

UPLC-MS/MS 法分析洋槐蜜及其蜜源花中的黄酮类成分*

王笑笑^{1,2}, 颜伟华², 黄华², 徐国群³, 雷美康³, 吴永江^{1**}

(1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 衢州市食品药品检验研究院, 衢州 324002; 3. 衢州出入境检验检疫局, 衢州 324002)

摘要 目的: 考察采用蜜源花作为“对照药材”寻找蜂蜜中特征成分的分析方法的可行性。**方法:** 洋槐蜜和洋槐花酸水提取液经 D-101 型大孔吸附树脂提取纯化后采用 UPLC-MS/MS 分析。色谱柱采用 Inertsil ODS-3 柱 (2.1 mm × 75 mm, 2 μm), 甲醇-0.02% 甲酸为流动相梯度洗脱, 流速为 0.4 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 2 μL; 以儿茶素、表儿茶素、芦丁、芸香柚皮苷、桑黄素、杨梅素、山柰酚、生松素等 16 种黄酮类对照品作为对照, 采用电喷雾离子源 (ESI), 多反应监测 (MRM) 进行分析。**结果:** 洋槐蜜与洋槐花中同时存在柚皮素、槲皮素、染料木素、木犀草素、山柰酚、芹菜素和汉黄芩素, 且它们的含量在总共有组分含量中的占比呈一定比例, 分别为 5.75 : 23.21 : 5.00 : 30.37 : 32.47 : 2.94 : 0.25 和 2.45 : 23.05 : 0.88 : 5.41 : 66.04 : 2.13 : 0.03。洋槐蜜和洋槐花中的黄酮类组分及含量存在一定程度的相关性: 洋槐花中含量高的化合物, 洋槐蜜中也相对较高; 相反则相对较低。最后, 发现洋槐蜜中的潜在标志物染料木素。**结论:** 采用蜜源花作为“对照”寻找蜂蜜中特征成分的分析方法具有可行性。

关键词: 洋槐花; 洋槐蜜; 黄酮; 特征成分; 染料木素; 木犀草素; 芹菜素; 桑黄素; 杨梅素; 生松素; 白杨素; 汉黄芩素; 超高效液相色谱串联质谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)05-0796-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.05.08

Analysis of flavonoids in acacia honey and locust flower by UPLC-MS/MS*

WANG Xiao-xiao^{1,2}, YAN Wei-hua², HUANG Hua², XU Guo-qun³,
LEI Mei-kang³, WU Yong-jiang^{1**}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Quzhou Institute for Food and Drug Control, Quzhou 324002, China;

3. Quzhou Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Quzhou 324002, China)

Abstract Objective: To investigate the feasibility of using nectar flower as a contrast to find chemical markers for honey. **Methods:** Acacia honey and aqueous hydrochloric acid extract of acacia flower were extracted and purified by D-101 macroporous resin and then analyzed by UPLC-MS/MS. Separation was performed on an Inertsil ODS-3

* 浙江省食品药品监管系统科技计划项目 (2014018); 浙江省衢州市重点实验室项目 (衢市科发高 [2015] 8 号)

** 通信作者 Tel: 13515815761; E-mail: yjwu@zju.edu.cn

第一作者 Tel: 18057080851; E-mail: 123143807@qq.com

column (2.1 mm × 75 mm, 2 μm), with methanol-0.02% formic acid solution as mobile phase in gradient elution at a flow rate of 0.4 mL · min⁻¹. The column temperature was controlled at 40 °C and the injection volume was 2 μL. Electrospray ionization (ESI) source was applied in multiple reaction monitoring (MRM) mode, taking 16 kinds of flavonoids as the reference, such as catechin, epicatechin, rutin, narirutin, morin, myricetin, kaempferol, pinocembrin, etc. **Results:** Naringenin, quercetin, genistein, luteolin, kaempferol, apigenin and wogonin were found in both acacia honey and acacia flower, and the proportion of each component in the total content of common components was 5.75 : 23.21 : 5.00 : 30.37 : 32.47 : 2.94 : 0.25 and 2.45 : 23.05 : 0.88 : 5.41 : 66.04 : 2.13 : 0.03, respectively. There was a certain degree of correlation between content of flavonoids in acacia honey and locust flower. Compounds with high content in acacia flower were also relatively high in acacia honey, vice versa. Finally, a potential marker of genistein was found in acacia honey. **Conclusion:** It was feasible to find markers for honey by using nectar flower as a “contrast”.

