

肉苁蓉提取工艺及干燥方式研究

黄翔¹, 郭晔红^{1*}, 贾存勤², 马旭东¹, 杨丽平¹, 黄广斌¹, 阚建红¹

1. 甘肃农业大学农学院, 中药材研究所, 甘肃省中药材规范化生产技术创新重点实验室, 甘肃省药用植物栽培育种工程中心, 甘肃省干旱生境作物学重点实验室, 甘肃 兰州 730070
2. 甘肃汇勤生物科技有限公司, 甘肃 白银 730600

摘要: **目的** 选择肉苁蓉最佳提取工艺参数, 研究不同干燥方式对 5 种苯乙醇苷类成分的影响。 **方法** 采用单因素筛选结合 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。最优条件提取后, 利用 HPLC 法检测不同干燥方式肉苁蓉的松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷成分含量并采用单因素方差分析、聚类分析、主成分分析、密切值法分析 5 种苯乙醇苷类成分含量, 选择最佳干燥方式。 **结果** 最佳提取工艺: 甲醇体积分数 55.14%, 液料比 46.39, 提取时间 38.50 min。聚类分析、主成分分析、密切值法分析表明, 采用冷冻干燥法所得到的肉苁蓉品质最好, 80 ℃烘干次之, 40 ℃烘干最低。 **结论** 使用该工艺提取肉苁蓉, 其 5 种苯乙醇苷类成分提取完全、充分。虽然冷冻干燥法炮制肉苁蓉所保留有效成分最高, 但从生产角度考虑, 采用 80 ℃烘干法炮制能达到成本和功效的平衡。

关键词: 肉苁蓉; 提取工艺; Box-Behnken 响应面法; 干燥方式; HPLC; 松果菊苷; 肉苁蓉苷 A; 毛蕊花糖苷; 异毛蕊花糖苷; 2'-乙酰基毛蕊花糖苷

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)15-3622-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.016

Extraction parameters and drying methods of *Cistanche deserticola*

HUANG Xiang¹, GUO Ye-hong¹, JIA Cun-qin², MA Xu-dong¹, YANG Li-ping¹, HUANG Guang-bin¹, KAN Jian-hong¹

1. Gansu Key Laboratory of Arid Habitat Crop Science, Gansu Province Medicinal Plant Cultivation and Breeding Engineering Research Center, Key Laboratory of Standardized Production Technology Innovation of Traditional Chinese Medicine in Gansu Province, Chinese Herbal Medicine Research Institute, Agriculture College of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China
2. Gansu Huiqin Biological Technology Co., Ltd., Baiyin 730600, China

Abstract: Objective The optimum extraction process parameters of *Cistanche deserticola* were selected to study the effects of different drying methods on five phenylethanoid glycosides. **Methods** Single factor screening combined with Box-Behnken response surface method was used to optimize the extraction process. After optimal conditions were extracted, HPLC method was used to detect the content of echinacoside, cistanche A, verbascoside, isoacteoside, and 2'-acetylacteoside in different drying methods, and one-way ANOVA, cluster analysis, principal component analysis and close value analysis were used to analyze the content of five phenylethanoid glycosides to choose the best drying method. **Results** Optimal extraction process was as following: methanol volume fraction was 55.14%, liquid to material ratio was 46.39, extraction time was 38.50 min. Cluster analysis, principal component analysis, and close value analysis showed that the quality of *C. deserticola* obtained by freeze-drying method was the best, followed by drying at 80 ℃ and the lowest at 40 ℃. **Conclusion** Using this process to extract *C. deserticola*, the five phenylethanoid glycosides are completely and fully extracted. Although the freeze-drying method of *C. deserticola* has the highest active ingredient retention, from the production point of view, the 80 ℃ drying method can achieve a balance of cost and efficiency.

Key words: *Cistanche deserticola* Y. C. Ma; extraction process; Box-Behnken response surface method; drying method; HPLC; echinacoside; cistanche A; verbascoside; isoacteoside; 2'-acetylacteoside

收稿日期: 2019-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31860349); 国家自然科学基金资助项目 (31860102); 甘肃省科技计划资助项目 (18YF1NA072)

作者简介: 黄翔 (1995—), 男, 硕士研究生, 从事中药学研究。E-mail: 81566431@qq.com

*通信作者 郭晔红, 博士, 副教授, 从事药用植物资源与利用研究。E-mail: guoyh@gsau.edu.cn

肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 或管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight 干燥带鳞叶肉质茎^[1]。肉苁蓉主要活性成分为苯乙醇苷类^[2-4]，药理研究表明其具有壮阳、提高免疫力、增强记忆等功能^[4-9]。

近年来，响应面法得以在中药提取中得到广泛应用^[10-14]。响应面法具有检测精确度高、实验所需次数少、能准确预测函数模型、能反映因素和预测值之间关系等先天的优点^[15-17]。因此，本实验将 5 种苯乙醇苷类成分含量的综合评分作为响应值，使用 Design-Expert 8.0.6.1 软件设计实验，优化肉苁蓉的提取工艺，为肉苁蓉的鉴定和质量标准建立提供参考。

目前，指标性成分松果菊苷和毛蕊花糖苷为肉苁蓉提取、炮制工艺的研究热点，且《中国药典》2015 年版规定肉苁蓉加工方法为“除去杂质，洗净，润透，切厚片，干燥”^[1]，对于干燥的方式没有明确规定。因此，本实验采用晒干、阴干、烘干（40、60、80、100、120 ℃）、冷冻干燥 8 种不同干燥方式对肉苁蓉进行炮制^[18]，为肉苁蓉干燥工艺提供理论指导。

