

中华人民共和国供销合作行业标准

GH/T 1081—2012

蜂胶中杨树胶的检测方法 反相高效液相色谱法

Determination of poplar tree gum in propolis—
Reversed-phase high performance liquid chromatography method

2012-07-09 发布

2012-08-01 实施



中华全国供销合作总社 发布

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》的规则编写。

本标准采用专利 201010180675.0(申请号)。

本标准由浙江大学提出。

本标准由中华全国供销合作总社归口。

本标准起草单位：浙江大学、中国蜂产品协会。

本标准主要起草人：胡福良、张翠平、郑火青、吕泽田。

引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,涉及本文件相关的专利申请(申请号:201010180575.0)的使用。

本文件的发布机构对于该专利申请的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利申请人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就相关授权许可进行谈判。该专利申请人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利申请人:浙江大学。

地址:浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号。

请注意除上述专利申请外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

蜂胶中杨树胶的检测方法

反相高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了蜂胶中是否含有杨树胶的反相高效液相色谱检测方法。

本标准适用于蜂胶原料及蜂胶乙醇提取物中杨树胶的检测。

本标准在进样量为 5 μL 时,水杨苷的最低检测限为 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。蜂胶原料中杨树胶的检出下限约为 5%,蜂胶乙醇提取物中杨树胶的检出下限约为 15%。

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—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 24283—2009 蜂胶

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

蜂胶 propolis

工蜂采集树脂等植物分泌物与其上颌腺、蜡腺分泌物等混合形成的胶粘性物质。

3.2

蜂胶乙醇提取物 ethanol extracted propolis

乙醇萃取蜂胶后得到的物质。

3.3

杨树胶 extracted *Populus* buds, leaves or barks

杨属(*Populus*)植物的芽、叶子或树皮等组织经人工熬制加工,再经乙醇提取而成的提取物。

3.4

杨树型蜂胶 poplar type propolis

杨属(*Populus*)为主要植物来源的蜂胶。

3.5

杨树胶特征性成分 a characteristic component of poplar tree gum; CCP

杨树胶中含有而蜂胶中不含有的相对分子质量为 406 的特征性成分。

3.6

水杨苷 salicin

水杨酸盐类酯苷的基本结构单元,广泛存在于杨属和柳属植物的芽、叶子和树皮中的主要降解产物之一。

4 原理

水杨苷广泛存在于杨属和柳属植物的芽、叶子和树皮中,西方蜜蜂(*Apis mellifera*)在采集杨属植物树脂以及蜂巢内传递这些树脂加工成蜂胶的过程中加入了其腺体分泌的 β 葡萄糖苷酶等,将树脂中所含有的水杨苷水解。但是,在杨树胶加工过程中水杨苷能稳定存在。因而水杨苷是区分蜂胶与杨树胶的有效指标。在本标准检测条件下,除了水杨苷外,还发现另一个特征性更强的杨树胶中含有而蜂胶中不含有的特征峰,其指示为 CCP。因此,可根据水杨苷或 CCP 的有无来定性确定蜂胶中是否含有杨树胶。

试样经乙醇提取后,经浓缩、溶解于水后,用配有紫外检测器的反相高效液相色谱仪在 213 nm 处检测水杨苷和 CCP 的有无,从而判断蜂胶中是否含有杨树胶。

5 试剂和材料

除非另有规定,所有试剂均为分析纯。实验用水应符合 GB/T 6682—2008 中一级水的规定要求。

5.1 甲醇:色谱纯。

5.2 乙腈:色谱纯。

5.3 乙醇:分析纯。

5.4 磷酸:分析纯。

5.5 水杨苷标准品:纯度 $\geq 98\%$ 。

5.6 0.5%磷酸溶液:量取 5 mL 磷酸(5.4),用高纯水定容至 1 L。

5.7 标准贮备液:准确称取水杨苷标准品(5.5)10 mg,用甲醇溶液(5.1)配制成 1.0 mg/mL 的标准溶液,于 4℃ 冰箱保存。

5.8 标准工作液:吸取适量 1.0 mg/mL 的标准贮备液(5.7),用甲醇溶液(5.1)分别稀释成 0.005 mg/mL、0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.04 mg/mL 和 0.06 mg/mL 五个浓度,现用现配。

