

不同季节中国蜂胶醇提物的化学成分及生物活性

郭夏丽¹, 罗丽萍^{1,*}, 徐元君¹, 陈 滨¹, 付宇新²

(1.南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 330031; 2.江西省林业科学院, 江西 南昌 330032)

摘 要: 季节是影响蜂胶化学组成和生物活性的生态因子之一。为了解季节对蜂胶品质的影响, 以分别来自温带、亚热带和热带地区的不同季节中国蜂胶为材料, 采用分光光度法测定其色度、特定吸收率 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) 以及总酚、总黄酮、黄酮-黄酮醇和黄烷酮的含量; 并测定蜂胶醇提物的抗氧化及抑菌活性。实验结果相关性分析表明: 季节对中国蜂胶醇提物(ethanol extract of propolis, EEP)的化学组成有显著影响, 中国 EEP 中总酚、总黄酮、黄酮-黄酮醇和黄烷酮的含量均在 7~8 月为最高, 9 月份化学成分含量大多最低, 说明其品质在 8 月总体最好, 而 9 月份, 中国蜂胶品质最差。不同季节 EEP 的总酚和总黄酮含量差异极显著, 总酚最大值为 $(243.87 \pm 152.13)\text{mg/g}$, 最小值为 $(187.25 \pm 146.45)\text{mg/g}$, 总黄酮最大值为 $(189.34 \pm 107.51)\text{mg/g}$, 最小值为 $(122 \pm 81.02)\text{mg/g}$; 且季节对 EEP 的抗氧化活性也有显著影响; EEP 的 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 值与清除 DPPH 自由基活性和总酚、总黄酮的含量有显著正相关性。而季节对中国 EEP 的抑菌性没有显著影响。因此, 季节对中国蜂胶品质有较大影响。

关键词: 蜂胶; 醇提物; 季节; 化学组成; 生物活性

Chemical Components and Biological Activity of Chinese Propolis from Different Seasons

GUO Xia-li¹, LUO Li-ping^{1,*}, XU Yuan-jun¹, CHEN Bin¹, FU Yu-xin²

(1.School of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China;

2.Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330032, China)

Abstract: In order to explore the effect of season on the quality of propolis, propolis samples harvested in different seasons from temperate, subtropical and tropical regions in China were extracted with 60% aqueous ethanol, and the color intensity, total phenol content, total flavonoid content, flavonol content, flavanone content and specific absorbance constant of ethanol extract of propolis (EEP) obtained were spectrometrically determined. Meanwhile, the antioxidant activity and antibacterial activity of EEP were also evaluated. The results showed that harvest season had a significant effect on the chemical composition of EEP. The contents of total phenol, total flavonoids, flavonol and flavanone revealed the highest level in the propolis harvested in June and July and the lowest level in September, which suggested that the best quality of Chinese propolis is in August. Moreover, an obvious difference in the contents of total phenol and total flavonoids in EEP from different seasons was observed. The highest levels of total phenol and total flavonoids were $(243.87 \pm 152.13)\text{mg/g}$ and $(189.34 \pm 107.51)\text{mg/g}$, respectively; in contrast, the lowest levels of both components were $(187.25 \pm 146.45)\text{mg/g}$ and $(122 \pm 81.02)\text{mg/g}$, respectively. Furthermore, propolis from temperate zones in China had the best antioxidant activity, which was followed by propolis from sub-tropical zones and tropical zones. An obvious correlation between specific absorbance constant and DPPH radical scavenging capacity, total phenol content or total flavonoid content was observed. Therefore, harvest season exhibits a great impact on the quality of propolis.

Key words: propolis; ethanol extract of propolis (EEP); season; chemical composition; biological activity

中图分类号: S896.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0141-06

收稿日期: 2010-11-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30700105; 31071551); 江西省青年科学家(井冈之星)培养计划资助项目(S00590)

作者简介: 郭夏丽(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物资源开发与利用。E-mail: guoxiali2520@sina.com

* 通信作者: 罗丽萍(1972—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食物资源(含生物物质)开发与利用。E-mail: lluo2@126.com

