

超高效液相色谱法同时测定蜂胶中的12种活性成分

李 熠, 赵 静, 薛晓锋, 周金慧

(中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要 :采用超高效液相色谱法同时测定了蜂胶中类黄酮、阿魏酸、咖啡酸苯乙酯等12种活性成分。蜂胶样品用甲醇稀释,超声波提取,样液过滤后以Acquity BEH C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)为分离柱,0.4%磷酸水溶液和甲醇为流动相,梯度洗脱,采用二极管阵列检测器检测。整个分离过程在9.5 min内完成。以加标蜂胶样品做添加回收测定,12种化合物的回收率为90.1%~104.3%,相对标准偏差为2.12%~4.90%。该方法为评价蜂胶质量提供了一种新的检测方法,已应用于实际蜂胶样品的测定。

关键词 :超高效液相色谱;活性成分;蜂胶

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2007)06-0857-04 栏目类别 :研究论文

Determination of Twelve Active Compounds in Propolis Using Ultra-Performance Liquid Chromatography

LI Yi, ZHAO Jing, XUE Xiaofeng, ZHOU Jinhui

(Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract : In this study, a fast, selective and sensitive ultra-performance liquid chromatographic method (UPLC) with photodiode array detection (DAD) was developed to determine 12 active compounds, such as flavonoids, ferulic acid, caffeic acid phenethyl ester, etc. in propolis. The propolis sample was diluted with methanol and extracted by sonication. The gradient separation was achieved within 9.5 min by using an Acquity BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with 0.4% phosphoric acid aqueous solution and methanol as the mobile phase. The experimental parameters were optimized and adapted to analyse propolis samples from different production areas in China. The spiked recoveries were 90.1% - 104.3% with relative standard deviations of 2.12% - 4.90%. This method can be used as a novel method for quality control of propolis. The results are validated through testing 106 propolis samples from various production areas.

Key words : ultra-performance liquid chromatography (UPLC); active compounds; propolis

蜂胶是蜜蜂用从植物幼芽与树干上采集来的树脂并混入它的上颚腺分泌物和蜂蜡等加工而成的一种具有芳香气味的胶状固体物。蜂胶的化学成分复杂,迄今发现已有上百种之多。现代药理研究表明,其功效成分主要为黄酮类、酸类、酯类化合物等。研究显示这些化合物具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、消炎镇痛、防腐保鲜等多种功效,能增加机体免疫力,促进组织再生。随着蜜蜂采集蜂胶的季节、地区和蜜源植物不同,其包含黄酮、酸和酯类化合物的种类和含量也不同^[1-3]。从蜂胶中分离的黄酮化合物有20多种,常见的为芦丁、杨梅酮、桑色素、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松鼠素、柯因、高良姜素和金合

欢素,分离出的酸类化合物主要有阿魏酸,分离出的酯类化合物主要为咖啡酸苯乙酯。目前,对于蜂胶质量的评价主要是依据黄酮的含量高低。评价方法主要有分光光度法^[4]、高效液相色谱法^[5-9]、毛细管电泳法^[10,11]、液相色谱-串联质谱检测法^[12]等。随着蜂胶产业的迅速发展,蜂胶被广泛地应用于医药、食品、化妆品等领域,蜂胶中阿魏酸、咖啡酸苯乙酯等主要活性物质的含量多少也直接影响到蜂胶的生理活性。仅用黄酮类化合物的含量来控制蜂胶质量已不能满足要求。目前,同时测定咖啡酸、阿魏酸、咖啡酸苯乙酯及多种类黄酮的方法还少有报道。本文建立了一种采用超高效液相色谱梯度洗脱的测定

收稿日期 2007-04-29

第一作者:李 熠,男,硕士研究生,助理研究员,Tel (010)82597882,E-mail snonxin@yahoo.com.cn.

通讯联系人:赵 静,女,研究员,E-mail zhaojingjun@sina.com.

基金项目:科技部科研院所公益基金专项资助课题(2004DIB4J144).

