

高效液相色谱法测定蜂胶软胶囊中白杨素和高良姜素的含量

陆婷婷*, 刘小玉, 汪玉玲, 陈星蓉

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定保健食品蜂胶软胶囊中白杨素和高良姜素含量的方法。**方法** 样品经乙醇提取后, 由 C₁₈ 色谱柱分离, 以甲醇-0.1%磷酸(60:40, V:V)为流动相进行等度洗脱, 用紫外检测器在波长为 270 nm 检测, 外标法定量。**结果** 白杨素在 5.685~284.25 μg/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数为 0.999, 加标回收率为 97.1%~103.0%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.8%~1.8%; 高良姜素在 5.32~266 μg/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数为 0.999, 加标回收率为 96.2%~102.0%, RSD 为 0.5%~1.9%。**结论** 此方法简便快速, 准确可靠, 可提高保健食品蜂胶软胶囊中白杨素和高良姜素含量测定的效率。

关键词: 蜂胶; 白杨素; 高良姜素; 高效液相色谱法

Determination of chrysin and galangin content in propolis soft capsules by high performance liquid chromatography

LU Ting-Ting*, LIU Xiao-Yu, WANG Yu-Ling, CHEN Xing-Rong

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of chrysin and galangin content in health food propolis soft capsules by high performance liquid chromatography. **Methods** The sample was extracted with ethanol, separated on a C₁₈ column and isocratic eluted with methanol-0.1% phosphoric acid (60:40, V:V) as mobile phase. The targets were detected by a ultraviolet detector at the wavelength of 270 nm, and quantified by external standard method. **Results** Chrysin had a good linear relationship in the concentration range of 5.685–284.25 μg/mL, and the correlation coefficient was 0.999. The spiked recoveries ranged from 97.1%–103.0% with the standard deviations of 0.8%–1.8%. Galangin had a good linear relationship in the concentration range of 5.32–266 μg/mL, and the correlation coefficient was 0.999. The spiked recoveries ranged from 96.2%–102.0% with the standard deviations of 0.5%–1.9%. **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate and reliable, and can improve the efficiency of the determination of chrysin and galangin in propolis soft capsule of health food.

KEY WORDS: propolis; chrysin; galangin; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 陆婷婷, 助理工程师, 主要研究方向为食品理化检验及食品安全。E-mail: 546510396@qq.com

*Corresponding author: LU Ting-Ting, Assistant Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: 546510396@qq.com

1 引言

蜂胶是蜜蜂科昆虫意大利蜂(*Apis mellifera* L.)工蜂采集的植物树脂与其上颚腺、蜡腺等分泌物混合形成的具有黏性的固体胶状物^[1]。国内外研究表明,蜂胶中含有丰富的黄酮类、酚酸类及萜烯类化合物^[2-4],有广泛的生物学活性和药理学活性,如抗氧化、抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、保肝、免疫调节等。目前已广泛用于医药、保健食品、化妆品等领域^[5],是近十余年来蜂产品乃至天然产物研发的热点之一^[6]。

