

总黄酮、高良姜素和白杨素含量指标综合优选蜂胶前处理方法

夏正燕^{1,2}, 姜建民², 冯瑛², 吴永江^{1*} (1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.浙江省中药研究所, 杭州 310023)

摘要: 目的 建立蜂胶含量分析的最佳前处理方法。方法 采用单因素及 $L_9(3^4)$ 正交设计试验, 以总黄酮、高良姜素、白杨素成分的含量变化为评价指标, 对各流程进行优化, 筛选最佳前处理方法。结果 最佳前处理方法: 药材粉末用 95% 乙醇 50 °C 超声提取 2 次, 每次 30 min。结论 该方法准确可靠, 能作为蜂胶含量分析前处理方法。

关键词: 蜂胶; 总黄酮; 高良姜素; 白杨素; 正交设计; 综合评价; 前处理

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)03-0268-04

Comprehensive Evaluation on Pretreatment Methods of Propolis by Determination of Total Flavonoids, Galangin and Chrysin Content

XIA Zhengyan^{1,2}, JIANG Jianmin², FENG Ying², WU Yongjiang^{1*} (1.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish optimal propolis pretreatment methods by comprehensive evaluation. **METHODS** Single-factor and orthogonal experiment was designed with the content change of total flavonoids, galangin and chrysin as evaluation index to screen the best pretreatment methods. **RESULTS** The optimal pretreatment condition was as follows: 95% ethanol was used as extraction solvent, ultrasonic extraction was applied at 50 °C for 2 times, 30 minutes for each time. **CONCLUSION** The method was scientific and reasonable which can be used in pretreatment of propolis.

KEY WORDS: propolis; total flavonoids; galangin; chrysin; orthogonal design; comprehensive evaluation; pretreatment methods

蜂胶是蜜蜂采集植物茎、腋芽的树脂并混入花粉、自身分泌物和蜂蜡, 混合而成的一种具芳香气味的胶状固体物^[1], 其主要化学成分为黄酮类、萜烯类、酚酸类化合物^[2]等。黄酮类成分是蜂胶增强机体免疫、软化血管、降低血脂^[3]、清除自由基的主要活性成分之一^[4], 故而成为蜂胶品质评价主要指标之一, 其中的高良姜素、白杨素只有在天然原生蜂胶中才含有, 中国药典关于蜂胶功效成分检测, 将其作为必检项目^[5]。因此, 笔者进行了本研究^[6-7], 以总黄酮、高良姜素和白杨素的含量为指标, 综合优选蜂胶最佳前处理方法, 为蜂胶总黄酮及单体黄酮的开发提供依据, 并为蜂胶的含量分析奠定基础。

1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), DAD 检测器; UV-2550 紫外-可见分光光度计(日本岛津); KQ-100DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 芦丁(批号: 0080-9504, 纯度: 91.7%)、高良姜素(批号: 111699-200501, 纯度>98%)、白杨素对照品(批号: 111701-200501,

纯度>98%)均购自中国药品生物制品检定所; 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

试验用药材购自吉林、浙江、安徽、山东等地蜂农, 经浙江省中药研究所杨苏蓓教授鉴定为蜂胶。

2 方法与结果

2.1 UV 测定总黄酮含量^[8]

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取芦丁对照品 10.4 mg, 加无水乙醇溶解配成浓度为 0.208 mg·mL⁻¹ 的溶液, 即得。

2.1.2 标准曲线的制备 分别精密吸取“2.1.1”项下的对照品溶液 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加 95%乙醇至总体积为 15 mL, 依次加入硝酸铝溶液(0.1 g·mL⁻¹)1 mL, 醋酸钾溶液(9.8 g·L⁻¹)1 mL, 加水至刻度, 摇匀, 静置 1 h。于 415 nm 处, 以试剂空白为参比, 测定吸光度。以总黄酮含量为横坐标(X), 吸光度为纵坐标(Y), 得回归方程: $Y=0.6152X-0.0002$, $r=0.9999$, 线性范围为 0~1.248 mg。

2.1.3 供试品溶液的测定

基金项目: 浙江省科技计划项目(2011C37066)

作者简介: 夏正燕, 女, 硕士生, 工程师 Tel: (0571)85229644
授 Tel: (0571)85208455 E-mail: yjwu@zju.edu.cn

E-mail: xzhengyan@gmail.com *通信作者: 吴永江, 男, 博士, 教

2.1.3.1 样品的提取 取药材粉末(过 65 目筛)约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 95% 乙醇 50 mL, 称重, 超声提取 2 次, 每次 30 min, 放冷, 称重, 以 95%乙醇补足原重, 摇匀, 滤过, 即得。

