

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241212001

引用格式: 汪玥, 杜一男, 路运才, 等. 柑橘蜜中特征性成分鉴定及真实性评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(6): 298-308.

WANG Y, DU YN, LU YC, et al. Identification of characteristic components and authenticity evaluation of *Citrus reticulata* Blanco honey [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(6): 298-308. (in Chinese with English abstract).

## 柑橘蜜中特征性成分鉴定及真实性评价

汪玥<sup>1,2</sup>, 杜一男<sup>2</sup>, 路运才<sup>1</sup>, 张红城<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江大学现代农业与生态环境学院, 哈尔滨 150080; 2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

**摘要:** **目的** 建立一种有效的评价柑橘蜂蜜真实性的方法。**方法** 本研究采用高效液相色谱-串联质谱法 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 对柑橘蜜中的植物化合物进行定性和定量分析, 通过将特征性成分和 HPLC 指纹图谱结合, 对市售的柑橘蜜真实性进行评价。**结果** 在柑橘蜜中鉴定出 6 个成分, 包括咖啡因、顺,反脱落酸、5-甲氧基短叶松素、松属素、山奈酚以及柯因, 其中咖啡因的含量较高, 平均含量为 9.45 mg/kg, 因此, 将咖啡因作为柑橘蜜的特征性成分。对市售的 6 个柑橘蜜进行真实性评价, 其中有 4 个品牌的柑橘蜜品质卓越, 一个品牌的柑橘蜜中可能掺杂了其他成分, 一个品牌的柑橘蜜可能不是真正的柑橘蜜。**结论** 该研究提出了一种通过特征性成分与 HPLC 指纹图谱相结合的方法, 用于评价柑橘蜜的真实性, 为柑橘蜜分等分级、提高附加值提供理论依据。

**关键词:** 柑橘蜜; 特征性成分; 指纹图谱

### Identification of characteristic components and authenticity evaluation of *Citrus reticulata* Blanco honey

WANG Yue<sup>1,2</sup>, DU Yi-Nan<sup>2</sup>, LU Yun-Cai<sup>1</sup>, ZHANG Hong-Cheng<sup>2\*</sup>

(1. College of Advanced Agriculture and Ecological Environment, Heilongjiang University, Harbin 150080, China;  
2. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an efficient method for assessing the authenticity of *Citrus reticulata* Blanco honey. **Methods** High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was utilized for the qualitative and quantitative analysis of plant compounds present in *Citrus reticulata* Blanco honey. The authenticity of commercially available *Citrus reticulata* Blanco honey was evaluated by integrating characteristic components with HPLC fingerprints. **Results** A total of 6 kinds of components were identified in *Citrus reticulata* Blanco honey, namely caffeine, *cis,trans*-abscisic acid, 5-methoxybrevosin, pinocembrin, kaempferol and chrysin. Caffeine exhibited a relatively high concentration, with an average content of 9.45 mg/kg. Thus, it was regarded as a characteristic component of *Citrus reticulata* Blanco honey. The authenticity assessment of 6 kinds of *Citrus reticulata* Blanco honeys available on the market revealed that 4 brands exhibited superior quality, one brand might

收稿日期: 2024-12-12

基金项目: 中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2015 IAR)

第一作者: 汪玥(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为天然产物分析。E-mail: 1636546822@qq.com

\*通信作者: 张红城(1967—), 男, 研究员, 主要研究方向为功能食品与生物活性物质、食品生物技术。E-mail: zhanghongcheng@caas.cn

be adulterated with other components, and one brand could potentially be counterfeit *Citrus reticulata* Blanco honey.

**Conclusion** This study presents a novel methodology that synergistically combines characteristic component profiling with HPLC-fingerprinting technology for authenticity assessment of *Citrus reticulata* Blanco honey. This study provides a theoretical foundation for grading *Citrus reticulata* Blanco honey and enhancing its added value.

**KEY WORDS:** *Citrus reticulata* Blanco honey; characteristic components; fingerprint

## 0 引言

蜂蜜是指蜜蜂采集植物花蜜或植物活体分泌物或在植物活体上吮吸蜜源的昆虫的排泄物等生产的天然甜味物质,经蜜蜂采集、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<sup>[1]</sup>。蜂蜜成分复杂,除主要成分糖类外,蜂蜜还含有少量蛋白质、有机酸、维生素、矿物质和一些植物化合物,如黄酮、酚酸、萜类、生物碱等<sup>[2]</sup>。蜂蜜中含有的植物化合物在成分组成和含量上均具有明显的差异性,这种差异性主要受到蜂蜜的种类、蜜源植物生长的地理条件(如气候、光照、土壤)等影响<sup>[3]</sup>。蜂蜜中的这些成分赋予了蜂蜜多种功能活性<sup>[4]</sup>,如抗氧化、抗炎、抗菌、调节胃肠道、促进伤口愈合等<sup>[5-6]</sup>。但蜂蜜是目前市场上掺假率最高的食品之一<sup>[7-8]</sup>,单花蜜常常面临掺假的风险,为了鉴别其真实性和纯度,需要采用恰当的生物学手段<sup>[9]</sup>。多酚化合物的含量与蜂蜜植物源之间存在着明显的相关性<sup>[10-11]</sup>,因此科研人员对各种多酚化合物作为蜂蜜植物来源的特征性标记物展开了相关研究<sup>[12]</sup>。例如,石南花蜜中发现的主要类黄酮有杨梅素、杨梅素 3-甲基醚、杨梅素 3'-甲基醚和三头曲素,它们被认为是石南花蜜植物来源的标记物<sup>[13]</sup>。红花蜂蜜中含有高浓度的丁香醛、核黄素、光黄素和光色素。因此,这 4 种化合物也被看作是红花蜂蜜的植物标志物<sup>[14]</sup>。

柑橘蜜是一种优质的单花蜜,是长江以南地区的特色蜂蜜之一,色泽通常为浅琥珀色,香气浓郁,口感甘甜<sup>[15]</sup>,深受消费者喜爱。其蜜源植物是芸香科柑橘属植物柑橘。柑橘蜜含有丰富的天然营养成分,具有多种生物活性,如调节胃肠道功能、促进伤口愈合等健康益处。近年来,已有国内外学者对不同产地的柑橘蜜展开了研究。王方莉等<sup>[16]</sup>采用固相微萃取-气相色谱-质谱法,对 4 种柑橘蜜中醇、烃、酮、醛、酯等挥发性成分进行定性与半定量分析,发现柠檬烯、反式和顺式氧化芳樟醇和柠檬醛是其特征性成分。TRUCHADO 等<sup>[17]</sup>采用液相色谱-质谱技术对柑橘蜜进行了采集和分析后,发现其含有橙皮苷、山奈酚-3-O-己糖(1→2)己糖苷等成分。

目前,埃及、西班牙、意大利等国的柑橘蜜已有相关研究,中国的柑橘蜜研究相对较少,但是我国作为一个柑橘种植大国,有种类繁多品质各异的柑橘蜂蜜,因此,迫切需要建立一套实用、高效的鉴别柑橘蜂蜜真实性的方法。

柑橘蜜成分复杂,主要包括葡萄糖、果糖、蔗糖、蛋白质、氨基酸、有机酸、维生素、矿物质等初级代谢产物,而本研究主要聚焦柑橘蜜的植物次级代谢产物,包括黄酮、酚酸、萜烯、生物碱等,运用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography)、高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)等方法挖掘柑橘蜜的特征性成分,对其进行仪器分析并绘制柑橘蜜的标准指纹图谱,此外还对市面上销售的柑橘蜜进行真实性评价,以期为柑橘蜜的品质控制和标准制定提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

