

超高效液相色谱法测定荔枝蜜中黄酮类化合物

刘功良^{1,2},陈意光³,马磊¹,向燕玲¹,罗海英³,白卫东^{1,2}

(1. 仲恺农业工程学院 轻工食品学院,广东 广州 510225; 2. 广东省岭南特色食品工程技术研究中心,广东 广州 510225; 3. 广州市质量监督检测研究院,广东 广州 510110)

摘要: 为建立超高效液相色谱-二极管阵列检测法(UPLC-PDA)分析荔枝蜜中黄酮类化合物,选用 BEH C18 (2.1 mm×50 mm,1.7 μm) 色谱柱,流动相 A 为 0.05% 的甲酸水、B 为甲醇,进样量 2 μL,流速 0.3 mL/min,柱温 23 ℃,检测波长 255 nm,建立了超高效液相色谱-二极管阵列检测法(UPLC-PDA)。结果显示,检测芦丁标准曲线的线性方程为 $y = 21\,436x - 36\,053$,线性相关系数为 0.996 2,变异系数为 0.94%,加标回收率为 97.36%~103.32%。8 种荔枝蜜含有 7 种共有组分,其保留时间分别为 0.993、2.801、3.141、4.365(该组分经确证为芦丁)、5.250、5.720、5.972 min。

关键词: 荔枝蜜; UPLC-PDA; 黄酮类化合物; 芦丁

中图分类号: S896.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2015)04-0173-04

Determination of Flavonoids in Litchi Honeys by UPLC

LIU Gongliang^{1,2}, CHEN Yiguang³, MA Lei¹, XIANG Yanling¹, LUO Haiying³, BAI Weidong^{1,2}

(1. College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. Guangdong Engineering Technology Research Center for Lingnan Specialty Food, Guangzhou 510225, China; 3. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510110, China)

Abstract: To identify the characteristic components of litchi honey, the flavonoid in litchi honey by ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled with photo-diode array (PDA) was analyzed. The standard curve linear equation of the method for rutin detection was as follows, $y = 21\,436x - 36\,053$. The linear correlation coefficient was 0.996 2 and the relative standard deviation of accuracy test was 0.94%, the recovery of standard sample added was 97.36%—103.32%. The results showed that eight kinds of litchi honeys contained seven characteristic peaks in common. Their retention times were 0.993 min, 2.801 min, 3.141 min, 4.365 min (confirmed as rutin), 5.250 min, 5.720 min and 5.972 min, successively.

Key words: litchi honey; UPLC-PDA; flavonoid; rutin

荔枝蜜主要分布于我国华南地区,其气息芳香馥郁,味甘甜,微带荔枝果酸味,是岭南特有的蜜种,营养丰富^[1-3]。从化荔枝蜜自 2011 年被国家质检总局纳入国家地理标志产品以来,其特征成分的种类及含量尚未见报道。

黄酮类化合物是一种天然抗氧化剂,具有抗衰老、增强机体免疫力等功效,在不同类别的蜂蜜中含量差异较大,可作为特征物质为蜂蜜的种类判别和

质量优劣提供依据^[4-7]。国内外已经开展应用指纹图谱鉴定技术,大多以 XAD-2 树脂柱层析富集蜂蜜中酚类物质(黄酮、酚酸),构建液相色谱指纹图谱,进行蜂蜜真实属性判定的相关研究^[8-9]。但 XAD-2 树脂柱层析富集方法耗时费力、操作繁琐,难以适应市场产品的现场抽查、生产企业的自查及产品进出口快速通关检测的要求。为此,采用有机溶剂萃取快速富集蜂蜜中含有的黄酮,再经旋转蒸

收稿日期:2014-09-05
基金项目:广州市重大民生攻关专项(2012Y2-00015);广州市食品安全检测技术重点实验室开放基金课题(GZKLTTFS-KF-02)
作者简介:刘功良(1980-),男,湖南衡阳人,副教授,博士,主要从事食品安全检测研究。E-mail:gongliangliu@126.com

发浓缩,建立一种超高效液相色谱-二极管阵列检测法(UPLC-PDA),并初步建立荔枝蜜的 UPLC 图谱,旨在为荔枝蜜的种类判别及质量指标提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 供试材料 1—8 号供试荔枝蜜样品均采集于 2012 年 7 月,分别购自广州市蜂唛蜂业有限公司、从化润至园蜂业有限公司、广州市从化区良口镇、广州市从化区温泉镇、广州市从化区街口镇、广州市谭山蜂业有限公司(中华蜜蜂采集)、广州市谭山蜂业有限公司(意大利蜜蜂采集)、广州市从化区吕田镇。

