

中文摘要

本实验研究以茶花粉和油菜花粉为原料,进行蜂花粉黄酮类物质的提取研究,探讨了溶剂浓度、提取温度、提取时间、料液比、搅拌速度等因素对提取率的影响,应用正交试验和 DPS 分析法,确定了蜂花粉黄酮类物质的最佳提取条件:温度 65℃、乙醇浓度 65%、提取时间 32 h、料液比 6:1、搅拌速度 150 转/min,在此最佳条件下,茶花粉的提取率为 55.52%;油菜花粉的提取率为 48.68%,

蜂花粉中的黄酮类物质是植物生长过程中形成的一类次生代谢产物,是花粉中重要的生理活性物质,通过对几种检测方法的比较,确定了比色法为蜂花粉总黄酮的测定方法。其检测波长 420 nm,以芦丁为标准品,在一定浓度范围内,其浓度与吸光度呈良好的线性关系,相关系数 r 为 0.99991。稳定性、精密度和重现性均理想,该法检测出的茶花粉乙醇提取物中平均总黄酮含量为 30.28%,油菜蜂花粉乙醇提取物中平均总黄酮含量为 33.62%。

关键词:蜂花粉;总黄酮;提取工艺

Study on the Extaction of the Total Flavonoids in Bee-Pollen

Abstract

Here use bee pollen and rape pollen as material, research in bee pollen flavone category substances extracting, and discuss the influence of elements such as solvent density, extracting temperature and time, material and liquid rate, stir speed, etc., on extracting rate, find the best conditions of bee pollen flavone category extracting through orthogonal experiment and DPS analysis: temperature-35°C, ethanol density-65%, extracting time-32h, material and liquid-6:1, stir speed- rev/min . Under this, the pollen extracting rate is 55.52%, as rape 48.86%.

Substances of flavone category of bee pollen are kinds of secondary metabolites in plants growth, they are important physiological active substances of pollen. Through comparing with other examining ways, we make color comparing as the way of measuring the pollen total flavone in bee pollen. And the examining wavelength is 420nm, if use rutin as standard, under certain density range, the density and absorbency appear a good linear relation, the relative coefficient is 0.99991, and stability, precision, repeatability are satisfied. Under this condition, the average total flavone content in ethanol extracting substances of bee pollen is 30.28%, as in rape pollen is 33.62%.

Key words: bee-pollen; total flavone; extracting technology

独创性声明

本人声明，所呈交的学位（毕业）论文，是本人在指导教师的指导下独立完成的研究成果，并且是自己撰写的。尽我所知，除了文中作了标注和致谢中已作了答谢的地方外，论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果。与我一同对本研究做出贡献的同志，都在论文中作了明确的说明并表示了谢意，如被查有侵犯他人知识产权的行为，由本人承担应有的责任。

学位（毕业）论文作者亲笔签名：夏广英

日期：2008.6.23

论文使用授权的说明

本人完全了解福建农林大学有关保留、使用学位（毕业）论文的规定，即学校有权送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密，在 年后解密可适用本授权书。

不保密，本论文属于不保密。

学位（毕业）论文作者亲笔签名：夏广英

陈崇总

日期：2008.6.23

指导教师亲笔签名：陈崇总

日期：2008.6.23

第一章 引言

蜂花粉 (pollen) 是蜜蜂采集花粉后用自己的唾液和花蜜粘合形成的颗粒。我国早在《神农本草经》和《本草纲目》中就有花粉的相关记载和应用。实践证明, 蜂花粉能为人体提供各种营养成分, 为机体组织细胞的生长和修复提供丰富的原料。同时蜂花粉的生物活性物质对机体的生理功能具有调节作用, 几乎对机体各个器官都有保健作用^[1]。蜂花粉既是一种极好的天然营养食品, 同时也是一种理想的滋补品^[2], 并具有一定的医疗保健功能^[3,4,5,6,7]。现代药理实验研究表明, 花粉具有降血脂^[8]、抗辐射^[9]、增强机体免疫功能^[10]、保护肝脏、治疗前列腺增生以及抗衰老等作用^[11,12]。

蜂花粉的化学成分复杂, 其中含有黄酮类、维生素激素、核酸、酶类和微量元素^[13], 蜂花粉含有丰富的黄酮类化合物^[15], 这类化合物具有抗动脉硬化、降低胆固醇、防辐射等作用。所以在蜂花粉的诸多成分中, 黄酮类物质和他们的生物活性已经成为研究的热点。

黄酮类化合物是一类在自然界广泛分布的多酚类抗氧化剂。大量研究表明黄酮类化合物具有清除自由基、抗氧化、抗突变、抗肿瘤、抗菌、抗病毒和调节免疫等功能^[15,16,17], 其中最重要的是它的抗氧化活性。黄酮类化合物在自然界中多数以黄酮苷的形式存在, 只有极少量的以游离黄酮苷元的形式存在^[18]。虽然天然存在的游离黄酮苷元含量极少, 但其表现出来的活性要比结合型的糖苷高很多。黄酮苷元可以直接被吸收进入动物血液, 大部分糖苷型的黄酮化合物在人体内不能通过小肠壁进入到血液中, 而是被肠腔内微生物通过杂环裂解方式降解和代谢, 其中仅有小部分黄酮在结肠内益生菌(乳酸菌和双歧杆菌)分泌的水解酶的作用下, 产生苷元再重新吸收进入血液。因此, 黄酮苷在动物体内的生物利用率远远低于苷元型黄酮。研究表明, 黄酮苷元清除人体氧自由基的生物活性明显优于黄酮糖苷, 黄酮苷元的效价是黄酮糖苷效价的 7 倍^[19]。

花粉中黄酮类化合物是其重要的营养成分之一, 而且含量丰富。目前从花粉中发现的黄酮类黄酮类化合物有: 黄酮醇、槲皮酮、山奈酚、杨梅黄酮, 异鼠李素、原花青素等。Lewis 最早报道从花粉中提取出类黄酮, 以后日本的久道周次和德国的威尔曼等都先后报道对多种花粉含黄酮类检测的结果。

本课题研究以茶花粉和油菜花粉为实验材料, 主要探讨蜂花粉黄酮类物质的

提取和总黄酮含量的测定。

第二章 文献综述

2.1 蜂花粉的研究现状

花粉是指被子植物和裸子植物的雄性配子,是雄性生殖细胞,是遗传基因源,担负着植物遗传的任务,拥有植物发育所需的全部营养物质,是植物生命之源,蜜蜂采集回的花粉称之为“蜂花粉”。蜂花粉中除含有一般花粉的成分外,还含有蜜蜂在采集时加入的少量的分泌物和花蜜,故此蜂花粉与一般的花粉的成分略有不同。其外表也与粉末状的花粉有所不同,而是经蜜蜂加工过的多为扁圆形、上面带有蜜蜂后肢嵌携痕迹的花粉团,富含包括黄酮等在内的各种营养成分,是当今世界最具营养价值的天然产物之一,在营养、保健、化妆品、医疗等领域得到广泛的应用。蜂花粉因植物种类不同颗粒大小、色泽、成分也有所不同,对人体的作用也有所不同。

近年来,蜂花粉的研究开发利用在国内外已广泛地开展,蜂花粉的药食作用也引起人们的广泛关注重视。许多植物学家、营养学家和医药工作者均很关注蜂花粉的开发利用研究。各自在自己的领域内进行了大量的实验工作,取得了满意的效果和宝贵的实验数据,对蜂花粉做出了高度的评价。在欧美一些国家中将蜂花粉加工制成各种制剂,用于食用和药用,欧洲称之为“完全营养食品”;日本的花粉研究者则认为:任何植物性的食物营养价值均难与蜂花粉抗衡,并称之为“健康美容之源”。我国早在《神农本草经》中就有花粉的相关记载和应用,并将“蒲黄”列为上品,“……无毒,久服轻身,益气力延年”。在《本草纲目》中记载松花即松花粉,“……久服令轻身,……令人收黄(松花粉)和白砂糖印为饼膏,充果饼食之……”,具有“润心肺,益气,除风止血”之功效,在《古今秘苑》中,记有李商隐的诗句“借问健身何物好,无心摇落玉花黄”,玉花黄即玉米的花粉,可见我国用花粉保健治疗之早。世界上许多国家的人们在食用花粉,并赞美花粉是永葆青春和健康的源泉。原苏联科学家调查苏联百岁以上的老人发现,有150位老人是以养蜂为业,常食蜂蜜残渣,这些沉渣几乎是纯花粉,使之长寿。由于花粉的神奇功效,蜂花粉的开发利用研究风行于世界。欧美一些国家兴起花粉热,利用花粉食品提高食品业营养价值。我国也利用花粉作食品添加剂和医药保健品,提高食品的营养价值和防病治病。

蜂花粉几乎含有人类迄今发现的所以氨基酸，而且含量较高，部分以游离态存在，可以被人体直接吸收利用。一个活动量较强的成年人，每天食用大约20~25g的蜂花粉便能满足一天的氨基酸需要量。蜂花粉中所含有的碳水化合物主要是：葡萄糖、果糖、蔗糖、半纤维素、纤维素等，这些都是人体的主要能源，是人心脏、大脑等器官活动不可缺少的营养物质。蜂花粉中类脂含量较高，平均含量为9.2%；蜂花粉中所含脂类中不饱和脂肪酸占60%~91%，远比一些植物油中的含量高，不饱和脂肪酸是人体不可缺少的营养物质，具有降低血中胆固醇和甘油三酯，增强毛细血管通透性及促使动物精子形成等特殊作用。蜂花粉是天然的多种维生素浓缩库，含量高、种类全^[21]。浙江省医学院胡欣等对我国11个地区14个品种23个样品蜂花粉(100g)的抗坏血酸含量进行分析，结果抗坏血酸含量在18.52~92.80mg之间。另据报道，蜂花粉中还含有胆碱和肌醇，并且含量较高。蜂花粉中还含有大量的生长素和微量元素，它们对人体的生长发育起着极为重要的作用，生长素是花粉重要的营养成分之一^[26]，其中人生长素是191个氨基酸残基组成的一条多肽链。此外，蜂花粉中还含有多种活性酶，现已发现的各种植物花粉中已有80余种酶存在，其中主要是水解酶及转化酶，如淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶、果胶酶、过氧化氢酶、细胞色素、氧化酶等，它们可以改善细胞的氧化还原能力，激活酶的活性中心，防止细胞中酶自身的破坏，从而控制衰老及某些疾病的发生。

蜂花粉中生物活性物质的存在，对人体的代谢与物质的合成，对中枢神经系统兴奋性，对生长发育，对维持多种生理器官功能，都有着极为重要的调节作用和广泛的医疗效果。蜂花粉具有延缓衰老的作用，主要是作用在中枢神经系统，促使下丘脑和垂体增强活动的的能力，延长活力时间。老年人服用蜂花粉可以刺激下丘脑的神经元，有利于本已疲劳或功能出现衰退的神经组织得到恢复，从而减缓了衰老进度。国内外专家通过大量研究证实，蜂花粉有改善精神状态和提高精力、体力的作用。蜂花粉对脑的作用，主要是对脑细胞的发育提供了丰富的营养，增强了中枢神经系统的功能和平衡调节，使得大脑和机体保持了旺盛的活力。蜂花粉是前列腺疾病的克星，瑞典医生首次采用蜂花粉治疗前列腺炎，如今，日本、德国等好多国家采用蜂花粉治疗前列腺疾病，我国流行最广泛的治疗前列腺疾病的特效药“前列康”，其主要成分就是蜂花粉。蜂花粉具有提高免疫能力和抗癌

作用,食用蜂花粉能刺激胸腺分泌,提高T淋巴细胞和巨噬细胞数量和能力,从而提高机体免疫能力,预防了各种疾病特别是肿瘤的发生。蜂花粉对治疗贫血有奇特的作用,蜂花粉有加速造血组织的修复和血细胞的新生,对保证造血组织的功能的正常运转发挥着良好的功效。食用蜂花粉不但能增加食欲,而且能促进消化系统的消化吸收能力,增强消化系统功能。蜂花粉富含维生素P和黄酮类化合物等,对增强毛细血管强度,防止毛细血管通透性障碍、脑溢血、视网膜出血、高血压等有良好的效果。蜂花粉的有效成分可以被皮肤直接吸收利用,改善皮肤的营养状态,促进皮肤的新陈代谢能力,防止皮肤干燥,增加皮肤弹性,消除皱纹,延缓衰老,具有美容的作用。此外,蜂花粉对女性更年期综合症等有一定的作用,也是妊娠妇女的最佳营养品,并可有效防止感冒^[15]。

2.1.1 蜂花粉的成分

蜂花粉之所以有很多神奇的功效,是因为其成分相当全面、复杂。各种蜂花粉因植物来源不同,所含成分种类及含量也不同。不同季节生产的蜂花粉其成分及含量也有差异,但差异不大^[27]。一般蜂花粉所含营养成分大致是:蛋白质 20%~25%,碳水化合物 40%~50%,脂肪 5%~10%,矿物质 2%~3%,木质素 10%~15%,未知物质 10%~15%^[28]。

2.1.1.1 蛋白质和氨基酸

人体的细胞及组织都由蛋白质组成,约占人体干重的 45%。促进生长发育,维持组织器官的正常功能和细胞的新陈代谢,主要是蛋白质的作用。氨基酸是蛋白质的分解产物,也就是蛋白质的基本构成单位。人体与自然界中存在的蛋白质大约由 20 多种氨基酸组成,其中亮氨酸等 8 种人体自身不能合成,必须从食物中摄取,故为必须氨基酸,人体缺乏任何一种都会带来不良后果。

蜂花粉中几乎含有人类迄今发现的所有的氨基酸,油菜、芝麻、党参花粉中必须氨基酸总量在 10.49 ± 5.07 mg/g,与动物性食品牛肉、对虾等含有 9.25 ± 3.5 mg/g 相比无多大差异,且部分以游离形式存在,能直接被人体所吸收。一个活动量较强的成年人,每日食用 20~25 g 蜂花粉即可满足全天的氨基酸消耗量。蜂花粉中的氨基酸含量不但种类多,很少有食物能与其相比,而且含量高,比富含氨基酸的牛肉、鸡蛋干酪高出 5~7 倍。蜂花粉显然比肉类、蛋类、奶类、小麦胚芽等良质蛋白食品的含量高。同时,蜂花粉除含有含量较高的必需氨基酸

外,还含有酪氨酸与胱氨酸两种“半必需氨基酸”。

2.1.1.2 碳水化合物

碳水化合物也称糖类,由碳、氢、氧三种元素组成。蜂花粉中所含碳水化合物,主要是葡萄糖、果糖、蔗糖、淀粉、糊精、半纤维素、纤维素等。这些都是人体的主要能源,是心脏、大脑等器官活动不可缺少的营养物质,所以神经组织和细胞核中都少不了碳水化合物,作为生物遗传物质基础的核酸也含有戊糖。安·尔·莫西兰 1977 年报道,苏格兰东南地区七种主要蜂花粉的平均总含糖量约为蜂花粉干物质的三分之一。来源不同的蜂花粉中碳水化合物的含量有所不同,花粉中总糖量以杜鹃花科最高(42.4%),十字花科最低(22.4%)。

2.1.1.3 脂类

脂类是脂肪和类脂的总称。脂肪即甘油酯,作为能源存在皮下,当机体过分需要时会被动用,故称为能源库。类脂主要包括磷脂、糖脂、固醇脂等。是人体所有细胞膜的组成成分,对大脑的发育及整个神经系统的发育具有极为重要的作用。蜂花粉中类脂含量较高,平均含量 9.2%,其中皂化类脂含量 0.7%~10.2%,非皂化类脂含量 0.8%~11.9%。蜂花粉中所含脂类中不饱和脂肪酸占 60%~91%,远比其他动植物油脂中的含量高。不饱和脂肪酸是人体不可缺少的营养物质,有使胆固醇酯化,降低血中胆固醇和甘油三酯,增强毛细血管通透性及促使动物精子形成等特殊作用。蜂花粉的可贵之处就在于,它含有丰富的类脂。勒·恩·斯坦第凡 1966 年报道,他在北美研究了蜜蜂采集的豆科、菊科、百合等十六种花粉的类脂成分。花粉经乙醇氢氧化钾皂化,用重量法测定可皂化和非皂化的类脂含量,结果表明,花粉中类脂类含量很高。

2.1.1.4 维生素^[27]

维生素是维持人体正常生理功能必需的一类物质,这类化合物有十几种,都存在于天然食物中,极少数量就可以满足机体维持正常的生理功能的需要,但绝对不可以缺少任一种。当膳食中维生素长期缺乏或不足时,即可引起代谢紊乱出现病理状态,形成维生素缺乏症。

蜂花粉是天然的多种维生素浓缩物,含量不十分高,但种类十分全。浙江省医学院胡欣等人对我国 11 个地区 14 个品种 23 个样品蜂花粉(100g)的抗坏血酸含量进行了分析,结果抗坏血酸含量在 18.52~92.80 mg 范围之内,平均值为

