

淫羊藿中淫羊藿苷和总黄酮的闪式提取工艺

贺石麟, 牛景霞, 倪艳*

(山西省中医药研究院, 太原 030012)

[摘要] 目的: 研究闪式提取法对淫羊藿中淫羊藿苷和总黄酮的最佳提取工艺条件。方法: 以淫羊藿苷和总黄酮含量为指标, 通过正交试验得出闪式提取法提取其淫羊藿苷和总黄酮的最优条件。结果: 闪式提取法各因素对总黄酮和淫羊藿苷提取效果的影响程度依次为: 提取次数 > 提取时间 > 液固比 > 乙醇体积分数, 最佳提取工艺为: 加 25 倍量 50% 乙醇提取 3 次, 每次 10 min。结论: 闪式提取法是一种高效、快速提取淫羊藿中总黄酮和淫羊藿苷的方法。

[关键词] 淫羊藿; 闪式提取; 总黄酮; 淫羊藿苷; 正交实验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0038-03

Study on Flash-type Extraction Process for Total Flavonoids and Icariin from Herba Epimedii

HE Shi-lin, NIU Jing-xia, NI Yan*

(Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

[Abstract] **Objective:** To study and optimize the extraction and preparation technics of icariin and total flavonoids by orthogonal design. **Method:** The best conditions of extracting icariin and total flavonoids from Herba Epimed by flash-type extraction were screened by using method of orthogonal design and selecting the amount of icariin and total flavonoids as index. **Result:** The effect influencing factors of flash-type extraction were as follows: extraction times > duration of extraction > ratio of solid to liquid > concentration of ethanol. The optimum extraction condition obtained was: 10 minutes and 3 times, ratio of solid to liquid 1:25, 50% ethanol. **Conclusion:** Flash-type extraction was found to be an efficient and rapid method for extracting total flavonoids and icariin from Herba Epimedii.

[Key words] Herba Epimedii; flash-type extraction; total flavonoids; icariin; orthogonal test

淫羊藿为小檗科多年生草本植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim, 箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* Maxim, 柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim, 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的干燥叶, 具有补肾阳, 强筋骨, 祛风湿的功效^[1]。其主要化学成分为总黄酮, 淫羊藿苷, 多糖等。本文旨在摸索闪式提取

法对其淫羊藿苷和总黄酮的最佳提取条件, 实验以淫羊藿苷和总黄酮含量为指标, 通过正交设计实验得出闪式提取法提取其淫羊藿苷和总黄酮的最优条件。闪式提取法是指将生物组织加入提取溶剂, 进行高速组织匀浆, 以提取组织中有效成分。该方法对淫羊藿叶中淫羊藿苷和总黄酮的提取研究尚未见文献报道。

1 材料

淫羊藿药材(山西省中医药研究院中药房提供, 经倪艳主任药师鉴定为箭叶淫羊藿), 淫羊藿苷对照品(供含量测定用, 批号 110737-200312, 中国药品生物制品检定所提供), 乙醇, 甲醇均为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为超纯水。

[收稿日期] 20100903(003)

[第一作者] 贺石麟, 在读硕士研究生, 从事中药化学及中药的药效物质基础研究, Tel: 0351-4668028, 13753127211, E-mail: shilinhe@tom.com

[通讯作者] *倪艳, 教授、主任药师, 从事中药的药效物质基础及制剂的现代化研究, Tel: 0351-4668028, 13513620165, E-mail: niyan_01@hotmail.com

BP211D型电子天平(德国赛多利斯);JHBE-50S型闪式提取器(北京金鼎科技发展有限公司郑州公司);RE5298A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);TU-1910型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);Agilent高效液相色谱仪(Agilent)。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿苷的含量测定^[1]

2.1.1 色谱条件 十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,大连依利特),柱温室温,流动相乙腈-水(30:70),流速1 mL·min⁻¹,检测波长270 nm。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取淫羊藿苷对照品2.52 mg,置25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得0.100 8 g·L⁻¹对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 精密量取淫羊藿闪式提取液2 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 标准曲线制备 取2.1.2项下的淫羊藿苷对照品溶液(0.100 8 g·L⁻¹),分别精密量取1,2,5,10,15,20 μL进样,依法测定,记录峰面积,以淫羊藿苷质量浓度(μg)为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程 $Y = 240 8.1 X + 10.325$ ($r = 1$)。结果表明,淫羊藿苷进样量在0.100 8~2.016 0 μg线性关系良好。

2.1.5 测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定峰面积,以外标法计算即得。理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于1 500。结果表明,保留时间约为12 min,分离度>1.5,对照品溶液和供试品溶液色谱图见图1。

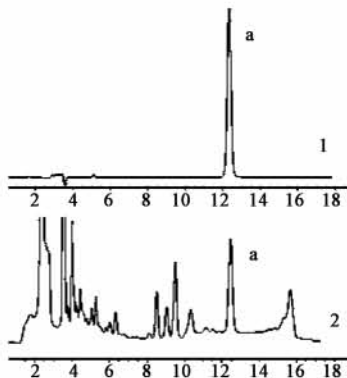


图1 淫羊藿 HPLC

1. 对照品; 2. 闪式提取样品; a 淫羊藿苷

2.2 总黄酮的含量测定^[1]

2.2.1 对照品溶液制备 精密量取2.1.2项下对照品溶液1 mL定容至10 mL即得10.08 mg·L⁻¹对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取淫羊藿闪式提取液5 mL,置50 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。精密量取1 mL,置50 mL量瓶中,加甲醇至刻度,即得。