2.1.3.2 供试品溶液的制备 精密吸取“2.1.3.1”项下样品溶液 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加 95%乙醇至总体积为 15 mL, 按“2.1.2”项下制备。

2.1.3.3 空白试验 精密吸取“2.1.3.1”项下滤液 1 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加 95%乙醇至总体积为 15 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀。

2.1.3.4 测定 以空白试验做参比, 在 415 nm 处测定吸光度, 以芦丁计算其总黄酮的含量。

2.2 HPLC 测定高良姜素和白杨素的含量

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Welchrom C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 以甲醇为流动相 A, 以 0.15%磷酸溶液为流动相 B, 按表 1 的规定进行梯度洗脱; 检测波长: 268 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃。在上述条件下, 白杨素、高良姜素的保留时间分别为约 18, 22 min, 理论板数不低于 3 000, 高良姜素、白杨素与其他组分达到基线分离, 见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱时间表

Tab 1 Gradient elution schedule of mobile phase

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~24	64	36
24~25	75	25
25~32	75	25
32~33	64	36
33~38	64	36

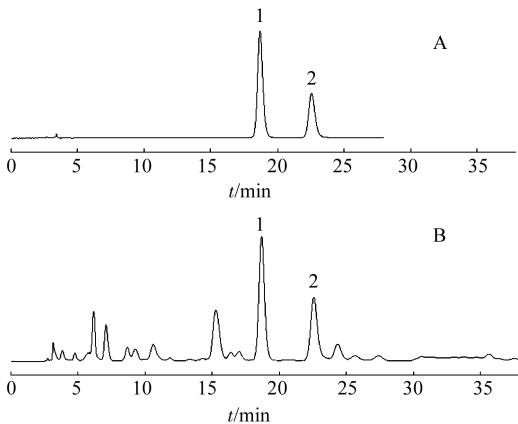


图 1 HPLC 色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-白杨素; 2-高良姜素

Fig 1 HPLC chromatograms

A-control; B-sample; 1-chrysin; 2-galangin

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取高良姜素、白杨素对照品适量, 加甲醇溶解, 制成每 1 mL 分别含约 18, 23 μg 的混合溶液, 作为混合对照品溶液; 另取白杨素对照品, 精密称定, 加甲醇溶解制成每 1 mL 约含 30 μg, 作为白杨素对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“2.1.3.1”项下样品溶液, 精密吸取 2.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 95%乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置, 用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.3 前处理方法的考察

2.3.1 提取溶媒的选择 取药材粉末(过 65 目筛)约 0.3 g, 精密称定, 分别置具塞锥形瓶中, 精密加入 95%乙醇、80%乙醇、65%乙醇、丙酮、甲醇 50 mL, 称重, 50 ℃超声提取 2 次, 每次 30 min, 放冷, 称重, 分别以不同的提取溶媒补足原重, 摇匀, 滤过, 即得。按“2.1”及“2.2”项下测定。结果 95%乙醇与丙酮、甲醇的提取效果相当, 从经济环保方面考虑, 选择 95%乙醇作为提取溶媒, 见表 2。

表 2 提取溶媒选择结果

Tab 2 Results of different solvents

溶媒	总黄酮		白杨素		高良姜素	
	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/ %	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/ %	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/ %
95%乙醇	100.5	1.89	20.17	1.21	16.78	1.33
80%乙醇	96.42	0.76	19.96	1.19	16.43	1.26
65%乙醇	95.48	0.81	19.84	0.89	16.39	0.89
丙酮	100.0	1.57	20.19	1.02	16.70	1.11
甲醇	100.6	1.12	20.15	1.66	16.77	1.88

2.3.2 提取方法的比较 取药材粉末(过 65 目筛)约 0.3 g, 称定, 精密加入 95%乙醇 50 mL(索氏提取 100 mL), 称重, 分别采用以下方法提取: ①30 ℃超声提取 2 次, 每次 30 min, 补足原重; ②回流 1 h 后, 补足原重; ③索氏提取至无色, 挥干, 加 95%乙醇溶解定容至 50 mL, 摇匀, 滤过, 即得。按“2.1”及“2.2”项下测定。结果超声法提取较完全, 且简单易行, 见表 3。

