

超高效液相色谱指纹图谱结合化学模式识别在狼牙蜜质量评价中的应用

王斐斐¹, 王波², 刘阿静², 王娟², 李海斌³, 寇宗红³, 刘兰霞³, 周小平^{1,2*}

(1. 甘肃农业大学 食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2. 兰州海关技术中心, 兰州 730010;

3. 白银市食品检验检测中心, 白银 730999)

摘要:采用超高效液相色谱法(UHPLC)建立 28 批不同产地狼牙蜜样品的指纹图谱,结合化学模式识别对狼牙蜜进行质量研究,为狼牙蜜的掺伪鉴别和产地来源判断提供依据。称取狼牙蜜样品 20 g,加入 15 mL 水,涡旋溶解,然后加入 15 mL 乙酸乙酯,涡旋提取,离心后,取上清液,残渣中加入 10 mL 乙酸乙酯重复提取一次,合并上清液,于 30 ℃ 氮吹至近干,用 1 mL 甲醇复溶,过 0.22 μm 有机滤膜。滤液注入超高效液相色谱仪,以 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱为固定相,以 0.1%(体积分数,下同)甲酸溶液-含 0.1%甲酸的甲醇溶液为流动相体系进行梯度洗脱,用二极管阵列检测器在检测波长 280 nm 下进行测定。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版),得到 28 批狼牙蜜样品的指纹图谱和对照指纹图谱,生成 22 个共有峰。通过与混合对照品溶液色谱图进行比对,初步指认出其中 9 个共有峰,对应的化合物分别为对羟基苯甲酸、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸、丁香酸甲酯、槲皮素、山奈酚、白杨素。28 批狼牙蜜样品的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度为 0.909~0.993。对掺入不同质量分数(5%~50%)油菜蜜和洋槐蜜的狼牙蜜样品进行模拟掺伪检测分析,得到的掺伪狼牙蜜样品的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度为 0.251~0.853。采用分层聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘-判别分析对 28 批狼牙蜜样品进行研究,结果表明,3 种方法均将 28 批狼牙蜜样品分为 3 类,徽县产区的样品被分为一类,两当县产区的样品被分为两类。对指认出的 9 种化合物进行定量分析,9 种化合物标准曲线的线性范围均为 0.5~200.0 mg·L⁻¹,检出限(3S/N)均为 0.01 mg·kg⁻¹,28 批狼牙蜜样品中对羟基苯甲酸、芥子酸、槲皮素、山奈酚含量较高,但各批次样品中每种成分含量差异较大。

关键词:超高效液相色谱法(UHPLC); 狼牙蜜; 指纹图谱; 化学模式识别; 掺伪鉴别

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2023)07-0783-09

狼牙蜜是由蜜蜂采集狼牙刺花(白刺花)的花蜜并与自身分泌物相结合,经充分酿造而成的天然甜味物质^[1-2],其味甘甜芳香、品质细腻,具有良好的食用价值和药用价值,备受消费者青睐^[3-4]。研究表明,狼牙蜜中富含葡萄糖、果糖、氨基酸、蛋白质、维生素、生物碱、多酚、黄酮类化合物等物质^[5-6],具有抗肿瘤、抗炎症、抗氧化、抗衰老、抑菌、保护肝功能和免疫调节等多种功效^[7-9]。甘肃狼牙蜜主要来源

于陇南市两当县和徽县,两当县野生资源丰富,素有“狼牙蜜之乡”的美称。因蜜源品种和产地的特殊性,狼牙蜜的市售价格略高于一般蜂蜜,导致一些不法商贩抓住漏洞掺假制假^[10-12]。目前掺假蜂蜜占蜂蜜市场的 20%~30%,有些地区高达 50%左右^[13],主要的掺假方式有直接添加和间接掺假^[14],例如,在蜂蜜中直接加入甜味剂、掺入低价蜂蜜、用白砂糖或甜味剂喂养蜜蜂等,这种掺假现象严重影响了蜂蜜市场的稳定性,损害了消费者的利益,使蜂蜜产品的质量难以得到保障。由于狼牙蜜成分比较复杂,掺假蜂蜜理化指标相似度极高,传统的检测标准很难满足实际鉴定需求^[15],并且国内有关狼牙蜜质量的评价鲜有报道,因此建立和完善狼牙蜜质量

收稿日期: 2022-11-09

基金项目: 甘肃省市场监督管理局科技计划(SSCJG-SP-A202210)

