

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240328001

高效液相色谱法测定蜂王浆和蜂王浆干粉中羟甲基糠醛含量

周萍¹, 李珊珊², 尹志红¹, 吴晓群³, 李樱红⁴, 魏琳², 胡福良^{2*}

(1. 杭州碧于天保健品有限公司, 桐庐 311500; 2. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310058;

3. 桐庐县市场监管局, 桐庐 311500; 4. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定蜂王浆和蜂王浆干粉中羟甲基糠醛含量。**方法** 将蜂王浆经氨水碱化, 使样液呈中性或者弱碱性, 用乙酸乙酯提取, 离心, 取上清液蒸干后复溶解, 过0.22 μm滤膜, 采用C₁₈色谱柱分离, 以羟甲基糠醛为标准品进行外标法定量, 以高效液相色谱仪进行检测。**结果** 羟甲基糠醛在20~500 μg/kg范围内线性良好, 相关系数 r^2 为0.9983, 添加回收率为86.1%~100.8%, 相对标准偏差为4.6%~8.0%, 检出限为6 μg/kg, 定量限为20 μg/kg。对11个样品进行测定, 蜂王浆和蜂王浆干粉中羟甲基糠醛含量不等, 与储存条件有关。**结论** 本研究方法可用于检测蜂王浆及其冻干粉中羟甲基糠醛的含量, 羟甲基糠醛具有评价蜂王浆及其冻干粉新鲜度的潜力。

关键词: 蜂王浆; 蜂王浆干粉; 羟甲基糠醛; 高效液相色谱法; 新鲜度

Determination of hydroxymethylfurfural in royal jelly and its dry powder by high performance liquid chromatography

ZHOU Ping¹, LI Shan-Shan², YIN Zhi-Hong¹, WU Xiao-Qun³,
LI Ying-Hong⁴, WEI Lin², HU Fu-Liang^{2*}

(1. Hangzhou Biyutian Health Products Co., Ltd., Tonglu 311500, China; 2. Animal Science College of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3. Tonglu County Market Supervision and Administration Bureau, Tonglu 311500, China;

4. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of hydroxymethylfurfural in royal jelly and its dry powder by high performance liquid chromatography. **Methods** Royal jelly was alkalized with ammonia to make the sample neutral or weakly alkaline. The royal jelly sample was extracted using ethyl acetate and then centrifuged. The supernatant was evaporated to dryness and then dissolved. After passed through 0.22 μm filter membrane, the resultant sample was separated by C₁₈ column and tested using liquid chromatography. The sample was quantified by

基金项目: 2023年第一批推荐性国家标准计划项目(20230012-T-442)、国家蜂产业技术体系专项(CARS-44)、2021年度浙江省市场监督管理局科技项目(20210127)

Fund: Supported by the First Batch of Recommended National Standards Program Projects in 2023(20230012-T-442), the Modern Agroindustry Technology Research System (CARS-44), and the Zhejiang Provincial Market Supervision Administration Science and Technology Project in 2021(20210127)

*通信作者: 胡福良, 博士, 教授, 主要研究方向为蜜蜂、蜂产品及功能性食品科学。E-mail: flhu@zju.edu.cn

*Corresponding author: HU Fu-Liang, Ph.D, Professor, Animal Science College of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China. E-mail: flhu@zju.edu.cn

external standard method as the standard of hydroxymethylfurfural. **Results** Hydroxymethylfurfural had good linearity in the range of 20–500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The correlation coefficients were 0.9983. The recoveries of addition were 86.1%–100.8%, and the relative standard deviation were 4.6%–8.0%. The limit of detection was 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and limit of quantitation was 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The contents of hydroxymethylfurfural in 11 samples royal jelly and royal jelly dry powder were different and related to storage conditions. **Conclusion** This method can be used to determine the content of hydroxymethylfurfural in royal jelly and its freeze-dried powder, and hydroxymethylfurfural has the potential to evaluate the freshness of royal jelly and its freeze-dried powder.

KEY WORDS: royal jelly; royal jelly dry powder; hydroxymethylfurfural; high performance liquid chromatography; freshness

0 引 言

GB 9697—2008《中华人民共和国国家标准 蜂王浆》中介绍蜂王浆是工蜂咽下腺和上颚腺分泌的,主要用于饲喂蜂王和蜂幼虫的乳白色、淡黄色或浅橙色浆状物质。蜂王浆含有 62%~67%的水分、14%~16%的蛋白质、10%~15%的糖类、2%~9%的脂类、0.6%~2.0%的矿物质、微量的维生素,具有抗氧化和抗炎等生物学活性^[1]。由于蜂王浆对温度敏感,如果贮存不当,蜂王浆会产生褐变,因蛋白质聚集凝固而变黏稠,受微生物污染而变酸、变臭和产生气泡,严重影响蜂王浆的品质^[2-3]。然而,GB 9697—2008 和 ISO 12824《BSI Standards publication, Royal jelly-Specifications》中,仅规定了蜂王浆标志性成分 10-羟基-2-癸烯酸(10-hydroxy-2-decenoic acid, 10-HDA)含量 $\geq 1.4\%$ 、蛋白质含量 11%~18%、总糖含量 7%~18%及总脂含量 2%~9%。关于蜂王浆新鲜度指标没有明确要求,这限制了蜂王浆行业的良性发展以及蜂王浆品质的监管。所以,这是蜂王浆行业亟待解决的问题。

