

- decoction prevents vascular dysfunction in diabetes via inhibition of endothelial arginase 1[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 201.
- [8] 侯金萍, 李晨晨, 陈建强. 黄芪桂枝五物汤用于脑梗死治疗的效果评估分析[J]. 内蒙古中医药, 2023, 42(4): 71-72; 143.
- [9] 于宁, 张宪忠, 徐东成. 黄芪桂枝五物汤加味治疗气虚血瘀证冠心病的临床疗效观察[J]. 世界中医药, 2019, 14(9): 2334-2338.
- [10] 杨园园, 赵国良, 李达, 等. 黄芪桂枝五物汤加味治疗冠心病心绞痛的系统评价[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(10): 1323-1326.
- [11] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要[J]. 中国循环杂志, 2021, 36(6): 521-545.
- [12] 艾克热木·吾斯曼, 胡炜. 类固醇注射与黄芪桂枝五物汤在腰椎管狭窄症的治疗进展[J]. 新疆中医药, 2020, 38(3): 85-88.
- [13] 胡红, 朱骏飞. 黄芪桂枝五物汤治疗硬皮病临床体会[J]. 内蒙古中医药, 2023, 42(3): 44-45.
- [14] 黄洁. 中药颗粒剂的优势与应用前景[J]. 中国社区医师, 2023, 39(9): 4-6.
- [15] 梁启超. 中药颗粒剂研究进展与应用前景分析[J]. 中外女性健康研究, 2019(7): 27-28; 49.
- [16] 徐婧. 25首古代经典名方关键信息表公开征求意见[J]. 中医药管理杂志, 2022, 30(15): 44.
- [17] 许如玲, 范君婷, 董惠敏, 等. 经典名方黄芪桂枝五物汤标准煎液化学成分的上PLC-Q-TOF-MS分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5614-5630.
- [18] 韩兆莹. 黄芪桂枝五物汤颗粒剂制备工艺与质量标准研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2014.
- [19] 陈革豫, 王孟, 付佳乐, 等. 经方黄芪桂枝五物汤复方颗粒剂的成型工艺研究[J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34(4): 35-38.
- [20] 蔡需, 肖作奇, 王哲明, 等. 盆炎灵颗粒剂成型工艺及辅料筛选的研究[J]. 解放军药学报, 2018, 34(2): 131-133.
- [21] 何婷, 李柯翔, 季志红, 等. 正交试验优选红花配方颗粒的成型工艺[J]. 新疆中医药, 2017, 35(2): 41-44.
- [22] 范越, 张文妮, 田明, 等. 黄芪桂枝五物汤颗粒质量标准研究[J]. 中医药信息, 2019, 36(4): 23-26.

低共熔溶剂提取鱼腥草中绿原酸工艺优化

顾东雅, 金绍娣*, 谢佳伶, 史怡颖
(盐城工业职业技术学院药品与健康学院, 江苏盐城 224000)

摘要: 目的 优化低共熔溶剂提取鱼腥草中绿原酸工艺。方法 在单因素试验基础上, 以料液比、提取温度、提取时间为影响因素, 绿原酸提取率为评价指标, 正交试验优化提取工艺。结果 最佳条件为提取溶剂氯化胆碱-乙酸(1:3), 含水量20%, 料液比1:30, 提取温度70℃, 提取时间60 min, 绿原酸提取率为5.43%。结论 低共熔溶剂既能提高提取率, 又能减轻环境压力, 有利于绿色环保提取鱼腥草中绿原酸。

关键词: 鱼腥草; 绿原酸; 低共熔溶剂提取工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)02-0573-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.02.036

鱼腥草俗称折耳根, 具有清热解毒、利尿消肿的功效^[1], 具有抗菌、抗病毒、提高机体免疫力、化痰、利尿、抗癌等作用^[2-4]。绿原酸是鱼腥草中活性成分之一, 具有增高白血球、保肝利胆、抗肿瘤、降压降脂、抗艾滋病作用^[5-6]。目前, 对于绿原酸提取方法主要是酶法、微波、超声波等^[7], 主要采用传统的有机溶剂, 对环境不友好^[8], 探索一种绿色高效提取方法很有必要。低共熔溶剂是由氢键受体和氢键提供体组成的共熔混合物^[9], 溶解度高、可生物降解、无毒^[10-11], 具有原料成本低、合成简单、不