21 个柑橘蜜样品(15 个原料蜜样品采自于湖南、浙江、福建,6 个柑橘商品蜜购自京东平台和线下超市)。

氨水(分析级,北京奥维森科技有限公司);甲醇(色谱纯)、乙酸(色谱纯)、乙酸(质谱纯)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);咖啡因、顺,反脱落酸、山奈酚、松属素、柯因(纯度 $\geq 95\%$ ,上海源叶生物科技有限公司);5-甲基基短叶松素(实验室制备)。

### 1.2 仪器与设备

AL104 电子分析天平(精度 0.01 g, 美国 Sartorius 公司); SevenEasyS20 型 pH 计(瑞士 Mettler 公司); ThermoSorvall 台式离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Strata™-X-A 33  $\mu\text{m}$  Polymeric Strong Anion SPE 固相萃取柱、Phenomenex Gemini® C<sub>18</sub> 110 Å 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$ )(美国 Phenomenex 公司); Milli-Q IQ7000 默克超纯水系统、0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜(德国 Merk Milipore 公司); SB-80DTD 全自动超声波清洗装置(昆山超声仪器有限公司); LC-6AD 型岛津高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); 安捷伦 6500 型 Q-TOF 液相质谱联用仪(美国 Agilent 公司); DN-24W 氮吹仪(上海达洛科学仪器有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 花粉孢子学分析方法

参照 GB/T 23194—2008《蜂蜜中植物花粉的测定方法》,在光学显微镜下观察并统计观察结果,每个样品随机选择 20 个视野进行统计,花源植物花粉孢子占比高于

45%时可以判定该蜂蜜为单花蜂蜜。

### 1.3.2 蜂蜜中植物化合物富集

参考本课题组乔江涛<sup>[18]</sup>的研究方法。

### 1.3.3 色谱条件

流动相 A: 超纯水, 含 2% 乙酸; 流动相 B: 甲醇, 含 2% 乙酸; 色谱柱: Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 3 μm); 柱温箱温度: 35 °C; 检测波长: 270 nm; 样品进样量: 20 μL; 总流速: 0.7 mL/min; 柑橘蜜的梯度洗脱程序为: 0~11 min, 9%~14% B; 11~17 min, 14%~15% B; 17~24 min, 15%~16% B; 24~28 min, 16%~17% B; 28~30 min, 17%~22% B; 30~38 min, 22%~25% B; 38~41 min, 25%~30% B; 41~55 min, 30%~33% B; 55~60 min, 33%~34% B; 60~70 min, 34%~36% B; 70~80 min, 36%~40% B; 80~90 min, 40%~45% B; 90~100 min, 45%~52% B; 100~110 min, 52%~57% B; 110~120 min, 57%~65% B; 120~130 min, 65%~70% B; 130~135 min, 70%~80% B。

### 1.3.4 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI), 离子源喷射电压为 4 kV, 出口电压 130 V, 加热温度 350 °C, 氮气流速 11 L/min, 碰撞气体为氦气, 雾化气流速为 80 kPa, 雾化器的压力 40 psi (1 psi= 6895 Pa), 质量扫描范围  $m/z$  为 100~900。

### 1.3.5 柑橘蜜中特征性成分定量分析

分别称取一定质量的咖啡因、顺,反脱落酸、5-甲氧基短叶松素、松属素、山奈酚、柯因。将其制成 10 mL 标准贮备液, 采用 5、10、15、20、25 μL 的上样量梯度进样, 标准品的上样量作为横坐标(X, ng), 峰面积为纵坐标(Y), 构建标准曲线。

### 1.3.6 HPLC 指纹图谱的建立

以柑橘蜜原料蜜为研究对象得到 HPLC 色谱图, 结合中药指纹图谱相似性评价系统(2004 A)进行相似度评估, 对 15 个样品的色谱峰进行多点校正, 以获得柑橘蜜的标准指纹图谱。

### 1.3.7 真实性评价方法

品质较好的柑橘蜜应同时满足以下两个指标: (1)柑橘蜜的 HPLC 色谱图应与标准指纹图谱吻合良好, 无明显的异常峰。这是鉴别柑橘蜜真实性的先决条件, 若出现了异常较大的色谱峰, 则推测该样品存在真实性问题; (2)柑橘蜜中特征性成分含量应不显著低于原料蜜样品中特征性成分含量范围下限。

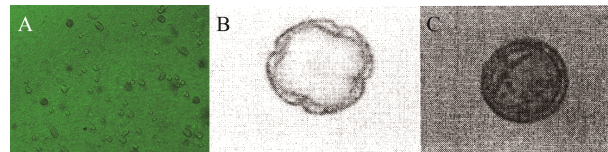
## 1.4 数据处理

采用 SPSS 26.0 软件对所得数据进行平均值和标准偏差分析, Mass Hunter 10.0 对质谱数据进行质谱分析, Chem Bio Draw Ultra10.4 对化合物进行结构式绘制, 采用中药指纹图谱相似性评价系统(2004 A)构建柑橘蜂蜜的指纹图谱, 并对其相似性分析。每个实验重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 柑橘蜜孢粉学分析

蜜蜂采集花蜜过程会将蜜源植物的花粉与花蜜一起带入蜂蜜中, 因此蜂蜜孢粉学分析方法可以实现单花种蜂蜜蜜源植物的溯源鉴别。本研究采用光学显微镜方法, 对柑橘蜜的花粉孢子进行鉴别分析, 如图 1 所示。



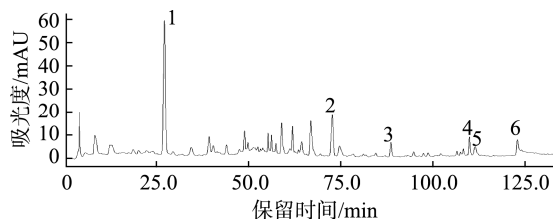
注: A. 本研究柑橘蜜样品中植物花粉光学显微镜图片; B 和 C. GB/T 23194—2008 附录 A 中柑橘蜜植物花粉形态的图片。

图 1 柑橘蜜花粉孢子图

Fig.1 Spore map of *Citrus reticulata* Blanco honey pollen

### 2.2 柑橘蜜中特征性成分鉴定

柑橘蜜的 HPLC 分析结果如图 2 所示。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, 确定柑橘蜜中包含咖啡因、顺,反脱落酸、5-甲氧基短叶松素、山奈酚、松属素和柯因 6 种化合物。



注: 1. 咖啡因; 2. 顺,反脱落酸; 3. 5-甲氧基短叶松素; 4. 山奈酚; 5. 松属素; 6. 柯因, 图 13~15 同。

图 2 柑橘蜜样品的 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of *Citrus reticulata* Blanco honey sample

#### 2.2.1 咖啡因的鉴定

在对柑橘蜜进行 HPLC 分析时, 观察到化合物 1 的色谱峰显著突出。正、负离子双模式下检测的化合物 1 的质谱图见图 3。如图 3 所展示的数据, 可以观察到在正离子模式下存在  $m/z$  195.0805  $[M+H]^+$  的准分子离子峰。在负离子模式下存在  $m/z$  387.1665  $[2M-H]^-$  的离子峰。因此, 可以推断出化合物 1 的相对分子质量为 194。此外, 通过不饱和度  $\Omega$ (环加双键值)的计算, 可以得知该化合物含有 6 个不饱和的碳原子, 确认其分子式为  $C_8H_{10}N_4O_2$ 。

通过对准分子离子峰  $m/z$  195.0805  $[M+H]^+$  的二级特征离子的分析, 结合化合物的最大紫外吸收波长, 最终通过标准品验证确定了该化合物正是咖啡因, 其质谱裂解途径如图 4。

