

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240219005

超高效液相色谱-多元统计分析法评价蜂胶 提取物质量

章 越, 姜慧洁, 慎凯峰, 周丹英*

(浙江省中药研究所有限公司, 杭州 310023)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)快速测定蜂胶提取物中的 14 种化学成分, 结合多元统计分析方法对不同厂家的蜂胶提取物质量进行综合评价。**方法** 收集来自不同厂家的 17 批蜂胶提取物样品, 采用 UPLC 采集色谱图, 甲醇-0.2%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 同时测定咖啡酸、p-香豆酸、阿魏酸、异阿魏酸、3,4-二甲氧基肉桂酸、咖啡酸苯乙酯、阿替匹林 C、槲皮素、山奈素、芹菜素、异鼠李素、乔松素、白杨素、高良姜素的含量, 运用统计学软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、聚类分析(clustering analysis, CA)、偏最小二乘-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA), 筛选分析质量差异标志物。通过熵权法计算各指标权重, 将结果应用于优劣解距离法(technique for order preference by similarity to ideal solution, TOPSIS)和秩和比法(rank sum ratio, RSR)构建综合评价模型, 评价不同批次的蜂胶提取物质量优劣。**结果** 14 个指标成分在各自的浓度范围内线性关系良好($r \geq 0.9992$), 平均加样回收率是 96.37%~102.21%, 相对标准偏差小于 2%。化学计量学结果表明 17 批样品聚为 4 类, 同一个厂家的样品聚为一类, 不同厂家的样品存在明显差异, 3,4-二甲氧基肉桂酸、异阿魏酸、槲皮素、高良姜素、阿替匹林 C、咖啡酸苯乙酯可能是影响厂家质量差异的潜在标志物。通过熵权-TOPSIS、熵权-RSR 以及两者相结合的方式构建的综合质量评价模型, 对不同批次蜂胶提取物的质量优劣排序结果较为一致。**结论** 基于 UPLC 的多指标测定方法准确便捷, 结合 PCA、CA、PLS-DA 和 TOPSIS-RSR 建立的评价模式能够有效分析不同厂家的差异性, 为蜂胶提取物的整体质量评价提供参考。

关键词: 蜂胶提取物; 超高效液相色谱法; 主成分分析; 聚类分析; 偏最小二乘分析-判别分析; 优劣解距离法-秩和比法

Evaluation of propolis extract quality by ultra performance liquid chromatography-multivariate statistical analysis

ZHANG Yue, JIANG Hui-Jie, SHEN Kai-Feng, ZHOU Dan-Ying*

(Zhejiang Institute of Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the rapid determination of 14 kinds of chemical components in

基金项目: 浙江省属科研院所扶持专项(2022F03355)

Fund: Supported by the Project of Zhejiang Provincial Scientific Research Institutes (2022F03355)

*通信作者: 周丹英, 高级工程师, 主要研究方向为中药保健食品研发。E-mail: 471861007@qq.com

*Corresponding author: ZHOU Dan-Ying, Senior Engineer, Zhejiang Institute of Chinese Medicine Co., Ltd., No.553, Xixi Road, Xihu District, Hangzhou 310023, China. E-mail: 471861007@qq.com

propolis extracts by ultra performance liquid chromatography (UPLC), and to comprehensively evaluate the quality of propolis extracts from different manufacturers by multivariate statistical analysis. **Methods** The 17 batches of propolis extract samples from different manufacturers were collected and chromatographed by UPLC with methanol-0.2% phosphoric acid aqueous solution as mobile phase and gradient elution, the content of caffeic acid, P-coumaric acid, ferulic acid, isoferulic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid, phenethyl caffeic acid, atipilin C, quercetin, kaempin, apigenin, isorhamnetin, josinetin, albumin and galangin were determined. Principal component analysis (PCA), cluster analysis (CA), partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were used to screen and analyze the quality difference markers by statistical software, meanwhile, the weights of each index were calculated by entropy weight method, and the results were applied to the superiority and inferiority solution distance method (TOPSIS) and rank sum ratio method (RSR) to construct a comprehensive evaluation model to evaluate the quality of different, the results were used to evaluate the quality of different batches of propolis extracts. **Results** The linear relationships of the 14 components were good ($r \geq 0.9992$) in their respective concentration ranges. The average recoveries were 96.37%–102.21%, and the relative standard deviations were less than 2%. The chemometric results showed that the 17 batches of samples were clustered into 4 categories, samples from the same manufacturer were clustered into one category, and there were significant differences between samples from different manufacturers. 3,4-dimethoxycinnamic acid, isoferulic acid, quercetin, galangin, atipyrine C, and caffeic acid phenethyl ester might be potential markers affecting the quality differences of manufacturers. The comprehensive quality evaluation models constructed by entropy-TOPSIS, entropy-RSR and a combination of both showed more consistent results in ranking the quality of different batches of propolis extracts. **Conclusion** The UPLC-based multi-indicator determination method is accurate and convenient, and the evaluation model established by combining PCA, CA, PLS-DA and TOPSIS-RSR can effectively analyze the variability of different manufacturers and provide a reference for the overall quality evaluation of propolis extracts.

KEY WORDS: propolis extracts; ultra performance liquid chromatography; principal component analysis; clustering analysis; partial least squares-discriminant analysis; technique for order preference by similarity to ideal solution-rank sum ratio

0 引言

蜂胶是蜜蜂科昆虫意大利蜂(*Apis mellifera* L.)工蜂获得的植物树脂与其上颚腺、蜡腺等分泌物混合而成的黏性固体胶状物^[1]。蜂胶提取物是蜂胶通过乙醇浸提等工艺得到的,功效丰富,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降血脂等作用,在保健食品中被广泛开发与应用^[2-6]。近些年来,市场上蜂胶提取物质量参差不齐,经常出现以次充好,真假混淆的现象^[7-8]。目前大多数蜂胶类保健食品仅是通过测定总黄酮含量进行品质控制,该类方法专属性差,难以辨别优劣。因此建立一种多指标质控模式,对于全面评价蜂胶提取物质量具有重要的意义。

目前蜂胶的定量分析方法主要是通过荧光光谱法^[9]、紫外-可见分光光度法^[10]、高效液相色谱-质谱法^[11]、气相色谱-质谱法^[12]等,其中荧光光谱法、紫外-可见分光光度法,操作便捷,但是局限于对同类成分的研究;高效液相色谱-质谱法、气相色谱-质谱法检测速度快、灵

敏度高,但是仪器价格昂贵、检测成本较高,大多数生产厂家并不具备相应设备。高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)是应用较为广泛的方法^[13-15],而超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)是在 HPLC 基础上发展起来的,将其应用于蜂胶的成分分析,柱效高、定量准确,且能减少试剂的消耗^[16]。