作者简介: 王斐斐,硕士研究生,研究方向为食品安全检测

* 通信联系人。zhxp1123@163.com

评价体系显得尤为迫切。

酚类化合物是蜂蜜中一类重要的活性物质,近年来,通过分析蜂蜜中的酚类化合物的组成和含量来判断蜂蜜的花源和地理来源的文献已有报道^[16-17],常见的分析方法有紫外-可见分光光度法^[5]、液相色谱-质谱联用法^[18]、液相色谱-四极杆飞行时间质谱法等^[19]。基于此,本工作采用超高效液相色谱法(UHPLC)建立 28 批不同产地狼牙蜜的指纹图谱,结合化学模式识别建立狼牙蜜的质量评价模型,以为狼牙蜜的品质鉴定和评审、掺假鉴别提供技术支持。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪,配四元泵、自动进样系统、柱温箱、二极管阵列检测器和 Empower 3 工作站;BC-100 型多管涡旋混合仪;3K30 型台式高速冷冻离心机;BSA 822 型电子天平。

混合对照品溶液 1:10 mg·L⁻¹,称取适量的香豆酸、阿魏酸、芥子酸、山奈酚、丁香酸、咖啡酸、绿原酸、对羟基苯甲酸、香草酸、槲皮素、芦丁对照品,用甲醇溶解并定容至 10 mL,配制成质量浓度均为 10 mg·L⁻¹的混合对照品溶液 1,于 4℃冷藏备用。

混合对照品溶液 2:10 mg·L⁻¹,称取适量的原儿茶酸、间羟基苯甲酸、香兰素、对香豆酸、丁香酸甲酯、杨梅素、橙皮素、白杨素、高良姜素对照品,用甲醇溶解并定容至 10 mL,配制成质量浓度均为 10 mg·L⁻¹的混合对照品溶液 2,于 4℃冷藏备用。

原儿茶酸、杨梅素、香兰素对照品的纯度均不小于 99.0%;香豆酸、阿魏酸、芥子酸、山奈酚、丁香酸、咖啡酸、绿原酸、香草酸、槲皮素、芦丁、丁香酸甲酯、对香豆酸、橙皮素、白杨素、高良姜素、对羟基苯甲酸、间羟基苯甲酸对照品的纯度均不小于 98.0%;甲醇、甲酸均为色谱纯;乙酸乙酯为分析纯;试验用水为屈臣氏蒸馏水。

28 批狼牙蜜样品的采集信息见表 1。

1.2 仪器工作条件

ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);柱温 35℃;流动相 A 为 0.1%(体积分数,下同)甲酸溶液,B 为含 0.1%甲酸的甲醇溶液;流量 0.30 mL·min⁻¹;进样量 2 μL;检测波长 280 nm。梯度洗脱程序见表 2。

表 1 28 批狼牙蜜样品的采集信息

Tab. 1 Information of 28 batches of bitter thorn nectar samples collected

样品编号	采集时间	产地
S1	2022-05-20	徽县水阳乡
S2	2022-05-22	徽县高桥乡
S3	2022-05-20	两当县张家乡
S4	2022-05-24	两当县泰山乡
S5	2022-05-24	两当县鱼池乡
S6	2022-05-24	两当县泰山乡
S7	2022-05-22	两当县左家乡
S8	2022-05-24	两当县泰山乡
S9	2022-05-20	两当县张家乡
S10	2022-05-21	两当县杨店乡
S11	2022-05-23	两当县显龙乡
S12	2022-05-23	两当县金洞乡
S13	2022-05-25	两当县云屏乡
S14	2022-05-22	两当县站儿巷镇
S15	2022-05-21	两当县杨店乡
S16	2022-05-20	两当县西坡镇
S17	2022-05-20	徽县永宁镇
S18	2022-05-22	徽县柳林镇
S19	2022-05-23	两当县城关镇
S20	2022-05-22	两当县杨店乡
S21	2022-05-23	两当县金洞乡
S22	2022-05-23	两当县城关镇
S23	2022-05-20	两当县西坡镇
S24	2022-05-25	两当县云屏乡
S25	2022-05-23	两当县金洞乡
S26	2022-05-22	两当县站儿巷镇
S27	2022-05-25	两当县云屏乡
S28	2022-05-22	两当县左家乡

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution procedure

时间/min	φ _A /%	φ _B /%	时间/min	φ _A /%	φ _B /%
0	95.0	5.0	40.00	15.0	85.0
5.00	95.0	5.0	43.00	10.0	90.0
10.00	90.0	10.0	45.00	10.0	90.0
15.00	70.0	30.0	46.50	95.0	5.0
35.00	40.0	60.0			

1.3 试验方法

称取狼牙蜜样品 20 g(精确至 0.01 g)于 50 mL

离心管中,加入 15 mL 水,涡旋 5 min,加入 15 mL 乙酸乙酯,涡旋 10 min,以转速 10 000 r · min⁻¹ 离心 5 min。取上清液于另一 50 mL 离心管中,残渣中加入 10 mL 乙酸乙酯重复提取一次。合并上清液于同一 50 mL 离心管中,于 30 ℃ 氮吹至近干,用 1 mL 甲醇复溶,过 0.22 μm 有机滤膜,滤液按照仪器工作条件进行测定。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版)以及 Origin 2021、SPSS 25.0、SIMCA 14.1 软件对数据进行处理。

