

# 油松花粉中总黄酮的提取研究

杨志岩<sup>1</sup>, 尹树花<sup>2</sup>, 白明<sup>2</sup>, 郭丽梅<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学现代分析技术研究中心, 天津 300457)

(2. 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 对油松花粉中总黄酮的提取条件进行了研究。其最优提取条件为: 温度为70 ℃, 溶剂乙醇浓度为60%, 液固比为10:1, 加热回流提取。在此条件下, 用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法测定的总黄酮为1.41%。

**关键词:** 油松花粉; 总黄酮; 提取

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)12-0164-03

## Extraction of Total Flavonoids from Chinese Pine Pollen

YANG Zhi-yan<sup>1</sup>, YIN Shu-hua<sup>2</sup>, BAI Ming<sup>2</sup>, GUO Li-mei<sup>2</sup>

(1. Research Center of Modern Analysis, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)(2. College of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The extraction conditions of total flavonoids from Chinese pine pollen were studied in this paper. The optimum reflux extraction conditions were as follows: temperature of 70 ℃, ethanol content of 60% and ratio of solid to liquid of 10:1. In these conditions, the content of flavonoids in the extracts was 1.41%.

**Key words:** pine pollen; total flavonoids; extraction

花粉是花蕊的精细胞, 营养丰富, 成分均衡, 具有很高的药用价值和保健功能, 广泛应用于保健品、药品、化妆品和饲料添加剂等领域<sup>[1-3]</sup>。油松花粉营养丰富、全面, 含多种维生素、蛋白质、氨基酸, 不饱和脂肪酸, 单糖, 多糖, 黄酮, 核酸, 膳食纤维等营养物质, 被称“花粉之王”。黄酮具有很好的生理功能<sup>[4-7]</sup>, 油松花粉中黄酮含量丰富, 含量达1.6%<sup>[8]</sup>, 本文对油松花粉中总黄酮提取进行了研究, 并用“ $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ ”方法测定了油松花粉中总黄酮的含量, 为进一步分析研究油松花粉的营养成份奠定了基础。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

芦丁对照品, 中国(天津)药品生物制品检定所提供; 油松花粉: 河北承德畅达天然营养品有限公司提供; 正己烷, 95%乙醇, 氢氧化钠, 亚硝酸钠, 硝酸铝等试剂均为分析纯。

D-8401 多功能搅拌器; VIS-723G 可见分光光度计; SHB-IV 双循环水式多用真空泵; TDA-8002 水浴

收稿日期: 2007-07-12

作者简介: 杨志岩(1956-), 男, 高级实验师, 主要研究方向: 从事天然植物成分提取、分离和分析方法的研究

锅; FA2004N 电子天平(分析)。

1.2 样品总黄酮的测定: 参见文献<sup>[9]</sup>。

### 1.2.1 标准曲线的绘制

#### 1.2.1.1 对照样品溶液的制备

精密称取在 120 ℃减压干燥至恒重的芦丁对照品 200 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 加乙醇 70 mL, 置水浴上微热使溶解放冷, 加乙醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 10 mL, 置于 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 即得 0.2 mg/mL 的无水芦丁溶液。

#### 1.2.1.2 标准曲线的制备

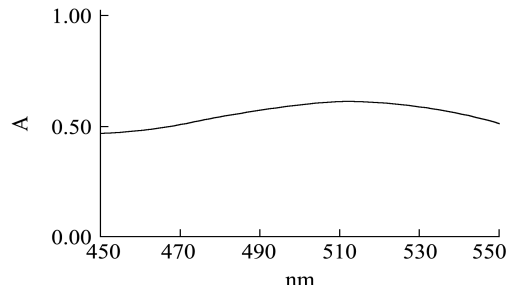


图1 芦丁溶液显色后的紫外吸收图

### Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of rutin solution

精密吸取芦丁对照溶液0.0 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL和6.0 mL, 分别置于25 mL容量瓶中, 往容量瓶中加入5%  $\text{NaNO}_2$ 溶液1 mL, 使混匀, 静置6 min, 往容量瓶中加入10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液1 mL, 摇

匀, 静置6 min, 往容量瓶中加4% NaOH溶液10 mL, 再加95%乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置15 min, 以水作参比, 在510 nm的波长处测定吸光度。芦丁溶液形成络合物后显色的紫外吸收图见图1。

