

高效液相色谱法测定保健食品中阿替匹林 C 的含量

杨耀群*, 杨露

(湖南省职业病防治院, 长沙 410007)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定保健食品中阿替匹林 C 的方法。**方法** 保健食品直接用甲醇超声提取, 加水稀释, 采用 Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱分离, 甲醇:1%乙酸水溶液作流动相, 紫外检测器 310 nm 波长检测, 外标法定量。**结果** 阿替匹林 C 在 0.80–40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性良好, 相关系数为 0.9999, 方法回收率为 99.2%–102.2%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.1%, 检出限(limit of detection, LOD)为 0.018 mg/100 g。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合保健食品中阿替匹林 C 的测定。

关键词: 阿替匹林 C; 高效液相色谱法; 保健食品; 蜂胶

Determination of Artepillin C in health care products by high performance liquid chromatography

Yang Yao-Qun*, Yang Lu

(Hunan Prevention and Treatment Center for Occupational Diseases, Changsha 410007, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determining Artepillin C in health food by high performance liquid chromatography **Methods** Health care products sample were extracted by ultrasonic with methanol and diluted with water, separated by Agilent ZORBAX SB-Aq column, methanol: 1% acetic acid solution as mobile phase, detected by ultraviolet detector at 310 nm wavelength, and quantified by external standard method. **Results** The calibration curve of Artepillin C showed a good linearity in the range of 0.80–40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r=0.9999$). The recoveries of Artepillin C were in the range of 99.2%–102.2%. The relative standard deviation was 1.1%, and the limits were 0.018 mg/100 g. **Conclusions** The method is rapid, accurate and sensitive. It is suitable for the determination of Artepillin C in health care products.

KEY WORDS: Artepillin C; high performance liquid chromatography; health care products; propolis

1 引言

蜂胶是蜜蜂从植物叶芽或树干破皮伤处采集的树脂类与其上腭腺、蜡腺的分泌物混合而成的具有芳香气味的物质^[1]。蜂胶具有多种生物活性, 如抗氧化、抗炎、抑菌、免疫调节、保肝护肝、抗癌等^[2]。由于其广泛的生物学活

性, 目前已广泛应用于食品、保健品和药品等行业^[3]。

阿替匹林 C 学名 3, 5-二异戊二烯基-4-羟基肉桂酸, 是蜂胶中一种特有的有效成分, 其具有抗菌、抗肿瘤和抗溃疡作用的成分^[4,5], 有研究表明阿替匹林 C 在降血糖^[6]、抑制肿瘤细胞生长^[7]、诱发白血病肿瘤细胞凋亡^[8]和加速肿瘤细胞凋亡^[9]过程中发挥关键作用。阿替匹林 C 曾被认

*通讯作者: 杨耀群, 主管技师, 主要研究方向为保健食品理化检测。E-mail: 851250094@qq.com

*Corresponding author: YANG Yao-Qun, Technician, Hunan prevention and treatment center for occupational diseases, No.21, Yuhua Road, Yuhua District, Changsha 410007, China. E-mail: 851250094@qq.com

为仅存在于巴西绿蜂胶(brazilian green propolis)^[10], 但有研究表明通过对国内外不同产地蜂胶成分比较发现, 部分国产蜂胶也含有一定量的阿替匹林 C^[11]。随着蜂胶被广泛用于保健食品生产的原料, 建立适用于保健食品中阿替匹林 C 的检验方法非常有必要。目前阿替匹林 C 的检测方法研究多集中于单一的蜂胶样品, 提取方法主要有超临界流体萃取^[12]和溶剂提取^[13], 测定方法主要使用高效液相色谱法^[14,15]。但上述方法检测时间较长, 流动相酸度较大, 而且对于通常含有多种中药材成分、基质更复杂、阿替匹林 C 含量更低、成品质状更多样的保健食品, 提取方法也不适用。

