

高效液相色谱-示差折光检测法检测 无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖含量

郑星¹, 王凯^{1,*}, 薛晓锋¹, 汪正威², 潘鹏³, 吴黎明¹, 赵亚周¹, 彭文君^{1,*}

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 西双版纳 650223;

3. 西双版纳云蜂古山生物科技有限公司, 云南 西双版纳 666200)

摘要: 目的: 建立一种简单快速测定无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖含量的分析方法, 并基于此方法对不同无刺蜂种、不同地理来源、不同采集时间等条件下所获得的无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖的含量进行检测, 以期在无刺蜂蜂蜜海藻酮糖的开发和综合利用提供依据, 同时也为相关食品标准的建立提供参考依据。方法: 通过收集2019—2021年来自不同无刺蜂蜂种、不同地区(中国云南、海南和马来西亚)无刺蜂蜂蜜, 利用高效液相色谱-示差折光检测法, 对所收集的无刺蜂蜂蜜样品中海藻酮糖含量进行测定。结果: 样品用纯水溶解, 经0.22 μm尼龙滤膜过滤后, 以纯水为流动相, 离子配体交换柱Hi-Plex Pb (300 mm×7.7 mm, 8 μm)为分离色谱柱对无刺蜂蜂蜜中的糖类物质进行分离。Hi-Plex Pb色谱柱可成功将海藻酮糖与蜂蜜中其他寡糖基线分离, 检测方法回收率高、重复性好(回收率为93.50%~95.71%, 相对标准偏差并不高于0.61%), 该方法可对无刺蜂蜂蜜样品中的海藻酮糖进行准确分析。结果表明, 无刺蜂蜂蜜样品中海藻酮糖质量分数为7.0%~30.8%, 不同年度收集的无刺蜂蜂蜜样品中海藻酮糖含量差异显著($P<0.05$), 且不同蜂种间海藻酮糖含量也具有显著差异($P<0.05$)。结论: 本研究建立了一种简单、快速、准确分析无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖的检测方法, 此方法可以应用于无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖的测定和无刺蜂蜂蜜的质量控制。实际样品分析结果显示, 无刺蜂蜂蜜中含有丰富的海藻酮糖, 可作为无刺蜂蜂蜜鉴别和评价的主要品质指标。

关键词: 无刺蜂蜂蜜; 无刺蜂蜂种; 海藻酮糖; 高效液相色谱; 示差检测器; 质量控制

Determination of Trehalulose in Stingless Bee Honey by High Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detector

ZHENG Xing¹, WANG Kai^{1,*}, XUE Xiaofeng¹, WANG Zhengwei², PAN Peng³, WU Liming¹, ZHAO Yazhou¹, PENG Wenjun^{1,*}

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;

2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna 650223, China;

3. Xishuangbanna Yunfenggushan Biological Technology Co. Ltd., Xishuangbanna 666200, China)

Abstract: Objective: This study aimed to establish a high performance liquid chromatography coupled with refractive index detector (HPLC-RID) method for the determination of trehalulose in stingless bee honey, and apply it to actual samples from different stingless bee species, geographic origins, and harvest dates. Methods: We collected stingless bee honey samples produced by different bee species in Yunnan and Hainan as well as Malaysia in 2019–2021 for analysis by HPLC-RID. Results: The samples were dissolved in pure water and filtered through a 0.22 μm nylon membrane. Baseline chromatographic separation of trehalulose from other oligosaccharides in honey was achieved on a Hi-Plex Pb column (300 mm × 7.7 mm, 8 μm) using pure water as the mobile phase. The method had high recoveries (ranging from 93.50%–95.71%, with relative standard deviation (RSD) not larger than 0.61%) and good repeatability and accuracy. The content of trehalulose in stingless bee honey ranged from 7.0% to 30.8%, and varied significantly across harvest years and bee species

收稿日期: 2021-05-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172791); 国家蜂产业技术体系建设专项(CARS-44)

第一作者简介: 郑星(1996—)(ORCID: 0000-0003-0896-2733), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能食品与生物活性物质。

E-mail: zhengxing@caas.cn

*通信作者简介: 王凯(1988—)(ORCID: 0000-0003-0553-5293), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为蜂产品质量与营养品质评价。E-mail: wangkai@caas.cn

彭文君(1970—)(ORCID: 0000-0002-7771-3872), 男, 研究员, 博士, 研究方向为蜂产品加工与功能评价。

E-mail: pengwenjun@caas.cn

($P < 0.05$). Conclusion: The proposed method is simple, rapid and accurate and can be used for the determination of trehalulose in stingless honey for quality control purposes. Stingless bee honey is rich in trehalulose, which can be a potential quality index for the identification and evaluation of stingless bee honey.

Keywords: stingless bees; stingless bee honey; trehalulose; high performance liquid chromatography; refractive index detector; quality control

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210520-251

中图分类号: TS201

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2022) 16-0217-09

引文格式:

郑星, 王凯, 薛晓峰, 等. 高效液相色谱-示差折光检测法检测无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖含量[J]. 食品科学, 2022, 43(16): 217-225. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210520-251. <http://www.spkx.net.cn>

ZHENG Xing, WANG Kai, XUE Xiaofeng, et al. Determination of trehalulose in stingless bee honey by high performance liquid chromatography with refractive index detector[J]. Food Science, 2022, 43(16): 217-225. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210520-251. <http://www.spkx.net.cn>

无刺蜂属于膜翅目 (Hymenoptera)、蜜蜂科 (Apidae)、麦蜂族 (Meliponini) 昆虫, 由于尾部蛰针退化, 故被名为无刺蜂。其主要生活在热带和亚热带地区, 在我国主要分布于中国台湾、云南和海南等热带地区^[1-2]。无刺蜂身形较小, 是热带植物的重要授粉者^[3], 它可采集巢穴周围开花的汁液、植物或昆虫分泌物, 并储存于用蜂胶和蜂蜡的混合物制成的球型罐中, 即为无刺蜂蜂蜜^[4]。研究发现无刺蜂蜂蜜中含有丰富的营养成分, 如多酚类化合物等^[5], 具有显著的药理活性和药用价值, 例如抗氧化^[6-7]、消炎^[8-9]、抑菌^[10-12]、促进伤口愈合^[13-14]、抗糖尿病^[15-16]、治疗眼部疾病^[17]、调节机体代谢^[18]、调节肠道菌群^[19]等, 因此会被认为是一种重要的保健食品^[20-21], 越来越受消费者的喜爱。无刺蜂蜂蜜的口感酸甜, 水分含量较高, 主要由糖类组成, 约占其干质量碳水化合物的95%~97%^[22-24]。

