

中国东北黑蜂蜂胶醇提物化学性质的研究

丁青芝^{1,2,3}, 陈玉¹, 陈婷婷¹, 邹仁英¹, 骆琳^{1,3}, 马士巧¹, 马海乐^{1,2,3}

(1. 江苏大学农业工程研究院, 江苏镇江 212013) (2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)
(3. 江苏省农产品物理加工重点实验室, 江苏镇江 212013)

摘要: 为了考察东北黑蜂蜂胶乙醇提取物 (Ethanol extracts from the Chinese northeast black bee propolis, EENBP) 的理化性质, 采用扫描电镜、紫外光谱、红外光谱、GC-MS 和 LC-MS 等技术, 分别研究了 EENBP 的化学组成和特征图谱。扫描电镜分析结果表明超声辅助提取制得的 EENBP 混合更加均匀; 紫外和红外光谱分析结果表明 EENBP 中的化学组分主要包括黄酮类、萜烯类、酯类、酚酸类和醇类等。GC-MS 结果表明超声辅助提取制得的 EENBP 中挥发性成分主要是萜烯类化合物, 分别是大根香叶烯、杜松烯、愈创木醇和芹子烯。LC-MS 从超声辅助提取制得的 EENBP 中鉴定出苯甲醛、咖啡酸、香豆酸和阿魏酸, 蜂胶中还含有柯因、异鼠李素和山奈素等成分。上述结果说明超声辅助提取制得的 EENBP 活性成分丰富, 可以进一步进行相应功能的健康食品、药品的开发。

关键词: 中国东北黑蜂; 蜂胶; 检测; 扫描电镜; 紫外光谱; 红外光谱; 气质联用; 液质联用

文章编号: 1673-9078(2017)4-134-140

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.021

Chemical Properties of Ethanol Extracts of Northeast-China Black Bee Propolis

DING Qing-zhi^{1,2,3}, CHEN Yu¹, CHEN Ting-ting¹, ZOU Ren-ying¹, LUO Lin^{1,3}, MA Shi-qiao¹, MA Hai-le^{1,2,3}

(1. Institute of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China) (2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China) (3. Key Laboratory for Physical Processing of Agricultural Products, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: In order to study the physicochemical properties of ethanol extracts from Northeast-China black bee propolis (EENBP), the chemical compositions and characteristic spectra of the extracts were studied by means of scanning electron microscopy, ultraviolet (UV) spectroscopy, infrared (IR) spectroscopy, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Scanning electron microscopy analysis showed that the EENBP obtained by ultrasonic assisted extraction (EENBPUA) had a more uniform distribution compared with that of EENBP. Analysis of UV and IR spectra showed that EENBPUA contained flavonoids, terpenes, esters, phenolic acids, and alcohols, among other components. GC-MS results showed that the main volatiles in EENBPUA were terpene compounds, including germacrene, cadinene, guaialol, and selinene. Seven compounds, including benzaldehyde, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, chrysin, isorhamnetin, and kaempferol were identified by LC/MS from the EENBPUA. These findings suggest that the active components of EENBPUA are abundant and EENBP can be used for further development of healthy food and drugs with corresponding functions.

Key words: northeast-China black bee; propolis; detection; scanning electron microscopy; ultraviolet spectrographs; infrared spectrum; gas chromatography-mass spectrometry; liquid chromatography-mass spectrometry

收稿日期: 2016-05-18

基金项目: 国家 863 计划重点项目 (2013AA100203); 江苏省博士后基金项目 (1302013A、1501105B); 中国博士后基金项目 (2015M581746); 江苏省农产品物理加工重点实验室基金项目 (JAPP2012-5); 国家自然科学基金项目 (31071502); 高级人才启动基金项目 (10JJDG031); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD2012); 江苏省大学生创新创业训练计划项目 (201613986009Y、201610299127H、201410299025Z); 大学生科研立项 (Y15A140、Y15A111、15A169、15A180、14A004、14A017、14A050、14A051、13A062、13A110)

作者简介: 丁青芝 (1975-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 酒类催陈、物理场在食品加工中的应用、生物活性成分的提取利用等

通讯作者: 马海乐 (1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品功能因子、活性多肽、生物物理技术

蜂胶是蜜蜂用于修补巢穴、育婴室以及蜂巢消毒的一种蜂产品,是蜜蜂从胶源植物的芽苞、树皮或茎干伤口上采集的粘性分泌物,混入其上颚腺分泌物、蜂蜡和少量花粉等经过加工形成的一种具有芳香气味和黏性的胶状固形物。近年来的研究证明,蜂胶含有多种独特的生物活性物质,使其具有抗菌、消炎、止痒、抗氧化、增强免疫、降血糖、降血脂、抗肿瘤等多种功能^[1-5],在治疗和预防疾病方面有较好的发展前景。蜂胶是一种稀缺资源,一个5~6万只的蜂群一年只能生产蜂胶 100~150 g,因此被誉为“紫色黄金”或“软黄金”。

