

蜂胶提取物的抗氧化活性研究

蔡君, 宋欢

(重庆市日用化学工业研究所, 重庆 401123)

摘要: 以菜籽油和猪油为实验油, 采用 Schall 烘箱法测定蜂胶及其乙醇提取物、超临界 CO₂ 提取物和 CO₂ 残渣醇提取物的抗氧化活性, 并与其他通用抗氧化剂比较。结果表明: 总黄酮浓度 0.01% 以上的蜂胶提取物均能显著延长油脂氧化诱导期, 是高效的油脂抗氧化剂; 黄酮类化合物仍是各蜂胶提取物中主要含量成分和主要抗氧化活性成分之一, 且随总黄酮浓度 0.005% 以上一定范围与其整体抗氧化活性呈现量效关系; 在相同添加量 0.02% (蜂胶提取物均以总黄酮计) 和恒温 60 °C 条件下, 各抗氧化剂抗氧化效果按强弱顺序排列为: 菜籽油中, TBHQ > 蜂胶超临界 CO₂ 提取物 > 蜂胶 CO₂ 残渣醇提取物 > 蜂胶乙醇提取物 > VE > 甘氨酸 > 蜂胶 > BHT; 猪油中, TBHQ > 蜂胶 CO₂ 残渣醇提取物 > 蜂胶乙醇提取物 > BHT > 甘氨酸 > 蜂胶 > 蜂胶超临界 CO₂ 提取物 > VE。本试验结果可望为各蜂胶提取物将来被用作含油脂食品的天然抗氧化剂提供一定的实验数据。

关键词: 蜂胶; 蜂胶提取物; 抗氧化性能; 蜂胶乙醇提取物; 蜂胶超临界 CO₂ 提取物; 蜂胶 CO₂ 残渣醇提取物

文章编号: 1673-9078(2012)8-940-944

Studies of Antioxidant Properties of Propolis Extracts

CAI Jun, SONG Huan

(Chongqing Daily-used Chemical Industry Research Institute, Chongqing 401123, China)

Abstract: The antioxidant activity of propolis, ethanol extract, supercritical CO₂ extract, and ethanol extract of CO₂ residue of propolis in rapeseed oil and lard were determined with Schall oven method. The results showed that, the propolis extract containing above 0.01% of total flavonoids can significantly prolong the rapeseed oil oxidation induction period and are efficient grease antioxidants. Flavonoids was one of the main components with high antioxidant activity in various propolis extracts. With the ranges of total flavonoids concentration above 0.005%, the overall anti-oxidative activity had a dose-response relationship. When the same adding amount of propolis and its extract and temperature (60 °C) were adopted, the order of the antioxidant activities of the tested antioxidant agents and propolis extracts in rapeseed oil was found as: TBHQ > supercritical CO₂ extract of propolis > ethanol extract of CO₂ residue of propolis > ethanol extract of propolis > VE > glycine > propolis > BHT. And the order of the antioxidant activities of the tested antioxidant agents and propolis extracts in lard was found as: TBHQ > ethanol extract of CO₂ residue of propolis > ethanol extract of propolis > BHT > glycine > propolis > supercritical CO₂ extract of propolis > VE. This study may provide some experimental data for the application of propolis extracts as natural antioxidants in greasy foods.

Key words: propolis; propolis extract; antioxidant properties; propolis ethanol extract; propolis supercritical CO₂ extract; propolis ethanol extraction of CO₂ residue.

蜂胶是工蜂采集长寿胶源植物树脂等分泌物与其上颚腺、蜡腺等分泌物混合形成的一种带有柔和香气的胶粘性物质。许多研究证明蜂胶中含有大量的天然有效成分如黄酮类、萜烯类和酚酸类如肉桂酸、咖啡酸、苯甲酸及其脂和衍生物等, 具有抗菌、抗病毒、消炎镇痛和抗氧化等多种生物学作用^[1], 这些特性使人们正试图开拓蜂胶在食品和药品方面的应用市场。

目前各国食品中常用的抗氧化剂大多数是合成的, 使用范围较广泛的有丁基羟基茴香醚 (BHA)、二丁基

收稿日期: 2012-04-27

基金项目: 重庆市科委攻关项目 (2009AC1127)

