

· 色谱指纹图谱研究 ·

蜂胶提取物红外指纹图谱研究

祁龙凯¹, 林 励¹, 邓 韬¹, 肖凤霞¹, 谭东山² (1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广州市谭山蜂业有限公司, 广东 从化 510925)

摘要: 目的 考察不同产地蜂胶提取物样品的红外指纹图谱差异, 构建蜂胶提取物的红外指纹图谱。方法 采用傅里叶变换红外光谱(FTIR)建立不同产地蜂胶提取物红外指纹图谱, 应用 OMNIC 软件对数据进行预处理, Matlab7.0 比较各样品的相似度, SPSS17.0 统计软件进行聚类分析。结果 FTIR 图谱在 690~1760 cm⁻¹ 波数范围内吸收峰差异较大, 可作为蜂胶提取物的指纹特征, 红外指纹图谱结合聚类分析的方法, 可作为蜂胶快速鉴别的方法。结论 该方法简便、稳定, 可用于蜂胶的鉴别和质量评价。

关键词: 蜂胶; 红外指纹图谱; 聚类分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)02-0197-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.021

Study on Infrared Fingerprint of Propolis Extract

QI Longkai¹, LIN Li¹, DENG Tao¹, XIAO Fengxia¹, TAN Dongshan² (1. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Guangzhou Tanshan Apiculture Co., Ltd, Conghua 510925 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the infrared fingerprint differences in propolis extract samples from different areas, and to construct the infrared fingerprint of propolis extract. **Methods** Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was adopted to construct the infrared fingerprint of propolis extract from different origins. OMNIC software was applied for data pre-processing, Matlab7.0 for comparing the similarity of each sample, and SPSS17.0 statistical software for cluster analysis. **Results** The absorption peak varied greatly in the FTIR spectra range of 690~1760 cm⁻¹, which can be used as the specific fingerprint of propolis extract. Cluster analysis method for infrared fingerprint can be used for the rapid identification of propolis. **Conclusion** The established method is simple and stable, and can be used for identification and quality evaluation of propolis.

Keywords: Propolis; Infrared spectroscopy; Cluster analysis

蜂胶为蜜蜂科昆虫意大利蜂 *Apis mellifera* L. 的干燥分泌物, 是蜜蜂从植物芽苞或树干处采集的树脂, 混入其自身分泌的唾液腺分泌物、花粉以及蜂蜡等的一种具有芳香气味的天然胶状固形物, 具有补虚弱、化浊脂、止消渴的作用; 外用具有解毒消肿、收敛生肌的功效^[1]。蜂胶中含有多种黄酮类^[2]、多酚类化合物^[3-4], 具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤、降血

脂、增强免疫调节等多种生物活性^[5-6]。近 10 年来蜂胶在医疗保健领域中得到了进一步的应用, 市场需求量也越来越大, 导致掺假蜂胶、劣质蜂胶屡见不鲜, 给我国蜂产品出口以及医疗健康事业带来不利的影响。红外光谱图具有较强的特征性和可比性, 其快速、无损、成本较低, 可实现生产在线检测, 红外光谱法已广泛应用于中药的质量控制及真伪鉴

收稿日期: 2013-11-04

作者简介: 祁龙凯, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源开发与新药研究。Email: qi371605700@qq.com。通讯作者: 林励, 研究员, 研究方向: 中药资源开发与新药研究。Email: LL76611@126.com。

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2011B090400124)。

别^[7-8]。为此,我们开展了本项研究。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Avatar 330 傅立叶变换红外光谱仪,美国 NICOLET; DTGS 检测器(氘代硫酸三甘肽溴化钾检测器, OMNIC Ver7.3 软件操作系统, 光谱范围 4000~400 cm⁻¹, 分辨率 4 cm⁻¹。HF-2 红外压片模具, FW-4A 型压片机, 天津天光光学仪器有限公司; XS225A 电子天平(d=0.0001 g), 瑞士 Precisa; AS2060B 超声仪, 天津奥特塞恩斯仪器有限公司; N-1000 型 EYELA 真空旋转蒸发仪, 东京理化公司; HH-S4 型数显恒温水浴锅, 常州普天仪器制造有限公司。

