

超高效液相色谱法快速检测麦卢卡蜂蜜中丙酮醛

赵琼晖, 金晓蕾, 胡晓苑, 王宏菊, 靳保辉, 岳振峰, 谢丽琪, 陈波*

(深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 深圳 518067)

摘要: **目的** 利用超高效液相色谱建立一种麦卢卡蜂蜜中丙酮醛的快速检测方法。**方法** 采用乙酸钠缓冲溶液直接提取蜂蜜中的丙酮醛, 提取液与 2,4-二硝基苯肼溶液室温避光衍生 20 h 后, 经 C₁₈ 色谱柱分离后采用二极管阵列检测器(PDA)检测, 外标法定量。**结果** 丙酮醛的检出限为 10.0 mg/kg, 定量限为 25.0 mg/kg, 在 1.0~60 mg/L 之间线性关系良好, 相关系数为 0.9982, 在蜂蜜中添加 25.0、500、1000 三个水平的回收率在 93.9%~97.8 %之间, 相对标准偏差在 1.8%~5.4%之间。**结论** 该分析方法能够满足麦卢卡蜂蜜中丙酮醛的快速测定要求。

关键词: 麦卢卡蜂蜜; 超高效液相色谱法; 丙酮醛

Determination of methylglyoxal in Manuka honey by ultra performance liquid chromatography

ZHAO Qiong-Hui, JIN Xiao-Lei, HU Xiao-Yuan, WANG Hong-Ju, JIN Bao-Hui, YUE Zhen-Feng, XIE Li-Qi, CHEN Bo*

(Shenzhen Key Laboratory of Detection Technology R & D on Food Safety, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518067, China)

ABSTRACT: Objective To establish a fast detection method of methylglyoxal (MGO) in Manuka honey by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** MGO in honey was extracted by sodium acetate buffer solution, extract solution derivatized 20 h with 2,4-dinitrophenylhydrazine solution, and detected by PDA detector after separated by C₁₈ chromatographic column, quantified by external standard calibration method. **Results** The detection limit of MGO was 10.0 mg/kg, limit of quantification was 25.0 mg/kg. The method showed a good linear range of detection between 1.0~60 mg/L mg/L ($r^2=0.9982$). The recoveries of MGO at three spiked levels (25.0, 500, and 1000 mg/kg) were between 93.9% ~ 97.8 %, RSD between 1.8% ~ 5.4%. **Conclusion** The method is suitable for fast analysis of MGO in Manuka honey.

KEY WORDS: Manuka honey; ultra performance liquid chromatography; methylglyoxal

1 引言

麦卢卡(*Leptospermum scoparium*)是一种天然茶树, 存于新西兰, 主要在北岛偏远的原始森林区域。麦卢卡蜂蜜(Manuka honey)中含有独特的抗菌活性,

这种抗菌活性不依赖于普通过氧化物, 被称为非过氧化抗菌活性(non-peroxide antibacterial activity, NPA); 麦卢卡蜂蜜能较好地治疗机体创伤, 尤其在对胃肠道的调养方面有极佳表现^[1-11]。因此, 麦卢卡蜂蜜也被称为“蜜中极品”。然而, 由于麦卢卡蜂蜜的

*通讯作者: 陈波, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: jakeebo2001@sohu.com

*Corresponding author: CHEN Bo, Master, Senior Engineer, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.1011, Fuqiang Road, Futian district, Shenzhen 518067. China. E-mail: jakeebo2001@sohu.com

价格比普通蜂蜜高数倍, 这导致假冒麦卢卡蜂蜜的现象时有发生。据新西兰一家蜂农协会统计, 麦卢卡蜂蜜的年产量不过 1700 吨左右, 但现在全球市场上以“麦卢卡”名义售出的新西兰蜂蜜却高达约 1 万吨^[12]。因此, 建立麦卢卡蜂蜜的真伪鉴别技术具有重要意义。

丙酮醛(methylglyoxal, MGO)被认为是麦卢卡蜂蜜的一种标志性成分, 也是非过氧化抗菌活性的功能性成分^[13]。因此开展丙酮醛检测对于麦卢卡蜂蜜的真伪鉴别具有重要意义。目前国内外对麦卢卡蜂蜜丙酮醛的研究主要是将丙酮醛衍生化后, 采用液相色谱^[2,4,14], 气相色谱质谱^[15,16]检测。本方法在参考文献的基础上, 建立了蜂蜜中丙酮醛的超高效液相色谱(UPLC)检测方法, 使得分析时间较文献报道的时间缩短至 6 min 以内。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