Keywords: locust flower; acacia honey; flavonoid; marker; genistein; luteolin; apigenin; morin; myricetin; pinocembrin; chrysin; wogonin; UPLC-MS/MS

刺槐 *Robinia pseudoacacia* L. 为豆科蝶形花亚科刺槐属多年生落叶乔木,刺槐花涩,性平,有小毒,入肝经,收敛止血,止大肠下血,咯血,又治妇女红崩^[1]。洋槐蜜为蜜蜂科昆虫中华蜜蜂 (*Apis cerana* Fabricius) 或意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica* Spinola) 采集刺槐花蜜或分泌物,经过充分酿造而贮藏在巢脾内的甜物质。目前国内外主要采用 UV 法^[2-3]、HPLC 法^[2-6]、LC-MS 法^[7-11]、GC-MS 法^[12-15]、IR 法^[16-17] 和 NMR 法^[10,17] 等研究洋槐蜜中的抗氧化成分、挥发性组分、抗生素残留以及掺假掺杂情况等。由于洋槐蜜是洋槐花蜜或分泌物经过意大利蜜蜂或中华蜜蜂的采集、储存和分泌等一系列过程产生的天然食品,从而导致了与洋槐花间既存在着密切的联系,又存在一定的区别。那么,能否通过同时分析洋槐花和洋槐蜜中的黄酮类成分来寻找洋槐蜜中的特征黄酮类组分呢? Giovanna 等^[15] 的研究思路(同时分析不同洋槐花部位的挥发性组分和洋槐蜜中的挥发性组分来研究洋槐蜜中挥发性组分的来源)给本次实验的设计提供了参考依据。本次实验主要采用 UPLC-MS/MS 法分析洋槐蜜、洋槐花不同部位以及洋槐花整花中的黄酮类化合物,寻找洋槐蜜中各黄酮类组分的来源,并将洋槐蜜与洋槐花中的共有成分作为特征组分的备选。

1 仪器与试剂

液质联用仪由日本岛津 LC-30AD 型超高效液相系统和 LCMS-8040 型三重四极杆串联质谱仪组成,配有 Nexera X2 LC-30AD 二元高压梯度泵、SIL-

30AC 自动进样器、CTO-20AC 柱温箱、电喷雾离子源、PEAK 氮气发生器和 Lab Solution 工作站;成都超纯科技有限公司 UPT- II -10T 型制水器;梅特勒-托利多公司 XS-205 型电子天平;梅特勒-托利多公司 ME1002E 型电子天平;德国 IKA RV10 型旋转蒸发仪。

儿茶素(批号 877-200001,纯度 100%)、表儿茶素(批号 110878-200102,纯度 100%)、芦丁(批号 100080-200707,纯度 90.5%)、葛根素(批号 0752-9907,纯度 100%)、黄芩素(批号 111595-200402,纯度 100%)、木犀草素(批号 111520-200504,纯度 100%)、芹菜素(批号 111901-201102,纯度 99.6%)、染料木素(批号 111704-201302,纯度 99.1%)、高良姜素(批号 111699-200501,纯度 100%)、汉黄芩素(批号 1514-200202,供鉴别用)均购于中国食品药品检定研究院,白杨素(批号 00003620-001,仅供定性用)、槲皮素(批号 00017030-566,纯度 95.0%)、山柰酚(批号 00011021-901,纯度 97.7%)、生松素(批号 00016840-158,仅供定性用)、杨梅素(批号 00013921-524,纯度 95.3%)、桑黄素(批号 00013896-415,纯度 91.0%)、柚皮素(批号 00014205-603,纯度 98.7%)购于 ChromaDex,芸香柚皮苷(批号 MUST-13041206,纯度 98%)购于中国科学院成都生物研究所。超纯水,UPT- II -10T 型制水器当日制备,电阻率 > 18 mΩ; D-101 型净品大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

本文中所有蜂蜜分别由浙江千红蜂产业有限公司(简称千红)、浙江江山恒亮蜂产品有限公司(简称恒亮)和董家蜂农处分批购入。所用洋槐花由衢州市出入境检验检疫局徐国群提供,产地为浙江省江山市,经王笑笑鉴定为豆科刺槐属刺槐花,又称洋槐花,作为对照药材备用。另有玫瑰花蜜从市场上购买,用于蜂蜜的提取回收率和基质效应等方法学试验。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Inertsil ODS-3 (2.1 mm × 75 mm, 2 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.02% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 2%A → 15%A; 5~10 min,