1.2 试剂 溴化钾(光谱纯), Aladdin 公司, 批号: P116273; 甲醇(AR), 广州市金华大化学试剂有限公司, 批号: 20111126; 丙酮(AR), 广州市金华大化学试剂有限公司, 批号: 20110320; 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材 蜂胶由江苏江大源生态生物科技有限公司提供, 经广州中医药大学中药学院林励研究员鉴定为蜂胶 *CollaApis*。样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备 将蜂胶在 -20 ℃ 冷冻数天后粉碎, 过 2 号筛, 备用。取蜂胶药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加丙酮 100 mL, 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, 滤过, 移至 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得样品溶液。

2.2 样品溶液的测定方法 精密称取溴化钾(KBr)约 150 mg, 置玛瑙研钵中, 移液枪精密吸取 2.1 项下样品溶液 50 μL, 滴加到研细的 KBr 上, 在红外光灯下使溶剂挥干, 磨匀, 均匀放入模具内, 压强为 16 mPa, 维持 30 s, 得到样品片。在波数 4000~400 cm⁻¹ 范围内进行扫描, 以空白 KBr 片采集背景, 扣除水和二氧化碳的干扰, 分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描 32 次, 即得样品溶液的红外光谱。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取 fj22 号蜂胶, 按照 2.1 项下方法制备样品溶液, 按照 2.2 项下方法连续测定 6 次。用 Matlab 7.0 软件计算相似度, 测得的红外图谱与其所得共有模式图谱的相似度均大于 0.990, RSD 为 1.02 %。表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取 fj22 号蜂胶样品 6 份, 按照 2.1 项下方法制备样品溶液, 压片, 按照 2.2 项下方法测定。用 Matlab 7.0 软件计算红外图谱的相似度,

表 1 蜂胶样品信息表

Table 1 Samples of propolis

编号	产地	性状	采集时间
fj1	山西	红棕色块胶	2010.8.26
fj2	西安	黄色块胶	2010.8.20
fj3	陕西	黄褐色块胶	2010.8.26
fj4	四川	黑色纱盖胶	2010.8.30
fj5	云南宣威	红褐色纱盖胶	2010.9.27
fj6	青海	绿褐色纱盖胶	2010.8.30
fj7	宝鸡	黑色纱盖胶	2010.7.17
fj8	冀中地区(太行山脉)	红棕色纱盖胶	2010.7.26
fj9	湖北荆门	灰褐色框梁胶	2010.7.17
fj10	湖南	灰黑色纱盖胶	2010.7.17
fj11	安徽滁州	青绿色框梁胶	2010.8.18
fj12	河北邯郸	黄色纱盖胶	2010.8.14
fj13	河北邢台	黄棕色纱盖胶	2010.7.26
fj14	北京	红褐色块胶	2010.8.26
fj15	山东	红褐色块胶	2010.9.26
fj16	山东青州	黄棕色纱盖胶	2010.8.26
fj17	大连、烟台	黄棕色块胶	2010.7.30
fj18	鲁中地区(青州、潍坊)	青色块胶	2010.7.30
fj19	辽西地区、山海关	黄棕色块胶	2010.7.26
fj20	吉林、黑龙江	棕褐色纱盖胶	2010.7.26
fj21	山东	棕褐色纱盖胶	2011.12.13
fj22	山东	黄棕色纱盖胶	2011.11.01
fj23	陕西	棕色块胶	2011.12.13
fj24	西安	青绿色纱盖胶	2011.11.16
fj25	河南	棕色纱盖胶	2011.11.08
fj26	河南	棕色块胶	2011.11.10

测得的红外图谱与其所得共有模式图谱的相似度均大于 0.980, RSD 为 1.43 %。表明重复性良好。

2.4 蜂胶样品红外指纹图谱 以波数为横坐标, 吸光度为纵坐标, 蜂胶样品红外光谱叠加图见图 1。从图中可以看出, 26 批蜂胶的红外光谱大体一致, 用 Matlab 7.0 软件计算其相似度, 共有模式见图 2。

26 批蜂胶样品红外指纹图谱与其共有模式图谱的相关系数(中位数)在 0.9522~0.9964 之间, 见表 2。其中, fj1 号蜂胶的相关系数最大, fj12 号和 fj26 号

