

安徽产 10 种委陵菜植物总黄酮的提取工艺与含量研究*

闵运江¹, 张银萍¹, 高 琼¹, 张晓雷¹, 周守标²

1(安徽省皖西学院化学与生命科学系, 安徽 六安, 237012)

2(安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖, 241000)

摘 要 采用单因素分析后再用正交设计研究了 4 因素 4 水平的委陵菜总黄酮提取的工艺条件, 并用最佳条件提取了安徽产委陵菜属 10 种植物的总黄酮, 并对其进行比较。结果表明: 最佳提取条件为: 提取温度 70℃, 乙醇体积分数 40%, 固液比 1 g : 100 mL, 提取 3 次的效果最佳。安徽产 10 种委陵菜植株全株中的总黄酮含量, 为 1.36%±0.466 8%~10.61%±0.898 4%, 其中以三叶委陵菜黄酮含量最高。

关键词 委陵菜属, 黄酮, 提取, 正交设计, 黄酮含量

委陵菜(*Potentilla chinensis* Ser.) 为蔷薇科委陵菜属植物^[1,2]。其中委陵菜、朝天委陵菜、三叶朝天委陵菜、翻白草、绢毛匍匐委陵菜等的嫩苗为食用野菜; 全部种类均可药用, 有清热解毒、凉血止血的功能^[3~5]。该属植物全草含黄酮类、三萜类、有机酸等成分^[6]。而黄酮类化合物具有生物活性强、降低心肌耗氧量、防治血管硬化等作用; 同时也是一种天然抗氧化剂, 具有抗衰老、增强机体免疫力、抗癌防癌的功效, 在医药、食品等领域具有广阔的应用前景

[7~10]。

文中研究委陵菜黄酮类化合物的最佳提取条件, 并对安徽产委陵菜属全部 10 种(含 3 变种)植株中总黄酮的含量进行比较, 为委陵菜黄酮的提取及该属植物的进一步利用提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材 料

材料来源见表 1。

表 1 十种委陵菜属材料的采集时间与地点

| 种 | 采集时间 | 采集地点 | 凭证标本 | 标本鉴定人 |
|---|------------|------------------------|-------------|---------|
| 朝天委陵菜(<i>P. supina</i>) | 2007-03-27 | 六安市区老淠河积水坑边湿地 | Myj20060002 | 周守标、闵运江 |
| 三叶朝天委陵菜(<i>P. supina</i> var. <i>ternata</i>) | 2007-03-27 | 六安市区老淠河积水坑边湿地 | Myj20060005 | 周守标、闵运江 |
| 莓叶委陵菜(<i>P. fragarioides</i>) | 2007-04-10 | 六安市小华山山坡阳坡粘土荒地 | Myj070001 | 闵运江 |
| 委陵菜(<i>P. chinensis</i>) | 2007-03-25 | 皖西学院校园桃园内杂草丛 | Myj20060003 | 周守标 |
| 翻白草(<i>P. discolor</i>) | 2007-04-10 | 六安市东七里站五中校内、小华山等地荒地 | Myj070002 | 闵运江 |
| 钩叶委陵菜(<i>P. ancistriifolia</i>) | 2006-10-1 | 舒城县万佛山山顶海拔 1300m 岩石缝 | Myj060389 | 闵运江 |
| 三叶委陵菜(<i>P. freyniana</i>) | 2006-07-23 | 金寨县天堂寨山顶海拔 1400m 草丛 | Myj060220 | 周守标、闵运江 |
| 中华三叶委陵菜(<i>P. freyniana</i> var. <i>sinica</i>) | 2006-07-23 | 金寨县天堂寨近山顶海拔 1300m 山坡草丛 | Myj060259 | 周守标、闵运江 |
| 蛇含委陵菜(<i>P. kleiniana</i>) | 2007-05-19 | 金寨县梅山/皖西学院校园内阴湿地 | Myj20060001 | 周守标 |
| 绢毛匍匐委陵菜(<i>P. reptans</i> var. <i>sericophylla</i>) | 2007-04-14 | 宿州市萧县马井镇庙村附近湿地 | Myj070003 | 周守标 |

注: 部分材料自凭证标本原采集地采集新鲜样。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪 器

TU-1201 紫外可见分光光度计(北京普析通用

仪器设备有限公司), HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司), GL-20G-II 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂), RE-520 旋转蒸发器(上海浦东仪器厂), KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), FA1004 电子天平(上海精科天平), 101AS-2 型不锈钢数显电热鼓风干燥箱(上海浦东跃欣科学仪器厂), 层析柱, 索式提取器, 标准检验筛等。

