

蜂蜜炼制前后黄酮类成分种类和含量变化分析

王 淳¹, 甘嘉荷¹, 宋志前¹, 刘元艳², 宁张弛¹, 马新玲¹, 舒一松², 刘振丽^{1*}

1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: 目的 研究中药辅料蜂蜜炼制前后黄酮类成分变化。方法 参考《中药药剂学》, 对不同来源的6种蜂蜜进行炼制。供试品经固相萃取法富集黄酮类成分。采用高效液相色谱-三重四级杆串联质谱(HPLC-TQ-MS)法测定, Thermo Accucore RP-MS 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm), 以0.1%甲酸水溶液-甲醇为流动相进行梯度洗脱, 体积流量0.3 mL/min, 柱温30 ℃。质谱条件: 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子检测模式, 多反应监测模式(MRM)扫描分析。结果 蜂蜜中共检测到12种黄酮类成分, 包括黄酮苷元、二氢黄酮苷元和异黄酮苷元。黄酮苷元有8种: 槲皮素、桑黄素、木犀草素、山柰酚、芹菜素、汉黄芩素、高良姜素和白杨素; 二氢黄酮苷元有3种: 短叶松素、柚皮素和乔松素; 异黄酮苷元染料木素。不同蜜源蜂蜜所含黄酮类成分种类和含量存在明显差异。6个蜂蜜样品炼制后, 都发现了蜂蜜中没有报道过的芦丁和芸香柚皮苷, 12种检测到的蜂蜜黄酮类成分在炼制后其量都有不同程度的变化, 椴树蜜的槲皮素、桑黄素、木犀草素、山柰酚、芹菜素、汉黄芩素、乔松素和白杨素量均有增加, 短叶松素、柚皮素和高良姜素量没增加反而还有下降的; 洋槐蜜中除芹菜素量增加不明显外, 其余均有所增加, 尤其是槲皮素和桑黄素增加的较为明显; 百花蜜和枣花蜜12种黄酮类成分量均显著增加。结论 炼制可造成蜂蜜中黄酮类成分的种类和含量发生改变。

关键词: 蜂蜜; 炼制; 黄酮; HPLC-TQ-MS; 芦丁; 芸香柚皮苷; 槲皮素; 桑黄素; 木犀草素; 山柰酚; 芹菜素; 汉黄芩素; 高良姜素; 白杨素; 短叶松素; 柚皮素; 乔松素; 染料木素

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0318-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.009

Comparative analysis of species and contents of flavonoids before and after honey refining

WANG Chun¹, GAN Jia-he¹, SONG Zhi-qian¹, LIU Yuan-yan², NING Zhang-chi¹, MA Xin-ling¹,
SHU Yi-song², LIU Zhen-li¹

1. The Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To study the changes of flavonoid components in honey before and after refining. **Methods** Six batches of honey from different sources were collected and refined based on Chinese Drugs Pharmacy. Solid phase extraction was used to enrich flavonoids from samples. HPLC-TQ-MS was established to determine the contents of 15 flavonoids in crude and refined honey, the separation was performed on a Thermo Accucore RP-MS (100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) column with the gradient elution of methanol-0.1% formic acid water, the flow rate was 0.3 mL/min, and the column temperature was 30 ℃. MS condition: Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the positive multiple reaction monitoring (MRM) modes. **Results** Twelve kinds of flavonoids in three species, flavonoids, dihydroflavonoids, and isoflavones, were detected in honey, which including quercetin, morin, xanthophyllin, kaempferol, apigenin, wogonin, galangin, chrysin in flavonoids; pinobanksin, naringin, and pinocembrin in dihydroflavonoids; genistein in isoflavones. There was significant difference in the species and contents of flavonoids between crude honey and refined honey. After refining, rutin and narirutin were detected which have not been reported in references, and the contents of 12 kinds of flavonoids have increased at different degrees. The contents of quercetin, morin, xanthophyllin, kaempferol, apigenin, wogonin, pinocembrin, and chrysin in linden honey have increased, but the contents of pinobanksin, naringin, and galangin have

收稿日期: 2017-08-07

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(YZ-1323, YZ-1655)

作者简介: 王 淳(1981—), 女, 博士, 中药化学专业。Tel: (010)64089020 E-mail: chuner-2006@hotmail.com

*通信作者 刘振丽 Tel: (010)64089020 E-mail: zhenli_liu@sina.com

decreased; all the contents of the components in acacia honey have increased except apigenin, especially the quercetin and morin; The content of 12 kinds of flavonoids in the honey of various flowers and Chinese date honey all have increased. **Conclusion** Refining can change the species and contents of flavonoids in honey.