2 结果与讨论

2.1 称样量和提取溶剂的选择

试验考察了称样量分别为 5,10,15,20,25 g 时对色谱峰的影响。结果表明:当称样量为 5,10,15 g 时,色谱峰个数少,峰强度较弱;当称样量为 20,25 g 时,出峰较多,且各色谱峰分离效果好,但称样量为 25 g 时一些色谱峰强度稍有降低。因此,试验选择的称样量为 20 g。

接着,试验考察了甲醇、80%(体积分数,下同)甲醇溶液、乙酸乙酯为提取溶剂时对对羟基苯甲酸、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸、丁香酸甲酯、槲皮素、山奈酚、白杨素提取效果的影响。称取狼牙蜜样品 20 g,分别用甲醇、80%甲醇溶液、乙酸乙酯进行提取,9 种目标物的测定值见表 3。

表 3 不同提取溶剂下 9 种目标物的测定值
Tab. 3 Determined values of 9 target compounds under different extraction solvents

化合物	测定值 w/(μg · kg ⁻¹)		
	甲醇	80%甲醇溶液	乙酸乙酯
对羟基苯甲酸	766.1	926.6	1 120.7
咖啡酸	112.6	244.8	281.6
对香豆酸	894.6	1 436.8	2 622.7
阿魏酸	76.2	115.6	222.6
芥子酸	166.2	169.2	214.1
丁香酸甲酯	44.8	101.6	114.8
槲皮素	478.6	268.4	481.4
山奈酚	1 626.8	2 011.7	3 431.6
白杨素	61.8	101.1	199.2

结果表明:以甲醇提取时会发生乳化现象,导致对目标物提取不彻底;以 80%甲醇溶液提取时,目标物测定值相对较低;以乙酸乙酯为提取溶剂时,目标物测定值均较高,且色谱图基线平稳。因此,试验

选择的提取溶剂为乙酸乙酯。

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 色谱柱

试验考察了 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm× 2.1 mm, 1.7 μm)、Thermo C₁₈ (250 mm× 4.9 mm, 5 μm)、Agilent Extend C₁₈ (250 mm× 4.6 mm, 5 μm)等 3 种色谱柱的分离效果。结果表明,使用 Thermo C₁₈、Agilent Extend C₁₈ 色谱柱时,得到的色谱图基线不稳定,个别目标物色谱峰和杂质峰重合,分离效果不佳;使用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱时,出峰较多,峰形尖锐,且各色谱峰分离效果较好。因此,试验选择的色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱。

2.2.2 流动相体系

试验考察了甲醇-水、乙腈-水和 0.1%甲酸溶液-含 0.1%甲酸的甲醇溶液分别为流动相体系时对目标物分离效果的影响。结果表明:在相同的梯度洗脱程序下,以乙腈-水为流动相体系时,部分色谱峰重合,分离度不高;以甲醇-水为流动相体系时,虽然各色谱峰可基本分离,但基线漂移严重,难以稳定检测;当在甲醇-水流动相体系中加入 0.1%甲酸后,各色谱峰分离效果较好。因此,试验选择的流动相体系为 0.1%甲酸溶液-含 0.1%甲酸的甲醇溶液。

2.2.3 检测波长

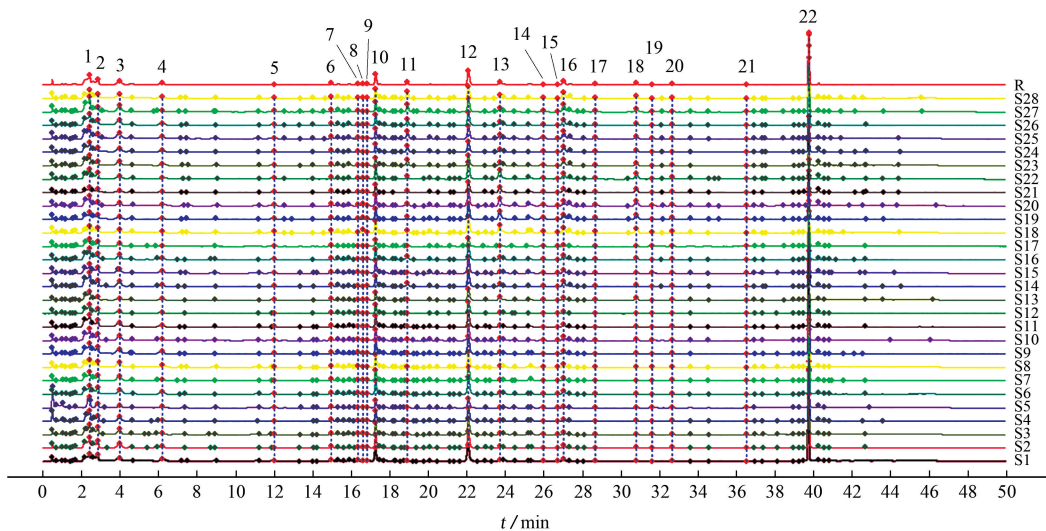
试验进一步考察了检测波长分别为 210,254,280,325,360 nm 时色谱图的出峰情况。结果表明,当检测波长为 280 nm 时,色谱峰个数较多,分离度较好,且基线平稳。因此,试验选择的检测波长为 280 nm。

