

doi: 10.19969/j.fxcsxb.22042202

超高效液相色谱 – 串联质谱法测定蜂蜜中 24种酚酸和黄酮类化合物

张敏, 黄京平, 赵文, 王鹏, 金玥, 胡菡, 张金振*

(中国农业科学院蜜蜂研究所 农业农村部蜂产品质量监督检验测试中心(北京), 北京 100193)

摘要: 建立了超高效液相色谱 – 串联质谱(UPLC – MS/MS)同时测定蜂蜜中24种酚酸和黄酮类化合物的方法。样品经水溶解, SHIMSEN Styra MAX固相萃取柱净化, 超高效液相色谱 – 串联质谱测定, 外标法定量。结果表明, 24种化合物在2 ~ 1 000 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于0.998, 方法定量下限为2 ~ 10 $\mu\text{g/kg}$; 在200、400、1 000 $\mu\text{g/kg}$ 加标水平下, 平均回收率为60.3% ~ 111%, 相对标准偏差为0.80% ~ 8.5%。采用该方法测定15批次5种植物源蜂蜜样品, 结果显示样品中均含有不同浓度的没食子酸、短叶松素、高良姜素、松属素、原儿茶酸、对香豆酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、槲皮素、异鼠李素、荜菲醇和柯因等18种化合物, 均不含有迷迭香酸和桑色素。该方法前处理简单、快速、灵敏、稳定, 可用于蜂蜜中酚酸类 and 黄酮类物质的测定。

关键词: 蜂蜜; 超高效液相色谱 – 串联质谱; 固相萃取; 酚酸; 黄酮

中图分类号: O657.7; TS201.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2022)11-1636-08

Determination of 24 Kinds of Phenolic Acids and Flavonoids in Honey by Ultra-high Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Min, HUANG Jing-ping, ZHAO Wen, WANG Peng,
JIN Yue, HU Han, ZHANG Jin-zhen*

(Bee Products Quality Supervision and Testing Center, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: An ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric method (UPLC – MS/MS) was established for the determination of 24 kinds of phenolic acids and flavonoids in honey. The target compounds were extracted with water, then purified and concentrated with a SHIMSEN Styra MAX solid phase extraction column, and finally analyzed by UPLC – MS/MS and quantified by external standard method. Under the optimal conditions, there were good linear relationships for 24 target compounds in the range of 2 – 1 000 $\mu\text{g/L}$ with correlation coefficients (r^2) greater than 0.998. The limits of quantitation for the analytes were in the range of 2 – 10 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries ranged from 60.3% to 111%, with relative standard deviations of 0.80% – 8.5%. The established method was successfully applied to the rapid detection of 15 samples from five types of honey. It was found that 18 compounds including gallic acid, pinobanksin, galangin, pinocembrine, protocatechuic acid, *p*-coumaric acid, *p*-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, quercetin, isorhamnetin, kaempferol and chrysin etc. were detected in all honeys, but there existed significant differences in their contents. Meanwhile, rosmarinic acid and morin were undetected in all honeys. The method is simple, rapid, sensitive and stable, and it could be used for the simultaneous determination of various phenolic acids and flavonoids in various honeys.

Key words: honey; ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry; solid phase extraction; phenolic acids; flavonoids

蜂蜜中含有维生素、氨基酸、酚酸、黄酮等丰富的生物活性物质, 不仅具有较高的营养价值, 还具有抗菌、抗氧化和调节机体免疫力等功效^[1-3]。酚酸和黄酮类物质是蜂蜜中重要的生物活性成分, 如对羟基苯甲酸、咖啡酸苯乙酯、木犀草素、槲皮素、山奈酚、芹菜素和柯因等已被证实具有抗氧化、

收稿日期: 2022-04-22; 修回日期: 2022-06-04

* 通讯作者: 张金振, 硕士, 副研究员, 研究方向: 食品科学, E-mail: 914341923@qq.com

抗炎和抗肿瘤等功效^[4-7]。蜂蜜中已发现的酚酸和黄酮类物质达几十种, 且在不同植物源蜂蜜中的含量差异较大, 可作为鉴别蜂蜜植物源的生物标记物^[8]。

蜂蜜基质复杂, 测定酚酸和黄酮类物质时, 需先对样品中的目标化合物进行提取、净化和富集。文献报道的前处理方法主要有液-液萃取^[9-14]、固相萃取(SPE)^[15-25]等。其中液-液萃取程序复杂、耗时长, 需要大量的有机溶剂, 污染环境, 而固相萃取法具有操作简单、萃取试剂用量少、重现性好等优点, 已广泛应用于前处理领域。高效液相色谱法^[18-23]是测定蜂蜜中酚酸和黄酮类物质的常用方法。但该方法分析时间长, 灵敏度低, 且不同化合物具有不同的最佳吸收波长, 共流出物易对结果产生干扰, 多组分分离难度大, 影响结果准确度。超高效液相色谱-串联质谱法具有分析时间短、灵敏度高等优点, 是近年来应用较为广泛的酚酸和黄酮类物质的分析方法^[12-13, 22-24]。

本研究采用固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱同时测定蜂蜜中的 24 种酚酸和黄酮类化合物。该方法简单、快捷, 可同时完成定性和定量分析, 为蜂蜜中酚酸和黄酮类化合物的含量测定及不同植物源蜂蜜的鉴别提供了技术支撑。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