2.3.3 正交试验

2.3.3.1 实验设计 为了确定蜂胶的最佳超声提取条件, 以总黄酮、高良姜素及白杨素为考察指标, 选用三因素三水平表即 L₉(3⁴)表对超声时间(A)、超声次数(B)、温度(C)3 个因素进行正交试验, 各因素均确定为 3 个水平, 见表 4。

表 3 提取方法选择结果

Tab 3 Results of different extract methods

提取方法	总黄酮		白杨素		高良姜素	
	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/ %	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/ %	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/ %
超声提取法	101.5	0.56	20.63	0.73	16.02	0.98
回流提取法	95.61	0.97	20.11	1.25	15.98	1.52
索氏提取法	100.4	1.91	18.77	1.76	15.14	1.83

2.3.3.2 正交试验方法与结果 取 9 个试验号所用蜂胶药材粉末各约 0.3 g, 精密加入 95%乙醇 50 mL, 称重, 按表 4 的试验安排分别进行超声提

表 5 L₉(3⁴)实验安排、实验结果及数据处理表

Tab 5 L₉(3⁴)orthogonal design and results

试验号	A	B	C	D(空白)	总黄酮含量/ mg·g ⁻¹	高良姜素含量/ mg·g ⁻¹	白杨素含量/ mg·g ⁻¹	试验结果 综合评分(yi)
1	1	1	1	1	97.42	20.65	15.45	105.0
2	1	2	2	2	102.4	20.96	15.79	108.1
3	1	3	3	3	103.7	20.68	15.58	107.6
4	2	1	2	3	102.1	20.49	15.20	105.8
5	2	2	3	1	104.5	20.58	15.48	107.4
6	2	3	1	2	101.0	20.22	15.08	104.7
7	3	1	3	2	101.2	21.67	15.52	108.2
8	3	2	1	3	102.2	21.33	15.23	107.3
9	3	3	2	1	102.5	21.54	15.34	108.0
I j	320.70	319.0	317.00	320.40				
II j	317.90	322.80	321.90	321.00				
III j	323.50	320.30	323.20	320.70				
I j ²	102 848.49	101 761.00	100 489.00	102 656.16				
II j ²	101 060.41	104 199.84	103 619.61	103 041.00				
III j ²	104 652.25	102 592.09	104 458.24	102 848.49				
I j ² /3	34 282.83	33 920.33	33 496.33	34 218.72				
II j ² /3	33 686.80	34 733.28	34 539.87	34 347.00				
III j ² /3	34 884.08	34 197.36	34 819.41	34 282.83				
Rj	102 853.72	102 850.98	102 855.62	102 848.55				
Sj	5.23	2.49	7.13	0.06				

2.3.3.3 方差分析 将表 5 的正交试验结果进行方差分析, 结果见表 6。

表 6 方差分析表

Tab 6 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	S _A =S ₁ =5.23	2	2.61	87.00	*
B	S _B =S ₂ =2.49	2	1.24	41.33	*
C	S _C =S ₃ =7.13	2	3.56	118.66	**
误差	Se=S ₄ =0.06	2	0.03		

注: F_{0.01}(2, 2)=99.0; F_{0.05}(2, 2)=19.0; F_{0.10}(2, 2)=9.0; *F_{0.05}<F<F_{0.01}, 有显著性差异; **F>F_{0.01}(2, 2), 有极显著性差异

Note: F_{0.01}(2, 2)=99.0; F_{0.05}(2, 2)=19.0; F_{0.10}(2, 2)=9.0; *F_{0.05}<F<F_{0.01}, significant; **F>F_{0.01}(2, 2), most significant

取, 放冷, 称重, 以 95%乙醇补足原重。按总黄酮、高良姜素和白杨素含量测定方法进行测定, 试验结果见表 5。

表 4 试验因素水平表

Tab 4 Levels of factors

水平	因 素		
	超声时间(A)/min	超声次数(B)/次	温度(C)/℃
1	10	1	30
2	20	2	40
3	30	3	50

2.3.3.4 结果分析 对表 5 中 3 个考察指标总黄酮含量、高良姜素含量和白杨素含量采用相同的权重进行综合评分, 再对 I j、II j、III j 值进行直观分析, 因素 A_{IIIj}>A_{Ij}>A_{IIj}, B_{IIj}>B_{IIIj}>B_{Ij}, C_{IIIj}>C_{IIj}>C_{Ij}, 最佳的前处理条件应该是 A₃B₂C₃, 比较 R 值可知, 影响程度 C>A>B; 表 6 的方差分析结果表明: F_{0.01}(2, 2)>F_A、F_B>F_{0.05}(2, 2), 因素 A、B 的水平变化对实验结果有显著性影响; F_C>F_{0.01}(2, 2), 因素 C 的水平变化对实验结果有极显著影响。因此, 超声提取的最佳方案为 A₃B₂C₃, 即: 样品超声提取 2 次, 每次 30 min, 提取温度设为 50 ℃。

