油菜花粉中黄酮类物质提取工艺的优化研究

阮 征[1]，胡筱波[2,*]，赖富饶[3]，朱新荣[2]，吴谋成[2]，吴 晖[3]，胡勇克[4]，温红霞[4]
(1.教育部食品科学重点实验室，南昌大学生命科学学院食品科学与工程系，江西 南昌 330031；
2.华中农业大学食品科技学院，湖北 武汉 430070；3.华南理工大学轻工与食品学院，广东 广州 510641；
4.南昌大学资产管理处，江西 南昌 330031)

摘 要：以油菜花粉为原料，提取黄酮类化合物，探讨乙醇浓度、料液比、提取时间、温度等因素对总黄酮得率的影响。应用Box-Behnken中心组合实验和响应面分析法，确定了油菜花粉中黄酮类物质的最佳提取条件：温度74℃，乙醇浓度88%，料液比1:10，提取时间48min。

关键词：油菜花粉；黄酮；响应曲面

Extraction Technology of Flavones in Cole Pollen

RUAN Zheng[1], HU Xiao-bo[2,*], LAI Fu-rao[3], ZHU Xin-rong[2], WU Mou-cheng[2], WU Hui[3], HU Yong-ke[4], WEN Hong-xia[4]
(1.Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Department of Food Science and Engineering, College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China;
2.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
3.College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;
4.Department of Assets Administration, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Studies were made on extracting flavones from cole pollen. The effects of different solvent concentrations, proportion of material and solution, extraction time and extraction temperature on yield were discussed. Box-Behnken center-united experiment design and response surface methodology were used to optimize the extraction technology of flavones of cole pollen. The optimum extraction conditions showed that the temperature 74 ℃, concentration of ethanol 88%, the ratio of material to solvent 1:10, extraction time 48 min.

Key words: cole pollen; flavones; response surface methodology
中图分类号：S896.4 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2007)07-0133-05

收稿日期：2007-05-23 *通讯作者
基金项目：国家“十一五”重大科技专项(2006AA206A04)
作者简介：阮征(1978-)，男，讲师，博士，研究方向为农产品深加工。

破坏降低到了最小的程度，严格控制可作到“0”排放。

本研究采用混合食用有机酸浸渍双孢蘑菇的新工艺，操作简单，鲜菇营养成分损失少，成本低，对环境的污染少。其机制是混合有机酸使汤汁和子实体中的pH低于3.5，各种杂菌、子实体菌丝细胞全部死亡，无法生存；混合有机酸在低浓度下不易挥发，保存液的pH稳定，可以长期保存食用菌的子实体。

这种加工技术保留了平菇质嫩、味美的原有风味和药用价值。该技术应该也适用于其他食用和部分蔬菜的加工，具有巨大的应用潜力。

参考文献：

[1] 贺新生. 混合食用有机酸浸渍双孢蘑菇试验[J]. 食用菌, 2006, 21: 38-40.
[2] 张玲, 贺新生. 酸渍香菇工艺研究[J]. 食品科技, 2003(10): 43; 48.
[3] 周树南. 食品生产卫生规范与质量保证[M]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 467.
[4] 刘长文. 双孢蘑菇泡菜制作工艺[J]. 食用菌, 1994(4): 39.

花粉中不但含有人体通常所需要的营养物质如蛋白质、脂肪、糖、微量元素和各种维生素，还含有黄酮、类胡萝卜素、磷脂、多不饱和脂肪酸等多种生物活性物质，花粉因而被誉为“微型营养库”[1]。中国科学院学部委员、著名的医药学家叶桔泉教授指出：“花粉是一种营养最全面的食疗佳品，具有强体力增精神、迅速消除疲劳和美容、抗衰老等作用。”现代药理实验研究表明，花粉具有降血脂[2]、抗辐射[3]、增强机体免疫功能[4]、保护肝脏、治疗前列腺增生以及抗衰老等作用[5-6]。目前在国内外掀起了研究和开发利用花粉的热潮。自由基研究学者认为，人体随着年龄的增加，自由基代谢紊乱，过量的自由基对人体细胞产生毒副作用，尤其对细胞膜的损伤作用最强，从而导致许多疾病的发生。黄酮类化合物是具有酚羟基的一类还原性的化合物，在生物体的内外都具有较强的抗氧化性。膳食中每日摄取一定量的抗氧化剂可以预防自由基对细胞膜的损伤，这类抗氧化剂中以黄酮类化合物最为明显[7]。

