

网络出版时间:2015-09-09 15:41

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.10.024

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150909.1541.048.html

中心组合设计-响应曲面法优化淫羊藿苷 超声波提取工艺

侯莹莹¹,赵 岩¹,唐国胜¹,郭 帅¹,韩玲玲¹,
李学军²,张志东²,杨 鹤¹,刘双利¹,张连学¹

(1 吉林农业大学 中药材学院,吉林 长春 130118;2 康美新开河(吉林)药业有限公司,吉林 集安 134200)

[摘 要] **【目的】**采用中心组合设计-响应面法优化淫羊藿苷的超声波提取工艺。**【方法】**在单因素试验的基础上采用中心组合设计方法,研究了乙醇用量、超声提取时间、液(mL)固(g)比及其交互作用对淫羊藿苷提取率的影响。**【结果】**通过岭脊分析确定的淫羊藿苷最优提取条件为:乙醇体积分数 68%、超声提取时间 23 min、液(mL)固(g)比 32:1,该条件下淫羊藿苷的提取率可达到 0.661%,与理论值 0.663%十分接近。**【结论】**确定了淫羊藿苷的最佳提取工艺,该工艺具有耗时短、提取率高、能量消耗少且工艺稳定可靠等优点。

[关键词] 淫羊藿;淫羊藿苷;提取工艺;中心组合设计;响应面分析

[中图分类号] R284.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)10-0175-07

Optimization of icariin extraction from *Epimedium brevicornu maxim* by supersonic wave using central composite design and response surface methodology

HOU Ying-ying¹, ZHAO Yan¹, TANG Guo-sheng¹, GUO Shuai¹, HAN Ling-ling¹,
LI Xue-jun², ZHANG Zhi-dong², YANG He¹, LIU Shuang-li¹, ZHANG Lian-xue¹

(1 College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 Kangmei Xinkaihe (Jilin) Pharmaceutical Company Limited, Ji'an, Jilin 134200, China)

Abstract: **【Objective】** The ultrasound-assisted extraction of icariin from *Epimedium brevicornu Maxim* was optimized using response surface methodology and central composite design (CCD). **【Method】** Based on single factor tests, the effects of ethanol concentration, ultrasonic extraction time, liquid to solid ratio and their interactions on extraction rate were studied using CCD method. **【Result】** The optimal ultrasonic extraction conditions based on ridge analysis were: ethanol concentration 68%, ultrasonic extraction time 23 min, liquid to solid ratio 32 mL/g. Under the optimum conditions, the extraction yield of total icariin was 0.661%, which was close to the theoretical value of 0.663%. **【Conclusion】** The optimal extraction conditions of epimedium glycoside extraction were determined and the advantages included short time, high extraction efficiency, less energy consumption, stable, and reliable.

Key words: *Epimedium brevicornu maxim*; icariin; extraction technique; central composite design; re-

[收稿日期] 2014-01-20

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI03B01);国家公益性行业科研专项(201303111);吉林省科技发展计划项目(20126046);吉林省中医药产业发展专项(YYZX201258)

[作者简介] 侯莹莹(1990—),女,吉林吉林人,硕士,主要从事天然药物化学成分提取与生物活性研究。E-mail:zmlhyy@126.com

[通信作者] 赵 岩(1979—),男,吉林长春人,副教授,博士,主要从事天然药物化学成分提取与生物活性研究。

E-mail:zhyjlu79@163.com

sponse surface analysis

淫羊藿(*Epimedium brevicornu maxim*) 又称仙灵脾,为小檗科(*Berberidaceae*) 淫羊藿属(*Epimedium*)多年生草本植物,在中国已有 2 000 多年的药用历史^[1],主要分布在中国的黑龙江、吉林、辽宁、山东、江西等地^[2]。淫羊藿中的主要活性成分是以淫羊藿苷为代表的黄酮苷类化合物,淫羊藿苷具有改善心脑血管功能、促进性腺功能、增强机体免疫力、延缓衰老、抗肿瘤等生理活性^[3-12]。

