

山茱萸提取、纯化工艺考察

宋春敬¹, 王艳^{1*}, 于顺禄², 王慧明³

(1. 天津中医药大学中药学院天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193;
2. 天津市天津医院, 天津 300211; 3. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

[摘要] 目的: 优选山茱萸的提取工艺及大孔树脂纯化工艺。方法: 以莫诺昔含量为指标, 选择乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数为考察因素, 采用单因素试验和正交试验优选提取工艺。选取上样量、洗脱速度、洗脱剂浓度及用量为考察因素, 采用单因素试验考察 HPD-300 型大孔吸附树脂纯化工艺。结果: 山茱萸最佳提取工艺为加 8 倍量 50% 乙醇提取 3 次, 每次 3 h。纯化工艺为 3 BV 30% 乙醇以 1.5 BV·h⁻¹ 洗脱, 洗脱率达 94.9%。结论: 优选的提取工艺稳定可行; HPD-300 型大孔吸附树脂可较好地纯化山茱萸总苷。

[关键词] 山茱萸; 总苷; 正交试验; 提取工艺; 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)01-0006-04

Investigation of Extraction and Purification Technology of *Cornus officinalis*

SONG Chun-jing¹, WANG Yan^{1*}, YU Shun-lu², WANG Hui-ming³

(1. Tianjin Key laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Chemistry and Analysis, School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China;
2. Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; 3. First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

[收稿日期] 20120822(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30901988); 天津市高等学校科技发展基金计划项目(20110206)

[第一作者] 宋春敬, 硕士, 实验师, 从事中西医结合研究, Tel: 022-595962811, E-mail: songchunjingjing@126.com

[通讯作者] * 王艳, 硕士, 讲师, 从事中药炮制学和中药药理学研究, Tel: 022-59596235, E-mail: paozhijiaoxue@126.com

宾 PLGA 微球, 所制备微球圆整, 粒径分布较均一旦在一定范围内可控, 为膜乳化技术在中药制剂领域的应用提供试验依据。

[参考文献]

- [1] Jose F, Alvarez B. Extraction of nutraceuticals from milk thistle [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2003, 108(10): 105.
- [2] 万华, 席宏丽, 陶迎红, 等. 水飞蓟宾葡甲胺片治疗非酒精性肝炎 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 157.
- [3] Pan Y, Li Y J, Zhao H Y. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin *in vivo* [J]. Int J Pharm, 2002, 249(1/2): 139.
- [4] 朱志君, 卢建军, 刘妙青. 膜乳化法原理及其制备单分

散高分子微球的进展 [J]. 日用化学工业, 2008, 38(5): 322.

- [5] Bodmeier R, McGinity J W. The preparation and evaluation of drug-containing poly (dl-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method [J]. Pharm Res, 1987, 4(6): 465.
- [6] XIAO L, JIN S M, ZHANG L X, et al. Study and application of silymarin dosage forms [J]. Chin Rem Clin, 2005, 5(3): 205.
- [7] Wei Q, Wei W, Lai B. Uniform-sized PLA nanoparticles: preparation by premix membrane emulsification [J]. Int J Pharm, 2008, 359(1): 294.
- [8] 吕丕平. SPG 膜乳化法制备均一硅油乳液及壳聚糖纳微球研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2009: 56.

[责任编辑 全燕]

[Abstract] Objective: To optimize extraction technology of *Cornus officinalis*, and investigate its purification technology by macroporous resin. **Method:** With the content of morroniside as index, the concentration of ethanol, solid-liquid ratio, extraction time and times were selected as factors, extraction technology of total glycosides was optimized by single factor test and orthogonal test. With sampling volume, elution speed, eluent concentration and dosage as factors, single factor test was used to investigate purification technology of *C. officinalis* with HPD-300 macroporous resin. **Result:** Optimum extraction technology was as following: extracted 3 times with 50% ethanol of 8 times amount, 3 h each time. Purification technology was: eluted with 3 BV 30% ethanol at 1.5 BV · h⁻¹, elution rate of 94.9%. **Conclusion:** Optimized extracting technology was stable and feasible; It showed that total glycosides from *C. officinalis* could be effectively purify by HPD-300 macroporous resin.

