

管花肉苁蓉中苯乙醇苷的提取和大孔树脂纯化工艺研究

王毓杰

成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 优选管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* 中苯乙醇苷的提取纯化工艺。方法 以松果菊苷和麦角甾苷质量分数为考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 对提取工艺进行优化; 考察 7 种大孔树脂对 2 种苯乙醇苷的吸附和解吸附性能, 确定最佳纯化工艺条件。结果 最佳提取纯化工艺为管花肉苁蓉药材加 12 倍量 50%乙醇, 70 °C温浸 2 次, 温浸时间 1 h, 滤过, 合并滤液, 回收溶剂, 加水调整为含生药 0.2 g/mL 的上样溶液, 上样量为 0.8 倍柱体积 (BV), 大孔树脂柱的径高比为 1:9, 先用 3 BV 的水除杂, 再用 4 BV 的 30%乙醇洗脱, 洗脱液减压浓缩至干, 即得肉苁蓉苯乙醇苷纯化物, 该纯化物中 2 种苯乙醇苷质量分数 >75%。结论 优选得到的提取纯化工艺稳定可行, 适合工业化生产。

关键词: 管花肉苁蓉; 大孔树脂; 苯乙醇苷; 松果菊苷; 麦角甾苷

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)16-2344-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.012

Extraction of phenylethanoid glycoside from *Cistanche tubulosa* and purification technology by macroporous resin

WANG Yu-jie

College of Ethnomedicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To optimize the extraction and purification technology of phenylethanoid glycoside from *Cistanche tubulosa*. **Methods** Orthogonal design $L_9(3^4)$ was employed to optimize the extraction conditions by taking the extraction yield of echinacoside and acteoside as indexes. The absorption-desorption characteristics of seven macroporous resins were evaluated, then the best purification conditions were optimized. **Results** The optimal extraction conditions were as follows: The air-dried stems of *C. tubulosa* were powdered and extracted twice with 12-fold 50% ethanol for 1 h each time, temperature was 70 °C; The supernatant was concentrated to 5-fold weight of the stems of *C. tubulosa*. The concentrated liquid was subjected to macroporous resin (HPD750) column and then eluted with deionized water (3 BV) and 30% ethanol (4 BV), respectively. The 30% ethanol fraction was evaporated under vacuum to give the phenylethanoid glycoside-rich *C. tubulosa* stem extract. The purity of phenylethanoid glycoside was above 75%. **Conclusion** The optimized extraction and purification process is stable, efficient, and suitable for industrial production.

Key words: *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight; macroporous resins; phenylethanoid glycoside; echinacoside; acteoside

肉苁蓉为列当科肉苁蓉属多年生草本寄生植物, 药用其根, 始载于《神农本草经》, 列为上品。性温, 味甘、咸, 归肾、大肠经, 有滋肝养肾、益精血、润肠通便的功效, 用于治疗肾阳不足、精血亏虚、腰膝酸软、筋骨无力、肠燥便秘等症^[1]。

《中国药典》2010 年版收载的法定品种为荒漠肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 和管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) Wight^[2]。两者化学成分相似, 但寄生于红柳根上的管花肉苁蓉更容易进行人工栽培, 已在新疆民丰县、于田县等地大面积种植, 是

目前市场流通量最大的肉苁蓉药材^[3]。肉苁蓉中的苯乙醇苷类成分是其发挥补益作用的主要成分^[4], 这类成分由苯乙醇基和糖构成, 结构中的多个糖链决定了这类成分具有较高的水溶性。除了补益作用, 肉苁蓉苯乙醇苷类成分还具有肝脏保护、神经保护等多种活性^[5-7]。因此, 肉苁蓉苯乙醇苷类成分的提取纯化工艺研究, 对于其药效物质基础及新产品开发研究都具有重要意义。

本研究以管花肉苁蓉中的主要苯乙醇苷类成分松果菊苷和麦角甾苷为考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交

收稿日期: 2014-03-25

基金项目: 四川省教育厅资助项目 (13ZB0304); 成都中医药大学科技发展基金 (ZRMS201246)

作者简介: 王毓杰, 男, 博士, 讲师, 从事中药及民族药药效物质基础及作用机制研究。Tel: (028)61800160 E-mail: superwangyj@126.com