化学计量学是一种基于数学、统计学还有计算机技术的交叉科学,能够对复杂数据进行降维分析,充分挖掘内在联系,寻找对质量评价有重要贡献的成分^[17-18]。优劣解距离法(technique for order preference by similarity to ideal solution, TOPSIS)和秩和比法(rank sum ratio, RSR)是多指标决策中的常用方法^[19-20]。TOPSIS 被广泛应用于中药质量综合评价^[21],但是 TOPSIS 灵敏度较低,对异常值的干扰较为敏感;RSR 在食品质量评价领域的应用较少,其容易损失原始数据信息^[22-23]。

本研究通过 UPLC 同时测定了蜂胶提取物中咖啡

酸(caffeic acid, CA)、p-香豆酸(p-coumaric acid, P-CA)、阿魏酸(ferulic acid, FA)、异阿魏酸(isoferulic acid, IA)、3,4-二甲氧基肉桂酸(3,4-dimethoxycinnamic acid, DA)、咖啡酸苯乙酯(phenethyl caffeic acid, PHCA)、阿替匹林 C (attipirine C, AC)、槲皮素(quercetin, QU)、山奈素(kaempferide, KA)、芹菜素(apigenin, AP)、异鼠李素(isorhamnetin, IS)、乔松素(pinoembrin, PI)、白杨素(chrysin, CH)、高良姜素(galangin, GA) 14 种化学成分的含量, 运用统计软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 热图聚类分析(clustering analysis, CA), 偏最小二乘-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA), 筛选并分析不同厂家质量差异的主要物质基础。此外, 采用熵权法计算权重系数, 减少了主观因素对于决策的影响, 建立熵权-TOPSIS 和熵权-RSR 相结合的综合评价方法, 弥补了单一方法排序的局限性, 为蜂胶提取物的整体质量控制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂胶提取物, 编号依次为 S1~S17, S1-S3 来自 A 厂家, S4~47 来自 B 厂家, S8~S10 来自 C 厂家, S11~S17 来自 D 厂家。

CA(纯度 98.0%)、PCA(纯度 98.0%)、DA(纯度 98.0%)、PHCA(纯度 98.00%)(成都普思生物科技有限公司); PI(纯度 99.52%)、CH(纯度 99.57%)、GA(纯度 98.73%)(成都曼斯特生物科技有限公司); FA(纯度 99.40%)、IA(纯度 99.30%)、QU(纯度 99.10%)、KA(纯度 95.50%)、AP(纯度 98.73%)、IS(纯度 99.80%)(中国食品药品检定研究院); AC(纯度 97.0%)(上海源叶生物科技有限公司)。

乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 甲醇(分析纯, 上海凌峰试剂有限公司); 磷酸(分析纯, 永华化学有限公司)。

1.2 仪器与设备

ME204 型万分之一电子天平(瑞士梅特勒托利多公司); TD-5002 十万分之一型电子天平(余姚市金诺天平仪器有限公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱、DK-S26 型恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); Agilent Technologies 1260 超高效液相色谱仪、Agilent 色谱柱(3 mm×100 mm, 2.7 μm)(美国 Agilent 公司); KQ-100DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

采用 Agilent 色谱柱(3 mm×100 mm, 2.7 μm), 以十

八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 柱温 35°C; 流速 0.6 mL/min; 检测时采用双通道波长分别为 270 nm(用于定量 QU、KA、AP、IS、PI、CH、GA)和 320 nm(用于定量 CA、PCA、FA、IA、DA、PHCA、AC); 进样量为 3 μL, 流动相是甲醇-0.2%磷酸水溶液, 进行梯度洗脱, 后运行时间 8 min, 洗脱程序见表 1。

表 1 洗脱梯度程度表
Table 1 Elution gradient degree table

时间/min	甲醇/%	0.2%磷酸水溶液/%
0~3	15~25	85~75
3~13	25~40	75~60
13~38	40~48	60~52
38~45	48~55	52~45
45~55	55~75	45~25
55~60	75~90	25~10
60~65	90~15	10~85

1.3.2 混合对照品的制备

取 CA、P-CA、FA、IA、DA、PHCA、AC、QU、KA、AP、IS、PI、CH、GA 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 约 125、105、35、370、100、115、45、180、65、75、70、480、650、470 μg 的混合对照品溶液。

1.3.3 供试品的制备

取本品 0.25 g, 精密称定, 置于 25 mL 容量瓶中, 加入甲醇 20 mL, 超声处理 30 min, 冷却室温后, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的滤膜滤过, 取续滤液, 即得待测液。

1.4 数据处理

PCA, PLS-DA 采用 SIMCA 软件, CA 采用 Origin 2019 软件, TOPSIS 和 RSR 通过 SPSS 26.0 进行计算。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 系统适用性考察

取空白溶剂、各对照品溶液以及供试品溶液, 按照 1.3.1 所述的色谱条件进行检测。结果显示, 空白溶剂对 14 种定量成分均无干扰。供试品中 CA、P-CA、FA、IA、DA、QU、KA、AP、IS、PI、CH、GA、PHCA、AC 色谱峰与相邻色谱峰分离良好(分离度 ≥ 1.5), 出峰时间分别是 4.486, 6.413, 7.383, 8.412, 11.825, 16.663, 22.017, 23.285, 24.319, 31.903, 37.439, 41.477, 42.567, 55.432 min, 对照品色谱图见图 1, 样品色谱图见图 2。

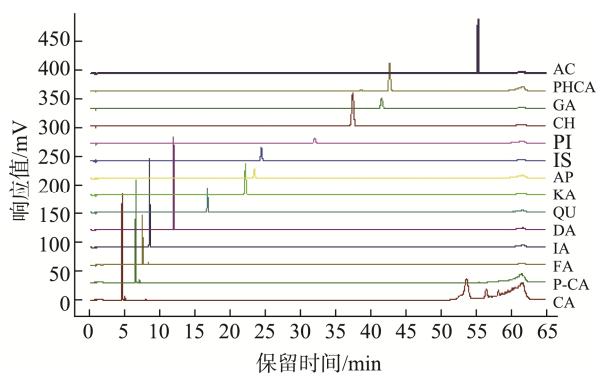


图1 对照品色谱图

Fig.1 Chromatograms of control

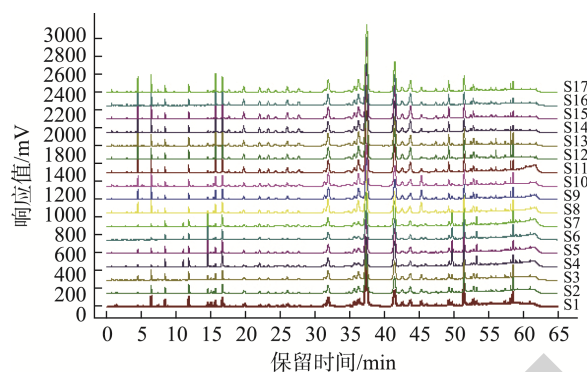


图2 样品色谱图

Fig.2 Chromatograms of the samples

2.1.2 精密度实验

取样品(编号 S1), 按照供试品方法制备一份溶液, 连续进样 6 次检测, CA、P-CA、FA、IA、DA、PHCA、AC、QU、KA、AP、IS、PI、CH、GA 色谱峰面积的相