1.1.2 主要试剂 芦丁(153-18-4)、槲皮素(117-39-5)、山奈酚(520-18-3)、儿茶素(225937-10-0)、高良姜素(485-49-4)、柚皮素(480-41-1)、木犀草素(491-70-3)、杨梅素(529-44-2)、染料木素(446-72-0)、白杨素(480-40-0)、乔松素(480-39-7)、黄芩素(491-67-8)、芒花柄素(485-72-3)(均为 HPLC 级别,纯度超过 98%)均购自南京青泽医药科技开发有限公司,甲醇为色谱纯,丙酮等试剂均为分析纯。

1.1.3 试验仪器 Waters Acquity UPLC 高效液相色谱仪、BEH C18 液相色谱柱、Waters Acquity UPLC 二极管阵列检测器购自美国 Waters 公司, PL206-5 分析天平购自德国赛多利斯公司, RE-52AA 旋转蒸发仪购自上海亚荣生化仪器厂, 0.22 μm 微孔滤膜购自津腾有限公司, XT-NS1 氮吹浓缩仪购自上海新拓分析仪器科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 BEH C18 (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为 0.05% 甲酸水, B 为甲醇;进样量 2 μL , 流速 0.3 mL/min;柱温 23 $^{\circ}\text{C}$;检测波长 255 nm;洗脱梯度时间为 0~2 min、2~12 min、12~15 min、15~15.5 min、15.5~16 min,对应的甲醇含量分别为 20%、35%、60%、60%、20%^[10-11]。

1.2.2 黄酮标准品溶液的制备及检测 将 13 种黄酮标准品芦丁、槲皮素、山奈酚、儿茶素、高良姜素、柚皮素、木犀草素、杨梅素、染料木素、白杨素、乔松素、黄芩素和芒花柄素干燥后,各精密称量 2.5 mg,加甲醇溶解并以氮吹仪浓缩,制成 1 mg/mL 的标准溶液,继续加甲醇稀释成 0.1 mg/mL 的混合标准溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[12],按 1.2.1 确定的色谱条件进行检测。

1.2.3 芦丁样品的标准曲线的绘制及精密度、加标回收率的测定 用甲醇作溶剂,将芦丁配制成质量

浓度分别为 0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,按 1.2.1 所确定的色谱条件进样分析,平行测定 3 次,以标准品含量为横坐标,以平均峰面积为纵坐标得到检测芦丁质量浓度的标准曲线。取质量浓度为 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 的芦丁标准品,按 1.2.1 所确定的色谱条件重复进样,测定 6 次,计算芦丁标准品峰面积的平均值及相对标准偏差(RSD),考察所建立方法的精密度。

精密称取 3 号样品 50 g,准确添加一定量的芦丁,按 1.2.4 样品处理方法进行处理,按 1.2.1 确定的色谱条件进行检测,利用标准曲线计算出芦丁标准品的浓度,计算检测结果的 RSD,考察所建立方法的加标回收率。

1.2.4 供试样品溶液的制备及检测 称取 100 g 样品于 250 mL 三角瓶中,加 200 mL 丙酮,振荡摇匀,在超声波功率 40 W 条件下提取 20 min;萃取并静置分层,取上层的丙酮提取液;将萃取液重复萃取 2 次,每次使用 200 mL 丙酮,将提取液合并于圆底烧瓶中,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 减压抽真空浓缩挥干;用甲醇复溶定容至 10 mL,摇匀;利用 0.22 μm 滤膜过滤,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[13],按 1.2.1 确定的色谱条件进行检测。

1.2.5 蜂蜜指纹图谱中相对保留值的测定 在标准图谱上选择一个出峰时间较居中,并为所有样品所共有的组分作为参照峰,分别计算各色谱峰的相对保留值(R_{RT}),分析其共有性^[14-15]。 $R_{RT} = t_{ri}/t_{rs}$,其中 t_{ri} 为待测峰的绝对保留时间, t_{rs} 为参照峰的绝对保留时间。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的建立

从图 1 可见,超高效液相色谱检测芦丁的标准曲线的线性方程为 $y = 21\,436x - 36\,053$,相关系数为 0.996 2,表明在此浓度范围内,芦丁的质量浓度与峰面积相关性良好。

