

利用非糖物质快速鉴别单花蜂蜜

范佳慧, 岳锦萍, 杨蕴格, 李意涵, 任虹

(北京工商大学轻工科学技术学院, 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 北京市食品风味化学重点实验室, 北京市食品质量安全实验室, 北京 100048)

摘要: 本文利用非糖物质快速鉴别四种常见的单花蜂蜜(枸杞蜂蜜、荆条蜂蜜、枣花蜂蜜和洋槐蜂蜜)。利用固相萃取除糖提取蜂蜜非糖物质,并用高效液相色谱(HPLC)结合化学计量学进行蜂蜜花源的判定。发现了四种单花蜂蜜的非糖特征标志物。芦丁、丁香酸甲酯、阿魏酸的含量在四种蜂蜜中差异最大。对羟基苯甲酸和脱落酸在枸杞蜂蜜中平均含量分别为 0.59 $\mu\text{g/g}$ 和 0.42 $\mu\text{g/g}$, 可作为枸杞蜂蜜的花源标志物;对香豆酸和肉桂酸在荆条蜂蜜中平均含量为 0.08 $\mu\text{g/g}$ 和 0.05 $\mu\text{g/g}$, 可作为荆条蜂蜜的潜在花源标志物;阿魏酸、异阿魏酸是枣花蜂蜜的特征标志物, 平均含量分别为 0.40 $\mu\text{g/g}$ 和 0.76 $\mu\text{g/g}$; 洋槐蜂蜜的特征标志物是芦丁和丁香酸甲酯, 平均含量为 0.08 $\mu\text{g/g}$ 和 0.14 $\mu\text{g/g}$ 。利用高效液相色谱指纹图谱结合化学计量学方法(主成分分析和判别分析), 四种单花蜂蜜依据其花源被成功区分。本研究对蜂蜜真实性判定有重要参考价值, 为后续蜂蜜真伪鉴别奠定基础。

关键词: 单花蜂蜜; 非糖特征标志物; 高效液相色谱(HPLC); 指纹图谱; 化学计量学; 真实性鉴别

文章编号: 1673-9078(2020)02-263-270

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.2.037

Rapid Identification of Monofloral Honey with Non-sugar Substances

FAN Jia-hui, YUE Jin-ping, YANG Yun-ge, LI Yi-han, REN Hong

(College of Light Industry Science and Technology, Beijing Technology & Business University, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Laboratory for Food Quality and Safety, Beijing 100048, China)

Abstract: In order to quickly identify four common monofloral honeys (Medlar honey, Chaste honey, Jujube honey and Locust honey), non-sugar substances were used in this work. The non-sugar substances of honey were extracted by solid phase extraction (SPE) and sugar was removed. The determination of honey floral origin was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) combined with chemometrics. The non-sugar characteristic markers of these four monofloral honeys were found. The contents of rutin, methyl syringate and ferulic acid were significantly different among the four monofloral honeys. *P*-hydroxybenzoic acid and abscisic acid can be considered as floral origin markers of medlar honey with an average content of 0.59 $\mu\text{g/g}$ and 0.42 $\mu\text{g/g}$, respectively. The average content of *p*-coumaric and cinnamic acid in chaste honey is 0.08 $\mu\text{g/g}$ and 0.05 $\mu\text{g/g}$, respectively, which can be used as potential flower origin markers for chaste honey. Ferulic acid and isoferulic acid can be the characteristic markers of jujube honey with an average content of 0.40 $\mu\text{g/g}$ and 0.76 $\mu\text{g/g}$, respectively. The characteristic markers of locust honey are rutin and methyl syringate with an average content of 0.08 $\mu\text{g/g}$ and 0.14 $\mu\text{g/g}$, respectively. HPLC fingerprint combined with chemometrics (principal component analysis and discriminant analysis) was used, and the four monofloral honeys were successfully distinguished according to their floral origins. This study has important reference value for the determination of honey authenticity, which lays a foundation for the subsequent identification of honey.

Key words: monofloral honey; non-sugar characteristic marker; high performance liquid chromatography (HPLC); fingerprint; chemometrics; authenticity identification

蜂蜜是一种经蜜蜂采集植物的花蜜、分泌物或蜜露与自身分泌物结合后经充分酿造形成的天然甜味物质^[1], 含有糖类、氨基酸、黄酮、多酚、有机酸等成分^[2,3]。药理研究发现, 蜂蜜具有抗菌、抗炎、抗氧化

收稿日期: 2019-09-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0400802)

作者简介: 范佳慧(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学

通讯作者: 任虹(1967-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然药物化学

等生理活性^[4-6]。临床上, 蜂蜜常被用于止咳平喘、愈合伤口、改善睡眠、预防便秘等; 现代医学中, 蜂蜜对治疗心血管疾病、神经退行性疾病、癌症等也具有极高的应用价值^[7-9]。

根据蜂蜜中花粉的种类和含量, 蜂蜜分为单花蜂蜜与杂花蜂蜜。一般而言, 单种花粉含量超过 80% 的蜂蜜称为单花蜂蜜, 其余则称为杂花蜂蜜。单花蜂蜜在纯度、口感、营养价值等方面都优于杂花蜂蜜, 因

此售价更高。一些商贩为谋取不法利益,选择用杂花蜂蜜代替单花蜂蜜,或将糖浆掺入单花蜂蜜进行售卖。这不但破坏了蜂蜜市场的正常运转,损害了蜂农的利益,更威胁到消费者的身体健康。因此,单花蜂蜜的真实性鉴别,即对蜂蜜花源的判定,已在全球范围内引起高度关注^[10-12]。

