



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104606297 B

(45)授权公告日 2017.04.26

(21)申请号 201510071356.9

(22)申请日 2015.02.11

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104606297 A

(43)申请公布日 2015.05.13

(73)专利权人 内蒙古昶辉生物科技股份有限公司

地址 011517 内蒙古呼和浩特市和林格尔县盛乐经济园区

(72)发明人 白易 闫强 万润丽 梁玉强 高瑞 高旭光 白莲婷 赵永强 张成亮

(51)Int.Cl.

A61K 36/64(2006.01)

C08B 37/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1526400 A,2004.09.08,实施例4-8.

CN 1721425 A,2006.01.18,说明书实施例1.

CN 103191196 A,2013.07.10,说明书第20-26段.

审查员 何华山

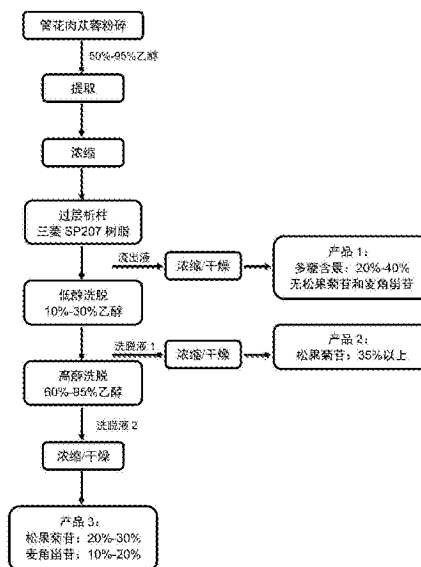
权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54)发明名称

一种管花肉苁蓉中活性成分的提取方法

(57)摘要

本发明涉及一种提取管花肉苁蓉中有效成分的方法,其特征在于:将管花肉苁蓉粉碎提取;浓缩至热比重为1.15过滤得滤液A;滤液A过层析柱得过柱流出液B、低醇洗脱液C和高醇洗脱液D;将过柱流出液B进行真空干燥,得到肉苁蓉多糖产品;将低醇洗脱液C喷雾干燥得到松果菊苷产品;将高醇洗脱液D喷雾干燥,得到松果菊苷与麦角甾苷混合产品;本发明所述方法可以同时得到三种规格的管花肉苁蓉提取物产品,操作较简便,产品纯度和收率均较高,最大限度地利用了原料,节约资源,以本发明所述的方法得到的全部产品总收率达90%以上。



1. 一种提取管花肉苁蓉中有效成分的方法,其特征在于:

(1) 将干燥的管花肉苁蓉粉碎,以50%-95%乙醇溶液加热提取2次,提取温度为70℃,每次提取时间为2h,合并提取液;

(2) 将提取液浓缩至热比重为1.15,加入500-600ppm天然澄清剂Ⅱ型ZTC1+1并使用10μm精密过滤器过滤,得到滤液A;

(3) 滤液A过层析柱,吸附剂为大孔树脂SP207,过柱流出液收集B;使用30%的乙醇水溶液,以2BV/h的流速,洗脱得到低醇洗脱液C;使用80%的乙醇水溶液,用量为树脂体积的3倍,以3BV/h的流速,洗脱得到高醇洗脱液D;树脂吸附再生溶剂为5%氢氧化钠、纯化水;

(4) 将过柱流出液B浓缩至热比重1.39,进行真空干燥,得到含量在20%-40%的肉苁蓉多糖产品;将低醇洗脱液C浓缩至热比重为1.20,进行喷雾干燥,得到含量在35%以上的松果菊苷产品;将高醇洗脱液D浓缩至热比重为1.20,进行喷雾干燥,得到含量在20%-30%的松果菊苷与含量在10%-20%的麦角甾苷混合产品。

2. 如权利要求1中所述的一种提取管花肉苁蓉中有效成分的方法,其特征在于:称取5kg干燥管花肉苁蓉,粉碎为直径约0.5cm的颗粒;以60%乙醇作为提取剂,对原料加热提取2次,每次加热2小时,提取温度70℃,原料与提取剂的质量比为1:5;将两次提取得到的提取液合并,加入浓缩器中真空浓缩至热比重为1.15,加入500ppm天然澄清剂Ⅱ型ZTC1+1,过10μm的精密过滤器,得到滤液A;滤液A以2BV/h的速度过层析柱,吸附剂为大孔树脂SP207,收集过柱流出液B;用3倍于树脂体积的30%乙醇水溶液进行洗脱,流速2BV/h,得到低醇洗脱液C;再用3倍于树脂体积的80%乙醇水溶液进行洗脱,流速3BV/h,得到高醇洗脱液D;树脂吸附再生溶剂为5%氢氧化钠、纯化水;将过柱流出液B浓缩至热比重1.39,进行真空干燥,得到肉苁蓉多糖含量为30.0%的产品1的质量为510g;将低醇洗脱液C浓缩至热比重为1.20,进行喷雾干燥,得到松果菊苷含量为40.3%的产品2的质量为293g;将高醇洗脱液D浓缩至热比重为1.20,进行喷雾干燥,得到松果菊苷含量为25.1%、麦角甾苷含量为11.2%的产品3的质量为489g;总过程中,多糖收率90.0%,松果菊苷收率为96.3%,麦角甾苷收率为91.3%。