东北黑蜂(*Apis mellifera ssp., northeastern black bee*)是由欧洲黑蜂与卡蜂自然杂交后,经长期自然选择结合人工选择而形成的一个新的品种,分布在中国黑龙江省。其各项生理指标均明显优于世界四大著名蜂种,是其它蜂种不可比拟的,是我国乃至世界不可多得的极其宝贵的蜜蜂基因库。产区主要树种有水曲柳、椴树、杨树和桦树等胶源植物,其中杨树数量占比重最大达 30%以上^[6]。这使得东北黑蜂具备了生产优质蜂胶的条件,但是蜂胶毕竟不是蜂产品的主体,因此长期以来蜂胶的生产都是处于一个比较尴尬的地位,尽管随着以蜂胶为原料的各类产品的开发,蜂胶的价格逐年攀升,但是蜂胶的生产效益与蜂蜜、蜂王浆等蜂产品相比还是很低,因此蜂农采集蜂胶的积极性很差,这就导致蜂胶原料本身的质量很不稳定。因此东北黑蜂蜂胶质量到底如何,需要通过对其成分分析来进行判定。尽管蜂胶成分分析的研究文章已有很多^[1-11],但对东北黑蜂蜂胶活性成分分析的研究鲜见报道。本文拟采用扫描电镜、紫外光谱、红外光谱、GC-MS 和 LC-MS 等技术研究东北黑蜂蜂胶的主要成分,为东北黑蜂蜂胶的开发利用提供一定的基础研究数据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

东北黑蜂蜂胶原胶,采自黑龙江迎春蜂产品股份有限公司原料基地蜂场,蜂场中除东北黑蜂以外无其他蜂种;无水乙醇为国产分析醇;有机酸标准品均购自美国 sigma 公司。

1.2 仪器及设备

单频逆流聚能式超声提取设备,江苏江大五棵松生物技术有限公司;气相色谱质谱联用仪 Agilent 6890GC/5973NMSD,美国安捷伦公司;液相色谱质

谱联用仪 Thermo LXQ,美国赛默飞世尔科技公司;热场发射扫描电子显微镜 JSM-7001F,日本浩视公司;紫外可见分光光度计瓦里安 Cary 100,美国瓦里安公司;傅立叶变换红外光谱仪,美国 Nicolet 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

将东北黑蜂胶在-20℃冰箱冷冻后粉碎,过 40 目筛,备用。称取经过粉碎的蜂胶样品 8 g,置于 500 mL 的烧杯中,加入 80%乙醇 240 mL,采用单频逆流聚能式超声设备,超声功率 220 W,提取温度 53℃,提取时间 16 min,占空比 10 s/5 s 的工艺条件进行超声波提取,一部分提取液减压浓缩后真空干燥,得到超声辅助制得的 EENBP,另一部分提取液保存备用。另取一份蜂胶样品利用 60 r/min 机械搅拌替代上述超声条件,提取 30 min,得到传统方法制备的 EENBP。

1.3.2 电镜扫描

蜂胶乙醇提取物放在研钵上碾碎,用导电胶将蜂胶粉末均匀的粘在样品台上,检查是否粘接牢固后,轻轻用吸耳球吹去多余的粉末,在原料涂层上喷金后用扫描电镜在 3 kV 电压下扫描。在电子显微镜下观察其外观形态。

1.3.3 紫外谱图扫描

取 10 mL 东北黑蜂蜂胶提取液 8000 r/min 离心 20 min,取上清液,采用紫外-可见分光光度计进行扫描。为了避免溶剂和杂质的干扰,将起始扫描波长确定为 200 nm。蜂胶中可能混有一些色素类物质,这些物质在可见光区有吸收,因此,最终确定 200~800 nm 为扫描范围。

1.3.4 红外谱图扫描

试验采用压片法。将蜂胶提取物和 KBr 按一定比例进行混合,研磨后进行压片,在 4000 cm⁻¹ 到 400 cm⁻¹ 之间扫描,得到红外谱图。通过对样品和 KBr 比例进行调整,使透过率最高介于 90%~100%,最低介于 10%~20%。

1.3.5 GC-MS 分析

(1) 固相微萃取条件

准确称取蜂胶提取物 0.5 g,置于 15 mL 的样品瓶中并封口,在 60℃ 的温度下平衡 10 min,然后将装有萃取头(050/30 μm DVB/CAR/PDMS, 24Ga)的手动进样器插入顶空瓶中(萃取头使用前要根据说明书来进行老化),60℃ 顶空吸附 30 min,270℃ 下解吸 5 min。

(2) 程序升温程序

起始温度 40℃,维持 1 min,以 20℃/min 升至

60 ℃, 保持 5 min, 然后以 10 ℃/min 升至 230 ℃, 保持 15 min, 进样口温度 250 ℃, 载气 He, 流速为 1.0 mL/min, 不分流进样。