油菜是我国五个种植面积上亿亩的作物之一，是世界最大的油菜生产国，也是我国的主要油料作物。我国油菜生产分布比较广泛，主要在湖北、安徽、湖南，四川、江西和贵州等十省，总产量1200余万吨。由于油菜蜂花粉所具有的特殊的青腥味不大为人们所接受，所以不宜直接作为商品出售，造成大量陈放。油菜花粉是已知所有花粉中黄酮含量较高的一类花粉，但对油菜花粉中黄酮类物质的提取优化的研究不多。本研究对油菜花粉中黄酮类物质的提取工艺条件进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甘蓝型油菜花粉(陈放一年以上) 武汉小蜜蜂公司。

芦丁(生化试剂BR) 湖北省农业科学院；无水乙醇、石油醚、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙酸乙酯等均为分析纯。

1.2 仪器设备

可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司；分析天平 沈阳龙腾电子标量仪器有限公司；电热恒温水浴锅 江苏省医疗器械厂；干燥箱、搅拌器 上海市试验仪器总厂。

1.3 方法

1.3.1 破壁花粉的制备

采用温差破壁法，将研细均匀的油菜花粉-18℃冷冻24h，80℃热水搅匀，40℃恒温水浴搅拌6h，冷冻干燥后得到破壁油菜花粉。

1.3.2 黄酮类物质的提取

将破壁油菜花粉用石油醚处理10～12h除去脂，挥干石油醚后，分别取样2.0g，用水、80%乙醇、乙酸乙酯为提取溶剂，80℃恒温水浴回流两次，每次45min。快速冷却至室温，过滤并定容至100ml，即为待测样品。

1.3.3 测定方法[8]

以芦丁为标准样品，采用分光光度计法测定样品中黄酮类物质的含量。黄酮类化合物能与铝离子生成稳定的络合物，该络合物在波长为510nm处有特征吸收峰，其吸光值与总黄酮含量成正比。

