

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2010.05.006

蜂胶总黄酮的提取及其紫外光度法测定

刘 君¹ 全先高¹ 马 蒙² 石振琛²

(¹ 济宁医学院基础医学与法医学院, 山东 济宁 272067; ² 济宁医学院药学院 04 级学生, 济宁 272067)

摘 要 **目的** 探讨不同提取方法对测定蜂胶中总黄酮含量的影响。**方法** 在 502nm 处, 以芦丁为标准品, 用紫外分光光度法测定不同提取方法所提取的蜂胶中总黄酮的含量。**结果** 测得工作曲线的回归方程为 $A = 0.01149C + 0.00772$, 线性相关系数 $R = 0.9997$, 表明芦丁浓度在 $8\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ 范围内, 与吸光度呈良好的线性关系。精密度 $\text{RSD}\% = 0.02 (n=6)$, 回收率为 $99.92\% (n=4)$ 。**结论** 超声提取法的提取率要比甲醇索氏提取法的提取率高, 且方法简便易行。

关键词 蜂胶; 总黄酮; 提取; 紫外分光光度法; 芦丁

中图分类号: O657.32 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)10-321-03

Study on the extract of total flavones in propolis

LIU Jun, QUAN Xian-gao, MA Meng, et al

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract; Objective To explore the effect of different extraction methods on the content of total flavones from propolis. **Methods** Using Rutin as standard material, a UV determination method was studied the content of total flavones extracted from propolis at 502nm. **Results** The linear regression equation of the UV determination method is $A = 0.01149C + 0.00772$. The precision ($\text{RSD}\%, n=6$) is 0.02 and the recovery is $99.92\% (n=4)$. **Conclusion** The ultrasonic extraction method is better than methanol Soxhlet extraction method. The ultrasonic extraction method was simple, effective and practical, and could be used to determine the content of total flavones from propolis when necessary.

Key words: Propolis; Total flavones; Extraction; UV; Rutin

近年来研究者对蜂胶的药理活性及化学成分进行了全面的研究, 发现蜂胶具有广泛的药理活性: 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生物活性作用^[1-2]。蜂胶中的活性成分主要是黄酮类化合物^[3]。《中华人民共和国药典》2005 版一部收录了蜂胶药材, 作为抗菌消炎、调节免疫中药应用^[4]。蜂胶总黄酮的含量已成为判定蜂胶产品质量的标志性物质之一^[5], 而提取方法是影响蜂胶总黄酮含量的重要因素之一。

蜂胶的提取工艺研究报道较多^[6], 王小平^[5]等的研究表明, 与药典法比较, 甲醇索氏提取法简便、省时、经济, 在测定总黄酮的含量时可以考虑用甲醇索氏提取法来代替药典法。胡福良^[7]综述了蜂胶的乙醇提取法、水提法、油提法等, 认为醇提法不

仅后续处理简单, 而且效率较其他方法高。本研究选取甲醇索氏提取法和超声波提取法对蜂胶中的总黄酮进行提取研究, 用紫外分光光度法分别测定所提取的蜂胶中总黄酮的含量。为蜂胶的提取工艺研究及其含量测定提供有价值的参考数据, 为蜂胶产品资源开发及品质评价提供依据。

1 仪器与试剂

UN-1901 紫外分光光度计(日本岛津公司)、电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、DF-1 恒温磁力搅拌器(上海梅香仪器有限公司)、KQ2200 型超声波发生器(昆山市超声仪器有限公司)、玻璃仪器气流烘干器(巩义市英峪予华仪器厂)、KDM 电子调温电热套(龙口市先科仪器公司)、真空恒温干燥箱。

芦丁标准品(上海友思生物技术有限公司)、蜂

* [基金项目] 济宁市科技局立项项目

△ [通信作者] 刘君, E-mail: liujzh-0@163.com

胶(济宁市蜂业协会提供)、95%乙醇(分析纯)、甲醇(分析纯)、 NaNO_2 溶液、 AlCl_3 溶液。

2 方法与结果

2.1 蜂胶中总黄酮的提取

2.1.1 蜂胶的预处理 将蜂胶在冰柜中冷冻 48h 后用粉碎机粉碎,过 40 目筛,放入干燥器中至恒重,密封后再置冰柜中冷冻 4h 后称重。

2.1.2 甲醇索氏提取法 精密称取蜂胶 1.0g,置于索氏提取器中,加 100ml 甲醇,加热回流至提取液无色,提取液转移至 100ml 容量瓶中,加甲醇至刻度。再精密吸取 4ml,置 10ml 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,待测。平行提取 3 次。

