

吴 娇, 张世青, 张凤龙, 等. 两种无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物中总酚含量及其抗氧化性比较[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 1036-1040.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.04.032

## 两种无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物中总酚含量及其抗氧化性比较

吴 娇<sup>1,2</sup>, 张世青<sup>3</sup>, 张凤龙<sup>4</sup>, 高景林<sup>1</sup>, 赵冬香<sup>1</sup>, 赵 珊<sup>1</sup>, 韩文素<sup>1</sup>, 钟义海<sup>1</sup>, 王释婕<sup>1</sup>

(1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101; 2. 海南大学热带作物学院, 海南 海口 570000; 3. 海南大学植物保护学院, 海南 海口 570000; 4. 云南蜂弘生物科技有限公司, 云南 昆明 650000)

**摘要:** 本研究以戈氏无刺蜂蜂胶和黄纹无刺蜂蜂胶为研究对象, 采用超声辅助提取法, 以乙酸乙酯为提取剂, 比较 2 种蜂胶在不同料液比下的提取率, 测定提取率最高条件下 2 种蜂胶提取物中总酚含量及其抗氧化能力。结果表明, 不同料液比的提取效果不同, 戈氏无刺蜂蜂胶和黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物的 pH 范围分别为 3.17~3.58 和 2.25~2.75; 当料液比为 1.0 : 5.0 (g/ml) 时戈氏无刺蜂蜂胶和黄纹无刺蜂蜂胶具有最高的提取率, 分别为 47.68%±1.26% 和 43.12%±3.64%; 总酚含量以每克样品中没食子酸当量表示, 戈氏无刺蜂蜂胶和黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物中的总酚含量分别为 (47.91±0.36) mg/g, GAE 和 (58.94±1.04) mg/g, GAE, 呈极显著差异 ( $P<0.01$ ); DPPH 自由基清除率随 2 种无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物的质量浓度升高而增加, 半清除率质量浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 (26.30±1.04) μg/ml 和 (24.60±1.02) μg/ml, 黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物的抗氧化性高于戈氏无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物。

**关键词:** 戈氏无刺蜂; 黄纹无刺蜂; 蜂胶; 乙酸乙酯; 总酚; 抗氧化性

**中图分类号:** S896.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)04-1036-05

## Comparison on total phenols content and antioxidant activity of ethyl acetate extracts from two kinds of stingless bee geopropolis

WU Jiao<sup>1,2</sup>, ZHANG Shi-qing<sup>3</sup>, ZHANG Feng-long<sup>4</sup>, GAO Jing-lin<sup>1</sup>, ZHAO Dong-xiang<sup>1</sup>, ZHAO Shan<sup>1</sup>, HAN Wen-su<sup>1</sup>, ZHONG Yi-hai<sup>1</sup>, WANG Shi-jie<sup>1</sup>

(1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570000, China; 3. College of Plant Protection, Hainan University, Haikou 570000, China; 4. Yunnan Fenghong Biotechnology Co., Ltd., Kunming 650000, China)

**Abstract:** In this study, the effects of different solid-liquid ratios on the extraction rate of geopropolis from *Tetragonula gressitti* (Sakagami) and *Lepidotrigona flavibasis* (Cockerell) were compared by using ultrasonic-assisted method.

Total phenols content and antioxidant activity were evaluated in the ethyl acetate extracts of two stingless bee geopropolis under the condition of the highest extraction rate. The results showed that the extraction effects were different under different solid-liquid ratios of geopropolis and ethyl acetate, and pH of ethyl acetate extracts of *T. gressitti* and *L. flavibasis* ranged from 3.17 to 3.58 and

收稿日期: 2020-02-05

基金项目: 海南省重点研发项目 (ZDYF2018082); 国家自然科学基金项目 (31402145)

作者简介: 吴 娇 (1989-), 女, 贵州贵阳人, 博士研究生, 研究方向为细胞与分子生物学。 (E-mail) wujiao1202@yahoo.com。张世青为共同第一作者。