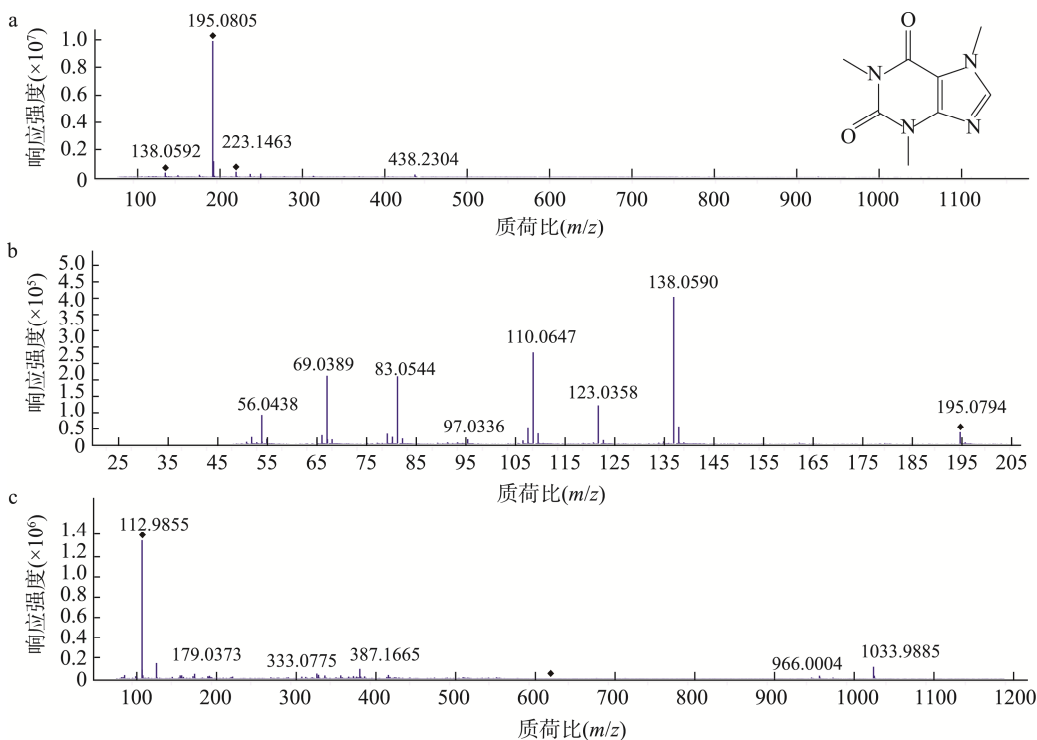
#### 2.2.2 顺,反脱落酸的鉴定

图 5 是化合物 2 在正、负离子双模式下的质谱图, 它存在准分子离子峰  $m/z$  265.1370  $[M+H]^+$ 、 $m/z$  263.1304

[M-H] 和  $m/z$  529.2739 [2M+H]<sup>+</sup>。由此, 推断化合物 2 的相对分子质量为 264。通过研究该化合物的保留时间以及最大紫外吸收波长, 同时结合二级质谱断裂模式的信息, 推断出该化合物的化学键性质, 并查阅大量相关文献[19], 包括化学文献、生物活性数据集以及分子结构数据库, 最终通过标准品验证, 确定该化合物为顺, 反脱落酸。

### 2.2.3 5-甲氧基短叶松素的鉴定

图 6 是化合物 3 在正离子和负离子两种模式下的质谱图。化合物 3 存在准分子离子峰  $m/z$  287.0912 [M+H]<sup>+</sup> 和  $m/z$  285.0778 [M-H]<sup>-</sup>。由此, 推断化合物 3 的相对分子质量为 286。通过研究该化合物的保留时间以及最大紫外吸收波长, 同时结合二级质谱断裂模式的信息(图 7), 推断出



注: a. 化合物 1 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图; b. 化合物 1 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图; c. 化合物 1 在负离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图。

图 3 化合物 1 进行质谱分析时所产生的质谱图  
Fig.3 Mass spectra of compound 1 for mass spectrometry

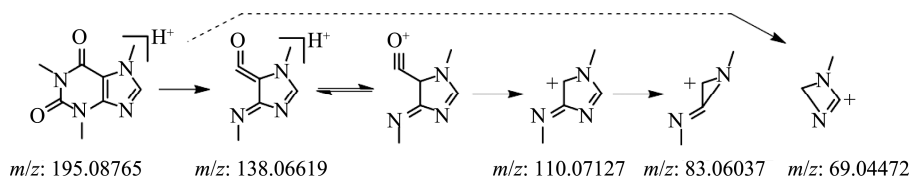
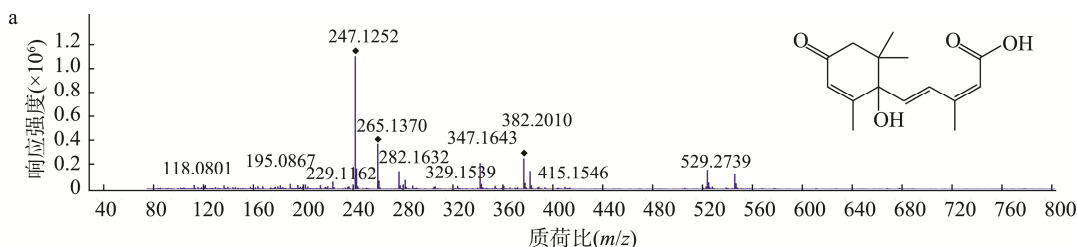


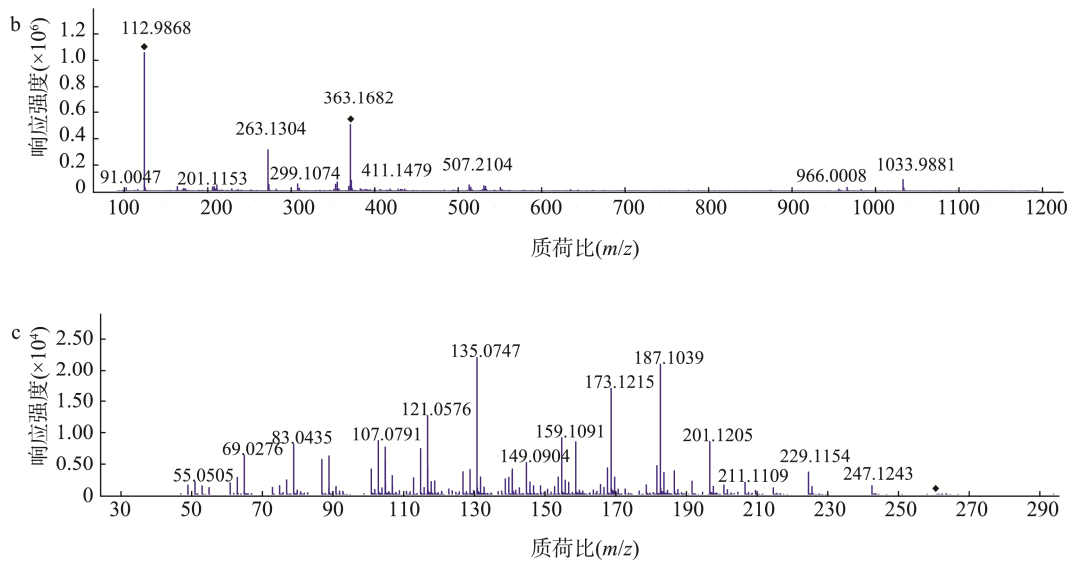
图 4 化合物 1 在 HPLC-MS/MS (ESI+) 正离子模式下的裂解途径

Fig.4 Cleavage pathway of compound 1 in HPLC-MS/MS (ESI+) cationic mode



注: a. 化合物 2 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图; b. 化合物 2 在负离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图; c. 化合物 2 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图。

