

蜂胶提取物制备工艺研究

吕武清¹, 文萍¹, 姚剑平¹, 范婷婷¹, 胡棠洪², 俞建辉³, 李淑岚³

1. 江西省中医药研究院, 江西 南昌 330046

2. 江西省保健品协会, 江西 南昌 330046

3. 江西汪氏蜜蜂园有限公司, 江西 新建 330100

摘要: 目的 优化蜂胶提取物制备工艺。方法 以浸膏得率, 总黄酮、白杨素、乔松素和高良姜素质量分数为指标, 采用单因素和正交试验, 比较不同提取方法、提取溶剂、提取次数、提取时间、溶剂用量对蜂胶提取物制备工艺的影响。结果 蜂胶提取物最佳工艺: 蜂胶冷藏后粉碎, 加 5 倍量 95%乙醇浸渍(加搅拌)提取 4 h, 滤过, 回收乙醇, 浓缩、干燥。结论 优化后的蜂胶提取物制备工艺简单、合理, 适于进一步推广应用。

关键词: 蜂胶提取物; 提取工艺; 总黄酮; 白杨素; 乔松素; 高良姜素

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)06-0791-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.010

Preparation technology of propolis extract

LV Wu-qing¹, WEN Ping¹, YAO Jian-ping¹, FAN Ting-ting¹, HU Tang-hong², YU Jian-hui³, LI Shu-lan³

1. Jiangxi Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330046, China

2. Jiangxi Province Health Products Association, Nanchang 330046, China

3. Jiangxi Schwann Bee Park Co., Ltd., Xingjian 330100, China

Abstract: Objective To establish the preparation technology of propolis extract. **Methods** With the contents of total flavonoids, chrysin, pinocembrin, and galangin and extract yield as evaluation indexes, the extraction methods, extraction solvent, extraction times, extraction time, and amount of solvent extraction were optimized with single factor test and orthogonal design to investigate the effect on the preparation technology of propolis extract. **Results** The optimal extraction technology was that propolis was refrigerated, grinded, soaked with 95% five times the amount of ethanol, shaken, then extracted for 4 h, filtrated, concentrated, and dried after ethanol recovery. **Conclusion** The optimal extracting technology of propolis is stable and feasible, and suitable for further application.

Key words: propolis extract; extracting technology; total flavonoids; chrysin; pinocembrin; galangin

蜂胶是蜜蜂采集植物幼芽及树干的分泌物, 混合其自身上颚腺、蜡腺的分泌物而形成的胶状物质。主要含黄酮类、萜烯类、酚类等化合物^[1]。其总黄酮用于抗菌消炎、调节免疫、抗氧化、高脂血症和糖尿病的辅助治疗^[2-3]。蜂胶提取物的制备工艺文献报道有回流法^[4]、超声法^[5]、浸渍法^[6]等。蜂胶提取物国标 GB/T 24283-2009 中仅有简单感官和理化指标要求, 无工艺控制过程, 制备工艺和质量控制不合理造成资源浪费。本实验以浸膏得率, 总黄酮、白杨素、乔松素和高良姜素质量分数为指标, 采用

单因素和正交试验, 比较不同提取方法、提取溶剂、提取次数、提取时间、溶剂用量对蜂胶提取物制备工艺的影响, 系统地研究蜂胶提取物的制备工艺, 为蜂胶的合理利用和标准制定提供依据。

1 仪器与材料

Waters 1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, 包括 2487 紫外检测器, 2707 自动进样器, Empower-2 色谱工作站); UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津), TU-1800SPC 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), DZF 型

收稿日期: 2013-09-18

基金项目: 国家食品药品监督管理局科技计划(食药监许函[2011]212)

作者简介: 吕武清, 男, 研究员, 硕士生导师, 从事中药新药及质量控制技术研究。Tel: (0791)88512906 E-mail: jxzyys@163.com