通讯作者: 王释婕, (E-mail) wang\_yujie@yeah.net

2.25 to 2.75, respectively. When the solid-liquid ratio was 1.0 : 5.0 (g/ml), the highest extraction rates of *T. gressitti* geopropolis and *L. flavibasis* geopropolis were  $47.68\% \pm 1.26\%$  and  $43.12\% \pm 3.64\%$ , respectively. The total phenols content of *T. gressitti* ( $47.91 \pm 0.36$ ) mg/g, GAE was significantly lower than that of *L. flavibasis* ( $58.94 \pm 1.04$ ) mg/g, GAE ( $P < 0.01$ ). DPPH free radical scavenging capacity increased with the increasing of mass concentration of ethyl acetate extracts from two stingless bee geopropolis, and  $IC_{50}$  values were  $(26.30 \pm 1.04)$   $\mu\text{g/ml}$  and  $(24.60 \pm 1.02)$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively, indicating those ethyl acetate extracts of *L. flavibasis* geopropolis had stronger antioxidant activity than those of *T. gressitti* geopropolis.

**Key words:** *Tetragonula gressitti* (Sakagami); *Lepidotrigona flavibasis* (Cockerell); geopropolis; ethyl acetate; total phenols; antioxidant activity

无刺蜂蜂胶是由无刺蜂工蜂采集多种植物树脂,与蜡腺分泌物以及泥土等混合加工而成的胶状固形物,主要用于筑巢、填补蜂箱缝隙以及防御天敌等<sup>[1]</sup>。无刺蜂蜂胶具有丰富的药理学活性,在抑菌、抗癌<sup>[2]</sup>、抗氧化<sup>[3]</sup>及抗炎<sup>[4]</sup>等方面的效果最为显著,此外还具有护胃、护肝及防治病虫害等作用<sup>[5]</sup>。

蜂胶的成分复杂,具有多种生物学活性,不同提取方法对于蜂胶的活性成分和生物学功能有很大影响。以往大多数研究主要关注西方蜜蜂(*Apis mellifera*)蜂胶醇提物或水提物的活性<sup>[6-8]</sup>,而研究表明,蜂胶的乙酸乙酯提取物不仅对温度和溶液的酸碱性有很好的稳定性<sup>[9]</sup>,还对柑橘青霉病和绿霉病有显著的抑制作用<sup>[10]</sup>。

目前国内外主要针对 *Melipona subnitida*<sup>[11]</sup>、*Scaptotrigona postica*<sup>[12]</sup>以及马来西亚无刺蜂(*Heterotrigona itama*)<sup>[13]</sup>等无刺蜂蜂胶的化学成分及抗氧化性进行研究,而中国无刺蜂蜂产品研究尚处于起步阶段。鉴于此,本研究以中国戈氏无刺蜂[*Tetragonula gressitti* (Sakagami)]和黄纹无刺蜂[*Lepidotrigona flavibasis* (Cockerell)]蜂胶为研究对象,采用乙酸乙酯按不同料液比提取蜂胶,比较提取率最高的蜂胶提取物中总酚含量及抗氧化效果,以期为中国无刺蜂蜂胶作为天然抗氧化剂提供科学理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

本试验所用的戈氏无刺蜂和黄纹无刺蜂蜂胶均采自云南昆明。乙酸乙酯、无水碳酸钠、甲醇、抗坏血酸购自西陇科学股份有限公司,没食子酸、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)购自上海阿拉丁生物科技股份有限公司,芦丁购自源叶生物科技有限公司,Folin-Ciocalteu 购自 Sigma-Aldrich Corporation of the USA。

