

# 基于 GC-MS 非靶向代谢组学分析贵州特色蜂蜜的代谢物差异

姚丹, 李应, 黎华君, 于瀛龙, 贺兴江, 詹洪平, 周文才, 万炜, 韦小平\*

(贵州省农业科学院现代农业发展研究所, 贵州贵阳 550006)

**摘要:** 该研究以中华蜜蜂 (*Apis cerana*, 简称中蜂) 特色蜂蜜蓝莓蜜、野蔷薇蜜为研究对象, 以荆条蜜、野桂花蜜为对照, 采用 GC-MS 非靶向代谢组学, 对特色蜂蜜代谢物聚类、功能富集分析, 并筛选差异代谢物及功能注释。结果表明, 4 种蜂蜜共检测到 90 种代谢物, 富集到 210 条通路上, 其中富集前 20 的通路在碳水化合物代谢 (8 条)、总览 (9 条)、膜运输 (3 条) 三个模块; 4 种蜂蜜中都检测出去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE), 它富集到了唾液分泌、胃酸分泌等通路。根据 VIP>1、log<sub>2</sub>FC>1、*p*<0.05 筛选出 2-酮丁酸、硬脂酸、肌醇等 12 种显著差异代谢物; 2-酮丁酸和 3-己烯二酸分别是蓝莓蜜和野蔷薇蜜的特征性物质。在改善人体消化吸收、促进蛋白质合成效果顺序为: 野桂花蜜>荆条蜜>蓝莓蜜>野蔷薇蜜。该研究从代谢组学角度分析了不同蜂蜜营养成分差异, 初步确定蓝莓蜜、野蔷薇蜜的特征性物质, 其结果为鉴别蜂蜜真假、蜂蜜溯源识别提供相应参考。

**关键词:** 中蜂蜂蜜; GC-MS; 非靶向代谢组学; 代谢物; 溯源

文章编号: 1673-9078(2022)08-105-115

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.1212

## Metabolite Difference Analysis for Guizhou Specialty Honey Based on GC-MS Untargeted Metabolomics

YAO Dan, LI Ying, LI Huajun, YU Yinglong, HE Xingjiang, ZHAN Hongping, ZHOU Wencai, WAN Wei, WEI Xiaoping\*

(Guizhou Institute of Integrated Agriculture Development, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

**Abstract:** Two kinds of mature *Apis cerana* honey, specifically blueberry and wild rose honeys, were chosen to represent Guizhou specialty honey, while vitex and osmanthus honeys were chosen as controls. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based untargeted metabolomics was employed to perform clustering and functional enrichment analyses on the metabolites of the specialty honey, followed by the screening of differential metabolites and functional annotations. Among the four honeys, the analysis detected a total of 90 metabolites and enrichment in 210 pathways, of which the top 20 pathways belonged to three types: carbohydrate metabolism (8), overview (9), and membrane transport (3). Norepinephrine (NE) was detected in all four honeys and was enriched by saliva, gastric acid, and pancreatic secretions. Additionally, twelve significantly different metabolites (VIP>1, log<sub>2</sub>FC>1 and *p*<0.05), including 2-ketobutyric acid, stearic acid, and inositol, were detected. Moreover, 2-ketobutyric acid and 3-hexanedioic acid were found to be characteristic substances that were unique to blueberry and wild rose honeys, respectively. The abilities of the honeys to improve human digestion, absorption, and protein synthesis were ranked in the following order: osmanthus honey > vitex honey > blueberry honey > wild rose honey. Thus, by analyzing the differences in

引文格式:

姚丹,李应,黎华君,等.基于 GC-MS 非靶向代谢组学分析贵州特色蜂蜜的代谢物差异[J].现代食品科技,2022,38(8):105-115

YAO Dan, LI Ying, LI Huajun, et al. Metabolite difference analysis for Guizhou specialty honey based on GC-MS untargeted metabolomics [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 105-115

收稿日期: 2021-11-01

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1100309); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑[2019]2270 号); 黔农科院种质资源项目 ([2020]16 号); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助项目 (CARS-44-SYZ8)

作者简介: 姚丹 (1993-), 女, 研究实习员, 硕士, 研究方向: 蜜蜂生物学, E-mail: 331223345@qq.com

通讯作者: 韦小平 (1977-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 蜜蜂生物学、蜂产品品质, E-mail: 2560631906@qq.com

nutritional components from a metabolomics perspective, the characteristic substances in blueberry and wild rose honeys were preliminarily determined. Therefore, the results provide a reference for identifying the authenticity and traceability of honeys.

**Key words:** *Apis cerana* honey; gas chromatography-mass spectrometry; untargeted metabolomics; metabolites; traceability

蜂蜜作为主要的蜂产品之一,按照植物来源可分为单花蜜和多花蜜,其所含的化学成分多样性与植物源密不可分<sup>[1,2]</sup>。蜂蜜中除大量葡萄糖、果糖等碳水化合物和水分外,还含有少量活性物质,包括氨基酸、酶类、黄酮类、矿物质等<sup>[3,4]</sup>。由于不同蜜源植物分泌的小分子萜类、黄酮类、酚酸类等次生代谢产物及矿物质成分存在差异,使得不同种类蜂蜜的口感、功效存在差异<sup>[5]</sup>。目前,检测蜂蜜中活性物质含量、糖类理化指标是鉴定蜂蜜品种和品质的重要手段<sup>[6-8]</sup>。糖类和活性物质是蜂蜜在维持血糖和血脂正常水平、抗氧化等方面发挥作用的原因<sup>[9-11]</sup>。

非靶向代谢组学(Untargeted metabolomics)是目前最为常用的代谢组学研究手段,通过液相色谱-质谱联用(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)、气相色谱-质谱联用(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)等技术手段来筛选待测样品中已知和未知代谢物的定量信息,来对生物现象进行总体认识<sup>[12-14]</sup>。近年来这一技术被广泛应用于鉴定食品品质及产地、掺假掺杂等溯源工作中<sup>[15]</sup>。陈志燕等<sup>[16]</sup>采用GC-MS技术鉴定了枇杷蜜、益母草蜜等5种蜂蜜中共25种代谢物,其中枇杷蜜中糠醛含量最高,益母草蜜中油酸乙酯含量最高;孙雨安等<sup>[17]</sup>采用基于顶空固相微萃取GC-MS分析了7种蜂蜜中44种共有代谢物,主要成分脱氢芳樟醇的含量为 $6.86 \times 10^{-3} \sim 1222.70 \times 10^{-3} \mu\text{g/g}$ 。粟有志等<sup>[18]</sup>采用SPME-GC-MS检测新疆地区沙枣蜜、棉花蜜等4种单花蜜,检出144种代谢物,其中芳樟醇、2-(1,1-二甲基)-环己醇和联苯为沙枣蜜的特征性成分,3-苯基丙烯醛、3-苯基-2-丙烯醇为棉花蜜的特征性成分。Jandrić等<sup>[19]</sup>研究了澳大利亚不同产地来源的蜂蜜,其单氯和多氯在蜂蜜之间存在差异。Georgios等<sup>[20]</sup>利用HRMS靶向和非靶向代谢组学对10种蜂蜜的酚类化合物分析,筛选出16个差异代谢物,其中脱落酸在杨梅蜜中含量最高。