57.41 mg。另据报道,蜂花粉中还含有维生素 B 族的另外两个成员,胆碱和肌醇,并且含量较高。据报道,每 100 g 玉米蜂花粉中含有胆碱 690.73 mg,含有肌醇 3.0 mg,有的蜂花粉每 100 g 中肌醇含量高达 900 mg。

维生素是维持人体正常生理功能必需的一类物质,这类化合物有十几种,都存在于天然食物中,极少数量就可以满足机体维持正常的生理功能的需要,但绝对不可以缺少任一种。当膳食中维生素长期缺乏或不足时,即可引起代谢紊乱出现病理状态,形成维生素缺乏症。

2.1.1.5 生长素^[13]

花粉含有丰富营养成分,已有不少文献报道,但花粉中含有生长素的报道不多,近期研究证明,花粉所含生长素是其重要的营养成分之一。人生长素是 191 个氨基酸残基组成的一条多肽链。生长素促进生长作用最显著的是对骨、软骨及结缔组织的影响,对代谢作用是增强肌肉对氨基酸的摄取,促进蛋白质、RNA、和 DNA 的合成,并可以促进脂肪转化,增加血中游离脂肪酸量。王开发 1991 年利用激素放射免疫测定盒测定花粉中人生长素的含量,不同种类花粉的人生长素含量相差很大。

2.1.1.6 黄酮类

蜂花粉含有丰富的黄酮类化合物,这类化合物具有抗动脉硬化、降低胆固醇、防辐射等作用。蜂花粉是由蜜蜂采集的植物花粉,而植物花粉含有种类繁多的黄酮类物质,所以蜂花粉中含有丰富的黄酮类物质^[30]。在蜂花粉的诸多成分中,黄酮类物质和他们的生物活性已经成为研究的热点,目的是为了以建立蜂花粉的质量参数^[27]并评估他们的生物学的特性^[32,33]。为进一步对蜂花粉的研究提供依据。任玉翠^[30]等人对 12 种花粉(100 g)进行分析,得出油菜蜂花粉黄酮苷含量高达 2276.4 mg,西瓜最低 352.4 mg,总甙醇含量荞麦最高 6222.0 mg,乌柏最低 514.4 mg, B-谷甙醇,党参最高 3647.4 mg,乌柏最低 233.0 mg。不同的花粉总黄酮含量差异很大,其中含总黄酮丰富的花粉为:板栗、茶花、蚕豆、飞龙掌血、紫云英、芸芥、胡桃等。

花粉中黄酮类化合物是其重要的营养成分之一,而且含量丰富。目前从花粉中发现的黄酮类黄酮类化合物有:黄酮醇、槲皮酮、山奈酚、杨梅黄酮,异鼠李素、原花青素等。Lewis 最早报道从花粉中提取出类黄酮,以后日本的久道周次

和德国的威尔曼等都先后报道对多种花粉含黄酮类检测的结果。

2.1.1.7 其他物质

蜂花粉中除含有钙、磷、钾、钠、镁、硫等外,还含有多种微量元素,对人体保健和生长发育有着重要的意义。蜂花粉中众多生物活性物质的存在,对加强人体的代谢与物质的合成,对中枢神经系统兴奋性,对生长与发育,对维持多种生理器官功能,有着重要的调节作用和广泛的医疗效能。

2.1.2 蜂花粉的性质

由于植物种类或采集季节的不同,各种蜂花粉的颜色也不同。蜂花粉是蜜蜂从被子植物雄蕊花药或裸子植物小孢子叶上小孢子囊内采集的花粉粒,经过蜜蜂粘合制作成一个一个的花粉团,其团粒大小基本一致,直径为 2.5~3.5mm,每个干重 10~17mg,含水量在 8%以下,比较好的蜂花粉团粒齐整,品种纯正,颜色一致,无杂质,无异味,无霉变,无虫迹,比较坚硬。蜂花粉外壁是层坚硬的壳,具有抗酸、耐碱、抗微生物分解的特性,不经破壁的蜂花粉只能从萌发孔中缓慢释放内容物。新鲜蜂花粉具有特殊的辛香味,但味道也各有不同,有的味稍甜,有的略苦涩。

2.1.3 蜂花粉的作用

早在 2000 多年前我们的祖先就将花粉应用于保健和医疗^[31],只因为生产方法落后等多种原因,直到 1979 年以后蜂花粉的加工利用及研究在我国才出现高潮,在食品、医药保健、化妆品等方面取得了很大进展^[32]。

2.1.3.1 蜂花粉的延缓衰老作用^[15]

蜂花粉的抗衰老功效,主要是作用于中枢神经系统,促使下丘脑和各种垂体增强活动能力,延长活力时间。老年人服用蜂花粉,可以刺激下丘脑的神经元,有利于本已疲劳或功能出现衰退的神经组织得到恢复,从而减缓了衰老进度。从免疫学上讲,随着年龄的增长,免疫系统也就随之发生衰退,导致功能下降,机体衰老,疾病缠身。而蜂花粉可以使胸腺增大,T 淋巴细胞、巨噬细胞增加,使机体免疫功能增强,从而也就延缓了机体的衰老过程。蜂花粉中发挥如此作用的主要成分是微量元素中的硒,硒能提高血液和组织中谷胱甘肽氧化酶的活性。催化氧化脂质分解,减少了氧化脂质的形成和积累,这是延缓机体衰老的重要条件。

2.1.3.2 蜂花粉的健脑强体作用

国内外专家通过大量研究证实,蜂花粉有改善精神状态和提高精力、体力的作用。蜂花粉对脑的作用主要是为脑细胞的发育提供了丰富的特有营养物质,增强中枢神经系统的功能和平衡调节,使大脑和机体保持旺盛的活力。蜂花粉中的维生素和氨基酸,有助于神经衰弱和神经抑郁及精神失常患者尽快恢复。

2.1.3.3 蜂花粉提高免疫能力和抗癌作用

人体内有一个系统的免疫组织,由免疫器官和免疫细胞组成,发挥着防御机体免遭细菌、病毒、肿瘤细胞侵害的作用。食用蜂花粉,能刺激胸腺分泌增加,提高T淋巴细胞和巨噬细胞数量和功能,也就大大提高了机体的免疫能力,从而预防各种疾病特别是肿瘤的发生。蜂花粉还能提高人体血清免疫球蛋白 IgG 水平,起到促进巨噬细胞的吞噬作用,增强了抵御细菌、病毒的能力,还具有中和毒素的功能。

蜂花粉还具有抑制肿瘤的作用,大量临床与实践早已做出证明。为了进一步证明这一点,杭州大学王维一教授对此作了进一步的对比试验:选用一批健康的小白鼠,全部接种上 S₁₈₀ 艾氏腹水癌肿瘤细胞,其中 10 只饲喂常规饲料作对照。20d 后处死全部小鼠,对其进行分解,发现饲喂花粉组小鼠肿瘤重量平均为 5.44g,而对照组则重达 26g,肿瘤块之大为实验组的 5 倍;喂食花粉的小鼠每毫升腹水里有 3.53×10^8 个肿瘤细胞,对照组则为 13.39×10^8 个肿瘤细胞,差异非常明显,证明花粉对肿瘤有较强的抑制作用。

2.1.3.4 蜂花粉对前列腺疾病的作用

前列腺疾病这种慢性病发病率比较高,治疗也比较困难,治愈率偏低。然而,蜂花粉的开发应用,为治疗该病开辟了一条新途径,且疗效显著。瑞典医生首次采用蜂花粉治疗前列腺炎,收到出乎预料的效果,接受治疗的病人中,绝大部分有显效。如今,日本、德国等好多国家均采用蜂花粉治疗前列腺疾病,我国流行最广泛的治疗前列腺病特效药“前列康”,其主要成分就是蜂花粉。目前,医疗界公认蜂花粉是前列腺疾病的克星。

2.1.3.5 蜂花粉对造血功能的作用

蜂花粉对治疗贫血有特效,早在 20 世纪 60 年代国外就有大量这方面的报道,主要被用作治疗缺铁、缺维生素性贫血和障碍性贫血。研究报告证明,蜂花粉有

利于促使受创的骨髓尽快恢复功能，能加快造血组织的修复和血细胞的新生，对保证造血功能的正常运转发挥着积极的良好作用。

2.1.3.6 蜂花粉对肝脏的作用^[17]

肝脏是人体的重要器官之一，发挥着排毒及合成某些营养素的关键作用。蜂花粉对肝脏细胞有良好的保护作用，对慢性肝炎造成的损伤有很好的治疗效果。医学工作者在这方面进行了大量的研究和实践，收到了很好的效果。花粉中的单糖有助于肝糖元的生成，而激素则对肾上腺皮质起到刺激作用，从而对蛋白质的合成代谢产生积极的影响。花粉中的B族维生素及铜、镁、锌等微量元素参与肝脏多种酶的组成，并能激活酶的活性。酶是生物体新陈代谢的催化剂，酶的活性低或失活，肝细胞合成蛋白质的过程则受到障碍。故此说，花粉保护肝脏的作用与花粉中含有的激素、维生素及多种微量元素有密切关系。

2.1.3.7 蜂花粉对心血管和消化系统的作用^[15]

蜂花粉富含维生素P和黄酮类化合物等，对增强毛细血管强度，防治毛细血管通透性障碍、脑溢血、视网膜出血、高血压、静脉曲张等均有良好的效果。医生对动脉粥样硬化患者给予蜂花粉治疗，发现患者血清总胆固醇、游离脂肪酸、甘油三酯、 β -脂蛋白和白蛋白等均有明显下降，头疼、心绞痛等症状普遍好转。食用蜂花粉不但能增加食欲，而且能促进消化系统对食物的消化吸收，还起到增强消化系统功能的作用。

2.1.3.8 蜂花粉的美容作用

蜂花粉被誉为可以食用的“美容剂”，服用蜂花粉一段时间，人的容面会焕发出光彩和晕泽。这一事实有力地证实了蜂花粉的美容作用是非常的理想。这是因为，蜂花粉的有效成分可以被皮肤直接吸收，它能改善皮肤的营养状态，促进皮肤的新陈代谢，防止皮肤干燥脱屑，增加了皮肤的弹性，从而有力消除皱纹，延缓衰老和皴裂。

2.1.3.9 蜂花粉免疫增强作用

大量实验研究表明，花粉能促进脾脏、骨髓、淋巴结和胸腺免疫器官的发育，增强免疫细胞的活性，提高机体的免疫功能，并有抗辐射、抗癌作用。同济大学花粉应用研究中心王开发教授等《花粉对机体免疫功能影响的研究》项目通过六种花粉对二百多只大小鼠的免疫功能试验，测定了体重、胸腺、脾重、NK细胞

活性，巨噬细胞功能，淋巴细胞转化，脾脏空斑溶血试验，外周血免疫球蛋白，外周血补体活性，白细胞，胸腺形态以及腹腔细胞内酸性磷酸酶、花粉对放疗癌症患者免疫力功能效果临床观察，运动员服用花粉对血清免疫球蛋白变化等研究，其结果表明花粉具有促进

2.1.3.10 蜂花粉的其他保健作用

除以上作用外，蜂花粉对妇女更年期综合症和月经不调有奇效，也是妊娠妇女的最佳天然营养品，并可有效地预防感冒，尤其对流感预防效果更佳。

2.1.4 蜂花粉的应用

早在两千多年前我们的祖先就开始将花粉应用于保健和医疗领域，但由于生产方法落后等诸多因素，知道最近几十年，蜂花粉的加工利用研究在我国才出现高潮，在食品、药品和化妆品等方面取得了较大的应用进展。

2.1.4.1 蜂花粉在食品工业上的应用

蜂花粉是一种能食用的美容食品，其服用方式很多，最简单的方法是将蜂花粉、蜂蜜等混合后食用，或者将蜂花粉干燥后直接食用，近年来我国的蜂花粉食品种类繁多，如花粉口服液、巧克力花粉果、花粉晶以及花粉饮料等。

蜂花粉发酵后，可以提高其营养价值的利用效果，同时起到脱敏的作用，故此食用经发酵处理后的蜂花粉制品比未经处理的更为有益。

2.1.4.2 蜂花粉在医药行业的应用

近年来，蜂花粉制品在临床上被广泛运用，蜂花粉味甘平无毒，主治心腹寒热，利尿、消淤血，久服轻身益气，延年益寿。

蜂花粉可以治疗慢性前列腺炎，以蜂花粉为主要原料的“前列康”被医学界称为前列腺炎的“克星”。蜂花粉对神经系统也有明显的作用，它能促进脑细胞的发育，增强中枢神经系统的功能因此蜂花粉可促进儿童的智力发育，用蜂花粉治疗智力低下的儿童取得良好效果。

2.1.4.3 蜂花粉在化妆品行业的运用

蜂花粉被誉为可以食用的美容剂，是极佳的营养型天然美容食品，对皮肤无毒副作用。蜂花粉中含有丰富的能被皮肤直接吸收的氨基酸和皮肤所需的维生素、活性酶和激素，对改善皮肤状态，延长青春期有明显的的作用效果。目前以蜂花粉为主要成分的化妆品有花粉雪花膏、花粉香粉、花粉生发水、花粉美容霜等。

2.1.4.4 蜂花粉在畜牧业上的运用^[18]

苏联爱沙尼亚农学院畜牧系 A·维博等研究了蜂花粉对初生牛犊和仔猪病原体微生物的杀伤效果, 结果表明: 葡萄球菌, 大肠杆菌对蜂花粉敏感, 链球菌和肠道球菌对蜂花粉的敏感率分别是 66.6% 和 58.3%, 用蜂花粉补充饲喂笼养的毛皮兽, 能促进它们的生长发育, 加强再生能力, 能提高家禽的产蛋量和种蛋的受精率, 提高断奶牛犊血液中的血红素和蛋白质含量。同时还表明补充饲喂蜂花粉能有效防止断奶牛犊的某些疾病。因此用蜂花粉饲喂畜禽是一种理想的强壮剂和抗菌剂。同时, 蜂花粉富含多种游离氨基酸和丰富的维生素、矿物质、酶等生物活性物质, 将它作为家禽的饲料添加剂可以促进家禽的生长发育。

2.2 黄酮类化合物的概述

2.2.1 黄酮类化合物的分类及结构

黄酮类化合物是具有两个苯环(A 环和 B 环)通过三碳链相互连接, 具有 $C_6-C_3-C_6$ 基本骨架的一大类化合物(见图 1), 广泛分布于植物界。其结构类型根据三碳链氧化程度, B 环(苯基)连接位置(2 位或 3 位)以及三碳链是否成环状等特点, 分为黄酮类、黄酮醇类、二氢黄酮类、二氢黄酮醇类、黄烷-3-醇类、异黄酮类、二氢异黄酮类、查尔酮类、花色素类、黄烷-3,4-二醇类、双苯吡酮类、二氢查尔酮类、橙酮类。一些黄酮类化合物结构上的-OH 与糖苷元结合生成黄酮苷。天然存在的黄酮类化合物多以糖苷形式存在, 组成黄酮苷类的单糖类有 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、L-鼠李糖、L-阿拉伯糖以及 D-葡萄糖醛酸等, 双糖和三糖类有芸香糖、龙胆二糖、龙胆三糖、槐三糖等, 并在 A 环和 B 环有不同程度的羟基化及甲氧基化。

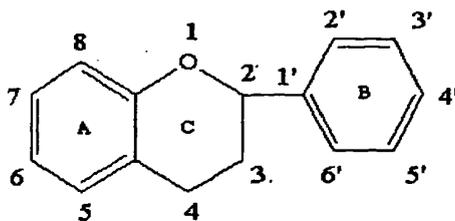


图1 黄酮类化合物的基本结构 ($C_6-C_3-C_6$)

Fig.1 Basic structure of flavonoids

2.2.2 蜂花粉黄酮

蜂花粉中的黄酮类物质是植物生长过程中形成的一类次生代谢产物,是花粉中重要的生理活性物质,包括十几种糖苷及配糖体,具有良好的保健、药用功效,但是蜂花粉黄酮的研究还处于相当滞后的状态,对于花粉黄酮的检测有为数不多的报道,但蜂花粉总黄酮的检测方法并无统一标准。此外,对于蜂花粉黄酮的提取、精制工艺的研究更是少之又少,在国内外基本上为空白。聚酰胺柱层析对各种黄酮类化合物有较好的分离效果,可用于分离各种类型的黄酮类化合物,广泛应用于石油化工、医药卫生、环境保护等领域,资料显示,聚酰胺柱层析对各种黄酮类化合物有较好的分离效果,可用于分离各种类型的黄酮类化合物,包括普及曹元、查耳酮与二氢黄酮等。邹淑仙^[37]采用聚酰胺柱色谱从脓疮草提取物中分离出六种黄酮类化合物。李勇军等^[38]采用硅胶和聚酰胺柱层析进行分离,从头花寥中分离出了棚皮素、棚皮昔、陆地棉营、棚皮素-3-鼠李糖普。王怡^[39]采用改性聚酰胺层析柱分离了银杏黄酮,但未见将聚酰胺柱层析法用于分离纯化蜂花粉黄酮的报道。