Key words: honey; refining; flavonoids; HPLC-TQ-MS; rutin; narirutin; quercetin; morin; xanthophyllin; kaempferol; apigenin; wogonin; galangin; chrysin; pinobanksin; naringin; pinocembrin; genistein

蜂蜜经炼制后为炼蜜,一是作为中药炮制中蜜炙法的辅料,能起到增强药物疗效、缓和药性、解毒和矫味矫臭等作用^[1];二是作为传统剂型蜜丸的辅料,在成型工艺起到黏合剂的作用,常用于治疗慢性病方药和滋补剂制丸^[2-3]。蜂蜜中富含丰富的糖、有机酸、维生素等营养物质,具有滋补、平喘、缓下、通便、解毒等作用^[4]。蜂蜜炼制后化学成分会发生变化,如挥发油总量降低^[3],果糖和葡萄糖量降低,5-羟甲基糠醛量升高^[4]。此外,蜂蜜中还含有多种黄酮类成分^[5-10],主要来自蜜源植物的花蜜、花粉和蜂胶,不同蜜源植物的蜂蜜中黄酮类成分的种类和量均存在差异^[6]。但炼制对蜂蜜中黄酮类成分的影响还未见报道。蜂蜜中黄酮类成分定量测定常用的提取分离方法主要有液-液萃取法^[11]、大孔树脂吸附法^[7]、固相萃取法^[10]等,目前较为常用的是固相萃取法。常用分析方法主要有 HPLC^[12]、CZE^[13]、LC-MS^[14]、LC-NMR^[15]等。本实验采用固相萃取法富集蜂蜜中的黄酮类成分,通过 UPLC-MS/MS 法测定蜂蜜和炼蜜中 15 种黄酮类成分的量,并对比分析炼制前后黄酮类成分种类和量的变化,为探讨炼制对蜂蜜中黄酮类成分的影响提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1260 系列高效液相色谱仪,包括 G1322A 脱气机, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 恒温箱, HP 化学工作站; Agilent 6410AQQQ 质谱仪,美国 Agilent 公司; Strata-X 固相萃取小柱,规格 200 mg/3 mL,美国 Phenomenex 公司;旋转蒸发器,上海振捷实验设备有限公司; TCQ-250 型超声波清洗器,北京医疗设备二厂; Sartorius CP225D 型十万分之一电子天平,德国赛多利斯公司; WYA-2W 型阿贝折光计,上海物理光学仪器厂。

对照品芦丁(批号 0080-9705,质量分数 $\geq 98\%$)购自中国食品药品检定研究院;对照品芸香柚皮苷(批号 MUST-13041206,质量分数 $\geq 98\%$)购自成都曼思特生物科技有限公司;对照品杨梅素(批号 DST160928-103,质量分数 $\geq 99\%$)、桑黄素(批号 DST161108-067,质量分数 $\geq 98\%$)、山柰酚(批号

DST160928-056,质量分数 $\geq 98\%$)、染料木素(批号 DST161128-002,质量分数 $\geq 98\%$)、高良姜素(批号 DST170215-020,质量分数 $\geq 99\%$)、乔松素(批号 DST170215-054,质量分数 $\geq 99\%$)、白杨素(批号 DST170215-048,质量分数 $\geq 99\%$)购于成都德思特有限公司;对照品槲皮素(批号 100081-200907,质量分数 $\geq 98.6\%$)、木犀草素(批号 111520-200504,质量分数 $\geq 99\%$)购自中国食品药品检定研究院;对照品汉黄芩素(批号 CAN17360,质量分数 $\geq 98\%$)购于和光纯叶株式会社;对照品短叶松素(批号 T16F8Z29467,质量分数 $\geq 98\%$)购于上海源叶生物科技有限公司;对照品芹菜素(批号 1246-081013,质量分数 $\geq 99.6\%$)购于中药固体制剂制造技术国家工程研究中心;对照品柚皮素(批号 127k1240,质量分数 $\geq 95\%$)购于 Sigma 公司。乙腈、甲醇为色谱纯,均购自美国 Fisher 公司;盐酸为分析纯,购自北京化工厂;水为超纯水。蜂蜜样品来自市售,共收集 6 种不同来源的蜂蜜,涉及品种有椴树蜜、洋槐蜜、百花蜜和枣花蜜。样品详细信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 炼蜜的制备和水分测定