真空干燥箱（北京市永光明医疗仪器厂）；JJ—1 增力电动搅拌器（江苏金坛城西晓阳电子仪器厂），Simplicity™ 型超纯水系统（美国 Millipore 公司），白杨素、高良姜素、乔松素对照品（均购自中国药品生物制品检定所，批号分别为 111701-200501、111699-200501、111829-201001，质量分数均大于 99.7%），蜂胶为课题组收集云南（样品编号 16）、四川（编号 37）、江西（编号 90）、湖南（编号 142）、山东（编号 128）、河南（编号 27）、山西（编号 52）、内蒙古（编号 130）、辽宁（编号 138）、陕西（编号 1）、甘肃（编号 15）、新疆（编号 31）、浙江（编号 88）等地 13 个蜂胶样品，经江西省中医药研究院副研究员余良忠鉴定为蜜蜂 *Apis cerana* Fabr. 将采自植物的枝条、叶芽及愈伤组织等的分泌物与上腭腺、蜡腺等的分泌物同少量花粉混合后所形成的黏性物质。乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取方法的选择

黄酮为蜂胶的主要成分，《中国药典》2010 年版蜂胶项下以白杨素、高良姜素作为定量控制指标，蜂胶提取物国标 GB/T 24283-2009 以总黄酮作为定量控制指标，本课题组在此基础上增加乔松素定量

测定指标并对国标总黄酮测定方法进行了修正^[7-8]。因此，提取方法选择蜂胶中浸膏得率，浸膏中总黄酮、白杨素、乔松素和高良姜素质量分数为指标进行考察。取蜂胶（编号 1，下同）冷藏，粉碎，称取 50 g 共 4 份，分别加入 95%乙醇 500 mL，按表 1 提取方法分别提取，滤过，回收乙醇，减压浓缩，真空干燥（80 ℃，-0.1 MPa）12 h。考察超声、回流、浸渍对浸膏得率的影响，并测定浸膏中总黄酮、白杨素、乔松素和高良姜素质量分数；为考察浸渍效果，增加一组浸渍提取（加搅拌），搅拌速度为 50 r/min，结果见表 1。结果显示，浸渍与浸渍加搅拌提取的得膏率、总黄酮质量分数最高，因此，采用浸渍加搅拌提取。

2.2 提取溶剂选择

提取方法结果显示，浸渍加搅拌提取效果最佳，因此，按上述方法取蜂胶，按照表 2 分别加不同体积分数乙醇提取，考察不同体积分数乙醇对浸膏得率，浸膏中总黄酮、白杨素、乔松素和高良姜素质量分数的影响，结果见表 2。结果显示，95%乙醇提取得膏率、总黄酮、白杨素、乔松素和高良姜素质量分数显著高于 75%乙醇，高于 90%乙醇，因此，采用 95%乙醇浸渍加搅拌提取。

表 1 不同提取方法测定结果

Table 1 Determination by different extraction methods

提取方法	得膏率 / %	总黄酮 / %	白杨素 / %	乔松素 / %	高良姜素 / %
超声 1 h	39.47	50.26	5.54	3.52	3.92
回流 2 h	31.38	49.97	5.72	3.64	3.83
浸渍提取 24 h	41.27	50.15	5.63	3.83	4.04
浸渍提取 24 h（加搅拌）	45.68	51.34	5.74	3.96	4.16

表 2 不同体积分数乙醇提取结果

Table 2 Extraction results by ethanol at different concentration

乙醇 / %	得膏率 / %	总黄酮 / %	白杨素 / %	乔松素 / %	高良姜素 / %
75	26.45	40.26	3.52	2.54	2.63
90	42.95	50.13	5.35	3.55	3.80
95	45.94	51.26	5.64	3.87	4.15

2.3 正交试验

单因素试验确定了 95%乙醇浸渍加搅拌提取效果最佳，选择提取时间（A）、提取次数（B）、乙醇用量（C）3 因素进行考察，每个因素设 3 个水平，按 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验设计，考察指标为取得膏率，测定干膏中总黄酮、白杨素、乔松素和

