表 5 提取时间对提取效果的影响

Table 5 Effect of extracting times on extract rate

提取次数/次	提取时间/min	提取率/%
2	10	6.24
2	20	6.73
2	30	8.38
2	40	8.87
3	10	8.41
3	20	8.51
3	30	9.92
3	40	8.33

表 6 10 min 提取次数对提取效果的影响

Table 6 Effect of extracting times in ten minutes on extract rate

提取次数/次	提取率/%	相对提取率/%
1	3.94	45.59
2	6.24	72.13
3	8.41	97.16
4	8.65	100.00

效果越好。但粉碎度太高，加大后续处理如过滤的难度，考虑到工业化生产的实际情况，本实验仅比较了粗颗粒和 20 目两种粒度，提取率无明显差异。

微波穿透厚度一般为 2～3 cm。本实验中放大实验的提取率和质量分数都低于小试，可能是因为小试设备容器小，微波辐射能完全穿透，放大设备容器较大，微波辐射只能部分穿透。可以考虑加大搅拌强度或改变容器形状来解决此问题。

表 7 放大工艺试生产

Table 7 Production with magnified technology

批次	提取率/%	质量分数/%
1	9.32	59.04
2	9.34	63.37
3	9.44	60.55

微波提取的提取率和质量分数都明显高于普通水煎法，原因是否是因为微波提取使细胞壁破裂，有效成分更易流出有关；微波提取是否会影响多糖结构和连接方式进而影响药效，有待进一步研究。

感谢中国医学科学院药用植物研究所赵永华博士对黄芪药材进行的鉴定工作。

参考文献：

[1] 倪 艳，苏 强. 黄芪多糖水煎提取工艺的优化试验研究[J]. 中国中药杂志，1998，23(5)：284-286.

[2] 王 莉，刘志勇，鲁建江，等. 黄芪多糖的微波提取及含量测定[J]. 中医药学报，2001，29(6)：35-36.

[3] 李红民，黄仁泉，王亚洲. 提高黄芪多糖提取收率的工艺研究[J]. 西北大学学报，2000，30(6)：509-510.

[4] 闫巧娟，韩鲁佳，江正强. 纤维素酶法提取黄花多糖[J]. 中草药，2005，36(12)：1804-1807.

[5] 中国药典[S]. 一部. 2005.

蜂胶 HPLC 指纹图谱的研究

王小平[1,3]，林 励[1*]，潘建国[2]，卢占列[2]

(1. 广州中医药大学，广东 广州 510400；2. 广州市宝生园有限公司，广东 广州 510400；
3. 陕西中医学院，陕西 咸阳 712046)

摘 要：目的 用高效液相色谱法建立蜂胶指纹图谱。**方法** 采用迪马公司 Diamonsil(钻石)C_{18}色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，甲醇-0.4%磷酸水为流动相，梯度洗脱，体积流量为 1.0 mL/min，检测波长为 283 nm，柱温为 25℃。**结果** 10 批蜂胶样品得到的指纹图谱有 13 个共有峰，通过与对照品的保留时间比较，4、7、12、13 号峰分别为芦丁、槲皮素、白杨素和高良姜素。方法学考察结果表明，稳定性试验、重现性试验所得指纹图谱的相似度均大于 0.95，芦丁、槲皮素、白杨素、高良姜素保留时间和峰面积的 RSD 均小于 2%。**结论** 所建立的蜂胶 HPLC 指纹图谱分析方法准确、可靠，重现性好，能够用于控制蜂胶的质量和真伪的鉴别，为更好的控制蜂胶的内在质量提供了科学依据。

关键词：蜂胶；指纹图谱；芦丁；槲皮素；白杨素；高良姜素；高效液相色谱

中图分类号：R286.1 **文献标识码：**A **文章编号：**0253-2670(2008)10-1499-03

蜂胶是意大利蜂 *Apis mellifera* L. 从植物芽苞 和树干处采集的树胶，混入意大利蜂上颚腺分泌物

收稿日期：2007-12-08

基金项目：广州市科技计划项目(2005Z-E0101)

作者简介：王小平(1976—)，女，陕西宝鸡人，广州中医药大学博士研究生，主要从事中药资源开发利用及新药研究。
Tel：(020)35622208 E-mail：wangxiaoping323@126.com

*通讯作者 林 励 Tel：13802914007

万方数据

和蜂蜡等形成的一种具有芳香味的胶状固形物。蜂胶主要化学成分为黄酮类、萜烯类、酚酸类化合物[1]。蜂胶具有抗病毒、抗菌消炎、抗肿瘤、抗氧化、调血脂、调节机体免疫功能等多种生物活性[2]。目前蜂胶原料及蜂胶产品的质控标准仅存在有效部位定量测定等指标，无法科学地评价其质量，社会上以次充好、以假当真，屡见不鲜，已严重影响了蜂胶的出口创汇及蜂胶产品的质量[3~5]。为更有效的控制其内在质量，保证蜂胶质量的稳定，本实验采用 HPLC 法建立了蜂胶的指纹图谱。