本研究考察了以蜂胶为原料的保健食品中阿替匹林 C 测定的前处理方法和液相色谱条件, 不同溶剂和不同提取方式的提取效果, 不同性状(液体、油状软胶囊和固体片剂)、不同成分的保健食品的色谱分离效果, 以期建立能快速、高效和准确检测保健食品中阿替匹林 C 的方法, 对蜂胶类保健食品的质量进行有效控制。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1260 高效液相色谱(美国安捷伦公司); MS205DU 电子天平(瑞士梅特勒公司); 5430R 离心机(德国艾本德公司); KQ-400DB 超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 冰乙酸(分析纯, 天津科密欧); 阿替匹林 C 标准品(lot: ZZS18092505, 甄准生物公司); 试验用水为超纯水。

样品: ①诺维利牌蜂胶液; ②丹溪康牌蜂胶红曲青钱柳叶亚麻籽油软胶囊; ③晟乐康牌灵芝蜂胶片(市售)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准品溶液配制

(1) 标准储备液配制

准确称取阿替匹林 C 标准品 4 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) 标准曲线的绘制

准确量取上述标准储备液适量, 用甲醇配制成浓度为 0.8、1.6、4.0、8.0、16.0、40.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列。

将阿替匹林 C 标准系列溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 进高效液相色谱分析, 记录色谱图, 以阿替匹林 C 浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程。

2.2.2 样品前处理

准确称取混合均匀的样品 0.5 g 于 10 mL 容量瓶, 加甲醇 7.5 mL, 超声提取 15 min, 使样品分散均匀, 待冷却后加水稀释至刻度, 混匀, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清

液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 进行高效液相色谱分析。

2.2.3 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), 流动相为甲醇:1% 乙酸水溶液=75:25(V:V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 5 μL , 检测波长为 310 nm。

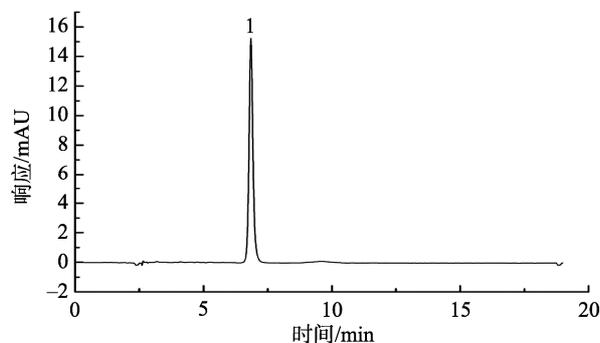
3 结果与分析

3.1 提取条件的选择

本研究考察了不同溶剂对不同性状样品提取效果的影响。分别采用 85%乙醇水溶液、75%甲醇水溶液和甲醇分别对液体、固体和油状样品超声提取。结果表明, 3 种溶剂提取的样品色谱峰无明显差别, 对于液体和固体样品, 提取效率无明显差别。但对于油状样品, 85%乙醇水溶液和 75%甲醇水溶液超声提取效果较差, 样品无法充分分散溶解; 采用甲醇为溶剂超声提取时, 样品分散均匀, 溶解效果好, 但进样后因流动相中甲醇含量为 75%, 提取液中溶解的油脂会在色谱柱中析出, 而导致色谱柱的堵塞。故本研究选择先用甲醇超声提取, 样品分散均匀后, 加水至与流动相相同比例, 使多余油脂析出, 再经离心、过滤后, 进样分析。

3.2 色谱条件优化

本研究在 GH/T 1114-2015 方法^[14]的色谱条件上进行优化, 分别考察了色谱柱的选择和流动相比例的选择。在色谱柱选择上比较了 5 μm , 4.6 mm \times 150 mm 的色谱柱与 5 μm , 4.6 mm \times 250 mm 的色谱柱, 结果表明 250mm 色谱柱分离效果更好, 适合分析成分组成更复杂的保健食品。在流动相比例选择上, 比较了 GH/T 1114-2015 方法^[14]的流动相条件与采用甲醇:1%乙酸溶液=75:25(V:V)等度洗脱, 结果表明采用甲醇:1%乙酸溶液=75:25(V:V)等度洗脱色谱图基线平稳, 将不同成分与性状的样品提取进样, 阿替匹林 C 与基质中干扰物质能基本分离, 分析时间由 GH/T 1114-2015 方法^[14]的 80 分钟缩短到 19 分钟, 提高效率, 节省流动相成本。阿替匹林 C 标准品色谱图及样品①、样品②、样品③色谱图分别见图 1、图 2、图 3、图 4。



