油菜蜂花粉中黄酮类化合物的提取工艺研究

卢 挺[1]，郭雪微[2,*]，马兰玉[1] ，吴玲歌[1]
(1.青海省产品质量监督检验所，青海 西宁 810008；2.北京市大兴区人民医院，北京 102600)

摘 要：本研究采用乙醇提出、水沉淀，并结合大孔树脂富集、乙醇洗脱等方法进行破壁油菜蜂花粉中黄酮类化合物的提取工艺研究，获得较好结果。花粉总黄酮的转移率可达70%以上，提取物的黄酮类化合物含量大于50%。采用柱式分离、有机溶剂分步洗脱等方法从提取物中分离出芦丁、槲皮素、山奈酚、异鼠李素等四种单体黄酮，经核磁共振结构鉴定证实的有芦丁、槲皮素、山奈酚等三种。同时，采用富集、洗脱等方法分离出β-谷甾醇、β-豆甾醇等两种生物活性物质并经核磁共振结构鉴定证实。

关键词：蜂花粉；黄酮类化合物；提取

Study on Extraction Technology of Flavonoids from Rape Bee Pollen

LU Ting[1]，GUO Xue-wei[2,*]，MA Lan-yu[1]，WU Ling-ge[1]
(1.Qinghai Institute of Supervision and Inspection on Product Quality, Xining 810008, China；
2.Daxing People’s Hospital, Beijing 102600, China)

Abstract: Technological extraction of flavonoids in rape bee pollen was studied by using the methods of ethyl alcohol extraction and water precipitation combined with macroporous resin concentration and ethyl alcohol elution, and the satisfying results were obtorined. The transfer rate of flavonoids in rape bee pollen is over 70%, and the content of flavonoids is over 50%. Rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin are separated from extracts by the methods of column separation and stepping elution of organic solvent. Rutin, quercetin and kaempferol are verified by appraisal of nuclear magnetic resonance. Meanwhile, β-sitosterol and β-stigmasterol are separated by the methods of concentration and elution. The bioactive substances are verified by nuclear magnetic resonance.

Key words: bee pollen; flawonoids; extraction
中图分类号：O623.54 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)10-0148-05

蜂花粉是有花植物的雄性生殖细胞，也是一种幼蜂的食粮。工蜂在采集花粉时加上自己特殊的腺体分泌物和花蜜等初步加工成花粉团，将之放入后腿的花粉筐中带回蜂房储存[1]。蜂花粉在蜂房里所有物质中最具营养价值。与其他任何食物相比，蜂花粉含有更高比例的人体必需营养成分。它能刺激器官和腺体，使人焕发青春、恢复精力并延长人的寿命。蜂花粉被证实为可增强活力和运动能力的十分有用的营养物质。可促进心率和呼吸的恢复并将之保持在正常水平。它可提供能量、精力、力量并提高运动水平[2]。

蜂花粉也含有丰富的黄酮类化合物[3-4]。黄酮类化合物具有对人体健康有益的诸多功能，因而日益引起人们广泛的兴趣。它们有抗病毒、抗过敏、抗血凝、抗炎症、抗失调等作用[5]，有卓越的抗氧化作用和清除自由基能力[6-7]。它们可通过捕获自由基而维护细胞的质量并减小对细胞的危害。可帮助血管壁变得更能抵御有害物质损害，并降低血脂和控制血清胆固醇[10]。

本研究对青藏高原油菜蜂花粉中的黄酮类化合物进行了提取分离实验。因花粉外部有一层坚硬的孢子壁(图1)，耐酸、耐碱且抗生物分解。由于孢子壁的“保护”作用，花粉内的黄酮类物质及其他营养物质不易被有效地提取出来。因此，本研究中首先采用酶解方法对花粉进行破壁处理，获得较好的结果(图2～4)。

