

蜂胶不同溶剂萃取物组成和抗氧化性的研究

孙丽萍^{1,2}, 徐 响^{1,2}, 黄少康³, 杜 立³, 董 捷^{1,2}, 杨佳林^{1,2}

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 国家蜂产品加工技术分中心, 北京 100093;

3. 福建农林大学蜂学学院, 福建 福州 350002)

摘 要: 以蜂胶为原料, 分别以甲醇、乙醇、氯仿、蒸馏水为溶剂进行萃取, 测定各萃取物总酚与黄酮类物质的含量, 通过测定还原能力, 清除 DPPH 自由基能力的测定来比较 4 种不同萃取物的抗氧化性。结果表明: 甲醇萃取物具有较强的抗氧化性。甲醇萃取物浓度为 0.25mg/ml 时还原力高达 1.162, 且浓度为 0.05mg/ml 时对 DPPH 自由基清除率为 64.676%。乙醇萃取物通过石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮依次分级萃取后所得 4 种萃取物各项指标测定结果表明, 氯仿萃取了蜂胶乙醇萃取物中主要成分, 但乙酸乙酯和丙酮萃取物的还原能力及清除 DPPH 自由基清除能力较佳, 在浓度为 0.05mg/ml 时还原力分别为 2.087 和 1.798, DPPH 自由基清除率达 87.724% 和 88.013%。

关键词: 蜂胶; 抗氧化性; 总酚; 黄酮

Chemical Compositions and Antioxidant Activity of Different Solvent Extracts from Propolis

SUN Li-ping^{1,2}, XU Xiang^{1,2}, HUANG Shao-kang³, DU Li³, DONG Jie^{1,2}, YANG Jia-lin^{1,2}

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

2. National Research Center of Bee Product Processing, Beijing 100093, China;

3. College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Different solvents such as methanol, ethanol, chloroform and distilled water were used to extract propolis. The contents of total flavonoids and total phenols in different solvent extracts were analyzed. Meanwhile, reducing power and DPPH free radical scavenging capacity were determined to compare antioxidant activity of four different solvent extracts. Results indicated that methanol and ethanol extracts had strong antioxidant activity. The reducing power of methanol extract was as high as 1.162 at 0.25 mg/ml concentration of and scavenging rate of methanol extract for DPPH free radicals was 64.676% at 0.05 mg/ml concentration of. The sequential extractions using petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and acetone were applied to ethanol extract of propolis. A maximum extraction efficiency was achieved using chloroform. The reducing power of chloroform-soluble extract reached 2.087 and the scavenging capacity for DPPH free radicals as high as 87.724% at 0.05 mg/ml concentration.

Key words: popolis; antioxidant; total phenols; flavonoids

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)21-0075-04

蜂胶是蜜蜂从植物花苞及树干上采集的树脂, 混入其上腺分泌物和蜂蜡等物质而成的一种具有芳香气味的胶状固体物质, 其主要化学成分为黄酮类、萜烯类、酚酸类化合物等生物活性物质^[1-4]。现代药理研究表明, 蜂胶具有抗病毒、抗菌消炎、抗肿瘤、抗氧化、降血脂、调节机体免疫功能等多种功效^[5-9]。蜂胶中有效成分的分离已经成为蜂胶产品深加工的重要方向。本实验采用不同溶剂分别萃取以及分级萃取蜂胶并比较不同萃取物的抗氧化活性, 以期有助于改进现有蜂胶的加工

方法, 以更有效地利用蜂胶资源。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

蜂胶由北京君健生蜂产品有限公司提供, 产地为安徽芜湖。

没食子酸 中国药品生物制品检定所; Folin-Phenol 试剂、DPPH 自由基、高良姜素 Sigma 公司; 三氯化铝、碳酸钠、三氯化铁、三氯乙酸、铁氰化钾、

收稿日期: 2009-06-19

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项经费项目(nyhyzx07-041)

作者简介: 孙丽萍(1963—), 女, 副研究员, 硕士, 研究方向为蜂产品功能因子的分离与纯化。E-mail: caasun@126.com

乙醇、甲醇、石油醚、乙酸乙酯、氯仿、丙酮均为分析纯 北京化工厂。

FW135 中草药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; HZQ-F160 全温振荡培养箱 太仓市实验设备厂; RE-3000 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; UV-2100 紫外分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司; DZF-6090 真空干燥箱 上海恒科技仪器有限公司; LGJ-18S 冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蜂胶不同溶剂萃取

粗蜂胶粉碎后, 称取 20g 分别加入 100ml 甲醇、80% 乙醇、氯仿, 在室温下振荡 30min, 抽滤后滤液旋转蒸发浓缩干燥, 得到不同溶剂萃取物; 称取 20g 用布包紧后水煮至沸腾 30min, 超滤后滤液经冷冻干燥得沸水萃取物。

