



油松花粉黄酮的提取及黄酮酒的制备

郭丽梅¹, 王盼盼¹, 杨蒙¹, 武首香²

(1. 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457; 2. 天津现代职业技术学院 天津 300350)

摘要: 对油松花粉中的黄酮类物质进行提取、检测, 为制作黄酮保健酒提供可靠的工艺路线. 采用醇提法对油松花粉中的黄酮进行提取, 利用分光光度法以及高效液相色谱法(HPLC)对黄酮的总含量及种类进行了检测. 从提取时间、固液比、白酒的酒精体积分数方面考察了最佳的提取条件, 确定黄酮的最大提取量, 并将之与花粉的浸出实验结果相对比, 确定最佳的制作工艺. 结果显示, 黄酮酒的最佳制作工艺为: 采用酒精体积分数为42%的白酒直接浸泡, 固液比(g : mL)为1 : 15, 浸泡时间为10~15 d, 总黄酮的提取量为1.9 mg/g.

关键词: 油松花粉; 黄酮; 高效液相色谱法; 分光光度法

中图分类号: TQ911 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2013)04-0010-04

Flavonoid Extraction from Chinese Pine Pollen and Preparation of Flavonoid Wine

GUO Limei¹, WANG Panpan¹, YANG Meng¹, WU Shouxiang²

(1. College of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science & Technology,
Tianjin 300457, China;

2. Tianjin Modern Vocational Technology College, Tianjin 300350, China)

Abstract: To determine the content and the varieties of flavonoid in Chinese pine pollen so as to better the flavonoid wine making process, extraction and soaking conditions of flavonoid were studied. The total flavonoid content was detected by UV-VIS spectrophotometry and the varieties were studied with HPLC. Time, solid-to-liquid ratio and ethanol content were chosen as the main factors. Through the comparison of extraction process and soaking process, the optimal conditions were determined as follows: the pollen should be directly soaked in 42% ethanol, the solid-to-liquid ratio(g : mL) was 1 : 15, and the time was 10~15 days. The total flavonoid extracted was 1.9 mg/g.

Key words: Chinese pine pollen; flavonoid; HPLC; spectrophotometry

氧化应激是导致人的衰老、心血管疾病、癌症等一系列疾病的重要因素, 适当补充外源性抗氧化剂能有效地预防自由基过量引发的疾病^[1]. 黄酮类物质是一类很好的外源抗氧化剂, 具有很强的药用价值, 可以起到延缓衰老、预防骨质疏松、保护肝脏、抗肿瘤等作用^[2]. 常用的提取黄酮的方法为醇提法以及超声、微波、酶法等辅助提取方法^[3]. 醇提法与其他的方法相比, 虽然存在着提取率低、杂质多的缺点, 但因其操作简便, 对设备无严格要求, 可以降低生产成本, 因此比较适合于大规模工业生产. 分析黄酮的方

法主要有分光光度法、气相色谱法、高效液相色谱法、薄层色谱法等^[4-9]. 其中分光光度法操作简单、耗时较少, 可用于总黄酮的检测. 液相色谱法分离效率高、分析速度快、检测灵敏度高, 可用于黄酮种类及各类黄酮含量的检测.

本研究采用富含黄酮的油松花粉作为提取原料, 采用醇提法对其中的黄酮进行了提取, 并采用分光光度法^[10]检测总黄酮的含量, 用高效液相色谱法^[11]对提取的黄酮进行了分离与定量检测, 为花粉黄酮酒的开发提供基础理论支撑.

收稿日期: 2012-10-16; 修回日期: 2013-04-10

基金项目: 天津市海洋资源与化学重点实验室(天津科技大学)开放基金资助项目(200906)

作者简介: 郭丽梅(1961—), 女, 吉林人, 教授, glmei@tust.edu.cn.