从 20 世纪 90 年代以来,众多学者围绕蜂王浆新鲜度指标进行了大量研究。在不同贮存条件下,对酶活性^[4-5]、蛋白活性^[6-10]、维生素含量^[11-12]、褐变成分含量^[13-16]、红外光谱指纹^[17-18]、挥发物^[19]的变化趋势进行研究,并取得了一些研究成果。但由于缺少生产实践验证、检测方法灵敏度不够、研究对象在不同蜂王浆中本底差异较大等原因,目前尚无公认的蜂王浆新鲜度评价指标。作为蜂王浆新鲜度指标,必须满足以下要求:该指标必须对温度具有敏感度,而且可以被定量且准确的检测^[20]。羟甲基糠醛(hydroxymethylfurfural, HMF)是美拉德反应的重要中间产物,在酸性条件下,己糖脱水,或是氨基酸与羰基化合物之间反应形成^[21]。高夫超等^[21]将蜂王浆在常温下放置 12 个月, HMF 从未检出升高到 0.573 mg/kg。魏月等^[14]认为蜂王浆中 HMF 含量在 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下,可以认为蜂王浆是新鲜的。通过以上结果推测 HMF 是判定蜂王浆新鲜度的潜在指标。因此,研究蜂王浆中的 HMF 含量的测定方法,可

为深入研究蜂王浆中 HMF 的变化规律提供技术支撑。

本研究通过前处理和液相条件的摸索,以及方法学验证,探究了基于高效液相色谱法的蜂王浆和蜂王浆干粉中的 HMF 含量的测定方法。以期完善蜂王浆质量控制体系提供理论依据,并为蜂王浆新鲜度指标的测定提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

HMF 标准品(CAS: 67-47-0, 纯度 $\geq 98\%$, 德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司); 蜂王浆和蜂王浆干粉样品(杭州碧于天保健品有限公司); 磷酸(优级纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 美国赛默飞世尔科技公司); 氨水(分析纯, 杭州双林化工试剂有限公司); 乙酸乙酯(色谱纯, 霍尼韦尔国际公司); 水, 符合 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法一级水》; 滤膜, 尼龙 66 (0.22 μm , 美国 Pall 公司)。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津仪器有限公司); Sartorius BS224S 电子分析天平(感量 0.0001 g, 德国赛多利斯集团); KQ3200E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SC-3612 台式高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

称取蜂王浆样品 1.00 g 或蜂王浆干粉样品 0.50 g(精确至 0.001 g)于 15 mL 塑料离心管中, 加入 1.5 mL 水, 蜂王浆样品中加入 1.5 mL 3%氨水溶液, 蜂王浆干粉样品中加入 2.0 mL 3%氨水溶液, 充分溶解至无肉眼可见蜂王浆颗粒, 加入 8 mL 乙酸乙酯, 手动振荡提取 1 min, 4500 r/min 的转速离心 5 min。吸取全部乙酸乙酯层于 50 mL 鸡心瓶中, 40°C 水浴旋转蒸发至干, 向鸡心瓶中加入 1 mL 6%甲醇溶液, 超声溶解残渣, 样液过 0.22 μm 滤膜, 得到测试液。

1.3.2 实验溶液配制

(1) 溶液配制

3%氨水溶液: 吸取 3.0 mL 氨水用水定容至 100 mL;
6%甲醇溶液: 吸取 6.0 mL 甲醇用水定容至 100 mL; 0.4%
磷酸溶液: 吸取 4.0 mL 磷酸用水定容至 1000 mL。

HMF 标准储备液: 称取 HMF 标准品 20 mg, 加甲醇定容至 20 mL 配成 1.0 mg/mL 的 HMF 储备液。-18 度保存 24 个月。

HMF 标准中间液, 10 mg/L: 吸取 0.1 mL HMF 储备液, 用水定容至 10 mL, 配成 10 mg/L HMF 标准中间液, -18℃ 保存 12 个月。

