

实验技术与方法

HPLC 法测定蜂蜜中槲皮素和山奈酚

黄东萍¹ 蒋贵发¹ 黄明立¹ 毕郁² 周文誉²

(1. 广西医科大学公共卫生学院,广西 南宁 530021;2. 广西医科大学药学院,广西 南宁 530021)

摘 要:目的 建立同时测定蜂蜜中槲皮素和山奈酚含量的方法。方法 以 Hpersil BDS C₁₈ (250 mm ×4.6 mm,5 μm) 为分析柱,流动相为甲醇+0.4%磷酸水溶液(45+55)并用三乙胺调节 pH 至 4.2,流速为 1.0 ml/min,检测波长为 375 nm。结果 槲皮素的线性范围为 0.045~2.25 μg,山奈酚的线性范围为 0.052~2.600 μg,相关系数均为 0.999 1;平均回收率分别为 95.9%,97.6%。5 种蜂蜜中均含微量槲皮素(18.62~189.26 μg/g)和山奈酚(5.97~22.54 μg/g),其含量与蜜源有关,桉树蜜中槲皮素含量最高(189.26 μg/g),红树林蜜中山奈酚含量最大(22.54 μg/g)。结论 该方法简便、准确,可以用于同时测定蜂蜜中槲皮素和山奈酚的含量。

关键词:蜂蜜;槲皮素;山奈酚;色谱法;高压液相

蜜素的定量检测限(LOQ)为 0.10 mg/kg。

2.4 精密度与回收率 分别在碳酸饮料、果汁饮料、乳饮料、葡萄酒、蜜饯、酱菜中添加 5.00、50.00 mg/L 甜蜜素标准品,按本方法进行测定,每个浓度测定 5 次,得该方法的回收率在 95.6%~105.3%之间,相对标准偏差(RSD)在 1.3%~2.2%之间。

2.5 干扰试验 食品中往往添加多种添加剂,为试验其他添加剂对方法的影响,在含有甜蜜素的溶液中加入安赛蜜、糖精钠、山梨酸、苯甲酸、亚硫酸钠后检测,结果表明苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜在所选色谱条件下不出峰,而 Na₂SO₃ 出峰时间在甜蜜素的后面,不干扰测定。

表 1 本法和国标法测定结果比较 g/kg

样品名称	本法	国标法
碳酸饮料	<0.01	<0.01
葡萄酒	<0.01	<0.01
果汁饮料 1	0.37	0.35
果汁饮料 2	0.57	0.55
乳饮料 1	0.20	0.19
乳饮料 2	0.31	0.28
蜜饯 1	4.50	4.29
蜜饯 2	33.70	34.80
蜜饯 3	61.90	59.80
酱菜 1	0.26	0.27
酱菜 2	0.45	0.48
酱菜 3	2.93	2.72

2.6 方法的应用 近来,在我市开展的食品餐桌污染监测活动中,应用该方法在市场抽检 50 份碳酸饮料、果汁饮料、乳饮料、葡萄酒、蜜饯、酱菜检测甜蜜素,测定结果在 0.20~61.9 g/kg 之间。几种不同类样品用本法和国标方法检出甜蜜素的结果见表 1。其差别无统计学意义($t=0.59$, $P=0.56$)。表明本文方法测定结果与国标方法有较好的一致性。

参考文献

[1] 陈炳卿,刘志诚,王茂起.主编.现代食品卫生学[M].北京:人民卫生出版社,2001.465-469.

[2] GB/T 5009.97—2003.食品中环己基氨基磺酸钠的测定[S].

[3] 徐春祥,秦金平.液相色谱-质谱联用直接测定白酒中的甜蜜素[J].食品与发酵工业,2006,32(2):106-107.

[4] 侯晓燕,李永芳,李俊玲.比色管顶空气相色谱法测定食品中甜蜜素的探讨[J].中国卫生检验杂志,2004,14(4):497-498.

[5] 尹艳春,李智红.反相高效液相色谱法同时测定食品中甜蜜素、糖精钠和苯甲酸钠[J].理化检验-化学分册,2003,39(8):469-470.

[6] 钟志雄,梁春穗,姚敬,等.离子色谱法测定食品中的甜蜜素和苯甲酸[J].中国卫生检验杂志,2005,15(9):1062-1064.

[7] 高鹤娟,主编.食品卫生检验方法(理化部分)注解[M].北京:卫生部食品卫生监督检验所出版,1987:248.

[8] 武汉大学,吉林大学,南开大学,等校编.高等学校教材-无机化学.下册[M].第 2 版.北京:高等教育出版社,1983:307.

