

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)14-0066-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.14.016



正交试验优选细叶铁线莲醇提工艺*

王回霞^{1,2,3}, 谢和兵^{1,2,3,4△}, 尼玛次仁^{3,4}, 白玛旦增^{3,4}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 江苏省南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133;
3. 江苏神猴医药研究有限公司, 江苏 南通 226133; 4. 西藏神猴药业有限责任公司, 西藏 日喀则 857000)

摘要:目的 优选细叶铁线莲的醇提工艺。方法 采用高效液相色谱法测定细叶铁线莲饮片样品中槲皮素的含量;以紫外吸收光谱法测定饮片样品中总黄酮含量;以料液比、提取次数、提取时间为考察因素,以干膏得率、总黄酮含量和槲皮素含量为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选最佳醇提工艺,并验证。结果 槲皮素质量浓度在 $1.99 \sim 198.99 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9999, n=6$),定量限和检测限分别为 $0.060 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $0.018 \mu\text{g}/\text{mL}$;精密性、稳定性和重复性试验结果的RSD均小于2.0%;平均加样回收率为101.74%,RSD为1.25%($n=6$)。芦丁质量浓度在 $7.42 \sim 44.52 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度线性关系良好。最佳工艺条件为加10倍40%乙醇,提取3次,每次0.5h。验证试验中干膏得率、总黄酮含量、槲皮素含量分别为25.10%、56.78 mg/g、1.35 mg/g,RSD分别为2.43%、4.10%、2.13%($n=3$)。结论 该研究中优选的醇提工艺稳定可靠、重复性好,可为细叶铁线莲的质量评价及其制剂产品的产业化开发提供参考。

关键词:细叶铁线莲;醇提工艺;槲皮素;高效液相色谱法;正交试验法;含量测定

Optimization of Ethanol Extraction Process of Herba Clematis by Orthogonal Test

WANG Huixia^{1,2,3}, XIE Hebing^{1,2,3,4}, NIMA Ciren^{3,4}, BAIMA Danzeng^{3,4}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong, Jiangsu, China 226133; 3. Jiangsu God Monkey Medical Research Co., Ltd., Nantong, Jiangsu, China 226133; 4. Tibet God Monkey Pharmaceutical Co., Ltd., Shigatse, Xizang, China 857000)

Abstract: Objective To optimize the ethanol extraction process of Herba Clematis. **Methods** The high-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the content of quercetin in the Herba Clematis Decoction Piece samples, and the ultraviolet absorption spectroscopy was used to determine the content of total flavonoids in the decoction piece samples. The ethanol extraction process of Herba Clematis was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with the ratio of material to liquid, extraction frequency and extraction time as the investigation factors, and with the yield of dry extract, total flavonoid content and quercetin content as the investigation indicators. Then the verification test was conducted. **Results** The mass concentration of quercetin showed a good linear relationship with the peak area in the range of $1.99 - 198.99 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($r = 0.9999, n = 6$). The limit of quantification and the limit of detection were $0.060 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $0.018 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rate of quercetin was 101.74% with an RSD of 1.25% ($n = 6$). The mass concentration of rutin showed a good linear relationship with the absorbance in the range of $7.42 - 44.52 \mu\text{g}/\text{mL}$. The optimal process was as follows: adding 10 times of 40% ethanol, extracting three times, each time for 0.5 h. The yield of dry extract, total flavonoid content and quercetin content in the the verification test were 25.10%, 56.78 mg/g, 1.35 mg/g, with the RSDs of 2.43%, 4.10%, 2.13% ($n = 3$), respectively. **Conclusion** The optimal ethanol extraction process in this study is stable, reliable and repeatable, which can provide a reference for the quality evaluation of Herba Clematis and the industrial development of its preparation products.