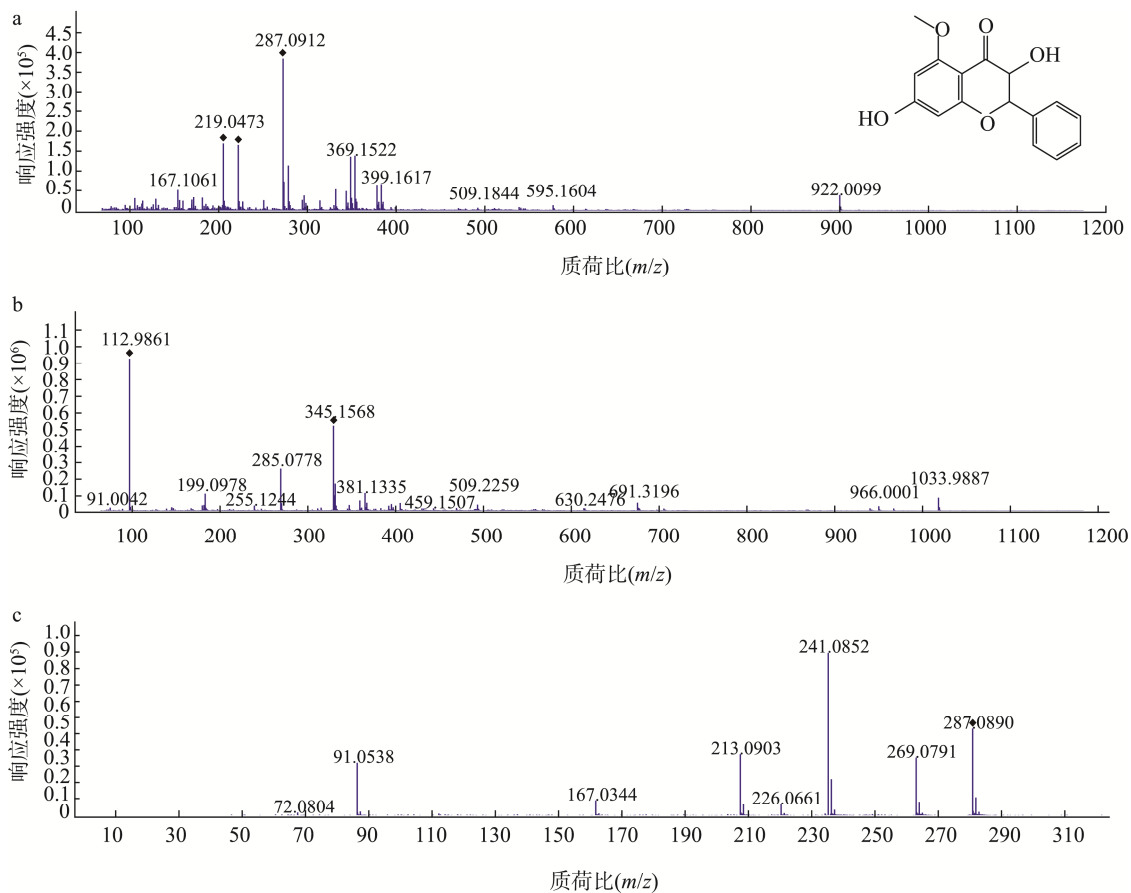
图 5 化合物 2 进行质谱分析时所产生的质谱图  
Fig.5 Mass spectra of compound 2 for mass spectrometry



注: a. 化合物 2 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图及顺,反脱落酸的结构式; b. 化合物 2 在负离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图; c. 化合物 2 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图。

图 5(续) 化合物 2 进行质谱分析时所产生的质谱图

Fig.5 Mass spectra of compound 2 for mass spectrometry



注: a. 化合物 3 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图及 5-甲氧基短叶松素的结构式; b. 化合物 3 在负离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图; c. 化合物 3 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图。

图 6 化合物 3 进行质谱分析时产生的质谱图

Fig.6 Mass spectra of compound 3 for mass spectrometry

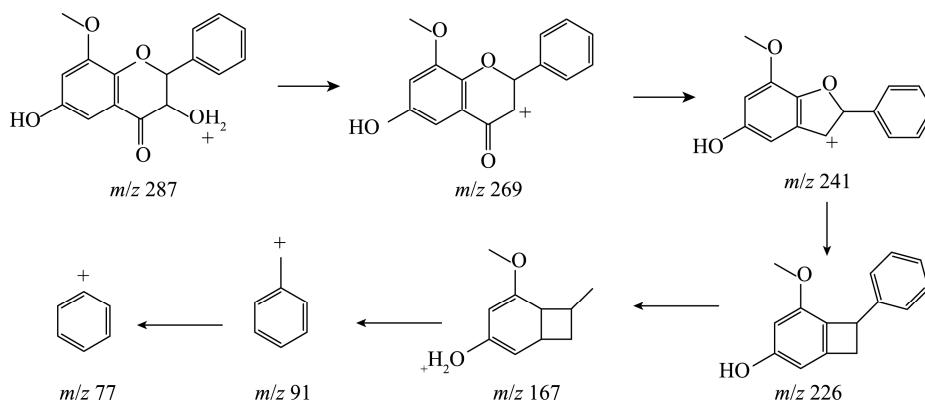


图 7 化合物 3 在 HPLC-MS/MS (ESI+) 正离子模式下的裂解途径

Fig.7 Cleavage pathway of compound 3 in HPLC-MS/MS (ESI+) cationic mode

该化合物的化学键性质, 并查阅大量相关文献[20], 包括化学文献、生物活性数据集以及分子结构数据库, 最终通过标准品验证, 确定该化合物为 5-甲氧基短叶松素。

#### 2.2.4 山奈酚的鉴定

图 8 是化合物 4 在正离子和负离子两种模式下的质谱图。该化合物存在准分子离子峰  $m/z$  287.0545  $[M+H]^+$  和  $m/z$  285.0414  $[M-H]^-$ , 由此, 推断化合物 4 的相对分子质量为 286。通过研究该化合物的保留时间以及最大紫外吸收波长, 同时结合二级质谱断裂模式的信息, 推断出该化合物的化学键性质, 并查阅大量相关文献[21], 包括化学文献、生物活性数据集以及分子结构数据库, 最终通过标准品验证, 确定该化合物为山奈酚。

