

高效液相色谱法检测蜂胶中 黄酮类物质的研究

杨理¹, 闫清华², 邓月娥³, 牛立元¹, 张焱², 赵怡楠³

(1. 河南科技学院实验中心, 河南新乡 453003;

2. 新乡医学院生命科学技术系, 河南新乡 453003;

3. 河南科技学院化学化工学院, 河南新乡 453003)

摘要:采用高效液相色谱-二极管阵列检测器测定蜂胶中芦丁和槲皮素的含量。用去离子水浸泡-甲醇回流提取法对蜂胶进行预处理, 除去蜂胶中的蜂蜡及脂溶性杂质。色谱柱为 EclipseXDB-C₁₈ (150mm × 4.6mm, 5μm), 以甲醇和 H₃PO₄ 缓冲液 (V:V = 60:40) 为流动相, 流速为 0.45mL/min, 在 370nm 处同时测定芦丁、槲皮素的含量。结果表明: 芦丁、槲皮素的线性回归方程相关系数 R² 分别为 0.9995 和 0.9996, 回收率分别为 96.48%~100.66%; RSD 分别为 1.25%~4.19%。该方法简便、灵敏、快速、可靠、重现性好, 本研究可为蜂胶生物活性评价及质量控制提供科学依据。

关键词: 蜂胶, 高效液相色谱法, 芦丁, 槲皮素

Study on determination of flavones in propolis by HPLC

YANG Li¹, YAN Qing-hua², DENG Yue-e³, NIU Li-yuan¹, ZHANG Yan, ZHAO Yi-nan³

(1. Experimental Center of Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China;

2. Department of Life Science and Technology, Xinxing Medical College, Xinxing 453003, China;

3. Department of Chemistry and Engineering of Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: HPLC method was applied to determine rutin and quercetin in propolis. Beeswax and fat soluble impurities were removed when deionized water immersion - methanol extraction was used to deal with propolis. The separation was performed on Eclipse XDB-C₁₈ (150mm × 4.6mm, 5μm), the mobile phase consisted of alcohol and H₃PO₄ buffer solution (V:V = 60:40) as the flow phase, the speed of flow was 0.45mL/min, the detector wavelength was set at 370nm. The result indicated that the linear correlation coefficient of rutin and quercetin was 0.9995 and 0.9996, the recovery was 96.48%~100.66%; RSD respectively was 1.25%~4.19%. The method was simple, sensitive, fast, reliable and repeatable. This study provided a scientific method for quality control and bioactivity evaluation in propolis.

Key words: propolis; HPLC method; rutin; quercetin

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)05-0353-03

蜂胶是蜜蜂从植物芽孢和树干处采集树脂, 再混以蜜蜂舌腺、蜡腺等腺体的分泌物, 经蜜蜂反复代谢合成的一种棕色粘性带有芳香气味的胶状物质, 其中约含蜂胶 55%, 蜂蜡 30%, 花粉和芳香油 15%, 及少量杂质^[1-3]。蜂胶中存在多种成分, 主要包括酚类(黄酮、酚酸、黄酮及酚酸酯化物)、萜类、类固醇、氨基酸及无机化合物等。蜂胶的生物活性主要归因于其所含的黄酮类化合物。黄酮是具有 C₆-C₃-C₆ 结构的酚类化合物, 黄酮类物质对人类健康有重要作用, 临床证明, 蜂胶具有抗菌、消炎、抗癌、促进组

织再生和增强肌体免疫力的作用, 已广泛用于药品、食品和化妆品等领域^[4-6]。传统的方法是用分光光度计检测蜂胶样品中总黄酮的含量, 紫外分光光度法检测前需对样品进行纯化处理, 操作要求较高, 消耗时间长, 只能定量计算出样品中总黄酮的含量, 无法判断样品中各组分的构成情况^[7]。高效液相色谱法由于具有样品处理简单、操作容易、分离度好、定量准确、可进行单体检测等优点而被广泛地应用于黄酮等天然产物的定量测定^[8-11]。本论文用去离子水浸泡-甲醇回流提取法对蜂胶进行预处理, 除去蜂胶中的蜂蜡及脂溶性杂质。采用高效液相色谱-二极管阵列检测器对蜂胶中芦丁和槲皮素的含量进行检测, 可为蜂胶生物活性评价及质量控制提供科学依据。

