

文章编号:1673-1689(2006)03-0033-04

栽培管花肉苁蓉中苯乙醇苷的乙醇提取工艺

任璐¹, 顾小红^{2*}, 汤坚², 陈卫¹

(1. 江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 分析测试中心, 江苏 无锡 214036)

摘要: 探索了用乙醇回流法从栽培管花肉苁蓉中提取苯乙醇苷类物质的工艺流程。通过单因素和响应面实验, 对影响苯乙醇苷提取的因素进行了探讨和研究, 运用响应面分析法确定了提取工艺的最优化条件: 提取温度为 60 ℃, 料液比(g : mL) 为 1 : 12.8, 提取时间为 3.75 h, 乙醇体积分数为 68.2 %, 提取次数 2 次。在此条件下苯乙醇苷的得率为 5.76 %。

关键词: 栽培管花肉苁蓉; 苯乙醇苷; 提取; 响应面分析法(RSA)

中图分类号: Q 33

文献标识码: A

Phenylethanoid Glycosides Extracting Method from Cultivated *Cistanche tubulosa* (Schenk) R. Wight by Ethanol

REN Lu¹, GU Xiao-hong^{2*}, TANG Jian², CHEN Wei¹

(1. Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Test and Analysis Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The technology of extracting phenylethanoid glycosides by ethanol from the cultivated *Cistanche tubulosa* (Schenk) R. Wight was studied in this article. The factors affecting the extraction were explored and studied. By the response surface analysis, the optimal parameters were obtained as following: temperature of 60 ℃, phase ratio of solid to liquid(g : mL) of 1 : 12.8, extraction time of 3.5 h, ethanol to whole extraction system in volume of 68.2 %, and exaction in two times. The extraction yield reached 5.76 %.

Key words: cultivated *Cistanche tubulosa* (Schenk) R. Wight; phenylethanoid glycosides; extraction; response surface analysis(RSA)

肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma) 为列当科肉苁蓉属寄生植物, 中药肉苁蓉为肉苁蓉的干燥带鳞叶肉质茎, 中药名又称金笋、地精, 俗称大芸, 其味甘、咸、性温^[1]。历代经书记载, 肉苁蓉具有补肾阳、益精血、润肠通便的作用。苯乙醇苷类化合物(phenylethanoid glycosides, PeG) 是肉苁蓉的主要活性成份, 它由咖啡酸、苯乙醇苷元、糖三部

分组成, 包括海胆苷、麦角甾苷、顺式麦角甾苷、异麦角甾苷、2-乙酰基麦角甾苷、肉苁蓉苷等物质^[2]。1985 年, 日本学者佐藤调证明苯乙醇苷类物质能明显提高小鼠的性功能, 增强学习记忆力^[3]。1993 年, 堵年生等通过实验观察到肉苁蓉总苷可以增强小鼠红细胞内 SOD 活性, 降低血清 MDA 含量, 提高肝、肾组织中的 DNA、RNA 含量, 具有增强免疫、

收稿日期: 2005-04-18; 修回日期: 2005-06-19.

基金项目: 国家“863”计划项目(2002AA248031).

作者简介: 任璐(1980-), 女, 黑龙江伊春人, 食品科学与工程硕士研究生; * 责任作者.

延缓衰老等作用^[4]。

作者通过乙醇回流提取,探讨栽培管花肉苁蓉中苯乙醇苷类物质的提取工艺,采用了响应面分析法进行实验设计,利用多元二次回归方程拟合因素与指标之间的函数关系,通过对响应面的等值线分析寻求最优工艺参数。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料 干燥的栽培管花肉苁蓉肉质茎:新疆和田地区提供,水分质量分数为14.5%。

1.1.2 主要材料 乙醇:体积分数95%,国药集团化学试剂有限公司产品;其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器 HH-4 数显恒温水浴锅,抽滤瓶及漏斗,紫外分光光度计,电子天平。

