

药用蜂蜜中 5-羟甲基糠醛的限量检查方法研究

张玉荣¹, 王瑞忠^{2,3}, 鲁静^{3*}

(1. 西安医学院第一附属医院, 西安 710077; 2. 山西中医药大学, 晋中 030619; 3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 研究药用蜂蜜中 5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethyl furfural, 5-HMF) 的限量检查方法。**方法:** 采用高效液相色谱法, 使用 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸 (5:95) 为流动相, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长为 284 nm (5-HMF)、254 nm (鸟苷), 柱温 35 °C。采用以鸟苷为内标物, 以鸟苷/5-HMF 的校正因子计算含量; 同时采用外标法测定 5-HMF 的含量, 比较校正因子法计算值与外标法实测值得差异。**结果:** 鸟苷/5-HMF 不同浓度比值 (0.34~3.46) 与峰面积比值的线性关系良好 ($r=0.9999$), 检出限为 0.1 ng, 加样回收率 ($n=6$) 为 101.4% (RSD=4.7%); 各批样品中 5-HMF 的计算值与实测值间无显著差异 ($P=0.411$)。**结论:** 本法可用于药用蜂蜜中 5-羟甲基糠醛的限量检查。

关键词: 药用蜂蜜; 5-羟甲基糠醛; 鸟苷; 校正因子; 限量检查; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 02-0326-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.02.20

Limit test of 5-hydroxymethyl furfural in medicinal honey

ZHANG Yu-rong¹, WANG Rui-zhong^{2,3}, LU Jing^{3*}

(1. The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, China; 2. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish a method for limit test of 5-hydroxymethyl furfural (5-HMF) in medicinal honey. **Methods:** HPLC with C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid solution (5:95) at a flow rate of 0.8 mL · min⁻¹, the detection wavelengths were 284 nm for 5-HMF and 254 nm for guanosine, the column temperature was 35 °C. With guanosine as internal standard, 5-HMF was determined by both external standard method and correction factor of 5-HMF/guanosine. The validity of the correction factor method was evaluated by comparison of the quantitative results of both methods. **Results:** The concentration ratio of guanosine to 5-HMF was between 0.34 and 3.46, and the related ratio of peaks area revealed a good relationship. The lowest detection limit was 0.1 ng and the average recovery ($n=6$) was 101.4% (RSD=4.7%). No significant difference was observed between results of external standard method and correction factor method in 21 batches of medicinal honey ($P=0.411$). **Conclusion:** The method is feasible for limit test of the medicinal honey.

Keywords: medicinal honey; 5-HMF; guanosine; correction factor; limit test; HPLC

* 通信作者 Tel:(010)67079533; E-mail: lujing@nifdc.org.cn

第一作者 Tel:(029)84230225; E-mail: zyr876281137@126.com

蜂蜜是蜜蜂将采集的植物花蜜、蜜露或甘露,与自身唾液腺的分泌物结合后,经充分酿制而储藏在巢脾内的天然甜物质^[1]。蜂蜜作为传统中药丸剂中的辅料,不仅具有黏合剂、矫味剂的作用,而且具有补中、润燥、解毒的功效,其主要成分为果糖和葡萄糖^[2-3],约占70%以上^[4]。5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl furfural, 5-HMF)是已糖经加热分解产生的降解物^[5-6],在新鲜蜂蜜中含量很低^[7]。据报道,该化合物可引起动物横纹肌麻痹及内脏损害^[8],具有基因毒性和细胞毒性^[9]和潜在的致癌风险^[10]。蜂蜜国家标准(GB 18796—2005)^[11]采用高效液相色谱法测定5-HMF的含量,规定应小于或不得过 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。GB/T 18932.18-2003^[12]规定了5-HMF测定的具体方法。5-HMF性质不稳定,熔点 $30\sim 34 \text{ }^\circ\text{C}$,极易潮解,高于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 难以准确称量。本文参照国家标准方法,以鸟苷为内标物,建立了校正因子法测定蜂蜜中5-HMF的含量。

