

蜂胶质量控制技术研究 *

文萍¹ 戴希希² 刘丹¹ 余良忠^{1#}

(1 江西省中医药研究院 南昌 330046; 2 江西省抚州市食品药品检验所 江西抚州 344000)

摘要:目的:建立蜂胶的质量控制方法。方法:对蜂胶的性状、干燥失重、总灰分、酸不溶性灰分、氧化时间、乙醇浸出物含量、有毒有害物质等进行检查,采用薄层鉴别对蜂胶进行特征性鉴别,并对蜂胶中总黄酮的含量测定方法进行方法学研究。结果:确定了蜂胶各项指标的标准限量;建立了蜂胶总黄酮含量测定的方法,并测定了 15 批蜂胶中总黄酮的含量,确定了含量范围。结论:该方法简便、可靠,可用于蜂胶的质量控制。

关键词:蜂胶;总黄酮;质量控制

Research of the Quality Control for Propolis

WEN Ping¹, Dai Xi-xi², LIU Dan¹, YU Liang-zhong^{1#}

(1Jiangxi Traditional Chinese Medicine Institute, Nanchang330046; 2Food and Drug Inspection Institute of Fuzhou City, Fuzhou344000)

Abstract: Objective: To establish the quality control method for propolis. Methods: Checked the characters, loss on drying, total ash, acid insoluble ash, oxidation time, ethanol extract content determination, toxic and harmful substances of the propolis, used TLC to identify the characteristics of propolis, and studied the content determination method of total flavonoids in propolis. Results: The standard limit of each index of propolis was determined. The content determination method of total flavonoids in propolis was established, and by the determination of the content of total flavonoids in the 15 batches of propolis, the range of content was determined. Conclusion: the method is simple, reliable and can be used for the quality control of propolis.

Key words: Propolis; Quality control; Total flavone

中图分类号:R282.5

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2016.02.044

蜂胶是蜜蜂采集植物树脂等分泌物与其上顎腺、蜡腺等分泌物混合,形成的胶粘性物质。蜂胶的化学成分复杂,药理作用广泛,已经成为保健食品研究领域的热点,是常用的保健食品原料,已收载于中国药典 2010 年版。其功能为补虚弱,化浊脂,止消渴;外用解毒消肿,收敛生肌^[1-3],用于抗菌消炎、调节免疫、抗氧化、加速组织愈合、高血脂症和糖尿病的辅助治疗^[4-6],但蜂胶尚无保健食品原料质量控制技术标准。本课题组前期对蜂胶提取物制备工艺进行了研究^[7],同时收集到有关部门颁布的 9 个蜂胶的相关标准,这些标准主要还是从蜂胶提取物的形态、色泽、气味、滋味、总黄酮含量、氧化时间、乙醇浸出物等指标来控制蜂胶提取物的质量,对蜂胶质量控制起到了一定作用,但是仅具有感官和理化指标要求是不够的,缺少特征鉴别和特征成分的含量检测指标,无法检测出真假,严重影响蜂胶产品的安全性和有效性。本课题组在全国范围内采(收)集了 160 多批次合格或不合格的蜂胶原料样品,及杨树胶和造假主要原料杨树芽,通过对样品性状、干燥失重、总灰分、酸不溶性灰分、氧化时间、乙醇浸出物及有毒有害物质的检查,薄层鉴别和含量测定的方法的研究及确定,为蜂胶的质量控制提供了科学的依据。

1 仪器、试药及试样

1.1 仪器 UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津);TU-1800SPC 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);CQ-250 超声波清洗器(上海船舶电子设备研究所);AG135 双量程十万分之一电子天平(Mettler Tkledo 公司);HH-4 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)。

1.2 试药 乙醇、苯、甲醇、磷酸、石油醚(B.P60~90℃)、三氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲酸(均为分析纯);CG-161M 美国 AMBERCHROM 色谱树脂(北京春达科技有限公司),聚酰胺薄膜 10×20 cm(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂);硅胶 G 高效薄层板(青岛海洋化工有限公司)。

