

SPME-GC/MS 联用技术分析蜂胶中挥发性成分的研究

李雅萍¹, 贺丽萍¹, 陈玉芬¹, 卢占列², 郑尧隆², 潘建国², 林励³

(1. 华南农业大学, 广东 广州 510400) (2. 广州市宝生园有限公司, 广东 广州 510100) (3. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

摘要: 用固相微萃取 (SPME) 及溶剂 (乙醇、乙酸乙酯) 提取法对蜂胶挥发性成分进行提取, 用 GC 毛细管柱进行分离, 归一化法测其相对含量, 气相色谱-质谱联用法对蜂胶中不同挥发性成分进行测定。结果 SPME 技术对蜂胶中萜烯类物质有简单快速, 提取效率高、溶剂消耗低及一定的浓缩富集作用等优点, 蜂胶含主要挥发性成分 28 种, 可检测到十几种萜烯类及醇类物质。通过 SPME-GC/MS 联用技术对蜂胶挥发性成分的研究, 为蜂胶的开发利用及指纹图谱的建立提供实验依据。

关键词: 蜂胶; 固相微萃取; 挥发性成分; 气相色谱-质谱联用技术

中图分类号: S896.6; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)07-0078-03

Identification of volatile components in Chinese propolis by solid phase microextraction coupled to gas chromatography- mass spectrometry (SPME-GC/MS)

LI Ya-ping¹, HE Li-ping¹, CHEN Yu-fen¹, LU Zhan-lie², ZHENG Yao-long², PAN Jian-guo², LIN Li³

(1.South China Agricultural University, Guangzhou 510400, China)(2.Guangzhou Company of Baosheng Yuan, Guangzhou 510100, China)(3.College of Chinese Medicine, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Propolis is a resinous substance collected by honeybees from various plant sources. SPME and solvent extraction methods were used to extract the volatile components from Chinese propolis. The major volatile constituents in Chinese propolis were identified by gas chromatography with a mass spectrometric detector and each component was quantitatively analyzed. SPME has the advantage of rapidly extracting and concentrating terpenes of analytical interest from propolis. Twenty-eight major compounds were identified, in which there are many terpenes compounds. This study can provide references for the further study of propolis.

Key words: propolis; solid phase microextraction; volatile components; GC/MS

蜂胶 (Propolis) 是蜜蜂采集植物茎、腋芽的树脂并混入自身鄂腺分泌物、花粉和蜂蜡混合而成的一种具芳香气味的胶状固体物, 是一种独特而宝贵的纯天然保健食品资源和药源。经常服用蜂胶, 能有效增强机体的免疫功能, 预防疾病的发生和加快病体的康复, 改善循环和消除各种炎症及保护肝脏, 防止肝硬化, 还可以消除体内毒素, 杀灭和抑制癌细胞。国内外医学专家研究证明, 蜂胶中所含有的黄酮类、多糖、酶类、萜烯类、有机酸等天然物质对癌症患者有独特的作用。蜂胶中的萜烯类等挥发性成分是其一个重要的质量指标, 具有指纹特征。

传统的挥发性有机物富集方法为水蒸气蒸馏和同

时蒸馏萃取, 不能满足快速分析的要求。固相微萃取是上世纪出现的样品浓缩新技术, 根据有机物与溶剂之间‘相似相溶’原则, 利用石英纤维表面的色谱固定相或吸附剂对分析组分的吸附作用, 将组分从试样基质中萃取出来, 并逐渐富集, 完成试样前处理过程。它克服了其它浓缩预处理方法大部分缺点, 如取样时间长、耗费样品过多、或使用对人体有害的有机溶剂、或容易出现一些挥发性成分丢失及交叉污染等。SPME 无需有机溶剂, 操作简单、快速, 分析样品量少, 费用低廉, 集萃取、浓缩、采样于一体, 能够尽可能减少被分析挥发性成分的损失, 并方便地与气相色谱、液相色谱联用。本文利用固相微萃取 (SPME) 对蜂胶挥发性成分进行提取, 采用气相色谱-质谱联用技术对提取物进行定性定量研究, 并与溶剂 (乙醇、乙酸乙酯) 提取法对蜂胶挥发性成分特别是萜烯类物

收稿日期: 2007-05-31

基金项目: 广州市科技计划项目, 蜂胶质控平台、指纹研究 (2005Z-E0101)

通讯作者: 贺丽萍

质的提取效果进行了比较,建立了 SPME-GC/MS 联用技术分析蜂胶中香气挥发性成分方法,得到较理想的结果,为进一步分析蜂胶某些成分的药用价值及蜂胶的开发利用及指纹图谱的建立提供依据。

1 仪器、试剂与材料

蜂胶(毛胶,由广州市宝生园有限公司提供,产于山东,经广州市蜂产品研究鉴定为蜂胶);乙酸乙酯、乙醇等试剂均为分析纯;高纯氮(纯度 $\geq 99.999\%$)

