

## 温浸醇提除蜡蜂胶总黄酮的工艺研究

梁宝军<sup>1</sup>, 陈绍民<sup>2</sup>, 田景振<sup>1\*</sup>

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东省食品药品监督管理局, 济南 250013)

[摘要] 目的: 确定温浸醇提除蜡蜂胶总黄酮的最佳工艺。方法: 将粗蜂胶水提除去蜂蜡, 对除蜡蜂胶进行提取。以蜂胶总黄酮的收率为指标, 在单因素实验基础上用正交实验进行工艺参数的优化, 获得最佳提取工艺。结果: 最佳提取工艺条件为: 冷浸时间 1 h, 提取溶剂为 80% 的乙醇溶液, 料液比 1:12, 提取时间 1 h, 提取温度 60℃, 提取 2 次。结论: 该工艺稳定, 可行, 节能, 生产周期短, 提取效率高, 适于工业化生产。

[关键词] 蜂胶; 总黄酮; 蜂蜡; 正交实验; 提取

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0015-04

## Study on Extraction Process of Total Flavonoids from Dewaxed Propolis with Ethanol by Warm-immersion

LIANG Bao-jun<sup>1</sup>, CHEN Shao-min<sup>2</sup>, TIAN Jing-zhen<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;  
2. Shandong Food and Drug Administration, Jinan 250013, China)

**[Abstract] Objective:** To determine the optimum extraction process of total flavonoids from dewaxed propolis with ethanol by warm-immersion. **Method:** Removed bee wax with water from raw propolis before extraction. With total flavonoids yield as index, based on the single factors test, orthogonal experiment was performed so as to optimize the extraction parameters. **Result:** The optimum extraction process of total flavonoids from dewaxed propolis with ethanol by warm-immersion was as follows: cold leaching for 1 h, ethanol concentration 80%, solid-liquid ratio 1:12, extracting for 1 h, extracting temperature at 60℃, extracting for 2 times. **Conclusion:** The optimum extraction process was achieved, which is stable, feasible, energy-saving, short production cycle, high extraction efficiency, suitable for industrialization.

**[Key words]** propolis; total flavonoids; bee wax; orthogonal experiment; extraction

蜂胶是蜜蜂从植物幼芽、树皮与树干裂缝上采集树脂, 并混入其上颚腺分泌物和蜂蜡加工而成的具芳香气味的胶状固体物。其具有多种药理作用, 常被制成酞、膜、片、栓、胶囊、口服液等剂型治疗多

种疾病<sup>[1]</sup>。黄酮类化合物是其最重要的组成成分和生物活性物质<sup>[2]</sup>, 多用乙醇作提取溶剂<sup>[3]</sup>。但是, 粗蜂胶中往往混杂着蜂蜡, 蜂蜡会微溶于乙醇, 影响蜂胶黄酮的提取、分析测定, 并且食用后不被人体吸收, 故应先去除蜂蜡<sup>[4]</sup>。目前关于蜂胶黄酮的提取工艺已有多篇文献报道, 但多是针对未除蜡粗蜂胶, 对除蜡蜂胶总黄酮的提取工艺进行研究的报道较少, 本实验对水提除蜡蜂胶中的总黄酮采用温浸醇提工艺进行了系统研究, 以期能为工业生产提供依据。

### 1 仪器与试剂

BS110S 型电子天平(北京赛多利斯天平公司), UV3010 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),

[收稿日期] 20100411(001)

[第一作者] 梁宝军, 中药师, 现为山东中医药大学在读硕士研究生, 主要从事中药制剂的研究工作。Tel: 0531-89628597, E-mail: lbjzhz@sina.com

[通讯作者] \* 田景振, 博士学位, 现为山东中医药大学药学院教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型、新技术的研究工作。Tel: 0531-89628597, E-mail: tianjingzhen@163.com