乙腈、甲醇(色谱纯)购于德国 Merck 公司; 甲酸(色谱纯)购于美国 Fisher Scientific 公司; 氨水购于北京化工厂。固相萃取柱: SHIMSEN Styra MAX (150 mg/6 mL) 购于岛津公司, Bond Elut Plexa PAX (200 mg/6 mL) 购于 Agilent 公司, Oasis HLB (200 mg/6 mL) 购于 Waters 公司; 24 种酚酸和黄酮类化合物的纯度均 $\geq 98\%$, 购于上海源叶公司。洋槐蜜(Acacia honey)、枣花蜜(Jujube honey)、椴树蜜(Linden honey)、荞麦蜜(Buckwheat honey)、荆条蜜(Vitex honey), 每个植物源蜂蜜 3 个样品共 15 批次购于蜂场(信息见表 1), 于 4 °C 保存。

1.2 仪器与设备

Agilent 6495 高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪, 配有电喷雾离子源(ESI 源)(美国 Agilent 公司); 千分之一天平、十万分之一天平(上海梅特勒-托利多公司); TTL-DC II 水浴氮吹仪(同泰联公司); Vortex-Genie2 涡旋混合器(美国 Scientific Industries); Milli-Q 去离子水发生器(Integral5, 美国 Milli-Q 公司); SPE 装置(美国 Agilent 公司)。

1.3 标准溶液的配制

1.3.1 标准储备液 用甲醇将各化合物溶解并稀释成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, 转移至棕色瓶中于 -18 °C 保存, 备用。

1.3.2 标准工作液 溶剂标准工作液: 用 0.1% 甲酸-80% 甲醇水溶液将标准储备液稀释成质量浓度分别为 2、5、10、50、100、200、500、1 000 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液, 现用现配。

基质标准工作液: 采用“1.4”方法处理果葡糖浆制备空白基质溶液, 将标准储备液稀释成质量浓度分别为 2、5、10、50、100、200、500、1 000 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液, 现用现配。

1.4 样品前处理

1.4.1 样品提取 称取样品 2 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 去离子水涡旋充分溶解, 用氨水调至 pH 6.0, 待净化。

1.4.2 样品净化 将样液全部转移至依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 去离子水活化的 SHIMSEN Styra MAX 固相萃取柱, 待样液全部流出后, 用 5 mL 超纯水淋洗, 抽干小柱, 然后用 5 mL 5% 甲酸-甲醇乙腈(甲醇: 乙腈 = 1:1)溶液洗脱, 收集洗脱液于 40 °C 氮吹至近干, 用 1 mL 0.1% 甲酸-80% 甲醇水溶液复溶, 过 0.22 μm 尼龙滤膜, 待测定。

表 1 样品信息

Honey sample	Region of honey	Time
Buckwheat honey 1	Shaanxi, China	2020
Buckwheat honey 2	Neimenggu, China	2021
Buckwheat honey 3	Neimenggu, China	2021
Linden honey 1	Jilin, China	2020
Linden honey 2	Heilongjiang, China	2020
Linden honey 3	Heilongjiang, China	2020
Acacia honey 1	Beijing, China	2021
Acacia honey 2	Gansu, China	2020
Acacia honey 3	Henan, China	2020
Vitex honey 1	Beijing, China	2020
Vitex honey 2	Hebei, China	2019
Vitex honey 3	Liaoning, China	2019
Jujube honey 1	Tianjin, China	2020
Jujube honey 2	Shanxi, China	2021
Jujube honey 3	Shanxi, China	2021

1.5 仪器条件

1.5.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 柱温: 35 °C; 流动相 A 相: 0.1% 甲酸水溶液, B 相: 乙腈; 梯度洗脱程序: 0 ~ 1 min, 95% A; 1 ~ 8.5 min, 95% ~ 30% A; 8.5 ~ 8.6 min, 30% ~ 0% A; 8.6 ~ 11 min, 0% ~ 95% A; 11 ~ 14 min, 95% A; 流速: 0.35 mL/min; 进样体积: 2 μL。

1.5.2 质谱条件 电喷雾离子源负离子模式(ESI⁻); 多反应监测模式(MRM); 鞘气温度: 290 °C; 鞘气流速: 11 L/min; 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流速: 9 L/min; 雾化气压力: 310 kPa; 碎裂电压: 380 V; 毛细管电压: 3 500 V; 保留时间、母离子、子离子等其他质谱参数见表 2。

