蜂蜜黄酮类化合物检测方法建立及其在云南5种特色蜂蜜中的分布

梁 铖[1]，卢焕仙[1]，刘宏程[2]，张学文[1]，赵洪木[1]，宗德琴[1]，王艳辉[1,*]
(1.云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所，云南 蒙自 661101；
2.农业部农产品质量安全风险评估实验室(昆明)，云南 昆明 650223)

摘 要：建立蜂蜜中芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇4种黄酮化合物含量的固相萃取-高效液相色谱检测方法。蜂蜜样品用pH2的盐酸溶液溶解、离心后，用Oasis HLB固相萃取柱吸附与净化，4种黄酮经VP-ODS色谱柱(150mm×4.6mm，5μm)分离，紫外检测器检测，检测波长270nm。流动相为甲醇-水(pH3.0)(60:40，*V/V*)，流速0.7mL/min。检出限：芦丁、杨梅酮均为0.05mg/kg，槲皮素、茨菲醇均为0.04mg/kg；回收率：芦丁91%～92%、杨梅酮82%～85%、槲皮素84%～86%、茨菲醇86%～89%。分析云南省的5种特色蜂蜜样品，结果表明不同品种蜂蜜中4种黄酮类化合物含量差异显著，显示蜂蜜黄酮类化合物含量可作为鉴别蜂蜜品种的一个指标。

关键词：黄酮类化合物；特色蜂蜜；高效液相色谱

Establishment of Determination Method for Flavonoids in Honey and Distribution of Flavonoids in 5 Kinds of Characteristic Honey from Yunan

LIANG Cheng[1]，LU Huan-xian[1]，LIU Hong-cheng[2]，ZHANG Xue-wen[1]，ZHAO Hong-mu[1]，ZONG De-qin[1]，WANG Yan-hui[1,*]
(1. Institute of Sericulture and Apiculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi 661101, China；
2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assess for Agro-Product, Ministry of Agriculture (Kunming), Kunming 650223, China)

Abstract：A method for the determination of flavonoids in honey by SPE/HPLC was developed. The sample was extracted with acidified water (pH 2) and centrifuged, then enriched and cleaned-up by oasis HLB. The chromatographic separation was conducted on a VP-ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column at the detection wavelength of 270 nm. The elution was completed by the mobile phase composed of methanol and water (pH 3) at the ratio of 60:40 (*V/V*) at the flow rate of 0.7 mL/min. The detection limits were 0.05 mg/kg for rutin and myricetin, and 0.04 mg/kg for quercetin and kaempferol, respectively. The recovery rates of rutin, myricetin, quercetin and kaempferol were 91%–92%, 82%–85%, 84%–86% and 86%–89%, respectively. Five kinds of characteristic honey from Yunnan were detected to reveal a significant difference in flavonoids. Therefore, flavonoids may be as the markers for the identification of honey.

Key words：flavonoids；characteristic honey；high performance liquid chromatography (HPLC)
中图分类号：S896.1 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)06-0148-04

黄酮类化合物主要分布于植物界，具有抗氧化[1-2]、抗癌[3-6]、抗菌[7]、抗炎[8]等生物学活性。蜂蜜是蜜蜂采集植物的花蜜、分泌物或蜜露，与自身分泌物结合后，经充分酿造而成的天然甜物质。蜂蜜不仅是营养丰富的滋补食品，而且具有极好的抗氧化[9-10]、抗菌功效，这些功效与其含有的黄酮类化合物有密切关系。蜂蜜中的黄酮类化合物主要来自蜜源植物的花蜜、花粉或蜂胶。不同单花种蜂蜜中的黄酮类化合物种类和含量差别很大[11-12]，建立相应的检测方法在单花种蜂蜜识别和蜂蜜掺假鉴定方面具有重要的意义。

蜂蜜中黄酮的提取方法主要有液-液萃取法[13-14]、大孔树脂吸附法[15-16]、固相萃取法[17-19]等。液-液萃取法操作简单，但净化效果稍差。大孔树脂吸附法需要自己填充层析柱和用大量的试剂洗脱，比较耗时；固相萃取法以操作方法简便，所需试剂较少等优点作为分析检测常用技术之一[20]。Michalkiewicz等[17]比较了多种固相