LD4-2A 型低速离心机(北京医用离心机厂)。

粗蜂胶购自河南蜂源蜂产品有限公司,经本校生药教研室周凤琴教授鉴定。芦丁对照品购自中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707;水为去离子重蒸水,乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 水提除蜡<sup>[5]</sup>** 粗蜂胶挑除杂质后,低温冷冻过夜,粉碎,过 20 目筛,按料液比 1:8( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )加水于烧杯内,70℃水浴保温,搅拌下加入粗蜂胶,加热保温 40 min,不断搅拌,使蜂蜡析出。取出烧杯静置过夜,将上层凝固的蜂蜡取出,蜂蜡得率为 30.11%。将水提液和除蜡蜂胶分离,测定水提液中黄酮质量分数为 1.16%(以已处理待除蜡粗蜂胶计)。收集下层除蜡蜂胶,低温冷冻过夜,再次粉碎,过 20 目筛,晾干,备用。

**2.2 标准曲线的绘制<sup>[6-7]</sup>** 精密称取在 120℃干燥至恒重的芦丁对照品 25 mg,置 50 mL 量瓶中,加乙醇适量,超声处理使溶解,放冷,加乙醇至刻度,摇匀。然后精密量取 20 mL,置 50 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得对照品溶液。精密量取对照品溶液 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mL,分别置 25 mL 量瓶中,各加水至 8 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 4.3% 氢氧化钠溶液 10 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂为空白,用紫外-可见分光光度法,在 440~700 nm 进行全波长扫描,结果在 510 nm 处有最大吸收,因此选择 510 nm 为检测波长。以吸光度(A)为纵坐标,浓度  $C(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$  为横坐标,绘制标准曲线。得到回归方程  $A = 10.513C - 0.0501$ ,  $R^2 = 0.9993$ ,芦丁在 0.016~0.064  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  线性关系良好。

**2.3 蜂胶总黄酮的提取与测定** 准确称取除蜡蜂胶 1 g,用一定浓度的乙醇溶液在适当料液比条件下冷浸,然后温浸提取,提取液离心( $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 10 min,放冷后过滤于 100 mL 量瓶中,相同条件下提取一定次数,用相应浓度的乙醇溶液定容至刻度。精密量取上述溶液一定量置于 25 mL 量瓶中,使吸光度在线性范围之内,照 2.2 项下的方法,自“加水至 8 mL”起依法测定吸光度。代入回归方程计算总黄酮的含量,并计算总黄酮的收率。总黄酮收率 = (黄酮类化合物的质量/除蜡蜂胶质量)  $\times 100\%$ 。

## 2.4 单因素实验

**2.4.1 乙醇体积分数对总黄酮收率的影响** 在恒定提取温度 60℃,提取时间 4 h,料液比 1:10,提取 2 次的条件下,分设 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 共 6 个浓度梯度进行提取,计算蜂胶总黄酮的收率(图 1)。由图 1 可知,随着乙醇体积分数的增加,总黄酮的收率增加,至 80% 时总黄酮收率最高,但随着乙醇体积分数的继续增加,总黄酮的收率有下降的趋势,因此最佳乙醇体积分数为 80%。

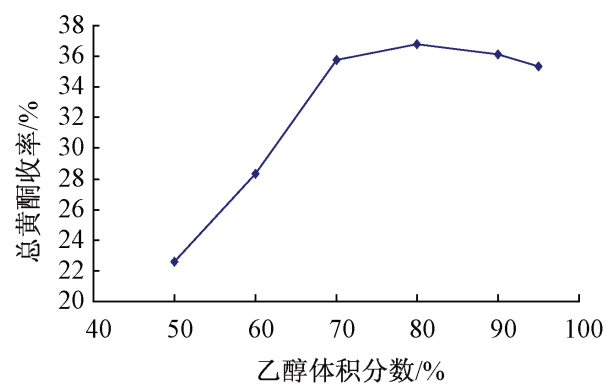


图 1 乙醇浓度对总黄酮收率的影响

**2.4.2 料液比对总黄酮收率的影响** 在恒定乙醇体积分数 80%,提取温度 60℃,提取时间 4 h,提取 1 次的条件下,分设 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:14 共 6 个溶剂倍量进行提取,计算蜂胶总黄酮的收率(图 2)。由图 2 可知,随着料液比的增加,总黄酮收率起初增加缓慢后迅速提高,当料液比为 1:12 时总黄酮收率最高。