目前,关于淫羊藿苷的提取工艺已有一些相关报道^[13-16],试验多采用均匀设计法和正交实验法,但这 2 种方法均存在一定的不足。均匀设计法的目的是在尽量减少实验次数的同时尽可能多地考察实验因素,再加上可能要引入某些因素的平方项或交叉乘积项作为派生的“自变量”,会导致自变量个数太多,而使获得的多重线性回归方程不唯一,同时不同的研究结果彼此之间可能会相差悬殊。正交实验当试验需考察的因素较多并且每个因素都有多个水平时,为了照顾整齐可比,试验就无法充分地均匀分散,并且试验的次数会很多(试验次数随水平数的平方而增加),从而导致试验难以安排。响应面分析法是基于合理的试验设计,利用试验得到的相关数据,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,是解决多变量问题的一种重要的统计方法^[17-18],它具有试验次数少,试验精度高等特点,在药学上应用成效显著。本研究采用中心组合设计-响应面法优化了淫羊藿苷的超声提取工艺,以期淫羊藿苷的提取提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 淫羊藿苷 淫羊藿苷购于上海莱雀生物科技有限公司,纯度大于 98%。

1.1.2 淫羊藿 淫羊藿采收于吉林省临江市,经吉林农业大学张连学教授鉴定为淫羊藿(*Epimedium brevicornu maxim*),试验前筛选去梗、去茎、晒干,粉碎过孔径 0.90 mm 的筛后,阴凉处保存。

1.1.3 仪器与试剂 CXTH-3000 高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司);DHG-9140A 型恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);KQ-250B 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ABS 320-4N 型分析天平(上海岛韩实业有限公

司);酒精计(河北省沧县杜生热工仪表厂)。乙腈,色谱纯;其他试剂均为分析纯;试验用水为超纯水。

1.2 淫羊藿苷标准曲线的建立

用甲醇精确配制 0.3 μmol/mL 的淫羊藿苷标准液,备用。精密吸取淫羊藿苷标准液 0.01,0.05,0.10,0.50 和 1.00 mL,分别用甲醇定容在 1 mL 容量瓶中,配制成 0.003,0.015,0.030,0.150 和 0.300 μmol/mL 的淫羊藿苷标准工作液。取淫羊藿苷标准工作液进行高效液相色谱(HPLC)分析,以淫羊藿苷峰面积为纵坐标(*y*),浓度为横坐标(*x*),进行线性回归分析,得到的回归方程为 $y = 4E-08x - 0.0008 (R^2 = 0.9996)$,说明在 0.003~0.300 0 μmol/mL 范围内,淫羊藿苷浓度与 HPLC 峰面积呈良好的线性关系。

HPLC 条件:色谱柱为大连江申分离科学技术公司 C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相乙腈-水(*V*(乙腈):*V*(水)=25.5:74.5);检测波长 270 nm;柱温 25℃;流速 1.0 mL/min;进样量 20 μL。

1.3 淫羊藿苷的提取及测定

精密称取淫羊藿粉末 0.5 g,置于三角瓶中,按一定的液(mL)固(g)比(下文简称液固比)加入不同体积分数的乙醇,按设定时间超声提取,过滤,滤液用尼龙膜再次过滤,取滤液作为供试品溶液。

取 0.3 μmol/mL 对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,分别进行 HPLC 分析,记录色谱图,计算供试品中淫羊藿苷的提取率。

1.4 淫羊藿苷提取工艺的单因素试验

对超声提取的乙醇用量、超声提取时间、液固比分别进行单因素试验,考察这 3 个因素对淫羊藿苷提取率的影响。

1.4.1 乙醇体积分数的影响 超声提取时间固定为 20 min,液固比为 40:1,乙醇体积分数分别为 0,20%,40%,60%,80%和 95%,试验重复 6 次。

1.4.2 超声提取时间的影响 固定乙醇体积分数为 60%,液固比为 40:1,超声提取时间分别为 5,10,20,40,60 和 80 min,试验重复 6 次。

1.4.3 液固比的影响 固定乙醇体积分数为 60%,超声提取时间为 20 min,液固比分别为 5:1,10:1,20:1,40:1,60:1 和 80:1,试验重复 6 次。

