingerprint Technology in Food Analysis

食品工业科技. 2021, 42(12): 413-421 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070109>

基于聚类分析的白茶高效液相色谱指纹图谱研究

HPLC Fingerprints of White Tea Based on Cluster Analysis

食品工业科技. 2021, 42(16): 255-262 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100150>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王琪琦, 黄忠连, 王莉, 等. 鹅掌柴蜂蜜中特征性成分鉴定及真实性评价 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 238–245. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100052

WANG Qiqi, HUANG Zhonglian, WANG Li, et al. Characteristic Compounds Identification and Authenticity Evaluation of Heptapleurum Honey[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 238–245. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100052

· 分析检测 ·

鹅掌柴蜂蜜中特征性成分鉴定及真实性评价

王琪琦^{1,2}, 黄忠连³, 王莉⁴, 董捷², 林珣², 张根生^{1,*}
(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150000;
2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093;
3. 广西梧州甜蜜家蜂业有限公司, 广西梧州 543000;
4. 江苏鸿祺生物科技有限公司, 江苏泰州 225300)

摘要: 为明确鹅掌柴蜂蜜中特征性成分并建立鹅掌柴蜂蜜的真实性评价方法, 本研究采用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱 (HPLC-Q-TOF-MS/MS) 法对鹅掌柴蜂蜜中特征性成分进行定性定量分析。在鹅掌柴蜂蜜中共鉴定出 5 个成分, 分别为 4-(1'-环乙醚-3'-丁二醇)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮 (苦蜜素 B)、3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇、4-(1'2'-二羟基-3'环氧丙烷)-3,5,5-2-环己烯酮 (苦蜜素 C)、反,反式脱落酸、顺,反式脱落酸。其中首次在蜂蜜中发现 3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇, 并将其定为鹅掌柴蜂蜜的标志性成分。收集 10 个不同产地的鹅掌柴原料蜜, 建立鹅掌柴蜂蜜的 HPLC 指纹图谱, 结合特征性成分和指纹图谱对市售的 6 个鹅掌柴蜂蜜进行真实性评价, 结果表明, 其中 3 个品牌为品质较好的鹅掌柴蜂蜜, 2 个品牌为鹅掌柴蜂蜜中可能混入其他蜂蜜, 1 个品牌中未检测到鹅掌柴蜂蜜的标志性成分, 并且色谱图与指纹图谱存在明显差异, 推测其不是鹅掌柴蜂蜜。本研究为鹅掌柴蜂蜜真实性评价提供理论参考。

关键词: 鹅掌柴蜂蜜, 特征性成分, 指纹图谱, 真实性评价

中图分类号: S896.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)23-0238-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100052



本文网刊:

Characteristic Compounds Identification and Authenticity Evaluation of Heptapleurum Honey

WANG Qiqi^{1,2}, HUANG Zhonglian³, WANG Li⁴, DONG Jie², LIN Xun², ZHANG Gensheng^{1,*}

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150000, China;

2. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;

3. Tianmijia Bee Industry Co., Ltd., Wuzhou 543000, China;

4. Jiangsu Hongqi Biotechnology Co., Ltd., Taizhou 225300, China)

Abstract: In order to clarify the characteristic compounds and establish the authenticity evaluation method of heptapleurum honey, high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (HPLC-Q/TOF-MS/MS) was used to qualitative and quantitative analysis of characteristic compounds in heptapleurum honey. Five compounds were identified including 4-(1'-cyclo-diethyl ether-3'-butanediol)-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexenone (Unedone B), 3,4,5-trimethoxy cinnamyl alcohol, 4-(1'2'-dihydroxy-3'epoxypropane)-3,5,5-2-cyclohexenone (Unedone C), trans, trans abscisic acid, and cis, trans abscisic acid. Notably, 3,4,5-trimethoxy cinnamyl alcohol was first found in honey, and it could be a marker of heptapleurum honey. Moreover, 10 raw heptapleurum honey samples with different geographic origins were collected to establish HPLC fingerprint. The authenticity of six commercial heptapleurum honey samples were evaluated by

收稿日期: 2022-10-09

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2015 IAR); 国家蜂产业技术体系项目 (CARS-44-KXJ19)。

作者简介: 王琪琦 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品与生物活性物质, E-mail: 1195903369@qq.com。

* 通信作者: 张根生 (1964-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 畜产品研究与综合利用, E-mail: zhanggsh@163.com。

combining characteristic compound with HPLC fingerprint. The results demonstrated that three brands of sample were genuine pure heptapleurum honey, two brands of sample might be mixed with other honeys. A brand sample did not contain characteristic compound and were significantly different with the standard fingerprints of heptapleurum honey. It was inferred that the sample was not heptapleurum honey. This study provides theoretical reference for the authenticity evaluation of heptapleurum honey.

Key words: heptapleurum honey; characteristic component; fingerprints; authenticity evaluation

蜂蜜是指蜜蜂采集植物花蜜、植物活体分泌物或在植物活体上吮吸的蜜源昆虫排泄物等生产的天然甜味物质,与其自身分泌的特殊物质结合转化、沉积、脱水、贮藏并留存于蜂巢中直至成熟的一种物质^[1]。蜂蜜中主要包含葡萄糖和果糖,此外还含有少量蛋白质、酶、多酚、萜烯类等营养物质^[2-4]。这些成分赋予了蜂蜜多种功能活性^[5],如抗菌^[6]、抗炎^[7]、抗氧化^[8]等。鹅掌柴蜂蜜呈浅琥珀色,味甘略带有苦味^[9],主产自广西、广东等地,是我国南方特有的冬季蜜种。以往关于鹅掌柴蜂蜜的研究只有其抗氧化活性^[10],而其特征性成分和真实性评价方法的研究几乎没有。

据统计,蜂蜜是目前十大最易掺假食品之一^[11],其掺假方式主要包括向蜂蜜中掺入糖浆^[12-13]和向高价蜂蜜中掺入低价蜂蜜。传统的蜂蜜真实性检测方法多集中在孢粉学和糖浆标志物检测上^[14]。然而,孢粉学检测需要专业孢粉学背景,且无法检测多种蜂蜜混合的掺假^[15]。糖浆标志物检测缺点是糖浆的种类繁多,不同种类糖浆的标志物不同,特别是有些糖浆通过大孔树脂等过滤可以有效的去除糖浆标志物,这给蜂蜜的真实性检测带来了巨大困难。AOAC 碳同位素检测也只能检测到 C4 植物糖浆掺假,对 C3 植物糖浆无效^[16-17]。核磁共振法和超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法价格昂贵,且核磁共振需要大量的真蜂蜜样本建立庞大的数据库作为支撑,无法对超出数据库外的样本做出评价^[18-19]。

