

蜂胶化学成分的提取方法研究

王小平^{1,3}, 陈玉芬², 李雅萍², 贺丽萍², 林励¹, 潘建国⁴, 郑尧隆⁴, 卢占列⁴

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405) (2. 华南农业大学, 广东 广州 510400)

(3. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046) (4. 广州市宝生园有限公司, 广东 广州 510100)

摘要: 目的: 为进一步研究蜂胶提供参考。方法: 采用 GC-MS 分别对乙醚索氏提取法、乙醚超声提取法、乙醚冷浸法和水蒸气蒸馏法提取蜂胶所得提取物的化学成分进行分析比较。结果: 不同方法提取蜂胶所得提取物化学成分有一定差异。结论: 索氏提取法可初步判定为适用于蜂胶的方便有效的提取方法。

关键词: 气相色谱-质谱; 索氏提取法; 超声提取法; 冷浸法; 水蒸气蒸馏法; 蜂胶; 提取物

中图分类号: S896.6; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)06-0073-05

GC-MS identification of Volatile Constituents from Chinese Propolis Extractives by four Different Ways

WANG Xiao-ping^{1,3}, CHEN Yu-fen², LI Ya-ping², HE Li-ping², LIN Li¹, PAN Jian-guo⁴, ZHENG Yao-long⁴, LU Zhan-lie⁴

(1.College of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

(2.South China Agricultural University, Guangzhou 510400, China)

(3.Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

(4.Guangzhou Baosheng Yuan Co., Ltd, Guangzhou 510100, China)

Abstract: Objective: To provide references for further study of Propolis. Methods: The volatile components extracted from Chinese Propolis by Soxhlet extraction method, Ultrasonic extraction method, Infusion extraction method and Steam-distilled extraction were comparatively analyzed by GC-MS. Results: The components of extractives by different ways were quite different. Conclusion: Soxhlet extraction method was preliminarily assessed as a convenient, effective and suitable extraction method for Propolis extraction.

Key words: GC-MS; Soxhlet extraction method; Ultrasonic extraction method; Infusion extraction method; Steam-distilled extraction; Propolis; extractive

蜂胶(Propolis)是蜜蜂采集植物茎、腋芽的树脂并混入自身上颚腺分泌物和蜂蜡混合而形成的一种具有芳香气味的胶状固体物。现代研究表明,蜂胶具有抑菌消炎,活血化瘀,促进局部组织再生和增进机体免疫功能等作用^[1-4]。传统的水蒸气蒸馏法提取需较多的药材,并且提取时间较长。我国蜂胶资源丰富,为进一步开发我国的蜂胶资源,笔者采用4种方法提取蜂胶,并用气相色谱-质谱法对其化学成分进行了测定,对比分析了4种方法提取蜂胶所得提取物的化学成分的差异,为进一步研究蜂胶挥发性成分提供有益的参考。

收稿日期: 2007-04-13

基金项目: 广州市科技计划项目, 蜂胶质控平台、指纹研究(2005Z-E0101)

作者简介: 王小平(1976-),女,中药师,博士研究生

通讯作者: 贺丽萍

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器与材料

TRACE GC-MS 联用仪(美国 Finnigan 公司); 8953 Dietikon 型电子分析天平(精度 0.1 mg); AS2060B 型超声仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

蜂胶(毛胶,由广州市宝生园有限公司提供,经广州市蜂产品研究所鉴定为蜂胶);乙醚、无水硫酸钠等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

美国 Finnigan TRACE GC-MS 联用仪; 色谱柱: DB-1 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 进样

口温度: 230 °C; 色质接口管道温度: 250 °C; 柱前压: 64 kPa; 进样方式: 分流进样, 分流比: 10:1; 进样量 1 μ L 载气: He, 载气流速: 1.0 mL/min; 柱温程序升温: 初始温度 100 °C, 停留时间为 3 min, 然后以 5 °C/min 的升温速率升至 230 °C, 停留 12 min。

2.2 质谱条件

E1 离子源: 电子轰击能量 70 eV, 350 V; 离子源温度: 200 °C; 扫描质量范围: 35-335 amu (m/z); 检索谱库名称: NIST。

2.3 样品溶液的制备

2.3.1 超声提取法

将蜂胶在 -10 °C 冷冻数天后用粉碎机粉碎, 取 20 g 蜂胶样品, 精密称定, 置具塞的三角瓶中, 加乙醚 50 mL, 超声 10 min, 过滤, 残渣加乙醚 50 mL, 超声 5 min, 过滤, 滤液合并, 蒸馏去除溶剂至干, 残渣用乙醚溶解并转移至 1 mL 量瓶中, 加乙醚至刻度, 摇匀待测。