1.5 淫羊藿苷提取工艺的中心组合设计-响应曲面法优化

为了分析各因素及其交互作用对淫羊藿苷提取

率的影响,在单因素试验的基础上,以淫羊藿苷提取率为考察目标,进行中心组合试验设计,中心组合设计各因素水平详见表 1,中心组合设计见表 2,并依据表 2 进行 17 次试验。利用 SAS 软件的 RSREG

(二次响应面回归模型)程序对试验结果进行响应面分析,用岭脊分析优化试验工艺,采用 ORIGIN 软件绘制响应面曲面图。

表 1 淫羊藿苷提取工艺中心组合设计的因素与水平

Table 1 Factors and levels of central composite design for the extraction process of the icariin

编码水平 Coded level	因素 Factors		
	乙醇体积分数(x_1)/% Ethanol concentration	超声提取时间(x_2)/min Ultrasonic extraction time	液(mL)固(g)比(x_3) Liquid-solid ratio
-1.682	20.0	5.0	10.0 : 1
-1	35.2	12.1	20.1 : 1
0	57.5	22.5	35.0 : 1
1	79.8	32.9	49.9 : 1
1.682	95.0	40.0	60.0 : 1

2 结果与分析

2.1 淫羊藿苷提取工艺的单因素试验结果

2.1.1 乙醇体积分数对淫羊藿苷提取率的影响

由图 1 可知,当乙醇体积分数低于 60%时,随着其用量的升高,淫羊藿苷提取率增加;但当乙醇体积分数高于 60%时,随着乙醇用量的升高,淫羊藿苷的提取率反而降低。考虑到实际生产,乙醇回收的耗能问题,应尽可能选择高含量乙醇进行提取,因此乙醇体积分数以 20%~95%为佳。

2.1.2 超声提取时间对淫羊藿苷提取率的影响

由图 2 可知,整体趋势上,随着超声提取时间的延长,样品中淫羊藿苷的提取率也随之提高。超声提取时间在 5~20 min,提取率增加相对缓慢;在 20~40 min,提取率增加较快,在 40~80 min,提取率增加缓慢。考虑到实际生产中的耗能等问题,在保证提取率的前提下,应尽可能选择较短的超声时间,故超声提取时间以 5~40 min 为宜。

2.1.3 液固比对淫羊藿苷提取率的影响

由图3可

知,液固比在(5 : 1)~(10 : 1)时,淫羊藿苷提取率增加缓慢;在(10 : 1)~(40 : 1)时,淫羊藿苷提取率增加幅度较大;在(40 : 1)~(60 : 1)时,提取率增加缓慢;液固比大于 60 : 1 时,提取率有降低的趋势。考虑到实际生产中的溶剂回收问题,应尽量选择较小的液固比,故液固比考察范围以(10 : 1)~(60 : 1)为宜。

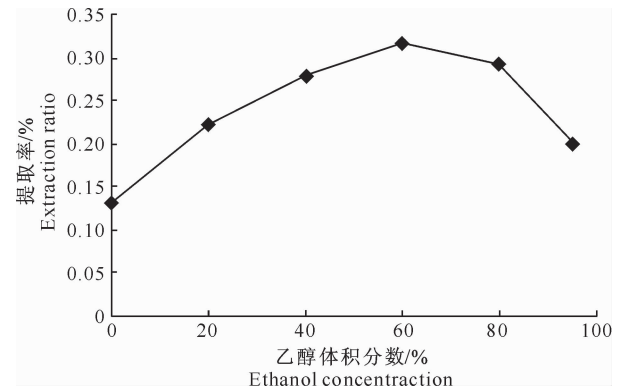


图 1 乙醇体积分数对淫羊藿苷提取率的影响
Fig. 1 Effects of ethanol concentration on extraction rate of icariin