1 材料与amp;方法

1.1 原料与amp;仪器

油松花粉、白酒,承德畅达天然营养品有限公司;亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠,分析纯,天津北方天医化学试剂厂;芦丁,南京替斯艾么中药研究所。

VIS-723G型可见分光光度计,北京福利仪器分析公司;PC-2000型高效液相色谱系统,525型可变波长紫外检测器,C18柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),天津兰博公司;WH8401-50型多功能搅拌器,天津市威华仪器设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 醇提法提取总黄酮

采用醇提法对花粉中的总黄酮进行提取。取一定量的花粉于四口烧瓶中,按照一定的固液比加入白酒,70℃水浴加热,重复提取两次,合并两次滤液,测量滤液总体积 V (mL)后,检测总黄酮的提取量。

1.2.2 可见分光光度法检测总黄酮提取量

显色方法:用移液管取 0.5 mL 滤液于 25 mL 容量瓶,加水至 6 mL,再加 5%的 NaNO_2 溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min,再向容量瓶中加入 10%的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min,向容量瓶中加入 4%的 NaOH 溶液 10 mL,再加蒸馏水定容,摇匀,静置 15 min。4 000 r/min 离心 10 min,取上清液。以水为参比溶液,采用分光光度法在 510 nm 的波长处测定吸光度 A 。以芦丁为标准,在上述显色方法下显色并绘制标准曲线,得到的回归方程为 $A = 9.4165X - 0.0088$, $R^2 = 0.9996$ 。由标准线性回归方程算出总黄酮类化合物浓度,再按式(1)计算出总黄酮提取量 M (mg/g)。

$$M = \frac{(A + 0.0088) / 9.4165 \times 50 \times V}{5} \quad (1)$$

1.2.3 影响总黄酮提取量的单因素实验

在白酒的酒精体积分数 60%、提取温度 70℃、固液比(g:mL)1:10的条件下,用分光光度法分别测定提取时间为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 时总黄酮的提取量。

在白酒的酒精体积分数 60%、提取温度 70℃、提取时间 1.5 h 的条件下,用分光光度法分别测定固液比(g:mL)为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 时总黄酮的提取量。

在固液比(g:mL)为 1:15、提取时间 1.5 h、提取温度 70℃条件下,选取白酒的酒精体积分数为 38%、42%、60%、70%进行单因素实验,得到的样品在

冰箱冷藏区放置 4 d 后,用分光光度法测定总黄酮的提取量。

1.2.4 高效液相色谱法检测黄酮提取量

PC-2000型高效液相色谱,紫外检测器,反相 C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相甲醇与 0.4%磷酸体积比 40:60,柱温 40℃,流量 0.5 mL/min,检测波长 280 nm/350 nm,进样量 20 μL。以芦丁为标准,采用标准曲线法检测黄酮的含量,各峰的峰面积记为 A_n 代入标准线性回归方程计算出每种黄酮的浓度 c_n ,然后按式(2)计算出每种黄酮的含量 M_n (mg/g)。

$$M_n = \frac{(A_n \times 2 \times 10^{-7} - 0.0665) \times V}{5} \quad (2)$$

2 结果与amp;讨论

2.1 影响总黄酮提取量的单因素实验结果

2.1.1 提取时间对总黄酮提取的影响

不同提取时间对总黄酮提取量的影响如图 1 所示。从图 1 可以看出,随着提取时间的增加,总黄酮提取量先增加后减少,当提取时间为 1.5 h 时,提取量最高,因此最佳的提取时间为 1.5 h。

