

# 峨嵋岩白菜叶和根状茎总黄酮提取工艺研究<sup>①</sup>

陈蕉<sup>a,b</sup> 黎云祥<sup>②a,b</sup> 陈光登<sup>a,b</sup> 蔡凌云<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>(西华师范大学生命科学学院 四川省南充市师大路 1 号 637002)

<sup>b</sup>(四川省高校环境科学与生物多样性保护重点实验室 四川省南充市师大路 1 号 637002)

<sup>c</sup>(凯里学院化学系 贵州省凯里经济开发区开元大道 3 号 556000)

**摘要** 采用微波辅助提取法,以总黄酮含量为考察指标,通过单因素实验和正交试验优选出峨嵋岩白菜叶和根状茎总黄酮微波最佳提取工艺。实验结果表明,峨嵋岩白菜叶中总黄酮提取的最佳工艺条件为:乙醇浓度 60%,料液比 1:30,微波时间 60s/次,微波功率 480W,提取次数为 3 次,黄酮含量为 15.181mg/g;根状茎中总黄酮最佳工艺条件为:乙醇浓度 60%,料液比 1:20,微波时间 75s/次,微波功率 480W,提取次数为 2 次,黄酮含量为 2.066mg/g。峨嵋岩白菜叶中总黄酮含量较根状茎中丰富,微波辅助提取法适合峨嵋岩白菜有效成分的提取。

**关键词** 微波辅助提取,峨嵋岩白菜,总黄酮,正交实验。

**中图分类号:** O657.32

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1004-8138(2009)01-0078-07

## 1 前言

峨嵋岩白菜(*Bergenia emeiensis* C. Y. Wu)为虎耳草科岩白菜属植物<sup>[1,2]</sup>,多年生草本,根状茎粗壮,生长在海拔 1590m 左右的岩坡和悬崖的石缝中,为四川产岩白菜之一<sup>[3]</sup>。具有清热解毒,收敛止血的功效,中医和临床广泛用于治疗咳嗽、吐血、便血、肠炎、白带、肿毒等,外用治疗疮毒、疥癣。岩白菜中含有岩白菜素(bergenin)<sup>[4]</sup>,熊果酚苷(arbutin),黄酮类化合物<sup>[5-8]</sup>,多糖<sup>[9]</sup>、蒽醌类化合物<sup>[10]</sup>,多种氨基酸和有机酸<sup>[11]</sup>等化学成分。研究和临床实验表明黄酮类化合物具有调节心血管系统作用,抗肝脏毒作用,抗炎,抗菌抗病毒,降血脂等作用<sup>[12]</sup>。目前,未见有关于峨嵋岩白菜黄酮类化合物方面的研究报道。本文采用微波辅助提取法提取峨嵋岩白菜叶和根状茎总黄酮,通过单因素实验和正交试验优选最佳提取条件,为峨嵋岩白菜的合理利用和进一步研究提供实验依据。

## 2 实验部分

### 2.1 材料与仪器

峨嵋岩白菜 2007 年 5 月采集于四川省天全县,经西华师范大学生命科学院秦自生教授鉴定为虎耳草科岩白菜属植物峨嵋岩白菜(*Bergenia emeiensis* C. Y. Wu)。样品洗去泥沙,阴干,粉碎后

① 四川省科技厅应用基础研究项目(2008JY0111);四川省杰出青年学科带头人培养计划项目(04ZQ026-047);四川省重点学科建设项目(SZD0420)

② 联系人:电话:(0817)2568352;手机:(0)15983794339;E-mail:zhdxhn@126.com

作者简介:陈蕉(1984—),女,四川省雅安市人,在读硕士生,主要从事药用植物有效成分研究。

过 40 目筛。芦丁对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,编号:1097-060918)。所用药品及试剂均为分析纯。