HMF 标准工作溶液 I: 吸取 1.0 mL HMF 标准中间液, 用水定容至 10 mL, 配成 1 mg/L HMF 标准工作溶液 I。

HMF 标准工作溶液 II: 吸取 1.0 mL HMF 标准工作溶液 I, 用水定容至 10 mL, 配成 0.1 mg/L HMF 标准工作溶液 II。

(2) 标准溶液制备

称取 6 份空白样品各 1.00 g (精确至 0.001 g), 于 15 mL 塑料离心管中, 各加入 0.10、0.20、0.50 mL HMF 标准工作溶液 II, 0.10、0.20、0.50 mL HMF 标准工作溶液 I, 分别加入 1.5 mL 水, 加入 1.5 mL 3% 氨水溶液, 充分溶解至无肉眼可见蜂王浆颗粒, 加入 8 mL 乙酸乙酯, 手动振荡提取 1 min, 4500 r/min 的转速离心 5 min。吸取全部乙酸乙酯层于 50 mL 鸡心瓶中, 40℃ 水浴旋转蒸发至干, 向鸡心瓶中加入 1 mL 6% 甲醇溶液, 超声溶解残渣, 样液过 0.22 μm 滤膜, 得到空白基质标准曲线工作溶液。相当于标准溶液系列质量浓度为 10、20、50、100、200 和 500 μg/kg。

1.3.3 液相色谱参考条件

色谱柱: C₁₈ 填料色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相: 流动相 A 为甲醇:0.4%磷酸溶液=6:94; 流动相 B 为甲醇。梯度洗脱条件见表 1。柱温: 35℃; 检测波长: 285 nm; 进样量: 20 μL。

表 1 流动相梯度洗脱条件
Table 1 Mobile phase gradient elution condition

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流量/(mL/min)
0.00	100	0	1.0
12.00	100	0	1.0
12.01	0	100	1.5
15.00	0	100	1.5
15.01	100	0	1.0
23.00	100	0	1.0

1.3.4 测定

用空白基质标准曲线工作溶液(1.3.2)、测试液(1.3.1)

分别进样, 以标准工作溶液质量浓度为横坐标(X, μg/kg), 以 HMF 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准工作曲线, 用标准工作曲线对样品进行定量。标准工作溶液及测试液中 HMF 的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 对数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 蜂王浆样品 pH 对 HMF 提取的影响

现行 HMF 测定方法中, 关于 HMF 的提取方法见表 2。从表 2 可知, 对于蛋白质含量低、颜色浅、可溶解物含量小的样品, 如黄酒、蜂蜜、出口葡萄酒等^[22-23], 多采取直接过滤、低比例的甲醇水溶液或乙腈水溶液进行稀释后过滤的前处理方法。对于颜色深、可溶解物含量大的样品, 如调味品(食醋、酱油)、饮料、水果汁等, 采用了乙酸乙酯、乙腈、甲醇等有机溶剂提取或 C₁₈ 固相萃取小柱进行净化。对于蛋白质含量高的样品, 如蜂王浆、干酪和炼乳、咖啡及其制品等^[14-15, 21, 24-25], 采用亚铁氰化钾/乙酸锌、三氯乙酸沉淀蛋白、QuEChERS 净化的方法对样品进行净化。

蜂王浆和蜂王浆干粉中, 蛋白质的含量高达 15% 和 39%, 还有 3% 和 10% 的脂肪酸, 以及微量的花粉色素^[1]。为了去除蛋白质、脂肪酸和花粉色素等杂质, 采用亚铁氰化钾/乙酸锌沉淀蛋白的方法对样品进行净化, 发现羟甲基糠醛可以被完全提取, 回收率在 90.4~101.2% 之间。但是, 因为样品进行了 10 倍的稀释, 导致方法检出限降低, 经过测定, 该方法检出限为 0.3 mg/kg, 不能满足蜂王浆新鲜度质量控制的要求。参照表 2 参考文献[21]的方法, 将样品用水溶解后, 用乙酸乙酯提取, 再进行浓缩检测, 发现该方法的检出限可以达到 0.1 mg/kg, 从而提高了此方法的灵敏度然而, 该方法对羟甲基糠醛的绝对提取率仅为 20%, 可能是由于蜂王浆中的蛋白质影响了提取效率。

进一步将蜂王浆溶于碱性溶液, 再用乙酸乙酯提取, 考察了不同浓度的碱性溶液条件下, 乙酸乙酯对蜂王浆中羟甲基糠醛的提取效率, 结果见表 3。从表 3 可知, 当 pH 呈中性时, 乙酸乙酯对蜂王浆中羟甲基糠醛的提取效率最高。可以认为蜂王浆中的蛋白质被氨水溶解后, 样液呈细腻的奶状, 见图 1 中 B4, 保证了乙酸乙酯与羟甲基糠醛充分接触, 提取时, 体系细腻而均匀, 静置时, 可缓缓分层, 见图 1 中 C6, 从而提高了提取效率。未加氨水的样液可见明显的絮状蛋白质, 见图 1 中 B3, 乙酸乙酯无法完全渗透至絮状蛋白质中, 提取时, 体系可明显见到粗颗粒状物体, 且沉降迅速, 见图 1 中 C5, 与羟甲基糠醛不能充分接触, 影响了提取效率。当 pH 呈较高的碱性(pH=9 以上)时, 提取效率不如中性样液, 可能由于样液粘度增加, 分子扩散