作者简介: 蔡君 (1965-), 女, 工程师, 研究方向为天然产物深加工及食品添加剂

羟基甲苯 (BHT)、叔丁基对苯二酚 (TBHQ) 和没食子酸酯类等, 合成的抗氧化剂多少都有些毒性, 随着人们健康意识的增强以及崇尚自然潮流的发展, 天然抗氧化剂越来越受到人们的欢迎, 蜂胶就是被人们看好的, 并早已被国内外研究证实是高效、安全无害的天然抗氧化剂之一^[2]。国内外学者关于蜂胶抑制油脂氧化作用的研究报道较多, 对于蜂胶乙醇提取物的抗氧化性能研究也有报道^[3], 但对于蜂胶超临界 CO₂ 提取物和蜂胶 CO₂ 残渣醇提取物的抗氧化性能的研究报道甚少。再者, 由于蜂胶属于天然产物, 是复杂组分的混合物, 其中, 黄酮类化合物是其主要含量成分和主要抗氧化活性成分之一, 然而不同产地品种蜂胶及蜂胶提取物中黄酮类化合物成分及含量等又有较大区

别^[45], 这势必影响到在相同实际添加量下不同品种蜂胶提取物的抗氧化效果, 因此, 为了蜂胶提取物将来应用作为天然抗氧化剂, 考虑其通用有效添加剂量, 有必要从量效关系思路探索考查蜂胶提取物中总黄酮含量与其整体抗氧化活性的强弱关系, 同时比较在相同总黄酮浓度及实验条件下各蜂胶提取物之间、蜂胶提取物与其他抗氧化剂之间的抗氧化活性, 以期为更多蜂胶提取物将来被用作含油脂食品的抗氧化剂提供一定的实验数据。

1 材料和设备

1.1 材料

蜂胶: 工蜂采集植物树脂等分泌物与其上颚腺、蜡腺等分泌物混合形成的胶粘性物质。实验室经冷冻粉碎制成粉状, 过筛除掉机械杂质, 测定总黄酮含量 11%, 乙醇提取物含量 54.7%, 重庆市畜牧科学院蜂业研究所提供 (湖南产地);

蜂胶乙醇提取物: 乙醇萃取蜂胶后得到的物质。实验室将蜂胶冷冻粉碎, 过筛除掉机械杂质后, 用 85% 乙醇常温提取 24 h, 料液比 1:15, 回收溶剂后真空干燥得到蜂胶乙醇提取物。块状粉碎后制成棕褐色至棕黄色粉状, 测定总黄酮含量 20%, 乙醇提取物含量 97.1%。

蜂胶超临界 CO₂ 提取物: 超临界 CO₂ 流体萃取蜂胶后得到的物质。实验室将蜂胶冷冻粉碎, 过筛除掉机械杂质后, 用超临界 CO₂ 萃取, 萃取压力 35 MPa, 萃取温度 32 °C, 萃取时间 4 h, CO₂ 流量 19 L/h, 分离塔出料得到蜂胶超临界 CO₂ 提取物。呈棕黄色至金黄色膏状, 测定总黄酮含量 5.6%, 乙醇提取物含量 60.7%。

蜂胶 CO₂ 残渣醇提物: 超临界 CO₂ 流体萃取蜂胶后的残渣再用乙醇萃取得到的物质。实验室将蜂胶冷冻粉碎, 过筛除掉机械杂质后, 先用超临界 CO₂ 萃取, 萃取塔出料残渣再用 85% 乙醇进一步常温提取 24 h, 料液比 1:15, 回收溶剂后真空干燥得到蜂胶 CO₂ 残渣醇提物。块状粉碎后制成棕褐色至棕黄色粉状, 测定总黄酮含量 24%, 乙醇提取物含量 97.5%。