15%A → 17%A; 10~15 min, 17%A → 32%A; 15~30 min, 32%A → 42%A; 30~40 min, 42%A; 40~45 min, 42%A → 50%A; 45~50 min, 50%A → 65%A; 50~55 min, 65%A → 70%A; 55~56 min, 70%A → 2%A; 56~58 min, 2%A); 流速: 0.4 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 进样量: 2 μL。

2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 多反应监测(MRM), 雾化气流量 3 L · min⁻¹, 脱溶剂温度 250 °C, 加热块温度 400 °C, 载气流量 15 L · min⁻¹; 不同对照品的母离子质量数(Q1) *m/z*、子离子质量数(Q3) *m/z*、驻留时间(dwel time)、Q1 Pre Bias、碰撞电压(CE)和 Q3 Pre Bias 见表 1。

表 1 质谱参数值

Tab. 1 Parameters of mass spectrometry

化合物 (compound)	保留时间 (retention time) / min	母离子质量数 (Q1) <i>m/z</i>	子离子质量数 (Q3) <i>m/z</i>	驻留时间 (dwel time) /ms	Q1 Pre Bias/ V	碰撞电压 (CE) /V	Q3 Pre Bias/ V
儿茶素(catechin)	7.658	289.00	109.00	91.0	10.0	23.0	20.0
表儿茶素(epicatechin)	11.857	289.00	123.00	91.0	10.0	27.0	21.0
芸香柚皮苷(narirutin)	18.636	578.80	151.00	91.0	20.0	42.0	15.0
芦丁(rutin)	19.595	608.90	300.00	91.0	22.0	38.0	32.0
桑黄素(morin)	23.424	301.00	125.00	91.0	11.0	21.0	24.0
杨梅酮(myricetin)	21.614	316.90	136.90	91.0	22.0	27.0	24.0
柚皮素(naringenin)	26.763	270.90	150.90	91.0	20.0	18.0	28.0
槲皮素(quercetin)	27.181	301.00	151.00	91.0	22.0	22.0	29.0
染料木素(genistein)	29.027	269.00	133.00	91.0	19.0	30.0	23.0
木犀草素(luteolin)	29.53	284.90	150.70	91.0	20.0	28.0	28.0
山柰酚(kaempferol)	33.847	284.90	184.00	91.0	10.0	30.0	20.0
芹菜素(apigenin)	35.398	268.90	150.90	91.0	19.0	24.0	25.0
生松素(pinocembrin)	43.612	255.00	151.00	91.0	18.0	22.0	15.0
汉黄芩素(wogonin)	47.117	285.00	270.00	91.0	-15.0	-26.0	-28.0
白杨素(chrysin)	48.358	252.90	143.10	91.0	18.0	27.0	13.0
高良姜素(galangin)	49.383	269.00	141.00	91.0	19.0	28.0	26.0

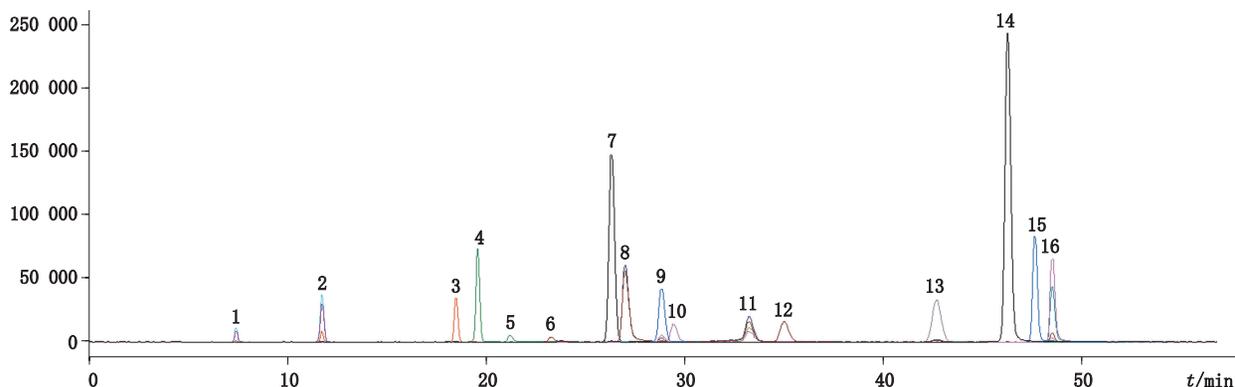
2.3 混合对照品的配制 分别精密称取儿茶素、表儿茶素、桑黄素和山柰酚的对照品 8.35、5.62、4.42 和 16.68 mg 置同一 100 mL 量瓶中; 其余 12 种对照品分别以甲醇为溶剂, 配制成一定浓度的单一成分对照品溶液, 再分别精密量取 1 mL 置上述 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 摇匀, 制成含儿茶素 83.5