对标准偏差(relative standard deviation, RSD)结果分别为 1.02%、0.89%、1.36%、1.54%、0.75%、1.41%、1.22%、1.05%、0.94%、1.64%、0.69%、0.61%、1.38%、1.82%, 可见精密度能够满足要求。

2.1.3 重复性实验

取样品(编号 S1) 6 份, 分别按照供试品方法制备溶液, 按照 1.3.1 所述的色谱条件进行检测, 记录色谱曲线峰面积, 通过外标法计算 CA、P-CA、FA、IA、DA、PHCA、AC、QU、KA、AP、IS、PI、CH、GA 的含量均值分别为 1.32、4.58、1.32、5.35、7.58、9.77、0.78、8.51、1.93、3.52、1.99、30.92、64.66、21.81 mg/g, 含量的 RSDs 分别是 1.83%、1.24%、1.35%、1.01%、1.98%、1.74%、1.54%、1.26%、1.09%、0.98%、1.33%、1.45%、1.68%、1.11%, 可见重复性良好。

2.1.4 稳定性实验

取同一份样品(编号 S1), 制备后分别于 0、4、8、12、16、24 h 后分别取样检测, 计算 CA、P-CA、FA、IA、DA、PHCA、AC、QU、KA、AP、IS、PI、CH、GA 的含量 RSDs 分别是 1.21%、1.35%、1.68%、1.08%、1.93%、1.74%、1.62%、1.51%、1.40%、1.39%、1.86%、1.91%、1.75%、1.52%, 可见蜂胶提取物供试品溶液放置 24 h 稳定。

2.1.5 线性关系考察

精密吸取 1.3.2 项下的对照品母液稀释成 6 个不同浓度质量浓度, 按照 1.3.1 所述的色谱条件进行检测, 记录色谱曲线峰面积, 以 CA、P-CA、FA、IA、DA、PHCA、AC、QU、KA、AP、IS、PI、CH、GA 质量浓度对峰面积进行回归, 得到的线性方程结果见表 2。从表 2 中可以看出, 14 个指标成分均在浓度范围内线性关系良好。

表 2 指标成分的线性方程和线性范围

Table 2 Linear equations and linear ranges of the indicator components

名称	线性方程	r ² 值	线性范围/(μg/mL)
CA	Y=24.563X+4.1092	0.9997	3.55~127.8
P-CA	Y=29.184X+1.1408	1.0000	4.33~103.92
FA	Y=25.002X+0.5087	0.9996	2.85~34.20
IA	Y=23.17X+0.3179	0.9995	31.36~376.35
DA	Y=25.93X+1.5569	0.9998	8.34~100.10
PHCA	Y=27.148X+2.3607	1.0000	9.66~115.92
AC	Y=21.943X+1.0197	0.9997	3.75~45.01
QU	Y=11.363X+1.8959	0.9996	15.11~181.30
KA	Y=15.666X+0.2017	0.9992	5.08~60.99
AP	Y=9.8247X-0.3443	0.9998	6.11~73.32
IS	Y=8.5577X+0.401	0.9995	5.71~68.41
PI	Y=6.705X+0.906	0.9994	40.25~483.01
CH	Y=30.633X+16.474	0.9993	54.03~648.34
GA	Y=19.067X-0.3142	0.9999	38.97~467.64

2.1.6 准确度实验

取样品(编号 S1) 6 份, 每份精密称定 0.1 g, 分别加入各对照品适量, 按照 1.3.3 所述方法制备供试品溶液, 依法检测, 得到 CA、P-CA、FA、IA、DA、PHCA、AC、QU、KA、AP、IS、PI、CH、GA 的平均回收率分别是 99.24%、100.36%、98.57%、96.68%、99.64%、101.38%、101.75%、97.43%、98.17%、102.21%、100.33%、96.37%; RSDs 均小于 2%。由此可见, 该方法准确度好、精密度高, 能够满足定量分析的要求。

2.2 多指标成分定量测定

取不同厂家的样品(编号为 S1~S17), 按照 1.3.3 所述

方法每个批次平行制备 3 份供试品溶液进行检测, 记录 CA、P-CA、FA、IA、DA、PHCA、AC、QU、KA、AP、IS、PI、CH、GA 的色谱峰面积, 依据外标法计算 14 种成分的含量(mg/g), 3 次测定取平均值, 并计算标准偏差(standard deviation, SD), 结果见表 3。同一批次 3 次取样结果计算 SD 值作为其批内变异系数, 17 批样品测定结果取 SD 值作为批间变异系数。从表 3 中可以看出, 样品批次内差异 SD 范围在 0.00~1.03 之间, 样品批次间差异 SD 范围在 0.10~23.41。说明样品批次内差异相对较小, 反映了各厂家内部生产工艺相对稳定, 样品质量较均一; 而批次间的差异相对较大, 这可能是采购来源不一致或者不同厂家之间生产环节控制的差异引起的。

表 3 蜂胶提取物样品 14 种化学成分含量计算结果表格($n=3$)
Table 3 Table of calculation results of 14 chemical components in propolis extract samples ($n=3$)