花粉经破壁处理后，其内含营养物质可得以充分释放[11]，各种活性成分的提取分离就变得相对容易。通过各种工艺方法和条件实验，对破壁花粉中的黄酮类化合

收稿日期：2007-08-07
基金项目：青海省重点科技攻关项目(2002-N-119)；科技部农业科技成果转化资金项目(02EFN216301200)
作者简介：卢挺(1954-)，男，研究员，研究方向为分析化学。E-mail：luting1954@hotmail.com
* 通讯作者：郭雪微(1958-)，女，主任医师，博士，研究方向为心脑血管疾病。E-mail：xueweiguo@tom.com

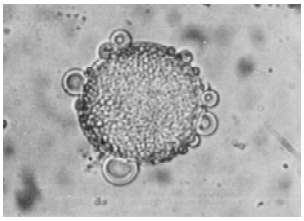


图1 破壁前的花粉(×1600)
Fig.1 Original rape bee pollen(×1600)

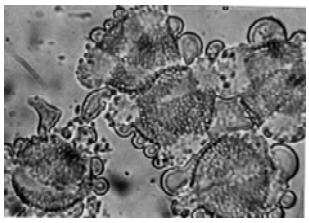


图2 酶解2h
Fig.2 Rape bee pollen after being enzymatically hydrolyzed for 2h

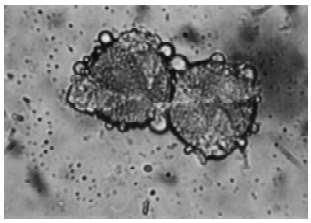


图3 酶解4h
Fig.3 Rape bee pollen after being enzymatically hydrolyzed for 4h

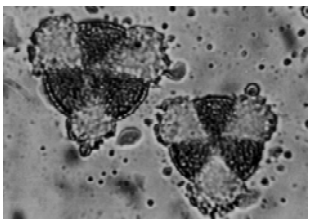


图4 酶解6h
Fig.4 Rape bee pollen after being enzymatically hydrolyzed for 6h

物进行提取，效果较好，同时还分离出数种具有明显药理作用的单体黄酮和甾醇类化合物。

1 材料与试剂

黄酮类化合物标准品 Sigma公司(Sr. Louis)；油菜蜂花粉 青海花宝蜂产品有限责任公司；酶制剂(Viscozyme L.) 中国食品工业(集团)公司。所用试剂均为分级纯。

2 生物总黄酮提取实验

2.1 提取条件选择

2.1.1 萃取剂选择

从萃取物的用途和安全性考虑，实验中选用了食用酒精为萃取剂。同时对酒精的使用浓度进行了比对实验(55%、75%、95%)，结果表明，95%的酒精对黄酮的萃取率较佳。

2.1.2 提取方法实验

2.1.2.1 热回流提取

用装有回流冷凝器的蒸馏瓶在78℃(酒精沸点)条件下，分别进行不同时间(20、40、60min)的提取试验，结果表明40min的提取效果较佳(提取率约为95%)。提取液经旋转蒸发浓缩后制得浸膏。

2.1.2.2 冷提取

在室温条件下，用10倍量的酒精浸泡花粉3次，每次7d(不时搅动)，可基本提出花粉内的黄酮类化合物(提取率约为92%)。合并3次的浸泡液，浓缩后制得浸膏。

比较热提和冷提两种方法，各有利弊。热提法省时，且提取率较高，但成本投入大。冷提法节约能源，投入小，却很耗时，但此缺点可在生产中通过合理安排得以弥补。具体采用何法可根据实际情况灵活选择。

