

# 黄酮类成分在蜂蜜抗菌性中的效能研究

王笑笑<sup>1</sup>, 周勇<sup>1</sup>, 徐国群<sup>2</sup>, 徐玲笑<sup>1</sup>, 顾一飞<sup>3</sup>, 徐都之<sup>3</sup>, 刘诗诗<sup>4</sup>, 王也<sup>1\*</sup> (1.衢州市食品药品检验研究院, 浙江 衢州 324002; 2.衢州出入境检验检疫局, 浙江 衢州 324002; 3.衢州学院, 浙江 衢州 324002; 4.浙江千红蜂产品有限公司, 浙江 江山 324100)

**摘要:** 目的 为了解蜂蜜的抗菌性与其黄酮类成分含量的相关性。方法 采用 UV 测定蜂蜜中的总黄酮含量; 采用 UPLC-MS/MS, 以 12 种黄酮类成分为对照品对蜂蜜中的黄酮类成分及其含量进行测定; 以平皿法检测蜂蜜和 81%糖溶液在不同质量分数下的抗菌性能。结果 7 个市售蜂蜜均含有黄酮类物质, 但因蜜源植物不同, 总黄酮含量差异显著, 其中以枣花蜜(千红)含量最高(87.138  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 玫瑰花蜜(青海)含量最低(28.649  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 12 种黄酮类成分在各蜂蜜中的含量各不相同, 其中以白杨素在总黄酮中含量占比最高, 最高占比达 85.1%, 其次为生松素、山奈酚和芹菜素; 供试蜂蜜和 81%糖溶液均表现出一定的抗菌性, 但抗菌效果因蜂蜜品种而异, 其中总黄酮含量越高的蜂蜜, 其抗菌性表现也较好, 81%糖溶液的高渗性对黑曲霉和白色念珠菌不起作用。结论 黄酮类组分含量与蜂蜜的抗菌性呈一定程度的正相关, 蜂蜜的抗菌性能可用于进一步鉴别蜂蜜的真假。

**关键词:** 蜂蜜; 黄酮类成分; UPLC-MS/MS; 最低抑菌浓度; 最低杀菌浓度; 金黄色葡萄球菌; 黑曲霉; 白色念珠菌  
中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)03-0363-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.03.013

## Study on the Efficacy of Flavonoids in the Antibacterial Properties of Honey

WANG Xiaoxiao<sup>1</sup>, ZHOU Yong<sup>1</sup>, XU Guoqun<sup>2</sup>, XU Lingxiao<sup>1</sup>, GU Yifei<sup>3</sup>, XU Duzhi<sup>3</sup>, LIU Sisi<sup>4</sup>, WANG Ye<sup>1\*</sup> (1. *Quzhou Institute for Food and Drug Control, Quzhou 324002, China*; 2. *Quzhou Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Quzhou 324002, China*; 3. *Quzhou University, Quzhou 324002, China*; 4. *Zhejiang Benny Bee Products Co., Ltd., Jiangshan 324100, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To understand the relationship between the antibacterial activity of honey and the content of flavonoids. **METHODS** UV method was used to determine the content of total flavonoids in honey, and UPLC-MS/MS method was used to determine the content of flavonoids by 12 kinds of flavonoids as control. The antibacterial properties of honey in different mass fractions was detected by using the method of plate method. **RESULTS** Seven commercial honey contain flavonoids, but due to the different nectar plants, there was significant difference in the content of total flavonoids, of which the date honey(Qianhong) content was the highest(87.138  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), rose honey(Qinghai) was the lowest(28.649  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). The contents of 12 kinds of flavonoids in different honey were different. The proportion of chrysin in total flavonoids content was the highest(85.1%), followed by pinocembrin kaempferol and apigenin. All the samples showed a certain antibacterial activity, but the antibacterial effect was different with the varieties of honey, and the higher total flavonoids content, the better antibacterial activity. **CONCLUSION** The content of flavonoids and the antibacterial activity of honey are positively related to some degree, antibacterial properties of honey can be used for further identification of genuine and supposititious honey.

**KEY WORDS:** honey; flavonoids; UPLC-MS/MS; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration; *Staphylococcus aureus*; *Aspergillus niger*; *Candida albicans*

蜂蜜为蜜蜂科昆虫中华蜜蜂(*Apis cerana febricius*)或意大利蜂(*Apis mellifera* Linnaens)采集植物花蜜或分泌物, 经过充分酿造而贮藏在巢脾内的甜物质, 其成分组成为总糖量>75%, 水分16%~25%, 蛋白质含量0.16%, 此外还含有少量的挥发油、有机酸、花粉及多种酶类和微量元素<sup>[1]</sup>。《本草纲目》<sup>[2]</sup>记载, 蜂蜜甘、平、无毒; 主治心腹邪气, 惊风癲病, 安五脏诸不足, 可益气补中, 止痛解毒; 养脾气, 除心烦, 助消化, 止痢疾, 肌

