

# 正交试验法优选荆芥橙皮苷的提取工艺

杨 静<sup>1\*</sup>, 杨晓君<sup>2#</sup>(1.新疆农业大学食品科学与药学学院2014届药学102班, 乌鲁木齐 830052; 2.新疆农业大学食品科学与药学学院, 乌鲁木齐 830052)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0532-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.32

**摘要** 目的: 优选荆芥药材中橙皮苷的提取工艺。方法: 以橙皮苷含量为考察指标, 采用高效液相色谱法, 通过单因素试验考察不同超声提取时间、料液比、提取次数、乙醇体积分数对橙皮苷含量的影响; 通过正交试验 $L_9(3^4)$ 确定荆芥橙皮苷提取的最优提取工艺, 并进行验证试验。结果: 优选的提取工艺为50%乙醇溶液超声提取1次, 提取时间为30 min, 料液比为1:30(g:ml)。3次验证试验结果显示橙皮苷的含量分别为0.27%、0.28%、0.28%。结论: 该提取工艺稳定、可行, 适合荆芥橙皮苷的提取。

**关键词** 荆芥; 单因素试验; 正交试验; 橙皮苷; 高效液相色谱法; 提取工艺

## Optimization of Extraction Technology of Hesperidin from *Schizonepeta tenuifolia* by Orthogonal Test

YANG Jing<sup>1</sup>, YANG Xiao-jun<sup>2</sup>(1. The 2014 Session of the 102 Class of Pharmacy, College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China; 2. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of hesperidin from *Schizonepeta tenuifolia*. METHODS: With the index of hesperidin content, HPLC was used to study the effects of different ultrasonic extraction time, solid-liquid ratio, extraction times, and ethanol volume fraction on the content of hesperidin by single factor test.  $L_9(3^4)$  orthogonal test was employed to optimize the extraction technology of hesperidin from *S. tenuifolia* with following verification test. RESULTS: The optimum extraction conditions were ultrasonic extraction for 1 time with 50% ethanol, 30 min extraction time and 1:30 (g:ml) ratio of solid-liquid. The contents of hesperidin were 0.27%, 0.28% and 0.28% in the three verification tests. CONCLUSIONS: The extraction technology is stable, feasible and suitable for hesperidin extraction.

**KEYWORDS** *Schizonepeta tenuifolia*; Single factor test; Orthogonal test; Hesperidin; HPLC; Extraction technology

荆芥, 收载于2010年版《中国药典》(一部), 为唇形科植物荆芥(*Schizonepeta tenuifolia* Briq.)的干燥地上部分, 其性微温、味辛, 归肺、肝经, 具有解表散风、透疹、消疮的功效, 主要用于感冒、头痛、麻疹、风疹、疮疡初起等症<sup>[1]</sup>。荆芥炒炭后具有止血作用, 可用于吐血、衄血、便血、崩漏、产后血晕等症。荆芥又名假苏, 也载于《神农本草经》中。目前从荆芥中分离得到的主要化学成分有挥发油类<sup>[2]</sup>、黄酮类化合物、酚类、酸类, 穗状花序含有单萜类化合物。其中, 黄酮类成分为其主要的有效成分之一<sup>[3]</sup>。橙皮苷为二氢黄酮苷, 具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗癌、美白、预防心血管疾病、兴奋胃肠功能及平滑肌作用, 还具有抗羟自由基氧化、抑制中枢神经、降低胆固醇、防止骨质疏松等作用<sup>[4]</sup>。荆芥常用的质量控制方法有挥发油测定法、气相色谱法, 其中历版《中国药典》均以测定挥发油含量为质量控制标准。但若单以挥发油的量为其质量控制的唯一指标, 市售的药材中至少有50%以上不合格, 因此有必要对荆芥的质量控制指标进行补充。有文献报道, 采用高效液相色谱(HPLC)法测定荆芥中橙皮苷的含量<sup>[5]</sup>, 以此可作为荆芥质量控制指标的补充。为了合理开发和利用荆芥橙皮苷, 本文采用HPLC法测定橙皮苷含量, 并以该含量为提取工艺考察指标, 通过单因素试验考察不同提取时间、料液比、提取次数、乙醇体积分数对橙皮苷含量的影响, 并通过正交试验优选荆芥

橙皮苷提取的最优提取工艺, 为荆芥的进一步开发与应用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

U3000HPLC仪(美国Thermo Fisher Scientific公司); BP211D型电子天平(德国Sartorius公司, 分辨率 $d=0.01$  mg); AS20500BDT超声波清洗仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); FW-80微型高速万能试样粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司); TGL-16B离心机(上海安亭科学仪器厂); UPT-11-10T优普特实验室超纯水机(成都超纯水科技有限公司)。