注: 阿替匹林 C 浓度为 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 1 阿替匹林 C 标准品色谱图

Fig.1 Chromatogram of Artepillin C standard solution

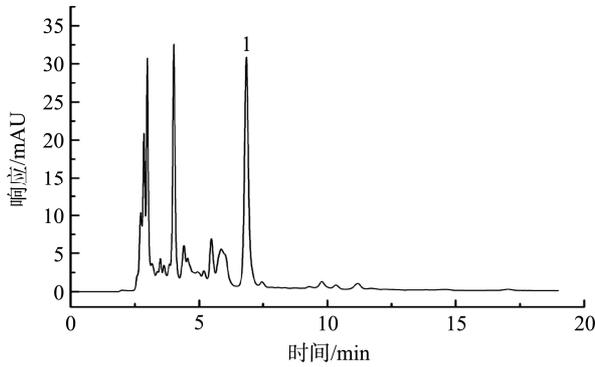


图 2 样品①色谱图

Fig.2 Chromatogram of sample①

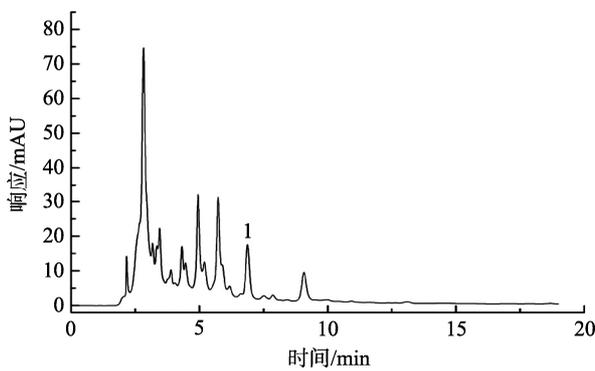


图 3 样品②色谱图

Fig.3 Chromatogram of sample②

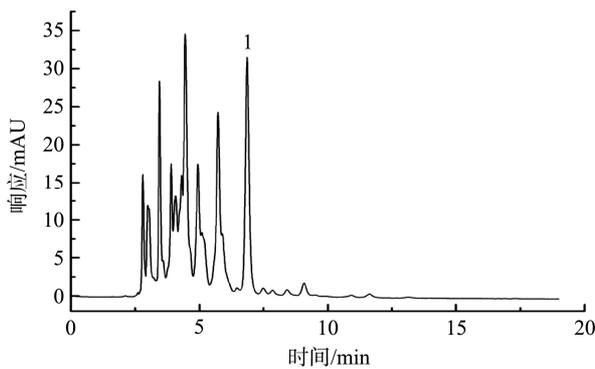


图 4 样品③色谱图

Fig.4 Chromatogram of sample③

3.3 线性关系

按 2.2.1 配制的阿替匹林 C 标准溶液绘制曲线, 阿替匹林 C 标准曲线方程为 $Y=38.97X+0.6135$, 相关系数 $r=0.9999$, 表明阿替匹林 C 浓度在 $0.80\sim 40.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内具有良好的线性关系。

3.4 检出限

以 3 倍仪器噪声与阿替匹林 C 峰高-浓度标准曲线回

归方程斜率(b)的比值计算阿替匹林 C 的检出限。经试验得到仪器噪声为 $0.01041\ \text{mAU}$, 按 2.2.1 配制的阿替匹林 C 标准溶液绘制曲线, 阿替匹林 C 峰高-浓度标准曲线回归方程斜率 $b=3.534$, 计算得阿替匹林 C 仪器检出限为 $0.0088\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 当取样量为 $0.5\ \text{g}$, 按 2.2.2 方法处理, 计算得阿替匹林 C 的 LOD 为 $0.018\ \text{mg}/100\ \text{g}$ 。