1 材料与仪器

鲜品肉苁蓉采收于 2018 年 10 月，产地为甘肃省白银市民勤县糜滩乡，经甘肃农业大学郭晔红副教授鉴定为肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 带鳞叶的肉质茎。对照品松果菊苷（批号 82854-37-3，质量分数≥98%）、肉苁蓉苷 A（批号 93236-42-1，质量分数≥95%）、毛蕊花糖苷（批号 61276-17-3，质量分数≥98%）、异毛蕊花糖苷（批号 61303-13-7，质量分数≥98%）、2'-乙酰基毛蕊花糖苷（批号 94492-24-7，质量分数≥95%）均购于成都普菲德生物技术有限公司；甲酸、甲醇为色谱纯，德国 Merck 公司；水为纯净水，其他试剂均为分析纯。

Waters Acquity 液相色谱仪，PDA 检测器，Empower 色谱工作站及四元溶剂管理系统；KQ-100E 超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；AL104 分析天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；LyoQuest-85 冷冻干燥机，西班牙泰事达公司。

2 方法与结果

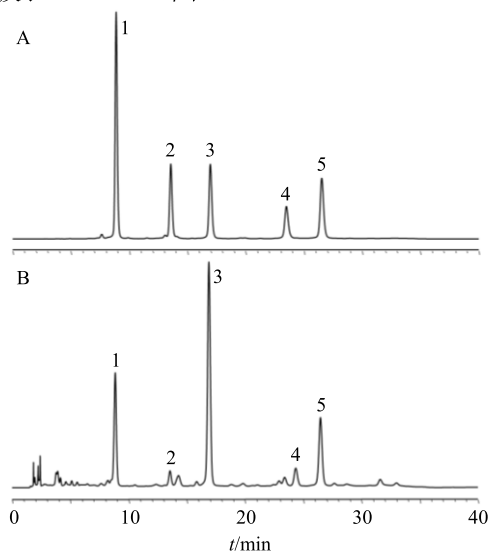
2.1 对照品溶液的制备

精密称定松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷对照品适量，加 70% 甲醇制成质量浓度分别为 1.04、0.61、0.63、

0.39、0.48 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2 肉苁蓉的色谱条件

Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；柱温 30 ℃，体积流量 1.0 mL/min；流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液，洗脱梯度：0~12 min，29%~34% 甲醇；12~40 min，34%~40% 甲醇；30~35 min，40%~35% 甲醇；35~40 min，30% 甲醇；检测波长 330 nm（图 1）。



1-松果菊苷 2-肉苁蓉苷 A 3-毛蕊花糖苷 4-异毛蕊花糖苷
5-2'-乙酰基毛蕊花糖苷
1-echinacoside 2-cistanche A 3-verbascoside 4-isoacteoside
5-2'-acetylacteoside

图 1 混合对照品 (A) 与肉苁蓉样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of mixed reference (A) and *C. deserticola* sample (B)

2.3 供试品溶液的制备

精密称取 1 g 烘干的肉苁蓉粉末于三角烧瓶中（过 65 目筛），加 50% 甲醇 50 mL，称质量，40 kHz 超声 150 W，冷却室温，补足质量，即得。

2.4 线性关系考察

取上述混合对照品溶液 0.1、0.5、1、2、4、8 mL 置 10 mL 量瓶中，加 70% 甲醇至刻度。精密吸取 10 μL，按“2.2”项色谱条件测定，质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，进行线性回归，得回归方程分别为松果菊苷 $Y=128\,049 X-830\,189$ ， $r=0.999\,5$ ，线性范围 10.4~832.0 μg/mL；肉苁蓉苷 A $Y=87\,980 X-416\,764$ ， $r=0.999\,9$ ，线性范围 6.1~488.0 μg/mL；毛蕊花糖苷 $Y=92\,831 X-447\,963$ ， $r=0.999\,8$ ，线性范围 6.3~504.0 μg/mL；异毛蕊花糖苷 $Y=92\,831 X-447\,963$ ， $r=0.999\,2$ ，线性范围 3.9~312 μg/mL；2'-乙酰基毛蕊花糖苷 $Y=79\,207 X-$

304 428, $r=0.999\ 4$, 线性范围 4.8~384.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度考察 取“2.1”项混合对照品溶液 20 μL , 连续进样 6 次, 测定松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷峰面积, RSD 分别为 0.23%、0.71%、0.59%、0.41%、0.29%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取同一肉苁蓉样品 6 份, 按“2.3”项制备供试品溶液, “2.2”项色谱条件进样, 测定峰面积。结果松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷质量分数的平均值分别为 1.83%、0.21%、2.34%、0.13%、0.68%, RSD 分别为 1.32%、0.83%、1.24%、2.19%、0.78%, 说明方法重复性较好。

2.5.3 稳定性试验 于 0、2、4、8、12、24、48 h 测定同一份供试品溶液(按“2.3”项制备)的稳定性, 得松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷峰面积, RSD 分别为 0.58%、0.21%、1.58%、1.46%、2.19%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.5.4 加样回收率试验 取 6 份已知含量的肉苁蓉样品 1 g, 精密加入一定量混合对照品溶液(松果菊苷 1.06 mg/mL、肉苁蓉苷 A 0.86 mg/mL、毛蕊花糖苷 2.17 mg/mL、异毛蕊花糖苷 0.79 mg/mL、2'-乙酰基毛蕊花糖苷 0.91 mg/mL), 加 70% 甲醇补足至 50 mL, 按“2.2”项色谱条件进样, 测得平均回收率

分别为 101.52%、99.21%、102.62%、98.62%、97.36%, RSD 分别为 1.64%、1.95%、0.87%、1.59%、1.13%, 加样回收率良好。

2.6 样品测定

精密称量单因素及响应曲面试验样品, 按“2.3”项方法制备溶液, “2.2”项色谱条件进样测定, 样品平行制备 2 份且重复 2 次测定, 得到样品含量平均值。

2.7 数据标准化处理

将单因素实验和响应面试验的结果进行 Z-score 标准化处理^[19], 标准化处理公式为新数据=(5 种苯乙醇苷类成分含量-算术平均数)/标准差, 将标准化处理后的 5 种苯乙醇苷类指标数据加和, 得到综合评分。

