

荷花不同部位总黄酮分布及荷叶黄酮提取工艺研究

郭明^{1,2}, 杨群超², 朱灵芝², 吕圭源¹ (1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 浙江林学院理学院化学系, 浙江 临安 311300)

摘要:目的 测定荷花不同部位总黄酮含量分布并探讨荷叶黄酮最佳提取工艺条件。方法 采用索氏提取法对荷花五个不同部位(花瓣、荷叶、叶梗、莲蓬壳、雄蕊)的总黄酮进行提取,利用硝酸铝显色法测定提取总黄酮含量;采用超声波辅助回流法提取荷叶黄酮并通过正交实验设计进行工艺条件优化。结果 荷花不同部位总黄酮含量分布:莲蓬壳>荷叶>雄蕊>花瓣>叶梗;超声波辅助回流法提取荷叶黄酮时用30倍量60%乙醇,70℃超声回流提取90 min,其中超声时间为20 min为佳。结论 荷花不同部位总黄酮含量有一定差异;在超声波辅助回流法提取荷叶黄酮实验处理下,不同提取工艺条件对荷叶黄酮提取效果产生一定的影响。

关键词:荷花;黄酮;提取工艺;分光光度法

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2009)03-0211-05

Total Flavonoid Distribution in the Different Parts of Lotus and Study on the Extraction Technology of Flavonoid in Lotus Leaf

GUO Ming^{1,2}, YANG Qunchao², ZHU Lingzhi², LV Guiyuan¹ (1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Department of Chemistry, Zhejiang Forestry University, Lin'an 311300, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To determine the total flavonoid distribution in the different parts of lotus and explore on the best extraction technology of flavonoid in lotus leaf. **METHODS** The total flavonoids of lotus petal, lotus leaf, lotus stalk, lotus receptaculum and lotus stamen were extracted by Soxhlet's apparatus method, the NaNO_2 -Al(NO_3)₃-NaOH solution was adopted as development system and rutin as the standard sample, and the total flavonoids from the five parts of lotus were then determined through ultraviolet spectrophotometer and their distribution was calculated. The ultrasonic-assisted reflux extraction method was also used to extract the flavonoids of lotus leaf, and the optimum extraction condition was explored using orthogonal design. **RESULTS** The total flavonoid distribution in the different parts of lotus is as follows: lotus receptaculum > lotus leaf > lotus stamen > lotus petal > lotus stalk. The extraction technology of flavonoid in lotus leaf by using ultrasonic-assisted reflux extraction method was got to the optimum condition: 30 fold of 60% alcohol solution proportion to the lotus leaf materials, ultrasonic-assisted reflux extraction 90 min under the temperature 70℃, and ultrasonic time 20 min. **CONCLUSION** The content of total flavonoid varies in the different parts of lotus; the extraction efficiency of flavonoid of lotus leaf has been influenced to some extent under different experimental condition using ultrasonic-assisted reflux extraction.

KEY WORDS: lotus; flavonoids; extraction technology; ultraviolet spectrophotometric method

荷花又名莲,是被子植物中起源最早的种属之一。现代莲属植物主要有开粉红花和白花的中国莲以及开黄花的美国莲二种^[1]。荷花含有多种药理活性物质^[2-4],尤其是荷叶,可以入药,国家卫生部曾将其列入第二批“既是食品又是药品”的名单之中^[5]。荷叶中的黄酮类物质主要是荷叶苷,其次是槲皮素、异槲皮素等^[6]。Elegami等^[7]从荷叶中分离出 Nympholide A, Nympholide B 和 Myricetin-3'-O-(6"-p-coumaroyl)-glucoside 3种黄酮类物质,田娜等^[8]从荷叶中分离出金丝桃苷(Hyperosin)、异槲皮素(Isoquercetin)、紫云英苷(Astragaloside)、槲皮素(Quercetin)4种黄酮类物质。荷叶黄酮类化合物具

有抗病毒、抗癌、抗氧化、抗炎、抗衰老等生理和药理活性,是具有广泛开发前景的天然活性物质^[9-13]。

有关文献报道,荷叶中的黄酮类化合物含量丰富^[14-17],但荷花植株不同部位黄酮类化合物的含量状况目前报道十分有限。同时,在主产地,除花朵以外大量的荷花其它部分多是废弃处置,未被适当利用,故对荷花黄酮分布情况及提取工艺条件进行深入研究具有必要性。在本工作中,我们以荷花的地上部分为原料,对荷花五个不同部位进行适当处理后测定总黄酮含量分布,同时,对荷叶黄酮的超声波辅助回流法提取工艺进行了一定程度的探讨,以期对此价廉易得资源的开发利用提供参考。

