

淫羊藿药渣总黄酮提取工艺研究

贺灵芝¹ 邹青¹ 李翔¹ 彭栋梁² 通讯作者

1. 湖南环境生物职业技术学院, 中国·湖南 衡阳 421005

2. 古汉中药有限公司, 中国·湖南 衡阳 421008

【摘要】为了高效合理利用淫羊藿资源,以总黄酮提取率为考察指标,通过单因素实验和正交实验,确定了超声波辅助提取总黄酮的最佳工艺。结果表明:从淫羊藿药渣中提取黄酮的温度为60℃、时间为40min、乙醇浓度为80%、料液比为1:25,总黄酮得率为3.68%。超声辅助提取淫羊藿药渣中总黄酮的工艺操作简单、能耗低,损失少,可减少环境污染、减少中药资源浪费。

【关键词】淫羊藿; 药渣; 黄酮; 提取工艺

【基金项目】湖南省教育厅科学研究项目(20C0688); 衡阳市指导性计划项目(2020jh042695); 湖南环境生物职业技术学院支柱工程项目(2019)33号。

引言

淫羊藿是小檗科淫羊藿属的多年生草本植物,其味辛、甘、性温,有补肾阳、强筋骨、祛风湿等功效^[1]。随着科技进步,技术革新,中药开发速度不断加快,淫羊藿与其他中药材一样,许多药用价值和临床功效被不断挖掘,这势必带来巨大的经济效益和社会效益。但是,由此而产生的中药渣也日益增加,对产家、社会和生态环境造成的压力也日益严峻。有资料显示,每年排放的中药渣已达 3.0×10^7 吨以上^[2],且逐年递增,这势必带来严重的社会问题和环境问题。国家早在“十二五”规划中明确指出,要对传统名贵中药进行二次开发、技术改造和临床应用再评价研究^[3]。淫羊藿作为名贵中药,生理活性明显,是多种中药产品中的重要组成成分。但其在我国实际加工生产中大多处于粗加工水平,提取过程中存在只提取某一部位的某一化学成分,提取技术单一或提取效率低等问题^[4]。淫羊藿中的主要功能活性成分为黄酮类化合物,具有抗氧化、抗骨质疏松、抗衰老等作用,其含量已成为衡量淫羊藿药材原料品质的重要指标。目前淫羊藿总黄酮在工业上主要使用水提法,提取后剩余药渣部分往往被丢弃。对水提后的淫羊藿药渣进行再提取,可为药材利用率提供一定的实验研究基础。淫羊藿总黄酮的常用提取方法有回流法、水煎法、渗漉法、醇提水沉法、水提醇沉法、超声波提取法等^[5]。与其他方法相比,超声波辅助提取法具有提取时间短、有效成分不易破坏、提取率高等优点。本实验以某上市中药公司产品生产过程中产生的淫羊藿药渣为研究对象,以淫羊藿药渣总黄酮类化合物提取率为考察指标,通过单因素实验和正交试验考察了不同提取溶剂及浓度体积、液料比、超声时间、超声温度等因素对提取效果的影响,优选出最佳的超声波辅助提取工艺条件,以期找出最简单,提取效率最高的总黄酮类化合物提取方法,以促进淫羊藿的进一步合理开发和利用。

1 材料与方法

1.1 主要药材、试剂及仪器

淫羊藿药渣:3月份取自于古汉中药有限公司,产地新疆,经古汉中药有限公司彭栋梁高级工程师鉴定为小檗科植物朝鲜淫羊藿药渣。将淫羊藿药渣55℃烘干至恒重,用粉碎机粉碎并过20目筛后置于密闭容器中,避光保存,备用。

试剂:甲醇、乙醇(分析纯)、氢氧化钠、盐酸镁粉、乙酸乙酯、正丁醇、氯化铁、纯化水、芦丁标准品。

仪器:TU-1810紫外-可见分光光度计,购自北京普析通用仪器有限公司;A124分析天平,购自湖南轩彩科学仪器有限公司;KQ-100B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、圆底烧瓶、抽滤器。

1.2 实验方法

1.2.1 超声波辅助提取法

精密称取淫羊藿药渣碎,加入有机溶剂,按照设定条件经超声波辅助提取并抽滤,收集提取液。

1.2.2 定性分析

参考文献实验方法验证黄酮类物质的存在^[6],取提取液用不同溶剂萃取后分别使用1mol/L NaOH、FeCl₃及盐酸镁粉进行显色反应并做空白实验。

1.2.3 总黄酮的含量测定

采用紫外分光光度法测定,以淫羊藿苷为标准样品为标准,绘制出总黄酮标准曲线,用乙醇体系,于510nm处吸光度测定并计算出淫羊藿药渣中总黄酮含量。

总黄酮含量计算公式为:含量(%)= $\frac{A}{E_{1cm}^{1\%}} \cdot 100 \cdot C_{样} \times 100\%$
式中 $E_{1cm}^{1\%}$ 是当吸光物质溶液浓度为1%(1g/100mL),液层厚度为1cm时,一定条件下的吸收度。