1.2.2 蜂胶分级萃取

乙醇萃取物加入 50ml 石油醚进行萃取, 在室温下振荡 30min, 过滤出石油醚萃取液, 此操作重复两次, 得到石油醚萃取物。然后依次采用氯仿、乙酸乙酯、丙酮进行分级萃取, 得到氯仿、乙酸乙酯和丙酮萃取物。

1.2.3 蜂胶萃取物各项指标的测定

1.2.3.1 总酚含量测定

参照 Folin-Phenol 试剂比色法^[10]建立标准曲线: 精密称取没食子酸 5.0mg, 置 50ml 量瓶中, 加 80% 乙醇使溶解并稀释到刻度, 摇匀, 即得到浓度为 0.1mg/ml 的没食子酸溶液, 吸取 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6ml 的没食子酸溶液分别置于 10ml 容量瓶中, 再各加入蒸馏水 6ml, Folin-Phenol 试剂 0.5ml, 摇匀, 静置 5min, 再各加 20% 的碳酸钠溶液 1.5ml, 摇匀, 室温下静置 30min, 用去离子水稀释到刻度, 摇匀, 在 763nm 处测定吸光度。

将样品配制成一定浓度的样液后, 取一定体积待测样品, 按上述方法测定总酚含量。回归方程为: $A = 94.5C + 0.0263$, ($R^2 = 0.992$), 以每 100g 干质量含有没食子酸等效物质的质量计算萃取物总酚质量分数。

1.2.3.2 黄酮含量测定

参照三氯化铝比色法^[11]。以高良姜素作标准品, 分别配制浓度为 2.5、5.0、7.5、10、12.5、15 $\mu\text{g/ml}$ 溶液, 吸取 0.1ml 溶液分别置于 10ml 容量瓶中与 2ml 的 2% 三氯化铝反应, 充分摇匀, 用甲醇定容到刻度线。室温避光静置 30min, 测定 415nm 下吸光度。回归方程为: $C = 19.576A - 0.1489$, ($R^2 = 0.997$), 以每 100g 干质量含有高良姜素等效物质的质量计算萃取物黄酮质量分数。

将样品配制成一定浓度的样液后, 取一定体积待测样品, 与三氯化铝混合, 充分摇匀, 室温避光静置

30min, 测定 415nm 波长下的吸光度。

1.2.3.3 还原力的测定

还原能力的测定采用铁氰化钾还原法评价^[12]。取浓度为 0.25mg/ml 的萃取物 1.5ml, 加入 1.5ml pH6.6 的磷酸缓冲液及 1% 的铁氰化钾溶液 1.5ml 混匀, 于 50℃ 水浴反应 20min 后迅速冷却, 加入 1.5ml 10% 的三氯乙酸, 用 4500r/min 离心 10min, 取上清液 2.5ml, 加入蒸馏水 2.5ml 和 0.1% 的三氯化铁 0.5ml 混合。在 700nm 处测定吸光度, 吸光度越大则样品的还原能力越强。

$$\text{还原力} = A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}$$

1.2.3.4 DPPH 自由基清除率测定^[13-14]

将样品稀释成 0.05mg/ml 样品溶液, 加入 0.2mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液 2ml, 充分混匀后, 于黑暗处室温放置 30min, 然后在测定 520nm 波长下的吸光度, 样品对 DPPH 自由基清除率按下面的公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{调零}})}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

式中: $A_{\text{空白}}$ 为 2ml 的 80% 乙醇与 2ml 的 DPPH 溶液混合; $A_{\text{样品}}$ 为 2ml 的样品与 2ml 的 DPPH 溶液混合; $A_{\text{调零}}$ 为 2ml 的乙醇与 2ml 的样品溶液混合。

1.3 统计分析

实验数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 统计软件包进行分析, 经 t 检验比较组间差异。