海藻酮糖是一种还原性二糖, 目前仅在天然无刺蜂蜂蜜中发现^[25], 难以用化学合成, 研究表明目前只有某些微生物可以通过蔗糖异构酶转化蔗糖生成异麦芽酮糖和海藻酮糖^[26]。这些蔗糖异构体比蔗糖具有更高的酸稳定性, 在某种程度上可以增加物种的竞争优势。高蔗糖饮食除了会引起人体的肥胖、高血压、高血脂、高血糖等代谢疾病^[27], 还会引起全身和脑部炎症^[28], 以及增加结肠直肠癌^[29]等风险。考虑到蔗糖异构体还没有副作用的报道, 这些物质可能是理想的蔗糖替代品^[30]。异麦芽酮糖的甜度约为蔗糖的30%; 但海藻酮糖甜度是蔗糖的60%, 具有高度水溶性, 可作为填充剂、保湿剂和质地增强剂, 适合用于果冻和果酱等高甜食品加工^[31]。海藻酮糖的消化吸收慢于蔗糖, 会降低单糖和胰岛素释放到血液中的速率, 可用于糖尿病患者的食品和饮料^[32]; 并且海藻酮糖不作为能引起龋齿的变形链球菌的葡萄糖基转移酶的底物, 显著降低龋齿病, 防止蛀牙^[33]。除了作为食品成分的优点外, 海藻酮糖的还原性使其成为良好

的化学修饰前体, 并且还被用于制作糖醇, 作为低热量的甜味剂和生物相容性聚合物^[25]。海藻酮糖具有优秀的生物学功能, 然而目前鲜见针对我国无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖的研究报道。

无刺蜂蜂蜜含有多种功效成分, 消费者对无刺蜂蜂蜜衍生产品的需求迅速增长, 无刺蜂蜂蜜的鉴别、质量控制和标准对于无刺蜂蜂蜜的应用具有重要的支撑意义。但我国无刺蜂产品相关研究刚起步, 对其化学组分及营养成分的研究才刚刚开始。本实验以我国无刺蜂蜂蜜为研究对象, 通过建立无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖的检测方法, 对我国无刺蜂蜂蜜样品中的海藻酮糖进行分析。通过样品的采集地点、时间、蜂种差异, 分析海藻酮糖在无刺蜂蜂蜜中的含量及稳定性, 旨在为相关食品标准的建立提供一定参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

无刺蜂蜂蜜样品主要是2019—2021年从我国海南、云南和马来西亚采集, 具体样品编号、所属的蜂种、采集日期和地点详见表1。

表1 无刺蜂蜂蜜样品

Table 1 Details of stingless bee honey samples tested

编号	蜂种	采集日期	采集地点
1	黄纹无刺蜂 (<i>Lepidotrigona flavibasis</i>)	2020.5	云南
2	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2020.5	云南
3	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2020.5	云南
4	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2020.5	云南
5	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2020.5	云南
6	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2020.5	云南
7	顶无刺蜂 (<i>L. terminata</i>)	2020.5	云南
8	顶无刺蜂 (<i>L. terminata</i>)	2020.5	云南
9	顶无刺蜂 (<i>L. terminata</i>)	2020.5	云南
10	顶无刺蜂 (<i>L. terminata</i>)	2020.5	云南

续表1

编号	蜂种	采集日期	采集地点
11	戈氏无刺蜂 (<i>Tetragonula gressitti</i>)	2020.5	云南
12	戈氏无刺蜂 (<i>T. gressitti</i>)	2020.5	云南
13	戈氏无刺蜂 (<i>T. gressitti</i>)	2020.11	云南
14	混合样品 (黄纹、顶、戈氏无刺蜂)	2020.11	云南
15	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2020.11	海南
16	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2019.11	海南
17	<i>Heterotrigona itama</i>	2019.5	马来西亚
18	<i>H. itama</i>	2019.5	马来西亚
19	<i>H. itama</i>	2019.5	马来西亚
20	<i>H. itama</i>	2019.5	马来西亚
21	<i>H. itama</i>	2019.5	马来西亚
22	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2021.1	云南
23	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2021.1	云南
24	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2021.1	云南
25	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2021.1	云南
26	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2021.1	云南
27	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2021.1	云南
28	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2021.1	云南
29	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2021.1	云南
30	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2021.1	云南
31	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	2021.1	云南

洋槐蜂蜜、枣花蜂蜜、荆条蜂蜜 (中国农业科学院蜜蜂研究所实验蜂场, 由意大利蜂 *Apis mellifera* 采集); 麦卢卡蜜 康维他食品 (中国) 有限公司; 果葡糖浆 (食品级) 安徽源森生物科技有限公司; 海藻酮糖标准品 (HPLC \geq 90%, CAS: 51411-23-5) 英国 Biosynth Carbosynth 公司; D-无水葡萄糖 (HPLC \geq 99.5%, CAS: 50-99-7)、D-果糖 (HPLC \geq 99.5%, CAS: 57-48-7;)、蔗糖 (HPLC \geq 98%, CAS: 57-50-1)、麦芽糖 (HPLC \geq 98%, CAS: 6363-53-7)、海藻糖 (HPLC \geq 98%, CAS: 99-20-7) 标准品 上海源叶生物科技有限公司; 超纯水 中国华润怡宝饮料有限公司。

1.2 仪器与设备

ME104E型电子分析天平 上海Mettler-Toledo仪器有限公司; KQ-500DE数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪 (配示RID-10A示差检测器) 日本岛津有限公司; 1290高效液相色谱-6545电喷雾离子源四极杆飞行时间串联质谱仪 安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 糖标准品及蜂蜜样品溶液制备

海藻酮糖标准溶液: 将1 g/mL的海藻酮糖母液, 依次稀释为300、150、50、25、10、5、2.5、1、0.5 mg/mL。

其他糖单标准品溶液: 分别配制质量浓度为150 mg/mL的葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖和海藻糖标准品溶液, 后稀释为50 mg/mL的单标准品溶液。

