

东北铁线莲中抗肿瘤活性成分的提取工艺优选

金晨^{1,2}, 翟兴英^{1,4}, 李翔^{1,2}, 张武岗^{1,2*}, 唐琍萍^{3*}, 张凌¹, 冯育林^{1,2}, 杨世林^{1,2}

(1. 江西中医学院, 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;
3. 江西中医学院附属医院, 南昌 330000; 4. 北京中医药大学, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立东北铁线莲中抗肿瘤活性成分 W2[3-O- α -L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃核糖-(1 \rightarrow 3)- α -L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖齐墩果酸皂苷]的提取工艺。方法: 以 W2 提取量为指标, 采用 HPLC 测定 W2 含量, 通过正交试验和单因素试验考察提取溶媒、提取时间、料液比、提取次数对提取工艺的影响, 确定 W2 最佳提取工艺。结果: 最佳提取工艺为 30% 乙醇提取 2.5 h, 料液比 1:12, 提取 2 次。结论: 优选的提取工艺合理、稳定、可行, 为东北铁线莲后续研究提供实验依据。

[关键词] 东北铁线莲; 提取工艺; 齐墩果酸皂苷; 正交试验; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)08-0033-04

[doi] 10.11653/syfy2013080033

Optimization of Extraction Process of Anti-tumor Active Ingredient in *Clematis manshurica* Rupr

JIN Chen^{1,2}, ZHAI Xing-ying^{1,4}, LI Xiang^{1,2}, ZHANG Wu-gang^{1,2*},
TANG Li-ping^{3*}, ZHANG Ling¹, FENG Yu-lin^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330006, China;
2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation of Chinese

[收稿日期] 20121108(015)

[第一作者] 金晨, 在读硕士, 从事天然药物活性成分研究, Tel:0791-88607657, E-mail:last59@sina.com

[通讯作者] * 张武岗, 副教授, 从事天然产物活性成分研究及中药质量标准研究, Tel:0791-87119650, E-mail:zwgchf98@foxmail.com;

* 唐琍萍, 主管药师, 从事药事管理及中药质量标准研究, Tel:0791-86361304, E-mail:tanglipingnc@sina.com

用乙醇-水体系作为提取溶媒, 既保证了有效成分的溶解度, 又有利于样品吸热升温。试验中发现物料粉碎程度对提取效率影响很大, 粒径减小, 药材与提取溶剂接触的面积增大, 促进有效成分的溶出、扩散。

[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: 中国医药科技出版社, 2010:15.
- [2] Dirsch V M, Stuppner H, Vollmar A M. Cytotoxic sesquiterpene lactones mediate their death-inducing effect in leukemia T cells by triggering apoptosis [J]. *Planta Med*, 2001, 67(6):557.
- [3] Konishi T, Shimada Y, Nagao T, et al. Antiproliferative

sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(10):1370.

- [4] Huo Y, Shi H M, Wang M Y, et al. Chemical constituents and pharmacological properties of *Radix Inulae* [J]. *Pharmazie*, 2008, 63(10):699.
- [5] 范送玲, 张建军, 熊带水, 等. 川芎微波提取工艺优选 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(18):46.
- [6] 王秀文, 王颖莉, 裴晓丽, 等. 均匀设计法优选党参茯苓水溶性多糖的微波提取工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4):24.
- [7] 王金, 李素霞, 赵永明, 等. 正交试验优化土木香根中土木香内酯和异土木香内酯的提取工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(12):36.

