

苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜特征性成分鉴定 及抑菌活性评价

李佳¹, 杜一男², 张文想¹, 邱伟乐¹, 乔江涛¹, 刘利强^{1*}, 杜娟^{1*}

(1. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北邯郸 056038) (2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要: 为了鉴别苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜的植物来源差异, 并建立其真实性评价方法, 本研究以苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜为研究对象, 采用固相萃取结合 HPLC-MS/MS 对两种蜂蜜中特征性成分进行定性定量分析, 并建立指纹图谱用于真实性评价, 同时评价其抑菌活性。结果表明, 苜蓿蜂蜜中共鉴定出 8 种特征性成分, 其中, 4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮仅在苜蓿蜂蜜中检出, 平均含量为 12.39 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 可作为其潜在特征性标志物。三叶草蜂蜜中共鉴定出 13 种特征性成分, 其中 N1,N5,N10-三-对-香豆酰亚精胺和山奈酚-3-O-鼠李糖苷仅在三叶草蜂蜜中检出, 平均含量分别为 24.30 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 和 4.47 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 具有较强的蜜源指示意义。HPLC 指纹图谱及特征成分分析结果表明, 部分市售样品存在标称蜜源与实际化学特征不一致的现象。抑菌活性评价结果显示, 三叶草蜂蜜对大肠杆菌具有明显抑制作用, 平均抑菌圈直径为 23.37 mm, 而苜蓿蜂蜜未形成明显抑菌圈。本研究为两种蜂蜜的植物来源鉴别、真实性评价及质量控制提供了理论依据。

关键词: 苜蓿蜂蜜; 三叶草蜂蜜; 特征性成分; 真实性评价; 抑菌活性

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0878

Characteristic Components and Authenticity Evaluation of Alfalfa Honey and Clover Honey

LI Jia¹, DU Yinan², ZHANG Wenxiang¹, QIU Weile¹, QIAO Jiangtao¹, LIU Liqiang^{1*}, DU Juan^{1*}

(1.School of Life Sciences and Food Engineering, Hebei University of Technology, Handan 056038, China)

(2.Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: To identify the botanical origin differences between alfalfa honey and clover honey and to establish an authenticity evaluation method, alfalfa honey and clover honey were investigated in this study. Solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS/MS) was employed to identify and quantify characteristic phytochemical compounds in the two honey types. In addition, chromatographic fingerprints were established for authenticity assessment, and their antibacterial activities were evaluated. The results showed that eight characteristic compounds were identified in alfalfa honey, 4-(3'-methylallene ketone)-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one was detected exclusively in alfalfa honey with average contents of 12.39 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ and could serve as a potential characteristic marker. Thirteen characteristic compounds were identified in clover honey, among which N1,N5,N10-tri-p-coumaroyl spermidine and kaempferol-3-O-rhamnoside were detected exclusively in clover honey, with average contents of 24.30 and 4.47 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, respectively, indicating strong botanical-origin specificity. HPLC fingerprinting and characteristic compound analyses revealed that some commercial honey samples showed inconsistencies between their labeled floral origins and actual phytochemical characteristics. Antibacterial activity evaluation demonstrated that clover honey exhibited a clear inhibitory effect against *Escherichia coli*, with an average inhibition zone diameter of 23.37 mm, whereas alfalfa honey showed no obvious antibacterial activity. This study provides a theoretical basis for the botanical origin identification, authenticity evaluation, and quality control of alfalfa honey and clover honey.

Key words: alfalfa honey; clover honey; characteristic components; authenticity evaluation; antibacterial activity

收稿日期: 2026-06-10; 修回日期: 2026-07-08; 接受日期: 2026-07-08

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

作者简介: 李佳 (2002-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物提取, E-mail: 1805298274@qq.com

通讯作者: 刘利强 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 464703755@qq.com; 共同通讯作者: 杜娟 (1979-), 女, 硕士, 讲师,

研究方向: 发酵食品, E-mail: 82471638@qq.com

蜂蜜是蜜蜂采集植物花蜜,与自身分泌的酶类及其他活性物质混合后,经过充分的生物化学转化、脱水及成熟过程后形成的一种天然甜味食品^[1]。其化学组成较为复杂,除糖类占主要比例外,还含有多种来源于植物的微量活性成分,包括黄酮类、酚酸类、萜类、生物碱以及少量蛋白质、有机酸、维生素和矿物质等^[2]。研究表明,不同蜜源植物及地理环境会显著影响蜂蜜中植物化学物的组成及含量差异^[3],这些植物化合物赋予了蜂蜜抗菌^[4-6],抗氧化^[7-9],抗肿瘤^[10-12],调节肠道菌群^[13-15]和促进伤口愈合^[16,17]等诸多生物活性^[18]。

由于蜂蜜具有较高的经济价值且真实性鉴别难度较大,其已成为当前食品市场中掺假问题较为突出的天然食品之一。传统的蜂蜜真伪鉴别方法主要依赖于感官评价与孢粉学分析的结合^[19],现在鉴别蜂蜜的真实性多采用稳定碳同位素比率法^[20]、糖浆标志物检测法^[21]、核磁共振法^[22]、高分辨质谱法^[23]等方法。近年来,越来越多研究发现,不同单花蜜中的植物化合物具有一定的特异性,因此植物化合物可被作为判定蜂蜜植物来源及真实性的重要特征性标记物^[24,25]。

苜蓿蜜是以紫花苜蓿(*Medicago sativa* subsp. *sativa* L.)为主要蜜源植物形成的单花蜂蜜,主要分布于我国西北地区,具有色泽浅、香气浓郁等特点,是我国重要单花蜜之一。三叶草蜜来源于车轴草属(*Trifolium* spp.)植物花蜜,色泽多为浅黄色至琥珀色,风味独特,长期被认为是高品质单花蜜代表。苜蓿与三叶草同属豆科植物,花期重叠,且色泽、风味及部分理化特征相近,在市场流通和蜜源判定中容易混淆。目前关于二者差异性植物化学成分的系統比较研究仍较少,尤其缺乏基于植物化合物的特征性标记物筛选及真实性评价研究。

蜂蜜作为天然活性产物,因其抑菌潜力受到广泛关注。研究表明,蜂蜜可抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌等食源性致病菌,其活性与蜜源植物、蜂种、地理环境及理化性质密切相关^[26]。蜂蜜的抑菌作用并非由单一成分决定,而是高渗透压、低 pH、过氧化氢、甲基乙二醛及酚酸、黄酮、有机酸等多种活性物质协同作用的结果^[27,28]。不同品种单花蜂蜜的抑菌能力存在差异,其抑菌能力与酚类物质、过氧化氢含量及抗氧化能力等密切相关^[28-30]。大量研究证实不同单花蜂蜜对革兰氏阳性致病菌和革兰氏阴性致病菌表现出不同程度的抑菌活性,本文对三叶草蜂蜜和苜蓿蜂蜜的抑菌活性展开对比研究,对提高两种蜂蜜的附加值具有重要意义。

本研究以苜蓿蜂蜜与三叶草蜂蜜为研究对象,重点比较两者中化合物的组成差异。基于高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)分析及高效液相色谱-串联质谱(High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS)鉴定技术,对两种蜂蜜的植物化学成分进行对比鉴定,筛选并确定其各自的特征性成分,在此基础上建立两种蜂蜜的标准指纹图谱,对市售的两种蜂蜜开展真实性评价。同时,进一步评价两种蜂蜜的抗菌活性,以期对苜蓿蜂蜜与三叶草蜂蜜的植物来源鉴别、真实性评价及功能特性研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜样品分别采自我国苜蓿和三叶草主产区,共收集苜蓿蜂蜜样品 8 份、三叶草蜂蜜样品 8 份,并依据采收时间顺序分别编号为 C1-C8(苜蓿蜂蜜)和 D1-D8(三叶草蜂蜜),其中苜蓿蜂蜜主要来源于新疆、甘肃和内蒙古等地区,三叶草蜂蜜主要来源于黑龙江、吉林和内蒙古等地区。所有样品均由当地养蜂合作社或蜂农提供。各样品采集后密封保存于 4℃ 条件下储存备用。从京东、淘宝等线上平台以及线下超市分别购买了 6 个苜蓿商品蜂蜜和 6 个三叶草商品蜂蜜,保存于 4℃ 条件下储存备用,对其真实性进行评价。

大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922)菌株来源于中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)保存菌种。细菌在 LB 培养基(含 10 g L⁻¹ 胰蛋白胨、5 g L⁻¹ 酵母提取物、10 g L⁻¹ NaCl, pH 7.0)中培养,37℃ 摇床培养 12~16 h,至对数生长期后用于蜂蜜样品的抗菌活性实验。所有操作均在无菌条件下进行。

甲酸、甲醇及氨水(均为分析纯),由上海麦克林生化科技股份有限公司提供;色谱级甲醇和质谱级乙酸,均购自 Thermo Fisher Scientific(美国);3,4-二甲氧基苯甲酸和 3,4-二甲氧基苯乙酸,购自上海源叶生物科技有限公司;脱落酸(顺式与反式)、*p*-香豆酸、丁香酸甲酯、山奈酚光色素、木犀草素、短叶松素、山奈酚-3-O-鼠李糖苷、芹菜素、松属素、柯因、高良姜素、芹菜素标准品,购自德国 Merck(Sigma-Aldrich)公司;4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮、N1,N5,N10-对香豆酰亚精胺为本实验室通过制备液相制备,纯度大于 98%;实