2.3.2 乙醚索氏提取法

将蜂胶在 -10 °C 下冷冻数天后用粉碎机粉碎, 取蜂胶样品约 20 g, 精密称定, 置于索氏提取器中, 加入 100 mL 乙醚, 加热回流至提取液无色, 残渣用乙醚溶解并转移至 1 mL 量瓶中, 加乙醚至刻度, 摇匀待测。

2.3.3 水蒸气蒸馏法

将蜂胶在 -10 °C 冷冻数天后用粉碎机粉碎, 取蜂胶样品约 100 g, 精密称定, 1000 mL 置圆底烧瓶中, 加水 500 mL, 浸泡过夜, 照挥发油测定法 (2005 版药典一部附录 XD) 维持微沸至油量不再增加为止。将提取的挥发油 (无水硫酸钠脱水) 置 5 mL 量瓶中, 加乙醚至刻度, 摇匀待测。

2.3.4 冷浸法

将蜂胶在 -10 °C 冷冻数天后用粉碎机粉碎, 取 20 g 蜂胶样品, 精密称定, 置具塞的三角瓶中, 加乙醚 50 mL, 室温 (18~20 °C) 浸泡 2 d, 倾出上清液, 残渣加乙醚 50 mL, 室温浸泡 1 d, 过滤, 滤液合并, 回收溶剂至干, 残渣用乙醚溶解并转移至 1 mL 量瓶中, 加乙醚至刻度, 摇匀待测。