[Key words] *Cornus officinalis*; total glycosides; orthogonal test; extraction process; macroporous resin

山茱萸味酸、涩,性微温,具有补益肝肾、收涩固脱之功效,临床用于治疗眩晕耳鸣、腰膝酸痛、阳痿遗精等症^[1]。其总苷成分包括环烯醚萜类和皂苷类成分(五环三萜酸及其酯类),近代研究表明环烯醚萜苷类为山茱萸中主要有效部位,具有抗心率失常^[2]、保护脑缺血损伤^[3]、降血糖^[4]、治疗骨质疏松症^[5-8]等药理作用。莫诺苷属环烯醚萜苷类,为山茱萸中主要药效成分,且含量较高^[9],具有预防糖尿病性血管病的作用^[10]。本试验以莫诺苷为指标,采用单因素试验和正交试验优选山茱萸的提取工艺,以期最大程度地提取其药效成分,并通过考察HPD-300型大孔树脂富集、纯化山茱萸总苷的工艺条件,为山茱萸的工业化生产提供试验依据。

1 材料

美国 CoMetro 6000 型高效液相色谱仪(天津市深航科技仪器有限公司),Hypersil C₁₈ 色谱柱(大连依利特分析仪器有限公司),FN1004N 型分析天平(上海精密科学仪器有限公司),H1650 型高速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

山茱萸药材购于河北安国药市,经天津中医药大学马琳教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉,50 ℃ 干燥备用。莫诺苷(纯度 > 98%,天津马克生物技术有限公司,批号 20101210),HPD-300 型大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),其他试剂均为分析纯或色谱纯。

2 方法与结果

2.1 莫诺苷的含量测定

2.1.1 色谱条件与检测方法 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 冰乙酸(20:80),检测波长 240 nm,柱温 40 ℃,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取莫诺苷对照品适量,加 80% 甲醇制成 0.216 g · L⁻¹ 的溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取山茱萸粉末(过三号筛)约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 25 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液,用 80% 甲醇稀释成 0.003 37, 0.013 5, 0.027 0, 0.108, 0.216 g · L⁻¹ 的系列对照品溶液,进样 10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定峰面积。以对照品质量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,得回归方程 $Y = 8390.4X + 25808$ ($r = 0.9999$),表明莫诺苷在 0.033 73 ~ 2.16 μg 呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 取山茱萸生品粗粉,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,重复进样 6 次,测得莫诺苷峰面积 RSD 0.76%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取山茱萸生品粗粉,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 进样,测得峰面积积分值 RSD 1.62%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一山茱萸生品粗粉 6 份,每份约 0.1 g,精密称定,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,进样,测定莫诺苷含量,结果 RSD 2.55%,表明方法重复性良好。

2.1.8 加样回收试验 取已知含量的山茱萸粉末约 0.05 g,精密称定,加入莫诺苷对照品适量,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,测定莫诺苷含量,计算回收率,见表 1。结果表明该方法回收率良好。

2.2 山茱萸提取工艺优化

2.2.1 提取溶剂的选择 称取山茱萸药材 2 g,选

表 1 莫诺昔加样回收率试验

称样量 /g	样品中质量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
0.053 2	0.900 6	1.962	102.1	101.2	2.68
0.052 1	0.882 1	1.938	101.5		
0.054 0	0.914 2	1.986	103.1		
0.050 2	0.849 8	1.940	104.8		
0.051 5	0.871 9	1.901	99.0		
0.054 1	0.915 9	1.921	96.6		

注:莫诺昔对照品加入量均为 1.04 mg。

用水和体积分数分别为 30%、50%、70%、95% 的乙醇溶液为提取溶剂,固定料液比 1:10,回流提取 4 h,合并提取液,过滤,离心(4 000 r·min⁻¹, 10 min),取上清液,加 50% 乙醇定容至 50 mL 量瓶中,分别吸取 2 mL,于水浴上蒸干,加 80% 甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,得供试品溶液。0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下条件进样,测得莫诺昔含量分别为 10.88, 11.90, 13.00, 12.10, 11.19 mg·g⁻¹。故选取 50% 乙醇为山茱萸的提取溶剂。