混合标准品溶液: 分别取150 mg/mL各标准溶液20 μ L, 配成25 mg/mL的混合标准品溶液。

样品溶液: 准确称取0.5 g样品于烧杯中, 加入5 mL水溶解, 转移至10 mL的容量瓶中, 用3 mL水清洗烧杯, 并转移至相同的容量瓶中, 纯水定容。用一次性注射器取1 mL样品溶液过0.22 μ m尼龙滤膜到进样小瓶中, 准备进样。

1.3.2 色谱条件

Hi-Plex Pb色谱柱 (300 mm \times 7.7 mm, 8 μ m); 流动相: 纯水; 柱温50 $^{\circ}$ C; 压力0.6 kPa; RID-10A示差检测器温度50 $^{\circ}$ C; 进样量10 μ L; 流速0.5 mL/min; 单梯度洗脱时间27.5 min。

1.3.3 高效液相色谱-电喷雾离子源四极杆飞行时间串联质谱分析

50 mg/mL无刺蜂蜂蜜水用高效液相色谱仪按照1.3.2节条件下进行分离, 当保留时间为18.61 min的目标化合物峰值出现时, 用离心管收集洗脱液。将收集的单体物质用冷冻干燥的方法出去溶剂水, 然后配制成50 mg/mL单体物质。

高效液相色谱条件: ACQUITY UPLC[®] BEH Amide (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m) 分离柱; 柱温45 $^{\circ}$ C, 流速0.15 mL/min, 分别对制备单体和海藻酮糖、蔗糖、麦芽糖标准品进样5 μ L, 流动相为50% A相 (0.2%氨水) 和50% B相 (乙腈) 进行等度分离。

质谱条件: 在负离子Auto MS/MS模式下对母离子341.1089 ([M-H]⁻) 进行撞击, 获得二级碎片。干燥气温度320 $^{\circ}$ C, 干燥气流速8 L/min, 鞘气温度320 $^{\circ}$ C, 鞘气流速11 L/min, 喷嘴电压1 000 V, 去簇电压130 V。

1.3.4 方法学考察

干扰性实验: 将50 mg/mL海藻酮糖、葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖和海藻糖混合标准品溶液, 在1.3.2节色谱条件下进样10 μ L, 记录各标准品糖的出峰时间及峰面积, 观察此方法中其他糖类物质对海藻酮糖的干扰。

标准曲线绘制: 分别将50、25、10、5、2.5、1、0.5 mg/mL的海藻酮糖标准溶液在1.3.2节和1.3.3节条件下进样测定, 以不同质量浓度海藻酮糖标准溶液 (X , mg/mL) 为横坐标, 以不同质量浓度海藻酮糖标准溶液的出峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线。检出限 (limit of detection, LOD) 为3 倍的信噪比, 定量限 (limit of quantitation, LOQ) 为10 倍的信噪比。

重复性实验: 按照1.3.1节方法平行制备6 份50 mg/mL海藻酮糖标准品溶液, 按照1.3.2节色谱条件进样10 μ L, 记录6 份平行制备的标准品溶液的出峰时间, 并计算其相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。

精密度实验: 按照1.3.1节方法制备50 mg/mL海藻酮糖标准品溶液, 按照1.3.2节色谱条件连续进样6 次, 记录标准品溶液的出峰时间, 并计算其峰面积的RSD。

稳定性实验：按照1.3.1节方法平行制备3份50 mg/mL海藻酮糖标准品溶液，按照1.3.2节色谱条件分别在第1、2、3、4、5天进样10 μ L，观察日间稳定性，记录标准品溶液的出峰时间，并计算其峰面积的RSD。

回收率实验：用果葡糖浆作为样品添加不同量海藻酮糖标准品进行回收，精确称取0.500 g果葡糖浆4份，分别添加100 mg/mL海藻酮糖标准品5、2.5、1、0.5 mL，用水定容至10 mL，所得最终海藻酮糖溶液质量浓度分别为50、25、10、5 mg/mL，样品溶液过0.22 μ m尼龙滤膜到进样小瓶中。再按1.3.2节色谱条件进样10 μ L，计算海藻酮糖的加标回收率。

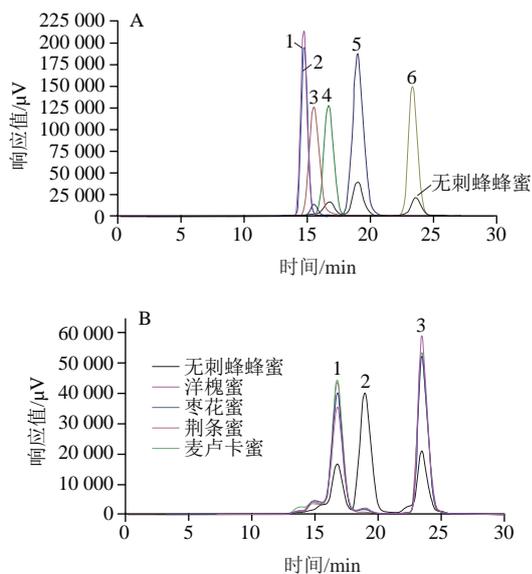
1.4 数据处理与统计

实验数据为重复3次测定的平均值，采用SPSS 22.0软件进行差异显著性分析 ($P < 0.05$ ，差异显著)，并使用GraphPad Prism 8.3.0和Excel 2019进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 糖标准品和蜂蜜样品色谱检测

蜂蜜样品前处理直接用纯水进行提取，方法简单易行。Hi-Plex Pb色谱柱有更好的保留性，提高了对乳糖、蔗糖和其他一些单糖的分辨能力，经常用于甜乳制品的分析。本实验发现用Hi-Plex Pb可以将无刺蜂蜂蜜中的葡萄糖、果糖和海藻酮糖有效分离，峰形和保留时间稳定（图1）。用纯水作为流动相，只需等度洗脱，在27.5 min内无刺蜂蜂蜜中的葡萄糖、海藻酮糖和果糖就可以得到良好分离。



A: 1.海藻糖; 2.蔗糖; 3.麦芽糖; 4.葡萄糖; 5.海藻酮糖; 6.果糖。B: 1.葡萄糖; 2.海藻酮糖; 3.果糖。

图1 糖标准品(A)和蜂蜜样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of sugar standards (A) and honey samples (B)

