

蜂胶中黄酮的提取及其自由基清除活性研究

曹小燕, 杨海涛

(陕西理工学院 化学与环境科学学院, 陕西 汉中 723000)

摘要:以蜂胶为原料,在单因素实验的基础上,通过正交实验优化超声波提取蜂胶黄酮工艺,并对其抗氧化性进行评价。结果表明,影响黄酮提取的因素主次顺序为:料液比>乙醇浓度>超声时间>提取温度,最佳提取工艺组合为 $A_2B_2C_2D_2$,即料液比为1:30、乙醇浓度为80%、超声时间为20 min、提取温度为50℃,在此工艺条件下蜂胶中黄酮的提取率为9.60%。蜂胶中的黄酮对羟基自由基和超氧阴离子自由基具有较好的抑制作用且具有明显的量效关系,即随着提取物浓度的增加,对自由基的清除活性逐渐增强;当提取物添加量为0.15 mg/mL时具有较好的自由基清除作用,其抗氧化活性优于天然抗氧化剂 V_c 。

关键词:蜂胶;黄酮类化合物;超声提取;抗氧化

中图分类号:TS 218 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)05-0045-05

Study on extraction of flavonoids from propolis and the activity of scavenging free radicals

CAO Xiao-yan, YANG Hai-tao

(College of Chemical & Environment Science, Shaanxi University of Technology, Hanzhong Shaanxi 723000)

Abstract: Taking propolis as raw material, based on single factor experiments, orthogonal test was used to optimize the ultrasonic-assisted extraction of flavonoids, and antioxidant activity of the total flavonoids was studied. The results showed that the order of factors affecting the extraction was ratio of solid to liquid > ethanol concentration > extraction time > extraction temperature; the optimum extraction technology was $A_2B_2C_2D_2$, namely ratio of solid to liquid 1:30, ethanol concentration 80%, extraction time 20 min, extraction temperature 50℃, under the condition the extraction rate of flavonoids in propolis was 9.60%. Propolis flavonoids had obvious inhibition effect on hydroxy radical and superoxide anion free radical, with obvious dose effect relationship, namely the ability of eliminating free radical strengthened along with the increasing of ethanolic extract density. Flavonoids of propolis with addition amount of 0.15 mg/mL had good antioxidant activity in scavenging free radicals, which was better than natural antioxidant V_c .

Key Words: propolis; flavonoids; ultrasonic extraction; antioxidation

蜂胶是蜜蜂从花苞、树芽处采集的树胶,结合蜜蜂的上颚腺分泌物及蜂蜡等形成的具有特殊芳香气味的胶状固体物^[1]。蜂胶素有“紫色黄金”之称,其主要的活性成分为黄酮类、有机酸类、萜烯类、芳香醛类、酯类及多种氨基酸、维生素、矿物质等^[2-3],具有抑菌、抗病毒、抗氧化、防癌抗癌、调节免疫力等生理功能^[4],同时蜂胶内服,可以调节高血脂、高血压

等,预防动脉粥样硬化及血栓的形成,被誉为“血液的清道夫”^[5]。蜂胶也被称为“黄酮类化合物的宝库”,主要包括黄酮、黄酮醇、黄烷醇、酚酸等^[6],其中5-羟基-4,7-二甲氧基双氢黄酮和5,7-二羟基-3,4-二甲氧基黄酮是蜂胶的特有成分,大部分蜂胶的生理及药理学活性都与此类化合物相关。黄酮类化合物的抗氧化活性与其分子结构息息相关,黄酮类化合物B环上的3,4-二羟基是其清除自由基的关键部位,其它环上的羟基可以不同程度地增加其抗氧化效果^[7]。自由基是生物体正常的代谢

收稿日期:2015-04-05

基金项目:陕西省教育厅专项科研项目(2013JK0680);陕西理工学院2013年校级人才启动项目(SLGQD13-1)

作者简介:曹小燕,1982年出生,女,河南开封人,讲师。

产物,正常情况下处于产生与清除的动态平衡中;氧化应激条件下可以导致机体的氧化损伤,引起衰老、炎症、癌症等疾病,蜂胶黄酮具有较好的自由基清除活性。本实验在单因素实验的基础上,利用正交实验优化超声提取蜂胶中黄酮的工艺,并评价蜂胶黄酮的自由基清除活性,为蜂胶黄酮保健食品的研究与开发提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料、仪器与试剂