近年来,蜂蜜的真实性检测从对糖浆标志物检测转移到蜂蜜本身化合物检测上。Qiao 等^[20]通过对洋槐蜜、椴树蜜、油菜蜜中的特征性成分的研究,发现洋槐蜜中的萜烯类化合物红花菜豆酸、椴树蜜中的萜烯类化合物椴树素、油菜蜜中的酚酸酯类成分丁香酸甲酯可以作为这三种单花蜜的标志成分,结合标志成分和指纹图谱,实现这三种单花蜜的真实性评价。林珣等^[21]对枸杞蜜中植物化合物分析,发现其中特有的黄酮类成分花旗松素,并将其作为枸杞蜜的标志成分,以此建立枸杞蜜的真实性评价方法。因此,通过挖掘单花蜜中特征性化合物,通过特征性化合物建立单花蜜的真实性评价方法对单花蜜真实性评价具有重要意义。目前针对鹅掌柴蜂蜜品质评价缺乏系统的方法,因此,本研究通过对鹅掌柴蜂蜜中特征性成分进行分析,挖掘鹅掌柴蜂蜜中的特征性化合物,通过特征性化合物和指纹图谱建立鹅掌柴蜂蜜真实性评价方法,为鹅掌柴蜂蜜的真实性

评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鹅掌柴蜂蜜样品 中国农业科学院蜜蜂研究所提供,采自广东、广西、海南等地;甲醇(色谱纯)、乙酸(质谱纯) 美国 Thermo Fisher 公司;反,反脱落酸、顺,反脱落酸 纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma 公司;4-(1'-环乙醚-3'-丁二醇)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮 上海源叶生物科技有限公司;3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇 纯度 $\geq 97\%$,本实验室合成。

SevenEasyS20 型 pH 计 瑞士梅特勒公司;ThermoSorvall 离心机 美国 Thermo Fisher 公司;Strata-X-A 固相萃取柱(3 mL) 美国 Phenomenex 公司;0.22 μm 滤膜 Milipore 公司;安捷伦 6500 型 Q-TOF 液质联用仪,配备 Phenomenex Gemini C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm,3 μm)反相色谱柱 美国 Agilent 公司;DN-24W 氮吹仪 上海达洛科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蜂蜜中化合物富集 参考乔江涛^[22]的研究方法,称取 20 g 蜂蜜样品,加入 80 mL 超纯水,制备体积分数为 5% 的氨水,将蜂蜜样品 pH 调为 7,放入离心机 9000 r/min 离心 15 min。保留上清液,合并至烧杯,用 3 mL 分析级甲醇活化 SPE 固相萃取柱,再用 3 mL 超纯水进行平衡,用固相萃取柱进行富集,结束后用 2 mL 超纯水清洗,再用 2 mL 10% 的甲酸甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,用氮气吹干后,加入 2 mL 色谱级甲醇复溶,0.22 μm 滤膜过滤,装至棕色进样瓶中于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,用于分析。

1.2.2 色谱分析条件 流动相 A: 0.2% 乙酸的纯水,流动相 B: 0.2% 乙酸的甲醇,柱温箱温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 、反相色谱柱(C18)、样品进样量 20 μL 、鹅掌柴蜂蜜的检测波长 270 nm、总流速 0.7 mL/min。鹅掌柴蜂蜜的梯度洗脱方法: 0~10 min, 9%~14% B; 10~18 min, 14%~15% B; 18~28 min, 15%~17% B; 28~40 min, 17~26% B; 40~44 min, 26~33% B; 44~54 min, 33~34% B; 54~64 min, 34~35% B; 64~69 min, 35~37% B; 69~74 min, 37~38% B; 74~84 min, 38~41% B; 84~89 min, 41~44% B; 89~96 min, 44~54% B; 96~126 min, 54~65% B; 126~135 min, 65~80% B。

1.2.3 质谱分析条件 电喷雾 ESI 离子源,出口电压为 125 V、喷射电压为 4 kV、加热温度 350 $^{\circ}\text{C}$ 、氮气(N_2)流速为 12 L/min、雾化气流速为 80 kPa、雾化

器压力 40 psi、碰撞气体为氦气、扫描范围为 100~900 Da^[23]。

1.2.4 特征性成分定性分析 首先通过一级质谱信息确定化合物的分子量及化学式,通过二级质谱数据与数据库比对,并通过二级质谱碎片信息得到化合物大致化学结构,结合化合物的极性、最大紫外吸收,推测出化合物结构。通过购买商业标准品进行验证。

1.2.5 特征性成分定量分析 称取一定质量的苦蜜素 B、3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇、反,反式脱落酸、顺,反式脱落酸,配制成 10 ml 标准品储备液,按照梯度进样方法进行 HPLC 分析,根据不同的上样量和不同的峰面积建立标准曲线;其中 x 为标准品的上样量 (ng), y 为峰面积,如表 1 所示。由于苦蜜素 C 无商业标准品,但苦蜜素 C 和苦蜜素 B 是同分异构体,具有相同的分子量、相同的最大紫外吸收,并且其化学结构也相似。因此苦蜜素 C 含量以苦蜜素 B 的标准曲线来定量。

表 1 标准品的相关信息
Table 1 Information of standards

标准物质	回归方程	R^2
苦蜜素 B	$y=1487x-55623$	0.9993
3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇	$y=1869.6x-97664$	0.9996
苦蜜素 C	$y=1487x-55623$	0.9993
反,反式脱落酸	$y=2795.2x-466413$	0.9999
顺,反式脱落酸	$y=4513x+135049$	0.9999

