

蜂胶样品乙醇提取物的UPLC-Q-TOF-MS 指纹特征

刘莉敏¹, 郭 军^{1,*}, 米智慧¹, 王 竹², 向雪松²

(1. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018;

2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050)

摘 要: 探索蜂胶质谱指纹在建立蜂胶品质和真实性判别模型的可行性, 对9个国内外蜂胶样品用体积分数75%热乙醇溶液提取, 提取液用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪进行一级阳离子化总离子流色谱和总质谱(色谱和质谱指纹)的采集分析。从总离子流图指纹发现2个广东成品蜂胶色谱指纹与其余7个极为不同, 判断为异常蜂胶; 9个蜂胶样品均未检出芦丁和槲皮素。总离子流图指纹结合峰内分子的质荷比可直观对比蜂胶样品的相同和差异, 能克服色谱峰的漂移, 比单用液相色谱指纹特征判别更可靠。总质谱指纹主成分分析对2个异常蜂胶的判别与色谱指纹结果一致, 表明色谱和质谱指纹结合有望建立更稳健的蜂胶鉴别方法。

关键词: 蜂胶; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱; 色谱指纹; 质谱指纹; 主成分分析

UPLC-Q-TOF-MS Fingerprint Profiling of Ethanol Extracts of Propolis

LIU Li-min¹, GUO Jun^{1,*}, MI Zhi-hui¹, WANG Zhu², XIANG Xue-song²

(1. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;

2. National Institute For Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract: This study aimed to explore a robust method for propolis authentication. Ultra high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) first grade cation electronic spray ionization ($[M+H]^+$) total ion chromatogram (TIC) and mass spectrometry (MS) were used to acquire and analyze chromatographic fingerprints and mass spectral fingerprints of hot 75% (*V/V*) ethanol extracts of 9 propolis samples. Samples of two brands of propolis from Guangdong province were identified as abnormal or fake propolis by TIC fingerprint profile; neither rutin nor quercetin was found in all 9 samples. Compared to HPLC chromatographic fingerprint profiling, TIC profile combined with *m/z* ratio of molecules in the peak could improve the discrimination power of chromatographic fingerprint profiling. Through principal component analysis (PCA) of mass spectral fingerprint two abnormal propolis samples were confirmed. This study implies that the combination of the two strategies may be helpful to develop a more accurate method for propolis authentication. Mass spectrum contains far more information which is more complicated when compare to chromatogram, so that deserving to be further explored.

Key words: propolis; ultra high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS); chromatographic fingerprint profiling; mass spectrum fingerprint profiling; principal component analysis (PCA)

中图分类号: TS201.6; R155.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 18-0096-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201418019

我国蜂胶掺假造假现象非常严重^[1-3], 这种欺诈和谋取暴利不仅冒犯消费者尊严、威胁消费者健康, 也严重扰乱蜂胶市场的健康发展。开发准确可靠的蜂胶真实性鉴别技术是打击这种恶劣现象的首要环节。

蜂胶是蜜蜂从树芽、树皮等采集的树脂混合了蜜蜂

分泌的蜂蜡以及花粉、蜜蜂尸体残片、环境杂物等形成的混合物^[4-5]。因此蜂胶的化学成分极为复杂, 已知成分有数百种之多。仅树脂组分就可能含有数十种黄酮类以及其他多酚化合物^[6], 而且这些化合物可能因树脂来源、树种、地理位置和季节的不同而不同^[7-8]。总之鉴别蜂胶

收稿日期: 2013-12-17

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD33B01-6)

作者简介: 刘莉敏(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品安全。E-mail: limin_liu@emails.imau.edu.cn

*通信作者: 郭军(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为营养与食品安全。E-mail: guojunge@imau.edu.cn