高良姜素的量。

取冷藏的蜂胶，粉碎，称取 50 g，按表 3 正交试验表设计试验，经提取、滤过，回收乙醇，浓缩，真空干燥（80 ℃，-0.1 MPa）12 h，得蜂胶提取物，比较得膏率，测定干膏中总黄酮、白杨素、乔松素和高良姜素质量分数，采用综合评分进行方差分析，

其中权重系数分别为得膏率 0.30, 总黄酮 0.25, 白杨素、乔松素、高良姜素质量分数各 0.15, 综合评分计算公式: 综合评分=浸膏得率 $\times$ 0.30+总黄酮

的量 $\times$ 0.25+白杨素的量 $\times$ 0.15+乔松素的量 $\times$ 0.15+高良姜素的量 $\times$ 0.15。正交试验设计与结果见表 3。方差分析结果见表 4。

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 3 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A/h	B/次	C/倍	D(误差)	得膏率/%	总黄酮/%	白杨素/%	乔松素/%	高良姜素/%	综合评分
1	2(1)	1(1)	4(1)	(1)	35.92	50.18	5.13	4.35	4.00	25.34
2	2(1)	2(2)	5(2)	(2)	45.35	50.10	5.52	4.43	4.54	28.30
3	2(1)	3(3)	6(3)	(3)	47.15	51.30	5.30	4.34	4.31	29.06
4	4(2)	2(2)	4(1)	(3)	41.24	51.08	5.44	4.30	4.13	27.22
5	4(2)	3(3)	5(2)	(1)	45.66	51.54	5.34	4.41	4.24	28.68
6	4(2)	1(1)	6(3)	(2)	46.33	51.95	5.40	4.34	4.20	28.98
7	6(3)	3(3)	4(1)	(2)	41.42	51.31	5.52	4.10	4.34	27.35
8	6(3)	1(1)	5(2)	(3)	44.61	50.69	5.33	4.33	4.21	28.14
9	6(3)	2(2)	6(3)	(1)	47.60	51.22	5.64	4.24	4.23	29.20
K_1	82.70	79.91	82.46	83.22						
K_2	84.88	85.12	84.72	84.63						
K_3	84.69	87.24	85.09	84.42						
R	2.18	7.33	2.63	1.41						

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.972	2	2.518	
B	9.485	2	24.573	$P<0.05$
C	1.351	2	3.500	
D(误差)	0.386	2		

$$F_{0.05}(2, 2)=19.00 \quad F_{0.01}(2, 2)=99.00$$

表 4 的方差分析表明, 因素 B 对蜂胶提取有显著性影响, 因素 A、C 对提取无显著性差异; 结合 K 值分析和实际生产, 从节约时间和生产成本考虑, 蜂胶提取物提取方法为加蜂胶 6 倍量 95%乙醇, 浸渍加搅拌提取 2 次, 每次提取 4 h。

2.4 提取次数再考察

上述实验证明, 提取次数是影响蜂胶提取物得率和总黄酮质量分数的主要因素, 但在实验和中试放大中观察到, 第 2 次提取时提取液颜色较第 1 次提取液相差甚远, 分别对 2 次提取进行考察。取冷藏的蜂胶, 粉碎, 称取 200 g, 加 6 倍量 95%乙醇, 浸渍(加搅拌)提取 4 h, 滤过(滤渣另置), 滤液减压回收乙醇, 真空干燥(80 $^{\circ}\text{C}$), 得第 1 次提取的蜂胶提取物; 滤渣加 5 倍量 95%乙醇, 同法得蜂胶第 2 次提取物; 分别计算 2 次蜂胶提取物得膏率;

