

不同方法萃取蜂胶挥发油组成及抑菌作用的研究

徐 响^{1,2}, 董 捷^{1,2}, 丁小宇¹, 杨佳林¹, 孙丽萍^{1,2,*}

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 农业部国家蜂产品加工专业分中心, 北京 100093)

摘 要: 采用水蒸气蒸馏法和超临界二氧化碳萃取法获得了蜂胶挥发油。GC-MS 分析并鉴定出 50 种化合物, 两种提取方法所得蜂胶挥发油在成分组成上存在显著差异。抑菌实验表明, 两种提取方法获得的挥发油对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌具有很强的抑制作用, 而超临界法萃取的挥发油的抑菌效果强于水蒸气蒸馏法。
关键词: 超临界二氧化碳萃取法; 水蒸气蒸馏法; 蜂胶; 抑菌作用

Propolis Essential Oil Extracted by Different Methods: Chemical Composition Analysis and Antibacterial Activity Evaluation

XU Xiang^{1,2}, DONG Jie^{1,2}, DING Xiao-yu¹, YANG Jia-lin¹, SUN Li-ping^{1,2,*}

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;

2. National Research Center of Bee Product Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100093, China)

Abstract: In this work, propolis essential oil was obtained by steam distillation extraction and supercritical CO₂ extraction, respectively. Added together, 50 components in resulting propolis essential oils were identified by GC-MS method. Propolis essential oils extracted by both methods exhibited strong inhibition effects against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro*. Stronger inhibition effect of propolis essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction on the three species of bacteria than that of propolis essential oil extracted by steam distillation extraction was observed.

Key words: supercritical CO₂ extraction; steam distillation extraction; propolis; antibacterial activity

中图分类号: S896

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)03-0060-04

蜂胶含有大量生物活性物质, 包括黄酮类、酚酸类、醇类、萜烯类和甾醇类化合物等^[1], 是具有良好的保健功能的蜂产品, 具有抗氧化、抗菌消炎、抗衰老、增强免疫力等活性^[2-4]。蜂胶提取物以其良好的保健功能, 成为一种非常有前途的功能食品, 具有广阔的开发前景。目前国内关于蜂胶黄酮类化合物的研究较为广泛^[5], 而对于研究其挥发油提取方法的比较及其抑菌活性的报道较少, 仅赵强等^[6]对蜂胶挥发油的抗氧化活性进行了评价。本研究比较传统的水蒸气蒸馏法与超临界二氧化碳萃取法得到的挥发油在组成和抑菌活性上的差异, 为蜂胶产品的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂胶(为毛胶, 采自安徽芜湖, 胶源植物主要为杨

树) 北京中蜜科技发展有限公司; 乙醇 北京化学试剂有限公司; 二氧化碳(纯度 99.9%) 北京普莱克斯气体有限公司。

供试菌种: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, CICC 编号 10201)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, CICC 编号 10063)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, CICC 编号 20240) 中国微生物菌种保藏中心。

LB 琼脂培养基 北京路桥试剂公司。

1.2 仪器与设备

1L 超临界流体萃取装置(装置的流程图见文献[7]) 江苏南通华安; Agilent7890/5975 气相色谱仪(GC-MS) Agilent 公司; LRH-150 型生化培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; D-1 型高压灭菌锅 北京发恩科贸有限公司; ZY-300IV 型多功能抑菌圈分析仪 北京先驱威锋技

收稿日期: 2009-03-31

基金项目: 农业部现代农业(蜂)产业技术体系建设专项资金项目(NYCYTX-43);

中国农业科学院院本级基本科研业务费项目(0032007222)

作者简介: 徐响(1983—), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为功能食品开发。E-mail: xuxiang5000@yahoo.com.cn