产地、品牌、植物来源及真伪等真实性是一个难度较大的课题。一些媒体和网络上介绍的感官和简单理化鉴别方法^[9-10],对蜂胶真实性、真实程度鉴别显然是不够的。基于光谱、色谱或质谱“指纹图谱”的蜂胶鉴别研究是很有希望的尝试或方向,但国内文献[11-15]所指的“指纹”鉴别,通常是指蜂胶液相色谱图的直接肉眼对比。当大量样品覆盖了不同地区、季节、树种、蜂巢及真假信息时,或提取物组分很多时,“色谱指纹”复杂程度可能会超过肉眼可辨别的程度。基于化学计量学的判别分析技术^[16-17]可以消除或屏蔽指纹的共性,突出不同的特征,使“指纹”鉴别变得更直观和轻松。但目前基于化学计量学的蜂胶判别技术研究报道相对较少。

超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(ultra high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)联用仪是目前最为先进的色谱质谱联用技术之一,色谱分辨率和质谱精密密度比高效液相色谱-质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)高^[18],在蜂胶“质谱指纹”方面研究未见报道。本研究用UPLC-Q-TOF-MS对蜂胶热乙醇提取物(主要成分为黄酮类^[19-21])总离子流色谱图(total ions chromatogram, TIC)和总质谱图进行采集和分析。为蜂胶真实性鉴别技术开发积累一些工作和经验,以期利用UPLC-Q-TOF-MS色谱图结合质谱数据的化学计量学分析建立更稳健的蜂胶鉴别方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂胶:1~4号蜂胶样品 国产市售;5、6号蜂胶样品 新西兰市售;7号样品 荷兰市售;8、9号样品 内蒙古托克托县和赤峰市郊区养蜂场。共采集了9个蜂胶样品(表1)。7种黄酮标准物:芦丁、槲皮素、杨梅素、山奈酚、松属素、芹菜素和高良姜素 北京世纪奥科生物技术公司。

表1 蜂胶采集信息
Table 1 Information about propolis samples

编号	品牌	剂型	标注总黄酮含量/(g/100 g)	产地或生产厂家
1	略	流体软胶囊	3.75	中国, 广东
2	略	流体软胶囊	6.28	中国, 广东
3	略	流体软胶囊	4.0	中国, 广东
4	略	流体软胶囊	3.0	中国, 广东
5	Good health	粉末胶囊	未知	新西兰
6	Kiwi Harvest	流体软胶囊	未知	新西兰
7	Propol	原蜂胶粉末	未知	荷兰, 瓦赫宁根
8	无	原蜂胶块	未知	中国, 内蒙赤峰
9	无	原始蜂胶	未知	中国, 内蒙托县

1.2 仪器与设备

玻璃冷凝回流装置、JC-HH-S26恒温水浴锅 济南精诚实验仪器有限公司;液相色谱-质谱联用仪(XEVO-G2QTOF UPLC-Q-TOF、电喷雾接口、Masslynx 4.1工作站) 美国Waters公司;Synergy纯水器 美国Millipore公司;Pirouette 4.5化学计量学分析软件 美国Infometrix公司。

1.3 方法

1.3.1 蜂胶样品制备

准确称取9个样品各1.0 g(原蜂胶冷冻粉碎),加体积分数75%乙醇溶液80 mL, 80 ℃水浴,冷凝回流处理2 h,过滤后定容100 mL^[19-20],用0.22 μm微孔滤膜过滤后作为待测样品。重复上述方法,每个蜂胶共提取3组平行乙醇提取液为待测样品。

1.3.2 标准物

7种黄酮标准物用体积分数75%乙醇溶液溶解,0.22 μm过滤,单独和等比混合上机。本实验确认的UPLC-Q-TOF-MS色谱和质谱信息见表2。

表2 7种黄酮类化合物标准物色谱和质谱信息
Table 2 Chromatographic information about 7 flavonoid standards