1.3 试样

1.3.1 对照品 白杨素对照品(批号:111701-200501),高良姜素对照品(批号:111699-200501),乔松素对照品(批号:100080-200707),芦丁对照品(批号:100080-200707),均由中国药品生物制品检定研究院提供。

1.3.2 样品 蜂胶为本课题组收集,产地为云南(样品编号 16、17)、四川(编号 35、37、38)、江西(编号 90、99、103、104、106)、湖南(编号 111、117、119)、山

* 基金项目:江西省科技计划项目(编号:20141BBG70075)

通讯作者:余良忠, E-mail: ylz@sohu.com

东(编号 128、129)、河南(编号 27、43、45、47)、山西(编号 50、52、57)、内蒙(编号 130、134、136)、辽宁(编号 138)、陕西(编号 2、4)、甘肃(编号 10、15)、新疆(编号 31)、浙江(编号 86、87、88、89)等地,经江西省中医药研究院余良忠研究员鉴定为蜜蜂采集植物树脂等分泌物与其上颚腺、蜡腺等分泌物混合形成的胶粘性物质。杨树胶(编号 58、59、62、63、64、65、66、153~159)购于河南。巴西蜂胶(编号 91 号)、乌拉圭蜂胶由江西汪氏蜜蜂园有限公司提供。

2 方法及结果

2.1 蜂胶性状 根据 95 批次样品的观察结果、口尝滋味、鼻嗅气味,再将样品至烘箱中加热至 30℃ 以上,观察其是否软化。结合国标(GB/T 24283-2009)蜂胶标准,蜂胶性状定为:团块状或不规则碎块,呈棕黄色、棕褐色、青绿色或灰褐色,具光泽,10℃ 以下质脆,30℃ 以上逐渐变软,气芳香,无异味,味微苦,略涩,有辛辣和微麻感。

2.2 一般检查 按照中国药典 2010 年版一部蜂胶氧化时间规定项下的方法和附录 IXG、IXK 进行操作,通过对不同批次蜂胶样品的测定比较,规定蜂胶干燥失重不得过 4.0%、总灰分不得过 8.0%、酸不溶性灰分不得过 6.0%、氧化时间不得过 22 s。

2.3 乙醇浸出物含量 按中国药典 2010 年版一部附录 XA 浸出物测定法,对不同批次的蜂胶样品进行测定。结果,合格蜂胶醇浸出物含量在 40.50%~66.60%,不合格蜂胶醇浸出物含量在 13.70%~39.20%。不合格蜂胶浸出物含量低的原因是多方面的,主要因为蜂蜡多,其次为杂质。中国药典 2010 年版一部蜂胶项下规定,醇浸出物含量不得少于 50%,根据江西汪氏蜂蜜园有限公司近几年大生产提取数据和本课题组浸出物测定数据表明,合格蜂胶乙醇浸出物大多在 40~50%之间,因此,为充分利用资源,规定蜂胶醇浸出物含量 $\geq 40.0\%$ 。

2.4 蜂胶薄层鉴别 取蜂胶样品 100 mg,加甲醇 10 ml,超声提取 15 min,作为供试品溶液;另取蜂胶对照药材 0.1 g(取 87 号蜂胶作为对照),同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(中国药典 2010 年版附录 VIB)试验,吸取上述二种溶液各 1 μ l,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以丙酮:水:甲酸(5:5:1)为展开剂,40℃ 展开,取出,晾干,置紫外光(365 nm)下检视。杨树胶 157、158、159、自提杨树芽胶 95 和杨树胶 153~156,在与对照药材色谱相应的位置上,斑点均不相同,可以判断为假蜂胶或杨树芽胶,其余供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,特征斑点 Rf 值适中。此