752 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),Buchi R200 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司),Eppendorf Research 移液器(德国 Eppendorf 公司),塞多利斯 BT124S 电子天平[塞多利斯科学仪器(北京)有限公司],G8023CTL-K3 格兰仕微波炉(佛山市顺德区格兰仕微波炉电器有限公司),DZW-4 型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司),SHZ-III 循环水式真空泵(上海亚荣生化仪器厂)。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 供试液的制备

准确称取一定量的峨嵋岩白菜叶和根状茎粉末,分别置于索氏提取器中,先以石油醚回流除去杂质(主要为叶绿素和脂),回收石油醚。在一定的乙醇浓度、料液比、微波辐射时间和微波功率条件下提取黄酮,结束后抽滤,收集滤液,经旋转蒸发仪浓缩到一定体积,加乙醇定容至 100mL。

### 2.2.2 黄酮的定性鉴别

颜色反应符合黄酮类化合物的显色反应(表 1),说明峨嵋岩白菜中含有黄酮类化合物。

### 2.2.3 对照品溶液的制备

准确称取在 120℃减压干燥至恒重的芦丁对照品 10.0 mg 于干燥烧杯中,加 95%乙醇充分溶解后,转移置 100mL 容量瓶中,定容,摇匀即得芦丁对照品溶液(0.1 mg/mL)。

### 2.2.4 最大吸收波长的选择

准确吸取对照品溶液 1.0mL 置 10mL 容量瓶中,加入 1mL 的 1% AlCl<sub>3</sub>,然后加乙醇稀释至刻度,摇匀放置 20min;同法作空白,在 400—600nm 范围内进行扫描,确定它的最大吸收波长为 420nm。

### 2.2.5 校准曲线的绘制

准确吸取对照品溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mL 于 7 只 10mL 容量瓶中,加 95%乙醇补足 3.0mL,分别加入 1mL 1% AlCl<sub>3</sub> 乙醇溶液,加乙醇定容,摇匀放置 20min,在 420nm 处测定其吸光度。以溶液质量浓度  $C$  为横坐标,吸光度  $A$  为纵坐标绘制校准曲线。得  $A = 23.2C - 0.0034$ ,  $r^2 = 0.9998$ 。结果表明芦丁在 0.005—0.03mg/mL 内具有良好的线性关系。

### 2.2.6 峨嵋岩白菜叶和根状茎总黄酮的含量测定

分别准确吸取叶和根状茎供试品液 2.0mL,按上述校准曲线制定项下操作,分别测定叶和根状茎中总黄酮吸光度,然后按公式计算出黄酮含量。公式如下:

$$\text{总黄酮}(\text{mg/g}) = (C \cdot V_1 \cdot V_2) / (W \cdot V_3)$$

$C$ ——根据校准曲线得出的供试品液质量浓度(mg/mL);  $V_1$ ——提取定容体积(mL);  $V_2$ ——显色反应定容体积(mL);  $W$ ——样品重量(g);  $V_3$ ——显色反应取样体积(mL)。

表 1 峨嵋岩白菜叶和根状茎黄酮的检识

试剂	叶	根状茎
HCl+ Mg 水浴加热	红色	红色
1% AlCl <sub>3</sub> 乙醇溶液	黄色 <sup>①</sup>	黄色 <sup>①</sup>
1% 醋酸铅溶液	粉红色沉淀	黄色沉淀
NaOH 溶液	棕色	红色
2% 二氯化锆溶液	黄色	黄色

① 示有荧光。

### 3 实验结果

#### 3.1 微波辅助提取黄酮单因素实验

##### 3.1.1 乙醇浓度对提取的影响

准确称取已除杂质的峨嵋岩白菜叶粉末 1g, 根状茎粉末 2g, 按料液 1 : 20(g/mL) 微波功率 320W, 微波时间 60s 间隙加热, 以不同乙醇浓度提取, 按 2.2.5 法测定吸光度, 结果如图 1a 和图 1b。由图可知, 刚开始随着乙醇浓度的增加, 黄酮得率呈上升趋势, 超过一定浓度时, 则为下降趋势。叶中提取黄酮的乙醇浓度在 60% 左右为好, 根状茎中在 70% 左右为佳。