能力下降, 羟甲基糠醛在乙酸乙酯中的分配系数变小, 影响了羟甲基糠醛提取^[27]。因此, 选择用 1.5 mL 水和 1.5 mL

3%氨水溶解蜂王浆样品, 用 1.5 mL 水和 2.0 mL 3%氨水溶解蜂王浆干粉样品。

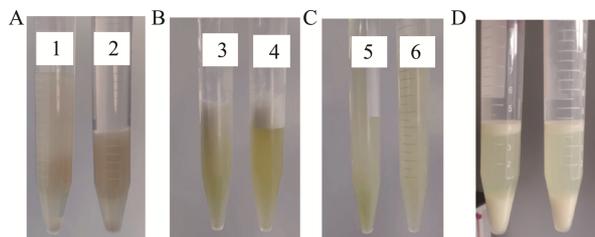
表 2 不同样品中羟甲基糠醛的提取方法
Table 2 Extraction methods of Hydroxymethylfurfural from different samples

样品名称	提取方法	检测器	文献出处
蜂王浆	1 g 样品→水溶解→亚铁氰化钾/乙酸锌沉淀蛋白→定容至 10 mL。	HPLC-UV	[14-15,21]
干酪和炼乳	0.05 g 样品→12 mL 水溶解→5 mL 0.15 mol/L 草酸→三氯乙酸沉淀蛋白→定容至 25 mL。	HPLC-UV	[24]
饮料	5 mL 样品→水溶解→乙酸乙酯提取→碳酸钠净化→乙酸酸化→无水硫酸钠脱水→40-45°C 蒸干→0.5 mL 乙腈溶解→衍生化→0.1 mL 丙酮溶解→GC-MS/MS。 2.5 mL 样品→C ₁₈ 固相萃取小柱→乙酸乙酯-乙醚洗脱→氮气吹干→0.5 mL 乙酸溶液→LC-MS/MS。	LC-MS/MS 和 GC-MS/MS	SN/T 1859—2007《饮料中棒曲霉素和 5-羟甲基糠醛的测定方法液相色谱-质谱法和气相色谱-质谱法》
出口葡萄酒	10.0 mL 样品→10%甲醇水溶液定容。	HPLC-UV	SN/T 4675.8—2016《出口葡萄酒中 5-羟甲基糠醛的测定液相色谱法》
蜂蜜	5.0 g 样品→20 mL 10%乙腈溶解→10%乙腈定容至 50 mL。	HPLC-UV	[22]
调味品(食醋、酱油)	1 g 样品→3 mL 乙腈提取→离心→上清液氮气吹干→1 mL 流动相溶解。	HPLC-UV	T/SATA 034—2022《调味品中 5-羟甲基糠醛的测定高效液相色谱法》
白术	0.5 g→20 mL 80%甲醇→超声→过滤→定容至 50 mL	HPLC-UV	[26]
黄酒	直接取样→0.45 μm 滤膜过滤	HPLC-UV	[23]
水果汁	5.0 g 样品→15 mL 甲醇提取→离心→上清液氮气吹干→2 mL 流动相溶解。	HPLC-UV	T/JAASS 96—2023《水果制品中 5 种糠醛类物质的测定液相色谱法》
咖啡及其制品	0.3-0.5 g→5 mL 50%乙醇+5 mL 10%Na ₂ CO ₃ 稀释→1.5 mL 稀释液→1.5 mL 乙腈提取→QuEChERS 净化管	GC-MS/MS	[25]

注: 高效液相色谱法-紫外检测 (high performance liquid chromatography-ultraviolet, HPLC-UV), 液相色谱串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS), 气相色谱串联质谱法 (gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)。

表 3 不同碱性溶液浓度下 HMF 的提取效率 (n=3)
Table 3 Extraction efficiency of HMF in different alkaline solution concentrations (n=3)

样品名称及重量	加入水体积/mL	3%氨水加入体积/mL	样液中氨水浓度/%	样液 pH	HMF 峰面积	绝对提取率/%
1 g 蜂王浆	3.0	0	0	3.8±0.2	471±25	23.7±1.1
	1.5	1.5	1.5	7.7±0.2	1450±42	73.0±2.1
	0	3.0	3.0	9.6±0.3	1068±19	53.7±1.9
0.5 g 蜂王浆干粉	3.5	0	0	3.4±0.1	3080±118	19.1±0.8
	1.5	2.0	1.7	7.4±0.2	12004±319	74.4±2.3
	0	3.5	3.0	9.8±0.3	8158±237	50.6±1.6



注: A1 为样液加 4 mL 乙酸乙酯离心后的状态, A2 为样液加 8 mL 乙酸乙酯离心后的状态, B3 为样品加水溶解的状态, B4 为样品加氨水溶解的状态, C5 为样品加水溶解后, 加入乙酸乙酯提取的状态, C6 为样品加 1.5 mL 3%氨水溶解后, 加入乙酸乙酯提取的状态, D 为样液加 12 mL 乙酸乙酯离心后的状态。