蜂花粉一直被作为人类保健品使用,其效果也被广泛认可。在复杂的生物化学反应过程中,黄酮类化合物的自身氧化而使其据有较强的抗氧化性,黄酮类化合物对于羟基自由基有较好的消除作用而能延缓人体衰老。黄酮类化合物的生理作用具有多样性及其保健作用,使花粉越来越受到人们的青睐。早在20世纪90年代,德国联邦卫生局已将花粉列为药品。蜂花粉的治疗特性使它被广泛应用,因此蜂花粉提取物被用于慢性前列腺炎,因为其具有抗炎和抗雄激素作用。芦丁是花粉黄酮中最丰富的成分,因为芦丁可以减少毛细血管的脆性,所以蜂花粉也具有该特性。

2.2.2.1 抗氧化、清除自由基

Dudov, I A^[40]给小鼠摄入蜂花粉之后降低了红血球中脂肪的氧化产物的水平,这表明蜂花粉具有抗氧化的作用。Maria G. (2003)研究了蜂花粉中的黄酮类成分在自由基清除中所起到的作用,在花粉或蜂花粉的清除自由基能力中酚或类黄酮组分从中起到了非常重要的作用,表现出最高活力的花粉往往就是那些含有高水平的类黄酮和酚酸衍生物的种类^[41]。

用比色法和化学发光法研究了玉米黄酮的抗氧化作用。结果表明,玉米花粉黄酮类物质浓度在0.005 mg/mL开始对经自由基(OH⁻)一有清除作用,并随浓度

的增加而加强,浓度从 0.001 mg/mL 起,对超氧阴离子自由基(OH^{\cdot})有清除作用,其作用也随浓度增加而加强。研究表明玉米花粉黄酮类物质有良好的抗氧化作用。曹炜^[42]以 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)为荧光探针,超氧阴离子自由基和羟基自由基致鼠红细胞膜氧化损伤实验模型,分别研究了油菜花粉黄酮、茶叶花粉黄酮对鼠红细胞膜氧化损伤的影响。实验证明超氧阴离子自由基和羟基自由基均能引起鼠红细胞膜脂质过氧化反应,脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量显著升高,膜脂流动性下降。将鼠红细胞膜预先用油菜花粉黄酮处理后,膜脂的 MDA 含量明显下降,呈现剂量与效应关系,膜脂流动性显著提高,结果表明油菜花粉黄酮、茶叶花粉黄酮对超氧阴离子自由基和 TL 基自由基引起的鼠红细胞膜的氧化损伤有保护作用。研究表明,黄酮类化合物清除自由基和抗氧化的作用机理在于它阻止了自由基在体内产生的 3 个阶段:即与 O^{\cdot} 反应阻止自由基引发;与金属离子螯合阻止 OH^{\cdot} 生成;与脂质过氧自由基(ROO^{\cdot})反应阻止脂质过氧化过程。黄酮类化合物的抗氧化性质主要与黄酮类物质的结构、酚羟基取代基的位置和数目、羟基成苷等有关:

研究表明,黄酮为酚酸类化合物,在某些金属离子存在的条件下,其结构极易被氧化,所以具有很强的抗氧化活性,能保护细胞膜上的非饱和脂肪酸(unsaturated fatty acids, UFAs)免于氧化^[43]。生物体内的含氧自由基包括超氧阴离子自由基(O_2^{\cdot})、羟基自由基(OH^{\cdot})和脂质过氧化自由基(ROO^{\cdot})^[44]。此类自由基可与体内大量生命所必需的分子(如核酸、蛋白质)相互作用从而对后者产生毒害作用^[45]。类黄酮作为非常强的自由基消除剂以及单线态氧消除剂,可抑制脂质的过氧化作用。而且,类黄酮与过氧化自由基相反应,还终止了自由基反应的链式反应。Bombardelli和Morazzoni^[46]观察到,当一种多不饱和脂肪酸产生自动氧化时,类黄酮主要通过金属螯合活性等显出它们的抗氧化作用。

黄酮类化合物的抗氧化机理有两大类:一类是络合具有促氧化作用的金属离子,另一类是清除自由基^[47]。其机理又和结构(酚羟基位置、数目、取代模式等)密切相关,特别是羟基的结构^[48]。

黄酮类化合物是具有多羟基的化合物,研究表明,分子中的酚羟基数目越多,则与活性自由基结合的氢原子数目也就越多,其抗氧化能力也越强,如杨梅素羟基自由基清除率为50%,而山奈酚仅为20%,但当B环酚羟基数目增加到一定的量

时, 抗氧化活性不再随酚羟基数目的增加而增大^[49]。张英等用化学发光法测定出B环上的3', 4'-邻苯二酚结构是清除羟自由基的关键结构, 其中4' 羟基尤为重要。当B环无取代基存在时, A环上的邻二羟基同样具有抗氧化活性。同时, A环上的5、7位羟基有利于抗氧化活性, 可与金属离子络合, 7位羟基在4' 羟基存在时可以提高抗氧活性。

研究发现羟基成苷后, 影响了自由基中间体的稳定性, 从而使抗氧化活性有了显著差异。如芦丁和槲皮素, 由于芦丁 3-OH 被芸香糖苷化, 其抗氧化活性比其苷元槲皮素低得多; 大豆异黄酮苷只有微弱的抗氧化活性, 而当用酶解的方法使大豆苷元游离出来时, 其抗氧化能力可与丁基羟基茴香醚(BHA)相匹敌^[46]。

Rice 指出黄酮化合物 C 环的 3-OH 是很重要的结构, 与相应的苷元相比, 黄酮 3-OH 的糖基化将减小它的抗氧化活性^[51]。龙春比较了槲皮素、木犀草素、芦丁和紫杉叶素的 TEAC 值(抗氧化性值), 得出结论: 槲皮素>芦丁>木犀草素>紫杉叶素, 证明 C 环中 3-OH 和相邻双键的结合具有较高的抗氧化活性。少了 3 位羟基相连的双键或是少了双键的 3-OH 都将在很大程度上失去其抗氧化活性^[52]。胡春比较了芦丁、槲皮素、桑色素、橙皮苷在不同体系中的抗氧化作用。这几种黄酮抑制猪油过氧化的能力为: 槲皮素>桑色素>芦丁 \approx 橙皮苷。提出酚羟基苷化后尤其 7-OH 糖苷化不利于其清除自由基活性, 并且推测在阻止油脂自动氧化中, 3-OH 和 4-羰基可能起着更重要的作用, 同时提出黄酮体中的有效酚羟基为 3-OH、5-OH、4-羰基和 B 环邻二-OH(即 3', 4'-二羟基)^[53]。沈建福等研究了竹叶黄酮糖苷的水解及其苷元的抗氧化性, 结果表明, 竹叶黄酮糖苷经水解脱糖基成为黄酮苷元后, 其抗氧化性增强。竹叶黄酮苷元在菜籽油中显示了良好的抗氧化性能, 相同纯度的抗氧化能力与 2, 6-二叔丁基对甲酚(BHT)相近。在猪油中的抗氧化能力与槲皮素、茶多酚相似。已知槲皮素是自然界中存在的抗自由基和抗氧化活性最强的黄酮醇苷元, 竹叶黄酮苷元的清·OH 活性接近槲皮素^[54]。宾丽英用 β -葡萄糖苷酶来水解大豆和葛根提取物、槐米提取物、黄芩苷、芦丁、橙皮苷、42. 4%大豆苷等黄酮苷, 由酶解前后的现象和紫外光谱分析, 酶解作用使黄酮苷变成苷元。进一步比较酶解前后各样品在猪油中的抗氧化活性, 发现酶解后黄酮苷元的抗氧化能力都有了不同程度的提高, 其中芦丁、大豆苷、黄芩苷的提高更是显著, 酶解后芦丁、大豆苷的抗氧化活性提高了 3 倍多, 与 BHT 相当, 而黄

苯苷酶解后的抗氧化活性甚至比 BHT 还高。^[53]

2.2.2.2 促进免疫

Dudov, I A^[56]用含蜂花粉的日粮饲喂兔子一个月,能免疫激活兔体内 IgM 和 IgE(IgM 和 IgE 是人体免疫球蛋白中的两种)的初级和次级水平。发挥这一活性的关键成分可能是蜂花粉中的抗氧化剂—黄酮类和其他酚类成分,这些成分已被广泛研究。

2.2.2.3 降血脂

王开发教授^[53]通过给患高血脂的动物连续 20d 灌胃玉米黄酮类物质后,其血清胆固醇和甘油二酯含量与模型对照组比,均有明显差异,在三种不同剂量中以中剂量(200 mg/hg)组效果最为显著。这说明玉米黄酮类物质对实验性高血脂症和高胆固醇血症均有显著的治疗作用。

纵观文献报道,黄酮类化合物还具有多种生物活性功能,其在抗衰老、抗菌、抗病毒、抗癌症、抗肿瘤、护肝、抑制高血压、调节内分泌系统、增强机体免疫力、预防,自血管疾病及止痛镇痛等多方面具有良好的作用^[58, 59]。黄酮类化合物的许多作用在花粉黄酮研究中尚未涉及,如黄酮类化合物在油脂中的抗氧化活性的研究已有不少报道,芦丁和槲皮素是较早用来作为食品抗氧化剂黄酮类化合物。^[60]在研究沙棘黄酮的抗氧化作用过程中,比较了槲皮素、BHT(二十基轻基甲苯)、银杏黄酮和沙棘黄酮在沙棘油中的抗氧化能力,发现 4 种抗氧化剂都能明显地延缓沙棘油自动氧化过程,其抗氧化顺序为槲皮素>BHT>银杏黄酮>沙棘黄酮。在预防心血管疾病方面,目前认为,低密度脂蛋白(LDL)的氧化修饰是动脉粥样硬化(AS)发生发展的主要原因之一,脂质过氧化是 LDL 氧化修饰的主要因素。黄酮类化合物对动脉粥样硬化预防和治疗作用主要是基于对 LDL 氧化的防止。研究表明,桑色素、槲皮素可在 1-2 $\mu\text{mol/L}$ 50%抑制体外巨噬细胞导致的 LDL 氧化。

Viaon 等^[61]比较了黄酮化合物与几种天然及合成抗氧化剂对 LDL 体外氧化的抗氧化特性,发现具有较强的抑制 LDL 体外氧化的黄酮类化合物大都 B 环上有邻二羟基结构,表明这些化合物清除自由基的作用是构成了它们抵抗 LDL 氧化的重要原因。黄酮类化合物体外抑制 LDL 氧化可能是由于清除了巨噬细胞中产生的自由基,也可能是由于保护 LDL 中固有的 α -生育酚或者使氧化了的生育酚再生,

从而间接抑制了 LDL 的氧化。黄酮类化合物不仅在医药上已经广泛应用,在功能食品开发方面也越来越多受到重视。除了利用它们的生物活性外,也将其作为功能食品的添加剂、天然氧化剂、天然色素、天然甜味剂等。生物黄酮类化合物均具有不同程度的抗氧化作用,尤其芸香昔、槲皮素、银杏黄酮、大豆异黄酮等具有较强的抗氧化能力,可以代替合成抗氧化剂,用于油脂的抗氧化中。

2.3 蜂花粉的研究概况

2.3.1 蜂花粉的一般物理特性

2.3.1.1 花粉粒的颜色

花粉是裸子植物或被子植物的雄性生殖细胞体,在不同的季节和不同的植物中,花粉长呈现不同的颜色,如黄色、黄绿色、红色、灰色、黑色、褐色等,其中本实验中所涉及到的两种蜂花粉茶花粉和油菜花粉分别呈现橘红色和黄色。

2.3.1.2 花粉的形特特征

多数蜂花粉粒表面光滑或有波浪状,但少数有雕纹分子,如小刺、瘤、颗粒等,外壁上除了有雕纹外,大多数花粉还有萌发孔或萌发沟,萌发孔的形状、结构、位置、数目、及大小因植物种类而异。

2.3.1.3 花粉粒的大小

不同植物的花粉粒大小变化幅度很大,最小的直径不足 10 μm ,最大的达到 200 μm 以上,一般多集中在 30~80 μm 之间。

2.3.1.4 花粉气味与口感

新鲜的蜂花粉一般具有该种粉源植物特有的芳香味,口感亦不相同,有的甜味,有的味苦涩。

2.3.2 蜂花粉的化学特性

蜂花粉中的花粉粒具有坚固的外壁,可以抵抗强烈的酸碱刺激而不被破坏,在泥炭、土壤、煤层、片岩等沉积物中,经常可以找到化石孢粉的孢壁遗迹,虽经千百万年甚至几亿年,其孢壁亦能保存完好。花粉经过酸或碱处理后,其内部的物质及柔软的内壁都被溶解,留下的只有花粉外壁,外壁主要由孢粉素、纤维素和果胶质构成。花粉的萌发孔后萌发沟由于结构状态比较脆弱,在酸碱,微生物发酵或机械处理时容易破裂,释放出其内容物,有的花粉经水浸泡后亦能从萌发孔中释放出内容物。由于蜜蜂采集回来的花粉含水量比较高,储藏不当很容易

发生霉变，霉变的花粉味道变苦涩，食用这样的蜂花粉会影响到人体健康。

2.3.3 蜂花粉黄酮类

目前从花粉中发现的黄酮类化合物有：黄酮醇、槲皮酮^[62]、山奈酚、杨梅黄酮、木犀黄素、原花青素、二氢山奈酚、柚（苷）配基、芹菜（苷）基等。Lewis最早报道从花粉中提取出类黄酮，以后日本的久道周次和德国的威尔曼等都先后报导对多种花粉含黄酮类检测的结果。

蜂花粉中的黄酮类物质是植物生长过程中形成的一类次生代谢产物，是花粉中重要的生理活性物质，包括十几种糖苷及配糖体，具有很好的保健、药用功效。花粉黄酮多以糖苷的形式存在，即一个糖的半缩醛羟基与苷键结合，非糖部分叫糖苷配基或配糖体，在葡糖苷酶的作用下生成，D-葡萄糖是最常见的结合糖，D-半乳糖和L-鼠李糖也常见。有时在黄酮上连接二糖和三糖（芦丁），在不同植物中发现游离黄酮苷元的报道逐年增加。但很少有人关注他们是否真的以游离态存在，更少去关注他们是存在外部结构还是内部结构。蜜蜂采集的花粉团中混合有蜂蜜和蜜蜂唾液腺的分泌物，该分泌物中存在α和β葡萄糖苷水解酶。因此，蜂花粉中的黄酮主要以游离态黄酮苷元存在，干燥蜂花粉中游离芦丁的聚集显然是由于葡糖苷酶的作用。研究表明黄酮可以作用于新陈代谢和生长发育，有人关注它的被动保护作用，授粉中它作为一种花吸引剂^[59]。

黄酮类化合物是以黄酮为母核，黄酮母核上连有羟基、甲氧基、羟基等取代基，是植物经过光合作用产生的，按结构可以分为黄酮类、黄烷类、异黄酮类、二氢黄酮类、二氢黄酮醇类等。花粉中黄酮类化合物是其重要的营养成分之一，而且含量丰富。花粉中黄酮类是不低的，一般达1398.25~2549.9 mg/100g。我国早在1983年由湖南中药研究所从长苞香蒲花粉中分离出异鼠李素、槲皮素、异鼠李-3-O-芸香糖苷和一个尚未完全鉴定的异鼠李苷，花粉中芦丁含量比较丰富。槲皮素、山奈酚、异鼠李素在多种花粉中都有报道。特别是对郁金香等花粉的研究十分深入，已鉴定出6种黄酮醇类化合物。其中花粉黄酮类化合物芦丁、槲皮素、山奈酚等在一定条件下能溶解与水，其结果如图2所示^[64]：

槲皮素也称槲黄素，其结构特点是C-环的3-位连有羟基，加上A-环和B-环各两个羟基，形成了五羟基化合物，如果3-OH上的氢被葡萄糖取代，则形成异槲皮素苷。槲皮素是非常重要的生物黄酮，具有很好的抗氧化性。

山奈酚也称茨菲醇，其结构特点是 C-环的 3-位连有羟基，A-环上有两个羟基而 B-环有一个羟基，加上 3-OH 形成了四羟基化合物，如果 3-OH 上的氢被葡萄糖基取代，则形成紫云英苷。山奈酚是中草药银杏叶、八角莲的有效成分，其功能从结构上分析应与槲皮素相近。