验过程中所用水均为超纯水。

1.2 仪器与设备

AL104 电子分析天平, 美国 Sartorius 公司; SevenEasyS20 型 pH 计, 瑞士 Mettler 公司; ThermoSorrall 台式离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Strata™-X-A 33 μ m Polymeric Strong Anion SPE 固相萃取柱, 美国 Phenomenex 公司; Phenomenex Gemini® C18 110 A 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μ m), 美国 Phenomenex 公司; Milli-QIQ7000 默克超纯水系统, 德国 Merk Milipore 公司; 0.22 μ 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 蜂蜜中植物花粉检测

分别称取 10 g 苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜至 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 蒸馏水, 混匀涡旋, 在 9 000 r $\cdot$ min⁻¹ 条件下离心 15 min, 弃上清液, 重复提取 1 次并弃去上清液, 用胶头滴管吸取花粉残渣后滴在载玻片上, 盖上盖玻片置于显微镜上观察和计数。花粉率按下式计算:

$$X = \frac{N_1}{N_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

X——某种蜜源植物花粉粒占总花粉粒的比率;

N_1 ——10 个视野中某种蜜源植物花粉粒数, 单位为个;

N_2 ——10 个视野中蜜源植物花粉粒总数, 单位为个。

1.3.2 蜂蜜样品前处理

蜂蜜中化合物的富集方法参照本实验室乔江涛^[31]所使用的方法并进行改进, 具体富集方法如下:

取蜂蜜样品 20 g, 加入 80 mL 超纯水充分溶解后, 以氨水调节溶液 pH 值至 7.0。样品于 4 $^{\circ}$ C 条件下以 9 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液备用。SPE 柱预先采用 3 mL 色谱级甲醇和 3 mL (pH 值 7.0) 超纯水依次活化。随后将上清液加载至固相萃取柱, 使目标化合物保留于吸附剂表面。上样结束后, 以 3 mL 超纯水去除杂质, 再采用 3 mL 体积分数为 10% 甲酸的甲醇溶液洗脱目标组分。收集洗脱液后经氮气吹干, 以 2 mL 色谱级甲醇复溶, 过 0.22 μ m 滤膜后转入进样瓶进行分析。

1.3.3 两种蜂蜜高效液相色谱分析条件

采用 HPLC 技术对苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜中的目标成分进行分析, 色谱分离采用 Phenomenex Gemini C18 色谱柱完成。柱温维持在 35 $^{\circ}$ C。苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜样品检测波长设置为 270 nm, 进样量为 20 μ L, 总流速维持 0.7 mL $\cdot$ min⁻¹。以体积分数 0.2% 乙酸水溶液和含 0.2% 乙酸的甲醇溶液分别作为流动相 A 和 B, 采用梯度洗脱方式进行分离。

两种蜂蜜样品的梯度洗脱程序为 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 质谱分析条件

质谱分析条件参照汪月等^[32]所使用的分析条件, 并进行改动, 具体质谱分析条件为: 离子源为电喷雾离子源 (Electron Spray Ionization, ESI), 喷射电压为 4 kV, 出口电压 130 V、加热温度 350 $^{\circ}$ C、氮气 (N_2) 流速 11 L $\cdot$ min⁻¹, 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=6 895 Pa), 质量扫描范围 m/z 为 100~800。

1.3.5 蜂蜜中特征性成分定量分析

各标准品分别配制成储备液, 并进一步稀释获得系列工作液。根据峰面积与对应浓度之间的关系建立校准曲

线, 采用外标法对样品中的目标化合物进行定量分析。

1.3.6 两种蜂蜜 HPLC 指纹图谱的建立

将不同来源两种蜂蜜样品的色谱数据进行统一处理, 在此基础上提取各样品中稳定出现的共有特征峰, 并构建能够反映其整体化学组成特征的参考指纹图谱, 用于后续相似性评价。

1.3.7 抑菌活性测定

取-80℃保存的菌株瓷珠, 划线接种于 LB 固体培养基, 37℃培养 16 h 后, 挑取单菌落接种到 100 mL LB 液体培养基, 37℃、180 r min⁻¹ 摇床培养 16 h, 用无菌生理盐水调整菌浓度至 1.0×10⁸ CFU/mL, 吸取 200 μL 菌液均匀涂布于 LB 琼脂培养基中, 分别吸取 200 μL 三叶草蜂蜜溶液 (2.0 g mL⁻¹)、苜蓿蜂蜜溶液 (2.0 g mL⁻¹) 依次加入牛津杯中, 以 200 μL 氨苄青霉素钠 (30 μg mL⁻¹) 为阳性对照、200 μL 灭菌的蒸馏水为阴性对照。37℃培养 16 h, 用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.4 数据分析

所有蜂蜜样品均进行三次重复测定, 实验结果以均值±标准差 (Mean±SD) 表示。样品间的统计分析使用 IBM SPSS Statistics 29.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) 进行, 以评估不同样品在特征性化合物含量上的差异。蜂蜜化学指纹图谱相似性分析采用《中国药典》2004A 版的色谱指纹相似性评价系统进行, 以比较不同样品的整体化学特征。

2 结果与讨论

2.1 苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜孢粉学分析

蜜蜂在采集花蜜过程中会将蜜源植物的花粉颗粒一同带入蜂蜜中, 蜂蜜孢粉学分析是单花种蜂蜜蜜源植物溯源与鉴别的重要方法。根据 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 10 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。本试验采用光学显微镜对苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜中的花粉形态特征进行观察与鉴定, 结果如图 1 所示。本研究中测定的苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜的花粉率分别为 66.7% 和 72.6%, 根据上述结论可认定本研究对象为苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜。因此, 根据该蜂蜜中的花粉率和花粉形态特征可以推断其植物来源为苜蓿和三叶草。

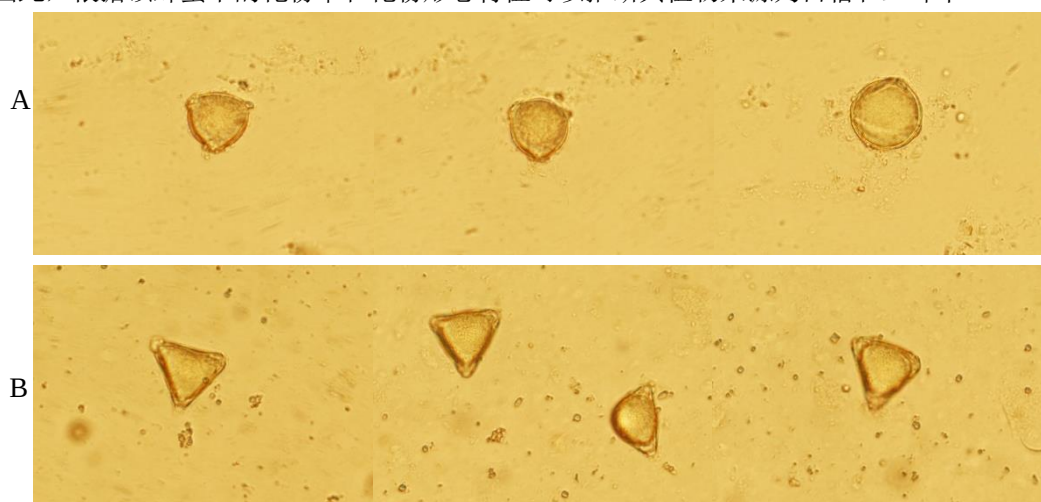


图 1 苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜花粉孢子图

Fig.1 Pollen Morphology of Alfalfa Honey and Clover Honey

注: 图 A 为苜蓿蜂蜜花粉孢子图; 图 B 为三叶草蜂蜜花粉孢子图。

2.2 特征性成分鉴定

如图 2 所示, 苜蓿蜂蜜 (A) 与三叶草蜂蜜 (B) 的 HPLC 图谱存在明显差异。通过 HPLC-MS/MS 对特征峰进行鉴定, 共检测到 17 个化合物 (表 1), 包括酚酸及酚酸酯类 (4 个)、黄酮及黄酮苷类 (8 个)、酚胺类 (1 个)、

萜类（3 个）及其它类成分（1 个）。结果表明，两种蜂蜜在化合物组成方面存在明显差异，其中 4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮和脱落酸类化合物仅在苜蓿蜂蜜中检出，而在三叶草蜂蜜中未检测到，因此可作为苜蓿蜂蜜的潜在特征性成分。相较之下，N1,N5,N10-三-对-香豆酰亚精胺和山奈酚-3-O-鼠李糖苷仅存在于三叶草蜂蜜中，表现出较强的植物来源特异性，可作为区分三叶草蜂蜜的潜在特征性标记物。此外，两种蜂蜜在部分黄酮类和酚酸类化合物组成上也存在一定差异。例如，木犀草素、短叶松素及高良姜素仅在三叶草蜂蜜中检出，而山奈酚则主要存在于苜蓿蜂蜜中。然而，由于部分黄酮和酚酸类化合物在多种单花蜂蜜中普遍存在，其植物来源特异性相对较弱，因此更适合作为辅助差异性成分，而非单一特征性标记物。