Key words: Herba Clematis; ethanol extraction process; quercetin; HPLC; orthogonal test; content determination

细叶铁线莲为毛茛科草本植物芹叶铁线莲 *Clematis aethusaefolia* Turcz. 的带花叶枝条,蒙语名为特木日-敖日秧古,收载于1998年版《中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册》。其具有破痞、调温、止腐、消肿、止泻功效,蒙医临床常用作破痞去滞药,用于治疗寒痞、肿瘤、食积、水肿、创疡、痔疮等^[1-2]。细叶铁线莲中含有黄酮类、皂苷类、木质素、生物碱、挥发油等多种生物活

性成分^[3-4],其中主要成分黄酮类化合物具有抗炎、抗氧化、抗病毒、降血糖等作用^[5-8]。细叶铁线莲药材的质量标准仅有外观性状检查项,无成分的定量测定项,质量控制水平较低。鉴于此,本研究中采用高效液相色谱法对细叶铁线莲的指标成分槲皮素进行含量测定,并以 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选药材的醇提工艺,为其质量评价及质量标准提升提供参考,也为细叶铁线莲相关制

*基金项目:西藏自治区日喀则市区域科技协同创新专项[QYXTZX-RKZ2022-07]。

第一作者:王回霞,女,在读硕士研究生,研究方向为中药药剂学,(电子信箱)3080871923@qq.com。

△通信作者:谢和兵,男,硕士,副主任药师,研究方向为高原医学、传统藏药产业化开发,(电子信箱)76445044@qq.com。

剂的产业化开发提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UV-1900型紫外-可见分光光度计、LC-16A型液相色谱仪,均购自日本Shimadzu公司;XSR205DU/AC型电子天平(美国Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);HH-6型恒温水浴箱、SHZ-DC(Ⅲ)型循环水式多用真空泵,均购自上海力辰邦西仪器科技有限公司;YRE-2020Z型旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 试药

芦丁对照品(批号为100080-202012,含量92.2%),槲皮素对照品(批号为100081-201610,含量99.1%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈、磷酸、无水氯化铝、氢氧化钠、亚硝酸钠均为分析纯。细叶铁线莲饮片(安徽援康中药饮片股份有限公司,批号为20220314)。

2 方法与结果

2.1 槲皮素含量测定

2.1.1 色谱条件^[9]

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-0.2%磷酸水溶液(40:10:50, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:360 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液制备

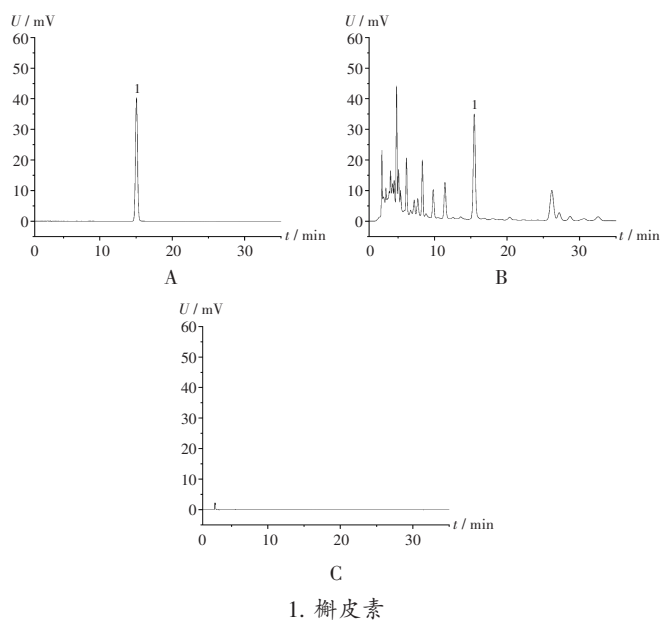
对照品溶液:取槲皮素对照品10.04 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,制得质量浓度为198.99 μg/mL的对照品贮备液;精密吸取1 mL,置10 mL容量瓶中,用甲醇定容,即得质量浓度为19.90 μg/mL的对照品溶液I。

供试品溶液:取饮片样品粉末(过65目筛)1 g,精密称定,加入40%乙醇12 mL,加热回流提取2次,每次0.5 h,滤液合并,加入40%乙醇定容至25 mL,摇匀,即得供试品贮备液I;精密吸取8 mL,置梨形瓶中,80℃减压浓缩至干,用甲醇-25%盐酸溶液(4:1, V/V)20 mL溶解,并转移至锥形瓶中,90℃水浴回流30 min,冷却,加甲醇定容至25 mL,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液I。