一种管花肉苁蓉中活性成分的提取方法

技术领域

[0001] 本申请涉及一种从管花肉苁蓉中提取松果菊苷、麦角甾苷和肉苁蓉多糖的方法。

背景技术

[0002] 管花肉苁蓉又称红柳大芸、管花大芸,主产于新疆维吾尔自治区塔里木盆地南端,被列为濒危物种,生长于海拔约1200米处水分较充足的柽柳丛中及沙丘地,常寄生于塔克拉玛干柽柳(*T. talamakanensis* M. T. Liu)、多枝柽柳(*T. vamosissima* Bunge)和多花柽柳(*T. hohenackeri* Bunge)的根部。管花肉苁蓉为多年生寄生草本,茎肉质,茎不分枝,干后变褐色,穗状花序,花萼筒状,花冠筒状漏斗形,蒴果长圆形,种子多数近圆形,干后变黑褐色。管花肉苁蓉生品呈纺锤形或扁纺锤形,直或稍弯曲,质坚硬,无韧性,不易折断,断面颗粒状,灰棕色至灰褐色,黄白色点状维管束散生于整个断面,具有明显的酒糟香味,味甘微苦。

[0003] 管花肉苁蓉(*cistanche tubulosa*)干燥带鳞叶的肉质茎具有补肾壮阳,填精补髓,养血润燥,悦色延年等功效,具有“沙漠人参”的美称。其中主要的活性成分为苯乙醇苷类、环烯醚萜苷类、木脂素苷类、寡糖脂类及多元醇等。苯乙醇苷类作为其中一种主要活性成分,包括松果菊苷、毛蕊花糖苷、2-乙酰基毛蕊花糖苷等。

[0004] 松果菊苷(Echinacoside, ECH)具有保护神经系统、保护骨骼、抗氧化和抗损伤的功能。松果菊苷能逆转保护鱼藤酮、中动脉闭塞、6-羟多巴胺诱导的多巴胺能神经元损伤,也能自由穿过血脑屏障,有可能用于治疗帕金森、阿尔兹海默等神经变性疾病及预防和治疗大脑的缺血性疾病。松果菊苷能保护急性肺损伤,用于治疗急性呼吸窘迫综合征。松果菊苷通过诱导Ⅱ期细胞保护能力而具有持久的皮肤保护效应,还能激发细胞活力,保护细胞免受DNA损伤,起到护肤和抗衰老的作用。

[0005] 毛蕊花糖苷(Acteoside),又称麦角甾苷。具有治疗慢性肾小球肾炎等病症的功效。高莉等研究发现,毛蕊花糖苷能明显改善D-半乳糖致亚急性衰老小鼠的学习记忆能力障碍,可以调节脑组织胆碱乙酰转移酶(ChAT)和乙酰胆碱酯酶(AchE)活性,保护脑组织海马CA1区神经元细胞,提高脑组织和免疫器官指数,改善模型小鼠的脑损伤,提示毛蕊花糖苷的作用可能与其增强中枢胆碱能功能和保护神经元细胞有关。(中草药,毛蕊花糖苷改善D-半乳糖致亚急性衰老小鼠脑损伤的作用,2014年45卷01期,P81-85)。

[0006] 肉苁蓉多糖也是管花肉苁蓉中的一种活性成分,具有抗衰老、抗氧化、调节免疫力、促进造血、改善记忆、抗癌等方面的功效。CN101870742A中公开了一种肉苁蓉多糖的分离提纯方法,CN101775047A、CN101717417A、CN1721425A中均公开了一种从肉苁蓉中分离松果菊苷的方法,CN103896997A中公开了一种从肉苁蓉中分离纯化毛蕊花糖苷的方法,CN101629198A中公开了一种采用生物催化方法制备毛蕊花糖苷单体化合物的方法。上述方法虽然均能得到目标产物,但均是从原料中获得单一产物的方法,对管花肉苁蓉中其它活性成分造成浪费。。

发明内容

[0007] 本发明涉及一种提取管花肉苁蓉中有效成分的方法。具体而言,本发明所述方法可同时从管花肉苁蓉中提取肉苁蓉多糖、松果菊苷和麦角甾苷。所述方法其特征在于:

[0008] (1) 将干燥的管花肉苁蓉粉碎,以乙醇溶液加热提取2次,合并提取液;

