

蜂胶除蜡工艺对黄酮类成分含量影响的实验研究

孙 静 王昌利 张文平

摘 要 目的 蜂胶除蜡后对蜂胶中黄酮类化合物含量的影响。方法 选用紫外分光光度法,以芦丁为对照品,测定总黄酮含量。结果 蜂胶除蜡后,有 8.5% 的总黄酮类成分损失,但胶层与水层中总黄酮量仍大于未除蜡蜂胶的总黄酮量。结论 除蜡对蜂胶中总黄酮量影响不大,在其治疗心脑血管疾病复方制剂开发应用时可作为杂质除去。

关键词 蜂胶 除蜡 黄酮 影响

Study the Impact of Beeswax Removal on the Content of Total Flavonoids from Propolis. Sun Jing, Wang Changli, Zhang Wenping. School of Pharmacy, Shannxi University of Traditional Chinese Medicine, Shanxi 712046, China

Abstract Objective To study the impact of beeswax removal on the content of total flavonoids separated from propolis. **Methods** Rutin was used as contrast calibre, and content of total flavonoids was determined by using UV spectrophotometric method. **Results** 8.5% of the total flavonoids lost after beeswax were removed from propolis, but the amount of total flavonoids in the process propolis and water containing was stiu much higher than that mentioned in the natural unprocessed condition. **Conclusion** There was little impact of beeswax removal on content of total flavonoids. Beeswax as impurity would be removed when propoli as medicine was used in complex Chinese patent medicine for treatment of cardio - cerebral vascular diseases.

Key words Propolis; Beeswax removal; Flavonoids; Impact

蜂胶是蜜蜂采集植物芽苞和树干上的树脂并混入其上腭腺分泌物及蜂蜡所形成的黏性物质,对高血脂、高胆固醇、高血液黏稠度有明显调节作用,能预防动脉血管内胶原纤维增加和肝内胆固醇堆积,对动脉粥样硬化有防治作用,能有效清除血管内壁积存物,抗血栓,保护心脑血管,改善血液循环状态及造血功能^[1,2]。由于蜂胶对净化血液有奇效,被称为“血管清道夫”,黄酮类化合物是蜂胶中的主要生理活性物质^[3-6]。一般选用一定浓度的乙醇回流法或温浸法提取有效部位^[7-11]。在对其复方制剂研制开发的过程中发现,蜂胶的醇提浸膏得率非常高,一般达到 40% 左右,甚者达 60%,其中含有大量的蜂蜡。蜂胶除蜡后可以大大降低出膏率。本试验以芦丁为对照品,选择紫外分光光度法测定总黄酮含量,通过除蜡前后黄酮类化合物总量变化情况,考察蜂胶除蜡对有效部位影响,从而为蜂胶降低出膏率找到有效的解决方法。试验方法与结果如下。

材料与方法

1. 仪器与试剂:(1)仪器:USC302 超声波清洗机(上海波

龙电子设备有限公司);1100 型紫外分光光度计(上海分析仪器厂);GB204 Mettle Toledo 电子天平。(2)试剂:芦丁对照品(中药药品生物鉴定所),其他试剂均为分析纯。蜂胶(购于陕西省咸阳市自然之子蜂产品公司,经陕西中医学院药学院生药教研室雷国莲教授鉴定为药典收录品种)。