3.5 精密度

准确称取 6 份样品①, 按 2.2.2 方法处理样品并测定, 计算阿替匹林 C 的含量及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 计算结果见表 1。6 份样品阿替匹林 C 含量的 RSD 为 0.59% , 表明本方法具有良好的精密度。

表 1 精密度实验结果($n=6$)Table 1 The precision of the experiment ($n=6$)

编号	称样量/g	含量 /(mg/100 g)	平均含量 /(mg/100 g)	RSD/%
1	0.5065	17.29	17.42	0.59
2	0.5041	17.60		
3	0.5067	17.37		
4	0.5033	17.44		
5	0.5072	17.40		
6	0.5058	17.45		

3.6 回收率

准确称取 9 份样品①, 按样品含量加入高中低 3 个不同量的标准溶液, 按 2.2.2 方法处理样品并测定, 计算加标回收率, 结果见表 2。回收率为 $99.2\%\sim 102.2\%$, RSD 为 1.1% , 表明本方法具有良好的准确度。

表 2 加标回收率实验结果($n=3$)Table 2 Results of recovery tests ($n=3$)

编号	样品含量 / μg	加入量 / μg	测得总量 / μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	88.2	43.4	132.3	101.6	101.0	1.1
2	88.1	43.4	132.0	101.2		
3	88.0	43.4	131.8	100.9		
4	88.0	86.8	174.2	99.3		
5	88.1	86.8	176.5	101.8		
6	88.2	86.8	176.6	101.8		
7	87.9	130.2	217.1	99.2		
8	87.7	130.2	220.7	102.2		
9	88.3	130.2	220.1	101.2		

3.7 稳定性

准确称取样品①, 按 2.2.2 方法处理, 将样品待测液

于室温、避光条件下放置, 分别于放置 0、1、2、4、8、10、12 h 后进样分析, 计算阿替匹林 C 的含量及相对标准偏差, 结果见表 3。RSD 为 0.13 %, 表明样品溶液在 12 h 内阿替匹林 C 含量稳定。

3.8 实际样品检测

采用本方法对市售 3 种保健食品中阿替匹林 C 含量进行了测定, 样品的检测结果见表 4。

表 3 稳定性实验结果
Table 3 Results of stability tests

编号	放置时间/h	含量/(mg/100 g)	平均含量/(mg/100 g)	RSD/%
1	0	17.52		
2	2	17.48		
3	4	17.51		
4	6	17.53	17.52	0.13
5	8	17.54		
6	10	17.50		
7	12	17.54		

表 4 保健食品中阿替匹林 C 的含量
Table 4 Content of Artepillin C in health foods

样品	含量/(mg/100 g)
诺维利牌蜂胶液	17.40
丹溪康牌蜂胶红曲青钱柳叶亚麻籽油软胶囊	7.54
晟乐康牌灵芝蜂胶片	16.70

4 结论与讨论

随着对蜂胶研究的深入, 蜂胶所含有的丰富而独特的生物活性物质, 对人体广泛的医疗、保健作用越来越被人们了解, 以蜂胶为原料制成的保健食品越来越受到欢迎。阿替匹林 C 作为蜂胶中重要的有效成分, 为其建立一种保健食品中含量测定方法是很有必要的。本研究在国标方法的基础上, 优化了提取条件和色谱条件, 同时优化了线性范围和检出限, 来适应比单一蜂胶样品有更加复杂的样品基质和样品性状的保健食品检测。结果表明, 以甲醇超声提取, 加水稀释的前处理方法, 提取效率高, 适合液体、固体和油状保健食品中阿替匹林 C 的提取; 以甲醇:1% 乙酸溶液=75:25(V:V)为流动相等度洗脱时, 阿替匹林 C 色谱峰与样品基质峰能完全分离, 峰型良好且分析时间短, 能提高效率, 节省流动相成本。本研究建立的高效液相色谱法测定保健食品中阿替匹林 C 含量, 方法准确可靠, 通用性强, 具有样品前处理方法简便, 分析时间短, 分离效