[0009] (2) 将提取液浓缩至热比重为1.15,加入天然澄清剂并过滤,得到滤液A;

[0010] (3) 滤液A过层析柱,吸附剂为大孔树脂SP207,过柱流出液收集B;用10-30%的乙醇水溶液进行洗脱,得到低醇洗脱液C,其用量为树脂体积的3倍,流速1-2BV/h;再用60-95%的乙醇水溶液进行洗脱,得到高醇洗脱液D,其用量为树脂体积的3倍,流速2-3BV/h;树脂吸附再生溶剂为5%氢氧化钠、纯化水;

[0011] (4) 将过柱流出液B浓缩至热比重1.39,进行真空干燥,得到含量在20%-40%的肉苁蓉多糖产品;将低醇洗脱液C浓缩至热比重为1.20,进行喷雾干燥,得到含量在35%以上的松果菊苷产品;将高醇洗脱液D浓缩至热比重为1.20,进行喷雾干燥,得到含量在20%-30%的松果菊苷与含量在10%-20%的麦角甾苷混合产品。

[0012] 进一步的,本发明所述的步骤(1)中,提取溶剂为50%-95%的乙醇水溶液。

[0013] 进一步的,本发明所述的步骤(1)中,加热提取温度为70℃,每次提取时间为2h。

[0014] 进一步的,本发明所述的步骤(2)中,天然澄清剂为II型ZTC1+1,加入量为500-600ppm;过滤可使用10μm的精密过滤器。

[0015] 进一步的,本发明所述的步骤(3)中,优选使用30%的乙醇水溶液,以2BV/h的流速,洗脱得到低醇洗脱液C。

[0016] 进一步的,本发明所述的步骤(3)中,优选使用80%的乙醇水溶液,以3BV/h的流速,洗脱得到高醇洗脱液D。

[0017] 更进一步的,本发明所述的步骤(1)中,提取溶剂为60%的乙醇水溶液。

[0018] 本发明所述方法可以同时得到三种规格的管花肉苁蓉提取物产品,操作较简便,产品纯度和收率均较高,最大限度地利用了原料,节约资源。以本发明所述的方法得到的全部产品总收率达90%以上。

附图说明

[0019] 图1为本发明所述方法的工艺流程图。

[0020] 图2为松果菊苷标准品HPLC谱图。

[0021] 图3为麦角甾苷标准品HPLC谱图。

[0022] 图4为本申请实施例1中低醇洗脱液所得产品的HPLC谱图。

[0023] 图5为本申请实施例1中高醇洗脱液所得产品的HPLC谱图。

具体实施方式

[0024] 实施例1

[0025] 称取5kg干燥管花肉苁蓉(多糖含量3.4%,松果菊苷含量5.0%,麦角甾苷含量为1.2%),粉碎为直径约0.5cm的颗粒。以60%乙醇作为提取剂,对原料加热提取2次,每次加热2小时,提取温度70℃,原料与提取剂的质量比为1:5;将两次提取得到的提取液合并,加入浓

缩器中真空浓缩至热比重为1.15,加入500ppm天然澄清剂Ⅱ型ZTC1+1,过10 μ m的精密过滤器,得到滤液A;滤液A以2BV/h的速度过层析柱,吸附剂为大孔树脂SP207,收集过柱流出液B;用3倍于树脂体积的30%乙醇水溶液进行洗脱,流速2BV/h,得到低醇洗脱液C;再用3倍于树脂体积的80%乙醇水溶液进行洗脱,流速3BV/h,得到高醇洗脱液D;树脂吸附再生溶剂为5%氢氧化钠、纯化水;将过柱流出液B浓缩至热比重1.39,进行真空干燥,得到肉苁蓉多糖含量为30.0%的产品1的质量为510g;将低醇洗脱液C浓缩至热比重为1.20,进行喷雾干燥,得到松果菊苷含量为40.3%的产品2的质量为293g;将高醇洗脱液D浓缩至热比重为1.20,进行喷雾干燥,得到松果菊苷含量为25.1%、麦角甾苷含量为11.2%的产品3的质量为489g;总过程中,多糖收率90.0%,松果菊苷收率为96.3%,麦角甾苷收率为91.3%。