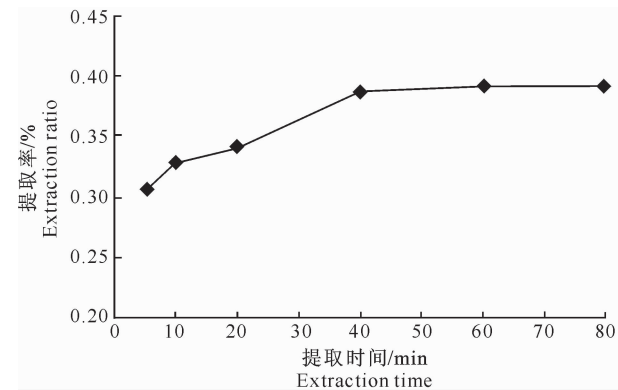


图 2 超声提取时间对淫羊藿苷提取率的影响
Fig. 2 Effects of ultrasonic extraction time on extraction rate of icariin

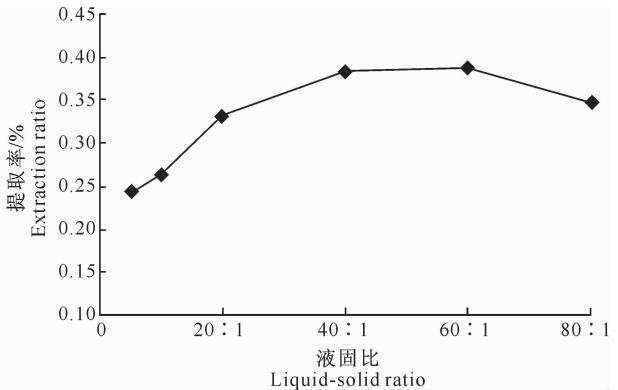


图 3 液(mL)固(g)比对淫羊藿苷提取率的影响
Fig. 3 Effects of liquid-solid ratio on extraction rate of icariin

2.2 淫羊藿苷提取工艺的中心组合设计-响应面分析 组合设计试验结果见表 2。

2.2.1 试验方案及结果 淫羊藿苷提取工艺中心

表 2 淫羊藿苷提取工艺中心组合试验设计与结果

Table 2 Arrangement and results of central composite design for the extraction process of icariin

试验号 Experiment No.	水平 Level			提取率/% Extraction rate
	x_1	x_2	x_3	
1	0	0	0	0.648
2	0	0	0	0.642
3	0	0	0	0.646
4	+1	+1	+1	0.604
5	+1	+1	-1	0.638
6	+1	-1	+1	0.606
7	+1	-1	-1	0.648
8	-1	+1	+1	0.472
9	-1	+1	-1	0.362
10	-1	-1	+1	0.480
11	-1	-1	-1	0.434
12	-1.682	0	0	0.300
13	1.682	0	0	0.490
14	0	-1.682	0	0.552
15	0	1.682	0	0.612
16	0	0	-1.682	0.600
17	0	0	1.682	0.624

2.2.2 响应面分析 利用 SAS 软件的 RSREG(二次响应面回归模型)程序对试验结果进行响应面分析,经二次回归拟合,得回归模型参数估计值见表 3,方差分析结果见表 4,岭脊分析结果见表 5。由表 3 可知,回归方程为: $y = -0.390\ 343 + 0.025\ 801x_1 + 0.004\ 500x_2 + 0.007\ 479x_3 - 0.000\ 174x_1^2 + 0.000\ 036\ 651x_1x_2 - 0.000\ 191x_2^2 - 0.000\ 087\ 278x_1x_3 + 0.000\ 058\ 080x_2x_3 - 0.000\ 045\ 358x_3^2$ 。在一次项的预测中,乙醇用量(x_1)对淫羊藿苷提取率的影响最大,达到极显著水平($P<0.01$);在二次项的预测中,乙醇用量达到了极显著水平($P<0.01$);在交互项中,乙醇用量(x_1)

乘以液固比(x_3)达到了显著水平($P<0.05$);而其余各项 P 值均大于 0.2。在 $P<0.2$ 水平上拒绝假设后,形成校正的回归方程: $y = -0.390\ 343 + 0.025\ 801x_1 + 0.007\ 479x_3 - 0.000\ 174x_1^2 - 0.000\ 191x_2^2 - 0.000\ 087\ 278\ x_1x_3$,其对提取率的预测值与实测值误差较大,因此放弃对回归方程的校正,在 $P<0.2$ 水平上接受所有系数及截距的假设,最终确定淫羊藿苷提取率的回归方程为: $y = -0.390\ 343 + 0.025\ 801x_1 + 0.004\ 500x_2 + 0.007\ 479x_3 - 0.000\ 174x_1^2 + 0.000\ 036\ 651x_1x_2 - 0.000\ 191x_2^2 - 0.000\ 087\ 278x_1x_3 + 0.000\ 058\ 080 \times x_2x_3 - 0.000\ 045\ 358x_3^2$ 。