方法可以用于鉴别蜂胶真伪。

2.5 有毒有害物质限量

2.5.1 铅、砷、汞 分别按 GB5009.12、GB/T5009.11、GB/T5009.17 规定的方法测定,结果显示,不同批次的样品重金属铅含量测定结果相差较大,铅含量实测值在 0.75~22.10 mg/kg,砷含量实测值在 0.13~0.71 mg/kg 之间,汞未检出。根据实测结果及日本《保健食品原料手册》中蜂胶乙醇提取液、蜂胶粉末制品的规定, $Pb \leq 20$ mg/kg,最终标准规定蜂胶铅含量 ≤ 20 mg/kg,砷含量 ≤ 1.0 mg/kg,汞参照无公害蜂胶标准 NY5136-2002 制定,含量 ≤ 0.3 mg/kg。

2.5.2 六六六、滴滴涕 按 GB/T5009.19 规定的方法测定,结果不同批次蜂胶中有毒有害物质六六六、滴滴涕均未检出。限度参照无公害蜂胶标准 NY5136-2002 制定,规定六六六、滴滴涕含量均为 ≤ 0.05 mg/kg。

2.6 蜂胶总黄酮含量测定方法的研究^[8-9]

2.6.1 溶液的配制 取蜂胶粉末约 0.1 g,精密称定,置 100 ml 量瓶中,加甲醇适量,超声处理 15 min,取出,放置至室温,加甲醇至刻度,摇匀。精密量取 1 ml,置 50 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取乔松素对照品约 20 mg,精密称定,置 50 ml 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 1 ml,置 100 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.6.2 方法学考察 取蜂胶粉末约 0.1 g,按照 2.6.1 项下同法制备供试品溶液,吸取样品溶液 2 ml,以甲醇为空白,照紫外-可见分光光度法(中国药典 2010 年版一部附录 V A)操作,在 290 nm 处测定吸光度,并对精密度、溶液稳定性、重复性、回收率进行考察。结果精密度平均值为 0.356, RSD=0.11%;溶液稳定性平均值为 0.361, RSD=1.19%、重复性平均值为 25.04%(总黄酮含量), RSD=0.84%、平均回收率为 99.67%, RSD=0.77%(n=6),说明本方法准确性好。

2.6.3 样品测定 按照 2.6.1 项下同法配制供试品溶液和对照品溶液。分别吸取样品溶液和对照品溶液 2 ml,以甲醇为空白对照,照紫外-可见分光光度法(中国药典 2010 年版一部附录 V A)依法在 290 nm 处测定吸光度,计算。结果显示,不同批次合格蜂胶中总黄酮含量在 18.63%~47.36%之间,不合格蜂胶中总黄酮含量在 6.07~22.59%,杨树芽及其提取物中总黄酮含量在 1.25~24.15%。根据测定结果,合格蜂胶中只有 9 号蜂胶中总黄酮含量为 19.66%和 117 号蜂胶中总黄酮含量为 18.63%, $< 20.0\%$,其

它批次蜂胶中总黄酮含量均>20.0%，最终规定蜂胶中总黄酮含量(以乔松素计)应不得少于 20.0%。

3 讨论

本文利用现代的薄层色谱技术,确定蜂胶以及蜂胶提取物中的专属性薄层色谱,方法简便易行,为真伪蜂胶的鉴别提供依据。通过多批次蜂胶的性状、一般性检查等实验研究把合格蜂胶定义为:团块状或不规则碎块,呈棕黄色、棕褐色、青绿色或灰褐色,具光泽,10℃以下质脆,30℃以上逐渐变软,气芳香,无异味,味微苦,略涩,有辛辣和微麻感。蜂胶干燥失重不得过 4.0%、总灰分不得过 8.0%、酸不溶性灰分不得过 6.0%、氧化时间不得过 22 s。蜂胶醇浸出物含量≥40.0%,铅含量≤20 mg/kg,砷含量≤1.0 mg/kg,汞含量≤0.3 mg/kg,六六六、滴滴涕含量均为≤0.05 mg/kg,蜂胶中总黄酮含量(以乔松素计)应不得少于 20.0%。利用先进的分析手段对蜂胶进行检测,建立了系统、全面、科学的质量控制技术,确