美国 Finnigan Trace 2000 GC-MS 气-质联用仪; DB-1 聚甲基硅氧烷弹性石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m);手动固相微萃取(SPME)进样器及商品萃取头 PDMS(美国 Supelco 公司)。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱: DB-1 聚甲基硅氧烷弹性石英毛细管柱;进样口温度: 230 $^{\circ}$ C; 色质接口温度: 250 $^{\circ}$ C; 进样方式: 分流进样或直接联用进样(SPME 萃取); 分流比: 10:1; 进样量: 1.0 μ L; He 气流速: 1.0 mL/min; 程序升温: 初始温度 100 $^{\circ}$ C(保持 3 min),以 5 $^{\circ}$ C/min 的升温至 230 $^{\circ}$ C(保持 12 min)。

2.2 质谱条件

E1 离子源: 电子轰击能量 70 eV, 光电倍增管电压 350 V; 离子源温度: 200 $^{\circ}$ C; 扫描质量范围: 35~335 amu(m/Z); 检索谱库名称: NIST。

2.3 样品处理

2.3.1 乙酸乙酯提取物

将蜂胶-20 $^{\circ}$ C 冷冻,于研钵中研磨搅拌机粉碎,取 1 g 蜂胶粉碎样置于沙包内,加入乙酸乙酯浸泡数小时超声波提取,用 5% NaHCO₃ 溶液萃取,置于 4 $^{\circ}$ C 过夜,取上层得蜂胶乙酸乙酯提取物待测。

2.3.2 乙醇提取物

5 g 蜂胶粉碎样加入 75%乙醇水溶液浸泡 3 d,超声波提取,浸提液过滤后收集,于 20 $^{\circ}$ C 稀释 10 倍,上机前置换成无水乙醇待测。

2.3.3 SPME 采样提取

10 g 蜂胶粉碎样迅速放入样品瓶中,用 2 到 3 层 parafilm 封口,避光保存。将经 45 min 老化的 SPME 头插入封口顶空采样,推出纤维头,注意不要使萃取头碰到蜂胶样,45 $^{\circ}$ C 吸附 40 min。抽回纤维头,从样品瓶中拔出萃取头,再将萃取头插入气相色谱仪推出纤维头,在进样口初始温度 230 $^{\circ}$ C 下解吸 5 min。同时启动仪器采集数据。

2.4 样品测定与定性定量方法按

2.1 项的色谱条件和 2.2 项的质谱条件精确吸取供试样品溶液各 1.0 μ L,或 SPME 纤维头直接解吸进样,上机检测并记录色谱图。

定性: 化合物经计算机检索同时与 NIST library 和 Wiley library 相匹配。仅报道匹配度大于 750 的测定结果。

定量: 相对百分含量按峰面积归-化法计算,求得挥发性化学成分的相对百分含量

3 结果与讨论

3.1 样品的定性定量分析

蜂胶乙醇或乙酸乙酯提取物经滤去其中的絮状沉淀后取 1.0 μ L 直接进样,用 GC/MS 联用仪分析测定,在确定各对照组分质谱数据和扫描峰号后,用 NISF/LPA/NIHMS DATABASE 谱库进行检索,核对标准质谱图及有关资料。蜂胶乙醇及乙酸乙酯提取物挥发性成分的总离子流图分别见图 1 及图 2。

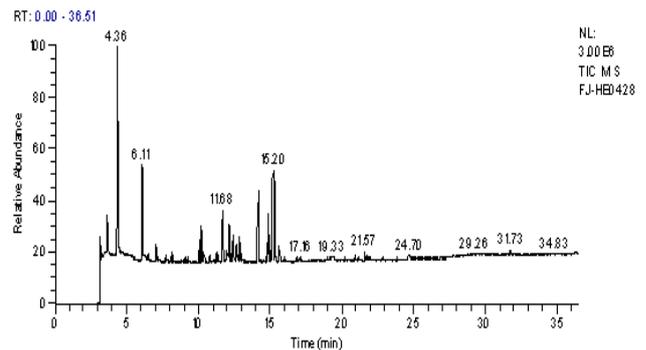


图 1 乙醇提取物 GC-MS 总离子流图

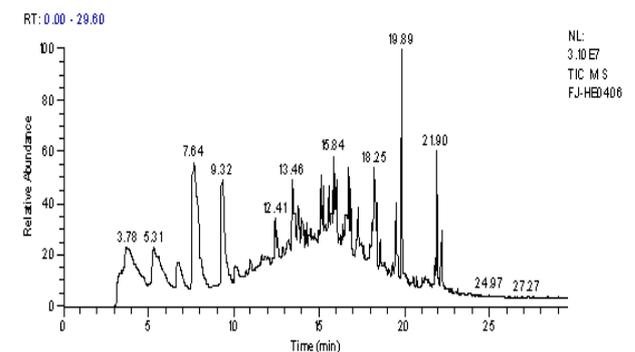


图 2 乙酸乙酯提取物 GC-MS 总离子流图

实验优化了 SPME 条件,包括萃取涂层、萃取时间、萃取温度。在优化的实验条件下(30 μ m PDMS 萃取头、45 $^{\circ}$ C 吸附萃取 40 min)分析测定。挥发性成分的总离子流图见图 3,主要挥发性成分及其相对百分含量见表 1。