产生三废等优点^[12]。目前, 以鱼腥草为原料提取绿原酸的文献报道较少, 而且低共熔溶剂提取鱼腥草中绿原酸也尚未有研究报道。

本实验制备7种低共熔溶剂并进行筛选, 以筛选后的低共熔溶剂提取鱼腥草中的绿原酸, 以绿原酸提取率为评价指标, 单因素试验考察低共熔溶剂含水量、料液比、提取温度和时间对提取率的影响; 正交试验优化提取工艺, 与水、60%乙醇等传统溶剂进行比较, 以期为低共熔溶剂在鱼腥草绿原酸的高效提取提供科学依据。

收稿日期: 2023-01-12

基金项目: 2021年江苏省大学生创新创业训练计划项目(202113752001Y); 2023年江苏省科技厅产学研合作项目(BY20231107)

作者简介: 顾东雅(1979—), 女, 硕士, 副教授, 从事植物中药有效成分提取、加工技术研究。Tel: 15851060889, E-mail: gudongyasong@126.com

* **通信作者:** 金绍娣(1983—), 女, 硕士, 副教授, 从事药物分析与检测技术研究。Tel: 15151074451, E-mail: jinshaodi@163.com

1 材料

1.1 试剂与药物 鱼腥草购于颂药堂精品药材店,经江苏天宇检测技术有限公司裴丽高级研究员鉴定为正品。绿原酸对照品(分析纯,广州市江顺化工科技有限公司)。氯化胆碱、尿素(分析纯,茂名市雄大化工有限公司)。乙腈(色谱纯,济南元素化工有限公司);乙二醇、丙三醇、1,4丁二醇、丁二酸、柠檬酸、乙酸、甲醇均为分析纯。

1.2 仪器 FA2204B电子分析天平(济南程腾生物技术有限公司);UV759高分辨紫外分光光度计(青岛聚创华业分析仪器有限公司);Prominence LC-20A高效液相色谱仪(日本岛津公司);HJ-6恒温磁力搅拌器(深圳市鼎鑫宜实验设备有限公司);KS50R高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司);LAB-BL2冷冻干燥机(悦高致实验仪器有限公司)。

2 方法

2.1 低共熔溶剂制备 将氢键接受体氯化胆碱与氢键提供体乙二醇、丙三醇、1,4丁二醇、尿素、乳酸、柠檬酸、乙酸等按一定比例置于圆底烧瓶中,60~85℃水浴加热1~2h,磁力搅拌混合均匀,直至溶液澄清,干燥,冷却至室温,即得^[13]。

2.2 绿原酸提取 按照文献[14]报道精密称取2.50g鱼腥草药材粉末若干份,置于圆底烧瓶中,加入低共熔溶剂,控制料液比、温度、时间和含水量,提取绿原酸,离心分离,上清液置于100mL量瓶中,乙腈-水(25:75)定容至刻度,计算提取率,公式为提取率=($c \times V \times n / m$) × 100%,其中 c 为提取液中绿原酸质量浓度, V 为提取液体积, n 为提取液稀释倍数, m 为鱼腥草质量。

2.3 对照品溶液制备 按照文献[15],精密称取5.25mg绿原酸对照品,置于25mL量瓶中,甲醇定容至刻度,即得。

2.4 色谱条件 流动相乙腈-水(25:75);体积流量1mL/min;柱温室温;检测波长327nm;进样量25μL。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 分别取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL对照品溶液,置于10mL量瓶中,定容至刻度。以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得方程为 $Y = 4.608X + 2.845$ ($r = 0.9996$),在0.102~0.637mg/mL范围内线性关系良好。

2.5.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液25μL,在“2.4”项色谱条件下进样测定6次,测得绿原酸峰面积RSD为0.36%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取同一份绿原酸提取液适量,在“2.4”项色谱条件下进样测定6次,测得提取率RSD为0.42%,表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取绿原酸提取液适量,于1、6、12、24、36、48h在“2.4”项色谱条件下进样测定,测得绿原酸含量RSD为1.49%,表明提取液在48h内稳定性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取绿原酸含量已知的提取

液6份,精密加入0.21mg/mL对照品溶液1、2、3、4、5、6mL,在“2.4”项色谱条件下进样测定,计算回收率。结果,绿原酸平均加样回收率为99.21%,RSD为1.00%。