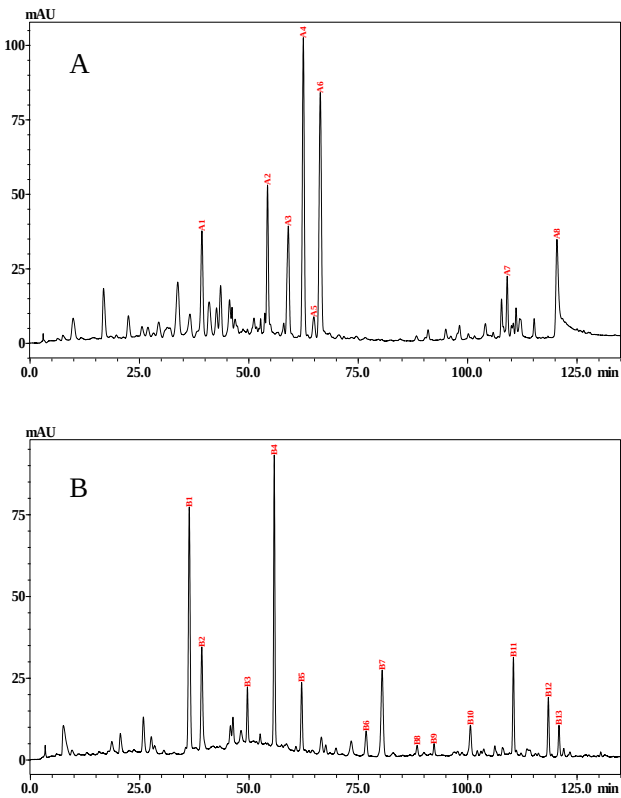


图 2 苜蓿蜂蜜(A)和三叶草(B)样品的 HPLC 图

Fig.2 HPLC chromatograms of alfalfa honey and clover honey samples

注：A1: *p*-香豆酸；A2: 丁酸甲酯；A3: 反,反-脱落酸；A4: 光色素；A5: 4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮；A6: 顺,反-脱落酸；A7: 芹菜素；A8: 山奈酚；B1: 3,4-二甲氧基苯甲酸；B2: *p*-香豆酸；B3: 3,4-二甲氧基苯乙酸；B4: 丁酸甲酯；B5: 光色素；B6: 木犀草素；B7: 短叶松素；B8: 山奈酚-3-O-鼠李糖苷；B9: 芹菜素；B10: N1,N5,N10-三-对-香豆酰亚精胺；B11: 松属素；B12: 柯因；B13: 高良姜素。

表 1 苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜成分信息

Table 1 Component information of alfalfa honey and clover honey

序号	化合物	保留时间/min	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	分子量	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}-\text{H}]^-$
A1	<i>p</i> -香豆酸	50.277	309	164	-	163.082 2
A2	丁酸甲酯	66.453	275	212	213.073 9	-
A3	反,反-脱落酸	76.1	264	264	265.143 7	263.187 3
A4	光色素	78.653	261	242	243	-
A5	4-(连二烯-3'-甲基酮)-3, 5, 5-三甲基-2-环己烯酮	81.49	283	204	205.122 2	-
A6	顺,反-脱落酸	85.463	262	264	265.140 9	263.188 2
A7	芹菜素	116.105	267	270	271.059 8	269.107 0
A8	山奈酚	120.645	352	286	287.088 8	285.140 6
B1	3,4-二甲氧基苯甲酸	46.313	307	182	-	181.060 4

B2	<i>p</i> -香豆酸	51.703	310	164	-	163.038 5
B3	3,4-二甲氧基苯乙酸	59.364	290 322	196	-	195.043 8
B4	丁香酸甲酯	67.866	275	212	213.109 5	211.065 8
B5	光色素	78.931	260	242	243.081 4	-
B6	木犀草素	95.104	286	286	287.084 3	285.061 7
B7	短叶松素	99.076	291	272	273.069 1	271.050 1
B8	山奈酚-3-O-鼠李糖苷	103.616	322	432	433.103 9	-
B9	芹菜素	110.425	268	270	271.089 9	269.070 3
B10	N1,N5,N10-三-对-香豆酰亚精胺	114.965	310	583	584.261 6	582.256 4
B11	松属素	121.774	289	256	257.070 4	255.051 9
B12	柯因	128.016	268,315	254	255.050 7	253.034 5
B13	高良姜素	130.286	264	270	271.003 9	269.027 9

2.2.1 酚酸及酚酸酯类化合物

本研究共鉴定出 3 个酚酸及 1 酚酸酯类化合物，包括 *p*-香豆酸（A1&B2）、3,4-二甲氧基苯甲酸（B1）、3,4-二甲氧基苯乙酸（B3）和丁香酸甲酯（A2&B4）。图 2 展示了本研究鉴定的酚酸及酚酸酯类化合物的负离子模式 LC-MS/MS 图谱。通过与标准品及文献数据对比，可以确认 *p*-香豆酸、3,4-二甲氧基苯甲酸、3,4-二甲氧基苯乙酸和丁香酸甲酯的峰归属。

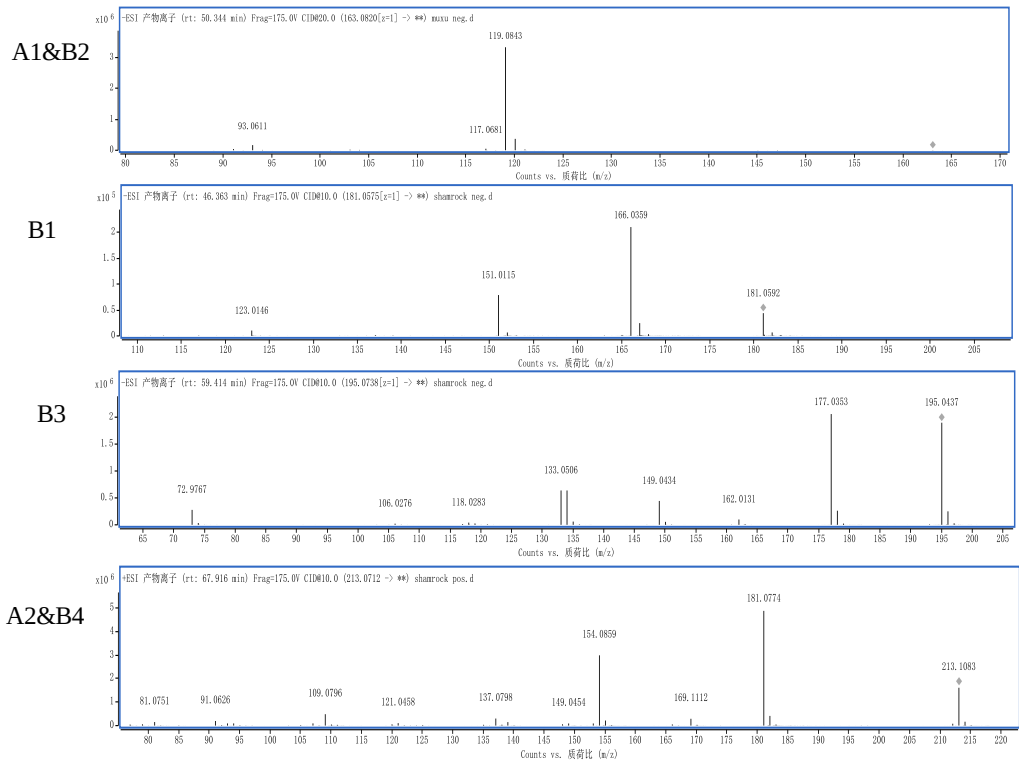


图 3 酚酸及酚酸酯类化合物的 LC-MS/MS 图谱

Fig.3 LC-MS/MS spectra of phenolic acids and phenolic acid esters

2.2.2 黄酮及黄酮苷类化合物

本研究共鉴定出 7 个黄酮及 1 个黄酮苷类化合物，包括芹菜素（A7/B9）、山奈酚（A8）、木犀草素（B6）、短叶松素（B7）、山奈酚-3-O-鼠李糖苷（B8）、松属素（B11）、柯因（B12）和高良姜素（B13）。

如图 4 所示，本研究对在两种蜂蜜中鉴定出的黄酮类化合物骨架及其主要取代基类型进行了整理。图中 R1、R2 和 R3 分别对应 B 环 3'位、4'位和 C 环 3 位取代基。芹菜素、山奈酚、木犀草素、柯因、高良姜素等化合物均纳入该通式中，短叶松素和松属素 C 环饱和无双键，其结构与典型黄酮骨架存在差异。该图直观展示了不同蜂蜜中黄酮类化合物的结构特点及取代基差异，有助于理解其化学多样性及潜在的植物来源特征。

如图5所示,山奈酚-3-O-鼠李糖苷(B8)在正离子模式下检测到准分子离子峰 m/z 433.103 9 $[M+H]^+$ 。其二级质谱中产生特征碎片离子 m/z 287.047 8, 为鼠李糖基(146 u)中性丢失形成的山奈酚苷元,表明该化合物含有一个鼠李糖基结构。此外,还检测到 m/z 147.060 5、129.050 2 等特征碎片离子,与文献报道的山奈酚糖苷类化合物裂解规律基本一致^[33]。因此,结合一级质谱、二级质谱及相关文献数据,并通过标准品进行验证,最终将该化合物鉴定为山奈酚-3-O-鼠李糖苷。

