

# 市售提纯蜂胶中黄酮含量测定及其聚类分析

张金振<sup>1</sup>, 陈兰珍<sup>1</sup>, 吴黎明<sup>1</sup>, 李熠<sup>2\*</sup>, 周金慧<sup>2</sup>, 薛晓锋<sup>2</sup>, 陈芳<sup>2</sup>, 王鹏<sup>2</sup>

<sup>1</sup>农业部蜂产品质量安全风险评估实验室; <sup>2</sup>中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093

**摘要:** 采用液相色谱法测定了 175 个市售提纯蜂胶样品中芦丁、杨梅酮、槲皮素、苜蓿醇、芹菜素、松属素、萜因和高良姜素等 8 种黄酮的含量, 并用 SPSS 软件对 175 个提纯蜂胶中苜蓿醇、芹菜素、松属素、萜因和高良姜素等 5 种黄酮化合物含量进行聚类分析, 将这些提纯蜂胶样品聚成 5 类, 结果表明这 5 种黄酮化合物的含量可以用于市场提纯蜂胶的分类。

**关键词:** 提纯蜂胶; 液相色谱; 黄酮; 聚类分析

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## The Content and Cluster Analysis of Flavonoids in Purified Propolis from Market

ZHANG Jin-zhen<sup>1</sup>, CHEN Lan-zhen<sup>1</sup>, WU Li-ming<sup>1</sup>, LI Yi<sup>2\*</sup>, ZHOU Jin-hui<sup>2</sup>,  
XUE Xiao-feng<sup>2</sup>, CHEN Fang<sup>2</sup>, WANG Peng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Risk Assessment for Quality and Safety of Bee Products, Ministry of Agriculture;

<sup>2</sup>Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China

**Abstract:** The contents of eight flavonoids such as rutin, myricetin, quercetin, kaempferol, apigenin, pinocembrin, chrysin and galangin in purification propolis samples were determined by liquid chromatography, and cluster analysis of SPSS was applied to study the content of kaempferol, apigenin, pinocembrin, chrysin and galangin in purification propolis samples. The results of cluster analysis showed that samples could be classified into five groups, and the contents of the 5 kinds of flavonoids could be used for classification of purified propolis in market.

**Key words:** purified propolis; liquid chromatography; flavonoids; cluster analysis

蜂胶(propolis 或 bee glue)是蜜蜂从植物芽孢或树干上采集的树脂,混入其上腭腺、蜡腺的分泌物加工而成的一种具有芳香气味的胶状固体物。蜜蜂将这些物质涂布在整个蜂巢的表面可以起到防腐、抗氧化的作用,同时用来粘合蜂巢,堵塞缝隙等,使众多病菌无法在蜂巢内滋生。蜂胶具有抗病毒、抗菌消炎、抗肿瘤、抗氧化、调节血脂、调节机体免疫功能等多种生物活性<sup>[1,2]</sup>。

与蜂蜜、蜂王浆、蜂蜡等其他蜂产品相比,蜂胶的质量检测和控制难度较大,这主要是因为蜂胶的主要成分来源于树胶,其化学成分复杂多样,且不同植物源、不同地区和不同气候条件的同种蜂胶中成分也存在差异<sup>[3]</sup>。目前已从蜂胶中鉴定的单体化合物有 300 多种,主要包括黄酮类化合物、芳香酸与芳香酸酯、醛与酮类化合物、脂肪酸与脂肪酸酯、萜类化合物、甾体化合物、氨基酸、糖类化合物、烃类化

合物、醇和酚类及其它化合物<sup>[3-5]</sup>。已有研究发现,虽然大多数蜂胶的主要成分为黄酮类和肉桂酸衍生物,但超过 40% 的温带蜂胶主要成分为酚酸和黄酮类化合物,而亚热带蜂胶的主要成分为萜类化合物<sup>[6-8]</sup>。另外,由于从蜂箱中收集的毛胶中含有大量的杂质,生产厂家需要对蜂胶提纯后以蜂胶块或蜂胶粉的形式作为原料出售,不同的生产工艺也使蜂胶的成分存在差异。