参考《中药药剂学》“蜜丸”项下蜂蜜的炼制方法^[16],将蜂蜜放入锅中,加热,待温度达到 116~118 °C,出现浅黄色有光泽的均匀小泡,呈鱼眼泡状,且用手捻之多有黏性,两手指打开时无长白丝出现,滴水不散时,即成炼蜜。依据《中国药典》2015 年版第四部通则 0622 折光率测定法^[17],采用阿贝折射仪测定蜂蜜炼制前后的水分量,结果见表 1,均符合药典要求的不得超过 24%^[18]。

2.2 色谱条件与质谱条件

2.2.1 色谱条件 Thermo Accucore RP-MS 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 2.6 μ m);流动相为 0.1%甲酸水溶液-甲醇,梯度洗脱:0~15 min, 6%~32%甲醇;15~30 min, 32%~42%甲醇;30~40 min, 42%甲醇;40~58 min, 42%~70%甲醇;58~60 min, 6%甲醇;体积流量 0.3 mL/min,柱温 30 °C,进样量 5 μ L。

表 1 蜂蜜样品信息
Table 1 Honeys samples information

样品名称	供应商	产地	批号	色泽	状态	气味	水分/%	
							炼制前	炼制后
椴树蜜 1	中粮山萃天然食品 (北京) 有限公司	北京	HD1609064Y	浅琥珀色	透明、黏稠液体	气芳香, 味香甜	19.5	11.8
椴树蜜 2	ООО “МН НЮЙ”	俄罗斯	20150915	淡黄色	半透明、黏稠液体	气芳香, 味香甜	17.6	10.8
洋槐蜜 1	中粮山萃天然食品 (北京) 有限公司	北京	HD1609067Y	水白色	透明、黏稠液体	气清香, 槐花香, 味甜润	18.9	11.5
洋槐蜜 2	农家自产	黑龙江	20160923	淡黄色	透明、黏稠液体	气清香, 槐花香, 味甜润	20.1	12.9
百花蜜	Wendell Estate Co., Ltd.	加拿大	1023REG21	乳白色	半透明、膏状、结晶	气清香, 味甜润	15.8	10.2
枣花蜜	中粮山萃天然食品 (北京) 有限公司	北京	HD1609066Y	浅琥珀色	透明、黏稠液体	气浊香, 枣花香, 味甜润	18.2	12.5

2.2.2 质谱条件 正离子检测模式, 采用电喷雾电离源 (ESI), 扫描方式为多反应离子监测模式 (MRM), HPLC-TQ-MS 图谱见图 1, 各化合物的质谱信息见表 2。

2.3 对照品溶液的制备

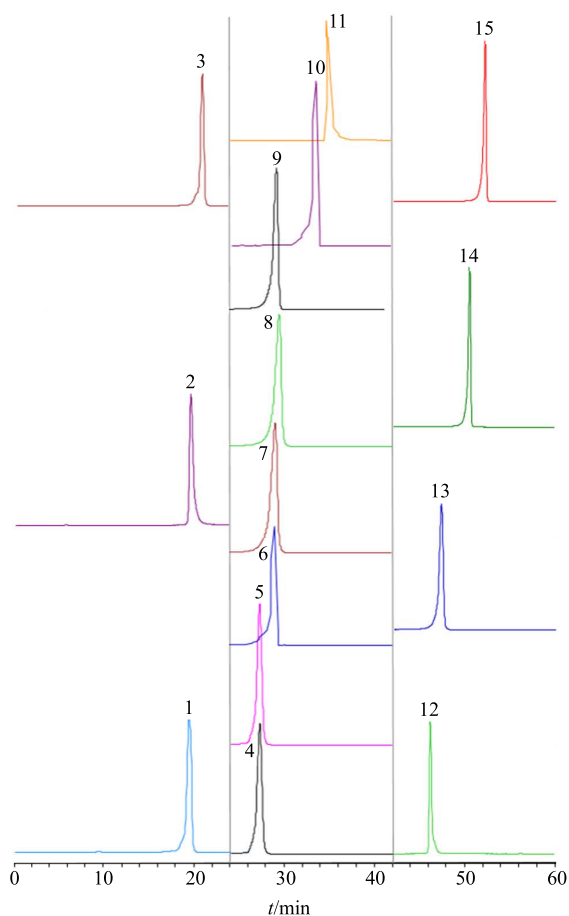
分别取芦丁、芸香柚皮苷、杨梅素、槲皮素、桑黄素、木犀草素、山柰酚、短叶松素、柚皮素、染料木素、芹菜素、汉黄芩素、高良姜素、乔松素、白杨素对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成 0.203、0.310、0.250、0.312、0.494、0.133、0.452、0.475、0.204、0.375、0.115、0.035、0.555、0.410、0.512 mg/mL 的溶液, 作为对照品储备液。分别精密吸取上述 15 个对照品储备液适量, 混合, 加甲醇定容, 制成含各成分分别为 0.132、0.620、50.000、6.989、6.916、2.527、17.716、1.188、1.020、0.563、0.138、0.0375、2.220、6.560、5.120 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