标准物类别	测定纯度	相对分子质量	保留时间/min	分子离子[M+H] ⁺
芦丁	UV≥98%	610.51	9.27	611.161
杨梅素	HPLC≥98%	318.24	11.51	319.047
槲皮素	HPLC≥98%	302.23	14.53	303.052
芹菜素	HPLC≥98%	270.24	16.87	271.060
山奈酚	HPLC≥98%	286.23	17.26	287.055
松属素	HPLC≥98%	256.25	23.57	257.081
高良姜素	HPLC≥98%	270.24	24.02	271.060

1.3.3 质谱指纹特征采集

用UPLC-Q-TOF-MS采集蜂胶乙醇提取物及混合黄酮标准物一级阳离子总离子流图和质谱图(数据集);质谱数据用仪器自带Masslynx 4.1软件和美国Infometrix公司的化学计量学软件Pirouette 4.5进行了主成分分析(principal component analysis, PCA)^[17]。

色谱条件: Waters BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相: A相为水和体积分数0.1%甲酸, B相为乙腈和体积分数0.1%甲酸,梯度洗脱;流速0.3 mL/min;进样量2 μL;柱温40 ℃;柱后分流后进入质谱仪。

质谱条件: 电离方式: 电喷雾电离(electron spray ionization, ESI)源;检测方式: 正离子[M+H]⁺模式;锥孔电压10~30 kV;离子源温100 ℃;质量扫描范围m/z 100~1 000(分析是截取200~800 m/z质谱范围);碰撞能4 eV;锥孔气流量50 L/h;脱溶剂气流量600 L/h。

2 结果与分析

2.1 总离子流色谱图

图1和表3为9个蜂胶样品总离子流色谱图（截取保留时间5~30 min）和色谱峰质谱扫描基峰或主要分子离子质荷比。1）2个广东产蜂胶（1号和4号）出现两者独有的极为异常的色谱峰群（保留时间约5~12 min，峰号1'~10'），判断为异常蜂胶，或非天然蜂胶。且这2个品牌蜂胶加工时可能使用了相同的原料。2）所有蜂胶未检测出芦丁和槲皮素。5'号峰保留时间与标准物芦丁接近，但质谱与芦丁不符合。南垚等^[22]和丽艳^[23]也曾报道蜂胶中不含芦丁或含量甚微。3）除了1、4号特别异常外，其余7个蜂胶在保留时间23~26 min有明显的相似峰群。1~5号峰，2号峰为松属素、3号峰为高良姜素、1、4号和5号峰无标准对照物，1号峰疑为柯因。4）4个国内蜂胶近似度较高，基本都有1~9号峰；新西兰蜂胶无4、6号峰（芹菜素）和7号峰（山奈酚）或峰很小；荷兰蜂胶色谱峰最多。总之TIC指纹上基本可看出不同来源蜂胶的差别，但有待更多的实验结果证实这种判别的可靠性。

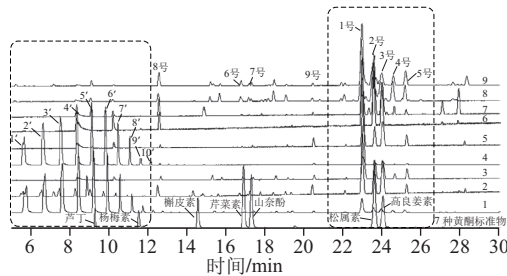


图1 黄酮标准物和蜂胶样品总离子流色谱图

Fig.1 Total ion current chromatogram (TIC) of propolis samples and flavonoid standard substances

表3 总离子流色谱图1~9号色谱峰质谱扫描分子离子质荷比
Table 3 Mass to charge ratios of molecular ions 1 through 9 in each labeled peak in TIC