由于蜂胶中含有大量的黄酮类物质,被认为是主要的生物活性成分,因此在蜂胶国家标准中将总黄酮含量作为蜂胶质量评价的技术指标<sup>[9]</sup>,于是一些不法企业就通过以杨树胶假冒蜂胶、以次充好或非法添加等手段达到检测合格的目的。这使得仅通过总黄酮含量来控制蜂胶质量还不够,2010 年版中国药典<sup>[10]</sup>要求蜂胶中萜因含量不得低于 2.00%,高良姜素不得低于 1.00%。

本研究采用高效液相色谱(HPLC)技术对市场提纯蜂胶的 8 种黄酮含量进行测定,并使用聚类分析法—K 均值聚类法对市场提纯蜂胶中 8 种黄酮的

定量测定结果进行分析,以对中国市场上销售的提纯蜂胶进行分类,为蜂胶的质量控制和功效研究提供参考依据

## 1 实验部分

### 1.1 仪器设备及主要试剂

#### 1.1.1 仪器设备

Agilent 1200 高效液相色谱仪;配有 DAD 检测器;温度可调超声波;注射过滤器:容积为 1 mL;0.45  $\mu\text{m}$  尼龙滤膜。

#### 1.1.2 主要试剂

甲醇:色谱纯;磷酸:优级纯;芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、萜因和高良姜素等标准物质均购自 Sigma 公司,纯度均  $\geq 99\%$ 。准确称取上述黄酮标准物质,用甲醇分别配制成浓度为 475.0、475.0、570.0、261.0、261.0、720.0、475.0、820.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液,于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中保存。吸取恢复至室温的八种黄酮标准储备液各 100  $\mu\text{L}$ ,并加入 200  $\mu\text{L}$  甲醇,混合均匀后配制成混合标准工作溶液。

#### 1.1.3 蜂胶样品

共计 175 个提纯蜂胶,均来自市场上不同的生产厂家。

### 1.2 色谱条件

A 相:0.05% 磷酸水;B 相:甲醇。梯度洗脱程序为:0 min,60% A;10 min,60% A;20 min,55% A;25 min,45% A;42 min,25% A;52 min,25% A;53 min,60% A;73 min,60% A。色谱柱为 XDB-C18 ( $4.6 \times 150 \text{ mm}$ ,5  $\mu\text{m}$ ),流速为 0.8 mL/min,柱温为  $30^\circ\text{C}$ ,进样量为 5  $\mu\text{L}$ ,检测器波长为 270 nm。

### 1.3 样品制备

参考 GB/T 19427-2003 方法<sup>[11]</sup>。称取 0.1 g ~ 0.2 g 试样,精确到 0.001 g,置于 50 mL 容量瓶内,加入 40 mL 甲醇,在  $60^\circ\text{C}$  的超声波水浴中,超声 40 min,待样品完全溶解后,取出冷却至室温,然后用甲醇定容至 50 mL,摇匀,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜,供液相色谱仪测定。

### 1.4 样品测定

在优化的色谱条件下,先测定混合标准工作溶液,然后测定各提纯蜂胶样品,采用单点校正法对样品中黄酮组分进行定量。

## 2 结果和讨论

### 2.1 液相色谱条件的优化

参考 GB/T 19427-2003 液相色谱方法<sup>[11]</sup>,在此基础上进行了优化,改变了流动相的比例和流速,采用梯度洗脱,八种黄酮的出峰时间在 40 min 内出峰,且均能与杂质完全分开。混合标准工作溶液和样品色谱图见图 1 和图 2。在优化的条件下,稀释标准储备液,测定八种黄酮的线性范围均良好,相关系数  $r$  均大于 0.999。根据  $S/N = 3$  的信噪比计算方法的检出限与 GB/T 19427-2003 中的液相色谱方法一致,杨梅酮、茨菲醇、芹菜素、萜因为 0.10 g/kg;芦丁、槲皮素、松属素、高良姜素为 0.20 g/kg。

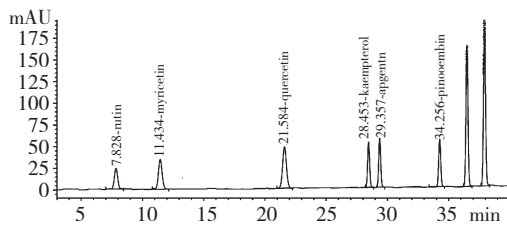


图 1 八种黄酮混合标准工作溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the standard solution of eight different kinds of flavonoids