1.2.6 HPLC 指纹图谱的建立 将鹅掌柴原料蜜样品的高效液相色谱图,通过中药色谱指纹图谱软件进行相似度分析,在此过程中对比并记录各个样品中的色谱峰相似度,并在允许范围内进行多点校正,即可得到鹅掌柴蜂蜜的标准指纹图谱。

1.2.7 真实性评价方法 a.按照 1.2.1 方法对蜂蜜中的特征性化合物进行富集,在 1.2.2 的色谱条件下得到样品色谱峰。b.将样品色谱峰与标准指纹图谱比对,差异较大或有明显异常色谱峰的样品均不是鹅掌柴蜂蜜。c.色谱图与标准指纹图谱较一致的样品再对其中的特征性成分进行定量分析。d.样品中鹅掌柴蜂蜜的标志性成分 3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇的含量应大于或等于原料蜜中最低限量,可判定其为真正的鹅掌柴蜂蜜。

1.3 数据处理

实验所有数据分析基于 SPASS 26.0 软件计算

表 2 鹅掌柴蜂蜜样品中化合物信息

Table 2 Composition information on heptapleurum honey

化合物	成分	时间 (min)	λ_{\max} (nm)	Mw	MSMS	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
1	苦蜜素 B	30.21	245	240	109.1014,137.0958,179.1084	241.1424	239.1276
2	3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇	48.00	268	224	121.1005,151.1104,181.1218	225.1476	-
3	苦蜜素 C	73.23	243	240	109.1004,137.0952,179.1053	241.1444	239.0523
4	反,反式脱落酸	74.82	263	264	121.0633,135.0796,163.0744	265.1417	263.1292
5	顺,反式脱落酸	84.21	263	264	122.0367,153.0921,189.0922	265.1417	263.1285

平均值及标准偏差,MassHunter 10.0 分析质谱数据,ChemBioDraw Ultra 10.4 绘制化合物结构式,使用中药色谱指纹图谱相似度评价软件建立鹅掌柴蜂蜜的指纹图谱并且分析其相似度。每组实验均为 3 次平行。

2 结果与分析

2.1 鹅掌柴蜂蜜中特征性成分鉴定

鹅掌柴蜂蜜样品的高效液相色谱图如图 1 所示。

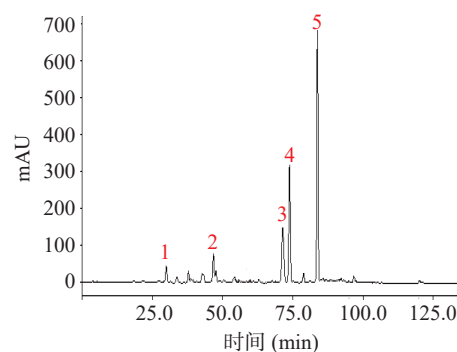


图 1 鹅掌柴蜂蜜样品的 HPLC 图谱

Fig.1 Chromatograms of heptapleurum honey

注:1:化合物 1,2:化合物 2,3:化合物 3,4:化合物 4,5:化合物 5。

根据化合物的保留时间、最大紫外吸收波长、二级质谱碎片信息,标准品验证分析,确定出鹅掌柴蜂蜜中的 5 个特征性成分。表 2 为鹅掌柴蜂蜜样品的成分鉴定结果。

化合物 1 在正离子模式下有 m/z 241.1424[M+H]⁺、 m/z 263.1248[M+Na]⁺、 m/z 481.2785[2M+H]⁺ 的准分子离子峰(图 2),负离子模式下有 m/z 239.1276[M-H]⁻ 的准分子离子峰,因此判断该化合物的分子量为 240。根据其精确质量可计算出化学组成为 C₁₃H₂₀O₄。由 m/z 241.1439[M+H]⁺ 脱水产生碎片离子 m/z 223.1308[M+H-H₂O]⁺,说明化合物含有羟基;由 m/z 241.1439 [M+H]⁺ 到 m/z 197.1171[M+H-CH₃CHO]⁺,说明化合物含有“-CH(OH)CH₃”片段;由 m/z 137.0956 到 m/z 109.1014 是脱 CO,说明化合物结构具有羰基,由 m/z 179.1171 到 m/z 123.0805,分析结构为环烯,脱去 2-甲基丙烯。该化合物在 245 nm 处有最大紫外吸收峰,结合相关文献报道初步判定化合物 1 是 4-(1'-环乙醚-3'-丁二醇)-3,5,5-2-环己烯酮^[24]。后通过标准品对其进行验证,明确化合物 1 是 4-(1'-环乙醚-3'-丁二醇)-3,5,5-2-环己烯酮。

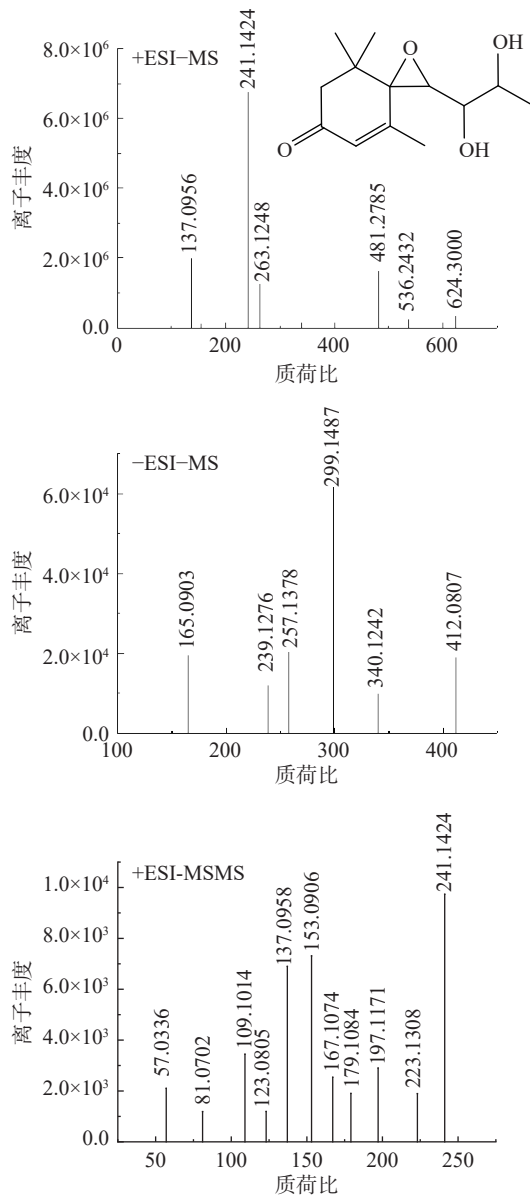


图 2 化合物 1 在正负离子模式下的一级和二级质谱图

Fig.2 HPLC-MS and HPLC-MSMS spectrum of compound 1 in positive and negative ion mode