2.2 破壁油菜花粉中总黄酮产业化提取工艺研究

2.2.1 实验样品

a 乙酸乙酯总提物；b 大孔树脂柱层析总提物；c 硅胶柱层析总提物；d 分步冷沉物。

2.2.2 不同工艺条件花粉黄酮的分析

对破壁花粉的乙醇提取物，采用不同的富集纯化方法，进行产业化最佳工艺的预试，并对实验所得的花粉粗酮进行总黄酮的比色法和色谱归一化法对比分析(表2)。结果显示：a、b两种方法所得的花粉粗酮中的总黄酮转移率偏低，而c、d两种方法所得的花粉粗酮总黄酮含量较高，且花粉黄酮的主要成分分布基本一致(参见HPLC图4、图8)，证明该工艺可行。但由于硅胶(c)富集方法工艺复杂，成本昂贵等因素，不宜形成产业化。因此，采用提取后的分步沉淀法(d)，应是破壁油菜花粉中总黄酮提取工艺中操作简化，成本低廉，易于操作和实现产业化的最佳工艺。

表1 不同工艺条件下所得花粉粗酮中总黄酮含量分析
Table 1 Camparions of contents determined by different methods of flavonaids extrated by different methods

样品序号	a	b	c	d
比色法(%)	7.36	13.30	37.71	52.07
色谱归一化法(A%)			54.5	85.3

色谱归一化法不能准确提供样品含量范围，但能清楚的反映花粉黄酮中主要成份分布情况，同时可确认不同富集方法所得产品的差异。在同等条件下，对花粉黄酮中的主要色谱峰(保留时间约为18、19.5、21、22、24min)进行了紫外光谱图的比较和归一化法的计算。

2.2.3 测定条件

2.2.3.1 比色法(同企业标准)

2.2.3.2 色谱法

10AVP 二极管阵列 岛津公司；色谱柱；C_{18}，5μl 进样，4 × 250mm。

洗脱条件：流速 1ml/min，梯度洗脱 0～60min，35～60min，甲醇 0.2% 磷酸；检测波长 254nm，柱温 室温。

2.2.4 分步沉淀法富集花粉黄酮的工艺初试

为证明该方法的可行性，分别对三批破壁花粉进行了同一条件提取和分离的工艺初试，并对分级沉淀后的母液进行了大孔树脂的富集实验。计算出三批破壁花粉总黄酮的转移率。对总提取物及粗酮中的总黄酮含量用比色法进行了测定(表 2)。为了确认该工艺的重复性，分别测定了三批总黄酮提取物的主要成分分布(液相色谱法)，结果显示主要成分分布基本一致。同时对第三批沉淀后母液进行了 D-101 大孔树脂的富集，分别得到 10%、40%、95% 的乙醇洗脱物，测出共有黄酮 3.81g，占总黄酮转移率的 13%。结果表明，产业化初试工艺，沉淀法加柱层析法，可将破壁花粉中 70% 以上的花粉黄酮提出。

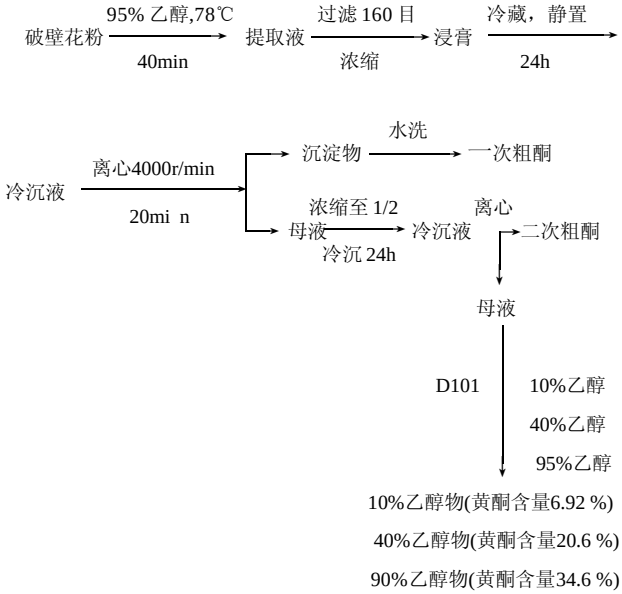
表 2 三批分步冷沉工艺试验参数

Table 2 Experimental results of three batches of simples by stepping cold precipitate