图 1 溶剂对蜂王浆中 HMF 提取的影响

Fig.1 Effects of solvent on extraction of Hydroxymethylfurfural

2.2 溶剂对蜂王浆中 HMF 提取的影响

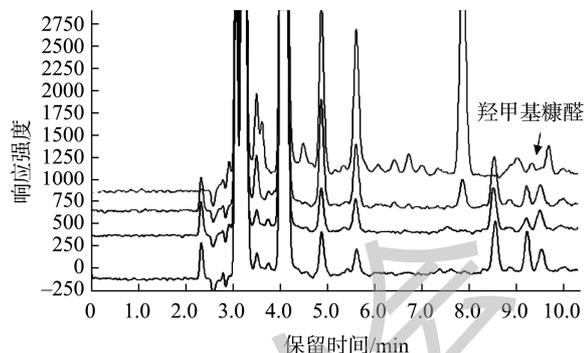
HMF 易溶于水、乙腈、丙酮、醇类、乙酸乙酯、二甲基甲酰胺、苯、乙醚、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和氯仿等溶剂^[28]。由于醇、乙腈、丙酮、二甲基甲酰胺、DMSO 可以溶解于水, 在提取时同时提取了蜂王浆中的糖类, 蒸干后残渣的量较多, 需要进一步净化, 故不宜选用^[29]。乙醚是易制毒化学品, 苯与氯仿具有一定的毒性, 故选择乙酸乙酯作为提取溶剂。

蜂王浆样品加水及氨水后, 总体积约 4.5 mL, 经过试验, 当乙酸乙酯的量为 4 mL 时, 样液容易发生乳化现象, 无法分层(见图 1 中 A1)。当乙酸乙酯的量为 8 mL 时, 样液不会发生乳化现象(见图 1 中 A2), 样品中 HMF 绝对提取率在 73.0%~74.4%。当乙酸乙酯的量为 12 mL 时, 样液不会发生乳化现象(见图 1D), 样品中 HMF 绝对提取率在 75.7%~76.2%。考虑到试剂用量、检测灵敏度, 8 mL 乙酸乙酯的用量即可满足要求。故选择乙酸乙酯的用量为 8 mL。

2.3 流动相的选择

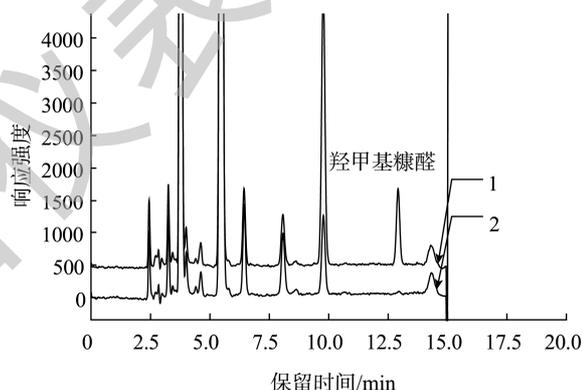
不同 pH 条件下, 乙酸乙酯提取蜂王浆中 HMF 色谱图, 见图 2。胡九菊等^[30]采用甲醇与磷酸水溶液作为流动相, 建立了蜂王浆中 HMF 含量的检测方法, 参考方法中的流动相条件, 选择了甲醇:0.4%磷酸=1:9, 8:92 和 6:94 (V:V) 为流动相, 进行色谱分离试验。如图 3 所示, 当甲醇+0.4%磷酸=10+90 时, HMF 色谱峰前有一个干扰峰, 当甲醇+0.4%磷酸=8+92 时, HMF 色谱峰后有一个干扰峰, 如图 2 所示, 虽然 2 种比例均可实现与干扰峰的完全分离, 但是杂质峰与 HMF 色谱峰靠得相对较近, 当样品中 HMF 含量较高时, 不能保证所有样品都能完全分离, 当甲醇+0.4%磷酸=6+94 时, HMF 色谱峰附近无杂质峰干扰, 但是 HMF 色谱峰的保留时间较长, 为保证检测效率, HMF 色谱峰保留时间后采用 100%甲醇洗柱 3 min, 再以甲醇+0.4%磷酸=6+94 稳定色谱柱 8 min, 总时长为 23 min。流动相洗脱条件见表 1, 经过流动相优化后的色谱图, 见图 3。结果表明, 当

甲醇+0.4%磷酸=6+94 作为流动相时, 采用 100%甲醇洗柱 3 min, 再以甲醇+0.4%磷酸=6+94 稳定色谱柱 8 min, HMF 色谱峰附近无干扰峰, 可满足检测需求。



注: 1. pH=3.8; 2. pH=7.7; 3. pH=9.6; 4. pH=7.7 蜂王浆添加 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ HMF。