[责任编辑 全燕]

Herbal Medicine, Nanchang 330006, China;

3. Affiliated Hospital of Jiangxi University of TCM, Nanchang 330000, China;

4. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish extraction technology for anti-tumor active ingredient of W2 [3-O- α -L-pyran rhamnose-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-ribosepyranose-(1 \rightarrow 3)- α -L-pyran rhamnose-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl oleanolic acid saponins] from *Clematis manshurica* Rupr. **Method:** With the content of W2 as index, which was determined by HPLC, effects of extraction time, extraction solvent, liquid-solid ratio and extraction times on extraction technology were investigated by single factor test and orthogonal test, then to determine optimum technology of W2. **Result:** Optimum extraction process of W2 was as following: reflux extracted 2 times with 12 times the amount of 30% ethanol, 2.5 hours per time. **Conclusion:** Optimized technology was reasonable, stable and feasible, which could provide a experimental basis for the follow-up research of *C. manshurica* Rupr.

[Key words] *Clematis manshurica* Rupr; extraction process; oleanolic acid saponins; orthogonal experiment; HPLC

东北铁线莲具有祛风湿、通经络之效,作为威灵仙的基原植物收载于 2010 年版《中国药典》,其主要成分包括皂苷类、木脂素类、生物碱类、酚苷类、内酯及有机酸等^[1-5]。现代药理研究表明,其具有抗肿瘤、抗菌消炎、降血糖、利胆、抗利尿、止痛等作用^[6-7]。前期研究发现,东北铁线莲提取物中 W2 [3-O- α -L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃核糖-(1 \rightarrow 3)- α -L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖齐墩果酸皂苷]对肝癌细胞 SMMC-7721 具有显著的抑制作用。本实验以 W2 提取量为指标,采用正交试验和单因素试验优选东北铁线莲的提取工艺,为其大规模生产提供参考。

1 材料

Agilent 1100 系列手动高效液相色谱仪(美国安捷伦),COSMOSIL C₁₈ ODS 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m,日本半井),AUW-220D 型 1/10 万分析天平(日本岛津),BS124S 型 1/万电子分析天平(德国赛多利斯),Millipore Simplicity 型超纯水器(美国密理博),RT-02B 型二两装粉碎机(台湾荣聰)。

W2 对照品(自制,经蒸发光散射检测器检测,纯度 \geq 95%),东北铁线莲(辽宁产,厦门仁泽堂代理,经江西中医学院刘庆华副教授鉴定为毛茛科铁线莲属植物东北铁线莲 *Clematis manshurica* Rupr. 的干燥根),甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 碱水解工艺 在前期研究中已确定东北铁线

莲的碱水解工艺,即将提取液置于 65 $^{\circ}$ C 减压浓缩至无醇味,调配成含生药量 0.3 g \cdot mL⁻¹的预水解液,每 10 g 生药的预水解液加入 10 mol \cdot L⁻¹氢氧化钠 2 mL,于 85 $^{\circ}$ C 以上磁力搅拌加热反应 3 h,反应完毕后调至 pH 6~7,即得。

2.2 含量测定

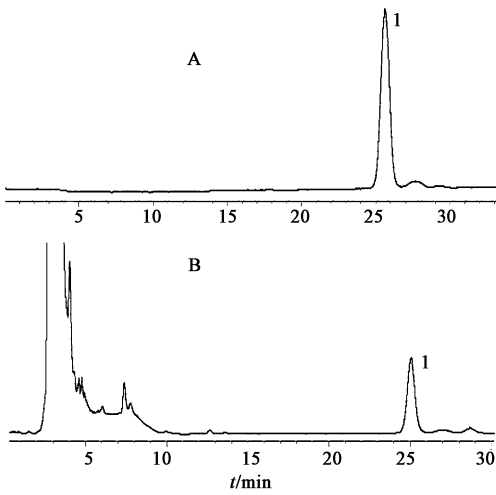
2.2.1 对照品溶液的制备 称取已恒重的 W2 适量,加甲醇配制成质量浓度分别为 0.459,0.324,0.259,0.194,0.188,0.130,0.065,0.032 g \cdot L⁻¹的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 准确称取东北铁线莲药材样品(根部经药材粉碎机粉碎后过 2 号筛,下同)10 g,置具塞锥形瓶中,加 70% 甲醇 100 mL,密塞,超声提取(300 W,50 kHz)30 min,放冷,过滤,按 2.1 项下方法处理,碱水解液稀释 10 倍后待测,即得。