我国西南地区是特色蜜源植物野蔷薇和蓝莓的主要生长地区之一。目前关于野蔷薇蜜成分分析的相关文献尚未见报道。贵州省是我国蓝莓的最大种植区,是实现蓝莓蜜商品化生产的唯一省份,前期对蓝莓蜜的研究结果显示,蓝莓蜜的酸度偏高、易结晶,槲皮素、对羟基苯甲酸含量较高<sup>[21]</sup>,为进一步了解蓝莓蜜的理化性质,还需要对蓝莓蜜营养成分进一步分析。因此,本研究选择野蔷薇蜜、蓝莓蜜为研究对象,以

高品质的荆条蜜、野桂花蜜作为参考,利用GC-MS技术,根据代谢物的功能分类和代谢通路分析,在代谢水平上研究不同特色蜂蜜所含代谢物差异。本研究对丰富鉴别蜂蜜真假、溯源识别有重要意义,为确定特色蜂蜜蓝莓蜜、野蔷薇蜜特征性物质奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验材料蓝莓蜜、野蔷薇蜜、荆条蜜、野桂花蜜分别采集自贵州省丹寨县、麻江县、播州区、德江县、息烽县和铜仁市6地区,均为自然成熟封盖中蜂蜜,共13个样本,每个样本3个生物学重复。

### 1.2 实验试剂与仪器

甲醇(CAS: 67-56-1, HPLC级), CNW Technologies; JXFSTPRP-24 研磨仪,上海净信科技有限公司; YM-080S 超声机,深圳市方奥微电子有限公司; Forma 900 series 离心机, Thermo Fisher Scientific; LNG-T98 真空浓缩器,太仓市华美生化仪器厂; L-2-氯苯丙氨酸(CAS: 103616-89-3, 纯度 $\geq 98\%$ ), 上海恒柏生物科技; 甲氧胺盐(CAS: 593-56-6, 纯度: AR), TCI; 吡啶(CAS: 110-86-1, 纯度: HPLC级), Adamas; DHG-9023A 烘箱,上海一恒科学仪器有限公司; 氯仿(CAS: 67-66-3, HPLC级), Adamas; Agilent 7890 气相色谱-飞行时间质谱联用仪(配有 Agilent DB-5MS 毛细管柱), J&W Scientific, Folsom, CA, USA。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 代谢物提取

取10 mg 蜂蜜样本于2 mL EP管,加入1000  $\mu\text{L}$  预冷的甲醇提取液,涡旋30 s; 35 Hz 研磨仪处理4 min,冰水浴超声10 min,将样本4  $^{\circ}\text{C}$  12000 r/min 离心15 min,取50  $\mu\text{L}$  上清液于1.5 mL EP管中,每个蜂蜜样本各取30  $\mu\text{L}$  混合成QC样本,在真空浓缩器中干燥,加入5  $\mu\text{L}$  内标L-2-氯苯丙氨酸继续干燥,之后向干燥好的代谢物中加入100  $\mu\text{L}$  甲氧胺盐试剂(甲氧胺盐酸盐溶于20 mg/mL 吡啶),轻摇混匀并放入80  $^{\circ}\text{C}$  烘箱孵育30 min,后在每个蜂蜜样品中加入100  $\mu\text{L}$  BSTFA(含有1% TMCS, V/V)、混匀,于70  $^{\circ}\text{C}$

孵育 1.5 h, 冷却至室温 (25 °C 左右), 向混合的样本中加入 5 μL FAMES 并溶于氯仿, 随机上机检测。

### 1.3.2 上机检测

Agilent 7890 气相色谱-飞行时间质谱联用仪配有 Agilent DB-5MS 毛细管柱 (30 m×250 μm×0.25 μm), GC-TOF-MS 具体分析条件为: 以无分流模式注入 1 μL 等份蜂蜜样本, 氦气用作载气, 前部入口流量为 3 mL/min, 通过色谱柱的气体流速为 1 mL/min。初始温度为 50 °C 并保持 1 min, 然后以 10 °C/min 的速率升高至 310 °C, 310 °C 恒温保持 8 min。注入、传输线和离子源温度分别为 280 °C、280 °C 和 250 °C。电离电压为 70 eV, 在溶剂延迟 6.25 min 后, 以每秒 12.5 个光谱的速率在 *m/z* 范围为 50~500 的全扫描模式下测定蜂蜜样本质谱数据。

### 1.3.3 数据分析

使用 ChromaTOF 软件 (V 4.3x, LECO) 对质谱数据进行了峰提取、基线矫正、解卷积、峰积分、峰对齐等分析<sup>[22]</sup>。对物质定性工作中, 使用了 LECO-Fiehn Rtx5 数据库, 包括质谱匹配及保留时间指数匹配。最后, 将 QC 样本中检出率 50% 以下或 RSD>30% 的峰去除<sup>[23]</sup>。使用 Heatmap R R<sup>[24,25]</sup> 包对测定的代谢物作聚类热图; 蓝莓蜜、野蔷薇蜜、荆条蜜、野桂花蜜四种蜂蜜之间两者间根据差异倍数、*t* 检验的 *p* 值和 OPLS-DA 模型获得的变量重要性投影 (variable importance in project, VIP) 评分, 将 VIP>1, FC>1、*p* value<0.05 的代谢物定义为差异代谢物 (significant changed metabolites, SCMs), 同时将得到的相应差异代谢物通过代谢通路数据库 KEGG Pathways (KEGG, www.genome.jp/kegg) 进行注释。

## 2 结果与讨论

### 2.1 四种蜂蜜 GC-MS 数据质量、PCA 分析和重复性评估

QC 样本 TIC 出峰保留时间、峰面积都重叠良好; 内标在 QC 样品中峰面 RSD≤30%, 其相对标准偏差为 11.66%; QC 样本相关性≥0.9, 显示本次系统稳定性、实验方法、样本质量均为良好, 数据质量良好, 可作进一步分析。