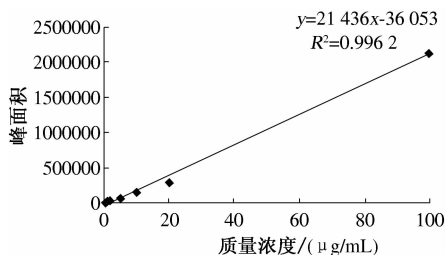


图 1 超高效液相色谱检测芦丁的标准曲线

2.2 精密度

将芦丁重复进样 6 次^[16],芦丁的色谱峰相对保留时间和其相对峰面积比值无明显变化,求得各色

谱峰相对峰面积的 RSD 为 0.94% ,表明该方法的精密度好。

2.3 加标回收率

如表 1 所示,芦丁标准品的回收率为 97.36% ~ 103.32% , RSD 为 2.41% ,表明该方法回收率高。

表 1 芦丁的加标回收率测定结果

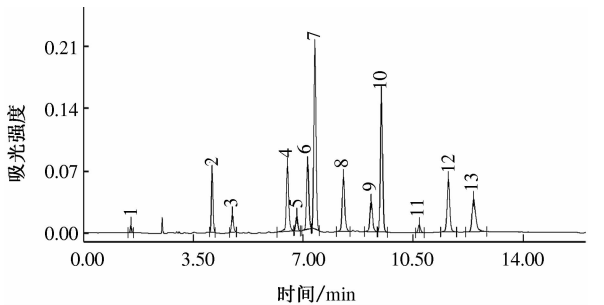
序号	本底含量/ (mg/g)	加入量/ (mg/g)	测定值/ (mg/g)	回收率/ %	RSD / %
1	0.001	0.008	0.010	97.36	2.41
2	0.001	0.008	0.001	99.34	
3	0.001	0.008	0.010	103.32	
4	0.001	0.008	0.010	97.36	
5	0.050	0.400	0.010	101.33	
6	0.050	0.400	0.010	101.33	

2.4 样品测定

2.4.1 黄酮标准品的检测 由图 2 可见,13 种黄酮标准品的 UPLC 图色谱峰清晰,区分度明显。将 8 种荔枝蜜样品的 UPLC 色谱图进行对比发现,3 号样品的色谱峰数量最多,总面积最大,将其定为标准图谱。

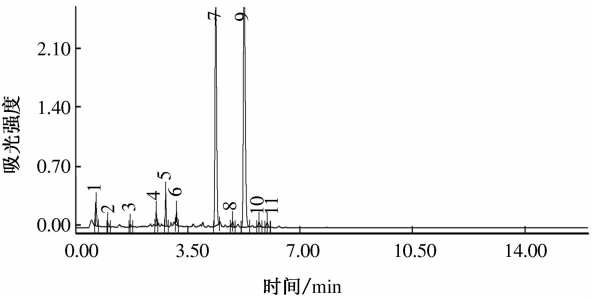
2.4.2 荔枝蜜的高效液相色谱图特征分析 将 8 种荔枝蜜的超高效液相色谱图(图略)与图 2 进行比较,发现 8 种荔枝蜜中的超高效液相色谱图含有 7 个共有的特征峰,其保留时间分别为 0.993、2.801、3.141、4.365、5.250、5.720、5.972 min。其中,保留时间为 4.365 min 和 5.250 min 的这 2 个特征峰峰值特别高(图 3 中 7 号和 9 号峰所示);通过与图 2 中黄酮标准品的液相色谱图对比,保留时间为 4.365 min 的特征峰(图 3 中 7 号峰所示)为芦丁;其他特征成分是否为黄酮仍需进一步确证。

根据图 1 中超高效液相色谱检测芦丁的标准曲线进行计算,1—8 号荔枝蜜样品中的芦丁含量分别是 31.28、9.665、45.28、31.25、38.41、17.63、27.33、51.23 $\mu\text{g/g}$ 。



1: 儿茶素 1.518 min; 2: 芦丁 4.104 min; 3: 杨梅素 4.746 min;
4: 槲皮素 6.497 min; 5: 柚皮素 6.792 min; 6: 木犀草素 7.140 min;
7: 染料木素 7.369 min; 8: 山奈酚 8.276 min; 9: 黄芩素 9.158 min;
10: 芒花柄素 9.488 min; 11: 乔松素 10.688 min;
12: 白杨素 11.616 min; 13: 高良姜素 12.414 min

图 2 13 种黄酮标准品的超高效液相色谱



1:0.622 min; 2:0.993 min; 3:1.698 min;
4:2.504 min;5:2.801 min;6:3.141 min;7:4.365 min;
8:4.886 min; 9:5.250 min; 10:5.720 min; 11:5.972 min