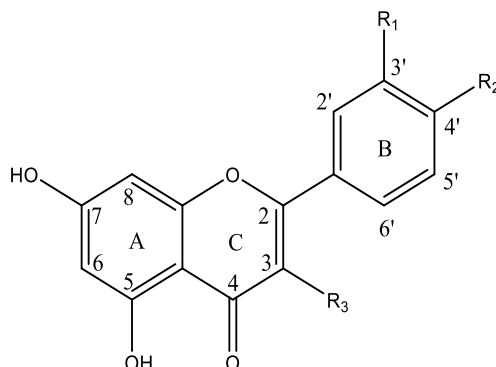


图4 两种蜂蜜中黄酮类化合物骨架结构及取代基类型

Fig.4 Skeletal structures and substituent types of flavonoids in the two honey samples

注: 芹菜素: R1:H;R2:OH;R3:H; 山奈酚: R1:H;R2:OH;R3:OH; 木犀草素: R1:OH;R2:OH;R3:H; 短叶松素:R1:H;R2:H;R3:OH; C环C2-C3位为单键; 松属素:R1:H;R2:H;R3:H; C环C2-C3位为单键; 柯因: R1:H;R2:H;R3:H; 高良姜素: R1:H;R2:H;R3:OH。

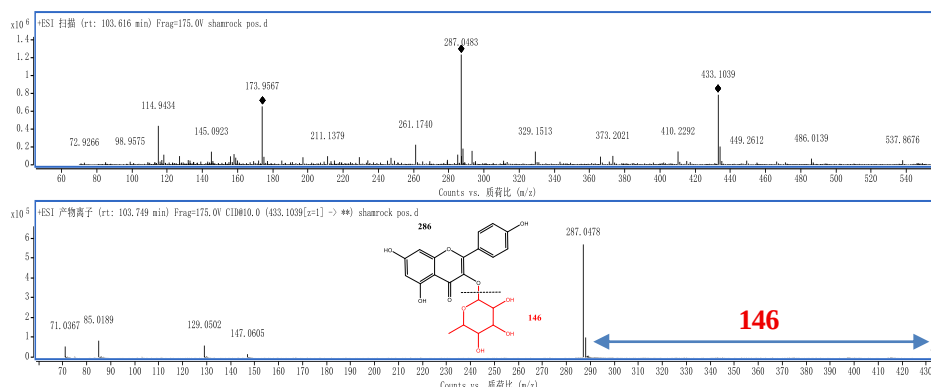


图5 山奈酚-3-O-鼠李糖苷(B8)的LC-MS/MS图谱

Fig.5 LC-MS/MS spectrum of kaempferol-3-O-rhamnoside (B8)

2.2.3 酚胺类化合物

本研究共鉴定出1个酚胺类化合物,即N1,N5,N10-三-对-香豆酰亚精胺(B10)。如图6所示,该化合物在二级质谱中存在准分子离子峰 m/z 584.261 0 $[M+H]^+$, m/z 147.039 0 $[M+H]^+$ 为准分子离子峰连续丢失三个对香豆酰碎片(146 u)得到,表明该化合物含有三个对香豆酰结构。此外,还检测到 m/z 204.096 9 酚胺类化合物特征碎片离子,因此,结合质谱及相关文献数据^[34],并通过标准品进行验证,最终将该化合物鉴定为N1,N5,N10-三-对-香豆酰亚精胺。

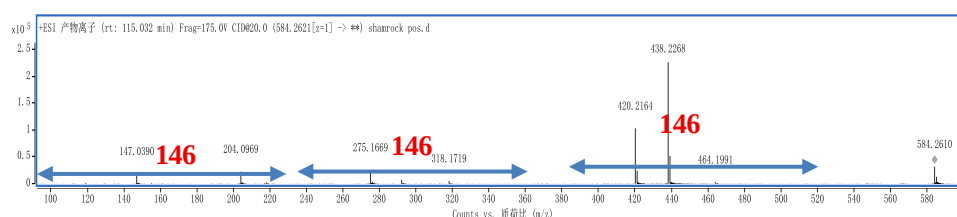


图6 N1, N5, N10-三-对-香豆酰亚精胺(B10)的LC-MS/MS图谱

Fig.6 LC-MS/MS spectrum of N1, N5, N10-tri-p-coumaroyl spermidine (B10)

2.2.4 萜类化合物

本研究共鉴定出 3 个萜类化合物,包括反,反-脱落酸(A3)、顺,反-脱落酸(A6)和 4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮(A5)。如图 7 所示,化合物 A5 在 ESI⁺模式下产生准分子离子峰 m/z 205.120 8 [M+H]⁺, 推测其分子式为 C₁₃H₁₆O₂。其 MS/MS 裂解过程中,首先发生脱水反应,形成特征碎片离子 m/z 187.111 7。随后,该离子进一步发生侧链断裂及中性小分子丢失,产生 m/z 163.111 3、147.080 0、129.070 0、121.060 0、119.090 0 和 105.070 0 等特征离子峰。其中, m/z 163.11 为脱除 C₂H₂O 后形成的主要碎片离子,丰度最高; m/z 147.08 则由进一步脱除 CH₄形成; m/z 129.07 来源于 m/z 147.08 的脱水过程。此外, m/z 105.07、91.05、79.05、77.04 和 65.04 等低质量碎片离子主要由侧链连续断裂及环状结构重排产生,反映了该化合物具有典型的降异戊二烯类骨架裂解特征。结合其保留时间、精确分子量、特征裂解规律及相关文献数据^[35],推测化合物 A5 为 4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮。化合物 A3、A4 与化合物 A5 均属于降异戊二烯类化合物,二者在生物合成途径上具有一定相关性,均来源于类胡萝卜素的氧化裂解过程,其质谱裂解行为中表现出部分相似的特征离子峰和碎裂规律。

已有研究表明,苜蓿蜂蜜富含酚类和黄酮类化合物,并具有一定的抗氧化活性。Shehata 等^[36]研究发现,苜蓿蜂蜜中检出 14 种酚类化合物,其中包括多种酚酸及黄酮类成分。本研究同样检测到 *p*-香豆酸、芹菜素和山奈酚等典型酚类化合物。同时,本研究进一步发现了降异戊二烯类化合物在苜蓿蜂蜜中的特征分布,为苜蓿蜂蜜的蜜源鉴别和真实性评价提供了新的化学依据。

此外,本研究进一步丰富了三叶草蜜的植物化学组成信息,与 Sultana 等^[37]的综述比叫来看,均表明三叶草蜜富含黄酮及酚类化合物。同时,本研究首次从中国三叶草蜂蜜样品中筛选出山奈酚-3-O-鼠李糖苷和 N1,N5,N10-三-对-香豆酰亚精胺等具有较强蜜源指示意义的特征性成分,为三叶草蜜真实性评价提供了新的化学标志物。

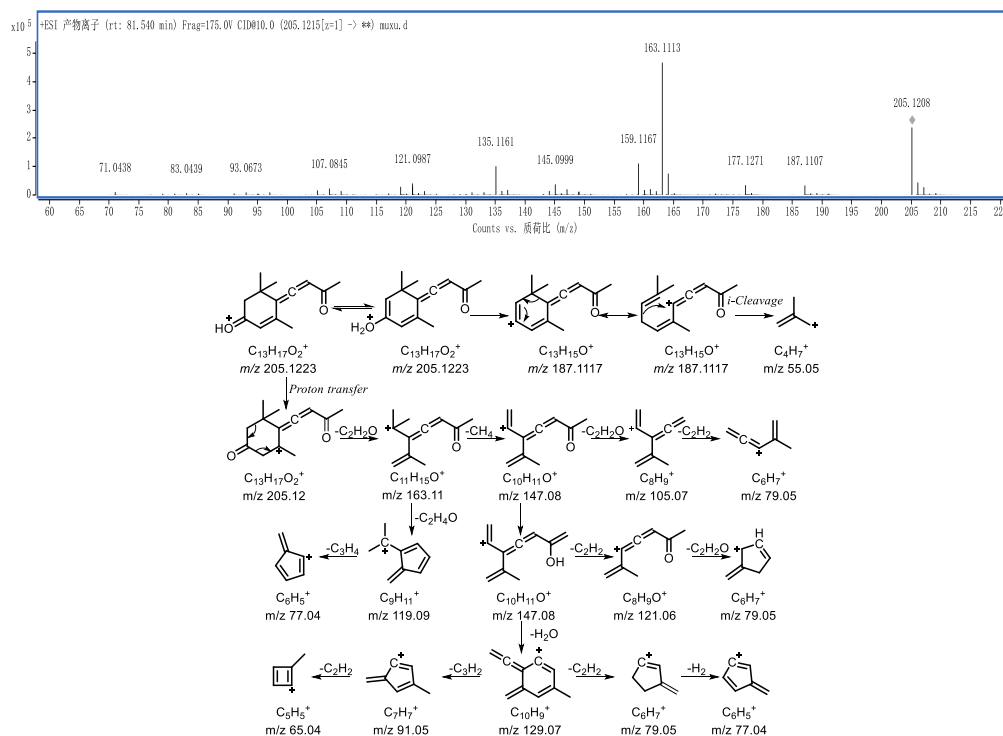


图 7 化合物 A5 的 LC-MS/MS 图谱及断裂规律

Fig.7 LC-MS/MS spectrum and fragmentation pattern of compound A5

2.3 特征性成分定量分析

为进一步验证苜蓿蜂蜜与三叶草蜂蜜之间的化学组成差异,对鉴定得到的特征性成分进行了定量分析(表 2、表 3)。结果表明,两种蜂蜜均含有 *p*-香豆酸、丁香酸甲酯、光色素和芹菜素等共有成分,但其含量分布存在明显差异。其中,苜蓿蜂蜜中 *p*-香豆酸含量为 145.32~265.54 $\mu\text{g}/100\text{ g}$,平均含量为 211.56 $\mu\text{g}/100\text{ g}$,显著高于三叶草蜂蜜(59.62~103.57 $\mu\text{g}/100\text{ g}$,平均 79.43 $\mu\text{g}/100\text{ g}$);光色素在苜蓿蜂蜜中的平均含量为 119.60 $\mu\text{g}/100\text{ g}$,而在三叶草蜂蜜中仅为 51.11 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。相反,丁香酸甲酯在两种蜂蜜中均为优势成分,其平均含量分别为