(3) 质谱条件

电子轰击离子源 (EI), 电子能量 70 eV, 离子源温度为 230 ℃, 灯丝发射电流 200 μA, 扫描范围 30~450 u。

1.3.6 LC-MS 分析

(1) 梯度洗脱程序

色谱条件为: 0~25 min, 0.8 mL/min, 90%的 2% 乙酸水, 10%的甲醇; 25~45 min, 0.7 mL/min, 78% 的 2%乙酸水, 22%的甲醇; 45~53 min, 0.7 mL/min, 35%的 2%乙酸水, 65%的甲醇; 53~60 min, 0.8 mL/min, 50%的 2%乙酸水, 50%的甲醇; 60~70 min, 0.8 mL/min, 90%的 2%乙酸水, 10%的甲醇; 检测波长为 280 nm; 温度为 15 ℃。

(2) 质谱条件

质谱采用电喷雾 (ESI), 负离子模式离子扫描范围为: 50~1000 m/z , 干燥气 (N_2), 温度 350 ℃, 离子源温度为 100 ℃, ESI 电离电压为 -3.20 kV, 脱溶 N_2 流速为 540 L/h。

(3) 混合标准品溶液的配制

准确称取没食子酸、苯甲醛、绿原酸、香草醛、咖啡酸、丁香酸、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸、芦丁和水杨酸, 配制一定浓度的标准品储备液, 进样量为 20 μL。

(4) 东北黑蜂蜂胶乙醇提取物的测定

取适量蜂胶提取液, 过 0.22 μm 有机系滤膜后进行检测, 进样量 20 μL。

1.3.7 数据统计分析

所有试验至少进行 3 次平行测定, 其中定量分析试验结果以 (平均值±标准差) 的形式表示, 采用 Excel 2010 软件进行统计分析与数据处理。

2 结果与讨论

2.1 东北黑蜂蜂胶乙醇提取物的扫描电镜分析

析

扫描电镜 (SEM) 是介于透射电镜 (TEM) 和光学显微镜 (OM) 之间, 用来观察样品表面形态的一种微观研究工具, 它利用狭小的电子束扫描样品进行微观成像。将东北黑蜂蜂胶乙醇提取物进行电镜扫描, 扫描结果如图 1。

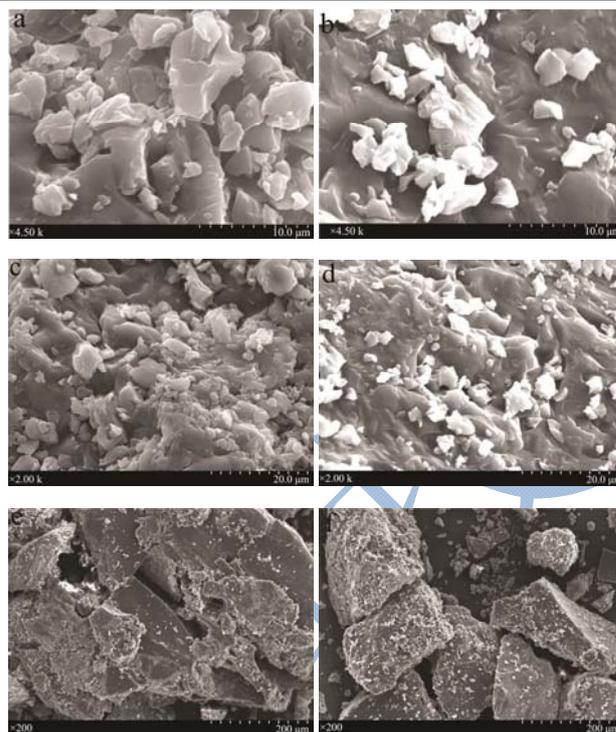


图 1 东北黑蜂蜂胶乙醇提取物的扫描电镜图

Fig.1 SEM images of EENBP and EENBPUA

注: 图 a、c、e、b、d 和 f 分别为传统方法和超声辅助提取法蜂胶提取物的 4500 倍、2000 倍和 200 倍扫描电镜照片。

由图 1 可以看出, 东北黑蜂蜂胶乙醇提取物有一层光滑的背景表面, 从电镜图上来看, 并看不出有明显的组织结构, 表明蜂胶提取物是一种均匀的非结晶的无定形态。

分别对照不同放大倍数下的超声 (图 1b、图 1d 和图 1f) 和非超声 (图 1a、图 1c 和图 1e) 提取得到的 EENBP 的扫描电镜图, 均可以清晰看出, 传统方法得到的提取物表面有明显的析出物聚集, 而超声波辅助提取得到的提取物表面析出物明显减少且颗粒分散。R.B.Bodini 等^[2]用扫描电镜和透射电镜分别研究了蜂胶的表面微结构, 表明蜂胶会增加膜表面的不规则性。这表明传统方法提取得到的提取物内部物质分布不均匀, 而经过超声提取后得到的提取物内部分布的更加均匀。蜂胶提取物一般以黄酮含量作为主要评价指标^[3], 所以提取物内部分布是否均匀对产品的品质稳定性影响较大, 而合适的超声波处理条件有可能得到混合得更加均匀、品质更佳的蜂胶提取物。