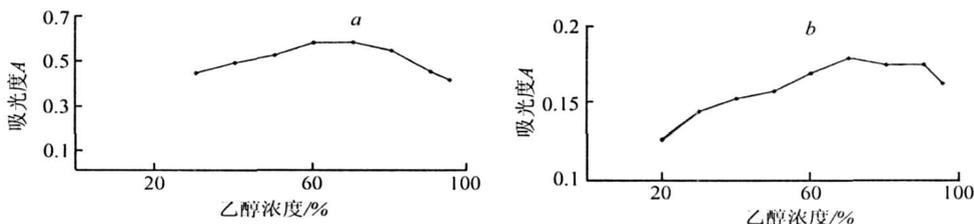


图 1 乙醇浓度对提取的影响

*a*——乙醇浓度对叶黄酮提取的影响; *b*——乙醇浓度对根状茎黄酮提取的影响。

##### 3.1.2 微波时间对提取的影响

准确称取已除杂质的峨嵋岩白菜叶粉末 1g, 根状茎粉末 2g, 按 60% 乙醇浓度, 料液比 1 : 20 (g/mL), 微波功率 320W, 以不同微波辐射时间间隙加热提取, 按 2.2.5 法测定吸光度, 结果如图 2a 和图 2b。可见, 辐射时间超过一定范围后吸光度趋于平衡, 叶中黄酮的提取时间在 50s 左右合适, 而根状茎的最佳提取时间在 90s 左右。

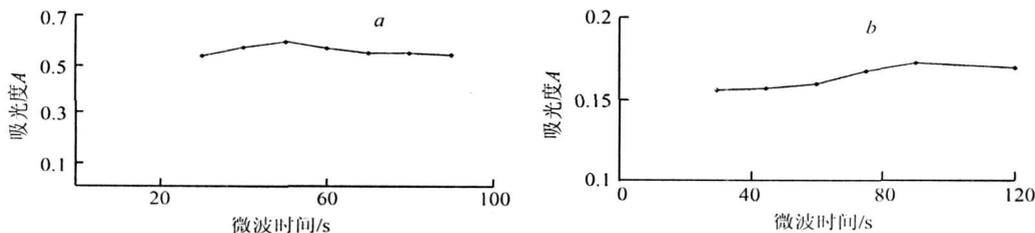


图 2 微波时间对提取的影响

*a*——微波时间对叶黄酮提取的影响; *b*——微波时间对根状茎黄酮提取的影响。

##### 3.1.3 提取次数对提取的影响

准确称取已除杂质的峨嵋岩白菜叶粉末 1g, 根状茎粉末 2g, 按 60% 乙醇浓度, 料液比 1 : 20 (g/mL), 微波功率 320W, 微波辐射 60s 间隙加热提取 1、2、3、4 次, 按 2.2.5 法测定吸光度, 结果如图 3a 和图 3b。结果表明, 叶中黄酮较多, 提取 3 次才充分, 而根状茎中则提取 2 次已经足够。

##### 3.1.4 料液比对提取的影响

准确称取已除杂质的峨嵋岩白菜叶粉末 1g, 根状茎粉末 2g, 按 60% 乙醇浓度, 不同的料液比 (g/mL), 微波功率 320W, 微波辐射 60s 间隙加热, 叶提取 3 次, 根状茎提取 2 次, 按 2.2.5 法测定吸光度, 结果如图 4a 和图 4b。叶黄酮吸光度在 1 : 10 到 1 : 30 增加较快, 之后趋于平衡; 根状茎黄