2. 实验方法:(1)样品的制备^[12]:精密称取两份蜂胶 61.0124g、61.1001g,将 61.1001g 的样品加 8 倍量水,文火煎煮 4h,在 25℃ 的条件下,自然冷却,得到蜡层(上层)、水层(中层)、胶层(底层),取出蜡层、胶层,用吸水纸吸取表面水分,同时置于阴凉处干燥至重量不再变化,精密称定,得到未除蜡蜂胶 61.0124g(I)、蜂蜡 18.0132g(II)、水层 420ml(III),除蜡蜂胶 48.3931g(IV)4 个样品。(2)总黄酮含量的测定^[13-16]:①对照品溶液的制备:精密称取干燥至恒重芦丁对照品 5.1mg,置于 25ml 量瓶中,用 75% 乙醇稀释至刻度,摇匀,得到浓度为 0.204mg/ml 的溶液,作为对照品溶液;②供试品溶液的制备:称取未除蜡蜂胶(I)、蜂蜡(II)、水层(III),除蜡蜂胶(IV)各两份,每份 0.05g,精密称定,置于 25ml 量瓶中,加入 20ml 75% 乙醇,超声处理 20min,再用 75% 乙醇定容至刻度,静置,备用。精密量取标准品及各样品 0.05ml 置于 10ml 量瓶中,加入 75% 乙醇 5ml,再加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3ml,摇匀,静置 6min,加入 5% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3ml,摇匀,静置 6min,加入

基金项目:陕西省教育厅产业化项目(03JC26)

作者单位:712046 咸阳,陕西中医学院药学院(孙静、王昌利);410208 长沙,湖南中医药大学研究生院(孙静);650000 昆明,云南中医学院药学院(张文平)

4% NaOH 溶液 4ml, 摇匀, 静置 15min, 加水定容至 10ml, 测定各供试品中总黄酮含量; ③最大吸收波长的测定: 精密量取 1ml 对照品溶液加入 10ml 容量瓶中, 定容至刻度线, 摇匀。用去离子水作为空白, 在 200 ~ 600nm 范围做全程扫描, 发现其在 499nm 左右有一最大吸收峰; 同法将供试品于 200 ~ 600nm 范围做全程扫描, 其最大吸收波长也在 499nm 左右, 所以选择 499nm 为检测波长; ④标准曲线及线性范围: 分别精密吸取 20.4 μg/ml 芦丁标准溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0ml 于 7 个 25ml 量瓶中, 加入 75% 乙醇 5ml 后, 加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3ml, 摇匀, 放置 6min, 加入 5% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3ml, 摇匀, 放置 6min, 加入 4% NaOH 溶液 0.4ml, 摇匀, 静置 15min, 加水定容至刻度, 以空白溶液作对照, 于 751 型分光光度计 499nm 处测定吸收度, 结果见表 1。以吸收度 A 为纵坐标, 总黄酮含量 C(μg) 为横坐标计算回归方程为: $A = 0.008839C + 0.022893$, 相关系数 $r = 0.9986$, 线性范围 20.4 ~ 122.4 μg, 标准曲线见图 1; ⑤方法学考察: 分别考察了对照品、样品溶液测定的稳定性与重复性及加样回收率。结果表明, 对照品溶液的精密密度良好 (RSD 为 0.972%), 样品溶液测定具有较好的稳定性 (4h 内测定 RSD 为 1.284%) 和重复性 (平行测定 5 份样品的 RSD 为 0.1105%); 样品加样回收率分别为 99.5%、100.2%、98.6%、99.8%、97.9%, 表明测定方法可行; ⑥总黄酮含量的测定: 将标准品及各供试品测定总黄酮含量, 按照下列公式计算, 得到供试品总黄酮含量及样品总黄酮量。

供试品总黄酮含量 = $\frac{\text{供试品吸光度值} \times \text{标准品浓度} \times 10 \times 25}{\text{标准品吸光度值} \times 0.5 \times \text{供试品质量}}$;

总黄酮量 = 样品总重量 × 平均总黄酮含量 / 1000。

表 1 标准曲线试验结果

芦丁 (μg)	吸收度 A ₂	吸收度 A ₂	吸收度 A ₃	平均吸收度 A
0.0	0.001	0.000	0.000	0.000
20.4	0.216	0.224	0.208	0.216
40.8	0.390	0.396	0.405	0.397
61.2	0.580	0.576	0.587	0.581
81.6	0.727	0.730	0.729	0.729
102.0	0.92	0.915	0.934	0.923
122.4	1.101	1.098	1.103	1.101