2.8 肉苁蓉提取工艺单因素考察

以 5 种苯乙醇苷类成分含量的综合评分为考察指标, 分别考察甲醇体积分数、液料比、提取时间和提取温度对提取效果的影响。

2.8.1 甲醇体积分数对综合评分的影响 根据单因素实验设计(表 1)进行实验, 每个实验水平设 3 个平行组, 进行考察, Z-score 标准化处理数据(表 2)。综合评分随着甲醇体积分数的增大而增大。当甲醇体积分数大于 50% 时, 综合评分增长缓慢, 考虑到液料比的增加可能会对提取液 pH 值产生影响, 令肉苁蓉中对酸碱度敏感的苷类成分含量发生变化, 因此选择 50% 甲醇体积分数作为最优选择。

表 1 单因素实验条件

Table 1 Single factor test condition

因素	变化条件	固定条件
甲醇体积分数	40%、50%、60%、70%、80%	液料比 50, 提取时间 30 min, 温度 35 $^{\circ}\text{C}$
液料比	30、40、50、60、70	甲醇体积分数 50%, 提取时间 30 min, 温度 35 $^{\circ}\text{C}$
提取时间	20、30、40、50、60 min	甲醇体积分数 50%, 液料比 50, 温度 35 $^{\circ}\text{C}$
提取温度	20、35、50、65、80 $^{\circ}\text{C}$	甲醇体积分数 50%, 液料比 50, 提取时间 30 min

2.8.2 液料比对综合评分的影响 根据单因素实验设计(表 1)进行实验, 每个实验水平设 3 个平行组, 进行考察, Z-score 标准化处理数据(表 2)。液料比在 50 后, 综合评分增长缓慢。推测提取溶剂增加, 肉苁蓉溶解更充分, 提取量随之增加。液料比在 50 时, 肉苁蓉有效成分大体溶出。因此, 最佳液料比为 50。

2.8.3 提取时间对综合评分的影响 根据单因素实验设计(表 1)进行实验, 每个实验水平设 3 个平

行组, 进行考察, Z-score 标准化处理数据(表 2)。在 20~40 min 时, 综合评分逐渐增大, 40 min 之后逐渐变小。推测随着提取时间的增加, 有效成分逐渐析出, 40 min 时达到顶峰。之后, 有效成分随着提取时间的增加被破坏, 含量逐渐降低。因此, 选择 40 min 为最优超声时间, 不仅能提高提取效果, 还能节约能源。

2.8.4 提取温度对综合评分的影响 根据单因素实验设计(表 1)进行实验, 每个实验水平设 3 个平

表 2 单因素考察结果 (括号内为标准化处理后的数据)

Table 2 Single factor investigation result (brackets for standardized processing of test data)

因素	水平	松果菊苷/%	肉苁蓉苷 A/%	毛蕊花糖苷/%	异毛蕊花糖苷/%	2'-乙酰基毛蕊花糖苷/%	综合评分
甲醇体积分数/%	40	1.68 (-1.506)	0.29 (-1.604)	2.14 (-1.803)	0.26 (1.604)	0.42 (-1.826)	-5.135
	50	1.72 (-0.878)	0.30 (-0.267)	2.31 (-0.344)	0.24 (0.267)	0.57 (-0.321)	-1.543
	60	1.84 (1.004)	0.30 (-0.267)	2.41 (0.515)	0.24 (0.267)	0.66 (0.582)	2.101
	70	1.82 (0.690)	0.31 (1.069)	2.43 (0.687)	0.22 (-1.069)	0.68 (0.783)	2.160
	80	1.82 (0.690)	0.31 (1.069)	2.46 (0.945)	0.22 (-1.069)	0.68 (0.783)	2.417
液料比	30	1.43 (-1.881)	0.22 (-1.876)	1.91 (-1.868)	0.19 (-1.860)	0.38 (-1.879)	-9.364
	40	1.76 (0.180)	0.31 (-0.188)	2.26 (-0.209)	0.22 (-0.116)	0.54 (-0.190)	-0.883
	50	1.93 (0.670)	0.36 (0.751)	2.44 (0.645)	0.23 (0.465)	0.62 (0.654)	3.185
	60	1.92 (0.620)	0.36 (0.751)	2.43 (0.597)	0.24 (1.046)	0.62 (0.654)	3.669
	70	1.95 (0.771)	0.35 (0.563)	2.48 (0.834)	0.23 (0.465)	0.63 (0.760)	3.393
提取时间/min	20	1.53 (-1.784)	0.27 (-1.349)	2.31 (-0.383)	0.19 (0.439)	0.53 (-1.887)	-4.964
	30	1.82 (0.611)	0.34 (0.797)	2.37 (0.767)	0.20 (0.877)	0.62 (0.472)	3.524
	40	1.89 (1.189)	0.36 (1.410)	2.41 (1.534)	0.20 (0.877)	0.64 (0.996)	6.006
	50	1.76 (0.116)	0.31 (-0.123)	2.29 (-0.767)	0.17 (-0.439)	0.62 (0.472)	-0.741
	60	1.73 (-0.132)	0.29 (-0.736)	2.27 (-1.150)	0.14 (-1.754)	0.60 (-0.052)	-3.825
提取温度/℃	20	1.82 (-0.498)	0.32 (-1.294)	2.39 (0.255)	0.25 (-0.791)	0.62 (0.359)	-1.969
	35	1.97 (1.469)	0.33 (-0.755)	2.41 (0.680)	0.24 (-1.581)	0.57 (-1.886)	-2.073
	50	1.89 (0.420)	0.37 (1.402)	2.31 (-1.445)	0.27 (0.791)	0.63 (0.808)	1.976
	65	1.87 (0.157)	0.36 (0.863)	2.34 (-0.807)	0.27 (0.791)	0.63 (0.808)	1.812
	80	1.74 (-1.547)	0.34 (-0.216)	2.44 (1.317)	0.27 (0.791)	0.61 (-0.090)	0.255