中疼痛, 口疮, 明耳目; 治疗牙龈炎, 唇口疮, 目肤赤障, 杀虫等。目前, 国内外学者对蜂蜜的研究主要集中在蜂蜜中掺假物质的鉴定技术研究<sup>[3-4]</sup>、蜂蜜品种鉴别技术的研究(包括挥发性成分和蜜源次生代谢产物)<sup>[5-8]</sup>、抗菌机制和药理应用的研究<sup>[9-11]</sup>、抗氧化性研究<sup>[1,12]</sup>、抗菌药物残留研究<sup>[13-16]</sup>以及生物碱<sup>[17]</sup>、5-羟甲基糠醛含量检测<sup>[18]</sup>等。但是目前国内对蜂蜜的抗菌性和黄酮类成分之间关联性的研究少之又少, 本实验旨在研究不同蜜源蜂蜜

基金项目: 浙江省食品药品监管系统科技计划项目(2014018); 浙江省衢州市重点实验室项目(衢市科发高[2015]8号)

作者简介: 王笑笑, 女, 副主任药师 Tel: (0570)8358032 E-mail: 123143807@qq.com \*通信作者: 王也, 女, 副主任药师 Tel: (0570)8358002 E-mail: 25671760@qq.com

中黄酮类化合物组分、含量与抗菌性间的关联性,同时考察不同蜜源蜂蜜中黄酮类成分的组成情况,为蜂蜜的蜜源鉴别研究提供一定的参考。

## 1 材料

### 1.1 样品的采集

蜂蜜样品分别从浙江千红蜂产业有限公司、浙江江山恒亮蜂产品有限公司、青海蜂蜜农村经济合作社以及董家蜂蜜蜂农等处分批购入,再经浙江千红蜂产业有限公司高级食品检验工刘思思鉴定确定:1号千红洋槐蜜、2号千红枣花蜜、3号恒亮洋槐蜜、4号金华蜂农柑橘蜜、5号兰溪董家洋槐蜜;而6号青海玫瑰花蜜和7号青海枇杷蜜为假蜂蜜。

### 1.2 化学试剂、对照品、培养基和菌种

亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝、甲醇、乙醇、盐酸、甲酸、乙醚等,除甲醇为色谱纯外,其余均为分析纯。

木犀草素(批号:111520-200504,纯度:100%)、芹菜素(批号:111901-201102,纯度:99.6%)、汉黄芩素(批号:1514-200202,供鉴别用)、染料木素(批号:111704-201302,纯度:99.1%)、高良姜素(批号:111699-200501,纯度:100%)、槲皮素(批号:100081-201509,纯度:98.6%,供标准曲线制备用)等均购自中国药品生物制品检定研究院;槲皮素(批号:00017030-566,纯度:95.0%,供UPLC-MS/MS用)、生松素(批号:00016840-158,仅供定性用)、杨梅酮(批号:00013921-524,纯度:95.3%)、桑黄素(批号:00013896-415,纯度:91.0%)、柚皮素(批号:00014205-603,纯度:98.7%)、山奈酚(批号:00011021-901,纯度:97.7%)、白杨素(批号:00003620-001,仅供定性用)等均购自ChromaDex。

胆盐乳糖培养基(批号:20140919-00)、甘露醇氯化钠培养基(批号:20140513-00)购自杭州微生物试剂有限公司;营养肉汤培养基(批号:20150127)、改良马丁琼脂培养基(批号:20131106)和麦康凯琼脂培养基(批号:1311072)均购自北京三药科技开发公司;改良马丁培养基(批号:20131011)、假单胞菌琼脂基础培养基(批号:20150317)购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

大肠埃希菌[*Escherichia coli*, CMCC(B)44 102];金黄色葡萄球菌[*Staphylococcus aureus*, CMCC(B)26 003];铜绿假单胞菌[*Pseudomonas*

*aeruginosa*, CMCC(B)10 104];白色念珠菌[*Candida albicans*, CMCC(F)98 001];黑曲霉[*Aspergillus niger*, CMCC(F)98 003];乙型副伤寒沙门菌[*Salmonella paratyphi B*, CMCC(B)50 094]。

### 1.3 器材

LC-MS-8040型超高效液相色谱-串联质谱联用仪[日本岛津, Inertsil ODS-3 (75 mm×2.1 mm, 2 μm)色谱柱; UV 2450型紫外分光光度计]; XS 205型电子天平(瑞士Mettler); TD 6001 B型电子天平(余姚市金诺天平仪器有限公司); USC 302超声波清洗器(上海波龙电子设备有限公司); IKA RV 10型旋转蒸发器(德国IKA); HH-6数显恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司); MIR-262-PC型松下恒温恒湿箱(松下健康医疗器械株式会社); MLS-3781L-PC型松下高压蒸气灭菌器(松下健康医疗器械株式会社); Hfsafe-900型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司); LBS-DT 50型智能电子特种储存柜(深圳市诺为气流控制有限公司)等。

