

文章编号:1001-6880(2016)12-1995-05

# 黄芩黄酮总苷元提取新方法的研究

刘云华<sup>1</sup>,易进海<sup>1\*</sup>,彭易兰<sup>1,2</sup>,刘玉红<sup>1</sup><sup>1</sup>四川省中医药科学院,成都 610041; <sup>2</sup>成都中医药大学,成都 611137

**摘要:**研究黄芩黄酮总苷元提取制备新方法。以黄芩苷的酶解率为评价指标,筛选黄芩酶液制备的 pH 值;以黄芩苷提取率为评价指标,采用正交实验对影响黄芩提取的加水量、煎煮时间和煎煮次数进行优选;确定黄芩黄酮总苷元提取制备方法为:黄芩粗粉以 pH3 水搅拌提取 0.5 h,过滤,得到黄芩酶液;药渣投入 12 倍量沸水中,调 pH6 煎煮两次,每次 0.5 h,过滤,合并滤液,加入上述黄芩酶液,调 pH6,于 50 °C 酶解 6 h,过滤,沉淀干燥,即得黄芩黄酮总苷元提取物。该方法简便可行,黄芩素提取率约为 80%,提取工艺稳定,为从黄芩中提取黄芩黄酮总苷元提供参考方法。

**关键词:**黄芩;黄芩黄酮总苷元;黄芩素;黄芩酶;pH 值;提取方法

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.025

## A New Extraction Method of *Scutellaria Radix* Total Flavone Aglycone

LIU Yun-hua<sup>1</sup>, YI Jin-hai<sup>1\*</sup>, PENG Yi-lan<sup>1,2</sup>, LIU Yu-hong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China; <sup>2</sup>Pharmaceutical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract:** To develop a new method of obtaining *Scutellaria Radix* total flavone aglycone. The pH of baicalinase was optimized using enzymatic hydrolysis rate of baicalin as evaluation index. Taking extraction yield of baicalin as evaluation index, parameters such as water volume, decocting time and extraction times were optimized by orthogonal test. The established method: stirring the *Scutellariae Radix* powder with water (pH3) for 0.5 h, then baicalinase solution was obtained by filtration, the residue was put into boiled water (12 times of residue) two times for decocting at pH6, 0.5 h each time, then mixed the filtration fluid with the baicalinase solution at 50 °C (pH6) for 6 h. *Scutellaria Radix* total flavone aglycon can be obtained by drying the precipitate of filtration. The extraction rate of baicalein was 80%. The developed method was simple, reliable and stable. It can be used as a way to get *Scutellaria Radix* total flavone aglycon from *Scutellaria Radix*.

**Key words:** *Scutellariabaicalensis*; *Scutellaria Radix* totalflavone aglycone; baicalein; *Scutellaria Radix* enzyme; pH; extraction

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,具有清热燥湿,泻火解毒,止血,安胎之功效。黄芩主要含黄酮类化合物,如黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等<sup>[1]</sup>。文献报道黄芩素具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、神经元保护等药理活性作用<sup>[2]</sup>,黄芩素较黄芩苷有更强的生物活性且毒副作用小<sup>[3]</sup>;药代研究表明,黄芩素比黄芩苷更易吸收,生物利用度高<sup>[4]</sup>;因此从黄芩中直接提取黄芩素等苷元类成分可能更有意义。目前制备黄芩素等苷元的主要方法有酸水解法<sup>[5,6]</sup>、自

生酶解法<sup>[7,8]</sup>以及外加β-葡萄糖苷酶、纤维素酶、复合植物水解酶酶解法<sup>[9-11]</sup>等。上述方法产生酸水对环境造成污染、或需应用乙醇等有机溶剂提取、或需要外加活性酶等,生产工艺较复杂,成本较高。