蓝莓蜜、野蔷薇蜜、荆条蜜、野桂花蜜 4 种蜂蜜的主成分分析中, 第 1 主成分占 58.71%, 第 2 主成分占 37.17%, 总和为 95.88%, 第 1、2 主成分已包含不同蜂蜜的大部分物质信息 (图 1a)。重复性评估采用斯皮尔曼等级相关系数 *r* (Spearman Rank

Correlation), 同一样本的 3 个生物学重复样本的斯皮尔曼等级相关系数  $r^2 \geq 0.9$ , 重复性良好, 不同样本之间样本相关性不高 (图 1b)。

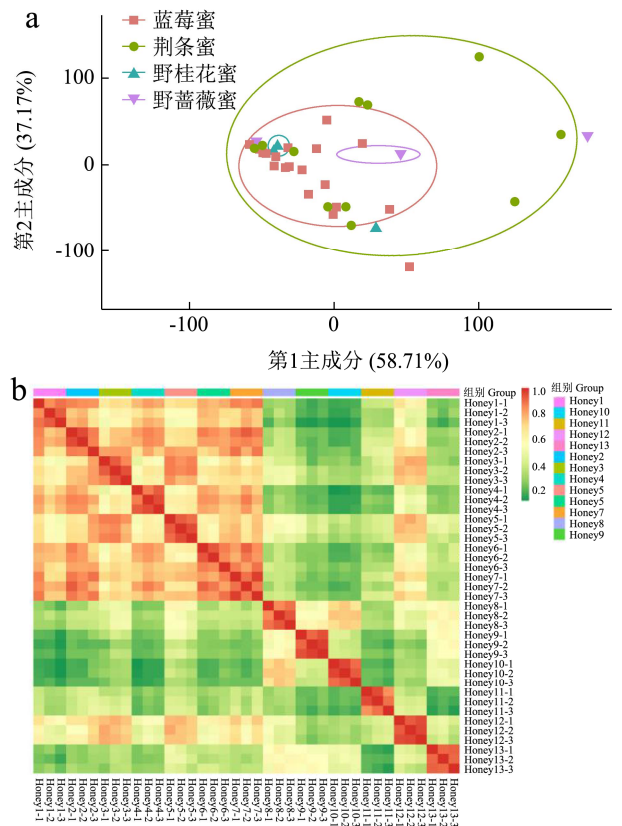


图 1 样本组内、组间 PCA 分析及相关性图

Fig.1 PCA and correlation diagram within and between sample groups

### 2.2 四种蜂蜜的代谢物功能注释

#### 2.2.1 KEGG 数据库注释

由于蜂蜜中所含成分包含植物分泌的代谢物、蜜蜂加工过程的代谢物以及其它物质, 因此, 本次 KEGG 数据库注释选用的是所有物种数据库进行注释。其注释结果显示, 本次所鉴定到的 90 个代谢物 (见表 1) 在 pathway level 2 条目的 top 20 注释信息绘图以及注释 (图 2)。孙雨安等<sup>[17]</sup>分析的 7 种蜂蜜中共有的化合物仅有 44 种; Jose 等<sup>[5]</sup>测定不同单花蜜中的氨基酸、蛋白质、总酚含量, 含量差异使得不同蜂蜜在抗氧化、抑菌等方面存在差异。本次鉴定到的 90 个代谢物分别富集到了总览, 碳水化合物代谢和膜运输等模块相关的 210 条信号通路上, 其中总览模块有次级代谢物的生物合成 (16 个)、脂肪酸代谢 (16 个)、氨基酸的生物合成 (16 个) 等 9 条通路; 碳水化合物代谢模块有肌醇磷酸代谢 (10 个)、氨基糖和核苷酸糖代谢 (7 个)、丙酮酸代谢 (7 个) 等 8 条通路; 膜运输模块有 3 条信号通路, 分别为 ABC 运输 (7 个)、磷酸转

移酶系统 (PTS) (7 个)、细菌分泌系统 (7 个)。对改善机体消化的重要物质进一步分析, 消化系统模块中脂肪消化与吸收 (5 个)、蛋白质消化与吸收 (5

个) 等途径上有代谢物富集。综上, 蜂蜜中的所含的物质较为丰富, 且所含的代谢物与物质代谢、氨基酸及其他有机物代谢密切相关。

表 1 代谢物名称、分子量、保留时间、定性离子等信息

Table 1 Metabolite name, retention time, qualifier ion and other information

名称	平均相似度	平均保留时间/min	检出次数	定量离子
Analyte 3	0	6.35261,0	44	281
Analyte 5	0	6.39239,0	44	204
Analyte 8	0	6.41937,0	39	281
Analyte 9	0	6.45627,0	44	221
Analyte 13	0	6.49777,0	40	147
Analyte 14	0	6.51933,0	44	98
Analyte 23	0	6.68171,0	41	121
Analyte 26	0	6.74124,0	44	281
Analyte 31	0	6.8183,0	44	248
Analyte 33	0	6.86119,0	43	207
Analyte 37	0	6.89836,0	44	160
Analyte 40	0	6.96115,0	44	93
Analyte 42	0	7.0053,0	44	248
Analyte 43	0	7.02688,0	44	147
Analyte 46	0	7.08008,0	41	136
Analyte 48	0	7.12373,0	44	207
2-hydroxypyridine	838.41	7.2053,0	44	152
Analyte 56	0	7.25542,0	44	221
Analyte 65	0	7.45279,0	44	174
Unknown	550.61	7.54773,0	44	147
Analyte 70	0	7.57227,0	44	221
Analyte 71	0	7.63885,0	44	225
Glycolic acid	825.19	7.70997,0	44	147
Analyte 77	0	7.81452,0	44	69
Analyte 88	0	7.9738,0	40	151
2-ketobutyric acid 1	294.58	8.17539,0	44	57
Analyte 100	0	8.15852,0	36	174
Analyte 104	0	8.29752,0	44	73
Analyte 105	0	8.31758,0	38	71
Analyte 110	0	8.48352,0	44	147
Analyte 113	0	8.52533,0	44	130
3-Hydroxypropionic acid 1	496.18	8.63209,0	44	147
Analyte 118	0	8.68461,0	44	267
Analyte 119	0	8.70658,0	44	191
Analyte 120	0	8.72803,0	42	89
Analyte 124	0	8.90315,0	43	141
Sulfuric acid	427.76	8.98239,0	44	281
Analyte 131	0	9.12039,0	44	207
Analyte 134	0	9.1714,0	43	221