表 3 淫羊藿苷提取率回归模型系数的显著性检验

Table 3 Significance of regression coefficients for the extraction data icariin

参数 Parameter	自由度 df	预测值 Estimate	标准差 Error	t 值 t value	$P> t $	显著性 Significance
截距 Intercept	1	-0.390 343	0.162 155	-2.41	0.047 0	*
x_1	1	0.025 801	0.002 923	8.83	<0.000 1	**
x_2	1	0.004 500	0.005 870	0.77	0.468 4	
x_3	1	0.007 479	0.004 228	1.77	0.120 2	
x_1^2	1	-0.000 174	0.000 020 278	-8.60	<0.000 1	**
x_2x_1	1	0.000 036 651	0.000 051 619	0.71	0.500 7	
x_2^2	1	-0.000 191	0.000 093 132	-2.05	0.079 9	
x_3x_1	1	-0.000 087 278	0.000 036 029	-2.42	0.045 9	*
x_3x_2	1	0.000 058 080	0.000 077 255	0.75	0.476 7	
x_3^2	1	-0.000 045 358	0.000 045 593	-0.99	0.352 9	

注: * 表示显著($P<0.05$), ** 表示极显著($P<0.01$);在 $P<0.2$ 水平上拒绝假设。
Note: * Indicates significant difference ($P<0.05$), ** Indicates extremely significant difference ($P<0.01$); At $P<0.2$ level, hypothesis was rejected.

表 4 淫羊藿苷提取率回归模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance of regression equations for the extraction data of icariin						
项目 Item	自由度 <i>df</i>	总离差平方和 Sum of squares	复相关系数(R^2) <i>R</i> -square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	$P>F$	显著性 Significance
总模型 Total model	9	0.180 363	0.957 4	17.48	0.000 5	* *
线性项 Linear	3	0.084 518	0.448 6	24.57	0.000 4	* *
平方项 Quadratic	3	0.087 891	0.466 5	25.55	0.000 4	* *
交互项 Crossproduct	3	0.007 954	0.042 2	2.31	0.162 8	
总误差 Total error	7	0.008 026				
失拟项 Lack of fit	5	0.008 007		11.58	0.058	
纯误差 Pure error	2	0.000 018 667				

注: * * 表示极显著($P<0.01$)。
Note: * * Indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

从表 4 可以看出,总模型、线性项、平方项的 $P<0.001$,表明总模型和方程的线性项、平方项对淫羊藿苷提取率的影响极显著;而方程的交互项的 $P>0.05$,表明其对提取率的影响不显著。相关性分析中,总模型的复相关系数 $R^2=0.957\ 4$,表明回

归方程对淫羊藿苷提取率的预测值与实测值有较好的相关性。失拟性检验分析结果显示 $P=0.058>0.05$,表明失拟性不显著,该回归方程无失拟因素存在,回归方程与实测值能较好地拟合。

表 5 淫羊藿苷提取率模型的岭脊回归分析

Table 5 Ridge analysis of maximum responses for the extraction data of icariin					
编码半径 Coded radius	响应预测值 Estimated response	标准差 Standard error	因子预测值 Factor estimation		
			x_1	x_2	x_3
0.0	0.644 814	0.019 509	57.500 000	22.500 000	35.000 000
0.1	0.655 538	0.019 384	61.236 040	22.568 777	35.191 815
0.2	0.661 353	0.019 027	64.961 188	22.847 917	34.894 906
0.3	0.663 031	0.018 505	67.980 288	23.209 805	32.469 073
0.4	0.662 889	0.017 939	69.417 599	22.939 939	28.960 055
0.5	0.662 108	0.017 520	70.356 619	22.518 504	25.901 324
0.6	0.660 876	0.017 512	71.146 552	22.075 647	23.089 319
0.7	0.659 239	0.018 210	71.869 821	21.628 439	20.408 028
0.8	0.657 216	0.019 862	72.556 531	21.180 408	17.804 329
0.9	0.654 814	0.022 581	73.220 687	20.732 458	15.250 720
1.0	0.652 039	0.026 352	73.869 817	20.284 815	12.731 470