如图1A所示，6个单标准品溶液的色谱图表明，海藻糖同蔗糖出峰时间完全一致，但其同海藻酮糖可实现明显分离。图1B无刺蜂蜂蜜样品溶液色谱图中3个主要高响应峰分别为葡萄糖（1号峰，保留时间16.59 min）、海藻酮糖（2号峰，保留时间18.61 min）和果糖（3号峰，保留时间23.02 min）。以洋槐蜜、枣花蜜、荆条蜜、麦卢卡蜜作为常见蜂蜜对照，从图1B可以看出，无刺蜂蜂蜜的葡萄糖和果糖含量低于普通蜂蜜，但含有较高的海藻酮糖。由于海藻酮糖具有丰富的功能和生物利用度^[30-33]，检测出无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖的含量有极大的研究价值。

海藻糖是一种低甜度的非还原性二糖，由2个葡萄糖残基组成，于细菌、真菌、昆虫、无脊椎动物以及低等植物中天然存在^[34]。海藻糖在生物细胞中，能够与蛋白质或脂质间形成氢键，在炎热、寒冷、干燥、缺氧等不利条件下具有稳定细胞膜和蛋白质结构的特性^[35]。文献报道蜂蜜中含有少量的海藻糖和异麦芽酮糖，且海藻糖质量分数低于0.3%^[36-37]。但是国内没有研究者报道蜂蜜中含有海藻酮糖，这是首次在我国蜂蜜，特别是我国无刺蜂蜂蜜中发现海藻酮糖的证据。

蜂蜜中糖含量检测，目前主要采用的方法主要包括高效液相色谱-蒸发光散射检测法^[38]、稳定碳同位素比值测定法^[39]、高性能薄层色谱法^[40]、核磁共振碳水化合物谱图^[41]以及近红外光谱法^[42]等。参照GB 5009.8—2016《食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定》^[43]中提出的检测方法，用高效液相色谱-示差折光检测法/蒸发光散射检测法，使用氨基色谱柱，以乙腈-水（70:30，V/V）为流动相，检测蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的含量，但课题组前期实验表明，通过此方法，蔗糖和海藻酮糖的保留时间完全相同，不能实现二者的完全分离。因此在国标的基础上，探索出一种简单、快速和准确的方法检测无刺蜂蜂蜜中的海藻酮糖，此方法亦可对其他食物中海藻酮糖的检测提供重要参考。

2.2 高效液相色谱-电喷雾离子源四极杆飞行时间串联质谱分析海藻酮糖

通过高效液相色谱法对样品与标准品的对比可推测，保留时间为18.61 min的目标化合物为海藻酮糖。海藻酮糖与蔗糖、麦芽糖具有相同的分子式 $C_{12}H_{22}O_{11}$ ，互为同分异构体，它们在负离子模式下 ($[M-H]^-$) m/z 341.1089。因此通过电喷雾离子源四极杆飞行时间串联质谱对制备的单体物质和海藻酮糖、蔗糖、麦芽糖标

准品进行二级分离,以检查制备单体物质与单体糖标准品的二级碎片([M-H]⁻) m/z 341.108 9差异性。

由图2可以看出,从无刺蜂蜂蜜中分离制备的单体物质与海藻酮糖标准品的二级谱图一致,母离子([M-H]⁻) m/z 341.108 9的主要二级碎片为m/z 113、119、179和221。蔗糖在母离子([M-H]⁻) m/z 341.108 9的主要二级碎片为m/z 113、119和179,没有海藻酮糖中的221。麦芽糖在母离子([M-H]⁻) m/z 341.108 9的主要二级碎片为m/z 113、119、161和221,与海藻酮糖的二级离子也有显著差异。这与Fletcher等^[44]用UPLC-MS/MS分析的结果一致,海藻酮糖与蔗糖、麦芽糖在母离子([M-H]⁻) m/z 341.108 9的主要二级碎片具有明显的差异性,3种糖互为同分异构体。因此,通过高效液相色谱-电喷雾离子源四极杆飞行时间串联质谱可进一步确定保留时间18.61 min的目标化合物为海藻酮糖。

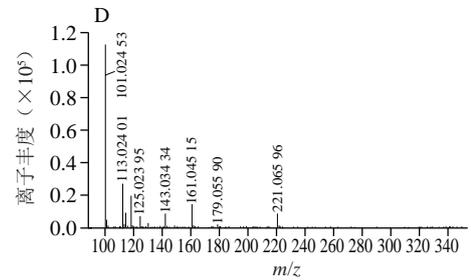
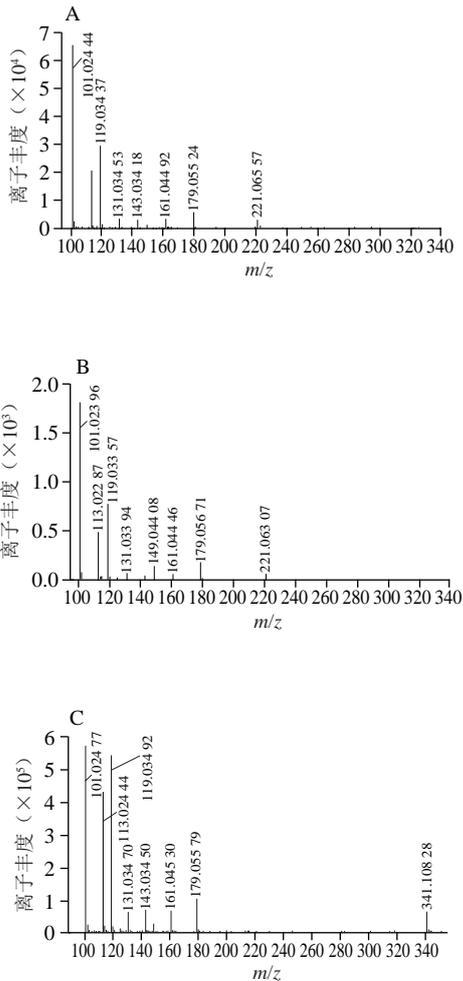
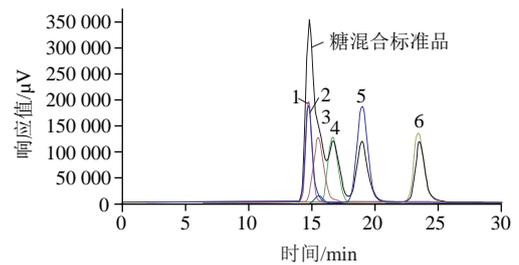