保蜂胶质量稳定可控,规范蜂胶的市场秩序。

参考文献

[1]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,2011,9(17):42-43
[2]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,2010,4(18):245
[3]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):75-76
[4]王浩,张庆乐,徐晓燕,等.蜂胶总黄酮对衰老小鼠学习记忆的影响[J].中国老年学杂志,2009,29(22):2880-2882
[5]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):253-255
[6]张波,王东风,王爽.蜂胶总黄酮镇痛作用及其机制研究[J].2005,16(19):1458-1460
[7]吕武清,文萍,姚剑平,等.蜂胶提取物制备工艺研究[J].中草药,2014,45(6):791-794
[8]范婷婷,文萍,姚剑平,等.蜂胶总黄酮含量测定方法的探讨[J].中国医药指南,2013,11(13):69-70
[9]周立东,郭伽,余竟光.北京蜂胶的黄酮类成分[J].中国中药杂志,1999,24(3):162-163

(收稿日期: 2015-12-28)

赣产南丹参药材含量测定研究*

任正宇¹ 王小青² 李晶^{2#}

(1 燕京理工学院 2012 级化工与制药 河北三河 065201; 2 江西省中医药研究院 南昌 330046)

摘要:目的:建立南丹参药材的含量测定方法。方法:色谱条件:色谱柱:Dikma Diamonsil C18(2)(250 mm× 4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸(18:82);流速:1.0 ml/min;检测波长:225 nm;柱温:30℃。结果:丹参素钠在 6.2~775 μg/ml 范围内线性关系良好;加样回收率为 101.82%;RSD 分别为 1.97%。结论:高效液相色谱法(HPLC)操作简单,重现性好,可用于南丹参药材的质量控制。

关键词:南丹参;丹参素钠;丹酚酸 B;高效液相色谱法

中图分类号:R284

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2016.02.045

南丹参为唇形科植物南丹参 *Salvia bowleyana* Dunn. 的干燥根及根茎,收载于江西省中药材标准 1996 年版和 2014 年版,历代本草中少见记载,本品为地方性习惯用药;南丹参广泛分布于江西、福建、浙江、湖南等省,均为野生品种,江西为主要分布产区之一^[1]。南丹参主要含有总丹参酮、丹参酮ⅡA、隐丹参酮、丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 C、丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、咖啡酸等化学成分^[2-5]。其主要水溶性成分丹参素具有多种药理作用,包括抗炎、抗肿瘤、神经保护、心肌保护、提高免疫力等^[6-7]。前期我院仅对该植物中所含丹酚酸 B 进行了报道^[8],本实验对其所含丹参素进行含量测定研究,并同时进行了丹酚酸 B 的测定。现报道如下:

1 仪器与试剂

Waters-1525 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Simplicity™ 个人型超纯水系统(Millipore 公

* 基金项目:江西省青年基金资助项目(编号:20142BAB215065)

通讯作者:李晶, E-mail: savon@sina.com

司),CQ-250 超声波清洗仪(上海船舶电子设备研究所),AG-135 电子天平(梅特勒-托利多),AL-204 电子天平(梅特勒-托利多)。南丹参药材:分别来源于江西南昌(2013051301、2013051302、2013061401、2013061402、2013081501);江西德安(2013051303、2013052201);江西婺源(2013051401、2013051402);江西于都(2013060201)。丹参素钠对照品(含量测定用,批号:110855-200405,中国药品生物制品检定所),丹酚酸 B 对照品(批号:110562-200807,中国药品生物制品检定所)。甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯),其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹参素钠的含量测定

2.1.1 色谱条件及专属性的选择 色谱柱:Dikma Diamonsil C18 柱(4.6 mm× 250 mm,5 μm),流动相:甲醇-0.1%磷酸(18:82),流速:1 ml/min;经光