1.2 试验方法

1.2.1 苯乙醇苷含量的测定

1) 苯乙醇苷标准曲线的绘制 精确吸取标准的松果菊苷对照品溶液(0.43 mg/mL)溶液10 mL于50 mL容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。分别吸取以上溶液0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mL置于25 mL容量瓶中,各加入质量分数5%亚硝酸钠1 mL,摇匀放置6 min,加入质量分数10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀再放置6 min,加入10%氢氧化钠溶液10 mL,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀放置18 min后,以第一管为空白,在510 nm处测定其吸光度值^[5],以吸光度为纵坐标,以松果菊苷的浓度为横坐标绘制标准曲线,曲线方程如下

$$A=34.738C-0.0157 \quad R^2=0.9991$$

松果菊苷质量浓度在3.44~2.752 $\mu\text{g/mL}$ 内呈良好的线性关系。

2) 苯乙醇苷的测定方法 精确称取样品20.00 g,置于圆底烧瓶中,用乙醇回流提取,一次提取完毕后抽滤,残渣以同样的方法再进行多次提取,抽滤,并用适当的乙醇水溶液清洗滤渣,将多次提取液合并,减压浓缩,浸膏用蒸馏水定容至100 mL,精密吸取5 mL用水饱和的正丁醇溶液萃取3次,正丁醇萃取液合并,减压浓缩至干,用水溶解并定容至100 mL容量瓶中,再吸取1 mL于25 mL容量瓶中,分别加入质量分数5%亚硝酸钠1 mL,摇匀放置6 min,加入质量分数10 g/dL硝酸铝溶液1 mL,摇匀再放置6 min,加入10%氢氧化钠溶液10 mL,用蒸馏水稀释至刻度,在510 nm处测定其吸光度值,数据

1.2.2 栽培管花肉苁蓉中苯乙醇苷提取工艺研究

1) 提取温度对得率的影响 称取20.00 g肉苁蓉干粉4份,分别加入140 mL体积分数为70%乙醇溶液中,于40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 恒温加热回流提取3.0 h,一次提取完毕后抽滤,残渣以同样的方法进行二次提取,合并两次提取液,并用100 mL质量分数70%的乙醇清洗残渣,采用1.2.1方法测定苯乙醇苷类物质的含量。

2) 乙醇体积分数对得率的影响 称取20.00 g肉苁蓉干粉5份,分别加入140 mL不同体积分数(50%、60%、70%、80%、90%)的乙醇溶液中,于60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温加热回流提取,提取时间及次数同上。

3) 料液比对得率的影响 称取20.00 g肉苁蓉干粉5份,分别按料液比为1:5;1:7;1:9;1:11;1:13(g:mL)加入体积分数70%乙醇中,同上提取苯乙醇苷类物质并测定其含量。

4) 提取时间对得率的影响 称取20.00 g肉苁蓉干粉5份,分别加入体积分数70%乙醇溶液220 mL,并于60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温加热回流提取1.0、2.0、3.0、3.5、4.0 h,提取次数及测定苯乙醇苷的含量同1.2.1。

5) 提取次数对得率的影响 称取20.00 g肉苁蓉干粉4份,分别加入体积分数70%乙醇溶液220 mL,于60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温加热回流提取3.5 h,并对4份样品分别进行1次,2次,3次,4次提取,合并提取液,测定苯乙醇苷类物质的含量。

1.2.3 运用响应面分析实验优化提取工艺 根据单因素实验结果,选择影响显著的三因素:乙醇体积分数、料液比、时间,采用响应面设计,做三因素三水平试验,运用SAS软件进行回归分析,考察指标为苯乙醇苷的得率。因素水平安排如表1。

表1 试验方案的设定

Tab.1 Design of experiments

| 水平 | 时间/h | 乙醇体积分数/% | 料液比/(g:mL) |
|----|------|----------|------------|
| -1 | 3 | 65 | 1:9 |
| 0 | 3.5 | 70 | 1:11 |
| 1 | 4 | 75 | 1:13 |

2 试验结果与分析

2.1 肉苁蓉中苯乙醇苷类物质乙醇回流提取工艺的单因素实验结果

2.1.1 提取温度对得率的影响 由表2可以看出,随着温度的提高,得率增加。当温度提高至

60 ℃后,得率增长不明显,由于温度过高会破坏样品中的有效成分,糖产生焦化,增加杂质的溶解度,不利于有效成分的提取。故确定实验温度为60 ℃。

表2 提取温度对得率的影响

Tab. 2 Effect of extraction temperature on yield

| 温度/℃ | 得率/% |
|------|-------|
| 40 | 3.434 |
| 50 | 4.237 |
| 60 | 5.091 |
| 70 | 5.230 |