参考文献方法^[8-9], 分别取各供试品约 10 g, 精密称定, 置于 100 mL 三角瓶中, 加入 pH 值为 2.0 的盐酸溶液 30 mL, 振荡提取 1 h, 提取液 7 000 r/min 离心 10 min, 上清液通过预处理好的 Strata-X 固相萃取柱 (固相萃取柱的预处理: 分别加入 5 mL 甲醇和 10 mL pH 值为 2.0 的盐酸溶液进行活化), 以水 10 mL 洗脱, 弃去水液, 再用甲醇 20 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣精密加甲醇 2 mL 超声使溶解, 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察和检测限 (LOD)、定量限 (LOQ)



1-芦丁 2-芸香柚皮苷 3-杨梅素 4-桑黄素 5-槲皮素 6-短叶松素 7-柚皮素 8-木犀草素 9-染料木素 10-山柰酚 11-芹菜素 12-乔松素 13-汉黄芩素 14-白杨素 15-高良姜素
1-rutin 2-narirutin 3-myricetin 4-morin 5-quercetin 6-pinobanksin 7-naringin 8-luteolin 9-genistein 10-kaempferol 11-apigenin 12-pinocembrin 13-wogonin 14-chrysin 15-galangin

图 1 15 个黄酮类成分的 HPLC-TQ-MS 图谱

Fig. 1 HPLC-TQ-MS Spectrum of 15 flavonoids

测定 精密吸取混合对照品溶液, 用色谱甲醇梯度稀释成不同质量浓度的对照品溶液。以待测物质量浓度为横坐标 (X), 待测物峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。计算 LOD 和 LOQ。结果见表 3。

2.5.2 精密度试验 精密吸取洋槐蜜 1 炼蜜样品制备的供试品溶液, 连续进样 6 次, 测得芦丁、芸香柚皮苷、杨梅素、槲皮素、桑黄素、木犀草素、山柰酚、短叶松素、柚皮素、染料木素、芹菜素、汉黄芩素、高良姜素、乔松素、白杨素峰面积积分值的 RSD 分别为 1.35%、0.56%、0.00%、1.04%、1.05%、

0.30%、1.16%、1.33%、0.60%、0.50%、1.10%、1.36%、0.94%、0.75%、0.96%, 精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取洋槐蜜 1 炼蜜样品约 10 g, 6 份, 精密称定, 按“2.4”项下方法制备成供试品溶液, 分别进样测定, 计算各成分质量分数。样品中芦丁、芸香柚皮苷、杨梅素、槲皮素、桑黄素、木犀草素、山柰酚、短叶松素、柚皮素、染料木素、芹菜素、汉黄芩素、高良姜素、乔松素、白杨素的平均质量分数分别为 2.60、12.97、0.00、135.12、124.54、44.59、336.54、24.20、19.87、12.51、1.99、

表 2 15 个黄酮类成分的多反应监测模式信息

Table 2 MRM information of 15 different flavonoids

化合物	t_R/min	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压/V	碰撞电压/eV
芦丁	19.039	611.2	303.1, 465.1	130	16
芸香柚皮苷	19.488	581.3	273.0, 421.1	120	8
杨梅素	21.324	319.0	153.1, 273.1	155	30
槲皮素	27.224	303.1	153.1, 229.1	160	37
桑黄素	27.109	303.1	153.2, 229.1	160	35
木犀草素	29.360	287.1	153.1, 135.0	160	30
山柰酚	33.557	287.1	153.0, 121.1	155	37
短叶松素	28.784	273.1	153.1, 147.1	130	22
柚皮素	28.793	273.1	153.0, 147.1	125	20
染料木素	30.353	271.1	153.1, 215.2	140	22
芹菜素	34.791	271.0	153.1, 119.0	150	30
汉黄芩素	47.962	285.1	270.1, 168.1	140	25
高良姜素	52.371	271.1	153.1, 105.0	150	30
乔松素	46.282	257.1	153.1, 131.1	120	23
白杨素	50.523	255.1	153.0, 103.1	150	33

