

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

孙艳芳, 肖白曼*, 陈彦凤, 付宇, 丁笑莉

(黑龙江省疾病预防控制中心, 哈尔滨 150030)

摘要: **目的** 建立用反相高压液相色谱测定保健食品中白杨素、高良姜素的方法。**方法** 蜂胶样品中白杨素、高良姜素经甲醇水浴回流提取、C₁₈反相柱分离, 在波长 268 nm 处检测。**结果** 此方法得到的白杨素回收率为 95.5%~100.8%, RSD 为 1.1%~2.0%, 高良姜素回收率为 95.2%~100.5%, RSD 为 1.6%~2.8%。**结论** 此方法简便快速, 准确可靠, 可用于对一些蜂胶保健食品中白杨素、高良姜素含量的测定。

关键词: 白杨素; 高良姜素; 反相高压液相色谱法; 保健食品

Determination of chrysin and galangin in propolis health care foods by reversed-phase high pressure liquid chromatography

SUN Yan-Fang, XIAO Bai-Man*, CHEN Yan-Feng, FU Yu, DING Xiao-Li

(Heilongjiang Province Center for Disease Control and Prevention, Harbin 150030, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the detection of chrysin and galangin in propolis health care foods by reversed-phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC). **Methods** Chrysin and galangin in samples were reflux extracted with methanol in water bath, separated by C₁₈ reversed phase column, and detected at wavelength of 268 nm. **Results** The recovery of chrysin was 95.6%~100.8% with the relative standard deviations of 1.1%~2.0%, and the recovery of galangin was 95.2%~100.5% with the relative standard deviations of 1.6%~2.8%. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reliable, which could be used for the detection of chrysin and galangin in propolis health care foods.

KEY WORDS: chrysin; galangin; reversed-phase high pressure liquid chromatography; health care foods

1 引言

蜂胶为蜜蜂科昆虫意大利蜂 *Apis mellifera* L. 的干燥分泌物。多于夏季从风箱中收集, 除去杂质。蜂胶有补虚弱, 化浊脂, 止消渴的功能。外用解毒消肿, 收敛生肌。用于体虚早衰。高脂血症, 消渴; 外治皮肤皲裂, 烧烫伤^[1]。中华人民共和国药典(2010 年版一部)中蜂胶含量测定以白杨素和高良姜素为质控指标。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^[2]; 另有文献报道白杨素还具有抗焦虑作用^[3]。高良姜素具有抗氧化、抗炎、抗病毒抗肿瘤等作用^[4]。不同产地的蜂胶质量存在着一定的差异, 其中的白杨素和高良姜素含量差别很大, 单独测定其中一种成分不能有效、全面的控制蜂胶药材的质量^[5]。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, 因此迫切需要制定一套现行可靠的可同时测定白杨素和高良姜素含量的标准。本文在参照中华人

*通讯作者: 肖白曼, 女, 主任技师, 研究方向: 卫生检验。E-mail: gwjyk2003@yahoo.com.cn

民共和国药典(2010年版一部)的基础上,进行白杨素和高良姜素液相色谱检测条件的摸索,以期建立适用于保健食品中蜂胶含量的测定和鉴别方法。

2 材料与方法

2.1 仪器

高压液相色谱仪(Waters 2695, 附二极管阵列检测器 Waters 2996, Waters 公司);恒温水浴锅(HWS28型, 上海一恒科技有限公司);纯水机(PALL 公司)。

2.2 试剂

甲醇(色谱纯);磷酸(色谱纯);白杨素(中国药品生物制品检定所提供, 含量 100%, 批号 111701-200501, 化学对照品);高良姜素对照品(中国药品生物制品检定所提供, 含量 100%, 批号 111699-200501, 化学对照品)。

2.3 液相色谱参考条件

色谱柱: DiamonsilTM(钻石) C_{18} 柱(5 μ m, 200 mm $\times$ 4.6 mm);流动相: 甲醇: 0.15%磷酸溶液=64: 36;流速 0.8 mL/min;检测波长: 268 nm;进样量 10 μ L;柱温 25 $^{\circ}$ C。

2.4 标准曲线的配制

精密称量白杨素、高良姜素对照品各 20.00 mg,

用甲醇溶解并定容至 100 mL, 分别准确移取 0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 mL 于 10 mL 容量瓶中并用甲醇稀释至刻度, 即得到浓度为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 μ g/mL 标准系列。