材料:蜂胶(购于汉中市汉台区),原料除杂后置于冰箱,于0~6℃冷冻后取出,立即粉碎,放置冰箱备用。

试剂:芦丁标准品(自制)、无水乙醇、硝酸铝、氢氧化钠、亚硝酸钠、石油醚、抗坏血酸、七水硫酸亚铁、邻苯三酚、浓盐酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、双氧水、水杨酸等,以上所用试剂均为分析纯。

仪器:HHS-1 电热恒温水浴锅,上海医疗器械五厂;204-IC 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;FW-177 型中草药粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;PHS-3S 型 pH 酸度计,亿通电子有限公司;SHZ-DIII 循环水真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;101A-1 电热鼓风干燥箱,中国重庆银河试验仪器有限公司;722-E 型分光光度计,上海光谱仪器有限公司;KQ3200E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蜂胶总黄酮的提取及含量的测定

准确称取 0.1 g 蜂胶样品加入 50 mL 的烧瓶中,配制不同浓度的乙醇,加入一定体积的乙醇于 50 mL 的烧瓶中,设定超声频率为 50 kHz。提取温度、提取时间、料液比、乙醇的浓度根据实验方案设置。提取 3 次,合并 3 次滤液。取一定量的上清溶液离心后,准确吸取 1 mL 离心液置于 50 mL 的容量瓶中,加 5% 亚硝酸钠溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 15 mL,用乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min,在波长 510 nm 处测定其吸光度值,线性回归芦丁标准曲线,依据下式计算蜂胶中总黄酮的提取率^[8]:

$$\text{黄酮提取率} = \frac{\text{黄酮的浓度} \times \text{稀释体积} \times 10^{-3}}{\text{蜂胶样品的质量}} \times$$

100%,其中浓度单位为 mg/mL,体积单位 mL,质量单位 g。

1.2.2 芦丁标准曲线的绘制

精确称取干燥至恒重的芦丁标准品 20.0 mg,加乙醇溶解并定容至 50 mL,配制为 0.4 mg/mL 芦丁标准溶液。准确吸取标准品溶液 0、1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、7.00、8.00、9.00 mL,分别加乙醇至 10.00 mL,再加 5% 亚硝酸钠溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min,加 10% 的硝酸铝溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 15 mL,用乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min,在波长 510 nm 处测定其吸光度,以芦丁浓度(单位:mg/mL)为横坐标,吸光度值(A)为纵坐标,绘制标准曲线,建立回归方程^[9],标定蜂胶中总黄酮的浓度。

1.2.3 黄酮类化合物的定性检验

向蜂胶提取液中加入 1% 的 AlCl₃ 溶液,紫外分光光度计 300~800 nm 处扫描,观测吸光度值的变化及溶液颜色的变化。

1.2.4 单因素实验

研究料液比(1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL),提取温度(30、40、50、60℃),提取时间(10、20、30、40 min),乙醇浓度(40%、60%、80%、100%)对蜂胶黄酮提取率的影响。

1.2.5 蜂胶中总黄酮提取工艺优化

在单因素实验的基础上^[10],分别研究料液比、提取温度、提取时间及乙醇浓度对蜂胶黄酮提取率的影响,设计 4 因素 3 水平 L₉(3⁴) 正交实验,优化蜂胶中总黄酮的提取工艺,正交实验因素水平见表 1。

表 1 正交实验因素水平

水平	A 料液比/(g/mL)	B 乙醇浓度/%	C 温度/℃	D 时间/min
1	1:20	60	40	10
2	1:30	80	50	20
3	1:40	100	60	30

1.2.6 蜂胶中总黄酮对羟基自由基的清除

在试管中依次移取 9 mmol/L 硫酸亚铁 2.5 mL 和 8.8 mmol/L 双氧水 2.5 mL,混合均匀后加入 9 mmol/L 水杨酸-乙醇混合液 7.5 mL。37℃ 恒温水中反应 20 min 后,在 510 nm 处测定吸光度,该值即为 A₀ 值。将蜂胶黄酮的提取液配制成不同浓度(0.15、0.10、0.05、0.03 mg/mL) 的溶液,移取 1 mL 某一浓度的溶液加入 A₀ 测定体系中,在 37℃ 的恒温水中反应 20 min 后在 510 nm 处测吸光度,该值即为 A_x 值,以蒸馏水作参比^[11],以相同浓度的 Vc 为对照,按照公式计算蜂胶黄酮对羟基自由基的清