表 3 线性方程、LOD 和 LOQ 结果

Table 3 Results of linear equations, LOD, and LOQ

化合物	线性方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	r	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
芦丁	$Y=4\ 785.8 X+17.101$	0.413~132.000	0.999 2	0.11	0.37
芸香柚皮苷	$Y=1\ 709.6 X+6.589\ 6$	1.938~620.000	0.999 4	0.15	0.51
杨梅素	$Y=273.37 X+21.788$	30.000~3 000.000	0.999 3	3.08	10.15
槲皮素	$Y=257.35 X+1.050\ 9$	21.840~6 989.000	0.999 8	3.10	10.70
桑黄素	$Y=3\ 019.9 X+34.896$	21.610~6 916.000	0.999 2	0.87	2.90
木犀草素	$Y=1\ 239.7 X+2.597\ 9$	7.897~2 527.000	0.999 3	1.30	4.40
山柰酚	$Y=438.01 X+14.124$	53.680~17 176.000	0.999 6	3.30	10.70
短叶松素	$Y=1\ 900.6 X+10.553$	3.713~1 188.000	0.999 2	0.62	2.10
柚皮素	$Y=1\ 959.4 X+7.716\ 4$	3.188~1 020.000	0.999 5	0.55	1.70
染料木素	$Y=743.82 X+3.268\ 3$	1.759~563.000	0.999 7	0.26	0.88
芹菜素	$Y=11\ 241 X+3.525\ 3$	0.431~138.000	0.999 4	0.08	0.26
汉黄芩素	$Y=18\ 312 X+4.258\ 9$	0.117~37.500	0.999 5	0.02	0.06
高良姜素	$Y=653.88 X+5.999\ 1$	6.938~2 220.000	0.999 6	0.90	3.10
乔松素	$Y=2\ 245.7 X+66.834$	20.500~6 560.000	0.999 4	0.35	1.03
白杨素	$Y=1\ 236.8 X+9.912\ 3$	16.000~5 120.000	0.999 2	5.00	1.50

0.97、42.70、117.48、88.61 ng/g, RSD 分别为 2.78%、1.95%、0.00%、2.20%、1.80%、1.90%、2.11%、2.19%、2.60%、2.68%、2.36%、2.30%、2.20%、1.93%、2.54%, 符合要求。

2.5.4 稳定性试验 取洋槐蜜 1 炼蜜样品约 10 g, 精密称定, 按“2.4”项下方法制备成供试品溶液, 在制备后 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样, 测得芦丁、芸香柚皮苷、杨梅素、槲皮素、桑黄素、木犀草素、山柰酚、短叶松素、柚皮素、染料木素、芹菜素、汉黄芩素、高良姜素、乔松素、白杨素峰面积积分值的 RSD 分别为 1.42%、1.55%、0.00%、0.89%、1.31%、1.21%、0.53%、1.33%、1.02%、1.24%、1.63%、1.35%、0.91%、1.25%、1.66%, 符合要求, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.5 加样回收率试验 取洋槐蜜 1 炼蜜样品约 5 g, 6 份, 精密称定, 分别精密加入各对照品适量(加

入约为样品中各成分一半的对照品), 按照“2.4”项下方法制备成供试品溶液, 在上述色谱条件下进行测定, 计算回收率, 结果芦丁、芸香柚皮苷、杨梅素、槲皮素、桑黄素、木犀草素、山柰酚、短叶松素、柚皮素、染料木素、芹菜素、汉黄芩素、高良姜素、乔松素、白杨素的平均加样回收率分别为 99.18%、98.69%、99.92%、99.21%、99.56%、99.72%、99.49%、98.83%、99.24%、98.68%、99.08%、99.14%、99.65%、99.17%、98.33%, RSD 分别为 2.05%、1.35%、1.02%、2.70%、2.06%、2.19%、1.94%、2.86%、1.88%、2.49%、2.49%、2.10%、2.09%、2.32%、1.91%。

2.6 样品测定

分别取蜂蜜和炼蜜样品各 10 g, 按照“2.4”项下方法制备, 测定各黄酮类成分量, 并考虑水分量, 各成分以干燥品计算。具体结果见表 4。对比分析炼制前后蜂蜜中黄酮类成分的种类和含量的变化,