1.2.4 单因素试验

精密称取120℃减压干燥至恒重的5.0g淫羊藿药渣3份于圆底烧瓶中,在其他因素一定的情况下,分别以不同提取温度、提取时间、乙醇浓度和料液比进行超声提取,趁热抽滤得滤液。量取1mL滤液,用50%甲醇定容至10mL,按标准曲线方法显色,于510nm处测定吸光度值,平行测试3次,取平均值,计算总黄酮含量。

1.2.5 正交试验

试验因素与水平表设计根据单因素实验结果,选择超声温度(A)、超声时间(B)、乙醇浓度(C)、料液比(D)为自变量,以淫羊藿药渣中总黄酮提取率为评价指标,采用L₉(3⁴)正交试验优化淫羊藿药渣总黄酮提取工艺参数,正交实验因素水平设计如表1所示。

表1 正交试验因素水平表

因素水平	A超声温度(℃)	B超声时间(min)	C乙醇浓度(%)	D料液比(mg/ml)
1	55	35	60	1:20
2	60	40	70	1:25
3	65	45	80	1:30

2 结果与分析

2.1 定性分析结果

按照1.2.1中操作方法,分别取各条件下的提取液用乙酸乙酯萃取滤液后,加1-2滴下列试剂,做定性分析结果如下表

表2 定性分析结果

试剂	NaOH(1mol/L)	NaOH(1mol/L)	FeCl ₃	盐酸镁粉
淫羊藿药材提取液	黄色(乙酸乙酯萃取)	黄色(正丁醇萃取)	绿色	橙红色
淫羊藿药渣提取液	黄色(乙酸乙酯萃取)	黄色(正丁醇萃取)	绿色	橙红色
空白对照(乙醇)	无色	无色	无色	无色

以上反应均呈阳性,证明淫羊藿原药材和淫羊藿药渣提取液中均存在黄酮类化合物。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 提取温度对总黄酮物含量提取的影响

按超声时间 40min, 乙醇浓度 60%, 料液比 1:20, 超声功率 100W 于不同的提取温度下提取淫羊藿药渣中总黄酮。如图 2a 所示, 在 50-60℃ 之间, 提取率随着温度的升高而增加, 当温度为 60℃ 时提取率最高, 随后下降。说明随着提取的温度升高, 分子之间运动激烈, 有利于总黄酮随着有机溶剂渗出; 而当温度过高时, 淫羊藿药渣中总黄酮溶出量减少。出现该现象的可能原因是, 首先高温下乙醇溶液蒸发得更快, 乙醇浓度过高不利于黄酮渗出; 另外温度过高时会破坏黄酮的化学结构, 导致提取率下降。因此, 淫羊藿药渣中总黄酮的提取温度最好控制在 60℃。

2.2.2 超声时间对总黄酮物含量提取的影响

按超声温度 60℃, 乙醇浓度 60%, 料液比 1:20, 超声功率 100W 于不同的提取时间下提取淫羊藿药渣中总黄酮。如图 2b 所示, 淫羊藿药渣中总黄酮的提取率随着超声提取时间的延长而增高, 提取率在 35min 时达到最大值 3.69%, 随后时间延长提取率逐渐下降, 提取率在 45min 之后逐渐变得平稳。可能原因是提取时间较短时, 淫羊藿药渣中总黄酮并没有完全提取, 所以时间增长提取率增大; 然而加热时间较长时可能破坏黄酮的化学结构而导致淫羊藿药渣中总黄酮提取率下降, 因此淫羊藿药渣中总黄酮的超声提取时间最好控制在 40min。