图2 无刺蜂蜂蜜制备单体(A)与海藻酮糖(B)、蔗糖(C)、麦芽糖(D)标准品在ESI-MS/MS光谱(碰撞电压130 V)在负离子模式下([M-H]⁻) m/z 341.108 9的结果

Fig. 2 ESI-MS/MS spectra (at fragmentor voltage of 130 V) in negative ion mode of ([M-H]⁻) m/z 341.108 9 of stingless bee honey (A) and trehalulose (B), sucrose (C) and maltose (D) standards

2.3 方法学验证

2.3.1 方法的选择性



1.海藻糖; 2.蔗糖; 3.麦芽糖; 4.葡萄糖; 5.海藻酮糖; 6.果糖。

图3 糖混合标准品和单个糖标准品的液相色谱图

Fig. 3 Liquid chromatograms of mixed and individual sugar standards

由于蜂蜜中主要的糖种类为葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖,并且文献中对蜂蜜报道较多的糖为海藻糖,因此将这5种糖与海藻酮糖混合到一起作为混合标准糖溶液,观察蜂蜜中其他常见糖对海藻酮糖检测的干扰性。从图3可以看出,海藻酮糖与另外5种糖完全分离,且保留时间与海藻酮糖单体一致。用1.3.2节色谱条件可以将海藻酮糖完整分离出来,方法具有很好的选择性,因此这种色谱条件可以作为检测蜂蜜中海藻酮糖含量的方法。

2.3.2 海藻酮糖标准曲线

由0.5、1、2.5、5、10、25、50 mg/mL的海藻酮糖标准溶液在1.3.2节色谱条件下检测得出的标准曲线,线性方程为 $Y=1.56 \times 10^5 X + 2.21 \times 10^2$, $R^2=0.999 6$,因此海藻酮糖在0.5~50 mg/mL范围内线性关系良好。该方法测定海藻酮糖的其LOD为0.07 mg/mL, LOQ为0.22 mg/mL。

2.3.3 重复性、精密度、稳定性实验结果

由表2可以看出,6份50 mg/mL的海藻酮糖标准品溶液进样后,出峰面积的RSD为2.46%,表明此提取方法重复性良好;同一份海藻酮糖标准品进样后,出峰面积的RSD为0.18%,表明色谱方法的精密度良好;不同时间测定3份相同质量浓度的海藻酮糖标准品后,出峰面积的RSD为2.43%,表明此色谱方法在5 d内稳定性良好。

表2 50 mg/mL海藻酮糖标准品溶液的重复性、精密度、稳定性实验结果

Table 2 Repeatability, precision and stability for the determination of 50 mg/mL trehalulose standard

实验	海藻酮糖	峰面积	RSD/%
重复性实验	1	6 663 660	2.46
	2	7 068 138	
	3	6 804 188	
	4	6 846 026	
	5	7 076 496	
	6	6 582 927	
精密度实验	1	6 252 454	0.18
	2	6 278 219	
	3	6 272 488	
	4	6 252 999	
	5	6 262 466	
	6	6 247 548	
稳定性实验	1 d-1	7 220 115	2.43
	1 d-2	6 836 117	
	1 d-3	6 919 954	
	2 d-1	7 197 306	
	2 d-2	6 818 678	
	2 d-3	6 903 050	
	3 d-1	7 145 341	
	3 d-2	6 719 232	
	3 d-3	6 873 871	
	4 d-1	7 134 917	
	4 d-2	6 729 258	
	4 d-3	6 866 770	
5 d-1	7 037 117		
5 d-2	6 708 105		
5 d-3	6 848 365		

2.3.4 回收率实验结果

表3 果葡糖浆中海藻酮糖加标回收率数据 (n=3)

Table 3 Recoveries of trehalulose spiked into high fructose corn syrup (n = 3)

实验次数	10 mg/mL		20 mg/mL		30 mg/mL		40 mg/mL		50 mg/mL	
	测定值/(mg/mL)	回收率/%								
1	9.41	93.66	18.97	94.85	28.09	93.64	38.02	95.05	47.83	95.65
2	9.39	94.11	18.75	93.75	28.16	93.87	38.28	95.71	47.16	94.33
3	9.37	93.92	18.93	94.65	28.05	93.50	38.21	95.53	47.72	95.44
平均值		93.90		94.42		93.67		95.43		95.14
标准偏差%		0.19		0.48		0.15		0.28		0.58
RSD%		0.20		0.51		0.16		0.29		0.61

表3表明,不同添加量海藻酮糖在果葡糖浆中的加标回收率在93.50%~95.71%之间,RSD均不高于0.61%,说明本方法有较好的回收率,结果准确可靠。

2.4 无刺蜂蜂蜜样品中海藻酮糖含量测定

通过本实验建立的蜂蜜中海藻酮糖的检测方法,对不同蜂种、采集时间和地点的无刺蜂蜂蜜进行海藻酮糖含量的测定。1~6号样品为2020年5月在云南采集的黄

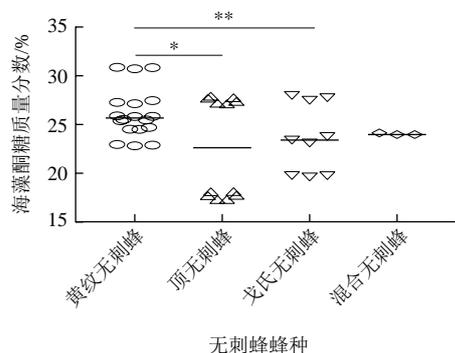
纹无刺蜂蜂蜜,海藻酮糖质量分数为22.90%~30.82%;7~10号样品为2020年5月在云南采集的顶无刺蜂蜂蜜,海藻酮糖质量分数为17.30%~27.91%;11~13号样品为2020年5月和11月在云南采集的戈氏无刺蜂蜂蜜,海藻酮糖质量分数为19.72%~27.74%;14号样品为2020年11月在云南同一蜂场采集的黄纹无刺蜂、顶无刺蜂、戈氏无刺蜂的混合蜂蜜,海藻酮糖质量分数为24.03%;15和16号样品分别为2020年和2019年11月在海南同一蜂场采集的黄纹无刺蜂蜂蜜,海藻酮糖质量分数相似,分别为18.16%和18.52%;17~21号样品为2019年在马来西亚采集的*Heterotrigona itama*无刺蜂蜂蜜,海藻酮糖质量分数为10.36%~20.92%;22~31号样品为2021年1月在云南采集的黄纹无刺蜂蜂蜜,海藻酮糖质量分数为6.97%~20.61%。