菜籽油 (市售新鲜瓶装产品, 未添加任何抗氧化剂); 猪油, 板猪油新鲜熬制过滤后冰箱储备。

1.2 试剂

特丁基对苯二酚 (TBHQ)、二丁基羟基甲苯 (BHT)、维生素 E (含量 98%)、甘氨酸、95% 食用酒精等均为食用级。

1.3 设备

HA221-50-06-C 型超临界萃取仪 (江苏南通华安

超临界萃取有限公司); UV-1200 型紫外/可见分光光度计 (上海美谱达仪器有限公司); WS/08-01 调温调湿箱 (重庆试验设备厂)。

2 试验方法

2.1 蜂胶中总黄酮含量测定

按国家标准《蜂胶中总黄酮含量的测定方法 分光光度比色法》GB/T20574-2006 执行。

2.2 蜂胶中乙醇提取物含量测定

按国家农业行业标准《无公害食品 蜂胶》NY5136-2002 执行。

2.3 蜂胶及提取物的 GC-MS 分析

2.3.1 样品的制备

分别称取蜂胶及其乙醇提取物、超临界 CO₂ 提取物、CO₂ 残渣醇提物各试样 4 g (精确到 0.001 g) 放入研钵, 加入少量 75% 乙醇液研磨成糊状移入锥形瓶内, 用乙醇液冲洗研钵合并于锥形瓶内, 使乙醇液体积达到 40 mL, 盖好瓶塞室温浸提 24 h; 过滤提取液到 50 mL 容量瓶内, 用少量乙醇冲洗锥形瓶及滤纸, 滤液定溶至 50 mL, 得各样的醇溶液。

2.3.2 GC-MS 检测条件

气相色谱条件: 色谱柱为 Rtx-1ms (30 m×0.25 mm×0.25 μm), 载气为高纯 He (99.999%), 分流比 100:1。程序升温: 以 9 °C/min 从初始温度 40 °C 升温至 80 °C 保持 3 min, 再升温至 150 °C 保持 5 min, 再升温至 220 °C 保持 46 min。质谱条件: E1 离子源, 电离能 70 eV, 离子源温度 200 °C, 接口 250 °C, 柱前压 47 kPa, 电子倍增器 1.2 kV。进样量 0.3 μL, 扫描范围 40~600 amu, 全扫描方式。所得质谱数据用美国 NIST 质谱数据库检索, 用面积归一化法确定各组分的相对含量。

2.3.3 蜂胶及提取物主要有效成分的统计分析

对蜂胶、蜂胶乙醇提取物、蜂胶超临界 CO₂ 提取物及蜂胶 CO₂ 残渣醇提物主要有效成分及含量的 GC-MS 分析结果进行分类统计。

2.4 抗氧化剂溶液的制备

2.4.1 蜂胶溶液的制备

本实验按 100 g 油品中主要成分总黄酮浓度依次为 0.005%、0.01%、0.02%、0.03% 分别称取蜂胶、蜂胶乙醇提取物、蜂胶超临界 CO₂ 提取物及蜂胶 CO₂ 残渣醇提物的实际重量于三角瓶中, 各用同等少量 95% 食用酒精溶解, 制成各蜂胶溶液样品。

2.4.2 其他抗氧化剂溶液的制备

按 100 g 油品中抗氧化剂纯品添加量为 0.02% 分别称取 TBHQ、BHT、维生素 E、甘氨酸的实际重量

于三角瓶中,各用同等少量 95%食用酒精溶解,制成各抗氧化剂溶液样品。

2.5 样品抗氧化能力的检测

以菜籽油和猪油为底物,在相同实验条件下,对不同品种、不同纯品添加量的抗氧化剂样品的抗氧化活性进行测试。

参照 schall 烘箱法,将 100 g 油品分别加入到盛有不同品种、不同纯品添加量的抗氧化剂溶液样品的三角瓶中,混合均匀,置于 60 °C 的恒温箱内,加速其氧化,每隔一定时间取油样测定其过氧化值(POV 值,按《食用植物油卫生标准的分析方法》GB/T 5009.37-2003 测定),同时跟踪统计出每一个油样 POV 值达到终点值所用的时间(天数)-氧化诱导期。从而考查不同品种、不同纯品添加量的抗氧化剂的抗氧化性能。