2.2 东北黑蜂蜂胶乙醇提取物的紫外光谱分析

紫外-可见吸收光谱是由分子中价电子能级跃迁

产生的,利用物质的紫外-可见吸收光谱的形状、吸收峰的数目及最大吸收波长的位置可以对物质的组成、含量和结构进行分析、测定、推断。

在紫外区,蜂胶具有明显吸收的物质主要是黄酮类化合物,符军放^[5]研究了国内6个蜂胶产区30个样品的紫外光谱图,这六个地区的蜂胶醇提取物均在紫外区(310 nm)有一个最大吸收峰。

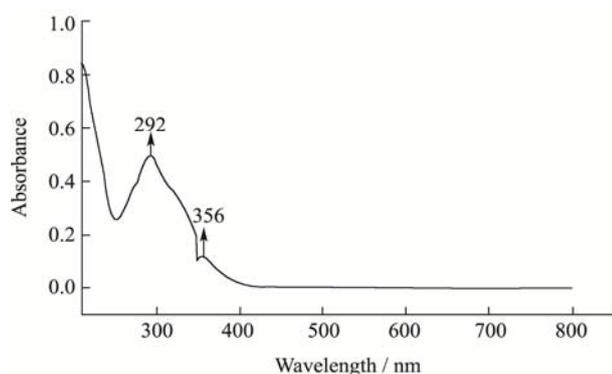


图2 东北黑蜂蜂胶乙醇提取物紫外光谱图

Fig.2 UV spectrum of EENBP

图2是东北黑蜂蜂胶醇提物的紫外光谱图,由图2可以看出,东北黑蜂蜂胶醇提物在356 nm下有最大吸收峰,这说明东北黑蜂蜂胶的醇提物与其他地区的蜂胶存在共性即在300~400 nm都有吸收峰。黄酮类化合物在乙醇中的紫外吸收应该有两个吸收带,出现在300~400 nm之间的为吸收带I,出现在240~300 nm之间的为吸收带II^[12]。由图2可以看出,东北黑蜂蜂胶乙醇提取物在紫外区有2个吸收峰,在292 nm下有一个最强吸收峰,在356 nm有一个较弱的吸收峰。吸收带I的吸收峰在356 nm处,可能是黄酮醇或其苷类化合物,而且,吸收带I为弱吸收,为次峰,吸收带II为强吸收,为主峰,可能是异黄酮、二氢黄酮及二氢黄酮醇类化合物。Gastón Darío Pierini等^[11]的研究表明,不同来源的蜂胶在280~300 nm范围内有较宽的吸收带,其中290 nm处的吸收代表抗氧化性强的物质。本研究获得的提取物在292 nm有最强吸收,表明东北黑蜂蜂胶有可能具有较强的抗氧化性。

2.3 东北黑蜂蜂胶乙醇提取物的红外光谱分析

析

红外吸收光谱是由分子振动能级的跃迁同时伴随转动能级跃迁而产生的,它有很高的特征性和可比性,广泛用于鉴定和表征各种化学物质。由于其可以快速、无损、低成本的对样品进行在线检测,红外光谱法已广泛应用于中药的质量控制及真伪鉴别。

常见的有机化合物基团在4000~670 cm⁻¹范围内有

特征基团频率。通常,4000~1300 cm⁻¹区域称为官能团区,1300~670 cm⁻¹区域称为指纹区,这里吸收峰数目多,代表了物质的具体特征^[12]。官能团区和指纹区可以互相补充。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。

东北黑蜂蜂胶乙醇提取物的红外谱图见图3。

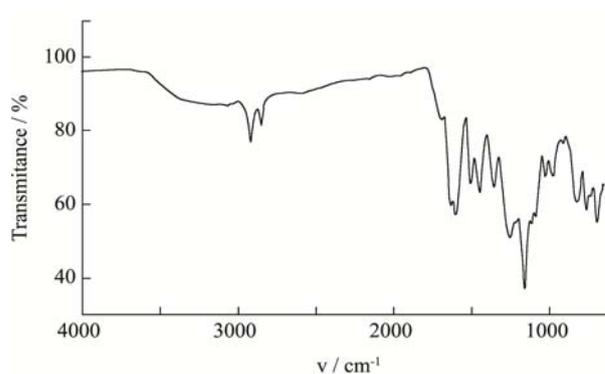


图3 东北黑蜂蜂胶乙醇提取物红外光谱图

Fig.3 Infrared spectrum of EENBP

表1 典型化合物的红外光谱特征峰

Table 1 Typical IR spectra peaks of compounds

吸收峰位置/cm ⁻¹	键型	化合物类型
1000~1250	C-O	醇及酚
1050~1300	C-O-C	酯类
1450~1650	C=C	芳香族
1500~1600	-NO ₂	硝基
1500~1600	N=O	亚硝基
1620~1680	-C=C-	烯烃
1640~1690	C=O	酰胺
1705~1725	C=O	羧酸
1715附近	C=O	酮
1725附近	C=O	醛
1735附近	C=O	酯类
2400~3400	-OH	羧酸
2845~2975	C-H	烷烃
2100~2260	C≡C	炔烃
3030	=C-H	芳香族
3030~3080	=C-H	烯烃
3150, 3350	NH	酰胺
3300~3360	=C-H	炔烃
3300~3500	-NH ₂	胺
3600~3650	-OH	醇及酚

