

# 女贞子中红景天苷的提取纯化工艺优选

黄君梅, 谭玉柱, 董小萍\*

(成都中医药大学药学院, 成都 610075)

**[摘要]** 目的: 优选女贞子中红景天苷的提取、纯化工艺。方法: 采用 HPLC 测定红景天苷含量, 以红景天苷含量及浸膏得率的综合评分为指标, 通过正交试验考察溶剂、料液比、时间及次数对红景天苷提取工艺的影响; 通过单因素试验筛选大孔树脂型号, 并优选其纯化工艺条件。结果: 优选的提取工艺为加 6 倍量水回流提取 3 次, 每次 1 h; D4020 型大孔树脂纯化女贞子中红景天苷的工艺条件为上样液质量浓度  $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 吸附流速  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 用 5 BV 的 20% 乙醇溶液洗脱, 收集洗脱液, 减压回收, 即得红景天苷粗品, 其纯度达 16.34%。结论: 按优选的工艺条件提取、纯化后, 女贞子中红景天苷含量提高了 2.12 倍。

**[关键词]** 女贞子; 红景天苷; 提取; 大孔吸附树脂

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0060-03

**[doi]** 10.11653/syfy201310060

## Optimization of Extraction and Purification Technology of Salidroside from *Ligustrum lucidum*

HUANG Jun-mei, TAN Yu-zhu, DONG Xiao-ping\*

(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction and purification technology of salidroside from *Ligustrum lucidum*. **Method:** The content of salidroside was determined by HPLC, with composite score of the content of salidroside and yield of extract as index, orthogonal test was adopted to optimize extraction technology with solvent, liquid-solid ratio, extraction time and times as factors; model of macroporous resin was screened by single factor test, and its purification technology was optimized. **Result:** Optimum extraction technology was as following: reflux extracted 3 times with 6 times the amount of water, each time for 1 hour; optimized purification technology of D4020 type resin was: the concentration of sample solution  $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , adsorption velocity for  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , eluted with 5 BV 20% ethanol, collected eluate, vacuum recovery, then received salidroside crude product with purity of 16.34%. **Conclusion:** By following these optimized extraction and purification conditions, the purity of salidroside in *L. lucidum* could increase 2.12 times.

**[Key words]** *Ligustrum lucidum*; salidroside; extraction; macroporous adsorption resin

女贞子是常用的扶正固本药物, 具有滋补肝肾、明目乌发的功效<sup>[1]</sup>。其主要化学成分红景天苷最早被发现于高原红景天植物中, 是适应高山环境的

必需成分, 具有抗高原反应、抗心肌缺血和抗疲劳等作用; 现代药理研究还发现, 红景天苷具有抗骨质疏松、扩张阻力血管和容量血管、抗肝纤维化、抗肾损害和抗肿瘤等作用<sup>[2-3]</sup>。因此, 红景天苷被广泛开发成药品和保健品, 但女贞子中其含量较低, 约 0.02% ~ 0.2%<sup>[4]</sup>, 在一定程度上影响了红景天苷的临床推广。本实验采用 HPLC 测定女贞子中红景天苷含量<sup>[5-6]</sup>, 通过正交试验优选其提取工艺, 单因素试验优选红景天苷的纯化工艺条件, 为女贞子的临床开发及应用提供实验依据。

**[收稿日期]** 20121119(011)

**[第一作者]** 黄君梅, 硕士, 从事中药有效成分及质量标准研究, Tel: 13540704339, E-mail: 497716284@qq.com

**[通讯作者]** \* 董小萍, 教授, Tel: 028-61800105, E-mail: dongxiaoping11@126.com

## 1 材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),AG135 型 1/10 万电子天平(Mettler 公司),JY1201 型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)。D101, D4020, NKA, AB-8, NKA-9 型大孔树脂(上海劲凯树脂有限公司),红景天苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 A0076),甲醇为色谱纯,水为二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。女贞子购自成都荷花池中药材专业市场,由中国科学院成都生物所陈前锋博士鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实。

## 2 方法与结果

### 2.1 红景天苷含量测定

**2.1.1 色谱条件** Alltima™ C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(20:80),检测波长 224 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35 ℃。理论塔板数按红景天苷峰计算不低于 2 000。

