

星点设计-效应面法优化荆芥穗黄酮类成分的提取工艺

谷民举*, 鞠建峰, 朱宗敏

(山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] 目的: 优选荆芥穗黄酮类成分的提取工艺, 为该药材的资源开发提供参考。方法: 选择乙醇体积分数、提取时间及乙醇用量为自变量, 橙皮苷、木犀草素、芹菜素提取量的总评“归一值”为因变量, 通过星点试验优选提取工艺, 运用 Design-Expert 8.0 软件对自变量各水平进行多元线性回归和二项式拟合, 利用效应面法优选提取工艺并进行预测分析。采用 HPLC 测定橙皮苷、木犀草素、芹菜素含量, 流动相乙腈(A)-0.4% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~20 min, 5%~20% A; 20~50 min, 20%~30%; 50~60 min, 30%~5% A), 检测波长 283 nm。结果: 最佳提取工艺为加 15 倍量 73% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h; 橙皮苷、木犀草素、芹菜素提取量分别为 3.991, 1.307, 0.589 mg·g⁻¹, 总评“归一值”0.925 3, 与预测值的偏差 -2.14%。结论: 优选的提取工艺简单易行、准确度高, 适用于荆芥穗总黄酮的工业化生产。

[关键词] 荆芥穗; 总黄酮; 橙皮苷; 木犀草素; 芹菜素

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0029-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080029

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150225.1607.005.html>

[网络出版时间] 2015-02-25 16:07

Optimization of Extraction Process for Flavonoids from Schizonepetae Spica by Central Composite Design-response Surface Methodology GU Min-ju*, JU Jian-feng, ZHU Zong-min (Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of flavonoids from Schizonepetae Spica and provide a reference for development of this medicinal herb. **Method:** Ethanol concentration, the amount of ethanol and extraction time were selected as independent variables, overall desirability of extracting amounts of hesperidin, luteolin and apigenin as dependeng variable, data of overall desirabilities were fitted to a second-order polynomial equation and regressed by multiple linear, response surface methodology was used to optimize extraction technology and predictive analyze. HPLC was adopted to determine contents of hesperidin, luteolin and apigenin with mobile phase of acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution for gradient elution and detection wavelength of 283 nm. **Result:** Optimal extraction technology was as following: extracted 2 times with 15-fold the amount of 73% ethanol for 2 h per time; extracting amounts of hesperidin, luteolin and apigenin were 3.991, 1.307, 0.589 mg·g⁻¹, respectively. Overall desirability was 0.925 3, whose deviation was -2.14% by comparing with the predictive value. **Conclusion:** This optimized extraction technology is convenient, accurate and suitable for industrial production of total flavonoids from Schizonepetae Spica.

[Key words] Schizonepetae Spica; total flavonoids; hesperidin; luteolin; apigenin

荆芥穗功效解表散风、透疹, 用于治疗感冒、头痛、麻疹、疮疡初起等证^[1]。目前已从该药材中分离出了挥发油、单萜苷、黄酮、有机酸、三萜、甾体等化学成分^[2-7]; 其黄酮类成分木犀草素、橙皮苷具有

抗炎抑菌抗病毒活性, 芹菜素具有解痉、抗胃溃疡作用。现代药理研究表明荆芥穗具有抗炎、消炎、抑制肿瘤细胞增殖、抗过敏和抗补体作用^[8-10]。荆芥穗是银翘散的重要组成药物, 黄酮类成分是该方主要

[收稿日期] 20140725(008)

[基金项目] 山东省中医药科技计划项目(2013-082)

[通讯作者] * 谷民举, 硕士, 主管中药师, 从事中药制剂工艺及质量标准研究, Tel: 0531-68617982, E-mail: 1056288707@qq.com

的抗流感病毒有效部位^[11-12]。

目前针对荆芥穗挥发油的研究报道较多^[13-17],关于黄酮类等其他成分的研究并不全面^[18-19]。近年以多指标成分表征中药品质已成为药材质量控制的主要手段^[20],中药提取工艺的优化亦应以多成分评价为导向。正交试验或均匀设计法优化中药提取工艺时,虽具有简便、试验次数较少等优点,但精度较低。本实验以橙皮苷、木犀草素、芹菜素提取量为综合评价指标,在单因素试验基础上,采用星点设计-效应面法优化荆芥穗黄酮类成分提取工艺,为荆芥穗质量的全面控制提供参考。

1 材料

1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),AB135-S型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。橙皮苷、木犀草素、芹菜素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110721-200613,111520-200504,111901-201102),甲醇、乙腈和磷酸为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。荆芥穗购自山东中医药大学附属医院,经山东中医药大学药系李峰教授鉴定为唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuisfolia* 的干燥花穗。