5.9 滤膜:0.45 μm 。

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 旋转蒸发器。

6.4 超声波清洗器。

7 样品的取样及预处理

从被检样品的不同部位均匀取样 50 g,冷冻,粉碎,混匀,作为备检样品。

8 试验方法

8.1 供试样品溶液的制备

称取 1 g 蜂胶乙醇提取物试样或 2 g 蜂胶原料试样,用 75%乙醇超声波提取 30 min,料液比为 1:15(质量浓度),反复提取 3 次。合并滤液,离心过滤后旋转蒸发除去乙醇,然后用蒸馏水定容至

50 mL,取上清液,0.45 μm 滤膜过滤,供液相色谱测定。

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 mL/min。

梯度洗脱,洗脱程序见表 A.1。

检测波长:213 nm。

柱温:30 ℃。

进样量:5 μL。

8.3 测定

取 5 μL 样品溶液(8.1)和水杨苷标准工作液(5.8)(控制标准液浓度与试样溶液中水杨苷的浓度尽量接近)分别进样分析,根据水杨苷的含量和 CCP 的有无确定是否存在杨树胶。

水杨苷标准品、杨树型蜂胶、杨树胶、掺 5% 杨树胶的蜂胶原料及掺 15% 杨树胶的蜂胶乙醇提取物的色谱图参见附录 B。

8.4 结果计算

试样中水杨苷含量(X)以毫克每克(mg/g)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{c_s \times V \times A}{m \times A_s} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c_s ——水杨苷标准溶液的浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

V ——试样最终定容体积,单位为毫升(mL);

A ——试样溶液对应的峰高或峰面积;

m ——样品质量,单位为克(g);

A_s ——水杨苷标准溶液对应的峰高或峰面积。

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%。

8.5 结果判定

本方法所检测水杨苷和 CCP 为杨树胶中含有而蜂胶中不含有的物质。如果待测样品中检测不到水杨苷或待测蜂胶乙醇提取物样品中水杨苷检测浓度小于 0.25 mg/g,或待测蜂胶原料样品中水杨苷检测浓度小于 0.15 mg/g,并且检测不到 CCP,则该样品为未检出杨树胶的样品;如果待测蜂胶乙醇提取物样品中水杨苷检测浓度大于 0.25 mg/g,或待测蜂胶原料样品中水杨苷检测浓度大于 0.15 mg/g,无论检测到 CCP 与否,该样品判定为检出杨树胶的样品;如果待测样品中检测不到水杨苷,而检测到 CCP 的,则采用液相色谱串联质谱法作进一步验证(液相色谱、质谱检测条件参见附录 C)。确定为 CCP 的,则该样品判定为检出杨树胶的样品。

附录 A
 (规范性附录)
 高效液相色谱梯度洗脱条件

表 A.1 高效液相色谱法梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	乙腈 %	0.5%磷酸 %
0	1	5	95
20	1	5	95
20.1	1	100	0
30	1	100	0
30.1	1	5	95
38	1	5	95



附录 B

(资料性附录)