1.2.2 试 剂

第一作者: 硕士, 高级实验师(周守标教授为通讯作者 E-mail: zhoushoubiao@vip. 163.com)。

* 安徽省高校自然科学基金重点项目(2006KJ060A), 安徽省高校自然科学基金项目(KJ 2007B290), 安徽省生态工程与生物技术重点实验室开放基金资助。

收稿日期: 2007-12-21, 改回日期: 2008-05-18

芦丁(国药集团化学试剂有限公司),AB-8 型大孔吸附树脂(天津市光复精细化工研究所),乙醇(徐州试剂二厂),乙醚(开封化学试剂总厂),盐酸(合肥医药站化玻部),亚硝酸钠(中国医药上海化学试剂公司),硝酸铝(上海科昌精细化学品公司)等,以上试剂为分析纯。

1.3 黄酮类化合物的提取^[11,12]

1.3.1 样品处理

取采回的新鲜带根委陵菜全草,洗净,103℃烘至约 8 成干,剪成长约 1 cm 长度小段,粉碎,再用 103℃烘至恒重。采用 Soxhlet 提取法,以无水乙醚为脱脂剂,于 43℃水浴中除去样品中脂类和脂溶性色素。取出样品滤纸包,先置通风处凉干,再将滤纸包置烘箱中 103℃烘干至恒重,放入干燥器中备用。

1.3.2 标准曲线制作

称取约 20 mg 芦丁对照品于称量瓶中,置 103℃烘箱下烘干至恒重,干燥器中冷却,精确称取 10 mg 芦丁,用 70%乙醇定容至 100 mL 为标准液。

精确吸取芦丁标准液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL 分别置于 6 支具塞试管中,加体积分数 70%乙醇至 5 mL,加质量分数 5%亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6min 后,加质量分数 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min 后,再加质量分数 4%氢氧化钠溶液 4 mL,加水 0.4 mL,摇匀,放置 15 min 后,在 510 nm 处测吸光度。得出回归方程: $A = 12.721C - 0.02903$, $r = 0.9998$ 。式中: A 表示吸光度; C 表示黄酮浓度。

样品中的黄酮含量测定皆参照标准曲线制作的测定方法测定吸光度,再由回归方程计算出黄酮含量。

1.3.3 委陵菜黄酮类化合物提取单因素试验

1.3.3.1 温度单因素试验

取已脱脂的委陵菜粉末 6 份,每份 1.00 g,分别放在 250 mL 锥形瓶中,温度设定为:30、40、50、60、70 和 80℃ 6 个组,其他条件不变,即固液比为:1 g : 100 mL、提取剂乙醇体积分数为 70%、浸提时间为 2h。按此操作条件回流提取委陵菜黄酮类化合物,测定浸提液中黄酮含量,测定 3 次(n=3),取其平均值。

1.3.3.2 乙醇体积分数单因素试验

取已脱脂的委陵菜粉末 4 份,每份 1.00 g,分别放在 250 mL 锥形瓶中,提取剂乙醇体积分数设定为:30%、50%、70%和 90%4 个组,其他条件不变,即

固液比为 1 g : 100 mL、温度为 70℃、浸提时间为 2 h。按此操作条件回流提取委陵菜黄酮类化合物,测定浸提液中的黄酮含量(n=3)。

1.3.3.3 固液比单因素试验

取已脱脂的委陵菜粉末 6 份,每份 1.00 g,分别放在 250mL 锥形瓶中,固液比(g : mL)设定为:1 : 20、1 : 40、1 : 60、1 : 80、1 : 100 和 1 : 120 等 6 个组,其他条件不变,即提取剂乙醇体积分数为 50%、温度为 70℃、浸提时间为 2h。按此操作条件回流提取委陵菜黄酮类化合物,测定浸提液中的黄酮含量(n=3)。

1.3.3.4 浸提次数单因素试验

取已脱脂的委陵菜粉末 4 份,每份 1.00 g,分别放在 250 mL 锥形瓶中,提取次数设定为:1 次、3 次、5 次、7 次,其他条件不变,即提取剂乙醇体积分数为 50%、温度为 70℃、浸提时间为 2 h。按此操作条件回流提取委陵菜黄酮类化合物,测定浸提液中的黄酮含量(n=3)。

1.3.4 正交实验设计

表 2 乙醇正交试验因素水平

| 因 素 | 水 平 | | | |
|--------------|--------|--------|--------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| (A)水浴温度/℃ | 40 | 50 | 60 | 70 |
| (B)乙醇体积分数/% | 40 | 50 | 60 | 70 |
| (C)固液比(g:mL) | 1 : 40 | 1 : 60 | 1 : 80 | 1 : 100 |
| (D)提取次数(次) | 2 | 3 | 4 | 5 |