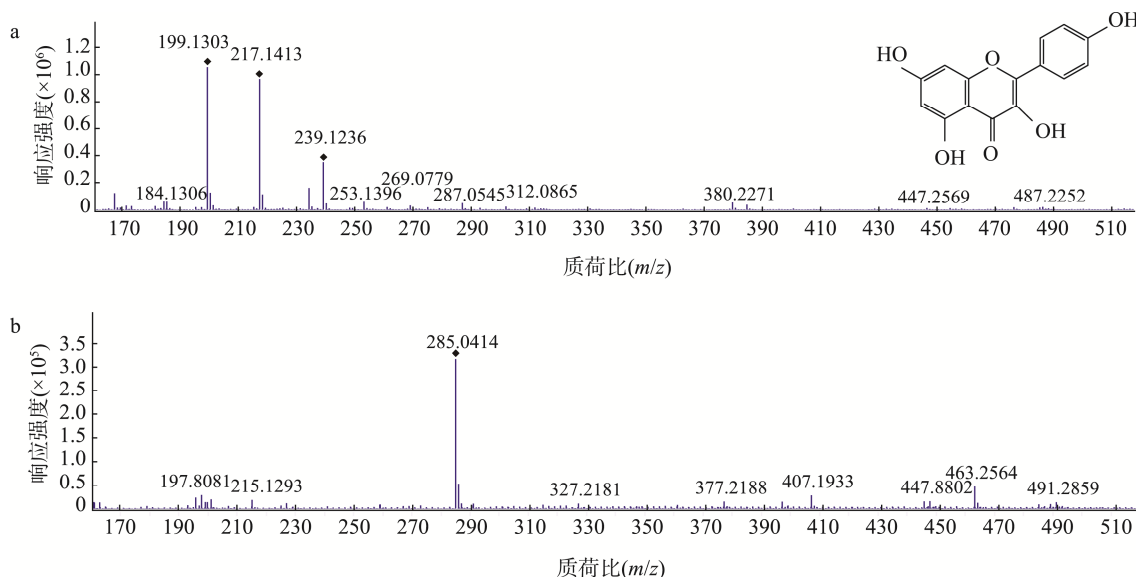
#### 2.2.5 松属素的鉴定

图 9 是化合物 5 在正、负离子双模式下的质谱图。

如图 9 所示, 化合物 5 存在准分子离子峰  $m/z$  257.0734  $[M+H]^+$  和  $m/z$  255.0636  $[M-H]^-$ , 由此, 推断化合物 5 的相对分子质量为 256。通过研究该化合物的保留时间以及最大紫外吸收波长, 同时结合二级质谱断裂模式的信息(图 10), 推断出该化合物的化学键性质, 并查阅大量相关文献[22], 包括化学文献、生物活性数据集以及分子结构数据库, 最终通过标准品验证, 确定该化合物为松属素。

#### 2.2.6 柯因的鉴定

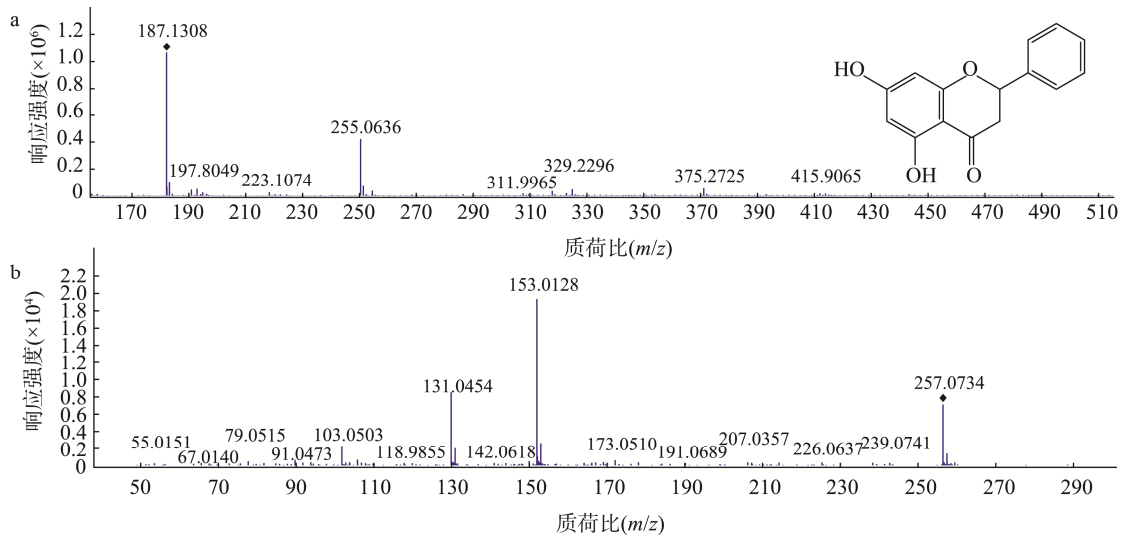
图 11 是化合物 6 在使用正、负离子双模式下的质谱图。化合物 6 存在准分子离子峰  $m/z$  255.0612  $[M+H]^+$  和  $m/z$  253.0523  $[M-H]^-$ 。由此, 推断化合物 6 的相对分子质量为 254。通过研究该化合物的保留时间以及最大紫外吸收波长, 同时结合二级质谱断裂模式的信息(图 12), 推断出该化合物的化学键性质, 并查阅大量相关文献[23], 包括



注: a. 化合物 4 在正离子模式进行质谱分析时所产生的的一级质谱图及山奈酚的结构式; b. 化合物 4 在负离子模式进行质谱分析时所产生的的一级质谱图。

图 8 化合物 4 进行质谱分析时所产生的质谱图

Fig.8 Mass spectra of compound 4 for mass spectrometry



注: a. 化合物 5 在负离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图及松属素的结构式; b. 化合物 5 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图。

图 9 化合物 5 进行质谱分析时所产生的质谱图  
Fig.9 Mass spectra of compound 5 for mass spectrometry

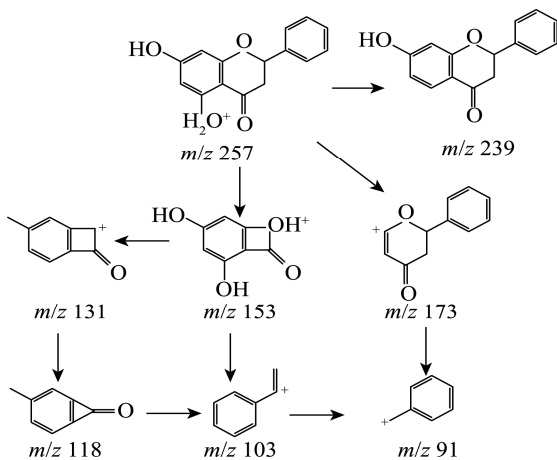
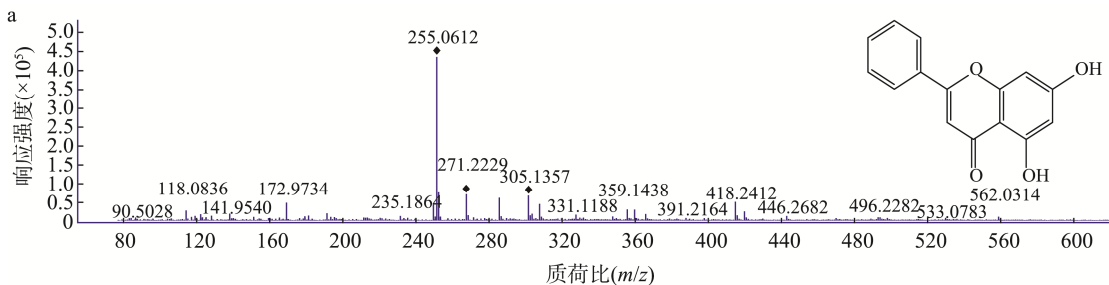


图 10 化合物 5 在 HPLC-MS/MS (ESI+) 正离子模式下的裂解途径  
Fig.10 Cleavage pathway of compound 5 in HPLC-MS/MS (ESI+) cationic mode

