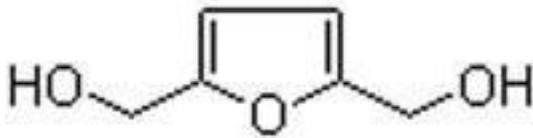


## 蜂蜜中羟甲基糠醛的含量测定——高效液相色谱法

### 背景:

羟甲基糠醛是蜂蜜中的还原糖经加热、脱水生成的一种黑色具有难闻气味的有毒物质,其反应机理是在酸性条件下,蜂蜜中的氨基化合物与葡萄糖发生 Maillard 反应或者蜂蜜中的还原糖发生脱水反应,生成羟甲基糠醛。



新鲜蜂蜜中羟甲基糠醛的含量很低,一般不会超过 10mg/kg。但在加工和贮藏过程中其含量将逐渐增高,甚至可能超标。羟甲基糠醛的存在会严重影响到蜂蜜食用的安全性,对眼睛、黏膜或皮肤有刺激性,摄入过多会引起中毒,甚至引发癌症、造成动物横纹肌麻痹和内脏损伤。



在国际贸易中羟甲基糠醛属强检指标,要求每千克蜂蜜中羟甲基糠醛的含量应小于 40mg。各国也规定了羟甲基糠醛的最高限量,并将之作为判定是否掺有转化糖的依据。

### 实验部分:

仪器与试剂:

仪器与设备: 悟空 K2025 高效液相色谱仪; 分析天平(精确到 0.0001g); 涡旋振荡器; pH 计; 容量瓶(10mL、1000mL, 棕色带刻度)等。

试剂与材料: 羟甲基糠醛标准品(CAS 号:67-47-0, 纯度为 99.9%); 符合 GB/T6682 的一级水; 甲醇(色谱纯); 0.22 $\mu$ m 微孔滤膜(有机相)。

实验方法:

样品处理: 称取10g蜂蜜试样(精确至0.01g), 置于100mL烧杯中, 加入10 mL甲醇, 用玻璃棒轻轻搅拌均匀, 使试样完全溶解。将上述溶液转移至100 mL容量瓶中, 用水稀释至刻度, 充分混匀。该溶液用0.22  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 取续滤液待上机测定。

色谱条件:

a) 色谱柱: C18 色谱柱 (4.6 $\times$ 250mm, 5  $\mu\text{m}$ )

b) 流动相: 甲醇+水 (10+90)

c) 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$

d) 进样量: 10 $\mu\text{L}$

e) 流速: 1.0mL/min

f) 波长: 285nm

#### 【结果与讨论】:

1. 羟甲基糠醛标准溶液(浓度为 2.040 $\mu\text{g/mL}$ ) 色谱图如图 1 所示:

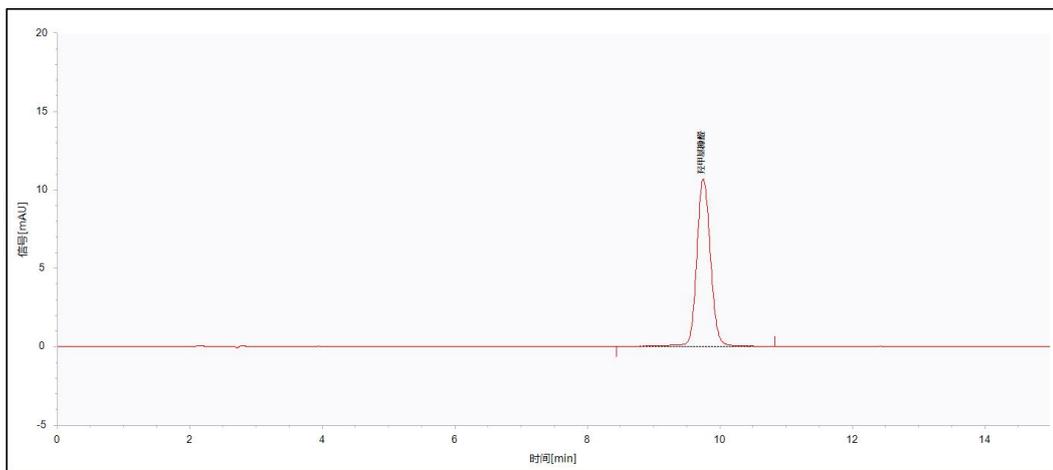


图 1 羟甲基糠醛标准溶液色谱图

2. 将羟甲基糠醛标准溶液逐级稀释至信噪比 S/N 为 3 左右, 计算仪器的检出限, 数据结果见表 1。经计算仪器针对羟甲基糠醛的检出限为 0.014 $\mu\text{g/mL}$ , 定量限为 0.048 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 灵敏度测试数据

目标物	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
羟甲基糠醛	0.102	0.601	0.028	21.5	0.014	0.048

3. 将系列羟甲基糠醛标准溶液在 HPLC 上进行测定, 绘制校准曲线, 线性方程及相关系数见图 2, 曲线的相关系数  $R^2$  为 0.9999, 线性关系良好; 系列浓度溶液色谱图如图 3 所示。