样品号	主要色谱峰编号									m/z
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	255.066	257.081	271.060	315.087	285.078	271.060	287.055	384.233*	285.078	
2	255.066	257.081	271.060	—	285.078	271.060	287.055	—	285.078	
3	255.066	257.081	271.060	315.087	285.078	271.060	287.055	453.344	285.078	
4	255.066	257.081	271.060	—	285.078	—	—	384.233*	285.078	
5	255.066	257.081	271.060	—	285.078	—	287.055	453.344	285.078	
6	255.066	257.081	271.060	—	—	—	—	453.344	—	
7	255.066	257.081	271.060	479.135*	285.078	271.060	287.055	453.344	285.078	
8	255.066	257.081	271.060	315.087	285.078	271.060	287.055	453.344	285.078	
9	255.066	257.081	271.060	315.087	285.078	271.060	287.055	453.344	285.078	
确定物质	柯因?	松属素	高良姜素	—	—	芹菜素	山奈酚	—	—	

注：*，保留时间相同或相近的峰，但基峰或主要分子离子质荷比不同；—，该样品中没有此特征峰或峰极小；?，该峰质荷比与柯因一致，但因本实验中无柯因标准物，故无法确定是否为柯因。

HPLC色谱指纹对比主要靠峰的有无、高低，以及几个峰的组合形态等特征。色谱分析常出现保留时间的漂移现象，而且保留时间相同的峰内物质也不一定是同一种或同一组化合物。UPLC-Q-TOF-MS在分析TIC色谱特征的同时，可以用工作站软件扫描单个峰的质谱，可以判断峰内物质的组分，因此液相色谱-质谱分析比单纯液相色谱指纹分析更具有优越性。本实验在比对TIC色谱特征的同时，也给出了各峰的质谱基峰或主要分子离子的质荷比。1、4号样品中对8'~10'号特征峰丰度接近基峰的质荷比数据都进行了记录，由上到下丰度依次减少（表4）。

表4 总离子流色谱图1'~10'号色谱峰质谱扫描分子离子质荷比
Table 4 Mass to charge ratios of molecular ions 1' through 10' in each labeled peak in TIC

样品号	主要色谱峰编号										m/z
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	
1	327.201	317.227	415.255	459.281	503.307	547.333	591.362	635.383	679.41	740.465	
								652.412	696.436	362.223	
									340.208	723.439	
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
4	327.201	371.231*	415.255	459.281	503.307	547.333	591.362	635.389	679.41	362.223	
									340.212	723.239	
									696.436	740.465	

注：*，保留时间相同或相近的峰，但基峰或主要分子离子质荷比不同；—，该样品中没有此特征峰或峰极小。

2.2 总质谱图

9个蜂胶热乙醇提取物电喷雾电离一级阳离子化总质谱图，即所有色谱峰（保留时间5~30 min）的质谱图（质谱指纹）见图2。蜂胶体积分数75%热乙醇溶液提取物主要成分为黄酮类^[6,19-21]，而黄酮类基本结构理论分子质量约为222 D，黄酮苷类衍生物分子质量最大也不会超过800 D，因此截取m/z 200~800段可大致为黄酮类物质质谱图。虽然一级离子化分子碎片极少，但每个样品质谱峰数量仍少则几千，多则上万个或更多（质谱图放大或转出数据矩阵是可以看到）。肉眼略能看出7种黄酮类混合标准物质和1、4号蜂胶的质谱相对稀疏。质谱指纹比色谱指纹复杂的多，数据信息量很大，但隐藏的规律似乎也很多，显然无法用肉眼比对和判别。质谱数据分析主要用化学计量学处理，最常用的数据结构分析是PCA^[16-17]。

2.3 质谱数据PCA

本研究将9个蜂胶总质谱指纹（图2）转化为质谱数据矩阵（数据表从略），用化学计量学软件进行了PCA，获得PCA得分向量2D或3D图。本研究PCA图中又引入了样品序列号，因此实际绘制了4D图，如图3所示。一种形状代表一个样品，即形状相同的散点为一个蜂胶