作者简介:郭明,男,教授 Tel: (0571) 63740852 E-mail: guoming@zjfc.edu.cn

1 实验仪器和药品

芦丁标准品(纯度 $\geq 95\%$,华东医药公司,黄酮含量测定的对照品);乙醇(AR);硝酸铝(AR);亚硝酸钠(AR);氢氧化钠(AR);浓硫酸(AR)。

数显恒温水浴锅(HH-4,中国国华电器有限公司);索氏提取器;万分之一电子天平(AEG-220G, Shimadzu);紫外-可见分光光度计(UV7500, Shimadzu);KQ-250DB型数控超声波发生器(昆山市超声仪器有限公司);SENCO R201型旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);DHG-9123A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

2 实验方法

2.1 荷花不同部位材料的采集和处理^[18]

足量的新鲜荷花花瓣、荷叶、叶梗、莲蓬壳、雄蕊均取自浙江林学院东湖水面的(8月)。采集的样品材料阴干后置于烘箱 $[(50 \pm 1)^\circ\text{C}]$ 中至完全干燥,粉碎过筛,干粉末样品装袋保存于干燥皿中待用。

2.2 荷花不同部位黄酮定性分析

对所选的荷花花瓣、荷叶、叶梗、莲蓬壳、雄蕊五种材料进行碱性试剂反应预实验。将同等少量材料于10 mL乙醇中浸提10 min,各取数滴于试管中,加氨水3 mL,振荡后静置5 min,观察清液颜色并记录。然后,在各试管中分别加入3 mL冰醋酸,振荡后静置5 min,观察颜色并记录,根据特征颜色反应定性说明所取材料中是否含有黄酮类物质^[19]。

2.3 荷花总黄酮含量分布测定

2.3.1 浸提方法 分别取定量的样品(荷叶、花瓣、雄蕊、叶梗、莲蓬壳的干燥粉末)5.0 g,用两层擦镜纸、两层滤纸包裹粉末,用60%乙醇200 mL于索氏提取器中浸提3 h,抽滤至少3次,定容至250 mL。

2.3.2 测定方法 样品中黄酮化合物的测定方法采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 体系络合物化学吸光法,通过UV7500紫外-可见分光光度计测量。据相关文献报道^[20],在亚硝酸盐存在时, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 在碱性条件下与黄酮类化合物形成络合物,在一定波长下有稳定吸收峰,以此进行比色分析,标准品选用芦丁。

2.3.3 样品中黄酮吸收峰值的测定 60%乙醇配制 $0.205\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准溶液,取该标准溶液5 mL至50 mL量瓶,用60%乙醇稀释至刻度。取稀释后芦丁标准溶液和样品待测液各5 mL,各加5% NaNO_2 2.5 mL,混匀静置6 min,加入2.5 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,混匀静置6 min,加入10 mL 5%的NaOH,放置15 min,于270~650 nm范围测定吸光度,根据吸收曲线确定最佳吸收波长。

2.3.4 标准曲线的绘制 取浓度为 $0.205\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准溶液2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,12.0 mL于6支50 mL量瓶中,各加60%乙醇补至刻度,按上述 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 测定黄酮化合物方法显色并于最佳吸收波长处(510 nm)测定吸光度A值,以A值为横坐标、标样芦丁含量 $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 为纵坐标作图得标准曲线。

2.3.5 样品黄酮含量的测定与比较 取定容提取液各10 mL于50 mL量瓶中,按上述 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 测定黄酮化合物方法显色并于510 nm处测定吸光度值,以空白标准液作对照用标准曲线计算提取液的总黄酮含量。

2.4 荷叶黄酮提取工艺实验

2.4.1 超声回流提取单因素试验 准确称取2.0 g荷叶干粉末5份,用不同的乙醇浓度、超声条件下的回流提取温度、料液比、回流提取时间、超声时间分别进行单因素实验,结束后抽滤初提液,旋转蒸发仪上 $(55^\circ\text{C}, 100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1})$ 蒸至近干,80 mL蒸馏水溶解,20 mL石油醚脱色至醚层近乎无色,取水层置于量瓶中定容至100 mL,从中吸取5 mL,用60%乙醇定容至50 mL。参照“2.3.3”项下方法,测定荷叶总黄酮在510 nm的吸光度值。