1.4 委陵菜属 10 种植物总黄酮含量的测定

用正交试验所得委陵菜总黄酮提取最佳提取工艺条件,提取安徽产委陵菜属全部 10 种(含 3 变种)植物,全株中的总黄酮,测定各自的总黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 乙醇提取法单因素试验结果与分析

2.1.1 温度单因素试验结果(见表 3)

表 3 温度单因素试验结果表(±S)

| 试验号 | 温度 /℃ | 乙醇 /% | 固液比 (g : mL) | 浸取时间 /h | 提取液中黄酮含量 mg($\bar{X} \pm S$) |
|-----|-------|-------|--------------|---------|--------------------------------|
| 1 | 30 | 70 | 1 : 100 | 2 | 55.31±0.98 ^a |
| 2 | 40 | | | | 58.13±1.72 ^a |
| 3 | 50 | | | | 63.27±0.32 ^b |
| 4 | 60 | | | | 64.26±2.42 ^b |
| 5 | 70 | | | | 69.17±2.95 ^a |
| 6 | 80 | | | | 70.68±0.28 ^a |

从表 3 中可以看出,选择 70℃经济适用。

2.1.2 乙醇体积分数单因素试验结果(见表 4)

表 4 乙醇浓度单因素试验结果表(̄X±S)

| 试验号 | 乙醇体积 分数/% | 温度 /℃ | 固液比 g : mL | 浸取时间 /h | 提取液中黄酮含量 /mg (̄X±S) |
|-----|--------------|----------|---------------|------------|-------------------------|
| 1 | 30 | 50 | 1 : 100 | 2h | 56.74±0.43 ^c |
| 2 | 50 | | | | 67.22±0.96 ^a |
| 3 | 70 | | | | 60.27±1.13 ^b |
| 4 | 90 | | | | 33.66±0.55 ^d |

从表 3 中可以看出,乙醇体积分数为 50%时,提取效果最好。

2.1.3 固液比单因素试验结果(见表 5)

表 5 固液比单因素试验结果表(̄X±S)

| 试验号 | 固液比 (g : mL) | 温度 /℃ | 乙醇体积 分数/% | 浸取时间 /h | 提取液中黄酮含量 /mg ̄X(±S) |
|-----|-----------------|----------|--------------|------------|-------------------------|
| 1 | 1 : 20 | 50 | 50 | 2 | 43.08±0.41 ^c |
| 2 | 1 : 40 | | | | 58.10±0.52 ^b |
| 3 | 1 : 60 | | | | 62.08±0.60 ^b |
| 4 | 1 : 80 | | | | 71.12±0.11 ^a |
| 5 | 1 : 100 | | | | 73.12±1.20 ^a |
| 6 | 1 : 120 | | | | 71.88±2.20 ^a |

从表 4 可以看出,固液比为 1g : 100mL 时提取效果最好。

2.1.4 浸提次数单因素试验结果(见表 6)

表 6 浸提次数单因素试验(̄X±S)

| 试验号 | 浸提 次数 | 温度 /℃ | 乙醇体积 分数/% | 固液比 (g : mL) | 提取液中黄酮含量 /mg (̄X±S) |
|-----|----------|----------|--------------|-----------------|-------------------------|
| 1 | 1 | 70 | 50 | 1 : 100 | 30.33±0.95 ^a |
| 2 | 3 | | | | 40.72±1.14 ^b |
| 3 | 5 | | | | 41.98±1.93 ^b |
| 4 | 7 | | | | 43.19±1.27 ^b |

从表 5 可以看出,当提取次数增加至 3 次时提取液中黄酮含量明显增加,但当提取次数继续增加时,取液中黄酮含量并无明显变化($P>0.05$),所以,从经济及生产运用方面来考虑,确定提取次数为 3 次为宜。

2.2 乙醇提取法正交试验结果与分析(见表 7、表 8)

由正交试验方差分析结果(表 7、8)可见,提取委陵菜黄酮含量最大的是处理 13,该处理组提取黄酮含量显著高于其他处理组($P<0.05$),即 $A_4B_1C_4D_2$ 达 3.81%,表明委陵菜黄酮的最佳提取条件是:水浴温度为 70℃、乙醇体积分数为 40%、固液比为 1g : 100mL、提取次数为 3 次。

表 7 极差 R、表 8 中的 F 值和 P 值均表明,影响委陵菜提取效果因素的主次顺序为: $A>C>B>D$,即提取温度影响最大,固液比与乙醇浓度的影响次之,提取次数影响最小。