蜂胶是蜜蜂将采集的植物幼芽和愈伤组织分泌的树脂状物质与自身的消化腺和蜡腺的分泌物(如蜂蜡及多种消化酶)混合之后形成的一种具有黏性的天然混合物^[1]。其中,树脂类(包括类黄酮、相关的酚酸以及多酚成分)占蜂胶的50%~55%、挥发油和芳香油占10%、蜂蜡占30%~40%、以及5%~10%的花粉及矿物质和维生素等物质^[2]。蜂胶是重要的蜂产品之一,在西方作为民间药物被广泛使用,并一直受到欧洲研究学者的重视^[3]。蜂胶具有显著的抗菌性、抗氧化性、抗病毒性、抗炎症、抗癌性等生物学活性^[4-9],这些生物活性与其特有的化学组成,尤其是富含多酚类化合物(黄酮类、酚酸及其酯类)有密切关系^[10-11]。故蜂胶的化学组成和生物活性及二者之间关系一直是研究热点。

蜂胶的化学组成及生物活性具有多样性,受到胶源植物、季节、土壤、气候、蜂种等因子的影响^[12]。对于胶源植物影响的研究较为深入,而季节的影响并不能确定。Sforcin等^[13]和Bankova等^[14]认为季节对蜂胶化学成分的影响不显著。Sforcin等^[15]研究发现不同季节的蜂胶提取物抑菌水平差异不明显,这可能因为他们采集自同一个地理区域,植物区系相同。但是,Bankova等^[14]研究在不同季节采用两种蜂种采集蜂胶,结果发现秋季蜂胶中二萜类含量丰富,且在所有蜂胶中,二萜类在夏季出现,在秋天达到最大值,但是在其他季节不存在,说明季节对蜂胶的成分有一定影响。Chen等^[16]研究发现季节是影响台湾蜂胶主要酚类成分的主要影响因素。目前,关于季节对中国蜂胶的影响的研究还很少。但已有研究表明,季节对蜂胶有较大影响,但报道不多,存在需要明确的问题,如不同气候带,季节影响是否存在差异。

为系统地了解季节对中国EEP的化学组成及生物活性的影响,本实验分别从中国的温带地区、亚热带地区和热带地区采集了不同季节的蜂胶原胶,测定其化学组成、总抗氧化能力和清除DPPH自由基活性,及对5种细菌和4种真菌的抑菌活性,旨在了解季节对中国蜂胶品质的影响,为中国蜂胶的研究提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、菌种与试剂

蜂胶样品为原胶。采集于山东济宁、湖北随州和海南海口固定养蜂的养蜂厂内,采集时间为6、7、8、9月的中旬,每月采一次,按气候依次为中国温带、亚热带和热带地区。采集后的原胶置于-18℃冷冻,待其变硬变脆后,用木锤敲打砸成小碎块,去除杂质,用药材粉碎机粉碎后过14目筛,于-18℃保存备用。

菌种:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、产气杆菌(*Clostridium*

perfringens);大肠杆菌(*Escherichia coli*)、变形杆菌(*Potensbacillus vulgaris*);青霉(*Penicillium glaucum*)、曲霉(*Aspergillus niger*)、毛霉(*Mucor racemosus*)、根霉(*Rhizopus nigricans*)。

培养基:肉汤培养基、真菌培养基。

DPPH 美国Sigma公司;槲皮素、柚皮素 中国固体制剂制造技术国家工程研究中心;没食子酸 中国药品生物制品检定所(北京);芦丁 中国医药上海化学试剂公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

KQ3200DE型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;JA1003电子天平(感量0.0001g) 上海精密科学仪器有限公司;GZX-DH-50-55-s电热恒温干燥箱 上海跃进医疗器械厂;UV-1700pharmaSpec紫外-可见分光光度计 日本Shimadzu公司;7200可见分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 蜂胶醇提取物(ethanol extract of propolis, EEP)制备

取1.000g蜂胶粉末,用60%乙醇溶液按固液比1:20,在35℃提取4h后过滤,滤液于50℃真空减压旋转蒸发至干,得到EEP,置于-18℃中保存备用。使用时,根据需要配制成20mg/mL的EEP溶液。

1.3.2 化学成分的测定

1.3.2.1 色度的测定^[17]

将EEP用甲醇复溶,配制成4mg/mL的工作液,在450nm波长处测定其吸光度。色度值以吸光度计。

1.3.2.2 特定吸收率 $E_{1cm}^{1\%}$ 的测定^[18]

将EEP以无水乙醇复溶,配制成0.01mg/mL工作液,用1cm比色杯,在190~400nm范围内进行扫描,确定其紫外最大吸收波长,记录该波长下的吸光度。按式(1)计算特定吸收率。