方法,能够同时测定蜂胶中的阿魏酸、芦丁、杨梅酮、桑色素、槲皮素、苜蓿醇、芹菜素、松鼠素、柯因、高良姜素、金合欢素和咖啡酸苯乙酯,为建立蜂胶的指纹图谱和评价蜂胶质量提供了一种新的方法。该方法可用于不同地域和不同植物源蜂胶样品的测定。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters ACQUITY 超高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器)。阿魏酸(ferulic acid)、芦丁(rutin)、杨梅酮(myricetin)、桑色素(morin)、槲皮素(quercetin)、苜蓿醇(kaempferol)、芹菜素(apigenin)、松鼠素(pinocembrin)、柯因(chrysin)、高良姜素(galangin)、金合欢素(acacia)和咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester)标准品:纯度高于98%,均购自Sigma公司。以上12种标准品均用甲醇溶解配制成0.2 g/L的标准储备溶液,再根据需要用甲醇稀释成适量质量浓度的混合标准溶液,于-18℃条件下避光保存。水为去离子水,磷酸为优级纯,甲醇为色谱纯。

1.2 样品处理

准确称量0.2 g提纯蜂胶样品,置于50 mL容量瓶中,加入40 mL甲醇,在超声波水浴中超声20 min,待样品完全溶解后取出冷却至室温,用甲醇定容至50 mL,摇匀。用0.45 μm注射过滤器将试样溶液过滤至样品瓶内,摇匀后供超高效液相色谱测定。

1.3 色谱条件

色谱柱:Acquity BEH C₁₈柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, Waters公司, USA);流动相:0.4%磷酸水溶液和甲醇,流速为0.4 mL/min,梯度洗脱程序为0~4 min,30%甲醇;4~6 min,30%甲醇~62%甲醇;6~7 min,62%甲醇~80%甲醇;7~8 min,80%甲醇~100%甲醇;8~9.5 min,100%甲醇~30%甲醇;柱温:40℃;进样量:1 μL;扫描波长范围200~400 nm。以保留时间和紫外吸收光谱定性,峰面积定量。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

2.1.1 流动相类型的选择

蜂胶组分复杂,采用等度洗脱很难将蜂胶中的多种组分分离,因此本文采用梯度洗脱方式分离蜂胶组分。在选定的色谱条件下,分别采用乙腈和磷酸水溶液、甲醇和磷酸水溶液两种流动相体系对12种化合物的混合标准溶液进行测定。实验发现,当以乙腈和磷酸水溶液作为流动相时,系统的压力小,

但阿魏酸与芦丁、苜蓿醇与芹菜素之间很难达到基线分离,表明乙腈和磷酸水溶液的选择性较差;同时由于出峰时间短,不适合多种化合物的同时测定。当以用甲醇和磷酸水溶液作为流动相时,系统压力虽然高,但通过调节柱温(从30℃升到40℃),降低了系统压力,12种化合物的分离度、灵敏度和峰形均好于乙腈和磷酸水溶液作流动相时的结果。

2.1.2 流动相比例的选择

磷酸水溶液的紫外吸收本底低,可以有效地提高紫外测定的灵敏度,因此在所报道的高效液相色谱法^[6-9,12]中多选择磷酸水溶液作为流动相。配制一系列的磷酸水溶液(体积分数为0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%,0.6%)与甲醇构成流动相,发现当磷酸的体积分数达到0.4%时,12种化合物和蜂胶样品分离达到最佳。磷酸水溶液的粘度大,综合考虑分离度、灵敏度及峰形等原因,本方法选用甲醇和0.4%磷酸水溶液作为流动相。

2.2 检测条件的选择

蜂胶中的12种活性成分均有明显的紫外吸收。以往报道的方法中基本采用固定波长进行检测。但由于每种活性成分的最大吸收波长不同,固定波长检测会造成测定的灵敏度偏低,且对于基质复杂的样品不能进行峰纯度的鉴定。本文采用二极管阵列检测器,在200~400 nm范围内对12种活性成分进行紫外波长扫描。在“1.3”节的色谱条件下得到12种化合物的最大紫外吸收波长:阿魏酸280.2 nm,326.3 nm;芦丁255.8 nm,356.5 nm;杨梅酮293.9 nm;桑色素252.1 nm,352.7 nm;槲皮素216 nm,277 nm;苜蓿醇265.0 nm,365.3 nm;芹菜素266.8 nm,336.6 nm;松鼠素290.2 nm;柯因268.0 nm,314.6 nm;咖啡酸苯乙酯267.4 nm,335.3 nm;高良姜素265.6 nm,358.3 nm;金合欢素212.4 nm,289.6 nm。为了优化每种活性成分的检测灵敏度,且使定量方法简单,本文以280 nm波长对阿魏酸、槲皮素、苜蓿醇、芹菜素、柯因、高良姜素、咖啡酸苯乙酯进行定量测定,以290 nm波长对杨梅酮、松鼠素、金合欢素进行测定,以350 nm波长对芦丁、桑色素进行测定,这样使得12个组分都有最佳的检测灵敏度。

