

超声提取蜂胶黄酮的研究

卢燕珊¹, 彭文君², 贲永光^{1,2}

(1. 广东药科大学药学院, 广东广州 510006; 2. 中国农业科学院蜜蜂研究所农业农村部授粉昆虫生物学重点实验室, 北京 100093)

摘要: 蜂胶黄酮是蜂胶的主要活性成分, 具有抗氧化、抗菌等多种功效。优化蜂胶黄酮的超声提取工艺, 为蜂胶产品的开发与利用提供了理论依据。首先进行了单因素试验, 研究超声功率、超声时间和乙醇浓度这三个因素分别对蜂胶黄酮提取率的影响。在此基础上, 再采用响应面法优化蜂胶黄酮的超声提取条件。研究结果表明, 影响蜂胶黄酮提取率的主次因素依次是超声时间、乙醇浓度和超声功率。当超声功率为 150 W、超声时间为 16 min、乙醇浓度为 86% 时, 蜂胶黄酮提取率实际最大可达到 $21.10\% \pm 0.075\%$ ($n=3$)。经本实验分析可知, 湖北孝感蜂胶属于蜂胶中的优等品。相比于其他超声提取蜂胶黄酮的方法, 该实验的超声提取方法具有提取温度低、提取时间短的优势。

关键词: 蜂胶黄酮; 超声; 提取率; 响应面法

中图分类号: O426

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2020)-02-0190-05

DOI 编码: 10.16300/j.cnki.1000-3630.2020.02.011

Ultrasonic extraction of flavonoids from propolis

LU Yanshan¹, PENG Wenjun², BI Yongguang^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China;

2. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100093, China)

Abstract: Flavonoids are the main bioactive components in propolis, which exhibit a variety of physiological activities such as anti-oxidative and antibacterial effects. Optimization of ultrasonic extraction of propolis flavonoids will provide a theoretical basis for exploitation and utilization of propolis products. Firstly, single-factor experiments are carried out. The effects of three extraction parameters (ultrasonic power, extraction time and alcohol concentration) on extraction yield of propolis flavonoids are investigated. Secondly, based on the single-factor tests, the ultrasonic extraction conditions of flavonoids from propolis are optimized by using response surface methodology. The experimental results show that the order of factors affecting the extraction yield is extraction time, alcohol concentration and ultrasonic power. The maximum extraction yield of propolis is $21.10\% \pm 0.075\%$ ($n=3$) while ultrasonic power is 150 W, extraction time is 16 min and alcohol concentration is 86%. According to the analysis of this experiment, it is found that the propolis from Xiaogan, Hubei is identified as premium grade product in propolis. Compared with other ultrasonic extraction methods of propolis flavonoids, the ultrasonic extraction method used in this study has the advantages of lower extraction temperature and shorter extraction time.

Key words: propolis flavonoids; ultrasound; extraction yield; response surface methodology

0 引言

蜂胶是由蜜蜂采集的树脂和其腺体分泌物等形成的一种黏性胶状固体物质。蜜蜂用它来修补蜂巢, 一方面可以抵御外敌入侵, 另一方面可以抑制蜂巢内微生物的生长。蜂胶的成分极其复杂, 现已被鉴定其含有 20 大类共 300 多种成分, 主要含有

黄酮类、酚酸类、萜烯类、酯类、甾体类、氨基酸和维生素等^[1]。蜂胶的成分并非是一成不变的, 它的成分是由地理区域、采集季节、植物种类和蜜蜂种群等因素所决定的。蜂胶具有广泛的药理活性, 如抗细菌、抗真菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化活性和免疫调节作用^[2]。近年来, 蜂胶已经被广泛应用于食品工业、化妆品工业和药品工业等方面。黄酮类化合物是蜂胶的重要活性物质, 它具有抗氧化、抗微生物、抗癌和免疫调节等多种生物活性。因此, 优化蜂胶黄酮的提取工艺, 提取蜂胶黄酮的产率, 对蜂胶的开发和研究有重要的参考价值, 对工业和社会的发展有重要意义。

