

RP-HPLC 测定蜂胶中乔松素、白杨素和高良姜素的含量

文萍¹, 范婷婷¹, 吕武清^{1*}, 姚剑平¹, 胡棠洪², 李淑岚³, 俞建辉³

(1. 江西省中医药研究院, 南昌 330046; 2. 江西省保健品协会, 南昌 330046;
3. 江西汪氏蜜蜂园有限公司, 江西 新建 330100)

[摘要] 目的: 采用反相高效液相色谱法测定蜂胶中乔松素、白杨素和高良姜素的含量。方法: 使用 YMC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸 (40:60), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长, 乔松素 290 nm, 白杨素和高良姜素 268 nm, 柱温 30 °C。结果: 乔松素、白杨素和高良姜素分别在 4.266 ~ 426.6, 4.59 ~ 459, 4.322 ~ 432.62 mg·L⁻¹ 线性关系良好, 平均回收率 (n = 6) 分别为 98.28%, 98.82%, 100.77%, RSD 分别为 0.89%, 0.90%, 1.32%。结论: 方法简便、准确、重复性好, 可为蜂胶的质量控制提供实验依据。

[关键词] 蜂胶; 乔松素; 白杨素; 高良姜素; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)19-0108-03

[doi] 10.11653/syjf2013190108

RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Propolis Pinocembrin, Chrysin and Galangin Concentration

WEN Ping¹, FAN Ting-ting¹, LU Wu-qing^{1*}, YAO Jian-ping¹, HU Tang-hong², LI Shu-lan³, YU Jian-hui³

(1. Jiangxi Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330046, China;
2. Health Products Association of Jiangxi Province, Nanchang 330046, China;
3. Jiangxi Wang Bee Park Company Limited, Xinjian 330100, China)

[Abstract] **Objective:** By reversed phase high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of propolis pinocembrin, chrysin and galangin concentration. **Method:** YMC-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-0.1% phosphoric acid (40:60) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ detected at 268 nm for chrysin and galangin, 290 nm for pinocembrin. The column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** Pinocembrin, chrysin and galangin were linear respectively in the range of 4.266-426.6, 4.59-459, 4.322-432.62 mg·L⁻¹. The average recovery rates (n = 6) were 98.28%, 98.82% and 100.77%; RSD was 0.89%, 0.90% and 1.32%. **Conclusion:** The method is simple, accurate, reproducible, and can be as propolis quality control of Chinese medicinal materials and provide experimental basis.

[Key words] propolis; pinocembrin; chrysin; galangin; HPLC

[收稿日期] 20121114(001)

[基金项目] 国家食品药品监督管理局科技计划项目 (2009342)

[第一作者] 文萍, 助理研究员, 从事中药分析研究, Tel: 13803502552, E-mail: wenp818@yahoo.cn

[通讯作者] * 吕武清, 研究员, 硕士研究生导师, 从事中药新药及质量控制技术研究, Tel: 0791-88512906, E-mail: jxzyys@163.com

蜂胶是蜜蜂采集植物树脂混入自身腺、蜡腺等分泌物混合形成的胶黏性物质。蜂胶化学成分非常复杂, 黄酮类化合物为其主要成分, 已知成分还有萜烯类、有机酸、醛类、醇类、酚类、酶等^[1-2], 其中黄酮类化合物具有多种生理活性如抗病毒、消炎、增强免疫、降血脂、降糖、保肝、护肾、抗艾滋病毒、抗菌、抗原虫、抗诱变、抗氧化的作用^[3-4]。目前质量控制主要测定其白杨素、高良姜素^[5-7]。而乔松素