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{A}{L \times c} \times 100 \quad (1)$$

式中: $E_{1cm}^{1\%}$ 为特定吸收率/(mL/(cm·g));A为吸光度;L为透光距离/cm;c为被测物质量浓度/(g/mL)。

1.3.2.3 总酚、总黄酮含量测定

总酚含量的测定:准确吸取EEP 20μL于25mL容量瓶中,加入3mL福林试剂,再加入2mL 200g/L的碳酸钠水溶液,混匀后用蒸馏水定容至刻度,在70℃水浴15min,室温冷却后,于760nm波长处,测定吸光度。以没食子酸作标准曲线,结果以mg/g没食子酸表示^[19]。

总黄酮含量的测定:准确吸取EEP 50μL于25mL容量瓶中,加入无水乙醇至10mL,再分别加入100g/L氯化铝水溶液0.5mL,混匀后用蒸馏水定容至刻度,室温

静置 15min 后, 于 415nm 波长处, 测定吸光度。以芦丁作标准曲线, 结果用 mg/g 芦丁表示^[20]。

1.3.2.4 黄酮-黄酮醇、黄烷酮含量测定^[21]

黄酮-黄酮醇含量的测定: 准确吸取 20mg/mL EEP 100 μ L 于 25mL 容量瓶中, 加入 95% 乙醇至 4mL, 再分别加入 100g/L 氯化铝水溶液 2.5mL, 及 1mol/L 醋酸钾水溶液 2.5mL。混匀后用蒸馏水定容至刻度, 室温静置 15min 后, 于 415nm 波长处, 以 50g/L 氯化铝空白溶液作对照, 测定吸光度。以槲皮素作标准曲线, 结果用 mg/g 槲皮素表示。

黄烷酮含量的测定: 准确吸取 20mg/mL EEP 溶液 1mL 置于试管中, 加入 2mL 甲醇, 再加入 2mL 1% 的 DNPH- 硫酸溶液, 混匀后于 50℃ 水浴 1h。室温冷却后, 加入 5mL 1% 氢氧化钾溶液, 摇匀, 静置。取上清液 1mL 于 25mL 容量瓶。以甲醇定容至刻度, 于 495nm 波长处, 测定吸光度。以柚皮素作标准曲线, 结果用 mg/g 柚皮素表示。

1.3.3 抗氧化性的测定

1.3.3.1 总抗氧化性的测定

参照 Atmani 等^[22]的实验方法, 将 20mg/mL EEP 用甲醇稀释成 25、50、100、200、400 μ g/mL 溶液。分别吸取 1mL 各质量浓度样液加入 2.5mL PBS 缓冲液, 再加入 2.5mL 铁氰化钾溶液; 50℃ 水浴 20min 后, 加入 2.5mL 三氯乙酸, 摇匀后, 取 7.5mL 样液, 加入同体积双蒸水, 再加入 1.5mL 氯化铁溶液。摇匀, 静置 10min, 于 700nm 波长处测定吸光度。以芦丁作为阳性对照。EEP 总抗氧化能力以 EEP 质量浓度-吸光度线性回归方程斜率 k 表示。

1.3.3.2 对 DPPH 自由基的清除能力测定^[23]

将 20mg/mL EEP 用甲醇稀释成 100、200、300、400、500、600 μ g/mL 溶液。分别取各质量浓度样液 0.1mL, 加入 3.9mL 0.1~0.2mmol/L DPPH 自由基甲醇溶液 (现配现用), 以 0.1mL 甲醇作空白。室温黑暗条件下静置 90min 后, 于 517nm 波长处测其吸光度。

$$\text{自由基清除率} \% = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 为空白样品的吸光度; A_s 为不同质量浓度的被测混合物的吸光度。

用抗氧化活性指数(AAI) 来直接评价 EEP 对 DPPH 自由基的清除能力。当 $AAI < 0.5$ 时, 说明 EEP 清除 DPPH 自由基活性不强, $0.5 < AAI < 1.0$ 时, 活性适中, $1.0 < AAI < 2.0$ 时, 活性较强, 当 $AAI > 2.0$ 时, 则说明其活性很强。

$$AAI = \frac{\rho_{[\text{DPPH 自由基}]e}}{IC_{50}} \quad (3)$$

式中: $\rho_{[\text{DPPH 自由基}]e}$ 为 DPPH 自由基终质量浓度 / (μ g/mL); IC_{50} 为 50% 抑制率时样品质量浓度 / (μ g/mL)。可通过自由基清除活性-样品质量浓度的线性关系求出。