续表 1

名称	平均相似度	平均保留时间/min	检出次数	定量离子
Analyte 143	0	9.40667,0	44	221
Analyte 145	0	9.49179,0	44	226
Methylmalonic acid	446.14	9.53567,0	44	281
Analyte 148	0	9.57352,0	44	57
Analyte 154	0	9.78527,0	44	281
Citraconic acid degr1	261.17	10.0087,0	43	68
4-Methylbenzyl alcohol	320.04	10.4339,0	41	130
Proline	813.15	10.8564,0	40	142
Maleic acid	534.33	10.8987,0	44	129
Analyte 199	0	11.4269,0	37	207
Analyte 202	0	11.5005,0	42	57
Alanine 2	346.77	11.7468,0	44	174
3-Aminoisobutyric acid 1	485.74	12.9967,0	44	174
Analyte 237	0	13.4203,0	43	305
Analyte 238	0	13.4393,0	44	57
3-Hexenedioic acid	324.40	13.7475,0	44	305
Glutamine 3	261.43	14.0049,0	43	71
Analyte 269	0	14.7091,0	44	217
Digitoxose 1	372.32	14.7883,0	41	204
Analyte 272	0	14.8142,0	44	217
Allose 1	565.91	15.2616,0	44	204
Ribitol	909.39	16.1078,0	44	73
Unknown	573.91	16.4946,0	37	217
Glucose-1-phosphate	764.6818	16.5845,0	44	217
Analyte 308	0	16.7297,0	43	217
Unknown	623.32	18.0081,0	37	79
Mannose 2	891.44	18.1583,0	44	320
Galactose 2	899.16	18.2873,0	44	320
Gluconic lactone 3	321.00	18.3124,0	42	275
Analyte 360	0	18.5836,0	44	361
Analyte 363	0	18.7428,0	44	204
Analyte 373	0	19.2131,0	44	204
Palmitic acid	910.27	19.5009,0	44	117
Myo-inositol	926.34	19.8336,0	44	217
Trans-3,5-Dimethoxy-4-hydRoxycinnamaldehyde 1	318.43	20.1478,0	42	174
Noradrenaline	578.11	20.4976,0	44	174
Analyte 389	0	20.6076,0	40	57
Linolenic acid	313.63	21.0585,0	44	76
Stearic acid	832.05	21.3114,0	44	117
Analyte 407	0	24.1651,0	42	73
Unknown	539.75	24.2879,0	19	73
Sucrose	913.20	24.3698,0	44	73
Analyte 410	0	24.5077,0	44	204

续表 1

名称	平均相似度	平均保留时间/min	检出次数	定量离子
Lactose 2	626.84	24.7063,0	44	217
Lactulose 1	624.64	24.8309,0	44	217
Unknown	607.37	24.9581,0	38	217
Maltose	899.50	25.0127,0	44	361
Unknown	683.94	25.0799,0	20	437
Trehalose	674.50	25.2263,0	44	437
Unknown	723.64	25.3104,0	25	160
Sophorose 2	890.27	25.4963,0	44	319

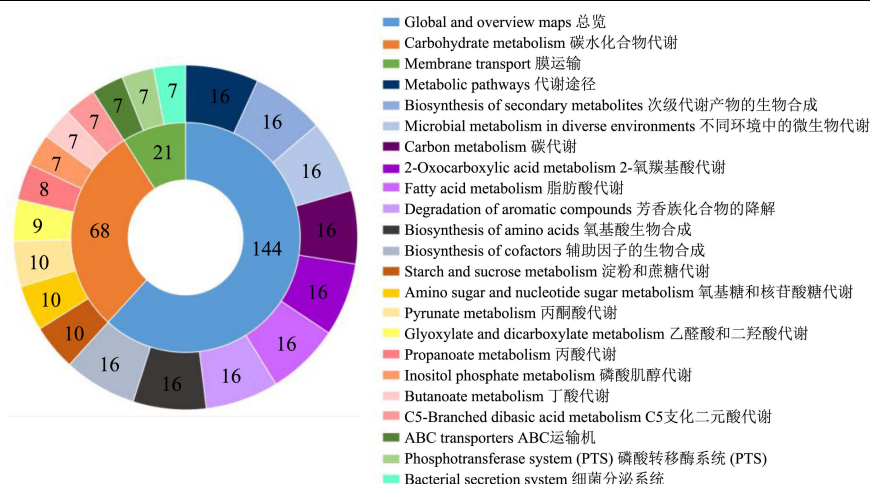


图 2 K0 pathway level 2 条目 top20 注释信息绘图以及注释

Fig.2 KO pathway level 2 entry top20 annotation information drawing and annotation

去甲肾上腺素 (NE; ID: meta\_159) 同时富集在唾液分泌 (1 个)、胃酸分泌 (1 个) 等通路; 其中在内分泌系统模块中 NE、葡萄糖-1-磷酸 (ID: meta\_133) 同时富集到卵巢类固醇生成、雌激素信号通路、催产素信号通路等通路。Yu 等<sup>[26]</sup>表明了儿茶酚胺类激素会影响微生物组、营养吸收及肠道固有的免疫系统; NE 是天然的儿茶酚胺类激素, 是 Fe 的载体, 可促进体外微生物的生长、代谢, 营养状况和生物膜形成<sup>[27-29]</sup>。本次测定 4 种蜂蜜均检出 NE, 这可能是蜂蜜能治疗腹泻和美容养颜的原因之一。并且 NE 富集到唾液分泌、胃酸分泌通路上, 因此 NE 很可能是蜜蜂在蜂蜜酿造这一过程中分泌产生, 这有待于进一步验证, 以作为真假蜂蜜判别的重要依据。

### 2.2.2 HMDB (Human Metabolome Database) 数据库注释

HMDB 数据库注释结果显示, 代谢物分别归类到酚类 (1 个)、非金属氧阴离子化合物 (1 个)、脂肪酰基 (1 个)、羧酸及其衍生物 (2 个)、有机氧化合物 (5 个)、吡啶及其衍生物 (1 个) 6 个分类。其中 NE 归类到酚类上; 麦芽糖 (maltose; ID: meta\_184)、海藻糖 (trehalose; ID: meta\_182)、葡萄糖-1-磷酸、肌