本实验探索先提取黄芩自生酶(黄芩酶),再提取黄芩苷类成分进行酶解,即第一步常温搅拌提取黄芩酶液,关键是调节合适的 pH 值抑制酶的活性,减少提取过程中黄芩苷酶解为黄芩素,避免后续水煎提取黄芩素不溶造成的损失,同时还要保存酶的活性可恢复;第二步是按常规方法水煎提取黄芩苷类成分;第三步是将上述的黄芩酶液和黄芩苷提取液合并,在适宜的 pH 值和温度下酶解生成黄芩素等苷元沉淀,过滤,即得黄芩黄酮总苷元提取物。本

文主要对 pH 值、煎煮条件等参数进行了优选,经中试放大实验,表明该方法黄芩素提取转移率可达 80% 左右,提取物中黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 的总量约为 70%,生产过程不使用乙醇,也不添加外源活性酶,工艺简便,成本低,具有产业化应用推广价值。

## 1 材料与仪器

黄芩药材购自成都荷花池药材市场,经四川省中医药科学院方清茂研究员鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。

黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110715-201016)、黄芩素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111595-200905)、汉黄芩素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号:MUST-14110311)、千层纸素 A(成都曼斯特生物科技有限公司,批号:MUST-14112104),甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

美国 Agilent 1200 型高效液相色谱仪(四元泵、DAD 检测器、柱温箱、自动进样器),AUW220D 型十万分之一天平(日本岛津),Millipore Milli-Q 超纯水系统(德国默克)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm,5 μm);柱温:35 °C;流动相:甲醇-0.2% 磷酸水溶液(42:58);流速:1.0 mL/min;检测波长为 280 nm。理论塔板数按黄芩苷峰计算应不低于 3000。

表 1 不同 pH 值对黄芩酶活性的影响

Table 1 Effects of different pH values on enzyme activity of Baicalin

编号 No.	pH 值 pH value	黄芩苷量 Amount of Baicalin(g)	酶解率* Enzymatic hydrolysis rate(%)
1	1	0.930	2.31
2	2	0.896	5.88
3	3	0.825	13.3
4	4	0.720	24.4
5	5	0.699	26.6
6	6	0.652	31.5

注:酶解率\*=[(0.952-黄芩苷量)/0.952]×100%。

Note: Enzymic hydrolysis rate\*=[(0.952-amount of Baicalin)/0.952]×100%.

由表 1 可见,pH4~6 时黄芩酶的活性较强;pH1~3 时酶的活性被抑制,但还需考察酶的活性是否可恢复。

### 2.2 标准曲线的制备

精密称取黄芩苷对照品 9.33 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品稀释液。分别精密吸上述取对照品稀释液 10 μL 注入液相色谱仪测定,以峰面积 Y 对进样量 X(μg)进行线性回归,黄芩苷回归方程为  $Y=3461.2X+0.61$ , $r=0.9999$ ,线性范围:0.003732~0.037320 mg/mL。

### 2.3 供试品溶液的制备

精密量取样品溶液适量,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

### 2.4 黄芩酶液的提取

采用水搅拌提取过滤得到黄芩酶液,提取过程中,部分黄芩苷酶解为黄芩素,而黄芩素难溶于水,将影响后续水煎提取工序的黄芩素转移率。因此,抑制黄芩酶的活性、减少黄芩苷的酶解就显得尤为重要。故参考文献方法<sup>[9,12]</sup>,对黄芩酶活性的主要影响因素 pH 值进行考察。

取黄芩药材粗粉 100 g,加水 1000 mL,搅拌 0.5 h,滤过。滤液通过 D101 型大孔吸附树脂柱,收集流出液(除去黄芩苷等成分),得到黄芩酶液。取药渣立即投入 1000 mL 沸水中,煎煮两次,每次 1 h,过滤,合并滤液,调整体积至 2000 mL,得到黄芩水煎液。取上述黄芩酶液 6 份,每份 100 mL,加入黄芩水煎液各 200 mL(含黄芩苷 0.952 g),混匀。分别调 pH1、2、3、4、5、6,即得样品溶液(编号 1~6),室温放置 2 h,测定溶液中黄芩苷的含量,计算酶解率,结果见表 1。