根据回归分析结果,运用 ORIGIN 软件绘制响应曲面图,即淫羊藿苷提取率 y 与乙醇体积分数 x_1 、超声提取时间 x_2 、液固比 x_3 构成的三维空间图形。为了更直观地表现 2 个因素同时对淫羊藿苷提取率的影响,可以令第 3 个因素水平值在中心点(即编码水平为 0),仅考虑该 2 个因素对提取率的影响,结果见图 4~6。由图 4~6 可知,3 个响应面图形均开口向下,可以直观地得出淫羊藿苷提取率的较优提取工艺条件为: x_1 60%~70%、 x_2 15~25 min、 x_3 (25:1)~(35:1)。

由岭脊分析结果(表 5)可知,回归方程预测的淫羊藿苷的最佳提取条件为:乙醇体积分数 68%、超声提取时间为 23 min、液固比为 32:1。为验证模型的有效性,在上述条件下,进行 3 次重复性试验,结果淫羊藿苷提取率分别为 0.671%,0.665%和 0.647%,平均值为 0.661%,试验值与预测值拟

合良好,也进一步说明了模型的可行性。

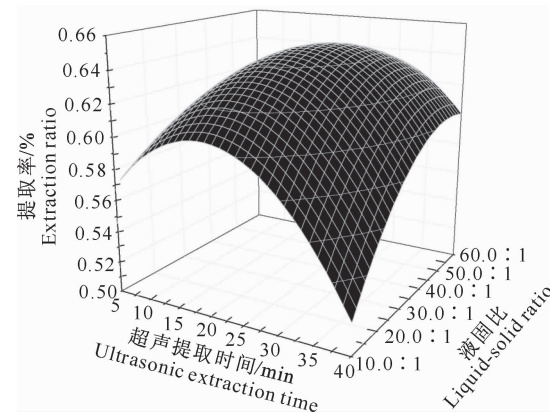


图 4 乙醇体积分数为 57.5%时超声提取时间和液(mL)固(g)比对淫羊藿苷提取率的影响
Fig. 4 Responsive surface plot for ultrasonic extraction time and liquid to solid ratio of icariin (Fixed ethanol concentration=57.5%)

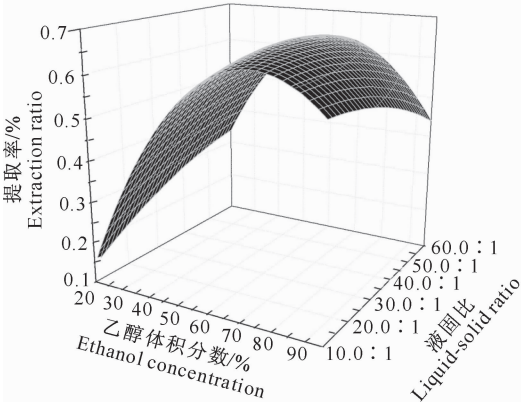


图 5 超声提取时间为 22.5 min 时乙醇体积分数和液固比对淫羊藿苷提取率的影响

Fig. 5 Responsive surface plot for ethanol concentration and liquid to solid ratio of icariin (Fixed ultrasonic extraction time=22.5 min)

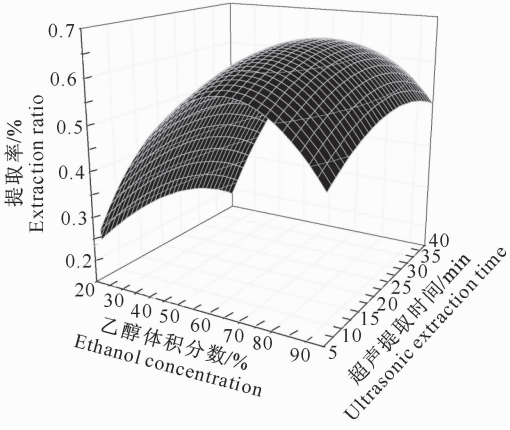


图 6 液固比为 35 : 1 时乙醇体积分数和超声提取时间对淫羊藿苷提取率的影响

Fig. 6 Responsive surface plot for ethanol concentration and ultrasonic extraction time of icariin (Fixed liquid to solid ratio=35 : 1)