从图3可以发现蜂胶的指纹区为2000~400 cm⁻¹,特征频率区为4000~2000 cm⁻¹。蜂胶的特征峰及峰值如下:总共15个特征峰,峰位置为:694.53、763.98、827.06、978.82、1027.56、1157.84、1257.26、1356.39、

1449.14、1507.84、1603.25、1634.71、1694.21、2849.96 和 2918.54。

参照表 1，分析东北黑蜂蜂胶的红外图谱，峰 1027.56 和峰 1157.84 在 1000~1250 cm^{-1} 之间，推测东北黑蜂蜂胶乙醇提取物中可能含有醇及酚。峰 1694.21 在峰 1715 附近，推测可能是黄酮类化合物^[8]。峰 1634.71 在峰 1620~1680 cm^{-1} 范围内，推测可能为萜烯类化合物^[12]。峰 2849.96 和峰 2918.54 在 2845~2975 cm^{-1} 之间，可以推测为烷烃类化合物，可能来源蜂胶中的蜂蜡。

龚上佺^[13]研究了中国不同地区蜂胶的红外光谱，通过分析全国 48 种蜂胶的红外谱图，得出的结论表明黑龙江和湖北 8 月的蜂胶与其他地区的蜂胶匹配度不高，说明东北黑蜂蜂胶具有其特异性。而且，他研究了黑龙江饶河的黑蜂有 16 个特征峰，峰值范围与本文中的数值接近。因此红外光谱指纹图谱可以作为蜂胶产地鉴别的依据之一。

2.4 东北黑蜂蜂胶醇提取物的 GC-MS 图谱分析

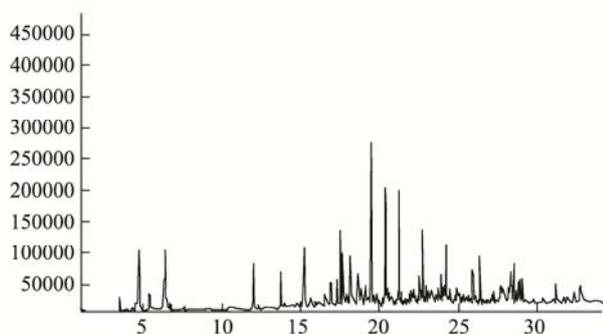


图 4 EENBP 的 GC-MS 总离子流图

Fig.4 GC-MS total ion chromatogram of EENBP

图 4 为东北黑蜂蜂胶醇提取物挥发性成分 GC-MS 总离子流色谱图，参考文献对谱图进行解析，鉴定了东北黑蜂蜂胶乙醇提取物中的 30 种化学成分，并用面积归一化法计算各组分的百分含量。蜂胶挥发性化学成分的 GC-MS 分析结果见表 2。

由表 2 可以看出，东北黑蜂蜂胶乙醇提取物中的挥发物质主要包括萜烯类、酯类、酚酸类和醇类。其中萜烯类化合物占比例较大，分别是大根香叶烯、杜松烯、愈创木醇和芹子烯。贺丽芳等^[7]从山东蜂胶提取物中鉴定出香橙烯、金合欢烯、萆澄茄醇、桉叶油醇等几种萜烯及醇类化合物。蔡君等从河南蜂胶中鉴定出萜烯、萜烯醇和酚类等物质。可见不同来源蜂胶

挥发性成分组成中大多含有萜烯类、酚类和醇类，但组成还是有一定的差异，这可能和蜂种、胶源植物等相关。东北黑蜂蜂胶乙醇提取物中的这四种萜烯类化合物均属于倍半萜类。倍半萜类化合物具有特殊的生物活性：如抗肿瘤、降血脂、降血压、抗菌及抗老年痴呆等^[1,3,7]。因此东北黑蜂蜂胶在这些功能方面有一定的开发潜力。