取上述溶液,分别调 pH6,于 50 °C 保温酶解 6

表 2 pH6 酶解率的测定结果

Table 2 Determination of enzymatic hydrolysis rate under pH6

编号 No.	黄芩苷量 Amount of Baicalin(g)	酶解率 * Enzymatic hydrolysis rate(%)
1	0.924	0.65
2	0.627	30.0
3	0.018	97.8
4	0.016	97.8
5	0.020	97.1
6	0.014	97.9

注: 酶解率 \* = [(表 1 黄芩苷量 - 表 2 黄芩苷量) / 表 1 黄芩苷量] × 100%。

Note: Enzymatic hydrolysis rate \* = [(amount of Baicalin in table 1 - amount of Baicalin in table 2) / 0.952] × 100%.

h<sup>[7,9]</sup>, 离心, 测定上清液中黄芩苷的含量, 计算酶解率, 结果见表 2。

由表 2 可见, pH1 黄芩酶的活性已灭活, pH2 酶的活性大部分失活不可恢复, 综合表 1 结果, 提取黄芩酶液以 pH3 为宜, 不仅能抑制酶的活性, 而且酶活性可恢复。

## 2.5 黄芩水煎提取

### 2.5.1 黄芩粉碎粒度考察

取黄芩适度粉碎, 加水煎煮二次(沸水投料), 第一次加水 12 倍, 第二次加水 10 倍, 每次 1 h, 滤过, 药渣烘干, 过分样筛得到 >5 目、5~10 目、10~20 目、20~40 目、40 目以下的药渣粉末, 测定药渣中残留黄芩苷的含量, 由此计算不同粒度黄芩中黄芩苷的提取率, 结果见表 3。

表 3 黄芩粉碎粒度考察

Table 3 Study on the granulesize of Scutellaria Radix

粒度 Granulesize	>5 目 >5mesh	5~10 目 5~10mesh	10~20 目 10~20 mesh	20~40 目 20~40 mesh	40 目以下 <40 mesh
黄芩苷提取率 Extraction yield of Baicalin(%)	83.4	90.1	90.5	89.6	90.9

由表 3 可见, 5 目以下的黄芩中黄芩苷提取率均大于 90%, 故黄芩应粉碎过 5 目筛。

### 2.5.2 正交实验

(1、2、3 次)、加水量(8、10、12 倍)、煎煮时间(0.5、1、1.5 h)等 3 个因素, 每个因素设计 3 水平, 采用 4 因素 3 水平的正交实验设计 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>), 实验共计 9 种组合, 见表 4 和表 5。

表 4 正交因素水平表

Table 4 Factors and levels of orthogonal design

水平 Levels	因素 Factors		
	(A) 煎煮次数 Times of extraction	(B) 加水量 Amount of water added	(C) 煎煮时间 Extraction duration(h)
1	1	8	0.5
2	2	10	1.0
3	3	12	1.5

表 5 正交实验结果

Table 5 Results of the orthogonal experiment

编号 No.	因素 Factors				黄芩苷提取率 Extraction yield of Baicalin(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	61.4
2	1	2	2	2	68.5

编号 No.	因素 Factors				黄芩苷提取率 Extraction yield of Baicalin(%)
	A	B	C	D	
3	1	3	3	3	72.9
4	2	1	2	3	81.8
5	2	2	3	1	84.9
6	2	3	1	2	91.4
7	3	1	3	2	83.3
8	3	2	1	3	91.2
9	3	3	2	1	92.4
K <sub>1</sub>	202.8	226.5	244.0	238.7	
K <sub>2</sub>	258.1	244.6	242.7	243.2	
K <sub>3</sub>	266.9	256.7	241.1	245.9	
R	21.37	10.07	0.967	2.40	
K <sub>1</sub> <sup>2</sup>	41127.84	51302.25	59536.00	56977.69	
K <sub>2</sub> <sup>2</sup>	66615.61	59829.16	58903.29	59146.24	
K <sub>3</sub> <sup>2</sup>	71235.61	65894.89	58129.21	60466.81	
Qi	59659.69	59008.77	58856.17	58863.58	
SSi	804.93	154.01	1.41	8.82	