μg · mL⁻¹、表儿茶素 56.2 μg · mL⁻¹、芸香柚皮苷 4.76 μg · mL⁻¹、芦丁 1.307 μg · mL⁻¹、桑黄素 40.2 μg · mL⁻¹、杨梅素 9.00 μg · mL⁻¹、柚皮素 0.69 μg · mL⁻¹、槲皮素 4.495 μg · mL⁻¹、染料木素 4.055 μg · mL⁻¹、木犀草素 3.665 μg · mL⁻¹、山柰酚 163.0 μg · mL⁻¹、芹菜素 1.072 μg · mL⁻¹、生松素 1.18 μg · mL⁻¹、汉黄芩素 0.353 μg · mL⁻¹、

白杨素 $2.925 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、高良姜素 $11.12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液,即得。

2.4 洋槐蜜的提取纯化 样品处理方法参考了相关文献[18–19]中蜂蜜的提取方法:取蜂蜜 100 g,加入 pH 2.0 的盐酸 500 mL,搅拌溶解后用盐酸调节 pH 至 2.0,再加入已处理好的 D-101 型大孔吸附树脂(粒度范围 0.3~1.2 mm) 150 g,搅拌 10 min,装柱,用酸水(盐酸调节 pH 至 2.0 的水溶液) 250 mL 和

蒸馏水 300 mL 先后冲洗柱子除去糖及其他组分,再用甲醇 400 mL 以 $1\sim 2 \text{滴} \cdot \text{s}^{-1}$ 的流速解吸附,收集甲醇,40 °C 低温旋转蒸干;最后用蒸馏水 10 mL 溶解,水溶液用乙醚(10、10、10 mL)提取纯化 3 次,合并乙醚液,水浴蒸干,甲醇溶解至 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀,用微孔滤膜($0.22 \mu\text{m}$)滤过,取续滤液作为供试品溶液。供试品的总离子流(TIC)色谱图见图 1。



1. 儿茶素(catechin) 2. 表儿茶素(epicatechin) 3. 芸香柚皮苷(narirutin) 4. 芦丁(rutin) 5. 杨梅酮(myricetin) 6. 桑黄素(morin) 7. 柚皮素(naringenin) 8. 槲皮素(quercetin) 9. 染料木素(genistein) 10. 木犀草素(luteolin) 11. 山柰酚(kaempferol) 12. 芹菜素(apigenin) 13. 生松素(pinocembrin) 14. 汉黄芩素(wogonin) 15. 白杨素(chrysin) 16. 高良姜素(galangin)

图 1 16 种黄酮类化合物的总离子流图

Fig. 1 The total ion chromatograms of 16 flavonoids

2.5 洋槐花的提取 首先,将一部分洋槐花的花瓣与其他部位(花托,花蕊,蜜腺和花萼等)进行分离;再将各部位与整花自然阴干,其提取方法结合 Martos 等^[18]和李艳艳等^[20]的方法:取自然阴干的样本 2.0 g,粉碎过 2 号筛,加入 pH 2 的盐酸水溶液 80 mL,加热提取 1 h,放冷,滤过,滤液加入 D-101 型大孔吸附树脂 150 g,搅拌 10 min,装柱,先用蒸馏水 300 mL 冲洗柱子,再用甲醇 400 mL 以 $1\sim 2 \text{滴} \cdot \text{s}^{-1}$ 的流速解吸附,收集甲醇,40 °C 低温旋转蒸干,最后用甲醇溶解至 10 mL 量瓶中并定容,即得。

2.6 方法学考察 本次实验方法学的考察内容主要有:最低检测限、最低定量限、线性、精密性、稳定性、蜂蜜的提取回收率和基质效应等,考察结果具体参照王笑笑等的研究报道^[21]。

2.7 样本测定 按照“2.4”和“2.5”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件分别进样 $2 \mu\text{L}$,以外标法计算各黄酮类组分含量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 液质色谱条件的优化 本法参照 Escriche 等^[22]、