阴性对照品溶液:不加饮片样品,其余操作同供试品溶液I制备方法,制得阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:取2.1.2项下对照品溶液I、供试品溶液I、阴性对照品溶液各适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应吸收峰,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图1。



A. 对照品溶液 I B. 供试品溶液 I C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Quercetin

A. Reference solution I B. Test solution I C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察:取2.1.2项下对照品贮备液0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 mL,分别置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得系列对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以系列对照品溶液的质量浓度(X_1 , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y_1)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_1 = 40\,476 X_1 + 10\,510$ ($r = 0.999\,9$, $n = 7$)。结果表明,槲皮素质量浓度在1.99~198.99 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限与检测限考察:精密吸取2.1.2项下对照品溶液I适量,倍比稀释,并按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,分别以信噪比(S/N)为10:1和3:1时的质量浓度为定量限和检测限。结果定量限和检测限分别为0.060, 0.018 μg/mL。

精密度试验:取2.1.2项下对照品溶液I适量,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,以及连续进样测定3 d,且每天同一时间进样3次,记录峰面积。结果的RSD分别为0.13% ($n = 6$)和0.19% ($n = 3$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.1.2项下供试品溶液I适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 32 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为0.78% ($n = 10$),表明供试品溶液I室温放置32 h内基本稳定。

重复性试验:取饮片样品适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液I 6份,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果槲皮素的平均

含量为 1.39 mg/g, RSD 为 1.04% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量的饮片样品粉末约 1 g, 精密称定, 共 6 份, 加入 2.1.2 项下对照品贮备液 1.2 mL, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液 I, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 并计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果 ($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
1380.96	238.79	1620.56	100.34		
1390.66	238.79	1637.14	103.22		
1393.43	238.79	1633.79	100.66	101.74	1.25
1392.05	238.79	1637.16	102.65		
1382.35	238.79	1627.76	102.77		
1386.51	238.79	1627.19	100.79		

2.2 醇提工艺研究

2.2.1 总黄酮含量测定^[10-11]

溶液制备: 取芦丁对照品 10.06 mg, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加 40% 乙醇溶解并定容, 即得质量浓度为 185.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液 II。精密吸取饮片样品醇提液 0.2 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 加 40% 乙醇 5.8 mL, 摇匀, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 摇匀, 静置 6 min, 加 10% 氯化铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 静置 6 min, 加 4.0% 氢氧化钠试液 10 mL, 加 40% 乙醇定容, 摇匀, 静置 15 min, 即得供试品溶液 II。

检测波长确定: 取对照品溶液 II 及供试品贮备液 I 各适量, 经显色后于 200~800 nm 波长范围内扫描。结果显示, 2 种溶液在 509 nm 波长处均有较好吸收, 故以其为检测波长。

线性关系考察: 精密吸取对照品溶液 II 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL, 分别置 25 mL 容量瓶中, 分别加 40% 乙醇至 6 mL, 摇匀, 加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 静置 6 min, 加入 10% 氯化铝溶液 1 mL, 摇匀, 静置 6 min, 加入 4.0% 氢氧化钠试液 10 mL, 再加 40% 乙醇定容, 摇匀, 静置 15 min, 于 509 nm 波长处测定吸光度。以芦丁质量浓度 (X_2 , $\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, 吸光度 (Y_2) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y_2 = 0.0137 X_2 - 0.0116$ ($r = 0.9997$, $n = 6$)。结果表明, 芦丁质量浓度在 7.42~44.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度线性关系良好。

精密度、稳定性、重复性试验: 按相关要求进行方法学考察。精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好, 供试品溶液室温放置 12 h 内基本稳定, 方法重复性良好。

样品含量测定: 取供试品溶液适量, 于 509 nm 波长处测定吸光度, 并计算总黄酮含量。

2.2.2 干膏得率测定^[12]