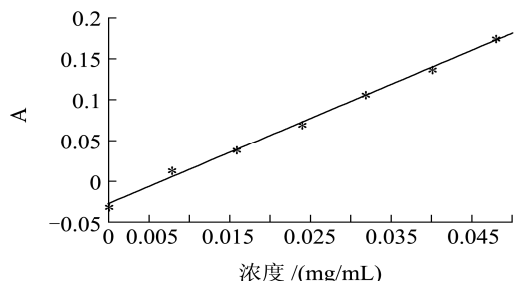


图2 芦丁对照品标准曲线

Fig.2 The calibration curve of control substance of rutin

以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线, 如图2。用MATLEB线性回归, 得芦丁浓度Y (mg/ml) 与吸光度X的关系为:  $Y = -0.35 + 4.286X (r = 0.9998)$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素的确定

#### 2.1.1 乙醇浓度对提取黄酮的影响

称取一定量花粉, 一定的液固比, 分别用 30%、40%、50%、60%、70%、80%、95%的乙醇。在水浴 50 °C 下回流提取 2 h, 过滤得滤液, 减压蒸干液体, 得样品, 并测定样品的黄酮含量, 结果见表 1。

表1 乙醇浓度对提取黄酮的影响

Table 1 Influence of ethanol concentration to flavonoids extraction

乙醇浓度/%	30	40	50	60	70	80	90
黄酮含量/%	0.99	1.07	1.20	1.32	1.30	1.26	1.22

从表 1 知最适宜乙醇提取浓度为 60%。

#### 2.1.2 温度对提取黄酮的影响

称取一定量花粉, 一定的液固比, 分别在常温、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 相同浓度的乙醇溶剂条件下回流提取 2 h, 过滤得滤液, 减压蒸干液体, 得样品, 并测定样品的黄酮含量, 结果见表 2。

表2 温度对提取黄酮的影响

Table 2 Influence of temperature to flavonoids extraction

温度/°C	常温	30	40	50	60	70	80
黄酮含量/%	0.87	0.96	1.05	1.20	1.23	1.24	1.26

从表 2 知随着温度的逐渐升高黄酮得率随之升高, 考虑到乙醇沸点 (78.31 °C), 温度过高溶剂挥发严重, 因此选最适宜提取温度为 60 °C。

#### 2.1.3 提取时间对提取黄酮的影响

称取一定量花粉, 一定的液固比, 在水浴 50 °C 下

分别回流提取 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h 过滤得滤液, 减压蒸干液体, 得样品, 并测定样品的黄酮含量, 结果见表 3。

表3 提取时间对提取黄酮的影响

Table 3 Influence of time to flavonoids extraction

提取时间/h	1	2	3	4	5	6	7
黄酮含量/%	1.06	1.20	1.28	1.30	1.31	1.31	1.30

从表 3 知提取时间延长, 黄酮得率升高, 3 h 后黄酮得率基本变化不大, 因此选 3 h 为最适宜提取时间。

#### 2.1.4 液料比对提取黄酮的影响

称取一定量花粉, 液料比分别为 5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、40:1, 在水浴 50 °C 条件下回流提取 2 h, 过滤得滤液, 减压蒸干液体, 得样品, 并测定样品的黄酮含量, 结果见表 4。

表4 液料比对提取黄酮的影响

Table 4 Influence of liquid-solid to flavonoids extraction

液料比	5:1	10:1	15:1	20:1	25:1	30:1	40:1
黄酮含量/%	0.93	1.09	1.20	1.22	1.23	1.23	1.25

从表 4 知随着液固比的不断加大, 黄酮得率随之升高, 达到 15:1 后, 得率增长缓慢, 过大的溶剂用量加大回收溶剂时的能耗, 因此选 15:1 为最适宜液固比。

### 2.2 实验条件的优化

依据单因素试验初步确定的提取条件, 选择温度 (A)、乙醇浓度 (B)、液固比 (C) 作为试验因子, 以黄酮含量为指标, 采用 L9(3<sup>3</sup>) 正交试验设计, 对油松花粉中总黄酮的提取条件进行优化 (表 5)。

表5 试验方案

Table 5 Experimental design

因素	A 温度/°C	B 乙醇体积分数/%	C 固液比
1	50	50	10:1
2	60	60	15:1
3	70	70	20:1

通过正交试验, 确定了总黄酮提取的最适温度、乙醇浓度和液固比。正交试验结果见表 6。

表6 正交试验结果及分析

Table 6 Analysis of orthogonal test results

实验号	A	B	C	黄酮含量/%
1	1	1	1	1.06
2	1	2	2	1.40
3	1	3	3	0.86
4	2	1	2	0.71
5	2	2	3	1.02
6	2	3	1	1.08