**2.1.2 方法学考察** 红景天苷含量测定的线性回归方程为  $Y = 11.9X - 285.37$  ( $R^2 = 0.9989$ ),线性范围 66 ~ 330 mg·L<sup>-1</sup>;精密密度试验 RSD 1.02% ( $n = 3$ );稳定性试验 RSD 1.34% ( $n = 6$ );重复性试验 RSD 1.68% ( $n = 6$ );加样回收试验的平均回收率 99.06%,RSD 1.28% ( $n = 6$ )。

**2.2 提取工艺优选** 采用回流法提取。选取提取溶剂、液料比、提取次数及时间为考察因素,每个因素设 3 个水平,因素水平见表 1。按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表对女贞子药材进行提取,提取液经适当处理,精密吸取 1~9 号供试液各 10 μL 测定。以浸膏得率和红景天苷含量的综合评分为考察指标,评分标准为规定红景天苷含量占 0.7 分,红景天苷含量为 0.11% 时取满分 0.7 分,红景天苷含量为 0% 时取 0 分;浸膏得率占 0.3 分,浸膏得率为 27.50% 取满分 0.3 分,浸膏得率为 0% 时取 0 分。每次试验平行 2 次。试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 女贞子中红景天苷提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取溶剂	B 液料比	C 提取时间/h	D 提取数/次
1	95% 乙醇	6:1	1	1
2	70% 乙醇	8:1	2	2
3	水	10:1	3	3

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响次序为  $A > D > B > C$ ,最佳提取工艺条件为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>。方差分析结果表明,除提取时间影响不显著外,其他

表 2 女贞子中红景天苷提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	浸膏得率 /%	红景天 苷含量 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	9.06	0.015	0.19
2	1	2	2	2	16.17	0.025	0.33
3	1	3	3	3	21.02	0.025	0.385
4	2	1	2	3	23.335	0.055	0.60
5	2	2	3	1	17.10	0.015	0.28
6	2	3	1	2	22.47	0.035	0.46
7	3	1	3	2	27.02	0.110	0.99
8	3	2	1	3	27.50	0.075	0.77
9	3	3	2	1	21.18	0.060	0.605
K <sub>1</sub>	1.81	3.56	2.84	2.15			
K <sub>2</sub>	2.68	2.76	3.07	3.56			
K <sub>3</sub>	4.73	2.9	3.31	3.51			
R	2.92	0.80	0.47	1.36			

$$\text{注:综合评分} = \frac{0.3 \times \text{浸膏得率}}{\text{最大浸膏值}} + \frac{0.7 \times \text{红景天苷含量}}{\text{最大红景天苷含量值}}$$

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.749	2	0.375	229.350	<0.05
B	0.061	2	0.030	18.626	<0.05
C	0.018	2	0.009	5.636	>0.05
D	0.213	2	0.107	65.310	<0.05
E(误差)	0.015	9	0.002		

$$\text{注:} F_{0.01}(2,2) = 99.0, F_{0.05}(2,2) = 19.0。$$

因素对提供工艺均有显著性影响。结合实际生产情况考虑,确定红景天苷的最佳提取工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,即加 6 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h。按优选的工艺条件进行 3 次验证试验,结果浸膏得率分别为 25.74%、25.63%、25.81%;红景天苷质量分数依次为 1.40‰、1.42‰、1.44‰。表明优选的提取工艺稳定可行。

**2.3 大孔树脂纯化工艺优选** 女贞子提取液减压浓缩后,加 20 倍量冰乙酸,于 100 ℃ 回流 20 h,用碳酸氢钠调至中性,于 80 ℃ 减压回收溶剂至干,得红景天苷的水解物浸膏。

**2.3.1 树脂型号筛选** 取 5 种不同型号已预处理好树脂柱(相当于 10 g 干树脂),包括非极性(D101, D4020, NKA)、弱极性(AB-8)及极性(NKA-9)大孔树脂。分别置于具塞锥形瓶中,各加入 0.5 g·mL<sup>-1</sup> 的样品液 30 mL,置电动振荡机上振荡 24 h,

