

微波辐射对淫羊藿朝藿定 B 提取的影响

张华峰^{1,2}, 杨晓华^{2,3*}

1. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062

2. 中国科学院武汉植物园, 湖北 武汉 430074

3. 西安交通大学医学院, 陕西 西安 710061

摘要:目的 研究微波辐射对淫羊藿朝藿定 B 提取的影响。方法 采用单因素试验逐一考察提取溶剂、料液比、微波辐射时间对朝藿定 B 提取率的影响; 采用紫外-可见分光光度法考察微波辐射对朝藿定 B 稳定性的影响; 采用石蜡切片方法研究微波辐射对淫羊藿材料的影响。**结果** 乙醇体积分数和微波辐射时间对提取率的影响较大, 料液比影响较小。微波辐射能引起叶片组织等的破损, 但不会影响朝藿定 B 的稳定性。**结论** 微波辐射能够提升提取效果, 其机制可能是微波辐射促进了乙醇溶液进入叶片组织和朝藿定 B 溶出叶片组织的传质过程。

关键词: 微波辐射; 淫羊藿; 朝藿定 B; 提取; 传质过程

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1719-05

Effects of microwave radiation on extraction of epimedin B from *Epimedium Folium*

ZHANG Hua-feng^{1,2}, YANG Xiao-hua^{2,3}

1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

2. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China

3. School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: Objective To investigate the influence of microwave radiation on the extraction of epimedin B from *Epimedium Folium*.

Methods The effects of extraction solvent, ratio of material to liquor, and duration of microwave radiation on the extraction yield of epimedin B were studied by single factor tests. The influence of microwave radiation on the stability of epimedin B was assessed by UV-Vis spectrophotometric analysis. The impacts of microwave radiation on leaf sample were observed using paraffin section method. **Results** The contributions of ethanol concentration and duration of microwave radiation for the extraction yield of epimedin B are significant, whereas ratio of material to liquor is not a significant factor. Microwave radiation could result in the disruptions of leaf tissues and other parts, but it did not affect the stability of epimedin B. **Conclusion** Microwave radiation could facilitate the extraction of epimedin B, which might result from the enhancement of the mass transfer of ethanol solution into leaf tissues and dissolution of epimedin B from the matrix.

Key words: microwave radiation; *Epimedium Folium*; epimedin B; extraction; mass transfer

淫羊藿是我国应用历史最悠久的中草药之一, 常被用来治疗骨质疏松症^[1-4]。淫羊藿的骨质疏松症防治功效与其黄酮类化合物有关, 其中朝藿定 B 是具有显著药理活性的黄酮醇糖苷, 有望成为新型骨质疏松症防治药物或食品添加剂^[5-6]。骨质疏松症是老龄化社会的常见疾病^[7-9], 研究淫羊藿中朝藿定 B 的提取可为新型药物或食品添加剂的开发, 以及淫

羊藿药材质量控制体系的完善提供参考, 具有一定的社会效益和经济效益。微波辅助提取是中药活性成分提取的重要技术。同传统的索氏提取法相比, 微波提取法具有提取时间短、提取率高、选择性好、提取溶剂用量少等优点^[10]; 同超临界 CO₂ 流体萃取法相比, 微波提取法操作简单, 成本较低^[11]。陈燕芬等^[12]研究了微波技术在淫羊藿苷提取中的应用。

收稿日期: 2010-12-06

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (GK200902043); 大学生创新性实验计划项目 (101071817)

作者简介: 张华峰 (1975—), 男, 陕西华县人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药用植物资源开发与利用研究。

Tel: (029)85310517 E-mail: isaacsau@sohu.com

*通讯作者 杨晓华 Tel: (029)82657505 E-mail: xhyang@mail.xjtu.edu.cn

黄瑞华等^[13]在淫羊藿浸膏和淫羊藿苷的微波辅助提取方面开展了大量研究工作,建立了淫羊藿苷的微波提取中试工艺。Chen 等^[14]优化得到了淫羊藿黄酮类化合物的动态微波提取工艺(dynamic microwave assisted extraction),其提取率高于超声波提取法和索氏提取法,并且提取时间大幅缩短。本实验研究微波辐射对淫羊藿中朝藿定 B 提取效果的影响,分析微波辐射下朝藿定 B 的稳定性,并探讨微波辐射对淫羊藿材料的影响,以期对朝藿定 B 微波提取工艺的优化及提取机制的阐明提供依据。

