

文章编号:1001-6880(2014)7-1141-04

# 淫羊藿总黄酮的碱提工艺研究

李倩<sup>1,2</sup>, 李晓<sup>1,2</sup>, 魏悦<sup>1,2</sup>, 范毅<sup>1,2</sup>, 陈玲<sup>1,2</sup>, 张海艳<sup>1,2</sup>, 赵天增<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>河南省生物技术开发中心; <sup>2</sup>河南省植物天然产物开发工程技术研究中心, 郑州 450002

**摘要:**以淫羊藿苷和总黄酮的含量为指标,考察了提取溶剂及用量、提取时间、次数以及浓缩比例和酸用量对淫羊藿黄酮类成分提取的影响,确定了淫羊藿总黄酮碱提酸沉的最佳提取条件为:用10倍量的0.1% NaOH溶液加热煮沸2次,每次1 h,滤液浓缩至料液比1:4后用盐酸调节pH为2,沉淀放置36 h后,真空过滤或离心分离干燥即得高含量提取物。该提取工艺提取率高,稳定性好,操作简便,适合工业化生产。

**关键词:**淫羊藿;总黄酮;碱提法**中图分类号:**R284.2**文献标识码:**A

## Extraction of Total Flavonoid from Herba Epimedii Maxim Using Alkali Solution

LI Qian<sup>1,2</sup>, LI Xiao<sup>1,2</sup>, WEI Yi<sup>1,2</sup>, FAN Yi<sup>1,2</sup>, CHEN Ling<sup>1,2</sup>, ZHANG Hai-yan<sup>1,2</sup>, ZHAO Tian-zeng<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Biotechnology Developing Center of Henan Academy of Science; <sup>2</sup>Henan Plant Natural Products Development Engineering Technology Center, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** A new method for the extraction of total flaconoid from Herba Epimedii Maxim was developed in this study. The extraction solvent, extraction duration, times of extraction, concentration ratio and acid dosage used for precipitation were investigated using the extraction yield of icariin and total flavonoid as considering indices. The extraction process was optimized as follows: using 10 times amount (compare to sample) of 0.1% NaOH solvent, boiling for 2 times and 1 h every time. The filtrate was concentrated to the ratio of 1:4 for the ratio of solid to solvent. The pH of the concentrated filtrate was then adjusted to 2 by HCl followed by precipitation for 36 h and vacuum filtration or centrifugation of precipitate to afford flavonoid with high concentration. The developed method was stable, easy to operate and suitable for industrial production.

**Key words:** Herba Epimedii Maxim; total flavonoid; alkali extraction

淫羊藿(Herba Epimedii Maxim)为小檗科淫羊藿属多种植物的地上部分,具有补肝阳、强筋骨、和祛风湿之功效<sup>[1]</sup>。其主要有效成分为以淫羊藿苷为代表的总黄酮类。现代药理学表明,淫羊藿总黄酮能增强心脑血管流量、促进造血功能、提高免疫功能,还具有抗衰老、抗肿瘤和抗骨质疏松等功效<sup>[2]</sup>。

目前,淫羊藿总黄酮的提取工艺多为利用不同含量的乙醇提取,其原理是利用黄酮类物质易溶于乙醇,将其从淫羊藿原料中提取出来<sup>[3-5]</sup>。但所提取的粗品中含有大量的植物多糖、色素、单宁等多种杂质,所以还要通过大孔吸附树脂等进一步精制。此法存在以下缺点:需使用大量的有机溶剂;加热时间过长;工序多,工艺繁琐复杂;有效成分含量和利用

率较低。

本实验采用碱提酸沉法提取淫羊藿总黄酮,利用黄酮类成分含有酚羟基,呈弱酸性,不溶于酸性水而易溶于碱性水的性质,先用碱性水提取原材料,再通过调节溶液pH值使之沉淀而得以分离。相对于乙醇提取,该法具有以下优点:不需使用有机溶剂,降低成本;工艺简单且有效成分含量较高。

## 1 材料与仪器

**淫羊藿:**购自河南中原正信药材有限责任公司,产地为河南,经本研究室赵天增研究员鉴定;**淫羊藿苷对照品:**购自中国药品生物制品检定所(10737-200312);**旋转蒸发仪 RE-52A**(上海亚荣生化仪器厂);**TU-1810PC 紫外可见分光光度计**(北京普析通用仪器有限责任公司);**LC-20AT 高效液相色谱仪、PDA 检测器**(日本岛津公司);试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 淫羊藿昔的含量测定

按照2010年版《中华人民共和国药典》一部进行检测。色谱柱:Sunfire C<sub>18</sub>(250 mm(4.6 mm,5(m);流动相:乙腈-水(90:10);检测波长:270 nm;流速:1 mL/min;进样量:10 μL;柱温:25 °C。标准曲线方程: $Y = 12604X - 7.7642, r = 0.9997$ ,在0~27.5 mg/L范围内呈线性关系。

