

荷叶中槲皮素提取工艺研究

雍国新 (海口经济学院应用技术学院, 海南海口 570203)

摘要 [目的] 优化荷叶提取槲皮素的工艺。[方法] 研究了 3 种提取方法对槲皮素转移率的影响; 通过对荷叶中槲皮素的回流提取条件进行 4 因素 3 水平正交试验, 确定了荷叶中槲皮素的最好提取工艺。[结果] 采用乙醇回流提取法提取荷叶中槲皮素效果最好, 槲皮素转移率均高于 60%, 明显优于乙醇温浸法 (<16.2%) 和碱温浸法 (<20.0%)。4 因素对于槲皮素转移率的影响程度依次为固液比>溶剂浓度>提取时间>提取温度。荷叶中槲皮素最好提取工艺条件为: 乙醇回流提取, 乙醇溶液浓度 60%, 提取温度 100 ℃, 料液比 1:20, 提取时间 1 h。[结论] 经试验验证, 该研究筛选优化的工艺条件基本稳定、可行。在此工艺条件下, 槲皮素的转移率在 70% 以上。

关键词 荷叶; 黄酮; 槲皮素; 提取工艺

中图分类号 S682.33 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)14-05705-02

Study on Extraction Technique of Quercetin from Lotus Leaf

YONG Guo-xin (College of Applied Technology, Haikou Economic Polytechnic College, Haikou, Hainan 570203)

Abstract [Objective] This study aimed to optimize extraction technique of quercetin from Lotus leaf. [Method] The effects of 3 kinds of extraction methods on transfer rate of quercetin were investigated. Through the $L_9(3^4)$ orthogonal design experiment about conditions of reflux extraction, the optimum extraction process of quercetin from lotus leaf was ascertained. [Result] The ethanol refluxing method of extracting quercetin from L. leaf could get optimum effect, by which the transfer rate of quercetin was more than 60%, being obviously higher than that by ethanol warm immersion (<16.2%) and alkali warm immersion (<20.0%), resp. The influencing degree of 4 factors on transfer rate in order was ratio of solid to liquid> solvent density> extraction time > extraction temperature. The optimum process conditions for extracting quercetin from L. leaf were the ethanol refluxing extraction, 60% ethanol, extraction temperature of 100 ℃, solid-liquid ratio of 1:20, extraction time of 1 h. [Conclusion] The extraction technique screened by this study was stable and feasible on the whole, under which, the transfer rate of quercetin was over 70%.

Key words Lotus leaf; Flavonoids; Quercetin; Extraction technique

睡莲科植物莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 的干燥叶具有清热解暑, 升发清阳, 凉血止血的功效^[1]。其所含有的丰富的黄酮类化合物在生物抗氧化性、抗病毒、治疗心血管疾病、降血脂、抗癌等方面具有较高的应用价值^[2-3]。槲皮素是黄酮类化合物中最具代表性的生理活性物质之一, 其在天然产物中以单体和苷的形式大量存在。在黄酮类化合物的提取和纯化工艺过程中, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 试剂的显色反应发生在黄酮醇类成分邻位无取代的邻二酚羟基部位^[4], 而一部分具备无取代邻二酚羟基的酚类成分也显色, 从而干扰黄酮类化合物的含量测定和提取工艺的优化。为此, 笔者采用 HPLC 法测定荷叶中槲皮素含量, 对提取工艺进行优化, 以期开发新的荷叶黄酮提取物的减肥制剂和保健食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试荷叶采自湖北潜江, 洗净后烘干、粉碎备用。

1.2 仪器与试剂 仪器: Agilent1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)、UV265-FW 紫外分光光度计 (日本岛津公司)、AUW-220D 型电子分析天平 (日本岛津公司)。试剂: 槲皮素标准品 (批号 111566-200402, 中国药品生物制品检定所), 水为二次重蒸水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 提取工艺的优化。在提取温度 (70 ℃)、样品量 (20 g) 等条件一定的情况下, 采用温浸法和回流法提取荷叶中的槲皮素, 得荷叶提取液。然后用 HPLC 法测定其含量, 筛选出适宜的提取方法, 采用正交试验优化提取工艺, 并对提取工艺进行验证试验。

1.3.2 槲皮素含量的测定。

1.3.2.1 色谱条件。色谱柱: Hypersil ODS 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm, 大连依利特公司); 流动相: 甲醇-0.2% 磷酸溶液 (40:60); 检测波长: 360 nm; 流速 0.8 ml/min; 柱温: 室温。