2.3 狼牙蜜指纹图谱的建立及相似度评价

2.3.1 狼牙蜜指纹图谱

按照试验方法对 28 批狼牙蜜样品进行分析,记录色谱图,将测定的数据以 AIA 格式导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版),以 S2 样品色谱图作为参照指纹图谱,采用中位数法,设定时间窗宽度为 0.1,多点校正后进行峰匹配,得到 28 批狼牙蜜样品的指纹图谱和对照指纹图谱(R),生成 22 个共有峰,结果如图 1 所示。

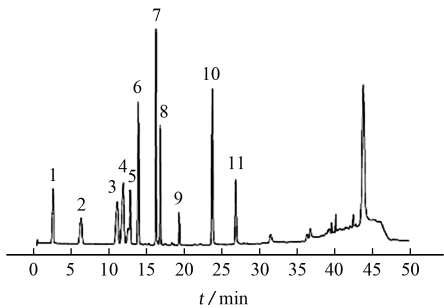
通过与混合对照品溶液色谱图[图 2(a)和(b)]进行比对,初步指认出 9 个共有峰,其中峰 4 为对羟基苯甲酸,峰 5 为咖啡酸,峰 6 为对香豆酸,峰 7 为阿魏酸,峰 9 为芥子酸,峰 11 为丁香酸甲酯,峰 13 为槲皮素,峰 16 为山奈酚,峰 20 为白杨素。



4-对羟基苯甲酸;5-咖啡酸;6-对香豆酸;7-阿魏酸;9-芥子酸;11-丁香酸甲酯;
13-槲皮素;16-山奈酚;20-白杨素

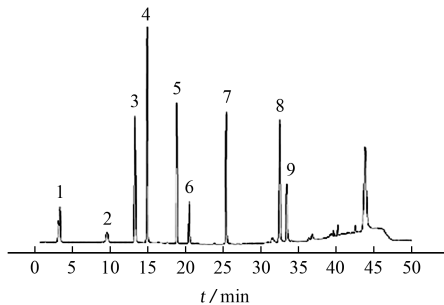
图 1 28 批狼牙蜜样品指纹图谱和对照指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of 28 batches of bitter thorn nectar samples and reference fingerprint



1-香豆酸;2-对羟基苯甲酸;3-香草酸;4-咖啡酸;
5-绿原酸;6-丁香酸;7-阿魏酸;8-芥子酸;
9-芦丁;10-槲皮素;11-山奈酚

(a) 混合对照品溶液 1



1-原儿茶酸;2-间羟基苯甲酸;3-香兰素;4-对香豆酸;
5-丁香酸甲酯;6-杨梅素;7-橙皮素;
8-白杨素;9-高良姜素

(b) 混合对照品溶液 2

图 2 色谱图

Fig. 2 Chromatograms

2.3.2 相似度评价

使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版)对 28 批狼牙蜜样品进行相似度评价,结果如表 4 所示。

表 4 相似度评价结果

Tab. 4 Results of similarity evaluation

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.988	S15	0.987
S2	0.992	S16	0.992
S3	0.981	S17	0.948
S4	0.991	S18	0.914
S5	0.970	S19	0.909
S6	0.992	S20	0.911
S7	0.991	S21	0.916
S8	0.981	S22	0.945
S9	0.986	S23	0.936
S10	0.993	S24	0.925
S11	0.989	S25	0.918
S12	0.980	S26	0.991
S13	0.951	S27	0.986
S14	0.991	S28	0.983

结果显示:28 批狼牙蜜指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于 0.900,表明这 28 批样品品质较为一致,相对稳定。

2.4 掺假狼牙蜜指纹图谱对比

在狼牙蜜中加入一定量的油菜蜜和洋槐蜜,按照相同试验方法进行分析,比较了掺假狼牙蜜指纹图谱与对照指纹图谱的相似度。结果表明:当在狼牙蜜样品中添加质量分数为 5%,10%,20%,30%,40%,50%的洋槐蜜时,其与对照指纹图谱的相似度分别为 0.853,0.767,0.632,0.512,0.329,0.251;添加质量分数为 5%,10%,20%,30%,40%,50%的油菜蜜时,其与对照指纹图谱的相似度分别为 0.825,0.793,0.615,0.497,0.339,0.271。从相似度结果可以明显看出,掺入其他蜂蜜后,得到的指纹图谱与狼牙蜜对照指纹图谱相差较大,因此利用建立的指纹图谱可为狼牙蜜的掺假鉴定提供数据参考。