图 3 3 号荔枝蜜的超高效液相色谱

取图 2 中的 6 号特征峰为参照峰,计算出 7 个共有特征峰的 R_{RT} 分别为 0.316、0.892、1.000、1.389、1.671、1.821 和 1.901,8 种荔枝蜜中特征峰分布情况如表 2 所示。对于由不同蜂种(中华蜜蜂和意大利蜜蜂)采集的荔枝蜜,其超高效液相色谱图中的峰分布情况与峰值大小并无明显区别,所含特征物质的种类完全一样,这表明荔枝蜜的特征成分与蜂种无关。

表 2 8 种荔枝蜜的超高效液相色谱图共有峰分析

样品 编号	$t_{ri}(R_{RT})/\text{min}$										
	0.622 (0.198)	0.993 (0.316)	1.698 (0.541)	2.504 (0.797)	2.801 (0.892)	3.141 (1.000)	4.365 (1.389)	4.886 (1.556)	5.250 (1.671)	5.720 (1.821)	5.972 (1.901)
1	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
2	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
5	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
6	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
7	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
8	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

注: + 表示出现此峰, - 表示未出现此峰。

3 结论

本研究建立了一种高效液相色谱法,检测芦丁的标准曲线的线性方程为 $y = 21\,436x - 36\,053$,相关系数为 0.996 2,精密度的 RSD 为 0.94%,加标回收率为 97.36%~103.32%,可用于荔枝蜜中黄酮等微量特征成分的检测。

8 种荔枝蜜的超高效液相色谱图中含有 7 个共有的特征峰,其中 R_{RT} 为 1.389、1.671 的 2 个峰峰值得特别高;荔枝蜜的特征成分与蜂种无关;建立的 UPLC 图谱可作为荔枝蜜质量检测指标,为荔枝蜜的真伪鉴别提供重要参考依据。

虽然在荔枝蜜中成功检测出 7 种共有组分,其中,保留时间为 4.365 min 的组分经确证为芦丁,但研究过程中标准物质种类有限,尚有其他特征成分未能确定,这需要结合质谱分析、红外光谱等技术手段进一步判断。若要进行荔枝蜜的产地来源分析、品种鉴定及指纹图谱的建立,还需要搜集不同地区、不同年份的荔枝蜜来开展进一步的研究。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB 14963—2011 食品安全国家标准 蜂蜜[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [2] Federico F, Paula A, Francisco A. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44: 2053-2056.
- [3] 林捷,郑华,周伟坚,等. 超滤膜孔径对荔枝蜜加工特性的影响及营养分析[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(7): 741-744.
- [4] Makawi S A, Gadkariem E A, Ayoub S H. Determination of antioxidant flavonoids in Sudanese honey samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *E-Journal of Chemistry*, 2009, 6(1): 429-437.
- [5] Hamdy A A, Ismail H M, Ahwal A A, *et al.* Determination of flavonoid and phenolic acid contents of clover, cotton and citrus floral honeys [J]. *Journal of the Egypt Public Heath Association*, 2009, 84(3): 245-259.
- [6] 王海敏,虞海霞,董蕊,等. 苕子蜜总酚酸和总黄酮含量测定及抗氧化活性的研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(1): 54-57.
- [7] Xu Y Q, Yu Z Y, Wu F. Studies on the flavonoids and antioxidant activities in leaves of black currant [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2002, 19(2): 136-140.
- [8] Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, *et al.* Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells [J]. *Food Chemistry*, 2007, 104: 1635-1640.
- [9] 邢建军,杨洁,郑国伟,等. XAD-2 树脂对油菜蜂蜜中黄酮类物质分离条件的优化[J]. *中国蜂业*, 2010, 61(12): 9-12.
- [10] 梁铨,卢焕仙,刘宏程,等. 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[J]. *食品科学*, 2013, 34(6): 148-151.
- [11] Yao L H. Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian Eucalyptus honeys [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2004, 52(2): 210-214.
- [12] Izabela J M, Anna P, Malgorzata D, *et al.* Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys [J]. *Food Chemistry*, 2011, 131: 1149-1156.
- [13] Jasna B, Mojca K, Terezija G, *et al.* LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of slovenian honey [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127: 296-302.
- [14] Petrus K, Schwartz H, Sontag G. Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400: 2555-2563.
- [15] Jasna B. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127: 296-302.
- [16] Lihu Y. Phenolic acids and abscisic acid in Australian eucalyptus honeys and their potential for floral authentication [J]. *Food Chemistry*, 2004, 86: 169-177.