1.3.2.2 标准曲线绘制。准确称取槲皮素标准品 17.7 mg, 置于 100 ml 容量瓶中, 加甲醇溶液并定容至刻度, 然后精密吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml, 分别置于 10 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度。分别精密吸取 10 μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积的积分值 (y) 为纵坐标, 槲皮素浓度 (x) 为横坐标进行线性回归, 得回归方程为: $y=52.794x-200.15$, $r=0.9992$ (n=5)。

1.3.3 槲皮素转移率的计算。精密移取荷叶提取液 1 ml, 置于锥形瓶中, 加入甲醇-25% 盐酸溶液 (2:1) 20 ml, 称重后加热回流 1 h, 冷却后再称重, 用甲醇-25% 盐酸溶液 (2:1) 补足减少的重量, 摇匀, 过滤。精密量取 1 ml 滤液, 置于 5 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 测定槲皮素含量。准确称取荷叶粉末 0.16 g, 按上述方法测定槲皮素含量, 然后用下列公式计算槲皮素的转移率。

$$\text{槲皮素转移率}(\%) = \frac{\text{供试品溶液中槲皮素含量} \times \text{供试品溶液体积}}{\text{荷叶粉末中槲皮素含量} \times \text{荷叶粉末投入量}} \times 100 \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对槲皮素转移率的影响

2.1.1 不同浓度乙醇溶液温浸提取对槲皮素转移率的影响。在提取温度、称样量等条件一定的情况下, 将荷叶粉末分别用 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液温浸相同时间, 然后测定槲皮素含量, 计算转移率。由表 1 可知, 采用乙醇温浸法提取荷叶中槲皮素的效果不理想。各浓度乙醇溶液提取时, 槲皮素的转移率都不高于 16.2%。

2.1.2 不同 pH 值氢氧化钠溶液温浸提取对槲皮素转移率

作者简介 雍国新 (1980-), 男, 甘肃康乐人, 助教, 从事制药工程方面的研究。

收稿日期 2008-03-06

表 1 不同浓度乙醇溶液温浸提取对槲皮素转移率的影响
Table 1 Effects of different concentrations of ethanol solution with warm immersion extraction on quercetin transfer rate

乙醇溶液浓度 Ethanol solution concentration//%	槲皮素含量 Quercetin content//mg	转移率 Transfer rate//%
50	1.75	13.5
60	2.10	16.2
70	1.91	14.8
80	2.06	16.0
90	1.56	12.0

的影响。在提取温度、称样量等条件一定的情况下,将荷叶粉末分别用 pH 值为 8、9、10、11、12 的氢氧化钠溶液温浸相同时间,然后测定槲皮素含量,计算转移率。由表 2 可知,采用碱温浸法提取荷叶中槲皮素的效果也不理想。各 pH 值氢氧化钠溶液提取时,槲皮素的转移率都不高于 20.0%。

表 2 不同 pH 值氢氧化钠溶液温浸提取对槲皮素转移率的影响
Table 2 Effects of pH value of NaOH solution with warm immersion extraction on quercetin transfer rate

氢氧化钠溶液 pH 值 pH value of NaOH solution	槲皮素含量 Quercetin content//mg	转移率 Transfer rate//%
8	2.52	19.5
9	1.98	15.3
10	2.58	20.0
11	2.39	18.5
12	2.16	16.7

2.1.3 不同浓度乙醇溶液回流提取对槲皮素转移率的影响。在提取温度、称样量等条件一定的情况下,将荷叶粉末分别用 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液回流提取相同时间,然后测定槲皮素含量,计算转移率。由表 3 可知,采用乙醇回流法提取荷叶中槲皮素的效果较好。各浓度乙醇溶液提取时,槲皮素的转移率均高于 60.0%,这说明该法提取荷叶中槲皮素较乙醇温浸法和碱温浸法优良。

表 3 不同浓度乙醇溶液回流提取对槲皮素转移率的影响
Table 3 Effects of different concentrations of ethanol solution reflux extraction on quercetin transfer rate

乙醇溶液浓度 Ethanol solution concentration//%	槲皮素含量 Quercetin content//mg	转移率 Transfer rate//%
50	7.92	61.6
60	9.79	75.7
70	9.14	70.7
80	10.04	77.7
90	8.88	68.0