250.14 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 和 238.34 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 差异相对较小。

脱落酸类化合物主要分布于苜蓿蜂蜜中。其中, 顺、反-脱落酸含量最高, 为 298.56~322.58 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 平均达到 310.49 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 反、反-脱落酸含量为 85.64~129.58 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 平均 106.46 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 而在三叶草蜂蜜中均未检出。同样仅在苜蓿蜂蜜中检出, 含量范围为 6.32~18.32 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。上述结果进一步证明脱落酸类化合物和 4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮具有较强的苜蓿蜜源植物特异性, 可作为苜蓿蜂蜜的重要潜在标志物。

与之相对应, 三叶草蜂蜜中检出的木犀草素、短叶松素、山奈酚-3-O-鼠李糖苷、N1,N5,N10-三对香豆酰亚精胺、松属素、柯因及高良姜素等化合物均未在苜蓿蜂蜜中发现。其中, 短叶松素和松属素含量相对较高, 平均含量分别达到 55.67 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 和 59.11 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; N1,N5,N10-三对香豆酰亚精胺含量为 10.67~37.29 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 平均 24.30 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 山奈酚-3-O-鼠李糖苷含量为 2.68~6.73 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。由于这些化合物仅存在于三叶草蜂蜜中, 表现出明显的蜜源植物专属性, 因此可作为区分三叶草蜂蜜的重要候选标志物。

此外, 山奈酚主要存在于苜蓿蜂蜜中, 其平均含量为 68.61 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 而三叶草蜂蜜则富集松属素、柯因和高良姜素等黄酮类成分, 表明两种蜂蜜在黄酮组成和代谢特征方面存在显著差异。

已有研究表明, 不同蜜源蜂蜜在酚酸、黄酮及其他植物源次级代谢产物组成方面存在显著差异。Shehata 等^[36]对苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜中的酚类化合物进行比较分析时发现, 三叶草蜂蜜中酚类化合物的种类和总含量均高于苜蓿蜂蜜。在本研究中, 三叶草蜂蜜中共检出 13 种特征性成分, 而苜蓿蜂蜜中仅检出 8 种特征性成分, 表明三叶草蜂蜜具有更丰富的植物化学组成。然而, 与已有研究主要关注酚类化合物不同, 本研究进一步发现两种蜂蜜在降异戊二烯类和酚胺类化合物组成方面也存在明显差异。

其中, 反、反-脱落酸和顺、反-脱落酸仅在苜蓿蜂蜜中检出, 平均含量分别达到 106.46 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 和 310.49 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 而在三叶草蜂蜜中均未检出; 4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮同样仅存在于苜蓿蜂蜜中, 表明这些降异戊二烯类化合物具有较强的蜜源植物专属性。脱落酸及其相关代谢产物广泛存在于豆科植物中, 并被认为是与植物生长发育及逆境响应密切相关, 本研究进一步从定量角度证实了其在苜蓿蜂蜜中的富集特征。与此同时, N1,N5,N10-三对香豆酰亚精胺和山奈酚-3-O-鼠李糖苷仅在三叶草蜂蜜中检出, 平均含量分别为 24.30 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 和 4.47 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 表现出良好的蜜源特异性。上述结果表明, 除共有的酚酸和黄酮类成分外, 降异戊二烯类化合物和酚胺类化合物在区分苜蓿蜂蜜与三叶草蜂蜜方面具有更高的鉴别价值。

综合定性与定量结果, 脱落酸类化合物和 4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮可作为苜蓿蜂蜜的潜在特征性标志物, 而 N1,N5,N10-三对香豆酰亚精胺和山奈酚-3-O-鼠李糖苷则可作为三叶草蜂蜜的潜在特征性标志物, 为两种蜂蜜的真实性鉴别和蜜源植物溯源提供了可靠的化学依据。

.....

表 2 苜蓿原料蜜中化合物含量 (μg/100 g)

Table 2 Contents of compounds in raw alfalfa honey (μg/100 g)

化合物		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
酚酸及酚酸酯类 化合物	<i>p</i> -香豆酸	263.89±0.12	207.54±0.04	200.66±0.18	177.89±0.16	265.54±0.09	145.32±0.05	232.18±0.04	199.45±0.09
	丁香酸甲酯	288.59±0.11	310.44±0.12	254.68±0.16	249.58±0.08	233.59±0.03	219.73±0.06	199.57±0.05	244.95±0.1
萜类化合物	反,反-脱落酸	100.98±0.06	129.58±0.18	99.65±0.11	85.64±0.05	127.58±0.08	109.35±0.07	-	98.87±0.14
	4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮	12.35±0.01	-	14.66±0.08	11.98±0.06	10.68±0.05	6.32±0.06	-	18.32±0.07
	顺,反-脱落酸	322.58±0.03	298.56±0.05	315.98±0.06	311.69±0.12	316.65±0.1	299.31±0.08	318.26±0.09	300.89±0.18
黄酮及黄酮苷类 化合物	芹菜素	38.97±0.06	49.67±0.08	51.63±0.07	-	36.22±0.02	40.65±0.11	44.36±0.11	55.23±0.05
	山奈酚	65.23±0.11	59.65±0.09	55.87±0.05	98.65±0.07	49.65±0.09	87.69±0.13	54.32±0.09	75.62±0.12
其他类化合物	光色素	99.84±0.09	95.65±0.04	143.21±0.05	154.97±0.12	100.86±0.02	155.65±0.06	106.54±0.09	100.09±0.08

注：数值均为三次试验平均值。

表 3 三叶草原料蜜中化合物含量 (μg/100 g)

Table 3 Contents of compounds in raw clover honey (μg/100 g)

化合物		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
酚酸及酚酸酯 类化合物	3,4-二甲氧基苯甲酸	157.94±0.09	144.68±0.06	123.95±0.12	176.35±0.07	130.59±0.11	195.64±0.13	128.94±0.15	180.42±0.03
	<i>p</i> -香豆酸	72.85±0.08	59.62±0.09	62.35±0.1	80.56±0.11	103.57±0.02	-	65.49±0.08	90.57±0.11
	3,4-二甲氧基苯乙酸	68.43±0.04	43.29±0.08	33.09±0.09	56.27±0.12	38.07±0.16	29.54±0.05	67.24±0.13	40.63±0.11
	丁香酸甲酯	292.65±0.08	194.63±0.13	234.56±0.19	278.42±0.11	299.83±0.15	205.14±0.12	211.98±0.09	189.54±0.05

黄酮及黄酮 苷类化合物	木犀草素	4.68±0.05	12.87±0.02	2.38±0.08	7.06±0.01	9.83±0.05	5.66±0.08	11.53±0.06	15.37±0.09
	短叶松素	44.27±0.06	56.29±0.12	79.58±0.04	39.99±0.05	65.89±0.07	35.87±0.03	46.92±0.15	70.59±0.11
	山奈酚-3-O-鼠李糖苷	2.68±0.05	-	5.08±0.08	5.93±0.01	4.68±0.07	-	6.73±0.02	3.94±0.1
	芹菜素	1.68±0.08	2.06±0.02	-	2.98±0.03	4.29±0.06	3.67±0.05	2.08±0.03	-
	松属素	70.65±0.12	69.57±0.17	45.31±0.11	84.65±0.04	56.94±0.05	64.2±0.09	33.25±0.13	47.95±0.18
	柯因	26.91±0.03	46.37±0.04	18.37±0.17	50.82±0.06	38.69±0.04	59.34±0.09	58.37±0.16	22.73±0.13
	高良姜素	25.67±0.07	15.39±0.15	22.97±0.09	5.92±0.06	10.65±0.06	-	10.85±0.05	19.58±0.11
酚胺类化合物	N1,N5,N10-三-对-香豆酰亚精胺	15.29±0.09	-	27.68±0.06	10.67±0.07	19.64±0.03	30.68±0.08	28.92±0.01	37.29±0.11
其他类化合物	光色素	23.59±0.09	45.32±0.05	39.82±0.07	-	71.21±0.11	55.91±0.16	60.83±0.08	64.08±0.14

注：数值均为三次试验平均值。

2.4 两种蜂蜜 HPLC 指纹图谱建立

采用色谱指纹图谱相似度评价系统对两种蜂蜜原料样品的 HPLC 数据进行处理，通过共有峰匹配和保留时间校正建立参考指纹图谱。分析结果显示，各样品与对应对照指纹图谱之间的相似度均大于 0.80，说明样品具有较好的整体一致性。苜蓿蜜和三叶草蜜的指纹图谱如图 8 和图 9 所示。