收稿日期：2012-09-25
基金项目：国家蜂产业技术体系专项(CARS-45-SYZ17)；云南省科技厅项目(2011BB012)；
云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所青年创新基金项目(QC2010002)
作者简介：梁铖(1983—)，男，研究实习员，本科，研究方向为授粉昆虫研究和蜂产品质量与安全。E-mail：liang1087@163.com
*通信作者：王艳辉(1973—)，女，副研究员，硕士，研究方向为蜜蜂研究和蜂产品质量与安全。E-mail：wyh686686@sina.com

萃取柱提取蜂蜜中的酚酸和芦丁、槲皮素和荧菲醇的优缺点。本实验研究Oasis HLB固相萃取-高效液相色谱法检测蜂蜜中黄酮含量的方法，能用于日常大批量样品的检测。

云南省地理条件复杂，气候类型丰富多样，区域差异非常明显，在此条件下孕育出了丰富的蜜源植物，养蜂条件优越，出产的蜂蜜品种较多，但关于蜂蜜中黄酮类化合物含量的报道较少，本研究选取5种蜂蜜样品，采用所建立的Oasis HLB固相萃取-高效液相色谱法测定其黄酮类化合物的含量，以期为开发云南的特色蜂蜜提供一定的参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂蜜样品：苕子蜜产自云南省弥勒县；石榴蜜、桉花蜜产自云南省蒙自县；杜鹃蜜产自云南省建水县；野坝子蜜产自云南省大姚县。样品采集后置于－18℃冰箱保存。

标准品(纯度)：芦丁(98%)、杨梅酮(98%)、槲皮素(98%)、荧菲醇(98%)　上海融合医药科技有限公司；甲醇(色谱纯)　美国Fish公司；甲醇、磷酸、盐酸(均为分析纯)　西陇化工股份有限公司。

1.2 仪器与设备

$LC\text{-}10AT_{VP}$高效液相色谱仪、$SPD\text{-}10A_{VP}$紫外检测器　日本岛津公司；固相萃取装置　北京成萌伟业科技有限公司；Oasis HLB cartridge固相萃取柱　美国Waters公司；AL-204电子天平　梅特勒-托利多仪器有限公司；HY-5回旋振荡器　常州国华电器有限公司；xw-80A旋涡混合器　上海精科实业有限公司。

1.3 色谱条件

VP-ODS色谱柱(150mm×4.6mm，5μm)；柱温30℃；进样量10μL；流动相为甲醇-水(用磷酸调至pH3)=60:40(*V*/*V*)，等度洗脱；流速0.7mL/min；检测波长：270nm。

1.4 标准溶液的配制

分别称取0.025g芦丁、杨梅酮、槲皮素、荧菲醇标准品到25mL容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，配制成1.0mg/mL的混合标准储备液。

用混合标准储备液配制10mL质量浓度分别为2.0、10.0、50.0、200.0μg/mL的混合标准溶液系列。

1.5 样品处理

参照Michalkiewicz等[17]报道的前处理条件，准确称取10g蜂蜜于100mL三角瓶中，加入30mL pH2的盐酸溶液，振荡提取1h，把提取液倒入50mL离心管中，用3mL pH2的盐酸溶液3次洗三角瓶并转入上述离心管中，7000r/min离心10min，取上清液到预处理好的Oasis HLB固相萃取柱中(固相萃取柱的预处理：分别加入5mL甲醇和10mL pH2的盐酸溶液)，用10mL水洗固相萃取柱后用真空泵抽干萃取柱，用甲醇洗脱，收集洗脱液20mL，40℃旋转蒸发至干，加入1mL甲醇溶解，用0.45μm滤膜过滤，待高效液相色谱分析。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择

用甲醇与水(用磷酸调至pH3)的几个配比作为流动相，分别为60:40、55:45、58:42，发现甲醇-水(用磷酸调至pH3)为60:40时分离效果最佳，受杂质干扰小，出峰时间适宜，结果见图1。