### 1.2 药材

荆芥药材(样品1, 产自江苏, 批号: 20120916; 样品2, 产自河北, 批号: 20120813; 经新疆维吾尔自治区药物研究所贺金华副研究员鉴定为唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq.的干燥地上部分)。

### 1.3 药品与试剂

橙皮苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110721-201115, 纯度: 按100%计); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果<sup>[6]</sup>

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取样品粗粉(河北)10 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入70%乙醇400 ml, 超声处理30 min, 放冷, 摇匀, 离心(离心半径3.5 cm, 4 000 r/min)2 min,

\* 学士。研究方向: 药学。E-mail: 2468389750@qq.com

# 通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 新疆特色天然产物研究开发。电话: 0991-8763671。E-mail: sunruntao8@sina.com

取上清液,滤过,取续滤液,注入色谱仪测定,计算橙皮苷的含量。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品6.18 mg,置于25 ml棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成247.2 μg/ml的溶液,备用。

## 2.2 色谱条件与系统适用性、专属性试验

色谱柱:Agilent C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液(20:80, V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:283 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,取“2.1”项下供试品溶液和对照品溶液,分别进样,依法测定。结果表明,供试品中橙皮苷峰与相邻组峰能够达到基线分离,分离度大于1.5,且峰形良好。色谱图见图1。

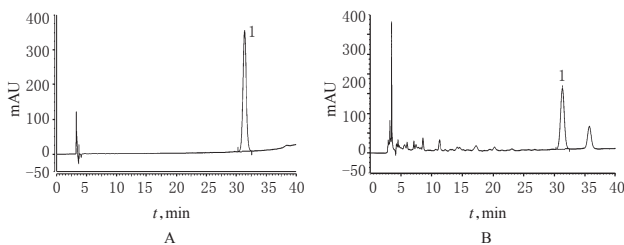


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;1.橙皮苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference; B. test sample; 1. hesperidin

## 2.3 线性关系考察

分别精密移取对照品溶液0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、10 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成系列质量浓度的溶液。精密吸取上述溶液各10 μl,注入色谱仪,记录峰面积。以对照品溶液质量浓度为横坐标(x),以对照品峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,得回归方程为 $y=183.36x-0.1605$  ( $r=0.9999, n=9$ ),表明橙皮苷检测质量浓度线性范围为6.18~247.2 μg/ml。

## 2.4 精密度、稳定性、重复性、加样回收率试验

按相关方法进行试验,得精密度、重复性试验的RSD分别为0.38%、0.31% ( $n=5$ ),稳定性试验中供试品在24 h内稳定( $RSD=1.21%, n=5$ ),低、中、高质量浓度样品平均回收率为101.65% ( $RSD=1.86%, n=6$ )。

## 2.5 样品的含量比较

取江苏、河北荆芥粗粉各10 g,精密称定,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇400 ml,超声处理30 min,提取1次,放冷,摇匀;离心,取上清液,滤过,取续滤液,注入色谱仪,测定,计算橙皮苷的含量,结果分别为0.0733%、0.1484%。由于河北荆芥中橙皮苷含量高于江苏荆芥中橙皮苷含量,因此选用河北荆芥作为提取工艺研究用药材。

## 2.6 单因素试验

橙皮苷为二氢黄酮苷,难溶于水,易溶于乙醇、甲醇等有机溶剂,根据其性质及文献<sup>[7-12]</sup>报道,选择乙醇作为提取溶剂并以乙醇体积分数为单因素进行考察。荆芥为唇形科植物荆芥的干燥地上部分,本品粗粉存在一定的空间间隙,根据植物的本身属性及文献<sup>[7-12]</sup>报道,选择料液比作为单因素进行考察。采用超声提取法,其优势在于提取时间短,通过文献<sup>[7-12]</sup>对比及考虑到后续将用于工业化生产中,故选择提取时间、提取次数作为单因素进行考察。根据供试品溶液制备方法,依法进行

单因素试验。

2.6.1 乙醇体积分数对橙皮苷含量的影响 取本品粗粉约10 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,分别精密加入30%、50%、70%、95%不同体积分数的乙醇400 ml,超声处理30 min,提取1次,放冷,摇匀;离心,取上清液,滤过,取续滤液,注入色谱仪,测定,计算橙皮苷的含量,结果见表1。