2.5 试样制备及测定

准确称取样品 1.000 g, 加甲醇 50 mL, 称重, 78 $^{\circ}$ C 水浴回流 1 h, 放至室温后用甲醇补足失重, 混匀, 过 0.45 μ m 滤膜, 上机测定。

3 结果与讨论

3.1 检测波长的确定

用二极管阵列检测器在 200~400 nm 下对标准溶液进行扫描, 发现白杨素在 269.0 nm 处有最大吸收(见图 1)、高良姜素在 265.5 nm 处有最大吸收(见图 2), 故选择 268 nm 为白杨素、高良姜素的测定波长。

3.2 流动相及流速的选择

首先按照药典中介绍的方法, 采用流动相甲醇-0.15%磷酸溶液(64: 36)、流速 1.0 mL/min 进行测定, 白杨素、高良姜素的峰型和分离度都比较理想, 但有时高良姜素吸收峰末端基线不稳定, 通过调整流动相比比例未见改善, 将流速改为 0.8 mL/min 后, 色谱图大有改善。以下是标样色谱图和样品色谱图, 分别见图 3、图 4。

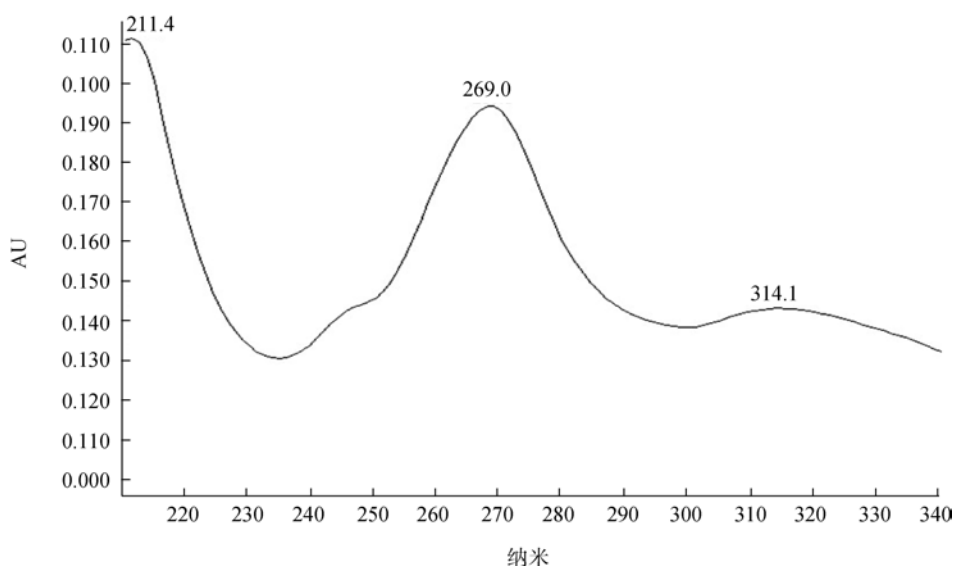


图1 白杨素标准溶液扫描光谱图

Fig. 1 Scan spectrogram of chrysin standard solution

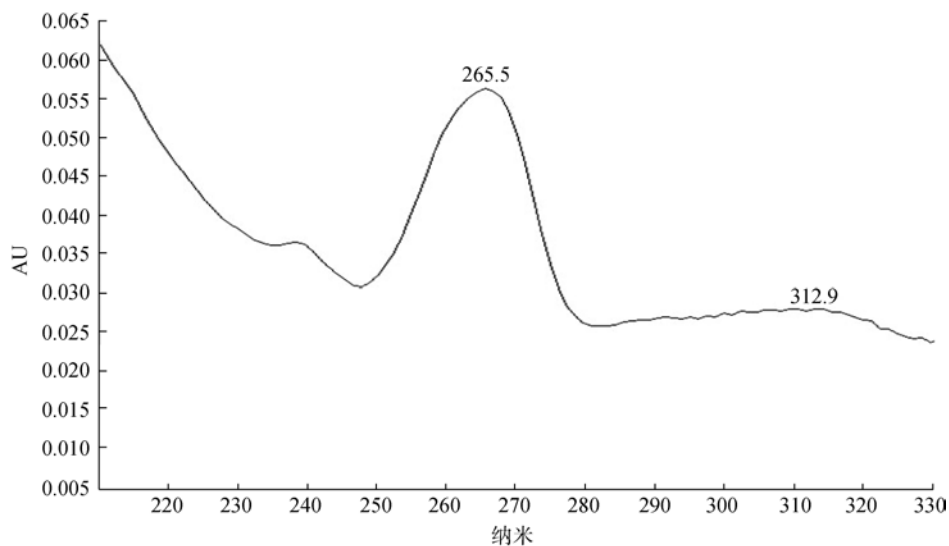


图 2 高良姜素标准溶液扫描光谱图

Fig. 2 Scan spectrogram of galangin standard solution

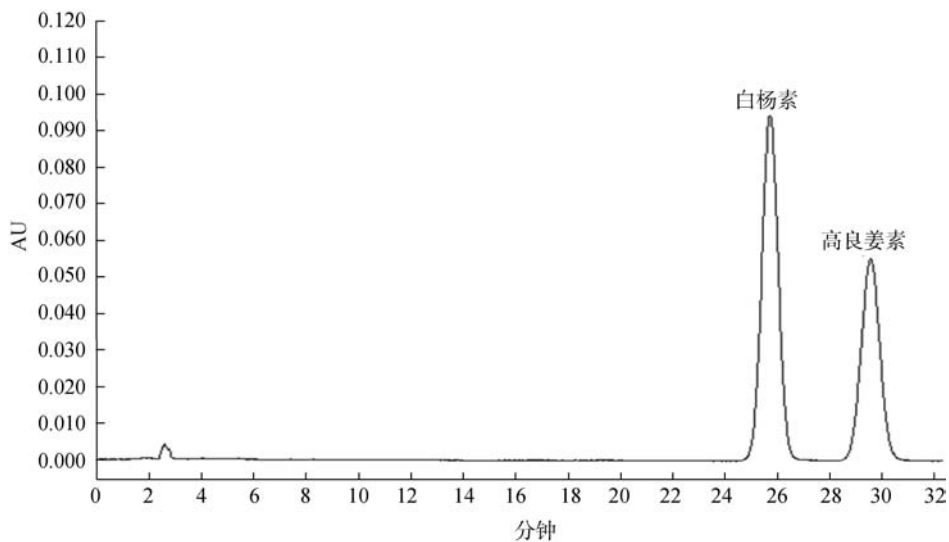