Yao 等^[23]和郭夏丽等^[2]使用甲醇-甲酸作为流动相,考察了梯度洗脱程序和正、负离子扫描方式下各被测成分的响应强度和碎片离子数。通过对多种梯度洗脱程序的比较,最后在流动相比例上参考了郭夏丽等使用的方法,在时间上有所调整和延长。通过考察发现,被测组分的离子响应强度正离子模式高于负离子模式 10~100 倍,但是其碎片离子数多(除汉黄芩素外)且不稳定,故采用负离子模式为主,此结果与黄酮类化合物有较多羟基,呈酸性易失去氢离子形成稳定的氧负离子,而汉黄芩素因 8-OH 被甲氧基取代从而能形成较为稳定的正离子有关,这与单鸣秋的研究结果^[24]一致。因甲酸在水溶液中易电离出正离子,与氧负离子重新结合成分子,从而影响离子响应强度,故本实验分析比较了不同甲酸浓度下各被测组分的离子响应强度,发现低浓度甲酸溶液具有较高的离子响应强度,当甲酸浓度为 0.02% 时其离子响应强度达到最大,高于 0.05% 时,其离子响应强度趋向平稳,并随着甲酸浓度的增大而逐渐降低。故以 0.02% 甲酸溶液作为流动相 B。

表 2 不同批次洋槐蜜和洋槐花的测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Tab. 2 Analysis results of locust flower and acacia honey from different sources

化合物 (compound)	洋槐蜜 (acacia honey)					平均值 (\bar{X})	花的结构 (flower structures)		
	恒亮 1 (Hengliang 1)	恒亮 2 (Hengliang 2)	千红 1 (Qianhong 1)	千红 2 (Qianhong 2)	董家 (Dongjia)		花瓣 (petals)	其他 (others)	整花 (whole flower)
儿茶素 (catechin)	—	—	—	—	—	—	2.67×10^3	1.42×10^5	1.34×10^5
表儿茶素 (epicatechin)	—	—	—	—	—	—	—	1.16×10^5	—
芸香柚皮苷 (narirutin)	—	—	—	—	—	—	—	2.04×10^5	1.46×10^4
芦丁 (rutin)	—	—	—	—	—	—	1.29×10^5	1.66×10^6	1.62×10^6
桑黄素 (morin)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
杨梅酮 (myricetin)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
柚皮素 (naringenin)	6.32	28.83	10.28	0.99	20.36	13.36	175.59	5.91×10^3	3.31×10^3
槲皮素 (quercetin)	229.06	—	—	40.77	—	53.97	5.32×10^3	7.59×10^4	3.11×10^4
染料木素 (genistein)	—	45.09	12.74	0.28	—	11.62	—	1.57×10^3	1.19×10^3
木犀草素 (luteolin)	24.88	201.95	113.52	0.29	12.41	70.61	—	2.06×10^4	7.30×10^3
山柰酚 (kaempferol)	69.94	41.70	23.31	133.60	108.96	75.50	8.88×10^4	8.19×10^4	8.91×10^4
芹菜素 (apigenin)	6.50	16.56	4.08	0.01	7.07	6.84	232.55	7.74×10^3	2.88×10^3
生松素 (pinocembrin)	100.56	103.03	54.88	3.72	84.28	69.29	—	—	—
汉黄芩素 (wogonin)	—	1.23	—	0.01	1.70	0.59	57.77	83.90	39.84
白杨素 (chrysin)	2.49×10^3	832.96	370.25	2.26	703.57	881.42	—	—	—
高良姜素 (galangin)	—	56.51	—	2.67	48.32	14.80	—	—	—

注 (note): “—” 表示未检出 (means not detected)

3.2 混合对照品溶液配制的优化 在对各黄酮类化合物的最低检出限初步考察时发现,儿茶素、表儿茶素、桑黄素和山柰酚 4 种化合物的灵敏度偏低,最低检出限浓度均较高,而柚皮素、槲皮素和汉黄芩素等的灵敏度较高,其他适中。故在配制混合对照品溶液时,将此 4 种化合物均采取一步稀释,而其他化合物根据取样情况分别进行稀释。最后测得 4 种化合物的最低检出限分别为 0.334、0.224、0.804 和 1.63 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 是其他化合物的 10~1 800 倍。

