

蜂胶总黄酮的最佳提取工艺研究

夏道宗¹, 励建荣², 陈明之³, 吕圭源¹

(1. 浙江中医学院药理学系, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江工商大学食品系, 浙江 杭州 310035;

3. 浙江商业职业技术学院烹饪与旅游管理系, 浙江 杭州 310053)

摘 要: 影响蜂胶总黄酮提取效率的主要因素是提取时间, 其次是乙醇浓度, 提取温度和料液比对提取效率几乎无影响; 超声波提取具有短时高效的优点, 适合于蜂胶总黄酮的提取; 正交试验表明, 超声条件下蜂胶总黄酮的最佳提取工艺是 30℃, 50min, 95% 乙醇, 料液比 1:30, 此条件下测得总黄酮百分含量为 6.39%。

关键词: 蜂胶; 总黄酮; 最佳提取工艺

Study on Optimum Extracting Process of Total Flavones from Propolis

XIA Dao-zong¹, LI Jian-rong², CHEN Ming-zhi³, LÜ Gui-yuan¹

(1. Department of Pharmacy, Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China
2. Department of Food Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China 3. Department of Cooking and Tourism Management, Zhejiang Vocational College of Commerce, Hangzhou 310053, China)

Abstract: The main factors affecting the content of total flavones extracted from propolis was the extraction time, the ethanol

收稿日期: 2003-12-01

作者简介: 夏道宗(1978-), 男, 助教, 硕士, 主要从事功能食品研究与开发工作。

中的果胶浓度最大。这可能是因为 pH3.0 的条件下, 酸可能水解桔皮中一些多糖的化学键, 使得原本比较紧密的结构变得比较疏松(但桔子皮并不破碎, 有利于将产物分离), 这样一方面有利于酶与底物接触, 加快反应速度, 另一方面也有利于果胶物质的溶出, 然而关于这一现象更为确切的解释仍有待于进一步的研究。对反应温度的研究结果表明, 较低的温度有利于酶提取果胶。这主要是因为本研究中所采用的原果胶酶对热不稳定, 较低的温度有利于酶活性的保存。

在本实验的研究中发现了酶法生产果胶的不足之处, 采用乙醇沉淀法时, 体系中的一些蛋白也会变性一起沉淀出来, 影响产品的纯度。在实验中曾试图通过加热使蛋白变性以及 5% 的三氯乙酸变性蛋白沉淀法, 效果均不是很理想, 还有待于采用其它方法, 如凝胶层析^[7], 或者改变乙醇沉淀为其它沉淀法, 如盐沉淀法^[8,9], 进行进一步的研究。

果胶作为一种食品添加剂, 用粘度测定法只能粗略地估计体系中果胶的浓度。关于果胶详细的品质要求, 应在去除果胶中杂质(如蛋白、糖类、色素)等后, 参照国家标准进行详细的评估。

参考文献:

- [1] 方修贵, 祝慕韩, 郑益清. 果胶及其生产工艺[J]. 食品工业科技, 1999, 20(6): 34-35.
- [2] 赵利, 王杉. 果胶的制备及其在食品工业的应用综述[J]. 食品科技, 1999, (5): 32-34.
- [3] 何天富, 等. 柑橘学[M]. 中国农业出版社, 1999.
- [4] Takuo Sakai Makoto, Masaru Nagai. Reach on protopectinase: a new aspect of research on pectolytic enzymes[J]. Mem Fac Agr Kinki Univ, 1999, 19(1): 32.
- [5] 汪勤. 食品分析[M]. 南京农业大学食品科学系, 1993, 12: 33-34.
- [6] 李秉定, 安欣欣, 朱新星. 食品化学实验指导[M]. 南京农业大学, 1991. 22-25.
- [7] 罗昌荣. 高质量番茄粉的研制及其贮藏稳定性的研究[D]. 江南大学博士论文, 2001.
- [8] 权英, 曹端林, 王建龙, 等. 盐析法从向日葵盘中提取果胶[J]. 华北工学院学报, 1998, 19(4): 368-370.
- [9] 张玲华, 唐小俊, 张宝玲, 等. 高价铁盐沉淀法从柚皮提取果胶的研究[J]. 农牧产品开发, 2000, 11: 12-13.

concentration and the extraction temperature, while the material-liquid ratio had little to do with the extraction efficiency. Ultrasonic wave extraction could shorten the extraction time and increase the extraction efficiency, so could be considered for the extraction of total flavones from propolis. Orthogonal test results showed that the optimum conditions were 30℃, 50min, 95% ethanol and material-liquid ratio 1:30. Under the conditions, the yield of total flavones from propolis was 6.39%.