目前, 提取蜂胶黄酮的方法有很多种, 主要有浸渍法、加热回流法、微波提取法、超声提取法、超高压提取法和超临界 CO₂ 萃取法。浸渍法操作简

收稿日期: 2019-10-01; 修回日期: 2019-12-27

基金项目: 农业农村部授粉昆虫生物学重点实验室开放基金(2017MFNZS06)、广东省自然资源厅项目(GDOE2019A27)、广东省科技计划项目(2016A020210133)

作者简介: 卢燕珊(1993—), 女, 广东东莞人, 硕士研究生, 研究方向为天然产物超声技术。

通讯作者: 彭文君, E-mail: pengwenjun@caas.cn
贲永光, E-mail: biyongguang2002@163.com

便,但耗时长并且需要大量的溶剂;加热回流法溶剂用量较小,但操作麻烦,提取时间长,提取温度较高,活性成分易被破坏;微波提取法工艺简便,提取时间短,但是较高的提取温度容易破坏活性成分;超高压提取法和超临界 CO₂ 萃取法耗时短,耗能低,无污染,但是设备成本较高^[3]。相比于上述的提取方法,超声提取法设备简单,操作简便,耗时短,效率高,耗能低,溶剂用量较小。超声波通过机械作用和空化效应降低原材料的粒径大小,有效地破坏细胞结构,加强溶出物的传质速率,从而提高产率^[4]。

本实验以湖北蜂胶为原料,超声提取蜂胶黄酮,采用响应面法优化超声提取工艺,以期获得最佳提取工艺条件,为蜂胶黄酮资源的开发利用提供理论基础。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

实验所用材料有:蜂胶(湖北孝感蜜蜂养殖场),芦丁标准品(上海源叶生物科技有限公司),DFY-600型万能粉碎机,FA2004 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),KQ-300DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),UV-5500PC 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司),其余化学试剂均为分析纯级别。

1.2 实验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的制备

采用三氯化铝比色法测定芦丁的标准曲线^[5]。分别精密吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 的芦丁储备液(质量浓度为 0.2 mg·mL⁻¹)到 25 mL 容量瓶中,加入 5.0 mL 三氯化铝溶液(浓度为 0.1 mol·L⁻¹),然后用 95%乙醇定容。摇匀,静置 15 min 后,用紫外可见分光光度计测定其在 400 nm 波长处的吸光度。以芦丁的质量浓度(单位 mg·mL⁻¹)作为横坐标,吸光度作为纵坐标,绘制标准曲线,得到的回归方程为

$$\begin{cases} A=19.923C+0.0157 \\ R^2=0.9994 \end{cases} \quad (1)$$

式(1)中: A 为芦丁的质量浓度, mg·mL⁻¹; C 为吸光度; R 为相关系数。

1.2.2 超声提取蜂胶黄酮

将粗蜂胶放置在 -5℃ 的冰箱中冰冻 24 h 后,用万能粉碎机快速粉碎已变得硬脆的粗蜂胶并通过 20 目筛,然后将已过筛的蜂胶粉末置于冰箱中保

存。实验流程图如图 1 所示。称取 1 g 蜂胶粉末到试管中,加入一定浓度的乙醇溶液 20 mL,再将试管固定在超声清洗槽内左上角,槽内水的高度为 10 cm,试管插入水面以下 6 cm。在 40℃ 水温条件下,用设定功率的超声进行处理。结果显示,槽内水温在试验过程中变化较小,基本在 40~43℃ 范围试验可忽略温度的变化。

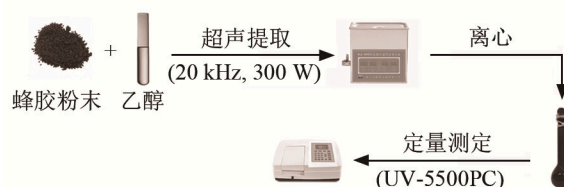


图 1 实验流程图

Fig.1 Experimental flowchart

1.2.3 蜂胶黄酮提取率的测定

超声提取后,将提取液在 4 000 r·min⁻¹ 的转速下离心 10 min,收集上清液。然后采用三氯化铝比色的方法测定蜂胶黄酮的含量。蜂胶黄酮提取率的计算公式如下:

$$Y = \frac{CV \times 10^{-3}}{M} \times 100\% \quad (2)$$

式中: Y 为蜂胶黄酮提取率, %; C 为蜂胶黄酮的质量浓度, mg·mL⁻¹; V 为提取体积, mL; M 为蜂胶的质量, g。

1.2.4 实验设计

1.2.4.1 单因素试验

探究超声功率(120、150、180、210、240 W),超声时间(1、6、11、16、21 min),乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%)分别对蜂胶黄酮提取率的影响。