### 1.2 仪器与设备

超声波清洗机(SB-5200D,宁波新芝生物科技股份有限公司产品)、涡旋仪(VORTEX-J,海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品)、离心机(德国艾本德公司产品)、冰箱(BCD-532WDPT,青岛海尔股份有限公司产品)、电子天平(ME403E/02,梅特勒-托利多仪器上海有限公司产品)、pH计(FE28,梅特勒-托利多仪器上海有限公司产品)、旋转蒸发仪(RE-52AA,上海振捷实验设备有限公司产品)、循环水式真空泵(巩义市英裕予华仪器厂产品)、低温冷却液循环泵(DL-2005,上海启前电子科技有限公司产品)、台式冷冻离心机(德国制造)、酶标仪(INFINITE 200 PRO,奥地利托肯有限公司产品)、纯水仪(PF09771,法国制造)、研磨仪(MM 400, Retsch 公司产品)等。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 无刺蜂蜂胶提取物的制备** 用超纯水将无刺蜂蜂胶清洗2~3遍去除杂质,晾干后放入-20℃冰箱冷冻。将冷冻后的蜂胶切碎,再用液氮将其研磨成粉状。称取无刺蜂蜂胶粉末4g,按照蜂胶:乙酸乙酯(质量体积比)1.0:10.0、1.0:5.0、1.0:2.5(g/ml)加入相应体积的乙酸乙酯浸提24h,分别制成不同料液比的提取物,浸提期间不定时摇晃,辅助超声30min后,10000r/min离心10min,取上清液浓缩,浓缩后的蜂胶提取物干燥后保存在冰箱中备用。提取率计算公式:

无刺蜂蜂胶提取率 = (干燥后总质量 - 容器质量) / 无刺蜂蜂胶初始质量 × 100%

**1.3.2 pH的测定** 不同料液比无刺蜂蜂胶提取液的pH,用pH试纸(量程为0.5~5.0)和pH计进行测定并记录。

**1.3.3 总酚含量的测定** 参考Folin-Ciocalteu法<sup>[14]</sup>测定无刺蜂蜂胶提取物中的总酚含量。选取提取率

最高的 2 种无刺蜂蜂胶提取物,以没食子酸制作标准曲线,测定其总酚含量。配制 1 000  $\mu\text{g/ml}$  的蜂胶提取物甲醇溶液和 1 000  $\mu\text{g/ml}$  的没食子酸甲醇溶液,将没食子酸甲醇溶液稀释成 100.00  $\mu\text{g/ml}$ 、50.00  $\mu\text{g/ml}$ 、25.00  $\mu\text{g/ml}$ 、12.50  $\mu\text{g/ml}$  和 6.25  $\mu\text{g/ml}$  质量浓度梯度。分别取上述浓度没食子酸甲醇溶液和蜂胶提取物甲醇溶液各 0.2 ml,加入 0.5 ml Folin-Ciocalteu 溶液和 2.0 ml 37.5% 碳酸钠,用超纯水定容至 5.0 ml,充分混匀并避光静置 30 min。每个处理取 0.2 ml 加入 96 孔板,在 760 nm 处测量吸光度,以甲醇溶液作为空白对照,总酚含量以样品中没食子酸当量质量( $\text{mg/g}$ , GAE)表示。

1.3.4 抗氧化性的测定 参考 Sobrinho 等<sup>[15]</sup>的方法,用 DPPH 法测定无刺蜂蜂胶抗氧化性。选取提取率最高的 2 种无刺蜂蜂胶提取物配制 1 000  $\mu\text{g/ml}$  提取物甲醇溶液,分别取 10  $\mu\text{l}$ 、20  $\mu\text{l}$ 、40  $\mu\text{l}$ 、80  $\mu\text{l}$ 、160  $\mu\text{l}$  提取物甲醇溶液,用 DPPH 甲醇溶液(40  $\mu\text{g/ml}$ )定容至 1 ml,样品质量浓度分别为 10  $\mu\text{g/ml}$ 、20  $\mu\text{g/ml}$ 、40  $\mu\text{g/ml}$ 、80  $\mu\text{g/ml}$ 、160  $\mu\text{g/ml}$ ,摇匀并避光静置 30 min。以甲醇溶液作为空白对照,以 DPPH 甲醇溶液作为阴性对照,在 517 nm 处测定吸光度。计算抗氧化性及半清除率质量浓度( $IC_{50}$ )。

抗氧化性计算公式:

$$AA = \frac{ABS_{cn} - (ABS_{sample} - ABS_{blank})}{ABS_{cn}} \times 100\%$$

其中,AA 为抗氧化活性的百分比; $ABS_{cn}$  为阴性对照的吸光度; $ABS_{sample}$  为样品的吸光度; $ABS_{blank}$  为空白对照的吸光度。