3 结果与讨论

3.1 蜂胶及提取物的主要有效成分及含量

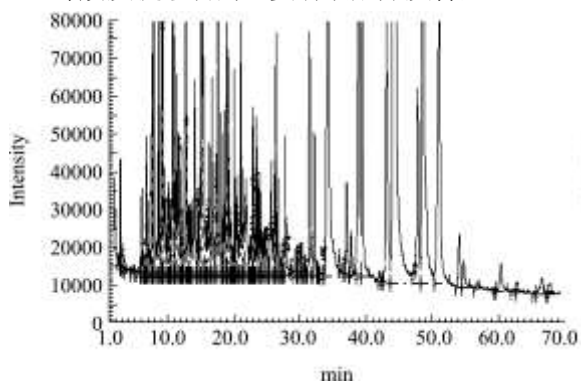


图 1 蜂胶的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of propolis

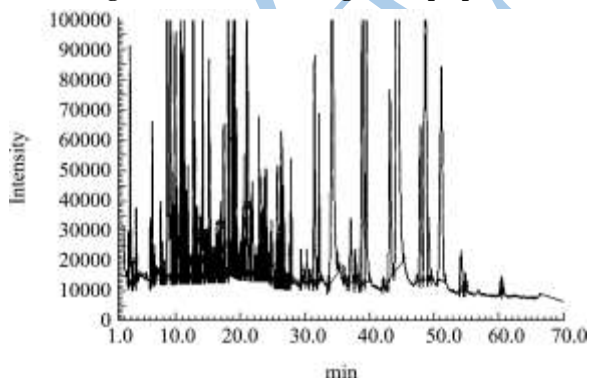


图 2 蜂胶乙醇提取物的总离子流图

Fig.2 Total ion chromatogram of propolis ethanol extract

图 1~4 分别是湖南蜂胶及各提取物中醇溶物的总离子流图,经计算机检索及人工解析质谱,蜂胶分离出 183 个成分,鉴定出其中 72 个成分;蜂胶乙醇提取物仅分离出 144 个成分,鉴定出其中 63 个成分;蜂胶