3 讨论与结论

本试验选择超声提取法提取淫羊藿苷,考察对象为乙醇用量、超声时间、液固比 3 个影响因素,采用中心组合试验设计对单因素及其相互作用进行探讨,并通过中心组合设计-响应面分析方法,建立了超声辅助提取淫羊藿苷的数学模型,回归方程的复相关系数为 0.957 4,方程拟合良好。通过岭脊分析优化出超声波提取淫羊藿苷的最佳工艺参数为:乙醇体积分数 68%、超声提取时间 23 min、液固比 32 : 1。

目前,淫羊藿苷的提取大多数研究都选用均匀设计和正交试验设计的方法进行实验^[13-16,19-20],虽然这 2 种方法基本可以满足一般试验的要求,但还存在一些问题,如试验的精度不够,无法精确找到最佳条件。如贾恒明等^[19]采用正交设计优选淫羊藿苷提取工艺,确定的最佳条件为:用水浸泡 12 h,用 8 倍量的 70%乙醇热回流提取 2 次,1.5 h/次,与本试验确定的工艺相比存在操作较繁琐、提取时间相对较长、耗能较多等不足。

综上所述,本试验通过中心组合设计-响应曲面法确定的淫羊藿苷超声波提取工艺,具有提取效率高、时间短、耗能少等优点,并且采用的方法为纯物理方法,保证了化学成分的稳定,这为淫羊藿苷简便、高效的工业化大规模生产提供了可能,也为深入研究淫羊藿苷的药理功能及促进淫羊藿药材的有效利用奠定了基础。

[参考文献]

[1] Zhang H F, Yang T S, Li Z Z, et al. Simultaneous extraction of epimedin A, B C and icariin from *Herba epimedii* [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(4): 376-385.

[2] Ma H P, He X R, Yang Y, et al. The genus epimedium: An ethnopharmacological and phytochemical review [J]. Ethnopharmacology, 2011, 134(3): 519-541.

[3] 吉瑞瑞, 李付英, 张雪静, 等. 淫羊藿苷对缺氧诱导血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(6): 520-530.

Gi R R, Li F Y, Zhang X J, et al. Effect of icariin on hypoxia induced vascular endothelial cells injury [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2005, 25(6): 520-530. (in Chinese)

[4] 刘 桦, 季 晖, 张超英. 淫羊藿苷对异丙肾上腺素所致乳鼠心肌细胞损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(12): 1509-1512.

Liu H, Ji H, Zhang C Y. Protective effects of icariin on isoproterenol-induced injury in neonatal rat cardiomyocytes [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2006, 22(12): 1509-1512. (in Chinese)

[5] 李芳芳, 李 思, 吕占军, 等. 淫羊藿苷对大鼠卵泡颗粒细胞和肾上腺皮质细胞分泌功能的影响 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(8): 499.

Li F F, Li S, Lü Z J, et al. Effects of icariin on rat granulosa cells and secretory function of the adrenal cortical cells [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 1997, 22(8): 499. (in Chinese)

[6] 肖幸丰, 王志强, 楼宜嘉. 淫羊藿苷伍用三七总皂苷对小鼠免疫功能的调节作用 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 888-891.