表 7 $L_{16}(4^4)$ 乙醇提取法正交实验结果与分析

| 处理 | A | B | C | D | 黄酮含量均值 /(̄X±S) |
|-------|---------|---------|---------|---------|-------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2.03±0.05 ^a |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2.66±0.02 ^f |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2.83±0.03 ^a |
| 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 2.52±0.10 ^f |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2.82±0.04 ^e |
| 6 | 2 | 2 | 1 | 4 | 2.83±0.02 ^e |
| 7 | 2 | 3 | 4 | 1 | 3.04±0.08 ^d |
| 8 | 2 | 4 | 3 | 2 | 2.79±0.04 ^e |
| 9 | 3 | 1 | 3 | 4 | 3.52±0.06 ^{bc} |
| 10 | 3 | 2 | 4 | 3 | 3.58±0.05 ^{bc} |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2 | 3.03±0.03 ^d |
| 12 | 3 | 4 | 2 | 1 | 2.99±0.04 ^d |
| 13 | 4 | 1 | 4 | 2 | 3.81±0.05 ^a |
| 14 | 4 | 2 | 3 | 1 | 3.53±0.03 ^c |
| 15 | 4 | 3 | 2 | 4 | 3.61±0.04 ^b |
| 16 | 4 | 4 | 1 | 3 | 2.91±0.22 ^{de} |
| k_1 | 2.822 5 | 3.287 5 | 3.017 5 | 3.222 5 | |
| k_2 | 3.160 0 | 3.442 5 | 3.285 0 | 3.357 5 | |
| k_3 | 3.505 0 | 3.317 5 | 3.480 0 | 3.305 0 | |
| k_4 | 3.742 5 | 3.182 5 | 3.447 5 | 3.345 0 | |
| R | 0.920 0 | 0.260 0 | 0.462 5 | 0.135 0 | |
| 较优水平 | A_4 | B_1 | C_4 | D_2 | |

表 8 $L_{16}(4^4)$ 乙醇提取法正交方差分析表

| 变异来源 | 平方和 SS | 自由度 df | 均方 s/f | F | P 值 |
|------|---------|--------|---------|-----------|---------|
| A | 1.940 9 | 3 | 0.647 | 153.426 9 | 0.000 9 |
| B | 0.137 4 | 3 | 0.045 8 | 10.861 7 | 0.040 5 |
| C | 0.535 9 | 3 | 0.178 6 | 42.359 7 | 0.005 9 |
| D | 0.044 6 | 3 | 0.014 9 | 3.521 7 | 0.164 3 |
| 误差 | 0.012 7 | 3 | 0.004 2 | | |
| 总和 T | 2.671 3 | | | | |

进一步进行方差分析得:本实验所选取的 A、B、C、D 4 个因素对提取委陵菜中黄酮含量影响,提取温度 A 和固液比 C 达到极显著($P<0.01$);乙醇体积分数 B 影响显著($P<0.05$);而提取次数 D 的影响无统计学差异($P>0.05$)。

2.3 委陵菜属 10 种植物总黄酮含量测定结果及其分析(见表 9)

表 9 安徽委陵菜属各种类植株黄酮含量测定结果(̄X±S)

| 种 类 | 植物中黄酮含量 /(̄X±S) |
|---|-----------------------------|
| 朝天委陵菜(<i>P. supina</i>) | 2.0767±0.2301 ^{cd} |
| 三叶朝天委陵菜(<i>P. supina</i> var. <i>ternata</i>) | 1.3600±0.4668 ^d |
| 莓叶委陵菜(<i>P. fragarioides</i>) | 7.2233±1.2023 ^b |
| 委陵菜(<i>P. chinensis</i>) | 3.3667±0.4960 ^c |
| 翻白草(<i>P. discolor</i>) | 3.1800±0.6736 ^c |
| 钩叶委陵菜(<i>P. ancistrifolia</i>) | 2.0233±0.3612 ^{cd} |
| 三叶委陵菜(<i>P. freyniana</i>) | 10.6100±0.8984 ^a |
| 中华三叶委陵菜(<i>P. freyniana</i> var. <i>sinica</i>) | 6.5167±1.4151 ^b |
| 蛇含委陵菜(<i>P. kleiniana</i>) | 1.9833±0.1069 ^{cd} |
| 绢毛匍匐委陵菜(<i>P. reptans</i> var. <i>sericophylla</i>) | 1.5433±0.4450 ^{cd} |