Key words: propolis; total flavones; optimum extracting process

中图分类号: TS272

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)01-0153-05

蜂胶(Propolis)是一种天然的活性物质,人们早在20世纪初就已对蜂胶所含的成分及相关的作用进行了研究,近年来采用动物进行了药效实验和临床实验,均表明它具有明显的增强免疫、抗病原体、抗炎、抗肿瘤、抗氧化等作用,有关它的研究还在进行之中^[1]。蜂胶的化学成分极为复杂,其中含有大量的黄酮类化合物,已分离鉴定出的黄酮类化合物有30余种,包括白杨素、柚柏杨素、金合欢素、槲皮素、芦丁山萘甲黄素等,其5,7-二羟基-3,4-二甲黄酮和5-羟基-4,7-二甲氧基双氢黄酮是蜂胶的特有成分^[2,3]。已有研究证明,蜂胶总黄酮具有明显的抑制肿瘤、抗氧化作用^[4,5]。本文主要研究了提取溶剂、提取温度、提取时间和提取方式等因素对蜂胶总黄酮提取效率的影响,以期优化其提取工艺,提高其提取效率,为蜂胶的深度开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

杭产蜂胶 杭州东海蜂业公司,灰褐色,无光泽,有明显杂质;黄胶 山东产,棕黄色,有光泽,断面结构紧密;黑胶 浙江淳安产,黑色,无光泽,断面结构密实不一;三个样品均除杂,用倾倒式粉碎机粉碎15s(时间过久会发粘)后,贮藏于2℃的冷柜内,备用。

芦丁:生化试剂,上海试剂二厂。

95%乙醇、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、乙酸乙酯等试剂,均为分析纯。

KQ-250B型超声波清洗器(可控温),昆山市超声仪器有限公司;ZKB-99型循环水多用真空泵,上海嘉鹏科技有限公司;RE-52 AAA型旋转蒸发器,上海嘉鹏科技有限公司;JA2003型万分之一天平,上海天平仪器厂;TC-30型恒温水浴锅,海宁市新华医疗器械厂;HP-7530G分光光度计,惠普上海分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蜂胶总黄酮的提取

取蜂胶5.0g,溶剂提取,提取液旋转蒸发回收溶剂,残渣用30%乙醇溶解,定容至50ml,作为待测液。

1.2.2 标准曲线绘制

按文献[6]进行,得回归方程: $y = 5.8674x + 0.0127$, $R^2 = 0.9998$ 。

1.2.3 蜂胶总黄酮含量测定

取1.2.1待测液0.5ml于10ml具塞试管中,以下操作按文献[6]进行。每一试样重复测定三次,取OD₅₁₀的平均值,从上述标准曲线计算相应的总黄酮含量。

1.2.4 溶剂浸提过程中主要影响因素的确定

考察了浸提条件下,提取溶剂、乙醇浓度、提取温度、提取时间、提取方式等因素对蜂胶总黄酮提取效率的影响。

1.2.5 超声条件下蜂胶总黄酮最佳提取工艺的确定

考察了超声条件下提取温度、乙醇浓度、提取时间和料液比对蜂胶总黄酮提取效率的影响,并确定在该条件下的最佳提取工艺。

2 结果与讨论

2.1 不同产地蜂胶乙醇提取结果比较

在室温,浸提6d的条件下,60ml不同浓度乙醇对不同产地蜂胶的提取得率和总黄酮含量如图1、图2所示。

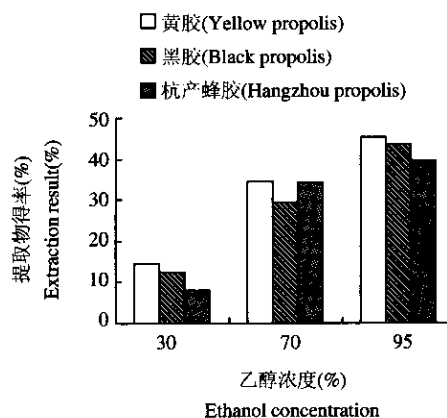


图1 不同产地蜂胶不同浓度乙醇提取结果

Fig.1 Extraction result of propolis from different area by different concentration ethanol