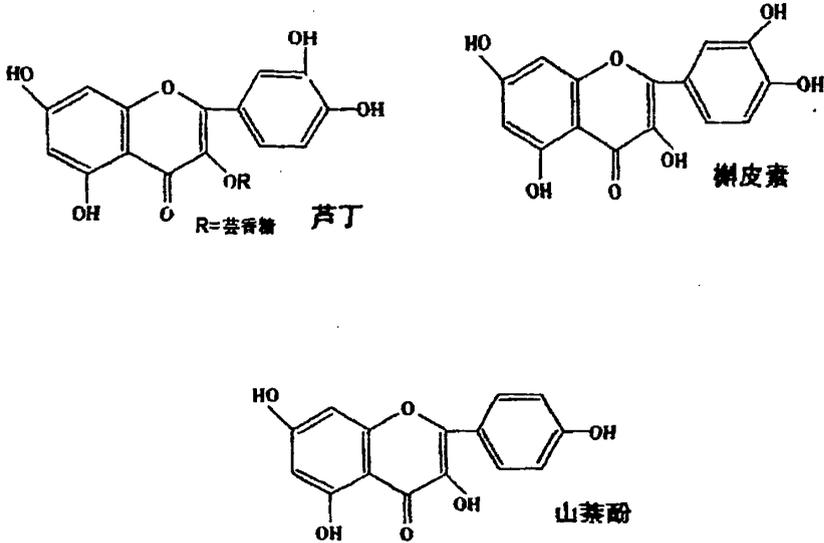


图2 蜂花粉几种黄酮醇类结构图

Fig.2 The structure graph of flavonols of pollen

2.3.4 蜂花粉成分和药理作用研究现状

进入 21 世纪后，科学技术在各个领域内的巨大作用已加快显现，科技创新成为人类文明进步的主要来源，在现有知识资源和物质资源的基础上大力推进科技创新，已成为世界潮流。我国的健康产业要在国际化的竞争中立于不败之地，则更需以现代技术改造传统生产，特别使高新技术来替代粗放落后的技术。

我国现代科技的飞速发展，也使高新技术为健康事业的科技发展提供更有利的条件。花粉广泛应用于食品、药品和化妆品等领域，是朝阳的健康产业的组成部分。我国花粉事业多年来虽然有显著的发展，但在当今科技飞速向前发展之际，更要靠科技创新来壮大花粉产业，通过科研、生产、经营的协同努力，使我国花粉事业达到世界先进水平。

我国花粉的基础理论研究多年来已全面展开，普遍深入，取得可喜的成果。

近年来特别在下述几方面有新进展和突破。

2.3.4.1 花粉多不饱和脂肪酸的研究

近几年来,人们对蜂花粉中脂类的研究开始活跃,特别是对心脑血管病越来越多,人们迫切需要寻求各种保健品和治疗品的药品。而多不饱和脂肪酸对心脑血管疾病有良好的保健和治疗作用。花粉中的脂类物质从20世纪80年代后期开始已引起国内外学者的关注,20世纪90年代中后期人们开始注意蜂花粉中脂类的潜在价值,特别是花粉中不饱和脂肪酸的价值。不饱和脂肪酸的研究是建立在花粉脂类研究的基础上。据考察,是Kerner(1891)最早开始对花粉中脂类和脂肪酸研究的^[61]。

多不饱和脂肪酸是机体必需的营养组分之一,具有重要的生物活性和生理功能,在花粉的营养成分中其研究相对较差,国内以往研究甚少。近年来对花粉中的多不饱和脂肪酸做了专题研究,用GC-MS测试获得我国17种花粉多不饱和脂肪酸(PUFAs)含量新数据,发现花粉的PUFAs含量丰富,居总脂肪酸中的首位,达到45.7%,以 ω -3-亚麻酸、亚油酸含量最多,花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸也有相当含量,在花粉脂肪酸中新发现含有重要活性神经酸(二十四碳烯酸)。探讨了CO₂超临界法、尿素包合法等花粉多不饱和脂肪酸的提取方法。展开了油菜花粉多不饱和脂肪酸降血脂的动物模型试验。最近已有CO₂超临界法提取花粉多不饱和脂肪酸产品研究成功,降血脂效果显著^[2]。

2.3.4.2 花粉矿物元素研究

花粉中常量和微量元素的营养重要性为人们所重视,以往研究比较多。近来对花粉中矿物元素进行了结合态分析,探讨花粉中Fe, Zn, Cu, Mn 4种元素的初级形态、次级形态、蛋白质结合态、可溶性糖类结合态和脂肪结合态。对以往未测试过的14种花粉利用等离子方法的矿物元素研究中,新发现13种微量元素:铈(Ce)、镨(Pr)、钐(Sm)、铕(Eu)、铥(Ho)、铒(Er)、镱(Lu)、钕(Nd)等13种元素,综合以前国内外花粉已发现的43种元素,加上C, H, O, N, 花粉中所含元素已达60种,大大推进了花粉矿物元素研究向纵深发展^[60]。

2.3.4.3 花粉多糖研究

花粉多糖是我国近年来花粉营养成分研究较为深入的功能因子,已对我国常见的花粉进行了含量测试,提纯工艺探讨,花粉多糖单体结构和分子量研究,特

别是花粉多糖的药理、药效研究更为全面。开展了小鼠免疫器官重量、DNCB 接触性皮炎作用, 巨噬细胞吞噬功能影响, 血清溶血素试验, NK 细胞活性等试验。通过对大鼠腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子分泌和产生白细胞介素 6 影响, 以及对肺泡巨噬细胞内乳酸脱氢酶和酸性磷酸酶影响试验, 证实花粉多糖是一种很好的免疫促进剂。玉米花粉多糖还进行了 S-180、肺癌、肝癌的动物试验, 获得抑瘤率达到 31.38%~48.01% 的效果。尚开展了对荷瘤(肝癌、肺癌)小鼠的免疫器官重量、NK 细胞活性、吞噬功能、血清溶血素和白细胞影响实验, 证实能提高荷瘤小鼠的免疫功能, 且进行花粉多糖毒理试验, 开展了花粉多糖针剂的标准、稳定性观察以及指纹图谱等新药报批前的研究工作, 最近开展了花粉多糖降血脂、抗菌等的药理研究^[61]。

2.3.4.4 花粉黄酮研究

花粉黄酮成分也是近几年来有所进展的研究, 除了对国产常见花粉的黄酮含量开展了普查, 还进行其提取、纯化工艺探讨, 对其抗自由基、降胆固醇药理进一步开展动物模型试验, 证实花粉黄酮对心血管病的治疗功能。

2.3.4.5 花粉植物甾醇研究

植物甾醇近来引起人们十分重视, 称为清脂食物因子, 具有很好降低血脂功能以及抗癌、消炎、止咳祛痰作用, 被国际生命科学学会推荐为十大功能营养之一, 国际营养学会推荐的未来十大功能性营养成分就包括了植物甾醇。国际上花粉甾醇已开展了一定的研究, 我国研究相对较差, 陈燕、王开发、林科院亚林所等均进行了一定的测试和研究, 已有以植物甾醇为有效成分指标之一的降血脂保健品问世, 显示我国亦开始重视花粉植物甾醇类成分的研究^[62]。

2.3.4.6 花粉抗衰老功能药理研究

花粉抗衰老功能以前已进行一定的研究, 近来开展了抗衰老动物模型试验, 观察动物不同脑区组织中超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)水平影响, 显示花粉能明显升高脑衰老动物某些脑区 SOD 活性和降低脑衰老动物某些脑区 NO 水平, 表明花粉具有延缓衰老和增强记忆力等作用。花粉抗衰老动物模型的试验结果尚显示, 花粉具有较好的预防脑衰老作用(1). 在细胞水平上花粉对海马、纹状体和下丘脑区的组织细胞有修复作用。(2). 证明花粉对海马、纹状体和下丘脑等脑区的单个细胞 DNA 有预防其损伤作用, 为花粉作为预防及修复 DNA 损伤的保护

食品提供了依据。

2.3.5 蜂花粉产品生产工艺研究状态

2.3.5.1 纳米技术在花粉生产中的应用

21 世纪是生物技术迅猛发展的世纪, 纳米技术的发展是其中标志性技术之一, 纳米技术在生物制品的应用, 使药品和保健品出现新面貌。使得产品比表面积增大, 更增加其液动力学的稳定有效途径, 控制稀释剂的给药系统, 使药物或功能成分定时定量释放, 促进产品功效更好。近年来已有人把花粉制成纳米材料的初步探索, 利用超临界技术进行超微粒化, 达到纳米级别, 制成花粉新产品的初步探索, 利用超临界技术进行超微粒化, 达到纳米级别, 制成花粉新产品。纳米技术在花粉产品的应用, 将大大提高花粉产品的科技含量, 提高我国花粉产品的竞争能力。

2.3.5.2 口崩片新工艺在花粉制品的应用

近年来国际上药品和保健品领域迅速崛起一种新型固体剂型—口腔速溶片, 简称口崩片。口崩片服用不必喝水吞服, 该片在口腔内遇到唾液后, 短时间内迅速溶解呈液体状态, 随之吞入胃发挥其功效, 它较普通片剂吸收快, 生物利用度高, 而且可以解决特殊人群服用之方便, 适用于外出旅游、野外无水环境下、野外作战、高空作业、资源勘探(钻机司钻)、工作繁忙者(白领人群)、吞咽困难者等服用。国际上近来发展很快, 据报道口崩片将会产生近 30 亿美元的国际市场效益, 是一种极有前景的新工艺。我国食品药品监督管理局已经将口崩片列为一种新剂型, 并已有几种药物口崩片制剂获准注册和上市, 但保健品尚未见该新产品, 花粉界已有个别单位开始探索花粉口崩片的研究, 将获得突破性的进展。

2.3.5.3 CO_2 超临界萃取工艺在花粉生产上的应用

超临界 CO_2 萃取技术从 20 世纪 70 年代到 90 年代开始用于药用植物有效成分的提取, 具有常温、无菌、环保、使用安全简便、时间短、产品质量高等优点, 产率大大高于传统的溶剂法。近年来亦在花粉生产工艺中获得应用, 如利用其萃取花粉中的脂溶性成分, 制成高浓缩软胶囊, 已获国家食健字号产品, 具有调节血脂的功能, 在市场销售流通。还有该方法提多不饱和脂肪, 已研究成产品, 经动物模型的药理药效试验, 效果甚佳, 有望成为有发展前景的产品^[60]。

2.3.5.4 尿素包合法富集多不饱和脂肪酸

尿素包合法始于 ω -3PUFAs 的富集, 使其产率从 30% 提高到 66%, 所以尿素

包合法分离结晶是一种分离富集 PUFAs 的有效方法,通过对油菜花粉尿素包合法分离富集的多次深入探索,证实该方法用于花粉富集 PUFAs 的效果显著,可以作为工业化的选择途径。生产工艺是实现新产品的关键技术,前几年花粉界在新工艺探索研究,显然有所忽视,新的成果不多,上述花粉新技术新工艺的探索成果将会鼓励大家,用更多时间和精力去开辟新工艺研究,推动我国花粉产品的创新发展^[3]。

2.3.6 花粉及其开发利用现状

我国花粉产品的市场状况,经过多年的运转总体上是不断发展壮大,但与其他健康行业相比呈现生产较分散、规模较小,大的企业不多,原料产品较多,制品较少,初级产品较多,科技含量高的产品较少,品牌产品有待更好地发展。

2.3.6.1 花粉保健品和食品

是花粉产品的主体,近些年来花粉保健品和食品在市场上有较快的发展,遍布全国,如在上海的各大超市均有蜂产品专柜,也有许多花粉产品专卖店,呈现花粉产品众多,市场出现繁荣。从目前市场上花粉产品分析有三大类:①花粉原料产品,各种花粉用散装、瓶装或压成片剂或装成胶囊。②花粉制品:花粉用经过超微粉碎或其他方法破壁制成片剂或胶囊,还有一部分是花粉经过提取制成胶囊、膏体或片剂。③花粉复方产品:如交大昂立的美知之,是以松花粉加珍珠、VE、VC 的胶囊,上海的新生力核酸,是以花粉为载体加上核酸的胶囊。上述第一类产品均以食字号或健康食品出现,第二类第三类产品多以食健号的保健品在市场流通,也有相当部分产品是以食字号健康食品销售。花粉产品与蜂王浆、蜂胶产品相比,近年来经国家审批的健字号相对显少,从产品的加工工艺、科技水平亦显简单,高科技水平不多,如何以高新技术武装是花粉业今后重视的课题。近年来松花粉的市场发展很快,不但产品种类较多,产品工艺水平亦大有提高,企业数量大增,产量产值增加很快,而且形成了在保健品行业居重要位置地位和名牌产品(松花粉、松花参宝)的新时代健康产业集团,应是我国花粉事业发展的方向。但花粉界总的还处于生产分散,规模较小,初级产品多,高新科技产品少,名牌产品不多,还需更好发展的市场状况,有待重视科技创新,极力开发新产品,来推动花粉食品市场的发展^[62]。

2.3.6.2 花粉药品

花粉药品是我国花粉产业中的重要部分,自20世纪80年代后期以来,我国花粉药品得到一定的发展在20世纪90年代初,我国已有7个花粉药品获准字号批准生产,除前列康产品逐年发展已成名牌,2001年以来年产值已上亿元,全国各地医院、药品商店均可见到产品,其原料花粉需求每年在300 t以上,是我国花粉原料市场的主要消费者,还有安徽百春制药生产的花粉片也有相当产量,原瑞典产现在南京组建美瑞制药公司的舍尼通也广销全国各地,年产值已超过8 000万元。近年来国家提倡新药研制,花粉药品研究亦较重视,近年亦有数种花粉新药的研制,有的品种亦获国家的临床应用批件,我国花粉药品的开发利用应具有很大的潜力^[15]。

2.3.6.3 花粉化妆品和饲料添加剂

花粉不仅能润肤、护肤,且可祛皱、消斑、保湿、防晒、治青春痘等功效,自古以来我们的祖先早就利用花粉美容。我国自20世纪80年代后期,市场上已出现一些花粉化妆品,一二十年来也有不少种类的花粉化妆品在市场上流通,如花粉营养霜、花粉菁华养颜霜、花粉菁华赋活露、花粉沐浴露、花粉洗发精、花粉洗面奶、花粉爽身宝、松花粉爽身粉等,但销售地域都不广,市场运行时间均不太长,至今花粉化妆品始终未能形成品牌。近年来新时代集团的松花靓颜化妆品市场销售不错,年产值已超2 000万元,能否形成品牌尚有待于努力。花粉在美容方面如能有外用、内服相结合的产品,其功效肯定很好,必能发挥其特色,能在化妆品行业中树立起应有的声誉。饲料添加剂产品是花粉应用中新兴的部分,进入市场时间较短,花粉饲料添加剂是绿色、天然,能提高饲养动物的产量和质量,具有防病的效果,在当今世界畜产品发生疯牛病,口蹄疫、禽流感等灾害后,天然饲料更引人重视。因此,饲料界均看好花粉饲料添加剂,但在实际推开时,由于花粉原料价格较高,目前一时难于推广和发展,在市场上运转较广的产品是浙江的“快大素”花粉饲料添加剂,新的产品应市还有待于努力。但随着我国牲畜的精细化、集约化,花粉饲料添加剂将前景诱人^[18]。

2.3.7 蜂花粉有效成分提取分离方法综述

花粉化学成分十分复杂,任何一种蜂花就其成分而言都是复杂的混合物。它不仅含有常规成分也含有微量元素和一些特殊成分,要想有机应用和研究其有效

成分，就必须将其成分提取分离出来，提取，是采用适宜的溶剂和适当的方法，将所以成分尽可能完全地从药用植物中分离出来，同时注意避免和减少其他杂质的提出^[69]。

目前，较常用的提取方法有：溶剂提取法、水蒸气蒸馏法、升华法、超临界流体提取法。

2.3.7.1 溶剂提取法

溶剂提取法是根据各种化学成分在溶剂中的溶解性，选用对有效成分溶解度大、对不需溶出的成分溶解度小的溶剂，将有效成分从蜂花粉中溶解出来的方法，主要有以下八类：

1 浸渍法

将蜂花粉装入适宜的容器中，加入一定量的溶剂（多用水或稀醇），以能浸透蜂花粉稍有过量为度，时常震摇或搅拌。放置一段时间，过滤。如此再提取一两次。第二三次浸渍的时间可适当缩短。合并浸提液。浓缩后得提取物。此法大多在室温下进行，适用于遇热易破坏的成分以及含大量淀粉、树胶、粘液胶等多糖的物质，但此法提取时间长，效率不高，特别是用水做溶剂提取时，提取物易发霉变质，所以必要时需加适量的防腐剂。

2 渗滤法

将蜂花粉用适当的溶剂润湿膨胀后，均匀地装入渗滤筒中，装至占筒内高2/3为度，上盖一层纱布或滤纸，缓缓加入溶剂，使蜂花粉粉末全部浸没，浸24h，打开下口徐徐流出液滴（每分钟3~5ml），收集渗滤液，同时不断添加新溶剂。一般收集渗滤液体积约为花粉重的7~8倍，将渗滤液浓缩既得提取物。此法所用溶剂多为不同浓度的乙醇或水，不宜用低沸点易挥发的有机溶剂。常在室温下进行，适用于遇热易破坏的成分，其常用装置图3。