表 4 黄酮类成分定量测定结果

Table 4 Results of flavonoid contents determination

样品	种类	质量分数/(ng·g ⁻¹)							
		芦丁	芸香柚皮苷	杨梅素	槲皮素	桑黄素	木犀草素	山柰酚	短叶松素
椴树蜜 1	蜂蜜	—	—	—	246.40	234.72	122.65	336.35	28.73
	炼蜜	6.28	2.14	—	271.28	251.09	140.83	413.45	27.73
椴树蜜 2	蜂蜜	—	—	—	42.17	36.40	5.40	62.18	4.99
	炼蜜	2.11	3.89	—	61.69	56.37	7.18	77.54	5.35
洋槐蜜 1	蜂蜜	—	—	—	49.22	38.48	33.79	219.06	11.96
	炼蜜	2.60	12.97	—	135.12	124.54	44.59	336.54	24.20
洋槐蜜 2	蜂蜜	—	—	—	179.37	172.69	11.11	333.47	13.67
	炼蜜	11.24	1.84	—	227.32	203.15	15.31	370.34	23.26
百花蜜	蜂蜜	—	—	—	476.18	416.46	12.52	1 845.59	53.79
	炼蜜	5.39	7.17	—	958.00	908.42	19.51	2 396.85	136.05
枣花蜜	蜂蜜	—	—	—	269.72	241.84	10.66	696.25	20.14
	炼蜜	8.33	4.80	—	344.18	324.04	15.97	905.65	41.69

样品	种类	质量分数/(ng·g ⁻¹)						
		柚皮素	染料木素	芹菜素	汉黄芩素	高良姜素	乔松素	白杨素
椴树蜜 1	蜂蜜	22.54	—	19.45	2.90	140.79	350.14	354.60
	炼蜜	21.46	0.97	24.37	3.84	139.62	383.41	401.52
椴树蜜 2	蜂蜜	4.04	—	—	0.04	16.34	57.38	69.77
	炼蜜	4.20	0.51	4.48	0.08	15.11	71.70	86.82
洋槐蜜 1	蜂蜜	9.15	10.94	1.51	0.76	35.23	60.55	78.99
	炼蜜	19.87	12.51	1.99	0.97	42.70	117.48	88.61
洋槐蜜 2	蜂蜜	9.91	10.43	1.55	—	37.53	129.80	73.46
	炼蜜	10.88	14.42	1.55	0.09	54.06	155.40	85.27
百花蜜	蜂蜜	38.94	0.37	8.20	0.04	198.53	1 006.57	495.46
	炼蜜	106.25	2.99	11.04	0.10	217.46	1 304.42	562.58
枣花蜜	蜂蜜	14.49	—	2.04	0.04	22.83	51.74	62.63
	炼蜜	31.10	1.27	2.70	0.05	25.39	61.22	78.16

以及不同蜂蜜中黄酮类成分种类和含量的差异。

3 讨论

3.1 RRLC-TQ-MS 的条件优化

文献报道的蜂蜜中黄酮成分定量测定,采用甲醇-甲酸^[5]或乙腈-甲酸^[11]作为流动相,实验对比了2种流动相,还对甲酸体积分数进行了考察,结果表明甲醇显现出更好的峰形,而加入到流动相中的甲酸为0.1%的时候,能通过增强分析物的电离而显著提高灵敏度和优化峰形。因此选择0.1%甲酸水溶液-甲醇作为流动相。在质谱条件的优化中,发现15种成分在正离子模式下的响应值均高于负离子模式,因此选取正离子模式,并对所有目标分析物的多反应监测(MRM)模式进行了优化。