近年来,以蜂胶为主要成分的各类保健食品日益增多,其中不乏假冒伪劣产品^[7]。由于蜂胶生产受胶源植物蜂种采胶方式、气候条件以及生产过程等多种因素的影响,产量相对有限。温带地区公认的蜂胶植物来源是杨属(*Populus*)及其杂交属的芽苞分泌物^[5]。曹炜等^[8]采用液相色谱及电喷雾质谱法对国内 30 个不同地区采集的蜂胶和 2 个地区采集的杨树芽的乙醇提取物进行液质联用分析,发现蜂胶与杨树芽提取物的谱图十分相似。由于蜂胶原料紧俏而利益较大,不法厂家用杨树芽熬制出杨树胶掺入到蜂胶中或直接以杨树胶冒充蜂胶,并加入类黄酮类物质,人为地提升总黄酮含量以达到以次充好的目的^[9]。目前我国已实施用于产地为中国的蜂胶掺假鉴别的国标方法 GB/T34782-2017《蜂胶中杨树胶的检测方法 高效液相色谱法》,该方法利用高效液相色谱法检测水杨苷和邻苯二酚,对蜂胶和杨树胶进行鉴别^[10]。蜂胶国家标准 GB/T 24283-2018《蜂胶》^[11]中规定的感官指标包括结构、色泽、状态、气味和滋味,理化指标包括乙醇提取物含量、总黄酮和氧化时间。所以,目前蜂胶类保健食品以总黄酮含量作为功效成分指标,但 2003 版《保健食品检验与评价技术规范》中的《保健食品中总黄酮的测定》^[12]的方法采用紫外分光光度法测定总黄酮的含量,在检测波长下除了黄酮类化合物外还有其他成分显色,总黄酮的测量值偏高,方法专属性不佳^[13],目前 2003 版《保健食品检验与评价技术规范》也已经废止。

白杨素和高良姜素等黄酮类成分是蜂胶的主要活性成分^[14],也是蜂胶质量控制的主要指标之一。白杨素具有抗氧化、抗病毒、抗高血压、抗糖尿病及抗肿瘤等多种药理作用^[15];另有文献报道白杨素还具有抗焦虑作用^[16]。高良姜素具有抗氧化、抗炎、抗病毒抗肿瘤等作用^[17]。《中国药典》^[1]2015 版一部的蜂胶含量测定项下也是以白杨素和高良姜素含量为指标,采用高效液相法测定蜂胶中白杨素和高良姜素的含量。以高效液相法测定蜂胶中的白杨素和高良姜素含量作为蜂胶的质量控制指标更为准确,专属性更强。

但是,《中国药典》^[1]2015 版一部的蜂胶含量测定项

下的前处理耗时 24 小时,过于费时,不适用于日常检测。本文参照 2003 年我国发布的 GB/T 19427-2003《蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、灰菲醇、芹菜素、松属素、苛因、高良姜素含量的测定方法 液相色谱-串联质谱检测法和液相色谱-紫外检测法》^[18]对《中国药典》^[1]2015 版一部蜂胶项下的白杨素和高良姜素的含量测定方法中的前处理方法以及色谱条件进行优化,以提高保健食品蜂胶软胶囊中白杨素和高良姜素含量测定的效率,为相关检测提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

白杨素化学对照品(含量 100%)、高良姜素化学对照品(含量 99.6%)(中国食品药品检定研究院);甲醇(色谱纯,美国默克公司);乙醇(分析纯,广州化学试剂厂);超纯水由实验室制备。

实验样品:市售蜂胶软胶囊。

2.2 仪器与设备

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Milli-Q Reference 超纯水仪(美国密理博公司); KQ-500DE 型台式数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); CPA225D 十万分之一电子天平(德国赛多利斯公司); LE104E/02 万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司); 0.22 μm 针孔滤膜(德国波尔公司)。

2.3 色谱条件与系统适应性

参考《中国药典》2015 年版一部蜂胶项下含量测定方法,以 SHIMADZU Shim-pack GIST C₁₈ 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)为色谱柱;以甲醇-0.1%磷酸(60:40, V:V)为流动相等度洗脱,检测波长 270 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样体积:10 μL ,理论塔板数按白杨素峰计算应不低于 3000。

2.4 对照品溶液配制

精密称取白杨素和高良姜素对照品适量,分别置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释成 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的白杨素对照品储备液和高良姜素对照品储备液。

分别精密吸取白杨素对照品储备液、高良姜素对照品储备液 5 mL,置于 10 mL 容量瓶中,即得浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品混合溶液。