3.3 洋槐蜜与洋槐花检测结果比较 从表 2 可以看出: 洋槐蜜与洋槐花中同时存在柚皮素、槲皮素、染料木素、木犀草素、山柰酚、芹菜素和汉黄芩素,将这 7 种黄酮类化合物进行含量占比分析发现,各组分在洋槐蜜和洋槐花中的占比相似,分别为 5.75 : 23.21 : 5.00 : 30.37 : 32.47 : 2.94 : 0.25 和 2.45 : 23.05 : 0.88 : 5.41 : 66.04 : 2.13 : 0.03。洋槐花酸水提取中未检出生松素、白杨素和高良姜素,其中高良姜素非极性较强,在酸水溶液中溶解性差,在乙醇等极性溶剂中溶解性强,故采用酸水提取的洋槐花中未检出高良

姜素; 洋槐花瓣中的黄酮类化合物含量除了山柰酚和汉黄芩素均低于其他结构 1 个数量级; 洋槐花瓣中未检出染料木素和木犀草素,这 2 种化合物主要存在于雄蕊、雌蕊、花萼或蜜腺等结构中; 以上 2 种情况,具体哪个部位中有或更多,均有待进一步的研究。

洋槐蜜中黄酮类成分以槲皮素、木犀草素、山柰酚、生松素和白杨素为主,柚皮素、木犀草素和染料木素等为辅; 洋槐花中富含儿茶素、芦丁、槲皮素和山柰酚,柚皮素、染料木素、木犀草素、芹菜素的含量居中,其中汉黄芩素的含量最低。通过洋槐花与洋槐蜜平均值 (\bar{X}) 分析结果的比较发现: 在洋槐花中含量高的化合物,在洋槐蜜中的检出量也相对较高; 相反,含量较低的化合物则检出量也较低; 而含量极低的化合物 (如汉黄芩素), 则因含量低和 / 或检测限的原因有时未能检出。由上所述,说明花中黄酮类组分及含量与蜂蜜中黄酮类组分及含量之间呈一定程度的正相关,这一结果与 Aronne 等的研究结果^[15]一致: 洋槐蜜中挥发性成分来源于洋槐花整花,其中花蜜占主导性作用,但有些成分仅来源于花瓣、花萼或雄蕊、

雌蕊。

有报道称少量的生松素、白杨素和短叶松素存在于只喂养蔗糖糖浆不采集花蜜的蜜蜂产的蜂蜜中,其原因与蜂蜜在精制或成熟过程蜂蜡中黄酮类化合物的迁移或蜜蜂吞咽蜂蜡、蜂胶后再分泌有关^[25]。而本次实验中的洋槐蜜均检出了大量的白杨素和生松素,此结果与 Schievano 等的检测结果^[10]一致;洋槐花中却未检出白杨素和生松素。此结果显示洋槐花中可能大量存在着白杨素和生松素的糖苷类成分,且此成分在酸水提取时不会分解成苷元,只有经过蜜蜂的酿造才能分解成白杨素和生松素,也许可用以区别非法添加洋槐花水提物的假蜂蜜。

郑永芹等^[26]以刺槐苷和鼠李糖刺槐苷作为指标性成分,分析比较不同采收期对指标性成分含量的影响,发现不同采收期刺槐花中的指标性成分刺槐苷和鼠李糖刺槐苷的含量不同,本次试验 5 批洋槐蜜中有 3 批未检出槲皮素,这可能也与蜜蜂采蜜时蜜源花的花期有关。

Tomás-Barberán 等^[27]在 2001 年报道薰衣草蜜和洋槐蜜中没有特别的酚类物质可作为标志物,可通过蜜源与蜜源花间的分析比较发现:洋槐花和洋槐蜜中同时含有少量的染料木素。虽然在油菜蜜和柑橘蜜中都有检出过少量染料木素,但油菜花和柑橘花中均未曾检出,只有在洋槐蜜和洋槐花中同时检出染料木素,且含量均远高于其他蜜种。查阅文献发现目前未见有文献报道将染料木素作为某一蜂蜜中的标志性化合物。也许,可以将染料木素作为潜在的标志物作为研究方向继续深入研究、确认。

3.4 展望 此次研究虽以黄酮苷元为主,但蜜蜂在酿造过程中也会因为蜂蜜的成熟度不够,导致黄酮苷未能全部水解或因蜜蜂的唾液中缺少某种酶而不能将苷转化成苷元,如 Truchado 等^[11]指出可能因为蜜蜂的唾液中缺少鼠李糖苷酶而导致洋槐蜜中存在山柰酚的糖苷类化合物(山柰酚与鼠李糖和己糖的结合物),并同时指出这些糖苷类化合物也许可作为区分洋槐蜜植物来源的标志物。因此糖苷类成分的研究也许是研究不同蜂蜜间特征组分的又一途径。另一方面,蜜蜂中因含有水解酶和葡萄糖氧化酶,导致蜂蜜中的成分与花蜜成分不同,未来建立模拟蜂蜜采蜜制蜜的模型也将有助于蜂蜜的研究。