2 方法与结果

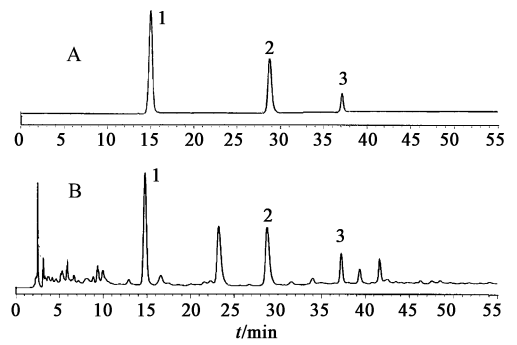
2.1 橙皮苷、木犀草素、芹菜素的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取橙皮苷、木犀草素、芹菜素对照品 21.16, 11.26, 8.86 mg, 分别加甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 得对照品贮备液。分别精密吸取各贮备液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成 211.6, 112.6, 88.6 mg·L⁻¹ 混合对照品溶液, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备^[18-19] 精密称取荆芥穗粗粉(过 40 目筛)约 1 g, 加 70% 乙醇 20 mL 回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 置于 100 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇定容至刻度, 即得。

2.1.3 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.4% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~20 min, 5%~20% A; 20~50 min, 20%~30%; 50~60 min, 30%~5% A), 检测波长 283 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。见图 1。

2.1.4 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液适量, 加甲醇稀释成系列对照品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得橙皮苷、木犀草素及芹菜素回归方程分别为 $Y = 14.90X - 3.78$ ($r = 0.9998$), $Y = 4220.52X +$



A. 对照品; B. 供试品; 1. 橙皮苷; 2. 木犀草素; 3. 芹菜素
图1 荆芥穗 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Schizonepetae Spica*

27.86 ($r = 0.9998$), $Y = 13.84X - 5.56$ ($r = 0.9996$), 线性范围依次为 2.115 ~ 211.5, 1.124 ~ 112.4, 0.884 ~ 88.4 mg·L⁻¹。

2.1.5 精密度试验 精密量取混合对照品溶液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 按 2.1.3 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果, 橙皮苷、木犀草素、芹菜素峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 1.0%, 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密称定荆芥穗粗粉 1.0 g, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 结果橙皮苷、木犀草素、芹菜素峰面积的 RSD 分别为 2.8%, 1.7%, 1.3%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一样品, 按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 计算橙皮苷、木犀草素、芹菜素质量分数分别为 3.98, 1.32, 0.56 mg·g⁻¹, RSD 依次为 2.4%, 1.3%, 1.8%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 分别精密称取同一批荆芥穗粗粉 0.5 g, 共 6 份, 各精密加入 2.1.1 项下混合对照品溶液 5 mL, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 计算橙皮苷、木犀草素、芹菜素平均加样回收率分别为 97.83%, 96.08%, 97.06%, RSD 依次为 1.5%, 2.4%, 1.9%。

2.2 单因素试验考察 荆芥穗黄酮类成分易溶于乙醇, 故采用乙醇回流法, 因提取次数为非连续变量, 回归处理较困难, 从节约成本和工业生产的实际考虑, 提取数定为 2 次。

2.2.1 乙醇体积分数 准确称取荆芥穗粗粉 5 份, 每份 50 g, 加 10 倍量体积分数分别为 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 乙醇提取 2 次, 每次 120 min, 结果橙皮苷提取量分别为 3.213, 3.424, 3.988, 3.825,

3.673 mg·g⁻¹; 木犀草素提取量 1.189, 1.353, 1.332, 1.236, 1.201 mg·g⁻¹; 芹菜素提取量 0.478, 0.521, 0.598, 0.532, 0.482 mg·g⁻¹。

2.2.2 提取时间 准确称取荆芥穗粗粉 5 份, 每份 50 g, 加 10 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 提取时间分别为 30, 60, 120, 180, 240 min。结果橙皮苷提取量分别为 2.875, 3.213, 3.981, 3.985, 3.988 mg·g⁻¹; 木犀草素提取量 0.900, 1.204, 1.345, 1.349, 1.355 mg·g⁻¹; 芹菜素提取量 0.412, 0.528, 0.588, 0.596, 0.590 mg·g⁻¹。

2.2.3 乙醇用量 准确称取荆芥穗粗粉 5 份, 每份 50 g, 分别加 5, 10, 15, 20, 25 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h。结果橙皮苷提取量分别为 2.755, 3.312, 3.979, 3.981, 3.984 mg·g⁻¹, 木犀草素提取量 0.945, 1.312, 1.345, 1.351, 1.354 mg·g⁻¹; 芹菜素提取量 0.400, 0.525, 0.586, 0.594, 0.589 mg·g⁻¹。