在上述色谱条件下,对标准样品和实际样品进行样分析,结果见图1。

2.3 线性范围、检出限、添加回收率和精密度

在实验条件下,所有分析物的质量浓度与峰面积之间具有良好的线性关系,具体结果和检出限($S/N=3$)见表1。采用在实际样品中加标来测定方法的回收率和精密度(以相对标准偏差(RSD)表示)结果见表2。

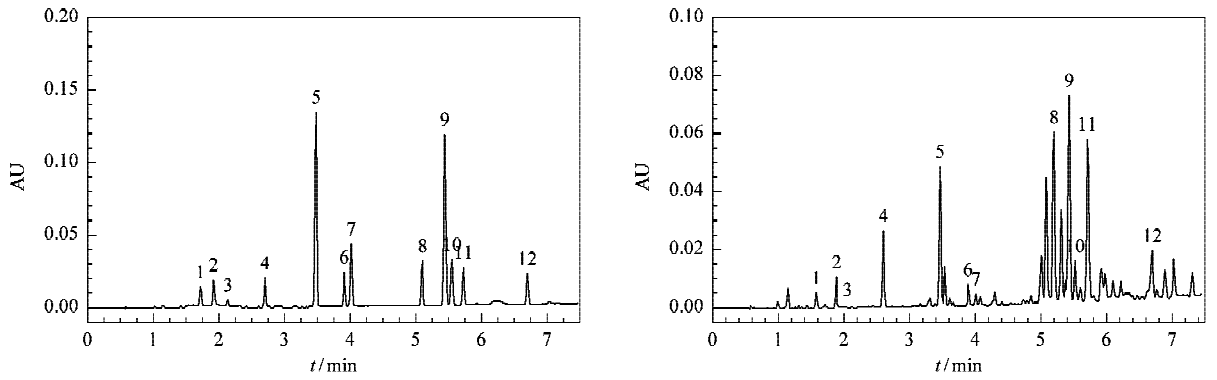


图 1 (a)12 种蜂胶活性成分标准品和 (b)实际蜂胶样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of (a) a mixture of twelve active compound standards and (b) a propolis sample

1. ferulic acid ;2. rutin ;3. myricetin ;4. morin ;5. quercetin ;6. kaempferol ;7. apigenin ;8. pinocembrin ;9. chrysin ;10. caffeic acid phenethyl ester ;11. galangin ;12. acacia.

表 1 12 种活性成分的线性关系与检出限

Table 1 Linearities and detection limits for 12 active compounds

| Compound | Linear range/ (mg/L) | Regression equation | Correlation coefficient (n = 5) | Detection limit (S/N = 3)/(mg/L) |
|------------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------------------|---|
| Ferulic acid | 4 - 2000 | $Y = -31.7 + 9763.2X$ | 0.9991 | 0.154 |
| Rutin | 4 - 2000 | $Y = 7.98 + 7685.3X$ | 0.9969 | 0.205 |
| Myricetin | 8 - 2000 | $Y = -13.7 + 6549.3X$ | 0.9974 | 0.478 |
| Morin | 8 - 2000 | $Y = -13.5 + 4356.2X$ | 0.9992 | 0.216 |
| Quercetin | 4 - 2000 | $Y = 3.76 + 2538.4X$ | 0.9985 | 0.052 |
| Kaempferol | 4 - 2000 | $Y = 13.2 + 9763.2X$ | 0.9993 | 0.211 |
| Apigenin | 4 - 2000 | $Y = 6.43 + 3152.6X$ | 0.9986 | 0.254 |
| Pinocembrin | 8 - 2000 | $Y = -4.49 + 7098.2X$ | 0.9996 | 0.247 |
| Chrysin | 4 - 2000 | $Y = -11.6 + 17662.1X$ | 0.9959 | 0.053 |
| Caffeic acid phenethyl ester | 8 - 2000 | $Y = 6.01 + 3480.3X$ | 0.9994 | 0.209 |
| Galangin | 8 - 2000 | $Y = 5.65 + 3490.7X$ | 0.9992 | 0.207 |
| Acacia | 8 - 2000 | $Y = 5.85 + 3498.6X$ | 0.9989 | 0.201 |

Y : peak area response ; X : concentrations of analytes (mg/L).