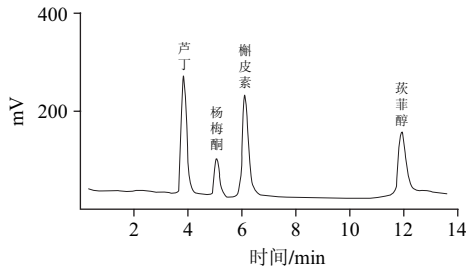


图1 标准样品色谱图

Fig.1 Chromatogram of standard solutions

2.2 固相萃取洗脱液的选择

由于Oasis HLB采用亲水亲脂平衡的聚合物作为固定相对酸碱和中性化合物有好的吸附作用，通常为反相吸附原理，因此考察体积分数60%、80%、100%的甲醇溶液作洗脱液，研究Oasis HLB柱对黄酮类化合物的洗脱效果，通过对标准溶液的加标回收率可知100%的甲醇才能把4种黄酮物质完全洗脱，因此选择100%甲醇作为洗脱剂。

2.3 精密度实验和检出限

精密吸取芦丁、杨梅酮、槲皮素、荧菲醇质量均为10μg/mL的混合标准溶液，平行测定5次，然后计算各组分峰高的相对标准偏差(RSD)分别为1.04%、0.73%、0.38%、0.85%。检出限LOD(R_{SN}=3)芦丁、杨梅酮均为0.05mg/kg，槲皮素、荧菲醇均为0.04mg/kg。

2.4 重复性实验

称取石榴花蜂蜜样品5份，每份10g，按1.5节样品处理方法操作，测定峰高，计算含量，结果芦丁、杨梅酮、槲皮素、荧菲醇的RSD分别为2.03%、1.93%、2.13%、1.52%。

2.5 回收率实验

往已知含量的石榴花蜂蜜样品中加入已知质量浓度的芦丁、杨梅酮、槲皮素、荧菲醇标准液，按样品处理方法操作，色谱条件不变，计算各自的回收率，结果见表1。

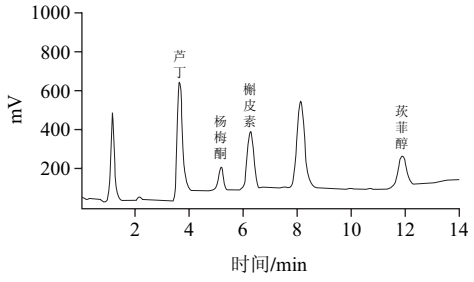
表1 样品加标回收率

Table 1 Recovery rates of spiked flavonoid standards in samples

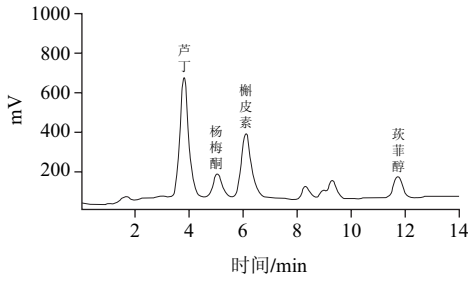
待测组分	样品中含量/(mg/kg)	加入量/(mg/kg)	测得量/(mg/kg)	回收率/%
芦丁	9.61	0.5	10.07	92
		1.0	10.52	91
		2.0	11.42	91
杨梅酮	1.24	0.5	1.65	82
		1.0	2.06	82
		2.0	2.93	85
槲皮素	4.15	0.5	4.57	84
		1.0	5.01	86
		2.0	5.83	84
莰菲醇	0.45	0.5	0.88	86
		1.0	1.34	89
		2.0	2.19	87

2.6 样品检测结果

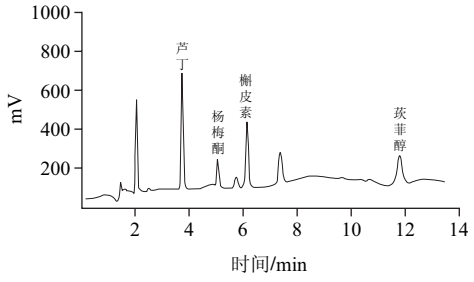
按相同的色谱条件检测5个品种的蜂蜜样品中的4种黄酮类化合物含量，每个品种10个样品，每个样品重复测定2次，数据处理用SPSS 17.0，结果见表2，样品色谱图见图2。