酮在 1 : 10 到 1 : 20 增加较快, 之后有所下降。

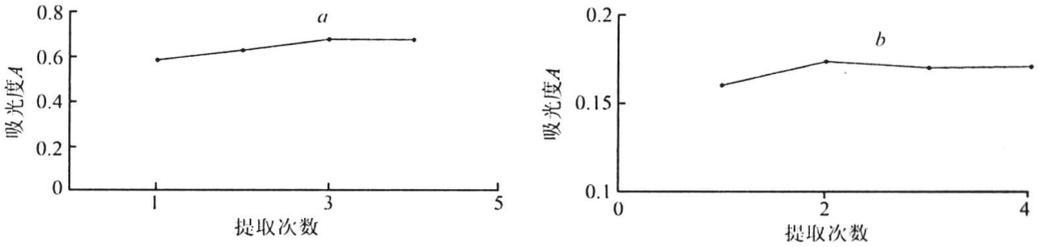


图 3 提取次数对取的影响

a——提取次数对叶黄酮提取的影响; b——提取次数对根状茎黄酮提取的影响。

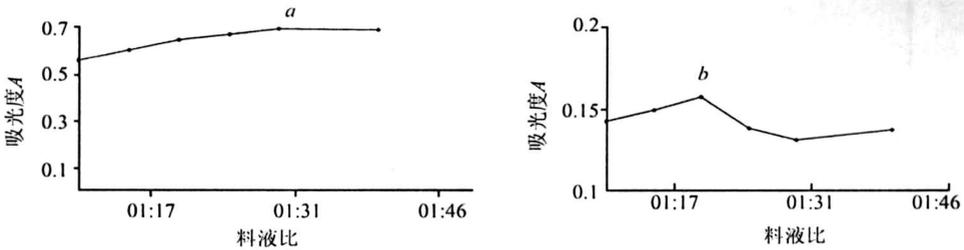


图 4 料液比对提取的影响

a——料液比对叶黄酮提取的影响; b——料液比对根状茎黄酮提取的影响。

### 3. 1. 5 微波功率对提取的影响

准确称取已除杂质的峨嵋岩白菜叶粉末 1g, 根状茎粉末 2g, 按 60% 乙醇浓度, 料液比 1 : 20 (g/mL), 不同微波功率, 微波辐射 60s 间隙加热, 叶提取 3 次, 根状茎提取 2 次, 按 2. 2. 5 法测定吸光度, 结果如图 5a 和图 5b。叶和根状茎黄酮吸光度在 480W 都达到最大。

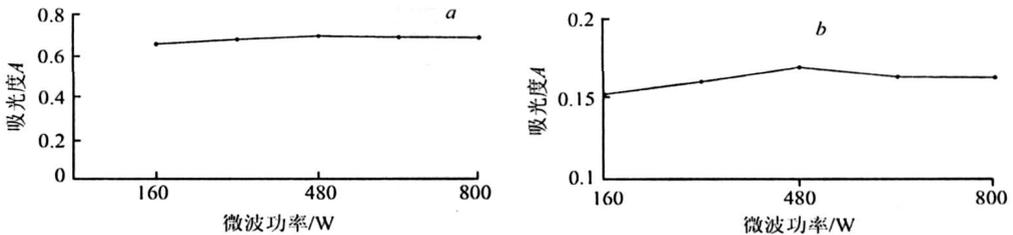


图 5 微波功率对提取的影响

a——微波功率对叶黄酮提取的影响; b——微波功率对根状茎黄酮提取的影响。

表 2a 叶黄酮提取的因素水平表

水平	A 乙醇浓度 (%)	B 料液比	C 微波时间(s)	D 微波功率 (W)
1	50	1 : 20	40	160
2	60	1 : 25	50	320
3	70	1 : 30	60	480

### 3. 2 微波辅助提取黄酮正交试验

在单因素实验结果的基础上, 以黄酮含量为考察指标, 选用  $L_9(3^4)$  表, 进行正交试验。因素水平见表 2a 和表 2b, 正交试验结果和方差分析见表 3 和表 4。