表 2 样品中 12 种活性成分的添加回收率(n = 4)

Table 2 Spiked recoveries of 12 active compounds in a sample (n = 4)

| Compound | Spiked/ (mg/kg) | Found/ (mg/kg) | Recovery/ % | RSD/ % | Compound | Spiked/ (mg/kg) | Found/ (mg/kg) | Recovery/ % | RSD/ % |
|--------------|----------------------|---------------------|----------------|-----------|------------------------------|----------------------|---------------------|----------------|-----------|
| Ferulic acid | 10 | 9.84 | 98.4 | 3.1 | Apigenin | 10 | 9.68 | 96.8 | 3.7 |
| | 50 | 49.68 | 99.4 | 2.6 | | 50 | 48.85 | 97.7 | 3.0 |
| | 100 | 99.81 | 99.8 | 2.7 | | 100 | 99.52 | 99.5 | 2.8 |
| Rutin | 10 | 9.74 | 97.4 | 3.2 | Pinocembrin | 10 | 9.49 | 94.9 | 3.1 |
| | 50 | 49.62 | 99.2 | 2.5 | | 50 | 48.57 | 97.1 | 2.5 |
| | 100 | 100.3 | 100.3 | 2.3 | | 100 | 96.82 | 96.8 | 2.7 |
| Myricetin | 10 | 9.01 | 90.1 | 4.9 | Chrysin | 10 | 10.01 | 100.1 | 3.8 |
| | 50 | 48.89 | 97.8 | 3.6 | | 50 | 49.84 | 99.7 | 3.5 |
| | 100 | 95.67 | 95.7 | 3.0 | | 100 | 99.61 | 99.6 | 3.0 |
| Morin | 10 | 9.81 | 98.1 | 2.6 | Caffeic acid phenethyl ester | 10 | 9.16 | 91.6 | 4.6 |
| | 50 | 49.85 | 99.7 | 3.1 | | 50 | 48.71 | 97.4 | 3.8 |
| | 100 | 104.3 | 104.3 | 2.2 | | 100 | 96.72 | 96.7 | 3.7 |
| Quercetin | 10 | 10.04 | 100.4 | 2.9 | Galangin | 10 | 9.42 | 94.2 | 3.1 |
| | 50 | 49.98 | 100.0 | 2.1 | | 50 | 49.06 | 98.1 | 2.9 |
| | 100 | 100.4 | 100.4 | 2.7 | | 100 | 100.3 | 100.3 | 2.2 |
| Kaempferol | 10 | 9.72 | 97.2 | 2.9 | Acacia | 10 | 9.25 | 92.5 | 4.5 |
| | 50 | 48.96 | 97.9 | 3.0 | | 50 | 48.72 | 97.4 | 4.0 |
| | 100 | 99.81 | 99.8 | 3.3 | | 100 | 97.08 | 97.1 | 3.8 |

2.4 实际样品测定

应用本方法对产自北京、河北、甘肃、陕西、云南、吉林、黑龙江、四川、山东、河南等 10 个省市的 106 份蜂胶样品进行测定。检测结果发现,蜂胶样品的产地不同,蜜蜂采集的植物源不同,所含的活性成分的种类及含量也不同。106 份样品中均含有的 7 种活性成分中,其含量有明显的差异。在测定的样品中,仅从产自甘肃的 5 份蜂胶样品中检出杨梅

酮。从产自北京、河北、甘肃的样品中未检出芦丁。桑色素、金合欢素两种活性成分仅从产自四川和云南的样品中检出。咖啡酸苯乙酯仅在产自北京、河北、吉林、黑龙江和山东的样品中检出(见表 3)。导致 12 种活性成分的组分和含量的差异的原因,有可能是不同地域和植物源,也有可能是不同的蜂胶加工工艺。关于不同加工工艺引起的组分差异和含量变化还需要进一步研究。