化学文献、生物活性数据集以及分子结构数据库, 最终通过标准品验证, 确定该化合物为柯因。

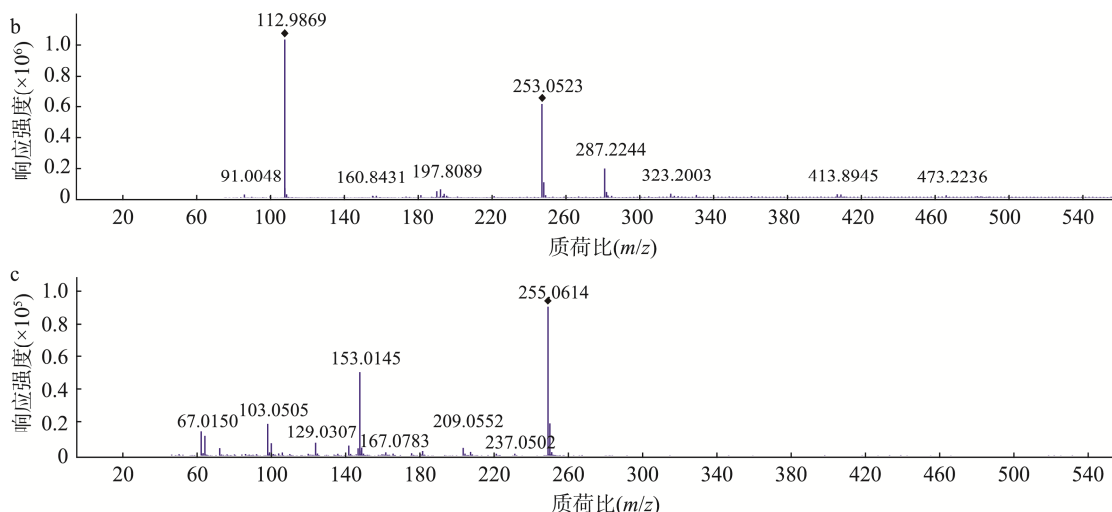
### 2.3 柑橘蜜成分定量分析

对 15 个不同产地的柑橘原料蜜中的化合物成分运用高效液相色谱-二极管阵列检测器法 (high performance liquid chromatography photo-diode array, HPLC-PDA) 进行定量研究, 其含量可根据标准曲线计算得出。结果如表 1 所示, 15 个样品中都检出了上述 6 种化学成分, 咖啡因占比最多, 其含量变化范围为: 4.40~16.72 mg/kg, 平均值为 (9.45±0.25) mg/kg。其次是顺,反脱落酸, 含量范围在 0.12~1.58 mg/kg, 平均值为 (0.65±0.05) mg/kg。此外, 5-甲氧基短叶松素、山奈酚、松属素、柯因的平均含量分别为 (0.63±0.23)、(0.14±0.07)、(0.16±0.08)、(0.52±0.09) mg/kg。



注: a. 化合物 6 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图及柯因的结构式; b. 化合物 6 在负离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图; c. 化合物 6 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图。

图 11 化合物 6 进行质谱分析时所产生的质谱图  
Fig.11 Mass spectra of compound 6 for mass spectrometry



注: a. 化合物 6 在正离子模式进行质谱分析时所产生的一级质谱图及柯因的结构式; b. 化合物 6 在负离子模式进行质谱分析时所产生的一级质谱图; c. 化合物 6 在正离子模式进行质谱分析时所产生的二级质谱图。

图 11(续) 化合物 6 进行质谱分析时所产生的质谱图

Fig.11 Mass spectra of compound 6 for mass spectrometry

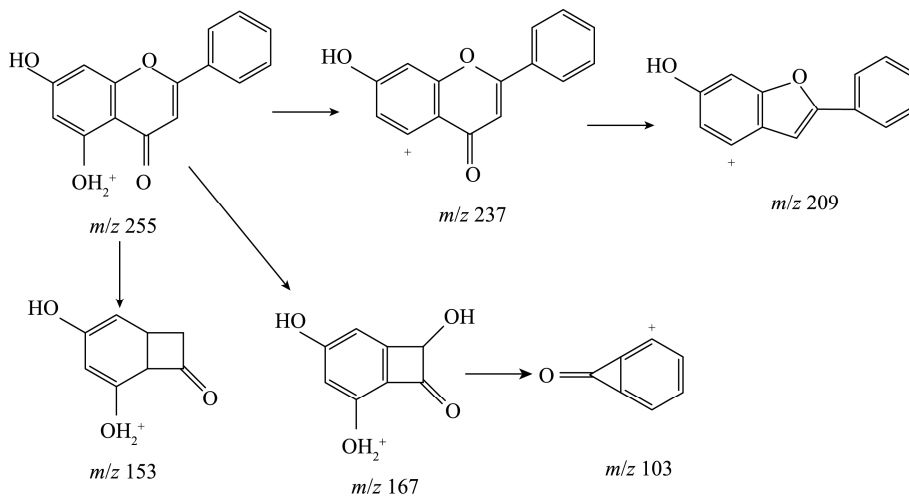


图 12 化合物 6 在 HPLC-MS/MS (ESI+) 正离子模式下的裂解途径

Fig.12 Cleavage pathway of compound 6 in HPLC-MS/MS (ESI+) cationic mode

表 1 柑橘原料蜜中的化合物含量(mg/kg)

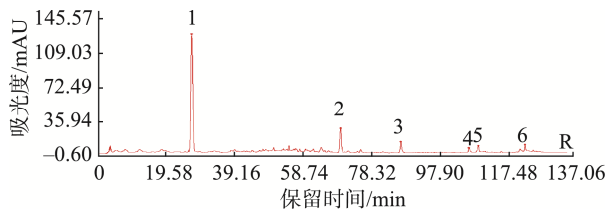
Table 1 Compounds content in *Citrus reticulata* Blanco raw honey (mg/kg)

样品	咖啡因	顺,反脱落酸	5-甲氧基短叶松素	山奈酚	松属素	柯因
S1	12.43±0.15	0.83±0.15	0.47±0.18	0.11±0.10	0.11±0.22	0.54±0.12
S2	9.72±0.18	0.66±0.10	0.63±0.25	0.16±0.10	0.18±0.10	0.69±0.12
S3	4.40±0.10	0.12±0.18	0.38±0.15	0.07±0.10	0.21±0.12	0.36±0.18
S4	5.77±0.18	0.13±0.25	0.36±0.10	0.04±0.15	0.08±0.12	0.37±0.15
S5	16.72±0.25	0.43±0.15	1.21±0.22	0.26±0.25	0.11±0.18	0.56±0.18
S6	11.52±0.05	1.26±0.18	0.51±0.15	0.17±0.12	0.13±0.18	0.55±0.13
S7	5.86±0.15	0.58±0.18	0.55±0.18	0.13±0.18	0.27±0.18	0.56±0.18
S8	12.57±0.22	0.25±0.18	1.02±0.10	0.32±0.15	0.31±0.12	0.68±0.10
S9	12.12±0.15	0.33±0.10	0.89±0.25	0.08±0.13	0.10±0.18	0.56±0.10
S10	8.86±0.22	1.58±0.22	0.48±0.15	0.22±0.15	0.32±0.13	0.52±0.25
S11	9.15±0.12	0.27±0.21	0.51±0.05	0.12±0.03	0.09±0.12	0.41±0.11
S12	5.26±0.33	0.35±0.13	0.72±0.12	0.15±0.05	0.11±0.03	0.52±0.22
S13	6.85±0.22	1.01±0.15	0.41±0.09	0.14±0.05	0.15±0.10	0.38±0.15
S14	10.56±0.18	1.33±0.21	0.39±0.15	0.16±0.07	0.22±0.02	0.45±0.11
S15	9.89±0.09	0.61±0.13	0.56±0.12	0.21±0.11	0.17±0.05	0.59±0.15

注: S1~S15 为柑橘原料蜜样品编号。

## 2.4 柑橘蜜 HPLC 指纹图谱建立

将上述所提到的 15 个柑橘蜜的 HPLC 图与中药色谱指纹图谱相似度评价系统相结合,以评估它们之间的相似度,同时生成柑橘蜜的 HPLC 标准指纹图谱。对其相似度进行分析,结果显示其相似度在 0.879~0.999 范围内,该结果表明这 15 个柑橘原料蜜的 HPLC 色谱图整体较为一致。图 13 是分析过程中得到的柑橘蜜的标准指纹图谱,图 14 是由这 15 个柑橘蜜样品生成的指纹图谱。