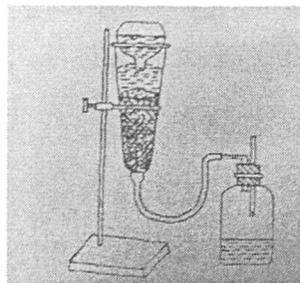


图3 渗滤装置

Fig.3 equipment precolation

3 煎煮法

将蜂花粉粉末装入适当的容器（避免铁器）中，加水浸过液面，加热煮沸 1h 左右，并不断搅拌，避免焦糊。一般煎煮两三次，第二、三次可以适当说短时间。本法简单易行，属热浸法，提取效率比冷浸法高。含挥发性成分及有效成分遇热易破坏的材料不易用此法。

4 回流提取法

将材料粉末装入适宜的烧瓶中，装入花粉量为烧瓶容量的一半，加入溶剂至没过蜂花粉面 1~2 cm，接上冷凝管，置水浴上加热回流 1h，滤取液体，残渣再以新溶剂回流 2 次，每次 0.5h，合并三次回流液，浓缩即得提取物。本法也属于热浸法，提取效率与煎煮法相同，对受热易破坏的成分，不易用此法，装置图 4。

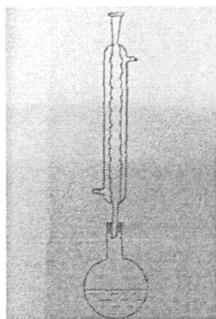


图 4 回流装置

Fig.4 Renfluence equipment

5 连续回流提取法

此法在实验室常用索氏提取器进行。索氏提取器弥补了分次加热提取法中需要溶剂量大，操作麻烦的不足，但提取时间较长，一般需要约 4~10 小时才可以提取完全。因此，对热不稳定的成分易被破坏。为防止成分破坏，可在提取过程中，每约 1~2h 将提取液转移出来后再继续提取，使提取的成分及时脱离加热的环境^[65]，常用装置图 5。

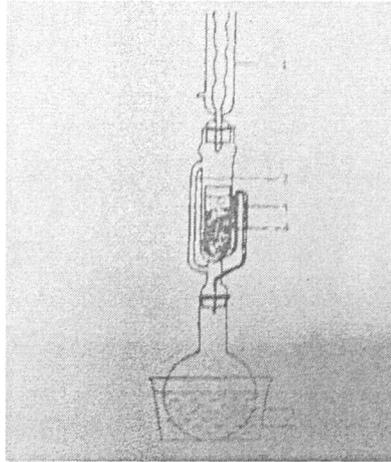


图 5 连续回流

Fig.5 Continuous renfluence equipment

6 超声提取法

超声提取法利用超声波高频率的振动,产生并传递强大的能量给蜂花粉颗粒和溶剂,使它们做高速运动,产生很深的穿透效应。由于大量的超声波作用在液体里,当振动处于稀疏状态时,液体被撕裂成无数小空穴,待其在瞬间闭合时,产生高的瞬时压力,它可击碎蜂花粉,加速蜂花粉中的成分溶出,使其进一步提取,从而增加提取效率。超声提取法操作简便,适用于各种溶剂的提取;提取时间短,一般只需数十分钟即可完成;不需加温即可达到提取目的,故也适用于对热不稳定成分的提取。因此,本法的提取效率优于前述几种提取方法。

7 微波法

微波是频率介于 300MHz 和 300GHz 之间的电磁波,微波加热是利用微波场中介质的偶极子转将电能转化为热能。其提取法就是将微波加热应用于植物细胞破壁,是一种快速、高效、安全、节能的提取胞内耐热物质的新工艺。微波提取法具有穿透力强、选择性高、加热效率高等显著的特点,但是也具有一定的局限性,一般只适用于对热稳定的产物,如多糖、核酸、生物碱、黄酮等有效成分,对于热敏性物质,如蛋白质、多肽、酶等,微波加热容易导致它们变性使活;二是要求被处理的物料具有良好的吸水性,或者说待分离的产物所处的位置容易吸水,否则细胞难以吸收足够的微波能将自身击破,产物也就难以迅速释放出来^[67]。

8 超滤法

本法是利用物理筛分的原理,用多孔半透膜(超滤膜)为介质,以错流方式

进行过滤,利用膜孔选择性的筛分作用对物质进行截留,使溶剂与低分子物质通过,从而达到分离纯化的目的^[68]。

2.3.7.2 水蒸汽蒸馏法

本法将水蒸汽通入含有挥发性成分的材料中,使材料中的挥发性成分随水蒸汽蒸馏出来的一种提取方法。适用于能随水蒸气馏出而不被破坏的有效成分的提取。植物中的挥发性油,某些小分子生物碱和小分子酚性物质等都可采用本法提取。另外,运用水蒸气蒸馏,对所提取的液体成分应具备的条件是:其沸点多在 100°C 以上,成分与水不发生反应,难溶于水。

2.3.7.3 升华法

某些固态化学成分受热直接变成气态,遇冷后又直接凝固为固态的性质称为升华。材料中具有升华性的成分可以用升华法提取。此法简单易行,但材料炭化后易产生挥发性焦油状物,黏附在升华物上,不仅不易去除,而且会使升华不完全,产率低,有时会伴随有分解的现象,因此较少采用此法进行提取分离物质。

2.3.7.4 超临界流体提取法

●提取原理

在临界压力和临界温度(如图6)以上相区内的物质是介于液体和气体直接的流体,叫超临界流体(SF)。SF同时具有流体和液体的双重特性,它的扩散系数和粘度系数接近气体,而分子密度却大大超过气体,几乎与液体接近,密度的增加使得分子间的相互作用增大,对其他化合物的溶解能力增强,故而超临界流体的溶解性能类似于液体。超临界流体与气体、液体的性质对照如下(表1)^[68]。

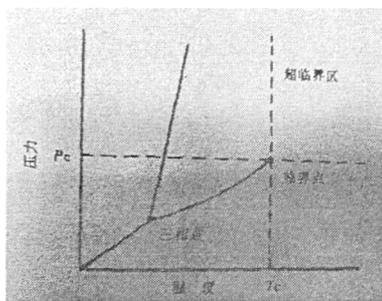


图6 临界压力和临界温度

Fig.6 Critical press and temperature

表 1 气体、超临界流体、液体性质对比

Table 1 charator Of supercritical fluid and liquid

状态	密度 (g/ml)	粘度 (Pa. s)	扩散系数 (cm ² /s)
气体	$(0.6\sim 2) \times 10^3$	0.05~0.35	0.01~1.0
超临界流体	0.2~0.9	0.20~0.99	$(0.5\sim 3.3) \times 10^{-4}$
液体	0.8~1.0	3.00~24.0	$(0.5\sim 2.0) \times 10^{-6}$

在形成超临界流体条件下,改变压力和温度,都可以改变流体的粘度和密度的变化,即可改变流体的溶解特性。也就是说,在一定的超临界流温度条件下,改变压力就可改变超临界流体的极性。因此,先对气体施加一定的温度和压力使之成为超临界流体,然后对花粉进行提取,提取后得到的溶有有效成分的流体通过改变压力或同时改变温度,使之进入临界曲线以下相区,此时超临界流体又成为气体,对物质的溶解能力大大下降,被提取成分即可析出。此时的提取物极易与气体分离。另外,利用程序升压便可将不同极性的成分进行分布提取和分离,提取液在超临界曲线以上时,各组分在流体中可以任何比例互相混合,但经过减压使其进入超临界曲线以下相区时,各组分就会分别析出。

●超临界流体提取法的提取工艺

二氧化碳在高于临界温度和临界压力的条件下,成为超临界流体,溶出原料中的化学成分,将溶有化学成分的超临界流体与原料残渣分开后,将压力和温度恢复到常温和常压时,溶解在二氧化碳流体中的化学成分立刻与气态二氧化碳分开,达到提取化学成分的目的。超临界流体用于化学成分提取时,一般对亲脂性强的成分提取效果较好,可用于生物碱、香豆素、芳香有机酸、酚、内酯类化合物和挥发油的提取^[74]。

2.3.8 蜂花粉有效成分含量测定方法综述

目前,对于植物有效成分的测定有很多方法,如高效液相色谱法、气相色谱法、比色法、薄层色谱法、紫外可见分光光度法等。由于紫外分光光度计是目前用来进行成分分析的较普通的一种仪器,具有灵敏度高、操作简便、快速等特点,因此在这里主要介绍一下紫外可见分光光度计的定量方法。

根据被测溶液的吸收光谱曲线,选择具有最大吸收时的波长为宜,称为“最大吸收原则”。因为在最大吸收波长处,吸光系数最大,灵敏度最高。当被测溶

液有几个吸收峰时, 可选不易有其他物质干扰的, 较高的吸收峰。主要有以下几种: 标准曲线、吸收系数法和对照法^[75]。

2.3.8.1 标准曲线法

配制一系列不同浓度的标准曲线, 在相同条件下分别测量其吸光度。以标准溶液的浓度 (C) 为横坐标, 相应的吸光度 (A) 为纵坐标, 绘制 A-C 曲线, 即为标准曲线。在相同条件下测定样品溶液的吸光度, 即可从标准曲线上查出样品溶液中被测组分的浓度。标准曲线也可将一系列标准溶液的浓度与相应的吸光度, 进行线性回归方程。然后将样品溶液的吸光度代入回归方程, 计算样品中被测组分的浓度。

2.3.8.2 吸收系数法

根据 Beer 定律 $A=abc$ (其中 a ——吸光系数; b ——液层厚度; c ——有色溶液的浓度), 若 b 和吸光系数 ϵ 或 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 可知, 可根据测得的 A 求出被测物质的浓度。

2.4 黄酮类化合物的开发现状

2.4.1 黄酮类化合物的通性^[71,72,73,74]

黄酮类化合物 (Flavonoid) 又称黄酮体、黄碱素, 是在植物界分布最广泛的一类成分, 早期是指具有乙-苯基吡喃酮机构的一类黄色素, 现指具有色酮环与苯环为基本结构 (即 $C_6-C_3-C_6$) 的一类化合物的总称, 通常可以分为黄酮 (醇)、二氢黄酮 (醇)、异黄酮 (醇)、查儿酮、二氢查儿酮和双苯吡酮及其衍生物。黄酮类化合物多为结晶固体, 少数为无定形粉末。苷元基本无旋光性, 苷类则由于引入了糖分子而具有旋光性, 且多为左旋。大部分黄酮及其苷类均有颜色。一般苷元难溶或不溶于水, 易溶于有机溶剂及稀碱溶液中, 苷类则易溶于水、甲醇、乙醇等强极性溶剂中, 糖链越长, 水溶性也大。黄酮类化合物与盐酸镁粉等发生还原反应, 产生颜色变化, 也可与金属盐类发生络合反应产生显色反应。

2.4.2 黄酮类化合物的活性研究

黄酮类对植物的生长、发育、开花、结果以及抵御异物的侵入等起着重要的作用, 具体有以下几种: ①免受紫外线、昆虫、病菌和细菌的伤害; ②吸引花粉传播者; ③抗氧化; ④植物激素调节剂; ⑤刺激根瘤产生; ⑥酶抑制剂。

一些黄酮类化合物具有较强的生理活性^[42,43,44]。如芦丁及其衍生乙基芦丁

(*Hydroxy-ethylrutin*)、二氢槲皮素 (*Taxiflin*) 以及 *Hesperidin-methylchalcone*(HMC)、双聚原矢车菊苷元、Ginkgetin 有抗炎作用；芦丁、橙皮苷、*d*-儿茶素 (*d-catechin*)、香叶木苷 (*Diosmin*) 等有维生素 P 样作用，可以用作防治高血压及动脉硬化的辅助治疗剂；芦丁、槲皮素、葛根素等具有明显的扩冠作用；木樨草 (*Luteolin*) Biochanin A、Formonetin、Pratensein 有降血脂及胆固醇的作用；水飞蓟素 (*Silybin*)、异水飞蓟 (*Silydianin*) 及次水飞蓟 (*Silychristin*)、(+)-儿茶素、4'-*dihydroxy-3, 7, 3-trimeth-oxyflavone* 等具有很强的护肝作用；染料木素 (*Genistin*)、金雀异黄素 (5, 7-二羟基-4, -甲氧基异黄酮)、大豆素 (*Daidzein*) 等异黄酮类均有雌激素样作用；大豆素和染料木素具有预防和治疗骨质疏松的作用；木樨草素、黄芩苷等具有一定程度的抗菌作用；槲皮素、桑色素、二氢槲皮素及山奈酚 (*Kaemferin*) 等有抗病毒的作用。大豆素和染料木素等具有预防和治疗癌变的作用^[41]，能抑制酪氨酸蛋白激酶。

2.4.3 黄酮提取方法

总黄酮的提取方法很多，主要有树脂法^[80,81,82]、聚酰胺法^[83]、乙酸铅法^[84]、碱提酸沉法、离子交换法^[85]、超临界流体萃取法^[86]、高速逆流层析法^[87]等。

2.4.4 黄酮含量测定原理

黄酮的含量测定有 HPLC^[88]、薄层扫描法^[89]、示波滴定法^[90]、分光光度法^[91]等。

HPLC 法多采用稀酸将黄酮苷水解成简单的小分子的苷元，再以主要的苷元含量和乘以转换因子，得到总黄酮含量。如银杏总黄酮的含量测定即是用酸水解成槲皮素、山奈酚、鼠李素三个主要的苷元。也有的不进行水解，直接用芦丁为基准测定银杏总黄酮的含量^[92]。

薄层扫描的样品处理方法与 HPLC 法基本相同，仅在于测定方法与 HPLC 的而已。

黄酮类化合物多半具有下列结构，常可与铝盐、铅盐、镁盐等试剂反应，生成有色络合物。其中与铝盐生成的络合物多为黄色，可定性及定量分析。

2.1 试验配方与设计：以下为试验过程中设置的配方，共6大块

表8：容重用来表示基质的松紧程度，疏松或有团粒结构的基质容重小，紧实板结的土壤容重大。测定结果表明，红泥土的容重最大，为 $1.328\text{g}/\text{cm}^3$ ；煤渣的次之，而膨胀珍珠岩的容重最小，仅为 $0.124\text{g}/\text{cm}^3$ 。基质的总孔隙度只能反映一种基质中水分和空气能够容纳的空间的总和，它不能反映基质中水分和空气各自能够容纳的空间。测定结果表明，膨胀珍珠岩、炭化谷壳和废菌棒的总孔隙度较大，分别为92.13%、83.14%和80.04%；煤渣和红泥土总孔隙度较小，分别为55.15%和52.71%。从表8可知，炭化类的基质都偏碱，pH值均在9以上，泥炭、饼肥和红泥土的pH分别为5.28、5.03和4.92。饼肥和堆肥的EC值非常大，分别为 $2.63\text{ms}/\text{cm}$ 和 $2.35\text{ms}/\text{cm}$ ；红泥土和膨胀珍珠岩的EC值分别为 $0.42\text{ms}/\text{cm}$ 、 $0.07\text{ms}/\text{cm}$ 。

表13：测定结果表明：J10处理、J11处理、J12处理、J24处理的容重较大，在 $0.815\text{g}/\text{cm}^3$ – $0.924\text{g}/\text{cm}^3$ 之间，J3处理、J5处理、J7处理、J13处理、J16处理的容重在 $0.502\text{g}/\text{cm}^3$ – $0.579\text{g}/\text{cm}^3$ 范围内，J4处理、J6处理、J8处理、J14处理、J15处理、J17处理、J19处理、J21处理的容重在 $0.603\text{g}/\text{cm}^3$ – $0.652\text{g}/\text{cm}^3$ ，比较接近J2处理（对照）（容重为 $0.617\text{g}/\text{cm}^3$ ），其余各处理的容重差异不是很明显，均在 $0.708\text{g}/\text{cm}^3$ – $0.739\text{g}/\text{cm}^3$ 范围内。基质的孔隙性直接影响水分和空气的含量，是最重要的理化性质参数。综合考虑各处理的总孔隙度、持水孔隙度、通气孔隙度及基质气水比，比较接近J1处理（对照）的有J3、J4、J5、J6、J7、J8、J15、J17和J18处理。

各基质配方中pH超过8的处理有J17–J22处理，其余处理的pH值均在5.18–7.50之间；EC值超过 $0.8\text{ms}/\text{cm}$ 的处理有J7–J10处理、J13–J24处理，其余处理的EC值均在 $0.58\text{ms}/\text{cm}$ – $0.77\text{ms}/\text{cm}$ 之间。

表15：通过对烤烟种子播后37天的烟苗的调查可知（表15），J1处理（对照）、J5处理、J6处理的叶片数最多，J3处理与J1处理（对照）的叶片数并无显著差异；J4处理的茎粗最粗，达到 0.22cm ；J3处理的茎高最高，J4处理的茎高也高于J1和J2处理（对照）的，J8处理的茎高最小；J1处理（对照）的最长根长最长，J3、J4、J5和J6处理的次之；J3、J4、J5和J6处理的最大叶长和叶宽也较大。