表 3 不同地区部分实际样品测定结果

Table 3 Contents of 12 active compounds in typical samples collected from different regions

| Production area | Ferulic acid | Rutin | Myricetin | Morin | Quercetin | Kaempferol | Apigenin | Pinocembrin | Chrysin | Caffeic acid phenethyl ester | Galangin | Acacia |
|-----------------|--------------|-------|-----------|-------|-----------|------------|----------|-------------|---------|------------------------------|----------|--------|
| Beijing | 11.3 | ND | ND | ND | 16.7 | 1.2 | 2.6 | 6.8 | 40.3 | 9.9 | 25.1 | ND |
| Hebei | 9.5 | ND | ND | ND | 20.3 | 1.6 | 3.1 | 5.9 | 38.1 | 11.3 | 28.1 | ND |
| Gansu | 12.4 | ND | 14.9 | ND | 33.1 | 1.8 | 2.5 | 17.9 | 37.6 | ND | 24.7 | ND |
| Shaanxi | 6.5 | 25.6 | ND | ND | 28.6 | 1.9 | 2.7 | 21.4 | 35.2 | ND | 30.2 | ND |
| Yunnan | 7.9 | 45.7 | ND | 12.5 | 20.4 | 3.2 | 2.8 | 18.4 | 29.5 | ND | 21.2 | 16.7 |
| Jilin | 9.6 | 15.2 | ND | ND | 6.5 | 2.5 | 2.7 | 40.2 | 18.7 | 6.5 | 17.6 | ND |
| Heilongjiang | 8.4 | 14.0 | ND | ND | 14.5 | 1.0 | 0.9 | 35.7 | 24.1 | 12.4 | 23.5 | ND |
| Sichuan | 9.4 | 33.4 | ND | 17.7 | 20.4 | 3.5 | 4.1 | 4.7 | 32.1 | ND | 25.4 | 11.2 |
| Shandong | 13.2 | 8.9 | ND | ND | 18.9 | 0.8 | 0.7 | 25.4 | 33.2 | 10.9 | 22.3 | ND |
| Henan | 15.4 | 14.6 | ND | ND | 25.7 | 1.1 | 1.6 | 21.4 | 45.4 | ND | 34.8 | ND |

ND : not detected.

3 结论

本文建立了一种超高效液相色谱-二极管阵列检测器测定蜂胶中类黄酮、阿魏酸、咖啡酸苯乙酯等 12 种活性成分的检测方法,方法快速简单,灵敏度高,弥补了仅用黄酮来评价蜂胶质量的缺陷。所建立的方法已用于实际样品的测定。

参考文献:

[1] Tomas Barberan F , Garcia Viguera C , Vit Olivier P , Ferreres F , Tomas Lorente F. *Phytochemistry* (Oxford) ,1993 , 34 (1) :191

[2] Ferreres F ,Ortiz A ,Silva C ,Garcia Viguera C ,Tomas Barberan F A , Tomas Lorente F. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* ,1992 ,194(2) :139

[3] Tomas Barberan F A , Tomas Lorente F , Ferreres F , Garcia Viguera C. *J Sci Food Agric* ,1989 ,47(3) :337

[4] Wang Y J , Cai H G , Chen S L. *Study of Beeproducts*. Bei-

jing : China Agricultural Press (王贻节,蔡宏高,陈盛禄. 蜂产品学. 北京:中国农业出版社),1994

[5] Vande Castele K , Geiger H , van Sumere C F. *J Chromatogr* ,1982 ,240 :81

[6] Barberan F A T , Tomas F , Hernandez L , Ferreres F. *J Chromatogr* ,1985 ,347 :443

[7] Repollés C , Herrero - Martínez J M , Ráfols C. *J Chromatogr A* ,2006 ,1131 :51

[8] Ferreres F , Tomas Barberan F A , Gil M I , Tomas Lorente F. *J Sci Food Agr* ,1991 ,56 :49

[9] Tomas Barberan F A , Blazquez F F M A , Garcia Viguera C , Tomas Lorente F. *J Chromatogr* ,1993 ,634 :41

[10] Ferreres F , Blazquez M A , Gil M I , Tomas Barberan F A. *J Chromatogr A* ,1994 ,669 :268

[11] Delgado C , Tomas Barberan F A , Talou T , Gaset A. *Chromatographia* ,1994 ,38 :71

[12] Pang G F , Li X M , Zhang J J , Cao Y Z , Fan C L , Jia G Q , Liu Y M. *Apiculture of China* (庞国芳,李学民,张进杰,曹彦忠,范春林, ,贾光群,刘永明. 中国养蜂) ,2004 ,55 (supplement) :30