* 通信作者: 孙丽萍(1963—), 女, 副研究员, 硕士, 研究方向为蜂产品化学。E-mail: caasbee@126.com

术开发公司。

1.3 方法

1.3.1 超临界 CO₂ 萃取

将 125g 冷冻的蜂胶粉碎过 20 目筛, 置于萃取釜中, 设定萃取温度 40℃, 分离条件: 分离 I 温度 40℃, 压力 7MPa、分离 II 温度 20℃。从钢瓶中流出的 CO₂ 经净化后进入冷凝箱即液化器冷凝至流体, 经高压计量泵加压至萃取压力 30MPa 后进入萃取釜进行动态萃取, CO₂ 经减压阀进入分离釜, 收集分离釜 I 的萃取物, 萃取物采用文献[6]的方法进行处理得到 1.968g 蜂胶挥发油。

1.3.2 水蒸气蒸馏法

称取 125g 粉碎的蜂胶置于 2000mL 圆底烧瓶中, 加入 1000mL 蒸馏水, 加热保持微沸 10h, 收集蒸馏液, 用无水乙醚多次萃取, 然后经无水硫酸钠脱水过滤, 再将滤液蒸馏浓缩得到 1.427g 挥发油。

1.3.3 GC-MS 分析

样品溶于三氯甲烷中过 0.45 μm 滤膜后进行 GC-MS 分析。色谱条件: 色谱柱为 DB-5MS (30m × 0.32mm, 0.25 μm); 载气: 氦气, 1mL/min; 进样口温度 260℃; 分流进样量: 1 μL; 分流比: 1:20; 柱温升温程序: 初始 50℃, 保持 1min, 以 1.5℃/min 速度升温至 140℃, 保持 1min; 以 7.5℃/min 速度升温至 290℃, 保持 6min。

MS 条件: 电子轰击(EI)离子源; 电子能量 70eV; 离子源温度 230℃; 四极杆温度 150℃; 接口温度 280℃; 扫描范围 m/z 50~550。

1.3.4 抑菌实验

菌种经复苏后在严格无菌的条件下采用牛津杯法^[8]进行抑菌实验(牛津杯外径 8mm), 一定浓度样品溶解于无水乙醇中, 两倍稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)。

2 结果与分析

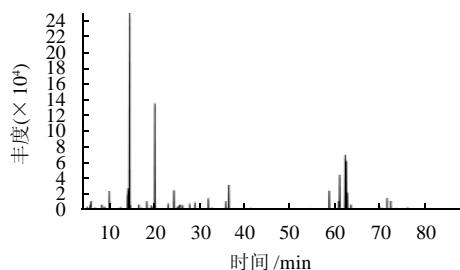


图1 水蒸气法萃取蜂胶挥发油 GC-MS 总离子流图

Fig.1 Total ion current in GC-MS of propolis essential oil extracted by steam distillation extraction

采用 GC-MS 对不同方法萃取得到的蜂胶挥发油进行定性分析, 总离子流图见图 1、2。GC-MS 检出组分经 NIST/WILEY 检索数据库进行检索并根据文献进行谱图解

析, 采用峰面积归一化法计算解析组分的百分含量, 结果见表 1。

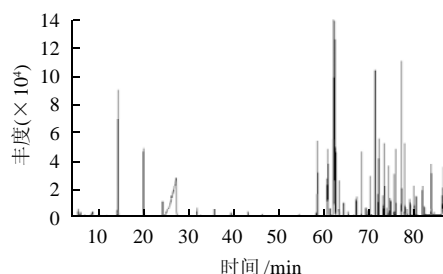


图2 超临界 CO₂ 萃取蜂胶挥发油 GC-MS 总离子流图

Fig.2 Total ion current in GC-MS of propolis essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction

由表 1 可以看出, 水蒸气蒸馏法制备的蜂胶挥发油主要的化学成分为: 二甲基丁酸(2-methyl-butanoic acid)、苯甲醛(benzaldehyde)、柠檬烯(limonene)、桉叶油醇(eucalyptol)、苯甲醇(benzyl alcohol)、苯乙醇(phenylethyl alcohol)、乙酸苯甲酯(acetic acid, phenylmethyl ester)、苯甲酸(benzoic acid)、2-甲氧基-4-乙烯苯酚(2-methoxy-4-vinylphenol)、愈创醇(guaiol)、甘菊环族化合物。超临界 CO₂ 萃取与水蒸气蒸馏法制备的蜂胶挥发油的化学组成不尽相同, 除含有较高含量的苯甲醇、甘菊环族及萘甲醇类化合物、愈创醇等物质外, 还含有癸醛、烃类(十六烷、十九烷、1-二十二烯、二十四烯等)、异香橙烯环氧化物、肉桂酸肉桂酯(cinnamyl cinnamate)等物质。水蒸气蒸馏法提取过程温度较高, 易造成对热不稳定成分的破坏; 而超临界二氧化碳萃取蜂胶时主要萃取出较多的非极性化合物, 如烷烃、肉桂酸肉桂酯等。笔者曾采用固相微萃取 SPME-GC/MS 联用技术分析蜂胶中挥发性成分^[9], 分析出蜂胶中挥发性成分有萜烯类、醇、醛、酮、酯等, 其中甲酸、乙酸、苯甲酸、苯甲醇、乙酸苯乙酯是所测定的蜂胶挥发性成分的主要贡献物质, 说明不同萃取方法得到的蜂胶挥发油成分存在显著差异。巴西蜂胶多来源于酒神菊属等植物, Atungulu 等^[10]采用同时蒸馏法萃取巴西蜂胶, GC-MS 鉴别出 30 多种挥发性成分, 其中主要成分为丙烯、乙酰苯、β-芳樟醇和丁香烯等。可见不同胶源植物来源的蜂胶在挥发油的化学成分上也有着较大不同。

表 2 结果表明, 样品质量浓度在 10mg/mL 时, 两种提取方法所制得挥发油均对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌 3 种菌产生明显的抑菌作用。两种提取方法所制得挥发油对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好, 而超临界二氧化碳萃取法提取的蜂胶挥发油较水蒸气蒸馏法提取的挥发油对金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌的抑菌圈更大。Melliou 等^[11]报道了希腊蜂胶的挥发性

表1 蜂胶挥发油化学组成及其相对百分含量
Table 1 Chemical composition and relative content of propolis essential oil