[收稿日期:2006-11-22]

中图分类号:R15;O657.75;TS202.3 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2007)02-0126-03

作者简介:黄东萍 女 讲师
通讯作者:蒋贵发 男 副教授

Determination of Quercetin and Kaempferol in Honey by HPLC

HUANG Dong-ping, JIANG Gui-fa, HUANG Ming-li, Bi Yu, ZHOU Wen-yu

(1. College of Public Health, Guangxi Medical University, Guangxi Nanning 530021, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of quercetin and kaempferol in five kinds of honeys simultaneously. **Method** The determination was carried out with Hpersil BDS C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) column. The mobile phase consisted of methanol + 0.4% phosphonic acid (45 + 55) and pH was adjusted to 4.2 by triethylamine. The flow rate was 1.0 ml/min. The detective wavelength was 375 nm. **Results** The standard curves of quercetin and kaempferol are linear within the range of 0.045 ~ 2.25 μ g, 0.052 ~ 2.600 μ g and the coefficient are 0.999 1, 0.999 1. The reclamation are 95.9%, 97.6%. The contents of both quercetin (18.62 ~ 189.26 μ g/g) and kaempferol (5.97 ~ 22.54 μ g/g) are lower in the five kinds of honey. The contents of quercetin and kaempferol had close relation with the plant that honey came from. The eucalyptus honey has the highest contents of quercetin (189.26 μ g/g), the mangroves honey had the highest contents of kaempferol (22.54 μ g/g). **Conclusion** The method is simple and accurate and can be used to determine the contents of quercetin and kaempferol in honey simultaneously.

Key word: Honey; Quercetin; Kaempferol; Chromatography, High Pressure Liquid

蜂蜜中源于蜜源植物的微量黄酮类物质,在其抗菌、抗衰老^[4]的疗效中起着积极而重要的作用。黄酮类物质的测定方法很多,有紫外法,薄层扫描法,高效液相色谱法等。本文建立 HPLC 法,对 5 种不同蜜源中的蜂蜜中的黄酮类化合物槲皮素和山奈酚的含量同时测定,为揭示蜂蜜的抗菌作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 日本岛津 LC-10AT ν p 高效液相色谱仪,SPD-10A ν p 紫外检测器。

蜂蜜 桉树蜜、荔枝蜜、红树林蜜、桂花蜜、野菊花蜜,产地广西。

槲皮素标准品,山奈酚标准品(中国药品生物制品检定所 100018-200406,0861-200002),甲醇(色谱纯),其他试剂均为分析纯。

槲皮素、山奈酚标准品溶液的制备 精密称取槲皮素标准品 5.2 mg,山奈酚标准品 4.5 mg,加甲醇溶解并定容至 10 ml,分别制成 0.45 mg/ml 的山奈酚标准品溶液、0.52 mg/ml 的槲皮素标准品溶液。

色谱条件 色谱柱 Hpersil BDS C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相 甲醇 + 0.4%磷酸水溶液(45 + 55),用三乙胺调节 pH 至 4.2;检测波长 375 nm,流速:1.0 ml/min。

1.2 方法

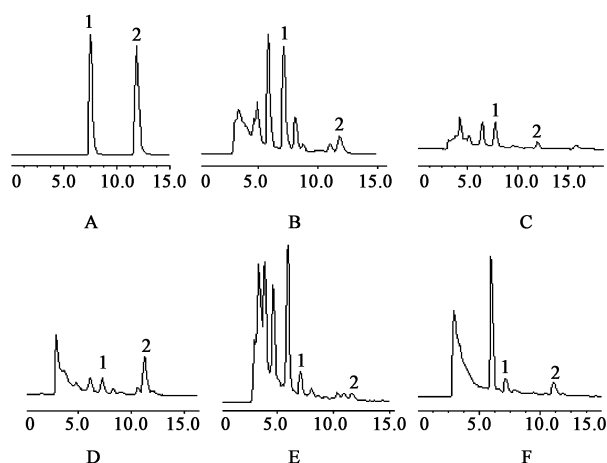
1.2.1 试样检测 精密称取 5 种蜂蜜(桉树蜜、荔枝蜜、红树林蜜、桂花蜜、野菊花蜜)各 50 g,各加 30 ml 蒸馏水溶解,以正丁醇 + 苯(8 + 2) 30 ml 萃取 3 次,取上清液合并,用 30 ml 蒸馏水洗后,取上层液于 75 $^{\circ}$ C 水浴挥干溶剂,用甲醇溶解并定容至 10 ml,制成供试品溶液按上述色谱条件进行槲皮素、山奈

酚的含量测定,每种蜂蜜试样平行测定 5 次。

1.2.2 校正曲线的制备 分别取槲皮素、山奈酚标准品溶液,用甲醇稀释,槲皮素浓度为 4.5、9.0、22.5、90.0、225.0 μ g/ml,山奈酚浓度为 5.2、10.4、26.0、104.0、260.0 μ g/ml,各进样 10 μ l,测定槲皮素、山奈酚的峰面积。槲皮素的回归方程: $A = 15\,305\,C - 23\,982$, $r = 0.999\,1$;山奈酚的回归方程: $A = 15\,467\,C - 21\,190$, $r = 0.999\,1$ 。