表 6 方差分析表

Table 6 Analysis of variance

方差来源 Sources of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	显著性(P 值) Sig. (P value)
A	804.93	2	402.47	157.21	<0.01
B	154.01	2	77.01	30.08	<0.01
Errors C + D	10.23	4	2.56	1	

 $F_{0.01}(2,4) = 18.0$ 

由表 5 可见, C 因素极差小于空白列, 故将 C 因素与空白列合并计算误差。表 6 方差分析结果显示: A 因素和 B 因素有显著性差异。表 5 极差 R 值大小显示, 各因素作用主次为 A > B > C, 以  $A_3B_3C_1$  为佳, 但 A 因素 2 水平、3 水平差异不大, 结合生产实际情况, 从节约能耗, 降低生产成本, 提高

生产效率等方面考虑, 可选次佳水平, 故拟定黄芩提取条件为  $A_2B_3C_1$ 。

### 2.5.3 验证实验

对最佳方案  $A_3B_3C_1$  与拟定方案  $A_2B_3C_1$  进行验证实验, 重复 3 次, 结果见表 7。

表 7 验证实验结果( $n=3$ )Table 7 The result of verification experiment ( $n=3$ )

编号 No.	$A_3B_3C_1$		$A_2B_3C_1$	
	黄芩苷量 Amount of Baicalin(g)	黄芩苷提取率 Extraction yield of Baicalin(%)	黄芩苷量 Amount of Baicalin(g)	黄芩苷提取率 Extraction yield of Baicalin(%)
1	12.11	94.6	11.68	91.3
2	12.05	94.1	11.49	89.8
3	11.99	93.7	11.70	91.4

注: 黄芩中黄芩苷含量为 12.8%。

Note: The content of baicalin in Scutellaria Radix was 12.8%.

由表 7 可见拟定方案  $A_2B_3C_1$  黄芩苷提取率与最佳方案差异不大, 略有降低, 但煎煮次数减少 1 次, 节约水量, 提高生产效率, 此应为最佳方案。即

黄芩加水 12 倍, 煎煮二次, 每次 0.5 h。

综合上述实验结果, 确定黄芩黄酮总苷元的制备方法为: 黄芩药材粉碎过 5 目筛, 加水 10 倍, 调

pH3, 搅拌 0.5 h, 过滤, 得黄芩酶液; 再将药渣投入 12 倍量沸水中, 调 pH6 煎煮两次, 每次 0.5 h, 过滤, 滤液合并, 加入上述黄芩酶液, 调 pH6, 于 50 °C 酶解 6 h。过滤, 取沉淀减压干燥即得黄芩黄酮总苷元提取物。

## 2.6 黄芩黄酮总苷元中试放大验证实验

取黄芩药材 10 kg, 粉碎过 5 目筛, 加水 100 L,

调 pH3, 搅拌 0.5 h, 过滤, 得黄芩酶液; 将药渣投入 120 L 沸水中, 调 pH6 煎煮两次, 每次 0.5 h, 过滤, 滤液合并, 加入上述黄芩酶液, 调 pH6, 于 50 °C 酶解 6 h, 过滤, 取沉淀减压干燥, 即得黄芩黄酮总苷元提取物。测定提取物中黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 的含量<sup>[13]</sup>。上述实验重复 3 次, 结果见表 8。

表 8 黄芩黄酮总苷元提取实验结果

Table 8 Experimental results for the extraction of Scutellaria Radix totalflavone aglycone

序号 No.	收率 Obtaining rate (%)	黄芩素含量 Content of Baicalein(%)	汉黄芩素含量 Content of Wogonin(%)	千层纸素 A 含量 Content of Oroxylin(%)	黄芩素转移率 Transfer rate of Baicalein(%) *
1	11.8	55.8	11.63	4.87	80.3
2	12.1	55.4	11.78	4.95	81.7
3	12.2	53.5	11.52	4.81	79.6

注: \* 黄芩药材中黄芩苷和黄芩素总量以黄芩素计为 8.2%。

Note: \* The total content of baicalin and baicalein in terms of baicalein in Scutellaria Radix was 8.2%.