1.4 数据处理与分析

利用SAS 8.0对数据进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 提取试剂的选择

分别用乙酸乙酯、80%乙醇、水对油菜花粉中黄酮类物质进行提取，结果如图1。

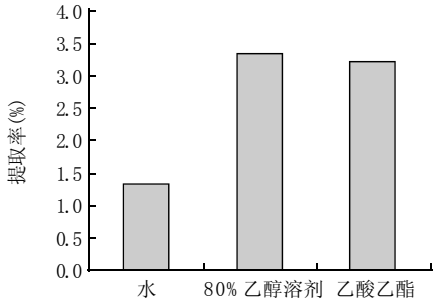

图1 溶剂对提取率的影响

Fig.1 Effects of different reagents on extraction rate

由图1可知，水作溶剂黄酮提取效率最低，80%乙醇作溶剂黄酮提取率最高，因此，本实验选择乙醇作为油菜花粉中黄酮类物质的提取溶剂。

2.2 乙醇提取黄酮类物质的单因素试验

2.2.1 乙醇浓度对提取效果的影响

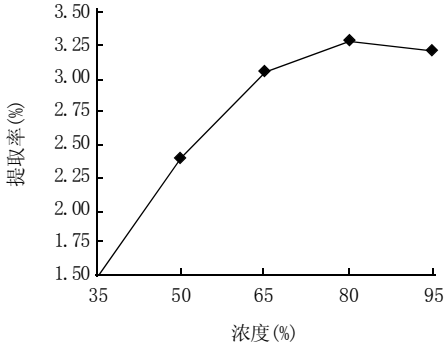

图2 乙醇浓度对提取率的影响

Fig.2 Effects of concentration of ethanol on extracting rate

由图2可知，油菜花粉的黄酮得率随乙醇浓度的增加而升高，但浓度超过80%反而开始下降。这可能是由于乙醇浓度过高时，沸点下降，导致挥发过大，同时一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分溶出量增加，与黄酮类化合物竞争和乙醇结合，从而导致黄酮类化合物提取率下降。因此，最适乙醇浓度为80%。

2.2.2 料液比对提取效果的影响

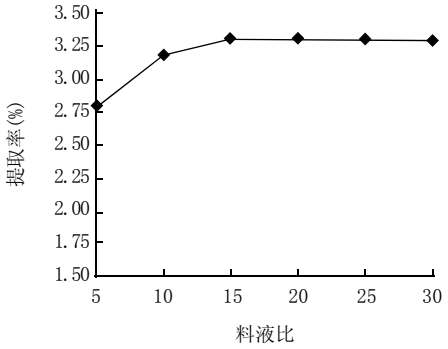

图3 料液比对提取率的影响

Fig.3 Effects of ratio of material to solvent on extracting rate

由图3可知，随料液比的增大，总黄酮得率增加，但从1:10到1:25的范围内增幅很小。分析其原因，在一定范围内溶剂用量增加有助于油菜花粉黄酮类化合物的浸出，溶剂用量少，提取不太完全，但溶剂用量过大，水浴加热的负荷增大，达到提取完全所需要的时间也增长，使得在有限的时间内提取不完全。因此，在提取量相差不大时，选择料液比较小的可以节约成本，综合考虑，采用1:10的比例比较合理。

2.2.3 提取时间对提取效果的影响

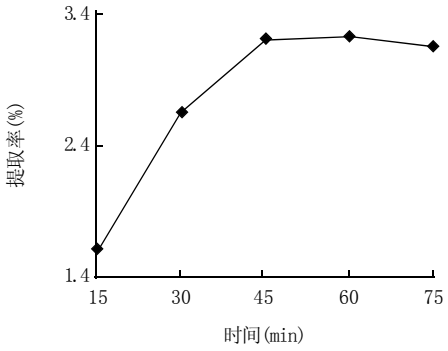

图4 水浴时间对提取率的影响

Fig.4 Effects of extracting time on extracting rate

由图4可知，提取时间延长，黄酮的提取率也随之增加，当时间超过45min时，时间延长提取率增加不明显，并有降低的趋势，表明长时间回流易于导致乙醇溶液的挥发，从而影响提取效果。所以提取时间应控制在45min为宜。

2.2.4 提取温度对提取效果的影响

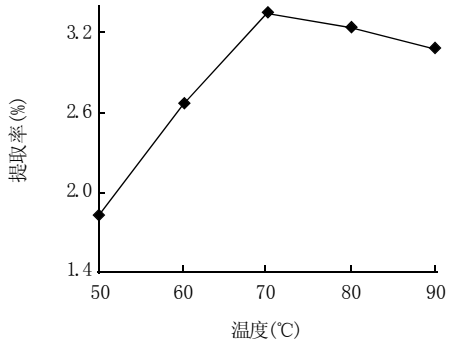

图5 温度对提取率的影响

Fig.5 Effects of temperature on extracting rate

由图5可知，提取温度在低于70℃时，随温度的升高黄酮提取率明显增加，但超过70℃，油菜花粉中黄酮类物质提取率反而随温度升高而降低。这表明，黄酮类物质的溶出率随着温度的升高而增加，但是温度过高，黄酮类物质的稳定性有一定的影响，且杂质的溶出量也会增加。提取温度为70℃时，油菜花粉中黄酮提取率最高。