Xiao X F, Wang Z Q, Lou Y J. Immunoregulation of icariin combined with panax notoginseng saponins in mice [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2006, 37(6): 888-891. (in

- Chinese)
- [7] 蔡外娇. 淫羊藿总黄酮、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 II 延长健康寿命及其作用机制的研究 [D]. 上海:复旦大学,2012.
- Cai W J. Research on the effect and mechanism of EF, icariin and icariside II in extending healthspan [D]. Shanghai: Fudan University, 2012. (in Chinese)
- [8] 毛海婷,张玲,王芸,等. 淫羊藿甙抗癌作用机制的实验研究 [J]. 中药材,2000,23(9):554-556.
- Mao H T, Zhang L, Wang Y, et al. Experimental study on the mechanism of anticancer icariin [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2000, 23(9): 554-556. (in Chinese)
- [9] 李梨,吴芹,周岐新,等. 淫羊藿苷对氧自由基所致大鼠脑线粒体损伤的保护作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志,2005,19(5):333-337.
- Li L, Wu Q, Zhou Q X, et al. Icariin protective effects of oxygen free radical-induced damage in rat brain mitochondria [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2005, 19(5): 333-337. (in Chinese)
- [10] 贾东升,贾晓斌,施峰,等. 淫羊藿苷元脂质体的制备及其对大鼠骨髓基质细胞增殖分化影响的研究 [J]. 中国药理学杂志,2010,45(3):353.
- Jia D S, Jia X B, Shi F, et al. Preparation of icaritin liposome and its effects on proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cell *in vitro* [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2010, 45(3): 353. (in Chinese)
- [11] 陈凯. 淫羊藿苷对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机制研究 [D]. 杭州:浙江工业大学,2012.
- Chen K. The study of the renal protective effects of icaritin on experimental diabetic rats and its mechanism [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2012. (in Chinese)
- [12] 李淑梅,宋利格,张秀珍. 淫羊藿甙对大鼠成骨细胞功能及 Osterix 表达的影响 [J]. 同济大学学报:医学版,2005,26(6):8-11.
- Li S M, Song L G, Zhang X Z. Effects of icariin on function and Osterix expression in rat osteoblasts [J]. Journal of Tongji University: Medical Science, 2005, 26(6): 8-11. (in Chinese)
- [13] 王辉,刘长路,杜惠蓉,等. 超声波法提取淫羊藿中淫羊藿苷工艺研究 [J]. 广州化学,2013,41(13):89-90.
- Wang H, Liu C L, Du H R, et al. Optimum conditions of extracting icariin by ultrasonic wave method [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2013, 41(13): 89-90. (in Chinese)
- [14] 黄瑞华,韩伟,施超欧,等. 微波辅助提取淫羊藿中淫羊藿苷工艺条件的研究 [J]. 中草药,2005,36(1):55-56.
- Huang R H, Han W, Shi C O, et al. Microwave-assisted extraction of icariin epimedium process conditions [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005, 36(1): 55-56. (in Chinese)
- [15] 胡道德,顾磊,姚慧娟. 均匀设计法优化淫羊藿中淫羊藿苷提取工艺的研究 [J]. 中国医院药学杂志,2009,29(10):799-802.
- Hu D D, Gu L, Yao H J. Optimization of extraction process of icariin from *Epimedium* by uniform design [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2009, 29(10): 799-802. (in Chinese)
- [16] 姜宁,刘晓鹏. 淫羊藿中淫羊藿苷的快速提取及测定研究 [J]. 中华中医药杂志,2008,23(1):64-66.
- Jiang N, Liu X P. Study on quick extraction and determination of icariin from herba *Epimedium* [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2008, 23(1): 64-66. (in Chinese)
- [17] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用 [J]. 郑州工程学院学报,2001,22(3):91-94.
- Mu Y D. Response surface methodology and its application in food industry [J]. Journal of Zhengzhou Grain College, 2001, 22(3): 91-94. (in Chinese)
- [18] Wang J, Sun B G, Cao Y P, et al. Optimization of ultra-sound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 804-810.
- [19] 贾恒明,邢俊波. 正交设计优选淫羊藿中淫羊藿苷提取工艺 [J]. 解放军药科学学报,2010,26(3):223-224.
- Jia H M, Xing J B. A study on extraction technology of icariin in herba epimedium by orthogonal design [J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2010, 26(3): 223-224. (in Chinese)
- [20] 杨柳,钟静娴,林巧玲. 淫羊藿中淫羊藿苷的提取工艺研究 [J]. 中药新药与临床药理,2005,16(4):286-287.
- Yang L, Zhong J X, Lin Q L. Studies on extraction of icariin in herba epimedium [J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2005, 16(4): 286-287. (in Chinese)