

中华人民共和国供销合作行业标准

GH/T 1280—2019

蜂胶中咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素含量的测定 反相高效液相色谱法

Determination of cafferic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, pinobanksin, pinocembrin, 3-O-acetylpinobanksin, chrysin and galangin in propolis-

Reversed-phase high performance liquid chromatography method

2019 - 11 - 28 发布

2020 - 03 - 01 实施

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》的编写规则。

本标准由中华全国供销合作总社提出。

本标准由全国蜂产品标准化工作组归口。

本标准起草单位：浙江大学、杭州蜂之语蜂业股份有限公司、杭州天厨蜜源保健品有限公司、缙云县绿纯养蜂专业合作社。

本标准主要起草人：胡福良、张翠平、周萍、王磊、胡元强。

行业标准信息平台

蜂胶中咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、 短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素含量的测定 反相高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了蜂胶中咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素的反相高效液相色谱检测方法。

本标准适用于蜂胶及蜂胶乙醇提取物中咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素的测定。

本标准液相色谱的检出限：咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素分别为 0.41、0.39、1.20、0.29、1.11、1.49、0.86、0.91 $\mu\text{g/mL}$ 。

本标准液相色谱的定量限：咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素分别为 1.35、2.16、4.00、0.98、3.69、4.97、2.88、3.03 $\mu\text{g/mL}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

蜂胶 propolis

工蜂采集树脂等植物分泌物与其上颚腺、蜡腺分泌物等混合形成的胶粘性物质。

4 原理

试样经乙醇提取，浓缩，再溶解于甲醇，用反相高效液相色谱仪紫外检测器在 280 nm 处检测，外标法定量。

5 试剂与材料

实验室用水应符合 GB/T6682 规定的一级水。

除非另有规定，所有试剂均为分析纯。

5.1 甲醇：色谱纯。

5.2 乙醇。

5.3 乙酸，色谱纯。

5.4 流动相：甲醇（5.1）和 1%乙酸（5.3）梯度洗脱。

5.5 咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素标准品：纯度 $\geq 98\%$

5.6 咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素标准储备液：准确称取适量的每种标准物质（5.5），用甲醇溶液（5.1）配成 1.0 mg/mL 的标准储备溶液，于 4℃冰箱保存，可保存 6 个月。

5.7 咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素标准工作液：吸取适量 1.0 mg/mL 的标准储备液（5.6），用甲醇溶液（5.1）分别稀释成适当浓度的标准工作溶液，现用现配。

5.8 滤膜：0.45 μm ，有机系。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

6.2 粉碎机。

6.3 旋转蒸发仪。

6.4 超声波清洗器。

7 试样准备与保存

7.1 试样的准备

取代表性试样适量，冷冻，粉碎，混匀，作为备检试样。

7.2 试样保存

将试样于 0℃~4℃保存。

8 操作步骤

8.1 蜂胶样品预处理

准确称取 10.0 g (精确到 0.1 g) 蜂胶试样, 用 30 mL 95%乙醇超声提取, 每次用时 15 min, 共提取 3 次, 合并滤液, 定容至 100 mL (V_1)。取 10 mL (V_2) 减压蒸干, 用 25 mL (V_3) 甲醇超声溶解并定容, 0.45 μm 滤膜过滤, 供测定。

8.2 色谱条件

色谱柱: Sepax HP-C18, 柱长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒度 5 μm ; 或性能相当的色谱柱。

流动相流速: 1.0 mL/min。

梯度洗脱: 洗脱程序参见附录 A 表 A.1。

检测波长: 280 nm。

柱温: 33 $^{\circ}\text{C}$ 。

进样量: 5 μL 。

8.3 测定

取 5 μL 样品溶液 (8.1)、标准工作溶液 (5.7) 分别进样分析, 绘制标准曲线, 外标法定量。

色谱图参见附录 A 图 A.1。

9 结果计算与表示

9.1 结果计算

试样中咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素含量 (X) 以毫克每克 (mg/g) 表示, 按式 (1) 计算:

$$X = \frac{C \times V_3 V_2}{m \times V_1} \quad (1)$$

式中:

C_S —标准工作曲线上计算得到的样液中化合物的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

V_1 —试样溶液定容体积, 单位为毫升 (mL);

V_2 —从试样溶液中取出的待测体积 (mL);

V_3 —待测试样最终定容体积, 单位为毫升 (mL);

m —样品质量, 单位为克 (g)。

9.2 结果表示

将符合重复性要求的两个独立测定值的算术平均值作为测定结果 (mg/g), 保留两位有效数字。平行试验相对偏差不得超过 2.0%。

附录 A

(资料性附录)

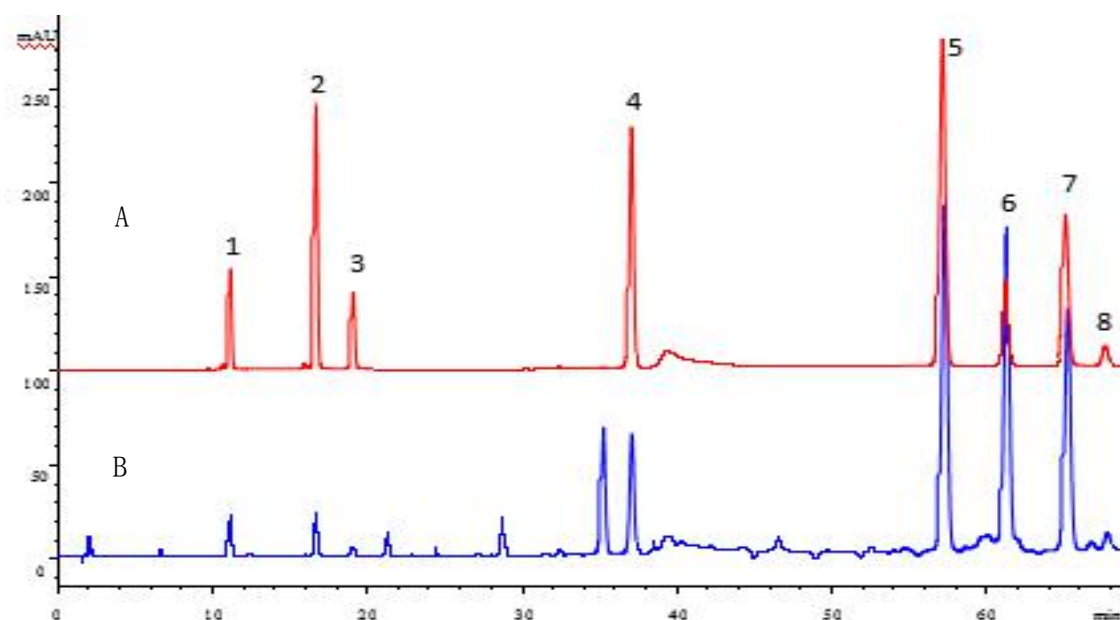
高效液相色谱法梯度洗脱程序和色谱图

表A.1 高效液相色谱法梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	甲醇 %	1%乙酸 %
0	1	15	85
30	1	40	60
65	1	55	45
70	1	62	38
80	1	100	0
90	1	15	85

行业标准信息服务平台

图A.1 咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素3-乙酸酯、白杨素和高良姜素混合标准品和蜂胶的色谱图



图A.1混合标准品和蜂胶的的HPLC图谱

A: 混合标准品; B: 蜂胶

1. 咖啡酸、2. *p*-香豆酸、3. 阿魏酸、4. 短叶松素、5. 松属素、6. 短叶松素3-乙酸酯、7. 白杨素、8. 高良姜素

行业标准信息平台