表 2b 根状茎中黄酮提取的因素水平表

水平	A 乙醇浓度(%)	B 料液比	C 微波时间(s)	D 微波功率(W)
1	60	1:10	60	160
2	70	1:15	75	320
3	80	1:20	90	480

表 3 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	叶中	根状茎中	叶中黄酮含量	根状茎中黄酮含量
					吸光度	吸光度	(mg/g)	(mg/g)
1	1	1	1	1	0.553	0.162	11.991	1.782
2	1	2	2	2	0.609	0.176	13.198	1.933
3	1	3	3	3	0.644	0.184	13.953	2.019
4	2	1	2	3	0.661	0.167	14.319	1.836
5	2	2	3	1	0.646	0.157	13.996	1.728
6	2	3	1	2	0.695	0.162	15.052	1.782
7	3	1	3	2	0.635	0.164	13.759	1.804
8	3	2	1	3	0.657	0.160	14.232	1.761
9	3	3	2	1	0.651	0.158	14.103	1.739
<i>k</i> <sub>1</sub>	13.047	13.356	13.758	13.363				
<i>k</i> <sub>2</sub>	14.456	13.809	13.873	14.003				
<i>k</i> <sub>3</sub>	14.031	14.369	13.903	14.168				
<i>R</i>	1.409	1.013	0.145	0.805				
最佳工艺	<i>A</i> <sub>2</sub>	<i>B</i> <sub>3</sub>	<i>C</i> <sub>3</sub>	<i>D</i> <sub>3</sub>				
<i>k</i> <sub>1</sub>	1.911	1.807	1.775	1.750				
<i>k</i> <sub>2</sub>	1.782	1.807	1.863	1.840				
<i>k</i> <sub>3</sub>	1.768	1.847	1.850	1.872				
<i>R</i>	0.143	0.04	0.075	0.122				
最佳工艺	<i>A</i> <sub>1</sub>	<i>B</i> <sub>3</sub>	<i>C</i> <sub>2</sub>	<i>D</i> <sub>3</sub>				

表 4 方差分析表

	因素	偏差平方和	自由度	<i>F</i> 比	显著度
叶黄酮	<i>A</i>	3.132	2	89.486	**
	<i>B</i>	1.545	2	44.143	**
	<i>C</i> (误差)	0.035	2	1.000	
	<i>D</i>	1.084	2	30.971	**
根状茎黄酮	<i>A</i>	0.037	2	12.333	*
	<i>B</i> (误差)	0.003	2	1.000	
	<i>C</i>	0.010	2	3.333	
	<i>D</i>	0.024	2	8.000	

注:叶黄酮因素 *C* 和根状茎黄酮因素 *B* 影响小,作为方差分析的误差处理; $F_{0.1}(2,2) = 9.00$ ,  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ , “\*\*”和“\*”分别表示差异显著性达到5%和10%。

根据极差分析可知,叶中  $R_A > R_C > R_B > R_D$ ,影响微波辅助提取峨嵋岩白菜叶黄酮的因素主次顺序为  $A > C > B > D$ ,最佳工艺为  $A_2B_3C_3D_3$ ,即乙醇浓度60%,料液比1:30,微波时间60s,微波功率480W,提取3次;根状茎中  $R_A > R_D > R_C > R_B$ ,影响微波辅助提取峨嵋岩白菜根状茎黄酮的因素主次顺序为  $A > D > C > B$ ,最佳工艺为  $A_1B_3C_2D_3$ ,即乙醇浓度60%,料液比1:20,微波时间75s,微波功率480W,提取2次。