研究表明, 环烯醚萜类物质往往带有苦味^[25], 通过 Virtual Taste 软件^[26]对化合物 1 苦味度进行预测分析, 值为 0.77 接近于已知的苦味物质乙酰氨基酚的苦味度 0.81^[27], 推测 4-(1'-环乙醚-3'-丁二醇)-3,5,5-2-环己烯酮是鹅掌柴蜂蜜苦味的来源之一, 因此, 我们将其命名为苦蜜素 B。

化合物 2 在正离子模式下有 m/z 225.1476 $[M+H]^+$ 、 m/z 471.2662 $[2M+Na]^+$ 的准分子离子峰(图 3), 确定其分子量为 224。如表 1 所示, 该化合物的最大紫外吸收波长为 268 nm, 二级特征离子碎片为 m/z 181.1218 $[M+H-CH_3CHO]^+$, m/z 151.1104 $[M+H-CH_3CHO-OCH_3]^+$, m/z 121.1005 $[M+H-CH_3CHO-OCH_3-OCH_3]^+$, 判断该化合物的分子式为 $C_{12}H_{16}O_4$, 计算其环加双键值为 5, 可以确定分子结构中有苯环。结合碰撞能量分析, 由 m/z 225.1465 到 m/z

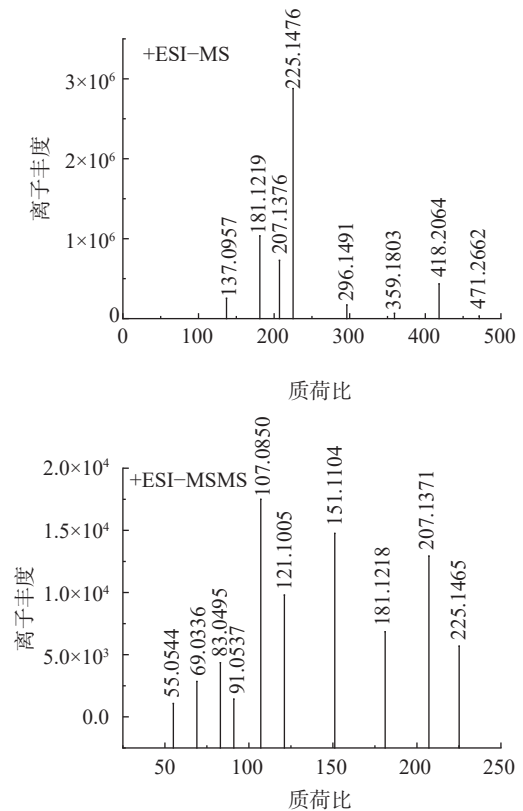


图 3 化合物 2 在正离子模式下一级和二级质谱图

Fig.3 HPLC-MS and HPLC-MSMS spectrum of composition 2 in positive ion modes

181.1218 相差 44, 通过元素拟合中性丢失为 CH_3CHO , m/z 181.1218 到 m/z 151.1104 相差 30, 由 m/z 151.1104 到 m/z 121.1005 相差 30, 由 m/z 121.1005 到 m/z 91.0531 为连续断裂 3 个甲氧基, 根据以上断裂规律, 初步推测该化合物为 3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇, 后通过标准品验证, 确定该化合物为 3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇, 由于首次在蜂蜜中鉴定出该成分, 将其定为鹅掌柴蜂蜜的标志性成分。

化合物 3 在正离子模式下有 m/z 241.1444 $[M+H]^+$ 、 m/z 263.2697 $[M+Na]^+$ 的准分子离子峰(图 4), 负离子模式下有 m/z 239.0523 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, 因此判断该化合物分子量为 240。化合物 3 和化合物 1 互为同分异构体。两个化合物的二级质谱断裂碎片也都接近, 表明两个化合物的化学结构接近。比较化合物 3 和化合物 1 的碎片离子 m/z 137.0958 和 m/z 153.0526 的丰度可知, 化合物 1 中碎片离子 m/z 137.0958 是 m/z 179.1084 经过 H 重排后断裂来的, 化合物 3 中 m/z 137.0958 可以通过 m/z 179.1084 经过 H 重排和 m/z 153.0526 的 RDA 碎裂而来。因此, 判断化合物 1 的环氧共轭在 C6 和 C7 上, 而化合物 3 的环氧共轭在 C8 和 C9 上。初步断定化合物 3 可能为: 4-(1'2'-二羟基-3'环氧丙烷)-3,5,5-2-环己烯酮。通过 Virtual Taste 软件对化合物 3 苦味度进行预测分析为 0.80, 推测化合物 3 也可能是鹅掌柴蜂蜜的苦味来源之一, 因此我们将其命名为苦蜜素 C。

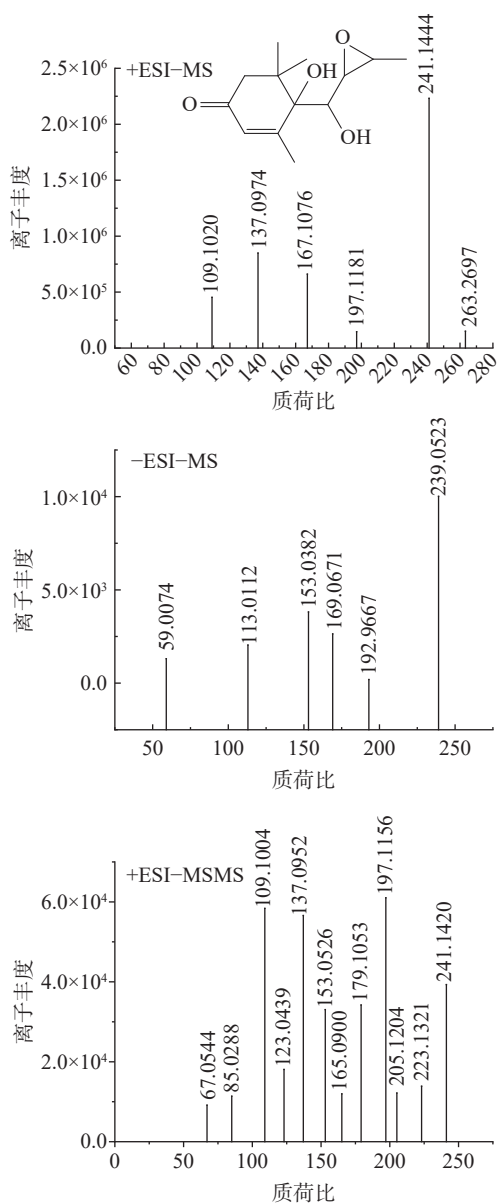


图 4 化合物 3 在正负离子模式下的一级和二级质谱图

Fig.4 HPLC-MS and HPLC-MSMS spectrum of compound 3 in positive and negative ion mode