试验设计,对提取工艺进行优化;并考察7种大孔树脂对上述苯乙醇苷的吸附和解吸附性能,确定纯化肉苁蓉苯乙醇苷的最佳工艺。

1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,含 G1311A 四元泵、G1315A 二极管矩阵检测器。松果菊苷(批号 A0282)、麦角甾苷对照品(批号 A0280),质量分数均>98%,成都普思生物科技有限公司;肉苁蓉药材购于新疆维吾尔自治区于田县,经成都中医药大学张艺研究员鉴定为列当科肉苁蓉属多年生草本寄生植物管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight 的干燥根;大孔吸附树脂 HPD400、HPD450、HPD600、HPD750、HPD826、DM130、ADS-17,沧州宝恩吸附材料科技有限公司;乙腈,色谱纯, Honeywell 公司;甲酸、乙醇,分析纯,成都科龙化工试剂厂。

2 方法与结果

2.1 松果菊苷和麦角甾苷测定方法的建立

2.1.1 色谱条件^[8] Waters Symmetry Shield RP₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); Symmetry Shield RP₁₈ (20 mm×3.9 mm, 5 μm) Guard 2Pk 保护柱;流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱:0~10 min, 17%乙腈;10~30 min, 17%~50%乙腈;检测波长 330 nm。在此色谱条件下待测组分可达到基线分离,理论塔板数以松果菊苷、麦角甾苷计算均大于 5 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 取松果菊苷、麦角甾苷对照品适量,精密称定,加 30%乙醇制成含松果菊苷 1.995 mg/mL、麦角甾苷 1.299 mg/mL 的对照品储备液,精密量取该储备液稀释 10 倍,作为对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密量取松果菊苷、麦角甾苷对照品储备液,稀释 5、10、50、100、500、1 000 倍制得不同质量浓度的对照品溶液,精密吸取上述对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪,测定峰面积,并以峰面积积分为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X),进行回归分析。松果菊苷的回归方程: $Y=18\,182\,X-69.895$, $r=0.999\,6$,表明松果菊苷在 1.995~399 μg 线性关系良好;麦角甾苷的回归方程: $Y=18\,035\,X-9.949\,3$, $r=1.000\,0$,表明麦角甾苷在 1.299~259.8 μg 线性关系良好。

2.2 肉苁蓉药材定量测定

按《中国药典》2010 年版肉苁蓉项下方法制备

供试品溶液,按“2.1”项方法测定。结果按干燥品计算,本研究所用肉苁蓉药材中松果菊苷和麦角甾苷的质量分数分别为 14.01%、3.18%。

2.3 苯乙醇苷的提取工艺研究

2.3.1 提取溶剂考察 分别取肉苁蓉药材粗粉 50 g,加 10 倍量的水及 30%、50%、70%乙醇,70 ℃ 温浸 2 次,每次 1 h,滤过,回收溶剂后,加水定容至 250 mL。取 1 mL,加 30%乙醇定容至 100 mL,滤过,测定松果菊苷和麦角甾苷;另取 200 mL(相当于 40 g 药材),置蒸发皿中挥干溶剂后,计算出膏量。上述提取溶剂所得粗提物中松果菊苷的质量分数分别为 19.96%、23.28%、31.98%、28.78%;麦角甾苷分别为 2.89%、4.57%、6.64%、5.93%。结果表明 50%乙醇对松果菊苷和麦角甾苷的提取率最高。

2.3.2 正交试验 以溶剂用量(A, 8、10、12 倍量),提取次数(B, 1、2、3 次),提取时间(C, 1.0、1.5、2.0 h)为因素,以松果菊苷、麦角甾苷质量分数为指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。实验结果见表 1,方差分析见表 2、3。

由直观分析(松果菊苷 K_s 、 R_s , 麦角甾苷 K_m 、

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果
Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A/ 倍	B/ 次	C/ h	D(空白)	松果菊 苷 / %	麦角甾 苷 / %
1	8 (1)	1 (1)	1.0 (1)	(1)	30.46	6.77
2	8 (1)	2 (2)	1.5 (2)	(2)	29.36	6.21
3	8 (1)	3 (3)	2.0 (3)	(3)	27.51	5.81
4	10 (2)	1 (1)	1.5 (2)	(3)	34.20	7.63
5	10 (2)	2 (2)	2.0 (3)	(1)	33.60	7.08
6	10 (2)	3 (3)	1.0 (1)	(2)	32.29	6.90
7	12 (3)	1 (1)	2.0 (3)	(2)	36.29	7.66
8	12 (3)	2 (2)	1.0 (1)	(3)	34.46	7.48
9	12 (3)	3 (3)	1.5 (2)	(1)	31.82	6.94
K_{s1}	87.33	100.95	97.21	95.88		
K_{s2}	100.09	97.42	95.38	97.94		
K_{s3}	102.57	91.62	97.40	96.17		
R_s	15.24	9.33	2.02	2.06		
K_{m1}	18.79	22.06	21.15	20.79		
K_{m2}	21.61	20.77	20.78	20.77		
K_{m3}	22.08	19.65	20.55	20.92		
R_m	3.29	2.41	0.60	0.15		