1 仪器与试剂

沃特世公司 Waters 2695 高效液相色谱仪(2998PDA 检测器);安捷伦公司 1260 型液相色谱仪、二极管阵列检测器。安捷伦公司 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶)。

5-羟甲基糠醛对照品(批号 111626-201007)由中国食品药品检定研究院提供,鸟苷(纯度 ≥ 98%,批号 060M16899V)购自 SIGMA 公司;样品购自北京、湖南、四川、陕西等地;乙腈、甲醇为色谱纯(Fisher 公司),其余均为分析纯(北京化工厂)。

2 溶液的制备

2.1 对照品储备液与内标储备液

精密称取 5-羟甲基糠醛对照品 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加 10% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度,即得对照品储备液。精密称取鸟苷对照品 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加 10% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得内标储备液。

2.2 供试品溶液

取蜂蜜 1 g,置烧杯中,精密称定,加 10% 甲醇溶液约 10 mL 溶解并转移至 50 mL 量瓶中,分 3 次洗涤容器,每次约 3 mL 10% 甲醇溶液,洗液并入量瓶中,精密加入鸟苷内标储备液 1 mL,加 10% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

3 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 甲酸水溶液(5:95);流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长:284 nm(5-HMF)、254 nm(鸟苷);柱温: $35 \text{ }^\circ\text{C}$;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,样品及对照品色谱图见图 1。

4 方法学验证

4.1 线性与校正因子测定

取内标储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 mL,分别置 100 mL 量瓶中,再分别加入对照品储备液 2.0 mL,加水稀释至刻度,摇匀,分别取 10 μL 进样测定。以鸟苷与 5-HMF 的质量浓度比值 X 为横坐标,以两者的峰面积比值 Y 为纵坐标,进行线性回归。鸟苷/5-HMF 不同浓度比值(0.34~3.46)与峰面积比值的线性关系良好($r=0.9999$),回归方程:

$$Y=0.3099X-0.0062 \quad r=0.9999$$

分别采用 Waters 2695-2998 及 Agilent 1260 这 2 种高效液相色谱系统,Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 及 Phenomenex C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 3 种色谱柱,重复进行 5 次试验,以不同质量浓度比值与峰面积值计算校正因子,校正因子平均值($n=5$)为 0.3399, RSD=3.3%。