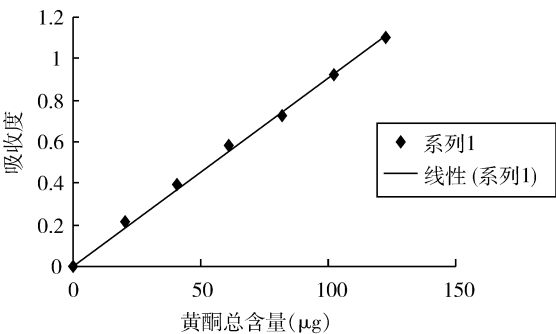


图 1 总黄酮标准曲线

结 果

结果见表 2。由表 2 实验结果可以看出, 蜂胶除蜡后, 有 8.5% 的总黄酮损失, 但胶层与水层中总黄酮量仍可以达到未除蜡蜂胶的总黄酮量。除蜡对蜂胶中总黄酮量影响不大, 在其治疗心脑血管疾病复方制剂开发应用时可作为杂质除去。

表 2 总黄酮测定结果表

试验号	样品				评价指标			
	样一 (g)	样二 (g)	样一吸光度 (abs)	样二吸光度 (abs)	样一总黄酮 含量 (mg/g)	样二总黄酮 含量 (mg/g)	平均总黄酮 含量 (mg/g)	样品总黄酮 量 (g)
标品			0.108	0.109				
I	0.0547	0.057	0.112	0.456	193.3780	748.6239	471.0009	28.7369
II	0.0549	0.0542	0.127	0.149	218.4780	257.2531	237.8656	4.2847
III	0.055	0.0538	0.011	0.014	18.8889	24.3511	21.6200	9.0804
IV	0.0559	0.0524	0.437	0.444	738.3224	792.9127	765.6175	37.0506

讨 论

1. 本实验测定未除蜡蜂胶总黄酮含量时发现, 两个样品的含量差异悬殊, 主要原因是蜂胶收采期不一致, 养蜂人对蜂胶的处理方法不一致, 根据实验结果得知, 本次实验购买蜂胶样品中含有少量已经除蜡的蜂胶。
2. 实验结果发现蜂胶经过水煎煮得到的蜡层、水层、胶层中的总黄酮量之和远远高于未除蜡蜂胶的总黄酮量, 根据蜂胶自身的特点, 造成这种现象的原因

- 主要是蜂胶中由于蜂蜡的存在, 使得大量的黄酮类成分被包裹其中, 同时由于蜂胶加热后, 易软化黏性很大, 有效成分也不宜游离出来。
3. 水层中黄酮含量较高, 考虑其药用价值, 可直接浓缩至稠膏或与其他药材提取液合并浓缩, 备用, 可减少浪费。

参考文献

- 1 何晓波, 周俐斐, 芦柏震. 蜂胶的药理活性[J]. 药学专论, 2006, 15(1): 27 ~ 28
- 2 潘娅, 郑德俊, 周莉玲, 等. 蜂胶生理活性与药理作用研究浅释