编号	含量/(mg/g)													
	CA	P-CA	FA	IA	DA	PHCA	AC	QU	KA	AP	IS	PI	CH	GA
S1	1.32±0.02	4.58±0.06	1.32±0.06	5.35±0.08	7.58±0.11	9.77±0.13	0.78±0.01	8.51±0.12	1.93±0.02	3.52±0.04	1.99±0.02	30.92±0.46	64.66±0.73	21.81±0.30
S2	0.95±0.01	3.41±0.05	1.07±0.05	4.62±0.06	6.79±0.08	8.34±0.12	0.68±0.01	7.52±0.08	1.78±0.03	3.13±0.05	1.72±0.02	27.28±0.38	57.95±0.81	21.37±0.26
S3	2.56±0.04	4.37±0.06	1.23±0.06	4.35±0.05	5.99±0.07	8.26±0.11	0.70±0.02	8.41±0.10	2.13±0.02	3.38±0.05	2.49±0.03	29.74±0.43	58.79±0.72	23.54±0.35
S4	1.04±0.02	0.92±0.01	0.42±0.01	5.71±0.07	6.11±0.06	3.24±0.08	0.52±0.00	13.62±0.21	2.93±0.02	2.41±0.03	1.59±0.02	26.79±0.36	43.78±0.43	29.43±0.38
S5	2.51±0.04	2.01±0.03	0.62±0.01	4.65±0.06	5.24±0.08	4.42±0.09	0.55±0.01	11.68±0.18	2.84±0.03	2.94±0.04	2.02±0.01	26.81±0.35	52.35±0.51	29.72±0.41
S6	0.36±0.01	0.88±0.01	0.33±0.00	3.97±0.04	4.88±0.06	3.37±0.07	0.54±0.00	8.98±0.16	2.11±0.02	2.09±0.03	1.41±0.01	24.21±0.33	42.12±0.39	24.78±0.30
S7	0.82±0.01	0.94±0.01	0.35±0.00	4.15±0.06	5.12±0.05	3.55±0.06	0.45±0.01	10.12±0.15	2.41±0.01	2.49±0.02	1.73±0.02	25.50±0.36	48.09±0.57	29.58±0.29
S8	6.62±0.05	8.58±0.14	2.07±0.03	3.22±0.03	4.25±0.06	8.92±0.12	0.63±0.02	9.15±0.11	2.76±0.04	3.67±0.05	3.62±0.03	40.46±0.50	58.81±0.64	26.89±0.25
S9	6.03±0.06	7.57±0.11	1.84±0.02	3.24±0.03	4.20±0.04	8.30±0.11	0.75±0.02	8.89±0.09	2.63±0.03	3.54±0.06	3.39±0.03	36.58±0.38	57.24±0.56	25.66±0.34
S10	6.44±0.07	8.48±0.12	2.06±0.04	3.34±0.04	4.46±0.05	8.99±0.09	0.79±0.01	9.12±0.11	2.72±0.02	3.51±0.05	3.53±0.04	40.95±0.51	62.46±0.63	26.50±0.36
S11	9.02±0.10	6.19±0.08	1.91±0.02	4.32±0.05	5.78±0.06	10.34±0.13	0.70±0.02	12.35±0.12	3.47±0.04	5.15±0.08	3.61±0.03	37.11±0.41	91.74±0.86	34.88±0.28
S12	10.94±0.12	4.83±0.06	1.98±0.02	4.54±0.05	6.52±0.08	11.59±0.14	0.78±0.02	13.46±0.17	3.42±0.02	5.74±0.09	3.44±0.04	36.83±0.38	100.19±0.98	36.61±0.46
S13	9.27±0.09	4.87±0.06	1.97±0.01	4.38±0.03	6.49±0.09	10.34±0.11	0.79±0.03	13.10±0.08	3.30±0.01	5.11±0.07	3.41±0.03	38.72±0.40	84.16±0.72	34.77±0.26
S14	10.05±0.08	7.27±0.12	1.81±0.01	4.11±0.02	4.68±0.06	10.01±0.09	0.66±0.01	12.97±0.16	3.90±0.04	5.94±0.08	4.28±0.04	33.94±0.31	101.48±1.03	37.21±0.44
S15	10.97±0.12	7.95±0.13	1.98±0.02	4.49±0.06	5.11±0.06	11.28±0.12	0.74±0.02	14.14±0.20	4.24±0.05	6.41±0.10	4.64±0.05	36.98±0.29	110.19±0.94	40.60±0.61
S16	10.27±0.11	7.42±0.12	1.85±0.01	4.19±0.07	4.74±0.04	10.46±0.08	0.66±0.01	13.11±0.18	3.94±0.03	5.89±0.09	4.51±0.05	34.24±0.32	99.37±0.88	37.40±0.57
S17	9.89±0.10	7.38±0.11	1.98±0.02	4.46±0.05	5.54±0.08	11.13±0.15	0.69±0.02	13.08±0.16	3.78±0.04	5.78±0.08	4.13±0.03	38.53±0.48	100.46±0.96	37.30±0.49
批次间 SD	4.13	2.74	0.66	0.65	0.97	2.89	0.10	2.28	0.76	1.44	1.10	5.60	23.41	6.18

2.3 化学计量学综合分析

2.3.1 主成分分析

为了进一步分析 17 批蜂胶提取物样品的差异, 以 14 种化学成分含量为变量, 导入 SIMCA 软件中, 进行降维分析获得各主成分的特征值和方差贡献率, 结果见表 4。从表 4 中可以看出主成分 1 方差贡献率占 63.30%, 主成分 2 占 18.60%, 主成分 3 占 13.60%, 前 3 个主成分累计占比为 95.50%, 基本能够展现的样本中的主要信息。从图 3 中可以看出, R^2X 为 0.9555, Q^2 为 0.8679, 可见建立的 PCA 模型较为稳定可靠, 样品被分为 4 类, S1~S3 聚为第 1 类, S4~S7 聚为第 2 类, S8~S10 聚为第 3 类, S11~S17 聚为第 4 类, 可见同一厂家质量较为一致。

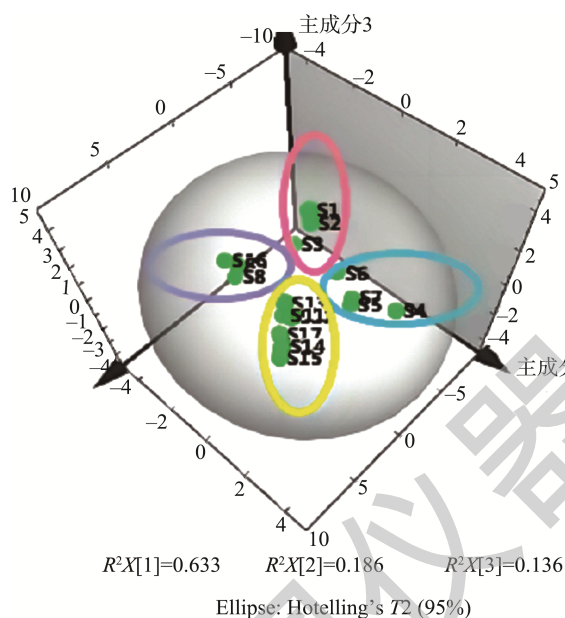


图 3 样品主成分得分图

Fig.3 Plot of principal component scores of samples

表 4 蜂胶提取物主成分特征值和方差贡献率

Table 4 Principal component eigenvalues and variance contribution of propolis extracts