除率,即:清除率 = $(A_0 - A_x) / A_0 \times 100\%$ 。

1.2.7 蜂胶中总黄酮对超氧阴离子自由基的清除

取5支25 mL比色管,加入4.0 mL 25 °C下预热20 min的50 mM Tris-HCl缓冲液(pH值8.2),向3~5号试管中分别加入4.0 mL浓度为0.15、0.10、0.05 mg/mL的蜂胶黄酮提取液,再向2~5号试管中加入25 °C预热20 min的3 mmol/L邻苯三酚溶液2.0 mL,用蒸馏水定容至25 mL^[12],3~5号试管中在波长325 nm处每隔30 s测一次吸光度值(A_x),2号试管溶液为参照组,测定其吸光度即为公式中的 A_1 ;与相同浓度的Vc对比,蜂胶黄酮对超氧阴离子自由基的抑制率为:

$$\text{抑制率} = [\Delta A_1 / \Delta t (A/\text{min}) - \Delta A_x / \Delta t (A/\text{min})] / \Delta A_1 / \Delta t (A/\text{min}) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

以芦丁为标准溶液,于510 nm处测定吸光度值,以芦丁浓度(x)为横坐标,吸光度值(y)为纵坐标,绘制标准曲线^[13],建立线性回归方程 $y = 10.661x + 0.007$, $R^2 = 0.9997$ 。

2.2 蜂胶中黄酮的定性检验结果

参照黄酮定性检验实验方法,向蜂胶提取液中加入1%三氯化铝溶液,提取液中生成一种黄色的可溶性物质,在365 nm下呈蓝绿色荧光。查阅文献可知^[14]:紫外分光光度计扫描300~800 nm波长范围,发现在415 nm处的吸光度值增大(见图1),表明提取液中存在黄酮类物质,证明蜂胶中含有黄酮类化合物。

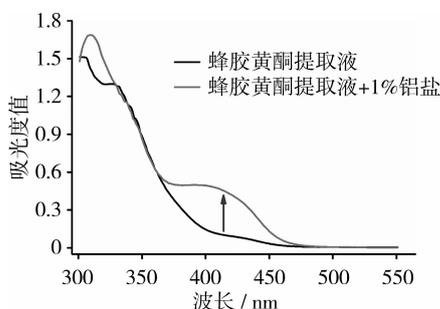


图1 蜂胶黄酮的定性检验

2.3 单因素实验结果

2.3.1 料液比对蜂胶黄酮提取率的影响

准确称取0.1 g蜂胶样品加入25 mL圆底烧瓶中,设定超声频率为50 kHz、提取温度40 °C、75%无水乙醇,提取时间30 min,研究不同的料液比(1:20、1:25、1:30、1:40、1:50 g/mL)对蜂胶黄酮提取效果的影响。由图2可知,料液比最大时,提取率最小,

随着料液比的降低,提取率先逐渐增大,可能是伴随乙醇浓度的增大,蜂胶中总黄酮的溶出量增加,即提取率逐渐增大;但当料液比小于1:30后,提取率逐渐下降,最终趋于平稳,这可能是伴随乙醇浓度的增大,一些醇溶性杂质、色素的浸出量增加,从而影响总黄酮的提取率。当料液比小时,黄酮提取率较低,同时浪费提取液,也为后续工作增加困难。因此,实验选取1:30为最佳料液比。

2.3.2 乙醇浓度对蜂胶黄酮提取率的影响

准确称取0.1 g蜂胶样品加入25 mL圆底烧瓶中,设定超声频率为50 kHz、料液比1:30、提取温度40 °C、提取时间30 min,研究不同的乙醇浓度(40%、60%、80%、90%、100%)对蜂胶黄酮提取效果的影响。由图3可知,蜂胶黄酮的提取率在乙醇浓度为40%~80%范围内时,随着乙醇浓度的增大提取率增强,乙醇浓度大于80%时则随乙醇浓度的升高提取率逐渐降低,乙醇浓度为80%时提取率最高。可能是由于乙醇浓度不同,提取液的极性不同,80%乙醇的极性与蜂胶中黄酮类化合物的极性相似,随着乙醇浓度的逐渐升高,蜂胶中一些脂溶性物质的溶出增强,影响了黄酮类物质的浸出^[12]。根据实验结果,选取80%乙醇为提取剂。