## 2 方法

### 2.1 蜂蜜总黄酮含量测定

**2.1.1 蜂蜜总黄酮含量测定** 精密吸取3 mL浓度为85.7%的蜂蜜溶液(取蜂蜜30 g,加水5 mL混合均匀制得)置于25 mL量瓶中,精密称重;再精密加入甲醇6 mL,混匀,分别依次加入5% NaNO<sub>2</sub>溶液0.6 mL, 10%Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液0.6 mL和4% NaOH溶液4 mL,混匀;最后用蒸馏水定容,室温下静置15 min,随后于402 nm处测定吸光度值。

**2.1.2 标准曲线配制** 精密称取槲皮素对照品22.53 mg,置100 mL量瓶中,加甲醇制成0.222 2 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液,分别精密吸取0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5和3.0 mL对照品溶液于25 mL量瓶中,加甲醇至6.0 mL,按“2.1.1”项下方法制定标准曲线:  $y=0.023x-0.008$ ,  $r^2=0.999$ ,式中:  $x$ 表示溶液中槲皮素含量(μg·mL<sup>-1</sup>),  $y$ 表示吸光度值。

**2.1.3 重复性试验** 精密吸取3 mL浓度为85.7%的枇杷蜜(青海),置于25 mL量瓶中,精密称重;按“2.1.1”项下方法制备6份,测定吸光度( $A$ ),计算总黄酮含量平均值为38.50 μg·g<sup>-1</sup>, RSD为1.7%。

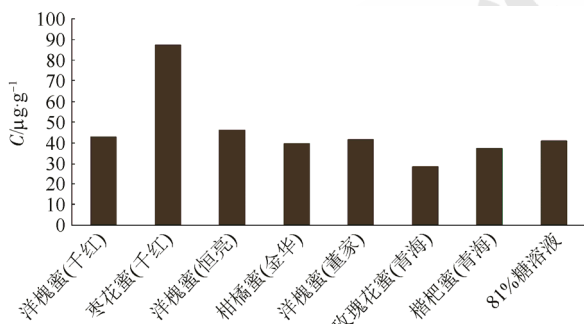
**2.1.4 稳定性** 取浓度为0.222 2 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液,按“2.1.1”项下方法处理后,每隔1~5 min测定1次  $A$ 值,根据  $A$ 值计算其稳定性。结果显示13 min前  $A$ 值变化大,13 min后较为稳定,每

隔 1 min *A* 值相差 0.003 左右。

**2.1.5 回收率试验** 精密吸取 3 mL 浓度为 85.7% 的枇杷蜜(青海), 置于 25 mL 量瓶中, 精密称定, 再精密加入对照品溶液 2 mL, 甲醇溶液 4 mL, 按“2.1.1”项下方法制备 6 份, 测定 *A* 值, 计算回收率, 平均回收率为 84.43%, RSD 为 2.24%。

**2.1.6 基质效应** 精密吸取 3 mL 浓度为 85.75% 的枇杷蜜(青海)6 份, 置于 25 mL 量瓶中, 精密称定, 再分别精密加入 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 和 6.0 mL 对照品溶液, 加甲醇至 6.0 mL, 按“2.1.1”制定标准曲线:  $y=0.014x+0.121$ ,  $r^2=0.990$ , 式中: *x* 表示溶液中槲皮素含量( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), *y* 表示吸光度值。基质效应为:  $0.014/0.023\times 100\%=60.9\%$ , 截距与枇杷蜜的检测结果接近。

**2.1.7 81%糖溶液和样品的测定** 按“2.1.1”项下方法, 测定不同蜜源蜂蜜和 81%糖溶液[取一烧杯称重  $W_1$ , 加入蔗糖  $M$ , 再加入一定量的水并放电炉上小火加热使融化, 放冷称重  $W_2$ , 糖浓度 $\% = M/(W_2 - W_1) \times 100\%$ ]的吸光度值, 再根据标准曲线计算出供试蜂蜜和 81%糖溶液中总黄酮含量( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 结果见图 1。



**图 1** 不同蜜源蜂蜜和 81%糖溶液的总黄酮含量  
**Fig. 1** The content of total flavonoids in different honey and 81% sugar solution

## 2.2 UPLC-MS/MS 测蜂蜜中黄酮类组分

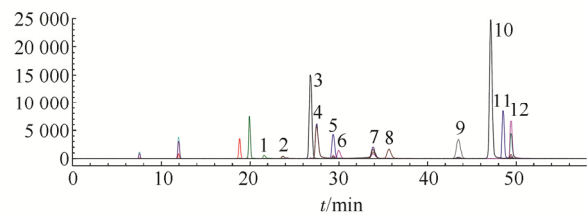
UPLC-MS/MS 测蜂蜜中黄酮类组分所用的方法, 包括色谱及质谱条件、混合对照品的配制、样品的制备、方法学的考察等均参照王笑笑等<sup>[19]</sup>的研究报道。