醇 (inositol; ID: meta\_156) 归类到有机氧化合物上。说明蜂蜜中的酚类、有机氧化物等与人体代谢密切相关。

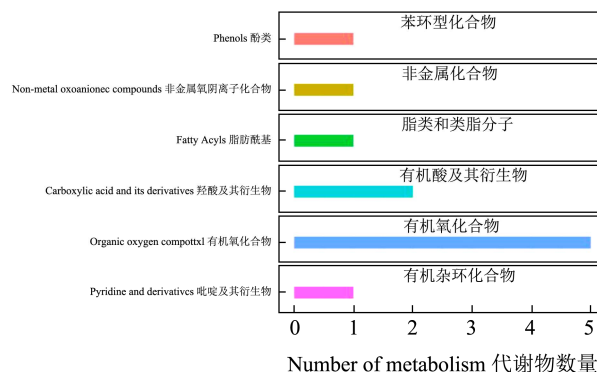


图 3 Top 20 class 绘图结果以及注释

Fig.3 Top 20 class drawing results and comments

### 2.2.3 差异代谢物分析

#### 2.2.3.1 OPLS-DA 分析

利用差异分组的正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis, OPLS-DA), R (3.3.2) 软件包 ropls 计算的 OPLS-DA 模型得分显示各组间  $R^2X > 0.68$ 、 $R^2Y > 0.59$ 、 $Q^2Y$  都在 0.50 左右, 认为是有效的模型 (图 4a-f)。

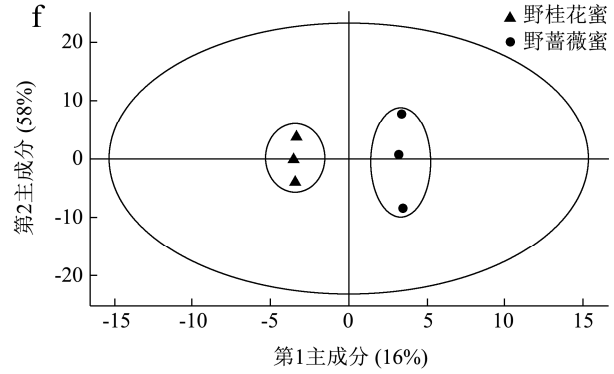
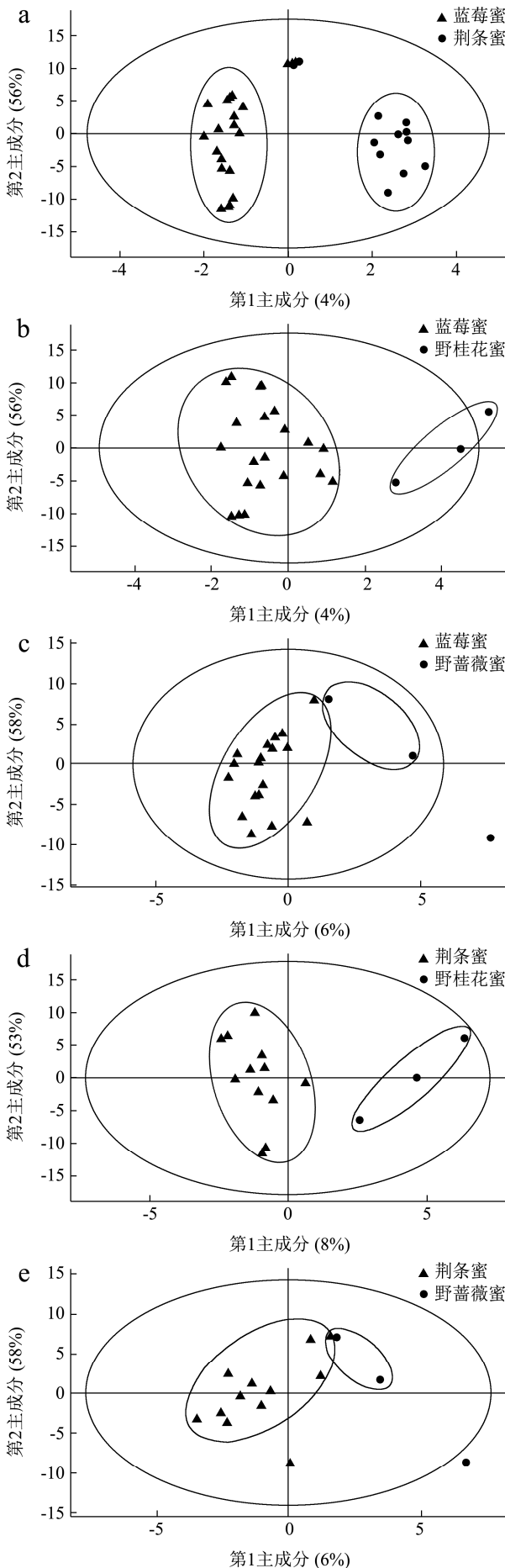


图4 OPLS-DA得分图

Fig.4 OPLS-DA score chart

注: a: 蓝莓蜜 vs 荆条蜜组间 OPLS-DA 得分图; b: 蓝莓蜜 vs 野桂花蜜组间 OPLS-DA 得分图; c: 蓝莓蜜 vs 野蔷薇蜜组间 OPLS-DA 得分图; d: 荆条蜜 vs 野桂花蜜组间 OPLS-DA 得分图; e: 荆条蜜 vs 野蔷薇蜜组间 OPLS-DA 得分图; f: 野桂花蜜 vs 野蔷薇蜜组间 OPLS-DA 得分图。