研究人员已经建立多种检测方法应对蜂蜜掺假,如各种理化指标、同位素比率质谱法、光谱法、差示扫描量热法等^[3,13]。实际应用中,这些检测技术有各自的特点和局限性。同位素比率质谱法有广泛的适用性和多功能性,但在蜂蜜鉴别方面还缺乏同位素比率质谱标准有效性及标准化方法^[14]。仅利用同位素比率质谱法能有效检测蜂蜜中碳-4植物糖的掺入,但对利用碳-3植物糖的掺假无法鉴别。碳-3植物糖作为蜂蜜掺假物对同位素比率质谱法具有一定的隐蔽性。近红外光谱技术能准确、高效、快速的鉴别出以葡萄糖、果糖以及果葡糖浆作为添加物的掺假蜂蜜,但蜂蜜样品前处理复杂^[15]。核磁共振波谱法能够根据单花蜂蜜的特征物质、糖浆的特征物质以及杂花蜂蜜的光谱特点判定蜂蜜的真实性,检测结果复现性高,无偏移,样本处理量小,但要求样品纯度高,需要广泛的最优化分析^[14,16]。

近年来,选择合适的花源特征标志物鉴别单花蜂蜜已被认为是一种有效的方法^[17]。国内外学者多利用特征酚酸来判定单花蜂蜜,鞣花酸可作为石南花蜜的特征花源标志物^[18],没食子酸作为花源标志物可用来鉴别麦卢卡蜂蜜^[19]。酚酸作为蜜源植物的重要次级代谢产物,存在于各种单花蜂蜜中^[20],仅利用特征酚酸虽能判定蜂蜜花源,但不够灵敏、精确,并且适用范围小。单花蜂蜜中除酚酸外,还含有其他多种非糖成分,如黄酮类、香豆素类、脱落酸等。本文采用固相萃取作为预处理方法提取枸杞蜂蜜、荆条蜂蜜、枣花蜂蜜和洋槐蜂蜜中的非糖成分,旨在获得四种单花蜂蜜的非糖特征标志物指纹图谱,结合化学计量学方法,实现对四种单花蜂蜜的鉴别,从而建立一种简便、高效的蜂蜜真实性鉴别方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

对羟基苯甲酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、异阿魏酸、芦丁、丁香酸甲酯、肉桂酸、脱落酸,均为标品,购自上海源叶生物科技有限公司;甲醇购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;乙酸购自西陇科学股份有限公司;盐酸、乙酸乙酯购自国药集

团化学试剂有限公司;甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;Strata-X-A(60 mg/3 mL)固相萃取柱(Torrance, CA, USA)。

1.2 蜂蜜样品

从中国北方六个地区(北京、河南、山东、陕西、山西、新疆)蜂农处采集65种新鲜的成熟单花蜂蜜样品,包括枣花蜂蜜(Z1-Z15)、荆条蜂蜜(J1-J15)、枸杞蜂蜜(G1-G14)、洋槐蜂蜜(Y1-Y21)。将编号为Z1-Z10、J1-J10、G1-G9和Y1-Y16的蜂蜜样品用作实验样品,将编号为Z11-Z15、J11-J15、G10-G14和Y17-Y21的蜂蜜样品作为测试样品,用来验证方法的准确性。所有蜂蜜样品采集时均经纱布过滤除杂质后收集在瓶中并进行编号,采集当天进行运输。所有蜂蜜样品均储存在4℃备用。

1.3 样品制备

采用固相萃取对蜂蜜样品进行预处理。称取20 g蜂蜜,将其溶解在3倍柱体积的超纯水中。用稀盐酸将溶液的pH调至pH=2。采用7888 r/min的转速高速离心20 min,收集上清液,以除去蜂蜜中的固体颗粒。用1倍柱体积的甲醇和1倍柱体积的超纯水以5 mL/min的流速活化固相萃取柱后,取收集好的上清液,以小于1 mL/min的流速上样。用超纯水以5 mL/min的速率冲洗固相萃取柱,以除去糖类物质。真空干燥20分钟后,用乙酸乙酯以小于1 mL/min的流速进行洗脱。将洗脱液冻干成粉末,然后置于4℃冰箱中备用。实验数据均重复三次。

1.4 高效液相色谱分析

采用连接DAD检测器的Agilent 1260高效液相色谱仪分析蜂蜜中的非糖成分。液相色谱柱为Agilent Zorbax SB-C 18 column(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。含有2%乙酸的超纯水作为流动相的A相,甲醇为B相,进样量为20 μL,流速为0.6 mL/min,柱温箱的温度设置为35℃。本实验采用梯度洗脱,具体程序见表1。检测波长为280 nm。实验数据均重复三次。

1.5 方法验证

为了确保实验方法的准确性和稳定性,以10种标准品进行方法学考察,包括检出限(LOD, 3倍信噪比)、定量限(LOQ, 10倍信噪比);通过一天内连续重复测定6次的峰面积的相对标准偏差(RSD)检测仪器的精确度(日内精密度);通过在3 d内重复测量12次的峰面积的相对标准偏差(RSD)来检测仪

器的稳定性(日间精密度)。采集数据以绘制高效液相色谱仪上的标准曲线,并得到相关系数、精确度、稳定性、检出限和定量限。

表1 高效液相色谱梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure for high performance

liquid chromatography		
时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	90	10
8	85	15
10	85	15
25	82	18
35	82	18
40	80	20
50	80	20
55	79	21
60	75	25
63	75	25
75	70	30
95	62	38
105	60	40
120	56	44
125	52	48
135	50	50
145	50	50