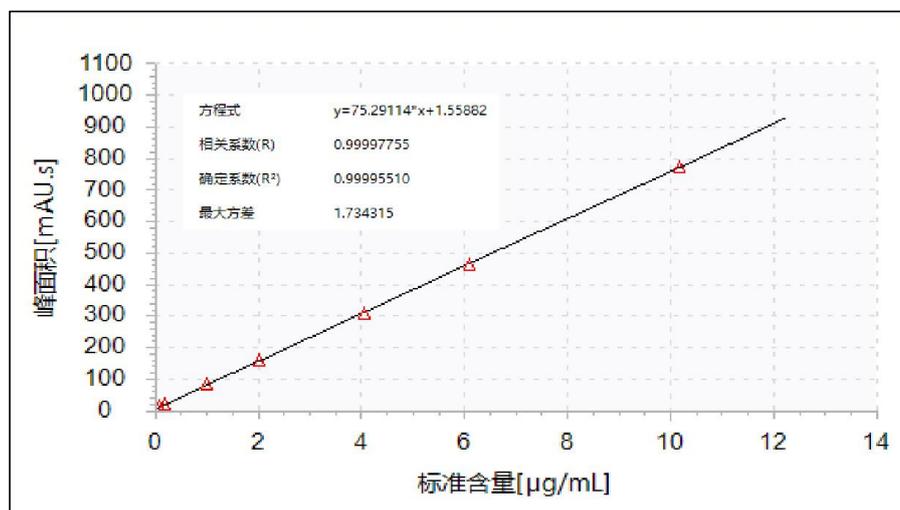


图 2 羟甲基糠醛标准溶液校准曲线

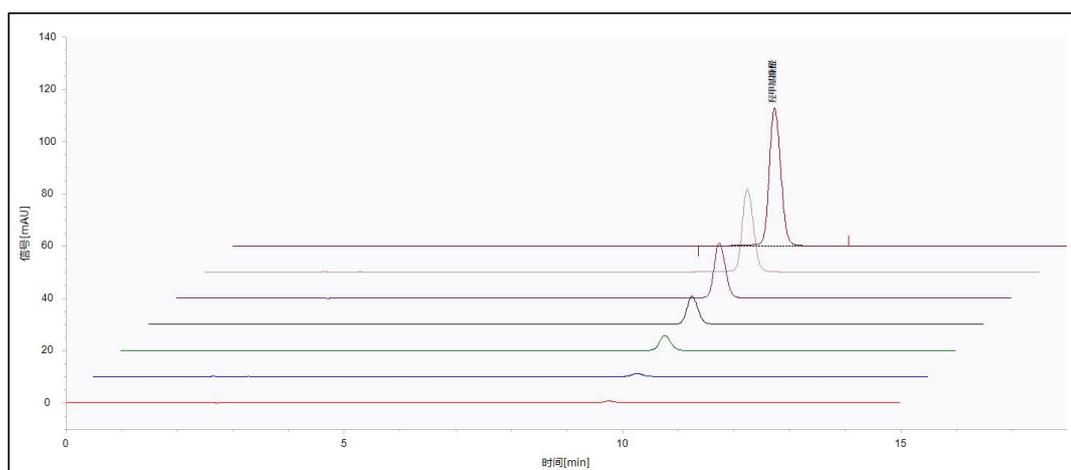


图 3 羟甲基糠醛系列浓度标准溶液色谱图

4. 购买市售蜂蜜样品进行处理, 并进行加标回收实验, 样品加标回收色谱图如图 4 所示, 羟甲基糠醛加标回收率为 95.2%。

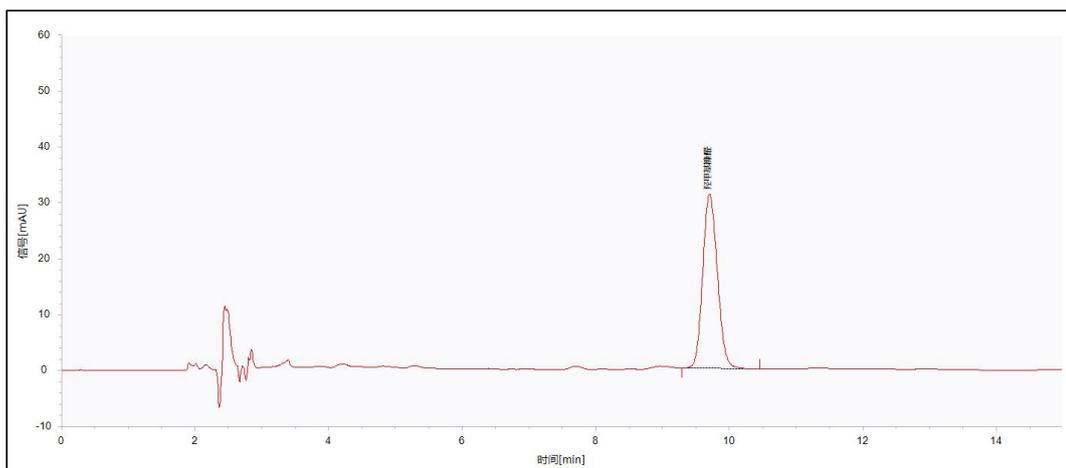


图 4 蜂蜜样品加标回收色谱图

### 【结论】

通过对羟甲基糠醛的色谱峰型、重复性、灵敏度、线性测试以及对蜂蜜样品测试,表明使用 K2025 高效液相色谱仪测定蜂蜜样品中羟甲基糠醛具有良好的线性关系,确定系数  $R^2$  值为 0.9999;连续进样 7 针,保留时间的 RSD 值为 0.031%,峰面积的 RSD 值为 0.489%,定性定量均有良好的重复性;羟甲基糠醛的仪器检出限为  $0.014\mu\text{g/mL}$ ,定量限为  $0.048\mu\text{g/mL}$ ,加标回收率为 95.2%。因此,Wooking K2025 高效液相色谱仪完全可以满足《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》测定羟甲基糠醛含量的需求。