批次	花粉黄酮含量(%)	总黄酮理论量(g)	浸膏得量(g)	一步沉淀粗酮得量(g)	二沉淀粗酮得量(g)	总黄酮含量(%)	总黄酮转移率(%)
1	3.73	37.3	221	25.5	4.4	53.09	56.29
2	2.89	28.9	210	25.7	5.3	51.93	59.79
3	2.87	28.7	255	33.0	3.7	50.86	66.81

本研究的花粉破壁过程中，酶制剂可重复使用 7 次，获得七个批次的破壁花粉。黄酮提取过程的三批试验分别使用第二次、第四次、第六次酶解破壁花粉各 1kg。

2.2.5 分步沉淀法工艺流程图



通过上述分离提取过程，得到总黄酮含量达 50% 以上的分离产物。对此分离产物及其他分离过程的分产物进行单体黄酮的 HPLC 检测，均可检出芦丁、槲皮素、山奈酚、异鼠李素等四种单体黄酮(图 5～10)。

测试条件：10AVP 型 HPLC 仪；色谱柱 C_{18}，5μl 进样，4 × 250mm，洗脱条件 流速 1ml/min，梯度洗脱 0～60min，35～60min，甲醇 0.2% 磷酸；检测波长 254nm，柱温：室温。图 5～10 中各样品对应保留时间(min)：芦丁 12.108；槲皮素 19.582；山奈酚 24.011；异鼠李素 24.807。

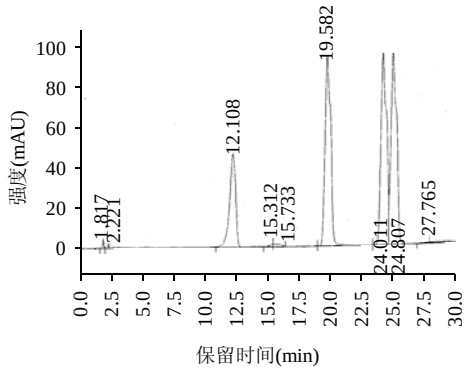


图 5 单体黄酮对照品混合样谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of standard mixture of monomer flavonoids

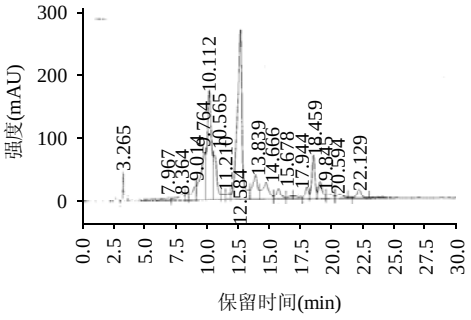


图 6 破壁花粉中黄酮成分分布图

Fig.6 HPLC chromatogram of flavonoids components in cell wall broken rape bee pollen

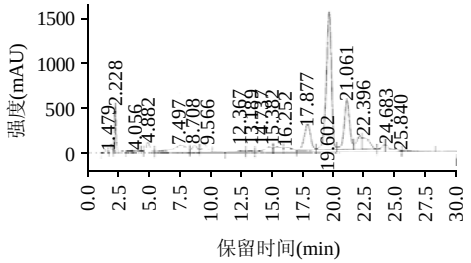


图 7 硅胶柱层析黄酮成分分布图

Fig.7 HPLC chromatogram of flavonoids isolates by silica gel column

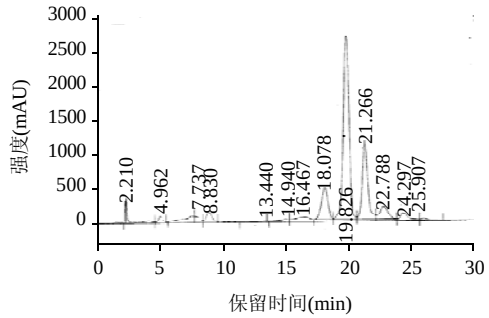


图8 水洗沉淀物黄酮成分分布图（平行样1）

Fig.8 HPLC chromatogram of flavonoids in washed precipitate by water(comparison 1)