2.5 化学模式识别

2.5.1 分层聚类分析

以 22 个共有峰为变量,将数据导入 SPSS 25.0 软件,运用欧氏距离对数据进行分层聚类分析(HCA),结果见图 3。

结果显示:当欧氏距离为 10 时,28 批狼牙蜜样品被分为 3 类,来自两当县张家乡(S3、S9)、泰山乡(S4、S6、S8)、鱼池乡(S5)、左家乡(S7、S28)的样品为一类,来自徽县水阳乡(S1)、高桥乡(S2)、永宁镇

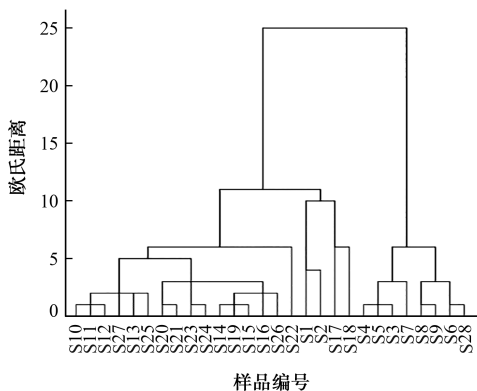


图 3 HCA 树状图

Fig. 3 Dendrogram obtained by HCA

(S17)、柳林镇(S18)的样品为一类,来自两当县杨店乡(S10、S15、S20)、显龙乡(S11)、云屏乡(S13、S24、S27)、站儿巷镇(S14、S26)、西坡镇(S16、S23)、城关镇(S19、S22)、金洞乡(S12、S21、S25)的样品为一类,表明 28 批狼牙蜜样品成分之间存在一定的差异,可能与蜜源、花源和地理环境因素(如土壤、季节、温度和气候)有关^[20]。

2.5.2 主成分分析

采用 SIMCA 14.1 软件,以 22 个共有峰为变量进行主成分分析(PCA),结果见图 4。

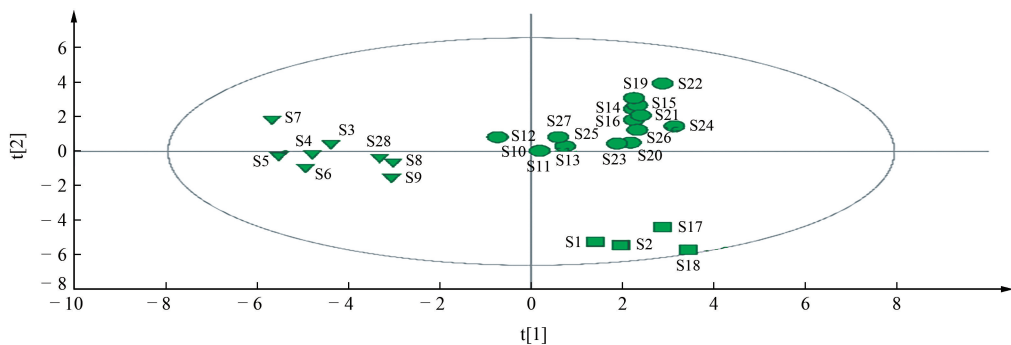


图 4 主成分得分图

Fig. 4 Principal component score plot

由图 4 可知,28 批狼牙蜜样品被分为 3 类,来自徽县的样品(S1、S2、S17、S18)被分为一类,来自两当县的样品被分为两类(S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S28 为一类,其余样品为一类)。PCA 结果与 HCA 结果一致,进一步表明狼牙蜜质量与其产地相关性较大。

2.5.3 正交偏最小二乘-判别分析

根据 PCA 结果,以 22 个共有峰为变量进行正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA),结果见图 5。

结果表明:模型的自变量拟合指数(R_X^2)为

0.894,因变量拟合指数(R_Y^2)为 0.951,预测指数(Q^2)为 0.794。由图 5 可知,28 批狼牙蜜样品被分为 3 类,分类结果与 PCA、HCA 结果一致,其中,产地为两当县的样品基本分布在纵轴的负半轴,产地为徽县的样品分布在纵轴的正半轴,并且同产地样品的重复性良好,表明该模型可用于不同产地狼牙蜜的识别,其中成分含量存在一定的差异性。