水杨苷标准品、杨树型蜂胶、杨树胶、掺入 5% 杨树胶的蜂胶原料及
掺入 15% 杨树胶的蜂胶乙醇提取物的色谱图

B.1 水杨苷(标准品)色谱图见图 B.1。

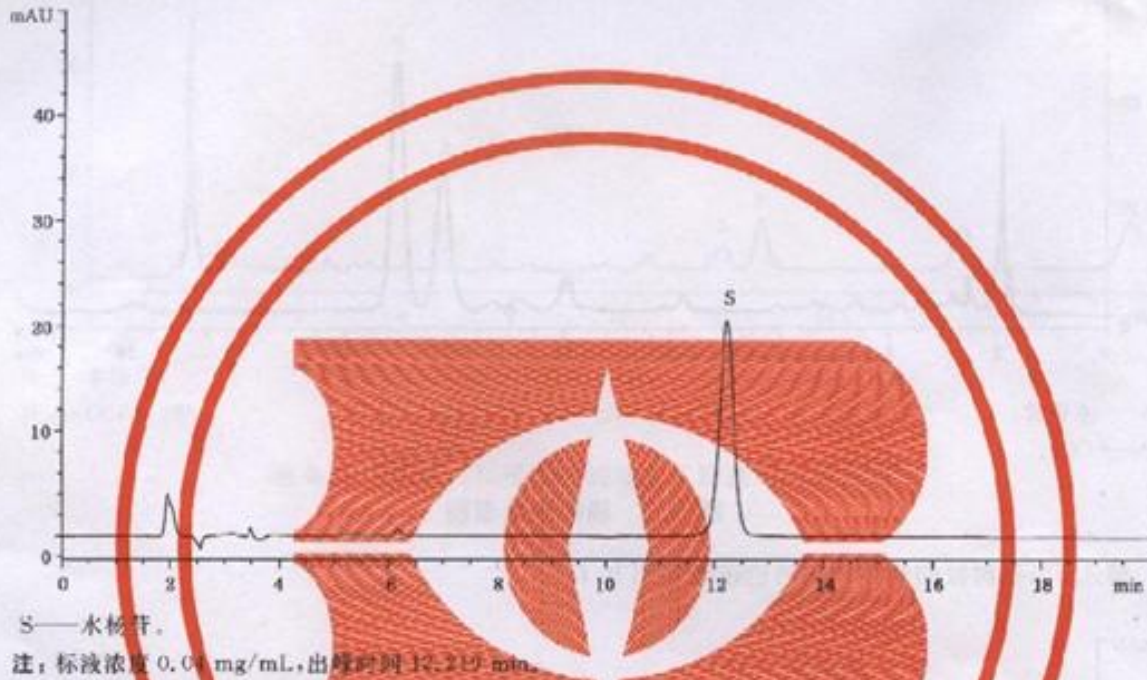


图 B.1 水杨苷(标准品)色谱图

B.2 杨树型蜂胶色谱图见图 B.2。

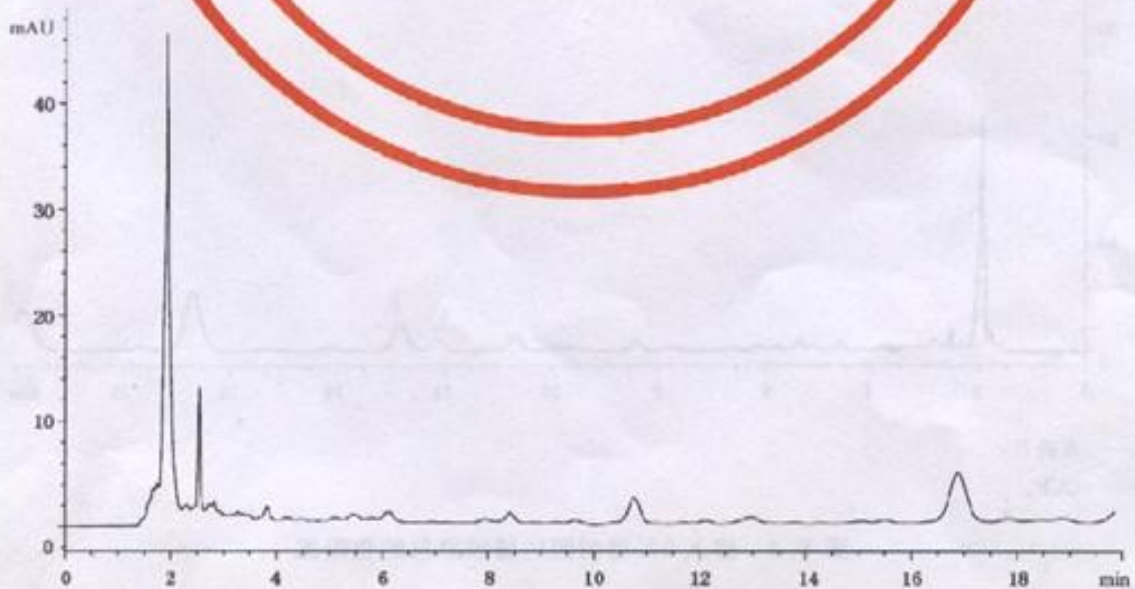


图 B.2 杨树型蜂胶色谱图

B.3 杨树胶色谱图见图 B.3。

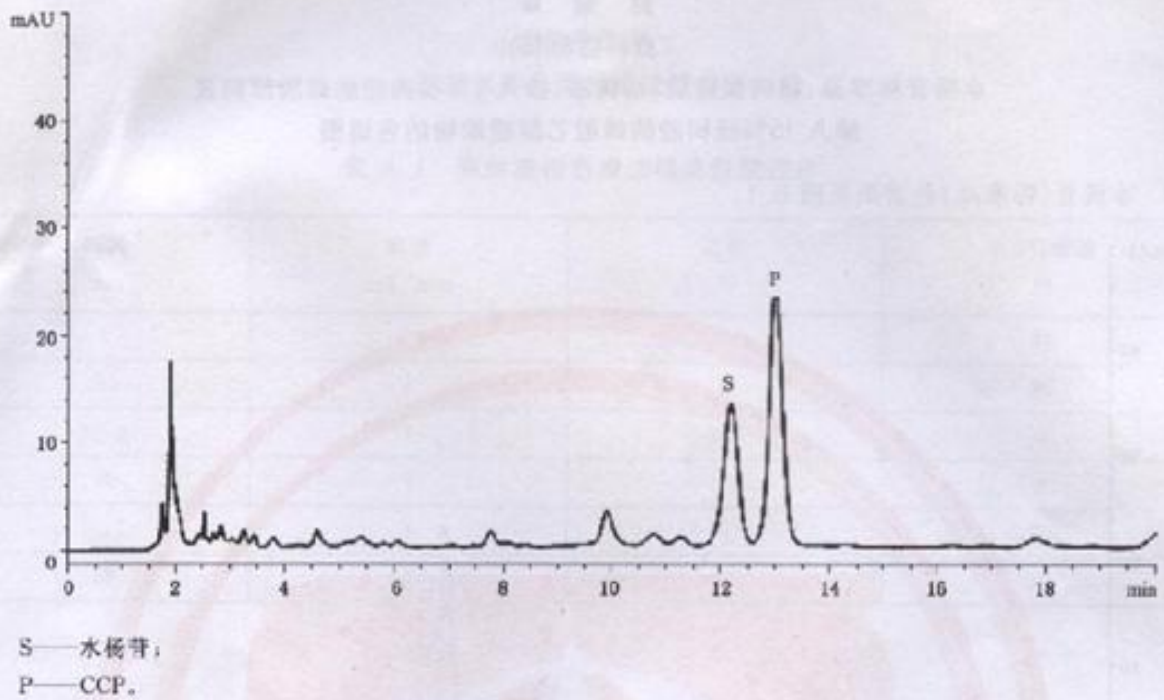


图 B.3 杨树胶色谱图

B.4 掺入 5% 杨树胶的蜂胶原料的色谱图见图 B.4。