2.2.2 正交试验设计 称取山茱萸药材 2 g,选择料液比、提取时间、提取次数为考察因素,以莫诺昔含量为指标,按 L₉(3⁴) 正交表安排试验,用 50% 乙醇回流提取,过滤,合并滤液,按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下条件进样,计算莫诺昔含量。因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 C>A>B;方差分析表明,C 因素对提取工艺有极显著影响,A 因素有显著影响,B 因素无影响,确定山茱萸总苷的最佳提取工艺为 A₂B₂C₃,即加 8 倍量 50% 乙醇,提取 3 h,3 次。

2.2.3 验证试验 精密称取山茱萸 5 g,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,结果莫诺昔平均含量 16.08 mg·g⁻¹,RSD 0.87%。表明该优选工艺稳定可行。

2.3 大孔树脂纯化工艺考察

2.3.1 树脂吸附容量考察 取经预处理的 HPD-300 型大孔树脂 30 mL 装柱,按 2.2.3 项下制备山茱萸提取液(质量浓度 25 g·L⁻¹)上柱,收集流出液(每 6 mL 为一馏份),按 2.1.1 项下条件测定每个馏份中莫诺昔含量,结果莫诺昔质量分别为 18.6, 1.8, 2.4, 9.0, 13.8, 67.8, 178.8, 297.6 μg。说明前 5 份中几乎无莫诺昔的泄漏,第 6 份为泄漏点,故 25 g·L⁻¹ 山茱萸提取液上样量为 1 BV。

表 2 山茱萸提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 提取时间/h	C 提取数/次
1	1:6	2	1
2	1:8	3	2
3	1:10	4	3

表 3 山茱萸提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	莫诺昔含量 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	9.74
2	1	2	2	2	13.58
3	1	3	3	3	14.18
4	2	1	2	3	15.03
5	2	2	3	1	16.05
6	2	3	1	2	11.62
7	3	1	3	2	16.70
8	3	2	1	3	11.86
9	3	3	2	1	14.05
K ₁	37.500	41.469	33.319	39.840	
K ₂	42.699	41.490	42.660	41.901	
K ₃	42.609	39.847	46.969	41.070	
R	5.199	1.641	13.710	2.061	

表 4 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	5.849	2	2.925	9.141	<0.05
B	0.536	2	0.268	0.838	>0.05
C	32.759	2	16.380	51.188	<0.01
D(误差)	1.280	4	0.32		

注:F_{0.05}(2,4)=6.940, F_{0.01}(2,4)=18.00。

$$\text{吸附量} = (C_0 - C) \times V/W$$

C₀, C 分别为吸附前后料液中莫诺昔质量浓度, V 为料液总体积, W 为树脂体积。

经计算得吸附量 2.912 g·L⁻¹,即每 mL 树脂吸附莫诺昔 2.912 mg。

2.3.2 洗脱剂浓度考察 吸附树脂柱依次用水及体积分数 10%、30%、50%、70% 的乙醇溶液 2 BV 洗脱,收集洗脱液各 60 mL,测定洗脱液中莫诺昔含量。计算洗脱率分别为 4.2%、7.4%、85.3%、18.7%、5.2%。故确定 30% 乙醇为洗脱剂。

2.3.3 洗脱速度考察 平行装 4 根大孔树脂柱,按上述优选条件上样,用水 100 mL 洗脱,加 30% 乙醇 120 mL 洗脱,洗脱流速分别为 0.5, 1, 1.5, 2 BV·h⁻¹,收集洗脱液,测定莫诺昔含量,计算率分别为 85.3%、89.6%、83.1%、70.8%。说明流速过快,洗脱剂不能与被吸附的莫诺昔充分作用而将其从树脂上洗脱出来。故确定洗脱流速 1.5 BV·h⁻¹。

2.3.4 洗脱剂用量考察 按上述优选条件上样后,用水 100 mL 洗脱,用 30% 乙醇洗脱,收集洗脱液,

每 10 mL 为一馏分,测定莫诺苷含量,计算洗脱率,见图 1。说明当洗脱剂用量增加到 40 mL 时,解吸率达最大值,洗脱剂用量 90 mL 时基本洗脱完全。故选用洗脱剂用量 90 mL(3 BV)。