精密吸取饮片样品醇提液 25 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 再置鼓风干燥箱 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h, 取出, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定, 计算干膏得率。干膏得率(%) = (蒸发皿及干膏总质量 - 恒重后蒸发皿质量) \times 提取液总体积 / (药材干质量 \times 25) \times 100%。

2.2.3 提取溶剂考察

取饮片样品粉末约 10 g, 精密称定, 共 4 份, 分别加入 120 mL 水及 20%, 40%, 60% 乙醇, 加热回流 2 次, 每次 0.5 h, 滤过, 合并滤液, 置 250 mL 容量瓶中, 定容, 即得提取液。按 2.2.1 项下方法测定总黄酮含量, 结果显示 40% 醇提取液中总黄酮含量最高。

2.2.4 正交试验^[13-16]

试验设计与结果: 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以料液比 (因素 A)、提取次数 (因素 B)、提取时间 (因素 C) 为考察因素, 以干膏得率、总黄酮含量、槲皮素含量为考察指标, 优选细叶铁线莲醇提工艺。采用综合加权评分法^[17-19], 按干膏得率、总黄酮含量、槲皮素含量权重比 (0.2:0.4:0.4) 进行综合评分, 综合评分 = (干膏得率 / 最大干膏得率) \times 0.2 + (槲皮素含量 / 最大槲皮素含量) \times 0.4 + (总黄酮含量 / 最大总黄酮含量) \times 0.4。选用单变量线性模型中的主效应分析对试验结果进行方差分析。因素与水平见表 2, 试验设计与结果见表 3, 方差分析结果见表 4。

表 2 因素与水平

Tab. 2 Factors and their levels

水平	因素 A(g/mL)	因素 B(次)	因素 C(h)
1	1:8	1	0.5
2	1:10	2	1.0
3	1:12	3	1.5

3 个考察因素的作用强度依次为 $B > A > C$, 仅因素 B (提取次数) 对结果有显著影响 ($P < 0.05$)。结合生产实际, 确定细叶铁线莲提取工艺为 $A_2B_3C_1$, 即料液比 1:10 (g/mL), 提取 3 次, 每次 0.5 h。

2.2.5 验证试验

取饮片样品粉末 (过 65 目筛) 适量, 共 3 份, 按上述最佳提取工艺操作, 测定干膏得率、槲皮素与总黄酮的含量。结果的 RSD 均小于 5.0% ($n = 3$), 表明该提取工艺稳定可行, 重复性良好。详见表 5。

3 讨论

3.1 试验条件选择

预试验中以甲醇 - 0.2% 磷酸水溶液 (60:40, V/V) 为流动相, 结果槲皮素的色谱峰与其他峰无法分离, 这可能与细叶铁线莲中含有的黄酮类成分较多有关^[20]。通过增加流动相中水相的比例来提高色谱峰的分度, 结果显示, 当流动相为甲醇 - 0.2% 磷酸水溶液

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号	因素				干膏得率(%)	槲皮素含量(mg/g)	总黄酮含量(mg/g)	综合评分
	A	B	C	D(空白)				
1	1	1	1	1	16.36	0.91	33.20	62.43
2	1	2	2	2	22.35	1.21	48.99	86.96
3	1	3	3	3	24.46	1.31	55.38	96.00
4	2	1	2	3	18.24	1.00	35.44	68.09
5	2	2	3	1	22.89	1.28	48.67	89.29
6	2	3	1	2	24.63	1.37	55.83	98.39
7	3	1	3	2	19.37	1.13	36.53	73.51
8	3	2	1	3	24.71	1.38	48.84	93.64
9	3	3	2	1	25.50	1.41	54.01	98.70
K_1	245.39	204.03	254.46	250.42				
K_2	255.77	269.90	253.75	258.86				
K_3	265.85	293.09	258.80	257.74				
k_1	81.80	68.01	84.82	83.47				
k_2	85.26	89.97	84.58	86.29				
k_3	88.62	97.70	86.27	85.91				
R	6.82	29.69	1.68	2.81				

表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	69.774	2	34.887	4.986	0.167
B	1432.051	2	711.526	101.690	0.010
C	4.982	2	2.491	0.356	0.737

表5 验证试验结果($n=3$)