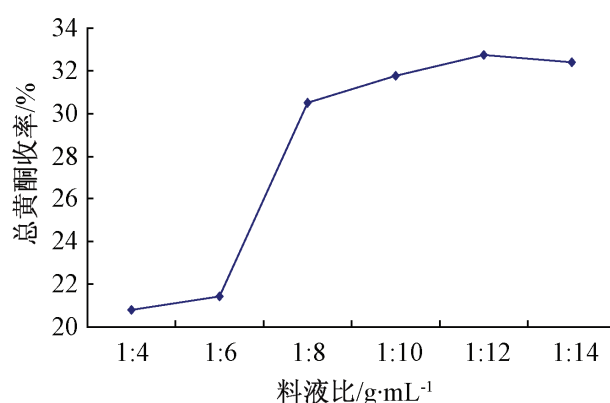


图 2 料液比对总黄酮收率的影响

**2.4.3 提取时间对总黄酮收率的影响** 在恒定乙醇体积分数 80%,提取温度 60℃,料液比 1:12,提取 1 次的条件下,分设 0.5, 1, 2, 3, 4, 8 h 共 6 个提取时间进行提取,计算蜂胶总黄酮的收率(图 3)。由图 3 可知,随着提取时间的增加,总黄酮收率迅速提高,1 h 达到峰值,其后随时间的延长总黄酮收率缓慢降低,然后趋于平稳,因此最佳提取时间为 1 h。

**2.4.4 提取温度对总黄酮收率的影响** 在恒定乙醇体积分数 80%,提取时间 4 h,料液比 1:12,提取 1 次的条件下,分设 40, 50, 60, 70, 80, 90℃ 共 6 个提

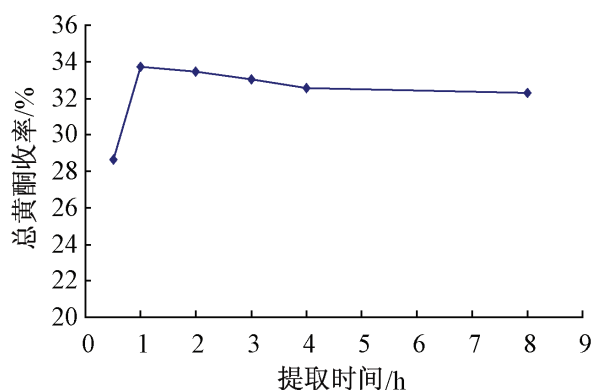


图 3 提取时间对总黄酮收率的影响

取温度进行提取, 计算蜂胶总黄酮的收率(图 4)。由图 4 可知, 总黄酮收率随着温度的升高逐渐增加, 在 70 时最高, 其后开始下降, 因此选定 70 为最佳提取温度。

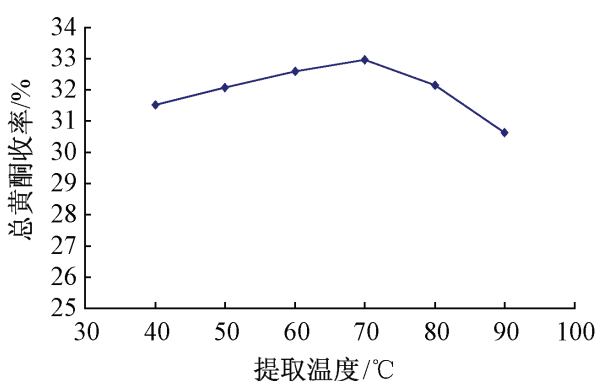


图 4 提取温度对总黄酮收率的影响

**2.4.5 冷浸时间对总黄酮收率的影响** 在恒定乙醇体积分数 80%, 提取时间 1 h, 料液比 1:12, 提取 2 次的条件下, 分设 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 h 共 7 个冷浸时间进行提取, 计算蜂胶总黄酮的收率(图 5)。由图 5 可知, 总黄酮收率随着冷浸时间的增加而升高, 在 1 h 后趋于平稳, 因此确定冷浸时间为 1 h。