2.3 提取工艺优选

2.3.1 星点试验设计 在预试验基础上, 选取乙醇体积分数、提取时间和乙醇用量为自变量, 以橙皮苷、木犀草素、芹菜素提取量的总评“归一值”

(overall desirability, OD) 为评价指标, 根据 Hassan 法^[21-22]对各个指标进行归一化处理。各指标计算公式为 $d_i = (Y_i - Y_{min}) / (Y_{max} - Y_{min})$, 式中 Y_i 为实测值, Y_{min} 和 Y_{max} 指每一指标在不同次试验中测得的最小值和最大值。OD = $(d_1 \times d_2 \cdots \times d_n)^{1/n}$, n 为指标数。根据中心组合试验设计原理对各因素均设计 5 个水平, 分别用代码值 -1.682, -1, 0, 1, 1.682 表示, 见表 1。准确称取荆芥穗粗粉 20 份, 每份 50 g, 根据试验设计方案回流提取, 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 试验安排及结果见表 2。

表 1 荆芥穗总黄酮提取工艺星点试验因素与水平编码

Table 1 Factors-levels coding of central composite test for extraction process of total flavonoids from Schizonepetae Spica

水平	X ₁ 乙醇体积分数/%	X ₂ 提取时间/h	X ₃ 乙醇用量/倍
-1.682	50	1	5
-1	58.11	1.41	9.05
0	70	2	15
1	81.89	2.59	20.95
1.682	90	3	25

表 2 荆芥穗总黄酮提取工艺星点试验分析

Table 2 Central composite test analysis of extraction process for total flavonoids from Schizonepetae Spica

No.	X ₁	X ₂	X ₃	橙皮苷 /mg·g ⁻¹	木犀草素 /mg·g ⁻¹	芹菜素 /mg·g ⁻¹	OD
1	-1	-1	-1	3.278	1.317	0.518	0.128
2	1	-1	-1	3.573	1.299	0.533	0.396
3	-1	1	-1	3.316	1.332	0.532	0.282
4	1	1	-1	3.647	1.306	0.538	0.483
5	-1	-1	1	3.283	1.323	0.520	0.157
6	1	-1	1	3.612	1.311	0.534	0.433
7	-1	1	1	3.587	1.353	0.524	0.366
8	1	1	1	3.721	1.320	0.534	0.489
9	-1.682	0	0	3.213	1.198	0.528	0.000
10	1.682	0	0	3.873	1.287	0.596	0.785
11	0	-1.682	0	3.678	1.195	0.571	0.000
12	0	1.682	0	3.988	1.342	0.584	0.919
13	0	0	-1.682	3.356	1.205	0.516	0.000
14	0	0	1.682	3.977	1.334	0.584	0.898
15	0	0	0	3.971	1.337	0.585	0.905
16	0	0	0	3.974	1.341	0.582	0.899
17	0	0	0	3.969	1.343	0.583	0.907
18	0	0	0	3.961	1.339	0.586	0.912
19	0	0	0	3.982	1.337	0.583	0.899
20	0	0	0	3.981	1.334	0.585	0.901

2.3.2 模型拟合及方差分析 将表 2 中数据用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面分析,以 OD 为响应值分别对各自变量进行多元线性回归和二项式拟合,得拟合方程 $Y = 0.91 + 0.16X_1 + 0.15X_2 + 0.12X_3 - 0.027X_1X_2 - 8.75 \times 10^{-3} X_1X_3 + 3.00 \times 10^{-3} X_2X_3 - 0.19X_1^2 - 0.17X_2^2 - 0.17X_3^2$, 方差分析见表 3。

表 3 响应面拟合回归方程的方差分析

Table 3 Variance analysis of fitting regression equation of response surface

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	2.04	9	0.23	5.46	0.007 0
X_1	0.35	1	0.35	8.46	0.015 6
X_2	0.31	1	0.31	7.43	0.021 3
X_3	0.20	1	0.20	4.90	0.051 2
X_1X_2	6.05×10^{-3}	1	6.05×10^{-3}	0.15	0.710 5
X_1X_3	6.13×10^{-4}	1	6.13×10^{-4}	0.02	0.905 7
X_2X_3	7.20×10^{-5}	1	7.20×10^{-5}	1.74×10^{-3}	0.967 6
X_1^2	0.54	1	0.54	13.10	0.004 7
X_2^2	0.42	1	0.42	10.10	0.009 8
X_3^2	0.44	1	0.44	10.55	0.008 8
残差	0.41	10	0.04		
失拟性	0.41	5	0.08	6.51	0.054 7
纯误差	1.33×10^{-4}	5	2.66×10^{-5}		
总差	2.45	19			

方差分析表明二次多项回归模型具有极显著性,在所选试验条件下,各自变量的交互项均无显著性差异。二项式回归方程失拟检验不显著,说明未知因素对试验结果干扰很小,该模型拟合程度很好,试验误差小。根据回归方程作出不同因子的响应面分析图,见图 2。