乙腈(色谱纯, Merck), 乙酸钠(分析纯), 冰乙酸(分析纯), 2,4-二硝基苯肼(纯度 99%), 超纯水(18.2 MΩ, Millipore)。丙酮醛标准品, 购自 Sigma-aldrich。乙酸钠缓冲溶液(pH=5): 称取 2.64 g 乙酸钠, 以适量水溶解, 加入 1.0 mL 冰乙酸, 用水定容至 500 mL; 2,4-二硝基苯肼溶液(0.6 g/L): 称取 2,4-二硝基苯肼 300 mg, 用乙腈溶解定容至 500 mL。

2.2 仪器与设备

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪(PDA 二极管阵列检测器) 美国 Waters 公司, 电子天平, 涡旋振荡器。

2.3 方法

2.3.1 标准溶液的制备

标准储备液: 称取丙酮醛适量, 用水溶解并定容至 10.0 mL。标准工作溶液: 根据样品中丙酮醛的浓度, 取丙酮醛标准储备溶液适量, 用乙酸钠缓冲溶液定容至 1 mL, 加入 1 mL 2,4-二硝基苯肼溶液, 使最终溶液浓度范围在 1.0 mg/L~60 mg/L 以内, 涡旋混匀后避光静置 20 h 以上, 过 0.22 μm 滤膜后上机。

2.3.2 样品前处理

称取 1 g(精确至 0.001 g)试样于 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 乙酸钠缓冲溶液, 涡旋振荡使蜂蜜充分溶解, 用乙酸钠缓冲溶液定容至 10 mL 后混匀。

2.3.3 衍生化

取提取液 1 mL 于 15 mL 离心管中, 加入 1 mL 2,4-二硝基苯肼溶液, 涡旋混匀后避光静置 20 h 以上, 过 0.22 μm 滤膜后上机。

2.3.4 仪器条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH C₁₈ 1.7 μm, 2.1 mm×50mm; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 2 μL; 波长: 360 nm; 梯度洗脱: 甲醇+水(v:v=50:50)。

3 结果与分析

3.1 样品前处理条件的选择

丙酮醛由于没有特征吸收, 且在反相色谱柱上没有保留, 因此文献报道的检测方法通常采用柱前衍生化法^[2,10]。本文参考 SN/T 1547-2011《进出口食品中甲醛的测定 液相色谱法》的衍生化条件, 采用乙酸钠缓冲溶液溶解提取蜂蜜中的丙酮醛, 使用 2,4-二硝基苯肼为衍生化试剂, 并对衍生化的条件进行了优化。

3.1.1 温度的影响

比较了在 60 °C 和室温(25 °C)条件下, 丙酮醛与 2,4-二硝基苯肼分别衍生化 1 h、2 h 时衍生化效果的差异, 如图 1。室温下的衍生化效果远比 60 °C 衍生化的效果好, 因此丙酮醛的衍生化反应不适合高温, 宜在室温下进行。

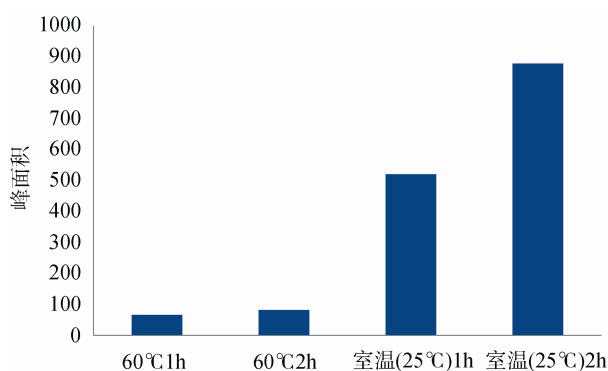


图 1 不同衍生化条件的峰面积比较

Fig. 1 Comparison of peak area obtained from different derivatization condition

3.1.2 衍生化时间的影响

比较了室温条件下, 避光衍生化 0 h~30 h 每 1 h 的峰面积变化, 如图 2。结果表明, 衍生化 20 h 以上时峰面积变化很小, 因此只需要避光衍生化 20 h 以

上时就可保证衍生化完全。

3.2 色谱条件的选择

3.2.1 检测波长的选择

经过提取丙酮醛衍生物的光谱可见, 在 360 nm 处有最大吸收, 见图 3, 因此选择该 360 nm 波长作为检测波长。

3.2.2 液相条件的选择

本方法选择 Acquity UPLC BEH C₁₈ 2.1 mm×50 mm 作为分析柱。根据 SN/T 1547-2011 采用甲醇

+水的流动相组合, 经过优化选择了甲醇+水(50+50)的流动相比例为洗脱条件, 丙酮醛衍生物在 1.6 min 左右出峰, 没有干扰物质。

3.3 定量低限, 回归方程及相关系数

衍生化不同浓度的丙酮醛标准工作液进行 UPLC 分析, 测定线性范围为: 1.0 mg/L~60 mg/L, 测定低限为 25.0 mg/kg。回归方程、相关系数和定量低限见表 1 (Y 为峰面积, X 为丙酮醛的浓度, mg/L)。