2.6 单因素试验

2.6.1 低共熔溶剂组成 本实验采用氯化胆碱作为氢键受体,与不同氢键供体(乙二醇、丙三醇、1,4丁二醇、尿素、乙酸、丁二酸、柠檬酸)制备低共熔溶剂,固定含水量20%,料液比1:30,提取温度60℃,提取时间40min,考察氯化胆碱与氢键供体比例1:1、1:2、1:3、1:4、1:5对绿原酸提取率的影响。

2.6.2 含水量 以氯化胆碱-乙酸(1:3)为提取剂,固定料液比1:30,提取温度60℃,提取时间40min,改变氯化胆碱-乙酸体系中的含水量(0、10%、20%、30%、40%、50%、60%),考察其对绿原酸提取率的影响。

2.6.3 料液比 以氯化胆碱-乙酸(1:3)为提取剂,固定含水量为20%,提取温度60℃,提取时间40min,改变料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50),考察其对绿原酸提取率的影响。

2.6.4 提取温度 以氯化胆碱-乙酸(1:3)为提取剂,固定含水量20%,料液比1:30,提取时间40min,改变提取温度(10、20、30、40、50、60、70、80、90、100℃),考察其对绿原酸提取率的影响。

2.6.5 提取时间 以氯化胆碱-乙酸(1:3)为提取剂,固定含水量20%,料液比1:30,提取温度60℃,改变提取时间(10、20、30、40、50、60、70、80、90、100min),考察其对绿原酸提取率的影响。

2.7 正交试验 基于单因素试验,以氯化胆碱-乙酸(1:3)为提取剂,选取料液比、提取温度和提取时间作为影响因素,绿原酸提取率作为评价指标,设计正交试验。

2.8 数据处理 单因素试验平行3次,取平均值,采用正交设计助手、Excel等软件进行分析。

3 结果

3.1 单因素试验

3.1.1 不同组成的低共熔溶剂 由表1可知,随着比例增大绿原酸提取率先升高后降低,为1:3时最高,主要是由于比例变化导致提取液中氢键的网格体系变化,从而使其扩散系数、极性等性质发生变化。当氢键供体为多元醇时,绿原酸的提取率普遍较低;当氢键供体为尿素时,绿原酸提取率最低;当氢键供体为有机酸时,绿原酸的提取率普遍较高,因为绿原酸在氢键供体呈碱性时结构不稳定,易被破坏;酸性条件下最稳定,表现出较高的提取率,但柠檬酸是三元羧酸,使得提取绿原酸时受到一定的阻力,故提取率较其他有机酸略低。最终,选择氯化胆碱-乙酸比例1:3。

3.1.2 含水量 由图1A可知,绿原酸提取率随氯化胆碱-乙酸体系中含水量的增加先升高后降低,为20%时最高,主要是因为氯化胆碱-乙酸体系通过氢键连接,而水作为极性溶剂能降低其黏度,增大扩散系数,从而提高对绿原酸

表1 不同低共熔溶剂对绿原酸提取率的影响

比例	绿原酸提取率/(mg·g ⁻¹)						
	乙二醇	丙三醇	1,4-丁二醇	尿素	乙酸	丁二酸	柠檬酸
1:1	1.32	1.18	1.40	0.87	1.98	1.83	1.76
1:2	2.03	1.91	2.30	1.10	3.14	2.74	2.05
1:3	3.11	2.78	3.12	1.83	5.28	4.34	3.75
1:4	2.41	1.82	2.90	1.32	4.14	3.12	2.31
1:5	1.32	1.04	1.85	0.76	2.76	2.04	1.99

的提取能力；但含水量过高时会导致体系极性过大，引起氢键断裂，从而影响绿原酸的提取。最终，选择含水量20%。

3.1.3 料液比 由图1B可知，绿原酸的提取率随料液比的增大逐渐升高，为1:30时最高，之后再增大时提取率变化不大甚至略有下降，因为料液比增大降低了氯化胆碱-乙酸体系的黏度，增加了扩散性，从而提高了体系的提取率；当提取液中绿原酸已达到一定的饱和度时再增大料液比对提高提取率作用不大，反而导致提取出的绿原酸重新吸附到原待提物中，使其略有下降。最终，选择料液比1:30。