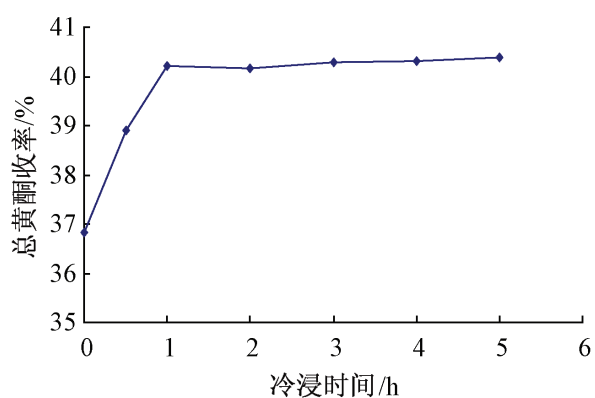


图 5 冷浸时间对总黄酮收率的影响

**2.4.6 提取次数对总黄酮收率的影响** 在恒定乙醇体积分数为 80%, 提取温度为 60, 提取时间为 1 h, 料液比为 1:12 的条件下, 分设 1, 2, 3, 4 共 4 个提取次数进行提取, 计算蜂胶总黄酮的收率(图 6)。由图 6 可知, 提取 2 次即可将总黄酮提取完全, 因此确定提取 2 次。

**2.5 正交试验** 参考文献<sup>[8]</sup>选择乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度为考察因素, 结合单因素试验结果及有关文献<sup>[9-10]</sup>选择各因素水平, 采用 L<sub>9</sub>

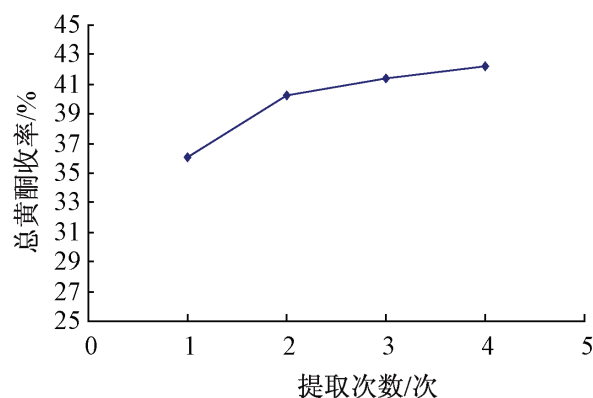


图 6 提取次数对总黄酮收率的影响

(3<sup>4</sup>) 正交表考察最佳提取工艺条件。正交实验因素及水平安排见表 1, 正交实验结果见表 2, 方差分析结果见表 3。

表 1 因素水平

水平	A	B	C	D
	乙醇/%	料液比/g·mL <sup>-1</sup>	提取时间/h	提取温度/
1	70	1:8	1	50
2	80	1:10	2	60
3	90	1:12	3	70

表 2 正交试验结果

No	A	B	C	D	总黄酮收率/%
1	1	1	1	1	36.51
2	1	2	2	2	37.51
3	1	3	3	3	38.66
4	2	1	2	3	37.18
5	2	2	3	1	38.35
6	2	3	1	2	40.23
7	3	1	3	2	37.27
8	3	2	1	3	38.88
9	3	3	2	1	37.74
K <sub>1</sub>	112.68	110.96	115.62	112.60	
K <sub>2</sub>	115.76	114.74	112.43	115.01	
K <sub>3</sub>	113.89	116.63	114.28	114.72	
R	1.03	1.89	1.06	0.80	

表 3 方差分析结果

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	1.605	2	0.803	1.391	>0.05
B	5.557	2	2.778	4.815	>0.05
C	1.710	2	0.855	1.482	>0.05
D(误差)	1.154	2	0.577	1.000	