表1 各因素对橙皮苷含量的影响

Tab 1 Effects of indexes on the content of hesperidin

| 因素         | 水平   | 样品量,g    | 橙皮苷含量,% |
|------------|------|----------|---------|
| 乙醇体积分数,%   | 30   | 10.018 5 | 0.121 4 |
|            | 50   | 10.022 0 | 0.147 2 |
|            | 70   | 10.000 9 | 0.148 4 |
|            | 95   | 9.995 0  | 0.042 0 |
| 料液比,g:ml   | 1:10 | 9.994 7  | 0.118 1 |
|            | 1:20 | 9.985 2  | 0.135 4 |
|            | 1:30 | 10.000 5 | 0.153 4 |
|            | 1:40 | 10.000 9 | 0.148 4 |
|            | 1:50 | 10.022 9 | 0.141 9 |
| 超声提取时间,min | 15   | 10.005 7 | 0.109 1 |
|            | 30   | 9.997 1  | 0.124 7 |
|            | 45   | 9.998 5  | 0.131 9 |
|            | 60   | 9.993 8  | 0.155 4 |
|            | 75   | 9.997 0  | 0.137 3 |
| 提取次数       | 1    | 9.995 8  | 0.116 4 |
|            | 2    | 9.995 8  | 0.117 8 |
|            | 3    | 9.995 8  | 0.118 7 |

由表1可知,乙醇体积分数为70%时,供试品中橙皮苷含量最高,但30%~70%时橙皮苷含量均较高。

2.6.2 料液比对橙皮苷含量的影响 取本品粗粉约10 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,分别在不同料液比[料液比=称样量(g):加入液体的体积(ml),1:10、1:20、1:30、1:40、1:50]中精密加入70%乙醇,超声处理30 min,提取1次,其余操作同“2.6.1”项,计算橙皮苷的含量,结果见表1。

由表1可知,料液比为1:30时,供试品中橙皮苷含量最高,但料液比为1:30~1:50时橙皮苷含量均较高。

2.6.3 超声提取时间对橙皮苷含量的影响 取本品粗粉约10 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,按1:30的料液比,精密加入70%乙醇,超声处理不同时间(15、30、45、60、75 min),提取1次,其余操作同“2.6.1”项,计算橙皮苷的含量,结果见表1。

由表1可知,超声处理时间为60 min时,供试品中橙皮苷含量最高,但超声提取30~75 min时橙皮苷含量均较高。

2.6.4 提取次数对橙皮苷含量的影响 取本品粗粉约10 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,按1:30的料液比,精密加入70%乙醇,超声处理60 min,分别提取1、2、3次,放冷,其余操作同“2.6.1”项,计算橙皮苷的含量,结果见表1。

由表1可知,随着提取次数的增加,供试品中橙皮苷含量增加并不明显。考虑提取时间较长会增加试验成本及中试时提取的难易程度,最终确定提取次数为1次。

经过单因素考察,初步确定提取溶剂乙醇体积分数为30%~70%时,对橙皮苷含量影响较大;提取料液比为1:30~1:50时,对橙皮苷含量影响较大;超声提取时间为30~60 min时(75 min时间太长,不宜选用),对橙皮苷含量影响较大。以此结果作为正交试验因素水平的安排依据。

## 2.7 正交试验法优选荆芥橙皮苷的最佳提取工艺

采用正交试验法,以乙醇体积分数(因素A)、超声提取时

间(因素B)、料液比(因素C)为考察因素,各取3个水平,固定提取次数为1次,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。以橙皮苷含量为指标筛选最优提取工艺,因素与水平见表2,正交试验结果见表3。

表2 因素与水平

Tab 2 Factor and level

| 水平 | 因素          |               |             |
|----|-------------|---------------|-------------|
|    | A(乙醇体积分数,%) | B(超声提取时间,min) | C(料液比,g:ml) |
| 1  | 30          | 30            | 1:30        |
| 2  | 50          | 45            | 1:40        |
| 3  | 70          | 60            | 1:50        |

表3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal test

| 编号    | 因素    |       |       |        | 橙皮苷含量, % |
|-------|-------|-------|-------|--------|----------|
|       | A     | B     | C     | D(空白列) |          |
| 1     | 1     | 1     | 1     | 1      | 0.223 9  |
| 2     | 1     | 2     | 2     | 2      | 0.227 0  |
| 3     | 1     | 3     | 3     | 3      | 0.234 3  |
| 4     | 2     | 1     | 2     | 3      | 0.256 2  |
| 5     | 2     | 2     | 3     | 1      | 0.268 7  |
| 6     | 2     | 3     | 1     | 2      | 0.298 1  |
| 7     | 3     | 1     | 3     | 2      | 0.254 8  |
| 8     | 3     | 2     | 1     | 3      | 0.280 5  |
| 9     | 3     | 3     | 2     | 1      | 0.273 5  |
| $K_1$ | 0.685 | 0.735 | 0.802 | 0.766  |          |
| $K_2$ | 0.823 | 0.776 | 0.757 | 0.780  |          |
| $K_3$ | 0.809 | 0.806 | 0.758 | 0.771  |          |
| R     | 0.138 | 0.071 | 0.046 | 0.014  |          |