#### 1.4 数据分析

每个处理平行测定 3 次,采用 SPSS 20 软件方差分析(ANOVA)中的 Duncan's 多重比较进行分析,采用 GraphPad Prism 7 软件计算  $IC_{50}$ 。结果均以平均值 $\pm$ 标准误差表示, $P < 0.05$  表示差异显著, $P < 0.01$  表示差异极显著。采用 Origin 2018 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 两种无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取率

不同料液比无刺蜂蜂胶与乙酸乙酯所得到的提取物得率差别很大(表 1)。戈氏无刺蜂蜂胶与乙酸乙酯料液比为 1.0 : 5.0 ( $\text{g/ml}$ ) 时提取率最高,为 47.68% $\pm$ 1.26%,其次是当料液比为 1.0 : 10.0 ( $\text{g/ml}$ ) 时,提取率为 46.45% $\pm$ 2.37%,且 2 种料液比的提取率

极显著高于料液比为 1.0 : 2.5 ( $\text{g/ml}$ ) 的提取率( $P < 0.01$ )。黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯的提取率最高为 43.12% $\pm$ 3.64%,最低为 29.26% $\pm$ 0.68%,且按料液比 1.0 : 10.0 ( $\text{g/ml}$ ) 和 1.0 : 5.0 ( $\text{g/ml}$ ) 所得到的提取率均极显著高于料液比 1.0 : 2.5 ( $\text{g/ml}$ ) 得到的提取率( $P < 0.01$ )。戈氏无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物的 pH 范围为 3.17~3.58,黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物的 pH 范围则为 2.25~2.75。当戈氏无刺蜂蜂胶和黄纹无刺蜂蜂胶与乙酸乙酯料液比为 1.0 : 5.0 ( $\text{g/ml}$ ) 时提取率最高,故采用料液比为 1.0 : 5.0 ( $\text{g/ml}$ ) 的无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物进行后续研究。

表 1 戈氏无刺蜂蜂胶和黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取率及提取液 pH 的比较

Table 1 Comparison on extraction rate and pH of ethyl acetate extracts from *Tetragonula gressitti* geopropolis and *Lepidotrigona flavibasis* geopropolis

样品	蜂胶质量/溶剂体积 ( $\text{g/ml}$ )	提取率 (%)	pH
戈氏无刺蜂蜂胶	1.0 : 10.0	46.45 $\pm$ 2.37Aa	3.50
	1.0 : 5.0	47.68 $\pm$ 1.26Aa	3.58
	1.0 : 2.5	30.09 $\pm$ 1.50Bb	3.17
黄纹无刺蜂蜂胶	1.0 : 10.0	40.68 $\pm$ 3.27Aa	2.75
	1.0 : 5.0	43.12 $\pm$ 3.64Aa	2.58
	1.0 : 2.5	29.26 $\pm$ 0.68Bb	2.25

同一列数据后不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ ),不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

### 2.2 两种无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物中总酚含量

根据没食子酸标准曲线( $Y = 0.0077 + 0.0034x$ ,  $R^2 = 0.9996$ ) (图 1),计算得到戈氏无刺蜂蜂胶和黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物的总酚含量(图 2),结果表明黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物中总酚含量[(58.94 $\pm$ 1.04)  $\text{mg/g}$ , GAE]极显著高于戈氏无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物中总酚含量[(47.91 $\pm$ 0.36)  $\text{mg/g}$ , GAE] ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 两种无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物的抗氧化性

由图 3 可知,当样品质量浓度为 10~160  $\mu\text{g/ml}$ ,2 种无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物对 DPPH 自由基均有一定的清除能力,且 DPPH 自由基清除率随提取物浓度的增加而升高。当样品质量浓度达到 80  $\mu\text{g/ml}$  时,变化趋于平缓。低数值的  $IC_{50}$  对应高抗氧化活性,戈氏无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物的抗氧化性  $IC_{50}$  高于黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物的抗氧化性  $IC_{50}$ ,表明黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取