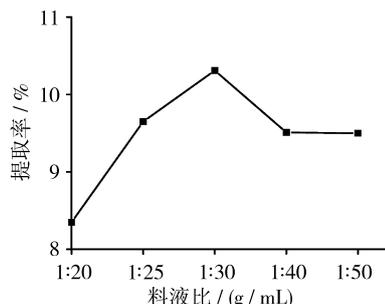


图2 料液比对蜂胶黄酮提取率的影响

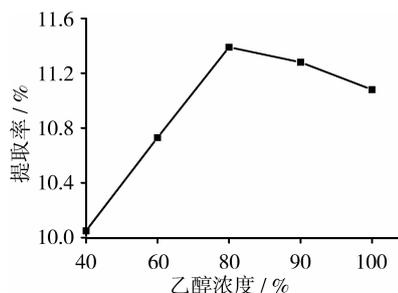


图3 乙醇浓度对蜂胶黄酮提取率的影响

2.3.3 提取温度对蜂胶黄酮提取率的影响

准确称取0.1 g蜂胶样品加入25 mL圆底烧瓶中,设定超声频率为50 kHz、80%无水乙醇、料液比1:30、提取时间30 min,研究不同的提取温度(30、40、50、60、70 min)对蜂胶黄酮提取效果的影响。由

图4可知,蜂胶黄酮的提取率在温度较低时较小,并且随着温度的升高变化不大,当温度为40~50℃时,黄酮的提取率随温度的升高增加显著,高于50℃后随着温度的升高,黄酮的提取率逐渐减弱,说明一定范围内温度越高对细胞的破坏作用越强,有利于黄酮的浸出,但温度过高可能会导致溶剂的挥发,反而不利于提取。因此,超声的最佳温度选取为50℃。

2.3.4 超声时间对蜂胶黄酮提取率的影响

准确称取0.1g蜂胶样品加入25mL圆底烧瓶中,设定超声频率为50kHz、料液比1:30、提取温度50℃、乙醇浓度80%,研究不同的提取时间(5、10、20、30、40min)对蜂胶黄酮提取效果的影响。由图5可知,蜂胶黄酮提取率先随时间的延长而增强,当时间为20min时蜂胶黄酮的提取率最大,再延长超声时间,提取率反而出现下降的趋势。可能是随着超声时间的延长,超声产生的热效应使提取体系的温度升高,促使蜂胶中黄酮类化合物的浸出从而提高其提取率;当温度达到一定限度时,黄酮的结构可能发生变化而被降解,导致黄酮提取率下降。因此,20min是蜂胶黄酮的最佳提取时间。

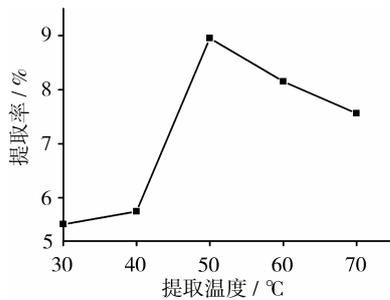


图4 提取温度对蜂胶黄酮提取率的影响

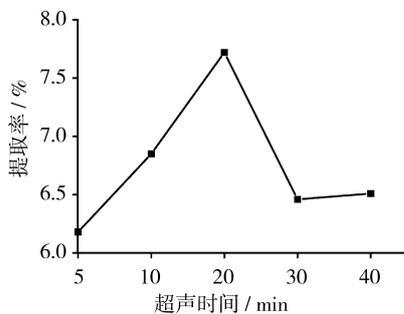


图5 超声时间对蜂胶黄酮提取率的影响

2.4 正交实验

以料液比(1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL),乙醇浓度(40%、60%、80%、100%),提取温度(30、40、50、60℃)和超声时间(10、20、30、40min)对蜂胶黄酮提取率的影响进行正交实验。由表2可以看出,影响蜂胶黄酮提取率的主次因素顺序为:料液比>乙醇浓度>超声时间>提取温度,最佳提取工艺组

合为A₂B₂C₂D₂,即料液比1:30、乙醇浓度80%、提取温度50℃、超声时间20min,在该提取条件下,蜂胶黄酮的提取率为9.60%。由方差分析统计表(表3)可知,料液比>乙醇浓度>超声时间>提取温度,其中料液比对黄酮提取率的影响具有显著性。