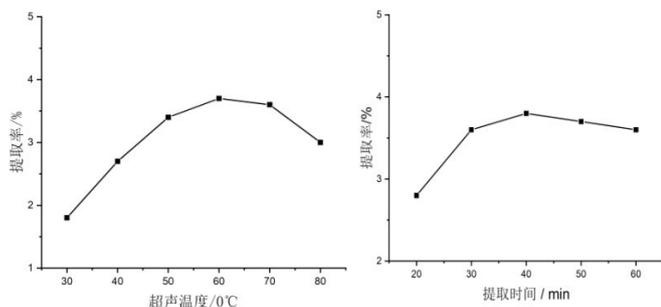


图1 超声温度(a) 超声时间(b)对总黄酮物含量提取的影响

2.2.3 乙醇浓度对总黄酮物含量提取的影响

按超声提取温度 60℃, 提取时间 35min, 料液比 1:20, 超声功率 100W 于不同的乙醇浓度下提取淫羊藿药渣中总黄酮。如图 3a 所示, 在乙醇浓度为 40%-80%, 淫羊藿药渣中总黄酮提取率随着乙醇体积分数的提高而逐渐增大, 当乙醇浓度为 80% 时淫羊藿药渣中总黄酮提取率达到最大值 3.98%, 随后提取率增加缓慢。根据“相似相溶”原理, 淫羊藿药渣中总黄酮的极性与 80% 乙醇极性相似, 所以在乙醇浓度为 80% 时提取率最大; 乙醇体积分数为 90% 时提取液中所含色素较多, 会干扰测定。因此淫羊藿药渣中总黄酮的超声提取乙醇浓度以 70%~90% 之间为宜。

2.2.4 料液比对总黄酮物含量提取的影响

按超声提取温度 60℃, 提取时间 35min, 乙醇浓度 80%, 超声功率 100W 于不同的料液比下提取淫羊藿药渣中总黄酮。如图 3b 所示, 在料液比为 1:5~1:20 之间, 淫羊藿药渣中总黄酮提取率随乙醇量增加而不断增大, 在料液比为 1:20 时, 淫羊藿药渣中总黄酮提取率达到最大 3.97%。然后随着料液比的增大呈现

逐渐下降的趋势, 原因可能为乙醇量增加可增大黄酮类物质与溶剂的接触面, 故总黄酮提取率会增大; 但当乙醇达到一定量后, 物料与溶剂量的比例达到饱和状态, 此时再增加溶剂的量对提取率影响不大, 反而会使细胞内外浓度差降低使提取率下降。因此, 淫羊藿药渣中总黄酮的超声提取料液比应控制在 1:15~1:25 之间为宜。

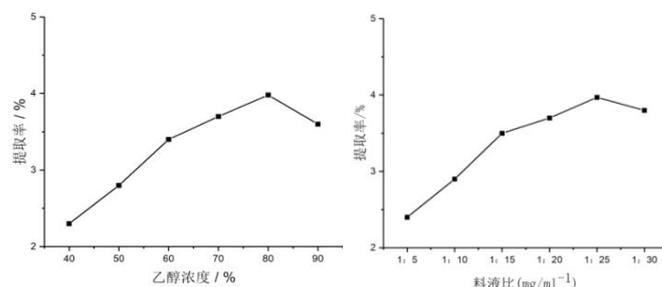


图2 不同乙醇百分比浓度(a) 料液比(b)对总黄酮物含量提取的影响

2.3 正交实验结果

由正交试验结果可知, 各因素影响淫羊藿药渣中总黄酮提取的主次顺序为: 提取时间>料液比>乙醇浓度>提取温度, 提取最优组合为 A2B2C3D1, 结合单因素实验结果, 淫羊藿药渣中总黄酮提取最优的实验方案为: 提取温度为 60℃, 料液比 1:20, 乙醇体积分数为 80%, 提取时间 40min, 在最优实验方案下, 重复超声提取 6 次取平均值, 得淫羊藿药渣中总黄酮提取率可达到 3.68%。

3 结论

本研究以古汉养生精中淫羊藿药渣为研究对象, 以乙醇为提取溶剂, 采用超声波辅助提取工艺, 通过单因素及正交实验得到最优提取工艺条件为: 提取温度 60℃、提取时间 40min、乙醇体积分数为 80%、料液比 1:20, 在此条件下淫羊藿药渣总黄酮提取率可达 3.68%。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 340.
- [2] 袁琪, 李伟东, 郑艳萍, 金俊杰, 李霜. 中药渣的深加工及其资源化利用[J]. 生物加工过程, 2019, 17(02): 171-176.
- [3] 刘焕焕, 郭枫, 许文迪, 等. 基于生物发酵技术的中药药渣开发应用研究进展[J]. 中国酿造, 2017, 36(4): 6-9.
- [4] Zhou M, Zheng W, Sun X.G, et al. Comparative analysis of chemical components in different parts of Epimedium Herb[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021 (prepublish).
- [5] 张华峰, 杨晓华. 淫羊藿的生物活性成分及其开发策略研究[J]. 中草药, 2010, 41(02): 329-332.
- [6] 张俊生, 陈莉华, 汤小虎. 淫羊藿总黄酮的超声辅助提取及其抗氧化活性[J]. 生物加工过程, 2012, 10(1): 13 - 18.

作者简介:

贺灵芝(1985-)女, 汉族, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物的开发与应用。

通讯作者:

彭栋梁(1974-), 男, 汉族, 湖南岳阳人, 高级工程师, 研究方向: 天然药物的开发与生产。