1 仪器与材料

微波提取设备由市售微波炉改装而成(微波频率为 2 450 kHz,最大输出功率为 800 W)。美国 Agilent 1100 Series 高效液相色谱(HPLC)仪,配备 Agilent Rev. A.10.02 工作站、G1313A 自动进样器、G1311A 四元梯度泵和 G1314A 可变波长紫外检测器。美国 Lambda 45 紫外-可见分光光度计。德国 Eppendorf 台式高速大容量离心机。国产石蜡切片机。日本 Olympus CKX41 显微镜,配备 Olympus E-330-ADUIX 数码相机。

淫羊藿药材经中国科学院武汉植物园张学军助理研究员鉴定为朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 的叶片。不同批次叶片采摘后按照文献方法^[15]进行预处理,制成淫羊藿样品,备用。朝藿定 B 对照品(质量分数≥98%)购自美国 Chromadex 公司。超纯水用美国 Millipore 公司超纯水器制备。乙腈为 HPLC 级(美国 Fisher 公司)。乙醇、冰乙酸等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 朝藿定 B 的提取

2.1.1 微波提取法 取一定量淫羊藿样品倾入玻璃瓶中,加入适量提取溶剂后摇匀,在微波提取设备中进行微波辐射提取(如果微波辅助提取过程中溶剂挥发损失,提取结束后应当补足减失的溶剂)。而后 3 250×g 离心 10 min,上清液用 0.45 μm 滤膜滤过后即得提取液,再经大孔吸附树脂色谱和真空干燥等处理后得朝藿定 B 粗品。

2.1.2 加热提取法 取淫羊藿样品倾入玻璃瓶中,按照料液比 1:10 与 50%乙醇混匀,水浴加热提取 14 min(若提取过程中溶剂挥发损失,则提取结束后补足减失的溶剂)。离心、滤过得提取液,进一步色谱、干燥后即得朝藿定 B 粗品。

2.2 朝藿定 B 的定量分析^[15-16]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB-C₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-1%乙酸溶液(B),梯度洗脱:0~10 min, 20% A; 10~40 min, 20%~25% A; 40~42 min, 25%~50% A; 42~60 min, 50%~20% A; 体积流量 1 mL/min,检测波长 270 nm,进样量 5 μL。

2.2.2 线性关系考察 用 50%乙醇溶液配制质量浓度分别为 6.6、11.0、22.0、33.0、44.0、55.0 mg/L 的朝藿定 B 对照品溶液,经 HPLC 分析后以峰面积对质量浓度进行线性回归,得回归方程 $Y=7.458X+6.210$ ($r=0.9993$),线性范围为 6.6~55.0 mg/L。

2.2.3 样品测定 取淫羊藿提取液适量,过 0.22 μm 微孔滤膜后进样测定,根据所得朝藿定 B 的质量浓度,计算出朝藿定 B 的提取率。

2.3 微波辐射对朝藿定 B 提取的影响

2.3.1 提取溶剂 朝藿定 B 是极性化合物,易溶于甲醇、乙醇等溶剂。溶剂吸收微波能量的能力可以用耗散因子来表示,它是介电损耗与介电常数之比^[10]。甲醇具有较高的耗散因子,能吸收较多的微波能量并转化成热能^[14],但是毒性较大,应当尽量避免用于制药和食品工业^[17]。鉴于此,本实验在固定料液比 1:100,微波辐射时间 3 min 的条件下,探讨了乙醇、水、乙醇水溶液对朝藿定 B 提取的影响,结果见表 1。在乙醇体积分数 0~70%时,朝藿定 B 的提取率随着乙醇体积分数的增加而升高;当乙醇体积分数为 70%时提取率最高;超过 70%时提取率降低。这可能是因为 70%乙醇溶液的溶剂-溶质亲和力高于其他体积分数的乙醇溶液^[18]。当乙醇体积分数达到 70%以上时提取液呈绿色,提示提取液中可

表 1 提取溶剂对淫羊藿中朝藿定 B 提取效果的影响 ($n=3$)

Table 1 Effect of extraction solvent on extraction yield of epimedin B from *Epimedium Folium* ($n=3$)

乙醇/%	提取液颜色	提取率/(mg·g ⁻¹)
0	淡黄	1.31
10	淡黄	1.44
30	淡黄	1.57
40	淡黄	1.60
70	浅绿	1.62
80	深绿	1.43
90	深绿	1.35
100	深绿	0.95