化合物 4 在正离子模式下有 m/z 265.1414 $[M+H]^+$ 准分子离子峰(图 5), 负离子模式下有 m/z 263.1259 $[M+H]^-$ 、 m/z 527.2657 $[2M-H]^-$ 的准分子离子峰, 因此, 判断其分子量为 264。如表 1 所示, 该化合物在 263 nm 下有最大紫外吸收峰, 结合实验室前期鉴定成果及加入标准品验证^[28], 确定该化合物为反,反式脱落酸。

化合物 5 在正离子模式下有 m/z 529.2759 $[2M+H]^+$ 准分子离子峰(图 6), 负离子模式下有 m/z 263.1285 $[M+H]^-$ 、 m/z 527.2643 $[2M-H]^-$ 的准分子离子峰, 因此, 判断其分子量为 264。结合表 1 可知, 化合物 5 与化合物 4 的分子量、最大紫外吸收波长及二级断裂碎片均相同, 保留时间不同, 因此推测两者可能互为同分异构体。结合实验室前期鉴定成果及加入标准品验证^[29], 确定该化合物为顺,反式脱落酸。

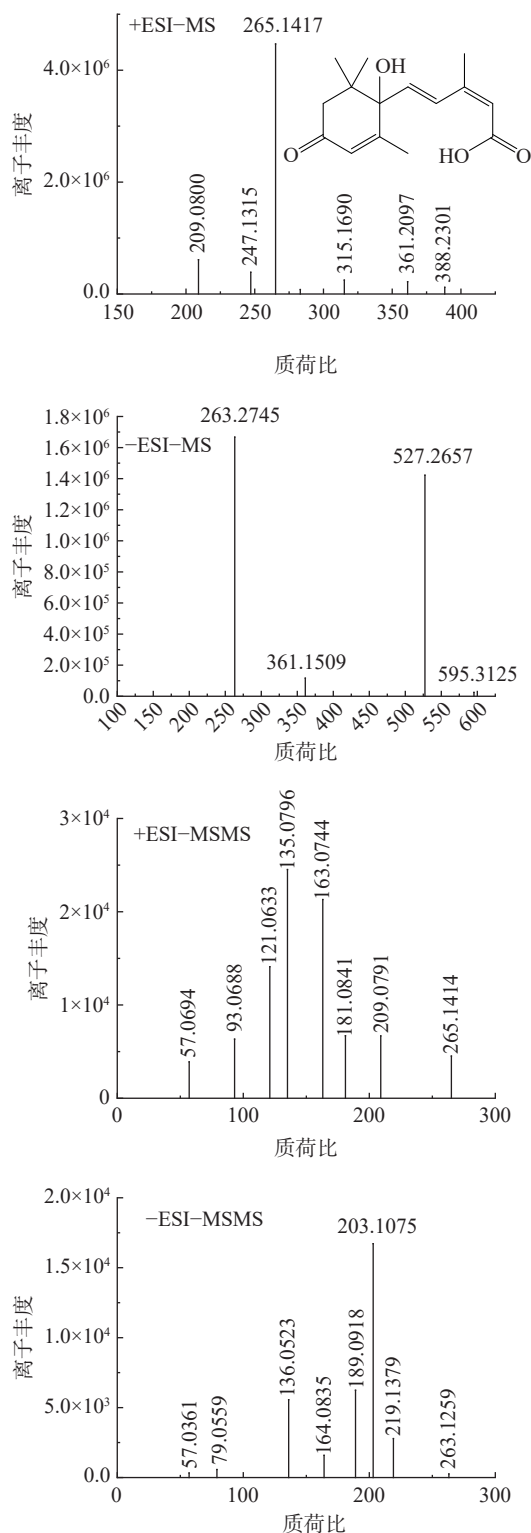


图 5 化合物 4 在正负离子模式下的一级和二级质谱图

Fig.5 HPLC-MS and HPLC-MSMS spectrum of composition 4 in positive and negative ion modes

2.2 鹅掌柴蜂蜜中特征性成分定量分析

将 Y01~Y10 不同产地的鹅掌柴原料蜜中的特征性成分进行定量分析, 结果如表 3 所示。其中, 顺,反式脱落酸含量最高, 平均含量 14.46 ± 0.34 mg/kg, 反,反式脱落酸的平均含量为 6.85 ± 0.52 mg/kg, 苦蜜素 B 和苦蜜素 C 的平均含量分别为 5.97 ± 0.26 、 $11.13 \pm$