### 3.3 验证实验

以正交试验得出的最佳工艺分别提取叶和根状茎总黄酮,按2.2.6项测定总黄酮含量,重复3

次。得出叶中平均总黄酮含量为 15.181mg/g, 根状茎中平均总黄酮含量为 2.066mg/g, 比正交试验中的任何一次含量都高。叶黄酮含量大于根状茎。

## 4 结论

峨嵋岩白菜黄酮类化合物的方面的研究一直未见报道。本实验首次分别对峨嵋岩白菜叶、根状茎总黄酮进行了微波辅助最佳提取工艺的研究。通过正交试验设计优选出峨嵋岩白菜叶中总黄酮微波提取的最佳工艺条件为:乙醇浓度 60%, 料液比 1:30, 微波时间 60s/次, 微波功率 480W, 提取次数为 3 次; 根状茎中总黄酮最佳工艺条件为:乙醇浓度 60%, 料液比 1:20, 微波时间 75s/次, 微波功率 480W, 提取次数为 2 次。

实验发现, 材料的前处理对提取和测定均有一定影响, 尤其是峨嵋岩白菜叶, 峨嵋岩白菜叶中含有较多叶绿素, 应尽量去除。极差分析和方差分析表明影响峨嵋岩白菜叶和根状茎黄酮提取的最主要因素都是乙醇浓度, 单因素实验过程中也发现高浓度的乙醇把石油醚未能除去的叶绿素浸出(原因是叶绿素在高浓度的乙醇中溶解度更大), 表现出乙醇浓度升高叶提取液变绿的现象。另外, 峨嵋岩白菜不同部位黄酮含量差异很大, 叶中总黄酮明显多于根状茎中。

黄酮类化合物的光学测定方法有紫外分光光度法,  $\text{NaNO}_3\text{-Al}(\text{NO}_2)_3\text{-NaOH}$  显色后比色法和  $\text{AlCl}_3$  显色后比色法测定等多种方法。其中  $\text{NaNO}_3\text{-Al}(\text{NO}_2)_3\text{-NaOH}$  显色法应用广泛。岩白菜属植物中含有的黄酮类化合物有山奈酚、槲皮素等多种<sup>[6-8]</sup>, 有文献<sup>[13]</sup>报道山奈酚、槲皮素等黄酮化合物用  $\text{NaNO}_3\text{-Al}(\text{NO}_2)_3\text{-NaOH}$  显色后在 500nm 处无吸收, 表明以芦丁为对照品, 以  $\text{NaNO}_3\text{-Al}(\text{NO}_2)_3\text{-NaOH}$  为显色剂测定总黄酮的方法无专属性。因此, 本实验采用  $\text{AlCl}_3$  显色法测定总黄酮含量。结果也表明该方法不仅具有仪器设备简单, 操作方便, 而且结果可靠稳定, 适用于峨嵋岩白菜黄酮类化合物的测定。

## 参考文献

- [1] 潘锦堂. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [2] 潘锦堂. 横断山岩白菜新分类群[J]. 植物分类学报, 1994, 32(6): 571—573.
- [3] 吕修梅, 王军宪. 岩白菜属植物的研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(1): 58—60.
- [4] 中华人民共和国药典编辑委员会编. 中国药典 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 278.
- [5] 奥田拓男. 中国产药用植物的鞣质及有关多元酚类的研究—岩白菜的多元[J]. 国外医学 中医中药分册, 1987, 9(2): 58.
- [6] Fujii M, Miyachi Y, Tomimori T. Studies on Nepalese Crude Drugs on the Phenolic Constituents of the Rhizome of *Bergenia Ciliata* (Haw.) Sternb[J]. *Natural Medicines*, 1996, 50(6): 404—407.
- [7] Olszewska-Kaczynska L. Accumulation of Main Biologically Active Compounds in Above and Underground Parts of *Leather Bergenia* [J]. *Herba Polonica*, 1998, 44(1): 53.
- [8] Bohm B. Flavonoids of Some Species of *Bergenia*, *Francoa*, *Parnassia* and *Lepuropetalon* [J]. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1986, 14(1): 75.
- [9] 林鹏程, 梁永欣, 康吉森. 西藏岩白菜中多糖的含量测定[J]. 青海科技, 2005, (4): 30—31.
- [10] Yuldashev M. Anthraquinones of *Bergenia Hissarica* [J]. *Khim. Prir. Soedin.*, 1993, 29(4): 615.
- [11] Sticher O. HPLC Separation and Quantitative Determination of Arbutin, Methylarbutin, Hydroquinone and Hydroquinone Monomethylether in *Arctostaphylos*, *Bergenia*, *Calluna* and *Vaccinium* Species [J]. *Planta. Med.*, 1979, 35(2): 253.
- [12] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 177—179.
- [13] 郭亚健, 范莉, 王小强等. 关于  $\text{NaNO}_3\text{-Al}(\text{NO}_2)_3\text{-NaOH}$  比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 97—