表4 无刺蜂蜂蜜样品中海藻酮糖含量测定结果

Table 4 Contents of trehalulose in different stingless bee honey samples

样品	蜂种	海藻酮糖质量分数/%				RSD/%
		1	2	3	平均值	
1	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	27.46	27.14	27.27	27.29±0.13 ^a	0.49
2	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	25.83	25.84	25.89	25.85±0.02 ^b	0.09
3	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	22.90	22.83	22.96	22.90±0.06 ^c	0.24
4	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	30.84	30.73	30.88	30.82±0.06 ^d	0.20
5	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	25.52	25.48	25.40	25.47±0.05 ^b	0.19
6	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	24.71	24.52	24.51	24.58±0.09 ^e	0.37
7	顶无刺蜂 (<i>L. terminata</i>)	27.75	27.71	27.91	27.79±0.09 ^f	0.32
8	顶无刺蜂 (<i>L. terminata</i>)	17.74	17.71	17.30	17.58±0.20 ^f	1.14
9	顶无刺蜂 (<i>L. terminata</i>)	27.19	27.13	27.37	27.23±0.10 ^g	0.38
10	顶无刺蜂 (<i>L. terminata</i>)	18.12	18.10	17.30	17.84±0.38 ^f	2.13
11	戈氏无刺蜂 (<i>T. gressitti</i>)	27.75	27.49	27.99	27.74±0.20 ^g	0.73
12	戈氏无刺蜂 (<i>T. gressitti</i>)	23.41	23.10	23.78	23.43±0.28 ^e	1.18
13	戈氏无刺蜂 (<i>T. gressitti</i>)	19.63	19.75	19.77	19.72±0.06 ^e	0.30
14	混合样品(黄纹、顶、戈氏无刺蜂)	23.97	23.98	24.15	24.03±0.08 ^e	0.34
15	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	18.42	18.16	17.90	18.16±0.21 ^f	1.17
16	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	18.64	18.51	18.39	18.52±0.10 ^f	0.55
17	<i>H. itama</i>	10.67	10.36	10.05	10.36±0.25 ^b	2.44
18	<i>H. itama</i>	20.97	20.59	20.47	20.68±0.21 ⁱ	1.02
19	<i>H. itama</i>	20.91	21.00	20.68	20.86±0.13 ⁱ	0.63
20	<i>H. itama</i>	17.73	17.66	17.11	17.50±0.28 ^f	1.61
21	<i>H. itama</i>	21.00	21.05	20.70	20.92±0.16 ⁱ	0.75
22	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	7.54	7.70	7.30	7.51±0.16 ^g	2.17
23	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	7.00	7.02	6.89	6.97±0.06 ^g	0.81
24	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	15.60	15.69	14.83	15.37±0.39 ^h	2.52
25	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	20.80	20.80	20.23	20.61±0.27 ^h	1.30
26	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	11.07	11.03	10.13	10.74±0.43 ^h	4.03
27	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	13.66	13.66	13.24	13.52±0.20 ^h	1.47
28	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	15.43	15.43	14.80	15.22±0.30 ^h	1.95
29	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	12.70	12.79	12.15	12.55±0.29 ^h	2.28
30	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	13.76	13.67	13.00	13.48±0.34 ^h	2.54
31	黄纹无刺蜂 (<i>L. flavibasis</i>)	13.01	13.02	12.03	12.69±0.47 ^h	3.67

注:不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。



*.差异显著, $P < 0.05$; **.差异极显著, $P < 0.01$.

图4 不同种类无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖含量

Fig. 4 Contents of trehalulose in different stingless bee honey samples

文献中对于蜂蜜中海藻酮糖鲜有报道, Fletcher等^[44]运用核磁共振氢谱法确认海藻酮糖, 并通过超高效液相色谱-串联四极杆质谱对来自澳大利亚 (*T. carbonaria* 和 *T. hockingsi*)、马来西亚 (*Geniotrigona thoracica* 和 *H. itama*) 和巴西 (*Tetragonisca angustula*) 的5种不同无刺蜂的蜂蜜进行检测, 首次鉴定出不同寻常的海藻酮糖作为蜂蜜的主要成分, 每100 g蜂蜜中含有13~44 g海藻酮糖。Popova等^[45]用核磁共振的方法鉴定出非洲 *Meliponula ferruginea* 无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖质量分数大于20%, 但我国无刺蜂蜂蜜研究鲜有报道。此结果与表4接近, 由于采集的时间和地理环境和蜂种等有差异, 2021年冬季于马来西亚和中国云南采集的无刺蜂蜂蜜样品中, 海藻酮糖含量略低。

表4中, 采集的所有蜂蜜样品海藻酮糖质量分数为7.0%~30.8%, 与文献中报道的含量接近^[44-45]。可看出相同采集时间、蜂种和地区的蜂蜜在不同蜂巢中收集, 测得的海藻酮糖含量有显著差异 ($P < 0.05$)。14号混合无刺蜂蜂蜜样品海藻酮糖含量相对居中, 15号和16号两年海南采集的样品中海藻酮糖含量相近。但相对于云南采集的样品, 海南采集的样品中海藻酮糖含量较低, 由于样品过少, 需要后期用更多的样品进行实验分析。