[0026] 实施例2

[0027] 称取10kg干燥管花肉苁蓉(多糖含量3.4%,松果菊苷含量5.0%,麦角甾苷含量为1.2%),粉碎为直径约0.5cm的颗粒。以60%乙醇作为提取剂,对原料加热提取2次,每次加热2小时,提取温度70 $^{\circ}$ C,原料与提取剂的质量比为1:5;将两次提取得到的提取液合并,加入浓缩器中真空浓缩至热比重为1.15,加入500ppm天然澄清剂Ⅱ型ZTC1+1,过10 μ m的精密过滤器,得到滤液A;滤液A以2BV/h的速度过层析柱,吸附剂为大孔树脂SP207,收集过柱流出液B;用3倍于树脂体积的20%乙醇水溶液进行洗脱,流速2BV/h,得到低醇洗脱液C;再用3倍于树脂体积的90%乙醇水溶液进行洗脱,流速3BV/h,得到高醇洗脱液D;树脂吸附再生溶剂为5%氢氧化钠、纯化水;将过柱浓缩液浓缩至热比重1.39,进行真空干燥,得到肉苁蓉多糖含量为35.4%的产品1的质量为900g;将低醇洗脱液浓缩至热比重为1.20,进行喷雾干燥,得到松果菊苷含量为36.5%的产品2的质量为620g;将高醇洗脱液浓缩至热比重为1.20,进行喷雾干燥,得到松果菊苷含量为27.4%、麦角甾苷含量为12.0%的产品3的质量为920g;总过程中,多糖收率93.7%,松果菊苷收率为95.68%,麦角甾苷收率为92.0%。

[0028] 实施例3

[0029] 本申请实施例1-2中得到的肉苁蓉多糖可采用苯酚硫酸法进行检测。多糖在硫酸的作用下,先水解成单糖,并迅速脱水生成糖醛衍生物,与苯酚反应生成橙黄色溶液,在490nm处有特征吸收,与标准系列比较定量;称取0.5g肉苁蓉多糖产品,置于50ml具塞离心管内,用5ml水浸润样品,缓慢加入20ml无水乙醇,同时使用涡旋振荡器振摇,使混合均匀,置超声提取器中超声提取30min,提取结束后,于4000r/min离心,离心10min,弃去上清液。不溶物用10ml 80%的乙醇溶液洗涤、离心。用水将上述不溶物转入圆底烧瓶,加入50ml蒸馏水,装上磨口的空气冷凝管,于沸水中提取2h。冷却至室温,过滤,将上清液转移至100ml容量瓶中,残渣洗涤2-3次,洗涤液转至容量瓶中,加水定容,此溶液为测定液;制作标准曲线:称取0.1g在105 $^{\circ}$ C烘干至恒重的葡萄糖,置于100ml烧杯中,加水溶解,用容量瓶定容至1000ml,制成标准葡萄糖工作溶液,置4 $^{\circ}$ C冰箱中储存;称取80g重新蒸馏的苯酚于100ml烧杯中,加水溶解,定容至100ml后转至棕色瓶中,制成80%苯酚溶液,置4 $^{\circ}$ C冰箱中避光保存;吸取5ml 80%苯酚溶液,溶于75ml水中,混匀,配成5%苯酚溶液,此溶液现配先用;分别吸取0、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml标准葡萄糖工作溶液置20ml具塞玻璃试管中,用蒸馏水补至1.0ml,向试液中加入1.0ml 5%苯酚溶液,然后快速加入5.0ml硫酸,静置10min。用涡旋振荡器使反应液充分混合,然后将试管放置于30 $^{\circ}$ C水浴中反应20min,于200-600nm范围内测吸光度。以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,制定标准曲线;结果计算:

样品中多糖含量以w计,单位以克每百克(g/100g)表示,按下面公式计算

$$[0030] \quad W=0.9 \times 10^{-4} m_1 \times V_1 / m_2 / V_2$$

[0031] m_1 —从标准曲线上差的样品测定液中含糖量,单位为微克

[0032] m_2 —样品质量,单位为克

[0033] V_1 —样品定容体积,单位为毫升

[0034] V_2 —比色测定时所移取样品测定液的体积,单位为毫升

[0035] 0.9—葡萄糖换算成葡聚糖的校正系数

[0036] 在重复条件下,两次独立测定结果的绝对值不大于10%,以大于10%的情况不超过5%为前提;样品中淀粉、糊精有无的判定:将3.6g碘化钾溶于20ml水中,加入1.3g碘,溶解后稀释至100ml,制成碘溶液;称取0.1g肉苁蓉多糖产品,置于20ml具塞试管中;加入10ml水,超声混合均匀,并离心;量取10ml上清液至20ml具塞试管中,加入一滴碘溶液,混合均匀,观察是否有淀粉或糊精与碘溶液反应后呈现的蓝色或红色;如果出现呈色反应,则判定样品中有淀粉和糊精,则此样品中多糖含量的检测不适于本方法;检测样品均在490nm处具有特征吸收,且吸光度最大。