收稿日期: 2009-05-28

作者简介: 杨理(1980-), 男, 实验师, 硕士, 主要从事仪器分析方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甲醇 色谱纯;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸、芦丁、槲皮素 分析纯;蜂胶 河南科技学院养蜂厂提供。

Surveyor Plus 液相色谱 美国菲尼根公司;3K18 高速冷冻离心机 德国 Sigma 公司;FW80 微型植物粉碎机 北京永光明仪器厂;RE-52AA 旋转蒸发仪 上海亚荣生化有限公司;DHG9241 电热恒温干燥箱 上海精宏实验仪器公司;Delta320 数字式酸度计 梅特勒-托利多上海有限公司。

1.2 色谱条件

色谱柱: EclipseXDB - C₁₈ (150mm × 4.6mm, 5μm);流动相: 甲醇和 H₃PO₄ 缓冲液 (V:V = 60:40) (pH = 4.2);流速: 0.45mL/min;柱温: 25℃;检测波长: 370nm;进样量: 20μL。

1.3 标准溶液的制备

精密称取芦丁、槲皮素各 1.0mg 对照品,用流动相定容至 25.0mL 容量瓶中,制成 40μg/mL 的标准储备液。

标准溶液的配制: 将标准储备液用流动相进行逐级稀释,混合标准溶液按 0.00、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00μg/mL 梯度进行配制,储备液和工作液均置于 4℃ 冰箱避光保存。

1.4 样品溶液的制备

蜂胶是含有树脂状化合物的粘性物质,不溶于水,易溶于甲醇、乙醇和甘油等有机溶剂。本实验选溶解性高、干扰小的甲醇为溶剂。为克服蜂胶的粘性,样品处理时进行冷冻粉碎。准确称取冷冻粉碎后的蜂胶 3.9658g,加入 30mL 水,浸取 6h,过滤后自然干燥得精蜂胶。称取精蜂胶 0.1026g,用甲醇水溶液稀释至 50mL。加热回流 5h,过滤除去杂质得蜂胶样品溶液,低温冷藏备用。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件选择

2.1.1 检测波长的确定 用二极管阵列检测器分别对芦丁和槲皮素在 190~800nm 进行全波长扫描,芦丁和槲皮素两种黄酮类物质在 206、256、370nm 处都有较强的吸收峰,且两物质的吸收峰基本完全重合,芦丁的扫描结果如图 1 所示,为了使检测样品紫外吸收更稳定,故选两物质的紫外检测波长为 370nm。

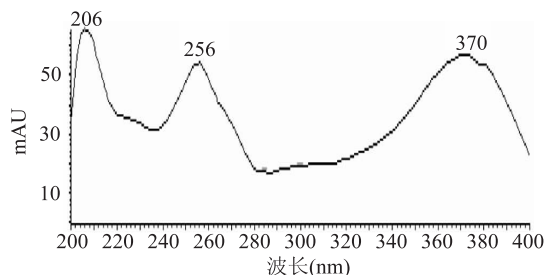


图1 芦丁紫外吸收图谱

2.1.2 柱温的确定 柱温是最重要的色谱操作条件,它直接影响色谱柱的选择性、色谱峰区域展宽和

分析速度。柱温不能高于固定相的最高使用温度,否则会造成固定相的大量挥发流失;柱温也不能低于固定相的熔点,以免影响其分配作用;提高柱温及柱温的选择,要依据具体情况而定;液相色谱中,一般在室温条件下进行分离分析,适当提高柱温有利于改善传质和提高分析速度。当选择柱温为 25℃ 时,芦丁、槲皮素可以在 15min 内完全分离,并且峰形较理想,因此,实验柱温选择 25℃。

2.1.3 流速的确定 流速大于 0.45mL/min 时,随着流速增大,色谱峰的保留时间减小,即测定样品所需分离时间越短,同时色谱峰的峰面积增加,即灵敏度升高。但流速增大会增加系统的压力。流速小于 0.45mL/min 时,分离时间较长;当流速为 0.45mL/min 时,系统压力适中,芦丁、槲皮素可以在 15min 内完全分离,色谱峰峰型对称且尖锐,且分离效果较理想。因此,实验流速为 0.45mL/min。