行组, 进行考察, Z-score 标准化处理数据 (表 2)。综合评分随提取温度的变化无规律, 且不易稳定提取温度, 因此, 不把提取温度纳入考察范围。

2.9 响应面法优化肉苁蓉提取工艺试验

2.9.1 试验设计与结果 选择甲醇体积分数 (A)、液料比 (B)、提取时间 (C) 为自变量, 5 种苯乙醇苷类成分含量的综合评分作为响应值 (R), 进行 Box-Behnken 试验设计 (表 3)。

2.9.2 模型显著性分析 利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对二次多项式回归方程进行拟合, 所得 2 次多元回归方程 $R=4.51+2.4 A-3.6 B-0.37 C+0.065 AB-0.62 AC-0.047 BC-2.4 A^2-4.94 B^2-2.24 C^2$, 决定系数 (r^2) = 0.998 0, 调整系数为 0.995 5, 表明方程拟合程度好, 试验误差较小, 此模型可用于 5 种苯乙醇苷类成分含量的综合评分的分析和预测。方差分析 (表 4) 可知, 该模型极显著 ($P<0.001$)。失拟项不显著 ($P=0.607 0$)。回归方程的显著性表明, 一次项 A、B、C 和 2 次项 A^2 、 B^2 、 C^2 有极强的显著性。交互项 AC 为显著项, AB 和 BC 为不显著项。综上所述, 各因素对综合评分影响为液料比

(B) > 甲醇体积分数 (A) > 提取时间 (C)。

2.9.3 最佳提取工艺参数预测 响应面倾斜度反映因素对响应值的影响程度, 坡度越陡, 因素间交互作用越显著。同时, 曲面图颜色也反映因素间的变化趋势, 颜色越深变化趋势越明显, 结果见图 2。根据单因素实验和二次回归模型分析, 以 5 种苯乙醇苷类成分含量最大值为目标, 采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件计算, 肉苁蓉最优提取工艺参数为甲醇体积分数 55.14%, 液料比 46.39, 提取时间 38.50 min。在此条件下, 5 种苯乙醇苷类成分提取综合评分为 5.800。

2.10 验证实验

为了检测实验结果, 验证模型。考虑操作可行性, 将工艺参数调整为甲醇体积分数 55%, 液料比 46, 提取时间 39 min, 重复 3 次, 结果见表 5。对结果的均值进行标准化处理后的综合评分为 5.963, 与预测值 5.800 相差 2.81%, 说明方程拟合较好, 优化后的提取工艺可靠, 稳定。

将《中国药典》2015 年版中所使用的含量测定方法 (液料比 50, 甲醇体积分数 50%, 超声提取

表 3 响应面试验设计与结果 (括号内为标准化处理后的数据)

Table 3 Response surface experiment result (brackets for standardized processing of test data)

编号	A/%	B	C/min	5 种苯乙醇苷类成分质量分数/%					综合评分
				松果菊苷	肉苁蓉苷 A	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	2'-乙酰基毛蕊花糖苷	
1	40 (-1)	50 (0)	30 (-1)	1.68 (-1.955)	0.29 (0.263)	2.14 (-0.718)	0.26 (1.214)	0.42 (-1.531)	-2.728
2	40 (-1)	60 (+1)	40 (0)	1.74 (-1.158)	0.17 (-1.802)	1.95 (-1.939)	0.02 (-1.843)	0.44 (-2.317)	-9.058
3	60 (+1)	60 (+1)	40 (0)	1.71 (-1.556)	0.27 (-0.081)	2.23 (-0.140)	0.04 (-1.588)	0.50 (-0.745)	-4.111
4	50 (0)	50 (0)	40 (0)	1.91 (1.103)	0.36 (1.468)	2.44 (1.209)	0.21 (0.577)	0.62 (0.433)	4.790
5	60 (+1)	50 (0)	50 (+1)	1.82 (-0.094)	0.31 (0.607)	2.26 (0.053)	0.22 (0.704)	0.57 (-0.058)	1.213
6	60 (+1)	40 (-1)	40 (0)	1.83 (0.039)	0.35 (1.296)	2.32 (0.438)	0.21 (0.577)	0.67 (0.924)	3.274
7	50 (0)	40 (-1)	30 (-1)	1.90 (0.970)	0.27 (-0.081)	2.21 (-0.268)	0.18 (0.195)	0.60 (0.237)	1.052
8	50 (0)	60 (+1)	50 (+1)	1.76 (-0.892)	0.19 (-1.457)	1.93 (-2.067)	0.06 (-1.333)	0.50 (-0.745)	-6.495
9	50 (0)	50 (0)	40 (0)	1.90 (0.970)	0.29 (0.263)	2.36 (1.017)	0.24 (0.959)	0.68 (1.023)	4.231
10	50 (0)	50 (0)	40 (0)	1.89 (0.837)	0.31 (0.607)	2.38 (0.824)	0.29 (1.596)	0.64 (0.630)	4.493
11	60 (+1)	50 (0)	30 (-1)	1.84 (0.172)	0.30 (0.435)	2.41 (1.017)	0.23 (0.832)	0.66 (0.826)	3.282
12	50 (0)	50 (0)	40 (0)	1.87 (0.571)	0.32 (0.779)	2.41 (1.209)	0.21 (0.577)	0.68 (1.023)	4.159
13	50 (0)	40 (-1)	50 (+1)	1.89 (0.837)	0.21 (-1.113)	2.27 (0.117)	0.12 (-0.569)	0.70 (1.219)	0.491
14	50 (0)	50 (0)	40 (0)	1.92 (1.236)	0.36 (1.468)	2.41 (1.017)	0.19 (0.322)	0.66 (0.826)	4.868
15	40 (-1)	40 (-1)	40 (0)	1.82 (-0.094)	0.25 (-0.425)	2.21 (-0.268)	0.12 (-0.569)	0.57 (-0.058)	-1.414
16	40 (-1)	50 (0)	50 (+1)	1.86 (0.438)	0.22 (-0.941)	2.19 (-0.397)	0.09 (-0.951)	0.53 (-0.451)	-2.302
17	50 (0)	60 (+1)	30 (-1)	1.72 (-1.424)	0.20 (-1.285)	2.08 (-1.104)	0.11 (-0.697)	0.45 (-1.236)	-5.746