2.4.2 超声回流提取正交优化试验设计 准确称取2.0 g荷叶干粉末,以乙醇浓度、超声时间、料液比作为考察的3个因素,根据单因素试验的结果各取3个水平,提取液定容至100 mL,测定荷叶总黄酮在510 nm的吸光度值,选用 $L_9(3^3)$ 正交表进行试验,见表1、表2。

表1 正交因子水平表 $L_9(3^3)$

Tab 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	A	B	C
	乙醇浓度/%	料液比/(W:V)	超声时间/min
1	60	1:10	20
2	70	1:20	25
3	80	1:30	30

表2 $L_9(3^3)$ 正交表

Tab 2 $L_9(3^3)$ orthogonal table

实验号	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

3 结果与讨论

3.1 黄酮类化合物的颜色反应

选取的荷花花瓣、荷叶、叶梗、莲蓬壳、雄蕊 5 种材料在碱性条件下均呈现黄色到棕红色,结果列于表 3。

表 3 荷花各部位黄酮的定性显色结果

Tab 3 The results of color reaction about five parts of lotus

荷花部位	氨水	冰醋酸
花瓣	黄色	澄清
荷叶	棕红色	不变
叶梗	棕黄色	澄清
莲蓬壳	棕红色	不变
雄蕊	黄色	澄清

含有邻二酚羟基或 3'、4'-二羟基取代黄酮类化合物在碱性溶液中很快被氧化,由黄色变为深红色至绿棕色沉淀。二氢黄酮在碱性溶液中易开环转变成相应的异构体-查耳酮类化合物,显橙色至黄色。而黄酮醇类化合物在碱性溶液中先呈黄色,遇空气后变为棕色。表 3 所得结果为实验初提物,参考文献^[19,21]初步判断荷花五部分材料含有黄酮类化合物。

3.2 最佳吸收波长选择及实验标准曲线

测试标准品和待测样品溶液的吸收曲线基本一致,两者均在 510 nm 处有吸收峰且吸收稳定,吸光度 A 值处于理想范围,无漂移现象,结合有关文献,选择 510 nm 为最佳吸收峰测定 A 值。实验绘制的标准曲线见图 1,其中 y-芦丁含量($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);x-吸光度 A 值(510 nm)。结果表明芦丁含量在 8.2 ~ 49.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与吸光度值线性关系良好。

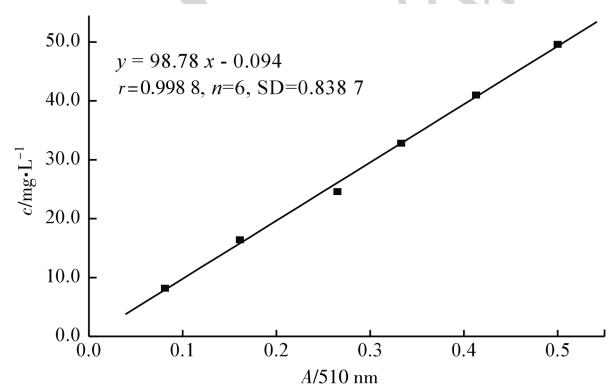


图 1 黄酮(芦丁)含量的实验标准曲线

Fig 1 The standard curve of flavonoid (Rutin) content

3.3 索氏法提取荷花五部位黄酮含量的比较

索氏法提取荷花五部位黄酮类化合物的含量分布见图 2。从图中可以看出,莲蓬壳的黄酮含量最高,其次为荷叶、雄蕊、花瓣,叶梗含量最少。

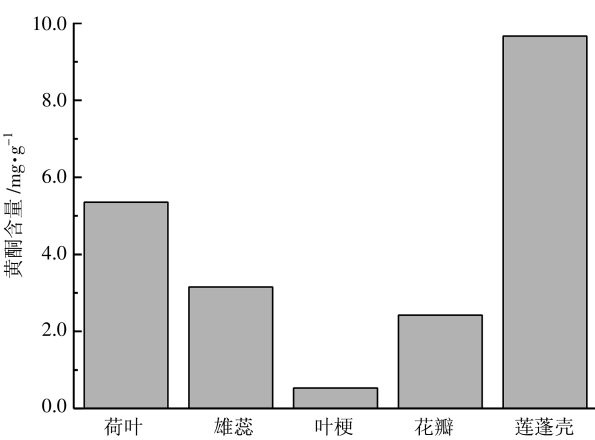


图 2 索氏法提取荷花五部位材料的黄酮含量棒状分布图

Fig 2 The distribution of flavonoid contents in five parts of lotus

3.4 超声辅助回流提取法单因素试验结果

3.4.1 乙醇浓度对超声辅助回流提取效果的影响

60 ℃时分别用不同浓度乙醇溶液超声回流提取荷叶 30 min,测定提取液吸光度并计算黄酮含量与乙醇浓度关系。结果显示,提取荷叶总黄酮含量随乙醇浓度增大而逐渐提高。但当乙醇浓度达到 60% 后,总黄酮含量反而降低,故乙醇浓度为 60% 提取效果最好。