表2 方差分析表 (松果菊苷)

Table 2 Analysis of variance (echinacoside)

变异来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	44.581	2	53.777	$P<0.05$
B	14.794	2	17.846	
C	0.829	2	1.000	
误差 (D)	0.829	2		

$$F_{0.05}(2, 2)=19.00 \quad F_{0.01}(2, 2)=99.00$$

表3 方差分析表 (麦角甾苷)

Table 3 Analysis of variance (acteoside)

变异来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	2.111	2	527.750	$P<0.01$
B	0.970	2	242.500	$P<0.01$
C	0.061	2	15.250	
误差 (D)	0.004	2		

$$F_{0.05}(2, 2)=19.00 \quad F_{0.01}(2, 2)=99.00 \quad F_{0.001}(2, 2)=199.00$$

R_m) 和方差分析结果可知, 各因素对提取效率的影响顺序为 $A>B>C$, 且 A 因素有显著性影响, 因此最佳提取方案为 $A_3B_2C_1$, 即肉苁蓉药材加 12 倍量 50%乙醇, 70 °C 温浸 2 次, 温浸时间 1 h。

2.4 验证试验

按正交试验优选的提取工艺, 平行试验 3 次。肉苁蓉粗提物中松果菊苷、麦角甾苷的平均质量分数分别为 33.21%、7.55%, 见表 4。

2.5 苯乙醇苷的大孔树脂纯化工艺研究

2.5.1 静态吸附与解吸附

(1) 静态吸附考察: 取肉苁蓉药材 50 g, 加 12 倍量 50%乙醇, 70 °C 温浸 2 次, 每次 1 h, 滤过, 回收溶剂后, 加水定容至 250 mL (相当于 0.2 g 生药/mL), 作为供试原液。分别称取不同型号经过预处理的大孔树脂 HPD-400、HPD-450、HPD-600、

表4 提取工艺验证试验结果

Table 4 Results of verification experiment of extraction process

批次	松果菊苷 / %	麦角甾苷 / %
1	33.11	7.44
2	33.25	7.60
3	33.26	7.61

HPD-750、HPD-826、DM-130、ADS-17 各 5 g, 置 50 mL 锥形瓶中, 加 30 mL 供试原液, 振荡吸附 24 h, 静置后取 1 mL 上清液, 加 30%乙醇定容至 100 mL, 测定。计算静态饱和吸附量 [饱和吸附量=(初始质量浓度-吸附后质量浓度)×吸附液体积/干树脂质量], 结果见表 5。

(2) 静态解吸考察: 取已吸附好的树脂, 经 100 mL 水洗后, 加入 50%乙醇溶液 250 mL, 置恒温振荡器上振荡解吸, 取上清液 1 mL, 加 30%乙醇定容至 10 mL, 测定。计算解吸率 (解吸率=解吸液质量浓度×解吸液体积/饱和吸附量), 结果见表 5。

由表 5 可以看出, HPD-750 和 ADS-17 2 种树脂对松果菊苷、麦角甾苷的吸附量高于其他型号树脂, 并且 HPD-750 的解吸率高于 ADS-17, 因此选择 HPD-750 进行下一步考察。

2.5.2 上柱液质量浓度考察 将提取后的药液分别浓缩成含生药 0.1、0.2、0.4 g/mL 的上柱液。分别取 3 份处理好的 HPD-750 树脂装柱, 每份 15 g, 将上述不同质量浓度的药液上大孔树脂柱 (上柱生药量相同), 上样后依次用 3 BV 的水、以 2 BV/h 的体积流量洗脱除去杂质, 再用 50%乙醇洗脱 6 BV, 体积流量为 2 BV/h。洗脱液浓缩至干, 测定, 计算质量分数。松果菊苷分别为 59.11%、63.16%、61.79%, 麦角甾苷分别为 10.21%、12.73%、11.26%。