1.3.4 抑菌活性的测定

1.3.4.1 抑菌圈的测定^[24]

采用琼脂稀释法测定抑菌圈。配制菌悬液, 用 5.0 麦氏比浊法校正, 使菌悬液浓度为 1.5×10^8 个/mL 菌液。将 200 μ L 的测试菌种悬浊液加入到固体培养基上, 细菌使用肉汤培养基, 真菌使用真菌培养基, 抹平。取无菌滤纸圆片 ($d=5.5\text{mm}$), 加 7 μ L EEP (质量浓度为 20mg/mL) 后, 均匀贴在上述培养基上。在 37℃ 恒温培养箱内培养, 细菌倒置培养 24h, 真菌培养 48h, 然后测量并记录抑菌圈直径, 每个菌种重复 3 次。

1.3.4.2 最小抑菌质量浓度的测定^[25]

将 EEP 母液 (质量浓度为 20mg/mL) 稀释成不同质量浓度, 加于含有等量菌悬浊液的 96 孔的平板内, 混合均匀, 然后将平板放在 37℃ 恒温培养箱内培养, 细菌培养 24h, 真菌培养 48h, 观察实验菌生长情况, 以不长菌的最小 EEP 质量浓度 (mg/mL) 为最小抑菌质量浓度。

2 结果与分析

2.1 EEP 的理化特性及主要化学组成测定结果

2.1.1 不同季节不同地理位置 EEP 色度、特定吸收值和化学成分含量的测定结果

由表 1 可知, 海南 EEP 总酚、总黄酮、黄酮-黄酮醇和黄烷酮含量均在 7 月最高, 9 月含量最低; 湖北 EEP 总酚含量在 8 月达到峰值, 9 月含量最低, 总黄酮在 7 月达到峰值, 6、9 月含量很低, 黄酮-黄酮醇含量在 9 月含量最高, 7 月最低, 且各成分中, 黄烷酮含量最低; 山东 EEP 总酚、总黄酮、黄酮-黄酮醇含量均在 8 月达到峰值, 9 月各含量均最低。总体表现说明 8 月所采集蜂胶质量最好, 而在 9 月质量有所下降。同时, 分别对三地 EEP 主要化学组成进行方差分析得出, 海南、湖北和山东蜂胶均在一定程度上受到季节的影响。

2.1.2 不同季节 EEP 的化学组成测定结果

将各地蜂胶按月份归类, 计算 EEP 中总酚、总黄酮、黄酮-黄酮醇和黄烷酮含量, 并进行显著性分析 (表 2)。总酚和黄酮-黄酮醇含量在 8 月最高, 而在 9 月最低; 总黄酮和黄烷酮最大值出现在 7 月, 6 月和 9 月含量较低。不同月份 EEP 的总酚、总黄酮含量差异较大, 而黄酮-黄酮醇和黄烷酮含量差异较小。总酚、总黄酮是 EEP 的主要有效成分, 故蜜蜂在 7、8 月所产蜂胶品质较好, 而在 6、9 月较差。经显著性分析, 结果表明, 季节对中国 EEP 理化特性和主要化学组成具有显著影响。

表1 不同季节不同地理位置 EEP 色度、特定吸收值和化学成分含量

Table 1 Color intensity, specific absorbance constant and chemical composition of EEP from different seasons and geographic areas