本方法首次采用 UPLC-MS/MS 法同时分析洋槐蜜和洋槐花中的黄酮类组分,方法专属性强,灵敏度

高,但是也存在着提取方法不够完善,目标化合物不够多,分析时间长等特点,这些都有待进一步的完善,UPLC-MS/MS 法的应用为单花蜜的鉴定工作提供更为可靠的检测方法奠定基础。通过实验研究发现:蜂蜜中特征成分研究如同药材中活性成分的研究一样,不能以单一成分的存在来判定蜜源,以蜜源花作为“对照药材”寻找不同蜜源蜂蜜中的特征组分是一种可行的方法,且通过含量测定可寻找黄酮类组分含量占比规律,并为蜂蜜中黄酮类组分的指纹图谱奠定研究基础。

参考文献

- [1] 连冠,初正云,王添敏,等,刺槐花的化学成分研究(II)[J]. 中草药,2011,42(9):1706
LIAN G, CHU ZY, WANG TM, et al. Chemical constituents from flowers of *Robinia pseudoacacia* (II)[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2011, 42(9): 1706
- [2] 郭夏丽,罗丽萍,冷婷婷,等,7种不同蜜源蜂蜜的化学组成及抗氧化性[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(4):665
GUO XL, LUO LP, LENG TT, et al. Chemical compositions and antioxidant activities of seven honeys from different floral sources [J]. Nat Prod Res Dev, 2010, 22(4): 665
- [3] 孙春丽,王紫燕,李春阳,等,市售洋槐蜜多酚类成分及其抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):321
SUN CL, WANG ZY, LI CY, et al. Study on the composition and anti-oxidative activity of polyphenols from commercial acacia honey [J]. J Jiangsu Agric Sci, 2016, 44(4): 321
- [4] 梁铨,卢焕仙,刘宏程,等,蜂蜜黄酮类化合物检测方法建立及其在云南5种特色蜂蜜中的分布[J]. 食品科学,2013,34(6):148
LIANG C, LU HX, LIU HC, et al. Establishment of determination method for flavonoids in honey and distribution of flavonoids in 5 kinds of special honey from Yunan [J]. Food Sci, 2013, 34(6): 148
- [5] 孙兰凤,孙倩,穆春旭,等,蜂蜜中7种成分含量 HPLC 切换波长法测定[J]. 中国公共卫生,2013,29(4):604
SUN LF, SUN Q, MU CX, et al. Determination of seven components in honey by HPLC wavelength-shift method [J]. Chin J Public Health, 2013, 29(4): 604
- [6] 卢坤. HPLC 法同时检测蜂蜜中 5 类抗生素残留的研究[D]. 无锡:江南大学,2012
LU K. Simultaneous Determination of 5 Classes of Antibiotics Residues in Honey Using High Performance Liquid Chromatography [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012
- [7] 何强,孔祥虹,李建华,等,超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中硝基咪唑类、磺胺类、喹诺酮类兽药残留[J]. 分析试验室,2010,29(8):61
HE Q, KONG XH, LI JH, et al. Simultaneous determination of nitroimidazoles, sulfonamides and quinolones residues in honey by