图2：由图2可知，在整个苗期中，J7处理（废菌棒：红泥土=7：3）烟苗的地上部干物质重都较小，直到62天时其重量都未大于 $0.25\text{g}/\text{株}$ ；J3处理（炭化谷壳：红泥土=7：3）、J4处理（炭化谷壳：红泥土=6：4）、J6处理（泥炭：红泥土=6：4）在烤烟种子播后47天后，各处理烟苗地上部的干重均大于J1处理

(对照)的,而且在烤烟种子播后62天时,J3处理干重达到最大,为0.7493g/株,比J1处理(对照)的干重多0.1163g/株;J8处理(废菌棒:红泥土=6:4)、J11处理(煤渣:红泥土=7:3)、J12处理(煤渣:红泥土=6:4)的地上部干重在整个苗期都比J1处理(对照)的小。

图 3: 由图 3 可知,各处理地下部干物质积累状况与地上部干物质积累状况很相似。

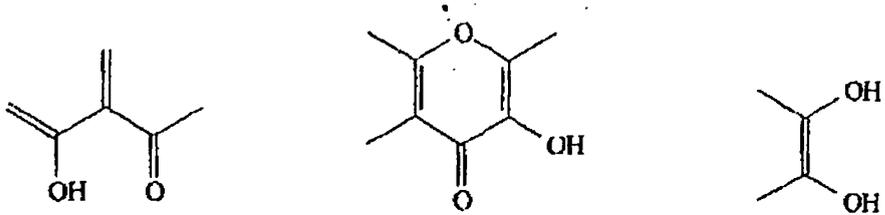


图 8 黄酮类化合物常具有的结构

Fig.8 Common structure of flavonoids

本试验采用芦丁作为标准品，三氯化铝乙醇溶液为显色剂，采用分光光度法测定总黄酮的含量。

2.5 课题来源及选题意义

2.5.1 课题来源：

浙江大学蜂学研究室课题。

2.5.2 本项目研究意义

蜂花粉具有低脂肪、高蛋白的特点，含有多种维生素、酶、微量元素、生物活性物质等。人们称蜂花粉为营养素的浓缩体，完全的营养源。花粉是蜜蜂分泌王浆、蜂蜡和蜜蜂繁衍后代不可缺少的。是一种无毒副作用的天然滋补品，营养学研究发现，蜂花粉能均衡人体，调节内分泌，清除人体有害的物质，增强机体免疫功能。蜂花粉中是何种物质对机体产生调节作用，目前还没有最终结论。同样蜂花粉能防治其它疾病如血管疾病也只是知道蜂花粉能起到预防的作用，不清楚防治的原因。

随着人民生活水平的提高，老龄化人口的增加，延年益寿更是大多数人的愿望。蜂花粉是传统的保健食品，经常服用蜂花粉不仅对老年病有良好的预防和治疗作用，而且能改变某些衰老现象，现在我们国家也已经进入了第三代保健产品的发展阶段。蜂花粉保健食品的开发也要更深入，也就是不仅要经过动物实验证明某些保健和疗效的功能，还需要确切知道该功能的功能因子（或有效成份）的结构及含量。

现代医学认为，现在危害人寿命的主要疾病是动脉粥样硬化和肿瘤，而高血脂症是动脉粥样硬化的重要诱因。目前，大多学者认为降低血脂是防治冠心病等心血管病的有效措施，并强调要早期预防。现在虽然有些降血脂的药物，但均有相应的副作用，不宜做长期的预防药物来用。近年来，许多学者认为膳

食可以影响血清胆固醇的水平,蜂花粉可以降低血清胆固醇。蜂花粉有人体代谢所需的各种营养成分,其中许多成分都参与脂质代谢和抗氧化过程。因此,我们探寻蜂花粉防治高血脂效果及与高血脂有关的成分,以及他们有无相关协同作用,以便经常食用,达到预防高血脂过高的目的。

通过本实验找出提取蜂花粉的最优实验方案,并测定定花粉提取物黄酮含量,初步评定蜂花粉提取物的性能,为蜂花粉的进一步研究开发和工业生产提供有意义的参考价值。

2.6 蜂花粉提取及其黄酮类物质国内外的研究现状与存在的问题

在人们回归自然,追求绿色健康的生活观念的指导下,具有生物活性的大然产物逐渐受到人们的青睐与厚爱。运用现代化的科学技术手段对天然活性成分进行分离、纯化、结构的鉴定、结构与功能关系的研究,是天然产物在新世纪研究发展的趋势,而具有生物活性的黄酮研究则是其中的一个重要的组成部分。现在方兴未艾的天然植物黄酮的研究与开发促进了蜂花粉的综合开发利用。天然植物黄酮产业正经历着由局部走向全部,其应用也从辅助型的食品添加剂向作为防治心脑血管疾病的新药物的方向转变。与银杏黄酮相比,花粉黄酮的开发利用显然更具优势,因为银杏叶黄酮的开发利用与其创造的经济效益均已接近饱和,这为花粉黄酮的开发和应用提供了一个很好的契机。

进行蜂花粉黄酮提取研究的三大理由:①与已经产业化的银杏黄酮、大豆异黄酮相比,油菜蜂花粉中的黄酮含量更高,②我国蜂花粉年产量约 3000t,③蜂花粉是可再生资源,采集蜂花粉不会对生态环境造成破坏。因此对花粉中的黄酮类物质进行提取分离和应用研究将具有较高的经济价值。

蜂花粉黄酮提取物的产业应用价值体现在以下几个方面:首先,花粉黄酮是一种优良的保健食品功能因子,其作为医药中间体极具市场潜力;此外,花粉黄酮还可作为天然食品抗氧化剂、饲料添加剂、生物杀虫剂等,并可广泛应用于化妆品,蜂花粉黄酮的开发和利用具有极为重要的经济和社会意义。

蜂花粉中的黄酮类物质是植物生长过程中形成的一类次生代谢产物,是花粉中重要的生理活性物质,包括十几种糖苷及配糖体,具有良好的保健、药用功效,但是蜂花粉黄酮的研究还处于相当滞后的状态,对于花粉黄酮的检测有为数不多的报道,但蜂花粉总黄酮的检测方法并无统一标准。此外,对于蜂花粉黄酮的提

取、精制工艺的研究更是少之又少,在国内外基本上为空白。聚酰胺柱层析对各种黄酮类化合物有较好的分离效果,可用于分离各种类型的黄酮类化合物,广泛应用于石油化工、医药卫生、环境保护等领域,资料显示,聚酰胺柱层析对各种黄酮类化合物有较好的分离效果,可用于分离各种类型的黄酮类化合物,包括苷及苷元、查耳酮与二氢黄酮等。邹淑仙^[93]采用聚酰胺柱色谱从脓疮草提取物中分离出六种黄酮类化合物。李勇军等^[94]采用硅胶和聚酰胺柱层析进行分离,从头花寥中分离出了槲皮素、槲皮苷、槲皮素-3-鼠李糖苷。王怡红^[95]采用改性聚酰胺层析柱分离了银杏黄酮,但未见将聚酰胺柱层析法用于分离纯化蜂花粉黄酮的报道。

第三章 蜂花粉黄酮的提取及含量测定

3.1 引言

3.1.1 茶花粉概述

花粉拥有生命所需要的各种营养成分,如蛋白质、氨基酸、核酸、维生素、黄酮类化合物以及矿物质元素等。茶花粉和其他植物天然花粉一样,可以补充人体营养,增强人体新陈代谢,调节内分泌和提高免疫功能等^[96]。

相对于玉米、油菜等作物而言,理论界对于茶树花粉开发利用的研究报道较少。通过大量的研究知道,天然蜂花粉有丰富的营养物质,它含有 22 种氨基酸,其中人体必需氨基酸 8 种氨基酸含量高于蜂王浆的 5~8 倍,10 种维生素和 20 多种微量元素,100 多种活性酶及具有抗癌作用的花粉多糖、胡萝卜素^[97]。它们协同作用可以抑制高胆固醇血症、抑制动脉粥样硬化、恶性肿瘤术后化疗患者的体质恢复、治疗前列腺增生、治脓疮疮、提高机体缺氧耐力、抗疲劳^[98~104]。

茶花粉中特有的茶多糖、茶多酚、氨基酸、维生素、超氧化歧化酶和过氧化氢酶等有益成分和活性物质对人体具有解毒、抑菌、降糖、延缓衰老、翻盖抗癌和增强免疫力等功效^[105]。

茶花粉是蜜蜂采集回来巢的茶叶花粉的雄性细胞,并掺入少量的蜜蜂分泌物和花蜜。其特点是口味香甜,是所以花粉中味道最好的品种之一,同时也是营养最好的品种之一,茶花粉氨基酸含量高达 23.57%,其氨基酸含量是常用花粉之首,烟酸含量高达 11.7 mg/100 g^[106]。

近年来对茶花粉的研究加工利用有所提高,花粉产品较多,但有关资料表明,

我国茶花粉产品剂型主要还是片剂居多,茶树花粉产品开发比较活跃的地方主要局限在浙江省、海南省、海南省、台湾省等^[107,108,109,110]。我国在茶树花粉深加工方面还有一定的差距。

综述各种因素可以看出,茶树花粉具有很高的开发价值,我国在茶花粉深加工工艺、产量、产品剂型方面均有巨大的潜在市场。

3.1.2 油菜蜂花粉

由工蜂从油菜花花蕊中采集的花粉粒—油菜蜂花粉,含有丰富的糖类、蛋白质、氨基酸、维生素、黄酮类、酯类、有机酸以及核酸等各种营养物质^[111]。油菜蜂花粉中的黄酮类化合物是其营养成分之一,文献报道油菜蜂花粉中的总黄酮含量达 3.56 g/100 g^[112],据笔者测定,青海产油菜蜂花粉中总黄酮的含量达 3.70g/100 g^[113]。现代研究表明,黄酮类物质除具有抗动脉硬化、降低胆固醇等多种生理活性作用外,还是一类性能优良天然抗氧化剂^[114,115]。

3.2 材料与方法

3.2.1 材料与试剂

破壁茶花粉、破壁油菜花粉,乙醇(食品级)、蒸馏水芦丁(分析纯)、氯化铝(分析纯)、醋酸钾(分析纯)

3.2.2 主要仪器与设备

KQ-500 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;

DK-S24 型电热恒温水浴锅,上海精宏试验设备有限公司;

RT-02 二两装高速中药粉碎机,永康市屹立工具厂;

SENCO R 系列旋转蒸发皿,上海申生科技有限公司;

导津 UV-2550 型光谱仪,日本岛津公司;

BS124S 型电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司

Chist Beta 1-16 冷冻干燥机,德国 Christ 公

提取装置,实验室自制;

电热恒温干燥箱,上海申生科技有限公司。

3.3 实验方法与结果

3.3.1 蜂花粉黄酮类物质的提取

蜂花粉总黄酮提取方法较多，本实验采用有机溶剂乙醇和丙酮为溶剂的浸渍提取的方法进行提取试验，工艺流程如下所示。

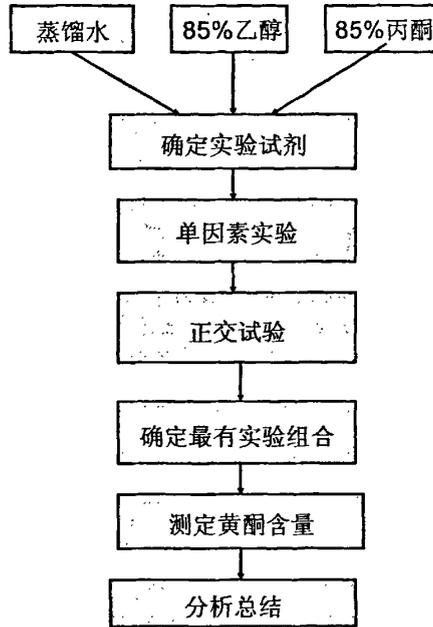
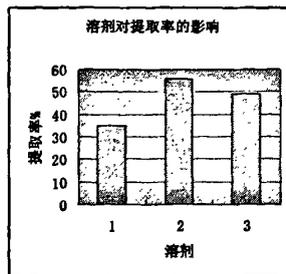


图 9 工艺流程图

Fig.9 process charts

3.3.1.1 提取试剂的选择

分别用水、85%乙醇，丙酮在 60℃、料液比 1:4 条件下，提取 16h，对茶花粉中有效成分进行提取，结果如图 10。



(注：1：水，2：乙醇，3：丙酮)

图 10 溶剂对提取率的影响

Fig.10 Effects of differet reagents on extraction rate

由图 3-1 可知,用水作溶剂提取时提取率低,而且容易在浸渍时出现腐臭现象,乙醇作溶剂提取率最高,丙酮作溶剂提取率与乙醇提取率相近,本实验研究采用乙醇和丙酮为蜂花粉有效成分的提取溶剂。

3.3.1.2 浓度对提取效果的影响

以茶花粉为实验材料,在 60℃ 温度、1:4 的料液比、100 转/min 的实验条件下,提取 16 h。试验结果作如下图 11 所示。

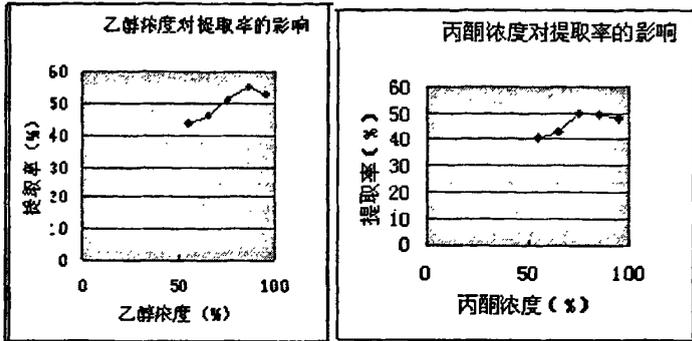


图 11 不同浓度对提取率的影响

Fig.11 Effects of differet concentrations on extraction rate

由图 11 可以看出,花粉醇溶出物提取率随醇浓度的增加而增加,在乙醇浓度超过 85%、丙酮浓度超过 75%时提取率反而开始有所下降。

3.3.1.3 料液比对提取率的影响

以茶花粉为实验材料,在 60℃ 温度、醇浓度为 80% 实验条件下,提取 16 h,并进行作图,所作图形如下所示。

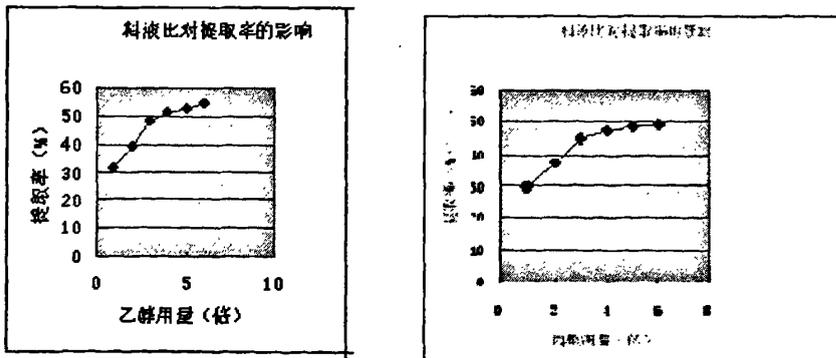


图 12 料液比对提取率的影响

Fig.12 Effects of ratio of material to solvent on extraction rate

由图 12 可知,在所作试验范围总体趋势上随料液比的增加而增加,在料液

比 1 至 3 范围内乙醇对蜂花粉的提取率呈直线增加幅度明显,而在 4 至 6 倍范围内提取率增幅不大;丙酮对蜂花粉的提取效果与乙醇提取效果趋势相似,而总体提取效果稍低乙醇作溶剂的提取效果。

3.3.1.4 提取时间对提取率效果的影响

以茶花粉为实验材料,在 60℃温度、4:1 的料液比、醇浓度为 80% 的实验条件下,提取。试验结果做如下所示图。

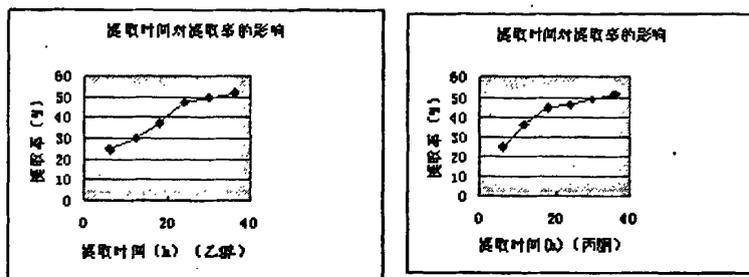


图 13 提取时间对提取率效果的影响

Fig.13 Effects of extracting time on extraction rate

由图 13 可以看出,6~36 h 小时的提取试验范围内,提取时间延长,两种溶剂对蜂花粉的提取率也随着增加,在 20 h 之前的提取时间内,乙醇对蜂花粉的提取率呈现较为显著的线形增加,但当时间超过 20 h 后,时间延长提取率增加显著;以丙酮为溶剂提取时,在 24 h 之前的提取条件下,提取率呈现显著的增加趋势,24 h 后提取率增加不明显。