图 2 不同 pH 条件下乙酸乙酯提取蜂王浆中 HMF 色谱图
Fig.2 Chromatogram of HMF at different pH



注: 1. 空白样品添加 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ HMF, 2. 空白样品。

图 3 流动相优化后的样品中 HMF 色谱图

Fig.3 Chromatogram of HMF after condition optimization

2.4 方法的线性范围、回收率、精密度和检出限

按 1.3 方法对空白基质样品和样品进行处理和测定, 以 HMF 峰面积(Y)对浓度(X, $\mu\text{g}/\text{kg}$)绘制工作曲线。HMF 在 20~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内线性良好, 回归方程为 $Y=51.31X+65.23$, 相关系数 $r^2=0.9983$, 满足定量分析要求。此方法的检出限和定量限分别为 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

在空白蜂王浆样品中分别添加 20、100、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 HMF 标准溶液, 按照 1.3 方法处理后做回收率实验, 每个添加水平重复测定 3 次。结果如表 4 所示, 添加回收率为 86.1%~100.8%, 相对标准偏差为 4.6%~8.0%。表明本研究方法的精密度、准确度良好, 符合 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范食品理化检测》关于检测方法确认的技术要求。

表 4 空白蜂王浆中 HMF 的加标回收率和精密度($n=3$)
Table 4 Standard recovery and precision of HMF in blank royal jelly ($n=3$)

	添加水平/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%	精密度/%
HMF	20	86.1	8.0
	100	95.3	5.3
	500	100.8	4.6

2.5 实际样品测定

按本研究建立的方法对 11 个蜂王浆样品进行测定,

表 5 蜂王浆和蜂王浆干粉样品测定结果
Table 5 Determination results of royal jelly and royal jelly dry powder samples

样品名称	贮存温度	贮存时间	外观	HMF/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
2017 年蜂王浆	4°C	5 年	红色, 无光泽, 流动性差	280±6.7
2018 年蜂王浆	4°C	4 年	红色, 无光泽, 流动性差	204±6.3
2019 年蜂王浆	4°C	3 年	黄色, 无光泽, 流动性尚可	91±3.4
2020 年蜂王浆	4°C	2 年	黄色, 无光泽, 流动性尚可	150±4.2
2021 年蜂王浆	4°C	10 个月	淡黄色, 有光泽, 流动性好	192±5.6
2021 年蜂王浆	-18°C	10 个月	淡黄色, 有光泽, 流动性好	33±1.3
2021 年蜂王浆	-18°C	8 个月	淡黄色, 有光泽, 流动性好	26±1.7
2022 年蜂王浆	-18°C	0 个月	淡黄色, 有光泽, 流动性好	<6
2022 年蜂王浆	-18°C	0 个月	淡黄色, 有光泽, 流动性好	12±0.9
蜂王浆冻干粉 2021	常温	未知	乳白色, 有光泽	898±19.0
蜂王浆冻干粉 2021	常温	未知	红色, 光泽度差	1865±36.0

3 结 论

本研究建立了操作简单、快速、准确、灵敏的蜂王浆和蜂王浆干粉中的 HMF 含量测定方法。以水和 3%氨水溶解稀释样品, 经乙酸乙酯提取 HMF, 采用高效液相色谱仪进行分析, 用外标法定量。方法检出限 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率在 86.1%~100.8%之间, 精密度在 4.6%~8.0%之间, 可以满足对蜂王浆和蜂王浆干粉新鲜度的判定要求。利用本研究对蜂王浆和蜂王浆干粉中的 HMF 含量进行进一步的研究, 积累更多实践数据, 将 HMF 指标列入产品质量标准, 对于提升我国蜂王浆产品质量, 以及蜂王浆产业的健康良性发展均具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] COLLAZO N, CARPENA M, NUNEZ-ESTEVEZ B, *et al.* Health promoting properties of bee royal jelly: Food of the queens [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 543.
- [2] 叶凯. 怎样鉴别蜂王浆掺假[J]. *蜜蜂杂志*, 1985, 2: 20.
YE K. How to identify royal jelly adulteration [J]. *J Bee*, 1985, (2): 20.
- [3] 张红城, 孙丽萍, 董捷, 等. 蜂王浆在常温储存条件下品质变化的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(11): 159-161.
ZHANG HC, SUN LP, DONG J, *et al.* Study on quality changes of royal jelly during storage at room temperature [J]. *Food Sci*, 2007, 28(11): 159-161.
- [4] 杨焱, 胡九菊, 李林霖, 等. 蜂王浆中超氧化物歧化酶的活性测定与应

结果见表 5。从表 5 可以看出, 蜂王浆和蜂王浆干粉中 HMF 含量在未检出至 1865 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 不等, 与储存条件有关。2022 年的新浆在 -18°C 保存时, HMF 含量在 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下, 2021 年的蜂王浆在 -18°C 保存条件下, HMF 含量在 33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下, 而在 4°C 保存条件下的蜂王浆, HMF 含量在 91~280 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。蜂王浆中 HMF 的含量与贮存的温度与时间具有一定的相关性, 这与文献报道的一致^[14,21], 进一步表明高效液相色谱法适用于蜂王浆中成分检测^[31]。由于样本量有限, 后续将会进一步对不同贮存或者加工温度条件下蜂王浆及其制品中 HMF 含量的变化情况进行研究。

用[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(1): 180-185.