3.2 不同蜂蜜中黄酮类成分种类和含量

本实验共收集6种不同来源的蜂蜜,涉及品种有椴树蜜、洋槐蜜、百花蜜和枣花蜜,共检测到12种黄酮类成分,包括黄酮苷元、二氢黄酮苷元和异黄酮苷元。黄酮苷元有8种:槲皮素、桑黄素、木犀草素、山柰酚、芹菜素、汉黄芩素、高良姜素和白杨素;二氢黄酮苷元有3种:短叶松素、柚皮素和乔松素;异黄酮苷元染料木素。不同蜜源蜂蜜所含黄酮类成分的种类有一定的相似性,4种蜜源蜂蜜均含有乔松素、白杨素、槲皮素、桑黄素、木犀草素、山柰酚、短叶松素、柚皮素和高良姜素,但同时也存在一些差异,如洋槐蜜和百花蜜含有染料木素,而椴树蜜和枣花蜜不含。此外,黄酮类成分的量也存在明显差异,其中来自加拿大的百花蜜黄酮类成分量最高;不同蜜源蜂蜜各黄酮类成分占比存在明显差异,如椴树蜜中主要以乔松素、白杨素、山柰酚为主,其次是槲皮素和桑黄素;洋槐蜜主要是以山柰酚为主,其次是乔松素、槲皮素、桑黄素和白杨素,其中染料木素量明显高于其他蜜源,与文献研究结果基本一致^[14,19],在多批次样品检测基础上,染料木素或可作为洋槐蜜的潜在标记物;百花蜜主要以山柰酚为主,其次是白杨素、乔松素和槲皮素,其各黄酮类成分量均明显高于其他蜜源蜂蜜;枣花蜜主要是以山柰酚为主,其次是桑黄素和槲皮素。

所有样品中均未检测到杨梅素,文献报道^[20]在意大利、西班牙和葡萄牙产的桉树蜜中均检测到杨梅素,而在其他单花蜜均未检测到,被认定为桉树蜜的标志物。本实验检测的样品中没有桉树蜜,因此未检测到杨梅素。

同一蜜源但不同产地的蜂蜜黄酮类成分量存在明显差异,如1号椴树蜜的黄酮类成分量明显高于2号椴树蜜,1号洋槐蜜的槲皮素、桑黄素和乔松素明显低于2号洋槐蜜,这可能与蜜蜂采蜜时蜜源花的花期有关,文献报道不同采收期刺槐花中的指标性成分刺槐苷和鼠李糖刺槐苷的量明显不同^[21];此外,还可能与蜂蜜产地、气候、加工和贮存条件等有关^[22]。

3.3 蜂蜜炼制前后黄酮类成分种类和含量变化

6种蜂蜜炼制后,检测到的黄酮类成分种类都有增加,都发现了蜂蜜中没有报道过的芦丁和芸香柚皮苷。12种检测到的蜂蜜黄酮类成分在炼制后其量都有不同程度的变化。从黄酮类成分种类看,炼制后椴树蜜和枣花蜜新增加了芦丁、芸香柚皮苷、染料木素;洋槐蜜和百花蜜新增加了芦丁和芸香柚皮苷。从黄酮类成分量看,椴树蜜的槲皮素、桑黄素、木犀草素、山柰酚、芹菜素、汉黄芩素、乔松素和白杨素量均有增加,短叶松素和柚皮素和高良姜素量没增加反而还有下降的;洋槐蜜中除芹菜素量增加不明显外,其余均有所增加,尤其是槲皮素和桑黄素增加的较为明显;百花蜜和枣花蜜12种黄酮类成分量均显著增加。蜂蜜抗氧化能力与总黄酮量呈正相关^[23],而文献报道^[24]指出蜂蜜炼制后DPPH清除率较炼制之前提高了6.32倍,推测其可能与炼制后黄酮类成分量明显增加相关。

文献报道^[25]苦荞麦在焙烤加热后,芦丁量有所升高,推测可能是其中的槲皮素-3-葡萄糖芸香苷等其他黄酮类成分在酶等作用下转化为芦丁。因此,推测蜂蜜炼制后产生的芦丁和芸香柚皮苷可能也是由其他黄酮类成分在酶和加热等作用下转化的,但具体由哪种成分转化来的,还需要进一步研究。

3.4 蜜丸辅料蜂蜜的代替品——果葡糖浆

目前市场有用果葡糖浆代替蜂蜜生产蜜丸^[26],在教科书中也认为其可以代替蜂蜜用于中药丸剂生产^[27]。果葡糖浆又被称为人造蜂蜜,是由蔗糖水解或淀粉酶解而成。其理化性质及所含主要成分果糖和葡萄糖量与蜂蜜基本相似且口味接近,但其不含有黄酮类成分。黄酮类成分具有调节细胞色素酶(CYP)活性作用^[28],CYP酶与药物代谢密切相关^[29],同时黄酮类还具有抗氧化^[23]等作用。因此,果葡糖浆能否代替蜂蜜生产蜜丸还值得进一步研究。