### 2.2 淫羊藿总黄酮的含量测定

按照文献<sup>[6]</sup>记载方法进行检测。检测波长:270 nm;标准曲线方程: $Y = 28.2428X - 0.51892, r = 0.9994$ ,在0~45 mg/L范围内呈线性关系。

### 2.3 工艺技术条件的研究

#### 2.3.1 提取溶剂的考察

称取50 g淫羊藿,分别用10倍量的水、0.5%酸水、0.2% NaOH溶液和0.4% NaOH溶液煮沸提取2 h,每次1 h。合并提取液,浓缩干燥后分别测定淫羊藿昔及总黄酮的含量。结果见表1。

表1 提取溶剂对淫羊藿昔及总黄酮含量的影响

Table 1 Effects of different solvents to the extraction yield of icaritin and total flavonoid

提取溶剂 Solvent	淫羊藿昔含量 Content of icaritin(%)	总黄酮含量 Content of total flavonoid(%)
水	2.16	25.8
pH 2 酸水	1.52	19.6
0.2% NaOH 溶液	4.33	36.7
0.4% NaOH 溶液	3.28	34.1

由表1可见,淫羊藿昔及总黄酮在碱水提取时的含量较高,而在酸水提取时含量最低,所以选择碱水作为提取溶剂。

#### 2.3.2 提取条件的考察

采用正交实验设计,采用提取次数(A)、提取溶剂用量(B)、提取溶媒(C)和提取时间(D)4个因素,每个因素选3个水平,用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表进行实验的优选(表2)。

表2 正交实验因素水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Level	(A)提取次数 Times of extraction	(B)提取溶剂用量 Amount of solvent	(C)提取溶媒 Solvent	(D)提取时间 Extraction duration
1	1	8倍药材量	0.3% NaOH 溶液	1 h
2	2	10倍药材量	0.2% NaOH 溶液	2 h
3	3	12倍药材量	0.1% NaOH 溶液	3 h

取干燥药材9份,每份100 g,根据正交实验设计,分别加入溶剂,煮沸提取,合并提取液,浓缩干燥

后分别测定淫羊藿昔及总黄酮的含量。结果见表3。

表3 正交实验设计与结果

Table 3 Design and results of orthogonal experiments

实验号 No.	A	B	C	D	淫羊藿昔含量 Content of icaritin(%)	总黄酮含量 Content of total flavonoid(%)
1	1	1	1	1	3.94	29.6
2	1	2	2	2	4.98	41.9
3	1	3	3	3	5.68	52.6
4	2	1	2	3	5.28	40.6
5	2	2	3	1	6.68	57.8
6	2	3	1	2	5.12	49.7
7	3	1	3	2	5.31	46.5
8	3	2	1	3	4.68	32.4
9	3	3	2	1	5.98	35.6

$K_1$	I	14.60	14.53	13.74	16.60
	II	124.10	116.70	111.70	119.00
$K_2$	I	17.08	16.34	16.24	15.41
	II	144.10	128.10	118.10	138.10
$K_3$	I	15.97	16.78	17.67	15.64
	II	114.50	137.90	152.90	125.60
$R$	I	1.03	0.95	2.64	0.27
	II	152.04	75.05	327.72	62.74

注:表中  $K_i$  = 水平  $i$  的均值;极差  $R$  = 列中最大值-列中最小值; I = 淫羊藿苷含量; II = 总黄酮含量。

Note:  $K_i$  is the average value of level  $i$ ;  $R$  is the maximum value minus the minimum value; I is the content of icariin; II is the content of total flavonoid.

表 4 方差分析(I)

Table 4 Analysis of variance (I)

误差来源 SV	离均差平方和 SS	自由度 <i>df</i>	均方 MS	F 值 F value	显著性 P value
A	1.0288	2	0.5144	3.8733	
B	0.9480	2	0.4740	3.5691	
C	2.6378	2	1.3189	9.9305	* * $P < 0.01$
D	0.2656	2	0.1328		

表 5 方差分析(II)

Table 5 Analysis of variance (II)

误差来源 SV	离均差平方和 SS	自由度 <i>df</i>	均方 MS	F 值 F value	显著性 P value
A	152.0356	2	76.0178	2.4234	
B	75.0489	2	37.5244	1.1963	
C	327.7156	2	163.8578	5.2238	* * $P < 0.01$
D	62.7356	2	31.3678		

表 3 极差分析表明,4 个因素对淫羊藿中黄酮类成分提取影响的顺序为:以淫羊藿苷含量为检测指标:  $C > A > B > D$ , 以淫羊藿总黄酮含量为检测指标:  $C > A > B > D$ ; 表 4、5 方差分析结果表明, 因素 C 对提取结果影响较大, 其次为 A, 其他因素影响不明显。考虑到工艺成本、简便可行等因素, 最终选定  $A_2B_2C_3D_1$ , 即 10 倍量的 0.1% NaOH 溶液煮沸提取 2 次, 每次 1 h 为最佳工艺。