为其黄酮类成分含量最高成分之一^[8],因此本文采用反相高效液相色谱法对蜂胶中乔松素、白杨素和高良姜素进行了含量测定研究,为蜂胶药材的质量控制提供科学依据。

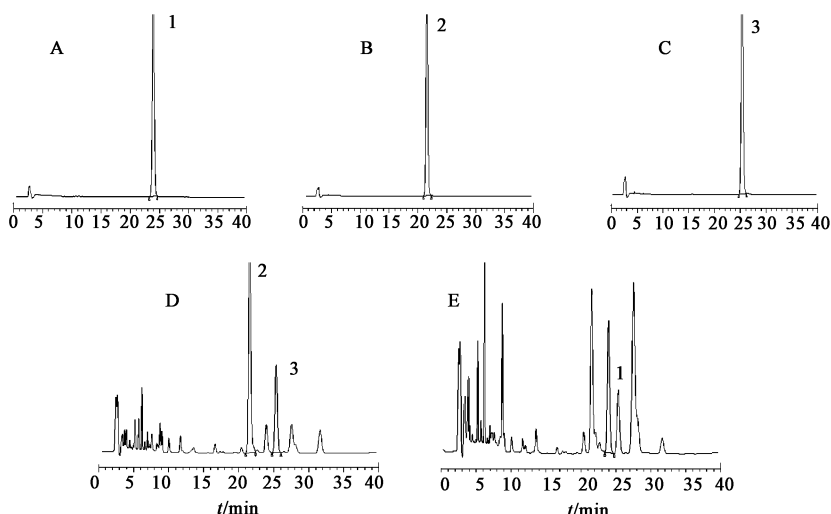
1 材料

Waters 1525-2487-2707 型高效液相色谱仪,Empower 工作站,Simplicity™型超纯水系统(Millipore公司),CQ-250型超声波清洗仪(上海船舶设备电子研究所),乔松素、白杨素和高良姜素对照品(均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为111691-200501,111701-200501,111829-200801),蜂胶为课题组收集云南、四川、江西、湖南、山东、河南、山西、内蒙、辽宁、陕西、甘肃、新疆等地95个蜂胶(*Propolis*)样品(由江西省中医药研究院中药室研究员虞金宝鉴

定),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 系统适应性实验 参考《中国药典》2010年版一部蜂胶项下含量测定方法,以YMC-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)为色谱柱,柱温室温,理论板数不低于2 000。选择甲醇-0.1%磷酸溶液,乙腈-0.1%磷酸溶液,以不同容积比进行分离,流速1.0 mL·min⁻¹,结果以乙腈-0.1%磷酸溶液(42:60)作流动相峰型好,分离效果好;检测波长白杨素和高良姜素268 nm,乔松素以甲醇溶解,在200~400 nm进行光谱扫描,结果在290 nm波长处有最大吸收。在此条件下蜂胶药材供试品溶液中乔松素、白杨素和高良姜素色谱峰有良好的分离(图1)。



1. 乔松素;2. 白杨素;3. 高良姜素;A~C. 对照品;D. 供试品色谱图(268 nm);E. 供试品色谱图(290 nm)

图1 蜂胶液相色谱

2.2 供试品溶液的制备 取本品约0.1 g,精密称定,置100 mL量瓶中,加甲醇适量,超声处理30 min,取出,放置至室温,加甲醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品溶液。

2.3 线性关系的考察 精密称定乔松素对照品21.33 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇使溶解并加至刻度,摇匀,得426.6 mg·L⁻¹乔松素对照品溶液。取此对照品溶液,分别加甲醇进行稀释成4.266,8.532,17.064,21.33,42.66,85.32 mg·L⁻¹。精密称定白杨素对照品22.95 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇使溶解并加至刻度,摇匀,得459 mg·L⁻¹白杨素对照品溶液。取此对照品溶液,分别加甲醇进行稀释成4.59,9.18,18.36,36.72,45.90,91.8 mg·L⁻¹。精密称定高良姜素对照品21.61 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇使溶解并加至刻度,摇匀,得432.2 mg·

L⁻¹高良姜素对照品溶液。取此对照品溶液,分别加甲醇进行稀释成4.322,8.644,17.288,34.576,43.22,86.44 mg·L⁻¹。分别精密吸取10 μL注入液相色谱仪,按确定的色谱条件测定峰面积,将乔松素、白杨素、和高良姜素浓度与相应峰面积进行回归处理,得回归方程 $Y_{\text{乔松素}} = 53\ 869.072X + 69\ 784$, $Y_{\text{白杨素}} = 171\ 711.37X + 111\ 199$, $Y_{\text{高良姜素}} = 43\ 026.955X + 73\ 186$ ($r=0.999\ 9$),结果表明乔松素、白杨素、高良姜素分别在4.266~426.6,4.59~459.0,4.322~432.2 mg·L⁻¹呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液10 μL,注入液相色谱仪中,连续进样6次,测定供试品溶液中乔松素、白杨素、高良姜素峰面积值,数据结果经分析RSD分别为0.05%,0.20%,0.37%,说明仪器精度高。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0, 1, 3, 12, 18, 24 h 注入液相色谱仪中, 测定乔松素、白杨素、高良姜素峰面积, 数据结果经分析 RSD 分别为 0.41% , 0.38% , 0.54% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验 取同一批蜂胶药材共 6 份, 测得乔松素、白杨素、高良姜素平均含量分别为 6.22% , 5.89% , 4.15% , RSD 分别为 0.13% , 0.12% , 0.25% , 说明方法稳定。