2 结果

2.1 槲皮素、山奈酚的分离 根据色谱条件进行分离,混合标准品和试样中的槲皮素和山奈酚均得到较好的分离。色谱图见图 1。



A. 标准品, B 桉树蜜, C 荔枝蜜, D 红树林蜜, E 桂花蜜, F 野菊花蜜, 1. 槲皮素(quercetin), 2. 山奈酚(kaempferol)。

图 1 标准品和蜂蜜提取物 HPLC 色谱图

2.2 精密度试验 取同一供试品溶液连续进样 6 次,得槲皮素日内 $RSD = 1.86\%$,山奈酚日内 $RSD = 1.94\%$ ($n = 5$)。

2.3 重复性试验 取桉树蜜共 5 份,每份 50 g,按试样测定项中方法操作,测定峰面积,计算含量,结果槲皮素和山奈酚的 *RSD* 分别为 2.03 %和 1.97 %。

2.4 回收率试验 称取已知含量的桉树蜜 9 份,每份 10 g,分别精密加入槲皮素、山奈酚标准品溶液 0.2、1、2 ml 各 3 份,按上述供试品溶液的制法制备所需溶液,测定,计算高、中、低 3 个加入量的回收率分别为槲皮素 97.2 %、95.7 %、94.9 % (*n* = 3),山奈

酚 98.1 %、94.9 %、97.6 % (*n* = 3),平均回收率分别为槲皮素 95.9 % (*n* = 9),山奈酚 96.9 % (*n* = 9)。

2.5 试样检测结果 5 种蜂蜜供试品溶液按上述色谱条件检测,结果表明,5 种蜂蜜中均含微量槲皮素 (18.62 ~ 189.26 μg/g) 和山奈酚 (5.97 ~ 22.54 μg/g),其中桉树蜜中槲皮素含量最高 (189.26 μg/g),红树林蜜中山奈酚含量最大 (22.54 μg/g),见表 1。

表 1 样品含量测定结果 (<i>n</i> = 5)						μg/g
组分	桉树蜜	荔枝蜜	红树林蜜	桂花蜜	野菊花蜜	
槲皮素	189.26 ±2.02	23.47 ±2.95	20.99 ±2.03	23.81 ±2.64	18.62 ±1.49	
山奈酚	22.54 ±3.21	5.97 ±2.67	25.31 ±2.16	6.01 ±2.14	16.84 ±2.12	

3 讨论

3.1 提取方法的选择 蜂蜜中含有大量的糖类物质,还含有少量的水分,所以不能用常用的醇提法提取黄酮类物质。本实验考察了聚酰胺层析法和石油醚 + 乙酸乙酯 (3 + 7)、正丁醇 + 苯 (8 + 2) 系统提取法,发现正丁醇 + 苯 (8 + 2) 系统提取法较聚酰胺层析法简便,并能很好除去大部分的糖,对试验产生的干扰最小,故选择其作为提取溶剂。

3.2 检测波长的选择 本实验考察了标准品溶液的最大吸收波长,结果表明槲皮素的 λ_{max} 为 375 nm、山奈酚的 λ_{max} 为 370 nm,故选择 375 nm 作为槲皮素、山奈酚的检测波长。

3.3 流动相的选择 考察了甲醇与磷酸水溶液的几个配比,分别为 45 + 55,47 + 53,50 + 50,55 + 45,60 + 40,发现甲醇 + 磷酸水溶液为 45 + 55 时出峰时间适宜,分离度良好,受杂质干扰较小,且柱压不会太高。同时考察了流动相的 pH 值,发现用三乙胺将 pH 调至 4.2 时,可得到较好的分离效果,也可减少峰形拖尾。

从含量测定的结果来看,不同蜂蜜中的槲皮素、

山奈酚的含量有所不同,特别突出的是桉树蜜中的槲皮素的含量远远超出其他蜜源的蜂蜜,国外也曾有文献[5]证实桉树蜜中黄酮类物质确实较丰富,故可考虑开发其应用价值。此外,市场上较少见到的红树林蜜的山奈酚含量是 5 种蜂蜜中最高的,提示我们红树林花粉中山奈酚含量可能较为丰富。

参考文献

[1] JEFFREYA E, ECHAZARRETA C. Medical uses of honey[J]. Revista Biomedica, 1996, 7 (1) :43-49.

[2] 朱威, 胡福良, 李英华, 等. 蜂蜜的抗菌机理及其抗菌效果的影响因素[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16 (4) :372-375.

[3] 姜建辉, 王富. 蜂蜜的抗衰老及其临床应用进展[J]. 中华中西医杂志, 2004, 2 (5) :92-93.

[4] 邹浩军, 明亮. 黄酮类化合物抗炎及抗衰老药理研究进展[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2003, 2 (6) :48-50.

[5] YAO L, SINGANUSONG R, D 'ARCY B, et al. Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian Eucalyptus honeys[J]. Journal of Agriculture and Chemistry, 2004, 52 (2) :210-214.

[收稿日期:2006 - 12 - 11]

中图分类号:R15;O657.72;S896.1 文献标识码:B 文章编号:1004 - 8456(2007)02 - 0128 - 03

勘 误

本刊 2007 年第 19 卷第 1 期的《教育部办公厅卫生部办公厅关于辽宁等 8 省(自治区)学校食品卫生专项检查的通报》一文的落款“教育办公厅、卫生办公厅”有误,应为“教育部办公厅、卫生部办公厅”。特此更正,并向读者诚挚致歉。