能含有较多的叶绿素杂质(朝藿定 B 对照品溶于乙醇溶液时呈无色), 这样可能增加朝藿定 B 纯化或精制环节的难度。光学显微镜观察显示, 淫羊藿材料经微波辐射后叶绿体结构可能受到破坏, 叶绿素可能溶出, 这可能是提取液呈现绿色的原因。综上所述, 将乙醇体积分数控制在 40%~70%较为合适。

2.3.2 料液比 对常规溶剂提取技术(加热提取法)和超声波提取法来说, 料液比越小, 提取率往往越大^[15]。但在朝藿定 B 的微波辅助提取过程中, 当固定提取溶剂为 40%乙醇, 微波辐射时间 3 min, 料液比在 1:10~1:100 时, 朝藿定 B 的提取率却随着料液比的减小而逐渐降低(表 2)。这可能是由于提取溶剂体积过大时, 搅拌混匀效果变差, 不利于淫羊藿与乙醇溶液的充分接触, 以及朝藿定 B 的有效溶出或扩散。由表 2 可见, 当料液比为 1:10 时, 提取率最高。

表 2 料液比对淫羊藿中朝藿定 B 提取效果的影响 (n=3)
Table 2 Effect of material-liquor ratio on extraction yield of epimedini B from *Epimedium Folium* (n=3)

料液比	提取率/(mg·g ⁻¹)	料液比	提取率/(mg·g ⁻¹)
1:10	0.71	1:40	0.60
1:20	0.70	1:50	0.58
1:30	0.64	1:100	0.56

2.3.3 微波辐射时间 固定提取溶剂为 40%乙醇, 料液比为 1:10 时, 微波辐射时间对朝藿定 B 的提取率具有较大的影响。在 1~10 min, 提取率随着微波辐射时间的延长而快速增加; 在 10~15 min, 提取率升高速率变慢(表 3)。从提取效率角度考虑, 微波辐射时间以不超过 15 min 为宜。

2.3.4 微波辐射最佳提取工艺的确定 为了统筹考虑多种因素的综合效应, 在单因素试验基础上采用 3 因素 3 水平正交试验进一步探讨了微波辐射对淫羊藿中朝藿定 B 提取的影响(表 4), 得出的适宜提

表 3 微波辐射时间对淫羊藿中朝藿定 B 提取效果的影响 (n=3)

Table 3 Effect of duration of microwave radiation on extraction yield of epimedini B from *Epimedium Folium* (n=3)

t / min	提取率/(mg·g ⁻¹)	t / min	提取率/(mg·g ⁻¹)
1	1.27	5	1.67
2	1.40	10	2.21
3	1.66	15	2.30

取工艺为: 乙醇体积分数为 50%、料液比 1:10、微波辐射时间 14 min。方差分析显示, 乙醇体积分数对提取率的影响最大, 微波辐射时间次之, 料液比的影响最小(表 5)。

表 4 正交试验设计与结果
Table 4 Design and results of orthogonal test

序号	乙醇/%	料液比	微波辐射时间/min	提取率/(mg·g ⁻¹)
1	40 (1)	1:10 (1)	8 (1)	0.73
2	40 (1)	1:15 (2)	12 (2)	0.86
3	40 (1)	1:20 (3)	14 (3)	1.19
4	45 (2)	1:10 (1)	12 (2)	1.53
5	45 (2)	1:15 (2)	14 (3)	1.28
6	45 (2)	1:20 (3)	8 (1)	0.96
7	50 (3)	1:10 (1)	14 (3)	2.11
8	50 (3)	1:15 (2)	8 (1)	1.41
9	50 (3)	1:20 (3)	12 (2)	1.93
K ₁	2.78	4.37	3.10	
K ₂	3.77	3.55	4.32	
K ₃	5.45	4.08	4.58	
R	2.67	0.82	1.48	

表 5 正交试验方差分析

Table 5 Variance analysis of orthogonal test

变差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
乙醇体积分数	1.215	2	0.607	143.457	0.01
料液比	0.115	2	0.058	13.614	0.07
微波辐射时间	0.416	2	0.208	49.165	0.02
误差	0.008	2	0.004		
总和	1.755	8			

2.3.5 微波提取法与加热提取法的比较 为了验证理论分析得出的适宜提取工艺的可靠性并评价微波提取法对朝藿定 B 的提取效果, 本试验比较了微波提取法和加热提取法在相同提取条件(提取溶剂为 50%乙醇, 料液比为 1:10, 提取时间 14 min)下的提取率, 结果分别为 2.00、2.13、2.20 mg/g 和 1.81、1.76、1.98 mg/g, 可见微波提取法的提取率显著高于加热提取法 (P<0.05)。