2.5 供试品溶液配制

取蜂胶软胶囊 10 粒的内容物混合均匀,精密称取 0.1 g 于 100 mL 容量瓶中,加入乙醇溶解样品并定容至刻度,密塞,40 $^{\circ}\text{C}$ 超声 30 min,冷却,分别定容至刻度。摇匀过 0.22 μm 针孔滤膜,即得供试品溶液。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的选择

首先按照药典中介绍的方法, 采用流动相甲醇-0.1%磷酸溶液梯度洗脱, 洗脱程序: 0~65 min: 53%甲醇; 65~70 min: 100%甲醇; 70~82 min: 53%甲醇。流速: 1.0 mL/min 进行分析, 白杨素、高良姜素的峰型和分离度都比较理想, 但洗脱时间过长, 需要 80 min。根据 2 个目标峰的保留时间, 调整流动相比例为甲醇-0.1%磷酸(60:40, V:V), 等度洗脱 30 min, 分析结果显示白杨素和高良姜素的峰型和分离度也比较理想, 而且大大缩短了分析时间。以下是混合对照品色谱图和实际样品色谱图, 分别见图 1、图 2。

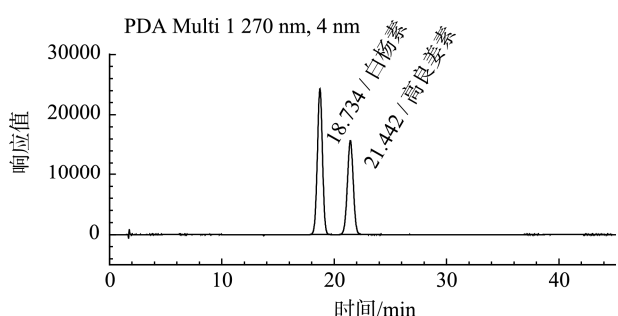


图 1 白杨素与高良姜素的混合对照品色谱图

Fig.1 Chromatogram of the mixture comparison products of chrysin and galangin

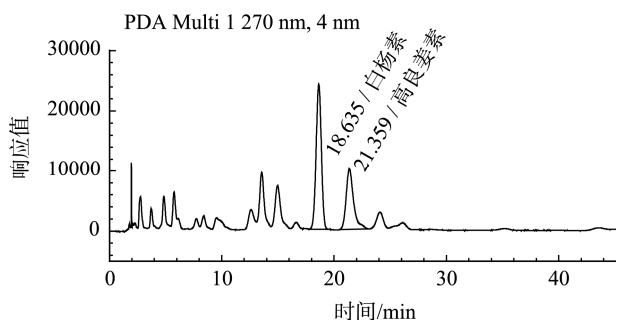


图 2 实际样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of the actual sample

3.2 前处理条件优化

3.2.1 提取方法的选择

取蜂胶软胶囊 10 粒的内容物混合均匀, 精密称取 0.1 g 于 100 mL 容量瓶中, 加入乙醇 70 mL, 密塞, 分别采用以下方法提取: ①按照药典方法^[1]: 冷浸 6 h, 并时时振

摇, 再静置 18 h, 用乙醇定容至刻度; ②参考 GB/T 19427-2003《蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、灰菲醇、芹菜素、松属素、萜因、高良姜素含量的测定方法 液相色谱-串联质谱检测法和液相色谱-紫外检测法》^[18]: 40 °C 超声 30 min, 冷却后, 用乙醇定容至刻度。摇匀, 滤过, 即得, 按 2.3 项下条件测定。结果表明, 2 种提取方法的效果相当, 但超声处理方便快捷, 提高效率(见表 1)。

3.2.2 提取溶剂的选择

取蜂胶软胶囊 10 粒的内容物混合均匀, 精密称取 0.1 g 于 100 mL 容量瓶中, 分别以甲醇、乙醇、70%乙醇为提取溶剂, 加入 70 mL 提取溶剂溶解样品, 密塞, 40 °C 超声 30 min, 冷却, 分别用提取溶剂定容至刻度。摇匀, 过滤, 即得, 按照 2.3 项下条件测定。结果表明, 甲醇和 70%乙醇的提取效果通过单因素方差分析存在显著性差异($P < 0.05$), 甲醇提取效果更好; 而甲醇和乙醇的提取效果通过单因素方差分析不存在显著性差异($P > 0.05$), 但从安全环保角度考虑, 选择乙醇作为提取溶剂更优(见表 2)。