**2.2.1 色谱及质谱条件** 色谱柱: Inertsil ODS-3 (2.1 mm $\times$ 75 mm, 2  $\mu\text{m}$ ); 流动相为甲醇(A 相)和 0.1%甲酸水溶液(B 相)梯度洗脱, 其时间程序为 0 min $\rightarrow$ 5 min $\rightarrow$ 10 min $\rightarrow$ 15 min $\rightarrow$ 30 min $\rightarrow$ 40 min $\rightarrow$ 45 min $\rightarrow$ 50 min $\rightarrow$ 55 min $\rightarrow$ 56 min $\rightarrow$ 58 min, 甲醇: 2% $\rightarrow$ 15% $\rightarrow$ 17% $\rightarrow$ 32% $\rightarrow$ 42% $\rightarrow$ 42% $\rightarrow$ 50% $\rightarrow$ 65% $\rightarrow$

70% $\rightarrow$ 2% $\rightarrow$ stop, 流速: 0.4 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ; 柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 2  $\mu\text{L}$ 。

采用电喷雾离子源(ESI)多反应监测(MRM), 离子源参数设置如下: 雾化气流量: 3 L $\cdot$ min $^{-1}$ , 脱溶剂管稳定: 250  $^{\circ}\text{C}$ , 加热模块温度: 400  $^{\circ}\text{C}$ , 载气流量: 15 L $\cdot$ min $^{-1}$ 。

**2.2.2 混合对照品的配制** 分别精密称取桑黄素和山奈酚对照品适量置同一 100 mL 量瓶中; 其余 10 种对照品分别以甲醇为溶剂配制成一定浓度的对照品溶液, 再精密量取适量置上述 100 mL 量瓶中, 甲醇溶解, 摇匀, 制成含桑黄素 40.2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 杨梅酮 9.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 柚皮素 0.69  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 槲皮素 4.495  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 染料木素 4.055  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 木犀草素 3.665  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 山奈酚 163.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 芹菜素 1.072  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 生松素 1.180  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 汉黄芩素 0.353  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 白杨素 2.925  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 高良姜素 11.12  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液, 即得。混合对照品的总离子流(TIC)色谱图见图 2。



**图 2** 12 种黄酮类化合物的总离子流图

**Fig. 2** The total ion chromatography of 12 flavonoids

1-杨梅酮; 2-桑黄素; 3-柚皮素; 4-槲皮素; 5-染料木素; 6-木犀草素; 7-山奈酚; 8-芹菜素; 9-生松素; 10-汉黄芩素; 11-白杨素; 12-高良姜素。

1-myricetin; 2-morin; 3-naringenin; 4-quercetin; 5-genistein; 6-luteolin; 7-kaempferol; 8-apigenin; 9-pinocembrin; 10-wogonin; 11-chrysin; 12-galangin.

**2.2.3 样品处理** 取上述蜂蜜各 100 g, 加入 500 mL pH 值为 2.0 的盐酸溶液, 搅拌溶解后用盐酸溶液调节 pH 值至 2.0, 再加入已处理好的 D101 型大孔吸附树脂(粒度范围 0.3~1.2 mm)150 g, 搅拌 10 min, 装柱, 用酸水(盐酸调节 pH 至 2.0 的水溶液)250 mL 和蒸馏水 300 mL 先后冲洗柱子除去糖及其他组分, 再用甲醇 400 mL 以每秒 1~2 滴的流速解吸附, 收集甲醇洗脱液, 40  $^{\circ}\text{C}$  低温旋转蒸干; 最后用蒸馏水 10 mL 溶解, 水溶液用乙醚(10, 10, 10 mL)提取纯化 3 次, 合并乙醚液, 水浴蒸干, 甲醇溶解至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 用微孔滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ )滤过, 取续滤液作为供试品溶液。按“2.2.1”项下方法进样分析。具体分析结果见表 1。

表 1 不同蜜源蜂蜜中黄酮类成分的含量

Tab. 1 Content of flavonoids in different honey

$\mu\text{g}\cdot(100\text{ g})^{-1}$

化合物	含量						
	洋槐蜜(千红)	枣花蜜(千红)	洋槐蜜(恒亮)	柑橘蜜(金华)	洋槐蜜(董家)	玫瑰花蜜(青海)	枇杷蜜(青海)
桑黄素	-	-	-	-	-	-	-
杨酶酮	-	-	-	7.30	-	-	-
柚皮素	1.028	-	0.632	10.40	2.036	1.165	1.402
槲皮素	-	-	22.906	56.78	-	12.456	16.050
染料木素	1.274	-	-	-	-	-	-
木犀草素	11.352	-	2.488	1.72	1.241	-	-
山奈酚	2.331	-	6.994	58.46	10.896	-	-
芹菜素	0.408	-	0.650	1.00	0.707	-	-
生松素	5.488	-	10.056	40.04	8.428	-	-
汉黄芩素	-	-	-	0.04	0.170	1.372	2.405
白杨素	37.025	-	249.806	14.94	70.357	-	0.077
高良姜素	-	-	-	7.84	4.832	9.525	15.457
总和	58.906	-	293.532	198.52	98.668	28.818	35.391

注：“-”表示未检出。

Note:“-” Not detected.