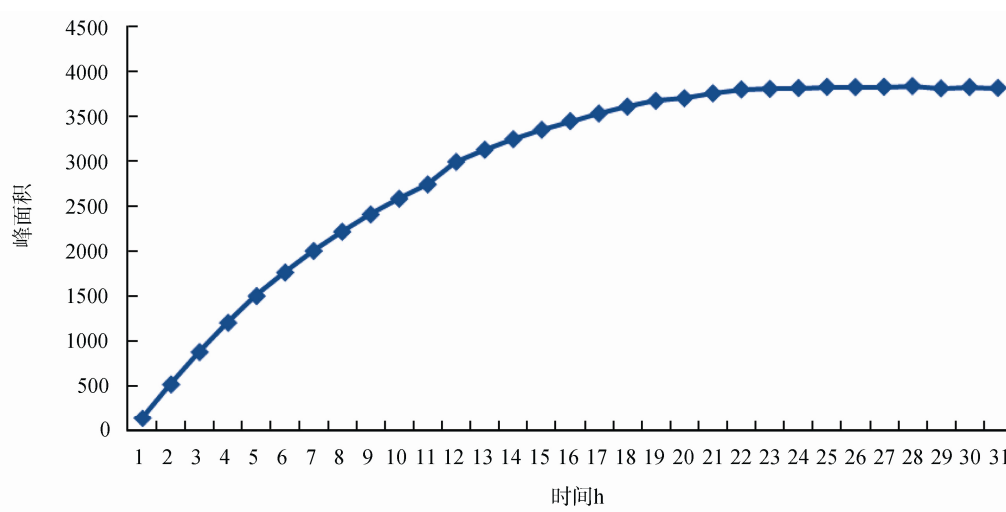


图 2 不同衍生化时间的峰面积比较

Fig. 2 Comparison of peak area obtained from different derivatization time

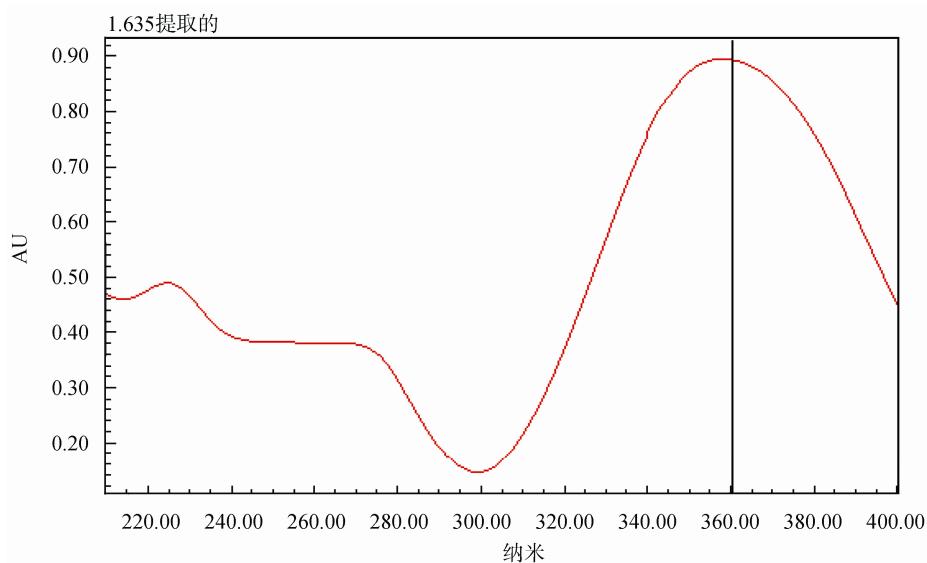


图 3 丙酮醛衍生物紫外吸收光谱图

Fig. 3 Ultraviolet absorption spectrum of MGO derivative

表 1 丙酮醛的回归方程、相关系数、定量低限和测定低限
Table 1 The regression equation, correlation coefficient, LOQ and LOD of MGO

组分名称	回归方程($Y=a+bX$)	相关系数(γ)	定量低限(mg/kg, $S/N>10:1$)	检出限(mg/kg, $S/N>3:1$)
丙酮醛	$Y=1.144\times 10^5 X+1.118\times 10^5$	0.9982	25.0	10.0