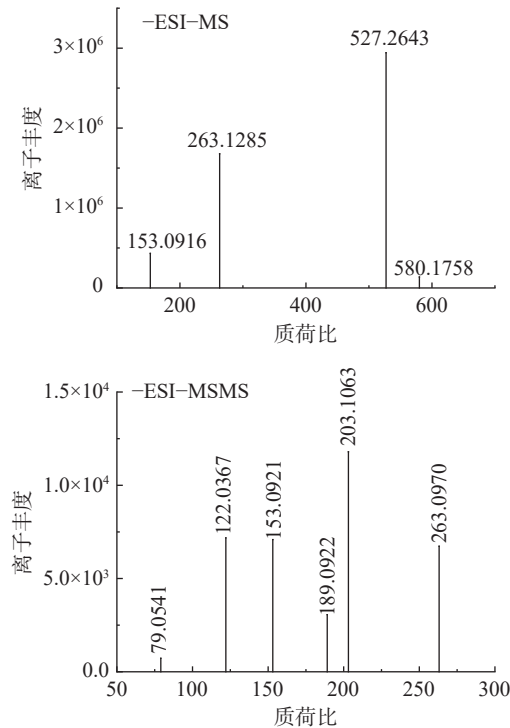
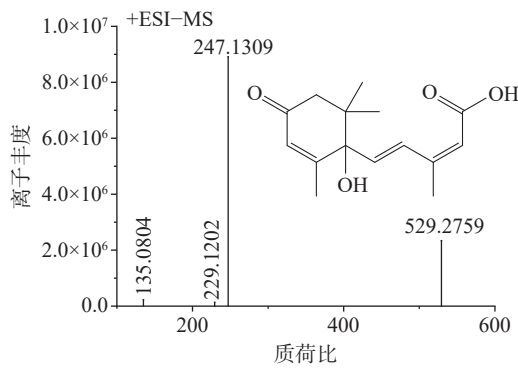


图 6 化合物 5 在正负离子模式下一级和二级质谱图

Fig.6 HPLC-MS and HPLC-MSMS spectrum of composition 5 in positive and negative ion modes

0.45 mg/kg。鹅掌柴蜂蜜的标志性成分 3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇的平均含量为 2.30 ± 0.25 mg/kg, 最低含量为 1.73 ± 0.18 mg/kg。

2.3 鹅掌柴蜂蜜 HPLC 指纹图谱建立

将 10 个鹅掌柴原料蜜样品的高效液相色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统, 在可允许范围内进行多点校正, 样品间相似度均高于 0.8。鹅掌柴原料蜜样品生成的指纹图谱及鹅掌柴蜂蜜的标准指纹图谱见图 7 和图 8。

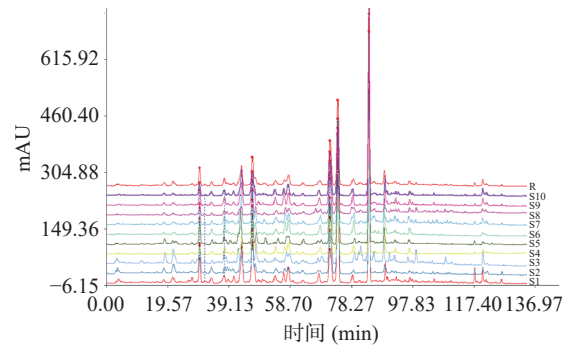


图 7 鹅掌柴原料蜜样品生成的指纹图谱

Fig.7 Fingerprints of heptapleurum raw honey samples

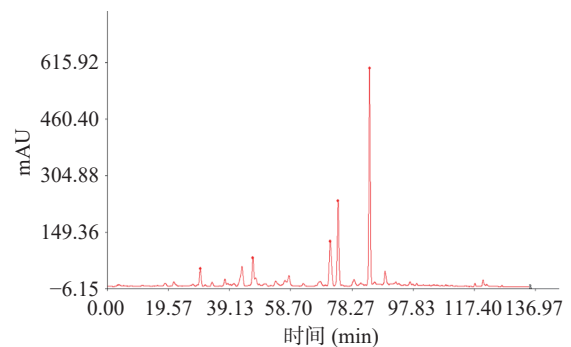


图 8 鹅掌柴蜂蜜的标准指纹图谱

Fig.8 Fingerprints of heptapleurum honey

2.4 市售鹅掌柴商品蜜的真实性评价

根据上述建立的鹅掌柴蜂蜜真实性评价指标, 对市售的 6 个品牌鹅掌柴蜂蜜进行真实性评价。从 HPLC 色谱图(图 9)中可以看到, 品牌 A、B 和 C 样品的色谱图与标准指纹图谱较一致, 在三个品牌中, 均检测到了在鹅掌柴蜂蜜中鉴定出的 5 个成分(表 4), 其含量范围分别为 4.12~6.65、1.98~2.72、4.57~11.23、4.96~8.25、10.92~14.68 mg/kg, 标志性成分含量均大于 1.73 mg/kg, 与原料蜜样品中含量较接近。因此, 这三个品牌为品质较好的鹅掌柴蜂蜜。在品牌 D 和 E 中, 虽然也检测到在鹅掌柴蜂蜜中鉴定出的 5 个成分, 但与标准指纹图谱相比, 存在较明显差异, 且品牌 D 中出现含量较高的异常峰。因此, 推测品牌 D 和 E 可能混入了其他单花蜜, 纯度较低。在品牌 F 中, 均未检测到在鹅掌柴蜂蜜中特征性成分, 且与标准指纹图谱差异较大。因此, 我们推测品牌 F 不是鹅掌柴蜂蜜。

表 3 鹅掌柴原料蜜中化合物含量 (mg/kg)

Table 3 Contents of compounds in heptapleurum raw honey samples (mg/kg)

化合物	Y01	Y02	Y03	Y04	Y05	Y06	Y07	Y08	Y09	Y10
苦蜜素B	9.11±0.12	3.62±0.20	5.95±0.13	10.22±0.20	5.43±0.15	3.10±0.22	4.06±0.20	8.07±0.18	2.69±0.04	7.44±0.25
3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇	1.78±0.15	1.75±0.15	2.48±0.24	2.10±0.14	2.11±0.18	1.80±0.12	2.09±0.14	3.38±0.20	1.73±0.18	3.76±0.15
苦蜜素C	9.28±0.22	11.72±0.11	7.32±0.20	9.37±0.22	9.59±0.21	9.29±0.12	12.62±0.18	10.97±0.23	19.80±0.24	11.33±0.12
反,反式脱落酸	8.05±0.17	7.05±0.10	7.79±0.18	8.53±0.11	5.51±0.22	7.48±0.12	5.61±0.13	4.84±0.14	6.82±0.18	6.84±0.12
顺,反式脱落酸	14.84±0.21	12.73±0.22	16.36±0.15	12.85±0.15	11.86±0.25	17.55±0.12	12.31±0.16	13.82±0.19	14.08±0.16	18.21±0.12