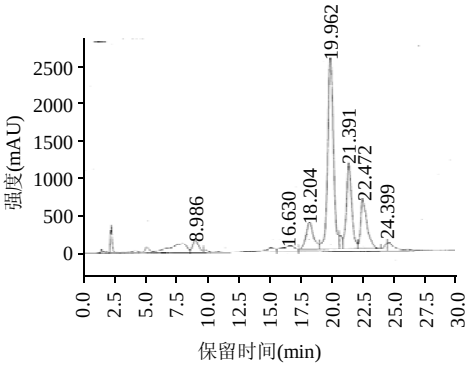


图9 水洗沉淀物黄酮成分分布图（平行样2）

Fig.9 HPLC chromatogram of flavonoids in washed precipitate by water (comparison 2)

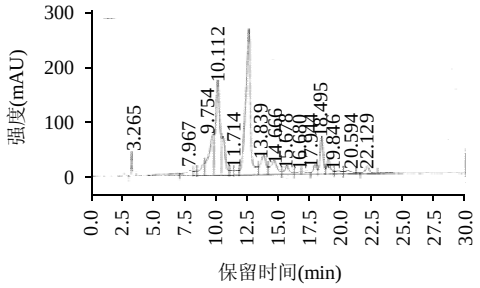


图10 沉淀后母液大孔树脂层析黄酮成分分布图

Fig.10 HPLC chomatogram of flavonoids contents in mother solution separated by macroporous resincolumn

3 活性成分分离实验

3.1 单体黄酮分离实验

通过试验确定：采用硅胶柱层析法，用不同极性的石油醚、氯仿进行梯度洗脱，可得到山萘酚、槲皮素。再用不同极性的氯仿、甲醇进行梯度洗脱，可得到芦丁。所得各种单体黄酮通过用400MHz超导核磁共振仪进行碳谱、氢谱等结构测定，得到证实(图11～13)。

测试条件： Mercury Plus-400超导核磁共振波谱仪，溶剂CD300，旋转20，温度20℃，湿度70%。

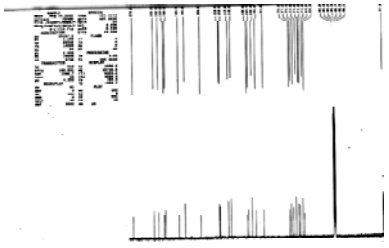


图11 400MHz核磁共振碳谱图(芦丁)

Fig.11 Spectrum of 400 MHz carbon nuclear magnetic resonance (rutin)

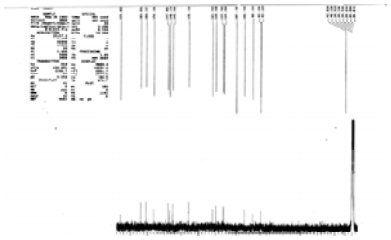


图12 400MHz核磁共振碳谱图(槲皮素)

Fig.12 Spectrum of 400 MHz carbon nuclear magnetic resonance (quercetin)

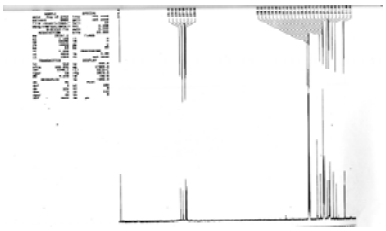


图13 400MHz核磁共振碳谱图(山萘酚)

Fig.13 Spectrum of 400 MHz carbon nuclear magnetic resonance (kaempferol)

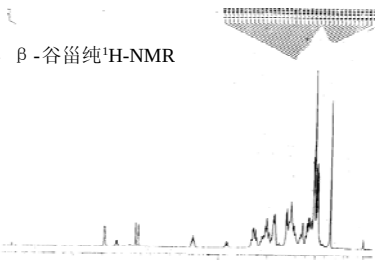


图14 400MHz核磁共振碳谱图(β-谷甾醇)