1.2.4.2 响应面试验

基于单因素试验的结果,采用三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计(Box-Behnken Design, BBD)进一步优化蜂胶黄酮提取的自变量(超声功率,超声时间,乙醇浓度)^[6]。自变量的水平范围如表 1 所示,Box-Behnken 实验设计如表 2 所示。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 超声功率对蜂胶黄酮提取率的影响

实验结果如图 2a 所示。随着超声功率的增加,提取率先增加并在 180 W 时达到最大值,随后降

低。增加超声功率会加强空化效应,产生更多的空化气泡,加快传质速率,从而提高提取得率。但是超声功率太高会破坏蜂胶黄酮的结构,导致提取得率降低^[6],因此 180 W 是较佳的提取功率。

表 1 Box-Behnken 设计的因素与水平
Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	超声功率/W	提取时间/min	乙醇浓度/%
-1	120	1	50
0	180	11	70
1	240	21	90

表 2 Box-Behnken 设计的实验结果
Table 2 Experimental results of Box-Behnken design

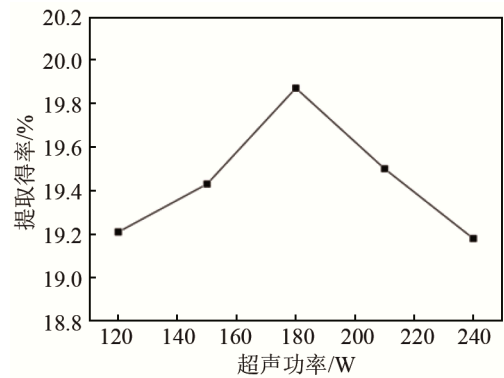
试验编号	超声功率水平	超声时间水平	乙醇浓度水平	Y/%
1	1	0	-1	18.82
2	-1	0	-1	18.63
3	0	1	1	20.70
4	0	0	0	20.30
5	1	1	0	20.09
6	-1	-1	0	16.61
7	-1	1	0	20.94
8	0	0	0	20.27
9	0	0	0	20.36
10	0	-1	1	19.07
11	0	0	0	20.43
12	1	0	1	20.93
13	0	-1	-1	15.31
14	0	1	-1	19.85
15	0	0	0	20.36
16	-1	0	1	20.53
17	1	-1	0	18.44

2.1.2 超声提取时间对蜂胶黄酮提取得率的影响

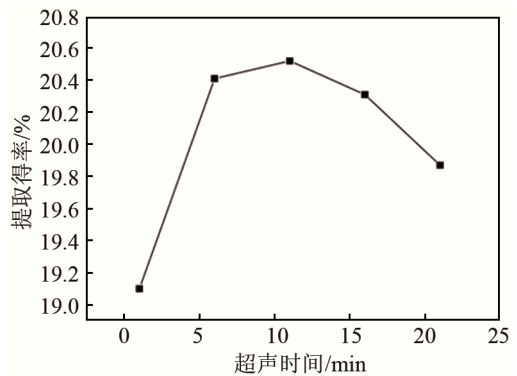
实验结果如图 2(b)所示。逐渐增加超声提取时间,提取得率先快速地增加并在 11 min 时达到最大值,然后缓慢地降低。由超声波产生的空化气泡在急剧崩溃破灭时会释放出很大的能量,这些能量不仅使细胞破裂,而且在固液界面上产生湍流振动,从而加快传质速率,提高提取得率。超声时间过长可能会导致蜂胶黄酮的分解,造成提取得率降低^[7]。因此 11 min 是较合适的提取时间。