充分吸附后,滤过。用 HPLC 测定滤液中剩余的红景天苷含量,计算红景天苷吸附量依次为 0.22, 0.44, 0.40, 0.42, 0.36  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。将吸附红景天苷的树脂置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加一定量洗脱剂,振荡洗脱 10 h,离心,过滤,测定滤液中红景天苷含量,计算红景天苷洗脱量分别为 0.16, 0.40, 0.31, 0.34, 0.25  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。说明 D4020 型树脂对红景天苷的吸附效率和解吸附率均优于其他 4 种树脂。

**2.3.2 洗脱溶剂浓度考察** 量取 0.5  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品液 6 mL,置已预处理的 D4020 型树脂柱上(10 g, 30 mm  $\times$  150 mm),静置 30 min,加水洗脱至还原糖反应至阴性,用体积分数分别为 10%, 20%, 30%, 50%, 70% 的乙醇溶液梯度洗脱,分次收集,浓缩,浸膏用甲醇超声溶解,用甲醇定容至 10 mL,按 HPLC 测得红景天苷含量分别为 0.20%, 0.67%, 0.13%, 0.08%, 0%, 故选择 20% 乙醇作为洗脱溶剂。

**2.3.3 上样液质量浓度考察** 将质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品液分别通过 D4020 型树脂柱进行动态吸附。采用 HPLC 检查流出液,待检出红景天苷时,停止上样,记录上柱量,计算得红景天苷吸附量分别为 0.21, 0.22, 0.24, 0.30, 0.32, 0.25, 0.24, 0.23, 0.21, 0.19  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,故选取上样液质量浓度 0.5  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**2.3.4 吸附流速考察** 将 0.5  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品液通过 D4020 型大孔树脂柱,分别以 1, 2, 3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  的流速进行动态吸附。采用 HPLC 检测流出液,待检出红景天苷时,停止上样,记录上柱量,结果红景天苷吸附量分别为 0.31, 0.22, 0.20  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,故吸附流速选 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  为宜。

**2.3.5 洗脱剂用量考察** 按上述确定的吸附和洗脱条件,取 0.5  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  样品液 2 mL 上柱、吸附和洗脱,分段收集洗脱液,20% 乙醇洗脱液共 30 份,每份 10 mL,分别测定红景天苷含量。结果第 20 份洗脱液中红景天苷含量已明显降低,故确定洗脱剂用量 200 mL。

### 3 讨论

在已发表的女贞子提取工艺文献中,红景天提

取物浸膏中红景天苷质量分数最高为 7.7%<sup>[7-8]</sup>,不能满足红景天苷的市场需求,而且女贞子中红景天苷未被提取充分。本实验采用正交试验优选女贞子中红景天苷的提取工艺,提取液浓缩后采用冰乙酸水解法(女贞子中裂环环烯醚萜苷类含量较高且结构中大多含有红景天苷结构单元)进一步提升红景天苷的含量,结合大孔树脂吸附法纯化水解物浸膏,最后测得女贞子浸膏中红景天苷质量分数达 16.34%,较以往工艺提高了 2.12 倍,既减少了对资源缺少的红景天植物的开采,又对女贞子的综合开发利用具有参考意义。本实验采用的溶剂主要为水、乙醇和冰乙酸,均为无毒且成本低的溶剂,适合于工业化大生产。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2010:43.
- [2] 张文生,朱陵群,牛福玲,等. 红景天苷对缺氧/缺糖损伤神经细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志,2004,29(15):459.
- [3] 王晓东,刘永刚,苏薇薇. 红景天苷对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中药材,2004,27(3):198.
- [4] 李曼玲,徐丹,全会娟,等. 女贞子不同市售品、炮制品及不同果实部位中红景天苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):16.
- [5] 李娜,赵斌,余娅芳,等. 高效液相色谱法测定圣地红景天中红景天苷的含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(2):411.
- [6] 李青,宋志前,王超,等. 青海产红景天中红景天苷及酪醇含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):110.
- [7] 王丹,石力夫,胡晋红. 从女贞子中提取红景天苷的工艺研究[J]. 中成药,2006,28(5):750.
- [8] 刘圣,唐丽琴,陈礼明,等. 大孔吸附树脂分离技术优选女贞子提取工艺研究[J]. 中成药,2007,29(1):139.

[责任编辑 全燕]