- YANG Y, HU JJ, LI LL, *et al.* Determination of superoxide dismutase activity and its application in royal jelly [J]. *Food Res Dev*, 2022, 43(1): 180-185.
- [5] SAGONA S, COPPOLA F, GIANNACCINI G, *et al.* Impact of different storage temperature on the enzymatic activity of *apis mellifera* royal jelly [J]. *Foods*, 2022, 11(20): 1.
- [6] 吴亚君, 刘鸣畅, 刘方圆, 等. 采用毛细管凝胶电泳技术检测蜂王浆新鲜度[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(4): 161-166.
WU YJ, LIU MC, LIU FY, *et al.* The detection of royal jelly freshness by capillary gel electrophoresis [J]. *Food Ferment Ind*, 2013, 39(4): 161-166.
- [7] 李建科, 冯毛, 张兰, 等. 蜂王浆中蜂王浆蛋白随储存条件变化的蛋白质组研究[C]. 2000-2018 中国蜂业科技前沿中国养蜂学会专题资料汇编, 2019.
LI JK, FENG M, ZHANG L, *et al.* Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions [C]. 2000-2018 China Apiculture Science and Technology Frontier Chinese Apiculture Society Special Data Collection, 2019.
- [8] NA L, SI C, HONG Z, *et al.* Quantification of major royal jelly protein 1 in fresh royal jelly by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(5): 1270-1278.
- [9] 肖立涵. 蜂王浆储藏过程中的成分变化及食品组学分析[D]. 佛山: 佛山科学技术学院, 2022.
XIAO LH. Composition change and food omics analysis of royal jelly during storage [D]. Foshan: Foshan University, 2022.
- [10] 郭城, 吴卫成, 谌迪, 等. 基于 ATR-FTIR 结合 CARS 算法测定蜂王浆中水溶性蛋白质和总糖含量[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(11): 183-190.
GUO C, WU WC, CHEN D, *et al.* Determination of water-soluble protein and total sugar in royal jelly based on attenuated total reflection mid-infrared spectroscopy and CARS algorithm [J]. *J Chin Inst Food Sci*