本实验通过对比6种不同来源蜂蜜炼制前后黄酮类成分种类和量变化,发现蜂蜜炼制后黄酮类成

分种类和量明显增加,但其具体原因仍不清楚,有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 刘晓秋,王延年.现代中药炮制[M].北京:人民军医出版社,2008.
- [2] 席啸虎,刘霞,全立国.星点设计-效应面法优化黄明胶-蜂蜜混合辅料膏方制备工艺[J].中草药,2016,47(8):1297-1302.
- [3] 任佳淼,彭文君,田文礼,等.加工工艺对蜂蜜挥发性成分的影响[J].食品科学,2014,35(10):41-45.
- [4] 鲜洁晨,张宁,冯怡,等.中药蜜丸炼蜜过程中果糖、葡萄糖、5-羟甲基糠醛的热稳定性研究[J].中药材,2011,34(9):1434-1437.
- [5] Güneş M E, Şahin S, Demir C, *et al.* Determination of phenolic compounds profile in chestnut and floral honeys and their antioxidant and antimicrobial activities [J]. *J Food Biochem*, 2017, 41(3): 1-12.
- [6] Khalil M I, Alam N, Moniruzzaman M, *et al.* Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys [J]. *J Food Sci*, 2011, 76(6): 921-928.
- [7] 王笑笑,周勇,俞婷婷,等.UPLC-MS/MS法分析10种不同蜜源蜂蜜中的黄酮类组分[J].药物分析杂志,2016,36(12):2180-2189.
- [8] Michalkiewicz A, Biesaga M, Pyrzynska K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1187(1/2): 18-24.
- [9] 梁钺,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.
- [10] Liu H, Zhang M, Guo Y, *et al.* Solid-phase extraction of flavonoids in honey samples using carbamate-embedded triacontyl-modified silica sorbent [J]. *Food Chem*, 2016, 204: 56-61.
- [11] Campillo N, Vinas P, Ferez-Melgarejo G, *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of flavonoid aglycone compounds in honey using liquid chromatography with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2015, 131: 185-191.
- [12] Perna A, Intaglietta I, Simonetti A, *et al.* A comparative study on phenolic profile, vitamin C content and antioxidant activity of Italian honeys of different botanical origin [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2013, 48(9): 1899-1908.
- [13] Volpi N. Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(12): 1872-1878.
- [14] 王笑笑,颜伟华,黄华,等.UPLC-MS/MS法分析洋槐蜜及其蜜源花中的黄酮类成分[J].药物分析杂志,2017,37(5):796-802.
- [15] March R, Brodbelt J. Analysis of flavonoids: Tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR [J]. *J Mass Spectrom*, 2008, 43(12): 1581-1617.
- [16] 狄留庆,刘汉清.中药药剂学[M].北京:化学工业出版社,2011.
- [17] 中国药典[S].一部.2015.
- [18] 中国药典[S].四部.2015.
- [19] Truchado P, Ferreres F, Bortolotti L, *et al.* Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudacacia*) honey [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(19): 8815-8824.
- [20] Martos I, Ferreres F, Tomas-Barberan F A. Identification of flavonoid markers for the botanical origin of *Eucalyptus* honey [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(5): 1498-1502.
- [21] 郑永芹,初正云,王添敏,等.不同采收期刺槐花中刺槐苷和鼠李糖刺槐苷的测定[J].中成药,2012,34(11):2190-2192.
- [22] 曾哲灵.蜂蜜的热稳定性及流变和真空脱水特性研究[D].南昌:南昌大学,2007.
- [23] 吴本培,徐是雄,雷波.市售蜂蜜的质量比较和抗氧化能力分析[J].食品研究与开发,2016,37(23):26-28.
- [24] 高慧丰.炼蜜炮制机理研究:美拉德反应对炼蜜炮制及其生物活性的影响[D].济南:山东大学,2015.
- [25] 马越,李双石,苑函,等.苦荞麦中芦丁稳定性的研究[J].食品科学,2008,29(11):94-97.
- [26] 陈伍强.果葡糖浆在蜜丸生产中的应用[J].中药材,1998,21(2):93-94.
- [27] 张兆旺.中药药剂学[M].北京:中国中医药出版社,2003.
- [28] Tushar T, Vinod T, Rajan S, *et al.* Effect of honey on CYP3A4, CYP2D6 and CYP2C19 enzyme activity in healthy human volunteers [J]. *Basic Clin Pharmacol*, 2007, 100(4): 269-272.
- [29] 谢珊珊,景欣悦,刘晓东.小肠CYP450酶在药物代谢中的作用[J].中国药科大学学报,2010,41(2):186-192.