表 2 24 种目标化合物的 MRM 参数
Table 2 MRM parameters for 24 target compounds

No.	Compound	Retention time(min)	Ion pair(<i>m/z</i>)	Collision energy(V)
1	Gallic acid(没食子酸)	2.38	169.0/125.0 [*] , 169.0/79.0	15, 19
2	Protocatechuic acid(原儿茶酸)	3.59	153.0/190.9 [*] , 153.0/81.0	15, 20
3	Chlorogenic acid(绿原酸)	4.05	353.1/190.9 [*]	15
4	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid(对羟基苯甲酸)	4.30	137.0/93.1 [*]	10
5	Caffeic acid(咖啡酸)	4.51	180.0/136.0 [*] , 180.0/118.0	15, 25
6	Rutin(芦丁)	4.83	609.0/301.0 [*] , 609.0/271.0	40, 58
7	Ellagic acid(鞣花酸)	5.08	301.0/145.0 [*] , 301.0/229.0	42, 38
8	<i>p</i> -Coumaric acid(对香豆酸)	5.17	163.0/119.0 [*] , 163.0/93.0	15, 25
9	Naringin(柚皮素)	5.29	579.0/271.0 [*] , 579.0/459.0	37, 25
10	Ferulic acid(阿魏酸)	5.35	193.1/134.0 [*] , 193.1/177.9	15, 15
11	Rosmarinic acid(迷迭香酸)	5.66	359.0/161.0 [*] , 359.0/197.0	12, 15
12	Morin(桑色素)	6.19	301.0/151.0 [*] , 301.0/125.0	16, 16
13	Salicylic acid(水杨酸)	6.22	137.1/93.1 [*]	14
14	Luteolin(木犀草素)	6.48	285.1/133.0 [*] , 285.1/150.9	40, 30
15	Quercetin(槲皮素)	6.53	301.0/151.1 [*] , 301.0/179.0	22, 18
16	Apigenin(芹菜素)	7.07	269.0/117.0 [*] , 269.0/151.0	30, 24
17	Naringenin(柚皮苷)	7.10	271.0/151.0 [*] , 271.0/119.0	19, 33
18	Kaempferol(茛菲醇)	7.20	285.0/93.0 [*] , 285.0/257.0	35, 20
19	Isorhamnetin(异鼠李素)	7.29	315.2/300.1 [*] , 315.2/227.4	22, 32
20	Pinobanksin(短叶松素)	7.31	271.0/252.9 [*] , 271.0/197.0	22, 28
21	Chrysin(柯因)	8.46	253.1/63.0 [*] , 253.1/143.0	32, 24
22	Pinocembrin(松属素)	8.57	255.1/151.0 [*] , 255.1/213.0	16, 12
23	Phenethyl caffeate(CAPE, 咖啡酸苯乙酯)	8.59	283.1/135.0 [*] , 283.1/179.0	20, 12
24	Galangin(高良姜素)	8.62	269.0/169.0 [*] , 269.0/171.0	24, 24

*quantitative ion

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

将质量浓度为 100 μg/L 的各标准工作溶液, 分别采用正、负离子扫描模式进行全扫描。由于待测目标化合物均带有羟基, 易失去氢质子形成负离子峰, 因此在负离子模式下具有更高的响应。以待测化合物的分子离子峰为母离子, 采用子离子扫描模式选择最优的 2 个离子并确定定性离子和定量离子, 在 MRM 模式下优化获得最佳质谱条件(见表 2)。

2.2 色谱条件的优化

化合物的峰形、分离度和响应强度受流动相和色谱柱的影响。实验比较了 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 和 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 2 种色谱柱以及甲醇-0.1% 甲酸水溶液和乙腈-0.1% 甲酸水溶液 2 种流动相的不同组合, 对目标化合物峰形、分离效果及响应强度的影响。因大部分待测物含有酚羟基和羧基, 分子极性较强, 采用 HSS T3 色谱柱和乙腈-0.1% 甲酸水溶液流动相时, 24 种目

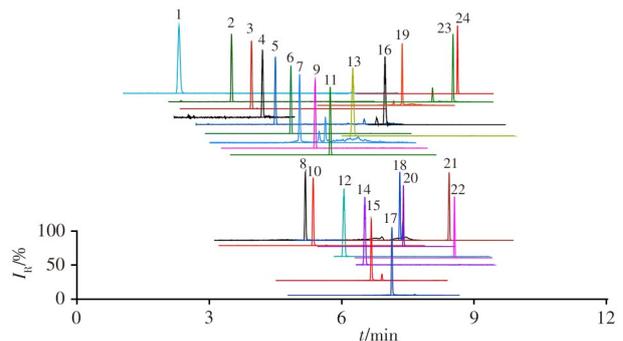


图 1 24 种目标化合物的特征离子谱图
Fig. 1 MRM chromatograms of 24 target compounds the peak numbers denoted were the same as those in Table 2

标化合物具有更强的保留能力和对称的峰形, 尤其是增强了没食子酸的保留能力, 改善了山奈酚和异鼠李素的峰拖尾现象。优化得到最佳色谱条件如“1. 5. 1”所示, 该条件下 24 种化合物的特征离子谱图见图 1。

2.3 前处理方法的优化

2.3.1 固相萃取柱的选择 目标化合物多含有酚羟基, 呈弱酸性, MAX 和 PAX 均属于混合型阴离子反相吸附固相萃取柱, 具有阴离子交换和反向保留的作用, 适于酸性化合物的萃取。HLB 固相萃取柱耐受的 pH 值范围较广, 对非极性至中性的化合物均有较好回收, 是目前蜂蜜中酚酸和黄酮类化合物测定常用的固相萃取柱。比较了 MAX、PAX 和 HLB 3 种固相萃取柱的净化效果(见图 2)。结果显示, 采用 HLB 柱净化时, 原儿茶酸、没食子酸、鞣花酸、芦丁、槲皮素的回收率低于 60%; PAX 柱净化时, 没食子酸、鞣花酸、槲皮素、异鼠李素的回收率低于 60%; MAX 柱净化时的整体回收率较好(均 > 60%)。因此, 本研究选择 MAX 固相萃取柱对样品进行净化。