2.1.2 乙醇体积分数对得率的影响 由表3可以看出:随着乙醇体积分数的提高,苯乙醇总苷的得率提高,当乙醇体积分数达到70%时,总苷溶解度最大,得率也最大;再增加乙醇体积分数,由于提取液的极性下降,不利于苯乙醇苷的溶解,因此提取率明显下降,初步选择乙醇体积分数为70%。

表3 乙醇体积分数对得率的影响

Tab. 3 Effect of ethanol on volume yield

| 乙醇体积分数/% | 得率/% |
|----------|-------|
| 50 | 4.071 |
| 60 | 4.315 |
| 70 | 5.042 |
| 80 | 3.851 |
| 90 | 2.320 |

2.1.3 料液比对得率的影响 由表4可以看出:随着料液比的增加,苯乙醇总苷得率上升,但料液比到达一定值(1:11)后,总苷得率增加缓慢,考虑到下一步浓缩工艺,初步选定料液比为1:11。

表4 料液比对得率的影响

Tab. 4 Effect of the ratio of liquid to solid on yield

| 料液比/(g:mL) | 得率/% |
|------------|-------|
| 1:5 | 4.677 |
| 1:7 | 5.047 |
| 1:9 | 5.187 |
| 1:11 | 5.331 |
| 1:13 | 5.335 |

2.1.4 提取时间对得率的影响 由表5可以看出:随着提取时间的增加,苯乙醇总苷的得率不断增加,当时间到达3.5 h后,得率基本保持不变,故选择提取时间为3 h左右。

表5 提取时间对得率的影响

Tab. 5 Effect of extraction time on yield

| 时间/h | 得率/% |
|------|-------|
| 1.0 | 4.591 |
| 2.0 | 5.112 |
| 3.0 | 5.272 |
| 3.5 | 5.642 |
| 4.0 | 5.487 |

2.1.5 提取次数对得率的影响 由表6可以看出:固定其他条件,改变提取次数,发现提取2次即可基本提取完全,继续增加提取次数。提取效率增加不明显,且增大了溶剂的消耗,杂质的含量也不断增加,故以下实验提取次数确定为2次。

表6 提取次数对得率的影响

Tab. 6 Effect of extraction times on yield

| 提取次数 | 得率/% |
|------|-------|
| 1 | 2.711 |
| 2 | 5.621 |
| 3 | 5.791 |
| 4 | 5.814 |

2.2 响应面实验方案和结果

响应面实验方案和结果见表7,其中 y 为苯乙醇总苷的得率(%); x_1 为时间(h), x_2 为乙醇体积分数(%), x_3 为料液比(g:mL)。

表7 实验方案和实验结果

Tab. 7 Experiment plan and result

| 序号 | X_1 | X_2 | X_3 | Y |
|----|-------|-------|-------|-------|
| 1 | -1 | -1 | 0 | 5.128 |
| 2 | -1 | 1 | 0 | 5.259 |
| 3 | 1 | -1 | 0 | 5.395 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 5.273 |
| 5 | 0 | -1 | -1 | 4.825 |
| 6 | 0 | -1 | 1 | 5.633 |
| 7 | 0 | 1 | -1 | 5.241 |
| 8 | 0 | 1 | 1 | 5.363 |
| 9 | -1 | 0 | -1 | 5.187 |
| 10 | 1 | 0 | -1 | 5.183 |
| 11 | -1 | 0 | 1 | 5.335 |
| 12 | 0 | 1 | 0 | 5.637 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 5.713 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 5.641 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 5.620 |

以苯乙醇苷的得率为响应值,运用 SAS 程序进行回归拟合后,各实验因子对响应值的影响可用下列函数表示:

$$Y = 5.658\ 000 + 0.072\ 375X_1 + 0.019\ 375X_2 + 0.191\ 500X_3 - 0.162\ 125X_1^2 - 0.063\ 250X_1X_2 - 0.232\ 125X_2^2 + 0.076\ 500X_1X_3 - 0.171\ 50X_2X_3 - 0.160\ 375X_3^2$$