2.3 响应面分析

2.3.1 因素水平的选取

选取提取时间、提取温度、乙醇浓度三个对油菜花粉中黄酮类物质提取效果影响较显著的三个因素，根据Box-Beknhen中心组合实验设计原理，设计三因素三水平的响应面试验。

2.3.2 响应面分析方案及结果

对提取时间A、提取温度B及乙醇浓度C作如下变换：$X_1=(A-45)/15$，$X_2=(B-70)/10$，$X_3=(C-80)/15$。以X_1、X_2、X_3为自变量，以黄酮类物质提取率为响应值(Y)，试验方案及结果见表2。

15个试验分为析因点和零点，试验号1～12是析因试验，13～15是中心试验。其中析因点为自变量取值在$X_1X_2X_3$所构成的三维定点，零点区域为中心点，零点试验重复三次，以估计试验误差。以油菜蜂花粉中黄酮类物质的提取率为响应值，经回归拟合后，得到回归方程：

$Y=3.5145+0.058325X_1+0.09405X_2+0.20815X_3-$

表1 响应面分析因素与水平

Table 1 Analytical factors and levels for RSA

因素	水平		
	-1	0	1
A时间(min)	30	45	60
B温度(℃)	60	70	80
C乙醇浓度(%)	65	80	95

表 2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Program and test results of RSA

试验号	X_1	X_2	X_3	Y 得率(%)
1	−1	−1	0	3.0558
2	−1	1	0	3.2901
3	1	−1	0	3.2472
4	1	1	0	3.4419
5	0	−1	−1	2.9205
6	0	−1	1	3.2571
7	0	1	−1	3.0888
8	0	1	1	3.4122
9	−1	0	−1	2.8743
10	1	0	−1	3.0195
11	−1	0	1	3.4604
12	1	0	1	3.4386
13	0	0	0	3.4221
14	0	0	0	3.5838
15	0	0	0	3.5376

$0.0099X_1X_2-0.04175X_1X_3-0.0033X_2X_3-0.1136X_1^2-0.14215X_2^2-0.2027X_3^2$

表 3 回归分析结果

Table 3 Results of regression analysis

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	Pr＞F	显著性
X_1	1	0.027214	0.027214	3.758676	0.11025	
X_2	1	0.070763	0.070763	9.773341	0.026068	*
X_3	1	0.346611	0.346611	47.87164	0.000967	**
X_1X_1	1	0.047649	0.047649	6.580971	0.050319	
X_1X_2	1	0.000392	0.000392	0.054146	0.825225	
X_1X_3	1	0.006972	0.006972	0.96296	0.371508	
X_2X_2	1	0.074609	0.074609	10.3045	0.023727	*
X_2X_3	1	0.000044	0.000044	0.006016	0.941183	
X_3X_3	1	0.151707	0.151707	20.95274	0.005961	**
模型	9	0.692745	0.076972	10.63082	0.009027	**
误差	5	0.036202	0.00724			
总和	14	0.728948				

注：* 为显著($p<0.05$)；** 为极显著($p<0.01$)。

由表 3 可知，上述回归方程描述各因子与响应值之间的关系时，其因变量和全体自变量之间的线性关系显著($r=0.692745/0.728948=95.03\%$)，方程$F>F_{0.01}(9,5)=10.63082$。所以，该方程是极显著的。若$p<0.05$方程是显著的，则表 3 中 X_2、X_3、X_2X_2 和 X_3X_3 项的影响是显著的；而 $r=95.03\%$，说明响应值(得率)的变化有 95.03% 来源于所选变量，即提取时间、提取温度和乙醇浓度。因此，该回归方程对试验拟合情况较好，可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系，回归方程的各项方差分析结果表明，一次项和二次项都有显著性因素，因此各试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。所以，可以利用该回归方程确定最佳提取工艺条件。