## 3 讨论

本实验利用黄芩药材自身的黄芩酶, 第一步用 pH3 水搅拌提取黄芩酶液, 仅提取一次得到黄芩酶足以完全酶解药材中的全部苷类成分, 后续采用常规的方法水煎提取, 黄芩酶液和黄芩水煎液合并, 于 pH6、50 °C 酶解得到黄芩黄酮总苷元沉淀, 该方法不仅黄芩素提取转移率高, 而且产品纯度高, 三种苷元成分的总量达 70%, 显著优于以前报道的先酶解黄芩药材, 再用乙醇提取, 回收乙醇水沉得到的黄芩黄酮苷元的方法<sup>[7]</sup>。上述 pH3 水提取黄芩酶液, 不仅能抑制了酶的活性, 减少提取过程中黄芩苷酶解为黄芩素, 而且能保存酶的活性可恢复。该方法生产过程中不再使用乙醇, 也不添加外源活性酶, 生产工艺简便, 成本低, 具有产业化应用推广价值。

## 参考文献

- Xu YT (徐玉田). Research development on composition and modern pharmacology of *Sastellaria Baicalensis*. *Guangming TCM* (光明中医), 2010, 25:544-545.
- Gao Y(高燕), Gu ZL(顾振纶), Jiang XG(蒋小岗), et al. New progress of baicalein pharmacological. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 21:1765-1767.
- Motoo Y, Sawabu N. Antimoreffects of saikoasponins baicalin and bacalein on human hepatomacellines. *Cancer Lett*, 1994, 86:91.
- Zhou YJ, Che QM, Xu SX, et al. Metabolites of baicalein in human urine. *Die Pharmazie*, 2000, 55:626-627.
- Jiang JJ(蒋建军), Dong HR(董慧茹). Preparation and characterization of high purity of baicalein. *J Beijing*
- Univ Chem Tech (北京化工大学学报), 2008, 35:31-34.
- Xu M(许闽), Xiao GS(肖功胜), Yang Y(杨云), et al. Study on the prepared process for baicalein. *Chin Prac Med* (中国实用医药), 2008, 3:3-4.
- Liu YH(刘云华), Huang ZF(黄志芳), Chen Y(陈燕), et al. Extraction of baicalein in *scutellaria baicalensis* by enzymedissolution. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19:688-691.
- Liu ZG(刘志刚), Yan RL(颜仁梁), Xu CR(徐昌瑞), et al. Study On Technology for Autogogenesis-enzyme Hydrolysis Total Flavonoid Glycoside in *Scutellaria*. *Pham J Chin PLA* (解放军药学学报), 2008, 24:130-132.
- Zhou J(周健), Du YF(杜永峰), Zhang WG(张文广). A new method of preparing baicalein. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2009, 30:1825-1827.
- Wang HZ(王宏志), Yu CH(喻春皓), Gao J(高钧), et al. Enzymatic extraction of baicalein and wogonin from *Radix Scutellariae*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2007, 30:851-854.
- Shi CY(施春阳), Qi XJ(齐香君), Zhang H(张珩). Research of enzymatic extraction technique of baicalein. *J Northwest Pharm* (西北药学杂志), 2011, 26:408-409.
- Zhang M(张敏). Studies on the purification characterization and application of Baicalin Glucosidase. Jinan: Shangdong University(山东大学), PhD. 2008.
- Peng YL(彭易兰), Liu YH(刘云华), Huang ZF(黄志芳), et al. Determination of total flavonoids and three main components in *Scutellariae Radix* total flavone aglycone extract by Ultraviolet Spectrophotometry and High-performance Liquid Chromatography. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:1210-1214.