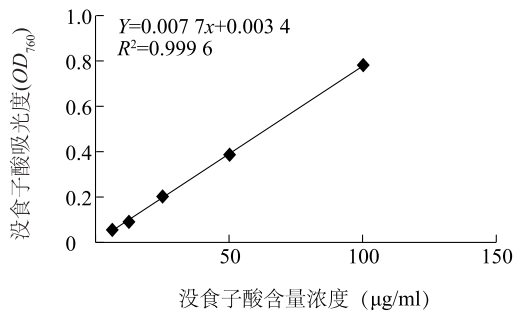


图1 没食子酸标准曲线

Fig.1 The standard curve of gallic acid

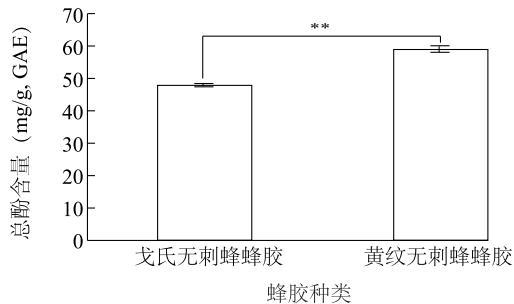
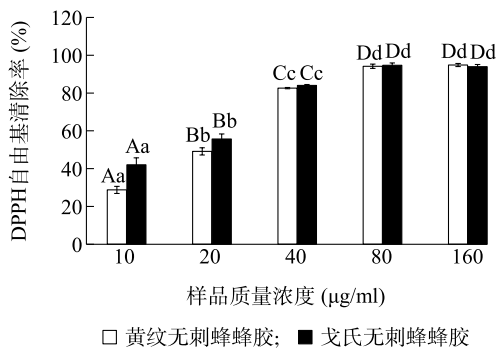
\*\*表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。

图2 2种无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物总酚含量的比较

Fig.2 Comparison on total phenols content of ethyl acetate extracts from two stingless bee geopropolis

物的抗氧化性高于戈氏无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物 (表2)。



不同大写字母表示差异极显著 ( $P<0.01$ ), 不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

图3 2种无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物清除 DPPH 自由基的能力

Fig.3 DPPH free radical scavenging capacity of ethyl acetate extracts from two stingless bee geopropolis

### 3 讨论

采用溶剂浸提法提取蜂胶是根据所选用浸提溶剂的极性与目标成分的极性相似相溶的原理,不同

溶剂因极性不同,浸提得到的目标成分及含量存在差异<sup>[16]</sup>。本研究结果表明,戈氏无刺蜂蜂胶和黄纹无刺蜂蜂胶与乙酸乙酯料液比为1.0:5.0 (g/ml)时提取率均为最高,其次是当料液比为1.0:10.0 (g/ml)时的提取率。无刺蜂蜂胶提取率发生变化的原因除了与蜂胶本身特性有关外,跟溶剂极性及其体积也有很大关系,因此提取出来的物质也会有差异。

表2 2种无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物清除 DPPH 自由基的  $IC_{50}$ Table 2  $IC_{50}$  for DPPH radical scavenging capacity of ethyl acetate extracts from two stingless bee geopropolis

样品	回归方程	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
戈氏无刺蜂蜂胶	$Y = 40.09 + \frac{54.79}{1 + 10^{(1.420 - x) \times 3.406}}$ ( $R^2 = 0.9992$ )	$26.30 \pm 1.04$
黄纹无刺蜂蜂胶	$Y = 24.75 + \frac{70.69}{1 + 10^{(1.391 - x) \times 3.122}}$ ( $R^2 = 0.9999$ )	$24.60 \pm 1.02$

自由基是人体组织中有氧代谢过程中的产物,对机体组织有一定损害甚至会导致脂质过氧化、动脉粥样硬化、心血管疾病等的产生<sup>[17]</sup>。本研究结果表明,戈氏无刺蜂蜂胶和黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物对 DPPH 自由基均有一定的清除能力, DPPH 自由基清除率随提取物质量浓度的增加而升高,且黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物的抗氧化性高于戈氏无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物,这与 *M. subnitida* 蜂胶乙酸乙酯提取物抗氧化活性最强的结果相一致<sup>[11]</sup>。也有大量研究结果表明, *S. postica*<sup>[12]</sup>、*S. depilis* 和 *M. quadrifasciata anthidioides*<sup>[18]</sup> 等无刺蜂蜂胶均有清除 DPPH 自由基的作用。此外,黄纹无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物中总酚含量极显著高于戈氏无刺蜂蜂胶乙酸乙酯提取物,但是其总酚含量远低于 Araújo 等<sup>[19]</sup>的测定结果,这可能与蜂胶来源、成分差异或者蜂胶的提取和测定方法有关。本研究中,蜂胶总酚含量与抗氧化性呈正相关,这一结论与 Pazin 等<sup>[20]</sup>证明巴西无刺蜂蜂胶酚酸含量与抗氧化活性相关的结果相一致。