2.7 回收率试验 取本品 0.1 g 共 6 份, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 精密加入混合对照品溶液 25 mL (乔松素 42.42 mg·L⁻¹, 白杨素 53.725 mg·L⁻¹, 高良姜素 43.22 mg·L⁻¹), 再加入甲醇至刻度线, 按含量测定方法测定, 计算回收率(表 1)。

7.54% , 平均含量为 4.19% ; 样品中高良姜素含量范围从 3.29% ~ 6.33% , 平均含量为 4.01% 。根据实验结果, 拟定蜂胶中乔松素含量不得少于 3.5% , 白杨素含量定为不得少于 3.0% , 高良姜素含量不得少于 3.0% 。

3 讨论

乔松素具有抗病毒、增强免疫、降血脂、降糖等多种生理活性^[9-11], 为蜂胶中黄酮类成分含量最高成分之一, 《中国药典》2010 年版一部蜂胶仅对白杨素和高良姜素进行了含量测定, 蜂胶中乔松素的含量测定方法目前还没有文献报道。因此, 有必要增加乔松素含量控制指标。白杨素和高良姜素的检测波长为 268 nm, 乔松素在 290 nm 波长处有最大吸收, 在本实验条件下, 采用双波长同时测定蜂胶中乔松素、白杨素和高良姜素的含量, 为蜂胶药材的质量控制提供科学依据。

[参考文献]

[1] 王亚群, 任永新. 蜂胶的化学成分及其保健作用[J]. 食品与药品, 2006, 8(12A):75.

[2] 南焱, 郭伽, 郑莲香, 等. 蜂胶化学成分研究进展[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2006, 8(1):62.

[3] 蒋春红, 吕武清, 胡棠洪. 蜂胶的药理作用研究概况[J]. 中国医药指南, 2011, 17(9):42.

[4] 孟晓英, 王玉华, 魏春琴. 蜂胶药理作用研究概述[J]. 中国现代药物应用, 2010, 18(4):245.

[5] 曹炜, 符军放, 索志容, 等. 蜂胶中白杨素和高良姜素的 HPLC 分析[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4):522.

[6] 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.

[7] 周立东, 郭伽, 余竞光. 北京蜂胶的黄酮类成分[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(3):162.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:336.

[9] 肖利龙, 杭丽涓, 陈亚. 云南蜂胶化学成分研究 I [J]. 蜜蜂杂志, 2012, 32(2):8.

[10] 杨明, 隋殿军, 孙红, 等. 蜂胶总黄酮抗心肌缺血作用[J]. 中草药, 2006, 37(2):253.

[11] 王宗伟, 黄兆胜. 蜂胶的药理作用[J]. 国外医药:植物药分册, 1997, 12(4):151.

[责任编辑 顾雪竹]

表 1 蜂胶中乔松素, 白杨素和高良姜素加样回收率试验

组分	原有量 /μg	加入量 /μg	测得总量 /μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
乔松素	1 084.11	1 060.5	2 117.91	97.48	98.28	0.90
	1 247.49	1 060.5	2 281.90	97.54		
	1 035.57	1 060.5	2 079.96	98.48		
	1 191.77	1 060.5	2 234.81	98.35		
	1 061.32	1 060.5	2 099.85	97.93		
	1 276.20	1 060.5	2 335.30	99.87		
白杨素	1 511.53	1 343.125	2 824.03	97.72	98.82	0.89
	1 739.32	1 343.125	3 054.04	97.89		
	1 443.84	1 343.125	2 784.89	99.85		
	1 661.62	1 343.125	2 989.42	98.86		
	1 479.75	1 343.125	2 808.79	98.95		
	1 779.34	1 343.125	3 117.64	99.64		
高良姜素	1 066.13	1 080.5	2 133.07	98.74	100.77	1.32
	1 226.79	1 080.5	2 311.69	100.41		
	1 018.39	1 080.5	2 107.23	100.77		
	1 171.99	1 080.5	2 266.60	101.31		
	1 043.71	1 080.5	2 130.33	100.57		
	1 255.03	1 080.5	2 365.97	102.82		

2.8 样品测定 对收集的 95 批样品, 按 2.2 项下方法制备供试液, 注入液相仪进行含量测定, 测得样品中乔松素含量范围从 3.86% ~ 8.60% , 平均含量为 4.24% ; 样品中白杨素含量范围从 3.47% ~