表2 正交实验结果

序号	A	B	C	D	提取率/%
1	1:20	60	40	10	8.89
2	1:20	80	50	20	9.60
3	1:20	100	60	30	8.68
4	1:30	60	50	30	8.51
5	1:30	80	60	10	8.04
6	1:30	100	40	20	8.30
7	1:40	60	60	20	8.07
8	1:40	80	40	30	8.37
9	1:40	100	50	10	7.31
k ₁	0.381	0.357	0.358	0.340	
k ₂	0.348	0.365	0.356	0.364	
k ₃	0.333	0.340	0.347	0.358	
R	0.048	0.025	0.011	0.024	

表3 方差分析统计

因素	偏平方和	自由度	F比	显著性
料液比	0.004	2	2.687	*
乙醇浓度	0.001	2	0.667	
温度	0.000	2	0.000	
超声时间	0.001	2	0.667	
误差	0.010	8		

注: * 指影响显著,判定标准为0.05。

2.5 蜂胶黄酮的抗氧化性研究

2.5.1 蜂胶黄酮对羟基自由基(·OH)的清除

羟基自由基是仅次于F⁻的强氧化剂,几乎可以和所有的细胞组分(核酸、蛋白质和脂质等)发生反应,对于筛选、评价具有清除自由基能力的生化药品和功能食品有重要意义^[15]。配置不同浓度的蜂胶提取液及V_c为样品,由图6可知,蜂胶黄酮的浓度与对·OH的清除作用呈明显的量-效关系,清除效果随着蜂胶提取液浓度的增加而增强。由图6可

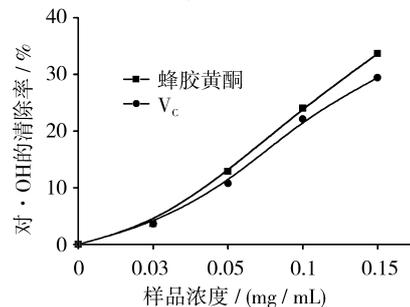


图6 蜂胶黄酮和V_c对·OH的清除率

知,蜂胶黄酮对羟基自由基的清除率与 V_c 近似。在浓度为 0.15 mg/mL 时,蜂胶黄酮对羟基自由基的清除率达到 35%,而同浓度下 V_c 对羟基自由基的清除率为 30%,即蜂胶黄酮对羟基自由基的清除效果优于天然抗氧化剂 V_c 。

2.5.2 蜂胶黄酮对超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)的清除

超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)是生物体代谢产生的活性中间体之一,可在短时间内引发自由基的链式反应,产生 $\cdot OH$ 、过氧亚硝酸根等^[16]。细胞内 $O_2^- \cdot$ 的累积可以引起线粒体膜的通透性改变,导致细胞色素 C 的释放,从而诱导细胞凋亡^[17]。因此,清除 $O_2^- \cdot$ 有助于维持机体的氧化还原平衡,保证机体的代谢稳定性。

由表 4 可知,蜂胶黄酮对 $O_2^- \cdot$ 有着明显的抑制作用,并且随着蜂胶黄酮含量的增加,对 $\cdot O_2^-$ 的抑制作用明显增强。在浓度为 0.15 mg/mL 时,蜂胶黄酮对 $O_2^- \cdot$ 的清除率达到 77.7%,而同浓度下 V_c 对 $O_2^- \cdot$ 的清除率为 70.4%,即蜂胶黄酮对超氧阴离子自由基的清除效果优于天然抗氧化剂 V_c ,但差距不大。

表 4 不同浓度黄酮提取液对超氧阴离子自由基的抑制率

样品浓度 (mg/mL)	吸光度值						氧化速率($\Delta A / \Delta t$) / (A/min)	对 $O_2^- \cdot$ 的抑制率/%
	0 min	0.5 min	1.5 min	2.0 min	2.5 min	3.0 min		
0	0.176	0.202	0.229	0.251	0.273	0.304	0.054	0*
0.05	0.470	0.488	0.510	0.526	0.542	0.559	0.036	33.3
0.100	0.521	0.533	0.543	0.558	0.571	0.583	0.025	53.7
0.15	0.952	0.958	0.965	0.970	0.977	0.982	0.012	77.7
0.05(V_c)	0.435	0.456	0.475	0.493	0.516	0.538	0.042	22.2
0.100(V_c)	0.514	0.528	0.541	0.556	0.569	0.583	0.028	48.1
0.15(V_c)	0.853	0.861	0.870	0.878	0.887	0.890	0.016	70.4