2.1.3 乙醇浓度对蜂胶黄酮提取得率的影响

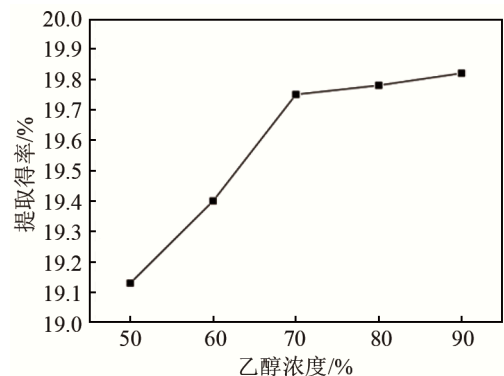
实验结果如图 2(c)所示。当乙醇浓度由 50%增加到 70%时,提取得率迅速地增加,然而继续增加乙醇浓度,提取得率几乎保持不变。增加乙醇浓度使更多的蜂胶黄酮分子溶解到乙醇溶剂中,从而提高了提取得率。继续增加乙醇浓度,提取得率基本不变,可能是因为蜂胶黄酮分子在乙醇溶剂中的溶解接近于饱和状态。所以 70%是较合适的乙醇浓度。



(a) 超声功率对提取得率的影响



(b) 超声提取时间对提取得率的影响



(c) 乙醇浓度对提取得率的影响

图 2 超声功率、超声时间和乙醇浓度对蜂胶黄酮提取得率的影响

Fig.2 Effects of (a) ultrasonic power, (b) extraction time, (c) alcohol concentration on extraction yield of propolis flavonoids

2.2 响应面法优化蜂胶黄酮的提取因素

2.2.1 回归方程的构建与分析

由表 2 可知, Box-Behnken 设计方案有 17 个试验点。通过对试验点的实验数据进行回归拟合分析,得到以下的二次多项式回归方程:

$$Y = 20.34 + 0.20X_1 + 1.52X_2 + 1.08X_3 - 0.67X_1X_2 + 0.052X_1X_3 - 0.73X_2X_3 - 0.16X_1^2 - 1.16X_2^2 - 0.45X_3^2 \quad (3)$$

式中: X_1 、 X_2 、 X_3 分别代表超声功率、超声提取时

间、乙醇浓度。

对式(3)的方差分析的结果见表 3。模型的显著性 P 值小于 0.000 1, 表明模型具有统计显著性。失拟项的 P 值是 0.058 6, 大于 0.05, 这表明失拟项与纯误差的相关性不显著, 因此验证了模型的有效性。另外, 决定系数 R^2 是 0.997 9, 表明仅有 0.21% 的变异不能用该模型来解释。调整决定系数 R^2_{adj} 是 0.995 1, 接近于决定系数 R^2 , 从而证实了这是个较好的统计模型。预测决定系数 R^2_{pred} 是 0.9713, 基本与 R^2_{adj} 保持一致, 这表明该模型具有较好的显著性。

表 3 回归方程的方差分析结果
Table 3 ANOVA results of the regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	39.02	9	4.34	361.95	<0.000 1
X_1	0.31	1	0.31	25.72	0.001 4
X_2	18.45	1	18.45	1 540.58	<0.000 1
X_3	9.29	1	9.29	775.44	<0.000 1
X_1X_2	1.80	1	1.80	149.91	<0.000 1
X_1X_3	0.011	1	0.011	0.92	0.369 3
X_2X_3	2.12	1	2.12	176.74	<0.000 1
X_1^2	0.11	1	0.11	9.51	0.017 7
X_2^2	5.66	1	5.66	472.61	<0.000 1
X_3^2	0.86	1	0.86	71.82	<0.000 1
残差	0.084	7	0.012		
失拟项	0.069	3	0.023	5.96	0.058 6
纯误差	0.015	4	3.830×10^{-3}		
总和	39.10	16			

注: $R^2=0.9979$, $R^2_{adj}=0.9951$, $R^2_{pred}=0.9713$, Adeg Precisor=67.251, CV=0.56%

同时, 信噪比(Adeg Precisor)是 67.251, 大于 4, 这表明有充足的信号。变异系数 CV 是 0.56%, 表明实验数据准确可靠。通过比较各因素的一次项系数和二次项系数, 可得到影响蜂胶黄酮提取率的主次因素的顺序: 超声提取时间>乙醇浓度>超声功率。

二维的等高线图跟三维的响应面图用来判断自变量之间的相关性。由图的形状可看出自变量之间的交互作用是否显著。椭圆形的等高线图和弯曲的响应面图表明自变量之间的交互作用显著。二维的等高线图跟三维的响应面图如图 3 所示。研究其中两个变量的相关性时, 第三个变量应保持不变。图 3(c)的响应面图比图 3(a)和 3(b)的响应面图更陡峭, 这表明乙醇浓度和超声提取时间之间的交互作用更显著, 与图 3 中的等高线图和表 3 中的结果一致。