图 3 标样谱图

Fig. 3 Chromatogram of standard samples

3.3 提取条件的选择

称取 3 份相同质量的样品, 分别采用三种不同处理方法处理: (1)800 W 超声提取 1 h; (2) 78 ℃ 水浴回流 1 h; (3) 石油醚(30~60 ℃)脱脂后, 78 ℃ 水浴回流 1 h, 上机测定。结果见表 1, 从表 1 可见加热回流法比较有利于成分的溶出, 故本法选择加热回流法处理样品。

3.4 线性范围和最低检出限

在规定的色谱条件下, 对白杨素、高良姜素标准系列溶液进行测定。白杨素、高良姜素在 5.0~200.0 μg/mL 范围内具有良好的线性关系, 白杨素的回归方程是 $Y=-32728+83011X$, 相关系数 $r=0.9997$, 以 3 倍信噪比计, 检

出限为 0.4 μg/mL; 高良姜素的回归方程是 $Y=-25730+55652X$, 相关系数 $r=0.9996$, 以 3 倍信噪比计, 检出限为 0.4 μg/mL。

表 1 不同提取条件检测的白杨素、高良姜素结果

Table 1 Detective results of different extraction conditions for chrysin and galangin

组分名称	超声提取 1 h 结果(g/100 g)	水浴回流 1 h 结果(g/100 g)	脱脂后水浴回 流 1 h 结果 (g/100 g)
白杨素	0.52	0.53	0.51
高良姜素	0.49	0.50	0.48