CO₂ 残渣醇提物分离出 200 个成分,鉴定出其中 78 个成分;蜂胶超临界 CO₂ 提取物分离出 189 个成分,鉴定出其中 88 个成分。

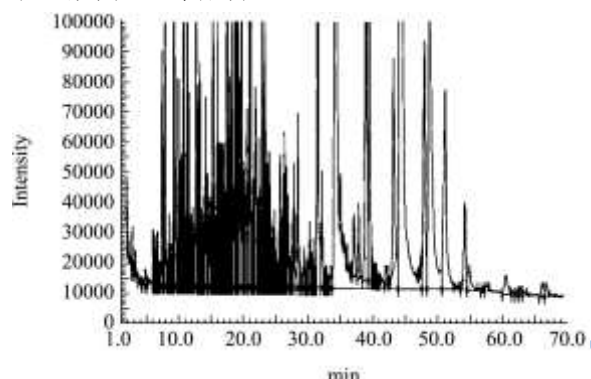


图 3 蜂胶 CO₂残渣醇提物的总离子流图

Fig.3 Total ion chromatogram of propolis ethanol extraction of CO₂ residue

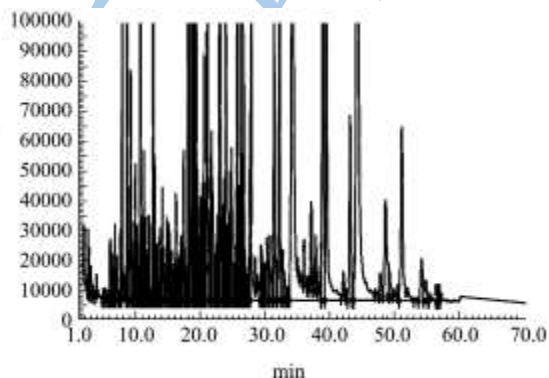


图 4 蜂胶超临界 CO₂提取物的总离子流图

Fig.4 Total ion chromatogram of propolis supercritical CO₂ extract

表 1 统计了蜂胶、蜂胶乙醇提取物、蜂胶超临界 CO₂ 提取物及蜂胶 CO₂ 残渣醇提物主要有效成分及含量的 GC-MS 分析结果。

表 1 结果可知,采用乙醇和超临界 CO₂ 流体两种溶剂分别提取和先后提取蜂胶,所得各蜂胶提取物的主要有效成分和相对含量等均有不同。相同的是,黄酮类成分、萜烯醇类成分、酚酸类成分如肉桂酸、阿魏酸、苯甲酸及衍生物等从高到低依次仍是各自的主要含量成分;区别较大的是,与蜂胶相比,黄酮类成分在蜂胶超临界 CO₂ 提取物中的含量有明显降低(43.06%),其中白杨素和高良姜素含量显著降低(分别为 0.02% 和 0.97%),柚皮素含量显著提高(14.08%);酚酸类成分的含量在蜂胶提取物中均有提高,尤其在蜂胶超临界 CO₂ 提取物中(如肉桂酸及其衍生物等)的含量明显提高(9.42%);萜烯醇类成分在蜂胶超临界 CO₂ 提取物中(如愈创木醇、雪松醇、桉叶油醇等)的含量也有明显提高(26.16%)^[5]。

表 1 湖南蜂胶及其提取物中主要有效成分的 GC-MS 分析结果统计

Table 1 GC-MS statistical analytic results of main components in Hunan propolis and its extract

名称	蜂胶	蜂胶乙醇提取物	蜂胶 CO ₂ 残渣醇提取物	蜂胶超临界 CO ₂ 提取物
总离子流成分合计/个	183	144	200	189
鉴定出的成分合计/个	72	64	67	88
松属素(5,7-二羟基二氢黄酮)/%	15.84	18.74	22.79	16.94
柚皮素(4,5,7-三羟基二氢黄酮)/%	3.79	1.66	2.70	14.08
柚木柯因(5-羟基-7-甲氧基二氢黄酮)/%	1.69	1.91	2.14	2.93
白杨素(5,7-二羟基黄酮)/%	21.64	20.14	15.96	0.02
高良姜素(5,7-二羟基二氢黄酮醇)/%	5.68	4.53	6.39	0.97
黄酮类成分相对含量合计/%	54.42	54.01	54.21	43.06
萜烯类、萜醇类成分相对含量合计/%	19.65	19.0	12.75	26.16
酚酸类化合物相对含量合计/%	3.42	4.82	5.94	9.42

3.2 蜂胶及提取物抗氧化活性比较

在相同总黄酮浓度 0.005%、0.01%、0.02%、0.03% 和实验条件下, 添加蜂胶、蜂胶乙醇提取物、蜂胶超

临界 CO₂ 提取物及蜂胶 CO₂ 残渣醇提取物各试样对油脂的抗氧化效果, 同时追踪各试样油的氧化诱导期, 结果见表 2。

表 2 蜂胶提取物不同总黄酮浓度下对食用油氧化的影响 (d)

Table 2 Effects of propolis extracts with different total flavonoids concentrations on edible oil

油品	蜂胶/%				蜂胶乙醇提取物/%				蜂胶超临界 CO ₂ 提取物/%				蜂胶 CO ₂ 残渣醇提取物/%				溶剂	空白
	0.005	0.01	0.02	0.03	0.005	0.01	0.02	0.03	0.005	0.01	0.02	0.03	0.005	0.01	0.02	0.03	-	-
菜籽油	16	23	24	25	17	30	39	49	16	25	44	25	18	28	41	28	16	14
猪油	15	19	30	32	17	20	32	33	15	18	27	28	16	20	33	33	14	12

注: 菜籽油 POV 初始值 0.80 mg/g, POV 终点值 2.50 mg/g; 猪油 POV 初始值 0.15 mg/g, POV 终点值 2.0 mg/g。

从表 2 可知, 没有添加任何试剂的空白油品氧化速度最快, 其次是加入 95% 食用酒精的油品; 总黄酮浓度 0.01% 以上的蜂胶及提取物均能显著延长油脂氧化诱导期, 具有较好的抗氧化活性; 在 0.005% 以上一定范围随总黄酮浓度增加与蜂胶及提取物整体的抗氧化活性存在量效关系; 且随总黄酮浓度增加到 0.02% 时均有显著提高, 特别是植物油中蜂胶超临界 CO₂ 提取物的抗氧化活性显著更强, 反映出蜂胶超临界 CO₂ 提取物组分中另有复杂多种富含含量的酚酸类或萜稀醇类化合物在植物油中同时具有很强的抗氧化活性, 起到协同增强作用。当总黄酮浓度达到 0.03% 时各蜂胶提取物抗氧化活性相对有所下降或趋于稳定, 这应与蜂胶提取物在油脂中的溶解度有关系。