样品的不同测定结果(每样有3个重复,1号蜂胶的一组测定因离群而被剔除)。蜂胶1和4脱离了其他7种蜂胶高悬上方,说明这2种蜂胶的质谱指纹特征(图1和表3)与其他有很大差异;其他蜂胶集中在底部,从侧面看,基本聚集成一群,说明有很多共同特征,如图1所示的共有峰。7、8、9为3种原蜂胶,相似度较大。尤其8、9两种内蒙产原蜂胶特征最相似,这可能是因为虽然产地间隔上千公里,但纬度和气候相同,胶原植物相同的缘故。李熠^[24]、丽艳^[23]等报道我国华东、华中、华北和西北地区蜂胶有效成分含量基本一致。

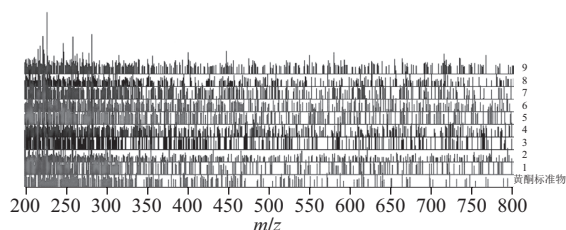
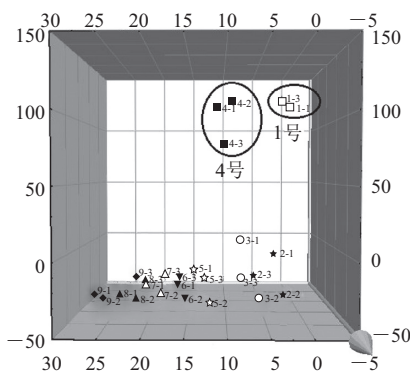


图2 9种蜂胶乙醇提取物和7种黄酮类标准物质一级阳离子化总质谱指纹图

Fig.2 Mass spectral profile of 9 propolis samples and 7 flavonoids

本研究因为样本量较少,有差异峰在TIC图上一目了然(分子离子质荷比见表3、4)。样本较多的情况,色谱图上较难寻比较差别,可以用PCA根向量图分析对差异贡献大的组分(质荷比),这对探索性研究意义较大,可以从众多影响因素中找到决定性因素。



1、2、3为国产市售蜂胶;5、6为新西兰市售蜂胶;7、8、9为原蜂胶。

图3 蜂胶总质谱数据PCA得分向量图

Fig.3 PCA score plot of the total mass spectral data of 9 propolis samples

3 讨论

蜂胶的UPLC-Q-TOF-MS分析,不仅可获得相当于HPLC色谱指纹图的TIC指纹图,其优越性还在于,当保留时间接近时还可单峰的质谱扫描结果确定峰内物质是否一致,这使得蜂胶的色谱指纹判别更加准确可靠;另外还可以单独研究建立“质谱指纹特征”判别分析。质谱指纹比色谱指纹复杂得多,但隐藏的信息和规律很

多,因此探索性研究和开发的空间也很大。质谱数据庞大,分析的主要工具是矩阵数学和化学计量学,其中目前国际上常用的有PCA及尤其演化或类似的偏最小二乘回归和三线性分解判别分析^[16-17]。这类方法的最基本原理是通过降维,去除样品间的共性或平行特征,突出差异,使差异判别变得比较简单。这类化学计量学分析还可以通过根向量图找到造成差异的物质,如什么物质(质荷比),有或无,量多或少^[16-17]。

本实验获得总离子流色谱图和质谱数据主成分图。这2种图谱分析对2种国产异常蜂胶的鉴别能力都很强,表明基于UPLC-Q-TOF-MS和化学计量学数据处理技术建立可靠的蜂胶鉴别方法很有希望。但建立基于化学计量学的鉴别技术,需要大量的训练样品集来建模,因此最终可否获得准确可靠的蜂胶产地、品牌及真伪判别模型尚需大量的专项研究。

参考文献:

- [1] 朱海华,杨强,田春华,等.蜂产品质量安全与现状分析[J].中国蜂业,2011,62(9):30-32.
- [2] 赵会方.蜂胶何时走出“造假漩涡”?[N].人民政协报,2010-12-15(01).
- [3] 罗辅林.警惕蜂胶中掺假物:白杨树芽孢[J].蜂蜜杂志,2002,4(4):8.
- [4] GHISALBERTI E L, JEFFERIES P R, LANTERI R, et al. Constituents of propolis[J]. Experientia, 1978, 34(2): 157-158.
- [5] VASSYA B. Recent trends and important developments in propolis research[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2005, 2(1): 29-32.
- [6] 符军放.中国蜂胶中酚类化合物的色谱分析方法研究[D].西安:西北大学,2006.
- [7] 郭夏丽,罗丽萍,徐元君,等.不同季节中国蜂胶醇提物的化学成分及生物活性[J].食品科学,2011,32(17):141-146.
- [8] 程煥,秦子涵,胡小松,等.固相微萃取/动态顶空-气相色谱-质谱联用法对蜂胶与杨树胶挥发性成分的分析[J].食品安全质量检测学报,2012,3(2):1-9.
- [9] 王振山.真假蜂胶鉴别方法教你如何选好蜂胶[EB/OL].(2013-06-13)[2013-10-05].中国食品报网,http://www.cnfood.cn/npage/shownews.php?id=5959.
- [10] 谈继芹.五招教你辨别真假蜂胶[EB/OL].(2011-01-08)[2013-10-05].食品商务网,http://www.21food.cn/html/news/35/612336.htm.
- [11] 张翠萍,胡福良.蜂胶与杨树胶HPLC指纹图谱鉴别[J].中国食品学报,2011,11(1):222-225.
- [12] 盛文胜.辨别真假蜂胶的一些方法[J].食品工业科技,2009,30(12):444-446.
- [13] 马纪伟,闫冬良.HPLC指纹图谱控制蜂胶质量[J].中国卫生检验杂志,2011,21(9):2162-2163.
- [14] 韩红祥,王维,陈雪松,等.应用HPLC-MS联用技术研究不同基源蜂胶指纹图谱[J].吉林中医药,2011,31(12):1221-1223.
- [15] 赵娜,毕玉芬,李园,等.云南蜂胶中酚类化合物的HPLC分析研究[J].云南民族大学学报:自然科学版,2011,20(5):209-212.
- [16] 褚小立.化学计量学方法与分子光谱分析技术[M].北京:化学工业出版社,2011:31-123.
- [17] The Premier Chemometrics Company. Infometrix, Inc. Software handbook: pirouette multivariate data analysis software. version 4.5[EB/OL].(2013-05-06)[2013-10-05].http://www.infometrix.com.
- [18] 质谱入门[EB/OL].(2013-10-05).http://www.waters.com/waters/zh_CN/Data-Handling/nav.htm?locale=zh_CN&cid=10091026#sthash.ApH6bdd8.dpuf.
- [19] 木努尔丁·托合尼牙孜,艾尔肯·艾米尔,依米提·热合曼.新疆产蜂胶总黄酮的提取工艺优化及GC-MS分析[J].食品科学,2011,32(2):132-135.
- [20] 李由,徐坤.溶法提取蜂胶有效成分的工艺研究[J].西华大学学报:自然科学版,2009,28(1):67-68.
- [21] 胡福良,朱威,李英华.不同方法提取的蜂胶液中总黄酮含量的测定及其药理学研究[J].中国养蜂,2004,55(3):4-6.
- [22] 南垚,周立东.蜂胶、杨树叶及杨树芽中水杨苷和芦丁含量比较[J].世界科学技术中医药现代化,2008,10(6):59-61.
- [23] 丽艳.中国不同地区蜂胶醇提取物化学组成及抗氧化活性[D].南昌:南昌大学,2008.
- [24] 李熠.我国不同地区蜂胶黄酮类化合物差异性分析[D].北京:中国农业科学院,2008.