1.6 数据分析

单花蜂蜜非糖物质得率计算:

$$\text{非糖物质得率 (mg/20g)} = \frac{\text{固相萃取所得蜂蜜非糖物质质量 (mg)}}{\text{蜂蜜样品质量 (20g)}}$$

利用中药色谱指纹图谱相似性评价系统(2004 A)建立蜂蜜样品的指纹图谱,利用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行数据分析。

表2 不同标准品标准曲线及相关性

Table 2 Standard curves and correlation coefficients of different standards

标准物质	回归方程	R ²	LOD/($\mu\text{g/mL}$)	LOQ/($\mu\text{g/mL}$)
对羟基苯甲酸	y=27.026 x-9.9118	0.9997	2.2×10^{-3}	6.8×10^{-3}
咖啡酸	y=21.566 x+0.1855	0.9992	1.4×10^{-3}	4.5×10^{-3}
丁香酸	y=24.378 x-0.9762	0.9994	2.2×10^{-3}	6.9×10^{-3}
对香豆酸	y=66.102 x-9.9283	0.9996	1.8×10^{-3}	5.4×10^{-3}
阿魏酸	y=26.877 x-21.602	0.9995	4.3×10^{-3}	1.3×10^{-2}
异阿魏酸	y=55.321 x-69.543	0.9995	1.7×10^{-3}	6.0×10^{-3}
芦丁	y=84.82 x-28.756	0.9999	4.8×10^{-3}	1.5×10^{-3}
丁香酸甲酯	y=117.28 x+30.446	0.9999	3.1×10^{-3}	1.0×10^{-2}
肉桂酸	y=290.23 x-236.52	0.9996	1.9×10^{-2}	5.9×10^{-3}
脱落酸	y=129.56 x+0.7791	0.9999	1.2×10^{-3}	3.4×10^{-3}

2 结果与讨论

2.1 方法验证

实验建立了 10 种标品的标准曲线,在较大浓度范围内,标准曲线的拟合度较高($R^2 > 0.999$)。仪器的检出限(LOD)和定量限(LOQ)详细数据见表 2。检出限值低于 $1.9 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$,定量限值低于 $1.3 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$,结果表明,样品和仪器都具有良好的稳定性。

仪器的精确度、稳定性、重复性和回收率详细数据见表 3。对于精确度,10 个标准品峰面积和出峰时间的相对标准偏差分别低于 2.73% 和 2.11%;对于稳定性,10 个标准品峰面积和出峰时间的相对标准偏差分别低于 2.42% 和 2.16%;对于重复性,10 个标准品峰面积和出峰时间的相对标准偏差分别低于 2.38% 和 2.12%;对于回收率,10 个标准品回收率的平均值在 77%~93% 之间,相对标准偏差值在 0.78%~2.01% 之间。实验中所有相对标准偏差(RSD)结果均低于 5%。方法学考察结果表明该实验方法的精确度、稳定性和重复性结果良好,符合实验要求;回收率结果表明采用固相萃取作为预处理方法,提取效果良好,符合实验要求。

2.2 非糖物质的得率及其含量

采用固相萃取提取蜂蜜中的非糖物质,得率见表 4。枣花蜂蜜的非糖物质得率最高,平均得率为 0.27 mg/g,枸杞蜂蜜和荆条蜂蜜的非糖物质平均得率分别为 0.12 mg/g 与 0.12 mg/g,洋槐蜂蜜的非糖物质得率最低,平均得率为 0.08 mg/g。与浅色蜂蜜相比,深色蜂蜜的多酚、黄酮等非糖物质含量更高,并且具有更强的抗氧化能力^[21],这与我们的实验结果一致。

表3 仪器精确度、稳定性、重复性及回收率

Table 3 Instrument precision, stability, repeatability and recovery rate

标准物质	精确度 (n=6, % RSD)		稳定性 (n=12, % RSD)		重复性 (n=6, % RSD)		回收率 (n=3)	
	峰面积	出峰时间	峰面积	出峰时间	峰面积	出峰时间	平均值/%	RSD/%
对羟基苯甲酸	1.14	1.03	2.04	1.97	0.99	1.12	83±0.85	1.03
咖啡酸	2.21	1.98	0.78	1.76	1.68	1.52	93±1.18	1.27
丁香酸	2.73	1.47	2.32	1.09	1.58	1.64	90±0.79	0.88
对香豆酸	2.01	1.91	1.25	0.94	1.79	1.39	78±1.57	2.01
阿魏酸	1.28	1.25	1.23	1.08	0.92	1.44	77±0.72	0.94
异阿魏酸	1.86	1.27	2.16	0.74	1.77	1.32	79±0.81	1.02
芦丁	1.66	1.37	2.42	1.98	2.07	1.99	89±0.69	0.78
丁香酸甲酯	2.29	2.11	1.75	1.28	1.44	1.82	85±0.82	0.97
肉桂酸	0.74	1.12	1.86	2.16	1.34	1.67	82±1.16	1.41
脱落酸	1.52	1.34	0.73	1.66	2.38	2.12	78±0.98	1.26

表4 四种单花蜂蜜非糖物质得率

Table 4 The extraction rate of non-sugar substance in four monofloral honeys (n=3)