### 参考文献:

- [1] SOUZA S A, DIAS T L M F, SILVA T M G, et al. Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Api-



- dae; Meliponini) [J]. Sociobiology, 2014, 61(4): 560-565.
- [2] IBRAHIM N, ZAKARIA A J, ISMAIL Z, et al. Antibacterial and phenolic content of propolis produced by two Malaysian stingless bees, *Heterotrigona itama* and *Geniotrigona thoracica* [J]. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 2016, 8(1): 156-161.
- [3] LIBERIO S A, PEREIRA A L A, DUTRA R P, et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2011, 11: 108-117.
- [4] DUTRA R P, ABREU B V B, CUNHA M S, et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(12): 2549-2557.
- [5] 陈佳玮, 申小阁, 胡福良. 无刺蜂蜂胶化学成分及生物学活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(12): 2021-2029.
- [6] 张其安, 王 坤, 杨少波. 蜂胶提取工艺的优化及蜂胶含片的制备研究[J]. 食品科技, 2016, 41(8): 223-228.
- [7] 王月华, 王变变, 尹旭升, 等. 中国蜂胶水提物抗肿瘤活性功效成分研究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(12): 153-156.
- [8] DUARTE S, KOO H, BOWEN W H, et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyl transferases and on growth and adherence of mutans streptococci [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2003, 26(4): 527-531.
- [9] 杨书珍, 彭丽桃, 潘思轶, 等. 蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉菌的抑制作用及稳定性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 87-90.
- [10] YANG S, PENG L, CHENG Y, et al. Control of citrus green and blue molds by Chinese propolis [J]. Food Science and Technology, 2010, 19: 1303-1308.
- [11] SOUZA S A, CAMARA C A, SILVA E M S, et al. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 2013: 801383.
- [12] FERREIRA J M, FERNANDES-SILVA C C, SALATINO A, et al. Antioxidant activity of a geopropolis from northeast Brazil: chemical characterization and likely botanical origin [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 2017: 4024721.
- [13] 王 蓓, 常化松, 苏松坤, 等. 无刺蜂蜂胶乙醇提取物的体外抗氧化及抗炎活性[J]. 中国农业科学, 2019, 52(5): 939-948.
- [14] AMORIM E L C, NASCIMENTO J E, MONTEIRO J M, et al. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology [J]. Functional Ecosystems and Communities, 2008, 2(1): 88-94.
- [15] SOBRINHO T J S P, CASTRO V T N A, SARAIVA A M, et al. Phenol content and antioxidant capacity of four *Cnidocolus* species (*Euphorbiaceae*) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil [J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, 5(20): 2310-2316.
- [16] SAWAYA A C H F, SOUZA K S, MARCUCCI M C, et al. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2004, 35(1/2): 104-109.
- [17] BOORA F, CHIRISA E, MUKANGANYAMA S. Evaluation of nitrite radical scavenging properties of selected Zimbabwean plant extracts and their phytoconstituents [J]. Journal of Food Processing, 2014(2): 1-7.
- [18] BONAMIGO T, CAMPOS J F, ALFREDO T M, et al. Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of Propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017. doi:10.1155/2017/1038153.
- [19] ARAÚJO K S S, SANTOS JÚNIOR J F, SATO M O, et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (*Meliponinae*) and *Apis* from two regions of Tocantins, Brazil [J]. Acta Amazonica, 2016, 46(1): 61-68.
- [20] PAZIN W M, MÔNACO L M, SOARES EGEA A E, et al. Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types [J]. Journal of Apicultural Research, 2017, 56(1): 40-49.

(责任编辑:陈海霞)