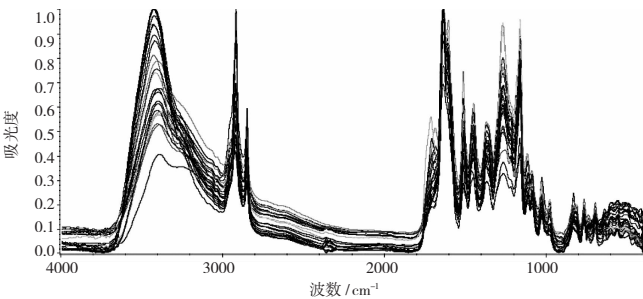


图 1 26 批蜂胶样品红外光谱图

Figure 1 IR spectra of 26 batches of propolis sample

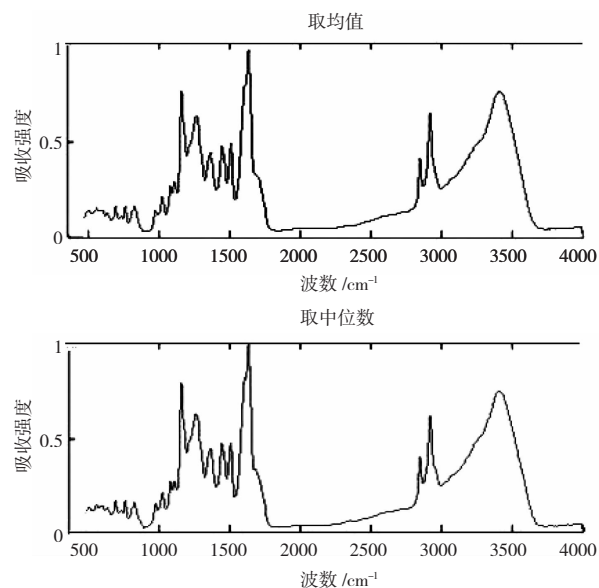


图 2 26 批蜂胶红外光谱共有模式图
Figure 2 A total of 26 batches of propolis IR mode Figure

表 2 26 批蜂胶样品相关系数 Table 2 Correlation coefficient of 26 batches of propolis			
样品编号	相关系数(中位数)	样品编号	相关系数(中位数)
fj1	0.9964	fj14	0.9749
fj2	0.9782	fj15	0.9901
fj3	0.9958	fj16	0.9901
fj4	0.9795	fj17	0.9951
fj5	0.9596	fj18	0.9833
fj6	0.9906	fj19	0.9894
fj7	0.9771	fj20	0.9892
fj8	0.9873	fj21	0.9727
fj9	0.9799	fj22	0.9851
fj10	0.9853	fj23	0.9859
fj11	0.9847	fj24	0.9825
fj12	0.9522	fj25	0.9840
fj13	0.9820	fj26	0.9522

蜂胶的相关系数最小。蜂胶的红外吸收峰主要集中在波数 1800~600 cm⁻¹ 之间，称为指纹区，在指纹区内各蜂胶样品吸收峰的峰位及相应的吸光度存在差异，可作为鉴别不同产地蜂胶的依据。

共有峰的确定方法：对于一组吸收峰，若组内吸收峰的波数差显著小于与其相邻组之间的平均波数差，则确定该组峰为一组共有峰^[9]。结合图 1 及数据分析可知蜂胶共有峰波数分别为 2920，2852，1637，1512，1450，1370，1269，1162，1115，1089，1030 cm⁻¹(差异不超过 ± 4 cm⁻¹)。蜂胶提取物共有峰的归属见表 3。

2.5 蜂胶红外指纹图谱聚类分析 26 批蜂胶的红外指纹图谱在波数 1800~600 cm⁻¹ 范围内，吸收峰的吸

表 3 蜂胶提取物共有峰的归属 Figure 3 Assignments of common peaks of propolis		
波数 /cm ⁻¹	基团及振动类型	归属
2920	vas C-H	饱和 CH(CH ₃ 、CH ₂)
2852	vs C-H	饱和 CH ₂
1637	ν C=C, ν C=O, δN-H	黄酮，醛，酯，氨基酸
1512	ν C=C	芳香族，黄酮
1450	ν C=C, δas C-H	芳香族，黄酮，饱和 CH ₃ 、CH ₂
1370	δas C-H	饱和 CH ₃ ，黄酮
1269	vas C-O-C, δO-H	环醚，醇，酚，羧酸
1162	ν C-O, vas C-O-C	醇，酯，芳香醚
1115	ν C-O, vs C-O-C	醇，酯
1089	ν C-O, νC-N	醇，黄酮，胺
1030	δC-OH, vs C-O-C	黄酮，醇