来源	色度	特定吸收值		总酚含量/(mg/g)	总黄酮含量/(mg/g)	黄酮-黄酮醇含量/(mg/g)	黄烷酮含量/(mg/g)
		特定吸收率/ (mL/(cm·g))	UV _{max} /nm				
海南	6月	0.465	23.9	269.0	60.72 ± 20.71 ^a	48.56 ± 22.74 ^{ab}	39.95 ± 7.18 ^a
	7月	0.797	52.4	288.0	105.76 ± 5.15 ^b	67.28 ± 14.82 ^a	43.40 ± 11.56 ^a
	8月	1.330	39.5	285.0	72.30 ± 0.20 ^a	54.00 ± 0.78 ^{ab}	43.31 ± 0.51 ^a
	9月	0.785	18.5	268.5	25.56 ± 0.17 ^c	25.76 ± 5.09 ^b	27.50 ± 0.11 ^b
湖北	6月	0.231	153.0	291.5	347.98 ± 4.43 ^{de}	211.60 ± 6.87 ^c	96.91 ± 0.13 ^c
	7月	0.303	168.8	292.0	333.63 ± 0.30 ^d	230.71 ± 3.52 ^{ef}	89.26 ± 0.81 ^c
	8月	0.248	185.6	291.5	362.33 ± 1.31 ^e	222.37 ± 3.64 ^{ef}	96.91 ± 1.16 ^c
	9月	0.239	166.8	292.0	310.98 ± 1.67 ^f	216.45 ± 1.23 ^{ef}	103.36 ± 0.78 ^c
山东	6月	0.585	116.1	291.5	270.00 ± 1.31 ^g	108.51 ± 1.23 ^d	116.01 ± 1.43 ^d
	7月	0.323	193.8	292.0	260.66 ± 1.30 ^g	270.01 ± 1.23 ^c	118.26 ± 0.38 ^d
	8月	0.352	164.7	291.5	296.97 ± 0.29 ^f	282.93 ± 1.23 ^c	132.86 ± 0.87 ^c
	9月	0.350	143.7	291.0	225.21 ± 1.67 ^h	244.17 ± 1.23 ^f	102.86 ± 0.73 ^c

注：同列字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

表2 不同季节 EEP 的总酚、总黄酮、黄酮-黄酮醇和黄烷酮含量

Table 2 Contents of total phenol, total flavonoids, flavonol and flavanone in EEP from different seasons

时间	总酚含量/ (mg/g)	总黄酮含量/ (mg/g)	黄酮-黄酮醇含量/ (mg/g)	黄烷酮含量/ (mg/g)
6月	226.23 ± 148.55 ^b	122.00 ± 81.02 ^c	84.29 ± 39.57 ^b	23.89 ± 11.13 ^b
7月	233.35 ± 116.36 ^a	189.34 ± 107.51 ^a	83.64 ± 37.75 ^b	26.28 ± 6.29 ^a
8月	243.87 ± 152.13 ^a	186.43 ± 118.62 ^a	91.03 ± 45.07 ^a	25.50 ± 7.20 ^a
9月	187.25 ± 146.45 ^c	163.03 ± 117.36 ^b	77.91 ± 43.65 ^c	21.89 ± 6.43 ^b

2.1.3 不同地理位置 EEP 的化学组成测定结果

将各地蜂胶按照地理位置分类,计算 EEP 总酚、总黄酮、黄酮-黄酮醇和黄烷酮含量,并进行显著性分析(表3)。其中,热带 EEP 的总酚和总黄酮含量是亚热带和温带地区 EEP 的 1/6~1/4,可见其差异极显著,而黄酮-黄酮醇含量差异较小。经显著性分析,结果表明地理位置对 EEP 化学成分有显著影响,特别是热带地区 EEP 与亚热带和温带地区 EEP 存在很大的差异。

表3 不同地理位置 EEP 的总酚、总黄酮、黄酮-黄酮醇和黄烷酮含量

Table 3 Contents of total phenol, total flavonoids, flavonol and flavanone in EEP from different geographic areas

地理位置	总酚含量/ (mg/g)	总黄酮含量/ (mg/g)	黄酮-黄酮醇含量/ (mg/g)	黄烷酮含量/ (mg/g)
热带	73.54 ± 26.35 ^c	56.17 ± 21.21 ^b	40.06 ± 9.50 ^b	20.34 ± 5.12 ^b
亚热带	338.73 ± 19.92 ^a	219.61 ± 8.70 ^a	96.61 ± 5.26 ^a	20.48 ± 2.88 ^b
温带	263.21 ± 26.84 ^b	226.41 ± 72.58 ^a	117.50 ± 11.14 ^a	32.85 ± 3.44 ^a

由于地理位置的差异,导致气候带和植被的不同,进而导致了蜂胶化学成分的差异。Bankova 等^[26]研究表明,不同季节的巴西蜂胶化学成分之间存在差异,随

着一些活性成分的减少(例如酚酸),另一些活性成分会增加(例如二萜类酸),并认为蜂胶化学成分的不同是因为蜜蜂在不同的季节会选择不同的植物种类作为胶源植物。

2.2 EEP 的总抗氧化能力和清除 DPPH 自由基活性

EEP 总抗氧化能力及清除 DPPH 自由基活性指数(AAI)见表4。根据 Atman 等^[22]所述,抗氧化活性与吸收值之间呈递增关系。EEP 总抗氧化能力表现为:山东>湖北>海南。同一地理位置不同季节 EEP 之间的总抗氧化能力差异不大,且海南、湖北 EEP 均在7月达到最大值,而在9月最小。