- [J]. 中医药学刊,2004,22(2):381-383
- 3 郭芳彬. 蜂产品中黄酮类化合物的保健作用[J]. 养蜂科技,2005,2:28-29
- 4 郭芳彬. 蜂胶中黄酮类化合物的保健功能[J]. 蜜蜂杂志,2005,9:28-31
- 5 杨明,隋殿军,孙红,等. 蜂胶总黄酮对急性心肌缺血大鼠心肌梗塞和血液流变学的影响[J]. 中成药,2005,27(9):1057-1059
- 6 董捷,闫继红,孙丽萍. 蜂胶复合软胶囊对实验大鼠血脂的调节作用[J]. 蜜蜂杂志,2003,12:5-6
- 7 焦连庆,于敏. 正交试验法优化蜂胶黄酮的提取工艺研究. 特产研究,2003,(4):49-51
- 8 叶陆星,胡福良,玄红专. 蜂胶的提取方法及影响因素. 蜜蜂杂志,2002,(7):16
- 9 吴平谷,叶之扬. 蜂胶有效成分的分离与鉴定. 卫生研究,2000,29(2):123-124
- 10 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):9-10
- 11 胡福良,詹耀锋,朱威,等. 不同方法提取的蜂胶液调节血脂作用的实验研究[J]. 中国蜂业,2006,57(5):13-16
- 12 家药典委员会. 中华人民共和国药典一部. 北京:化学工业出版社,2005:250
- 13 杨林莎,王东. 蜂胶提取工艺的研究. 中国现代应用药学杂志,2005,22(2):135-137
- 14 张建和,符伟玉,余戟. 蜂胶醇冷浸法提取物中总黄酮含量的测定[J]. 广东医学院学报,2004,22(4):419-420
- 15 刘香,刘振,段更利. 紫外分光光度法测定蜂胶搽剂中总黄酮的含量[J]. 贵阳医学院学报,2005,30(3):230-231
- 16 刘元法,王兴国,金青哲. 超声波技术提取蜂胶黄酮类功能性物质的研究[J]. 食品科学,2004,25(6):35-39

(收稿:2009-12-18)

左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠的治疗作用

李红梅 钟志勇 苗竹林 韦相才 范强

摘要 通过对 BALB/c 小鼠多点注射透明带多肽,造成免疫性卵巢早衰模型,研究左归丸对免疫性卵巢早衰模型的治疗作用。**方法** (1)建立小鼠免疫性卵巢早衰模型:以小鼠透明带 3 所合成透明带多肽为免疫原,以其免疫 SPF 级 BALB/C 雌性小鼠。以出现动情周期紊乱、卵巢细胞受损,表示造模成功。(2)造模成功后,将 BALB/c 小鼠随机分为模型组、左归丸高、中、低剂量组,泼尼松组、己烯雌酚组 and 对照组,共灌胃给药 4 周。**结果** 模型组小鼠在第 3~8 周的体重与对照组比较,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。模型组仅有 16.7% (2/12) 的动物维持正常的性周期,而空白对照组有 91.7% (11/12) 的动物维持正常的性周期。模型组小鼠卵巢中颗粒细胞、卵母细胞的凋亡率与对照组比较,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。**结论** 左归丸可能具有改善免疫性卵巢早衰小鼠症状的作用。

关键词 左归丸 卵巢早衰 性周期 细胞凋亡

Treatment Effect of Zuogui Pill on Immune Premature Ovarian Failure Rats. Li Hongmei, Zhong Zhiyong, Miao Zhulin, Wei Xiangcai, Fan Qiang. Guangdong Family Planning Research Institute of Science and Technology, Guangdong 510600, China

Abstract Objective To explore the treatment effect of Zuogui pill (ZGP) on immune premature ovarian failure rats. **Methods** Female mice model of POF was established by multiple sites subcutaneous injection of zona pellucida 3, and treated with different dosage ZGP (low, middle and high), with prednisone and diaethylstilbestrol as positive control. We detected apoptosis rate of granulosa and oocyte of murine ovaries by tunel method and observed the change of sexual cycle and weight. **Results** Compared with the control group, the weight of model group rat in the third to eighth weeks was significant difference ($P < 0.05$). Only 16.7% (2/12) maintained the sexual cycle in the model mice, 91.7% (11/12) in control group, 16.7% in low dosage ZGP, 25% in middle dosage ZGP and 50% in high dosage ZGP. Granulosa cell and Oocyte apoptosis rate in the model mice was higher. The differences were significant as compared with the low, middle and high dosage ZGP and control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Zuogui pill may have some prevention and treatment action on POF.

Key words Zuogui pill; Premature ovarian failure; Sexual cycle; Cells apoptosis

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(07001360),广东省人口与计划生育资助项目(2008005)

作者单位:510600 广州,广东省计划生育研究所(李红梅、苗竹林、韦相才、范强);528248 广州,广东省医学实验动物中心(钟志勇)

通讯作者:李红梅,电子信箱:lihongmei@yahoo.com.cn