2.6 方法学验证

2.6.1 重复性试验

取 S2 样品,按照试验方法制备并测定 6 份供试

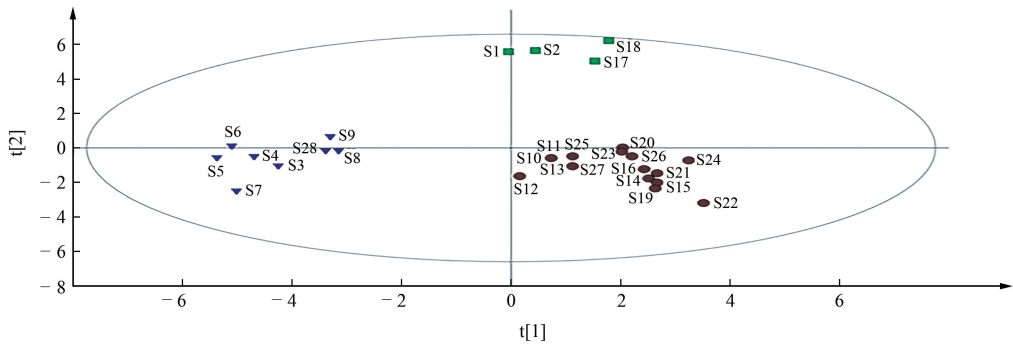


图 5 OPLS-DA 得分图
Fig. 5 Score plot obtained by OPLS-DA

品溶液,以峰 7(阿魏酸)为参照色谱峰,计算各共有峰与参照色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差(RSD)。结果显示,相对保留时间的 RSD 均小于 2.5%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.8%,表明方法重复性良好。

2.6.2 稳定性试验

取 S10 样品,按照试验方法制备 6 份供试品溶液,分别于放置 0,6,12,18,24 h 进样测定。结果显示,各共有峰与参照色谱峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2.8%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.3 仪器精密度试验

取 S5 样品,按照试验方法制备 1 份供试品溶液,连续进样 6 次。结果显示,各共有峰与参照色谱峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2.6%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.8%,表明仪器精密度良好。

2.6.4 标准曲线和检出限

称取适量的对羟基苯甲酸、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸、丁香酸甲酯、槲皮素、山奈酚、白杨素对照品,用甲醇溶解,配制成质量浓度均为 1.0 g · L⁻¹ 的混合标准溶液;分取适量,用甲醇稀释、定容,配制成质量浓度为 0.5,1.0,2.0,5.0,25.0,50.0,100.0,200.0 mg · L⁻¹ 的混合标准溶液系列,

按照仪器工作条件进行测定,以各成分的质量浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果显示,9 种成分标准曲线的线性范围均为 0.5~200.0 mg · L⁻¹,线性参数见表 5。

表 5 线性参数
Tab. 5 Linearity parameters

化合物	线性回归方程	相关系数
对羟基苯甲酸	$y=5\,720\,x-345.2$	0.999 8
咖啡酸	$y=1\,292\,x+4\,095$	0.999 7
对香豆酸	$y=3\,442\,x+1\,641$	0.999 8
阿魏酸	$y=1\,575\,x+1\,614$	0.999 5
芥子酸	$y=8\,300\,x+2\,060$	0.999 8
丁香酸甲酯	$y=1\,862\,x+765.2$	0.999 8
槲皮素	$y=1\,692\,x+301.6$	0.999 7
山奈酚	$y=7\,801\,x+2\,952$	0.999 5
白杨素	$y=2\,425\,x+3\,668$	0.999 6

以 3 倍信噪比(S/N)计算检出限(3S/N),结果显示,9 种成分的检出限均为 0.01 mg · kg⁻¹。

2.7 样品分析

按照试验方法测定 28 批狼牙蜜中 9 种成分的含量,结果见表 6。

表 6 样品分析结果
Tab. 6 Analytical results of the samples

样品编号	对羟基苯甲酸	咖啡酸	对香豆酸	阿魏酸	芥子酸	丁香酸甲酯	槲皮素	山奈酚	白杨素
S1	385.3	313.4	104.9	115.1	370.1	224.9	865.5	1 429.3	145.1
S2	353.0	278.8	112.2	96.9	774.5	260.6	841.9	1 065.5	156.9
S3	1 170.9	354.6	118.7	122.2	751.2	277.8	1 022.0	1 161.6	161.8
S4	1 081.4	365.9	123.5	129.2	664.9	282.5	1 030.3	1 240.1	172.9
S5	1 008.2	376.4	122.5	128.3	644.2	281.7	1 001.6	1 187.9	172.9

表 6(续)