利用 SPSS 软件分别对海南、湖北和山东 EEP 抗氧化活性与其化学组成进行相关性分析,结果得出海南 EEP 总抗氧化能力、清除 DPPH 自由基活性和 $E_{1cm}^{1\%}$ 两两之间相关极显著($P < 0.01$),而这三个变量在湖北、山东 EEP 中,除 $E_{1cm}^{1\%}$ 和清除 DPPH 自由基活性之间极显著($P < 0.01$)之外,其他则呈现不显著关系,同时季节对海南、湖北和山东 EEP 的总酚、总黄酮含量影响均显著($P < 0.05$),且海南、湖北 EEP 的总酚、总黄酮及山东的总黄酮含量与清除 DPPH 自由基活性和 $E_{1cm}^{1\%}$ 相关性显著($P < 0.05$),而山东 EEP 的总酚含量与其则呈现不显著相关性。

综合以上季节对中国 EEP 抗氧化活性的影响结果,可以得出,季节对中国 EEP 抗氧化活性影响显著,同时 EEP 的 $E_{1cm}^{1\%}$ 值均与清除 DPPH 自由基活性相关性极显著($P < 0.01$),而 $E_{1cm}^{1\%}$ 值也与总酚、总黄酮含量的相关性显著($P < 0.05$)著,所以测定 EEP $E_{1cm}^{1\%}$ 值也能快速测定其清除 DPPH 自由基活性。

表4 不同季节不同地理位置EEP总抗氧化能力及清除DPPH自由基活性

Table 4 Total antioxidant activity and DPPH radical scavenging capacity of EEP from different seasons and geographic areas

来源		总抗氧化能力		清除自由基能力	
		校正曲线	斜率 k	校正曲线	清除指数 AAI
海南	6 月	$y = 0.3241x - 0.0155$	0.3214	$y = 3.8753x - 16.9300$	0.24
	7 月	$y = 0.5082x + 0.0309$	0.5082	$y = 1.8265x - 13.3340$	0.55
	8 月	$y = 0.4398x - 0.0572$	0.4398	$y = 2.641x - 13.8320$	0.36
	9 月	$y = 0.3217x - 0.0553$	0.3217	$y = 3.5907x - 15.3700$	0.26
湖北	6 月	$y = 1.3574x + 0.0619$	1.3574	$y = 0.4916x - 3.2163$	2.00
	7 月	$y = 1.4754x + 0.0687$	1.4754	$y = 0.4220x - 1.8241$	2.22
	8 月	$y = 1.3849x + 0.0753$	1.3849	$y = 0.3929x - 2.3482$	2.47
	9 月	$y = 1.3276x + 0.0526$	1.3276	$y = 0.5141x - 4.0748$	1.97
山东	6 月	$y = 2.5785x + 0.2281$	2.5785	$y = 0.2155x - 1.0156$	4.61
	7 月	$y = 2.2852x + 0.2460$	2.2852	$y = 0.1748x - 0.5704$	5.51
	8 月	$y = 2.6274x + 0.2460$	2.6274	$y = 0.1749x - 0.4347$	5.41
	9 月	$y = 2.2810x + 0.2633$	2.2810	$y = 0.1796x - 0.2854$	5.18
芦丁			4.3400	$y = 4.3400x + 0.0097$	6.36

表5 不同季节不同地理位置EEP的抑菌圈及最小抑菌质量浓度

Table 5 Inhibition zones (mm) and MIC (mg/mL) of EEP from different seasons and geographic areas