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	314.610	7	34.960	396.59	<0.000 1	A ²	24.200	1	24.200	274.54	<0.000 1
A	45.890	1	45.890	520.61	<0.000 1	B ²	102.670	1	102.670	1 164.84	<0.000 1
B	103.770	1	103.770	1 177.32	<0.000 1	C ²	21.210	1	21.210	240.67	<0.000 1
C	1.090	1	1.090	12.37	0.009 8	残差	0.620	7	0.088		
AB	0.017	1	0.017	0.19	0.674 8	失拟项	0.210	3	0.070	0.68	0.607 0
AC	1.560	1	1.560	17.66	0.004 0	纯误差	0.410	4	0.100		
BC	8.836 × 10 ⁻³	1	8.836 × 10 ⁻³	0.10	0.760 8	总和	315.230	16			

P<0.05 为显著项, P<0.01 为极显著项

P<0.05 significant difference, P<0.01 more significant difference

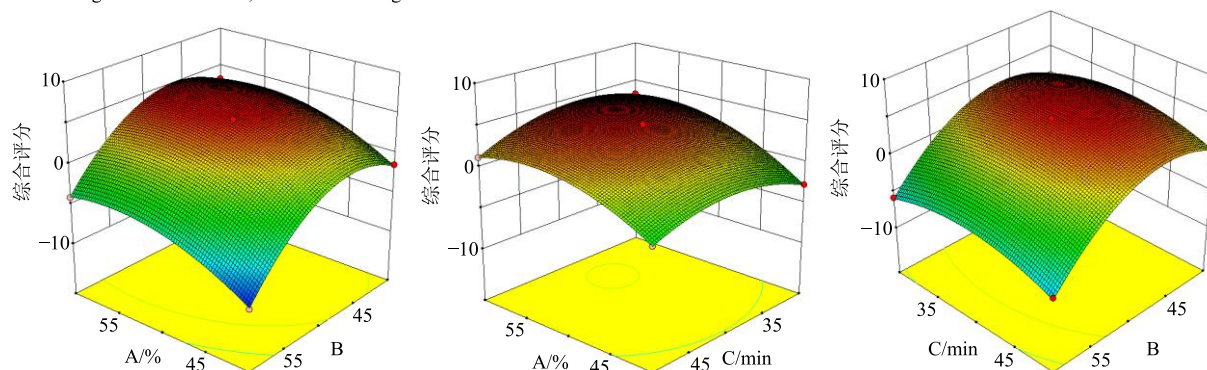


图 2 肉苁蓉提取工艺优化响应面图

Fig. 2 Optimized response surface map of extraction process of *C. deserticola*

表 5 工艺验证结果 (括号内为标准化处理后的数据)

Table 5 Results of process verification (brackets for standardized processing of test data)

验证批次	质量分数/%					综合评分
	松果菊苷	肉苁蓉苷 A	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	2'-乙酰基毛蕊花糖苷	
1	2.19 (1.560)	0.33 (0.146)	2.57 (1.176)	0.34 (1.678)	0.73 (1.214)	5.775
2	2.34 (2.389)	0.38 (0.325)	2.63 (1.462)	0.29 (1.117)	0.64 (0.318)	5.611
3	2.22 (1.726)	0.34 (0.182)	2.75 (2.034)	0.27 (0.893)	0.79 (1.812)	6.646
平均值	2.25	0.36	2.64	0.30	0.72	5.963
药典法 1	2.07 (1.357)	0.24 (0.112)	2.64 (1.021)	0.32 (1.326)	0.72 (1.224)	5.040
药典法 2	2.21 (1.756)	0.23 (0.109)	2.70 (1.261)	0.33 (1.483)	0.71 (0.602)	5.211
药典法 3	2.11 (1.457)	0.24 (0.213)	2.64 (1.018)	0.35 (1.623)	0.71 (0.717)	5.028
平均值	2.13	0.24	2.66	0.33	0.71	5.093

40 min) 制备供试品溶液 3 份进样检测, 与验证试验结果进行比较。优化的提取工艺比药典法所得的 5 种苯乙醇苷类成分综合评分高 0.87, 若按照药典中规定的松果菊苷和毛蕊花糖苷含量为评价指标, 优化的提取工艺比药典法高 2.08%, 有显著差异; 若以药典中所规定的毛蕊花糖苷的含量为评价指标, 优化的提取工艺比药典法低 0.75%, 无明显差异。且在检测过程中发现, 药典法检测的样品另外 3 种苯乙醇苷分离不理想。因此, 从肉苁蓉质量评价的可靠性和全面性来看, 响应面法优化的提取工艺相较于药典法更有优势。