表 2 方法验证数据
Table 2 Validation data

加标水平 mg/kg	空白 mg/kg	验证结果 mg/kg						平均值 mg/kg	回收率 %	RSD %
		1	2	3	4	5	6			
25		33.2	35.1	32.3	31.6	30.2	31.1	32.3	93.9	5.4
500	8.8	489.2	498.6	495.1	486.5	476.8	471.6	486	97.3	2.1
1000		959.2	970.5	983.7	961.6	1003.4	988.2	978	97.8	1.8

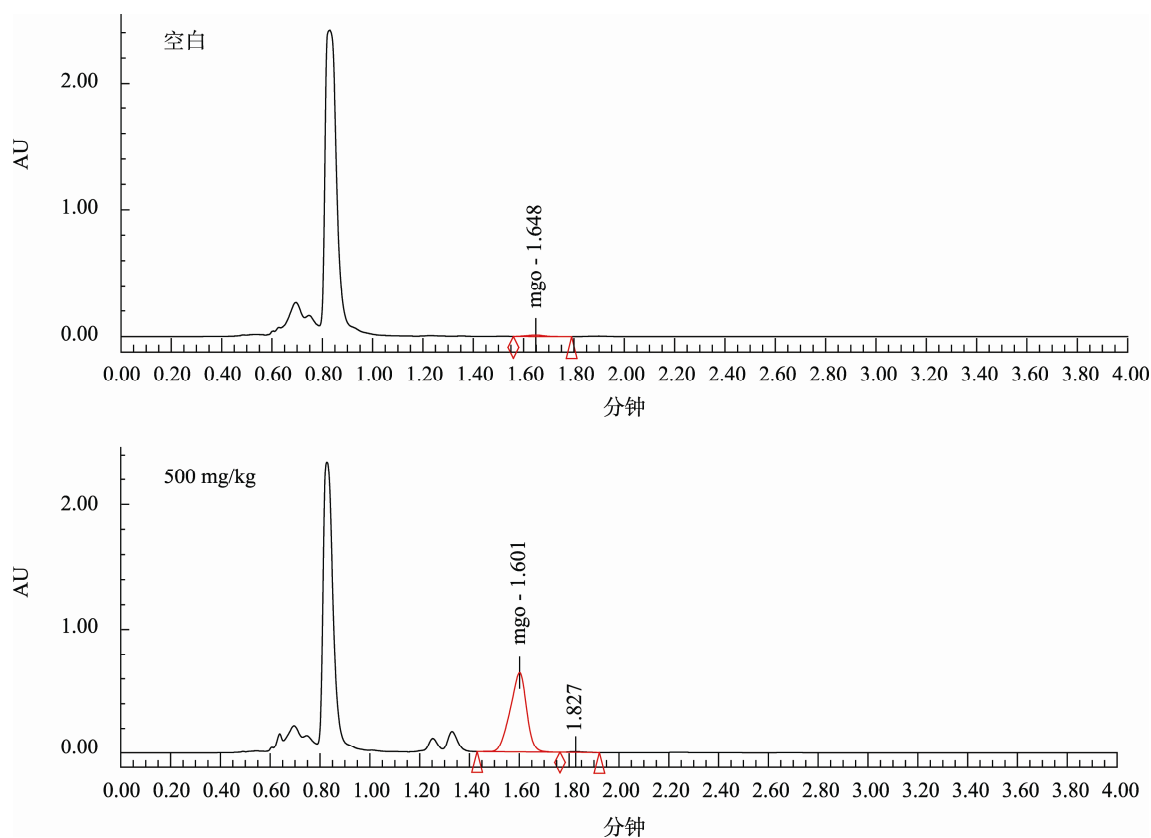


图 4 蜂蜜空白及加标 500 mg/kg 的色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of honey and honey spiked at 500mg/kg

3.4 方法精密度和回收率

选择蜂蜜为基质, 分别添加 25.0、500、1000 mg/kg 三个水平的丙酮醛标准, 每个加标水平平行测定 6 次, 数据见表 2。实验结果表明, 方法的平均回收率在 93.9%~97.8% 之间, 方法的相对标准偏差在 1.8%~5.4% 之间, 能够满

足日常检测需要。蜂蜜空白及加标液相色谱图见图 4。

3.5 实际样品检测

本文选择了市场上销售的 10 批次麦卢卡蜂蜜进行检测, 结果发现, 所检测样品麦卢卡蜂蜜的丙酮醛含量范围为 256~750 mg/kg。

表3 市售麦卢卡蜂蜜丙酮醛含量
Table 3 MGO contents of Manuka honey purchased from market

序号	结果(mg/kg)	序号	结果(mg/kg)
1	298.0	6	522.3
2	352.3	7	583.6
3	362.5	8	750.0
4	256.0	9	449.2
5	279.3	10	503.3