注:表 9 中同一列数字后不同字母表示它们差异极显著($P<0.01$),相同字母的表示没有统计学差异。

从表 9 可见,三叶委陵菜黄酮含量最高,达 10.610 0%±0.898 4%,其次是莓叶委陵菜 7.223 3%±1.202 3%和中华三叶委陵菜 6.516 7%±1.415 1%左右,再次是委陵菜 3.366 7%±0.496 0%和翻白草 3.180 0%±0.673 6%,均超过 3%。由此可见,安徽委陵菜属植物植株总黄酮含量均明显高于广泛被研究和应用的银杏叶黄酮 1%左右的含量值。因此,安徽委陵菜属植物是黄酮含量相对较高的植物种类之一,具有一定的药用和保健价值。

3 小 结

本文对委陵菜的提取和纯化工艺条件进行了研究。在提取条件研究中,先分别以温度、乙醇浓度、固液比和提取次数四组单因素试验,确定了正交设计的因素和水平范围,并用 4 因素 4 水平正交设计实验,结果表明,委陵菜黄酮的最佳提取条件是:提取温度为 70℃、乙醇体积分数为 40%、固液比为 1g:100mL、提取次数为 3 次。

安徽产 10 种委陵菜各种类植株全株中的黄酮类化合物的含量,在 1.360 0%±0.466 8%~10.610 0%±0.898 4%之间,其中以三叶委陵菜黄酮含量最高,达 10.610 0%±0.898 4%,其次是莓叶委陵菜 7.223 3%±1.202 3%和中华三叶委陵菜 6.516 7%±1.415 1%,再次是委陵菜 3.366 7%±0.496 0%和翻白草 3.180 0%±0.673 6%,均超过 3%,含量最低的是三叶朝天委陵菜 1.360 0%±0.466 8%。因此,安徽委陵菜属植物是黄酮含量相对较高的植物种类之一,高于银杏叶 1%左右的黄酮含量,具有较高

的药用和保健价值。

参 考 文 献

- 1 《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志(第 37 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1985. 233 ~ 244
- 2 Li C L, Ikeda H, Hideaki. *Potentilla* in Flora of China (Volume9) [M]. Beijing: Science Press and Missouri Botanical Garden Press. 2003. 291~327
- 3 肖培根. 新编中药志(第 3 卷) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 166~168
- 4 江苏新医学院. 中药大辞典(上册) [M]. 上海: 上海科技出版社, 1986. 1369
- 5 王庆贺, 李志勇, 沈 阳, 等. 委陵菜三萜类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(17): 1 434~1 436
- 6 陈乃富, 张莉. 金樱子黄酮类化合物的初步研究 [J]. 中国林副特产, 2005, (5): 2~4
- 7 陈乃富. 蕨菜黄酮类化合物的提取及其抗氧化作用 [J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(11): 63~66
- 8 Dixon R A, Steele CL. Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering [J], Trends Plant Sci, 1999, 4: 394~400
- 9 郭刚军, 龚加顺, 张新富, 等. 云南普洱茶中黄酮含量的测定及槲皮素、芦丁的提取分离 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(8): 67~70
- 10 郭志坚, 郭书好. 黄柏叶中黄酮醇甙含量测定及其抑菌实验 [J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2002, 23 (5): 64~66
- 11 刘新国, 魏元锋, 韩建伟, 等. 正交实验法优选三叶委陵菜渗漉提取的工艺条件 [J]. 医药导报, 2007, 26(6): 652~654
- 12 杨 洋, 韦小英. 柚皮黄酮类化合物的提取方法和抗氧化性的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(6): 9~12

Study on the Technology of Extraction and Content of Flavonoids from *Potentilla chinensis* Ser.

Min Yunjiang¹, Zhang Yinping¹, Gao Qiong¹,
Zhang Xiaolei¹, Zhou Shoubiao²

1(Department of Chemistry and Biology, West Anhui University, Lu'an 237012, China)

2(College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

ABSTRACT Study on the technology of extraction of flavonoids from *Potentilla Chinensis* Ser. and the flavonoid contents of ten species in *Potentilla* from Anhui Province. Adopt a 4-factor-four-level orthogonal test to study the optimal conditions of extracting flavonoids from *Potentilla Chinensis* Ser., and the flavonoid contents of ten species in *Potentilla* from Anhui Province had been determined. Using alcohol as extraction reagent, the best extracting condition might be: temperature at 70℃, 40% ethanol, the solid-liquid ratio 1g:100 mL, being extracted 3 time. The flavonoid contents of ten species in *Potentilla* from Anhui Province was from 1.36% to 10.61%. The flavonoid content in *P. freyniana* was the highest to 10.61%.

Key words *Potentilla* L., flavonoids, extraction, orthogonality design, flavonoid content