2.1.4 流动相的选择及其 pH 的确定 甲醇-水系统可满足多数样品的分离要求,且粘度小、价格低、是反相色谱最常用的流动相。采用反相色谱法分离弱酸 ($3 \leq \text{pKa} \leq 7$) 或弱碱 ($7 \leq \text{pKa} \leq 8$) 样品时,通过调节流动相的 pH,来抑制样品组分的解离,增加组分在固定相上的保留,并改善峰形。在实验过程中,如果仅用磷酸作为流动相,则分离芦丁、槲皮素色谱峰峰形不理想。因此,本实验采用甲醇-磷酸缓冲溶液为流动相,考察了甲醇与磷酸缓冲溶液不同配比条件下,芦丁、槲皮素的分离情况,结果显示,甲醇与磷酸缓冲溶液体积比为 60:40 时,芦丁、槲皮素色谱峰出峰时间适宜,分离度良好,柱压适中且杂质干扰较小。

同时考察了流动相的 pH 对芦丁、槲皮素分离度的影响,发现磷酸缓冲液的 pH 为 4.2 时,可得到较好的分离效果,且可消除峰形拖尾现象。由于流动相的 pH 对黄酮类物质的保留时间有很大的影响,在不同 pH 下黄酮类物质的保留时间都不同,鉴于 pH 太低会影响色谱柱的使用寿命,本法采用流动相的 pH 为 4.2,该条件下标准样品及蜂胶样品的色谱图如图 2。

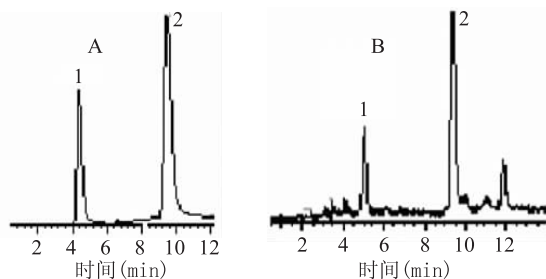


图2 芦丁(1)、槲皮素(2)标准品(A)与蜂胶样品(B)色谱图

2.2 标准曲线的绘制

分别移取芦丁、槲皮素标准溶液 (40μg/mL),配制成 0.00、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00μg/mL 混合标准系列溶液,溶液经 0.45μm 滤膜过滤后,分别用 20μL 微量进样器进样。以浓度 (μg/mL) 为横坐标,峰面积 (Y) 为纵坐标,按上述色谱条件进行测定,得到曲线方程如表 1 所示。

表1 芦丁、槲皮素的回归方程

组分	线性回归方程	相关系数
芦丁	$Y = 1.72 \times 10^5 X - 8.35 \times 10^{10}$	0.9995
槲皮素	$Y = 5.34 \times 10^5 X - 5.21 \times 10^{11}$	0.9996

2.3 精密度实验

取混合标准溶液,按上述色谱条件,每次进样20 μ L,连续进样六次,以峰面积定量,分别计算芦丁和槲皮素的RSD在1.25%~4.19%,计算结果如表2所示,可见精密度良好。

2.4 加标回收实验和样品测定

准确称取冷冻粉碎后的蜂胶4.00g各三份,用同样的方法进行处理,并加入一定量的已知浓度的混合标准对照品,进行峰面积测定,然后进行计算,测得芦丁和槲皮素的回收率分别为96.48%~100.66%。结果如表2所示。由结果可以看出,高效液相色谱测定芦丁和槲皮素的重现性和再现性都比较好。由表2中测量值,经计算可以求得,芦丁在蜂胶中的含量为10.12 μ g/g,槲皮素在蜂胶中的含量为16.05 μ g/g。

表2 回收率和精密度实验结果

样品	测定值 (μ g/mL)	加标 (μ g/mL)	测定总量 (μ g/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
芦丁	0.80	1.00	1.76	97.79	1.25
	0.82	1.00	1.80	98.96	2.29
	0.79	1.00	1.77	99.22	2.72
	1.29	1.00	2.29	100.35	3.28
槲皮素	1.27	1.00	2.19	96.48	4.19
	1.26	1.00	2.27	100.66	1.64

3 结论

实验结果表明:由于蜂胶成分复杂,组分相互干扰尤严重,样品前处理的好坏是HPLC分析测定成功与否的关键。采用去离子水浸泡除蜡工艺去除粗蜂胶中的蜂蜡,再用甲醇回流去脂溶性杂质的干扰,经HPLC色谱分离后,芦丁、槲皮素色谱峰出峰时间适宜,分离度良好,柱压适中且杂质干扰较小,测得的结果令人满意。由于黄酮类化合物常带有酚羟基,在水中会部分解离羟基与固定相作用较强,从而导