注: 提取得率(%) = $\frac{\text{蜂胶重量} - \text{残渣重量}}{\text{蜂胶重量}} \times 100$ 。

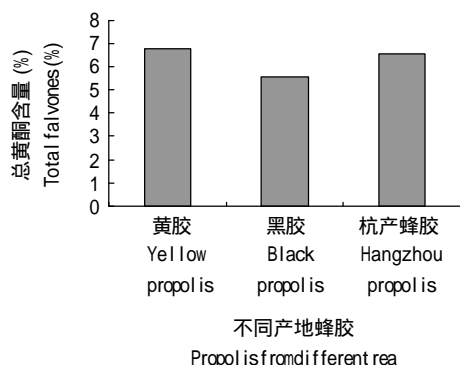


图2 不同产地蜂胶95%乙醇提取物总黄酮含量

Fig.2 Content of total flavones extraction from different area propolis by 95% ethanol

如图1、图2所示,随着乙醇提取浓度的增大,蜂胶提取率显著上升。不同产地的蜂胶其总黄酮含量有些许差异。以黄胶为最高,杭产蜂胶次之,黑胶最低。影响蜂胶总黄酮含量的因素很多,如采集的树种、季节等。以后各试验中均以黄胶为试验材料。

2.2 不同极性溶剂对蜂胶总黄酮含量的影响

乙醇、乙酸乙酯、甲醇和水各60ml作为提取溶剂,室温浸提6d的结果如图3所示。

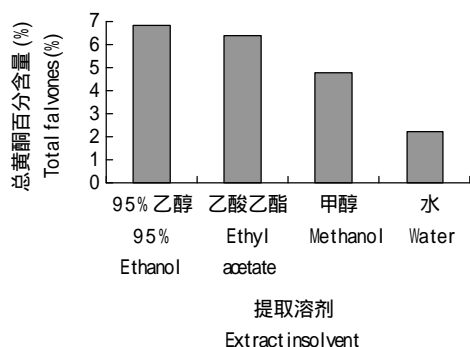


图3 不同极性溶剂对蜂胶总黄酮的提取结果

Fig.3 Extraction result of total flavones from propolis by different polarity solvent

图3表明,极性太强或偏弱的溶剂均不利于蜂胶总黄酮的提取,95%乙醇在上述四种溶剂中提取效率最高。再从溶剂的价格、食用安全性及回收率等因素考虑,故选择乙醇作为提取溶剂。

2.3 不同乙醇浓度对蜂胶总黄酮含量的影响

在室温,浸提6d的条件下,60ml不同浓度乙醇对蜂胶总黄酮的提取结果如图4所示。

图4表明,随着乙醇浓度的增大,总黄酮含量随之增大。这与表1中提取得率的变化趋势是一致的。乙醇浓度低于40%时,提取效率比较低;乙醇浓度高于75%时,提取效率增加的幅度较小,基本达到提取平衡。75%~95%乙醇与20%~30%乙醇提取效率相比较,

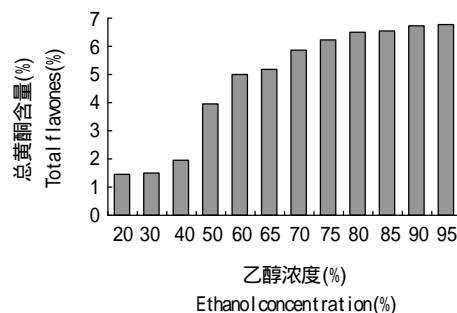


图4 不同浓度乙醇对蜂胶总黄酮的提取结果

Fig.4 Extraction result of total flavones from propolis by different concentration ethanol

差异极显著。

2.4 不同提取温度对蜂胶总黄酮含量的影响

在60ml 95%乙醇,浸提6d的条件下,不同提取温度对蜂胶总黄酮提取效率的影响如图5所示。

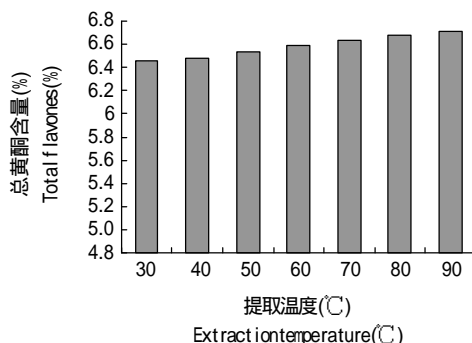


图5 不同提取温度对蜂胶总黄酮含量的影响

Fig.5 Extraction result of total flavones from propolis by different extraction temperature