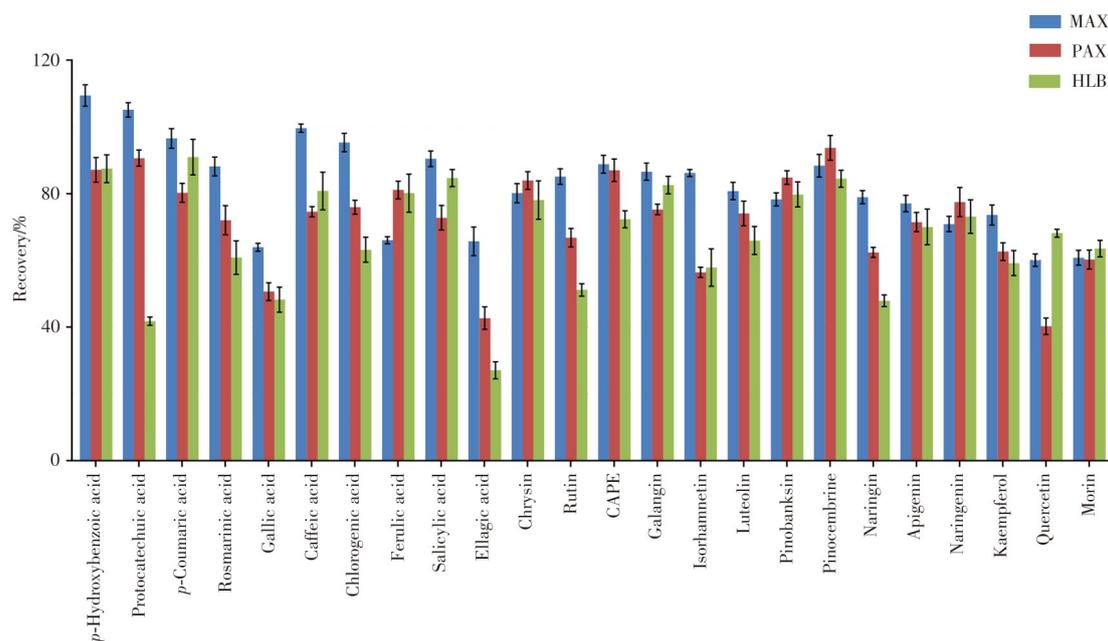


图 2 不同类型固相萃取柱对目标化合物回收率的影响

Fig. 2 Effects of different SPE columns on the recoveries of 24 target compounds

2.3.2 样品溶液 pH 值的选择 样品 pH 值是影响提取效果的重要因素, 当 $\text{pH} < \text{pK}_a$ 时, 化合物以分子状态存在。以水为提取溶液, 结合目标化合物的 pK_a 值, 比较了样品溶液 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 时, MAX 固相萃取柱对目标化合物回收率的影响(图 3)。结果表明, 随着 pH 值的增加, 目标化合物的整体回收率先增大后降低, 当 pH 为 6.0 时, 目标化合物的整体回收率较高, 为 62.7% ~ 109%。因此, 选择最佳提取条件为 pH 6.0。

2.3.3 洗脱溶剂的选择 为中和目标化合物的电荷, 达到最佳洗脱效果, 结合文献^[16-17], 选取甲醇、2% 甲酸甲醇、5% 甲酸甲醇、6% 甲酸甲醇作为洗脱溶剂, 通过洋槐蜂蜜加标回收的方式考察洗脱效果。结果显示, 目标化合物的回收率随着甲酸含量的增加而提高, 当甲酸为 5% 时, 目标化合物的洗脱效果较好。继续增加甲酸含量, 没食子酸、绿原酸的回收率降低。比较了 5% 甲酸甲醇和 5% 甲酸-甲醇乙腈(甲醇:乙腈 = 1:1)的洗脱效果, 发现当加入乙腈后, 色素、柚皮苷的回收率提高, 其他目标化合物的回收率基本不变, 最终确定洗脱溶剂为 5% 甲酸-甲醇乙腈(甲醇:乙腈 = 1:1)。

洗脱溶剂的用量也会影响目标化合物的洗脱效果,

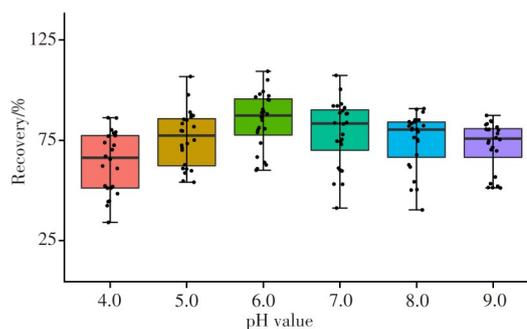


图 3 样品溶液 pH 值对目标化合物回收率的影响

Fig. 3 Effects of pH value on the recoveries of 24 target compounds

用量少时目标化合物洗脱不完全,用量大则造成试剂的浪费。以洋槐蜂蜜加标回收的方式,比较了不同洗脱溶剂用量(2、3、4、5、6 mL)时目标化合物的洗脱效果。结果表明,洗脱溶剂用量为2 mL时,目标化合物洗脱不完全,桑色素的回收率仅为12.5%。随着洗脱溶剂用量的增加,目标化合物的回收率逐渐增大,当洗脱溶剂用量为5 mL时,目标化合物具有较好的洗脱效果,回收率为60.5%~106%;继续增大洗脱溶剂用量,目标化合物的回收率基本不变。因此,选择洗脱溶剂用量为5 mL。