### 2.3.3 浓缩比例对结果的影响

取淫羊藿 500 g, 按照上述最佳提取工艺进行提

取, 将提取液平均分为 5 份后再取 4 份分别浓缩至每 5 mL 含 1 g 生药(5:1, 密度为 1.005)、每 4 mL 含 1 g 生药(4:1, 密度为 1.011)、每 3 mL 含 1 g 生药(3:1, 密度为 1.019) 和每 2 mL 含 1 g 生药(2:1, 密度为 1.080), 然后用 1 mol/L 盐酸将其 pH 调至 2。静置 36 h 后, 离心分离, 真空干燥。按 2.1 和 2.2 项所述方法测定沉淀中淫羊藿苷和总黄酮的含量。结果见表 6。

表 6 不同浓缩比例精制后淫羊藿苷及总黄酮的含量

Table 6 The content of icariin and total flavonoid extracted out by different concentration ratio

浓缩比例 Concentration ratio	淫羊藿苷含量 Content of Icariin(%)	总黄酮含量 Content of total flavonoid(%)	沉淀重量 Deposition weight(g)
2:1	3.53	31.7	5.23

3:1	6.22	43.3	5.29
4:1	6.57	57.6	4.83
5:1	5.68	48.5	3.65
未浓缩	4.86	41.9	0.86

由表6看出:随着浓缩比例的提高,淫羊藿昔和总黄酮的含量也随之提高,在4:1时含量达到最高,但随着浓缩比例的继续提高,所得沉淀的量虽然在提高,但其含量却开始降低,说明有效物质已经沉降完全。比较其数据,将提取液浓缩至4:1,密度约为1.011时,淫羊藿昔和总黄酮的含量达到最高值。

表7 酸用量对淫羊藿昔及总黄酮含量的影响

Table 7 Effect of acid dosage to extraction yield of icariin and total flavonoid

pH 值 pH	淫羊藿昔含量 Content of icariin(%)	总黄酮含量 Content of total flavonoid(%)	沉淀重量 Weight of precipitate(g)
4	6.23	47.4	1.96
3	6.57	51.6	2.12
2	6.98	58.2	2.62
1	5.96	52.3	2.56

由表7看出,随着溶液pH值降低,获得产物的量增加,而淫羊藿昔及总黄酮的含量在pH=2时最大,进一步降低pH值,虽然产物的量保持稳定,但是其含量却在减少,说明在pH=2时淫羊藿昔及总黄酮即可沉淀完全。

#### 2.4 验证实验

取淫羊藿3份,每份100g,按照最佳方案A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>进行提取后浓缩至料液比1:4,再用盐酸调节pH值为2,静置后真空干燥沉淀,测得其中淫羊藿昔的平均含量为6.78%,总黄酮平均含量为57.9%。说明筛选出的工艺合理可行,具有可操作性和重复性。

### 3 结论

利用淫羊藿黄酮类成分在一定条件下可以和某些无机碱形成酚盐的性质使其从体系里溶解出来,再通过盐酸调节溶液pH值的方法使之沉淀而得以分离。该法与有机溶剂提取法相比,具有工艺简单易行,操作安全方便,成本低,选择性强的特点。

淫羊藿总黄酮碱提酸沉的最佳提取条件为:用10倍量的0.1%NaOH溶液加热煮沸2次,每次1h,滤液浓缩至料液比1:4(密度约为1.011)后用盐酸调节pH为2,沉淀放置36h后,真空过滤或离心分离干燥即得高含量的淫羊藿总黄酮提取物。

#### 2.3.3 酸沉淀过程对结果的影响

取淫羊藿300g,按照上述最佳提取工艺进行提取,将提取液浓缩至约1200mL。分别取200mL浓缩液用1mol/L盐酸将其pH值调节为4、3、2、1,静置36h后,离心分离,真空干燥。按2.1和2.2项所述方法测定沉淀中淫羊藿昔和总黄酮的含量。结果见表7。

表7 酸用量对淫羊藿昔及总黄酮含量的影响

Table 7 Effect of acid dosage to extraction yield of icariin and total flavonoid

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 306.
- 2 Huang XL(黄秀兰), Zhou YW(周亚伟), Wang W(王伟). Progress on the pharmacological research on icariin and total flavonoid of *Herba Epimedii Maxim.* *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2005, 27:719-721.
- 3 Ma HP(马慧萍), Jia ZP(贾正平), Xie JW(谢景文), et al. Studies on extraction and separation of total flavonoid of *Herba Epimedii*. *West China J Pharm Sci*(华西药学杂志), 2002, 17:1-3.
- 4 Ma WK(马维坤), Chen W(陈文), Duan GF(段国锋). Studies on extraction and separation of total flavone of *Herba Epimedii*. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中医药学刊), 2006, 24:539-540.
- 5 Ma Y(马轶), Meng XS(孟宪生), Bao YR(包永睿). Adsorption and purification of total flavonoids and icariin on *Herba Epimedii* by macroporous resin. *Asia-pacific Tradit Med*(亚太传统医药), 2009, 5(9):48-51.
- 6 Xue DS(薛东升), Wang GM(王国明). Study on separation and purification for total flavonoids of *Herba Epimedii*. *Chin Pharm*(中国药业), 2010, 19(23):10-11.