4 结论

本方法建立了麦卢卡蜂蜜中丙酮醛的高效液相色谱法测定方法,方法定量低限为 25.0 mg/kg,方法线性范围为 1.0 mg/L~60 mg/L,方法的平均回收率在 93.9%~97.8%之间,方法的相对标准偏差在 1.8%~5.4%之间。结果表明,本方法是一种麦卢卡蜂蜜中丙酮醛的快速、高效、灵敏的检测方法,能够应用于麦卢卡蜂蜜的质量监控。

参考文献

- [1] Allen KL, Molan PC, Reid GM. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1991, 43(12): 817-822.
- [2] 陈磊, 栾军, 费晓庆, 等. 高效液相色谱法检测新西兰蜂蜜中的甲基乙二醛[J]. *色谱*, 2014, 32(2): 189-193.
Chen L, Luan J, Fei XQ, *et al.* Determination of methylglyoxal in Manuka honey of New Zealand by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2014, 32(2): 189-193.
- [3] 赵国英. 蜂疗剪报汇编[J]. *蜜蜂杂志*, 2012, (10): 40.
Zhao GY. Apitherapy clippings assembly [J]. *J Bee*, 2012, (10): 40.
- [4] Megan NCG, Marilyn MH, Fauzi NAM, *et al.* Effect of high pressure processing on the conversion of dihydroxyacetone to methylglyoxal in New Zealand mānuka (*Leptospermum scoparium*) honey and models thereof [J]. *Food Chem*, 2014, (153): 134-139.
- [5] 孙艳萍, 李萍. 不同品牌蜂蜜对铜绿假单胞菌的体外抗菌作用[J]. *职业与健康*, 2012, 28(19): 2366-2367.
Sun YP, Li P. Antibacterial activity of honey against *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* [J]. *Occup Health*, 2012, 28(19): 2366-2367.
- [6] Habsi NAA, Niranjana K. Effect of high hydrostatic pressure on antimicrobial activity and quality of Manuka honey [J]. *Food Chem*, 2012, 135(3): 1448-1454.
- [7] Snow MJ, Manley HM. On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey [J]. *Food Chem*, 2004, 84(1): 145-147.
- [8] Gras K, Luong J, Gras R, *et al.* Determination of furfurals in Manuka honey using piston-cylinderliquid-liquid extraction and gas chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1362: 43-48.
- [9] Chan CW, Deadman BJ, Manley-Harris M, *et al.* Analysis of the flavonoid component of bioactive New Zealand mānuka (*Leptospermum scoparium*) honey and the isolation, characterisation and synthesis of an unusual pyrrole [J]. *Food Chem*, 2013, 141: 1772-1781.
- [10] Adam Le Gresley, Kenny J, Cassar C, *et al.* The application of high resolution diffusion NMR to the analysis of manuka honey [J]. *Food Chem*, 2012, 135: 2879-2886.
- [11] Chepulis L, Francis E. The glycaemic index of Manuka honey [J]. *e-SPEN J*, 2013, 8(1): 21-24.
- [12] 韩冰. 新西兰国宝级蜂蜜为何不“甜”了[EB/OL]. http://news.xinhuanet.com/mrdx/2013-08/27/c_132666181.htm, 2013-08-27/2014-11-17
Han B. Why the New Zealand national treasure-class honey no longer “sweet” [EB/OL]. http://news.xinhuanet.com/mrdx/2013-08/27/c_132666181.htm, 2013-08-27/2014-11-17.
- [13] Adams CJ, Boulton CH, Deadman BJ, *et al.* Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey [J]. *Carbohydr Res*, 2008, 343(4): 651-659.
- [14] Atrott J, Haberlau S, Henle T. Studies on the formation of methylglyoxal from dihydroxyacetone in Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey[J]. *Carbohydr Res*, 2012, 361: 7-11.
- [15] Degen J, Vogel M, Richter D, *et al.* Metabolic Transit of Dietary Methylglyoxal [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 10253-10260.
- [16] Jiang YP, Hengel M, Pan CP, *et al.* Determination of toxic α -Dicarbonyl compounds, Glyoxal, Methylglyoxal, and Diacetyl, released to the headspace of lipid commodities upon heat treatment [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 1067-1071.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



赵琼晖, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: qionghuizhao@hotmail.com



陈波, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: jakeebo2001@sohu.com