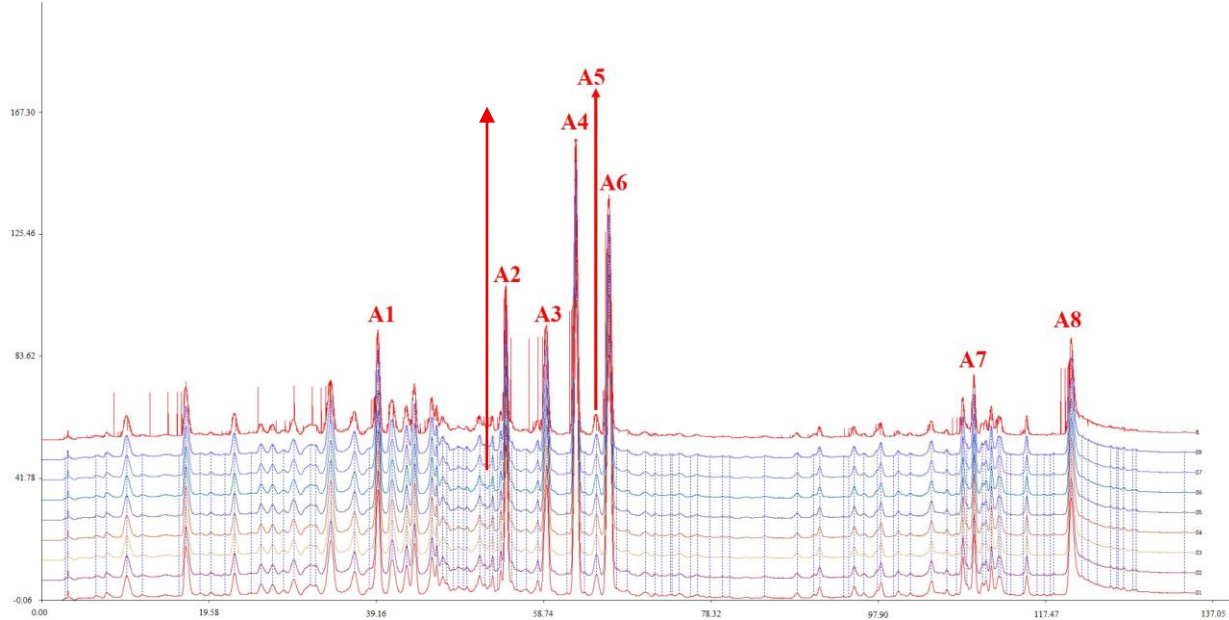


图 8 苜蓿原料蜜样品生成的指纹图谱
Fig.8 Fingerprint chromatogram generated from raw alfalfa honey samples

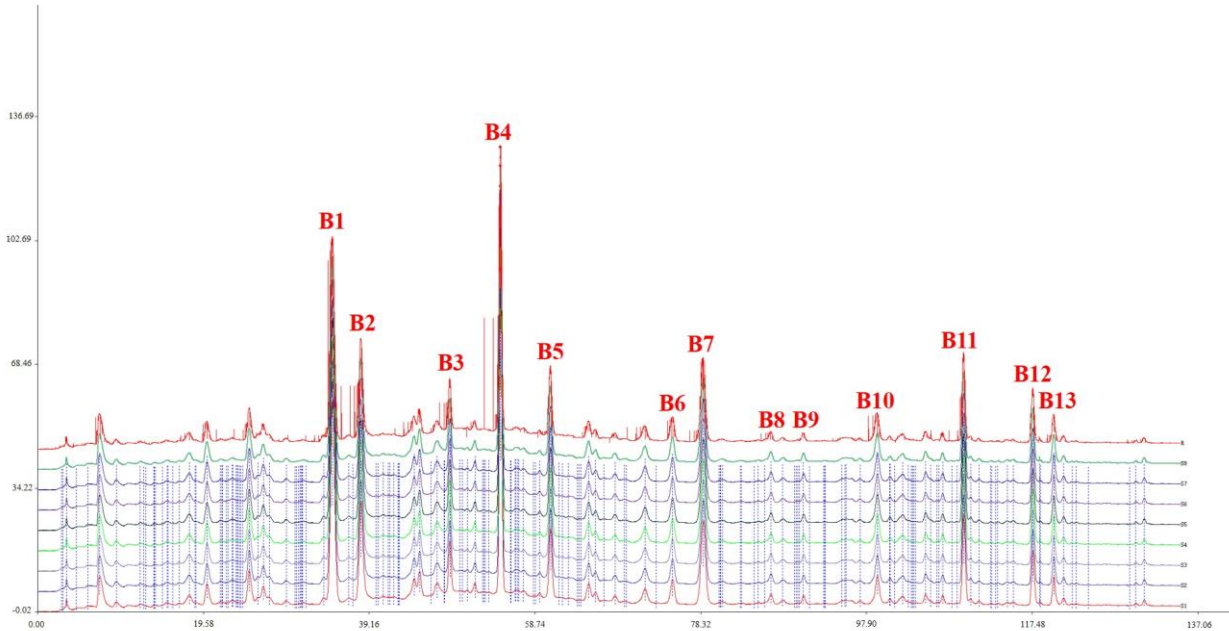


图 9 三叶草原料蜜样品生成的指纹图谱
Fig.9 Fingerprint chromatogram generated from raw clover honey samples

2.5 两种市售蜂蜜的真实性的评价

本研究进一步对 6 个市售苜蓿蜂蜜和 6 个市售三叶草蜂蜜样品进行了真实性评价。6 个市售苜蓿蜂蜜和 6 个市售三叶草蜂蜜的 HPLC 色谱图如图 10、图 11 所示。结果表明，在市售苜蓿蜂蜜样品中，E1、E2 和 E3 的 HPLC

色谱图与苜蓿蜂蜜标准指纹图谱具有较高一致性,且均检出了原料苜蓿蜂蜜中鉴定的8个特征性成分,其含量水平亦与原料蜜较为接近,3种苜蓿商品蜜的定量分析如表5所示。表明上述样品是真正的苜蓿蜂蜜。相比之下,E4、E5和E6的色谱图与苜蓿蜂蜜标准指纹图谱差异较大,均未检出鉴定出的苜蓿蜂蜜的特征性成分,说明E4、E5和E6均不是苜蓿蜂蜜。其中,值得注意的是,E5的色谱特征与三叶草蜂蜜标准指纹图谱高度相似,并检出了原料三叶草蜂蜜中鉴定的13个特征性成分且特征性成分含量与三叶草原料蜜特征性成分含量接近,其特征性成分含量如表6所示,说明E5是标识苜蓿蜂蜜的三叶草蜂蜜。

在市售三叶草蜂蜜样品中,F1、F2、F3和F4的HPLC色谱图与三叶草蜂蜜标准指纹图谱表现出较高一致性,且均检出了原料三叶草蜂蜜中鉴定的13种特征性成分,各特征成分含量与原料蜜基本一致,4种三叶草商品蜜的定量分析如表5所示说明上述样品具有较好的三叶草蜂蜜真实性特征。而F5和F6的色谱图与三叶草蜂蜜标准指纹图谱存在明显差异,未能呈现典型三叶草蜂蜜的特征性化学组成。综上所述,市售苜蓿蜂蜜E1、E2和E3可判定为真实性较高的苜蓿蜂蜜,E5则推测为三叶草蜂蜜;市售三叶草蜂蜜F1、F2、F3和F4可判定为真实性较高的三叶草蜂蜜,而E4、E6、F5和F6可能并非真实的苜蓿蜂蜜或三叶草蜂蜜,提示部分市售蜂蜜存在品种标识不符或来源不明确的问题。