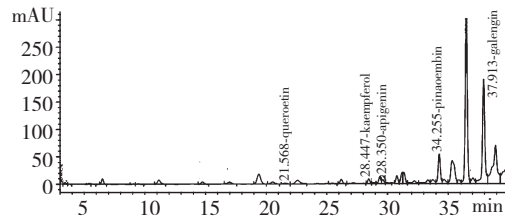


图 2 提纯蜂胶样品色谱图

Fig. 2 The chromatogram of purified propolis samples

### 2.2 不同蜂胶样品中黄酮含量

中国市场销售的 175 个提纯蜂胶样品中八种黄酮含量的测定结果表明(见表 1),大多数蜂胶样品中芦丁、杨梅酮和槲皮素的含量很低或未检出,茨菲醇和芹菜素含量范围分别为 0.77 ~ 4.11 g/kg 和 0.26 ~ 7.58 g/kg,松属素、萜因和高良姜素平均含量分别为 26.72 g/kg,31.02 g/kg 和 29.86 g/kg,为主要黄酮成分,这与赵玉娟等<sup>[12]</sup>报道的这三种黄酮的含量占总量 90% 以上的结果相符。在 175 个市场提纯蜂胶样品中,有 18 个样品中含有芦丁,其中 10 个样品中的芦丁含量为 5 ~ 105.39 g/kg,8 个样品芦丁含量低于 5 g/kg;有一个样品中芦丁含量高达 105.39 g/kg,且该样品中萜因和高良姜素 3 种主要黄酮成分均未检出,可能为人为添加的芦丁;在 7

个芦丁含量为 12-50 g/kg 的蜂胶样品中,其液相色谱图所出的峰数目或除芦丁以外的其它 7 种黄酮相应含量明显低于未检出芦丁的蜂胶样品,而李熠<sup>[13]</sup>收集全国不同地区 120 个毛胶样品并提纯,测定其

中的芦丁含量范围为 0.079 ~ 0.728% (相当于 0.79 ~ 7.28 g/kg),均低于 12 g/kg,由于蜂胶成分的影响因素较多,这些芦丁含量过高的蜂胶样品的质量还待商榷。

表 1 市场提纯蜂胶样品中黄酮的含量(g/kg, n = 175)

Table 1 The contents of flavonoids in different purified propolis samples from market(g/kg, n = 175)

黄酮组分 Flavonoids	最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值 Mean ± SD	标准偏差 Standard deviation
芦丁 Rutin	-	105.39	1.75	9.74
杨梅酮 Myricetin	-	7.40	0.27	1.19
槲皮素 Quercetin	-	35.52	1.30	4.46
茨菲醇 Kaempferol	0.77	4.11	1.86	0.61
芹菜素 Apigenin	0.26	7.58	2.21	1.17
松鼠素 Pinocembin	-	64.57	26.72	9.31
苜蓿素 Chrysin	-	70.43	31.02	11.66
高良姜素 Galangin	-	53.34	29.86	8.78
总量 Total	40.44	159.45	94.86	17.75

注:表中“-”为未检出。

表 2 最终聚类中心

Table 2 Final Cluster Centers

黄酮组分 Flavonoids	聚类				
	1	2	3	4	5
茨菲醇 Kaempferol	2.22	2.40	1.79	1.74	1.89
芹菜素 Apigenin	2.96	1.71	2.39	1.24	2.34
松鼠素 Pinocembin	36.04	51.64	24.79	20.61	28.40
苜蓿素 Chrysin)	62.78	22.91	30.30	14.44	38.57
高良姜素 Galangin	21.52	21.08	35.66	19.71	25.00

表 3 每类的观测量数目

Table 3 Number of Cases in each Cluster

聚类 Cluster	1	9.000
	2	8.000
	3	98.000
	4	25.000
	5	35.000
有效样品 Valid	175.000	
缺失样品 Missing	0	