2.4 样品测定

精确吸取待测样品溶液各 1 μ L, 注入气相色谱仪中, 按 2.1 的色谱条件和 2.2 的质谱条件进行试验, 测定并记录色谱图。

2.5 结果

对上述四种方法制得的样品通过 GC-MS 进行分析比较, 结果见图 1~图 4、表 1。

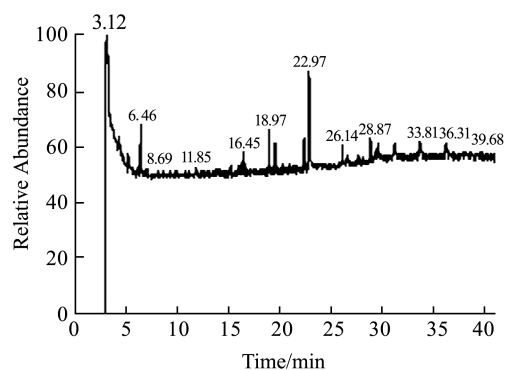


图 1 超声提取法 GC-MS 总离子流图

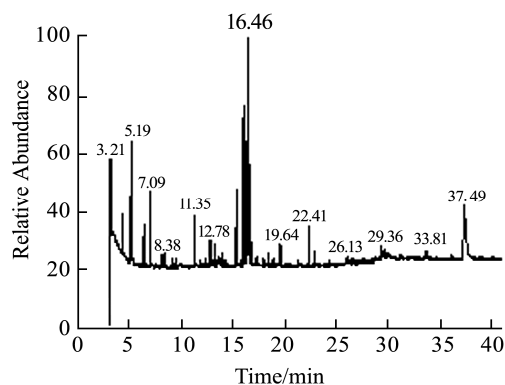


图 2 乙醚索氏提取法 GC-MS 总离子流图

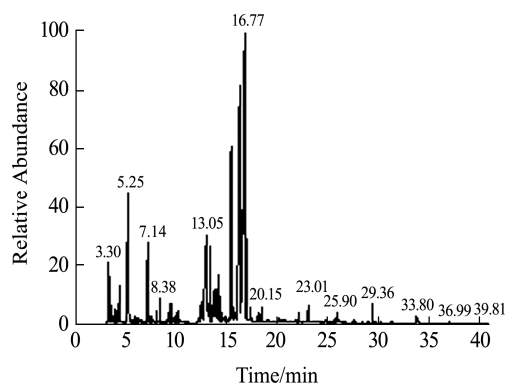


图 3 水蒸气蒸馏法 GC-MS 总离子流图

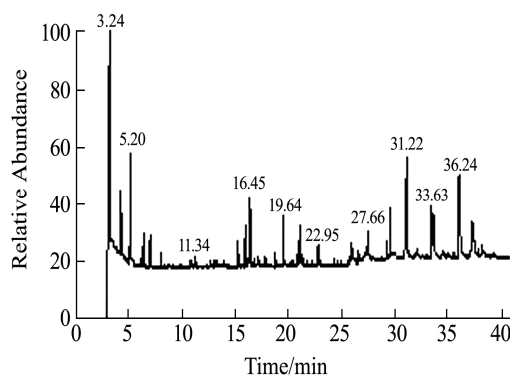


图 4 冷浸法 GC-MS 总离子流图

表1 四种方法所得蜂胶提取物 GC-MS 分析结果

RT	主要化学成分	相对百分含量/%			
		水蒸气 蒸馏法	索氏提 取法	超声提 取法	冷浸 法
3.21	Benzyl Alcohol (苯甲醇)	1.04	7.92	/	/
3.31	Benzene, 1-propenyl-, (E)- (E)1-丙烯基苯	2.09	0.75	/	/
3.46	Eucalyptol 桉油精	0.46	/	/	/
3.62	Acetophenone 苯乙酮	0.26	/	/	/
3.96	LINALOOL OXIDE TRANS (+) 里哪醇氧化物	0.39	/	/	/
4.18	LINALOOL OXIDE TRANS 里哪醇氧化物(异构体)	0.20	/	/	/
4.34	BENZENEETHANOL (CAS) (苯乙醇)	1.31	2.67	/	5.74
5.25	BENZYL ACETATE 苯甲酸乙酯	6.08	7.15	/	/
5.99	L- α -TERPINEOL α -松油醇	0.23	/	/	/
6.24	DECANAL (CAS) 癸醛	/	/	1.10	6.67
6.48	α -CYCLOCITRAL α -环柠檬醛	0.16	/	/	/
7.07	Phenylethyl acetoacetate 苯乙基乙酸乙酯	/	/	/	0.92
7.14	ACETIC ACID, 2-PHENYLETHYL ESTER 乙酸-2-苯乙酯	4.08	4.19	/	/
7.22	Benzaldehyde, ethenyl- 乙烯基苯甲醛	0.07	0.11	/	/
7.28	GERANIOL 牻牛儿醇	0.24	/	/	/
7.50	1-Pentanol, 5-(phenylmethoxy)- 5-苯甲氧基正戊醇	0.20	/	/	/
7.66	7,7-DIMETHYLBICYCLO[3.3.0]OCTAN-2-ONE 7,7-二甲基二环[3.3.0]辛-2-酮	0.15	/	/	/
8.09	BENZYL 2-METHYLPROPANOATE 2-甲基丙酸苄酯	0.43	/	/	/
8.13	(Z)-3-PHENYL-2-PROPEN-1-OL 3-苯-2-丙烯-1-醇	/	0.14	/	/
9.15	BUTANOIC ACID, PHENYLMETHYL ESTER (CAS) 丁酸苯甲酯	0.18	/	/	/
9.28	PROPANOIC ACID, 2-PHENYLETHYL ESTER (CAS) 丙酸-2-苯乙酯	0.53	/	/	/
9.29	B-PHENYLETHYL FORMATE B-苯乙基甲酯	/	0.39	/	/
8.38	2-Methoxy-4-vinylphenol (2) 对-甲氧基-4-乙烯基苯酚	0.57	/	/	/
8.39	PHENOL, 2-(1,1-DIMETHYLETHYL)- (CAS) 2-(1,1-二甲乙基)苯酚	/	0.69	/	/
9.51	Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy- 2-甲氧基-4-(-1-丙基)苯酚	0.46	0.31	/	/
9.70	3-Phenyl-1-propanol, acetate 3-苯基-1-丙醇乙酸酯	0.11	/	/	/
9.92	DECANOIC ACID (CAS) 十烯酸	/	0.21	/	/
10.03	1-BENZYLOXYMETHYL-1-HYDROXYMETHYL-2,5-CYCLOHEXADIENE1- 苯氧基甲基-1-羟甲基(乙氧甲酰基)-2,5-环己二烯	0.34	/	/	/
10.19	Pentanoic acid, phenylmethyl ester 戊酸苯甲酯	0.38	/	/	/
10.37	Propanoic acid, 2-methyl-, 2-phenylethyl ester 丙酸 2-甲基-2-苯乙酯	0.12	/	/	/
12.46	α -MUUROLENE α -木罗烯	0.5	/	/	/
12.81	α -GURJUNENE α -古芸烯	2.51	1.22	/	/
12.89	α -GUAIENE α -愈创木烯	1.68	0.64	/	/
12.96	Cedran-diol, 8S,14- 8S,14-雪松烯二醇	1.44	0.59	/	/
13.05	α -SELINENE α -芹子烯	2.31	1.36	/	/
13.11	CADINENE 杜松烯	0.47	0.19	/	/
13.18	Cedren-13-ol, 8 檀香脑	0.27	/	/	/