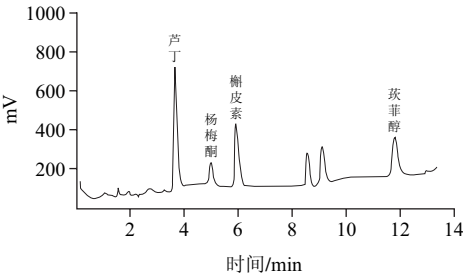
A.苕子蜜样品



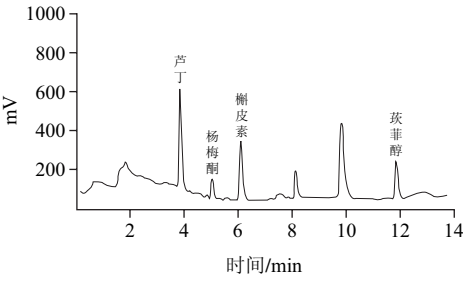
B.石榴蜜样品



C.杜鹃蜜样品



D.桉花蜜样品



E.野坝子蜜样品

图2 5种蜂蜜样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of five kinds of characteristic honey

表2 蜂蜜中黄酮类化合物含量

Table 2 Flavonoids in honey samples

mg/kg

蜂蜜名称	样品数量	芦丁含量	杨梅酮含量	槲皮素含量	莰菲醇含量	4种黄酮总量
石榴蜜	10	9.65 ± 0.05^{cC}	1.29 ± 0.07^{bB}	4.17 ± 0.06^{D}	0.45 ± 0.04^{dD}	15.55 ± 0.03^{D}
苕子蜜	10	5.87 ± 0.06^{dD}	1.37 ± 0.04^{bB}	3.80 ± 0.01^{E}	0.44 ± 0.01^{dD}	11.47 ± 0.06^{E}
杜鹃蜜	10	11.57 ± 0.11^{bB}	1.06 ± 0.04^{cC}	7.64 ± 0.04^{A}	1.73 ± 0.01^{aA}	21.99 ± 0.12^{A}
桉花蜜	10	9.76 ± 0.04^{cC}	0.94 ± 0.04^{dC}	6.12 ± 0.05^{B}	0.65 ± 0.02^{cC}	17.45 ± 0.03^{C}
野坝子蜜	10	12.20 ± 0.16^{aA}	2.16 ± 0.04^{aA}	4.95 ± 0.02^{C}	1.57 ± 0.04^{bB}	20.87 ± 0.13^{B}

注：同列大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$)；小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

由表2可知，5种蜂蜜中黄酮类化合物含量差异显著，芦丁含量野坝子蜜中最高(12.20mg/kg)，苕子蜜中最低(5.87mg/kg)；杨梅酮含量野坝子蜜中最高(2.16mg/kg)，桉花蜜中最低(0.94mg/kg)；槲皮素含量杜鹃蜜中最高(7.64mg/kg)，苕子蜜中最低(3.80mg/kg)；莰菲醇含量杜鹃蜜中最高(1.73mg/kg)，苕子蜜、石榴蜜中最低(0.44、0.45mg/kg)。4种黄酮总量最高的是杜鹃蜜(21.99mg/kg)，最低的是苕子蜜(11.47mg/kg)。不同品种蜂蜜黄酮类化合物含量的差异显示黄酮类化合物含量可作为鉴别蜂蜜品种的一个指标。