注: R. 标准指纹图谱,图 14 同。

图 13 柑橘蜜的标准指纹图谱

Fig.13 Standard fingerprint of *Citrus reticulata* Blanco honey

## 2.5 市售柑橘蜜的真实性评价

在完成柑橘蜜 HPLC 标准指纹图谱之后,将其应用于市场上销售的 6 种柑橘蜜的真实性评价。图 15 为这 6 种柑

橘商品蜜的 HPLC 色谱图,可以看到品牌 A、B、C、D 的色谱图与标准指纹图谱大致相同,柑橘蜜特有的成分咖啡因都存在且含量较高(表 2),由此可以得出这 4 种品牌的商品蜜是柑橘蜜。品牌 E 中也存在柑橘蜜的特征性成分咖啡因,但其含量较低,且色谱图与柑橘蜜的标准指纹图谱出入较大,因此,判断品牌 E 的柑橘蜜有可能混入了其他种类的蜂蜜。品牌 F 中没有检出柑橘蜜特有的成分咖啡因,且存在含量较高的异常峰,与标准指纹图谱存在明显差异,由此可以得出该品牌的商品蜜不是柑橘蜜。

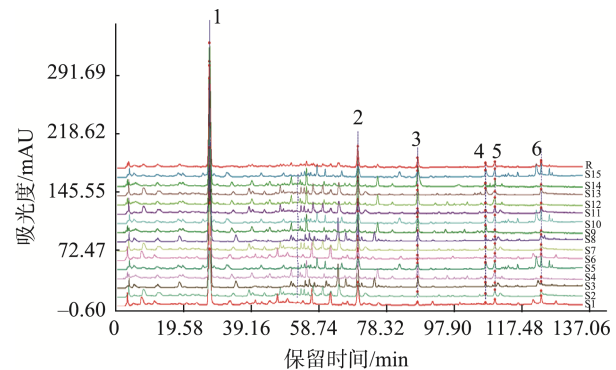


图 14 柑橘原料蜜样品的指纹图谱

Fig.14 Fingerprint of *Citrus reticulata* Blanco raw honey sample

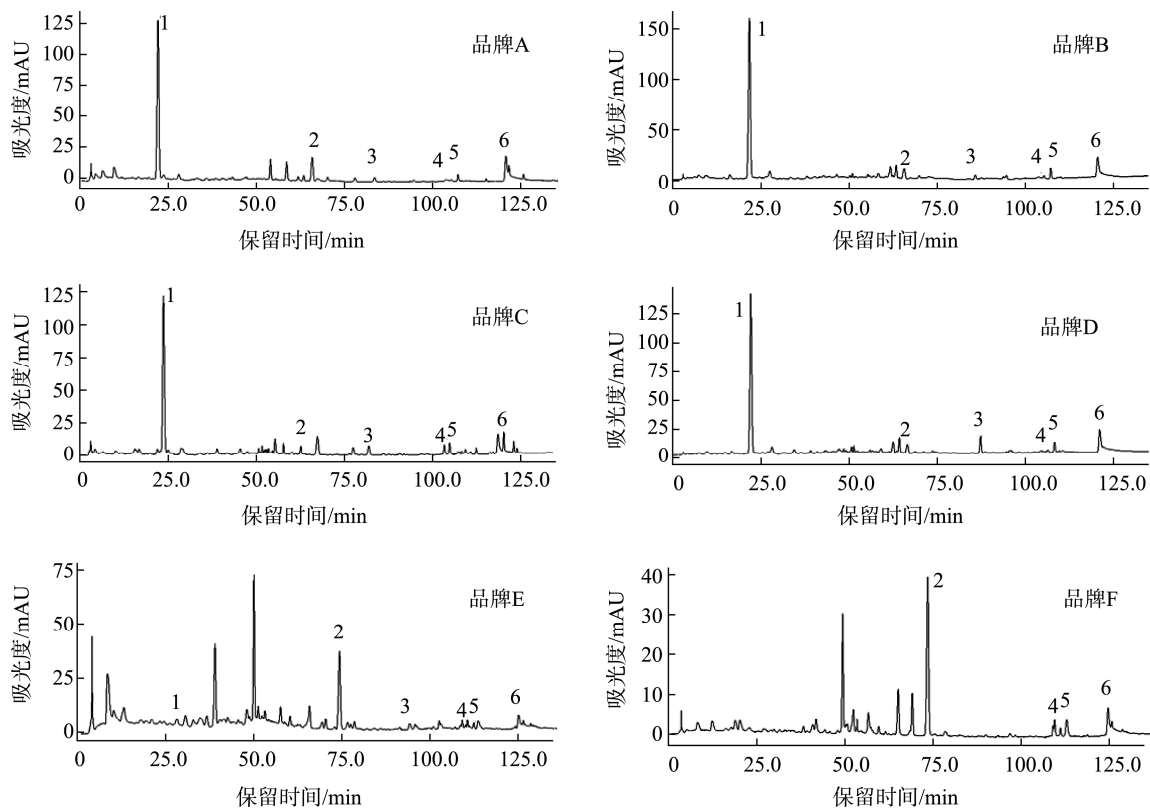


图 15 柑橘商品蜜 HPLC 色图谱

Fig.15 HPLC chromatogram of *Citrus reticulata* Blanco commercial honey

表2 柑橘商品蜜中化合物含量(mg/kg)  
Table 2 Compounds content in *Citrus reticulata* Blanco commercial honey (mg/kg)

化合物	A	B	C	D	E	F
咖啡因	10.29±0.12	12.61±0.08	9.72±0.22	10.98±0.21	1.95±0.11	0
顺,反脱落酸	0.65±0.15	0.32±0.13	0.06±0.12	0.19±0.22	1.42±0.13	1.57±0.25
5-甲氧基短叶松素	0.48±0.10	0.48±0.15	0.73±0.15	0.94±0.18	0.46±0.21	0
山奈酚	0.03±0.07	0.08±0.22	0.14±0.08	0.05±0.15	0.06±0.15	0.07±0.12
松属素	0.20±0.18	0.33±0.08	0.31±0.21	0.34±0.13	0.27±0.10	0.25±0.18
柯因	1.18±0.13	1.70±0.18	1.02±0.15	1.24±0.24	0.52±0.15	0.57±0.13