2 结果与分析

2.1 蜂胶 4 种萃取物的黄酮和多酚含量测定

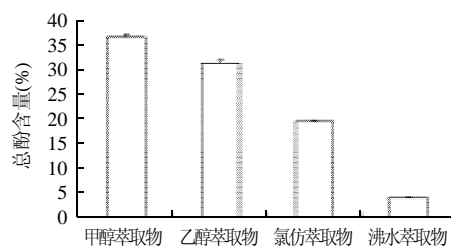


图1 蜂胶不同萃取物的总酚含量

Fig.1 Content of total phenols in different solvent extracts from propolis

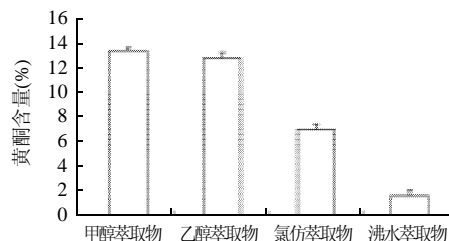


图2 蜂胶不同萃取物的黄酮含量

Fig.2 Content of total flavonoids in different solvent extracts from propolis

由图 1、2 可知, 萃取物按总酚含量和黄酮含量大小排序为: 甲醇萃取物>乙醇萃取物>氯仿萃取物>沸水萃取物。甲醇萃取物中所含总酚含量高达 37.167%。蜂胶中含有的多酚类物质在甲醇中的溶解性最好。黄酮含量的测定结果与多酚测定结果相似, 甲醇萃取物中含有黄酮最高, 而沸水萃取物所含黄酮最低, 只有 1.633%。

2.2 蜂胶萃取物的抗氧化性测定结果

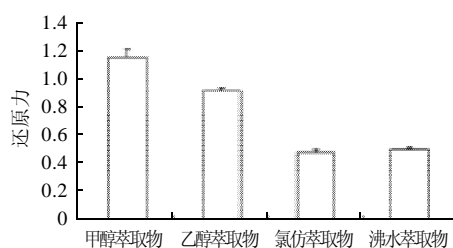


图 3 蜂胶不同萃取物的还原力

Fig.3 Reducing power of different solvent extracts from propolis

还原力是用来检测天然抗氧化物的供电子能力, 蜂胶萃取物的还原力与其抗氧化能力有直接的关系^[15-17]。见图 3, 还原能力的大小排序为: 甲醇萃取物>乙醇萃取物>沸水萃取物>氯仿萃取物。甲醇萃取物浓度为 0.25mg/ml 时还原力达 1.162。

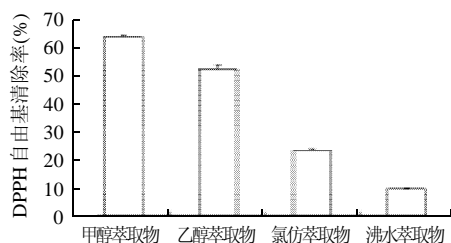


图 4 蜂胶不同萃取物的 DPPH 自由基清除率的测定

Fig.4 Scavenging rate of different solvent extracts from propolis for DPPH free radicals

DPPH 自由基是种稳定的自由基, 它在可见光区有特征吸收, 测定方法简捷快速且重现性好, 因此可以通过测定样品对 DPPH 自由基的清除能力来评价抗氧化剂的性能^[18]。对 4 种萃取液的 DPPH 自由基清除率进行测定, 结果见图 4。对 DPPH 自由基清除率的大小排序为: 甲醇萃取物>乙醇萃取物>氯仿萃取物>沸水萃取物。甲醇萃取物浓度为 0.05mg/ml 时对 DPPH 自由基清除率为 64.676%, 与其他 3 种不同萃取物存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

对不同萃取物的总酚含量、黄酮含量、还原力、

DPPH 自由基清除率的测定结果表明甲醇萃取物与乙醇萃取物都具有较强的抗氧化性, 而氯仿萃取物次之, 沸水萃取物的抗氧化性最低。萃取物的总酚质量分数与其抗氧化活性具有正相关性, 这与前人研究结果相符合^[15,19]。

2.3 乙醇萃取物分级萃取组分和抗氧化性测定结果

在现在最常用的乙醇浸提法的基础上, 对乙醇萃取物进行分级萃取, 将萃取物根据含有的化合物极性进行分离。一般情况下, 低极性黄酮苷元存在于石油醚组分中, 极性较大的黄酮苷元存在于氯仿和乙酸乙酯萃取物中, 而黄酮苷和酚酸类物质多存在于丙酮组分中^[20]。由表 1 可知, 乙醇萃取物不同溶剂萃取物黄酮含量的大小顺序为: 丙酮萃取物>乙酸乙酯萃取物>氯仿萃取物>石油醚萃取物。结果表明, 蜂胶乙醇萃取物中含有较多的极性较大的黄酮苷元。表 1 中乙醇萃取物不同溶剂萃取物还原力测定的结果显示蜂胶中乙酸乙酯组分极性较大的黄酮苷元的还原力最强。

表 1 乙醇萃取物分级萃取组分各项指标测定

Table 1 Yield, contents of total flavonoids and total phenols and antioxidant activity of various fractions of ethanol extract from propolis