结果 13 批次样品第 1 次平均得膏 95.2 g, 平均得膏率 47.6%; 第 2 次平均得膏 9.8 g, 平均得膏率 4.9%。考虑第 2 次提取增加了生产周期, 投入产出比低, 因此, 蜂胶提取最佳工艺为蜂胶冷藏, 粉碎, 加 6 倍量 95%乙醇, 浸渍(加搅拌)提取 4 h, 滤过, 回收乙醇, 减压浓缩, 真空干燥(80 $^{\circ}\text{C}$, -0.1 MPa) 12 h, 即得。

2.5 验证试验

根据优化后的提取工艺, 进行了 3 批中试放大, 结果见表 5。3 批中试放大试验表明, 所筛选提取工艺条件稳定、方法可行, 浸膏得率高, 总黄酮及白杨素、乔松素和高良姜素的量高, 适于进一步推广应用。

3 讨论

回流和超声提取得膏率、黄酮的量均低于浸渍(加搅拌)提取, 经观察, 回流和超声提取是由于加热的原因, 蜂胶在提取时溶液形成胶状, 影响了浸出, 超声提取发热程度不及回流提取, 所以得膏率、黄酮高于回流提取; 而浸渍(加搅拌)提取无发热过程, 蜂胶中的成分为溶解过程, 因此, 提取效果最佳。

蜂胶除含黄酮类等成分外, 还含一定量非活性成分蜂蜡^[9], 国内部分企业加乙醇提取后用冷藏方

表5 3批中试放大样品试验结果

Table 5 Amplified sample test of three batches of samples

样品编号	投入量 / g	得膏量 / g	得膏率 / %	总黄酮 / %	白杨素 / %	乔松素 / %	高良姜素 / %
27	1 000	516.0	51.60	57.13	5.42	4.91	3.89
88	1 000	569.0	56.90	57.65	5.23	5.01	3.95
52	1 000	609.0	60.90	52.66	6.35	4.27	4.36

法除蜡,本研究曾对冷藏除蜡效果及去除的成分进行研究,乙醇提取液冷藏后滤过,平均除蜡率为1.63%,对蜡状物中总黄酮及白杨素、乔松素、高良姜素进行测定,结果蜡状物中总黄酮质量分数平均为36.8%,白杨素、乔松素、高良姜素质量分数之和为8.4%;从冷藏实验结果分析,冷藏增加了生产周期,去除的蜡状物量少,而且蜡状物中还含有较高量的黄酮,而除蜡过程时间较长,需要配备冷藏设备,因此,不采用冷藏除蜡工艺。

参考文献

- [1] 罗照明,张红城. 中国蜂胶化学成分及其生物活性的研究 [J]. 中国蜂业, 2012, 63(2): 55-62.
- [2] 蒋春红,吕武清,胡棠洪. 蜂胶的药理作用研究概况 [J]. 中国医药指南, 2011, 9(17): 42-43.
- [3] 王凯,张江临,胡福良. 蜂胶抗炎活性及其分子机制研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2321-2329.
- [4] 顾青,张燕萍,钟立人. 蜂胶中有效成分提取工艺研究 [J]. 浙江农业学报, 2001, 13(3): 161-164.
- [5] 潘秋月,李英华,周晓红,等. 蜂胶黄酮的超声波提取工艺研究 [J]. 蜜蜂杂志, 2011, 31(12): 10-12.
- [6] 张跃,焦连庆,于敏,等. 多指标综合加权评分法优选蜂胶总黄酮提取工艺研究 [J]. 中国药师, 2012, 15(6): 759-762.
- [7] 范婷婷,文萍,姚剑平. 蜂胶总黄酮含量测定方法的探讨 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(13): 69-70.
- [8] 文萍,范婷婷,吕武清,等. RP-HPLC法测定蜂胶中乔松素、白杨素和高良姜素的含量 [J]. 中国实验方剂杂志, 2013, 19(19): 114-117.
- [9] 李彦杰,杨勇,阚健全. 蜂胶化学成分及其生物活性 [J]. 粮食与油脂, 2003, 4(12): 43-45.