										mm
样本		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>M. racemosus</i>	<i>P. glaucum</i>	<i>A. niger</i>	<i>R. nigricans</i>
海南	6月	7.68±0.42(9)	7.45±0.39(9)	9.52±0.06(7)	9.10±1.57(7)	7.48±0.60(9)	10.73±0.51(6)	17.35±0.93(5)	8.39±0.96(7)	8.78±0.25(9)
	7月	7.91±0.22(9)	7.47±0.09(9)	8.40±0.61(8)	8.53±0.79(8)	8.35±0.34(9)	9.23±0.65(7)	20.62±1.18(4)	12.02±0.66(4)	11.32±0.97(7)
	8月	7.09±0.19(10)	8.17±0.72(8)	9.17±0.26(8)	9.17±0.10(8)	7.30±0.58(10)	11.04±0.25(4)	15.38±1.98(6)	8.22±0.19(8)	10.11±0.25(7)
	9月	9.99±1.10(9)	7.80±0.50(9)	8.61±0.52(6)	13.17±0.77(5)	6.57±0.20(8)	12.08±0.50(2)	13.20±0.99(7)	9.76±0.08(8)	9.48±0.26(9)
湖北	6月	9.80±1.00(7)	9.77±0.81(5)	11.34±0.60(6)	10.34±0.34(7)	7.41±0.28(9)	10.15±0.22(5)	14.91±3.46(6)	8.25±0.67(8)	20.74±1.54(2)
	7月	11.54±1.06(6)	9.12±0.73(5)	9.82±0.69(7)	8.95±0.50(8)	9.91±0.25(8)	9.69±0.30(7)	13.08±0.77(7)	6.80±0.21(10)	19.17±0.95(3)
	8月	12.56±0.31(5)	8.64±0.19(8)	8.60±1.50(8)	9.83±0.95(7)	12.06±0.70(6)	10.61±0.41(6)	30.53±2.82(1)	11.43±0.58(5)	13.76±0.29(5)
	9月	11.39±0.22(6)	10.55±0.87(3)	9.28±0.27(8)	9.24±0.52(7)	7.26±0.08(9)	9.74±0.22(7)	18.23±1.34(5)	10.54±0.39(7)	18.07±0.59(3)
山东	6月	12.25±0.38(7)	9.28±0.85(7)	9.18±0.19(5)	9.19±0.04(8)	7.73±0.53(10)	9.10±0.09(8)	9.64±0.67(9)	10.48±0.57(5)	10.29±0.38(7)
	7月	14.83±1.80(4)	11.53±1.49(2)	9.28±0.41(6)	12.05±0.95(6)	10.00±1.45(7)	9.34±0.63(8)	18.68±1.92(4)	9.97±0.37(7)	15.16±0.40(4)
	8月	13.31±0.27(6)	10.86±0.84(3)	11.42±0.18(4)	10.94±0.55(7)	9.38±0.72(8)	12.42±0.09(5)	12.17±1.51(7)	9.63±0.83(7)	20.05±2.60(2)
	9月	12.23±0.42(5)	10.24±0.35(4)	10.82±0.42(5)	11.54±1.78(7)	8.48±1.38(8)	10.85±0.48(7)	17.96±0.98(5)	12.60±2.45(6)	13.86±1.73(6)

注: ()中数值为最小抑菌质量浓度(mg/mL)。

2.3 EEP的抑菌实验结果

不同季节不同地理位置中国EEP(质量浓度为20mg/mL)对9个菌种的抑菌性测定结果见表5。

由表5可知,中国三地不同季节EEP对G⁺和G⁻菌的抑菌性没有显著差异,而对真菌的抑菌性较强,其中对青霉和根霉的抑菌性远强于其他菌种;而不同地理位置EEP对G⁺菌的抑制作用有显著差异,而对G⁻菌的影响不显著,但热带EEP对真菌的抑菌性明显好于其他菌种,亚热带对真菌的抑菌性最好,温带EEP较弱。

将季节和地理位置EEP对9个菌种的抑菌圈直径和最小抑菌质量浓度结果进行相关性分析,结果均表明这两者呈负相关性显著,即抑菌圈越大,最小抑菌质量浓度越小,抑菌活性越强。同一地理位置不同季节EEP的抑菌结果没有显著性差异。所以本实验表明,季节和地理位置对EEP的抑菌性没有显著影响。Sforcin等^[15]

研究表明,巴西EEP对G⁺菌的抑菌性强于对阴性菌,但不同季节的抑菌性没有显著差异。

3 结 论

季节是影响蜂胶化学组成和生物活性的生态因子之一,实验测定了不同季节中国EEP的化学组成、抗氧化性及抑菌性,并利用方差分析对热带、亚热带和温带EEP的主要化学组成进行分析,所得结果均表明EEP在一定程度上受到季节的影响,而季节对中国EEP的抑菌性没有显著影响。