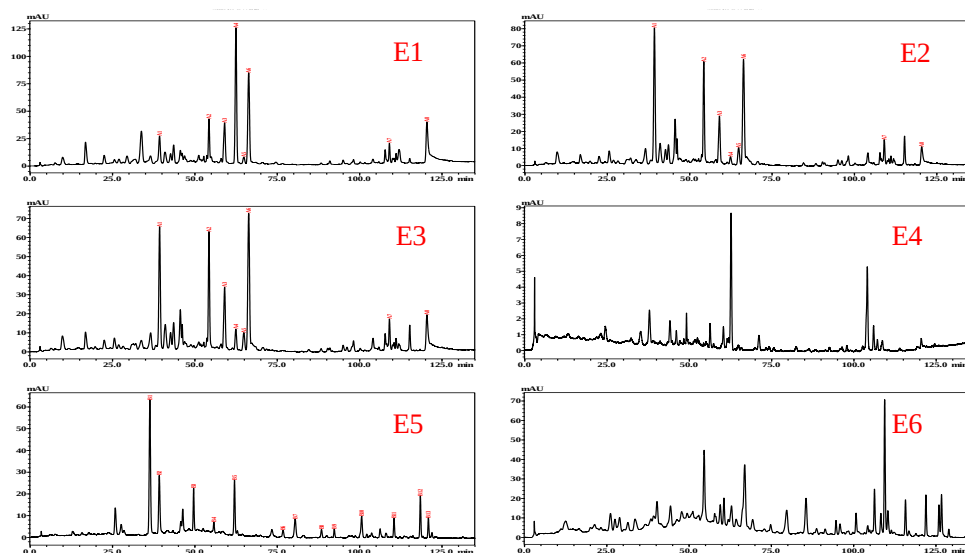


图 10 六种市售苜蓿蜂蜜的 HPLC 色谱图

Fig.10 HPLC chromatograms of six commercial alfalfa honey samples

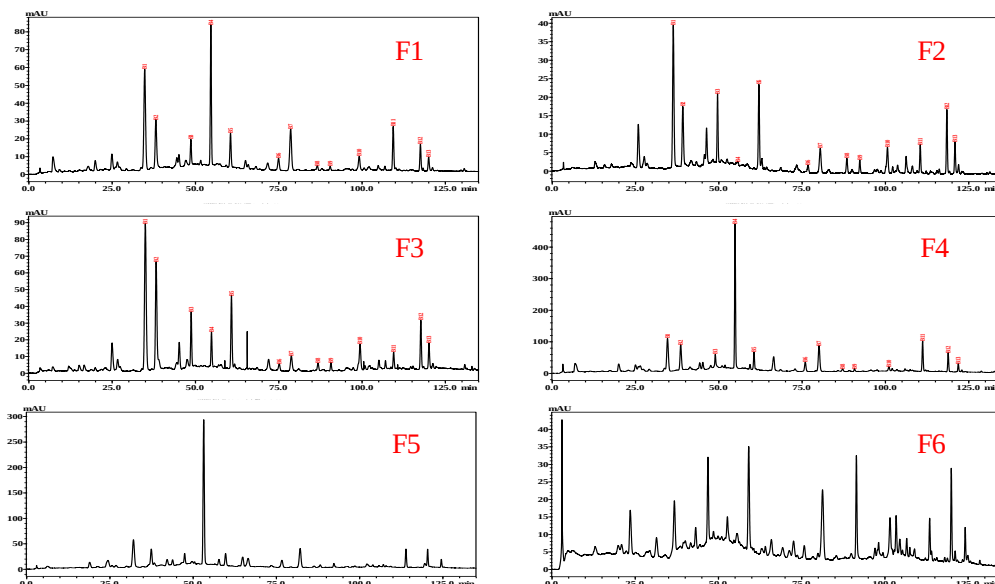


图 11 六种市售三叶草蜂蜜的 HPLC 色谱图

Fig.11 HPLC chromatograms of six commercial clover honey samples

表 4 市售苜蓿商品蜜特征性成分定量分析 (μ g/100 g)

Table 4 Quantitative analysis of characteristic components in commercial alfalfa honey (μg/100 g)

化合物	E1	E2	E3
<i>p</i> -香豆酸	124.87±0.12	256.47±0.09	196.35±0.14
丁香酸甲酯	199.67±0.08	173.98±0.16	188.24±0.05
反,反-脱落酸	154.38±0.11	124.05±0.06	96.28±0.08
光色素	301.29±0.19	10.25±0.01	20.67±0.03
4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮	9.18±0.03	8.18±0.04	11.67±0.01
顺,反-脱落酸	256.87±0.15	168.83±0.05	288.65±0.16
芹菜素	90.58±0.08	68.24±0.04	61.29±0.07
山奈酚	185.38±0.13	61.25±0.06	83.67±0.04

注：数值均为三次试验平均值。

表 5 市售三叶草商品蜜特征性成分定量分析 (μ g/100 g)

Table 5 Quantitative analysis of characteristic components in commercial clover honey (μg/100 g)

化合物	E5	F1	F2	F3	F4
3,4-二甲氧基苯甲酸	265.38±0.08	198.64±0.11	167.98±0.19	257.39±0.16	257.39±0.15
<i>p</i> -香豆酸	149.37±0.16	121.09±0.1	53.33±0.04	199.37±0.03	199.37±0.14
3,4-二甲氧基苯乙酸	101.39±0.13	38.19±0.08	68.54±0.03	79.51±0.07	79.51±0.04
丁香酸甲酯	13.48±0.08	256.87±0.05	1.34±0.01	409.88±0.13	409.88±0.18
光色素	120.68±0.11	66.28±0.09	70.94±0.04	99.44±0.09	99.44±0.07
木犀草素	9.57±0.09	7.08±0.03	5.23±0.04	23.92±0.02	23.92±0.06
短叶松素	20.41±0.07	79.64±0.09	12.67±0.01	154.27±0.04	154.27±0.12
山奈酚-3-O-鼠李糖苷	7.44±0.03	6.44±0.05	8.39±0.06	2.66±0.04	2.66±0.01
芹菜素	5.64±0.06	4.99±0.08	9.01±0.02	3.54±0.06	3.54±0.09
N1,N5,N10-三-对-香豆酰亚精胺	43.29±0.05	13.84±0.07	12.84±0.02	9.35±0.08	9.35±0.01
松属素	29.54±0.06	97.58±0.05	15.69±0.01	249.37±0.03	249.37±0.12
柯因	78.56±0.06	20.67±0.02	49.67±0.09	108.64±0.16	108.64±0.15
高良姜素	39.57±0.03	12.88±0.05	20.37±0.09	54.19±0.17	54.19±0.13

注：数值均为三次试验平均值。

2.6 苜蓿蜜和三叶草蜜抑菌效果

如表 6、图 12 所示，与灭菌蒸馏水相比，三叶草蜂蜜对大肠杆菌的抑菌作用显著，平均抑菌圈直径为 23.37 mm，而苜蓿蜂蜜对大肠杆菌未产生明显抑菌圈。与阳性对照（氨苄青霉素钠 30 μg·mL⁻¹，抑菌圈直径 25.42 mm）相比，三叶草蜂蜜虽然抑菌活性略低，但仍表现出明显的抗菌效果。结果表明，三叶草蜂蜜的活性成分在一定浓度下能够有效抑制大肠杆菌生长，而苜蓿蜂蜜由于活性成分含量较低或组成差异，对大肠杆菌无抑菌作用。

已有研究表明^[38]，蜂蜜的抑菌活性与其渗透压、酸度、过氧化氢含量以及酚酸、黄酮等植物源活性成分密切相关，不同蜜源蜂蜜的抑菌能力往往存在明显差异。部分研究报道^[39]，蜂蜜对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等常见致病菌具有一定抑制作用，而其抑菌效果与蜂蜜中酚类和黄酮类化合物含量密切相关。在本研究中，三叶草蜂蜜对大肠杆菌表现出明显抑制作用，平均抑菌圈直径达到 23.37 mm，接近阳性对照氨苄青霉素钠（25.42 mm），表明其具有较好的抑菌活性。

相比之下，苜蓿蜂蜜未形成明显抑菌圈，显示其对大肠杆菌的抑制作用较弱。结合特征性成分分析结果可知，三叶草蜂蜜中富含木犀草素、短叶松素、松属素、高良姜素、3,4-二甲氧基苯甲酸、3,4-二甲氧基苯乙酸以及 N1,N5,N10-三对香豆酰亚精胺等酚类和酚胺类化合物，可能与三叶草蜂蜜的抗菌活性存在一定关联。苜蓿蜂蜜虽然含有较高水平的降异戊二烯类化合物，但其抗菌贡献可能相对有限。因此，两种蜂蜜抑菌活性的差异可能与其植物化学组成的不同有关，但本研究尚未对上述单体化合物进行独立抑菌活性验证，因此目前不能明确判定其是

否直接参与三叶草蜜的抑菌作用。上述结果进一步表明，植物源特征性成分不仅可用于蜂蜜真实性评价，也可能影响蜂蜜的生物活性表现，但其具体作用机制仍有待进一步研究。

表 6 苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜抑菌圈直径 (mm)

Table 6 Inhibition Zone Diameters of Alfalfa Honey and Clover Honey (mm)				
组别	氨苄青霉素钠	苜蓿样品 (C1-C8)	三叶草样品 (D1-D8)	无菌水
1	25.58 ±0.12	-	23.58 ±0.08	-
2	25.21 ±0.06	-	23.11 ±0.12	-
3	25.36 ±0.13	-	22.94 ±0.09	-
4	25.49 ±0.08	-	23.46 ±0.05	-
5	25.27 ±0.09	-	23.20 ±0.11	-
6	25.64 ±0.13	-	23.69 ±0.07	-
7	25.33 ±0.11	-	23.32 ±0.11	-
8	25.48 ±0.04	-	23.66 ±0.09	-
M±SD	25.42 ±0.15	-	23.37 ±0.26	-

注：数值均为三次试验平均值。

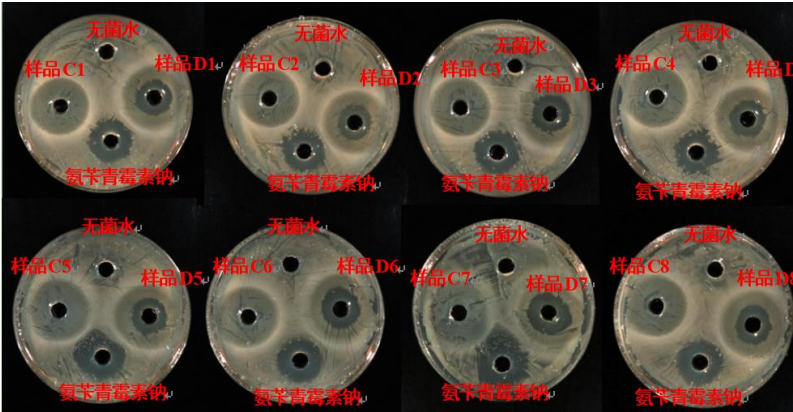


图 12 苜蓿蜜和三叶草蜜抑菌效果

Fig.12 Antibacterial effects of alfalfa honey and clover honey

3 结论

苜蓿和三叶草不仅是重要蜜源植物，也是我国草地生态系统中重要饲草植物，蜜蜂在采集花蜜过程中，同时为苜蓿和三叶草提供授粉服务，有助于提高其结实率、种子产量及繁殖能力，对维持草原生态系统稳定和促进草地资源可持续利用具有重要意义。本研究采用固相萃取结合 HPLC-MS/MS 技术，对苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜中的植物来源特征性成分进行了系统鉴定与定量分析，并建立了两种蜂蜜的 HPLC 指纹图谱用于真实性评价。结果表明，苜蓿蜂蜜与三叶草蜂蜜在化合物组成上存在显著差异。苜蓿蜂蜜中共鉴定出 8 个特征性成分，其中反，反-脱落酸、顺，反-脱落酸和 4-(连二烯-3'-甲基酮)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮表现出较强的蜜源植物特异性；三叶草蜂蜜中共鉴定出 13 个特征性成分，其中山奈酚-3-O-鼠李糖苷和 N1,N5,N10-三-对-香豆酰亚精胺仅在三叶草蜂蜜中检出，可作为其潜在特征性标志物。定量分析进一步验证了上述化合物在两种蜂蜜中的差异分布特征。