### 2.3 蜂蜜的抗菌性试验

**2.3.1 制备菌悬液** 将大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、乙型副伤寒沙门菌接种至已灭菌(121 °C, 20 min)10 mL 装的营养肉汤培养基, 35 °C 培养 18~24 h; 将白色念珠菌、黑曲霉菌分别接种至已灭菌 10 mL 装的改良马丁培养基中, 25 °C 培养 72 h, 最后再分别稀释至  $10^8\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**2.3.2 配制培养基** 以胆盐乳糖培养基、甘露醇氯化钠培养基、营养肉汤培养基、改良马丁琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基、改良马丁培养基和假单胞菌琼脂基础培养基作为基础培养基, 分别称量胆盐乳糖培养基 2.8 g、营养肉汤培养基 1.8 g、改良马丁培养基 2.85 g、甘露醇氯化钠琼脂培养基 11 g、麦康凯琼脂培养基 5.3 g、改良马丁琼脂培养基 4.2 g, 分别加水定容至 100 mL, 于 121 °C 下高压灭菌 20 min, 待用; 称量假单胞菌琼脂基础培养基 50.6 g, 加入 1 mL 甘油, 加水定容至 1 L, 于 121 °C 下高压灭菌 20 min, 待用。

**2.3.3 抗菌性试验(药敏试验)** 以 1~7 号蜂蜜的 85.7% 蜂蜜水溶液和 81% 糖溶液作为原液 1, 同时设置阴性对照(不添加菌液)和阳性对照(培养基加阳性菌); 再将原液 1 以对应培养液作为稀释液按照二倍稀释法稀释 2 倍、4 倍、8 倍和 16 倍, 分别编号为 1:2, 1:4, 1:8, 1:16。

将上述 6 种供试菌编组, 分别为大肠埃希菌(A 组)、铜绿假单胞菌(B 组)、金黄色葡萄球菌(C 组)、

乙型副伤寒沙门菌(D 组)、白色念珠菌(E 组)和黑曲霉(F 组), 每组再根据供试蜂蜜种类分为若干小组。

**最低抑菌浓度(MIC)试验:** 取已灭菌试管, 根据供试菌种类不同, 向每个小组的 6 支试管内加入 1 mL 不同培养基, 具体如下: A 组和 B 组加胆盐乳糖培养基、C 组和 D 组加营养肉汤培养基、E 组和 F 组加入改良马丁培养基。分别取 7 种蜂蜜的原液 1 和 81% 糖溶液各 1 mL 加入到各小组的试管 1 中, 按二倍稀释法分别稀释 2 倍、4 倍、8 倍和 16 倍, 混合均匀后, 对应加入 0.1 mL 菌悬液, 分别置 35 °C(A、B、C、D 组)或 25 °C(E、F 组)恒温恒湿箱中培养 18~24 h 或 2~3 d, 观察结果。液体浑浊表明有菌生长, 液体澄明且摇匀后仍澄明者, 无菌生长。无菌生长的蜂蜜最低浓度称为最低抑菌浓度(MIC)。

**最低杀菌浓度(MBC)试验:** 在上述试验基础上, 选用未见细菌生长的培养试管, 吸取 0.1 mL 培养液涂布于固体培养基上, 其中 A 组和 D 组涂布于麦康凯琼脂培养基、B 组涂布于假单胞菌琼脂基础培养基、C 组涂布于甘露醇氯化钠琼脂培养基、E 组和 F 组涂布于改良马丁琼脂培养基, 分别置于 35 °C(A、B、C、D 组)恒温恒湿箱中培养 18~24 h 或 25 °C(E、F 组)恒温恒湿箱中培养 2~3 d 后观察结果。平板上的菌落数 < 5 个的最小稀释度的药物浓度为最低杀菌浓度(MBC)。记录不同蜂蜜对不同菌落的抗菌效果, 结果见表 2。