2.4 微波辐射对朝藿定 B 稳定性的影响

微波是频率介于 0.3~300 GHz 的电磁辐射, 对某些黄酮类化合物的化学反应具有明显的促进作用^[19], 可能引起目标化合物的转化或降解^[10, 20]。研

究微波辅助提取过程中微波辐射对目标化合物稳定性的影响,有助于评价和优化微波提取工艺,但是以往的相关研究很少对此进行探讨。为了考察微波辐射朝藿定 B 的稳定性,取朝藿定 B 对照品溶液 1 mL,用 50%乙醇定容至 10 mL,微波辐射 14 min 后测定朝藿定 B 的量,并采用紫外-可见分光光度计扫描 200~400 nm 波长的吸收光谱。结果发现微波辐射前后溶液中朝藿定 B 的量无显著变化,吸收光谱也未见明显变化,提示在本实验确定的提取条件下微波辐射不会明显改变或破坏朝藿定 B 的化学结构,即不会影响朝藿定 B 的稳定性。

2.5 微波辐射对淫羊藿材料的影响

研究微波辐射对淫羊藿材料的效应,不仅有助于微波提取工艺的优化,而且有助于微波提取机制的揭示。将微波辐射前后的淫羊藿材料参照 Aguilera 等^[21]的方法制成石蜡切片。光学显微镜观察发现,微波辐射(提取)前淫羊藿叶片组织结构完整,细胞排列整齐有序,细胞结构完整(无损伤),细胞中叶绿体数目较多;而微波辐射后叶片组织出现少许裂隙,细胞的排列方式也略显杂乱,细胞中叶绿体的数目有所减少(图 1)。说明微波辐射能使淫羊藿叶片组织受到损伤,并可能使叶绿体也受到损伤,导致其结构遭到破坏直至解体,从而引起叶绿素的流失。微波辐射引起的淫羊藿叶片组织和某些细胞器的破损,可能对提取溶剂(乙醇溶液)进入淫羊藿材料和目标化合物(朝藿定 B)溶出药材的传质过程起到一定的促进作用。

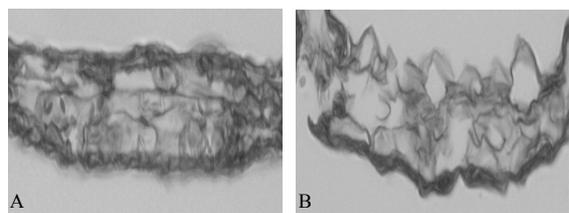


图 1 微波辐射前(A)、后(B)淫羊藿材料的光学显微镜观察

Fig. 1 Light micrographs of *Epimedium Folium* sample before (A) and after (B) microwave radiation

3 讨论

在采用微波技术提取淫羊藿中朝藿定 B 的过程中,提取溶剂(乙醇溶液)体积分数和微波辐射时间对提取率的影响较大,料液比的影响较小。本研究优选的微波提取工艺能够使淫羊藿叶片组织甚至某些细胞器受到损伤,而不会影响朝藿定 B 的稳定

性。微波辐射提升朝藿定 B 提取效果的机制可能是微波辐射引起叶片组织等的破损,从而促进了乙醇溶液进入叶片组织和朝藿定 B 随乙醇溶液溶出叶片组织的传质过程。微波辐射强化朝藿定 B 提取的详细机制尚待进一步探讨。