表 2 蜂胶醇提取物的挥发性成分 GC-MS 分析结果

时间 /min	物质	含量	相对含量 /%
0.17	乙醚	0.11±0.01	3.26±0.29
3.52	环氧乙烷	0.06±0.02	1.78±0.07
4.76	蝶呤-6-羧酸	0.26±0.04	7.72±0.42
15.26	苯甲酰溴	0.25±0.03	7.42±0.62
16.53	乙酸	0.04±0.01	1.19±0.12
16.94	2-氨基-5-甲基苯甲酸	0.1±0.01	2.97±0.32
17.68	磷酸三辛酯	0.16±0.01	4.75±0.18
18.16	3-苯乙醇酸	0.1±0.01	2.97±0.22
18.71	大根香叶烯	0.1±0.01	2.97±0.34
19.19	3-羟基扁桃酸	0.08±0.01	2.37±0.32
20.4	4-羟基丁酸内酯	0.61±0.07	18.10±0.34
22.2	2,4-二叔丁基苯酚	0.1±0.01	2.97
22.54	甲氧基苯基-肼	0.27±0.05	8.01
22.93	六甲基环三硅氧烷	0.07±0.01	2.08±0.06
23.09	乙酸苯乙酯	0.06±0.01	1.78±0.05
23.26	肉桂醛	0.04±0.01	1.19±0.12
23.36	杜松烯	0.01±0.01	0.30±0.03
23.71	苯甲醇	0.07±0.01	2.08±0.22
23.91	2,6-二叔丁基-4-乙基苯酚	0.08±0.02	2.37±0.21
24.04	2,5-二叔丁基-1,4-苯醌	0.05±0.01	1.48±0.11
24.49	酞酸二乙酯	0.05±0.01	1.48±0.11
25.31	1-甲基萘	0.04±0.01	1.19±0.08
26.4	愈创木醇	0.23±0.05	6.82±0.35
27.66	芹子烯	0.04±0.01	1.19±0.02
28.21	棕榈酸异丙酯	0.11±0.02	3.26±0.12
28.5	5,6,7-三甲氧基-茛菪酮	0.15±0.02	4.45±0.25
31.2	2-(氨基吡啶)-萘	0.12±0.04	3.56±0.23
32.73	苯甲酸	0.01±0.01	0.30±0.05

2.5 东北黑蜂蜂胶超声处理的提取物的 LC-MS 图谱分析

11 种有机酸混合标准品的 HPLC 色谱图见图 5，东北黑蜂蜂胶乙醇提取物的 LC-MS 图谱见图 6。

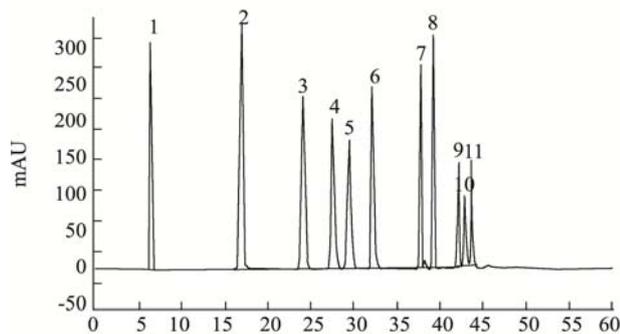


图5 11种有机酸标准品的HPLC图谱

Fig.5 HPLC chromatogram of 11 kinds of organic acid standards

注：图5中成分分别为1没食子酸、2苯甲醛、3绿原酸、4香草醛、5咖啡酸、6丁香酸、7香豆酸、8阿魏酸、9苯甲酸、10芦丁和11水杨酸。

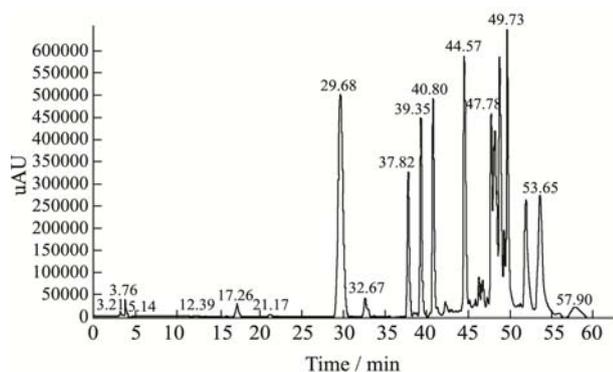


图6 蜂胶乙醇提取物的LC-MS图谱

Fig.6 LC-MS chromatogram of EENBP

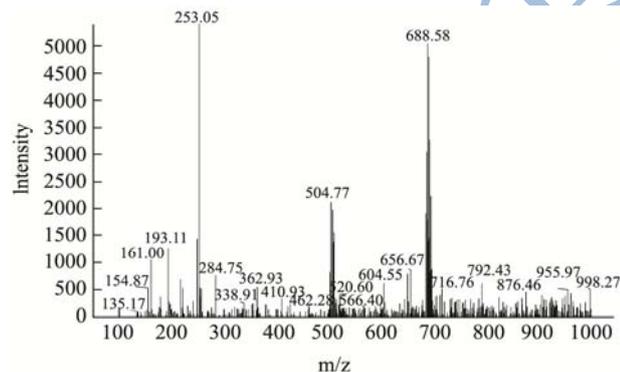


图7 化合物12的一级质谱图

Fig.7 MS spectrum of compound 12

ESI 质谱有正负离子模式，负离子模式下，化合物失去一个H 质子形成[M-H]⁻分子离子峰^[8]。正离子模式下，化合物得到一个H 质子形成[M+H]⁺分子离子峰；本试验选择的是负离子模式。通过对比标准品和样品的出峰时间，可以确定该提取物中含有的化合物为苯甲醛（保留时间 17.26 min）、咖啡酸（保留时间 29.68 min）、香豆酸（保留时间 37.82 min）和阿魏酸（保留时间 39.95 min）。