表 2 不同蜂蜜的抗菌性能

Tab.2 Antibacterial properties of different honey

菌株	稀释倍数	洋槐蜜(千红)		枣花蜜(千红)		洋槐蜜(恒亮)		柑橘蜜(金华)		洋槐蜜(董家)		玫瑰花蜜(青海)		枇杷蜜(青海)		81%糖水溶液	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
大肠埃希菌	1:2	-	-*	-	-*	-	-*	-	+	-	+	+	/	-	+	-	+
	1:4	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	1:8	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	1:16	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	/	/
	阳性	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	阴性	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
金黄色葡萄球菌	1:2	-	-*	-	-*	-	+	-	+	-	-*	-	+	+	+	-	+
	1:4	-	-*	-	+	+	/	+	/	-	+	+	/	+	/	+	/
	1:8	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	1:16	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	/	/
	阳性	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	阴性	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
沙门菌	1:2	-	-*	-	-*	-	-*	-	-*	-	-*	-	+	-	-*	-	+
	1:4	-	+	-	+	-	+	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	1:8	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	1:16	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	/	/
	阳性	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	阴性	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
铜绿假单胞菌	1:2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	1:4	+	/	+	/	+	/	-	+	+	/	+	/	+	/	+	/
	1:8	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	1:16	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	/	/
	阳性	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	阴性	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
黑曲霉	1:2	-	-*	-	-*	-	-*	-	-*	-	-*	+	/	+	/	+	/
	1:4	+	/	+	/	-	+	+	/	-	-*	+	/	+	/	+	/
	1:8	+	/	+	/	+	/	+	/	-	-*	+	/	+	/	+	/
	1:16	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	/	/
	阳性	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	阴性	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
白色念珠菌	1:2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	/
	1:4	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	1:8	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	1:16	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	/	/
	阳性	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/
	阴性	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/

注: +—有菌生长; --无菌生长; +\*—菌落数≥5; -\*—菌落数<5; /—未做细菌计数。

Note: +—bacterial growth; --no bacterial growth; +\*—colony number≥5; -\*—colony number<5; /—not done.

## 2.4 不同稀释剂、不同稀释倍数下蜂蜜的 pH 值测定

取原液 1, 按二倍稀释法, 以营养肉汤、胆盐乳糖培养基和改良马丁培养基作为稀释液, 分别测其 pH 值。

## 3 结果

### 3.1 不同蜜源蜂蜜中总黄酮含量测定结果

由图 1 可知, 不同蜜源蜂蜜中总黄酮含量有一定的差异: 其中枣花蜜含量最高, 达到 87.138  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 玫瑰花蜜含量最低 28.649  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ; 同一蜜源植物的 3 批洋槐蜜含量分别为洋槐蜜(千红)43.06  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、洋槐蜜(恒亮)46.51  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  和洋槐蜜(董家)41.98  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 三者间差异不显著。有研究指出, 蜂蜜中的黄酮类化合物主要来自蜜源植物的花蜜、花粉, 含量与蜜源植物种类密切相关<sup>[12]</sup>, 这

在本试验中也得到印证。

### 3.2 蜂蜜中黄酮类成分及含量

由表 1 可知, 12 种黄酮类成分在各蜂蜜中的含量各不相同, 其中以白杨素在总黄酮中含量占比最高, 最高占比达 85.1%, 其次为槲皮素、生松素、山奈酚、高良姜素、木犀草素、柚皮素和芹菜素等。12 种黄酮类成分总量>0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  的样品有 4 个, 分别是洋槐蜜(千红)、洋槐蜜(董家)、柑橘蜜(金华)和洋槐蜜(恒亮), 总含量<0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  的样品有 3 个, 分别是枣花蜜(千红)、玫瑰花蜜(青海)和枇杷蜜(青海), 其中枣花蜜(千红)总黄酮含量最高, 却未检出此 12 种黄酮类成分; 总量最高的是洋槐蜜(恒亮)193.532  $\mu\text{g}\cdot(100\text{g})^{-1}$ , 而总量最少的是玫瑰花蜜(青海)只有 28.818  $\mu\text{g}\cdot(100\text{g})^{-1}$ , 是前者

的 14.9%。

### 3.3 蜂蜜的抗菌性试验结果

由表 2 可知, ①40.5%糖溶液对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和沙门菌具有一定的抑菌作用, 对黑曲霉和白色念珠菌没有抑菌作用, 且随着进一步的稀释, 糖溶液对以上 4 种菌株也失去了抑菌作用; ②不同蜜源蜂蜜对不同菌株的抗菌性表现为: 在稀释 2 倍的情况下绝大部分蜂蜜都有抑菌效果或杀菌效果, 稀释 4 倍的情况下只有少量的蜂蜜具有抑菌效果, 比如洋槐蜜(千红)和枣花蜜(千红)在稀释 4 倍情况下对于金黄色葡萄球菌和沙门菌仍有抑菌效果, 稀释 8 倍和 16 倍则几乎所有的蜂蜜都失去了抑菌性, 除了洋槐蜜(董家)在稀释 8 倍的情况下仍对黑曲霉有杀菌效果; ③抗菌性能较好的有枣花蜜(千红)、洋槐蜜(千红)、洋槐蜜(恒亮)、洋槐蜜(董家)和柑橘蜜(金华), 玫瑰花蜜(青海)、枇杷蜜(青海)这 2 种蜂蜜效果较弱, 对黑曲霉无抑菌效果。

## 4 讨论

### 4.1 UV 测总黄酮标准曲线用对照品和检测波长的选择

本实验采用 UV 测总黄酮含量参照郭夏丽等<sup>[1]</sup>分析方法选用槲皮素作为标准曲线对照品, 而不是芦丁。主要原因是槲皮素的吸收波长与蜂蜜的最大吸收波长更为吻合。芦丁的最大吸收峰在 511 nm 和 356 nm, 槲皮素的吸收峰为 379 nm 和 402 nm, 蜂蜜的最大吸收峰为 399~404 nm, 故而采用槲皮素作为对照品更为合适。