致谢:部分研究工作得到中国科学院资助,以及王瑛研究员及朱海涛、卢大炎、赵丽东、董静洲、郑建武等的帮助。

参考文献

- [1] Zhang G, Qin L, Hung W Y, *et al.* Flavonoids derived from herbal *Epimedium brevicornum* Maxim. prevent OVX-induced osteoporosis in rats independent of its enhancement in intestinal calcium absorption [J]. *Bone*, 2006, 38(6): 818-825.
- [2] Kovačević N, Čolić M, Backović A, *et al.* Immunomodulatory effects of the methanolic extract of *Epimedium alpinum* *in vitro* [J]. *Fitoterapia*, 2006, 77(7/8): 561-567.
- [3] 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(2): 329-332.
- [4] 陈彦, 贾晓斌, Hu M. Caco-2 细胞单层研究淫羊藿黄酮类成分的吸收转运 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 220-224.
- [5] Zhang D W, Cheng Y, Wang N L, *et al.* Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(1/2): 55-61.
- [6] Meng F H, Li Y B, Xiong Z L, *et al.* Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim. [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(3): 189-193.
- [7] Rodan G A, Martin T J. Therapeutic approaches to bone diseases [J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1508-1514.
- [8] Kates S L, Kates O S, Mendelson D A. Advances in the medical management of osteoporosis [J]. *Injury*, 2007, 38(Suppl 3): S17-S23.
- [9] 马亚兵, 高海青, 刘新春, 等. 骨质疏松症预防与治疗的循证医学研究 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 135-139.
- [10] Chen Y, Xie M Y, Gong X F. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum* [J]. *J Food Eng*, 2007, 81(1): 162-170.
- [11] Wang L J, Weller C L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants [J]. *Trends Food Sci Technol*,

- 2006, 17(6): 300-312.
- [12] 陈燕芬, 冯 怡, 洪宋贞, 等. 微波技术提取中药淫羊藿的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(20): 1625-1626.
- [13] 黄瑞华, 韩 伟, 周永传, 等. 微波辅助提取淫羊藿苷的中试研究 [J]. 中成药, 2004, 26(7): 525-528.
- [14] Chen L G, Jin H Y, Ding L, *et al.* Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Herba Epimedii* [J]. *Sep Purif Technol*, 2008, 59(1): 50-57.
- [15] Zhang H F, Yang X H, Zhao L D, *et al.* Ultrasonic-assisted extraction of epimedin C from fresh leaves of *Epimedium* and extraction mechanism [J]. *Innovat Food Sci Emerg Technol*, 2009, 10(1): 54-60.
- [16] 张华峰, 高 翔, 卢大炎, 等. HPLC 法同时测定淫羊藿中朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷的含量 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(2): 198-201.
- [17] Hemwimol S, Pavasant P, Shotipruk A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* [J]. *Ultrason Sonochem*, 2006, 13(6): 543-548.
- [18] Li H Z, Pordesimo L, Weiss J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans [J]. *Food Res Int*, 2004, 37(7): 731-738.
- [19] Ghani S B A, Weaver L, Zidan Z H, *et al.* Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(2): 518-522.
- [20] Zhao L, Zhao G, Chen F, *et al.* Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-*E*)-astaxanthin [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(21): 8346-8351.
- [21] Aguilera J M, Escobar G A, Delvalle J M, *et al.* Ethanol extraction of red peppers: kinetic studies and microstructure [J]. *Int J Food Sci Technol*, 1987, 22(3): 225-232.

《药物评价研究》征稿与征订启事

《药物评价研究》(原《中文科技资料目录·中草药》)杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级药学科技学术性期刊, 双月刊, 国内外公开发刊。桑国卫院士为名誉主编, 刘昌孝院士任编委会主任委员, 汤立达研究员为主编。

办刊宗旨: 报道药物评价工作实践, 推动药物评价方法研究, 开展药物评价标准或技术探讨, 促进药物评价与研究水平的提高, 为广大药物研究人员提供交流平台。

内容与栏目: 针对药物及其制剂的评价规范以及药学评价、安全性评价、药效学评价、药物代谢动力学评价、临床评价、上市药物评价等评价研究的内容, 设置论坛、综述、方法学研究、试验研究(论著)、审评规范、国外信息、专题 7 个栏目。

读者对象: 药品管理、新药研发、药物临床应用、药学教育等相关的高等院校、科研院所、CRO 组织、生产企业、药品管理与审评机构的研究人员、管理人员、临床医生和研究生等。

本刊的创办填补了药物评价领域期刊的空白, 将为我国广大药物研究人员提供一个交流的平台, 通过交流药物评价工作的实践经验, 发展和完善评价的方法学, 探讨评价相关的国际标准或指南, 提高我国的总体评价研究水平。

欢迎广大作者积极投稿, 广大读者踊跃订阅! 本刊自办发行, 订阅请直接与编辑部联系! 本刊热忱与中外制药企业合作, 宣传推广、刊登广告(包括处方药品广告)。

本刊已正式开通网上在线投稿、审稿、查询系统, 欢迎广大读者、作者、编委使用!

《药物评价研究》编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号 (300193)

电话/传真: 022-23006822

E-mail: der@tiprpress.com

帐号: 441140100100081504

网址: www.中草药杂志社.中国

www.tiprpress.com

开户银行: 兴业银行天津南开支行

户名: 天津中草药杂志社