由表3极差分析可知,3种因素对提取结果影响大小依次为:A>B>C,其中乙醇体积分数对橙皮苷影响最大,其次是提取时间。对试验结果进行方差分析和F检验,结果见表4。

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

| 变异来源 | 离均差平方和  | 自由度 | 均方       | F      | P     |
|------|---------|-----|----------|--------|-------|
| A    | 0.011 5 | 2   | 0.005 74 | 117.63 | 0.008 |
| B    | 0.002 5 | 2   | 0.001 27 | 26.03  | 0.037 |
| C    | 0.001 4 | 2   | 0.000 68 | 13.96  | 0.067 |
| D    | 0.000 1 | 2   | 0.000 05 |        |       |
| 总变异  | 0.015 5 | 8   |          |        |       |

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$ 。19<F,P<0.05,具有显著性差异;99<F,P<0.01,具有非常显著性差异

Note:  $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$ 。19<F,P<0.05, with significant difference;99<F,P<0.01, with very significant difference

由表4可以看出,因素A对橙皮苷含量有显著性差异;B因素水平中,虽然 $K_3$ 结果最大,但B因素影响不显著,为节约成本,并从环境保护、工业化生产方便考虑,选择30 min为提取时间。因素B、C的水平改变对试验结果影响不大,从经济角度考虑,选择 $B_1, C_1$ 。因素主次顺序为A>B>C,优化的水平组合为 $A_2B_1C_1$ ,即50%乙醇溶液超声提取1次,超声提取30 min,料液比1:30(g:ml)。

## 2.8 验证性试验

取本品粗粉(河北产品)约10 g,精密称定,置于具塞锥形

瓶中,依据正交试验结果的最佳工艺条件,依法提取荆芥中的总黄酮。平行试验3次,测定并计算橙皮苷的含量,结果分别为0.27%、0.28%、0.28%,平均值为0.28%。由此可知,在最佳试验工艺条件下,橙皮苷含量相近,表明该工艺稳定。

## 3 讨论

2010年版《中国药典》(一部)中,未规定荆芥的产地,而不同产地的药材在有效成分含量、药理、药效作用等方面差异较大,因此,其中橙皮苷的含量也存在一定的差异。本试验结果显示,河北荆芥橙皮苷含量高于江苏荆芥,提示在临床应用和产地加工时,荆芥的选择标准还需与其药理、药效作用研究结果相结合来确定。

本次试验通过单因素试验与正交试验法的有效结合,对超声法提取荆芥中橙皮苷的提取工艺条件进行筛选。与文献报道的碱提酸沉法、醇溶剂提取法、酶辅助提取法、微波提取法等<sup>[13]</sup>比较,本文优选的提取工艺具有溶剂用量少、提取时间短、效率高、节能、稳定、重复性好、易操作等优点,可用于荆芥药材中橙皮苷的后续研究。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:160.
- [2] 谢练武,戴世鲲,王广华,等.裂叶荆芥不同部位精油组成研究[J].天然产物研究与开发,2009,21(6):976.
- [3] 刘红彬,李慧玲,顾小龙,等.不同生长期裂叶荆芥叶中总黄酮的微波提取及含量测定[J].时珍国医国药,2007,18(6):1 439.
- [4] 李玉山.橙皮苷研究新进展[J].科技导报,2009,27(22):108.
- [5] 欧阳荣,张志国,王芳. HPLC测定荆芥中橙皮苷的含量[J].中国中药杂志,2006,31(6):524.
- [6] 康雨彤,贺金华,毛艳,等.正交试验优选芩榆烧伤凝胶中黄芩、关黄柏、地榆的提取工艺[J].中国药房,2013,24(27):2 532.
- [7] 郭孝武,吉晓芹.杜仲叶中总黄酮物质超声提取的研究[J].西北植物学报,2003,23(11):1 984.
- [8] 陈帅,郁建平.藤茶总黄酮超声提取工艺研究[J].山地农业生物学报,2010,29(5):440.
- [9] 李春梅,郁建平.草珊瑚总黄酮的超声提取工艺研究[J].化学与生物工程,2009,26(7):48.
- [10] 陈洪涛,蔡丹昭,林立波.榕树叶总黄酮超声提取工艺条件的研究[J].时珍国医国药,2008,19(8):1 955.
- [11] 伍钢,彭密军,彭爱华,等.超声波与微波提取桔皮中橙皮苷的对比研究[J].生物质化学工程,2009,43(5):26.
- [12] 卢静华,王亚娟,于玲.陈皮中橙皮苷超声提取工艺研究[J].时珍国医国药,2006,17(4):604.
- [13] 刘明,常庆,杨鹏,等.橙皮苷提取工艺的研究进展[J].杭州化工,2011,41(4):11.

(收稿日期:2014-03-23 修回日期:2014-11-09)

(编辑:刘 萍)