样品编号	蜂蜜名称	得率/(mg/g)	样品编号	蜂蜜名称	得率/(mg/g)
G1	枸杞蜂蜜	0.19±0.01	Z5	枣花蜂蜜	0.27±0.01
G2	枸杞蜂蜜	0.12±0.01	Z6	枣花蜂蜜	0.23±0.02
G3	枸杞蜂蜜	0.08±0.01	Z7	枣花蜂蜜	0.23±0.01
G4	枸杞蜂蜜	0.12±0.02	Z8	枣花蜂蜜	0.25±0.01
G5	枸杞蜂蜜	0.12±0.00	Z9	枣花蜂蜜	0.31±0.04
G6	枸杞蜂蜜	0.10±0.03	Z10	枣花蜂蜜	0.26±0.01
G7	枸杞蜂蜜	0.13±0.02	Mean	枣花蜂蜜	0.27±0.03
G8	枸杞蜂蜜	0.13±0.02	Y1	洋槐蜂蜜	0.07±0.01
G9	枸杞蜂蜜	0.12±0.01	Y2	洋槐蜂蜜	0.06±0.00
Mean	枸杞蜂蜜	0.12±0.03	Y3	洋槐蜂蜜	0.05±0.03
J1	荆条蜂蜜	0.15±0.01	Y4	洋槐蜂蜜	0.06±0.02
J2	荆条蜂蜜	0.12±0.04	Y5	洋槐蜂蜜	0.09±0.00
J3	荆条蜂蜜	0.06±0.01	Y6	洋槐蜂蜜	0.12±0.01
J4	荆条蜂蜜	0.19±0.02	Y7	洋槐蜂蜜	0.10±0.01
J5	荆条蜂蜜	0.08±0.00	Y8	洋槐蜂蜜	0.07±0.01
J6	荆条蜂蜜	0.07±0.02	Y9	洋槐蜂蜜	0.10±0.02
J7	荆条蜂蜜	0.13±0.01	Y10	洋槐蜂蜜	0.12±0.03
J8	荆条蜂蜜	0.14±0.01	Y11	洋槐蜂蜜	0.08±0.00
J9	荆条蜂蜜	0.14±0.02	Y12	洋槐蜂蜜	0.10±0.02
J10	荆条蜂蜜	0.10±0.03	Y13	洋槐蜂蜜	0.08±0.01
Mean	荆条蜂蜜	0.12±0.04	Y14	洋槐蜂蜜	0.08±0.03
Z1	枣花蜂蜜	0.27±0.02	Y15	洋槐蜂蜜	0.08±0.01
Z2	枣花蜂蜜	0.24±0.03	Y16	洋槐蜂蜜	0.08±0.02
Z3	枣花蜂蜜	0.32±0.01	Mean	洋槐蜂蜜	0.08±0.02
Z4	枣花蜂蜜	0.29±0.00			

四种单花蜂蜜共检测到 8 种共有非糖物质，这 8 种共有非糖物质的含量在四种单花蜂蜜中各异。由表

5 得，枸杞蜂蜜中共有非糖物质的平均含量约为 1.71 μg/g，枣花蜂蜜中共有非糖物质的平均含量约为 1.66

$\mu\text{g/g}$, 洋槐蜂蜜和荆条蜂蜜中共有非糖物质的含量相对较低, 分别为 $1.55 \mu\text{g/g}$ 和 $1.31 \mu\text{g/g}$ 。

对羟基苯甲酸和脱落酸在枸杞蜂蜜中的含量最高且较稳定, 平均含量分别为 $0.59 \mu\text{g/g}$ 和 $0.42 \mu\text{g/g}$, 因此, 这两种非糖物质可作为枸杞蜂蜜的特征标志物。研究表明, 蜂蜜的抗菌活性主要归因于过氧化氢酶、酚酸、抗菌肽以及低 pH 值^[22]。对羟基苯甲酸自身具有抗菌活性, 因此, 蜂蜜的抗菌活性可能与其较高含量的对羟基苯甲酸有关。脱落酸是一种抑制生长的植物激素, 广泛分布于高等植物中。研究表明, 蜂蜜通

常含有脱落酸^[23-25], 这与我们的研究结果一致。

虽然对香豆酸和肉桂酸在荆条蜂蜜中含量不高, 但这两种物质含量较为稳定, 因此, 它们可用作荆条蜂蜜的潜在花源标记。枣花蜂蜜中含量最高且稳定的两种非糖物质是阿魏酸和异阿魏酸, 平均含量分别为 $0.40 \mu\text{g/g}$ 和 $0.76 \mu\text{g/g}$, 因此, 阿魏酸和异阿魏酸可作为枣花蜂蜜的花源特征标志物。洋槐蜂蜜中的芦丁和丁香酸甲酯含量较高且稳定, 可作为洋槐蜂蜜的特征标志物。

表 5 四种单花蜂蜜中共有非糖物质的含量

Table 5 Content of common non-sugar substances in four monofloral honeys (n=3)