萃取组分	得率(%)	黄酮(%)	总酚(%)	还原力	DPPH·清除率(%)
石油醚萃取物	0.04	7.570 ± 0.173 ^a	18.729 ± 0.683 ^a	0.779 ± 0.019 ^b	41.314 ± 0.547 ^a
氯仿萃取物	41.40	9.174 ± 0.354 ^b	27.306 ± 0.255 ^b	0.697 ± 0.008 ^a	53.045 ± 0.722 ^b
乙酸乙酯萃取物	6.45	16.688 ± 0.446 ^c	55.312 ± 1.120 ^c	2.087 ± 0.031 ^d	87.724 ± 0.722 ^c
丙酮萃取物	2.27	17.788 ± 0.587 ^d	29.904 ± 1.448 ^b	1.798 ± 0.048 ^a	88.013 ± 0.580 ^c

注: 不同小写字母表示有显著性差异, $P < 0.05$ 。

由表 1 可看出, 氯仿萃取物得率为 41.40%, 表明氯仿萃取了蜂胶乙醇萃取物中主要成分。乙醇萃取物不同溶剂萃取物对 DPPH 自由基清除率大小关系为: 丙酮萃取物>乙酸乙酯萃取物>氯仿萃取物>石油醚萃取物, 与黄酮含量结果成正相关性。乙酸乙酯萃取物的 DPPH 自由基清除率达到 87.724%, 丙酮萃取物的 DPPH 自由基清除率高达 88.013%, 高于乙醇萃取物的 DPPH 自由基清除率 64.676%(图 4), 实验表明通过乙酸乙酯和丙酮的萃取所表现出抗氧化活性较佳。

3 结 论

不同溶剂对蜂胶进行萃取时, 甲醇萃取物中多酚和黄酮含量最高, 其还原力及清除 DPPH 自由基的能力最强, 甲醇萃取物在浓度为 0.25mg/ml 时还原力达 1.162, 而浓度在 0.05mg/ml 时其对 DPPH 自由基清除率为 64.676%。乙醇萃取物通过石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮分级萃取的萃取物中, 各组分含有不同种类和含量的黄酮成分, 其中氯仿分级萃取物得率最高, 但乙酸乙酯和丙酮萃取物的还原能力及清除 DPPH 自由基清除

能力较佳, 在浓度为 0.05mg/ml 时还原力分别为 2.087 和 1.798, DPPH 自由基清除率达 87.724% 和 88.013%。

参考文献:

- [1] 王宗伟, 黄兆胜. 蜂胶的药理作用[J]. 国外医药: 植物药分册, 1997, 12(4): 151-153.
- [2] 胡福良, 玄红专. 蜂胶的生物学活性及毒性和过敏反应[J]. 科技通报, 2003, 19(2): 166-169.
- [3] 彭增起, 张梦寒, 姚蕊. 蜂胶液体中类黄酮化合物的 HPLC 测定和抗氧化性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(9): 213-215.
- [4] 董捷, 张红城, 尹策, 等. 蜂胶研究的最新进展[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 637-642.
- [5] 杨艳彬, 朱丽莉, 唐明翔, 等. 蜂胶抑菌作用的研究[J]. 食品科技, 1999, 12(6): 33-35.
- [6] 胡怡秀, 胡春生, 胡余明, 等. 北京蜂胶对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 实用预防医学, 2005, 12(5): 1049-1052.
- [7] 董捷, 闫继红, 孙丽萍. 蜂胶复合软胶囊对实验大鼠血脂的调节作用[J]. 蜜蜂杂志, 2003, 12(12): 5-7.
- [8] 曹炜, 尉亚辉. 蜂胶的抗氧化作用研究[J]. 西北大学学报, 2001, 12(2): 3-4.
- [9] 陈明之, 夏道宗. 蜂胶中有效成分的提取及其抗氧化作用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(6): 21-23.
- [10] 李凤英, 崔蕊静, 李春华. 葡萄皮中提取多酚物质[J]. 食品与发酵工艺, 2005(4): 144-149.
- [11] 王小平, 陈震霖, 林励. 不同产地蜂胶中总黄酮的含量测定[J]. 现代中医药, 2007, 27(5): 76-77.
- [12] 刘清, 李玉, 姚惠源. 大麦提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 131-133.
- [13] MORENO M N, ISLA M I, SAMPIETRO A R, et al. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of *Argentina* [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 71: 109-114.
- [14] 莫简. 医用自由基生物学导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 178-180.
- [15] 张燕平. 天然蜂胶对自由基的清除作用[J]. 食品与发酵工业, 2001, 28(1): 48-52.
- [16] SANCHEZ-MORENO C, LARRAURI J A, SAURA-CALIXTO F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents[J]. *Food Research International*, 1999, 32(6): 407-412.
- [17] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239: 70-76.
- [18] LU Y R, FOO L Y, LU Y R. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. *Food Chemistry*, 2000, 68(1): 81-85.
- [19] AMAROWICZ R, PEGG R B, RAHIMI-MOGHADDAM P, et al. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies[J]. *Food Chemistry*, 2004, 84: 551-562.
- [20] 唐浩国. 黄酮类化合物研究[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 93.