$\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$

样品编号	对羟基苯甲酸	咖啡酸	对香豆酸	阿魏酸	芥子酸	丁香酸甲酯	槲皮素	山奈酚	白杨素
S6	832.1	262.4	84.1	90.6	387.0	185.2	719.5	1 237.1	122.2
S7	1 335.1	388.4	132.2	139.3	551.6	291.1	1 130.0	1 970.2	194.7
S8	1 344.0	255.1	96.7	127.3	322.1	547.5	551.4	1 860.8	138.5
S9	990.4	57.5	93.3	93.5	195.3	531.1	440.8	1 057.5	194.3
S10	1 665.8	288.6	112.7	146.8	372.6	652.0	639.8	2 381.7	73.4
S11	1 621.7	279.5	122.9	149.2	416.2	585.2	569.6	1 772.7	73.6
S12	1 505.7	309.2	123.3	149.5	398.1	674.9	690.9	2 346.2	72.0
S13	1 536.4	280.7	106.5	129.3	341.3	600.5	600.5	2 045.6	76.0
S14	1 476.3	164.6	114.3	228.6	274.9	116.1	333.2	885.3	94.5
S15	856.1	191.8	119.8	243.4	297.8	124.8	350.2	963.8	99.1
S16	778.8	167.6	112.4	139.6	475.2	116.6	333.1	911.0	98.8
S17	377.5	159.5	96.4	219.7	252.2	112.4	277.3	765.3	82.9
S18	258.9	175.1	120.3	253.6	303.0	135.6	378.8	955.5	101.0
S19	1 152.4	147.1	102.4	241.6	283.2	113.4	312.9	860.8	87.3
S20	1 125.3	154.7	107.1	241.0	284.5	116.9	344.3	894.1	92.2
S21	1 563.2	182.6	122.6	242.7	307.7	133.2	361.0	875.7	90.0
S22	1 258.9	195.4	107.5	202.5	258.9	203.7	384.3	1 165.5	79.7
S23	1 419.7	147.1	106.5	192.6	256.6	107.4	328.3	795.3	84.1
S24	1 009.4	122.1	82.0	158.0	210.4	95.8	266.5	672.3	126.2
S25	808.7	166.5	78.4	157.1	161.6	129.8	514.3	964.8	105.9
S26	1 439.7	224.4	116.1	204.9	270.8	381.5	494.4	1 222.3	81.4
S27	1 608.7	177.3	112.4	215.5	271.9	119.0	346.9	851.4	89.6
S28	1 203.6	218.6	95.5	184.3	197.9	97.8	332.7	5 325.0	153.8

结果表明:28 批狼牙蜜样品中对羟基苯甲酸($258.9 \sim 1\,665.8\,\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、芥子酸($161.6 \sim 774.5\,\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、槲皮素($266.5 \sim 1\,130.0\,\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、山奈酚($672.3 \sim 5\,325.0\,\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)含量较高,但各批次样品中每个成分含量差异较大,例如来自徽县的 S1、S2、S17、S18 样品中对羟基苯甲酸质量分数为 $258.9 \sim 385.3\,\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,相对较低。

本工作采用 UHPLC 建立 28 批不同产地狼牙蜜的指纹图谱,指认出其中 9 种酚类化合物,并对这 9 种成分含量进行测定,结合 HCA、PCA 及 OPLS-DA 对狼牙蜜进行品质评价和分类。结果表明:狼牙蜜中对羟基苯甲酸、芥子酸、槲皮素、山奈酚含量较高,HCA、PCA、OPLS-DA 分类结果一致,均可将两当县和徽县样品区分开来,并且利用指纹图谱成功鉴别了掺入质量分数 5%以上其他蜂蜜的掺假狼

牙蜜。

参考文献:

[1] BOGDANOV S, JURENDIC T, SIEBER R, et al. Honey for nutrition and health: A review[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2008, 27(6): 677-689.

[2] 中华人民共和国卫生部.食品安全国家标准 蜂蜜:GB 14963—2011[S].北京:中国标准出版社,2011.

[3] 李国玉.谈提高中蜂群生产狼牙刺蜜产量的方法[J].蜜蜂杂志,2019,39(4):23-23.

[4] DO NASCIMENTO K S, SATTTLER J A G, MACE-DO L F L, et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys[J]. Food Science and Technology, 2018, 91:85-94.