3.3.1.5 提取温度对提取效果的影响

以茶花粉为实验材料,在以醇浓度为 80%、料液比 1:4 的实验条件下,提取 16 h,试验所作图形如下。

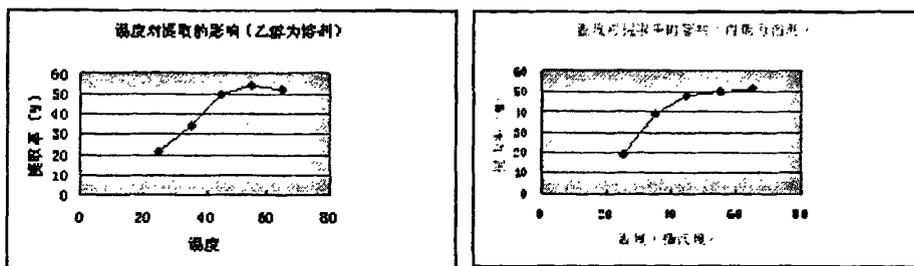


图 14 温度对花粉提取率的影响

Fig.14 Effects of extracting temperature on extraction rate

由图 14 观察可知,提取温度在低于 55℃ 时,乙醇对蜂花粉的提取了随温度

的升高明显增加,但高于 55℃时,花粉的提取率反而随着温度的升高而有所降低;提取温度在 55℃之前,丙酮对蜂花粉是提取率呈显著的增加趋势,温度继续增加,提取率变化不明显。

3.3.1.6 搅拌速度对提取效果的影响

以茶花粉为实验材料,在 60℃温度、醇浓度为 80%、料液比 1:4 的实验条件下,提取 16 h,试验所作图形如下。

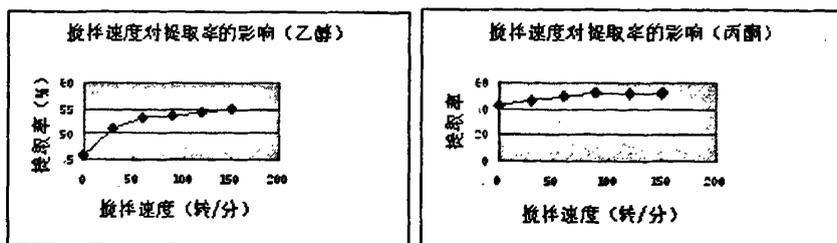


图 15 搅拌速度对提取效果的影响

Fig.15 Effects of stir speed on extraction rate

由图 15 看出,提取率随搅拌速度增加而增加,乙醇对蜂花粉提取时,在转速 100 转/min 之前的情况下,提取率呈较显著的增加趋势,速超过 100 转/min 时增加并不明显,速度超过 100 转/min 时,提取率有一个突增的现象。此外,在试验中还发现,较大速度提取时提取物液有浑浊的现象;而丙酮对蜂花粉提取时,在相同的试验条件下,总体提取率呈现较为缓和的增加趋势。

3.3.1.7 提取次数对提取率的影响

准确称取 50g 蜂花粉,用乙醇浸渍提取两次,第一次加 65%的乙醇 200 g, 35℃恒温振荡 2h,静置 0.5 h,过滤,滤液减压浓缩,将浓缩物在 40℃的恒温干燥箱中烘干,得提取物粗品,称重,计算得率;第二次重复第一次的操作,并计算出提取率。结果如表 2 所示。

表 2 提取次数对蜂花粉提取率的影响

Table 2 Effects of extracting times on extraction rate

醇提情况 (次数)	提取物质量 (g)	得率 (%)
一次醇提	18.35	36.70
二次醇提	6.99	13.98
三次醇提	4.05	8.10

从表 2 中可以看出,增加醇提次数,可以增加提取物质量,但得率明显降低,

而且增加醇提次数，需要使用大量的有机溶剂（乙醇），成本太高，因此，除非特别要求，一般情况下不进行第三次醇提。

3.3.2 蜂花粉提取工艺的试验研究

3.3.2.1 试验方法

准确称取破壁茶蜂花粉 50g 置于 1000ml 特质的玻璃瓶内，首先加 200g 左右的乙醇浸泡一段时间后，振荡处理一段时间，再静置后过滤，滤渣再加约 200g 左右的乙醇在同样的条件下振荡处理，合并两次滤液，在旋转蒸发器上减压浓缩，直至浸膏状，将浸膏在 50℃ 的恒温干燥箱内烘，冷却至恒重称量，计算得率。

3.3.2.2 正交试验确定蜂花粉提取工艺的最佳参数

本实验分别从蜂花粉加醇浸泡的时间、温度、溶剂用量、溶剂浓度、搅拌速度等五个方面对使用传统的浸渍法提取蜂花粉有效成分进行系统的研究。

在进行试验的单因素处理研究的基础上，分别确定了乙醇浓度、乙醇用量、处理时间、处理温度和处理搅拌速度的水平如表 3 所示。

表 3 试验因素水平

Table 3 levels and factors of test

因素 水平	乙醇浓度 (%)	乙醇用量 (倍)	处理时间 (h)	处理温度 (℃)	搅拌速度 (rpm)
1	95	3	8	25	0
2	85	4	16	45	50
3	75	5	24	65	100
4	65	6	32	85	150

选择 $L_9(3^4)$ 的正交试验表。

表 4 试验方案和正交结果表
Table 4 pilot programme and results Orthogonal test

处理号	乙醇浓度 (%)	乙醇用量 (倍)	处理时间 (h)	处理温度 (°C)	搅拌速度 (rpm)	提取率%
1	1	1	1	1	1	18.55
2	1	2	2	2	2	23.22
3	1	3	3	3	3	29.73
4	1	4	4	4	4	41.75
5	2	1	2	3	4	47.52
6	2	2	1	4	3	28.75
7	2	3	4	1	2	36.67
8	2	4	3	2	1	33.95
9	3	1	3	4	2	48.33
10	3	2	4	3	1	46.69
11	3	3	1	2	4	50.53
12	3	4	2	1	3	48.63
13	4	1	4	2	3	46.64
14	4	2	3	1	4	54.39
15	4	3	2	4	1	51.07
16	4	4	1	3	2	50.62
S1	113.26	161.04	148.45	158.24	150.26	
S2	146.89	153.06	170.45	154.35	158.85	
S3	194.18	168.00	166.40	174.56	153.75	
S4	202.72	174.95	171.75	169.90	194.19	
M1	28.315	40.260	37.113	39.560	37.565	
M2	36.723	38.265	42.613	38.588	39.713	
M3	48.545	42.00	41.600	43.640	38.438	
M4	50.680	43.728	42.938	42.475	48.540	
S	1319.274	66.018	87.238	68.087	307.883	
极差	22.365	5.473	5.825	5.053	10.983	
较优水平	A4	B4	C4	D3	E4	
因素主次	A	E	C	B	D	

正交试验结果分析见表 4, 由该表可以看出:

首先,各因素对蜂花粉提取率影响的大小次序为:乙醇浓度、搅拌速度、提取时间、乙醇用量、提取温度。

其次,综合试验来考虑,可得出提取蜂花粉的最佳工艺参数为: $A_4B_4C_4D_3E_4$,即采用 6 倍蜂花粉量的 65% 的乙醇溶液浸泡破壁的蜂花粉,在 65℃ 的恒温下,以 150 转/分钟的速度处理 32 小时。

试验结果的方差分析表 5。

表 5 方差分析表

Table 5 Variance analysis table

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A	1319.529	3	3.568	3.290	*
B	66.074	3	0.179	3.290	
C	87.207	3	0.236	3.290	
D	68.137	3	0.184	3.290	
E	307.910	3	0.833	3.290	
误差	1848.86	15			

从表 5 可以看出:

因素 A、B、C、D、E 对蜂花粉提取的影响顺序为乙醇浓度、搅拌速度、提取时间、乙醇用量、提取温度,这与前面的直接观察分析的结论基本一致,其中对蜂花粉提取来讲,在显著水平 $\alpha=0.05$ 的条件下,因素 A (乙醇浓度) 较显著。

从前面的分析可知,本实验所选五个因素的最佳组合是 $A_4B_4C_4D_3E_4$,因此在此最优工艺参数条件下进行试验,即精密称取茶花粉 50g 置于 1000ml 特质的玻璃瓶内,首先加入 65% 的乙醇溶液 300g 浸泡,在 65℃ 恒温下,以 150 转/分钟的速度处理 32 小时,静置后过滤,然后将滤渣在同样条件下进行处理,合并两次滤液,在旋转蒸发器上减压浓缩,直至浸膏状,干燥,称重,得花粉粗提物。试验结果见表 6。(其中:得率=提取物粗品质量/蜂花粉质量)

表 6 最优工艺条件下提取物粗品得率

Table 6 extraction rate of the crude extract Under optimum conditions

提取物粗品质量 (g)	得率 (%)
27.76	55.52

3.3.3 总黄酮含量的测定—芦丁标准曲线法^[110]

3.3.3.1 芦丁标准工作曲线的绘制

精确称取干燥至恒重的芦丁标准品 20 mg, 用 70% 的乙醇配成 0.04 mg/mL 的标准溶液。精密吸取标准溶液 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加入 70% 乙醇适量, 使成 5.0 mL。各加 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 2 mL, 1 mol/L 醋酸钾溶液 3 mL, 加入 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 放置 30 min, 同时作空白。芦丁的吸收光谱见图 16, 按分光光度法, 于 420 nm 处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 见图 17。

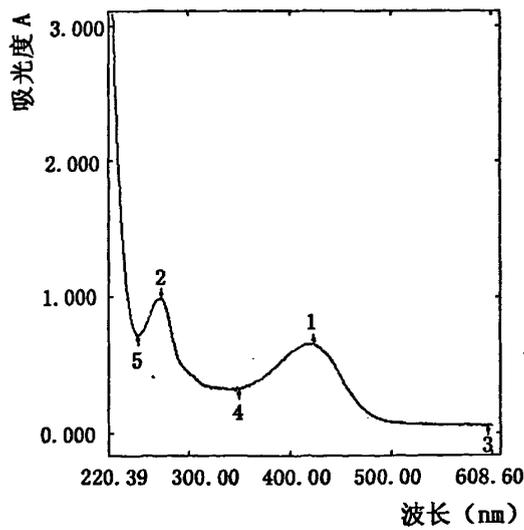


图16 芦丁吸收光谱

Fig. 16 The absorption spectrum of rutin

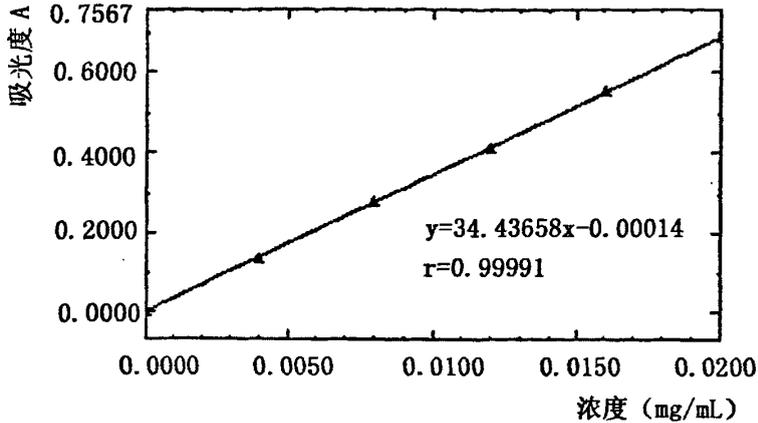


图17 芦丁标准曲线

Fig. 17 Standard curve of rutin

从图 17 可以看出芦丁标准曲线是一条直线，直线方程为： $y=34.43658x-0.00014$ ，且理论计算的相关系数是 $r=0.99991$ ，与朗伯-比尔（Lambert-Beer）定量符合。

3.3.3.2 蜂花粉样品测定

精确称取蜂花粉提取物 4 mg，用 70%乙醇配制成 0.4 mg/mL 的蜂花粉溶液，取 2 mL 于 10 mL 容量瓶中，加 70%乙醇至 5 mL，空白对照直接加乙醇 5 mL 于 10 mL 容量瓶中，其余操作同芦丁标准曲线的绘制方法。直接读取浓度并根据下列公式求算出蜂花粉提取物总黄酮含量。

$$C=12.5\times C_i\times 100\%$$

式中：C—蜂花粉提取物总黄酮含量，%

C_i —标准曲线上读取的浓度，mg/mL

3.3.4 不同溶剂对蜂花粉有效成分提取率和黄酮含量结果比较

3.3.4.1 试验方法

分别取茶花粉和油菜蜂花粉，按前面所述，在最优工艺参数条件下进行试验。

3.3.4.2 试验结果及分析

分别取不同的溶剂（乙醇和丙酮），按照上述介绍的试验方法和试验条件进行试验，结果见表 3-6。

表 7 不同溶剂对茶花粉提取的结果

Table 7 Results of extraction rate of tea pollen in differet reagents

溶剂	提取物质量 (g)	提取得率 (%)	黄酮含量 (%)
乙醇	27.76	55.52	30.28
丙酮	26.04	52.08	30.12

从表 7 可以看出,在相同试验条件下,两种溶剂(乙醇和丙酮)对同一种蜂花粉(茶花粉)的提取结果有所不同,但得率差别不是很大;其提取物中总黄酮含量相差相对较大,乙醇提取物黄酮含量(30.28%)较高。

3.3.4.4 同种溶剂对不同蜂花粉提取率结果比较

分别取茶花粉和油菜蜂花粉,取乙醇为溶剂,按前面所述,在最佳工艺参数条件下进行试验,试验结果见下表。

表 8 同种溶剂对不同蜂花粉提取率结果

Table 8 Results of extraction rate of differet pollens in the same reagent

花粉	提取得率 (%)	黄酮含量 (%)
茶花粉	55.52	30.28
油菜花粉	48.68	33.62

从表 8 可以看出,在相同试验条件下,乙醇对两种蜂花粉(茶花粉和油菜蜂花粉)的提取结果明显不同,茶花粉乙醇提取率明显高于油菜花粉提取率,而其提取物中总黄酮含量却较低。

第四章 结论与讨论

4.1 结论

1、对蜂花粉提取时,分别从溶剂的选择,溶剂浓度、溶剂用量,提取时间、提取温度、搅拌速度等六个方面对提取的影响来考察,得出:采用乙醇提取蜂花粉时,溶出物提取率最高,丙酮提取蜂花粉提取率次之,在综合考虑到丙酮毒性及价格时,本实验采用乙醇来进行提取试验研究。在进行单因素试验时得出如下结论:乙醇浓度为 80%时、料液比 1:6 时、在 70℃的恒温下,以 150 转/分钟转速、提取时间为 32h 时,蜂花粉的提取率分别达到最高。

2、采用五因素四水平的提取方案,通过正交试验的方法确定了蜂花粉有效成分的最佳工艺参数:65%的乙醇溶液、6 倍蜂花粉量乙醇、65℃的温度、150r/min

的搅拌速度提取 32 h。

3、在最佳工艺条件下对茶花粉和油菜花粉黄酮提取，其中黄酮含量油菜花粉(33.62%)比茶花粉(30.28%)高。

4.2 讨论

长时间对蜂花粉提取时，提取率会下降，可能是由于乙醇挥发，从而影响提取效果，所以提取时间控制在 24h 左右为宜。

另外，过在试验中还发现，较大速度提取时提取物液有浑浊的现象，可能是由于速度过大会使花粉微小颗粒悬浮于提取液中，从而影响提取率的考察。

对蜂花粉有效成分的提取方面的相关研究，还应在以下几方面进行深入的研究和探讨。

- 1、进一步研究蜂花粉破壁与否，破壁程度对花粉有效成分提取得率的影响。
- 2、进一步讨论考察不同提取方法对蜂花粉提取得率的影响。
- 3、将提取物应用于动物实验之中，以了解确定提取物的药理药效。
- 4、进一步考察研究不同产地蜂花粉提取物中有效成分的组成情况。
- 5、进一步考察提取物组分的结构与功能特点。

参考文献

- [1] 张雨, 李艳芳, 周才琼. 花粉主要营养成分与保健功能蜂产品加工与利用[J]. 中国蜂业 2006, 57(7):26~27.
- [2] 贾亚光. 纵观中国保健产业现在和未来[N]. 中国食品报, 2003, 12-13.
- [3] 李兴安, 蒋滢, 王尉平. 花粉抗脑衰老大鼠基因组 DNA. RAPD 分子标记的实验研究[J]. 中国养蜂, 2003, (2):8-9.
- [4] 李嘉蓉. 天然药物化学实验[M]. 中国医药科技出版社, 1998, 4-7.
- [5] 张继杰. 天然药物化学实验[M]. 人民卫生出版社, 1997, 7-9.
- [6] 张代佳, 刘传斌, 修志龙等. 微波技术在植物胞内有效成分提取中的应用[M]. 中草药, 2000, 31(9): 附 5.
- [7] patrick M. Membrane Separation Process. Amsterdam;Elsevier Scientific, Publishing Compang, 1976, 107.
- [8] 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.
- [9] PRATT D E .Water soluble antioxidant activity soybeans[J]. Food