转下页

接上页

13.27	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-, [2R-(2à,4aà,8aà)]-	2.08	/	/	/
13.34	2,6-DI-BUTYL-2,5-CYCLOHEXADIENE-1,4-DIONE 2,6-二丁基-2,5-环己二烯-1,4-二酮	/	0.61	/	/
13.37	Cycloisolongifolene, 8-hydroxy-, endo- 8-羟基环异长叶烯	1.39	/	/	/
13.47	DELTA.-GUAIENE δ -愈创木烯	0.40	/	/	/
13.61	Cedrene 柏木烯	0.67	/	/	/
13.69	1S,CIS-CALAMENENE 菖蒲烯	0.88	0.47	/	/
13.77	Spathulenol 匙叶桉油烯醇	0.82	0.30	/	/
13.83	.DELTA.-CADINENE ν -杜松烯	0.48	/	/	/
14.10	JUNIPENE 长叶烯	/	0.65	/	/
15.46	GUAIIOL 愈创木醇	6.65	3.79	/	/
16.03	(+)-AROMADENDRENE 香橙烯	/	1.74	/	0.74
16.24	10-EPI- ζ -EUDESMOL 10-表- ζ -桉叶醇	15.01	8.84	0.82	2.07
16.27	VERIDIFLOROL	/	1.51	/	3.54
16.36	Cubenol 库贝醇	2.14	/	/	/
16.46	EUDESMOL 桉叶醇	/	12.09	/	6.54
16.57	α -EUDESMOL α -桉叶醇	15.86	11.68	3.47	4.42
16.76	JUNIPER CAMPHOR 松樟脑	14.08	/	/	/
16.85	α -PATCHOULENE α -广藿香烯	/	1.41	/	/
18.06	Tetradecane, 2,6,10-trimethyl- 2,6,10-三甲基十四烷	0.16	0.92	/	/
18.42	BENZYL BENZOATE 苯甲酸苄酯	0.35	/	/	/
18.97	TETRADECANOIC ACID (CAS) 十四烯酸	/	/	9.65	1.93
19.64	Caryophyllenyl alcohol	/	1.10	/	/
19.65	Caryophyllenyl alcohol	/	/	5.06	/
22.41	1,2-BENZENEDICARBOXYLIC ACID, DIBUTYL ESTER (CAS) 1,2-苯二羧酸二丁酯	/	1.93	/	/
22.49	Hexadecenoic acid, Z-11- Z-11-十六烯酸	/	/	6.56	/
22.95	HEXADECANOIC ACID (CAS) 棕榈酸	0.57	0.83	19.41	6.55
26.13	9-OCTADECENOIC ACID (Z)- (CAS)油酸	0.10	0.35	4.24	1.55
29.65	2-PROPEN-1-ONE, 1-(2,6-DIHYDROXY-4-METHOXYPHENYL)-3-PHENYL-, (E)- (CAS)	/	0.55	3.57	4.02
31.23	4H-1-BENZOPYRAN-4-ONE, 2,3-DIHYDRO-5,7-DIHYDROXY-2-PHENYL-, (S)- (CAS)	/	0.19	1.18	1.67
36.25	4H-1-BENZOPYRAN-4-ONE, 5,7-DIHYDROXY-2-PHENYL- (CAS)	/	/	2.15	1.51
37.49	NONADECANE (CAS) 十九烷	0.22	12.68	/	/

注: 表 1 中的 / 表示未检出此物质。

从图 1~图 4、表 1 知: 乙醚冷浸提取法和乙醚超声提取法所得蜂胶提取物与其他两法的 GC-MS 总离子流图谱有显著差异, 其挥发性成分种类及含量也有显著差异; 水蒸气蒸馏法和乙醚-索氏提取法所得提取物挥发性成分的种类比较接近。

3 讨论

3.1 水蒸气蒸馏法所得提取物挥发性成分有 48 种, 乙醚-索氏提取法所得提取物的化学成分有 35 种, 其中水蒸气蒸馏法和乙醚-索氏提取法共有的化学成分

有 21 种;水蒸气蒸馏法和乙醚超声提取法共有的化学成分仅有 4 种;水蒸气蒸馏法和乙醚冷浸提取法共有的化学成分仅有 5 种,所以上述四种方法所得提取物化学成分的种类有一定差异,其 GC-MS 总离子流图谱整体性有也有差别。水蒸气蒸馏法和乙醚-索氏提取法的 GC-MS 总离子流图谱整体性较为相似,最大的差别在于,乙醚-索氏提取法所得提取物中检测到十九烷 (RT=37.49),而水蒸气蒸馏法所得提取物中未检测到该物质。