4.2 重复性试验

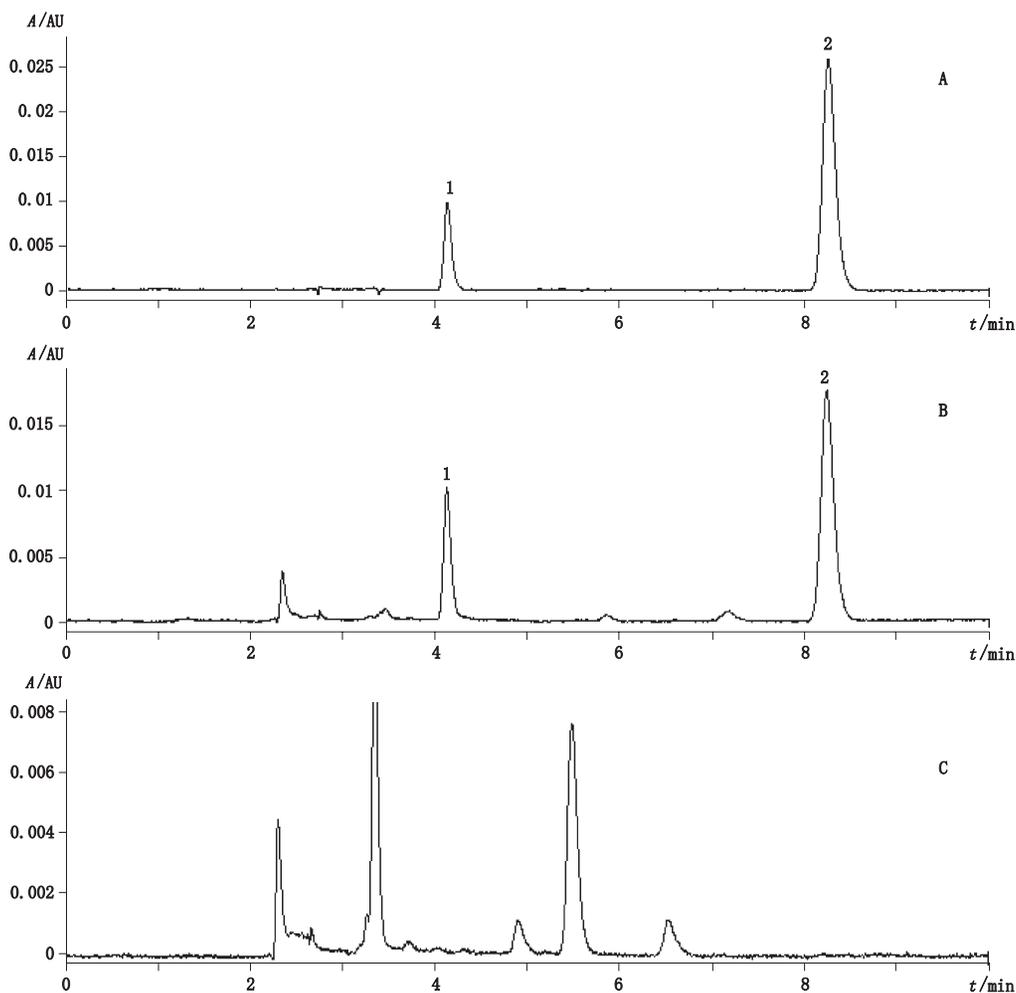
取蜂蜜样品 1 g 共 6 份,精密称定,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,以外标法及校正因子计算 5-HMF 平均含量($n=6$) 分别 14.48 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 14.23 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, RSD 均为 1.3%。

4.3 回收率试验

取蜂蜜样品 0.5 g 共 6 份,精密称定,分别加入 5-HMF 对照品溶液($0.1466 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 50 mL,按“2.2”项下方法制备供试溶液,进样测定,计算回收率。结果见表 1。

4.4 耐用性试验

4.4.1 不同色谱柱 采用 3 种不同商品规格的 C₁₈ 色谱柱[Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Phenomenex C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)] 分别测定同一样品的含量,比较不同色谱柱对测定结果的影响,结果 RSD 为 2.4%,表明校正因子法测定样品含量在采用不同品牌及不同型号色谱柱时具有良好的耐用性。



1. 鸟苷 (guanosine) 2. 5-HMF

图 1 加内标对照品 (A)、加内标阳性样品 (B)、不加内标阴性样品 (C) 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance and internal standard (A), sample and internal standard (B), negative sample without internal standard (C)

表 1 回收率试验结果 (n=6)

Tab. 1 Results of recovery test

样品含量 (content)/ μg	5-HMF 加入量 (added)/ μg	测得量 (detected)/ μg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
9.18	7.33	16.92	105.6	101.4	4.7
10.00		17.95	108.4		
8.24		15.38	97.4		
7.90		15.00	96.9		
8.72		16.21	102.1		
10.05		17.25	98.2		

4.4.2 流动相 pH 变化的影响 分别采用 0.07%、0.10% 和 0.13% 甲酸为流动相中的水相,测定同一样品的含量,比较改变流动相 pH 对含量的影响,结果 RSD 为 1.6%,表明校正因子法测定样品含量在不同 pH 的流动相条件下具有良好的耐用性。

4.5 检测限与定量限的测定

取“4.1”项下线性最低点的溶液,逐步进行稀释,然后进样,以信噪比方法测定,3 倍噪音时的检测限为 $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,10 倍噪音时定量限为 $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5 样品测定