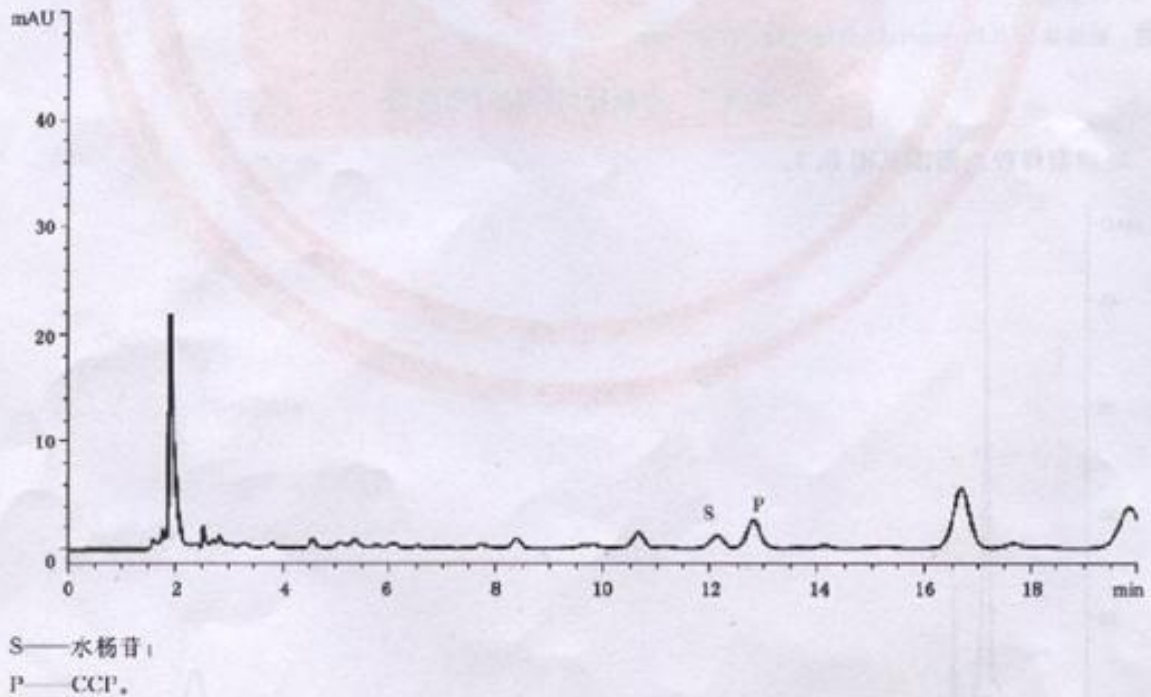
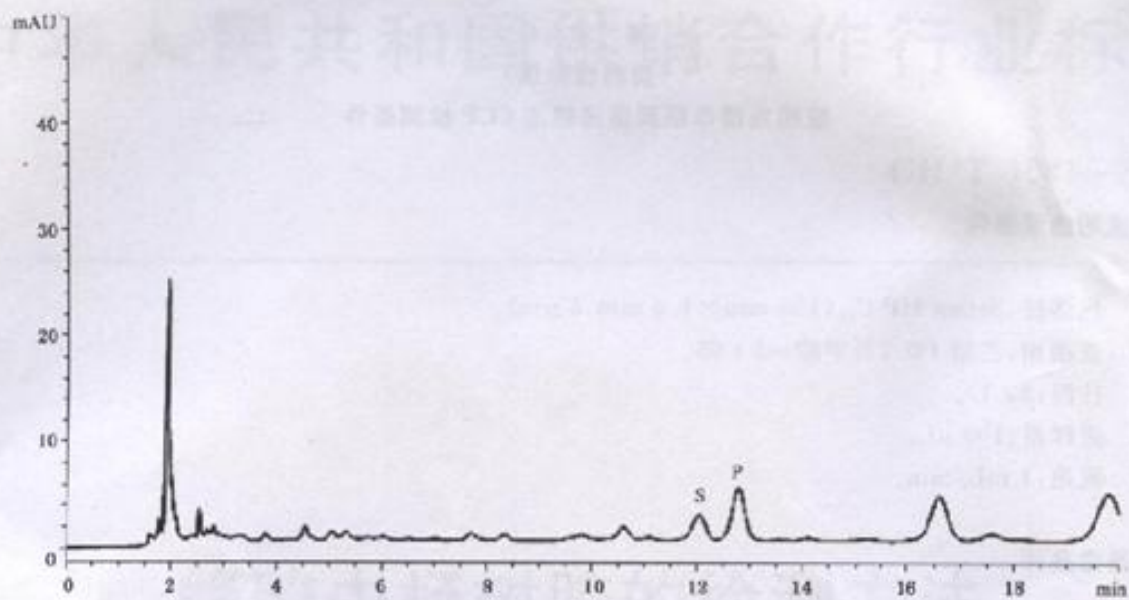


图 B.4 掺入 5% 杨树胶的蜂胶原料的色谱图

B.5 掺入 15% 杨树胶的蜂胶乙醇提取物的色谱图见图 B.5。



S—水杨苷；

P—CCP。

图 B.5 掺入 15% 杨树胶的蜂胶乙醇提取物的色谱图



附录 C

(资料性附录)

液相色谱串联质谱法确定 CCP 检测条件

C.1 液相色谱条件

C.1.1 色谱柱: Sepax HP-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)。

C.1.2 流动相: 乙腈 + 0.2% 甲酸 = 5 + 95。

C.1.3 柱温: 30 ℃。

C.1.4 进样量: 100 μL。

C.1.5 流速: 1 mL/min。

C.2 质谱条件

C.2.1 扫描方式: 负离子扫描。

C.2.2 干燥气流量: 12.0 L/min。

C.2.3 雾化器压力: 344.7 kPa (50 psi)。

C.2.4 干燥气温度: 350 ℃。

C.2.5 毛细管电压: 正离子 4 000 V, 负离子 3 500 V。

C.2.6 裂解电压: 100 V。



GH/T 1081—2012

版权专有 侵权必究

书号: 155066 · 2 · 24136

定价: 16.00 元