表5 不同型号树脂静态吸附、解吸性能比较

Table 5 Static adsorption and desorption capacity of different resins

树脂型号	极性	粒径 / mm	吸附量 / (mg·g ⁻¹)		解吸率 / %	
			松果菊苷	麦角甾苷	松果菊苷	麦角甾苷
HPD-400	中极性	0.30~1.25	59.919	29.925	51.941	71.599
HPD-450	中极性	0.30~1.20	49.548	24.263	39.481	70.336
HPD-600	中极性	0.30~1.20	49.475	25.208	41.902	71.243
HPD-750	中极性	0.30~1.20	63.715	30.043	57.755	72.597
HPD-826	极性	0.30~1.20	52.320	25.458	33.258	65.011
DM-130	中极性	0.30~1.25	53.441	24.191	35.210	67.051
ADS-17	中极性	0.30~1.25	61.592	31.388	45.644	68.259

因此,上柱液的浓度确定为生药 0.2 g/mL。

2.5.3 泄露曲线的绘制 取 50 g (体积为 100 mL) 处理好的 HPD-750 树脂装柱,取肉苁蓉上柱液,以 2 BV/h 的体积流量通过树脂柱,进行动态吸附,每 10 毫升接 1 流分,每 1 流分中取 1 mL,加 30%乙醇定容至 100 mL,测定,绘制泄露曲线,见图 1。由图 1 可知,当上样体积在 9 号流分(即上样量为 90 mL)时出现明显地泄露。因此,上样量确定为 80 mL,即 0.8 BV。

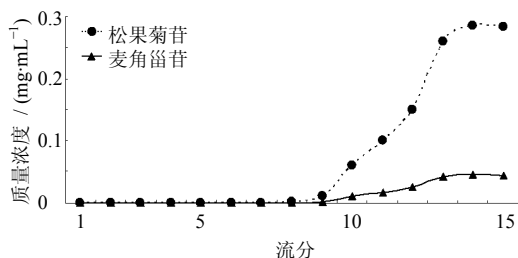
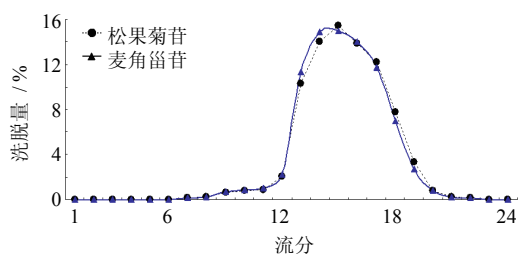


图 1 泄露曲线

Fig. 1 Dynamic leakage curves

2.5.4 洗脱溶剂的考察 取肉苁蓉上柱液 80 mL,加入到装有 50 g HPD-750 树脂柱中,依次用 3 BV 的水及 10%、30%、50%乙醇以 2 BV/h 的体积流量洗脱,洗脱液按每 0.5 BV 收集 1 份,每份中取 1 mL,加 30%乙醇定容至 100 mL,测定结果见图 2。苯乙醇苷主要集中在 30%乙醇洗脱液中,并且水洗脱液不会将苯乙醇苷洗脱下来。

2.5.5 洗脱溶剂用量的考察 取肉苁蓉上柱液 80 mL,加入到装有 50 g HPD-750 树脂柱中,依次用 3 BV 的水以 2 BV/h 的体积流量洗脱除去杂质,再用 30%乙醇洗脱,洗脱液按每 1 BV 收集 1 份,每份中取 1 mL,加 30%乙醇定容至 100 mL,测定结果见图 3。在洗至 4 BV 时,洗脱率达到 90%以上。同时,



1~6-水洗脱液 7~12-10%乙醇洗脱液 13~18-30%乙醇洗脱液
19~24-50%乙醇洗脱液

1—6-water eluent 7—12-10% ethanol eluent 13—18-30% ethanol eluent 19—24-50% ethanol eluent

图 2 洗脱溶剂的考察

Fig. 2 Investigation of eluting solvents

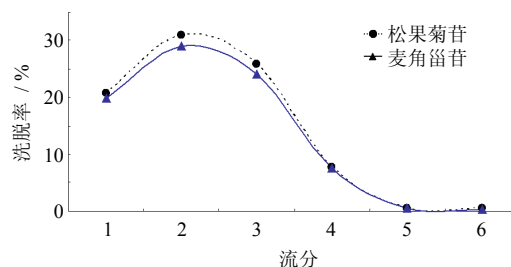


图 3 洗脱溶剂用量的考察

Fig. 3 Investigation of eluting solvent volumes

考虑到生产成本等因素,洗脱溶剂的量确定为 4 BV。

2.5.6 树脂柱径高比的考察 取肉苁蓉上柱液 80 mL,加入到装有 50 g HPD-750 树脂柱中,树脂柱的径高比分别为 1:3、1:6、1:9、1:12,分别用 3 BV 的水以 2 BV/h 的体积流量洗脱除去杂质,再用 4 BV 的 30%乙醇洗脱,洗脱液减压蒸干后,测定质量分数。结果显示,不同径高比的大孔树脂纯化样品中松果菊苷分别为 60.15%、62.46%、63.91%、63.96%;麦角甾苷分别为 11.65%、12.06%、13.21%、13.25%。从提高纯化效率和节约成本的角度出发,将径高比确定为 1:9。