2020年采集的黄纹无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖含量明显高于2021年 ($P < 0.05$)。从采集日期分析, 2020年5月正值花蜜期, 无刺蜂采集的花种类相对丰富, 而2021年1月属于冬季, 蜜源植物种类相对较少, 这可能是海藻酮糖含量较低的原因之一。马来西亚和中国云南的无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖含量没有显著差异, 可能是由于这两个地区的无刺蜂蜂种习性相似, 酿造出的蜂蜜中海藻酮糖含量差异不大。由图4可看出, 从云南采集的不同蜂种无刺蜂蜂蜜样品中, 黄纹无刺蜂蜂蜜中海藻酮糖含量显著高于顶无刺蜂 ($P < 0.05$) 和戈氏无刺蜂蜂蜜 ($P < 0.01$), 但与混合无刺蜂蜂蜜相似, 表明海藻酮糖在不同无刺蜂种的蜂蜜中含量不同。此外, 相同蜂种无

刺蜂在不同蜂箱中海藻酮糖含量也具有差异, 这需要采集大量的样本探究不同蜂种中海藻酮糖含量是否具有明显差异。

3 结论

采用高效液相色谱-示差检测器法测定蜂蜜中海藻酮糖的含量, 用纯水溶解蜂蜜样品, 使用离子配体交换柱Hi-Plex Pb (300 mm×7.7 mm, 8 μm) 作为分离色谱柱, 以纯水作流动相, 流速0.5 mL/min, 进样量10 μL, 柱温50 °C, 示差检测池温度50 °C, 海藻酮糖质量浓度在0.5~50 mg/mL范围内线性良好, R^2 为0.999 6。通过高效液相色谱-电喷雾离子源四极杆飞行时间串联质谱检测可知, 无刺蜂样品中保留时间为18.61 min的目标化合物是海藻酮糖。方法学验证证实海藻酮糖与其他糖类基线分离, 本检测方法的回收率高、重复性好, 其LOD为0.07 mg/mL, LOQ为0.22 mg/mL, 加标回收率为93.50%~95.71% ($RSD \leq 0.61\%$)。该方法简单快捷、定量准确, 可以实现无刺蜂蜂蜜样品中海藻酮糖的准确定量分析, 为我国无刺蜂蜂蜜品质评价提供了科学依据, 同时本研究建立的检测方法也可为相关食品标准的开发提供参考。

参考文献:

- [1] 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. DOI:10.7506/spkx10026630-201808023.
- [2] 郑星, 梁馨文, 吴黎明, 等. 无刺蜂蜂蜜研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 458-465. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020120285.
- [3] SANTANA R S, DE CARVALHO C A L, ODASOUZA M, et al. Characterization of honey of stingless bees from the Brazilian semi-arid region[J]. Food Chemistry, 2020, 327: 127041. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127041.
- [4] NORDIN A, SAINIK N Q A V, CHOWDHURY S R, et al. Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: a comprehensive review[J]. Food Composition and Analysis, 2018, 73: 91-102. DOI:10.1016/j.jfca.2018.06.002.
- [5] DE OLIVEIRA R G, JAIN S, LUNA A C, et al. Screening for quality indicators and phenolic compounds of biotechnological interest in honey samples from six species of stingless bees (*Hymenoptera: Apidae*)[J]. Food Science and Technology, 2017, 37(4): 552-557. DOI:10.1590/1678-457x.25716.
- [6] DO NASCIMENTO K S, SATTLER J A G, MACEDO L F L, et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys[J]. LWT, 2018, 91: 85-94. DOI:10.1016/j.lwt.2018.01.016.
- [7] BILUCA F C, DE GOIS J S, SCHULZ M, et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (*Meliponinae*)[J]. Food Composition and Analysis, 2017, 63: 89-97. DOI:10.1016/j.jfca.2017.07.039.
- [8] BILUCA F C, DA SILVA B, CAON T, et al. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless

- bee honey (*Meliponinae*)[J]. Food Research International, 2020, 129: 108756. DOI:10.1016/j.foodres.2019.108756.
- [9] BADRULHISHAM N S R, AB HAMID S N P, ISMAIL M A H, et al. Harvested locations influence the total phenolic content, antioxidant levels, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of stingless bee honey[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2020, 23(4): 950-956. DOI:10.1016/j.aspen.2020.07.015.
- [10] NISHIO E K, RIBEIRO J M, OLIVEIRA A G, et al. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 21641. DOI:10.1038/srep21641.
- [11] DOMINGOS S C B, CLEBIS V H, NAKAZATO G, et al. Antibacterial activity of honeys from Amazonian stingless bees of *Melipona* spp. and its effects on bacterial cell morphology[J]. Science of Food and Agriculture, 2020, 9: 2072-2077. DOI:10.1002/jsfa.10828.
- [12] ROSLI F N, HAZEMI M H F, AKBAR M A, et al. Stingless bee honey: evaluating its antibacterial activity and bacterial diversity[J]. Insects, 2020, 11(8): 500. DOI:10.3390/insects11080500.
- [13] ABD JALIL M A, KASMURI A R, HADI H. Stingless bee honey, the natural wound healer: a review[J]. Skin Pharmacology and Physiology, 2017, 30(2): 66-75. DOI:10.1159/000458416.
- [14] MALIK N A, MOHAMED M, MUSTAFA M Z, et al. *In vitro* modulation of extracellular matrix genes by stingless bee honey in cellular aging of human dermal fibroblast cells[J]. Food Biochemical, 2020, 44(1): e13098. DOI:10.1111/jfbc.13098.
- [15] YARIBEYGI H, YARIBEYGI A, SATHYAPALAN T, et al. Molecular mechanisms of trehalose in modulating glucose homeostasis in diabetes[J]. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 2019, 13(3): 2214-2218. DOI:10.1016/j.dsx.2019.05.023.
- [16] SAHLAN M, RAHMAWATI O, PRATAMI D K, et al. The Effects of stingless bee (*Tetragonula biroi*) honey on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(8): 2025-2030. DOI:10.1016/j.sjbs.2019.11.039.
- [17] ALEX I A, KWAPONG P K, KUSI R. Comparative antimicrobial activity of stingless bee honey and standard antibiotics against common eye pathogens[J]. Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology, 2010, 3(2): 9-15.
- [18] MOHD RAFIE A Z, SYAHIR A, WAN AHMAD W A N, et al. Supplementation of stingless bee honey from *Heterotrigona itama* improves antiobesity parameters in high-fat diet induced obese rat model[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018: 6371582. DOI:10.1155/2018/6371582.
- [19] DE MELO F H C, MENEZES F N D D, DE SOUSA J M B, et al. Prebiotic activity of monofloral honeys produced by stingless bees in the semi-arid region of Brazilian Northeastern toward *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Bifidobacterium lactis* BB-12[J]. Food Research International, 2020, 128: 108809. DOI:10.1016/j.foodres.2019.108809.
- [20] RAO P V, KRISHNAN K T, SALLEH N, et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review[J]. Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian, 2016, 26: 657-664. DOI:10.1016/j.bjp.2016.01.012.
- [21] AMIN F A Z, SABRI S, MOHAMMAD S M, et al. Therapeutic properties of stingless bee honey in comparison with european bee honey[J]. Advances in Pharmacological Sciences, 2018, 2018: 1-12. DOI:10.1155/2018/6179596.
- [22] SE K W, IBRAHIM R K R, WAHAB R A, et al. Accurate evaluation of sugar contents in stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey using a swift scheme[J]. Food Composition and Analysis, 2018, 6: 46-54. DOI:10.1016/j.jfca.2017.12.002.
- [23] WU L M, DU B, HEYDEN Y V, et al. Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey: a challenge[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2017, 86: 25-38. DOI:10.1016/j.trac.2016.10.013.
- [24] DE SOUSA J M, DE SOUZA E L, MARQUES G, et al. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 65: 645-651. DOI:10.1016/j.lwt.2015.08.058.
- [25] FU D X, ZHANG H, ZHANG Q, et al. Simple and efficient preparation of high-purity trehalulose from the waste syrup of isomaltulose production using solid-phase extraction followed by hydrophilic interaction chromatography[J]. Journal of Separation Science, 2021, 4(6): 1-31. DOI:10.1002/jssc.202001193.
- [26] TIAN Y Q, DENG Y, ZHANG W L. Sucrose isomers as alternative sweeteners: properties, production, and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(21/22): 8677-8687. DOI:10.1007/s00253-019-10132-6.
- [27] 牛红娟, 谢进, 何惠芳, 等. 蔗糖与代谢综合征研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(6): 1179-1183.
- [28] GUO Y R, ZHU X X, ZENG M, et al. A diet high in sugar and fat influences neurotransmitter metabolism and then affects brain function by altering the gut microbiota[J]. Translational Psychiatry, 2021, 11(1): 328. DOI:10.1038/s41398-021-01443-2.
- [29] KIRAN N, PRIZMENT A E, LAZOVICH D A, et al. Sucrose intakes and incident colorectal cancer risk among women[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2020, 3: 1-7. DOI:10.1080/07315724.2020.1848661.
- [30] WEI Y T, LIANG J Y, HUANG Y, et al. Simple, fast, and efficient process for producing and purifying trehalulose[J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 1183-1188. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.11.115.
- [31] HAMERLI D, BIRCH R G. Transgenic expression of trehalulose synthase results in high concentrations of the sucrose isomer trehalulose in mature stems of field-grown sugarcane[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(1): 32-37. DOI:10.1111/j.1467-7652.2010.00528.x.
- [32] NAM C H, SEO D H, JUNG J H, et al. Functional characterization of the sucrose isomerase responsible for trehalulose production in plant-associated *Pectobacterium* species[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 55(5): 100-106. DOI:10.1016/j.enzmictec.2013.10.005.
- [33] RAVAUD S, ROBERT X, WATZLAWICK H, et al. Trehalulose synthase native and carbohydrate complexed structures provide insights into sucrose isomerization[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(38): 26-36. DOI:10.1074/jbc.M704515200.
- [34] KOZUCH D J, STILLINGER F H, DEBENEDETTI P G. Effects of trehalose on lipid membranes under rapid cooling using all-atom and coarse-grained molecular simulations[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2021, 5(1): 1-12. DOI:10.1021/acs.jpcc.1c02575.
- [35] LUO Y, LIU X Y, LI W Q. Exogenously-supplied trehalose inhibits the growth of wheat seedlings under high temperature by affecting plant hormone levels and cell cycle processes[J]. Plant Signaling and Behavior, 2021, 5(7): 1-10. DOI:10.1080/15592324.2021.1907043.

- [36] KAMBOJ R, NAVIK G A, BERA M B, et al. Sugar profile and rheological behaviour of four different Indian honey varieties[J]. Food Science and Technology, 2020, 57(8): 2985-2993. DOI:10.1007/s13197-020-04331-7.
- [37] 迟韵阳. 蜂蜜成熟过程中糖的变化及油菜蜜腺分泌蔗糖的分子机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- [38] KOH D W, PARK J W, LIM J H, et al. A rapid method for simultaneous quantification of 13 sugars and sugar alcohols in food products by UPLC-ELSD[J]. Food Chemistry, 2018, 240: 694-700. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.07.142.
- [39] CHEN C T, CHEN B Y, NAI Y S, et al. Novel inspection of sugar residue and origin in honey based on the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio and protein content[J]. Food and Drug Analysis, 2019, 27(1): 175-183. DOI:10.1016/j.jfda.2018.08.004.
- [40] ISLAM M K, SOSTARIC T, LIM L Y, et al. Sugar profiling of honeys for authentication and detection of adulterants using high-performance thin layer chromatography[J]. Molecules, 2020, 25(22): 5289. DOI:10.3390/molecules25225289.
- [41] SCHIEVANO E, SBRIZZA M, ZUCCATO V, et al. NMR carbohydrate profile in tracing acacia honey authenticity[J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125788. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125788.
- [42] BASAR B, OZDEMIR D. Determination of honey adulteration with beet sugar and corn syrup using infrared spectroscopy and genetic-algorithm-based multivariate calibration[J]. Science of Food and Agriculture, 2018, 98(15): 5616-5624. DOI:10.1002/jsfa.9105.
- [43] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定: GB 5009.8—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-9.
- [44] FLETCHER M T, HUNGERFORD N L, WEBBER D, et al. Stingless bee honey, a novel source of trehalulose: a biologically active disaccharide with health benefits[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 12128. DOI:10.1038/s41598-020-68940-0.
- [45] POPOVA M, GERGINOVA D, TRUSHEVA B, et al. A preliminary study of chemical profiles of honey, cerumen, and propolis of the african stingless bee *Meliponula ferruginea*[J]. Foods, 2021, 10(5): 997. DOI:10.3390/foods10050997.