2.11 不同干燥工艺肉苁蓉样品制备

将肉苁蓉鲜品切制成 4 mm 的厚片, 按如下操作进行处理。

(1) 晒干: 在阳光下晾晒, 测定药材含水量变化, 将含水量低于 10.0% 的药材备用。

(2) 阴干: 在室温 25.3 °C 条件下, 避光阴干肉苁蓉, 测定药材含水量, 将含水量低于 10.0% 的药材备用。

(3) 烘干: 将肉苁蓉分别置于 40、60、80、100、120 °C 烘箱中烘干, 将含水量低于 10.0% 的药材备用。

(4) 冷冻干燥: 在 -80 °C 冰箱将肉苁蓉预冷 1 h 后, 置于真空冷冻干燥机中 (真空度 600 Pa、冷冻温度 -56 °C), 干燥 12 h 后取出。将不同干燥方式的肉苁蓉按响应面法优化的提取工艺参数进行提取, 按 “2.2” 项色谱条件进行检测。

根据表 6 结果可知, 不同干燥方法对 5 种苯乙醇苷类成分影响不同。其中, 异毛蕊花糖苷最高含量与最低含量相差近 45 倍, 毛蕊花糖苷最高含量与最低含量相差近 11 倍, 松果菊苷最高含量与最低含量相差近 3 倍。

表 6 不同干燥方式下肉苁蓉样品中 5 种苯乙醇苷类质量分数测定结果 (n = 3)

Table 6 Determination of mass fraction of five phenylethanoid glycosides from *C. deserticola* in different drying methods (n = 3)

干燥方式	质量分数/(μg·g ⁻¹)				
	松果菊苷	肉苁蓉苷 A	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	2'-乙酰基毛蕊花糖苷
晒干	4 832.587 ^b	710.534 ^b	10 224.817 ^{cd}	38.034 ^c	2 485.543 ^d
阴干	7 069.126 ^b	930.701 ^{ab}	13 619.880 ^{cd}	1 392.057 ^{ab}	3 482.823 ^{cd}
40 °C 烘干	6 031.002 ^b	2 630.170 ^a	3 999.760 ^b	641.832 ^{bc}	4 468.848 ^{cd}
60 °C 烘干	8 034.979 ^b	2 675.116 ^a	18 738.615 ^{bcd}	557.911 ^{bc}	6 441.495 ^{abc}
80 °C 烘干	14 425.772 ^a	2 679.503 ^a	25 401.254 ^{bc}	1 356.051 ^{ab}	8 500.003 ^a
100 °C 烘干	8 677.509 ^b	2 704.355 ^a	23 821.763 ^{bc}	1 742.931 ^a	8 142.917 ^{ab}
120 °C 烘干	4 991.590 ^b	1 183.523 ^{ab}	24 296.983 ^{bc}	1 033.144 ^b	6 105.496 ^{abc}
冷冻干燥	14 028.612 ^a	1 883.523 ^{ab}	44 407.415 ^a	507.711 ^{bc}	4 757.285 ^{bcd}
P	0.004	0.107	0.002	0.001	0.019

同列 P 值表示群组之间差异, 同列不同字母表示处理间差异显著 (P < 0.05)

P values in the same column show the inter-group differences, values in the same column followed by different letters show significant different at P < 0.05

2.11.1 样品方差分析 为了更加科学阐述不同干燥方法对肉苁蓉 5 种苯乙醇苷类成分的影响, 采用 SPSS 20.0.0, 规定 8 种干燥方式为自变量, 5 种苯乙醇苷类成分的质量分数为因变量, 进行单因素方差分析 (表 6)。分析结果表明, 除肉苁蓉苷 A 成分外, 不同干燥方式对其他 4 种苯乙醇苷类成分具有显著差异。肉苁蓉在晒干干燥条件下, 除毛蕊花糖苷成分外, 其他 4 种苯乙醇苷类成分质量分数最低, 具有显著差异 ($P<0.05$)。肉苁蓉在 80 °C 烘干干燥条件下, 除毛蕊花糖苷成分外, 其他 4 种苯乙醇苷类成分质量分数最高, 差异显著 ($P<0.05$)。在所有干燥方式中肉苁蓉苷 A 成分差异都不显著 ($P>0.05$), 说明不同干燥方式对肉苁蓉苷 A 含量影响不大。

2.11.2 聚类分析 为了更科学对干燥方法进行归类, 采用 SPSS 20.0.0 对 5 种苯乙醇苷类成分进行聚类分析 (图 3)。采用组间连接法和欧式平方距离作为聚类分析方法。当临界值在 5 时, 干燥方式被分为 3 类。其中 A 类: 晒干、阴干、40 °C 烘干被聚为一类; B 类: 100 °C 烘干、120 °C 烘干、60 °C 烘干、80 °C 烘干被聚为一类; C 类: 冷冻干燥独自成一类。当临界值大于 10 时, A 类和 B 类聚到一起。晒干、阴干、40 °C 烘干、100 °C 烘干、120 °C 烘干、60 °C 烘干、80 °C 烘干在聚类分析中得到的样品距离相同, 说明品质类似。而冷冻干燥样品距离较远, 结合质量分数可以得出冷冻干燥的肉苁蓉品质较好。

2.11.3 主成分分析 (PCA) 采用 SPSS 20.0.0 进行 PCA, 由表 7 可知前 3 个主成分累积方差贡献率为 93.269%, 由此可证明前 3 个因子能反映肉苁蓉质量, 所以前 3 个成分作为主成分进行分析。变量对前 3 个主成分的贡献可通过初始因子载荷矩阵和公共因子载荷散点图来表示 (图 4、表 8), 其中,

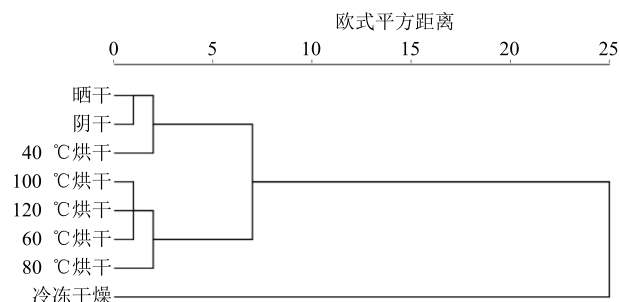


图 3 不同干燥方式肉苁蓉样品聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of *C. deserticola* samples by different drying methods