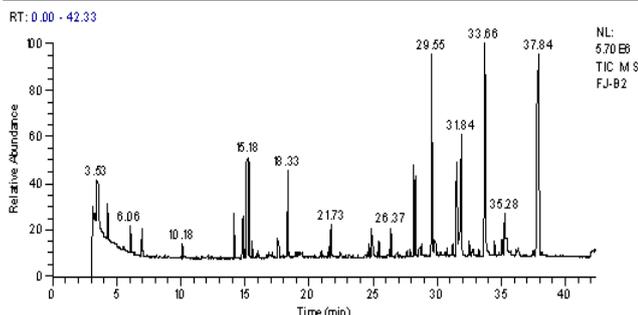


图3 蜂胶挥发性组分 SPME-GC/MS 法总离子流图

表1 SPME-GC/MS 法检测所得主要蜂胶挥发性化合物分析结果

RT	主要化学成分	相对百分含量
3.61	Benzyl Alcohol	4.19
4.36	Benzyl Acetate	6.08
6.11	Phenylethyl Acetate	8.33
7.06	(Z)-3-Phenyl-2-Propen-1-ol	1.15
8.20	Propanoic acid, 2-phenylethyl ester	0.78
9.13	Geranyl vinyl ether	0.11
9.33	Junipene	0.26
10.06	(+)-Aromadendrene	1.66
10.22	2-Propen-1-ol,3-phenyl-,acetate	2.65
10.37	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-di methyl-2-(1-methylethenyl)	0.38
11.3	Germacrene	0.87
11.68	Cubenol	6.56
11.72	Cedran-diol	1.64
11.82	à-Selinene	0.85
12.04	Veridiflorol	0.97
12.14	Cedranoxide	3.22
12.28	à-Gurjunene	0.65
12.40	Cedrene	1.41
12.48	1S,Cis-Calamenene	2.08
12.62	Cadinol	1.48
12.76	Spathulenol	0.48
12.89	Calacorene	1.60
14.16	Guaiol	5.43
14.34	2-Amino-4-hydroxypteridine-6-carb oxylic acid	0.23
14.87	10-Epi-ç-Eudesmol	3.87
15.20	2-Naphthalenemethanol, decahydro-à,à,4a-trimethyl-8-methy -lene	6.93
15.33	à-Eudesmol	7.38
15.61	à-Patchoulene	1.05

3.2 讨论

从实验可知,检测出的三种提取物蜂胶挥发性化

学成分,主要包括萜烯类、醇、酮、醛、酸及酯等芳香族化合物,乙醇提取物在保留时间 8~20 min 蜂胶萜烯类化合物出峰处数目少,含量小,只能明显较好检测到桉叶油醇、十四烯,且由于糖类等水溶性组分也同时被提取,GC 分离有较大的基体干扰,基线漂移,不挥发性成分残留在系统里对仪器有不良影响。蜂胶乙酸乙酯提取物与 SPME 采样提取所得蜂胶挥发成分基体干扰小,可较好基线分离。

乙酸乙酯提取物在保留时间 20~40 min 检测到含量最多的成分,主要是有机酸、烷烃、酚类物质(大黄酚 14.26%)。从蜂胶乙酸乙酯提取物中分离出 46 个峰,综合各项分析,鉴定出其中含有香橙烯、金合欢烯、萜烯茄醇、桉叶油醇等几种萜烯及醇类化合物(数据未给出)。

SPME 采样由于与萃取头的吸附性能有关,检测到的主要是保留时间位于 8~15 min 沸点较低的易挥发性成分,主要为萜烯类、醇、醛等香气成分,检测到长叶烯、à-古芸烯、去氢白菖烯、à-雪松烯、香橙烯、à-芹子烯、杜松萜烯、大根香叶烯、à-广藿香烯、桉叶油醇、杜松烯醇。而在保留时间 20~40 min 检测到的成分很少。

4 结论

从本文分析结果上看,不同的提取方法检测到的蜂胶挥发成分种数有差别。SPME 能采集富集到更多的挥发性萜烯类物质,可检测到更多具指纹特征的挥发性香气化合物,说明 SPME 是一种有效的蜂胶挥发性萜烯类物质富集方法。蜂胶中香气挥发性成分有萜烯类、醇、醛、酮、酯等类别。

蜂胶成分的差异与蜂胶的产地、环境等条件有密切关系。今后我们将利用 SPME-GC/MS 联用技术对不同产地采集期的蜂胶成分进行分析,提取有用的指纹信息,为蜂胶化学组分的分析研究及其指纹图谱的研究打下基础。

参考文献

- [1] 贺钮嵘,潘卫东,卢玉振,等.贵州蜂胶中有机酸成分研究[J].中草药.2002,33(5):406
- [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] 胡福良,玄红专.蜂胶化学成分的最新研究进展[J].养蜂科技,2003,(1):27-30