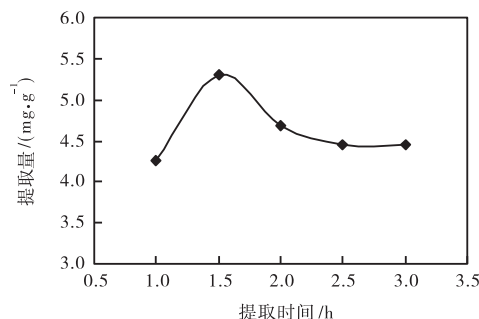


图 1 提取时间对提取量的影响

Fig. 1 Influence of time on extraction content

2.1.2 固液比对总黄酮提取的影响

不同固液比对总黄酮提取量的影响如图 2 所示。

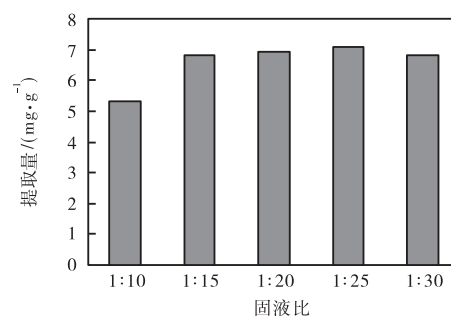


图 2 固液比对提取量的影响

Fig. 2 Influence of liquid-solid on extraction content

由图 2 可看出:固液比(g : mL)由 1 : 10 增加到 1 : 15 时,总黄酮的提取量增加了 1.5 mg/g,而此后直至增加至 1 : 30,提取量增加缓慢.最高的提取量时的固液比为 1 : 25,但由于其提取量与 1 : 15 相差不大,考虑到生产成本,固液比(g : mL)采用 1 : 15 较为合适.

2.1.3 酒精体积分数对总黄酮提取的影响

不同酒精体积分数对总黄酮提取量的影响如图 3 所示.从图 3 中可以看出,总黄酮的提取量随着白酒酒精体积分数的升高而升高,最佳酒精体积分数为 70%,总黄酮的提取量为 4.3 mg/g,酒精体积分数为 42%和 38%的白酒的总黄酮提取量相差不大,酒精体积分数为 42%的白酒的总黄酮提取量为 3.2 mg/g.酒精体积分数为 70%的白酒由于其度数过高不能直接饮用,且酒精体积分数为 70%和 42%的白酒的数据相差不大,因此可直接选用酒精体积分数为 42%的白酒作为提取剂.

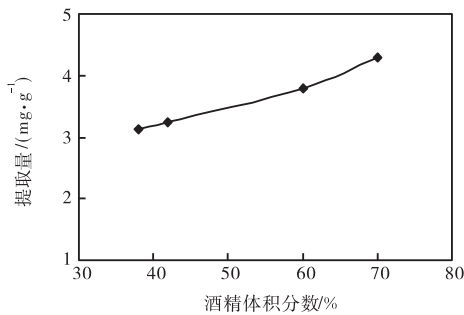


图 3 酒精体积分数对提取量的影响

Fig. 3 Influence of alcohol concentration on extraction content

2.2 油松花粉的浸出实验

分别用 75 mL 和 150 mL 酒精体积分数为 70% 的白酒、75 mL 酒精体积分数为 42%的白酒浸泡 5 g 油松花粉,浸泡时间为 3、5、10、15、20 d,得到的样品在冰箱冷藏区放置 4 d 后,使用分光光度法检测总黄酮的溶出情况,结果如图 4 所示.

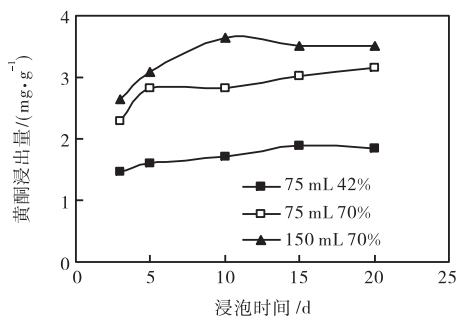


图 4 浸渍条件对浸出量的影响

Fig. 4 Influence of soaking conditions on soaking content

从图 4 中可以看出,150 mL 酒精体积分数为 70%的白酒浸出量高于 75 mL 酒精体积分数为 70%的白酒的浸出量,但其差别并不大,可见固液比对浸出量的影响较小,而酒精体积分数为 70%的白酒的浸出能力要高于 42%的白酒,约是后者的 1.7 倍.使用酒精体积分数为 70%的白酒作为提取剂时需要进行稀释,市场上饮用酒的酒精体积分数为 42%,需将酒精体积分数为 70%的白酒稀释两倍,稀释后,酒精体积分数为 70%的白酒的提取效果与 42%的白酒的提取效果相当,因此不如直接使用酒精体积分数为 42%的白酒进行浸提.