注: * 为参照组数据,即为公式中的分母组。

3 结论

影响蜂胶黄酮提取率的主次影响因素为:料液比 > 乙醇浓度 > 超声时间 > 提取温度,最佳提取工艺组合为 $A_2 B_2 C_2 D_2$, 即料液比 1:30、乙醇浓度 80%、提取温度 50 °C、超声时间 20 min,在该工艺条件下,蜂胶黄酮的提取率为 9.60%。

蜂胶黄酮对羟基自由基和超氧阴离子自由基具有较好的抑制作用,其抑制效果随蜂胶黄酮浓度的

增加而增强。在浓度为 0.15 mg/mL 时,蜂胶黄酮对 $\cdot OH$ 和 $O_2^- \cdot$ 的清除率分别达到了 35% 和 77.7%,同浓度下 V_c 对 $\cdot OH$ 和 $O_2^- \cdot$ 的清除率分别为 30% 和 70.4%,表明蜂胶黄酮的抗氧化效果优于天然抗氧化剂 V_c 。

参考文献:

- [1] 杨兆起,封秀娥. 中药鉴别手册:第三册[M]. 北京:科学出版社, 1994:102.
- [2] 崔庆新,刘国富. 蜂胶乙醇提取物化学成分的 GC/MS 研究[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(6):36-38.
- [3] 蒋春红,吕武清,胡裳洪. 蜂胶的药理作用研究概况[J]. 中国医药指南,2011,9(17):42-43.
- [4] Chen Y F, Li Y, Wang Y W, et al. Berberine improves free fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes through inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor and fatty acid transferase expressions[J]. Metabolism, 2009, 58(12):1694-1702.
- [5] 谢国芳,刘春梅,曹长靓,等. 基于响应面分析方法蜂胶总黄酮提取条件的优化[J]. 粮油加工,2010,(8):156-160.
- [6] 朱丹,袁芳,孟坤. 黄酮类化合物的研究进展[J]. 中华中医药杂志,2007,22(6):387-389.
- [7] 乌兰格日乐,白海泉,翁慧. 黄酮的抗氧化活性进展[J]. 内蒙古民族大学学报,2008,23(3):277-280.
- [8] 李红军. 银杏叶中黄酮类化合物的提取及其体外抗氧化活性研究[J]. 北方园艺,2013,(5):156-159.
- [9] 马燕妮,张清华,刘玉红,等. 桑叶黄酮与鬼针草黄酮组分伍抗氧化协同作用研究[J]. 食品与药品,2013,15(3):160-161.
- [10] 张凯妮,沈艳婷,张长峻. 蜂胶黄酮超声提取工艺的正交优化及不同地域蜂胶黄酮含量的比较[J]. 安徽农业科学,2014,42(17):5610-5613.
- [11] 蔡碧琼,蔡珠玉,张福娣,等. 稻壳中黄酮提取物的抗氧化性质研究[J]. 江西农业大学学报,2010,32(4):813-818.
- [12] 高旗,张竞怡,宁敏敏,等. 微波提取陕南名茶中总黄酮的工艺研究[J]. 河北农业科学,2011,15(1):154-157.
- [13] 何文兵,夏光辉,刘欢. 野生水芹总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性[J]. 北方园艺,2015,(1):122-127.
- [14] 何文英,杨英,刘微,等. 苦豆籽粕总黄酮的提取及定性检测[J]. 内蒙古农业大学学报,2013,34(2):152-155.
- [15] 吴文林,胡天喜. 几种黄酮类化合物对羟自由基引起的 DNA 损伤的保护作用[J]. 自由基生命科学进展,1997,(5):101-104.
- [16] Buetler T M, Krauskopf A, Ruegg U T. Role of superoxide as a signaling molecule[J]. Physiology, 2004, 19(3):120-123.
- [17] Shen H M, Yang C F, Ding W X, et al. Superoxide radical initiated apoptotic signaling pathway in selenite-treated HepG2 cells; mitochondria serve as the main target[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2001, 30(1):9-21. 