2.2.3.2 差异代谢物 Veen 分析

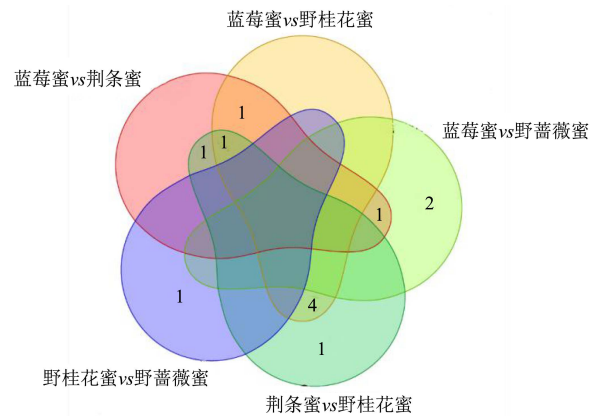


图5 不同组别的差异代谢物 Veen 图

Fig.5 Veen diagram of different metabolites in different groups

在不同蜂蜜样本之间, 共检测出差异代谢物 12 种(图 5)。荆条蜜相比于蓝莓蜜差异代谢物有 4 种, 分别为 2-酮丁酸 (ID: meta\_43)、分析物 407 (ID: meta\_170)、脯氨酸 (ID: meta\_79)、麦芽糖, 其中 2-酮丁酸下调表达, 其它物质上调表达。野蔷薇蜜相比于蓝莓蜜的差异代谢物有 3 个, 分别为 2-酮丁酸、分析物 389 (ID: meta\_160)、硬脂酸 (ID: meta\_163) 均为下调表达。Alissandrakis 等<sup>[30]</sup>认为所检测同一样本单花蜜都存在某一化合物, 在其它蜂蜜该化合物不存在或含量较少时, 此化合物是该单花蜜的特征性物质。经过两两蜂蜜比较后的结果, 在蓝莓蜜中 2-酮丁酸的含量显著高于其它 3 种蜂蜜的含量, 2-酮丁酸可初步确定为蓝莓蜜中所含, 目前, 2-酮丁酸应用于食品添加剂的中文名称为 2-氧代丁酸, 主要用于天然香味料。

野桂花蜜相比于蓝莓蜜差异代谢物有 6 种, 分别

为肌醇 (meta\_156)、分析物 407 (meta\_170)、乳糖 2 (meta\_174)、乳果糖 1 (meta\_175)、海藻糖 (meta\_182)、麦芽糖。除麦芽糖以外,其余物质都为下调表达。肌醇可降低胆固醇,在帮助体内脂肪的再分配以及供给脑细胞营养上,扮演重要的角色<sup>[31,32]</sup>,在蓝莓蜜中硬脂酸、肌醇含量高于其它 3 种蜂蜜的含量,蓝莓蜜可能在增强免疫力、护肝等效果优于其它 3 种蜂蜜。

野蔷薇蜜相比于野桂花蜜,检测出 1 个未知的显著下调表达代谢物, ID 为 meta\_140; 野蔷薇蜜与荆条蜜的代谢物比较,未检出差异显著的代谢物。3-己烯二酸开环可得到山梨酸,山梨酸是国际上应用最广泛的防腐剂之一,能有效抑制微生物生长、繁殖<sup>[33]</sup>。粟有志等<sup>[18]</sup>认为当某些挥发性物质虽然在所检测的单花蜜中不完全存在,但其出现次数较高,在其他蜂蜜中不存在或存在时含量较低,也应将它确定为单花蜜的特征性物质。本次检测中 3-己烯二酸仅存在于野蔷薇蜜中,因此,野蔷薇蜜可能在防止食物发霉、变质方面具有更好效果,以及 3-己烯二酸可确定为野蔷薇

蜜中所含。

已有研究表明麦芽糖具有排毒养颜,补脾柔肝,促进钙、镁、锌等矿物质吸收的特性;乳果糖被称为肠道益生菌的增生剂,缓解肠道菌群紊乱,促进肠道益生菌繁殖<sup>[34]</sup>。脯氨酸、麦芽糖、去甲肾上腺素、蔗糖这些物质同时富集到了碳水化合物的吸收与消化、蛋白质消化与吸收、脂肪消化与吸收等信号通路上,这可能是解释蜂蜜具有美容养颜、促进消化吸收的原因之一。上述 4 种蜂蜜麦芽糖、乳果糖的含量顺序为:野桂花蜜>荆条蜜>蓝莓蜜>野蔷薇蜜,因此,在促进肠道蠕动消化吸收效果强弱顺序可能为野桂花蜜>荆条蜜>蓝莓蜜>野蔷薇蜜。海藻糖可稳定人体细胞的细胞膜,与体内的蛋白质结合来保证皮肤水嫩,减少皱纹和色斑生成<sup>[35]</sup>;脯氨酸是身体中胶原蛋白和软骨所需的氨基酸,帮助人体合成蛋白质<sup>[36]</sup>;海藻糖、脯氨酸的含量顺序为:荆条蜜>野桂花蜜>蓝莓蜜>野蔷薇蜜,因此,在促进蛋白质合成、结合效果强弱顺序可能为野桂花蜜>荆条蜜>蓝莓蜜>野蔷薇蜜。

表 2 蓝莓蜜 vs 荆条蜜差异代谢物富集前 10 KEGG 通路

Table 2 Top 10 KEGG pathways of differential metabolites enrichment between blueberry honey and vitex honey

通路	通路 ID	通路上的差异代谢物
ABC 运输 ABC transporters	ko02010	2
代谢途径 Metabolic pathways	ko01100	2
次级代谢物的生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	ko01110	2
矿物质吸收 Mineral absorption	ko04978	1
氨基酸生物合成 Biosynthesis of amino acids	ko01230	1
氨酰 tRNA 生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ko00970	1
磷酸转移酶系统 Phosphotransferase system (PTS)	ko02060	1
碳水化合物消化和吸收 Carbohydrate digestion and absorption	ko04973	1
蛋白质消化和吸收 Protein digestion and absorption	ko04974	1
癌症中的中枢碳代谢 Central carbon metabolism in cancer	ko05230	1

表 3 蓝莓蜜 vs 野桂花蜜差异代谢物富集前 10 KEGG 通路

Table 3 Top 10 KEGG pathways of different metabolites enrichment between blueberry honey and wild osmanthus honey

通路	通路 ID	信号通路上的差异代谢物
代谢途径 Metabolic pathways	ko01100	3
次级代谢物生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	ko01110	3
ABC 运输 ABC transporters	ko02010	3
磷酸转移酶系统 Phosphotransferase system (PTS)	ko02060	2
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	ko00500	2
抗坏血酸盐和醛酸盐代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	ko00053	1
磷酸酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	ko04070	1
不同环境微生物代谢 Microbial metabolism in diverse environments	ko01120	1
碳水化合物消化和吸收 Carbohydrate digestion and absorption	ko04973	1
磷酸肌醇代谢 Inositol phosphate metabolism	ko00562	1



表4 荆条蜜 vs 野桂花蜜差异代谢物富集前 10 KEGG 通路

Table 4 Top 10 KEGG pathways of differentiated metabolites enrichment between vitex honey and wild osmanthus honey

通路	通路 ID	信号通路上的差异代谢物
代谢途径 Metabolic pathways	ko01100	4
次级代谢物生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	ko01110	4
ABC 运输 ABC transporters	ko02010	4
半乳糖代谢 Galactose metabolism	ko00052	2
磷酸转移酶系统 Phosphotransferase system (PTS)	ko02060	2
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	ko00500	2
碳青霉烯生物合成 Carbapenem biosynthesis	ko00332	1
氨酰 tRNA 生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ko00970	1
抗坏血酸和醛酸代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	ko00053	1
生物合成途径概述 Overview of biosynthetic pathways	ko01010	1