- Science, 1972, 37:322-323.
- [10] PRFAT D E. Lipid antioxidants in plant tissue [J]. Food Science, 1965, 30:737-742.
- [11] RAFAT H S. Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids[J]. Phytochemistry, 1987, 26: 2489-2491.
- [12] 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.
- [13] 宋心仿, 邵有全. 蜜蜂产品的应用与检测加工技术[M], 中国农业出版社, 2000, 39
- [14] 郭芳彬. 蜂花粉防治前列腺增生的效果和机理研究[J]蜜蜂杂志. 2004, (10): 5-7
- [15] 刘建涛, 赵利等. 蜂花粉生物活性物质的研究进展[J]. 食品科学. 2006, 12: 909-912
- [16] 钱伯初. 蜂花粉药理研究进展[J], 中国药理学通报, 1986, 2 (2): 1-5
- [17] 赵玉芝等. 蜂花粉的药理作用研究进展[J]. 长春中医学院学报. 1995, 11 (50): 61-62
- [18] 胡福良, 李英华. 蜂花粉在畜牧业中的利用研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医. 2001, 3 (158): 31-33
- [19] 刘起华, 王伟明, 李靖. 蜂花粉开发利用研究概况[J]. 中医药信息, 1999, 1: 16-18
- [20] 黄华艺. 黄酮类化合物抗肿瘤作用进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2002, 21 (7): 428-433.
- [22] 海丽娜. 天然抗高血压活性成分研究进展[J]. 云南师范大学学报, 2002, 22 (4): 74-78.
- [23] 赵保路. 自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999, 250-262.
- [24] Nuutila A M, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey K M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis [J]. Food Chemistry, 2002, (76):519-525.
- [25] 陈季武, 胡斌, 赵实, 等. 天然黄酮类化合物清除 DPPH+的构效关系[J]. 发光学报, 2005, 26 (5): 664-668.
- [26] 王开发. 花粉中生长激素的研究[J]. 蜜蜂杂志, 1997, 10: 4.
- [27] Zhang x, Habib F K, Ross M, Isolation and characterization of a cyclic hydroxamic acid from a pollen extract, which inhibits cancerous cell growth in vitro, J med Chem, 1995, 38, 735.
- [28] 王开发主编, 花粉营养成分与花粉资源利用[M]. 复旦大学出版社, 1993, 59-67.
- [29] 刘起华, 王伟明, 李靖. 蜂花粉开发利用研究概况[J]. 中医药信息, 1999, 1: 16-18.

- [30] J. Serra Bonvehi, Evaluation of Polyphenolic and Flavonoid Compounds in Honeybee-Collected Pollen in Spain [J]. *Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49:1848-1853.
- [31] J. C. Dauguet, M. Bert, J. Dolley, A. Bkaert, G. Lewin, *Phytochemistry* 1993, 33:1505.
- [32] M. G. Campos, Age-Induced Diminution of Radical Scavenging Capacity in Bee Pollen and the Contribution of Constituent Flavonoids [J]. *Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51:742-745.
- [33] 任玉翠等, 十二种蜂花粉的黄酮苷及甾醇类成分的含量测定[J]. *中国医院药学杂志*, 1990, 10 (4) .
- [34] 许萍, 李洲, 离子交换色谱法纯化赤霉素 A3 的研究[J], *清华大学学报(自然科学版)*, 1995, 35 (3), 49-53.
- [35] 宋心仿, 邵有全编著. 蜜蜂产品的生产与加工利用[M], 山东科学技术出版社 1988.
- [36] 邹淑仙, 宝乐日. 天然植物脓疮草中黄酮类有效成分提取与分离的研究(一). [J]. *内蒙古大学学报: 自然版*, 2001, 32 (1): 49-53.
- [37] 李勇军, 王永林. 头花蓼黄酮类化学成分的研究. 2000, 35 (5): 300-302.
- [38] 王怡红, 张征林. 改性聚酰胺层析柱的性能及其在银杏黄酮类化合物提取中的应用[J]. *植物资源与环境*, 1999, 8 (1): 10-14.
- [39] Dudov, I A Antioxidant system of rat erythrocytes under condition of prolonged intake of honeybee flower pollen load *Ukr Biokhim Zh* 1994, 66(6):94-96.
- [40] 王开发等, 玉米荒废黄酮类物质对清除自由基的作用[J]. *中国养蜂* 2001, 52(6): 4-5, 8.
- [41] 曹炜等, 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*, 2002, 23 (9): 115-118.
- [42] Bors W, Michel C, Stetmaier K. Antioxidant effects of flavonoids [J]. *Biofactors*, 1997, 6(4): 399-402.
- [43] 贾冬英, 姚开, 吕远平, 等. 柑橘类黄酮抗氧化活性研究进展[J]. *广州食品工业*, 2002, 18(4): 66-68.
- [44] Benavente-Garcia O. Uses and properties of citrus flavonoids[J]. *Agric Food Chem*, 1997, 45(12): 4505-4516.
- [45] Benavente-Garcia O. Changes in neodiosmin levels during the development of

- a citrus aurantium leaves and fruits postulation of neodiosmin biosynthetic pathway[J]. *Agric Food Chem*, 1993, 41: 1916~1919.
- [46] 郑裕国, 王远山, 薛亚平, 等. 抗氧化剂的生产和运用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [47] 陈迪华. 天然多酚成分研究进展[J]. 国外医药植物药分册, 1997, (12): 9~15.
- [48] 刘莉华, 宛晓春, 李大祥, 等. 黄酮类化合物抗氧化活性构效关系的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(3): 265~270.
- [49] 张英, 吴小琴. 黄酮类化合物结构与清除活性氧自由基效能关系的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1998, 10(4): 26~33.
- [50] Rice E C, Miller N J, Bolwell G P. Structure-activities relationships of flavinoids and phenolic acids [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 20(7): 933~956.
- [51] 龙春, 高志强, 陈凤鸣, 等. 黄酮类化合物的结构-抗氧化活性关系研究进展[J]. 重庆文理学院学报(自然科学版), 2006, 5(2): 13~17.
- [52] 胡春, 丁霄霖. 黄酮类化合物在不同氧化体系中的抗氧化作用研究[J]. 食品与发酵工业, 1996, (3): 46~53.
- [53] 沈建福, 张英, 徐维娅, 等. 竹叶黄酮糖苷的水解及其苷元的抗氧化性能研究注—II 黄酮苷元抗油脂氧化性能的初步评价[J]. 中国粮油学报, 16(4): 14~17
- [54] 宾丽英. 黄酮甙的酶解及其抗氧化活性的研究[D]. 广东工业大学硕士学位论文, 2000.
- [55] Dudov, I A Immunomodulatory effect of honeybee flower pollen load Ukr Biokhim Zh 1994, 66(6)91~93.
- [56] 王开发等, 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, 15 (6): 368~370.
- [57] 白凤梅, 蔡同一. 类黄酮生物活性及其机理的研究进展[J]. 食品科学, 1999, 8: 11~13.
- [58] 黄池宝, 罗宗铭. 黄酮类化合物抗氧化性与其结构关系的研究[J]. 广州工业大学学报, 2000, 17 (2): 72~74.
- [59] 张靛灵. 中国油脂[J]. 199926 (6): 19~22.
- [60] Viao J A, etal. *J Agric Food Chem*, 1995, 43:2800~2802.

- [61] 郭伽, 周立东. 蜂胶的化学成分研究进展(综述)[J]. 中国养蜂, 2000, 51(3): 21~22.
- [62] 朱清相. 台湾的茶花与养蜂[J]. 蜜蜂杂志, 1994, (3): 28.
- [63] 赵静. 蜂胶中主要黄酮官能团结构及其功效分析. 中国养蜂, 2004, 55(1): 9~10.
- [64] 王开发, 王宪曾. 孢粉学概论, M. 北京大学出版社, 1983.
- [65] 王开发. 我国花粉研究新进展与产品市场分析[J]. 蜜蜂杂志. 2007, (2):11-13
- [66] Yoon Hee Chung, Chung-Min Shin, Myeung Ju Kim, et al. Immunocy-tochemical study on the distribution od P53 in the hippocampus and cerebellum of the aged rat(J) Brain Research, 2000, 885 :137~141 .
- [67] 曾志将等. 蜂花粉多糖对大鼠降血脂效果研究[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26 (3): 406-408
- [68] 王长远等. 黄酮类化合物研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19 (2): 75-78
- [69] 邹浩军, 明亮. 黄酮类化合物抗炎免疫及抗衰老药理研究进展(综述)[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2003, 2 (6): 48-51.
- [70] 李嘉蓉. 天然药物化学实验. 中国医药科技出版社, 1998, 4~7.
- [71] 张继杰. 天然药物化学实验. 人民卫生出版社, 1997, 7~9.
- [72] 张代佳, 刘传斌, 修志龙等. 微波技术在植物胞内有效成分提取中的应用. 中草药, 2000, 31 (9): 附5.
- [73] patrick M. Membrane Separation Process. Amsterdam;Elsevier Scientific, Publishing Compang, 1976, 107.
- [74] 吴彦红, 江水泉. 超临界流体萃取技术及其在农产品加工工业中的应用. 江西农业大学学报, 1997, 19 (4): 110~115.
- [75] 梁光仪. 中药化学. 人民卫生出版社, 1998, 11~15.
- [76] Kim H. K. et. al. Inhibition of rat adjuvant-induced arthritis by ginkgetin, a biflavone from ginkgobiloba leaves. An inhibitor of group II phospholipase A2 antiarthritic and analgesic activites Planta Medica, 1999, 65:465.
- [77] Banskota A. H. et. al. Hepatoprotective effect of comberturn quadrangulare and its constituents Biol. pharm, Bull., 3000, 23(4):456.
- [78] Tob H et, al. Daidzein stmulation of bone resoption in pit fromation assay. Biosci. Biotechnol Biochem, 1997, 61(2):370.

- [79] Barnes S, *et, al.* Soy isoflaonoids and cancer prevention underlying biochemical and pharmacological issue *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1996, 401:87~100.
- [80] 肖顺吕, 伍岳宗, 温明章. 银杏叶黄酮制备工艺研究 *中国医药工业杂志*, 1990, 21 (8): 340~341.
- [81] 李兆龙, 虞杏英. 用树脂法和酶法从银杏中提取黄酮类化合物是专利介绍 *中成药*, 1994, 16 (10): 52 .
- [82] 王成章, 郁青, 谭卫红. 银杏叶中黄酮苷的树脂纯化 *中国医药工业杂志*, 1998, 29 (1): 5~6.
- [83] 肖崇厚, 陆蕴如. *中药化学* 上海科技出版社, 1983 .
- [84] 中国医学科学院药物研究所 薄层层离及其在中草药分析中的应用 科学出版社, 1978
- [85] 北京医学院中草药成分化学 北京人民卫生出版社, 1987.
- [86] 高福成. *现代食品工程高新技术* 中国轻工业出版社, 1997.
- [87] 姚渭溪. 银杏中活性成分的提取工艺测定及进展 *中草药*, 1995, 26 (3): 157~159.
- [88] Hasler A, Sticher O, Meier B Identification of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high performance liquid chromatography *J Chromatogr.*, 1992, 605:41.
- [89] 李吉米, 于留英, 曾宇珠. 薄层扫描测定银杏叶中总黄酮醇苷的含量 *中国中药杂志*, 1996, 21 (2): 106~108.
- [90] 杨天鸣, 陆俭洁, 吴士筠. 示波滴定法测定银杏叶提取物中总黄酮含量 *中草药*, 1998 (增刊): 54.
- [91] 李会军, 李萍. 紫外分光光度法测定酸枣仁中总黄酮的含量 *中国药科大学学报*, 2001, 32 (1): 73~77
- [92] 吴晓明, 段斌志. 银杏叶黄酮类化合物的测定方法 *药物分析杂志*, 2001, 21 (2): 138~140
- [93] 邹淑仙, 宝乐日. 天然植物脓疮草中黄酮类有效成分提取与分离的研究 (一). [J]. *内蒙古大学学报: 自然版*, 2001, 32 (1): 50~53.
- [94] 李勇军, 王永林. 头花蓼黄酮类化学成分的研究. 2000, 35 (5): 300-302.
- [95] 王怡红, 张征林. 改性聚酰胺层析柱的性能及其在银杏黄酮类化合物提取中的应用 [J]. *植物资源与环境*, 1999, 8 (1): 10~14.
- [96] 李晋玲. 茶花氨基酸和蛋白质含量测定及研究 [J]. *茶业通报*, 2003, 25 (2): 61.
- [97] 李建萍, 张小燕. 蜂花粉的营养价直及其花粉饮料的开发 [J]. *食品研究与开*

- 发, 2003, 24(1):65~66.
- [98] 陈国珍, 肖瑞崇. 花粉 I、II 号及复方花粉片对大鼠实验性高脂血症的影响 [J]. 昆明医学院学报, 1989, 10(3): 39~43.
- [99] 陈国珍, 肖瑞崇. 复方花粉片对家兔实验性动脉粥样硬化的影响 [J]. 昆明医学院学报, 1989, 10(4): 14~16.
- [100] 刘炬, 罗火泉, 羊静华, 等. 恶性肿瘤术后化疗合用天然蜂花粉扶正的疗效观察 [J]. 蜜蜂杂志, 1996, (2): 7~8.
- [101] 刘香云, 梅丽敏, 等. 芙蓉花粉治脓疱疮疗效观察 [J]. 中国药业, 2001, 10(6): 39.
- [102] 郑延辰, 孟庆荣, 宋登海. 花粉六味丸治疗前列腺增生 30 例疗效观察 [J]. 山东中医杂志, 2003, 22(9): 532~533.
- [103] 彭洪福, 刘子明, 等. 花粉提高机体缺氧耐力以适应高原环境的研究 [J]. 中华医学杂志, 1990, 70(2): 77~81.
- [104] 翟凤国, 周福波, 付惠. 蜂花粉抗疲劳作用的实验研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2004, 25(5): 8~10
- [105] 陈蕾. 身价百亿茶树花 [J]. 中国投资, 2006, (2): 105~107
- [106] 茶树花粉的营养价值. 中国茶叶网
(<http://www.china-tea.org/html/20055193657-1.htm>).
- [107] 浙江蜂业网 (<http://www.zjbee.com/index.htm>).
- [108] 中国食品商务网 (<http://2748.hotproduct.21food.cn>).
- [109] [29] 特产屋网 (<http://www.tc55.com/list.asp?id=385>).
- [110] 毛礼米, 王开发. 我国花粉资源应用及其研究进展 [J]. 自然杂志, 1998, 20(5): 271~275.
- [111] 王开发, 耿越. 花粉中黄酮类研究 [J]. 养蜂科技, 1997, (3): 8~12.
- [112] 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, 24(2): 301~305.
- [113] 唐津忠, 鲁晓翔, 陈瑞芳. 金莲花中黄酮类化合物的提取及其抗氧化性研究 [J]. 食品科学, 2003, 24(6): 88~91.
- [114] 胡春. 黄酮类化合物的抗氧化性质 [J]. 中国油脂, 1996, 21(4): 18~21.
- [115] 肖晶, 杨大进. 分光光度法测定保健食品中总黄酮的含量 [J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(6): 505~507.

致 谢

本论文是在导师陈崇羔教授与浙江大学苏松坤副研究员的悉心指导下完成的。从论文的选题、资料收集、试验设计、解决试验中出现的困难、购置仪器药品到论文的撰写无不凝结着老师的大量心血和汗水。衷心感谢老师在学习、工作和生活中给予的精心指导和无微不至的关怀。老师严以律己、宽以待人的高尚品德、求实的科学态度、严谨的治学学风、渊博的学识和孜孜不倦的敬业精神，将永远激励我不断上进。值此论文完成之际，谨向老师们致以深深的敬意和诚挚的谢意。

论文完成过程中得到了福建农林大学杜宏沪和刘亚男同学，浙江大学李英华师姐，朱威、郑火青师兄，湛毅、陶挺师弟，蔡芳、刘芳师妹，浙江大学陈盛禄教授和林雪珍老师的悉心指导和大力帮助。在他们的悉心指导和热心帮助下，我才能顺利地完成实验并撰写了毕业论文，在此一并表示衷心的感谢。

感谢我的父母、家人及朋友多年来对我生活上的无限关心和支持，精神上的不断鼓励，使我在困难与挫折面前坚定信心，顺利完成学业。

最后，向论文评阅人和答辩委员会的所有专家、教授致以最衷心的感谢！

夏 广 英

2008 年 4 月