注: F<sub>0.05</sub>(2, 2) = 19.00。

由表 2 极差分析得知, 各因素的影响程度大小为 B > C > A > D, 即料液比 > 提取时间 > 乙醇体积

分数 > 提取温度, 所以最优工艺组合为:  $A_2 B_3 C_1 D_2$ 。表 3 方差分析结果显示, 各因素对总黄酮收率均无显著性影响。由于蜂胶资源稀缺珍贵, 从充分提取其有效成分、发挥其最大效用的角度考虑, 最优工艺组合仍确定为  $A_2 B_3 C_1 D_2$ , 故而得到水提除蜡蜂胶总黄酮的最佳提取工艺条件: 冷浸时间 1 h, 提取溶剂 80% 的乙醇溶液, 料液比 1:12, 提取时间 1 h, 提取温度 60℃, 提取 2 次。

**2.6 验证试验** 准确称取除蜡蜂胶 3 份, 每份 1 g, 按得到的最佳工艺条件进行提取, 测得总黄酮收率分别为 40.18%, 40.37%, 40.22%, 平均为 40.26%, RSD 0.22%, 说明该工艺稳定可行。

**2.7 除蜡效果对比试验** 准确称取已处理待除蜡粗蜂胶, 按得到的最佳工艺条件进行提取, 测得总黄酮收率为 21.04% (以已处理待除蜡粗蜂胶计)。

### 3 讨论

蜂胶总黄酮的提取方法有冷浸法、温浸法、超声法、微波法、超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法等, 考虑到目前国内生产现状, 并且温浸法比冷浸法提取效率高, 生产周期短, 故本实验采用温浸法。

水提除蜡工艺脱蜡效果较好, 与文献报道一致, 此法操作简单, 不使用有机溶剂, 安全不污染环境, 生产成本低, 水提温度低对蜂胶中的活性成分影响相对较小。粗蜂胶除蜡后再进行提取, 总黄酮收率大大增加, 并且便于过滤等后续操作。

除蜡蜂胶在提取总黄酮前经过冷浸, 可提高提取效率, 节约能源。本实验得到的最佳工艺条件与文献<sup>[11-12]</sup> 不尽一致。

最佳工艺条件中的提取温度 (60℃) 与单因素试验得到的提取温度 (70℃) 不一致, 为此在最佳工艺其他条件固定不变的情况下对二者进行考察, 结果后者总黄酮收率为 39.02%, 稍低于按最佳工艺

进行提取得到的总黄酮收率 40.26%。

水提除蜡工艺与本实验得出的最佳提取工艺联用, 具有环保安全、经济节能、提取效率高、生产周期短等优点, 适于工业化生产。

### [参考文献]

- [1] 于英君, 李淑华, 郭丽新. 蜂胶的生物活性及临床应用 [J]. 中医药信息, 2002, 19(1): 27.
- [2] 张翠平, 胡福良. 蜂胶中的黄酮类化合物 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(6): 1084.
- [3] 张云香, 杨志孝, 安蔚, 等. 不同溶剂对蜂胶黄酮提取率影响的研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(1): 9.
- [4] 杨芙蓉, 王伟娜. 蜂胶总黄酮半仿生提取工艺研究 [J]. 粮食与油脂, 2009(5): 42.
- [5] 魏强华, 张继平, 刘润好, 等. 蜂胶水提除蜡工艺的研究 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(5): 72.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 23.
- [7] 薛晓丽, 李林. 紫外-可见分光光度法测定蜂胶胶囊中总黄酮含量的探讨 [J]. 吉林农业科技学报, 2009, 18(2): 4.
- [8] 林红景, 吴小娟, 唐前, 等. 正交实验优选南山茶子总黄酮的最佳提取工艺 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2616.
- [9] 杨林莎, 王东. 蜂胶提取工艺的研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(2): 135.
- [10] 王萍, 张宁, 白智华, 等. 正交设计优选蜂胶提取工艺研究 [J]. 陕西中医学院学报, 2005, 28(1): 34.
- [11] 徐颖, 赵小卫, 顾岚, 等. 蜂胶中黄酮类化合物提取工艺的优化 [J]. 农产品加工·学刊, 2006(4): 14.
- [12] 张利, 戴晶晶, 曾凡骏. 蜂胶总黄酮的提取最佳工艺研究 [J]. 四川食品与发酵, 2008, 44(4): 30.

[责任编辑 仝燕]