聚类分析对 175 个市场上销售的提纯蜂胶样品进行聚类分组。由于芦丁、杨梅酮和槲皮素的检出率和含量均较低,故采用茨菲醇、芹菜素,松鼠素,苜蓿素和高良姜素等 5 个黄酮成分的含量作为聚类变量。在 K 均质聚类分析过程中,不断调整 K 值,最终将市场上的提纯蜂胶分为 5 类,结果见表 2 和表 3。第一类占总样品数 4.57%,苜蓿素含量最高,为 62.78 g/kg,依次为松鼠素和高良姜素,含量分别为 36.04 g/kg 和 21.52 g/kg;第二类占总样品数 5.14%,松鼠素含量最高,为 51.64 g/kg,依次为苜蓿素和高良姜素,含量分别为 22.91g/kg 和 21.08 g/kg;第三类占总样品数 56.00%,高良姜素含量最高为,35.66 g/kg,依次为苜蓿素和松鼠素,含量分别为 30.30 g/kg 和 24.79 g/kg;第四类占总样品数 14.29%,松鼠素含量最高为 20.61 g/kg,依次为高良姜素和苜蓿素,含

## 2.4 聚类分析

聚类分析是在难以确定一批样品中每个样品的类别时,把样品特征作为分类依据、利用相似性度量法将特征相同或相近样本归为一类的方法<sup>[14]</sup>。本研究采用 K 均质聚类法,用 SPSS 11.0 软件包中的

量分别为 19.71 g/kg 和 14.44 g/kg;第五类占样品数 20.00%, 萜因含量最高,为 38.57g/kg;依次为松鼠素和高良姜素,含量分别为 28.40 g/kg 和 25.00 g/kg。在这 5 类蜂胶中,市场上销售的提纯蜂胶样品以第三类为主,占一半以上,其次为第四类和第五类。对于第四类样品,其萜因含量(14.44 g/kg)低于 2010 版药典规定的不少于 2.00% (相当于 20.0g/kg)的要求,但是中国药典采用的是薄层色谱检测方法,这一结果是两种测定方法引起的差异,还是蜂胶质量问题引起的还需要进一步研究。

### 3 结论

本研究提供了市场提纯蜂胶八种黄酮含量测定的准确数据,其中芦丁、杨梅酮和槲皮素检出率和含量均较低,松属素、萜因和高良姜素为市场上提纯蜂胶中的主要黄酮成分。采用 SPSS 软件对 175 个提纯蜂胶样品中苘菲醇、芹菜素,松鼠素,萜因和高良姜素等 5 种黄酮化合物含量进行聚类分析,中国市场上销售的提纯蜂胶可分成 5 类,其中第三类占样品总数 56.00%。结果表明这 5 种黄酮化合物的含量可以用于中国市场销售的提纯蜂胶的分类,这也为中国提纯蜂胶的质量判断和功效成分的研究提供依据。

#### 参考文献

- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol*, 1998, 36: 347-363.
- Banskota AH, Tezuka Y, Kadota SH. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*, 2001, 15: 561-571.
- Bankova V, Marcucci MC. Standardization of propolis: present status and perspective. *Bee World*, 2000, 81: 182-188.
- Nao Y(南垚), et al. Advances in studies on chemical constituents of propolis. *World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*(世界科学技术-中医药现代化), 2006, 8: 56, 61-71.
- Zhang CP(张翠平), Hu FL(胡福良). Flavonoids in propo-

- lis. *Nat Pro Res Dev*(天然产物研究与开发), 2009, 21: 1084-2000.
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva YU, et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*, 1999, 64: 235-240.
- Chen Y, Shiao M, Wang S. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anticancer Drugs*, 2001, 12: 143-149.
- Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 2502-2506.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局), Standardization Administration of the People's Republic of China(中国国家标准化管理委员会). Propolis. Chinese Standard Press(中国标准出版社), GB/T 24283-2009.
- Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 336.
- All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives(中华全国供销合作总社). Method for the determination of rutin, myricetin, quercetin, kaempferol, apigenin, pinocembrin, chrysin, galangin contents in propolis-LC-MS-MS detection method and LC-UV detection method. Beijing: Chinese Standard Press(中国标准出版社), GB/T 19427-2004.
- Zhao YJ(赵玉娟). Determination of flavonoid contents in propolis by high performance liquid chromatography (HPLC). *Modern Instruments*(现代仪器), 2000, 4: 22-24.
- LI Y(李熠). The differences analysis of flavonoids in propolis from different regions in China. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences(中国国农业科学院), MSc. 2008, 20.
- Wang TX(王同兴), Guo JJ(郭俊杰), Wang Q(王强). The recognition of soil sample based on the K-means dynamic clustering analysis. *Building Sci*(建筑科学), 2010, 26(7): 52-56.