参考文献:

- [1] KUMAZAWA S, HAMASAKA T, NAKAYAMA T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins[J]. Food Chemistry, 2004, 84(3): 329-339.
- [2] BURDOCK G A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)[J]. Food and Chemical Toxicology, 1998, 36(4):

- 347-363.
- [3] BANKOVA V S, de CASTRO S L, MARCUCCI M C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin[J]. *Apidologie*, 2000, 31(1): 3-15.
- [4] ABD EI HADY F K, HEGAZI A G. Egyptian propolis: 2. chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis[J]. *Zeitschrift Fur Naturfor Schung C-A Journal of Biosciences*, 2002, 57(3/4): 386-394.
- [5] ISLA M I, NIEVA MORENO M I, SAMPIETRO A R, et al. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts[J]. *Ethnopharmacol*, 2001, 76(2): 165-170.
- [6] KORU O, TOKSOY F, ACIKEL C H, et al. *in vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens[J]. *Anaerobe*, 2007, 13(3/4): 140-145.
- [7] BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S, et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis[J]. *Fitoterapia*, 1999, 70(2): 190-193.
- [8] GREGORY A G, TOSHITAKA U, FUMIHIKO T, et al. Effect of vapors from fractionated samples of propolis on microbial and oxidation damage of rice during storage[J]. *Journal of Food Engineering*, 2008, 88(3): 341-352.
- [9] LUO Liping, LI Yan, XU Yuanjun, et al. Chemical compositions and antioxidant activities of ethanol extract of Chinese propolis[C]. *International Conference of Natural Products and Traditional Medicine, Scientific and Technical Development Inc*, 2009: 136-178.
- [10] 陈滨, 罗丽萍, 丽艳, 等. 反相高效液相色谱法测定蜂胶水提物中的酚类化合物[J]. *分析化学*, 2009, 37(12): 1786-1790.
- [11] 徐元君, 罗丽萍, 丽艳, 等. RP-HPLC 确定两种中国蜂胶醇提物化学组成[J]. *林产化学与工业*, 2010, 30(2): 61-66.
- [12] XU Yuanjun, LUO Liping, CHEN Bin, et al. Recent development of chemical components in propolis[J]. *Frontiers of Biology in China*, 2009, 4(4): 385-391.
- [13] SFORCIN J M, ORSI R O, BANKOVA V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 98(3): 301-305.
- [14] BANKOVA V S, CHRISTOV R, TEJERA A D. Lignans and other constituents of propolis from the Canary islands[J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(5): 1411-1415.
- [15] SFORCIN J M, FERNANDES A, Jr, LOPRS C A M, et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 73(1/2): 243-249.
- [16] CHEN Yuewen, WU Shiaoowen, HO K K, et al. Characterisation of Taiwanese propolis collected from different locations and seasons[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, 88(3): 412-419.
- [17] BERETTA G, GRANATA P, FERRERO M, et al. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics[J]. *Analytica Chimica*, 2005, 533(2): 185-191.
- [18] MIYATAKA H, NISHIKI M, MATSUMOTO H, et al. Evaluation of propolis. I. evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1997, 20(5): 496-501.
- [19] 刘清, 李玉, 姚惠源. Folin-Ciocalileu 比色法测定大麦提取液中总多酚的含量[J]. *食品科技*, 2007, 32(4): 175-177.
- [20] 王浩, 刘德秀, 杨巍. 吸光光度法检测保健食品蜂胶中总黄酮[J]. *公共卫生与预防医学*, 2006, 17(2): 67.
- [21] KOSALEC I, PEPELJNIAK S, BAKMAZ M, et al. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products [J]. *Acta Pharmaceutica*, 2005, 55: 423-430.
- [22] ATMANI D, CHAHER N, BERBOUCHA M, et al. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants[J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(2): 303-309.
- [23] SCHERER R, GODOY H T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method[J]. *Food Chemistry*, 2009, 112: 654-658.
- [24] MARCUCCI M C. Propolis-chemical composition, biological properties and therapeutic activity[J]. *Apidologie*, 1995, 26(2): 83-99.
- [25] MURRAY P R, BARON E J. *Manual of clinical microbiology*[M]. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995.
- [26] BANKOVA V, KRASTEVA G B, POPOV S, et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis[J]. *Apidologie*, 1998, 29(4): 361-367.