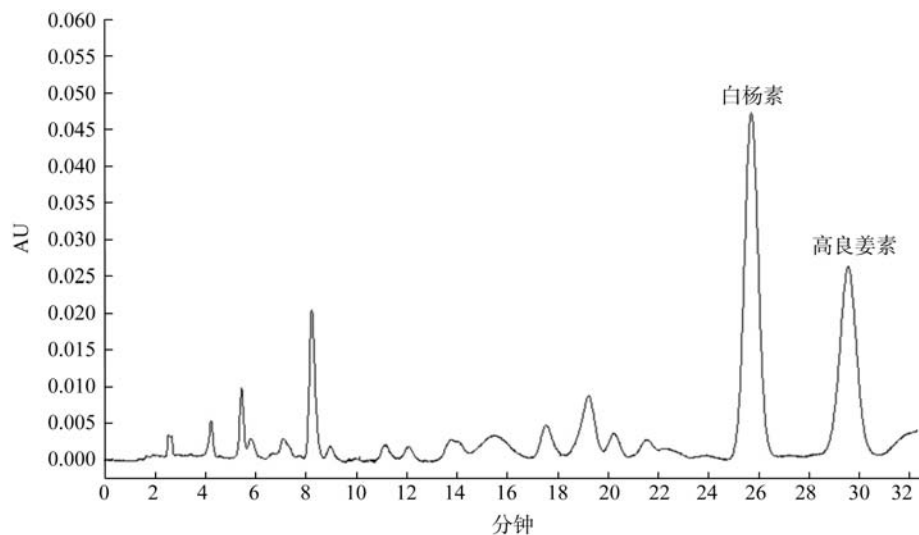


图 4 蜂胶样品色谱图

Fig. 4 Chromatogram of propolis samples

表 2 白杨素精密度试验结果

Table 2 Results of accuracy test for chrysin

标准品溶液浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	第 1 次 峰面积	第 2 次 峰面积	第 3 次 峰面积	第 4 次 峰面积	第 5 次峰 面积	第 6 次 峰面积	RSD (%)
20.0	1630536	1602470	1701250	1627341	1636466	1630346	2.0
50.0	4059339	4064586	4181841	4070453	4096754	4097544	1.1

表 3 高良姜素精密度试验结果

Table 3 Results of accuracy test for galangin

标准品溶液浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	第 1 次 峰面积	第 2 次 峰面积	第 3 次 峰面积	第 4 次 峰面积	第 5 次 峰面积	第 6 次 峰面积	RSD (%)
20.0	1102074	1071849	1154565	1094501	1085091	1075342	2.8
50.0	2716114	2735787	2837778	2732419	2729622	2727576	1.6

3.5 精密度试验

分别选择 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的白杨素、高良姜素标准品溶液按上述色谱条件进行检测, 连续进样 6 次, 测得白杨素峰面积的 RSD 分别为 2.0%和 1.1%, 高良姜素峰面积的 RSD 分别为 2.8%和 1.6%。

3.6 加标回收率试验

称取已知白杨素、高良姜素含量的保健食品 6 份, 分别加入不同体积 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 白杨素、高良姜素标准品溶液, 按照 2.5 节所述方法进行提取, 2.3 节色谱条件进行检测, 其回收率分别见表 4、5。

表 4 白杨素加标回收率结果

Table 4 Results of recovery test for chrysin

样品编号	称样量(g)	样品中白杨素含量(mg)	加入标准品体积(mL)	加入标准品含量(mg)	测定值 (mg)	回收率 (%)
1	0.110	0.583	2.0	0.4	0.965	95.5
2	0.205	1.086	5.0	1.0	2.066	98.0
3	0.312	1.654	5.0	1.0	2.637	98.3
4	0.421	2.231	10.0	2.0	4.216	99.2
5	0.520	2.756	10.0	2.0	4.760	100.2
6	0.601	3.185	20.0	4.0	7.217	100.8

表 5 高良姜素加标回收率结果
Table 5 Results of recovery test for galangin

样品编号	称样量(g)	样品中高良姜素含量(mg)	加入标准品体积(mL)	加入标准品含量(mg)	测定值 (mg)	回收率 (%)
1	0.105	0.525	2.0	0.4	0.906	95.2
2	0.208	1.040	5.0	1.0	1.997	95.7
3	0.315	1.575	5.0	1.0	2.546	97.1
4	0.407	2.035	10.0	2.0	3.997	98.1
5	0.521	2.605	10.0	2.0	4.591	99.3
6	0.606	3.030	20.0	4.0	7.051	100.5

4 结 论

本文所建立的二极管阵列反相高压液相色谱法能同时测定蜂胶样品中的白杨素、高良姜素两种功效成分。该方法操作简单，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，适用于一些保健食品中蜂胶含量的测定和鉴别。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典. 蜂胶. 中国医药科技出版社. 2010, 一部: 336-337.

[2] 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, 21(1): 77-80.

[3] 史娟, 杨海涛. 白杨素及其碘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.

[4] 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. 药物分析杂志[J]. 2010, 30(4): 592-595.

[5] 隋殿军, 董金香, 邱智东, 等. 不同基源蜂胶中白杨素和高良姜素含量的比较[J]. 吉林大学学报(医学版), 2011, 37(4): 675-677.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



孙艳芳, 女, 学士, 主管技师。研究方向: 卫生检验。
E-mail: fangzi_2011@163.com



肖白曼, 女, 主任技师, 研究方向: 卫生检验。
E-mail: gwjyk2003@yahoo.com.cn