3.4.2 料液比对超声辅助回流提取效果的影响

60 ℃时,不同的料液比用 60% 乙醇超声回流提取荷叶 30 min,测定提取液吸光度并计算黄酮含量与料液比关系。结果显示,在其它相同条件下,料液比大于 1:30 时,总黄酮的含量增加较少,而消耗溶剂的量增加较多,从经济角度考虑,料液比 1:30 提取为宜。

3.4.3 提取温度对超声辅助回流提取效果的影响

不同温度下,料液比为 1:30 的 60% 乙醇超声回流提取荷叶 30 min 后,测定提取液吸光度并计算黄酮含量与温度关系。结果显示,提取荷叶总黄酮的含量在超声温度 70 ℃时最高,故超声提取以 70 ℃为宜。

3.4.4 回流提取时间对超声辅助回流提取效果的影响

70 ℃时 60% 乙醇超声回流提取荷叶不同时间,测定提取液吸光度并计算黄酮含量与提取时间关系,其中超声时间为 30 min。结果显示,回流提取时间越长,提取荷叶总黄酮类物质的含量越高,但提取 90 min 后总黄酮含量反而减少,故以提取 90 min 为宜。

3.4.5 超声时间对超声辅助回流提取效果的影响

70 ℃时 60% 乙醇超声回流提取荷叶 90 min,其中

超声时间不同,测定提取液吸光度并计算黄酮含量与超声时间关系。结果显示,超声时间越长,提取荷叶总黄酮的含量越高。但提取 20 min 后总黄酮含量反而减少,故提取时超声时间以 20 min 为宜。

3.5 超声辅助回流提取法正交优化试验结果

根据“2.4”项下单因素实验结果,选定料液比、乙醇浓度、超声时间作为考察因素进行正交实验设计,试验结果见表 4,方差分析见表 5。由表 4 分析可见,最佳提取工艺为 A₁B₃C₁,即用 30 倍量 60% 乙醇,70 ℃ 超声回流提取 90 min,其中超声时间为 20 min。由表 5 可见,考察因素在选取的水平范围内对总黄酮提取率影响不显著。按最佳工艺条件重复试验,平均得率为 7.63‰。

4 结论

目前的文献资料报道中,针对荷叶的研究逐渐增多,但荷花其它部位的天然物质研究甚少。从本文实验结果可以看出,本地区(浙江临安)荷花中莲蓬壳和荷叶的黄酮含量比较高,特别是莲蓬壳,在取

表 5 方差分析

Tab 5 Analysis of variance

方差来源	平方和(s)	自由度(f)	均方(s/f)	F	临界值	显著性
乙醇浓度(A)	2.002	2	1.001	0.697	F _{0.99} (2,2)=99.0	-
料液比(B)	3.647	2	1.824	1.271	F _{0.95} (2,2)=19.0	-
超声时间(C)	0.796	2	0.398	0.278	F _{0.90} (2,2)=9.00	-
误差(e)	2.872	2	1.436			

出莲子后就会被废弃,若能对其黄酮类物质的提取做进一步工艺研究开发,相信是一个可资利用的资源。

近年来,超声波、微波等物理方法也逐渐引入了荷叶有效成分的提取中,本实验在溶剂萃取基础上融入了超声波辅助提取,超声辅助回流法提取荷叶黄酮含量可达到 7.63‰ 左右,故可以考虑利用此方法从本地区荷叶中提取得到较多的总黄酮物质,实验结果也表明可以通过正交实验设计得到相应实验范围下的最佳提取工艺条件。本工作对荷花地上部分不同部位总黄酮分布及荷叶黄酮超声辅助回流提取进行的相应实验可为荷花的深入开发研究提供一定借鉴。