致拖尾,故用甲醇和 H_3PO_4 缓冲液(V:V=60:40)为流动相并调节缓冲液的pH到4.2,以抑制黄酮类物质解离,克服拖尾现象。反相高效液相色谱法测定蜂胶中芦丁、槲皮素是一种行之有效的方法。此方法精密度、重现性和回收率均令人满意。本研究可为蜂胶生物活性评价及质量控制提供科学依据。

参考文献

- [1] 赵玉娟.高效液相色谱法测定蜂胶中的黄酮成分[J].现代仪器,2000(4):22-24.
- [2] 叶静凌,刘富海,乞永艳,等.超声技术在蜂胶提取上的应用研究[J].蜜蜂杂志,2008(5):7-9.
- [3] 刘元法,王兴国,金青哲.超声波技术提取蜂胶黄酮类功能性物质的研究[J].食品科学,2004,25(6):35-39.
- [4] 李彦杰,杨勇.蜂胶化学成分及其生物活性[J].粮食与油脂,2003(12)43-45.
- [5] 王亚群.蜂胶产品的开发[J].国家食物与营养咨询委员会,2007(3)246-248.
- [6] Karasten M. Propolis current and future medical uses [J]. American bee journal,2001,141(7):507-510.
- [7] 吕国良,紫外分光光度法测定蜂胶软胶囊中总黄酮含量方法的研究[J].现代仪器,2008,3:73-74.
- [8] Howard M, Marken, Cary R. Measurement of food flavonoid by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, 3:578-596.
- [9] Yu Z, Jingjing J. Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography [J]. Food Chemistry, 2008, 107: 1326-1336.
- [10] 罗丽萍,高荫榆,洪雪娥,等.液质联用测定薯蓣中黄酮类化合物的构成[J].食品科学,2008,29(6):52-55.
- [11] Boryana T, Dorina T, Vassya B. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study [J]. Chemistry Central Journal, 2007, 1:1-13.

(上接第352页)

表3 光转化液测定结果(mg/mL)

照射时间 (min)	维生素D ₃ 前体	维生 素D ₃	光甾醇	速甾醇	7-脱氢 胆固醇
8	0.343	0.031	0.012	0.111	0.503
6	0.383	0.038	0.026	0.153	0.399
24	0.288	0.064	0.069	0.282	0.296

个较好的定量测定光转化反应液中维生素D₃及其它光转化异构体的方法,快速、简便,精密度、准确度高,可满足定量分析要求。建立标准曲线时,直接将峰面积与样品浓度回归,线性关系不太理想,而将两者分别取自然对数后得到理想的线性关系,这种现象与ELSD检测器的检测机理是一致的^[5],因此,本研究对进样量、峰面积积分值均取自然对数以考察其相关性。

3.2 维生素D₃前体、光甾醇、速甾醇无法从市场购买,自制需要昂贵的正反向制备型色谱柱,步骤多,操作繁琐,样品易降解变质。2.4 实验结果说明,维生素D₃与其它4种异构体在ELSD中有相似的响应

植,因此,对不具备分离光甾醇等异构体条件的实验室,可以以某一纯物质(如维生素D₃)作标准品,其它异构体采取参照文献定性,峰面积归一化法计算定量的方式检测样品,当然这种方法误差相对较大。

参考文献

- [1] P B 霍克.实用生物化学[M].北京:人民卫生出版社,1961.
- [2] Lu ZR, Chen TC, Holick MF. Preparation of milligrams of three vitamin D₃ isomers in laboratory scale by two steps high performance liquid chromatography with straight and reverse phase column [J]. Acta Pharm sin, 1992, 27(5):369-374.
- [3] 邓海根,曹雨震.高效液相色谱仪的通用型质量检测器-蒸发光散射检测器[J].药物分析杂志,1994,14:61.
- [4] HPLC-ELSD法提高分析甾体化合物的灵敏度与准确度[C].蒸发光散射检测器的应用报告及论文集,2006.
- [5] Stockwell P B. A light scattering detector for Liquid chromatography [J]. American Laboratory, 1991(8):19.