基于特征性成分和指纹图谱建立的真实性评价体系能够有效区分苜蓿蜂蜜与三叶草蜂蜜，并成功应用于市售样品评价。结果显示，部分商品蜂蜜存在标称蜜源与实际化学组成不符的现象，表明利用植物来源特征性成分结合指纹图谱进行真实性评价具有较好的可行性和应用价值。

抑菌活性研究表明，三叶草蜂蜜对大肠杆菌具有一定抑制作用，而苜蓿蜂蜜未表现出明显抑菌活性，说明不同蜜源植物导致的植物化学组成差异可能对蜂蜜生物活性产生重要影响。

综上所述，本研究筛选获得了苜蓿蜂蜜和三叶草蜂蜜的潜在特征性标志物，建立了基于植物化合物的真实性评价方法，可为市场监管和蜂蜜质量评价提供科学依据，有助于提高单花蜂蜜真实性鉴别能力，减少掺假产品流通，维护蜂蜜市场秩序，保护优质单花蜂蜜生产者的合法权益，促进蜂蜜产业健康发展，并为蜜源植物资源的合

理开发利用及草地生态系统的可持续发展提供技术支撑。

参考文献

- [1] 高丽娇,盛利,姬聪慧,等.蜂蜜质量及真实性检测方法研究进展[J].现代农业科技,2025(24):124-129.
- [2] GOSLINSKIINSKI M, NOWKA D, SZWENGIEL A. Multidimensional comparative analysis of bioactive phenolic compounds of honeys of various origin [J]. Antioxidants, 2021, 10(4): 530.
- [3] TAFERE D A. Chemical composition and uses of honey: a review [J]. Journal of Food Science and Nutrition Research, 2021, 4(3): 194-201.
- [4] MAJTAN J, BUCEKOVA M, KAFANTARIS I, et al. Honey antibacterial activity: a neglected aspect of honey quality assurance as functional food [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 118: 870-886.
- [5] RANI G N, BUDUMURU R, BANDARU N R. Antimicrobial activity of honey with special reference to ethicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) [J]. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 2017, 11(8): DC05.
- [6] COMBARROS-FUERTE P, ESTEVINHO L M, DIAS L G, et al. Bioactive components and antioxidant and antibacterial activities of different varieties of honey: a screening prior to clinical application [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 67(2): 688-698.
- [7] CZERNICKA M A, SOWA-BOROWIEC P, DUDEK T, et al. Antioxidant capacity of honey enriched by wildflowers [J]. Applied Sciences, 2024, 14(5): 2018.
- [8] DZUGAN M, TOMCZYK M, SOWA P, et al. Antioxidant activity as biomarker of honey variety [J]. Molecules, 2018, 23(8): 2069.
- [9] VUJCIC Bok V, SOLA I, RUSAK G, et al. Phenolic content and antioxidant activity of Croatian and German honey [J]. Acta Pharmaceutica, 2024, 74(4 (Special issue)): 673-692.
- [10] NOOR N, SARFRAZ R A, ALI S, et al. Antitumour and antioxidant potential of some selected Pakistani honeys [J]. Food Chemistry, 2014, 143: 362-366.
- [11] SWELLAM T, MIYANAGA N, ONOZAWA M, et al. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies [J]. International journal of urology, 2003, 10(4): 213-219.
- [12] MASADR J, HANEEFA S M, MOHAMED Y A, et al. The immunomodulatory effects of honey and associated flavonoids in cancer [J]. Nutrients, 2021, 13(4): 1269.
- [13] CAI G, WUSIMAN A, GU P, et al. Supplementation of Alhagi honey polysaccharides contributes to the improvement of the intestinal immunity regulating the structure of intestinal flora in mice [J]. Food & Function, 2021, 12(20): 9693-9707.
- [14] YI S, YU W, CHEN L, et al. Effect of Triadica cochinchinensis honey supplementation on liver metabolomics and gut microbiota in naturally aging mice [J]. Food Bioscience, 2024, 61: 104863.
- [15] WU D, CHEN L, TEH J, et al. Honeys with anti-inflammatory capacity can alter the elderly gut microbiota in an ex vivo gut model [J]. Food Chemistry, 2022, 392: 133229.
- [16] SAIKALY S K, KHACHEMOUNE A. Honey and wound healing: an update [J]. American Journal of Clinical Dermatology, 2017, 18(2): 237-251.
- [17] YUPANQUI MIELES J, VYAS C, ASLAN E, et al. Honey: an advanced antimicrobial and wound healing biomaterial for tissue engineering applications [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(8): 1663.
- [18] WANG H, LI L, LIN X, et al. Composition, functional properties and safety of honey: a review [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2023, 103(14): 6767-6779.
- [19] SILICI S, GOKCEOGLU M. Pollen analysis of honeys from Mediterranean region of Anatolia [J]. Grana, 2007, 46(1): 57-64.
- [20] LAO M R, BAUTISTA VII A T, MENDOZA N D S, et al. Stable carbon isotope ratio analysis of Philippine honeys for the determination of adulteration with C4 sugars [J]. Food Analytical Methods, 2021, 14(7): 1443-1455.
- [21] DU B, WU L, XUE X, et al. Rapid screening of multiclass syrup adulterants in honey by ultrahigh-performance liquid chromatography/quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(29): 6614-6623.
- [22] CAGLIANI L R, MAESTRI G, CONSONNI R. Detection and evaluation of saccharide adulteration in italian honey by NMR spectroscopy [J]. Food Control, 2022, 133: 108574.

- [23] 严丽娟,徐敦明,薛晓锋,等.基于液相色谱-高分辨质谱的代谢组学技术用于麦卢卡蜂蜜的甄别[J].色谱,2019,37(6):589-596.
- [24] QIAO J, CHEN L, KONG L, 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.
- [25] WANG X, CHEN Y, HU Y, et al. Systematic review of the characteristic markers in honey of various botanical, geographic, and entomological origins [J]. ACS Food Science & Technology, 2022, 2(2): 206-220.
- [26] SUHARTATIK N, KARYANTINA M, LESTARI E. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of four types of honey against several bacteria [C] IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2023, 1177(1): 012031.
- [27] SOARES S, BORNET M, GROSSO C, et al. Honey as an adjuvant in the treatment of COVID-19 infection: a review [J]. Applied Sciences, 2022, 12(15): 7800.
- [28] WANG S, QIU Y, ZHU F. An updated review of functional ingredients of manuka honey and their value-added innovations [J]. Food chemistry, 2024, 440: 138060.
- [29] ZHANG Y Z, SI J J, LI S S, et al. Chemical analyses and antimicrobial activity of nine kinds of unifloral Chinese honeys compared to manuka honey (12+ and 20+) [J]. Molecules, 2021, 26(9): 2778.
- [30] WANG Y, GOU X, YUE T, et al. Evaluation of physicochemical properties of Qinling Apis Cerana Honey and the antimicrobial activity of the extract against Salmonella Typhimurium LT2 in vitro and in vivo [J]. Food Chemistry, 2021, 337: 127774.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] ELHEWEHYA A, EL-FISHAWY A M, EL-RASHEDY A A, et al. UPLC-ESI-MS/MS phytochemical profile, in vitro, in vivo, and in silico anti-Alzheimer's activity assessment of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. Leaves [J]. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 2025, 11(1): 30.
- [34] DU Y, ZHU H, QIAO J, et al. Characteristic components and authenticity evaluation of Chinese honeys from three different botanical sources [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(45): 17284-17294.
- [35] ZHU H, DU Y, LIN X, et al. Terpenoids identification and authenticity evaluation of longan, litchi and schefflera honey [J]. Food Science and Human Wellness, 2025, 14(3): 9250073.
- [36] SHEHATA I.A.A. The evaluation of phenolic constituents as markers to differentiate between clover and alfalfa honeys collected from different regions of Egypt [J]. Middle East J Appl Sci, 2016, 6: 610-615.
- [37] SULTANT S, FOSTER K, LIM L Y, et al. A review of the phytochemistry and bioactivity of clover honeys (*Trifolium spp.*) [J]. Foods, 2022, 11(13): 1901.
- [38] AHMED S, SULAIMAN S A, BAIG A A, et al. Honey as a potential natural antioxidant medicine: an insight into its molecular mechanisms of action [J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2018, 2018(1): 8367846.
- [39] KASSYM L, KUSSAINOVA A, SEMENOVA Y, et al. Antimicrobial effect of honey phenolic compounds against *E. coli*—An in vitro study [J]. Pharmaceuticals, 2024, 17(5): 560.