序号	保留时间 / min	化合物	分子式	相对百分含量/%	
				水蒸气蒸馏法	超临界萃取法
1	5.811	2-methyl-butanoic acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	2.62 ± 0.12	0.44 ± 0.13
2	8.872	2-methyl-2-butanoic acid	C ₅ H ₈ O ₂	1.28 ± 0.10	0.52 ± 0.18
3	9.822	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	1.51 ± 0.13	—
4	11.387	Pentanoic acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	0.17 ± 0.05	—
5	11.993	2-Butenedioic acid (E)-, dimethyl ester	C ₈ H ₈ O ₄	0.11 ± 0.02	—
6	13.847	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	1.43 ± 0.05	—
7	13.963	Eucalyptol	C ₁₀ H ₁₈ O	2.00 ± 0.06	0.11 ± 0.03
8	14.297	Benzyl alcohol	C ₇ H ₈ O	26.78 ± 1.27	4.47 ± 0.97
9	14.534	3,3,5-Trimethyl-cyclohexanone	C ₉ H ₁₆ O	0.47 ± 0.01	—
10	16.388	Acetophenone	C ₈ H ₈ O	0.56 ± 0.01	—
11	18.132	Mequinol	C ₇ H ₈ O ₂	0.77 ± 0.09	—
12	19.478	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	0.23 ± 0.03	—
13	19.905	Phenylethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	14.34 ± 0.18	2.82 ± 0.49
14	22.862	2,3-Dihydro-1H-indenol	C ₉ H ₁₀ O	0.92 ± 0.21	—
15	24.202	Acetic acid, phenylmethyl ester	C ₈ H ₁₀ O ₂	2.39 ± 0.06	0.55 ± 0.10
16	25.49	Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	3.96 ± 0.34	—
17	26.039	a, a, 4-Trimethyl-3-cyclohexene-1-methanol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.48 ± 0.03	6.04 ± 1.48
18	27.638	Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	0.63 ± 0.03	15.00 ± 2.30
19	28.799	4-Methyl-benzaldehyde	C ₈ H ₈ O	0.87 ± 0.07	—
20	31.716	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1.42 ± 0.03	0.38 ± 0.01
21	35.545	3-Phenyl-2-propen-1-ol	C ₈ H ₁₀ O	1.05 ± 0.28	0.30 ± 0.05
22	36.249	2-Methoxy-4-vinylphenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	3.16 ± 0.15	—
23	43.14	Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	0.16 ± 0.03	0.21 ± 0.04
24	49.469	1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, [1R-(1 α, 4 α, 8 α)]-naphthalene	C ₁₅ H ₂₄	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.10
25	58.415	Guaiol	C ₁₅ H ₂₆ O	2.47 ± 0.05	4.03 ± 0.45
26	58.496	[1S-(1 α, 4 α, 7 α)]-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-azulene	C ₁₅ H ₂₄	1.39 ± 0.04	—
27	60.742	1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro- α, α, 4a, 8-tetramethyl-, 2R, cis-2-naphthalenemethanol	C ₁₅ H ₂₆ O	4.03 ± 2.28	2.57 ± 0.29
28	61.955	decahydro- α, α, 4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2 α, 4a α, 8a α)]-2-naphthalenemethanol	C ₁₅ H ₂₆ O	8.73 ± 0.13	12.79 ± 1.42
29	62.192	1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1 α, 3a α, 4 α, 7 α)]-azulene	C ₁₅ H ₂₄	7.39 ± 0.18	11.10 ± 1.25
30	62.407	Isoaromadendrene epoxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1.98 ± 0.13	3.49 ± 0.37
31	69.238	2-Methylbenzyl benzoate	C ₁₅ H ₁₄ O ₂	0.20 ± 0.04	0.20 ± 0.01
32	69.602	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.06 ± 0.04	0.11 ± 0.06
33	70.22	Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	0.08 ± 0.01	0.76 ± 0.07
34	71.3	Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.61 ± 0.08	3.08 ± 0.15
35	71.814	Tetradecanoic acid, ethyl ester	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	—	0.39 ± 0.03
36	73.009	1,4-diphenyl-3-Buten-1-one	C ₁₆ H ₁₄ O	—	0.44 ± 0.11
37	73.327	Nonadecane	C ₁₉ H ₄₀	—	1.23 ± 0.03
38	73.419	2-Nonadecanone	C ₁₉ H ₃₈ O	—	0.59 ± 0.09
39	74.251	(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	—	0.98 ± 0.19
40	74.447	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, 2-phenylethyl ester	C ₁₇ H ₁₆ O ₂	—	0.12 ± 0.04
41	75.475	4-Acetoxyl-3-methoxycinnamic acid	C ₁₇ H ₁₂ O ₅	—	0.89 ± 0.50
42	75.533	1-Docosene	C ₂₂ H ₄₄	—	0.87 ± 0.13
43	75.845	Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	—	1.35 ± 0.31
44	77.081	(E)-1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-2-Propen-1-one	C ₁₈ H ₁₄ O ₄	—	3.97 ± 2.11
45	77.179	Cinnamyl cinnamate	C ₁₈ H ₁₆ O ₂	—	0.83 ± 0.55
46	77.786	10-Heneicosene(c, t)	C ₂₁ H ₄₂	—	1.77 ± 0.60
47	77.855	Oxalic acid, allyl hexadecyl ester	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	—	0.33 ± 0.19
48	79.137	5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl-4H-1-Benzopyran-4-one	C ₁₈ H ₁₂ O ₄	—	0.66 ± 0.82
49	86.085	1,15-Pentadecanediol	C ₁₅ H ₃₂ O ₂	—	1.52 ± 0.32
50	86.397	1-Eicosanol	C ₂₀ H ₄₂ O	—	3.90 ± 0.34