2.4 方法学验证

2.4.1 基质效应 酚酸和黄酮类化合物在蜂蜜中属于内源性化合物,因此以果葡糖浆代替蜂蜜,配制系列基质标准溶液,根据下式计算基质效应(ME): $ME = \text{基质标准曲线斜率} / \text{溶剂标准曲线斜率} \times 100\%$ 。若ME为80%~120%,表明存在弱基质效应,可忽略影响;ME < 80%,为基质抑制效应,ME > 120%,则为基质增强效应,均需采取措施减少基质影响^[26]。由表3可知,绿原酸(ME = 70.6%)、鞣花酸(ME = 56.3%)、迷迭香酸(ME = 77.3%)、水杨酸(ME = 72.3%)、槲皮素(ME = 74.5%)、柚皮苷(ME = 75.8%)和短叶松素(ME = 65.9%)具有基质抑制效应,因此采用基质标准曲线法进行定量。

表3 24种化合物的线性方程、相关系数、基质效应和定量下限

Table 3 Linear equations, correlation coefficients, matrix effects, limits of quantitation of 24 target compounds

Compound	Regression equation	r^2	Matrix effect(%)	LOQ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Gallic acid	$y = 3\ 659.1x + 4.1$	0.999 2	120	5
Protocatechuic acid	$y = 3\ 192.7x + 13\ 508.8$	0.999 0	112	2.5
Chlorogenic acid	$y = 1\ 483.5x + 1\ 337.7$	0.998 9	70.6	5
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	$y = 1\ 625.0x + 23\ 836.7$	0.999 6	103	5
Caffeic acid	$y = 628.2x + 719.8$	0.998 7	104	10
Rutin	$y = 490.9x + 106.9$	0.999 3	86.7	5
Ellagic acid	$y = 207.2x + 625.3$	0.998 9	56.3	5
<i>p</i> -Coumaric acid	$y = 3\ 891.7x + 4\ 827.7$	0.998 7	97.5	5
Naringin	$y = 593.9x + 189.2$	0.999 3	106	5
Ferulic acid	$y = 283.7x + 378.6$	0.998 1	96.4	5
Rosmarinic acid	$y = 774.7x + 158.9$	0.998 4	77.3	5
Morin	$y = 1\ 875.3x + 3\ 430.3$	0.998 8	91.6	5
Salicylic acid	$y = 3\ 306.6x + 14\ 385.1$	0.998 4	72.3	5
Luteolin	$y = 7\ 262.1x + 2\ 054.2$	0.999 4	89.9	2
Quercetin	$y = 6\ 177.1x + 8\ 027.9$	0.998 8	74.5	2
Apigenin	$y = 4\ 019.7x + 15\ 836.0$	0.998 4	86.7	2.5
Naringenin	$y = 5\ 258.0x - 8\ 229.0$	0.999 3	75.8	2
Kaempferol	$y = 457.5x + 9.3$	0.999 5	87.0	10
Isorhamnetin	$y = 9\ 048.6x + 21\ 183.8$	0.998 1	97.2	2
Pinobanksin	$y = 2\ 005.0x + 5\ 340.5$	0.998 7	65.9	2
Chrysin	$y = 2\ 520.9x + 11\ 246.7$	0.998 7	80.8	5
Pinoembrine	$y = 1\ 003.0x + 3\ 480.3$	0.999 2	94.1	2
CAPE	$y = 11\ 624.1x + 8\ 062.0$	0.999 3	89.5	2
Galangin	$y = 683.8x + 937.2$	0.999 6	83.5	5

2.4.2 线性与定量下限 将基质标准工作溶液按“1.5”条件测定,以化合物的质量浓度为横坐标(x , $\mu\text{g}/\text{L}$),对应的峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线。结果显示,各化合物在2~1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性良好,相关系数(r^2)均大于0.998(见表3)。以10倍信噪比($S/N = 10$)对应的质量浓度为定量下限(LOQ)^[27],24种化合物的定量下限为2~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (见表3)。

2.4.3 回收率与相对标准偏差 采用洋槐蜂蜜进行200、400、1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3个水平的加标回收实验,每个浓度水平重复6次,连续测定3 d。由表4可知,蜂蜜中24种化合物的回收率为60.3%~111%,日内相对标准偏差(RSD)为0.80%~8.5%,日间RSD为1.1%~7.4%。表明本方法的准确性和重复性满足分析要求,可用于实际样品测定。

2.5 实际样品的测定

采用本方法对洋槐、枣花、荆条、椴树和荞麦5种植物源蜂蜜共15批次样品进行测定,结果见图4,含量值见表5。结果显示,所有蜂蜜样品中均含有没食子酸、原儿茶酸、对香豆酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、短叶松素、松属素、槲皮素、异鼠李素、高良姜素、荜菲醇和柯因等18种化合物,均不含有迷迭香酸和桑色素。

表 4 24 种目标化合物的回收率和相对标准偏差
Table 4 Recoveries and relative standard deviations of 24 target compounds