2.2.3 标准曲线制备 取2.1.2项下的淫羊藿苷对照品溶液(0.100 8 g·L⁻¹),分别精密吸取1,2,2.5,3,4,5 mL,置25 mL量瓶中,加甲醇至刻度,采用比色法,在270 nm处,以甲醇为空白对照,分别测定吸光度,以淫羊藿苷质量浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A = 0.043 8 C + 0.011 1$ ($r = 0.999 8$)。结果表明淫羊藿苷在4.032~20.16 mg·L⁻¹与其吸光度呈良好线性关系。

2.2.4 测定法 以淫羊藿苷为对照品,以甲醇为空白溶液,采用比色法,在270 nm波长处,测定样品吸光度。

2.3 闪式提取法^[2]

2.3.1 单因素试验--提取时间考察 称取40 g淫羊藿药材,置闪式提取罐内,加入25倍量(1 000 mL)50%乙醇闪式提取,分别在2,4,6,8,10,12,14 min各取30 mL,放至室温,滤过,精密量取滤液5 mL,置50 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。精密量取1 mL,置25 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液。以总黄酮含量吸光度为指标,采用紫外-可见分光光度法测定其吸光度 A 。

由试验结果可知,在8 min时吸光度为最大值,所以分别选6,8,10 min作为3个水平。

2.3.2 闪式提取法正交试验 经单因素试验及对大量文献报道进行分析,选择影响4个闪式提取淫羊藿的主要因素,即提取次数、提取时间、乙醇体积分数、液固比,每个因素3个水平,选用 $L_9(3^4)$ 正交设计,以淫羊藿苷含量、总黄酮含量为评判指标,分别对其结果进行方差分析。因素水平表见表2,正交试验安排及方差分析分别见表3,4。

根据淫羊藿苷含量极差分析结果,影响大小依次为 $B > A > D > C$,最优提取工艺为 $A_3 B_3 C_3 D_2$;根据总黄酮含量极差分析结果,影响大小依次为 $A > B > D > C$;淫羊藿苷和总黄酮含量均以因素 C 为误差

表 2 闪式提取法正交试验因素水平

水平	A 提取 次数/次	B 提取 时间/min	C 乙醇体积 分数/%	D 液固 比/mL: g
1	1	6	40	20: 1
2	2	8	50	25: 1
3	3	10	60	30: 1

表 3 闪式提取法正交试验

No	A	B	C	D	淫羊藿苷 /mg	总黄酮 /%
1	1	1	1	1	1.53	4.148
2	1	2	2	2	1.92	4.494
3	1	3	3	3	1.99	4.769
4	2	1	2	3	1.79	5.068
5	2	2	3	1	1.89	5.025
6	2	3	1	2	2.26	5.632
7	3	1	3	2	2.02	5.491
8	3	2	1	3	2.06	5.564
淫羊藿苷	K_1	1.813	1.780	1.950	1.833	
	K_2	1.980	1.957	1.930	2.067	
	K_3	2.053	2.110	1.967	1.947	
	R	0.240	0.330	0.037	0.234	
总黄酮	K_1	4.470	4.902	5.115	4.982	
	K_2	5.242	5.028	5.112	5.206	
	K_3	5.610	5.392	5.095	5.134	
	R	1.140	0.490	0.020	0.224	

表 4 方差分析

项目	方差来源	SS	f	F	P
淫羊藿苷	A	0.091	2	45.500	<0.05
	B	0.164	2	82.000	<0.05
	C(误差)	0.002	2	1.000	
	D	0.082	2	41.000	<0.05
总黄酮	A	2.028	2	2028.000	<0.005
	B	0.388	2	388.000	<0.005
	C(误差)	0.001	2	1.000	
	D	0.078	2	78.000	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99, F_{0.005}(2,2) = 199$ 。

项,进行方差估算,A,B,D均有显著性影响。结合生产实际考虑成本以及均衡淫羊藿苷和总黄酮的提取效率,决定选取 50% 乙醇,确定最佳提取工艺条件为 $A_3B_3C_2D_2$,即以 25 倍量 50% 乙醇提取 3 次,每次 10 min。

2.3.3 验证试验 根据正交试验筛选得到的闪式提取最佳工艺条件提取淫羊藿,即称取淫羊藿药材 40 g,置闪式提取罐内,加入 50% 乙醇 1 000 mL,打开闪式提取器提取 3 次,每次 10 min,滤过,滤液减压浓缩至 500 mL,即得闪式提取液。重复 5 次,分别按 2.1;2.2 项下测定方法测定其淫羊藿苷含量和总黄酮含量,RSD 分别为 1.32% 和 1.75%。

3 讨论

为了综合评价淫羊藿苷和总黄酮的提取率,在实验过程中,将总黄酮和淫羊藿苷含量分别进行加权分析,得到最佳提取淫羊藿的工艺条件为 $A_3B_3C_2D_2$,即以 25 倍 50% 乙醇提取 3 次,每次 10 min。但是在试验过程中,受该型提取器提取罐容积恒定,动力的额定功率不宜过大及破碎刀具臂长调节范围有限等因素影响,在设计正交试验过程中对取药量及加入的溶剂量有所限制。

淫羊藿中淫羊藿苷和总黄酮可溶于水、乙醇等,闪式提取方法是利用高速机械剪刀力和搅拌力,迅速破坏植物细胞组织,使组织细胞内部的成分快速溶解,该方法具有省时、可室温提取、无成分破坏等优点^[3]。同时我们与超声提取法以及回流提取法对同一批药材的提取结果进行了比较,其结果并无显著性差异,说明闪式提取法是一种可以应用于淫羊藿中有效成分淫羊藿苷和总黄酮的提取方法,但是否可应用于大生产,尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:306.
- [2] 邓引梅,宋发军,崔永明,等. 甘草叶总黄酮提取工艺[J]. 中南民族大学学报,2008,27(1):41.
- [3] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J]. 中国天然药物,2007,5(6):401.

[责任编辑 全燕]