主成分	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	0.6330	63.30	63.30
2	0.1860	18.60	81.90
3	0.1360	13.60	95.50
4	0.0228	2.28	97.70
5	0.0135	1.35	99.00
6	0.0077	0.77	99.80
7	0.0013	0.13	99.90
8	0.0006	0.06	100.00

2.3.2 热图聚类分析

为了更加直观的展示不同批次间化学组分的含量差异性, 将 17 批蜂胶提取物 14 中化合物含量经过标准化后绘制热图, 采用 Origin 软件以欧氏距离、远邻法进行 CA, 结果见图 4。其中横向表示不同成分含量, 纵向表示样品批次, 颜色变化代表含量高低。含量越高, 颜色越偏向紫色, 对应的刻度值越大; 含量越低, 颜色越偏向红色, 且刻度值越小。从图 4 中可以看出, S1~S3 聚为第 1 类, S4~S7 为第 2 类, S8~S10 聚为第 3 类, S11~S17 聚为第 4 类, 样品分类与 PCA 结果一致, 可见同一生产企业的样品质量一致性较好而不同生产企业的样品间的质量有明显的差异。厂家 C 和厂家 D 的各条带偏紫色, 可见其所含成分含量均较高, 质量相对较好。成分聚类结果显示 DA、IA 可分为一类、其他成分聚为一类, 表明为 DA、IA 对于区分各样品有主要的贡献。

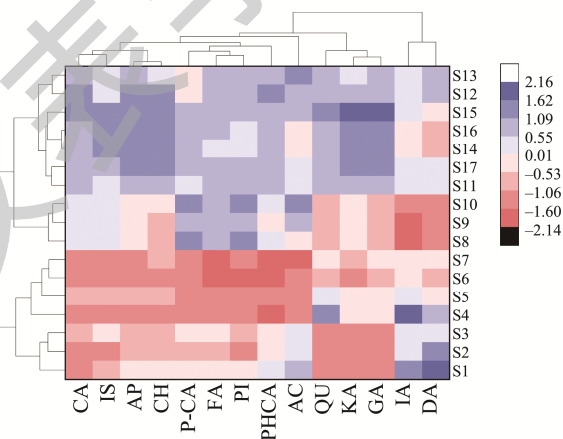


图 4 17 批样品聚类图

Fig.4 Cluster diagram of 17 batches of samples

2.3.3 偏最小二乘-判别分析

为了进一步筛选分析引起不同厂家质量差异的标志性成分, 将 14 种化合物成分含量导入 SIMCA 统计软件中。17 批蜂胶提取物样品的 PLA-DA 得分图如图 5。结果显示累积解释能力参数 (R^2Y) 分别为 0.867 (大于 0.5), 预测能力参数 Q^2 为 0.808 (大于 0.5), 可见所建立的模型稳定可靠、预测能力强。4 个厂家 17 批蜂胶提取物样品在 PLS-DA 模型中聚集显著。置换检验 PLS-DA 模型 200 次后, 结果 R^2 拟合直线 Y 轴截距为 0.0994 (<0.3), 表明所建立的 PLS-DA 模型结果可靠; Q^2 拟合直线 Y 轴截距为 -0.404 (<0), 表明模型未出现过拟合现象 (图 6)。对模型的变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) 参数进行分析, 以变量的 $VIP > 1$ 为评价标准, 筛选形成差异的标志性成分 (图 7), 结果 DA、QU、IA、GA、AC、PHCA 成分对蜂胶提取物样品质量的影响较大, 是影响蜂胶提取物产品质量的主要潜在标志物。

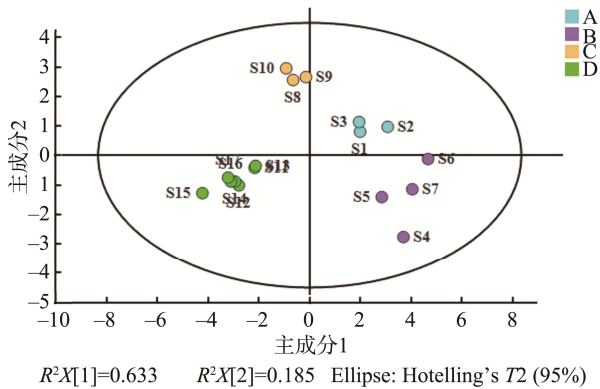


图5 17批蜂胶提取物样品PLS-DA模型得分图

Fig.5 PLS-DA model score plot for 17 batches of propolis extract samples

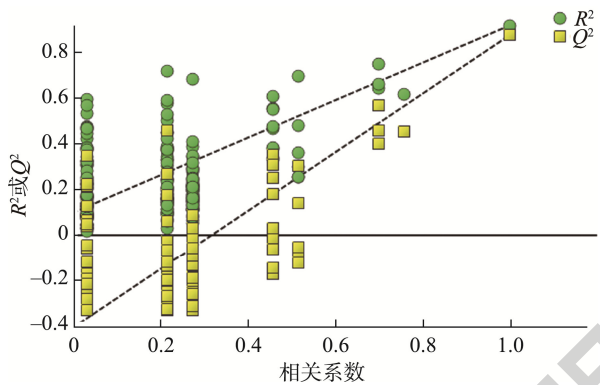


图6 PLS-DA置换检验结果
Fig.6 PLS-DA replacement test results

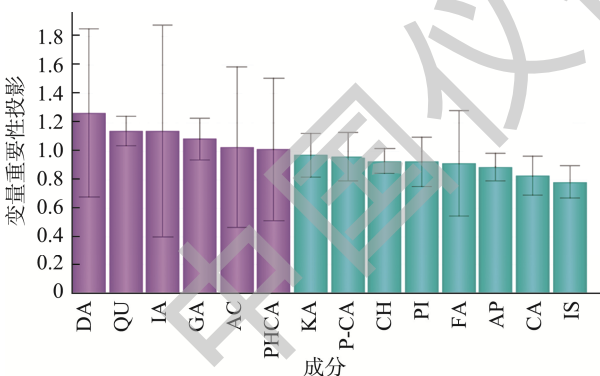


图7 17批蜂胶提取物样品变量重要性投影图
Fig.7 VIP chart of 17 batches of propolis extract samples

2.4 TOPSIS 与 RSR 综合分析

2.4.1 熵值法计算权重

熵值法是用来度量指标不确定性的判别方式, 指标信息量越大, 不确定性就会越小, 熵值也就越小; 利用熵值自身能够携带的信息计算权重, 结合各项指标的变异程度, 为多指标综合评价提供依据^[24-25]。步骤如下: (1)将原数据矩阵归一化[指标组分=(实测值-最小值)/(最大值-最