取 21 批样品,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液;分别精密吸取供试品溶液各 10 μL ,注入高效液相色谱仪进行测定。采用外标法和校正因子法

计算蜂蜜中 5-HMF 的含量,结果见表 2。使用 SPSS 18.0 统计软件对采用外标法和校正因子法测得的结果进行配对 t 检验,结果 2 种含量测定方法差异无统计学意义 ($P=0.411$)。

表 2 蜂蜜样品中 5-HMF 的测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Tab. 2 Determination results of 5-HMF in honey

编号 (No.)	样品 (sample)	5-HMF 含量 (5-HMF content)	
		外标法 (external standard method)	校正因子法 (correction factor method)
1	益母草蜂蜜 (leonurus artemisia honey) *	83	87
2	蜂蜜 (梧州) (Wuzhou honey) Δ	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)
3	益母草蜜 (leonurus artemisia honey) Δ	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)
4	荆条蜜 (vitex honey) Δ	23	23
5	蜂蜜 (重庆) (Chongqing honey) Δ	2	2
6	蜂蜜 (西安) (Xi'an honey) Δ	245	238
7	枸杞蜂蜜 (lycium chinense honey) *	16	16
8	蜂蜜 (honey) Δ	76	74
9	野玫瑰蜂蜜 (wild rose honey) *	107	106
10	益母草蜂蜜 (leonurus artemisia honey) *	87	84
11	土蜂蜜 (turkish honey) *	124	121
12	枇杷蜂蜜 (loquat honey) *	74	72
13	枣花蜂蜜* (date honey)	29	29
14	党参蜂蜜 (codonopsis honey) *	32	31
15	枣花蜜 (date honey) *	17	17
16	刺槐蜂蜜 (acacia honey) Δ	15	15
17	菊花蜂蜜 (chrysanthemum honey) *	54	52
18	洋槐蜜 (acacia honey) *	21	20
19	刺槐蜂蜜 (acacia honey) *	29	28
20	枣花蜂蜜 (date honey) *	100	105
21	荆条蜂蜜 (vitex honey) *	79	83

注 (note): *代表来源于市场 (* represents the sample from the market); Δ 代表来源于企业 (Δ represents the sample from the enterprises)

6 讨论

6.1 内标物的选择

查阅相关文献以及 5-HMF 的溶液的配制条件,因鸟苷熔点高,易溶解于 10% 的甲醇溶液中,保留时间适中,峰形良好,与蜂蜜中其他成分分离度较好,不干扰测定,因此选择鸟苷作为 5-HMF 测定的内标物。

6.2 蜂蜜中 5-HMF 含量结果分析

按 GB 18796—2005《蜂蜜》标准,蜂蜜中 5-HMF

不得过 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,测定的样品中,10 批超过限度。5-HMF 超出限度者可能与蜂蜜存储时间和存储环境有关^[13]。炼蜜中 5-HMF 含量一般较高,可能与炼制过程有关,在炼制的过程中由于高温加热产生更多的 5-HMF^[14]。