Tab. 5 Results of the verification test ($n=3$)

指标	1	2	3	\bar{X}	RSD(%)
干膏得率(%)	24.98	24.56	25.76	25.10	2.43
槲皮素含量(mg/g)	1.37	1.32	1.37	1.35	2.13
总黄酮含量(mg/g)	59.21	54.57	56.56	56.78	4.10

(50:50, V/V)时,槲皮素峰的分度提高,但拖尾因子大于1.05;再通过调节有机相的组成来调节拖尾因子,当流动相为甲醇-乙腈-0.2%磷酸水溶液(40:10:50, V/V/V)时,槲皮素的分离度和拖尾因子均符合2020年版《中国药典(一部)》规定,故选择其为流动相。

3.2 指标成分选择

本研究中所选考察指标能全面、综合地评价细叶铁线莲的醇提工艺。其中干膏得率的变化会直接影响制剂中有效成分含量及药效;细叶铁线莲中含多种黄酮类成分,许多文献报道黄酮类成分具有止咳、祛痰、平喘、抗炎、抗氧化等作用^[21-22],其中黄酮类化合物槲皮素具有抗氧化、抗炎、治疗心脑血管疾病、抗癌等多种作用^[23-25]。

3.3 提取溶剂与试验设计

黄酮苷元一般难溶或不溶于水,易溶于甲醇、乙醇、醋酸乙酯、乙醚等有机溶剂及稀碱水溶液中。常用的提取方法有醇提法、碱提法、有机溶剂萃取法等。本研究中探讨了水和20%~60%乙醇对细叶铁线莲总黄酮提取率的影响,结果不同体积分数乙醇的提取率均高于水,且随着体积分数的升高,细叶铁线莲的总黄酮提取率呈先升后降趋势,当乙醇体积分数为40%时总黄酮提取率最高,但超过60%后不仅总黄酮提取率降低,提取液的颜色也会明显改变,可能与高纯度乙醇促进细叶铁线莲中脂质、色素及其他物质的溶出有关^[17]。因此,选择40%乙醇作为提取溶剂。本研究中还以总黄酮含量为指标,开展了料液比、提取次数、提取时间的单因素试验,结果表明,料液比(g/mL)为1:8、1:10、1:12时总黄酮提取率明显增加,而为1:15、1:20时总黄酮含量变化不明显,故设计其水平为1:8、1:10、1:12;提取1次、2次、3次,总黄酮含量明显增加,而提取4次、5次时总黄酮含量变化不明显,故设计提取次数的水平为1次、2次、3次;提取时间在一定范围内与提取液中的指标成分含量呈正相关,回流提取30、60、90 min,提取液中指标成分含量明显增加,但回流提取120、180 min时,提取液中指标成分含量变化不明显,故选择提取时间的水平为30、60、90 min。

3.4 方法评价

本研究中采用正交试验法优选了细叶铁线莲的醇提工艺,建立了测定细叶铁线中槲皮素及总黄酮含量的方法。验证结果表明,本方法科学、可行。本研究结果为细叶铁线莲药材的质量标准提升提供了参考,也为细叶铁线莲制剂产品的产业化开发提供了试验依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1998:32.
- [2] 朱亚民. 内蒙古植物药志[M]. 第1卷. 呼和浩特:内蒙古人民出版社, 2000:389-393.
- [3] 胡阿荣,艾力,敖敦格日乐,等. 铁线莲属药材的化学成分以及药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(15):57-61.
- [4] 袁明霞,宋微,刘换换,等. 铁线莲花色相关次生代谢产物的测定及药理分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(18):6134-6141.
- [5] 祁建宏,董芳旭. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 北京联合大学学报, 2020, 34(3):89-92.
- [6] 张妍,李冬梅. 婆婆针黄酮类化学成分及其药理作用研究进展[J]. 广东化工, 2023, 50(5):120-122.
- [7] 吴琪,张晓琳,刘朝霞,等. 重要黄酮类物质药理作用及在畜禽养殖应用的研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2022, 47(4):42-46.
- [8] 张东霞. 黄芪中黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 内蒙古