## Study on Extraction Technology of Total Flavonoids in *Bergenia Emeiensis* C. Y. Wu Leaves and Rhizomes

CHEN Jiao<sup>a,b</sup> LI Yun-Xiang<sup>a,b</sup> CHEN Guang-Deng<sup>a,b</sup> CAI Ling-Yun<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>(College of Life Science, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637002, P. R. China)

<sup>b</sup>(Key Laboratory of Environmental Science and Biodiversity Conservation of Sichuan Higher Education, China West Normal University, Nanchong, Guizhou 637002, P. R. China)

<sup>c</sup>(Department of Chemistry, Kaili College, Kaili, Guizhou 556003, P. R. China)

**Abstract** The total flavonoids in *Bergenia emeiensis* C. Y. Wu leaves and rhizomes was extracted with microwave-assisted extraction (MAE). By using single factor test and orthogonal experiment, the optimization technology of microwave-assisted extraction of flavonoids in *Bergenia emeiensis* C. Y. Wu leaves and rhizomes were obtained. The optimization conditions were: 60% ethanol, solid-liquid ration of 1 : 30 for 3 times, 60s each time, and 480W as the microwave power, the contents of flavonoids were 15.181mg/g, the optimization technology for the flavonoids in *B. emeiensis* rhizomes were: 60% ethanol, solid-liquid ration of 1 : 20 for 2 times, 75s each time, and 480W as the microwave power, the contents of flavonoids were 2.066mg/g. The contents of flavonoids in *B. emeiensis* leaves are more than those in *B. emeiensis* rhizomes, and the microwave-assisted extraction method is reasonable to extract chemical constituents in *B. emeiensis*.

**Key words** Microwave-Assisted Extraction, *Bergenia Emeiensis*, Total Flavonoids, Orthogonal Experiment.

封四：“保质、高效——《光谱实验室》主要特色”的附件 3

### 不当挂名院士

1922年2月23日，苏联社会主义社会科学院主席团给列宁发了一个通知书，说1922年2月5日列宁被选为研究院院士。列宁看了这个通知书，并在下面写了复函，还注明：“瞥在公文纸上，交我签字。”

列宁复函写道：“非常感谢，遗憾的是，我因病根本无法履行社会主义研究院院士的哪怕最微小的职责。挂名的院士，我不想当。因此，请把我从院士名单中勾掉或不要列入名单。”

列宁的复函，言简意赅，发人深思。列宁具有渊博的知识，授予院士头衔是当之无愧的，可是，列宁不这样看。他考虑到自己无法履行院士的职责，便毅然拒绝当挂名院士。

不当挂名院士，只是一件小事，但是，列宁这种革命责任心和谦虚谨慎的科学态度，实在令人敬佩。

(原载1981年1月17日《北京晚报》，作者：郭熙)

**本刊主编点评：**我也曾请卢嘉锡先生任《光谱实验室》主编，但卢先生谢绝了。他说，请我任主编，抬举我，表示感谢。但是我年老多病，体弱事多，又不是学光谱专业的，别人当面不说什么，但背后是有议论的，也会说你拉大旗作虎皮，对刊物不利。