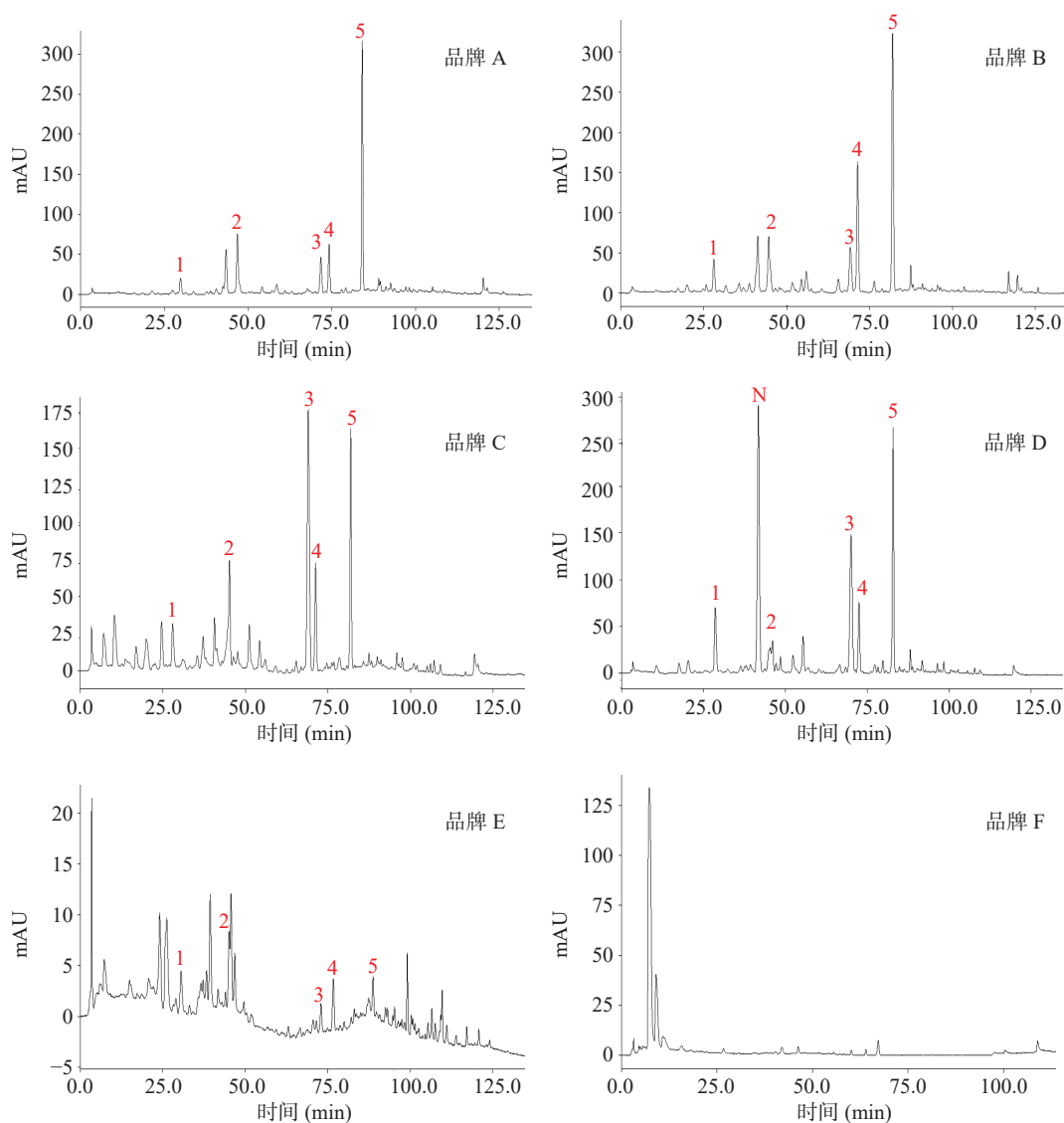


图 9 鹅掌柴商品蜜高效液相色谱图

Fig.9 HPLC chromatogram of commercial honey of heptapleurum

表 4 鹅掌柴商品蜜中化合物含量 (mg/kg)

Table 4 Contents of compounds in heptapleurum commercial honey samples (mg/kg)

化合物	A	B	C	D	E	F
苦蜜素B	6.65±0.20	4.12±0.36	4.37±0.18	8.22±0.14	0.22±0.10	0
3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇	2.32±0.02	2.72±0.12	1.98±0.04	0.94±0.09	0.41±0.26	0
苦蜜素C	11.23±0.09	9.80±0.24	4.57±0.22	8.62±0.15	0.49±0.22	0
反,反式脱落酸	8.25±0.20	4.96±0.10	5.65±0.20	6.28±0.20	0.53±0.08	0
顺,反式脱落酸	14.68±0.15	12.90±0.16	10.92±0.12	11.67±0.23	0.49±0.14	0

3 结论

通过 HPLC-Q-TOF-MSMS 在鹅掌柴蜂蜜中共鉴定出 5 个特征性成分,分别为苦蜜素 B、3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇、苦蜜素 C、反,反式脱落酸、顺,反式脱落酸。首次在蜂蜜中发现 3,4,5-三甲氧基苯丙烯醇,将其定为鹅掌柴蜂蜜的标志性成分。通过中药色谱指纹图谱软件,建立鹅掌柴蜂蜜的 HPLC 指纹图谱,通过结合特征性成分和指纹图谱,建立了鹅掌柴蜂蜜的真实性评价方法。对市售的 6 个鹅掌柴蜂蜜进行真实性评价,其中 3 个品牌为品质较好的鹅

掌柴蜂蜜,2 个品牌为鹅掌柴蜂蜜中可能混入其他蜂蜜,1 个品牌中未检测到鹅掌柴蜂蜜的标志性成分,并且色谱图与指纹图谱存在明显差异,推测其不是鹅掌柴蜂蜜。本研究为鹅掌柴蜂蜜的质量标准建立,提供了重要的理论依据。

参考文献

[1] 陈黎红,方兵兵. 国际食品法典《蜂蜜》标准(CAC 2019 年修订)[J]. 中国蜂业, 2021, 72(7): 12-13,15. [CHEN L H, FANG B B. Codex standard for honey (CAC 2019 revision)[J]. Apiculture of China, 2021, 72(7): 12-13,15.]
 [2] CANO C B, FELSNER M L, MATOS J R, et al. Comparison