2.5.7 水洗量的考察 取肉苁蓉上柱液 80 mL,加入到装有 50 g HPD-750 树脂柱中,树脂柱的径高比为 1:9,分别用 1、2、3、4 BV 的水以 2 BV/h 的体积流量洗脱除去杂质,再用 4 BV 的 30%乙醇洗脱,洗脱液减压蒸干后,测定质量分数。结果显示,4 种样品质量分数相差不大,但用 3、4 BV 水洗脱后,30%乙醇洗脱液颜色较澄清,HPLC 色谱图中杂质峰较少,从提高纯化效率的角度出发,选择用 3 BV 的水洗脱。

2.5.8 大孔树脂纯化工艺的确定 肉苁蓉提取液浓度调整为 0.2 g 生药/mL,上样量为 0.8 BV,大孔树脂柱的径高比为 1:9,先用 3 BV 的水除杂,再用 4 BV 的 30%乙醇洗脱,洗脱液减压浓缩至干,即得肉苁蓉苯乙醇苷纯化物。

2.5.9 大孔树脂纯化工艺验证试验 按上述确定的纯化工艺制备 3 批样品,分别测定纯化前(粗提物)、后(大孔树脂纯化物)松果菊苷和麦角甾苷的量,并计算出膏率和转移率。结果表明,经大孔树脂纯化后,松果菊苷和麦角甾苷的质量分数分别由粗提物中的 33.21%、7.55%提高到 66.14%、13.43%,纯化物中 2 种苯乙醇苷的质量分数 > 75%,见表 6。

3 讨论

本研究采用正交设计试验优化管花肉苁蓉苯乙

表6 大孔树脂纯化前后松果菊苷、麦角甾苷质量分数比较

Table 6 Comparison on contents of echinacoside and acteoside before and after purification by macroporous resin

样品	出膏率 / %	松果菊苷 / %		麦角甾苷 / %	
		质量分数	转移率	质量分数	转移率
纯化前	36.61	33.21	86.78	7.55	86.92
纯化后	17.16	66.14	81.01	13.43	72.47

醇苷的提取工艺。考虑到苯乙醇苷类成分结构中既有亲脂性基团,又有多个亲水性的葡萄糖取代基。因此,在考察提取溶剂时比较了水以及低浓度乙醇的提取效果,实验结果也证实50%乙醇的提取效率最高。同样的,笔者在预试验时也发现中等极性的大孔树脂对苯乙醇苷的吸附和解吸附效果较好。因此,通过比较多种型号中等极性大孔树脂的吸附、解吸附效果,最终筛选出HPD-750型树脂。

在分析正交试验结果以及大孔树脂工艺参数时,本研究综合考虑了提取效率、提取成本、药材成本等多种因素,筛选出最合理、稳定可行的提取纯化工艺。本工艺能够使管花肉苁蓉提取物中的主

要苯乙醇苷类成分松果菊苷和麦角甾苷的量明显增加,可用于指导工业化生产。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 屠鹏飞, 何燕萍, 楼之岑. 肉苁蓉类药源调查与资源保护 [J]. 中草药, 1994, 25(4): 205-208.
- [4] 龚梦鹃, 刘新民, 王立为. 肉苁蓉对阳虚小鼠抗疲劳作用的研究 [J]. 中医药导报, 2007, 13(11): 8-10.
- [5] Wu Y, Li L, Wen T, *et al.* Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Toxicology*, 2007, 232(1/2): 50-56.
- [6] Zhao Q, Gao J P, Li W W, *et al.* Neurotrophic and neurorescue effects of echinacoside in the subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Brain Res*, 2010, 1346: 224-236.
- [7] 陈 飞, 陈 卓, 邢雪飞, 等. 肉苁蓉的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(6): 469-475.
- [8] 张 岩. 高效液相色谱法测定宽肠理气汤中松果菊苷和毛蕊花糖苷 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1994-1995.