### 2.2.3.3 差异代谢物 KEGG 功能注释及富集分析

蓝莓蜜 vs 野蔷薇蜜中仅有 1 个下调差异代谢物硬脂酸, 分别富集到脂肪酸生物合成、植物次生代谢产物的生物合成等 4 条通路上。脂肪酸对于视觉、神经以及肝脏等方面具有重要作用<sup>[37,38]</sup>, 相对于野蔷薇蜜而言, 蓝莓蜜可能更有利于明目、保护肝脏等作用。野蔷薇蜜与荆条蜜、野桂花蜜相比, 所含的显著差异代谢物, 不具有 ko 富集功能。

研究表明人体对不同蜂蜜中的碳水化合物消化和吸收能力不同, 碳水化合物在帮助促进人体内代谢物的消化吸收具有重要作用<sup>[39,40]</sup>。通过 ko 富集分析, 蓝莓蜜 vs 荆条蜜组有 2 个具有富集功能的上调差异代谢物, 脯氨酸、麦芽糖分别富集到 ABC 运输 (2 个)、代谢途径 (2 个)、氨酰 tRNA 生物合成 (1) 等 18 条通路 (表 2)。蓝莓蜜 vs 野桂花蜜组中 3 个具有富集功能的上调差异代谢物, 肌醇、麦芽糖、海藻糖分别富集到代谢途径 (3 个)、磷酸转移酶系统 (2 个)、抗坏血酸盐和醛酸盐代谢 (1 个) 等 14 条通路 (表 3)。荆条蜜 vs 野桂花蜜组中 4 个具有富集功能的下调差异代谢物, 蔗糖、肌醇、脯氨酸、海藻糖分别富集在代谢途径 (4 个)、次级代谢物生物合成 (4 个)、磷酸转移酶系统 (2 个) 等 25 条通路 (表 4)。可见, 蜂蜜有助于人体内糖类、脂类物质的代谢及吸收, 且不同蜂蜜所含碳水化合物在人体内的吸收和代谢有较大差异, 这与 Sanchezzapata 等<sup>[39]</sup>和 Al-Waili 等<sup>[40]</sup>结果一致。

## 3 结论

本研究基于非靶向代谢组学对 4 种中蜂蜂蜜进行分析, 共检测到 2-酮丁酸、海藻糖、肌醇、硬脂酸等 12 种差异代谢物与糖类、脂类、维生素类物质代谢与吸收密切相关, NE 同时存在于 4 种蜂蜜中, 且同时

富集在唾液分泌、胃酸分泌、胰腺分泌等信号通路上, 未来可作为真假蜂蜜判别的重要依据。其中蓝莓蜜可能在增强免疫、保护肝脏等方面更为突出, 更适合作为天然香料添加剂, 2-酮丁酸可认为是蓝莓蜜的特征性物质; 3-己烯二酸独特存在于野蔷薇蜜中, 初步可判定为特征性物质; 根据差异代谢物显著程度, 本次检测的 4 种蜂蜜在促进人体消化吸收、帮助蛋白质结合及合成的强弱顺序可能为: 野桂花蜜>荆条蜜>蓝莓蜜>野蔷薇蜜。

## 参考文献

- [1] 张言政. 中蜂蜂蜜与意蜂蜂蜜蜂种来源真实性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019  
ZHANG Yanzheng. Research on the authenticity of bee species sources of *Apis cerana* honey and *Apis mellifera ligustica* honey [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019
- [2] Won S R, Lee D C, Rhee H I, et al. Honey major protein characterization and its application to adulteration detection [J]. Food Research International, 2008, 41(10): 952-956
- [3] 伊作林, 杨柳, 席芳贵, 等. 蜂蜜成分及功能活性的研究进展 [J]. 中国蜂业, 2018, 69(4): 51-54  
YI Zuolin, YANG Liu, XI Fanggui, et al. Research progress of honey composition and functional activity [J]. Chinese Bee Industry, 2018, 69(4): 51-54
- [4] Salim O, Paul S, Mostapha B B, et al. HPLC sugar profiles of Algerian honeys [J]. Food Chemistry, 2009, 121(2): 561-568
- [5] Jose M, Alvarez S, Sara T, et al. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(8): 2490-2499
- [6] 邓建军, 焦霞, 杨海霞, 等. 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术分