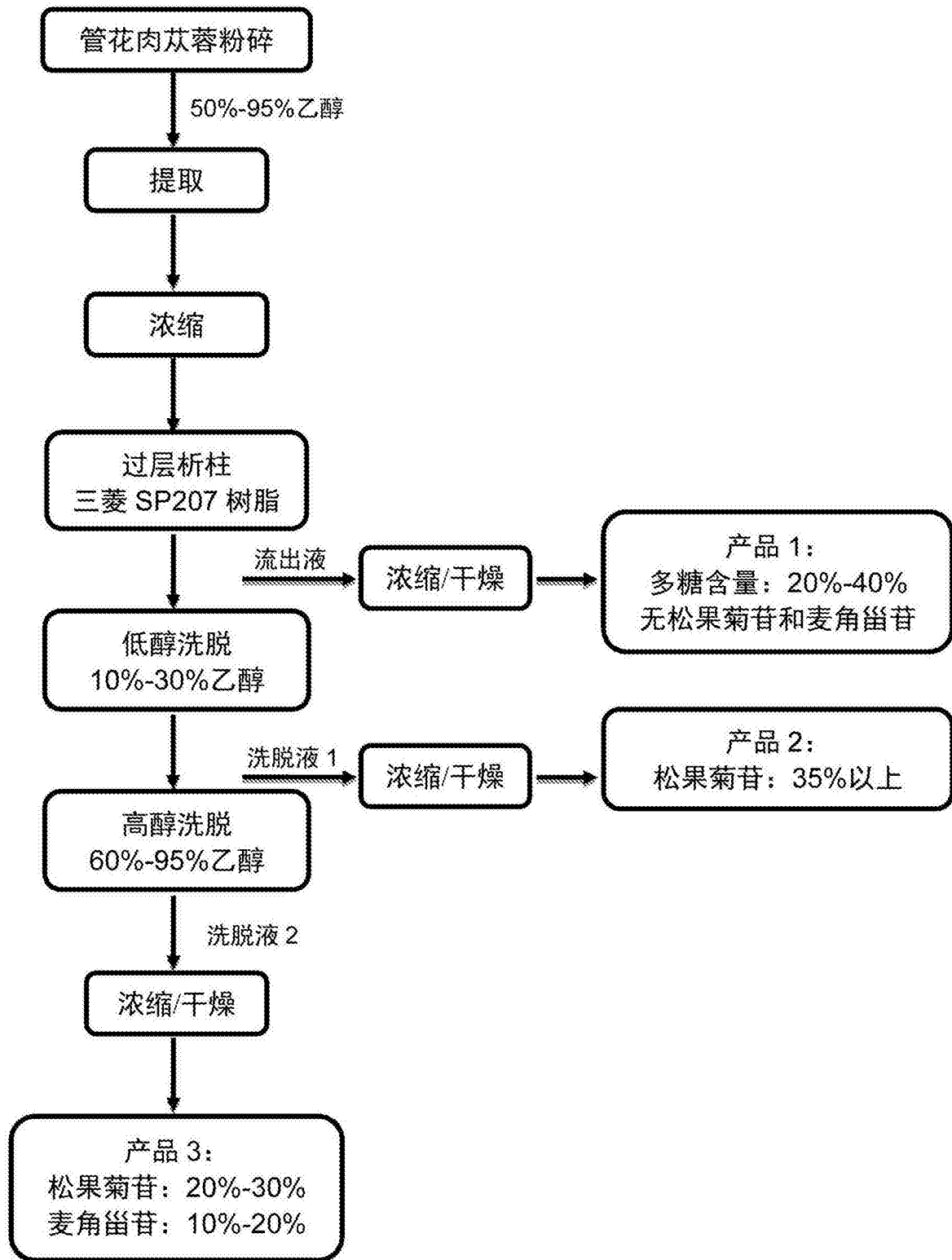


图1