光度差异明显，可作为指纹特征鉴别不同产地的蜂胶。采集 1800~600 cm⁻¹ 波段内 26 批蜂胶的吸光度，形成 26 × 311 数据矩阵，作为聚类分析的数据基础。采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行聚类分析，聚类方法为组间连接法(Between-groups linkage)，距离算法为欧氏距离的平方(Squared Euclidean distance)，聚类分析结果见图 3。

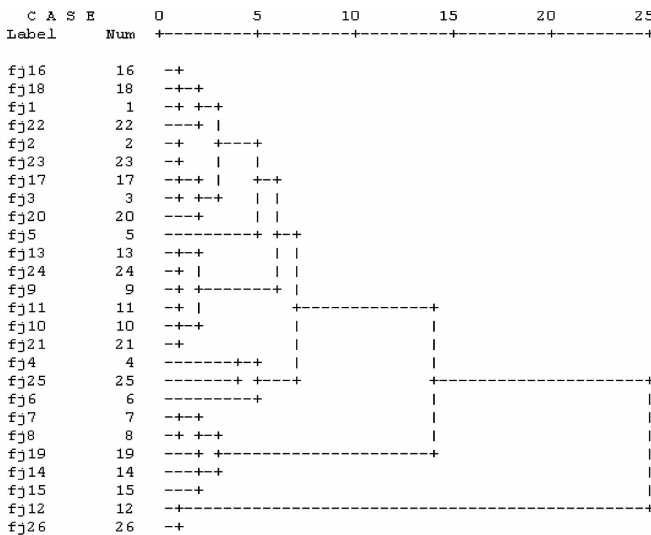


图 3 26 批蜂胶红外光谱聚类分析图
Figure 3 IR cluster diagram of 26 batches of propolis

从图 3 可知，26 批蜂胶样品可分为 5 类，第 1 类包括 fj1、fj2、fj3、fj5、fj16、fj17、fj18、fj20、fj22、fj23 号蜂胶；第 2 类包括 fj9、fj10、fj11、fj13、fj21、fj24 号蜂胶；第 3 类包括 fj4、fj6、fj25 号蜂胶；第 4 类包括 fj7、fj8、fj14、fj15、fj19 号蜂胶；第 5 类包括 fj12、fj26 号蜂胶。

将 26 批蜂胶提取物的红外指纹图谱经一阶导数处理后，采集 1800~600 cm⁻¹ 波段内数据，按上述方法进行聚类分析，结果见图 3。

比较图 3 和图 4 可知, 分别以 1800~600 cm^{-1} 波段内各蜂胶样品的吸光度值和将红外图谱经一阶导数处理后该波段内的数据作为聚类分析对象, 所得的聚类结果存在一定差异。经一阶导数处理后的聚类分析结果将 fj5、fj10、fj20、fj25 号蜂胶单独聚为一类。

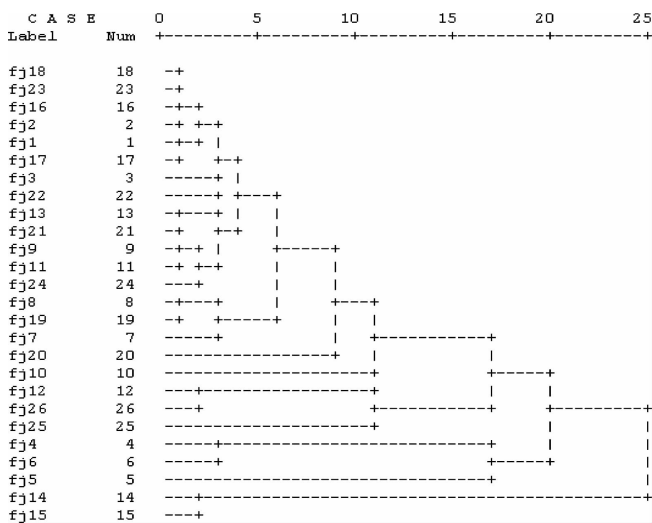


图 4 26 批蜂胶红外光谱一阶导数处理后聚类分析图
Figure 4 26 batches of propolis first derivative FTIR cluster analysis diagram