### 4.2 UV 测总黄酮的方法学讨论

UV 测食品药品中总黄酮含量是很经典的方法, 可作者在方法学验证过程中发现: 蜂蜜中的主要成分糖类对检测结果有很大的影响。①蜂蜜中存在的糖也能与  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  和  $\text{NaOH}$  反应生成在 402 nm 处有吸收的物质, 81%糖溶液总黄酮检测结果为  $41.130 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  就是最好的佐证, 且蜂蜜中含糖量越高, 其总黄酮含量越高, 但实际上蜂蜜中的总黄酮含量还是少之又少; ②通过对 UV 测蜂蜜中总黄酮含量的基质效应研究发现, 基质效应低, 有降低检测结果的可能性, 这与平均回收率为 84.43%相符。具体见表 1 和图 2。

### 4.3 UPLC-MS/MS 测蜂蜜中黄酮类组分的方法学及其结果讨论

首先, 由于 D101 型大孔吸附树脂的特性, 该

方法更适用于非极性和中等极性的黄酮类化合物的检测, 而对极性较强的黄酮苷元和强极性黄酮苷则不适合(目标化合物浓度范围内回收率几乎为 0); 其次, 桑黄素、杨梅酮、槲皮素和山奈酚等 4 种黄酮类成分的稳定性较差, 导致回收率也较低, 特别是桑黄素和杨梅酮的回收率  $<80\%$ <sup>[19]</sup>; 第三, 各对照品的基质效应值为 94.49%~115.67%, 说明基质对检测结果的影响不大, 检测结果较为准确; 第四, 不同批次洋槐蜜的黄酮类组分及其含量均较为一致, 且各组分含量呈一定的比例; 最后, 6 号蜜和 7 号蜜的总黄酮类组分含量明显低于其他几个蜂蜜(除 2 号蜜外), 色泽一致均为明黄色, 且两者的 UPLC-UV 紫外图谱几乎重叠, 具体见图 3。由此得出: 采用 UPLC 检测蜂蜜中的黄酮类组分也可用于鉴别蜂蜜的真假。

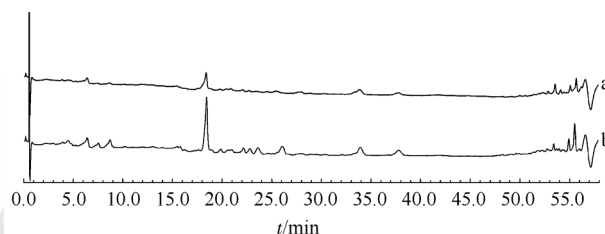


图 3 玫瑰花蜜(a)与枇杷蜜(b)的超高效液相色谱结果比较  
Fig. 3 The comparison chart of UPLC results between rose honey(a) and loquat honey(b)

### 4.4 黄酮类组分在蜂蜜抗菌性中的效能分析

首先, 本试验采用二倍稀释法测蜂蜜在 3 种稀释剂下的 pH 值, 发现在采用二倍稀释法测蜂蜜的抗菌性时, 由于培养基的稀释作用, 蜂蜜的低 pH 值(3.1~5.2)已经失去了其原有的作用, 故而排除了低 pH 值的抗菌效力; 其次, 以 81%的糖溶液作为阴性, 考察高渗性对蜂蜜抗菌性的贡献, 发现质量浓度为 40.5%的糖溶液只对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和沙门菌有一定的抑制作用, 对黑曲霉和白色念珠菌没有作用, 由此可知 1~5 号蜜的抗菌作用不是仅依赖于高渗性, 而 6~7 号则较多依赖高渗性, 从抗菌性的角度进一步证明 6~7 号蜜为假蜂蜜; 第三, 蜂蜜的成熟度对蜂蜜的抗菌性有一定的影响, 如 3~5 号蜜为生蜜, 它们对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和沙门菌的抑菌效果要比 1 号和 2 号熟蜜稍弱些; 第四, 蜂蜜中总黄酮含量与抗菌性存在一定程度的正相关: 1~5 号蜜的抗菌性强于 6~7 号, 而 6~7 号的抗菌性稍强于 81%糖溶液(这可能与调节蜂蜜

颜色的添加物有关), 但是其抗菌性的强弱不与总黄酮含量完全呈正比, 如: 洋槐蜜(董家)其总黄酮含量和组分总量均不是最高的, 但其抗黑曲霉的活性却是最好的, 洋槐蜜(恒亮)的组分总量是最高的, 但其抗菌性却不是最好的, 这从侧面印证蜂蜜的抗菌性不仅仅与黄酮类化合物有关; 第五, AGÜRO 等<sup>[20]</sup>报道, 白杨素对部分菌株具有一定的抗菌性, 木犀草素具有一定程度的抗菌性<sup>[21]</sup>, 除 2, 6, 7 号蜂蜜不含有或含极少量白杨素和木犀草素外, 其余几种蜂蜜中均含有较多的白杨素和木犀草素, 这也能较好地解释为何 6, 7 号蜂蜜的抗菌性差, 但未能从现有的 12 种黄酮类组分很好地解释 2 号枣花蜜的抗菌性能。