- of methods for determining moisture content of citrus and eucalyptus Brazilian honeys by refractometry[J]. *Journal Food Composition Analysis*, 2001, 14(1): 101–109.
- [3] JERKOVIC I, KUS P M. Terpenes in honey: Occurrence, origin and their role as chemical biomarkers[J]. *Rsc Advances*, 2014, 4(60): 31710–31728.
- [4] ANTONY S M, HAN I Y, RIECK J R, et al. Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from honey at different reaction times[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(9): 3985–3989.
- [5] ALMASAUDI S. The antibacterial activities of honey[J]. *Saudi Journal Biological Sciences*, 2021, 28(4): 2188–2196.
- [6] RANNEH Y, AKIM A M, HAMIDHA, et al. Honey and its nutritional and anti-inflammatory value[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2021, 21(1): 1–17.
- [7] KIVIMA E, TANILAS K, MARTVERK K, et al. The composition, physicochemical properties, antioxidant activity, and sensory properties of Estonian honeys[J]. *Foods*, 2021, 10(3): 511.
- [8] BAYRAM N E, CANLI D, GERCEK Y C, et al. Macronutrient and micronutrient levels and phenolic compound characteristics of monofloral honey samples[J]. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2020, 59(4): 192–195.
- [9] FRODIN D G. Studies in heptupleurum; The *Cephaloschefflera* complex[J]. *Journal of the Arnold Arboretum*, 1975, 56(4): 427–448.
- [10] HAILU D, BELAY A. Melissopalynology and antioxidant properties used to differentiate *Schefflera abyssinica* and polyfloral honey[J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0240868.
- [11] 刘世丽, 吴杰, 陈黎红, 等. 世界各国蜂业人士齐聚蒙特利尔—国际蜂联(APIMONDIA)第 46 届国际养蜂大会暨博览会[J]. *中国蜂业*, 2019, 70(10): 14–15. [LIU S L, WU J, CHEN L H, Apiculture professionals from all over the world gathered in Montreal—APIMONDIA 46th International Apiculture Congress & Expo [J]. *Apiculture of China*, 2019, 70(10): 14–15.]
- [12] LI Q, ZENG J, LIN L, et al. Low risk of category misdiagnosis of rice syrup adulteration in three botanical origin honey by ATR-FTIR and general model[J]. *Food Chemistry*, 2020, 332: 127356.
- [13] SIVAKESAVA S, IRUDAYARAJ J. A rapid spectroscopic technique for determining honey adulteration with corn syrup[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(6): 787–791.
- [14] 邱志超, 官咏仪. 柱前衍生-高效液相色谱-质谱联用法鉴定糖浆掺假蜂蜜[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017(2): 609–613. [QIU Z C, GONG Y Y. Identification of adulterated honey by pre-column derivatization-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017(2): 609–613.]
- [15] LAHA R C, MANDAL S, RALTE L, et al. Meta-barcoding in combination with palynological inference is a potent diagnostic marker for honey floral composition[J]. *Amb Express*, 2017, 7(1): 1–8.
- [16] KHALED E L, MOHAMAD A L, FAROUK J R, et al. Evaluation of honey authenticity in Lebanon by analysis of carbon stable isotope ratio using elemental analyzer and liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2021, 56(6): 23–27.
- [17] DONG H, LUO D, XIAN Y, et al. Adulteration identification of commercial honey with the C-4 sugar content of negative values by an elemental analyzer and liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(16): 3258–3265.
- [18] 吴迪, 李丽君, 王丹丹, 等. 核磁共振技术在蜂蜜植物糖浆掺假检测应用的研究进展[J]. *检验检疫学刊*, 2020, 30(3): 153–156. [WU D, LI L J, WANG D D, et al. Research progress of nuclear magnetic resonance technology in the detection of adulteration of honey plant syrup[J]. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2020, 30(3): 153–156.]
- [19] GUYON F, CHAVEZ D A, MAURIN A, et al. Metabolomics applied to proton nuclear magnetic resonance profile for the identification of seven floral origin of French honeys[J]. *Journal of Food & Nutrition Research*, 2020, 59(2): 257.
- [20] QIAO J T, CHEN L H, KONG L J, et al. Characteristic components and authenticity evaluation of rape, acacia, and linden honey[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(36): 9776–9788.
- [21] 林珣, 杜一男, 张根生等. 枸杞蜜中多酚类成分鉴定及指纹图谱建立[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(15): 166–174. [LIN X, DU Y N, ZHANG G S, et al. Identification of polyphenols in wolfberry honey and establishment of fingerprints[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(15): 166–174.]
- [22] 乔江涛. 四种单花蜜中标志性成分鉴定及真实性评价[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019. [QIAO J T. Characity evaluation of four monofloral honeys[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.]
- [23] 肖兴英, 乔江涛, 张红城. 破壁前后油菜蜂花粉中黄酮类化合物定性定量分析[J]. *中国蜂业*, 2021, 72(7): 60–64. [XIAO X Y, QIAO J T, ZHANG H C. Ualitative and quantitative analysis of flavonoids in rape bee pollen before and after wall disruption[J]. *Apiculture of China*, 2021, 72(7): 60–64.]
- [24] TUBEROSO C I G, BIFULCO E, CABONI P, et al. Floral markers of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(1): 384–389.
- [25] YUANFANG K, BIN Y, YULONG H U, et al. Research advance on structural modification and structure-activity relationship of iridoids[J]. *Natural Product Research and Development*, 2021, 33(7): 1236.
- [26] ALMURISI S H, AKKAWI M E, CHATTERJEE B, et al. Taste masking of paracetamol encapsulated in chitosan-coated alginate beads[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020, 56: 101520.
- [27] 郭顺悦. 红花蜜和五倍子蜜中特征性成分鉴定及指纹图谱建立[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020. [GUO S Y. Identification of characteristic components and establishment of HPLC fingerprints in safflower honey and gallnut honey[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.]
- [28] SUN C, TAN H, ZHANG Y, et al. Phenolics and abscisic acid identified in acacia honey comparing different SPE cartridges coupled with HPLC-PDA[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, 53: 91–101.
- [29] FRITZ F, PREISSNER R, BANERJEE P. Virtual taste: A web server for the prediction of organoleptic properties of chemical compounds[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W679–W684.