- 析蜂蜜蛋白质行为[J].食品科学,2012,33(14):188-191
- DENG Jianjun, JIAO Xia, YANG Haixia, et al. Analysis of honey protein behavior by polyacrylamide gel electrophoresis [J]. Food Science, 2012, 33(14): 188-191
- [7] 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
- [8] Sanz M L, Sanz J, Martínez-Castro I. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1059(1-2): 143-148
- [9] Bugarova V, Godocikova J, Bucekova M, et al. Effects of the carbohydrate sources nectar, sucrose and invert sugar on antibacterial activity of honey and bee-processed syrups [J]. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2021, 10(8): 1-15
- [10] Ghramh H A, Ibrahim E H, Kilany M. Study of anticancer, antimicrobial, immunomodulatory, and silver nanoparticles production by Sidr honey from three different sources [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(1): 445-455
- [11] Karabagias I, Badeka A, Kontominas M G. A decisive strategy for monofloral honey authentication using analysis of volatile compounds and pattern recognition techniques' [J]. Microchemical Journal, 2019, 152: 1-9
- [12] Alonso A, Marsal S, Julià A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015 [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2015, 3: 1-20
- [13] Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48: 155-171
- [14] Bino R J, Hall R D, Fiehn O, et al. Potential of metabolomics as a functional genomics tool [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(9): 418-425
- [15] 俞邱豪,张九凯,叶兴乾,等.基于代谢组学的食品真实属性鉴别研究进展[J].色谱,2016,34(7):657-664
- YU Qiu hao, ZHANG Jiukai, YE Xingqian, et al. Research progress of food real attribute identification based on metabonomics [J]. Chromatography, 2016, 34(7): 657-664
- [16] 陈志燕,黄世杰,朱静,等.5种蜂蜜挥发性成分的GC-MS分析[J].农产品加工(学刊),2013,22:72-74
- CHEN Zhiyan, HUANG Shijie, ZHU Jing, et al. GC-MS analysis of five kinds of honey volatile components [J]. Agricultural Products Processing (Journal), 2013, 22: 72-74
- [17] 孙雨安,孙敏青,王国庆,等.基于顶空固相微萃取GC-MS分析不同蜂蜜的挥发性成分[J].河南师范大学学报(自然科学版),2013,41(5):75-80
- SUN Yu'an, SUN Minqing, WANG Guoqing, et al. GC-MS analysis of volatile components in different honey based on headspace solid-phase microextraction [J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2013, 41(5): 75-80
- [18] 粟有志,谢丽琼,王强,等.4种新疆单花蜜挥发性成分的SPME-GC-MS分析[J].食品科学,2010,31(24):293-299
- SU Youzhi, XIE Liqiong, WANG Qiang, et al. SPME-GC-MS analysis of volatile components in four kinds of Xinjiang nectar [J]. Food Science, 2010, 31(24): 293-299
- [19] Jandrić Z, Frew R D, Fernandez-Cedi L N, et al. An investigative study on discrimination of honey of various floral and geographical origins using UPLC-QToF MS and multivariate data analysis [J]. Food Control, 2017, 72: 189-197
- [20] Koulis G A, Tsagkaris A S, Aalizadeh R, et al. Honey phenolic compound profiling and authenticity assessment using HRMS targeted and untargeted metabolomics [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2021, 26(9): 1-21
- [21] 冉曜琦,孙丽萍,曾海英,等.贵州蓝莓蜜的成分分析及其抗氧化活性[J].现代食品科技,2020,36(5):81-87,287
- RAN Yaoqi, SUN Liping, ZENG Haiying, et al. Composition analysis and antioxidant activity of Guizhou blueberry honey [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 81-87, 287
- [22] Kind T, Wohlgemuth G, Lee D Y, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2009, 81(24): 10038-10048
- [23] Dunn W B, Broadhurst D, Begley P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. Nat Protoc, 2011, 6(7): 1060-1083
- [24] Yu G, Wang L, Han Y, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS: A Journal of Integrative Biology, 2012, 16(5): 284-287
- [25] Chong J, Xia J. Metaboanalyst R: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data [J]. Bioinformatics, 2018, 34(24): 4313-4314
- [26] Sarkodie E K, Zhou S, Baidoo S A, et al. Influences of stress hormones on microbial infections [J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 131: 270-276

- [27] Kinney K S, Austin C E, Morton D S, et al. Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacteria--mechanistic studies [J]. *Life Sciences*, 2000, 67(25): 3075-3085
- [28] Gonzales X F, Castillo-Rojas G, Castillo-Rodal A I, et al. Catecholamine norepinephrine diminishes lung epithelial cell adhesion of *Streptococcus pneumoniae* by binding iron [J]. *Microbiology*, 2013, 159: 2333-2341
- [29] Yang Q, Anh N, Peter B, et al. Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 1-12
- [30] Alissandrakis E, Taranilis 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: 396-404
- [31] Bennett M, Onnebo S M, Azevedo C, et al. Inositol pyrophosphates: metabolism and signaling [J]. *Cellul Mol Lif Sci*, 2006, 63(5): 552-564
- [32] Chakraborty A, Kim S, Snyder S H. Inositol pyrophosphates as mammalian cell signals [J]. *Sci Sign*, 2011, 23(4): 188
- [33] 张乃茹,李晓莉.食品防腐剂山梨酸的研究进展[J].长春师范学院学报,1995,5:16-19  
ZHANG Nairu, LI Xiaoli. Research progress of food preservative sorbic acid [J]. *Journal of Changchun Normal University*, 1995, 5: 16-19
- [34] Karakan T, Tuohy K M, Solingen G J. Low-dose lactulose as a prebiotic for improved gut health and enhanced mineral absorption [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 672925
- [35] 张兰馨,张部昌.海藻糖分子的细胞保护作用研究进展[J].中国医药生物技术,2008,3(6):465-467  
ZHANG Lanxin, ZHANG Buchang. Research progress on cell protection of trehalose molecule [J]. *China Medical Biotechnology*, 2008, 3(6): 465-467
- [36] 张岩,马光路,杨志杰.不同溶剂提取-分光光度法测定蜂蜜中脯氨酸含量[J].黑龙江畜牧兽医,2017,15:278-280  
ZHANG Yan, MA Guanglu, YANG Zhijie. Determination of proline content in honey by spectrophotometry with different solvents [J]. *Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017, 15: 278-280
- [37] 王慧美,刘乐文,刘丽英,等.脂肪酸对动物肠道微生物菌群的影响[J].畜牧与兽医,2021,53(10):133-137  
WANG Huimei, LIU Lewen, LIU Liying, et al. Effects of fatty acids on intestinal microflora of animals [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2021, 53(10): 133-137
- [38] Mujico J R, Baccan G C, Gheorghe A, et al. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice [J]. *British Journal of Nutrition*, 2013, 110(4): 711-720
- [39] Sancheztapia M, Martinezmedina J, Tovar A R, et al. Natural and artificial sweeteners and high fat diet modify differential taste receptors, insulin, and TLR4-mediated inflammatory pathways in adipose tissues of rats [J]. *Nutrients*, 2019, 11(4): 880
- [40] Al-Waili N S. Natural honey lowers plasma glucose, C-reactive protein, homocysteine, and blood lipids in healthy, diabetic, and hyperlipidemic subjects: comparison with dextrose and sucrose [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2004, 7(1): 100-107

---

(上接第 235 页)

- [27] 张文秀,陆红佳,戴媛.蓝莓酒渣的粒度及添加量对面条品质的影响[J].食品科技,2020,45(11):167-174  
ZHANG Wenxiu, LU Hongjia, DAI Yuan. Effects of grain size and addition amount of blueberry wine lees on noodle quality [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(11): 167-174
- [28] 彭芸,陈洁,吕莹果,等.苦荞粉添加量对面团性质及馒头品质的影响[J].粮油食品科技,2015,23(1):47-50  
PENG Yun, CHEN Jie, LYU Yingguo, et al. Effects of Tartary buckwheat powder addition on dough properties and steamed bread quality [J]. *Cereals, Oils and Food Science and Technology*, 2015, 23(1): 47-50
- [29] 冯世德,孙太凡.玉米粉对小麦面团和馒头质构特性的影响[J].食品科学,2013,34(1):101-104  
FENG Shide, SUN Taifan. Effects of corn flour on texture characteristics of wheat dough and steamed bread [J]. *Food Science*, 2013, 34(1): 101-104