Compound	Original content ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	RSD (%)	
			Intra-day	Inter-day
Gallic acid	22.45	63.7 ~ 71.0	0.80 ~ 4.0	1.1 ~ 3.6
Protocatechuic acid	84.45	74.4 ~ 90.4	1.5 ~ 4.4	3.1 ~ 4.5
Chlorogenic acid	165.94	79.8 ~ 95.2	1.4 ~ 6.0	3.2 ~ 5.0
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	542.78	78.1 ~ 104	1.9 ~ 8.4	2.8 ~ 6.9
Caffeic acid	78.34	90.4 ~ 103	2.6 ~ 7.6	3.1 ~ 6.0
Rutin	17.87	80.6 ~ 88.1	2.7 ~ 5.7	4.5 ~ 6.1
Ellagic acid	-*	66.4 ~ 86.4	2.4 ~ 5.2	2.5 ~ 4.9
<i>p</i> -Coumaric acid	169.48	101 ~ 111	2.1 ~ 7.4	3.3 ~ 4.9
Naringin	105.25	75.1 ~ 87.1	2.5 ~ 7.5	4.3 ~ 5.1
Ferulic acid	-	66.9 ~ 83.2	3.9 ~ 8.5	4.6 ~ 6.3
Rosmarinic acid	-	72.8 ~ 90.3	4.3 ~ 8.3	5.4 ~ 7.4
Morin	-	60.3 ~ 69.3	1.8 ~ 3.1	2.3 ~ 2.9
Salicylic acid	127.63	84.1 ~ 91.6	1.9 ~ 6.3	2.7 ~ 4.3
Luteolin	16.52	61.4 ~ 92.5	2.8 ~ 6.0	3.2 ~ 4.7
Quercetin	66.20	60.5 ~ 66.7	1.7 ~ 4.2	1.9 ~ 3.3
Apigenin	38.87	66.0 ~ 86.4	2.2 ~ 8.2	3.9 ~ 5.9
Naringenin	20.42	72.4 ~ 96.2	1.9 ~ 8.1	3.8 ~ 5.3
Kaempferol	100.68	66.4 ~ 80.2	3.8 ~ 6.7	4.1 ~ 5.8
Isorhamnetin	285.52	81.1 ~ 87.1	2.0 ~ 6.3	2.8 ~ 4.9
Pinobanksin	194.18	67.6 ~ 90.5	1.3 ~ 7.5	4.7 ~ 5.8
Chrysin	534.98	79.6 ~ 89.3	2.0 ~ 6.0	3.2 ~ 4.5
Pinocembrine	339.61	82.6 ~ 95.8	1.9 ~ 4.5	4.0 ~ 4.7
CAPE	18.07	69.9 ~ 82.1	2.1 ~ 7.1	3.9 ~ 4.8
Galangin	70.01	81.4 ~ 90.5	2.2 ~ 4.6	3.4 ~ 4.0

* not detected

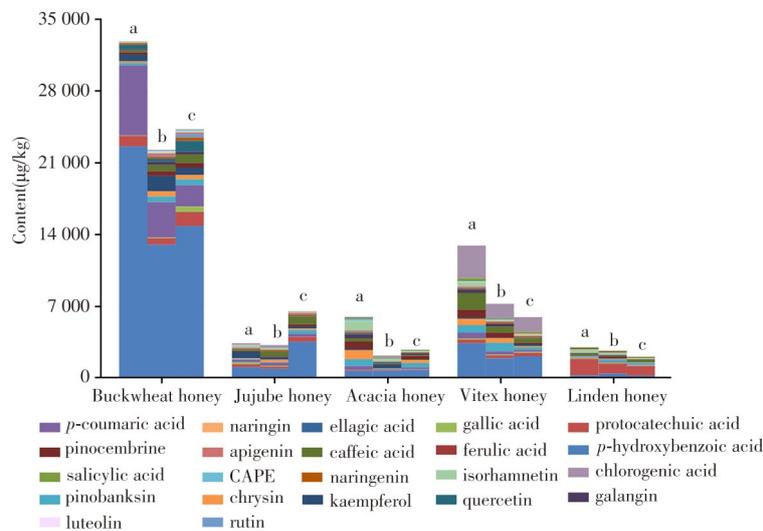


图 4 不同种类蜂蜜中酚酸和黄酮类化合物的组成

Fig. 4 Composition of phenolic acids and flavonoids in different types of honey
a, b, c means different samples from the same botanical sources

除洋槐蜜外, 其余 4 种植物源蜂蜜以酚酸类化合物为主, 荞麦蜜中对羟基苯甲酸和对香豆酸的含量高于其他蜂蜜, 平均含量分别为 $16\,823.53\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $4\,118.85\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。荆条蜜中绿原酸的含量高于其他蜂蜜, 平均含量为 $2\,002.48\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。洋槐蜜中异鼠李素、短叶松素、柯因和松属素等黄酮类化合物的含量相对较高, 与 Truchado 等^[28]测定意大利和斯洛伐克洋槐蜜的结果基本一致。椴树蜜中原儿茶酸的含量相对较高, 平均含量为 $1\,186.13\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 黄酮类化合物如芦丁、荜菲醇、木犀草素的含量较低。Sergiel 等^[8]鉴定得到波兰椴树蜜的原儿茶酸平均含量为 $1\,390\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 芦丁、荜菲醇、木犀草素的含量均低于 $30\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 本研究与其结果较一致。枣花蜜中对羟基苯甲酸、咖啡酸、荜菲醇的含量相对较高, 杨二林等^[29]研究表明, 陕西不同地区枣花蜂蜜均含有原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸、荜菲醇和松属素, 但含量与本研究结果存在一定差异, 说明蜂蜜中酚酸和黄酮的含量受地区、地理条件的影响^[30-31]。

表5 不同种类蜂蜜中酚酸和黄酮类化合物的含量
Table 5 Contents of phenolic acids and flavonoids in different types of honey samples