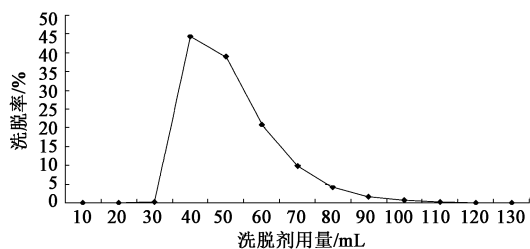
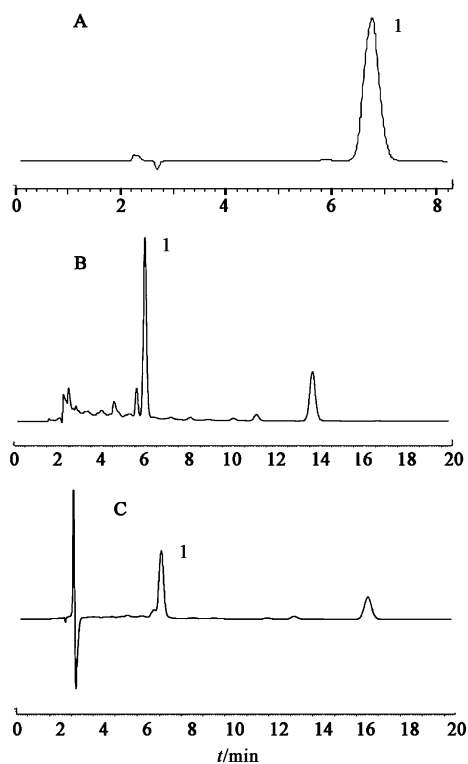


图 1 山茱萸皂苷大孔树脂纯化工艺的洗脱剂用量考察

2.3.5 纯化后含量测定 根据以上优选的提取工艺和纯化工艺条件,测定纯化后莫诺苷含量,结果洗脱液中莫诺苷质量浓度 $0.921 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,见图 2。



A. 对照品;B. 上样液;C. 纯化后样品溶液;1. 莫诺苷

图 2 山茱萸提取液纯化前后 HPLC

3 讨论

山茱萸总苷的提取方法较多,包括水浸法、甲醇回流法、大孔树脂法、乙醚脱脂-甲醇回流法等。结合山茱萸总苷特性及实际生产考虑,本试验采用乙

醇回流法。大孔吸附树脂作为一种有效的分离手段,在中药有效成分的提取、分离、富集过程中应用较广,且操作简便^[11]。山茱萸提取液中含有大量色素、黏液质、蛋白质等杂质,直接上样会大大降低树脂的吸附能力,故上样液必须进行预处理,以提高树脂的饱和吸附量。本试验采用冷置后高速离心对上样液进行预处理,不但能除去部分色素、粘液质、蛋白质等,总苷几乎无损耗,且操作简便,非常适合用于工业化大生产。

[参考文献]

- [1] 刘德军,路涛. 山茱萸[M]. 北京:中国中医药出版社,2001:3.
- [2] 张兰桐,山茱萸提取液制备及其抗心律失常活性研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2002.
- [3] 李小黎,叶翠飞,张丽,等. 山茱萸环烯醚萜苷对脑缺血沙土鼠学习记忆能力和脑内神经营养因子的影响[J]. 中华中医药学刊,2011,29(2):263.
- [4] 时艳,许惠琴. 山茱萸环烯醚萜总苷对实验性糖尿病心脏病变的保护作用[J]. 南京中医药大学学报,2006,22(1):35.
- [5] 李平,李晶,王惠明. 山茱萸总苷对去势大鼠骨代谢和骨密度影响的实验研究[J]. 天津中医药,2008,24(4):315.
- [6] 李晶,王惠明. 山茱萸总苷对去势大鼠骨代谢影响的生化研究[J]. 辽宁中医杂志,2007,34(10):1480.
- [7] 王惠明,李晶,李平. 山茱萸总苷对去势大鼠骨生物力学影响的实验研究[J]. 吉林中医药,2007,27(6):49.
- [8] 李晶,武峻艳,王惠明,等. 山茱萸总苷对去势大鼠骨组织形态学影响的实验研究[J]. 上海中医药杂志,2010,44(1):69.
- [9] 赵平,闫润红,刘养清,等. 栽培与野生山茱萸中马钱苷和莫诺苷含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(4):7.
- [10] 许惠琴,朱荃. 山茱萸环烯醚萜总苷对试验性糖尿病肾病变的保护作用[J]. 南京中医药大学学报,2003,19(6):342.
- [11] 张旭,王锦玉,全燕,等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):286.

[责任编辑 全燕]