3 结 论

用固相萃取-高效液相色谱法检测云南省5种特色蜂蜜样品中均含有芦丁、杨梅酮、槲皮素、莰菲醇4种黄酮类成分，含量：芦丁5.87～12.2mg/kg、杨梅酮

0.94～2.16mg/kg、槲皮素3.80～7.64mg/kg、莰菲醇0.44～1.73mg/kg。本方法简便、快速，可用于检测蜂蜜中芦丁、杨梅酮、槲皮素、莰菲醇4种黄酮类成分的测定。蜂蜜中黄酮类化合物含量丰富，初步结果显示，不同蜂蜜中差异明显，可作为鉴别蜂蜜品种的一个评价指标。但要准确全面的分析蜂蜜中黄酮类化合物，确定黄酮类化合物能否确实用于鉴别蜂蜜品种，还需要进一步的研究。

参考文献：

[1] 赵金英, 樊紫周, 赵伟鸿, 等. 栽培甘草的黄酮提取物对糖尿病大鼠血糖、尿糖及抗氧化作用的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2012(2): 110-114.

[2] HAO Ruixia , ZHOU Shuai, YANG Yan, et al. Flavone content and bioactivity of aqueous-ethanolic extracts of phellinus fruit bodies[J]. Acta Edulis Fungi, 2008, 15(2): 27-30.

[3] 王晓琴, 王冰芳, 张学武. 西兰苔叶黄酮体外抗癌活性的研究[J]. 安徽农业科学, 2010(35): 20014-20015; 20024.

[4] 姜泓, 孟舒, 陈再兴, 等. 紫穗槐中黄酮类化学成分的体外抗癌活性研究[J]. 中药材, 2008, 31(5): 736-738.

[5] 甄汉深, 周燕园, 袁叶飞, 等. 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3): 36-38.

[6] LIU Peixun, GAO Jjing, CHEN Yujie, et al. Anticancer activity of total flavonoids isolated from Xianhe Yanling recipe (仙鹤延龄方)[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2011, 717(6): 459-463.

[7] 黄晓冬. 4种龙眼核提取物的总黄酮含量、体外抗菌活性与抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 43-47.

[8] AQUILA S, GINER R M, RECIO M C, et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids from cayaponia tayuya roots[J]. J Ethnopharmacology, 2008, 121(1): 333-337.

[9] 常丹, 周梦遥, 徐瑞晗, 等. 蜂蜜抗氧化成分的研究进展[J]. 中国蜂业, 2010, 61(11): 38-40.

[10] 汤明杰, 蔡健荣, 吴小娟, 等. 蜂蜜还原能力的电化学传感器检测[J]. 农业工程学报, 2011, 27(2): 366-369.

[11] TOMÁS -BARBERÁN F A, MARTOS I, FERRERES F, et al. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys[J]. J Sci Food Agric, 2001, 81(5): 485-496.

[12] 陈兰珍, 叶志华, 赵静. 蜂蜜品种鉴别技术研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 494-498.

[13] 黄东萍, 蒋贵发, 黄明立, 等. HPLC法测定蜂蜜中槲皮素和山奈酚[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(2): 128-130.

[14] 罗显来, 刘吟, 黄文. 湖北油菜蜂蜜的指纹图谱研究[J]. 中国蜂业, 2010(4): 10-13.

[15] MIRIAM O I, AMILIA I S, ROSALIA F, et al. Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys[J]. Food Chem, 2009, 115(3): 1141-1149.

[16] YAO Lihu, JIANG Yueming, SINGANUSONG R , et al. Flavonoids in Australian Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potentialfor floral authentication[J]. Food Research International, 2004, 37(2): 166-174.

[17] MICHALKIEWICZ A, BIESAGA M, PYRZYNSKA K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey [J]. J Chromatography A, 2008, 1187(1/2): 18-24.

[18] HADJMOHAMMADI M R, NAZARI S S. Separation optimization of quercetin, hesperetin and chrysin in honey by micellar liquid chromatography and experimental design[J]. J Sep Sci, 2010, 33(20): 3144-3151.

[19] MOHAMMAD R H, SAMAN N, KAMYAR K. Determination of flavonoid markers in honey with SPE and LC using experimental design[J]. Chromatographia, 2009, 69(11/12): 1291-1297.

[20] KRYSTYNA P, MAGDALENA B. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey[J]. Trends in Anal Chem, 2009, 28(7): 893-902.