小值)], 建立原评价指标矩阵; (2)把原来的数据矩阵转换成概率矩阵; (3)对各指标的熵值、熵权系数进行计算。由 SPSS 20.0 可算得 CA、P-CA、FA、IA、DA、PHCA、AC、QU、KA、AP、IS、PI、CH、GA 得到的权重系数分别为 9.64%、7.65%、6.69%、6.22%、8.27%、6.41%、3.95%、6.69%、6.56%、7.39%、7.73%、6.48%、8.91%、7.41%。

2.4.2 TOPSIS 评价

TOPSIS 法是通过结合正理想解和负理想解, 计算得到各个评价对象最终的接近程度 C 值。本研究将上述熵权法获得权重值应用于 TOPSIS 评价。14 种指标分量纲一致, 均属于越大越优型, 根据公式对其进行归一化处理[指标组分=(实测值-最小值)/(最大值-最小值)]。将熵权法获得的权重值分别与归一化的数据相乘, 得到各加权决策矩阵。

根据加权矩阵可以得到最优方案 $Z^+ = \max(Z_1, Z_2, \dots, Z_{14})$ 和最劣方案 $Z^- = \min(Z_1, Z_2, \dots, Z_{14})$ 得 $Z^+ = \max(0.097, 0.077, 0.068, 0.063, 0.084, 0.065, 0.040, 0.068, 0.066, 0.075, 0.078, 0.065, 0.090, 0.075)$, 最劣方案 Z^- 均为 0.001, 按公式(1)、(2)、(3)计算各批样品的 D_i^+ (与正理想解距离)、 D_i^- (与负理想解的距离)及 C_i (最优解的贴进度), 结果见表 5。从表 5 中可以看出, 17 批蜂胶提取物样品中排名前 3 分别是 S15、S17、S12。

$$D_i^+ = \sqrt{\sum_{j=1}^n (Z_{ij} - Z_j^+)^2} \quad (1)$$

$$D_i^- = \sqrt{\sum_{j=1}^n (Z_{ij} - Z_j^-)^2} \quad (2)$$

$$C_i = \frac{D_i^-}{D_i^- + D_i^+} \quad (3)$$

表 5 TOPSIS 评价结果
Table 5 Evaluation results of TOPSIS

编号	正理想解 距离 D^+	负理想解 距离 D^-	相对接近度 C	排序结果
S1	0.185	0.138	0.427	11
S2	0.210	0.100	0.322	14
S3	0.186	0.101	0.351	12
S4	0.219	0.110	0.334	13
S5	0.203	0.084	0.294	15
S6	0.253	0.035	0.121	17
S7	0.233	0.057	0.196	16
S8	0.164	0.159	0.491	9
S9	0.173	0.140	0.448	10
S10	0.160	0.161	0.502	8
S11	0.086	0.195	0.694	7
S12	0.071	0.219	0.755	3
S13	0.086	0.198	0.698	5
S14	0.094	0.213	0.695	6
S15	0.070	0.247	0.779	1
S16	0.090	0.218	0.707	4
S17	0.069	0.221	0.762	2

2.4.3 RSR 评价

RSR 可以用来评价多个指标的综合水平情况, 其原理是利用了各项数学计算获得 RSR 值信息, RSR 值介于 0~1 之间且连续, 一般来说, 值越大代表评价对象越“优”。在 SPSS 中导入原始数据, 并输入各指标的权重值, 通过整次法进行综合分析, 分析结果如表 6 所示。接着进行 RSR 分布表格计算, 得到各组频数 f 、向下累计频数 Σf 、平均秩次 R 和向下累计秩次 $R/n \times 100\%$, 最后一项用 $(1-1/4n) \times 100\%$ 修正, 最后根据累计频率, 查询“百分数与概率单位对照表”, 求其所对应概率单位 Probit 值。对 RSR 值进行正态检验, $P < 0.01$, 表明 RSR 数据服从正态分布。以 Probit 为自变量, 以 RSR 分布值为因变量建立回归方程,

回归方程为: $Y = 0.204X - 0.518$, $r^2 = 0.911$, $F = 154.05$, $P < 0.05$, 表明回归方程有统计学意义。从表 6 中可以看出, 17 批蜂胶提取物样品中排名前 3 分别是 S15、S17、S12。

2.4.4 TOPSIS-RSR 计算综合贴进度

加权法-TOPSIS 和加权-RSR 的计算原理有所不同, 为了更加全面的体现不同批次蜂胶提取物的质量, 将两者结果进行结合, 将上述得到的 C 值和 RSR 值按照 $W_1C + W_2RSR$ 进行加权结合, 其中 W_1 和 W_2 分别代表加权法-TOPSIS 和加权-RSR 的权重数值, 分别取 0:1、0.2:0.8、0.5:0.5、0.8:0.2、1:0, 计算综合数值后进行排序, 具体结果见表 7。从表 7 中可以看出, 不同权重下获得的结果略有不同, 但是整体趋势一致。S12、S15、S17 在 17 个批次中质量较优, S6、S7 质量较差。

表 6 RSR 评价结果
Table 6 Evaluation results of RSR

编号	RSR 分布值	f	Σf	R	$R/n \times 100\%$	Probit 值	RSR 值	RSR 排名
S1	0.1791	1	1	1	5.9	3.435	0.410	11
S2	0.2640	1	2	2	11.8	3.813	0.289	14
S3	0.2676	1	3	3	17.6	4.071	0.381	12
S4	0.2888	1	4	4	23.5	4.278	0.264	16
S5	0.3320	1	5	5	29.4	4.459	0.332	13
S6	0.3810	1	6	6	35.3	4.623	0.179	17
S7	0.4095	1	7	7	41.2	4.777	0.268	15
S8	0.4885	1	8	8	47.1	4.926	0.622	9
S9	0.6221	1	9	9	52.9	5.074	0.489	10
S10	0.6277	1	10	10	58.8	5.223	0.628	8
S11	0.6755	1	11	11	64.7	5.377	0.676	7
S12	0.6877	1	12	12	70.6	5.541	0.743	3
S13	0.6920	1	13	13	76.5	5.722	0.688	6
S14	0.7390	1	14	14	82.4	5.929	0.692	5
S15	0.7431	1	15	15	88.2	6.187	0.848	1
S16	0.7541	1	16	16	94.1	6.565	0.739	4
S17	0.8482	1	17	17	98.5	7.178	0.754	2