3.1.4 提取温度 由图1C可知，绿原酸提取率随温度增

加先升高后降低，为60℃时最高，主要是因为温度较低时氯化胆碱-乙酸与绿原酸结合作用力较弱，不利于后者溶出，从而提取率较低；温度升高能使体系的黏度下降，扩散系数提高使得扩散速率增加，同时提高绿原酸的溶出；但绿原酸本身不稳定，对强光和高温很敏感，若继续升高温度会导致其结构改变，使得提取率降低。最终，选择提取温度60℃。

3.1.5 提取时间 由图1D可知，绿原酸提取率随时间延长先快速升高，为60min时最高，随后趋于平缓，变化不大，主要是因为60min后提取液中绿原酸基本饱和，再延长对其提取帮助较小。最终，选择提取时间60min。

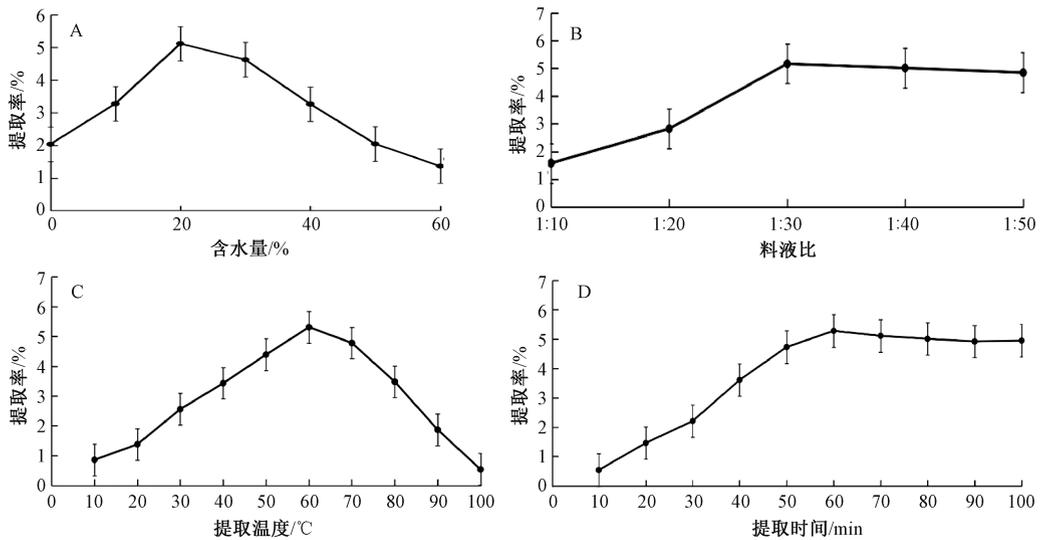


图1 单因素试验结果

3.2 正交试验 依据单因素试验结果，以绿原酸提取率为评价指标，料液比、提取温度、提取时间为影响因素，每个因素3个水平^[16]，具体见表2，结果见表3。

表2 正交试验因素水平

水平	因素		
	A 料液比	B 提取温度/℃	C 提取时间/min
1	1:20	50	50
2	1:30	60	60
3	1:40	70	70

由表3可知，料液比对绿原酸提取率的影响最主要，各因素影响次序为A>B>C，最优提取工艺为A₂B₃C₂，即料液比1:30，提取温度70℃，提取时间60min，提取率为5.43%，与单因素试验中在料液比1:30、提取温度60℃、

提取时间60min条件下提取率为5.32%基本接近。从实际考虑，最终确定最优工艺为提取溶剂氯化胆碱-乙酸(1:3)，含水量20%，料液比1:30，提取温度70℃，提取时间60min。

3.3 提取结果比较 以料液比1:30、提取温度70℃、提取时间60min为提取工艺，采用水、60%乙醇、氯化胆碱-乙酸(1:3，含水量20%)作为提取剂对鱼腥草中的绿原酸进行提取，重复3次，取平均值。由表4可知，相同条件下低共熔溶剂对鱼腥草中绿原酸的提取率明显高于传统溶剂，可实现高效提取的优点。

4 结论

文献[17]中提取鱼腥草最佳提取溶剂是60%的乙醇，而本实验发现氯化胆碱与不同氢键供体共混，氢键供体呈

表 3 正交试验结果

试验号	A	B	C	绿原酸提取率/%	
1	1	1	1	3.41	
2	1	2	2	4.05	
3	1	3	3	3.62	
4	2	1	2	4.12	
5	2	2	3	4.25	
6	2	3	1	5.03	
7	3	1	3	3.87	
8	3	2	1	4.56	
9	3	3	2	5.31	
绿原酸提取率/%	k_1	3.69	3.80	4.33	—
	k_2	4.67	4.29	4.49	—
	k_3	4.58	4.65	3.91	—
	R	0.98	0.85	0.58	—