表 7 特征值与累积方差贡献率

Table 7 Eigenvalues and cumulative variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	2.749	54.981	54.981
2	1.193	23.861	78.843
3	0.721	14.426	93.269
4	0.248	4.951	98.221
5	0.089	1.799	100.000

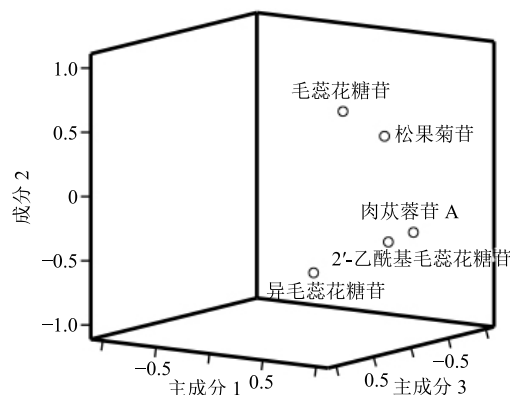


图 4 主成分载荷散点图

Fig. 4 Principal component load scatter plot

表 8 初始因子载荷矩阵

Table 8 Initial factor load matrix

成分	1	2	3
松果菊苷	0.796	0.488	-0.096
肉苁蓉苷 A	0.740	-0.334	-0.563
毛蕊花糖苷	0.622	0.709	0.212
异毛蕊花糖苷	0.613	-0.494	0.592
2'-乙酰基毛蕊花糖苷	0.897	-0.312	-0.002

2'-乙酰基毛蕊花糖苷、松果菊苷、肉苁蓉苷 A 在第 1 主成分上有较高载荷, 说明第 1 主成分主要反映这 3 种成分信息。毛蕊花糖苷在第 2 主成分上有较高载荷, 可知毛蕊花糖苷的信息主要反映在第 2 主成分上。同理, 第 3 主成分主要反映异毛蕊花糖苷的信息。根据公式, 可以得到 3 个主成分因子得分函数: $F_1=0.289 X_1+0.269 X_2+0.226 X_3+0.223 X_4+0.326 X_5$; $F_2=0.409 X_1-0.280 X_2+0.594 X_3-0.414 X_4-0.261 X_5$; $F_3=-0.132 X_1-0.781 X_2+0.294 X_3+0.820 X_4-0.003 X_5$ 。综合得分 (F): $F=0.549 81 F_1+0.238 61 F_2+0.144 26 F_3$, 计算组成分值得和综合得分, 并排序 (表 9)。排名第 1 为冷冻干燥, 排名第 2 为 80 °C 烘干, 排名第 3 为 100 °C 烘干, 排名第 4 到 8 为 120 °C 烘干、60 °C 烘干、阴干、

晒干, 40 ℃烘干。由此可见, 冷冻干燥为最佳干燥方式, 40 ℃烘干为最差干燥方式。

2.11.4 密切值法分析 密切值法分析首先确定最优点集 (B_j) 和最劣点集 (W_j), 计算与最优点的距

离 (d_j) 和最劣点的距离 (l_i), 再计算密切值 (C_i) 并排序, C_i 值越接近 0, 评价越优^[20]。表 10 说明, 冷冻干燥方式为最优干燥方式, 其次为 80 ℃烘干, 最差为 40 ℃烘干。这与聚类分析和 PCA 结果一致。

表 9 不同干燥方式主成分值、综合得分与排序

干燥方式	F_1	F_2	F_3	F	排序
晒干	4 717.329	7 186.647	1 836.999	13 740.975	7
阴干	6 817.258	9 235.557	3 475.281	19 528.095	6
40 ℃烘干	4 954.394	2 674.002	-1 161.430	6 466.966	8
60 ℃烘干	9 500.984	11 755.806	2 797.433	24 054.222	5
80 ℃烘干	13 703.918	17 458.319	4 557.537	35 719.774	2
100 ℃烘干	11 662.255	14 095.134	5 150.841	30 908.229	3
120 ℃烘干	9 472.838	14 121.326	6 388.953	29 983.117	4
冷冻干燥	16 261.107	30 136.477	10 135.023	56 532.606	1

表 10 密切值法综合评价结果

Table 10 Close value method comprehensive evaluation result

干燥方式	d_i	l_i	C_i	排序结果
晒干	0.613	0.087	9.497	7
阴干	0.522	0.161	7.968	6
40 ℃烘干	0.651	0.090	10.101	8
60 ℃烘干	0.435	0.256	6.451	4
80 ℃烘干	0.265	0.487	3.434	2
100 ℃烘干	0.362	0.332	5.190	3
120 ℃烘干	0.463	0.288	6.837	5
冷冻干燥	0.064	0.667	0.000	1

3 讨论

根据单因素试验的结果, 响应面法利用数据自动生成连续变量的曲面模型, 之后在曲面中获得一组条件所对应的最优值。因此, 在实验设计中, 尤为重要是单因素筛选。在《中国药典》2015 年版中, 肉苁蓉的含量检测只针对松果菊苷和毛蕊花糖苷这两种有效成分, 虽具有较高的参考价值, 但涵盖面窄。因此, 从准确性方面考虑, 单因素筛选中, 药典规定的工艺参数都必须涵盖在本实验每个因素的取值范围之内。并在药典工艺参数基础上扩大选择范围, 获得更优的提取工艺。