样品	含量/ $\mu\text{g/g}$								共有非糖物质总量
	对羟基苯甲酸	对香豆酸	阿魏酸	异阿魏酸	芦丁	丁香酸甲酯	肉桂酸	脱落酸	
G1	0.76±0.01	0.12±0.00	0.14±0.02	0.26±0.00	0.01±0.02	0.03±0.01	0.04±0.00	0.41±0.01	1.78±0.04
G2	0.72±0.01	0.10±0.01	0.13±0.02	0.27±0.04	0.01±0.01	0.03±0.00	0.05±0.02	0.37±0.01	1.68±0.11
G3	0.54±0.02	0.13±0.02	0.13±0.01	0.27±0.02	0.01±0.01	0.07±0.02	-	0.45±0.02	1.58±0.05
G4	0.38±0.00	0.12±0.02	0.11±0.01	0.25±0.03	0.01±0.00	0.06±0.03	0.04±0.03	0.35±0.03	1.33±0.05
G5	0.56±0.01	0.29±0.02	0.17±0.01	0.27±0.02	0.01±0.01	0.04±0.01	-	0.43±0.04	1.77±0.08
G6	0.60±0.03	0.25±0.01	0.16±0.02	0.23±0.00	0.01±0.02	0.03±0.01	0.04±0.01	0.43±0.02	1.76±0.05
G7	0.55±0.02	0.28±0.02	0.17±0.01	0.24±0.01	0.02±0.00	0.03±0.01	0.04±0.01	0.44±0.01	1.77±0.06
G8	0.64±0.01	0.31±0.00	0.18±0.01	0.24±0.00	0.01±0.02	0.04±0.01	-	0.44±0.00	1.85±0.03
G9	0.58±0.01	0.31±0.03	0.17±0.00	0.26±0.02	0.01±0.00	0.04±0.00	0.04±0.02	0.44±0.03	1.86±0.08
Mean	0.59±0.11	0.21±0.09	0.15±0.02	0.26±0.01	0.01±0.00	0.04±0.01	0.04±0.00	0.42±0.04	1.71±0.17
J1	0.39±0.00	0.10±0.01	0.15±0.01	0.22±0.01	0.02±0.00	0.03±0.00	0.04±0.02	0.13±0.02	1.07±0.04
J2	0.21±0.01	0.05±0.01	0.16±0.01	0.16±0.00	-	0.03±0.01	0.05±0.01	0.11±0.01	0.77±0.04
J3	0.49±0.04	0.11±0.02	0.15±0.01	0.19±0.01	0.01±0.02	0.05±0.02	0.05±0.00	0.25±0.01	1.31±0.06
J4	0.62±0.02	0.09±0.01	0.16±0.00	0.22±0.01	0.01±0.01	0.03±0.00	0.04±0.01	0.12±0.01	1.28±0.04
J5	0.39±0.01	0.07±0.01	0.16±0.02	0.17±0.00	0.02±0.01	0.03±0.02	0.05±0.01	0.23±0.01	1.13±0.05
J6	0.66±0.01	0.08±0.00	0.14±0.01	0.22±0.02	-	0.03±0.01	0.04±0.02	0.38±0.02	1.57±0.06
J7	1.03±0.01	0.07±0.03	-	0.20±0.01	0.01±0.00	0.04±0.01	0.05±0.03	0.08±0.00	1.48±0.08
J8	0.85±0.02	0.10±0.00	-	0.24±0.02	0.01±0.03	0.03±0.01	0.05±0.02	0.07±0.01	1.35±0.04
J9	1.04±0.02	0.06±0.01	0.17±0.02	0.23±0.00	0.02±0.03	0.03±0.01	0.05±0.01	0.05±0.02	1.65±0.05
J10	0.77±0.01	0.11±0.03	0.16±0.01	0.17±0.02	0.01±0.01	0.03±0.03	0.05±0.02	0.19±0.01	1.50±0.05
Mean	0.65±0.28	0.08±0.02	0.16±0.01	0.20±0.03	0.01±0.00	0.03±0.01	0.05±0.01	0.16±0.10	1.31±0.26
Z1	0.10±0.01	0.13±0.00	0.37±0.01	0.76±0.01	0.01±0.00	0.09±0.02	0.05±0.01	0.08±0.00	1.60±0.02
Z2	0.10±0.01	0.16±0.01	0.41±0.00	0.75±0.01	0.02±0.01	0.10±0.02	0.06±0.01	0.15±0.01	1.74±0.04
Z3	0.11±0.00	0.13±0.00	0.38±0.02	0.77±0.02	0.01±0.01	0.09±0.01	0.06±0.01	0.19±0.01	1.73±0.05
Z4	0.12±0.02	0.14±0.01	0.44±0.01	0.85±0.02	0.02±0.01	0.10±0.01	0.06±0.01	0.09±0.00	1.80±0.06
Z5	0.10±0.00	0.14±0.01	0.37±0.00	0.65±0.01	0.01±0.01	0.08±0.01	0.05±0.01	0.07±0.02	1.48±0.03
Z6	0.10±0.01	0.14±0.02	0.41±0.01	0.64±0.01	0.01±0.00	0.09±0.01	0.05±0.01	0.06±0.00	1.48±0.04
Z7	0.09±0.01	0.15±0.01	0.41±0.01	0.71±0.01	0.01±0.01	0.09±0.02	0.05±0.02	0.05±0.01	1.56±0.06
Z8	0.10±0.01	0.16±0.02	0.35±0.02	0.76±0.01	0.01±0.00	0.09±0.03	0.05±0.00	0.08±0.01	1.60±0.06