2.2.2 最佳超声提取条件的确定与验证

通过 Design Expert 8.0.6 软件的分析, 得到了最佳的提取条件: 超声功率为 163.38 W, 超声提取时间为 15.89 min, 乙醇浓度为 85.67%。在此条件下, 预测提取率为 21.11%。为了进一步验证回归模型的可靠性和准确性, 采用上述的最佳条件进行验证实验。考虑到实际情况的可操作性, 将最佳条件修正为: 超声功率为 150 W, 超声提取时间为 16 min, 乙醇浓度为 86%。在此条件下, 蜂胶黄酮的提取率为 $21.10\% \pm 0.075\%$ (试验次数 $n=3$), 接近于模型的预测值, 因此证实了该模型准确可靠。

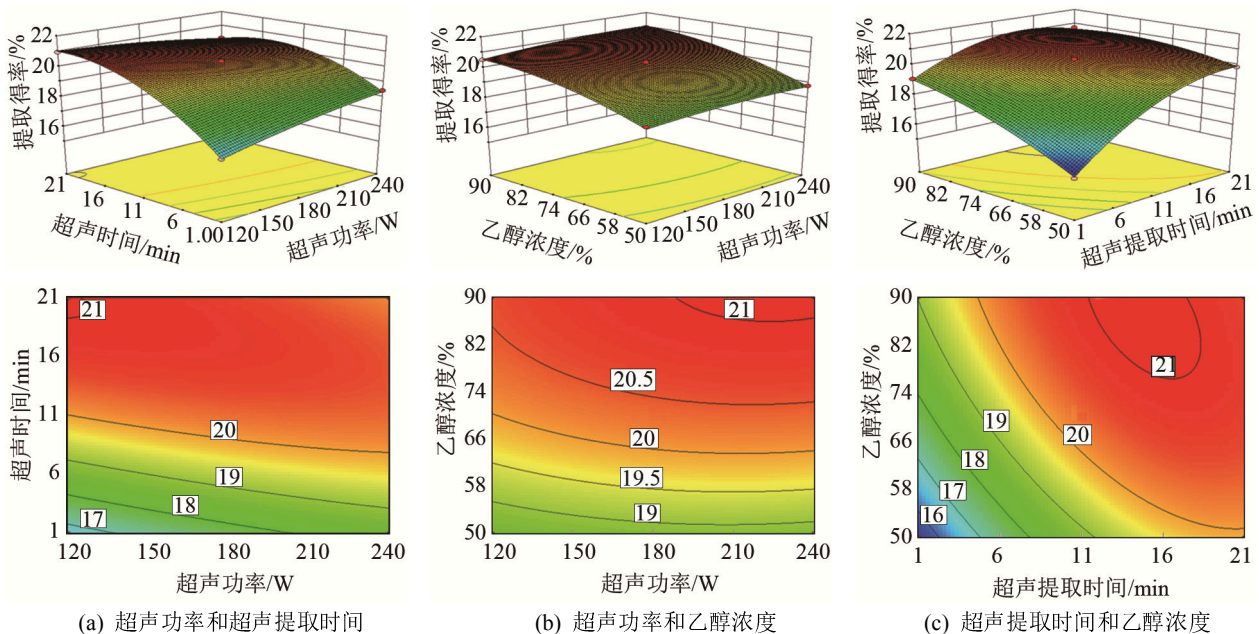


图 3 3 种自变量之间交互作用的响应面图和等高线图

Fig.3 Response surfaces and contour plots for the three interactions: (a) between ultrasonic power and extraction time, (b) between ultrasonic power and alcohol concentration, (c) between extraction time and alcohol concentration

2.3 超声提取方法的比较分析

一般来说,根据蜂胶黄酮的含量来判断蜂胶的品质,含量在 5%以上为合格品,含量大于 15%为优等品。本实验的蜂胶黄酮提取率在最佳超声提取条件下实际可达到 21.10%,所以该实验所用的湖北孝感地区的蜂胶属于优等品。