3.2 水蒸气蒸馏法提取挥发油时,对挥发性成分有一定的富集作用,而索氏提取法、冷浸法和超声提取法对挥发性成分没有富集作用;导致含量低的挥发性成分浓度太低,在总离子流图中的峰太低,有些甚至检测不到。这可能是四种提取法 GC-MS 总离子流图谱整体性差异的原因之一;此外,提取温度、提取时间以及索氏提取法、冷浸法和超声提取法所用的溶剂-乙醚等因素也可能导致四种提取法 GC-MS 总离子流图谱得整体性差异。

3.3 水蒸气蒸馏法是提取挥发油最经典的方法,但需要的药材量较多,而且提取所需时间长;索氏提取法

所需药材少,提取时间短。因此,乙醚-索氏提取法比传统的水蒸气蒸馏法有优势,而且从我们得实验结果可以看出,乙醚-索氏提取法和水蒸气蒸馏法所得提取物挥发性成分的种类比较接近,并且具有生物活性的主要天然挥发性组分萜烯类(香叶醇等单萜烯类、匙叶桉油烯醇等倍半萜烯类)物质、醇、酮、醛、酸及酯等芳香族化合物可以得到有效的检测。所以,乙醚-索氏提取法是提取蜂胶挥发性成分较为理想有效的方法。

参考文献

- [1] 贺钮嵘,潘卫东,卢玉振,等.贵州蜂胶中有机酸成分研究[J].中草药,2002,33(5):406
- [2] 胡福良,玄红专.蜂胶的生物学活性及毒性和过敏反应[J].科技通报,2003,19(2): 166-169
- [3] 胡福良,玄红专.蜂胶化学成分的最新研究进展[J].养蜂科技,2003,(1):27-31
- [4] 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,(12):43-45

如何鉴别蜂蜜质量

蜂蜜是蜜蜂采集花蜜酿制成的。

一般把不同的植物的花蜜酿制成的蜜就叫做那一种植物的蜜,如荔枝蜜就是蜜蜂采集荔枝的花蜜酿制成的蜜,它们的功效和这种植物的药物功效相似。

通常假的蜂蜜的粘稠度不如真的好,通透度也不好真正的蜂蜜好,这些一对比就知道了,如果有可能的话,尝一尝(真的蜂蜜有一股花的清香)、用手捻一捻(真的蜂蜜比较糯滑)就更能够看出了。

如何鉴别蜂蜜质量

- (1) 肉眼观色浅白色质地为好。
- (2) 取一干净玻璃杯,放少量蜂蜜,加 5 倍温开水充分搅拌,无沉淀物为优。
- (3) 滴入 90%浓度酒精无白色絮状沉淀物,则没含饴糖。
- (4) 含水应在 17~18%左右。

将蜂蜜滴在吸水纸上,如渐渐渗开,说明掺有糖水;在冷天,蜂蜜有白色沉淀是葡萄糖结晶,属正常现象。

鉴别蜂王浆:液面平整、无气泡;气味微香,入口时舌头有酸涩味,略有麻辣感;用玻璃棒插入内部搅拌,呈匀质量状,滞而不沾,流而不畅。

看:纯正蜂蜜是浓厚、黏稠的胶状液体,光亮润泽,各种蜂蜜有固定的颜色,如椴树蜜为浅琥珀色,清澈半透明,向日葵蜜为琥珀色,杂花蜜的颜色不固定,一般为黄红色。用筷子在蜂蜜中用劲搅几圈,提起筷子在光亮处可观察到纯正的蜂蜜光亮透明,而掺假蜂蜜混浊不清。真蜂蜜透光性强,颜色均匀一致;劣质蜂蜜混浊而有杂质。新蜂蜜以浅琥珀色而透明为正品。蜜加开水略加搅拌即溶化而无沉淀者为好蜜;劣质蜜不易溶化,且有沉淀。

闻:真蜜甜香,假蜜无任何气味。掺有香料的蜜有异常香味。真蜂蜜在采收后数月便能散发出特有的蜜香,香浓而持久,开瓶便能嗅到;或把少许蜜置于手掌,搓揉嗅之,有引人入胜的蜜香。

尝:优质蜂蜜芳香甜润,入口后回味长。掺假的蜂蜜没有花香味,有的假蜜有熬糖味,细品有白糖水味。纯正蜂蜜入口结晶会很快。