- Technol, 2021, 21(11): 183–190.
- [11] 孙小军, 杨晓慧, 李桂明, 等. 蜂王浆贮藏过程中品质变化研究[J]. 山东农业科学, 2015, 47(5): 102–104.
SUN XJ, YANG XH, LI GM, *et al.* Study on quality change of royal jelly during storage [J]. Shandong Agric Sci, 2015, 47(5): 102–104.
- [12] 周才琼, 罗雪雅. 蜂王浆新鲜度指标筛选及新鲜度的评判[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(3): 129–133.
ZHOU CQ, LUO XY. Study on freshness index of royal jelly [J]. Food Ferment Ind, 2010, 36(3): 129–133.
- [13] 刘娟, 高铁俊, 董捷, 等. 蜂王浆室温储存过程中的褐变产物[J]. 食品科学, 2012, 33(6): 238–241.
LIU J, GAO TJ, DONG J, *et al.* Browning products of royal jelly during storage at room temperature browning products of royal jelly during storage at room temperature [J]. Food Sci, 2012, 33(6): 238–241.
- [14] 魏月, 陈芳, 薛晓锋, 等. 蜂王浆贮存过程中糠醛类物质含量的变化[J]. 中国食品学报, 2016, 16(10): 222–227.
WEI Y, CHEN F, XUE XF, *et al.* The change of furfural compounds contents of royal jelly during storage [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2016, 16(10): 222–227.
- [15] 王露露, 董蕊, 范超, 等. 蜂王浆在贮藏过程中 5-羟甲基糠醛、10-羟基-2-癸烯酸及精氨酸双糖苷含量的变化[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 271–275.
WANG LL, DONG R, FAN C, *et al.* Changes in the contents of 5-HMF, 10-HDA and AFG in royal jelly during storage [J]. Food Sci, 2016, 37(2): 271–275.
- [16] 彭瑜, 陈坤, 徐锦忠, 等. 蜂王浆中糠氨酸含量测定及其对新鲜度的影响[J]. 中国蜂业, 2010, 61(1): 5–7.
PENG Y, CHEN K, XU JZ, *et al.* Determination of furosine content in royal jelly and its influence on the freshness of royal jelly [J]. Apicult China, 2010, 61(1): 5–7.
- [17] 吴黎明, 周群, 赵静, 等. FTIR 光谱法整体评价蜂王浆新鲜度的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(12): 3236–3240.
WU LM, ZHOU Q, ZHAO J, *et al.* Research on overall assessment of royal jelly freshness by FTIR spectroscopy [J]. Spect Spectral Anal, 2009, 29(12): 3236–3240.
- [18] DI C, CHENG G, WENJING L, *et al.* Rapid quantification of royal jelly quality by mid-infrared spectroscopy coupled with backpropagation neural network [J]. Food Chem, 2023, 418, 135996–135996.
- [19] CHEN L, NING F, ZHAO L, *et al.* Quality assessment of royal jelly based on physicochemical properties and flavor profiles using HS-SPME-GC/MS combined with electronic nose and electronic tongue analyses [J]. Food Chem, 2023, 403: 134392.
- [20] 魏琳, 李婧妍, 于心雨, 等. 蜂王浆新鲜度评价指标及其检测方法研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 1–13. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037684>
WEI L, LI JY, YU XY, *et al.* Recent advance in evaluation indicators and detection methods of freshness of royal jelly [J]. Food Ferment Ind, 2023, 1–13. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037684>
- [21] 高夫超, 崔长日, 魏月, 等. 高效液相色谱法测定蜂王浆中 6 种糠醛类物质含量[J]. 食品安全质量学报, 2014, 5(11): 3603–3608.
GAO FC, CUI CR, WEI Y, *et al.* Determination of 6 furfural compounds contents in royal jelly by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(11): 3603–3608.
- [22] 杨昆, 邓佳宁, 徐艺溶, 等. 高效液相色谱法对蜂蜜产品中糠醛类物质的测定及应用[J]. 中国口岸科学技术, 2024, 6(1): 86–91.
YANG K, DENG JN, XU YR, *et al.* Determination and application of furfural substances in honeyproducts by high performance liquid chromatography [J]. China Port Sci Technol, 2024, 6(1): 86–91.
- [23] 陈磊, 黄雪松. 高效液相色谱法同时检测黄酒中的 5-羟甲基糠醛和 9 种多酚[J]. 分析化学研究简报, 2010, 38(1): 133–137.
CHEN L, HUANG XS. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and nine kinds of phenolic compounds in rice wine using high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2010, 38(1): 133–137.
- [24] 邢倩倩. 高效液相色谱法测定干酪和炼乳中糠醛类化合物含量[J]. 乳业科学与技术, 2021, 44(1): 28–32.
XING QQ. Determination of furfural compounds in cheese and condensed milk by high performance liquid chromatography [J]. J Dairy Sci Technol, 2021, 44(1): 28–32.
- [25] 卢素格, 翟志雷, 张利锋, 等. 咖啡及其制品中糠醛类污染物含量测定及其含量水平初步调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(9): 1323–1327.
LU SG, ZHAI ZL, ZHANG LF *et al.* Determination and preliminary investigation of furfural compounds in coffee and its products [J]. Chin J Food Hyg, 2023, 35(9): 1323–1327.
- [26] 王宏贤, 史可, 王春燕, 等. 白术清炒过程中颜色变化与 5-羟甲基糠醛的相关性分析及拐点研究[J]. 中医药信息, 2024, (2): 9–15.
WANG HX, SHI K, WANG CY, *et al.* Correlation analysis between color change and 5-HMF and study on processing inflection point in the plain stir-frying process of white atractylodes [J]. Inf Tradit Chin Med, 2024, (2): 9–15.
- [27] 张慧敏, 何晓勇, 刘平稳, 等. 紫葡萄皮中花青素提取工艺研究[J]. 粮食与食品工业, 2023, 30(6): 6–10.
ZHANG HM, HE XY, LIU PW *et al.* Study on extraction technology of anthocyanins from purple grape skin [J]. Cere Food Ind, 2023, 30(6): 6–10.
- [28] 朱浩翔. 丙酮/水溶剂中己糖制 5-羟甲基糠醛研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2023.
ZHU HX. 5-Hydroxymethylfurfural preparation from hexose in acetone/water solvent [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2023.
- [29] 周萍, 李珊珊, 李樱红, 等. 固液分散萃取-高效液相色谱法测定蜂蜜中甘油残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9115–9123.
ZHOU P, LI SS, LI YH, *et al.* Determination of glycerin residue in honey by high performance liquid chromatography with dispersive solid-liquid-phase extraction method [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(24): 9115–9123.
- [30] 胡九菊, 王彦宁, 李婷, 等. 5-羟甲基糠醛的测定及其在蜂王浆贮存过程中的含量变化[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(9): 77–84.
HU JJ, WANG YN, LI T, *et al.* Determination of 5-hydroxymethylfurfural and its changes in royal jelly during storage [J]. Food Res Dev, 2023, 44(9): 77–84.
- [31] 黄华, 郭浩伟, 王健, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定蜂王浆中 15 种高风险农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(17): 5702–5708.
HUANG H, GUO HW, WANG J, *et al.* Simultaneous determination of 15 kinds of high risk pesticide residues in royal jelly by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(17): 5702–5708.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)

作者简介



周萍, 高级工程师, 主要研究方向为蜂产品检测与研发。

E-mail: tdbjhn@126.com



胡福良, 博士, 教授, 主要研究方向为蜜蜂、蜂产品及功能性食品科学。

E-mail: flhu@zju.edu.cn