Compound	Average content($\mu\text{g}/\text{kg}$)				
	Acacia honey	Jujube honey	Linden honey	Vitex honey	Buckwheat honey
Gallic acid	12.53	95.10	82.36	90.09	208.77
Protocatechuic acid	64.38	316.43	1 186.13	325.43	1 005.20
Chlorogenic acid	98.62	149.61	5.45	2 002.48	28.84
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	750.43	1 609.58	332.70	2 504.68	16 823.53
Caffeic acid	148.04	388.75	175.78	900.37	539.22
Rutin	35.54	10.80	8.09	21.99	148.02
Ellagic acid	—*	17.97	—	—	2.29
<i>p</i> -Coumaric acid	200.95	283.70	68.61	356.32	4 118.85
Naringin	77.08	107.08	—	118.72	224.57
Ferulic acid	—	1.40	71.32	—	—
Rosmarinic acid	—	—	—	—	—
Morin	—	—	—	—	—
Salicylic acid	94.76	—	106.63	177.26	—
Luteolin	7.96	20.16	2.35	34.04	56.70
Quercetin	97.53	22.88	21.41	24.30	587.04
Apigenin	36.32	63.68	2.68	69.62	129.52
Naringenin	19.57	6.13	4.90	36.47	12.95
Kaempferol	160.90	278.88	30.44	114.51	962.66
Isorhamnetin	396.56	199.59	208.48	209.48	113.58
Pinobanksin	397.39	124.88	159.44	614.55	449.29
Chrysin	404.96	120.81	35.16	393.78	362.79
Pinocembrine	381.81	85.29	90.37	464.99	379.19
CAPE	80.78	1.79	1.22	47.28	51.65
Galangin	194.06	22.75	18.44	212.21	235.51

* not detected

对所有样品检出的 22 种化合物进行 Pearson 相关性分析, 结果见图 5。酚酸类化合物对羟基苯甲酸和对香豆酸具有良好的相关性, 相关系数为 0.96; 黄酮类化合物高良姜素与短叶松素、松属素、柯因之间也具有良好的相关性, 相关系数均大于 0.85。

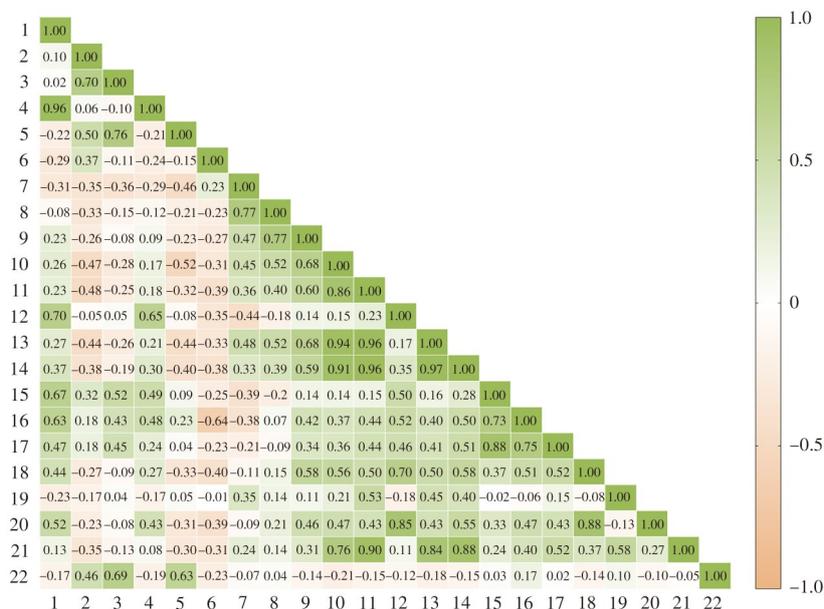


图5 蜂蜜中酚酸和黄酮类化合物的相关性

Fig. 5 Correlations of phenolic acids and flavonoids in honey samples

1. *p*-hydroxybenzoic acid; 2. protocatechuic acid; 3. gallic acid; 4. *p*-coumaric acid; 5. ellagic acid; 6. ferulic acid; 7. salicylic acid;
8. chlorogenic acid; 9. caffeic acid; 10. pinobanksin; 11. chrysin; 12. kaempferol; 13. pinocembrine; 14. galangin;
15. quercetin; 16. naringenin; 17. rutin; 18. apigenin; 19. isorhamnetin; 20. luteolin; 21. CAPE; 22. naringin

3 结论

本文建立了固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱同时测定蜂蜜中 24 种酚酸和黄酮类化合物的

方法。该方法前处理简单、分析时间短、灵敏度高、结果准确。采用该方法测定荞麦、枣花、洋槐、荆条和椴树 5 种植物源蜂蜜, 结果显示, 不同植物源蜂蜜样品在酚酸和黄酮类组成上具有相似性, 均含有没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、茨菲醇、异鼠李素、松属素等 18 种化合物, 但在含量上具有差异性。该研究为蜂蜜中酚酸和黄酮类化合物的测定和蜂蜜植物源的鉴别提供了技术支撑。

参考文献:

- [1] Alvarez-Suarez J M, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. *Mediterr. J. Nutr. Metab.*, **2009**, 3: 15-23.
- [2] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez J A. *J. Food Sci.*, **2008**, 73(9): 117-124.
- [3] Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. *J. Am. Coll. Nutr.*, **2008**, 27(6): 677-689.
- [4] Winter A N, Brenner M C, Noelle P, Michael S, Caleb B, Yingyot A, Linseman D A. *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2017**, 2017: 6297080.
- [5] Yang Y, Song S H, Xu G H. *Cereals Oils* (杨颖, 宋曙辉, 徐桂花. 粮食与油脂), **2009**, (9): 45-47.
- [6] Alam M, Ashraf G M, Sheikh K, Khan A, Ali S, Ansari M M, Adnan M, Pasupuleti V R, Hassan M I. *Front. Pharmacol.*, **2022**, 13: 845871.
- [7] Chen M. *The Scavenging Effect towards ROS and Vitro Antioxidant Activity of Several Flavonoids*. Xi'an: Northwest University (陈墨. 几种黄酮类化合物清除活性氧及抗氧化能力的评价. 西安: 西北大学), **2010**.
- [8] Sergiel I, Pohl P, Biesaga M. *Food Chem.*, **2014**, 145: 404-408.
- [9] Luca C, Anna L P, Imma P, Sonia C, Rosa D, Mariateresa R, Luca R. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1334(11): 9-15.
- [10] Karabagias I K, Vavoura M V, Badeka A, Kontakos S, Kontominas M G. *Food Anal. Methods*, **2014**, 7(10): 2113-2121.
- [11] Otmani A, Amessis-Ouchemoukh N, Birinci C, Yahiaoui S, Kolayli S, Rodríguez-Flores M S, Escuredo O, Seijo M C, Ouchemoukh S. *Food Biosci.*, **2021**, 42(4): 101070.
- [12] Kivrak S, Kivrak I. *Int. J. Food Prop.*, **2016**, 20(1/4): 864-876.
- [13] Keckes S, Gasic U, Velickovic T C, Milojkovic-Opšenica D, Natic M, Tesic Z. *Food Chem.*, **2013**, 138(1): 32-40.
- [14] Zhu Z Y, Zhang Y, Wang J H, Li X, Wang W, Huang Z P. *J. Chromatogr. A*, **2019**, 1601: 104-114.
- [15] Wang Q, Zhao H A, Xue X F, Liu C Y, He L L, Cheng N, Cao W. *Food Chem.*, **2020**, 309: 125656.
- [16] Sousa J M, De Souza E L, Marques G, Meireles B, Cordeiro A T D, Gullon B, Pintado M M, Magnani M. *Food Res. Int.*, **2016**, (84): 61-68.
- [17] Jasicka-Misiak I, Poliwoda A, Deren M, Kafarski P. *Food Chem.*, **2012**, 131(4): 1149-1156.
- [18] Mattonai M, Parri E, Querci D, Degano I, Ribechini E. *Microchem. J.*, **2016**, 126: 220-229.
- [19] Sergiel I, Pohl P, Biesaga M. *Food Chem.*, **2014**, 145: 404-408.
- [20] Ahmed A, Wabaidur S M, Siddiqui M R, Allothman Z A, Obeid M S, Khan M R, Al-Tamrah S A. *Eur. Food Res. Technol.*, **2016**, 242(6): 943-952.
- [21] Campone L, Piccinelli A L, Pagano I, Carabetta S, Sanzo R, Russo M, Rastrelli L. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1334(11): 9-15.
- [22] Shen S, Wang J B, Chen X, Liu T T, Ma Y, Wang L Y, Qin W, Gong Z L, Zhuo Q. *J. Hyg. Res.* (沈蕊, 王晶波, 陈曦, 刘婷婷, 马妍, 王丽媛, 秦文, 官照龙, 卓勤. 卫生研究), **2020**, 49(2): 259-266.
- [23] Su S F, Xue X, Gong P X, Sun S S, Fu R, Zhang R, Liu Y M, Zhu J H. *Mod. Food Sci. Technol.* (宿书芳, 薛霞, 公丕学, 孙珊珊, 付冉, 张然, 刘艳明, 祝建华. 现代食品科技), **2018**, 34(8): 260-266.
- [24] Hou J B, Xie W, Qian Y, Shi Y Z, Lu S, Sheng T, Chen W B. *Chin. J. Chromatogr.* (侯建波, 谢文, 钱艳, 史颖珠, 陆顺, 盛涛, 陈文彬. 色谱), **2020**, 38(5): 529-537.
- [25] Lin X, Du Y N, Zhang G S, Shan Y K, Zhang H C, Dong J. *Food Res. Dev.* (林珣, 杜一男, 张根生, 山水凯, 张红城, 董捷. 食品研究与开发), **2022**, 43(15): 166-174.
- [26] Lozano A, Rajski Ł, Uclés S, Belmonte-Valles N, Mezcua M, Amadeo R, Alba F. *Talanta*, **2014**, 118: 68-83.
- [27] Wu R, Ma F, Zhang L X, Li P W, Zhang W, Zhang Q, Li G M. *Chin. J. Anal. Chem.* (吴娆, 马飞, 张良晓, 李培武, 张文, 张奇, 李光明. 分析化学), **2015**, 43(10): 1600-1606.
- [28] Truchado P, Ferreres F, Bortolotti L, Sabatini A G, Tomás-Barberán F. A. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56(19): 8815-8824.
- [29] Yang E L, Zhao H A, Xu Y Y, Wang Y, Wang Y, Cao W. *Food Sci.* (杨二林, 赵浩安, 徐元元, 王悦, 王银, 曹炜. 食品科学), **2021**, 42(3): 150-157.
- [30] Elisabetta S, Claudia F, Stefano M, Illy B A, Silvia C, Luciano N. *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63(25): 5858-5863.
- [31] Hamide I, Avni H. *J. Apic. Res.*, **2020**, 59(4): 452-457.