- ultra performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection [J]. *Chin J Anal Lab*, 2010, 29(8): 61
- [8] KRIVOHAVEK A, ŽUNTAR I, IVEŠIĆ M. Food safety is an important public health issue: chloramphenicol residues determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in honey [J]. *Psychiatr Danub*, 2014, 26(Suppl 3): 537
- [9] CHUA LS, RAHAMAN NL, ADNAN NA, *et al.* Antioxidant activity of three honey samples in relation to their biochemical components [J]. *J Anal Methods Chem*, 2013, 2013: 313798. doi: 10.1155/2013/313798
- [10] SCHIEVANO E, MORELATO E, FACCHIN C, *et al.* Characterization of markers of botanical origin and other compounds extracted from unifloral honeys [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(8): 1747
- [11] TRUCHADO P, FERRERES F, BORTOLOTTI L, *et al.* Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of *Acacia* (*Robinia pseudoacacia*) Honey [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(19): 8815
- [12] 李成斌, 林瑜, 邓国宾, 等. 八种蜂蜜挥发性成分分析 [J]. *精细化工*, 2006, 23(11): 1082
LI CB, LIN Y, DENG GB, *et al.* Analysis of the volatile components of eight kinds of honey by GC-MS [J]. *Fine Chem*, 2006, 23(11): 1082
- [13] 裴高璞, 史波林, 赵镭, 等. 3种蜜源蜂蜜香气成分差异化信息分析研究 [J]. *食品科技*, 2014, 39(2): 68
PEI GP, SHI BL, ZHAO L, *et al.* The research of the analysis of the differentiation information of three nectar source honey aroma ingredients [J]. *Food Sci Technol*, 2014, 39(2): 68
- [14] JERKOVIĆ I, MASTELIĆ J, MARIJANOVIĆ Z, *et al.* Comparison of hydrodistillation and ultrasonic solvent extraction for the isolation of volatile compounds from two unifloral honeys of *Robinia pseudoacacia* L. and *Castanea sativa* L. [J]. *Ultrason Sonochem*, 2007, 14(6): 750
- [15] ARONNE G, GIOVANETTI M, SACCHI R, *et al.* From flower to honey bouquet: possible markers for the botanical origin of robinia honey [J]. *Sci World J*, 2014, 2014: 547275. doi: 10.1155/2014/547275
- [16] 姜川, 陈俊, 卢光英, 等. 一种洋槐蜜红外指纹图谱的构建方法及其应用 [J]. *丽水学院学报*, 2015, 37(2): 52
JIANG C, CHEN J, LU GY, *et al.* The IR fingerprints of *Robinia* honey: a constructing method and its application [J]. *J Lishui Univ*, 2015, 37(2): 52
- [17] 雷鸣. 六种单花种蜂蜜掺假情况的分析检测研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013
LEI M. Analysis and Detection of Six Kinds of Monofloral Honey Adulteration [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013
- [18] MARTOS I, COSSENTIMI M, FERRERES F, *et al.* Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45(8): 2824
- [19] MARTOS I, FERRERES F, TOMÁS-BARBERÁN FA. Identification of flavonoid markers for the botanical origin of *Eucalyptus* honey [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(5): 1498
- [20] 李艳艳, 初正云, 翟延君, 等. 刺槐花总黄酮提取工艺研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(5): 87
LI YY, CHU ZY, ZHAI YJ, *et al.* Preparation technique of total flavone of *Robinia pseudoacacia* [J]. *J Liaoning Univ TCM*, 2011, 13(5): 87
- [21] 王笑笑, 周勇, 俞婷婷, 等. UPLC-MS/MS 法分析 10 种不同蜜源蜂蜜中的黄酮类组分 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(12): 2183
WANG XX, ZHOU Y, YU TT, *et al.* Flavonoids components analysis of ten different nectar honeys by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(12): 2183
- [22] ESCRICHE I, KADAR M, JUAN-BORRÁS M, *et al.* Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys [J]. *Food Res Int*, 2011, 44(5): 1504
- [23] YAO LH, JIANG YM, SINGANUSONG R, *et al.* Phenolic acids in Australian Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication [J]. *Food Res Int*, 2005, 38(6): 651
- [24] 单鸣秋, 钱雯, 高静, 等. UPLC-MS 分析侧柏叶中黄酮类化合物 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(12): 1626
SHAN MQ, QIAN W, GAO J, *et al.* Analysis of flavonoids in *Platycladi Cacumen* by UPLC-MS [J]. *China J Chin Mater Med*, 2011, 36(12): 1626
- [25] TOMÁS-BARBERÁN F, FERRERES F, TOMÁS-LORENTE F, *et al.* Flavonoids from *Apis mellifera* beeswax [J]. *Z Naturforsch*, 1993, 48C: 68
- [26] 郑永芹, 初正云, 王添敏, 等. 不同采收期刺槐花中刺槐苷和鼠李糖刺槐苷的测定 [J]. *中成药*, 2012, 34(11): 2190
ZHENG YQ, CHU ZY, WANG TM, *et al.* Determination of robinin and rhamnorobinin in *Robinia pseudoacacia* L. in different picking times [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2012, 34(11): 2190
- [27] TOMÁS-BARBERÁN FA, MARTOS I, FERRERES F, *et al.* HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys [J]. *J Sci Food Agric*, 2001, 81(5): 485

(本文于 2016 年 6 月 19 日收到)