1 仪器、试药与材料

德国 Dionex P680A 型高效液相色谱仪（PDA—100 检测器、STH585 柱温箱、P680HPLC 泵、ASI—100 自动进样器），Chromeleon 色谱工作站；8953 Dietikon 型电子分析天平（瑞士）；AS2060B 型超声仪。

芦丁（批号 080-9705）、槲皮素（批号 081-9003）、白杨素（批号 111701-200501）、高良姜素（批号 111699-200501）对照品均由中国药品生物制品检定所提供，流动相所用甲醇为色谱纯，其他试剂均为分析纯，蜂胶共 10 批，2006 年 11 月采自不同产地，由广州市宝生园有限公司提供，经广州市蜂产品研究所卢占列鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件：色谱柱为迪马公司 Diamonsil（钻石）C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇（A）- 0.4%的磷酸水（B），梯度洗脱；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长为 283 nm；柱温为 25 ℃；进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备：精密称取干燥至恒重的芦丁、槲皮素、白杨素、高良姜素对照品各适量，加甲醇使溶解，分别制成每毫升含芦丁 0.268 mg，槲皮素 0.109 6 mg，白杨素 29.6 μg，高良姜素 20.6 μg 的溶液。

2.2.2 蜂胶供试品溶液：将蜂胶在—10 ℃冷冻数天后粉碎，取蜂胶样品约 1 g，精密称定，置索氏提取器中，加 100 mL 丙酮，加热回流至提取液无色，提取液回收溶剂至干，残渣用甲醇溶解并转移至 100 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验：取同一供试品溶液（01 号样品）10 μL，连续进样 5 次，测定，所得色谱图用 MATLAB 相似度软件评价，结果 5 次进样在同一仪器测得的色谱指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度（相合系数均值）分别为 0.993 7、0.995 2、0.997 3、0.996 9、0.995 9，满足相似度不小于 0.950。并考察色谱峰保留时间和峰面积的一致性，芦丁、槲皮素、白杨素、高良姜素保留时间和峰面积的 RSD 均小于 1.7%。

2.3.2 稳定性试验：取同一份供试品溶液，分别在 0、2、4、10、14 h 进行检测，直观观察指纹图谱的全貌无明显变化，用相似度计算，在同一仪器测得的色谱指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度（相合系数均值）分别为 0.992 2、0.993 2、0.988 6、0.995 9、0.995 1，满足相似度不小于 0.950。并考察保留时间和峰面积的一致性，芦丁、槲皮素、白杨素、高良姜素保留时间和峰面积的 RSD 均小于 1.6%，表明在此时间内供试品溶液的成分是稳定的。

2.3.3 重现性试验：取同一批样品 5 份（01 号样品），制备供试品溶液，分别注入液相色谱仪 10 μL，测定，所得色谱指纹图谱直观观察，表明指纹图谱的全貌无明显变化，用相似度计算，在同一仪器测得的色谱指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度（相合系数均值）分别为 0.989 4、0.995 6、0.995 1、0.996 9、0.997 7，均大于 0.95，并考察保留时间和峰面积的一致性，芦丁、槲皮素保留时间和峰面积的 RSD 均小于 1.8%。

2.4 样品测定：分别吸取上述供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，测定，记录色谱图。采用 MATLAB 软件对各样品色谱图的原始数据文件进行分析，以 10 批样品生成的对照谱图（平均值法和中位数法）作为对照模版，计算各色谱图的整体相似度，结果见表 1。

表 1 样品来源及测定结果

Table 1 Sources and results of tested samples

编号	产地	指纹图谱相似度（以对照谱图为模版，采用相合系数）	
		均值	中位数
1	山东	0.904 4	0.885 0
2	甘肃	0.882 7	0.875 7
3	内蒙古	0.949 5	0.941 7
4	辽宁	0.950 2	0.952 6
5	山西	0.981 6	0.982 0
6	吉林	0.964 4	0.967 9
7	山东	0.980 2	0.978 2
8	青海	0.928 7	0.923 2
9	河北	0.968 0	0.965 8
10	东北	0.940 0	0.944 5

万方数据

2.5 指纹图谱的建立和辨认：对样品的供试品溶液进行 HPLC 检测，得到不同批次蜂胶 HPLC 色谱图（图 1）。对蜂胶 HPLC 色谱图进行解析，确定有 13 个共有峰，构建了蜂胶药材的 HPLC 色谱图的指纹特征，作为蜂胶鉴别的依据（图 2）。取芦丁、槲皮素、白杨素、高良姜素对照品以及各对照品与样品溶液的混合液各 10μL，分别进样测定，比较相应色谱峰的保留时间和峰面积的变化，确定指纹色谱图中的 4 号峰为芦丁，7 号峰为槲皮素，12 号峰为白杨素，13 号峰为高良姜素。