2.2 乙醇回流提取荷叶中槲皮素工艺的优化 对荷叶中槲皮素的乙醇回流法提取工艺进行 4 因素 3 水平正交试验,因素及水平见表 4,试验结果见表 5。由表 5 可知,提取温度、溶剂浓度、固液比和提取时间对槲皮素转移率的影响大小依次为 C>B>D>A。方差分析结果表明,因素 C(固液比)对槲皮素转移率的影响有显著差异(P<0.05),而其他因素对其无显著差异(P>0.05)。由试验结果可得最佳组合为

表 4 正交试验因素及水平

Table 4 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
1	80	50	1:20	1
2	90	60	1:30	2
3	100	70	1:40	3

注:A 为提取温度(℃),B 为溶剂浓度(%),C 为固液比(W/V),D 为提取时间(h)。下同。

Note: A. Extraction temperature; B. solvent concentration; C. Solid-liquid ratio; D. Extraction time. The same as follows.

A₃B₂C₃D₃。为适应工业化生产,在实际生产中,提取时间长和乙醇溶液消耗大会增加成本,因此将提取时间调整为 1 h、固液比调整为 1:20,得最优组合为 A₃B₂C₁D₁,即提取温度 100℃,乙醇溶液浓度 60%,固液比 1:20,提取时间 1 h。

表 5 正交试验结果
Table 5 Results of orthogonal test

试验号 Test No.	因素 Factor				槲皮素含量 Quercetin content//mg	转移率 Transfer rate//%
	A	B	C	D		
1	80	50	1:20	1	64.7	25.0
2	80	60	1:30	2	82.7	32.0
3	80	70	1:40	3	86.2	33.4
4	90	50	1:30	3	80.5	31.1
5	90	60	1:40	1	88.1	34.1
6	90	70	1:20	2	70.4	27.2
7	100	50	1:40	2	82.6	32.0
8	100	60	1:20	3	78.6	30.4
9	100	70	1:30	1	78.3	30.3
Ij	30.1	29.4	27.6	29.8		
IIj	30.8	32.2	31.1	30.4		
IIIj	30.9	30.3	33.1	31.6		
Rj	0.8	2.8	5.6	1.8		

2.3 提取工艺验证试验 在“2.2”确定的工艺条件下,称取同一批号相同质量的荷叶,进行 3 次验证试验,计算槲皮素转移率。由表 6 可知,该研究所筛选的工艺条件稳定、可行。在此工艺条件下,槲皮素的转移率在 70.0%以上。

表 6 验证试验结果
Table 6 Results of verification test

试验号 Test No.	槲皮素含量 Quercetin content//mg	转移率 Transfer rate//%
1	2.00	77.7
2	1.82	70.4
3	1.84	71.1

3 结论与讨论

(1)结果表明,乙醇回流法较适宜提取荷叶中的槲皮素,最优提取工艺为提取温度 100℃,乙醇溶液浓度 60%,固液比 1:20,提取时间 1 h。此条件下,槲皮素的转移率在 70.0%以上。

(2)碱温浸法提取荷叶中槲皮素时,其转移率很低,这主要是因为槲皮素分子中含有 3,4'-二羟基取代及其 B 环上含有邻二酚羟基取代,在碱液中不稳定,易被氧化降解^[9]。

(3)《中国药典》^[10]记载的槲皮素含量测定方法中的流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(50:50)。由于流动相中磷酸的浓度越高,其对液相仪器及柱子的腐蚀越严重,故该试验将流动相中的磷酸溶液浓度调整为 0.2%。当甲醇-0.2%磷酸溶液比例为 50:50 时,槲皮素的保留时间过短,所以该试验将其比例调整为 40:60,且分离效果较好,理论塔板数达 2 500 以上。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中国药典[S].北京:化学工业出版社,2005:334~335.
- [2] YAO L H,JIANG Y M,SHI J,et al.Flavonoids in food and their health benefits [J].Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum).2004,59(3):113-122.
- [3] 冷桂华,黄宏伟,叶文峰,等.枇杷叶中黄酮类化合物提取方法的研究[J].安徽农业科学,2007,35(25):7763-7764.
- [4] 刘东平,周亚球,王先荣.罗布麻叶总黄酮的测定方法探讨[J].时珍国医国药,2007,18(3):614-616.
- [5] 姚新生,吴立军,吴继渊,等.天然药物化学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2003:173-185.
- [6] 国家药典委员会.中国药典[S].北京:化学工业出版社,2005:84.