2.3 黄酮酒制备工艺的确定

加热法的较佳工艺为提取时间 1.5 h,固液比(g : mL)为 1 : 15,白酒酒精体积分数为 42%,总黄酮的提取量为 3.2 mg/g.

浸提法的较佳工艺为采用酒精体积分数为 42%的白酒直接浸泡,固液比(g : mL)为 1 : 15,浸泡时间为 10 ~ 15 d.浸提法得到的较佳样品的提取量为 1.9 mg/g.

综合加热法与浸提法的结果可知,虽然加热法的提取量较大,但由于加热法本身热耗较大,在得到较高提取量的同时也加大了成本的投入,二者量上的差距并不值得在热耗上的投入,因此从生产成本方面考虑使用浸提法较为合适.

2.4 高效液相检测结果

选取酒精体积分数为 70%的白酒提取液(最佳提取条件)、酒精体积分数为 42%的白酒提取液、酒精体积分数为 42%白酒浸出液、酒精体积分数为 70%白酒浸出液为检测的样品,各样品在冰箱冷藏区放置 4 d 后在 1.2.3 的条件下用液相进行含量检测.依据黄酮类物质在 280、350 nm 左右为典型吸收峰^[12],因此同时出现在两个波长下的峰为黄酮峰,其他峰为杂质峰,酒精体积分数为 42%白酒的提取液分别在 280 nm 和 350 nm 下检测,结果如图 5 所示.

图 5 中所使用的流动相组成为甲醇与 0.4%磷酸体积比为 40 : 60,实验中发现,增大 0.4%磷酸比例时,4.7 min 与 5.1 min 的峰不会被洗出,减小比例时,两峰则缔合到一起无法分离.虽然该条件并没有将黄酮完全分离,但可以达到定性的要求.因此,将该条件作为分离黄酮、鉴定黄酮组分的较佳条件.由图 5 可看出油松花粉中黄酮的种类为 4 种.各样品的黄酮种类及含量见表 1.

从表 1 中可以初步推断出 4 种样品中均含有 4 种黄酮,即在黄酮种类方面,提取工艺和浸提工艺没

有差别,但在黄酮含量方面差别较大. 4种样品中酒精体积分数为42%白酒浸出液中黄酮的含量最高为10.066 mg/g,其余样品均低于该值. 因此从液相数据来看,采用酒精体积分数为42%的白酒直接浸出是最佳的制酒工艺,该方法得到的结论与分光光度法得到的结论一致.

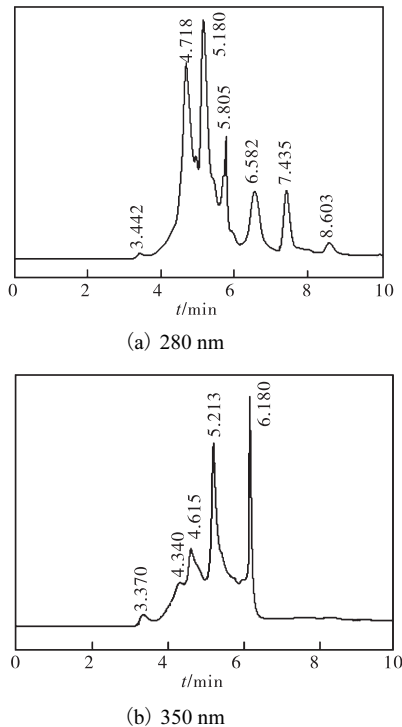


图5 280 nm和350 nm下42%白酒提取样品的HPLC图
Fig. 5 HPLC of extraction with 42% alcohol under 280 nm and 350 nm