转下页

接上页

Z9	0.12±0.00	0.16±0.02	0.42±0.01	0.84±0.00	0.02±0.01	0.08±0.02	0.05±0.01	0.09±0.01	1.79±0.09
Z10	0.12±0.01	0.14±0.01	0.42±0.02	0.85±0.01	0.02±0.00	0.09±0.02	0.06±0.01	0.10±0.01	1.80±0.09
Mean	0.11±0.01	0.14±0.01	0.40±0.03	0.76±0.08	0.01±0.00	0.09±0.01	0.05±0.00	0.09±0.04	1.66±0.13
Y1	0.28±0.01	0.10±0.03	0.19±0.03	0.42±0.01	0.04±0.02	0.08±0.00	0.05±0.01	0.36±0.03	1.54±0.07
Y2	0.23±0.01	0.10±0.01	0.19±0.01	0.42±0.01	0.07±0.01	0.09±0.01	0.06±0.02	0.47±0.04	1.62±0.10
Y3	0.21±0.00	0.10±0.02	0.20±0.02	0.43±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.05±0.01	0.30±0.01	1.43±0.03
Y4	0.21±0.01	0.10±0.00	0.20±0.01	0.44±0.02	0.08±0.00	0.11±0.01	0.05±0.00	0.35±0.02	1.54±0.06
Y5	0.25±0.01	0.09±0.01	0.20±0.00	0.32±0.00	0.12±0.00	0.11±0.02	0.06±0.01	0.47±0.01	1.62±0.05
Y6	0.23±0.01	0.11±0.01	0.20±0.01	0.41±0.02	0.11±0.01	0.17±0.01	0.06±0.01	0.41±0.01	1.71±0.05
Y7	0.25±0.02	0.10±0.01	0.19±0.01	0.44±0.01	0.07±0.02	0.18±0.01	0.05±0.01	0.46±0.02	1.75±0.08
Y8	0.22±0.01	0.11±0.01	-	0.55±0.01	0.11±0.01	0.09±0.02	0.05±0.02	0.52±0.00	1.66±0.05
Y9	0.22±0.00	0.10±0.01	0.19±0.01	0.55±0.01	0.07±0.01	0.07±0.03	0.05±0.01	0.33±0.03	1.58±0.10
Y10	0.23±0.01	0.11±0.00	0.20±0.01	0.43±0.02	0.05±0.00	0.19±0.01	0.05±0.00	0.30±0.01	1.56±0.05
Y11	0.26±0.01	0.10±0.01	-	0.22±0.01	0.14±0.01	0.20±0.01	0.05±0.01	0.46±0.01	1.43±0.04
Y12	0.23±0.01	0.11±0.01	-	0.26±0.01	0.03±0.01	0.15±0.01	0.05±0.01	0.35±0.01	1.18±0.04
Y13	0.28±0.00	0.12±0.00	0.18±0.01	0.35±0.01	0.08±0.01	0.16±0.03	0.05±0.02	0.34±0.02	1.55±0.09
Y14	0.25±0.01	0.11±0.01	0.19±0.02	0.35±0.00	0.08±0.02	0.17±0.01	0.05±0.00	0.41±0.00	1.61±0.07
Y15	0.29±0.01	0.10±0.01	0.17±0.01	0.45±0.02	0.09±0.01	0.17±0.02	0.06±0.01	0.31±0.01	1.63±0.07
Y16	0.23±0.00	0.10±0.01	-	0.48±0.01	0.09±0.02	0.18±0.01	0.05±0.01	0.31±0.01	1.45±0.04
Mean	0.24±0.03	0.10±0.01	0.19±0.01	0.41±0.09	0.08±0.03	0.14±0.05	0.05±0.00	0.38±0.07	1.55±0.14