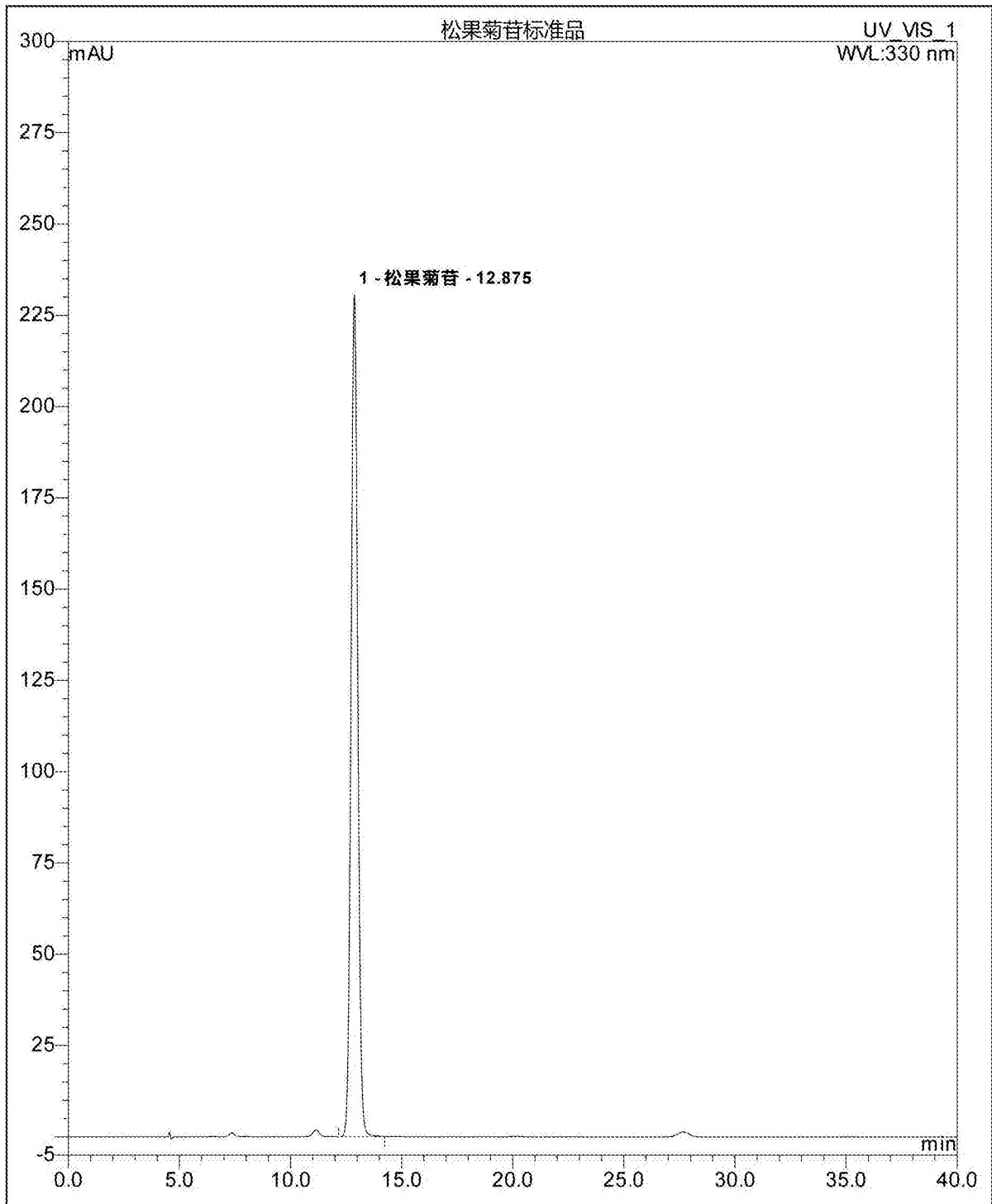


图2

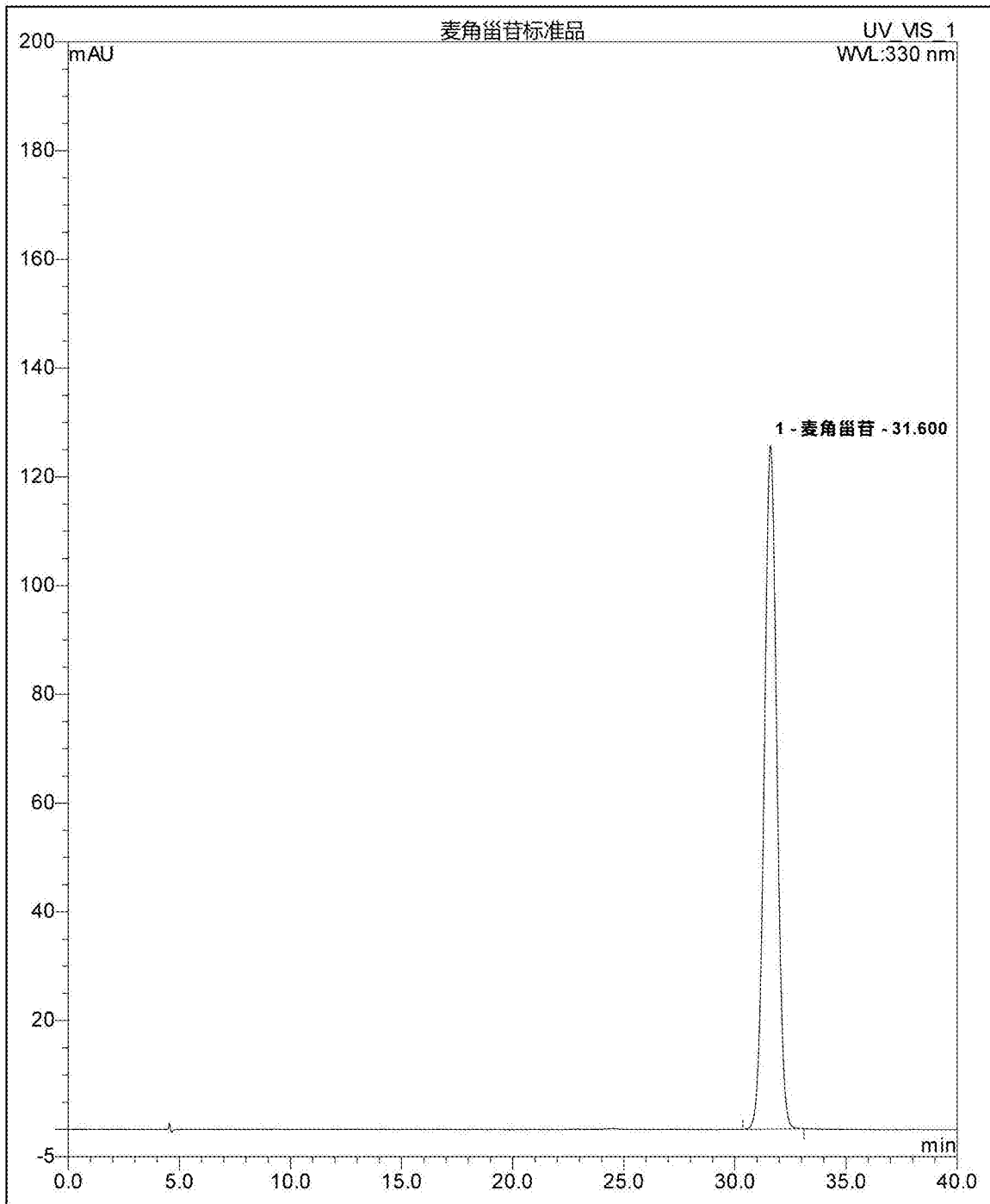