通过以上分析讨论得知, 蜂蜜中的黄酮类组分及其含量与蜂蜜的抗菌性能大小有关, 蜂蜜的抗菌性可用于进一步鉴别蜂蜜的真假; 但由于蜂蜜中各种黄酮类组分的含量较低, 同时不能排除其他物质, 如其他多酚类化合物、 $H_2O_2$  和溶菌酶等物质也起了抗菌作用, 所以其相关性具体如何还有待进一步研究。

黄酮类化合物广泛存在于自然界中, 生理活性多种多样。具有抗菌性能的黄酮类化合物具体都有哪些, 目前研究得还不是很透彻, 也尚未有方法能够将蜂蜜中的黄酮类组分一一鉴定出来, 故而蜂蜜中的黄酮类组分具体哪些组分在抗菌性能中起着关键作用也有待进一步研究。本实验虽有了一定的研究结果, 但存在 UPLC-MS/MS 分析黄酮类组分具有一定的局限性、研究的目标化合物数量有限以及未能排除  $H_2O_2$ 、残留抗菌药物和溶菌酶的抗菌性等缺点, 都需要在今后的实验过程中不断完善。

## REFERENCES

[1] GUO X L, LUO L P, LENG T T, et al. Chemical Compositions and antioxidant activities of seven honeys from different floral sources [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2010, 22(4): 665-670.

[2] 李时珍. 图解本草纲目[M]. 西安: 陕西师范大学出版社, 2012: 566.

[3] WANG R Z, RU J. Method study for the determination of adulteration honey by TLC and HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(4): 737-741.

[4] LEI M. Analysis and detection of six kinds of monofloral honey adulteration [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013.

[5] BIANCHI F, CARERI M, MUSCI M. Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: characterisation of aroma

compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Chem, 2005, 89(4): 527-532.

- [6] TOMÁS-BARBERAN F A, MARTOS I, FERRERES F, et al. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys [J]. J Sci Food Agric, 2001, 81(5): 485-496.
- [7] GARCÍA-ALVAREZ M, HUIDOBRO J F, HERMIDA M, et al. Major components of honey analysis by near-infrared transmittance spectroscopy [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(11): 5154-5158.
- [8] ESCRICHE I, KADAR M, JUAN-BORRÁS M, et al. Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys [J]. Food Res Int, 2011, 44(5): 1504-1513.
- [9] ZHU W, HU F L, LI Y H, et al. The antibacterial mechanism and the affected factors of honey [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2004, 16(4): 372-375.
- [10] ZHUGE Y, HU W, ZHU J, et al. Research and clinical application of antibacterial mechanism of natural honey [J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药), 2009, 40(增刊): 61-63.
- [11] HUANG D P, JIANG G F, ZHOU W Y, et al. The antibacterial effects *in vitro* of different kind of honey on helicobacter pylori [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2006, 17(10): 1989-1990.
- [12] LIANG C, LU H X, LIU H CH et al. Establishment of Determination method for flavonoids in honey and distribution of flavonoids in 5 kinds of characteristic honey from Yunan [J]. Food Sci(食品科学), 2013, 34(6): 148-151.
- [13] LU K. Simultaneous determination of 5 classes of antibiotics residues in honey using high performance liquid chromatography [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.
- [14] HE Q, KONG X H, LI J H, et al. Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of nitroimidazoles, sulfonamides, quinolones residues in honey [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2010, 29(8): 61-65.
- [15] WANG W, SHI Z H, KANG J, et al. Simultaneous determination of 60 kinds of veterinary drug residues in honey by QuEChERS combined with LC-MS/MS [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2013, 32(4): 82-88.
- [16] CHEN T B, DENG W H, LU W H, et al. Detection of residual antibiotics in honey by capillary electrophoresis [J]. Chromatographic(色谱), 2001, 19(1): 91-93.
- [17] GUO W H, ZHOU J H, HUANG J P, et al. Dispersive solid phase extraction and high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of alkaloids in honey [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2014, 42(10): 1453-1458.
- [18] YE L L, ZHU Z T, DAI Q J, et al. Effect of temperature on the content of 5-Hydroxymethyl furfural in different floral honeys [J]. Apicul China(中国蜂业), 2013, 64(3): 62-64.
- [19] WANG X X, ZHOU Y, YU T T, et al. Flavonoids components' analysis of ten different nectar honey by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(12): 2180-2189.
- [20] AGÜRO M B, GONZALEZ M, LIMA B, et al. Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(1): 194-201.
- [21] 姚新生, 吴立军, 吴继洲. 天然药物化学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 177.

收稿日期: 2016-02-04

(本文责编: 曹粤锋)