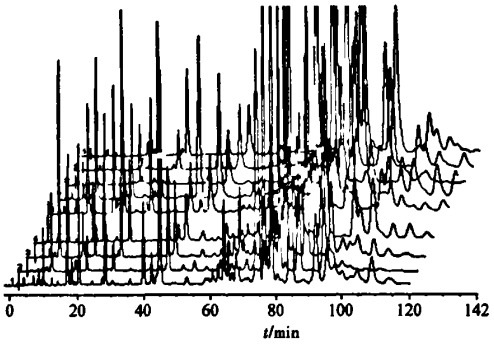

图 1 10 批不同产地蜂胶 HPLC 色谱图

Fig. 1 Fingerprints of ten batches of propolis from different habitats

指纹图谱表明，不同产地蜂胶药材中化学成分的种类和量差异较大，说明产地对蜂胶的内在质量有较大影响。

3 讨论

本实验对供试品溶液的制备、色谱条件进行了优化选择，对不同提取溶剂、提取方法所得指纹图谱进行反复考察，并结合蜂胶主含成分的性质，进行实验比较，结果选择 0.4%磷酸水-甲醇为流动相，能较好地使样品中各色谱峰分离且出峰最多；对柱温进行考察，优选的最佳柱温为 25 ℃；采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察，记录并比较不同波长的色谱图，结果在 283 nm 检测波长下，色谱图中色谱峰较多，信息丰富，故确立 283 nm 为检测波长。

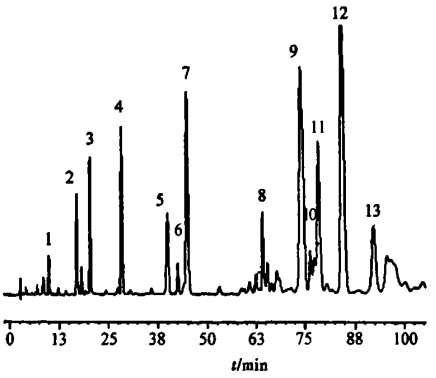

图 2 蜂胶 HPLC 色谱图的标准图谱

Fig. 2 HPLC Standardized chromatogram of propolis

分别采用迪马公司、Waters 公司和 Hypersil 公司的 C_{18}（250 mm×4.6 mm，5μm）色谱柱进行试验，均可得到基本相同的蜂胶指纹图谱。

本实验仅对 10 批蜂胶 HPLC 指纹图谱的构建进行了初步研究，仍需收集不同产地的大量样品，进行系统、规范化的深入研究。

参考文献：

[1] 王宗伟，黄兆胜. 蜂胶的药理作用[J]. 国外医药·植物药分册，1997，12：151-153.
[2] 胡福良，玄红专. 蜂胶的生物学活性及毒性和过敏反应[J]. 科技通报，2003，19 (2)：166-169.
[3] 袁泽良，刘建平，何薇莉，等. 2003 年蜂胶产、供、销状况以及 2004 年市场预测[J]. 蜜蜂杂志，2004，(5)：35-36.
[4] 王振山. 蜂胶市场分析[J]. 中国养蜂，2005，56(6)：37-37.
[5] 骆尚骅. 蜂胶质量控制的几个指标和检测方法[J]. 中国养蜂，1999，50(4)：35-36.

欢迎订阅《中国临床药学杂志》

《中国临床药学杂志》主要报道我国临床药学及相关领域的新成果、新技术、新方法，有关临床用药的基础研究，合理用药、药物不良反应、药物相互作用、药物动力学、血药浓度监测以及有关医院药学学科的研究成果与实践。旨在为我国广大临床药学工作者提供一个学术交流、信息传递和了解国内外临床药学及相关学科发展情况的窗口与平台。作为一本专业特色明显的全国性期刊，本刊被收录于国家科技部“中国科技论文统计源期刊”（中国科技核心期刊）、国家级火炬计划项目“中国科学引文数据库来源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库来源期刊”、“中国期刊网”、“中国学术期刊（光盘版）”和“万方数据资源系统（China info）数字化期刊群”，并从 1998 年起被美国《国际药学文摘》（IPA）和美国《化学文摘》（CA）摘录收载。

本刊为双月刊，大 16 开本，64 页，逢单月 25 日出版。每期定价 7 元，全年 42 元。邮发代号 4－573，国外代号 4726BM（中国国际图书贸易公司，北京 399 信箱）。国内统一刊号：CN31－1726；国际标准出版物编号：ISSN1007－4406。欢迎广大读者到本地邮局订阅。杂志社地址：上海市医学院路 138 号 290 信箱，邮编：200032，电话：(021)54237256；传真(021)64176498；E-mail：lcyx@fudan.edu.cn，cjcpfdu@citiz.net。

万方数据