未确定的成分，根据一级质谱图推测物质的分子量，通过二级质谱进行验证，并与相关文献比较进行进一步的确认。图7~图12分别为化合物12、化合物13、化合物14的一级和二级图谱。

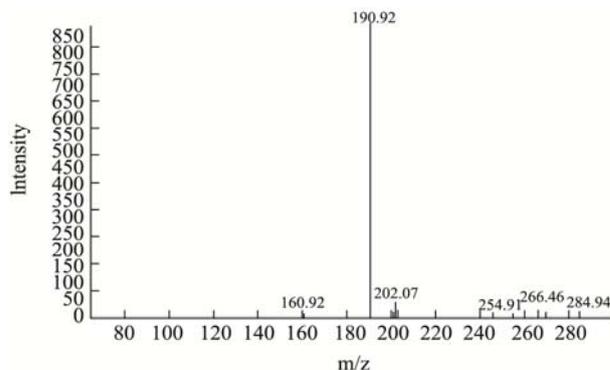


图8 化合物12的二级质谱图

Fig.8 MS² spectrum of compound 12

由图7和图8可知，一级质谱得到 253.05 m/z[M-H]⁻的分子离子峰，可知此化合物分子量为 254，二级质谱中，m/z 160.92 可能为母离子断掉一个羟基和一个苯环后得到的片段，结合相关参考文献^[8,14]，推测化合物12（保留时间 32.67 min）可能为柯因。

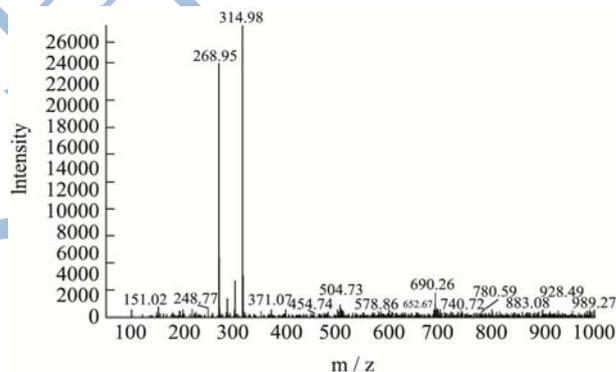


图9 化合物13的一级质谱图

Fig.9 MS spectrum of compound 13

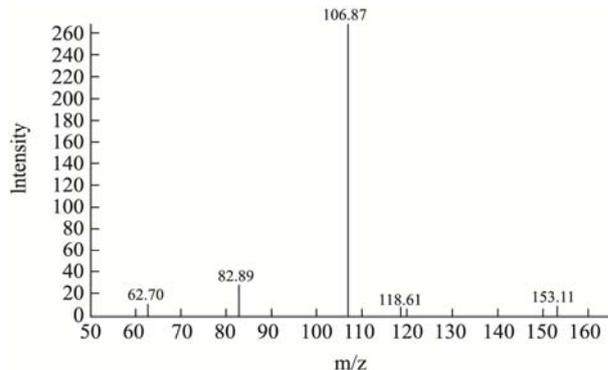


图10 化合物13的二级质谱图

Fig.10 MS² spectrum of compound 13

由图9和图10可知，一级质谱得到 315 m/z[M-H]⁻的分子离子峰，可知此化合物的分子量为 316，m/z 106.87 可能为母离子断下来的邻苯二酚的一个片段，

推测化合物 13 (出峰时间为 53.65) 可能是异鼠李素。

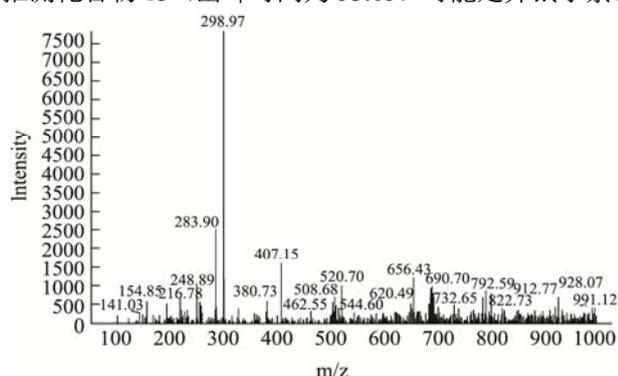


图 11 化合物 14 的一级质谱图

Fig.11 MS spectrum of compound 14

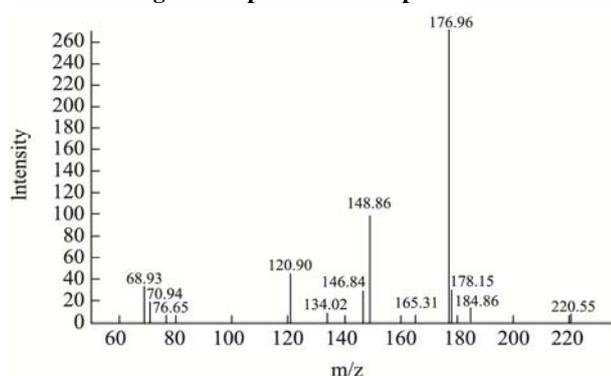


图 12 化合物 14 的一级质谱图

Fig.12 MS² spectrum of compound 14

由图 11 和图 12 可知, 一级质谱得到 299 m/z [M-H] 的分子离子峰, 可知此化合物的分子量为 300, 二级质谱中 m/z 76.65 可能为母离子断裂的一个苯环, 结合相关参考文献^[8,14], 推测化合物 14 可能是 (出峰时间 57.9) 山奈素。