图3

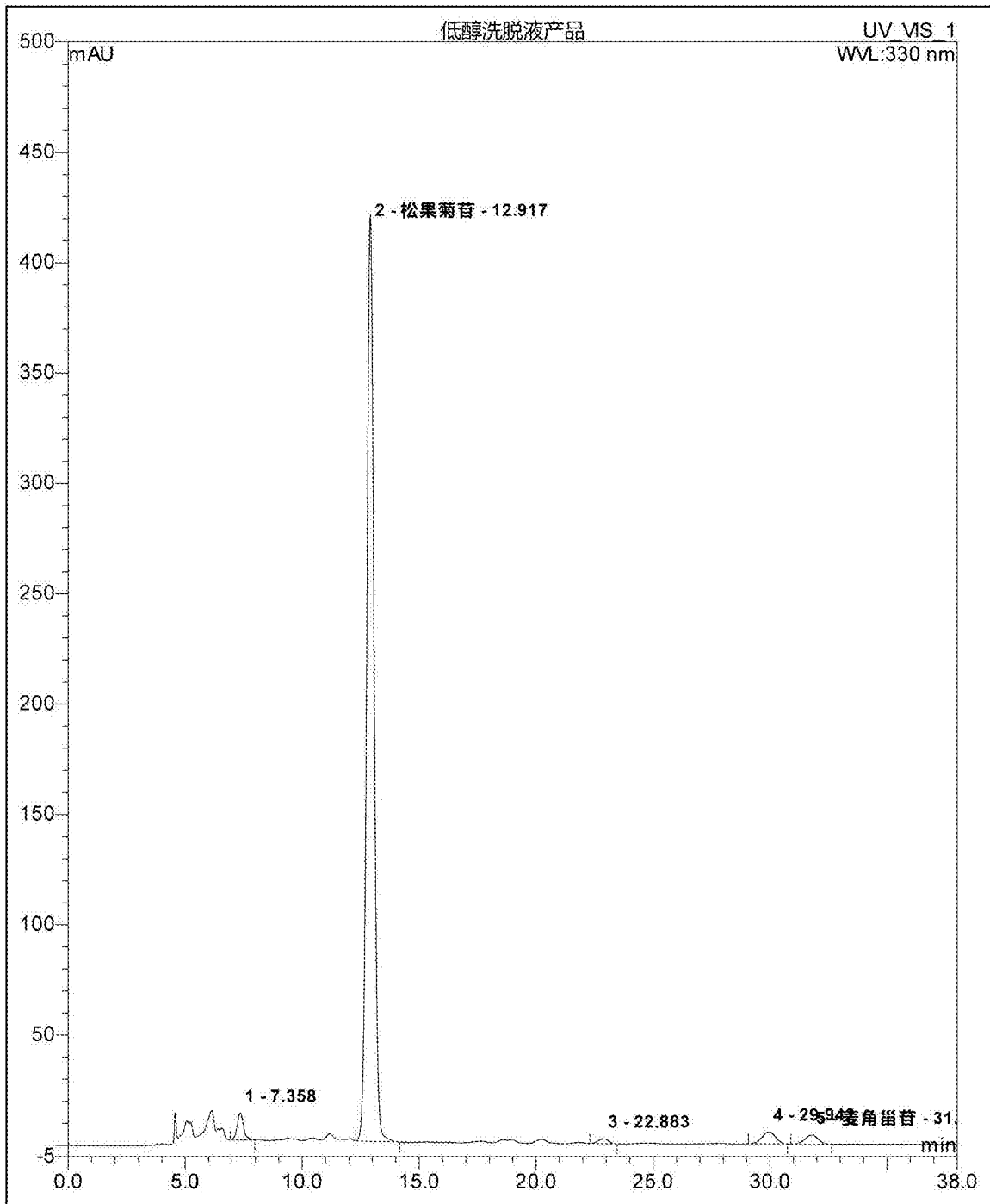