图5可以看出,随着提取温度的升高,总黄酮溶出率有不同程度的升高,但差异并不显著。这说明在对蜂胶总黄酮的提取过程中,温度不是主要影响因素。

2.5 不同提取方式及提取时间对蜂胶总黄酮含量的影响

采用室温浸提、超声波30℃、热回流85℃三种不同的方式对蜂胶总黄酮进行提取,提取溶剂为60ml 95%乙醇。结果如图6所示。

从图6可见,随着提取时间的延长,蜂胶总黄酮的含量均不同程度地增加。在室温浸提条件下,总黄酮含量在第2~4d增加的比较明显,第4~8d增加的比较平缓。用超声波处理时,10~20min时提取效率略有增大,但20~40min时迅速增大,40~60min又趋于平缓。在热回流提取过程中,总黄酮的含量与时间近乎成线性关系。但由于在温度较高(85℃),回流时间过长时,会造成蜂蜡的大量溶解,给过滤造成很大的麻烦,故选择热回流3~5h较为合适。超声波提取具有短时高效的特点,适合用于蜂胶总黄酮的提取。

表1 正交试验结果与分析
Table 1 Analysis of extraction result by orthogonal experiment

试验号 Experiment number	因素factors				总黄酮百分含量(%) Content of total flavones(%)
	A温度(℃) ATemperature(℃)	B时间(min) B Time(min)	C乙醇浓度(%) CEthanol concentration(%)	D料液比 DMaterial-solutionratio	
1	A ₁ (25)	B ₁ (20)	C ₁ (65)	D ₁ (1:4)	4.17
2	A ₁ (25)	B ₂ (30)	C ₂ (75)	D ₂ (1:10)	5.73
3	A ₁ (25)	B ₃ (40)	C ₃ (85)	D ₃ (1:20)	6.10
4	A ₁ (25)	B ₄ (50)	C ₄ (95)	D ₄ (1:30)	6.38
5	A ₂ (30)	B ₁ (20)	C ₂ (75)	D ₃ (1:20)	4.98
6	A ₂ (30)	B ₂ (30)	C ₁ (65)	D ₄ (1:30)	5.53
7	A ₂ (30)	B ₃ (40)	C ₄ (95)	D ₁ (1:4)	6.18
8	A ₂ (30)	B ₄ (50)	C ₃ (85)	D ₂ (1:10)	6.26
9	A ₃ (35)	B ₁ (20)	C ₃ (85)	D ₄ (1:30)	5.02
10	A ₃ (35)	B ₂ (30)	C ₄ (95)	D ₃ (1:20)	5.81
11	A ₃ (35)	B ₃ (40)	C ₁ (65)	D ₂ (1:10)	5.68
12	A ₃ (35)	B ₄ (50)	C ₂ (75)	D ₁ (1:4)	6.03
13	A ₄ (40)	B ₁ (20)	C ₄ (95)	D ₂ (1:10)	5.22
14	A ₄ (40)	B ₂ (30)	C ₃ (85)	D ₁ (1:4)	5.72
15	A ₄ (40)	B ₃ (40)	C ₂ (75)	D ₄ (1:30)	5.91
16	A ₄ (40)	B ₄ (50)	C ₁ (65)	D ₃ (1:20)	5.34
K ₁	22.38	19.39	20.72	21.45	
K ₂	22.95	22.79	22.65	22.79	
K ₃	22.54	23.87	23.10	22.23	
K ₄	22.19	24.01	23.59	22.84	
k ₁	5.60	4.85	5.18	5.36	
k ₂	5.74	5.70	5.66	5.70	
k ₃	5.64	5.97	5.78	5.56	
k ₄	5.55	6.00	5.90	5.71	
R	0.19	1.15	0.72	0.35	
优水平 optimum level	A ₂	B ₄	C ₄	D ₄	

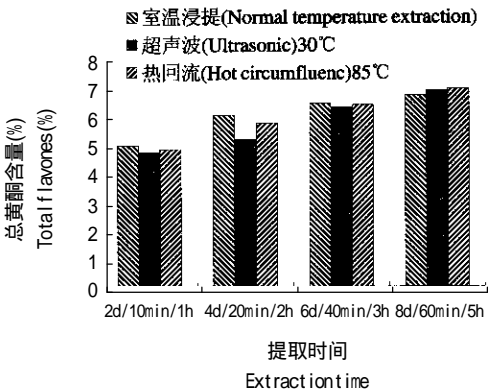


图6 不同提取方式和提取时间对蜂胶总黄酮含量的影响
Fig.6 Extraction result of total flavones from propolis by different extraction method and time