3 结论

本文通过扫描电镜、紫外光谱、红外光谱、GC-MS 和 LC-MS 分别对黑蜂蜂胶提取物进行了分析。结果表明, 超声波提取蜂胶使得提取物成分混合更加均匀, 有利于后续制剂开发的品质稳定性; 蜂胶提取物的红外光谱、紫外光谱特征明显, 有望用于蜂胶真伪鉴别和产地鉴别。利用 GC-MS 和 LC-MS 分别对黑蜂蜂胶醇提取物中的挥发性成分和其他成分进行了分析, 表明东北黑蜂蜂胶提取物含有较多的萜烯类物质。LC-MS 分析结果表明东北黑蜂蜂胶除了来源于树胶的特征成分咖啡酸和阿魏酸等以外, 还含有柯因、异鼠李素和山奈素等黄酮类物质。上述结果表明东北黑蜂蜂胶含有多种生物活性成分, 可以进一步进行相应功能的健康食品及药品的开发。

参考文献

- [1] S M Osés, A Pascual-Maté, M A Fernández-Muñoz, et al. Bioactive properties of honey with propolis [J]. Food Chemistry, 2016, 196(1): 1215-1223
- [2] R B Bodini, P J A Sobral, C S Favaro-Trindade, et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract [J]. LWT-Food Science and Technology, 2012, 51(1): 104-110
- [3] 蔡君, 宋欢. 蜂胶提取物的抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(8): 940-944
CAI Jun, SONG Huan. Studies of antioxidant properties of propolis extracts [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(8): 940-944
- [4] Julia Gabiroboertz Cardoso, Natalia Lopes Pontes Iorio, Luís Fernando Rodrigues, et al. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm [J]. Archives of Oral Biology, 2016, 65: 77-81
- [5] 符军放, 吴素芳, 曹炜, 等. 蜂胶醇提取物紫外光谱相似性探讨[J]. 中国蜂业, 2006, 57(5): 9-10
FU Jun-fang, WU Su-fang, CAO Wei, et al. The study on the similarity of ethanol extracts of propolis (EEP) [J]. Apiculture of China, 2006, 57(5): 9-10
- [6] 彭文君, 罗其花, 李长春, 等. 基于微卫星标记的东北黑蜂群体遗传多态性分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(21): 4484-4491
PENG Wen-jun, LUO Qi-hua, LI Chang-chun, et al. Genetic diversity of northeastern black bee (*Apis mellifera* ssp.) in China based on microsatellite markers [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(21): 4484-4491
- [7] 李雅萍, 贺丽苹, 陈玉芬, 等. SPME-GC/MS 联用技术分析蜂胶中挥发性成分的研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(7): 78-80
LI Ya-ping, HE Li-ping, CHEN Yu-fen, et al. Identification of volatile components in chinese propolis by solid phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC/MS) [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(7): 78-80
- [8] Midorikawa K, Banskota A H, Tezuka Y, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis [J]. Phytochemical Analysis, 2001, 12(6): 366-373
- [9] 张蓓, 韩鹏祥, 冯叙桥, 等. 紫外辐照对蜂胶/纳米 SiO₂ 复合膜性能的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 192-198
ZHANG Bei, HAN Peng-xiang, FENG Xu-qiao, et al. Effect of ultraviolet irradiation on performance of propolis/nano silica composite film [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(9): 192-198

- [10] Daniel Fasolo, Ana Maria Bergold, Gilsane von Poser, et al. Determination of benzophenones in lipophilic extract of Brazilian red propolis, nanotechnology-based product and porcine skin and mucosa: Analytical and bioanalytical assays [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 124: 57-66
- [11] Gastón Darío Pierini, David Douglas Sousa Fernandes, Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz, et al. A digital image-based traceability tool of the geographical origins of Argentine propolis [J]. *Microchemical Journal*, 2016, 128: 62-67
- [12] Augustin Cătălin Moț, Radu Silaghi-Dumitrescu, Costel Sârbu. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, 24(4-5): 516-522
- [13] 龚上佶. 中国不同地区蜂胶元素含量测定及红外光谱分析 [D]. 南昌: 南昌大学, 2011
- GONG Shang-ji. Element determination and infrared spectrum analysis of propolis [D]. Nan Chang: Nan Chang University, 2011
- [14] Kasote D, Ahmad A, Chen W, et al. HPLC-MS as an efficient hyphenated technique for the rapid identification of antimicrobial compounds from propolis [J]. *Phytochemistry Letters*, 2014, 11: 326-331