2.3.3.5 正交验证试验 取蜂胶药材粉末 3 份, 各

约 0.3 g, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入 95%乙醇 50 mL, 称重, 按上述优选出的前处理方法进行操作, 分别测定总黄酮、高良姜素及白杨素含量。结果表明, 总黄酮平均含量为 $102.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.46%; 高良姜素、白杨素含量分别为 16.02、 $20.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.76%, 0.82%。

3 讨论

本实验对蜂胶总黄酮含量测定、高良姜素及白杨素含量测定的方法学进行了考察, 对总黄酮含量测定方法进行了精密性、稳定性、重复性、加样回收率的考察, RSD 均 $<1.57\%$; 高良姜素及白杨素含量测定方法的精密性、稳定性、重复性、加样回收率试验得出 RSD 均 $<1.72\%$, 说明该方法稳定, 可以作为考察指标对蜂胶前处理方法进行综合评价。

对流动相的比列进行考察, 发现以甲醇-0.15%磷酸(64:36)为流动相, 分离较好且峰形佳, 但分析周期较长; 而采用梯度洗脱, 能大大地缩短分析时间, 节省了人力、物力。

REFERENCES

- [1] PAN J G, HE L P, ZHENG R L, et al. The application of modern analytical technology in effective constituent determination and quality control of propolis [J]. Apiculture of China(中国蜂业), 2008, 59(3): 34-35.
- [2] ZHANG C P, WANG K, HU F L. Phenolic acid in propolis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(1): 102-105.
- [3] WANG Y, KANG W, LI Z, et al. Research on the therapeutic effect and mechanism of propolis in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(8): 679-682.
- [4] YANG S L, WANG D. Study on extraction process of propolis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2005, 22(2): 135-137.
- [5] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部)[S]. 2010: Appendix 336.
- [6] CAO W, FU J F, SUO Z R, et al. HPLC analysis of chrysin and galangin in propolis [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(4): 522-524.
- [7] HUANG H T, HUANG H C. Extract and content assay of total flavonoids in propolis from different areas [J]. Guangdong Chem Ind(广东化工), 2010, 37(205): 215-217.
- [8] GB/T 20574-2006. Method for determination of total flavonoids in propolis-colorimetric method(蜂胶中总黄酮含量的测定方法分光光度比色法) [S]. 2006.

收稿日期: 2012-06-05

表面活性剂协同微波提取胡柚皮总黄酮的工艺研究

吴志强¹, 项玲², 陈京^{2*} (1.浙江省人民医院, 杭州 310014; 2.浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 优选表面活性剂增效微波提取胡柚皮中总黄酮的最佳工艺。方法 对 7 种表面活性剂强化提取胡柚总黄酮的效果进行了比较, 筛选出对该提取过程具有明显增溶效果的表面活性剂。以总黄酮含量为指标, 采用正交试验确定最佳提取工艺。结果 胡柚皮中的总黄酮的最优提取条件以质量百分数 2% 的月桂醇磺基琥珀酸单酯二钠盐(AK-201)为提取剂, 微波频率为 160 W, 提取 2 次, 每次 1 min, 提取 2 次, 料液比为 1:40, 提取率为 4.35%。该工艺比仅用微波法提取胡柚皮中黄酮的提取率增加了 6.36%。结论 该提取工艺简单, 方法快速、简便, 能降低成本, 同时提高提取率, 可用于胡柚皮中总黄酮的提取。

关键词: 表面活性剂; 微波提取; 胡柚皮; 总黄酮

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)03-0271-04

Study on Microwave-surfactant Extraction of Total Flavonoid from Pomelo Peel

WU Zhiqiang¹, XIANG Ling², CHEN Jing^{2*} (1.Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China; 2.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction technology of total flavonoids from pomelo peel by combining surfactant with microwave technology. **METHODS** As an indicator of total flavonoids, orthogonal test was used to study the

作者简介: 吴志强, 男, 主管药师 Tel: (0571)85893113 E-mail: wzhihzi@hotmail.com *通信作者: 陈京, 女, 博士, 讲师 Tel: (0571)86613716 E-mail: cj00123@zjtcn.net