Fig.14 Spectrum of 400 MHz carbon nuclear magnetic resonance (β-sitosterol)

3.2 甾醇类化合物分离实验

采用柱层析并使用不同试剂洗脱，分离出β-谷甾醇、β-豆甾醇两种物质，并通过用400MHz超导核磁共振仪进行碳谱、氢谱等结构测定，得到证实(图14、15)。

测试条件：同图11。

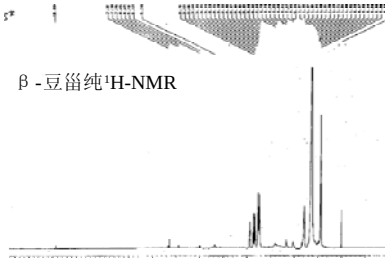


图 15 400MHz 核磁共振碳谱图（β-豆甾醇）

Fig.15 Spectrum of 400 MHz carbon nuclear magnetic resonance (β-stigmasterol)

4 讨 论

4.1 研究中对花粉黄酮的提取采用醇提水沉法，效果不错。但若使用铅盐沉淀法，还可能增加得率，为保证医用或食品用花粉黄酮的质量，未采用此法。

4.2 采用柱层析和有机溶剂洗脱法分离出的单体黄酮以及其他生物活性物质较多，但因缺少必要的对照品而未做结构鉴定。待条件许可时，可进行进一步的工作。

5 结 论

本研究立足于工业化生产要求，采用乙醇提出、水沉淀，并结合大孔树脂富集、乙醇洗脱等方法进行破壁油菜蜂花粉中黄酮类化合物的提取工艺研究，获得较好结果。花粉总黄酮的转移率可达 70% 以上，提取物中的黄酮类化合物含量大于 50%。采用柱式分离、有机溶剂分步洗脱、萃取等方法从提取物中分离出芦丁、槲皮素、山奈酚、异鼠李素等四种单体黄酮，经核磁共振结构鉴定证实的有芦丁、槲皮素、山奈酚等三种。同时，采用富集、洗脱、萃取等方法从黄酮分离物中分离出β-谷甾醇、β-豆甾醇等两种生物活性物质并经核磁共振结构鉴定证实。

参考文献：

[1] MARKHAM KR, CAMPOS M. 7- and 8-O-methylherbacetin-3-O-sophorosides from bee pollens and somestructure/activity observations [J]. Phytochemistry, 1996, 43: 763-767.

[2] ELKINS R, POLLEN B, JELLY R, Propolis and honey: an extraordinary energy and health-promoting ensemble[M]. Woodland Publishing, Orem, UT, 1996.

[3] CAMPOS M G, WEBBY R F, MARKHAM K R, et al. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 742-745.

[4] LU T, EDWARD P C L, JORN C C, et al. Analysis for flavonoids in bee pollens by capillary electrophoresis[J]. Food Science, 2006, 325: 582-587.

[5] MADHAVAN N, CHITHAN K P N, SUPRIYAR M, et al. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells [J] Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2002, 1953: 29-36.

[6] VANACKER S A B E, TROMP M N J L, HAENEN G R M M, et al. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 214: 755-759.

[7] PIER-GIORGIO P. Flavonoids as Antioxidants[J]. J Nat Prod, 2000, 63: 1035-1042.

[8] 郭雪微, 卢挺, 王雪里红. 天然黄酮类化合物在心脑血管疾病中的应用进展[J]. 中国中老年学杂志, 2006(7): 1001-1003.

[9] ROTELLI G T A E, JUAREZ A O, PELZER L E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids: Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat[J]. Il Farmaco, 2001, 56: 683-687.

[10] WALLE T. Absorption and metabolism of flavonoids[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2004, 36: 829-837.

[11] 卢挺. 青藏高原油菜蜂花粉酶解破壁研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 126-127.