注：-表示未检出。

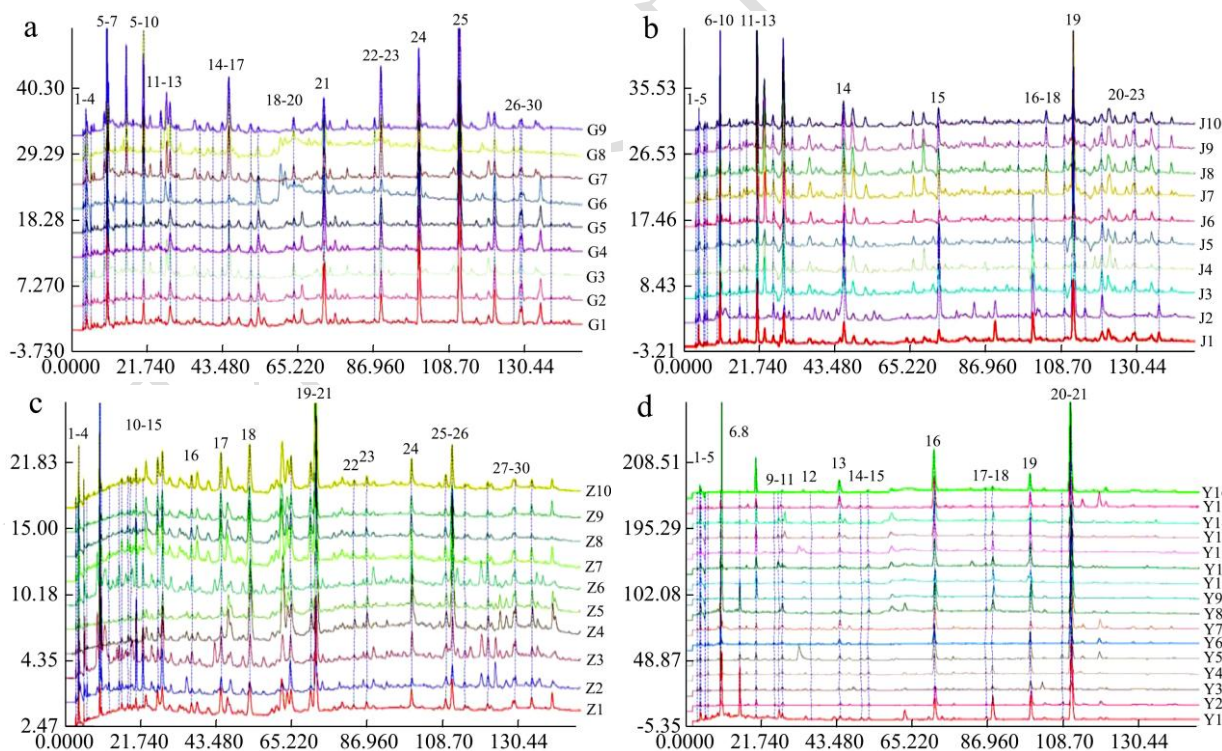


图1 四种单花蜂蜜高效液相色谱指纹图谱

Fig.1 HPLC chromatographic fingerprints of four monofloral honeys

注：(a)：枸杞蜂蜜；(b)：荆条蜂蜜；(c)：枣花蜂蜜；(d)：洋槐蜂蜜。

2.3 蜂蜜的液相色谱指纹图谱

图1为四种单花蜂蜜非糖物质的液相指纹图谱。枸杞蜂蜜，枣花蜂蜜，荆条蜂蜜和洋槐蜂蜜的指纹图

谱分别有 30、30、23 和 21 个共有峰。枸杞蜂蜜和枣花蜂蜜中非糖物质的含量相对较高，共有峰的数量也较多。荆条蜂蜜和洋槐蜂蜜的指纹图谱相对简单，共有峰较少，这与 2.2 的实验结果一致。枣花蜂蜜样品之间的相似性最高，相似度范围 0.894~0.942。9 种枸杞蜂蜜样品的相似度从 0.879 至 0.934。荆条蜂蜜的相似度在 0.819~0.928 之间，洋槐蜂蜜样品的相似度在 0.886~0.921 之间。然而，荆条蜂蜜样品 J 2 的相似度较低，仅为 0.605，可能是由于储藏期较长造成的。结果表明，同种蜂蜜的指纹图谱相似，但不同类型蜂蜜的指纹图谱在共有峰以及共有峰出峰时间和峰面积上有明显差异。

2.4 化学计量学分析

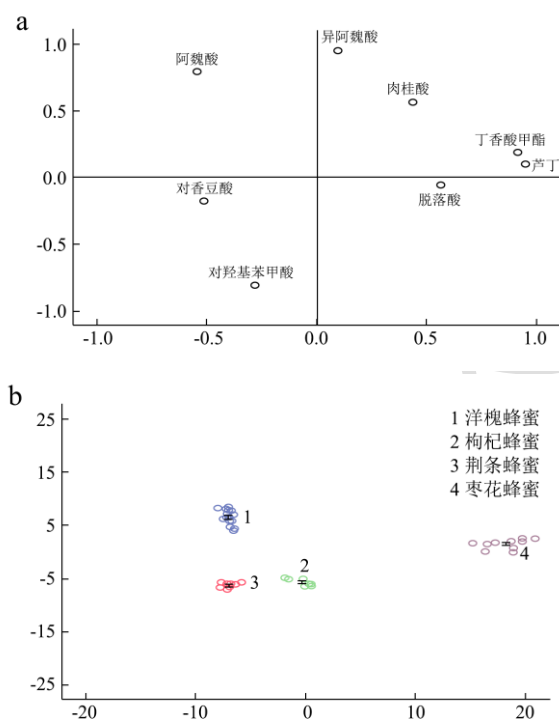


图 2 化学计量学分析

Fig.2 Chemometric analysis

注：(a)：主成分分析；(b)：判别分析。

本实验共测试了 45 个蜂蜜样本。采用 SPSS 软件进行四种单花蜂蜜 8 个共有峰(即 8 个共有非糖物质)的主成分分析和判别分析。主成分分析用于找到最重要的影响因素。实验中确定了两个主成分，占比总计为 89.278%，这两个主成分可以很好地代表蜂蜜中的非糖成分。主成分 1 占比 68.660%，主成分 2 占比 20.618%。主成分 1 由芦丁、丁香酸甲酯、肉桂酸和脱落酸组成。主成分 2 由阿魏酸、异阿魏酸、对香豆酸和对羟基苯甲酸组成。这 8 个共有峰均具有显著性，载荷图见图 2a。

在主成分分析的基础上，形成了三个判别函数进行判别分析。第一个函数：Wilks' Lambda=0.000, $X^2=368.241$, $df=24$, $p<0.05$ ；第二个函数：Wilks' Lambda=0.002, $X^2=188.463$, $df=14$, $p<0.05$ ；第三个函数：Wilks' Lambda=0.243, $X^2=53.776$, $df=6$, $p<0.05$ 。第一个函数的特征值为 112.408，方差占比为 75.4%；第二个函数的特征值为 33.618，方差占比为 22.5%；第三个函数的特征值为 3.117，方差占比为 2.1%，方差累计占比 100%，结果良好。结果如图 2b 所示。因此，利用单花蜂蜜共有峰可以有效判定四种单花蜂蜜，这也为进一步鉴别蜂蜜花源奠定基础。

2.5 验证实验

对四种单花蜂蜜的各 5 个样品进行验证。按照 1.3 中的方法对样品进行预处理，在获得相关的共有峰信息之后，利用单花蜂蜜的特征标志物对蜂蜜样品进行初步判定，再结合主成分分析和判别分析确认蜂蜜花源。如图 3 所示，形成了三个显著的判别函数。第一个函数：Wilks' Lambda=0.000, $X^2=158.390$, $df=24$, $p<0.05$ ；第二个函数：Wilks' Lambda=0.002, $X^2=82.664$, $df=14$, $p<0.05$ ；第三个函数：Wilks' Lambda=0.079, $X^2=32.943$, $df=6$, $p<0.05$ 。第一个函数的特征值为 337.685，方差占比为 85.1%；第二个函数的特征值为 44.817，方差占比为 11.4%；第三个函数的特征值为 11.605，方差占比为 2.9%。验证样本被成功判别，四个单花蜂蜜被完全分开，表明利用蜂蜜中的特征非糖物质鉴别单花蜂蜜是一种有效的方法。