响应面图形是响应值对各试验因子 X_1、X_2、X_3 所构成的三维空间的曲面图，从响应面分析图上形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用。当特征值均为正值时，响应面分析图为山谷形曲面，有极小值存在；当特征值为负值时，为山丘曲面，有极大值存在；当特征值有正有负时，为马鞍形曲面，无极值存在[9]，根据回归方程作出不同因子的响应面分析图，结果见图 6～8。对回归方程求一阶偏导数，即得最佳值。

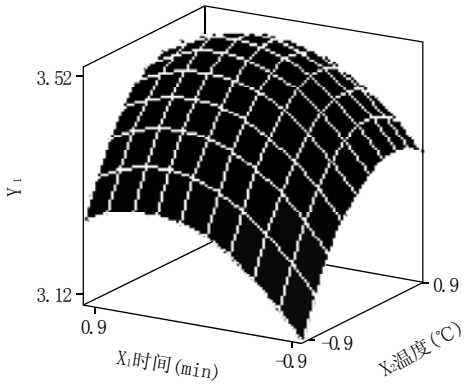

图 6 Y=f (X_1, X_2)的响应面图

Fig.6 Responsive surfaces of Y=f (X_1, X_2)

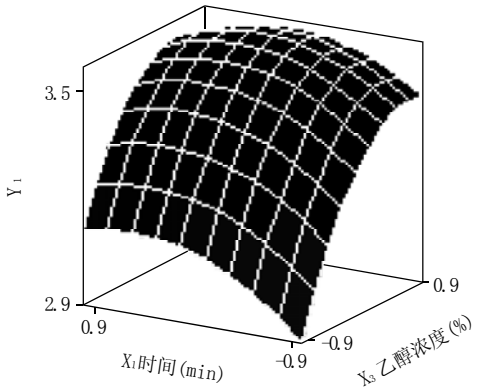

图 7 Y=f (X_1, X_3)的响应面图

Fig.7 Responsive surfaces of Y=f (X_1, X_3)

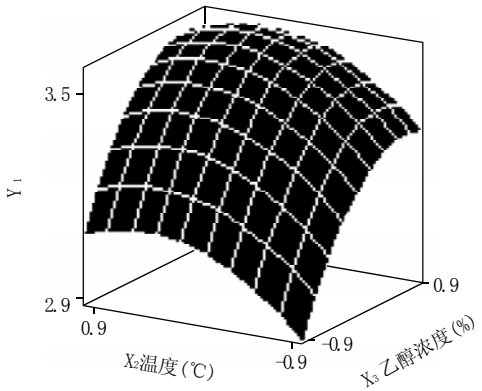

图 8 Y=f (X_2, X_3)的响应面图

Fig.8 Responsive surfaces of Y=f (X_2, X_3)

$0.058325-0.2272X_1-0.0099X_2-0.04175X_3=0$

$0.09405-0.0099X_1-0.2843X_2-0.0033X_3=0$

$0.20815-0.04175X_1-0.0033X_2-0.4054X_3=0$

解得 $X_1=0.159$、$X_2=0.366$、$X_3=0.494$。

代入变换公式即得时间为48min，温度为74℃，乙醇浓度为88%。即在74℃下乙醇浓度为88%时提取48min，由回归方程预测在此条件下的黄酮类物质得率的理论值为3.59%。

2.4 不同样品中黄酮类物质的得率

表4 不同样品中黄酮类化合物的含量

Table 4 Contents of flavones in different samples

花粉样品	平均得率(%)
未破壁新花粉	3.45±0.0522
破壁新花粉	3.59±0.0223
未破壁陈花粉(贮藏一年)	3.48±0.0575

根据最佳提取条件分别对三种不同花粉进行黄酮类物质的提取。表4结果表明，未破壁油菜花粉中黄酮类物质的含量在3.45%左右，而破壁的花粉黄酮类物质得率可达到3.59%。在最佳提取条件下，能使黄酮类物质的提取率有较大的提高。进一步表明，该回归方程是可取的，利用响应面分析法优化黄酮类物质提取工艺能得到较好效果。