3.2.3 提取时间的选择

取蜂胶软胶囊 10 粒的内容物混合均匀, 精密称取 0.1 g 于 100 mL 容量瓶中, 加入乙醇 70 mL, 密塞, 40 °C 下分别超声 10、30、60 min, 冷却, 用乙醇定容至刻度。摇匀, 滤过, 即得, 按照 2.3 项下条件测定。结果表明, 3 个超声提取时间的提取效果通过单因素方差分析存在显著性差异($P < 0.05$), 提取 30 min 效果最好, 故选择超声提取 30 min(见表 3)。

3.3 方法学考察

3.3.1 线性关系考察

精密吸取 2.4 项下对照品混合溶液 10、20、50、100、200、500 μ L, 配制成浓度为 5、10、25、50、100、250 μ g/mL 的标准系列溶液, 按照 2.3 色谱条件进样分析, 以浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 进行回归分析, 得回归方程 $Y_{\text{白杨素}} = 63008X + 157673$, $r^2 = 0.9991$, $Y_{\text{高良姜素}} = 50178X + 109874$, $r^2 = 0.9991$ 。结果表明, 白杨素在 5.685~284.25 μ g/mL, 高良姜素在 5.32~266 μ g/mL 呈良好的线性关系。

3.3.2 精密度实验

取 11.37 μ g/mL 白杨素和 10.64 μ g/mL 高良姜素的对照品混合溶液按 2.3 项下色谱条件进行测定, 重复进样 6 次, 测得白杨素和高良姜素的峰面积相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 0.06%和 0.08%, 表明仪器精密度良好。

表 1 不同提取方法的检测结果($n=6$)
Table 1 Detection results of different extraction methods ($n=6$)

提取方法	白杨素		高良姜素	
	含量/%	相对标准偏差/%	含量/%	相对标准偏差/%
冷浸 24 h	0.97	2.1	0.68	2.3
超声 30 min	0.97	0.9	0.69	1.0

表 2 不同提取溶剂的检测结果($n=3$)
Table 2 Detection results of different extraction solvents($n=3$)

提取溶剂	白杨素		高良姜素	
	含量/%	相对标准偏差/%	含量/%	相对标准偏差/%
甲醇	1.01	0.1	0.71	1.5
乙醇	0.98	1.8	0.71	0.7
70%乙醇	0.96	1.7	0.69	2.0

表 3 不同提取时间的检测结果($n=3$)
Table 3 Detection results of different extraction time($n=3$)

提取时间/min	白杨素		高良姜素	
	含量/%	相对标准偏差/%	含量/%	相对标准偏差/%
10	0.95	0.6	0.68	0.8
30	0.98	0.5	0.69	0.8
60	0.94	1.5	0.66	1.4

3.3.3 重复性试验

精密称取蜂胶软胶囊内容物 6 份, 分别按 2.5 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件进行测定, 计算出蜂胶软胶囊样品中的白杨素平均含量为 0.97%, RSD=0.9%($n=6$), 高良姜素含量为 0.67%, RSD=1.0%($n=6$)。结果表明, 该方法稳定。

3.3.4 稳定性试验

取同一份供试品溶液, 分别在 0、2、5、10、16、24、36、48 h, 按 2.3 项下色谱条件进行测定, 计算白杨素和高良姜素的峰面积的 RSD 分别为 0.2%和 0.7%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