国家标准 GB2760 中允许使用的抗氧化剂大多有严格的添加量限制, 其中大多数天然抗氧化剂属于复杂组分混合物, 因有效成分纯度较低, 毒性低, 添加量普遍远高于化学合成抗氧化剂的添加量 (合成纯度, 添加量少, 存在毒性), 基于此, 可将蜂胶总黄酮浓度折算成蜂胶提取物的实际添加量后再应用, 使其抗氧化效果更稳定, 重复性更好。

3.3 蜂胶提取物与常用抗氧化剂的抗氧化活性比较

在相同添加量 0.02% (蜂胶提取物均以总黄酮计)

和恒温 60 °C 条件下, 各抗氧化剂对菜籽油和猪油的抗氧化效果, 结果见图 5、图 6。

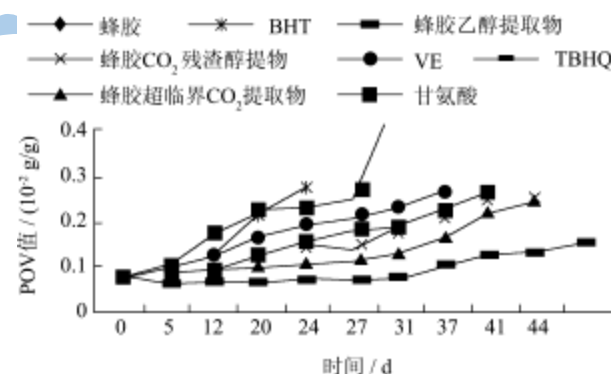


图 5 恒温 60 °C 下添加量 0.02% 的蜂胶提取物与常用抗氧化剂对菜籽油的抗氧化活性比较

Fig.5 Comparison of the antioxidant activities of 0.02% propolis extracts and traditional antioxidants in rapeseed oil at 60 °C

从图 5 和图 6 可知, 各抗氧化剂的抗氧化效果按强弱顺序排列为: 菜籽油中, TBHQ > 蜂胶超临界 CO₂ 提取物 > 蜂胶 CO₂ 残渣醇提取物 > 蜂胶乙醇提取物 > VE > 甘氨酸 > 蜂胶 > BHT; 猪油中, TBHQ > 蜂胶 CO₂ 残渣醇提取物 > 蜂胶乙醇提取物 > BHT > 甘氨酸 > 蜂胶 > 蜂胶超临界 CO₂ 提取物 > VE。比较结果表明: 在相同添加量 0.02% (蜂胶提取物均以总黄酮计) 和恒温

60℃条件下, 菜籽油中, 各蜂胶提取物的抗氧化活性均显著好于通用抗氧化剂合成品二丁基羟基甲苯(BHT)、天然品维生素 E、甘氨酸, 仅次于合成品特丁基对苯二酚(TBHQ); 猪油中, 蜂胶 CO₂残渣醇提物和蜂胶乙醇提取物与 BHT 相当, 均有较强的抗氧化活性, 强于甘氨酸, 显著强于维生素 E, 仅次于 TBHQ, 而蜂胶超临界 CO₂提取物的抗氧化活性略低于甘氨酸, 但仍强于维生素 E。

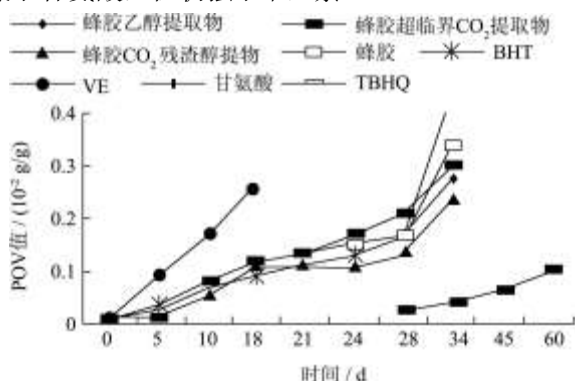


图6 恒温 60℃下添加量 0.02%的蜂胶提取物与常用抗氧化剂对猪油的抗氧化活性比较

Fig.6 Comparion of the antioxidant activities of 0.02% propolis extracts and traditional antioxidants in lard at 60 °C