### 3 结 论

本研究通过 HPLC-MS/MS 对柑橘蜜中的特征性成分进行分析和鉴定,在柑橘蜜中同时检测到一种生物碱(咖啡因)、一种萜烯(顺,反脱落酸)、4 种黄酮(5-甲氧基短叶松素、山奈酚、松属素、柯因),其中咖啡因的含量较高,平均含量为 9.45 mg/kg,因此,将咖啡因作为柑橘蜜的特征性成分。本研究与 WANG 等<sup>[24]</sup>的结果一致。咖啡因是一种黄嘌呤类生物碱,主要存在于咖啡豆<sup>[25-26]</sup>和茶叶<sup>[27]</sup>中。对人类而言,咖啡因能提神醒脑、抗忧郁等功效。对蜜蜂而言,咖啡因对蜜蜂的免疫系统具有边际增强作用<sup>[28-29]</sup>,还可以改善蜜蜂的记忆<sup>[30]</sup>,因此,与苦味的咖啡相比,含有咖啡因的甜味的柑橘蜜作为一款具有提神醒脑的饮品,会更容易被大众所接受。总的来说,本研究通过中药指纹图谱相似度评价系统,建立了柑橘蜜的标准指纹图谱,提出了一种通过特征性成分与 HPLC 指纹图谱相结合的方法,用于评价柑橘蜜的真实性,为柑橘蜜分等分级、提高附加值提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 陈黎红, 陈亮, 王建梅. 国际蜂联(APIMONDIA)针对伪劣蜂蜜的声明[J]. 中国蜂业, 2019, 70(4): 11-14.  
CHEN LH, CHEN L, WANG JM. Statement of the International Bee Federation (APIMONDIA) on fake and inferior honey [J]. Apiculture of China, 2019, 70(4): 11-14.
- [2] GOŚLIŃSKI M, NOWAK D, SZWENGIEL A. Multidimensional comparative analysis of bioactive phenolic compounds of honeys of various origin [J]. Antioxidants, 2021, 10(4): 530.
- [3] ATROUSE OM, ORAN SA, AL-ABBADI SY. Chemical analysis and identification of pollen grains from different jordanian honey samples [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2004, 39(4): 413-417.
- [4] 谭洪波, 王光新, 张红城, 等. 蜂蜜的营养成分及其功能活性研究进展[J]. 蜜蜂杂志, 2016, 36(7): 12-15.  
TAN HB, WANG GX, ZHANG HC, et al. Research progress on nutritional components and functional activities of honey [J]. Journal of Bee, 2016, 36(7): 12-15.
- [5] 张敏, 黄京平, 赵文, 等. 不同蜂蜜抗氧化活性和抑制酪氨酸酶活性的比较[J]. 现代食品科技, 2023, 39(1): 113-119.  
ZHANG M, HUANG JP, ZHAO W, et al. Comparison of antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity of different honey [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 39(1): 113-119.
- [6] 曾颖, 陈胜, 马振刚. 蜂蜜中活性物质种类及功效[J]. 蜜蜂杂志, 2023, 43(5): 1-5.  
ZENG Y, CHEN S, MA ZG. Types and effects of active substances in honey [J]. Journal of Bee, 2019, 43(5): 1-5.
- [7] 李梦璐, 张社梅. 媒体负面报道对蜂蜜消费预期变动的影响[J]. 浙江农业学报, 2020, 32(12): 9-10.  
LI ML, ZHANG SM. Impact of media negative coverage of honey consumption expectations [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2020, 32(12): 9-10.
- [8] CHUA LS, HAMZAH N. Comparing the physiochemical properties of natural, synthetic and adulterated honeys [J]. Longhua Chinese Medicine, 2020, 3(8): 1-7.
- [9] WANG J, QING XL. Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins [J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2011, 62(1): 89-137.
- [10] 常丹, 周梦遥, 徐瑞哈, 等. 蜂蜜抗氧化成分的研究进展[J]. 中国蜂业, 2010, 61(11): 38-40.  
CHANG D, ZHOU MY, XU RH, et al. Research progress of antioxidant components in honey [J]. Apiculture of China, 2010, 61(11): 38-40.
- [11] 袁琛凯, 杨俊, 石敏, 等. 基于指标成分指纹图谱技术结合 LC-MS 的蜂蜜质量分析[J]. 粮食与食品工业, 2022, 29(2): 68-72.  
YUAN CK, YANG J, SHI M, et al. Analysis of honey quality based on index component fingerprint technology combined with LC-MS [J]. Grain and Food Industry, 2022, 29(2): 68-72.
- [12] GAŠIĆ UM, MILOJKOVIĆ-OPSENICA DM, TEŠIĆ ZL. Polyphenols as possible markers of botanical origin of honey [J]. Aoac International, 2017, 100(4): 852-861.
- [13] FERRERES F, ANDRADE P, TOMÁS-BARBERÁN FA. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar [J]. Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(8): 2053-2056.
- [14] QIAO JT, CHEN LH, KONG LJ, 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.
- [15] 龚兔羌, 高正国. 柑橘蜜源特点与场地选择[J]. 蜜蜂杂志, 2007(3):

- 35–36.  
GONG FQ, GAO ZG. Honey source characteristics and site selection of citrus [J]. *Journal of Bee*, 2007(3): 35–36.
- [16] 王方莉, 吴俐勤, 沈振陆, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法对柑橘蜜中挥发性组分的定性和半定量分析[J]. *理化检验(化学分册)*, 2014, 50(4): 429–434.  
WANG FL, WU LQ, SHEN ZL, *et al.* Qualitative and semi-quantitative analysis of volatile components in citrus honey by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Physical and Chemical Examination (Chemistry Branch)*, 2014, 50(4): 429–434.
- [17] TRUCHADO P, FERRERES F, TOMAS-BARBERAN FA. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(43): 7241–7248.
- [18] 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 JT. Identification and authenticity evaluation of iconic components in four single nectar [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [19] 孙崇臻, 王超, 蔡子哲, 等. 高效液相色谱测定蜂蜜中的脱落酸、黄酮和酚酸[J]. *食品科学*, 2013(10): 281–285.  
SUN CZ, WANG C, CAI ZZ, *et al.* Determination of abscisic acid, flavonoids and phenolic acids in honey by high performance liquid chromatography [J]. *Food Science*, 2013(10): 281–285.
- [20] 蔺怡. 椴树蜜多酚类化合物的分析鉴定研究[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2018.  
LING Y. Research on the analysis and identification of polyphenolic compounds in tilia honey [D]. Handan: Hebei University of Engineering, 2018.
- [21] 黄庆佐, 杨晓灵, 赵会贤, 等. HPLC 法测定不同施肥模式栽培的金线莲中黄酮类成分[J]. *分析测试技术与仪器*, 2017(2): 114–119.  
HUANG QZ, YANG XL, ZHAO HX, *et al.* HPLC method for determination of flavonoids in different fertilization modes of *Chinchilla chinensis* [J]. *Analytical Testing Technology and Instruments*, 2017(2): 114–119.
- [22] 霍丽斯, 刘嘉亮, 陈颖芯. 高效液相色谱法测定蜂胶中的六种黄酮[J]. *农产品加工*, 2019(11): 54–55, 58.  
HOU LS, LIU JL, CHEN YX. Determination of six flavonoids in propolis by high performance liquid chromatography [J]. *Agricultural Processing*, 2019(11): 54–55, 58.
- [23] 赵亮亮. 中国蜂胶中多酚类成分分析及抗氧化活性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2013.  
ZHAO LL. Analysis of polyphenols in Chinese propolis and study on antioxidant activity [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2013.
- [24] WANG Z, CUI Z, LI X, *et al.* Simultaneous determination of trigonelline and caffeine and its application in the identification of Chinese citrus, coffee and rape honey [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2023, 18(2): 962–979.
- [25] YISAK H, REDI-ABSHIRO M, CHANDRAVANSI BS. New fluorescence spectroscopic method for the simultaneous determination of alkaloids in aqueous extract of green coffee beans [J]. *Chemistry Central Journal*, 2018, 12(1). DOI: 10.1186/s13065-018-0431-4
- [26] ALI A, ZAHID HF, COTTRELL JJ, *et al.* A comparative study for nutritional and phytochemical profiling of *Coffea arabica* (*C. arabica*) from different origins and their antioxidant potential and molecular docking [J]. *Molecules*, 2022, 27(16): 5126.
- [27] BAEK GH, YANG SW, YUN CI, *et al.* Determination of methylxanthine contents and risk characterisation for various types of tea in Korea [J]. *Food Control*, 2022, 132: 108543.
- [28] BARCELOS RP, LIMA FD, CARVALHO NR, *et al.* Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance [J]. *Nutrition Research*, 2020, 80: 1–17.
- [29] LU YH, WU CP, TANG CK, *et al.* Identification of immune regulatory genes in *Apis mellifera* through caffeine treatment [J]. *Insects*, 2020, 11(8): 516.
- [30] MOTTA EVS, ARNOTT RLW, MORAN NA. Caffeine consumption helps honey bees fight a bacterial pathogen [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e00520–e00523.

(责任编辑: 安香玉 韩晓红)