成分具有良好的抗细菌和真菌的功效，其抑菌活性可能与主要成分 α -蒎烯有关。超临界萃取法和水蒸气蒸馏法萃取的蜂胶挥发油中均含有大量的抑菌成分如苯甲醇、苯甲酸、甘菊环族及萘甲醇类化合物等，它们可能是挥发油中产生抑菌效果的主要物质。

表2 不同方法所制得蜂胶挥发油对细菌的抑制作用

Table 2 Inhibition effects of propolis essential oils obtained by different extraction methods against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*

项目	抑菌圈直径/cm		
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌
水蒸气蒸馏法所得蜂胶挥发油	12.02	13.5	8.8
超临界萃取法所得蜂胶挥发油	19.84	15.16	8.8
空白	8.0	8.0	8.0

表3 不同方法所制得蜂胶挥发油最小抑菌浓度结果

Table 3 Minimum inhibitory concentrations (MIC) of propolis essential oils obtained by different extraction methods against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*

蜂胶挥发油质量浓度/(mg/mL)	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌
40	—	—	—
20	—	—	—
10	+	—	+
5	++	+	++
2.5	++	++	++
10	—	—	—
5	—	—	+
2.5	—	—	++
1.25	—	—	++
0.625	+	+	++

注：++，大量菌生长；+，少量菌生长；—，无菌生长。

由表3可知，当超临界法萃取的挥发油质量浓度超过1.25mg/mL时，金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的生长开始受到抑制；铜绿假单胞菌的最小抑菌浓度为10mg/mL。而水蒸气蒸馏法的抑制效果不及超临界萃取法，不同细菌的最小抑菌浓度均大于超临界法萃取得到的挥发油。

3 结论

本研究采用水蒸气蒸馏和超临界CO₂萃取法获得了蜂胶挥发油。水蒸气蒸馏法制备的蜂胶挥发油主要的化学成分为：二甲基丁酸、苯甲醛、柠檬烯、桉叶油醇、苯甲醇、苯乙醇、乙酸苯甲酯、苯甲酸、2-甲氧基-4-乙烯苯酚、愈创醇、甘菊环族化合物，而超临界CO₂制备的蜂胶挥发油苯甲醇、甘菊环族及萘甲醇类化合物、愈创醇、癸醛、部分烃类、异香橙烯环氧化物、肉桂酸肉桂酯等。抑菌实验表明，两种萃取方法得到的挥发油对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、

铜绿假单胞菌具有抑制作用。最小抑菌浓度测定结果表明,超临界法萃取的挥发油的抑制效果强于水蒸气蒸馏法。

参考文献:

- [1] 王亚群,任永新.蜂胶的化学成分及其保健作用[J].食品与药品,2006,8(12):75-76.
- [2] 刘青云,徐先祥.蜂胶的药理作用研究进展[J].安徽医药,2007,11(1):1-3.
- [3] USIA T, BANSKOTA A H, TEZUKA Y, et al. Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities[J]. Journal of Natural Products, 2002, 65(5): 673-676.
- [4] AHN M R, KUMAZAWA S, USUI Y, et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China[J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1383-1392.
- [5] 徐响,张红城,董捷.蜂胶功效成分研究进展[J].食品工业科技,2008,29(9):286-289.
- [6] 赵强,张彬,李岂凡,等.蜂胶挥发油抗氧化性能及其成分研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(1):82-86.
- [7] XU Xiang, SUN Liping, DONG Jie, et al. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10(1): 42-46.
- [8] 焦翔,殷丽君,程永强.沙棘叶黄酮的提取及抑菌作用研究[J].食品科学,2007,28(8):124-129.
- [9] 徐响,董捷,李洁.固相微萃取与GC-MS法分析蜂胶中挥发性成分[J].食品工业科技,2008,29(5):57-60.
- [10] ATUNGULU G, MIURA M, ATUNGULU E, et al. Activity of gaseous phase steam distilled propolis extracts on peroxidation and hydrolysis of rice lipids[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(3): 850-858.
- [11] MELLIOU E, STRATIS E, CHINOI I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece-Antimicrobial activity[J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 375-380.