本实验先通过单因素筛选试验, 选择适合的 3 因素 3 水平。对甲醇体积分数、液料比、提取时间进行考察, 将 5 种苯乙醇苷类成分的含量用 Z-score

标准化处理得到综合评分作为响应值, 避免了 5 种成分质量分数差异太大造成低含量成分的影响被掩盖的问题。再通过 Box-Behnken 响应面法进行拟合, 得到最佳的提取工艺条件为甲醇体积分数 55.14%, 液料比为 46.39, 提取时间 38.50 min, 并进行 3 组验证试验证明了工艺的可靠性。肉苁蓉在此提取工艺条件下的成分提取更为充分、可靠, 可用于肉苁蓉提取工艺研究及质量评价。

从不同统计学方法分析结果来看, 不同干燥方法对肉苁蓉中苯乙醇苷类成分影响显著。苯乙醇苷类成分以冷冻干燥和 80 ℃烘干中质量分数最高。其中, 松果菊苷、肉苁蓉苷 A、异毛蕊花糖苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷质量分数在冷冻干燥样品中低于 80 ℃烘干样品, 但毛蕊花糖苷质量分数在 80 ℃烘干样品中低于冷冻干燥样品。总的来说, 80 ℃烘干样品 4 种苯乙醇苷类成分质量分数均高于冷冻干燥样品, 但差异不显著。冷冻干燥样品毛蕊花糖苷质量分数高于 80 ℃烘干样品, 且差异具有显著性。PCA 和密切值法分析都表明 40 ℃烘干样品中成分保留最差, 其次为晒干、阴干。推测造成这一结果的原因是这 3 种干燥方式所需时间较长, 且由于蒸制时间较短, 肉苁蓉植株内能造成苯乙醇苷类水解的酶未被完全灭活, 继续进行反应。这一结果与聚类分析结果一致。最终, 所有的分析结果都表明, 冷冻干燥和 80 ℃烘干相比于其他干燥方法具有明显优势, 40 ℃烘干的样品品质最差。据调查, 传统肉苁蓉干燥方法是阴干, 具有工艺简单, 节约成本

的优点。但所需干燥时间较长,且对于天气要求较高。本研究结果表明,采用现代化的冷冻干燥、烘干的方法,能缩短干燥时间、提高干燥效率有利于解决传统阴干干燥的弊端,而且能显著提高肉苁蓉苯乙醇苷类成分的含量,得到质优价低的药材。考虑到后期放大生产,采用更加节约成本的80℃烘干为最佳干燥方法。本实验只是从成分提取角度考虑不同干燥方式对肉苁蓉质量造成的差异,也需更深入研究这种差异对肉苁蓉药理、药效的影响。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2015.
- [2] 郝媛媛, 岳利军, 康建军, 等. “沙漠人参”肉苁蓉和锁阳研究进展[J]. 草业学报, 2012, 21(2): 286-293.
- [3] 王毓杰. 管花肉苁蓉中苯乙醇苷的提取和大孔树脂纯化工艺研究[J]. 中草药, 2014, 45(16): 2344-2348.
- [4] 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.
- [5] Wang L L, Ding H, Yu H S, *et al.* *Cistanches Herba*: Chemical constituents and pharmacological effects [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(2): 135-142.
- [6] Boakye-Yiadom M, Han L F, Li W, *et al.* Chemical constituents from stems of *Cistanches deserticola* [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(3): 293-296.
- [7] 曾克武, 廖理曦, 万彦军, 等. 基于靶点“钩钩”策略的肉苁蓉苯乙醇苷药理靶点鉴定及功效解析[J]. 中草药, 2018, 49(1): 173-178.
- [8] Morikawa T, Pan Y, Ninomiya K, *et al.* Acylated phenylethanoid oligoglycosides with hepatoprotective activity from the desert plant *Cistanche tubulosa* [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2010, 18(5): 1882-1890.
- [9] Nan Z D, Zhang M B, Zeng K W, *et al.* Anti-inflammatory iridoids from the stems of *Cistanche deserticola* cultured in Tarim Desert [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(1): 61-65.
- [10] 赵重博, 王晶, 吴建华, 等. 响应面法优化秦皮产地加工与饮片炮制一体化工艺研究[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4753-4759.
- [11] 彭晓霞, 路莎莎. 响应面优化法在中药研究中的应用和发展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 296-299.
- [12] Xu Q, Shen Y Y, Wang H F, *et al.* Application of response surface method-ology to optimise extraction of flavonoids from fructus sophorae [J]. *Food Chem*, 2013, 138(4): 2122-2129.
- [13] 宋燕, 冉姍, 孙方方, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优化木鳖子霜炮制工艺[J]. 中草药, 2019, 50(2): 382-387.
- [14] 刘伟, 孙维峰, 吴新荣. 响应面法在优化中药提取工艺中的应用[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(8): 1960-1962.
- [15] 权亮, 赵永峰, 陈志敏, 等. 基于信息熵赋值法的正交联用 Box-Behnken 设计-响应面法优化黄丝郁金醋炙工艺研究[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1823-1828.
- [16] 陈林伟, 秦昆明, 王琴, 等. Box-Behnken 响应面法优选气血双补酒的渗漉提取工艺[J]. 中草药, 2015, 46(8): 1151-1155.
- [17] 吴振, 李红, 陈岗, 等. 星点设计-响应面优化大黄酚葡聚糖复合物的制备工艺[J]. 中草药, 2014, 45(11): 1540-1544.
- [18] 范亚楠, 黄玉秋, 贾天柱, 等. 肉苁蓉炮制研究进展[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(6): 737-741.
- [19] 王永香, 米慧娟, 张传力, 等. Box-Behnken 响应面法优化热毒宁注射液金银花和青蒿(金青)的醇沉工艺研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 671-678.
- [20] 原跃礼, 郭连霞, 冯晖. 应用 Excel 进行密切值法综合评价[J]. 首都公共卫生, 2010, 4(4): 186-187.