3.3.5 加标回收试验

精密称取蜂胶软胶囊内容物 9 份, 置于 100 mL 容量瓶中, 按照 3 个加标水平, 每个加标水平 3 个平行样, 分别准确加入不同体积的 1137 $\mu\text{g/mL}$ 白杨素对照品溶液、1064 $\mu\text{g/mL}$ 高良姜素对照品溶液, 按 2.5 项下方法制备供试品加标溶液, 按 2.3 项下色谱条件进行测定, 结果表明白杨素的加标回收率为 97.1%~103.0%, RSD 为 0.8%~1.8%; 高良姜素的加标回收率为 96.2%~102.0%, RSD 为 0.5%~1.9% (见表 4)。

3.4 样品测定

取 2 批样品各 2 份, 按 2.5 项下方法制备供试品加标溶液, 按 2.3 项下色谱条件进行测定。结果显示, 样品 1 含白杨素 0.97%, 高良姜素 0.67%; 样品 2 含白杨素 1.2%, 高良姜素 1.0%。

4 结论与讨论

本文对蜂胶软胶囊中的白杨素和高良姜素的提取方

法及色谱条件进行了优化。《中国药典》2015 版一部蜂胶含量测定项下的提取方法耗时 24 h, 本文采用乙醇进行 40 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取只需要 30 min; 《中国药典》2015 版一部蜂胶含量测定项下的色谱条件需要梯度洗脱 80 min, 而本文采用甲醇-0.1%磷酸(60:40)等度洗脱只需要 30 min, 目标峰峰型及分离度良好。因此本研究更方便省时, 有效提高了检测效率。

表 4 白杨素、高良姜素的加标回收实验结果($n=3$)
Table 4 Results of recovery test for chrysin and galangin($n=3$)

组分	加标浓度/ $\mu\text{g/mL}$	平均回收率/%	RSD/%
白杨素	5.685		
	5.685	99.6	1.8
	5.685		
	9.096		
	9.096	97.1	0.8
	9.096		
高良姜素	13.644		
	13.644	103.0	1.1
	13.644		
	5.32		
	5.32	100.3	0.5
	5.32		
	10.64		
10.64	96.2	1.9	
10.64			
13.832			
13.832	102.0	0.9	
13.832			

本研究未对提取温度进行考察, 因为采用的超声波清洗器的恒定温度为 40 °C, 且药典方法的提取方法也是常温提取。而采用 40 °C 超声提取 30 min 与药典常温浸泡 24 h 的提取效果基本一致, 故不再考察更高的提取温度。