2.2.3 色谱条件与系统适用性试验 COSMOSIL C₁₈ ODS 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m),柱温 25 $^{\circ}$ C,流速 1 mL \cdot min⁻¹,进样量 20 μ L,流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~15 min,70% A;15~30 min,85% A),理论塔板数按 W2 计算大于 5 000。见图 1。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密量取 2.2.1 项下系列质量浓度对照品溶液,按 2.2.3 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,W2 进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 193.09X - 103.65$ ($R^2 = 0.999$),表明 W2 进样量在 0.648~9.184 μ g 与峰面积线性关系较好。



A. 对照品; B. 供试品; 1. W2

图1 东北铁线莲 HPLC

2.3.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液(0.259 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),按 2.2.3 项下方法检测,重复进样 6 次,结果峰面积 RSD 0.99%,表明仪器精密度较高。

2.3.3 稳定性试验 准确称取东北铁线莲样品适量,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.3 项下方法检测,分别于 0,2,4,8,12,24 h 各进样 1 次,结果峰面积 RSD 1.50%,表明供试品溶液在 24 h 内较为稳定。

2.3.4 重复性试验 精密量取同一供试品溶液 6 份,按 2.2.3 项下方法检测,结果峰面积 RSD 1.43%,表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收试验 准确称取东北铁线莲样品 9 份,每份 2 g,等分为 3 组,每组依次加入 W2 对照品 2.2,4.4,6.6 mg,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.3 项下方法检测,结果平均回收率 99.71%,RSD 1.08%,表明该方法较为稳定可靠。

2.4 单因素试验考察^[8]

2.4.1 提取溶剂 准确称取东北铁线莲样品每份 10 g,分别用水和体积分数为 30%,50%,70%,95% 的乙醇溶液 100 mL 加热回流提取 2 h,提取 1 次,过滤,按 2.1 项下方法碱水解,碱水解液稀释 10 倍,按 2.2.3 项下方法检测,结果 W2 提取量分别为 1.77,3.32,3.72,3.64,1.99 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。故选取 50% 乙醇。

2.4.2 提取时间 准确称取东北铁线莲样品 10 g,分别用 50% 乙醇 100 mL 加热回流提取 1,1.5,2,2.5,3 h,其他操作同 2.4.1 项,结果 W2 提取量分别为 3.15,3.34,3.35,3.43,2.81 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。故确定提取时间 2.5 h。

2.4.3 料液比 准确称取东北铁线莲样品 5 份,每

份 10 g,分别用 50% 乙醇 60,80,100,120,150 mL 加热回流提取 2.5 h,其他操作同 2.4.1 项,结果 W2 提取量分别为 2.27,4.75,3.98,3.90,3.74 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。故选取料液比 1:8。

2.4.4 提取次数 准确称取东北铁线莲样品 5 份,每份 10 g,加 50% 乙醇 80 mL 加热回流提取 2.5 h,分别提取 1,2,3,4,5 次,其他操作同 2.4.1 项,结果 W2 提取量分别为 3.34,0.96,0.30,0.28,0.28 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。故确定提取 2 次。

2.5 正交试验优选 准确称取东北铁线莲样品 9 份,每份 10 g,以 W2 提取量为指标,选取乙醇体积分数、提取时间及料液比为考察因素,按正交试验安排进行提取,每份药材提取 2 次,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表1 东北铁线莲中抗肿瘤活性成分 W2 提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 提取时间/h	C 料液比
1	70	2.5	1:12
2	50	2	1:10
3	30	1.5	1:8