表 4 2种溶剂提取结果比较

序号	提取剂	绿原酸提取率/%
1	水	1.67
2	60%乙醇	2.45
3	氯化胆碱-乙酸(1:3,含水量20%)	5.43

酸性且比例为1:3时绿原酸提取率最高,原因可能是绿原酸在酸性条件比较稳定,氯化胆碱分别与氢键供体乙酸、丁二酸、柠檬酸组成的低共熔溶剂体系使得提取液中氢键的网格体系发生变化,使其扩散系数、极性等性质也发生变化,更利于绿原酸溶出,但多元羧酸又阻碍了绿原酸的进一步提取。另外,低共熔溶剂体系中含水量对绿原酸的提取率也有较大的影响,无水时体系黏度高,流动性差,低共熔溶剂不利于渗透到提取液中,从而不利于绿原酸的提取;当低共熔溶剂体系中加入一定量的水时,可使体系黏度下降,低共熔溶剂能较好进入提取液的基质内部,破坏植物细胞壁,利于绿原酸的提取,但含水量过高,也不利于绿原酸的提取,最后筛选出氯化胆碱-乙酸(1:3,含水量20%)为最佳提取溶剂,具有制备简单、提取率高、可生物降解、不产生三废等优点^[8],为其在天然植物方面的提取及绿原酸提取新工艺提供了参考。

参考文献:

[1] 邹涛,陈宇迪,莫单丹,等. 差示扫描量热(DSC)图谱匹配识别法在鱼腥草产地快速鉴别中的应用[J]. 分析仪器, 2022, 33(1): 93-99.

[2] 黄明才,韦国兰,龙杰凤,等. 超声波辅助提取鱼腥草总黄酮的工艺研究[J]. 凯里学院学报, 2021, 39(3): 29-33.

[3] 廖健婷,郝晨静,李博. 鱼腥草抗病毒作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(5): 224-228.

[4] 郭洪麟,徐涛,张乔. 鱼腥草免疫作用及作用机制研究进展[J]. 黑龙江医药, 2022, 35(1): 50-52.

[5] 鄢胜君,操燕明. 正交试验法优选金银花中绿原酸的提取工艺[J]. 广东化工, 2015, 42(23): 106-107.

[6] 魏明,杨晓梅,刘佳红,等. 绿原酸的药理作用研究进展[J]. 陕西中医, 2016, 37(4): 511-512.

[7] 刘霞,廖梅香,罗江浩. 酶法辅助PEG-200超声波提取葵花籽仁中绿原酸的工艺优化[J]. 食品工业, 2021, 42(11): 76-80.

[8] 都宏霞,缪领珍,胡梓恒,等. 低共熔溶剂提取桂花黄酮的工艺优化[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 203-211.

[9] 王新茗,马天宇,徐丽华,等. 低共熔溶剂提取天然产物的研究进展[J]. 食品与药品, 2021, 23(2): 177-184.

[10] 熊颖,钟海雁,周波. 低共熔溶剂杏仁种皮提取物对油茶籽油氧化稳定性的影响[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(5): 102-107.

[11] 李杰,吴艳芳,王新胜,等. 低共熔溶剂提取枳实中黄酮类成分的工艺研究[J]. 应用化工, 2020, 49(12): 3078-3082.

[12] 周惠燕,陈珏,张利飞,等. 低共熔溶剂提取金银花中氯原酸的研究[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(9): 62-67.

[13] Crawford D E, Wright L A, James S L, et al. Efficient continuous synthesis of high purity deep eutectic solvents by twin screw extrusion [J]. Chem Commun (Camb), 2016, 52(22): 4215-4218.

[14] 罗娜,王雪,黄丽佳,等. 紫外分光光度法测定栀子中绿原酸含量[J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(6): 67-69.

[15] 曲明,程杨,曹春梅,等. 高效液相色谱法测定金银花中绿原酸的含量[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(22): 145-147.

[16] 庄楚强,何春雄. 应用数理统计基础[M]. 广州:华南理工大学出版社, 2002: 58-60.

[17] 吴燕芬,刘常坤,李晶. 超声波法提取鱼腥草中的绿原酸[J]. 化学与生物工程, 2004, 39(4): 19-20.