表 7 17 批蜂胶提取物熵权-TOPSIS 与熵权-RSR 综合质量评价结果

Table 7 Comprehensive quality evaluation results of 17 batches of propolis extracts by entropy weight-TOPSIS and entropy weight-RSR

编号	C		RSR		0.2C+0.8RSR		0.5C+0.5RSR		0.8C+0.2RSR	
	数值	排序	数值	排序	数值	排序	数值	排序	数值	排序
S1	0.427	11	0.410	11	0.4134	10	0.4185	10	0.4236	10
S2	0.322	14	0.289	14	0.2956	15	0.3055	15	0.3154	15
S3	0.351	12	0.381	12	0.375	13	0.366	13	0.357	13
S4	0.334	13	0.264	16	0.278	14	0.299	14	0.32	14
S5	0.294	15	0.332	13	0.3244	12	0.313	12	0.3016	12
S6	0.121	17	0.179	17	0.1674	17	0.15	17	0.1326	17
S7	0.196	16	0.268	15	0.2536	16	0.232	16	0.2104	16
S8	0.491	9	0.622	9	0.5958	9	0.5565	9	0.5172	9
S9	0.448	10	0.489	10	0.4808	11	0.4685	11	0.4562	11
S10	0.502	8	0.628	8	0.6028	8	0.565	8	0.5272	8
S11	0.694	7	0.676	7	0.6796	7	0.685	7	0.6904	7
S12	0.755	3	0.743	3	0.7454	3	0.749	3	0.7526	3
S13	0.698	5	0.688	6	0.69	5	0.693	5	0.696	5
S14	0.695	6	0.692	5	0.6926	6	0.6935	6	0.6944	6
S15	0.779	1	0.848	1	0.8342	1	0.8135	1	0.7928	1
S16	0.707	4	0.739	4	0.7326	4	0.723	4	0.7134	4
S17	0.762	2	0.754	2	0.7556	2	0.758	2	0.7604	2

3 讨论与结论

蜂胶提取物的国家标准是 GB/T 24283—2018《蜂胶》，该标准中仅用紫外测定总黄酮含量作为品质鉴定的依据，该方法专属性差，且测量值偏高，难以区分蜂胶提取物的质量优劣。《中国药典》2020 版关于蜂胶的含量测定是通过两种 HPLC 分析方法分别测定 CH、GA、PHCA 以及 PI，且供试品制备过程烦琐，梯度洗脱时间达到 80 min^[1]。本研究建立了蜂胶提取物多指标成分的质控模式，能够更加全面地反映样品内在质量。且在实验过程中，对提取方法和色谱条件进行了优化，60 min 内洗脱 14 种活性成分，有效提高了检测效率。

此外，通过 PCA^[26-27]、CA^[28]、PLS-DA^[29-30]对 4 个厂家 17 批样品的含量测定结果进行评价，结果均显示同一个厂家的样品能够聚为一类，不同厂家的样品存在一定差异，DA、IA、QU、GA、AC、PHCA 可能是造成差异的标志性成分，这有利于生产企业提升产品质量控制的方法与手段。此外，本研究应用了熵权-TOPSIS，熵权-RSR 以及两者联合的方法评价不同批次蜂胶提取物质量优劣性，结果显示，不同评价方法获得的结果有小幅波动，但整体趋势一致，S12、S15、S17 质量较优，厂家 D 的质量相对较好。对于质量排序较后的厂家 B 需要从原料的选取，生产工艺等相关环节进行严格控制，从而提升样品质量。本研究将熵值法应用于 TOPSIS 和 RSR，既保留了两者的评价优点，又能一定程度避免传统法中对指标权重进行人为赋权的主观性。TOPSIS 简单方便，可以充分利用原始信息，但是对异常值的干扰较为敏感，而 RSR 可以消除异常值的干扰，但是容易造成信息损失，结合两者，同时通过多种权重系数获得新的评价结果，可以避免单一方法评价的局限性，也能够避免权重系数不同导致的评价结果不一致的情况，从而更加准确的反映不同样品整体变化趋势，为蜂胶提取物的质量控制提供了可靠的依据，也为其他保健食品的质量评价方法建立提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 中国医药科技出版, 2020.
National Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China (PRC) pharmacopoeia I [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Publishing House, 2020.
- [2] 王雨宵, 常相伟, 陈博文, 等. 蜂胶化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国现代中药, 2023, 25(3): 665-685.
WANG YX, CHANG XW, CHEN BW, *et al.* Research progress on chemical composition, pharmacological action and clinical application of propolis [J]. *China Mod Chin Med*, 2023, 25(3): 665-685.
- [3] 黄帅, 张翠平, 胡福良. 2008-2012 年蜂胶化学成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(8): 1146-1153, 1165.
HUANG S, ZHANG CP, HU FL. Research progress of chemical constituents of propolis from 2008 to 2012 [J]. *Res Dev Nat Prod*, 2013, 25(8): 1146-1153, 1165.
- [4] 葛怡青, 汪浅, 全涛. 蜂胶功能成分及生物活性研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(4): 1027-1035.
GE YQ, WANG Q, TONG T. Research progress on functional components and biological activities of propolis [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(4): 1027-1035.
- [5] 罗照明, 董捷, 赵亮亮, 等. 河南蜂胶中多酚类物质成分分析[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 139-143.
LUO ZM, DONG J, ZHAO LL, *et al.* Composition analysis of polyphenols in propolis in Henan [J]. *Food Sci*, 2013, 34(10): 139-143.
- [6] 胡福良. 蜂胶的化学成分、质量控制及生物学活性研究进展[J]. 经济动物学报, 2017, 21(4): 187-196, 200, 184.
HU FL. Research progress on chemical composition, quality control and biological activity of propolis [J]. *J Econ Anim*, 2017, 21(4): 187-196, 200, 184.
- [7] 曹炜, 符军放, 索志荣, 等. 蜂胶与杨树芽提取物成分的比较研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, (7): 162-166.
CAO Y, FU JF, SUO ZR, *et al.* Comparative study on components of propolis and poplar bud extract [J]. *Food Ferment Ind*, 2007, (7): 162-166.
- [8] 张翠平, 杨茂森, 李诗怡, 等. 蜂胶与杨树胶鉴别的研究概况[J]. 蜜蜂杂志, 2014, 34(10): 9-12.
ZHANG CP, YANG MS, LI SY, *et al.* Overview of identification of propolis and poplar gum [J]. *Bee Magaz*, 2014, 34(10): 9-12.
- [9] 牟兰, 曾晞, 王海燕. 荧光光度法测定蜂胶中黄酮[J]. 光谱实验室, 2001, (2): 252-254.
MOU L, ZENG X, WANG HY. Determination of flavonoids in propolis by fluorescence spectrophotometry [J]. *Spectr Lab*, 2001, (2): 252-254.
- [10] 孙圣伟, 何健, 刘美娟, 等. 对比福林酚法和高效液相色谱法测定酒神菊属蜂胶和国产蜂胶中酚酸类化合物含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 269-274.
SUN SW, HE J, LIU MJ, *et al.* Determination of phenolic acids in *Dionysus propolis* and domestic propolis by comparison of Flynn phenol method and HPLC [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(1): 269-274.
- [11] 董玉娟. 保健食品中黄酮类功效成分的 LC-MS 检测技术研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
DONG YJ. Study on LC-MS detection technology of flavonoids in health food [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015.
- [12] 王小平, 林励, 肖凤霞. GC-MS 分析不同产地蜂胶的乙醚提取物[J]. 华西药理学杂志, 2009, 24(4): 383-385.
WANG XP, LIN L, XIAO FX. GC-MS analysis of ether extract of propolis from different habitats [J]. *Huaxi Pharm J*, 2009, 24(4): 383-385.
- [13] 张靖年, 毕晓黎, 胥爱丽, 等. HPLC 法同时测定不同产地酒制蜂胶中 7 种成分含量[J]. 中药材, 2021, 44(1): 121-125.
ZHANG JN, BI XL, XU AIL, *et al.* Simultaneous determination of seven components in propolis made from different places by HPLC [J]. *Chin Herbal Med*, 2021, 44(1): 121-125.
- [14] 张研. 蜂胶中酚类物质分析方法的建立与应用[D]. 秦皇岛: 燕山大学, 2023.
ZHANG Y. Establishment and application of analytical methods for phenolic compounds in propolis [D]. Qinghuangdao: Yanshan University, 2023.