2.1.3 超声波提取法 精密称取 1.0g 蜂胶样品于 250ml 锥形瓶中,加入 70%乙醇 100ml 振摇后,在超声波发射器上超声提取 20min,取出静置 0.5h,再超声处理 20min,取出静置后过滤,用 70%乙醇定溶于 100ml 容量瓶中。再精密吸取 4ml,置 10ml 容量瓶中,加 70%乙醇稀释至刻度,摇匀,待测。平行提取 3 次。

2.2 蜂胶中总黄酮含量的测定

2.2.1 测定波长的选择与标准曲线的制备 取 70%乙醇 6ml,加 50g/L 亚硝酸钠溶液 1ml,摇匀,加 100g/L 三氯化铝 1ml,摇匀,加 40g/L 氢氧化钠溶液 10ml,摇匀,放置 15min,作为空白对照液。在芦丁标准品和蜂胶提取液中加入与空白对照液相同的试剂,用紫外分光光度计在 400nm~600nm 范围内进行波谱扫描。结果表明两溶液在 502nm 处有最大吸收,故以 502nm 为测定波长(图 1,图 2)。

精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 0.0201g,用 70%乙醇溶解,定容至 100ml 容量瓶中。吸取溶液 1、2、3、4、5、6ml,分别置 25ml 容量瓶中,加入与上述空白对照液相同的试剂,加乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15min。以上述空白对照液作空白,用紫外分光光度计在波长 502nm 处分别测定其吸光度。

以吸光度为纵坐标与浓度为横坐标作图,得芦丁标准品的工作曲线(图 3),该工作曲线的回归方程为 $A = 0.01149C + 0.00772$ (A: 吸光度、C: 浓度),线性相关系数 $r = 0.9997$,表明芦丁浓度在 $8\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ 范围内,与吸光度呈良好的线性关系。

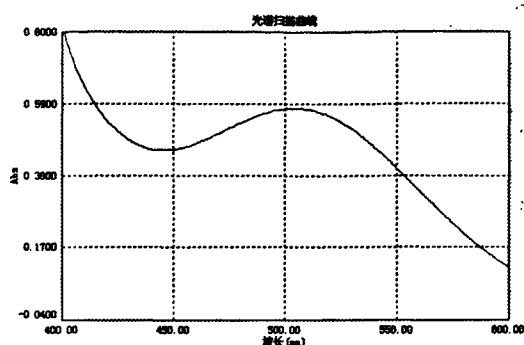


图 1 芦丁标准品的紫外扫描

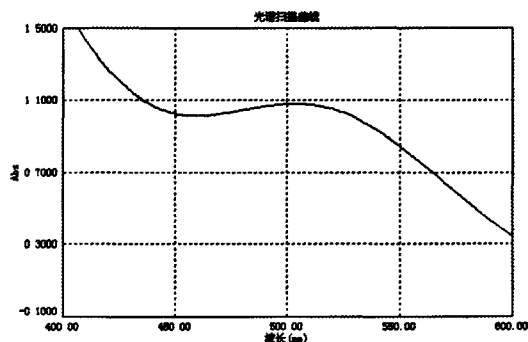


图 2 蜂胶提取液紫外光谱扫描

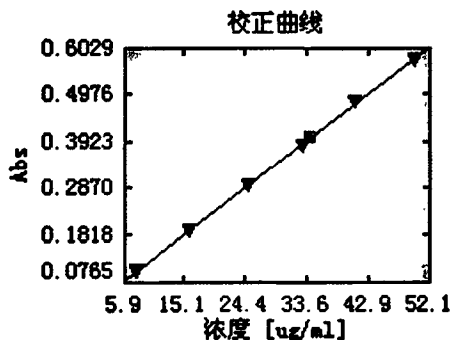


图 3 芦丁标准曲线

2.2.2 蜂胶中黄酮含量的测定 精确移取蜂胶醇溶液 1ml,置 25ml 容量瓶中,加 70%乙醇至 6ml,加 50g/L 亚硝酸钠溶液 1ml,摇匀,加 100g/L 三氯化铝 1ml,摇匀,加 40g/L 氢氧化钠溶液 10ml,摇匀,用 70%乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15min;以上述空白对照液作空白;在波长 502nm 处测定吸光度,据标准曲线的回归方程可得蜂胶样品中总黄酮的含量。3 次平行测定的结果见表 1。

表 1 不同提取方法黄酮含量(n=3)

提取方法	甲醇索氏提取法	超声波提取法
总黄酮含量(%)	20.99%	28.23%

(下转第 353 页)

能力评价偏低,尤其女性老人及单身老人,常常有意识地缩小日常活动和社会交往范围,情绪性孤独与社会性孤独并存,因而引发抑郁症状。通过调查了解,经济状况能否保障将来的生活和就医是老年人担忧的问题。经济状况差的老年人,可能累积较多的负性情绪,导致抑郁症状发生。