图4

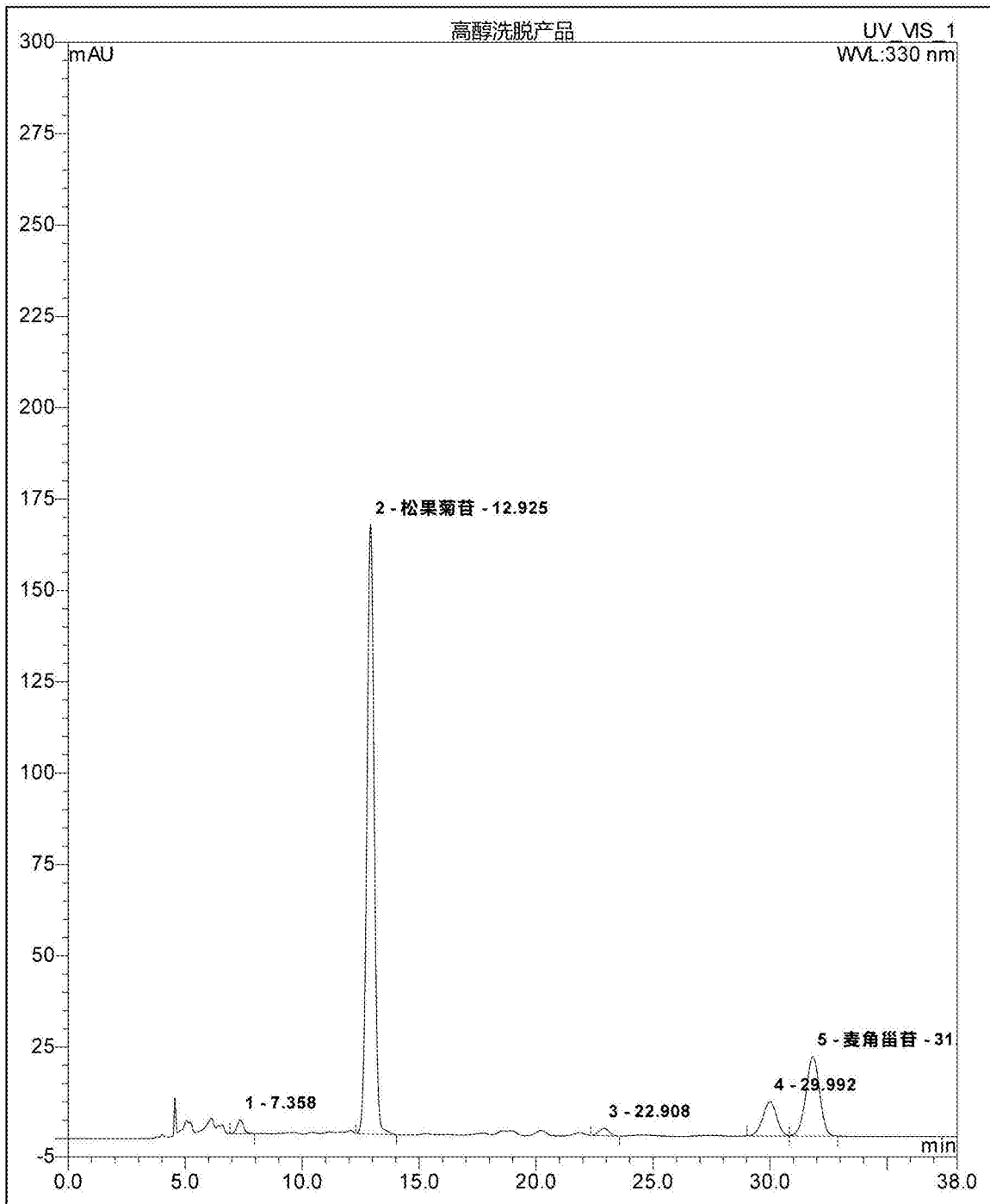


图5