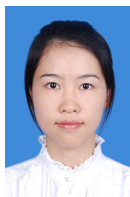
该方法操作简单省时, 线性范围宽, 检出限低, 精密度和准确度高, 可以满足对保健食品中白杨素、高良姜素定量分析的要求, 适用于蜂胶软胶囊中白杨素和高良姜素含量的测定, 为蜂胶类保健食品中白杨素和高良姜素含量测定的标准建立提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China: One edition [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [2] 张翠平, 胡福良. 蜂胶中的黄酮类化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(6): 1084-1090.
Zhang CP, Hu FL. Flavonoids in propolis [J]. Nat Prod Res Dev, 2009, 21(6): 1084-1090.
- [3] 张翠平, 王凯, 胡福良. 蜂胶中的酚酸类化合物[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(1): 102-105.
Zhang CP, Wang K, Hu FL. Phenolic acid in propolis [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2013, 30(1): 102-105
- [4] 张翠平, 胡福良. 蜂胶中的萜类化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(7): 976-984.
Zhang CP, Hu FL. Terpenoids in propolis [J]. Nat Prod Res Dev, 2012, 24(7): 976-984
- [5] Bankova VS, De-Castro SL, Marcucci MC. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin [J]. Apidologie, 2000, 31: 3-15.
- [6] 胡福良. 蜂胶的化学成分、质量控制及生物学活性研究进展[J]. 经济动物学报, 2017, 21(4): 187-196.
Hu FL. Research progress on chemical composition, quality control and biological activity of propolis [J]. J Econ Anim, 2017, 21(4): 187-196.
- [7] 孙艳芳, 肖白曼, 陈彦凤, 等. 反相高压液相色谱法测定蜂胶保健食品中白杨素高良姜素的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(4): 326-330.
Sun YF, Xiao BM, Chen YF, *et al.* Determination of astaxanthin and galangin in propolis health food by reversed-phase high-pressure liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2012, 3(4): 326-330.
- [8] 曹伟, 符军放, 索志荣, 等. 蜂胶与杨树芽提取物成分的比较研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, (7): 162-166.
Cao W, Fu JF, Suo ZR, *et al.* Comparative study on extracts of propolis and poplar buds [J]. Food Ferment Ind, 2007, (7): 162-166.
- [9] 张翠平, 杨茂森, 李诗怡, 等. 蜂胶与杨树胶鉴别的研究概况[J]. 蜜蜂杂志, 2014, 34(10): 9-12.
Zhang CP, Yang MS, Li SY, *et al.* Review on the research of propolis and poplar gum identification [J]. J Bees, 2014, 34(10): 9-12.
- [10] 陈磊, 刘芸, 陈雷, 等. 高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱检测中国杨树型蜂胶、巴西绿蜂胶和杨树胶中的酚类化合物及真伪鉴别[J]. 色谱, 2019, 37(1): 40-45.
Chen L, Liu Y, Chen L, *et al.* Detection and identification of phenolic compounds in Chinese poplar propolis, Brazilian green propolis and poplar gum by high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(1): 40-45.
- [11] GB/T 24283-2018 蜂胶[S].
GB/T 24283-2018 Propolis [S].
- [12] 保健食品检验与评价技术规范[Z].
Health food inspection and evaluation technical specifications [Z].
- [13] 杨晓梅, 董丽荣, 郭菊玲. HPLC 法测定保健食品蜂胶软胶囊中白杨素和高良姜素的含量[J]. 中外女性健康研究, 2017, (14): 62-63.
Yang XM, Dong LR, Guo JL. Determination of chrysin and galangin in health food propolis soft capsules by HPLC [J]. Chin Foreign Women's Health Res, 2017, (14): 62-63.
- [14] Stefano C, Francesco C. Própolis, an old remedy used in modern medicine [J]. Fitoterapia, 2002, 73: 1.
- [15] 王宇, 周秀田, 曹建国. 白杨素的抗肿瘤作用[J]. 长治医学院学报, 2007, (1): 77-80.
Wang Y, Zhou XT, Cao JG. Antitumor effect of poplars [J]. J Changzhi Med Coll, 2007, (1): 77-80.
- [16] 史娟, 杨海涛. 白杨素及其磺化配合物的研究进展[J]. 陕西理工学院学报(自然科学版), 2010, 26(3): 67-72.
Shi J, Yang HT. Advances in research on astaxanthin and its sulfonated complexes [J]. J Shaanxi Instit Technol (Nat Sci Ed), 2010, 26(3): 67-72.
- [17] 卫平, 邓亦峰, 罗辉, 等. 高效液相色谱法测定大鼠血清中高良姜素[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 592-595.
Wei P, Deng YF, Luo H, *et al.* Determination of galangin in rat serum by high performance liquid chromatography [J]. J Pharm Anal, 2010, 30(4): 592-595.
- [18] GB/T 19427-2003 蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、灰菲醇、芹菜素、松属素、萘因、高良姜素含量的测定方法 液相色谱-串联质谱检测法和液相色谱-紫外检测法[S].
GB/T 19427-2003 Methods for the determination of rutin, myricetin, sheppine, griffin, apigenin, pinesin, causticine and galangin in propolis-Liquid chromatography tandem mass spectrometry and liquid chromatography-ultraviolet detection [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



陆婷婷, 助理工程师, 主要研究方向为食品理化检验及食品安全。
E-mail: 546510396@qq.com