运用 SAS 程序对回归方程进行方差分析(见表 8)。从回归方差分析表分析可知:(1) $F_{\text{模型}} > f_{0.001}$

表 8 回归方程的方差分析

Tab. 8 Variance analysis of regression equation

| 方差来源 | 自由度 DF | 平方和 SS | 均方 MS | F 值 | Pr>F | 显著性 |
|----------------|--------|-----------|-----------|-------|---------|-------|
| 模型 | 9 | 0.836 864 | 0.976 | 22.58 | 0.001 6 | * * |
| X ₁ | 4 | 0.178 367 | 0.004 459 | 10.83 | 0.011 2 | * |
| X ₂ | 4 | 0.335 603 | 0.083 901 | 20.38 | 0.002 7 | * * |
| X ₃ | 4 | 0.529 403 | 0.132 351 | 32.14 | 0.000 9 | * * * |
| 一次关系 | 3 | 0.338 286 | 0.394 5 | 27.39 | 0.001 6 | * * |
| 二次关系 | 3 | 0.341 518 | 0.398 3 | 27.65 | 0.001 5 | * * |
| 交互关系 | 3 | 0.836 864 | 0.183 2 | 12.71 | 0.008 9 | * * |
| 误差 | 5 | 0.020 588 | | | | |
| 总计 | 14 | 0.857 452 | | | | |

为了进一步验证最佳点的值,对回归方程取一阶偏导等于零并整理得:

$$0.072\ 375 - 0.324\ 25X_1 - 0.063\ 250X_2 + 0.076\ 500X_3 = 0$$

$$0.019\ 375 - 0.063\ 250X_1 - 0.464\ 25X_2 - 0.171\ 500X_3 = 0$$

$$0.191\ 500 + 0.076\ 500X_1 - 0.171\ 50X_2 - 0.320\ 750X_3 = 0$$

解得: $X_1 = 0.510\ 163$, $X_2 = -0.365\ 459$, $X_3 = 0.914\ 119$, 带入回归方程得预测的苯乙醇苷最高提取率为 $Y = 5.760\%$, 即提取时间 3.75 h, 料液比 12.8 : 1, 乙醇体积分数为 68.2 %。

为了证实预测结果,用以上得到的最优条件重复实验 3 次,平均苯乙醇总苷提取率 $5.76 \pm 0.21\%$, 预测值 $Y = 5.760\%$ 与实验值之间良好的拟合性证实了模型的有效性,回归方程为栽培管花肉苁蓉

(9,5),说明回归方程在 0.001 的水平上显著。根据 $R^2 = 0.9760$,说明模型能解释 97.60% 苯乙醇苷得率的变化;(2)时间、乙醇体积分数、料液比对苯乙醇苷的提取率均有显著影响,其中料液比的影响最为显著;(3)因素之间的一次关系、二次关系及交互关系对苯乙醇苷的得率均有显著影响。因此回归方程给栽培管花肉苁蓉提取苯乙醇苷类化合物提供了一个合适的模型。

中苯乙醇苷提取率提供了一个合适的数学模型。^[6]

3 结 论

1) 根据肉苁蓉总苷具有邻苯二羟基的特点与硝酸铝反应后产物在 510 nm 处有最大吸收波长,以显色法测定其含量,该标准曲线在 3.44 ~ 27.5 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好。

2) 通过单因素实验确定:提取温度为 60 °C,提取次数为 2 次。

3) 通过响应面实验及回归分析,确定了用乙醇水溶液为溶剂提取栽培管花肉苁蓉中苯乙醇苷的最佳工艺参数为:乙醇体积分数 68.2 %,提取液的料液比为 1 : 12.8,每次提取时间 3.75 h。在此条件下苯乙醇苷类物质的得率达到 5.76 %。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典. 2003.
- [2] 宋志宏,屠鹏飞,赵玉英. 管花肉苁蓉的苯乙醇苷成分[J]. 中草药,2000,31(11):808-810.
- [3] 佐藤调. 药学杂志(日)[J]. 1985,105(2):1131.
- [4] 堵年生. 肉苁蓉总苷的抗脂质过氧化作用及抗辐射作用[J]. 中国中药杂志,1997,22(6):364.
- [5] 堵年生,叶银梅,胡君萍. 硝酸铝-比色法测定肉苁蓉中苯乙醇苷的含量[J]. 新疆医学院学报,1993,16(4):308-310.
- [6] 吴有炜. 实验设计与处理[M]. 苏州:苏州大学出版社,2002.