果好, 精密度和回收率高, 样品提取液稳定性好, 样品检出限高等优势, 方法可应用性强, 对蜂胶类保健食品的质量控制具有重要意义。

参考文献

- [1] 彭立影, 刘功良, 李南薇, 等. 蜂胶有效成分检测的研究进展[J]. 农产品加工, 2019, (4): 75-78.
Peng LY, Liu GL, Li NW, et al. Research developments of detecting effective components of propolis [J]. Farm Prod Proc, 2019, (4): 75-78.
- [2] 郑宇斐, 蒋侠森, 陈曦, 等. 2018 年国内外蜂胶的研究概况[J]. 蜜蜂杂志, 2019, 39(4): 1-8.
Zheng YF, Jiang XS, Chen X, et al. Research status of propolis in 2018 [J]. J Bee, 2019, 39(4): 1-8.
- [3] 袁雯雯, 常化松, 玄红专. 蜂胶抗炎功效成分研究[J]. 中国蜂业, 2019, (1): 65-68.
Yuan WW, Chang HS, Xuan HZ. Study on the anti-inflammatory bioactive constituents of Chinese propolis [J]. Apicul China, 2019, (1): 65-68.
- [4] 黄文诚. 蜂胶中的抗菌和抗肿瘤成分—阿替匹林[J]. 蜜蜂杂志, 2002, (4): 7-8.
Huang WC. Antifungal and anti-tumor components in propolis [J]. J Bee, 2002, (4): 7-8.
- [5] Philipe C, Marilia OA, Marivane L, et al. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action [J]. J Ethnopharmacol, 2018, (8): 82-89.
- [6] Choi SS, Cha BY, Lida K, et al. Artepillin C, as a PPAR γ ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(7):925-933.
- [7] Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by Artepillin C extracted from Brazilian propolis [J]. Cancer Detect Prew, 1998, 22(6): 506-515.
- [8] Kimoto T, Aga M, Hino K, et al. A poptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis [J]. Anticancer Res, 2001, 21(1): 221-228.
- [9] Szliszka E, Zydowicz G, Mizgala E, et al. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. Int J Oncol, 2012, 41(3): 818-828.
- [10] Messerli SM, Ahn MR, Kunimasa K, et al. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice [J]. Phytother Res, 2008, 23(3): 423-427.
- [11] 吴健全, 高蔚娜, 韦京豫, 等. 不同产地蜂胶成分含量的比较[J]. 中国食物与营养, 2013, (7): 62-65.
Wu JQ, Gao WN, Wei JY, et al. Comparative study on the components in propolis from different areas [J]. Food Nutr China, 2013, (7): 62-65.
- [12] Monroy YM, Rodrigues RA, Rodrigues MV, et al. Fractionation of ethanolic and hydroalcoholic extracts of green propolis using supercritical carbon dioxide as an anti-solvent to obtain Artepillin rich-extract [J]. J Supercrit Fluid, 2018, (138): 167-173.
- [13] 张文文, 王凯, 孙丽萍, 等. 蜂胶提取工艺研究进展[J]. 中国蜂业, 2018, 69(7): 51-53.
Zhang WW, Wang K, Sun LP, et al. Research progress on extraction technology of propolis [J]. Apicul China, 2018, 69(7): 51-53.

- [14] GH/T 1114-2015 蜂胶中阿替匹林 C 的测定方法 高效液相色谱法[S].
GH/T 1114-2015 Method for the determination of *Artepillin C* in propolis-High-performance liquid chromatography [S].
- [15] 韩利文, 刘可春, 王思锋, 等. HPLC 法测定蜂胶中阿替匹林的含量[J]. 中国药事, 2008, (4), 312-314.
Han LW, Liu KC, Wang SF, *et al.* Determination of *Artepillin C* in propolis by HPLC [J]. *Chin Pharm Affairs*, 2008, (4), 312-314.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



杨耀群, 主管技师, 主要研究方向为保健食品理化检测。
E-mail: 851250094@qq.com