2.6 蜂胶提取物红外光谱的二阶导数比较 二阶导数谱具有较高的分辨率, 可将重叠的吸收峰分开, 用于区别相似度大的红外光谱。以 fj19 和 fj23 号蜂胶为例, 两者的红外指纹图谱相似度较高, 共有峰率为 100%, 在指纹区(1800~600 cm^{-1})内各主要吸收峰的峰形基本一致, 通过二阶导数谱可发现两者的差异。用 OMNIC 软件对 fj19 和 fj23 号蜂胶红外光谱进行处理, 求二阶 Norris 导数(有效位数 5, 有效位间距 5), 二阶导数图谱见图 5。从图 5 中可以看出, 两个样品的二阶导数谱在波数 1711, 1562, 1250, 910 cm^{-1} 处存在差异。

3 讨论

由于蜂胶特殊的理化性质, 在常温下难以粉碎, 需在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻数天后再粉碎。蜂胶在常温下具有黏性, 在制备红外样品片时, 难以与 KBr 研磨混匀, 因此, 本实验以蜂胶提取物为研究对象, 建立其红外指纹图谱, 在采集样品光谱时需扣除 H_2O 和 CO_2 的干扰, 每个样品重复测定 3 次, 经加和取平均后得到该样品的红外图谱。

26 批蜂胶的红外图谱与共有模式图谱的相似度均大于 0.95, 表明其化学成分有一定相似性。导数

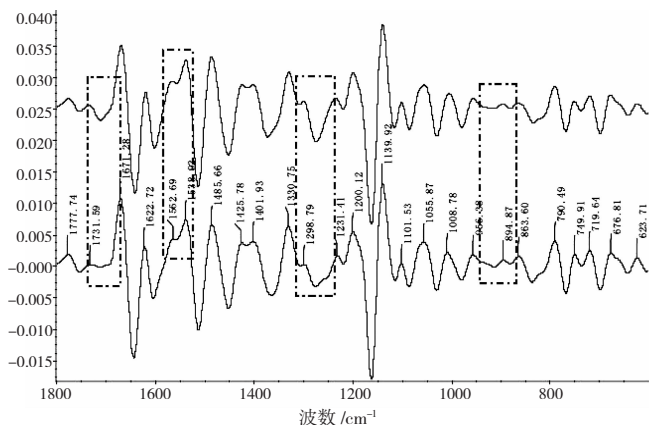


图 5 fj19 和 fj23 号蜂胶二阶导数图谱(1800~600 cm^{-1})
Figure 5 The second derivative spectra of the fj19 and fj23 propolis(1800 ~ 600 cm^{-1})

图谱具有很强的分辨能力, 可以进一步判断蜂胶的质量差异。蜂胶红外图谱经一阶导数处理后, 其聚类分析结果与实际情况更为相符。通过求二阶导数红外图谱可明显的发现不同产地蜂胶的差异性。

红外指纹图谱技术结合聚类分析法^[10], 可快速、可靠地鉴别不同产地的蜂胶药材, 通过红外二阶导数图谱可进一步判别两个或多个蜂胶样品间的差异, 为蜂胶的质量控制及产地溯源提供一种快速、简便的方法。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 336-337.
- [2] 张翠平, 胡福良. 蜂胶中的黄酮类化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(6): 1084-1090.
- [3] 张翠平, 王凯, 胡福良. 蜂胶中的酚酸类化合物[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(1): 102-105.
- [4] Ramanauskienė K, Savickas A, Inkenienė A, et al. Analysis of content of phenolic acids in Lithuanian propolis using high-performance liquid chromatography technique[J]. Medicina (Kaunas), 2009, 45(9): 712-717.
- [5] 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): 42-44.
- [6] 何晓波, 周俐斐, 芦柏震. 蜂胶的药理活性[J]. 中国药业, 2006, 15(1): 27-28.
- [7] 尹海波, 康廷国, 韩荣春, 等. 老鹳草药材 FTIR 图谱指纹鉴别与相似度分析[J]. 中药材, 2008, 31(5): 670-673.
- [8] 卢丽萍, 林励, 黄爱华, 等. 化橘红药材红外指纹图谱的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(3): 319-323.
- [9] 蔡浩, 秦昆明, 刘晓, 等. 用共有峰率和变异峰率双指标序列分析法分析百合的红外指纹图谱[J]. 红外, 2010, 31(11): 38-43.
- [10] 卢丽萍, 汪金玉, 林励, 等. 化橘红药材红外指纹图谱的聚类分析[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(3): 284-287.

(编辑: 宋威)