2.6 蜂胶提取的正交试验

对超声波条件下蜂胶总黄酮的提取设计正交试验，确定最佳提取工艺。各因素水平及试验结果如表 1 所示。从表 1 可以看出，在超声波条件下，影响蜂胶总黄酮提取效率的主要因素是提取时间，其次是乙醇浓度；提取温度和料液比对提取效率几乎无影响。蜂胶总黄酮的最佳提取条件是 A₂B₄C₄D₄，即：30℃，50min，95% 乙醇，料液比 1:30，在此条件下测得总黄酮百分含量为 6.39%。因为提取温度和料液比对蜂胶总黄酮的提取效率影响不显著，因此在实际生产过程中可根据具体情况选择合适的提取温度和料液比。

3 结 论

在蜂胶总黄酮的提取过程中，提取时间和乙醇浓度是影响提取效率的两个主要因素，而提取温度和提取溶剂的影响则较小。超声波提取具有短时、高效、条件

火棘水溶性多糖的提取及分离纯化

张海生, 段玉峰*, 周 芳, 杨锋
(陕西师范大学食品工程系, 陕西 西安 710062)

摘 要: 本文对火棘水溶性多糖的提取工艺、分离纯化以及纯度鉴定作了研究。结果表明: 火棘多糖的最佳提取工艺为 90℃、9h、料液比为 1:10, 火棘多糖的提取率约为 3.5%; 通过分级沉淀、DE-52 柱层析分离得到 PP-A2、PP-A3、PP-A4 和 PP-B1、PP-B2、PP-B3 六种组分; 经 Sephadex G-200 柱层析鉴定, PP-A2、PP-A3、PP-B2 为均一多糖。

关键词: 火棘; 多糖; 提取; 分离纯化

Extraction, Isolation and Purification of Water-soluble Polysaccharides from *Pyracantha fortuneana*

ZHANG Hai-sheng, DUAN Yu-feng*, ZHOU Fang, YANG Feng
(Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The extraction, isolation and purification of water-soluble *Pyracantha fortuneana* polysaccharides were studied. The results indicated that the optimal extraction technology of *Pyracantha fortuneana* polysaccharides were 90℃, 9h and 10:1 (W/W) of water to its fruit. Extraction rate of the polysaccharides was 3.5%. Then through isolating it with fractional precipitation and DE-52 column chromatography, six glycoconjugates, PP-A2, PP-A3, PP-A4, PP-B1, PP-B2 and PP-B3, were obtained. Sephadex G-200 gel filtration chromatography showed that PP-A2, PP-A3, PP-B2 were pure.

Key words: *Pyracantha fortuneana* polysaccharides; extraction; isolation and purification

中图分类号 Q948.6

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)01-0157-05

火棘(*Pyracantha fortuneana* (Maxim.) Li) 果实, 又叫赤阳子、救军粮, 主要分布于我国东南和西南部, 也是秦巴山区主要野生植物之一^[1]。火棘始载于《滇南本草》, 其果实性味干酸, 药用具有健脾消积、生津止

渴、清热解毒、活血止血等功效^[2]。近年来的研究表明火棘果实具有很大的药用和食用开发价值^[3]。有报道火棘果实总提取物具有消除自由基、降血脂、增强免疫力、增强体力和促进消化等作用^[4]。

为了进一步开发火棘野生资源, 我们对秦巴山区产火棘果实中水溶性多糖的提取、分离纯化及纯度鉴定等进行了研究, 为进一步阐明火棘多糖的生物活性及化学结构做了前期工作。

收稿日期 2003-12-15

* 通讯作者

作者简介: 张海生(1965-), 男, 在读博士, 主要从事天然活性成分研究与功能食品开发。

温和等特点, 适合用于蜂胶总黄酮的提取。

蜂胶对心血管疾病、肿瘤、糖尿病、肝病、肠胃病等具有十分明显的医疗保健功效, 作为功能食品资源必将具有十分广阔的开发应用前景。

参考文献:

- [1] 王玉芬. 蜂胶的研究进展[J]. 河北医药, 2002, 24(3): 227-228.
- [2] 黄文诚. 蜂胶的化学成分和生物学活性[J]. 蜜蜂杂志,

1998, (6): 9-10.

- [3] 玄红专, 胡福良. 蜂胶在医学上的应用研究进展[J]. 养蜂科技, 2002, (3): 26-29.
- [4] 齐彦, 郭丽新, 刘丽波, 等. 蜂胶黄酮对小鼠肝脏CAT活性的影响[J]. 中医药学报, 1999, (5): 53.
- [5] 吕泽田, 姜德勇, 田惠争. 蜂胶中黄酮类化合物抑制肿瘤作用的试验与应用[J]. 蜜蜂杂志, 1999, (3): 8-10.
- [6] 韩晋, 蔡光明. 紫外分光光度法对蜂胶提取物中总黄酮含量的测定[J]. 中国民间疗法, 1996, (4): 48.