蜂胶的抗氧化机理与其组分的复杂构成有关, 往往是多种有效成分协同作用的结果。据报道, 蜂胶中含有丰富的黄酮类化合物和多种酚羟基类化合物等均能表现出很强的抗氧化能力^[6], 一方面能与金属离子生成螯合物, 特别是抑制 F²⁺诱导的脂质过氧化作用, 并呈现量效关系, 同时对高温诱导的脂质过氧化作用也有很强的推迟能力, 另一方面能猝灭超氧阴离子和羟基自由基, 作为氢给予体和自由基接受体起着抑制自由基引起的连锁反应的作用, 也呈现量效关系。因此, 蜂胶是以多种机理、多种方式起着协同抗氧化作用^[7]。

4 结论

4.1 以菜籽油和猪油为实验油, 采用 schall 烘箱法测定蜂胶、蜂胶乙醇提取物、蜂胶超临界 CO₂提取物及蜂胶 CO₂残渣醇提物的抗氧化活性, 并与其他通用抗

氧化剂比较。结果表明: 总黄酮浓度 0.01%以上的蜂胶提取物均能显著延长油脂氧化诱导期, 具有较好的抗氧化活性; 各蜂胶提取物中黄酮类化合物是主要的抗氧化活性成分之一, 且随总黄酮浓度 0.005% 以上一定范围与其整体的抗氧化活性呈现量效关系; 在相同添加量 0.02% (蜂胶提取物均以总黄酮计) 和恒温 60 °C 条件下, 与通用抗氧化剂比较按强弱顺序排列为: 菜籽油中, TBHQ>蜂胶超临界 CO₂提取物>蜂胶 CO₂残渣醇提取物>蜂胶乙醇提取物>VE>甘氨酸>蜂胶>BHT; 猪油中, TBHQ>蜂胶 CO₂残渣醇提取物>蜂胶乙醇提取物>BHT>甘氨酸>蜂胶>蜂胶超临界 CO₂提取物>VE。

4.2 实验证明蜂胶提取物是高效的油脂抗氧化剂, 因此, 可利用其特性且有益于身体健康的多种生物活性, 将其纳入食品添加剂国家标准中使其能规范化、合法化推向市场, 并可结合其他天然组分, 开发出含蜂胶提取物的复合型防腐抗氧化保鲜剂产品, 取代或部分取代化学合成品的抗氧化剂, 既安全、高效抗菌、抗氧化, 又经济实用, 应用于大宗特色鲜果蔬、肉制品、禽蛋、乳制品等食品的防腐保鲜是完全切实可行的, 也顺应当前市场对天然食品保存剂的迫切需要。

参考文献

- [1] 李燕杰,杨勇,阚建全.蜂胶化学成分及其生物活性[J].粮食与油脂,2003,12:43-45
- [2] 芦兆芸.蜂胶保鲜机理及其在食品保鲜中的应用[J].现代食品科技,2008,24(9):305-307
- [3] 乞永艳,骆尚骅,刘富海,等.蜂胶乙醇提取物抗氧化性能研究[J].食品科技,2000,4:43-44
- [4] 崔庆新,刘国富.蜂胶乙醇提取物化学成分的 GCMS 研究[J].天然产物研究与开发,2001,6:36-38
- [5] 蔡君,谭群,晏家瑛,等.不同提取工艺下蜂胶醇提物的 GC-MS 分析[J].现代食品科技,2010,26(5):544-550
- [6] 郑研,朱利民.酚酸类化合物的应用及改性研究新进展[J].应用化工,2007,9:918-921
- [7] 叶振生.蜂产品深加工技术[M].北京:中国轻工业出版社,2003