表1 不同工艺下的黄酮种类及含量 mg/g

Tab. 1 Varieties and content of flavonoid under different processes

工艺	保留时间/min				总量
	3.4	4.7	5.1	5.8	
42%白酒提取	0.015	5.003	4.001	0.435	9.454
70%白酒提取	0.010	2.191	2.325	0.566	5.092
42%白酒浸出	0.011	6.349	3.430	0.276	10.066
70%白酒浸出	0.009	3.623	2.932	0.439	7.003

结合图3、图4与表1可以看出,液相色谱检测的4种样品的总黄酮的数据均高于分光光度法的数据,这是由于分光光度法是基于 Al^{3+} 与黄酮裸露的羟基络合显色的原理而检测的,所检测到的黄酮多为游离状态,而液相色谱法则没有这方面的局限性,黄酮的游离态以及结合态都可以被检测出来,因而液相检测的数据较高.在自然界中黄酮多以结合态存在,且多数与糖苷结合极性较大,因此同样极性较大酒精体积分数为42%的白酒样品的检测数据最高.

3 结论

初步推断出油松花粉中含有4种黄酮,分光光度法及液相色谱检测总黄酮含量时,结果有差异,但其得到的结论一致.制备油松花粉黄酮保健酒的最佳工艺为直接浸泡法,采用酒精体积分数为42%的白酒,固液比(g:mL)为1:15,浸泡时间为10~15 d.由于分光光度法检测到的黄酮多为游离态,易于人体吸收^[13],因此采用分光光度法检测总黄酮的浸出量为1.9 mg/g.

参考文献:

- [1] 吴建中,欧仕益,汪勇. 甘蔗中黄酮类物质的提取及其抗氧化性研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(2): 165-167.
- [2] 黄富远,高明,楼云雁. 黄酮类化合物的研究概况[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(8): 1730-1732.
- [3] 唐德智. 黄酮类化合物的提取、分离、纯化研究进展[J]. 中药与天然药物, 2009, 21(12): 101-104.
- [4] 龚叶南. 分光光度法测定蜂花粉中的总黄酮[J]. 河南大学学报, 2009, 28(2): 121-124.
- [5] Chen Haifang, Zhang Wugang, Yuan Jinbin, et al. Simultaneous quantification of polymethoxylated flavones and coumarins in *Fructus aurantii* and *Fructus aurantii immaturus* using HPLC-ESI-MS/MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 59: 90-95.
- [6] Hasegawa T, Tanaka A, Hosoda A, et al. Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. *gigantea*[J]. Phytochemistry, 2008, 69(6): 1419-1424.
- [7] 木努尔丁·托合尼牙孜, 艾尔肯·艾米尔, 依米提·热合曼. 新疆产蜂胶总黄酮的提取工艺优化及 GC-MS 分析[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 132-135.
- [8] 张瑞, 胡娜娜, 邢军. 薄层色谱法和硅胶柱层析法分离新疆紫花苜蓿中黄酮类化合物的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(1): 177-180.
- [9] 高淑云, 程熙. 麻叶千里光中总黄酮的测定分析[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 316-319.
- [10] 包秀萍, 郭丽梅, 白玉琢, 等. 板栗花粉总黄酮的分离纯化工艺研究[J]. 杭州化工, 2010, 40(1): 29-31.
- [11] 武首香, 包秀萍. 板栗花粉总黄酮提取及 HPLC 定量[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 270-272.
- [12] 任顺成, 查磊. 玉米花粉黄酮类的精制及其质谱分析[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2010, 31(4): 1-4.
- [13] 杨雪鸥, 郁建平, 何照范, 等. 酸法水解银杏黄酮的工艺条件[J]. 山地农业生物学报, 2006, 25(2): 181-184.

责任编辑: 郎婧