7	3	1	3	1.08
8	3	2	1	1.41
9	3	3	3	1.22
T1	3.32	2.85	3.55	
T2	2.81	3.83	3.33	
T3	3.71	3.16	2.96	
M1	1.11	0.95	1.18	
M2	0.94	1.28	1.11	
M3	1.24	1.05	0.99	
R	0.30	0.33	0.19	

通过极差分析,得出各因素影响的主次关系为:

B>A>C,最佳配比为 $B_2A_3C_1$ ,与试验所得结果相符,得出最佳提取条件,即:最佳温度为70℃,溶剂乙醇浓度为60%,液固比为10:1,在此条件下,得到油松花粉中总黄酮的含量为1.41%。

### 3 结论

(1) 实验的最佳提取工艺为:温度为70℃,溶剂乙醇浓度为60%,液固比为10:1,在此条件下,得到油松花粉中的总黄酮含量为1.41%。

(2) 实验采用乙醇为溶剂提取,设备简单,无毒操作,溶剂回收容易,便于工业化生产和产品的应用。所采用的“ $NaNO_2-Al(NO_3)_3-NaOH$ ”方法稳定、简便、快速,且该显色体系干扰因素少,为总黄酮的检测提供了优质的质量控制指标。

### 参考文献

- [1] 王开发.花粉营养成分与花粉资源利用[M].上海:复旦大学出版社,1993,1-52
- [2] 王开发.我国蜜源花粉资源及几种蜜源花粉的营养成分研究[J].植物学通报,1988,5:163-166
- [3] 王开发,王隆华,支崇远,等.玉米花粉黄酮类物质对SD大鼠降血脂作用的研究[J].放射免疫学杂志,2002,358-371
- [4] Wei H C, Cai Q Y, Rahn R O, et al. Inhibition of Uv light and fenton reaction induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein[J].Carcinogen Sis,1996,17:73
- [5] Beretc A. Flavonoids are selective cyclic CMP phosphodiesterase inhibitors[J].Biochem Phavmacol,1979,28: 536
- [6] 韩锐.抗癌药物研究与试验技术[M].北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1997
- [7] Matsuzaki Y, Kurokawa N, Terai S Y, et al. Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines[J].Jpn J cancer Res, 1996,87(2):170
- [8] 马养民,毛远.油松花粉成分分析[J].西北林学院学报,1993,8(4):98-100
- [9] 罗伟强,李济权,黄梅珍.花生壳中总黄酮含量的测定[J].西部粮油科技,2002,27(2):48-49

(上接第169页)

和正交实验的结果分析,得到其最佳的提取条件为:料液比为1:6、NaCl浓度为3%、浸提时间为60 min、浸提温度为80℃;

4.3 所提取的鱿鱼内脏糖蛋白粗品(GSV-0)具有一定的免疫活性。

### 参考文献

- [1] 顾谦群,王长云,方玉春,等.栉孔扇贝糖蛋白的制备及其抗肿瘤活性初步研究[J].研究简报,1998,5:63-65
- [2] 吴杰连.文蛤糖蛋白 MGP0501 抗肿瘤作用及其机制研究[D].南昌大学,2006
- [3] 董正之.世界大洋经济头足类生物学[M].山东科学技术出版社,1991,92-94
- [4] 夏玉宇.食品卫生质量检验与监测[M].北京工业大学出版社,1993

- [5] Lei Xiaoling, Fan Xiuping, Zhao Shujin, Study on extracting and fractioning of glycoprotein of dried octopus[J]. Journal of Shan Xi Universty of Tcience & Technology,2006,4:45-49
- [6] Stelio R.M. Oliveira, Antonia. Nascimento, Maria. E.P. Lima, et al .purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmel.) Santel. & Hommers[J]. Revista Brasil. Bot, 2002,25(4 ):397-403
- [7] 邓建仙.功能性食品[M].中国轻工业出版社,2002
- [8] 杨铁虹,贾敏,梅其炳.当归多糖的分离纯化与免疫调节活性及其机理研究[J].中成药,2005,27(5):253-256
- [9] 朱科学,周惠明.麦胚水溶性糖蛋白的分离纯化及性质测定[J].无锡轻工大学学报,2003,22(5):83-85