蜂胶黄酮的含量与蜂胶的地域性有直接的关系,不同地区蜂胶黄酮的含量差异较大。本次实验所用的蜂胶尚未有相关文献报道,与现有文献的蜂胶来源不同,所以根据蜂胶黄酮的得率来判断超声工艺的优劣是不恰当的,因此只比较提取条件的优劣。曹小燕等^[7]用超声提取陕西蜂胶黄酮,得到最佳提取工艺为:超声时间为 20 min,提取温度为 50℃,料液比为 1:30,乙醇浓度为 80%,黄酮的得率为 9.60%;李帅^[6]通过响应面法优化吉林蜂胶黄酮的超声提取工艺,得到最佳提取条件为:超声时间为 27 min,提取温度为 66℃,超声功率为 220 W,乙醇浓度为 73%,黄酮得率为 23.38%;安砚波等^[8]通过实验得到山东蜂胶黄酮的最佳超声提取工艺参数为:超声时间为 25 min,乙醇浓度为 72%,超声功率为 82%,实际的黄酮得率为 13.07%。与现有报道的蜂胶黄酮的超声提取工艺相比,本实验的超声提取方法具有提取温度低、提取时间短的优点。

3 结 论

本文通过响应面法优化蜂胶黄酮的超声提取工艺,得到结论如下:

(1) 蜂胶黄酮的提取率随着超声功率和超声提取时间的增加先升高后降低,随着乙醇浓度的增加先升高后保持不变。

(2) 通过对回归方程进行方差分析,可得到影响蜂胶黄酮提取率的主次因素依次是超声提取时间、乙醇浓度和超声功率。

(3) 通过响应面软件的分析以及考虑实际操作的可行性,可得到最佳提取条件为:超声功率为 150 W,超声提取时间为 16 min,乙醇浓度为 86%。在此条件下,蜂胶黄酮提取率的预测值为 21.11%。对上述提取条件进行验证实验,可得到蜂

胶黄酮提取率为 21.10%±0.075% (n=3),接近于模型的预测值,因此证实了该模型准确可靠。

(4) 目前湖北孝感蜂胶尚未有任何相关文献报道,经过本实验的提取工艺优化与分析,可知湖北孝感蜂胶黄酮的含量约为 21%,大于 15%,这说明湖北孝感蜂胶是优等品。通过与其他超声提取蜂胶黄酮的方法进行对比,可知本实验的超声提取方法具有提取温度低、提取时间短的优势。

参 考 文 献

- [1] AHN M R, KUMAZAWA S, HAMASAKA T, et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**(24): 7286-7292.
- [2] BANKOVA V, POPOVA M, TRUSHEVA B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review[J]. *Chemistry Central Journal*, 2014, **8**(1): 28.
- [3] 张凯妮,沈艳婷,张长峻,等. 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.
ZHANG Kaini, SHEN Yanting, ZHANG Changjun, et al. Orthogonal optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoids in propolis and comparison of flavonoids content in propolis obtained from different regions[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, **42**(17): 5610-5613.
- [4] WANG Y J, CHENG Z, MAO J W, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process of *Poria cocos* polysaccharides by response surface methodology[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, **77**(4): 713-717.
- [5] ZHANG S Q, XI J, WANG C Z. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2010, **80**(1): 50-54.
- [6] 李帅. 响应面优化超声波辅助乙醇提取蜂胶黄酮工艺的研究[J]. *饲料与畜牧: 新饲料*, 2015(7): 33-38.
LI Shuai. Study on optimization of ultrasonic-assisted ethanol extraction of propolis flavonoids by response surface methodology[J]. *Feed and Animal Husbandry: New Feed*, 2015(7): 33-38.
- [7] 曹小燕,杨海涛. 蜂胶中黄酮的提取及其自由基清除活性研究[J]. *粮油食品科技*, 2015, **23**(5): 45-49.
CAO Xiaoyan, YANG Haitao. Study on extraction of flavonoids from propolis and the activity of scavenging free radicals[J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2015, **23**(5): 45-49.
- [8] 安砚波,王浩. 响应面法优化蜂胶总黄酮的提取工艺[J]. *中国蜂业*, 2016, **67**(9): 46-49.
AN Yanbo, WANG Hao. Optimization of extraction process of total flavonoids from propolis by response surface methodology[J]. *Apiculture of China*, 2016, **67**(9): 46-49.