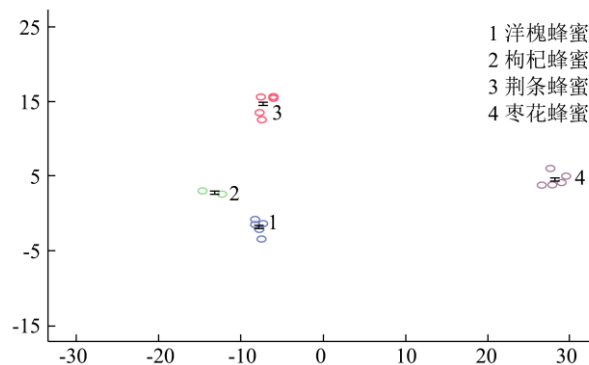


图 3 蜂蜜样本的判别分析

Fig.3 The discriminant analysis of honey samples

3 结论

本实验采用固相萃取提取蜂蜜中的非糖成分，提高了非糖成分的萃取率。建立了枸杞蜂蜜、枣花蜂蜜、荆条蜂蜜以及洋槐蜂蜜四种单花蜂蜜非糖成分的 HPLC 指纹图谱，找到了四种单花蜂蜜的特征标志物，结合主成分分析与判别分析，成功鉴定了这四种单花

蜂蜜。芦丁、丁香酸甲酯和阿魏酸是鉴别四种单花蜂蜜最有效的非糖成分。本研究主要利用蜂蜜中的特征非糖成分对单花蜂蜜进行真实性鉴别,比单纯利用特征酚酸类物质的鉴别更加灵敏、精确、高效。这四种单花蜂蜜的成功判别为后续蜂蜜真实性鉴别工作提供了十分有价值的参考。

参考文献

- [1] Kuś P M, Congiu F, Teper D, et al. Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 55(1): 124-130
- [2] Machado De-Melo A A, Almeida-Muradian L B D, Sancho M T, et al. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review [J]. Journal of Apicultural Research, 2018, 57(1): 5-37
- [3] Naila A, Flint S H, Sulaiman A Z, et al. Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants [J]. Food Control, 2018, 90: 152-165
- [4] Amaral T Y, Padilha I G, Presidio G A, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Apis mellifera* honey on the helicobacter pylori infection of Wistar rats gastric mucosa [J]. Food Science and Technology, 2017, 37: 34-41
- [5] Hussain M B. Role of honey in topical and systemic bacterial infections [J]. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 2018, 24(1): 15-24
- [6] Sawazaki T, Nakajima Y, Urai T, et al. Efficacy of honeydew honey and blossom honey on full-thickness wound healing in mice [J]. Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice, 2018, 30(7): 197-204
- [7] Hossen M S, Ali M Y, Jahurul M H A, et al. Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review [J]. Pharmacological Reports, 2017, 69(6): 1194-1205
- [8] Khan S U, Anjum S I, Rahman K, et al. Honey: Single food stuff comprises many drugs [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2018, 25(2): 320-325
- [9] Meo S A, Al-Asiri S A, Mahesar A L, et al. Role of honey in modern medicine [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2017, 24(5): 975-978
- [10] Schuhfried E, Del Pulgar J S, Bobba M, et al. Classification of 7 monofloral honey varieties by PTR-ToF-MS direct headspace analysis and chemometrics [J]. Talanta, 2016, 147: 213-219
- [11] Tiwari K, Tudu B, Bandyopadhyay R, et al. Identification of monofloral honey using voltammetric electronic tongue [J]. Journal of Food Engineering, 2013, 117(2): 205-210
- [12] Zhao J, Du X, Cheng N, et al. Identification of monofloral honeys using HPLC-ECD and chemometrics [J]. Food Chemistry, 2016, 194: 167-174
- [13] Se K W, Wahab R A, Syed Yaacob S N, et al. Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2019, 80: 16-32
- [14] Siddiqui A J, Musharraf S G, Choudhary M I, et al. Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 687-698
- [15] Downey G, Fouratier V, Kelly J D. Detection of honey adulteration by addition of fructose and glucose using near infrared transreflectance spectroscopy [J]. Journal of near Infrared Spectroscopy, 2003, 11(6): 447-456
- [16] Bertelli D, Lolli M, Papotti G, et al. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(15): 8495-8501
- [17] Castro-Vazquez L, Leon-Ruiz V, Alanon M E, et al. Floral origin markers for authenticating Lavandin honey (*Lavandula angustifolia* x *latifolia*) discrimination from lavender honey (*Lavandula latifolia*) [J]. Food Control, 2014, 37: 362-370
- [18] Ferreres F, Andrade P, Tomás-Barberán F A. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1996, 44(8): 2053-2056
- [19] Oelschlaegel S, Gruner M, Wang P-N, et al. Classification and characterization of manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(29): 7229-7237
- [20] Mattonai M, Parri E, Querci D, et al. Development and validation of an HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS2 method for the determination of polyphenols in monofloral honeys from Tuscany (Italy) [J]. Microchemical Journal, 2016, 126: 220-229
- [21] Kek S P, Chin N L, Yusof Y A, et al. Total Phenolic Contents and Colour Intensity of Malaysian Honeys from the *Apis spp.* and *Trigona spp.* Bees [M]. Chin N L, Man H C, Talib R A. 2nd International Conference on Agricultural and Food Engineering. City, 2014: 150-155