REFERENCES

[1] XU D S. Chinese Lotus (中国莲) [M]. Wu Han: Wuhan Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences,1987: 46-53.
[2] DING Y M, YE D Q, ZHOU M Q, et al. Inhibitory effects of flavone from the lotus on gallstone formation and its mechanism in rabbits [J]. Med J Wuhan Univ (武汉大学学报), 2007, 28

表 4 正交试验结果分析

Tab 4 Results of orthogonal experiments

实验序号	A	B	C	总黄酮含量/‰
1	1	1	1	5.039
2	1	2	2	6.447
3	1	3	3	7.558
4	2	1	2	4.916
5	2	2	3	5.187
6	2	3	1	6.694
7	3	1	3	4.545
8	3	2	1	6.447
9	3	3	2	4.644
K ₁	19.044	14.500	18.180	
K ₂	16.797	18.081	16.007	
K ₃	15.636	18.896	17.290	
k ₁	6.348	4.833	6.060	
k ₂	5.599	6.027	5.336	
k ₃	5.212	6.299	5.763	
R _K	3.408	4.396	2.173	
R _k	1.136	1.466	0.724	

(5): 573-575,591.
[3] JIN S R, YAO L F, LI H, et al. Study on the extraction of flavonoids from lotus leaf and its antionxygenation [J]. Anhui Agri Sci Bull (安徽农学通报), 2006,12(8): 40-41.
[4] CHEN H G, ZENG Q X. Study on the extracting technology of functional components from lotus leaf and the effect on scavenging oxygen freeradicals [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2000,27(10):34-38.
[5] FAN J S, HAN X G. Food Additives (食用食品添加剂) [M]. Tian Jing: Tianjin Science and Techonlogy Publishing House, 1993: 10.
[6] ZHONG X F. Studies on extraction, purification and structure of the polysaccharides of lotus leaf and extraction of its flavonoid [D]. Nanchang: Nanchang University, 2005.
[7] ELEGAMI A A, BATES C, GRAY A I, et al. Two very unusual macrocylic flavonoids from water lily nymphaca lotus [J]. Phytochemistry, 2003,63(6):727-731.
[8] TIAN N. Studies on the structural identification of flavonoids in lotus leaf and pharmacological effect research [D]. Chang Sha: Hunan Agricultural University, 2005.
[9] AUGUSTIN E. Prenylated isoflavanone from the roots of erythrina sigmoidea [J]. Phychochemistry, 1994,36(4):1074-1079.
[10] YIN A Q, MU H J, JIANG X X, et al. Research advance of

- flavonoids[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2005, 19(11): 689-692.
- [11] WANG W, WANG L. Research progress on flavonoids [J]. J Shenyang Med Coll(沈阳医学院学报), 2002, 4(2): 115-119.
- [12] XU L Y, MAO W L, JIANG X D. Study on antihyperlipidemic effect of lotus leaf [J], Hubei J Tradit Chin Med(湖北中医杂志), 1996, 18(4): 42-43.
- [13] PENG F. Biological effects of flavones [J]. J Dali Med Coll(大理医学院学报), 1998, 7(4): 52-54.
- [14] LIU S P, FAN S Y, HOU H N. et al. Research progress on chemical ingredients and pharmacological effect of lotus leaves [J]. J Hebei Med Univ(河北医科大学学报), 2004, 25(4): 254-256.
- [15] NIE B, TONG L H, YU M. Study on the isolation and analysis of chemical ingredients from lotus leaves [J]. Heilongjiang Med Pharm(黑龙江医药科学), 2003, 26(4): 54.
- [16] CHENG H G, YU Y G, ZENG Q X. Extraction of functional component from lotus leaf [J]. Food Mach(食品与机械), 2001, 85(5): 16-17.
- [17] YU Z L, GUAN Z S, LI J, et al. Study on extraction technology and acute toxicity of water extract from lotus leaf [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中医学刊), 2003, 21(5): 669-671.
- [18] HUANG A G, QIAN J Y, TAN D J, et al. A study on extraction of flavonoid in lotus leaf [J]. Food Mach(食品与机械), 2000, 79(5): 14-18.
- [19] KUANG H X. Chinese Medicine Chemical (中药化学) [M]. Beijing: China Traditional Medicine Press, 2003: 146-149.
- [20] YUAN X M, JIANG M W, HU Z Z. Colorimetric determination of flavones in hawthorn and its products [J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 1996, 22(4): 27-32.
- [21] GAO J M. Plant Chemistry (植物化学) [M]. Beijing: Science Press, 2003: 168-169.

收稿日期: 2008-04-29