[5] 郑晶晶,张晓华,刘秀平,等.蜂蜜中多酚类化合物的超

- 声辅助双水相提取工艺研究[J].食品研究与开发, 2022,43(17):63-70.
- [6] 贾茹,黄学者,贾光群,等.超高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定蜂蜜中12种糖组分[J].分析测试学报, 2022,41(6):851-857.
- [7] 王长伟,陈琛,蔺蓓蓓,等.狼牙刺中生物碱的研究应用进展[J].江苏农业科学, 2019,47(4):16-21.
- [8] 蒋合众.苦参碱及氧化苦参碱药理作用和制备方法研究进展[J].实用中西医结合临床, 2007,7(1):89-90.
- [9] GUO P L, DENG Q X, LU Q. Anti-alcoholic effects of honeys from different floral origins and their correlation with honey chemical compositions [J]. Food Chemistry, 2019,286:608-615.
- [10] 贺琼,何亮亮,康予馨,等.高效液相色谱-电化学检测指纹图谱鉴别3种单花种蜂蜜花源[J].食品科学, 2017,38(2)290-295.
- [11] FERNÁNDEZ-TORRES R, PÉREZ-BERNAL J L, BELLO-LÓPEZ M A, et al. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys[J]. Talanta, 2005,65(3):686-691.
- [12] MADEJCZYK M, BARALKIEWICZ D. Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES[J]. Analytica Chimica Acta, 2008,617(1/2): 11-17.
- [13] 裴高璞,史波林,赵镭,等.蜂蜜质量市场动态及掺假检测方法现状分析[J].食品科学, 2013,34(15)329-336.
- [14] SE K W, WAHAB R A, YAACOB S 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.
- [15] 孙潇慧,李新玲,霍胜楠,等.十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术及国内外蜂蜜掺伪检测技术研究进展[J].食品安全质量检测学报, 2019,10(16): 5288-5292.
- [16] 刘彩云.中蜂蜂蜜酚类色谱指纹图谱构建及加工对蜂蜜中酚类物质影响的研究[D].西安:西北大学, 2019.
- [17] 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, 2013,34(10) 281-285.
- [18] 罗照明,张红城,CLAUDIO G,等.高效液相色谱质谱联用仪分析不同产地蜂胶的多酚类成分(续)[J].中国蜂业, 2013,64(4):40-42.
- [19] 梁馨文,李强强,高景林,等.海南无刺蜂蜂蜜中多酚类物质成分分析及其抗氧化、抗炎活性评价[J].食品科学, 2018,39(8):141-148.
- [20] 张晓华,刘丹丹,郑晶晶,等.蜂蜜中多酚类物质的定量分析及其在蜂蜜种类鉴别中的应用研究[J].中国调味品, 2020,45(12):78-86.

Application of Ultra-High Performance Liquid Chromatography Fingerprint with Chemical Pattern Recognition in Quality Evaluation of Bitter Thorn Nectar

WANG Feifei¹, WANG Bo², LIU Ajing², WANG Juan², LI Haibin³,
KOU Zonghong³, LIU Lanxia³, ZHOU Xiaoping^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Technology Center of Lanzhou Customs, Lanzhou 730010, China;

3. Baiyin Food Inspection and Testing Center, Baiyin 730999, China)

Abstract: The fingerprints of 28 batches of bitter thorn nectar samples from different origins were established by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC), and the quality of samples were studied by UHPLC fingerprints combined with chemical pattern recognition, which provided the basis for the identification of adulteration and discrimination of origin of bitter thorn nectar. Bitter thorn nectar sample (20 g) was taken, and dissolved by 15 mL of water with vortex, and 15 mL of ethyl acetate was added into the mixture for extraction with vortex. After centrifugation, the supernatant was taken, and 10 mL of ethyl acetate was added into the residue for repeat extraction. The supernatants obtained were combined and blown to near dryness by nitrogen at 30 °C, the residue was redissolved by 1 mL of methanol, and the mixed solution was filtered through a 0.22 μm organic membrane. The filtrate obtained was injected into ultra-high performance liquid chromatograph, with ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column as stationary phase, and 0.1% (volume fraction) formic acid solution and methanol solution containing 0.1% formic acid as mobile phase system for gradient elution, and determined by diode array detector at the detection wavelength of 280 nm. The fingerprints of 28 batches of bitter thorn nectar samples and reference fingerprint were obtained by the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2012. 130723 edition), and 22 common peaks were obtained. By comparing with the chromatograms of the mixed reference solutions, 9 common peaks were identified, and the corresponding compounds were *p*-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, erucic acid, methyl eugenate, quercetin, kaempferol and albumin. The similarities between fingerprints of 28 batches of bitter thorn nectar samples and reference fingerprint were in the range of 0.909—0.993, and the similarities between fingerprints of pseudo bitter thorn nectar samples and reference fingerprint were in the range of 0.251—0.853 by simulated adulteration detection analysis of rape honey and locust honey mixed with different mass concentrations (5%—50%). The 28 batches of bitter thorn nectar samples were studied by hierarchical cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least square-discriminant analysis. The results showed that 28 batches of bitter thorn nectar samples were divided into three categories by the three methods, with the samples from Huixian county for one category, and the samples from Liangdang county for two categories. The quantitative analysis of 9 compounds identified showed that the linear ranges of the standard curves of 9 compounds were in the range of 0.5—200.0 mg · L⁻¹, with the same detection limit (3S/N) of 0.01 mg · kg⁻¹. The contents of *p*-hydroxybenzoic acid, erucic acid, quercetin and kaempferol in 28 batches of bitter thorn nectar samples were higher, but that of each component in each batch of sample was significantly different.

Keywords: ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC); bitter thorn nectar; fingerprint; chemical pattern recognition; identification of adulteration