- [15] 杨玲, 刘成浩, 韩萧茜, 等. 对一测多评法测定蜂胶类保健食品中芹菜素等 5 种成分含量的评价研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(1): 229–235, 251
YANG L, LIU CH, HAN XX, *et al.* Study on the evaluation of the content of apigenin and other five components in propolis health food by one test and multiple evaluation method [J]. Food Ind Sci Technol, 2020, 41(01): 229–235, 251.
- [16] DEVI DA, BHAVANI PG. Development and validation of stability indicating UPLC method for the simultaneous estimation of triamterene and hydrochlorothiazide in combined dosage forms using quality by design approach [J]. Fut J Pharm Sci, 2023, 9(1): 28–34.
- [17] LIU ZM, WANG WJ, LIU XL. Automated characterization and identification of microplastics through spectroscopy and chemical imaging in combination with chemometric: Latest developments and future prospects [J]. Trends Anal Chem, 2023, 160: 1–62.
- [18] SEMENIUC CA, MUREȘAN V. Spectroscopic, chromatographic, and chemometric techniques applied in food products characterization [J]. Separations, 2023, 10(1): 1–27.
- [19] HAJIAGHAEI-KESHTELI M, CENK Z, ERDEBILLI B, *et al.* Pythagorean fuzzy TOPSIS method for green supplier selection in the food industry [J]. Expert Syst Appl, 2023, 224: 3–18.
- [20] ZHANG XY, WANG Y, BAO J, *et al.* A research on the evaluation of China's food security under the perspective of sustainable development—based on an entropy weight TOPSIS model [J]. Agriculture, 2022, 12(11): 1926–1926.
- [21] DIPALI Y, GAUTAM D, KUNTAL S. Assessing and ranking international markets based on stringency of food safety measures: Application of fuzzy AHP-TOPSIS method [J]. British Food J, 2023, 125(1): 262–285.
- [22] 王小玲, 彭娟霞, 杨析健, 等. 基于综合指数法和 RSR 法的甘肃省急性弛缓性麻痹病例监测质量评价[J]. 疾病预防控制通报, 2023, 38(5): 5–7, 31.
WANG XL, PENG JX, YANG XJ, *et al.* Quality evaluation of acute flaccid paralysis case monitoring in Gansu Province based on comprehensive index method and RSR method [J]. Dis Prev Control Bull, 2023, 38(5): 5–7, 31.
- [23] 刘磊, 张娜娜, 林志红. 基于秩和比法的 DRG 支付改革后中医医院科室医疗质量现状研究[J]. 中医药管理杂志, 2024, 32(3): 160–163.
LIU L, ZHANG NN, LIN ZH. Research on the current status of medical quality in departments of traditional Chinese medicine hospitals after DRG payment reform based on rank sum ratio method [J]. J Tradit Chin Med Manag, 2024, 32(3): 160–163
- [24] FAN LB, ZHONG XH, CHEN JW, *et al.* Comprehensive energy system evaluation method of low-carbon park based on improved entropy weight [J]. J Phys: Confer Ser, 2023, 2418(1): 105–134.
- [25] SUN QH, XIA JQ, DENG SS, *et al.* A bank erosion risk evaluation procedure based on the analytic hierarchy process and entropy weight method [J]. Arab J Geosci, 2022, 15(24): 55–88.
- [26] UMAR L, ROSANDI VA, SETIADI RN, *et al.* Amperometric microbial biosensor for sugars and sweetener classification using principal component analysis in beverages [J]. J Food Sci Technol, 2022, 60(1): 382–392.
- [27] LARESMICHEL M, HOUSNI FE, AGUILERA CVG, *et al.* The water footprint and nutritional implications of diet change in Mexico: A principal component analysis [J]. Eur J Nutr, 2022, 61(6): 3201–3226.
- [28] ABBAS FM, ALKARKHI NANM, WASIN AA, *et al.* An investigation of food quality and oil stability indices of Muruku by cluster analysis and discriminant analysis [J]. Int J Adv Sci. Eng Inf Technol, 2017, 7(6): 2279–2285.
- [29] SU D, YANG YY, ZENG Q, *et al.* Two species origins comparison of herba patriniae based on their ingredients profile by UPLC-QTOF/MS/MS and orthogonal partial least squares discriminant analysis [J]. Chem Biod, 2022, 19(9): e202100961.
- [30] BASSBASI M, LUCA MD, IOELE G, *et al.* Prediction of the geographical origin of butters by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) applied to infrared spectroscopy (FTIR) data [J]. J Food Compos Anal, 2014, 33(2): 210–215.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



章 越, 硕士, 主要研究方向为中药保健食品研发。

E-mail: 1326372985@qq.com



周丹英, 高级工程师, 主要研究方向为中药保健食品、中药新药研发。

E-mail: 471861007@qq.com