表2 东北铁线莲中抗肿瘤活性成分 W2 提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	W2 提取量 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	4.29
2	1	2	2	2	3.62
3	1	3	3	3	2.20
4	2	1	2	3	3.36
5	2	2	3	1	2.18
6	2	3	1	2	4.29
7	3	1	3	2	3.46
8	3	2	1	3	3.10
9	3	3	2	1	3.91
K_1	3.37	3.70	3.89	3.46	
K_2	3.28	2.97	3.63	3.79	
K_3	3.49	3.47	2.61	2.89	
R	0.21	0.73	1.28	0.90	

表3 W2 提取量方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.069	2	0.056	>0.05
B	0.849	2	0.691	>0.05
C	2.741	2	2.232	>0.05
D(误差)	1.254	2		

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 $C > B > A$;方差分析显示各因素对提取工艺的影响均无显著性差异;最佳提取工艺为 $C_1B_1A_3$,即加 12 倍量 30% 乙醇回流提取 2.5 h,提取 2 次。

2.6 工艺验证 准确称取东北铁线莲样品 3 份,每份 100 g,按优选的工艺进行提取,提取液过滤,于 65 °C 减压浓缩至无醇味,结果 W2 提取量分别为 5.54,5.64,5.58 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$;出膏率 38.88%,浸膏中 W2 纯度 1.45%;说明优选的工艺较稳定且提取效率较高。

3 讨论

目前,东北铁线莲提取物的含量测定多以齐墩果酸为指标,以反映药材质量^[9],前期药理研究表明,W2 为东北铁线莲中主要抗肿瘤成分,故本实验以 W2 提取量为主要考察指标,可更有针对性的揭示东北铁线莲的抗肿瘤活性和质量。东北铁线莲常见的提取方法有微波提取^[10]、超声提取^[11]、加热回流提取等,但前两者不太适应工业生产的要求,因此本实验选择乙醇加热回流提取法,建立和优选了一整套完备的提取方案,为东北铁线莲抗肿瘤活性物质的工业生产提供实验依据。

[参考文献]

[1] Shi S P, Jiang D, Dong C X, et al. Triterpene saponins from *Clematis manshurica* [J]. J Nat Prod, 2006, 69 (11):1591.
[2] Dong F Y, Guo H C, Zhang Y H, et al.

Clematomandshurica saponin E, a new triterpenoid saponin from *Clematis manshurica* [J]. Asian Nat Prod Res, 2010, 12(12):1061.
[3] Shi S P, Tu P F, Dong C X, et al. Alkaloids from *Clematis manshurica* Rupr. [J]. Asian Nat Prod Res, 2006, 8(1):73.
[4] 孙凤. 铁线莲属植物的化学成分研究[D]. 杭州:浙江大学, 2008.
[5] Shi S P, Jiang D, Dong C X, et al. Lignans from the roots and rhizomes of *Clematis manshurica* [J]. Zeitschrift fuer Natufforschung, B: Chem Sci, 2006, 61(10):1299.
[6] 赵燕强, 杨立新, 张宪民, 等. 威灵仙的成分、药理活性和临床应用的研究进展 [J]. 中药材, 2008, 31(3):465.
[7] 龚小雪, 孙定隆, 陈继婷, 等. 细辛, 威灵仙联合应用止痛疗效观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):247.
[8] 潘激扬, 倪健, 尹兴斌. 牛蒡子, 威灵仙提取工艺优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):39.
[9] 张萌, 郑杨, 李盈. HPLC 法测定东北铁线莲中齐墩果酸含量 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(1):163.
[10] 钟方丽, 王晓林, 陈帅. 东北铁线莲中总皂苷的微波提取工艺优化 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(29):16495.
[11] 王晓林, 钟方丽, 孙威, 等. 东北铁线莲总多酚的超声提取工艺研究 [J]. 河北科技大学学报, 2012, 33(1):32.

[责任编辑 全燕]

欢迎订阅 2013 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,320 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行人,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfxj_2010@188.com,网址:www.syfxjzz.com。