3 结 论

利用Box-Behnken中心组合试验设计和响应面分析法，借助SAS统计软件，能方便快捷有效地对油菜花粉中黄酮类物质的提取工艺进行优化，本实验取得较为理想的结果。优化得出的最佳提取工艺条件为：温度74℃、乙醇浓度88%、提取时间48min。产品得率可达3.59%。实验对油菜花粉黄酮进一步的提取与生物活性研究具有重要作用。

参考文献：

[1] 曹炜, 尉亚辉. 蜂产品保健原理与加工技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 124-151.

[2] 曾述之, 刘泳泉. 花粉对小鼠实验性高血脂的影响[J]. 中国养蜂, 1987(4):14-15.

[3] PRATT D E. Water soluble antioxidant activity soybeans[J]. Food Science, 1972, 37: 322-323.

[4] PRATT D E. Lipid antioxidants in plant tissue[J]. Food Science, 1965, 30: 737-742.

[5] RAFAT H S. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids[J]. Phytochmistry, 1987, 26: 2489-2491.

[6] 田清来, 张震. 蜂花粉降血脂、抗氧化和防衰老作用的研究[J]. 中华老年医学杂志, 1991, 22(4): 182-184.

[7] 曹炜, 赵长琦, 尉亚辉. 油菜花粉黄酮对氧自由基致鼠红细胞膜损伤的保护作用[J]. 食品科学, 1999(4): 45-47.

[8] 魏永生, 郑敏燕, 王永宁, 等. 青海油菜蜂花粉黄酮类化合物含量的研究[J]. 西北植物学报, 2004(2): 301-305.

[9] GUPTA S, MANOHAR C S. An improved response surface method for the determination of failure probability and importance measures[J]. Structural Safety, 2004, 26: 123-139.

信 息

美国研制出可转移脂肪药物

美国科学家最近研制出一种转移身体局部脂肪的药物。对老鼠的实验发现，该药物能帮助把脂肪转移到身体的其他部位，比如胸部。这无疑具有健康与美容双重功效。这一研究成果被发表在《自然医学》杂志上。

这项研究基于一种叫神经肽Y(NPY)的神经传递素。负责此项研究的华盛顿乔治敦大学医疗中心的祖科夫斯卡博士说，对老鼠的试验显示，神经肽Y帮助制造的脂肪对人类更有害。如果神经肽Y得到有效控制，就可以减缓由肥胖引起的负面影响，比如心脏病和糖尿病等。神经肽Y与神经肽Y2受体(Y2R)相连，它能活跃脂肪细胞及血管中的一些细胞。

在这次研究中，研究人员首先给老鼠施加压力，“复制”人类的生活。比如，他们让老鼠站在冷水坑中，类似人在冬天湿着脚坐公共汽车。半数受压力的老鼠吃普通的饮食，另外一半老鼠吃高脂高糖的“美国饮食”。结果发现，吃普通饮食的老鼠体重降低了，而吃“美国饮食”的老鼠体重增加明显，它们的身体中制造出了多余的神经肽Y。

在研究人员给老鼠注射了能够阻止Y2R的药物后，老鼠大肚腩的部位减轻了40%的重量，糖尿病和其它疾病的不良反应也消失了。祖科夫斯卡认为，神经肽Y帮助身体储存脂肪。

此外，研究人员还将神经肽Y制成的小球植入猕猴的皮肤下，结果发现，小球的周围都长出了脂肪。这种试验有助于美容手术，如让一个上了年纪的人脸颊上丰满起来等。控制神经肽Y有可能将为整形外科医生提供新的手段，如“可以把臀部的脂肪转移到胸部或面颊”。