7 小结

采用校正因子法所得蜂蜜中 5-HMF 含量与常规的外标法所得的含量间无显著差异 ($P=0.411$),说明在无对照品的情况下,通过校正因子法测定蜂蜜中

5-HMF 含量准确可行。

参考文献

- [1] 龙光明, 裘璐, 马丽, 等. HPLC 测定 6 种蜂蜜中 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 数理医药学杂志, 2012, 25(6):643
LONG GM, QIU L, MA L, *et al.* Determination of 5-hydroxymethyl furfural in six kinds of honey by high performance liquid chromatography[J]. *J Math Med*, 2012, 25(6):643
- [2] 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
XIAN JC, ZHANG N, FENG Y, *et al.* Research for thermal stability of fructose, glucose, 5-hydroxymethyl furfural during the process of refining honey of honeyed pills[J]. *J Chin Med Mater*, 2011, 34(9):1434
- [3] 汪琪, 谢黔峰, 刘丽娜, 等. 六味地黄丸(大蜜丸)中蜂蜜辅料的质量考察(2)糖转化产物 5-羟甲基糠醛的测定[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(12):2349
WANG Q, XIE QF, LIU LN, *et al.* Quality investigation of honey in Liuwei Dihuang pills (big honeyed pills) (2)-determination of 5-hydroxymethyl furfural (5-HMF)[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30(12):2349
- [4] 刘学仁, 罗新鹏, 查敏, 等. 蜂蜜质量分析的研究进展[J]. 中药材, 2012, 35(7):1175
LIU XR, LUO XP, CHA M, *et al.* Progress in quality analysis of honey[J]. *J Chin Med Mater*, 2012, 35(7):1175
- [5] 臧清策, 何管管, 白进发, 等. 快速筛查中药注射液中有害物质 5-羟甲基糠醛的 LC-MS/MS 方法及其质量评价研究[J]. 药理学学报, 2013, 48(11):1705
ZANG QC, HE QQ, BAI JF, *et al.* Rapid screening and quality evaluation for the harmful substance 5-hydroxymethyl furfural in commercially available traditional Chinese medicine injection using LC-MS/MS method[J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(11):1705
- [6] 刘海静, 雷琨, 王嫦鹤, 等. HPLC 法测定右旋糖酐 40 原料中 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 中国药事, 2013, 27(9):945
LIU HJ, LEI K, WANG CH, *et al.* Content determination of 5-hydroxymethyl furfural in crude material of dextran 40 by HPLC[J]. *Chin Pharm Aff*, 2013, 27(9):945
- [7] 周坚. HPLC 法测定小活络丸(大蜜丸)中 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(1):34
ZHOU J. Determination of 5-hydroxymethyl furfural (5-HMF) in Xiaohuoluo pills (big honeyed pills) by HPLC[J]. *Northwest Pharm J*, 2013, 28(1):34
- [8] 刘晓瑜, 邱海强. HPLC 法测定中华跌打丸(大蜜丸)中 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 药学研究, 2016, 35(1):22
LIU XY, QIU HQ. Determination of 5-hydroxymethyl furfural in Zhonghuadieda pills (big honeyed pills) by HPLC[J]. *J Pharm Res*, 2016, 35(1):22
- [9] 赵颖, 张璐欣, 李越. 5-羟甲基糠醛的研究概况[J]. 医学综述, 2016, 22(17):3431
ZHAO Y, ZHANG LX, LI Y. The researches situation of 5-hydroxymethyl furfural[J]. *Med Recapit*, 2016, 22(17):3431
- [10] 阚旭辉, 郭红英, 谈兴和, 等. 食品中 5-羟甲基糠醛的研究进展[J]. 食品工业, 2017, 38(3):251
KAN XH, GUO HY, TAN XH, *et al.* Research progress in 5-hydroxymethyl furfural in food[J]. *Food Ind*, 2017, 38(3):251
- [11] GB 18796-2005 蜂蜜[S]. 2005
GB 18796-2005 Honey[S]. 2005
- [12] GB/T 18932.18-2003 蜂蜜中羟甲基糠醛含量的测定方法液相色谱-紫外检测法[S]. 2004
GB/T 18932.18-2003 Method for the Determination of Hydroxymethylfurfural in Honey—HPLC-UV Detection Method[S]. 2004
- [13] 裴珂哈, 欧仕益. 食品中 5-羟甲基糠醛的形成与控制[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1):251
PEI KH, OU SY. Formation and mitigation of 5-hydroxymethyl furfural in foods[J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(1):251
- [14] 叶莉莉, 祝子铜, 戴勤娟, 等. 温度对不同花蜜中 5-羟甲基糠醛含量的影响[J]. 中国蜂业, 2013, 64:62
YE LL, ZHU ZT, DAI QJ, *et al.* Effect of temperature on the content of 5-hydroxymethyl furfural in different floral honeys[J]. *Apic China*, 2013, 64:62

(本文于 2017 年 3 月 6 日收到)