Logistic 回归结果表明,老年人抑郁症状主要危险因素依次为孤独感觉、健康状况自我评价、经济状况、女性。年龄并非是老年人抑郁症状的危险因素,与有关研究结果一致^[2,6],年龄可能是通过健康、社会支持等因素起作用。

关于文化程度与老年人抑郁症的发生是否存在相关关系,国内外研究结果并不一致^[1-3,7]。本文调查结果并不支持受教育年限是老年人抑郁症的危险因素。另外,本文也没有发现独居老人抑郁症状阳性率高于非独居老人,与有关文献报道不符^[2,4]。可能是由于独居老人样本量不够大有关。因此关于本地区老年人抑郁症状评分的相关

影响因素,需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 陈立新,陈功,郑晓璇. 北京城市丧偶老人抑郁症状及其影响因素分析[J]. 中国老年学杂志,2008,28:696-699.
- [2] 袁群,何国平,冯辉. 长沙市社区老年人抑郁症状影响因素分析[J]. 中国老年学杂志,2010,30:746-748.
- [3] 陈彬,罗维武,施光铸,等. 福州市老年人抑郁症状检出率及相关因素分析[J]. 福建医药杂志,2010,32(1):24-27.
- [4] 桂全林,王素芬,兰勇. 四川省农村丧偶老人抑郁症状及其影响因素的调查分析[J]. 临床和实验医学杂志,2010,9(13):1004-6.
- [5] 郭爱妹, Daniel W. L. Lai. 老年人抑郁症状的城乡比较研究[J]. 山东师范大学学报(人文社会科学版),2011,56(1):106-110.
- [6] 唐丹. 城乡因素在老年人抑郁症状影响模型中的调节作用[J]. 人口研究,2010,34(3):53-63.
- [7] 季坚,张华,耿青. 老年抑郁状态与日常生活能力的相关性分析[J]. 中国健康心理学杂志,2007,15(11):1031-2.

(收稿日期 2011-09-15)

(上接第 322 页)

2.3 方法学研究

2.3.1 精密度试验 取在标准曲线线性范围内的蜂胶提取液,按照与测定芦丁标准曲线相同的条件测定其吸收强度。平行测定 6 次(0.4202;0.4204;0.4204;0.4205;0.4204;0.4202),其 RSD% 为:0.02%。

2.3.2 回收率试验 精密吸取 0.08mg/ml 的芦丁标准液 0.50,0.50,0.50,0.50ml 置于 10ml 的容量瓶中,分别对应吸取 0.06mg/ml 的蜂胶提取液 0.50,0.50,0.50,0.50ml,加 50g/L 亚硝酸钠溶液 0.5ml,加 100g/L 三氯化铝 0.5ml,加 40g/L 氢氧化钠溶液 2ml,用 70% 乙醇水溶液稀释至刻度,与测定芦丁标准曲线相同的条件测定其吸收强度,并计算其回收率,其回收率为:99.96%(n=4)。

3 结论

建立了以芦丁为标准品,在 502nm 处,用紫外分光光度法测定蜂胶提取液中总黄酮的含量的方法。该法回收率高,重现性好,方法简便,数据可靠,适用于蜂胶中总黄酮的含量测定以及一些天然产物中黄酮类化合物的测定。

通过采用两种不同的方法提取蜂胶中的总黄酮,得出超声提取法比甲醇索氏提取法的提取总黄酮的含量高,且方法简便易行。牟兰等^[8]认为其原

因是超声波提取只需 20min,而且是在室温下进行,有利于那些对热不稳定的黄酮化合物的提取,而索氏抽提需在加热条件下回流近 7~8h,有可能对一些热不稳定的黄酮类化合物不利。由于超声波提取具有短时、快速、提取条件温和,对蜂胶中的挥发性物质的破坏小的特点,预示着它在蜂胶提取中有着良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Shiva M, Mohammad S, Manoochehr H, et al. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Irania propolis[J]. Food Chemistry, 2007, 103:1097-1103.
- [2] Bankova V S, Solang E, Marcucci M C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin[J]. Apidologie, 2000, 31:3-15.
- [3] 王贻节. 蜜蜂产品学[M]. 北京:农业出版社,1995:289.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2005:246.
- [5] 王小平,林励,肖凤霞. 不同提取方法对测定蜂胶产品总黄酮含量的影响[J]. 广州中医药大学学报,2007,24(3):238-240.
- [6] Gomez-Caravaca A M, Omez-Romero M G, Arraez-Romand, et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41:1220-1234.
- [7] 胡福良. 蜂胶的抗菌作用及其在医药上的应用[J]. 养蜂科技, 2000, (3):23-25.
- [8] 牟兰,曾喙,王海燕. 荧光光度法测定蜂胶中黄酮[J]. 光谱实验室, 2001, 18(2):252-254.

(收稿日期 2011-09-15)