2.3.3 最佳工艺条件的预测与检验 通过回归模型的预测,初步得到最佳提取工艺为乙醇体积分数 72.80%,乙醇用量 14.47 倍,提取时间 2.14 h,此时预测橙皮苷、木犀草素、芹菜素提取量分别为 4.007,1.312,0.587 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, OD 0.945 5。结合实际生产情况,确定最佳工艺参数为加 15 倍量 73% 乙醇提取 2 次,每次 2 h。称取荆芥穗粗粉 50 g,共 3 份,按优选的工艺条件进行验证试验,结果橙皮苷提取量分别为 3.987,3.992,3.994 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,木犀草素提取量 1.307,1.314,1.299 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,芹菜素提取量 0.588,0.587,0.591 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,实测 OD 0.925 3,与预测值的偏差 -2.14%,说明该二项式拟合效果良

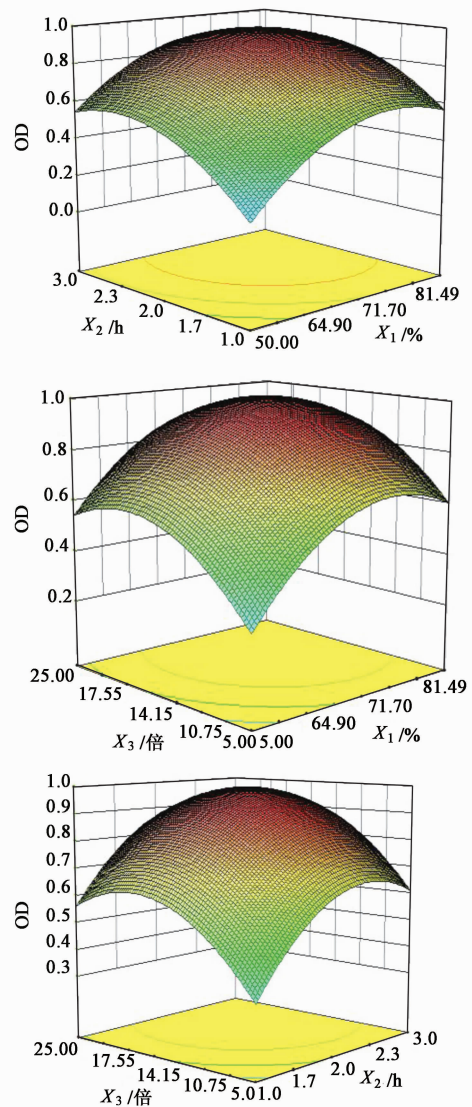


图 2 乙醇用量、乙醇体积分数及提取时间相互作用对荆芥穗总黄酮提取工艺影响的响应面

Fig.2 Response surfaces of effects of interaction among extraction time, ethanol amount and concentration on extraction process of total flavonoids from Schizonepetae Spica

好,建立的数学模型具有良好的预测性,优选的工艺条件重复性较好。

3 讨论

本文采用 HPLC-DAD 检测器,利用 DAD 检测器全波长扫描(200 ~ 400 nm),结果表明在 283 nm 处 3 个待测成分均有较大紫外吸收,响应高且分离效果良好。综合考虑各色谱峰的响应和干扰因素,选择 283 nm 作为检测波长。流动相分别考察了甲醇、乙腈、水和不同体积分数磷酸进行洗脱,结果发现乙腈和 0.4% 磷酸洗脱时,各色谱峰分离度及峰形均较好。通过考察流速和柱温对峰形的影响,最终确定流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

荆芥(穗)历版《中国药典》均以挥发油含量为质量控制指标。若单以挥发油含量为质量控制指标,市售药材中有较多是不合格的,因此有必要对荆芥(穗)的质量控制指标进行补充。本文采用星点设计-响应面法优化荆芥穗中橙皮苷、木犀草素、芹菜素提取工艺,利用 HPLC 测定这3种成分的含量,为荆芥(穗)的质量控制提供实验依据。

[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,2010:217-218.

[2] 张丽,曹丽诞,孔铭,等. 荆芥穗挥发油的质量标准研究[J]. 中草药,2006,37(2):216-217.

[3] 胡峻,石任兵,张援虎,等. 荆芥穗化学成分研究[J]. 北京中医药大学学报,2006,29(1):38-40.

[4] 伍彬. 荆芥穗化学成分研究[J]. 药物研究,2009,18(1):8-9.

[5] 张援虎,周岚,石任兵,等. 荆芥穗化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2006,15(3):1247-1249.

[6] 杨智蕴,闫吉昌,张殊佳,等. 荆芥穗挥发油化学成分的研究[J]. 中草药,1996,27(7):396-397.

[7] 杨帆,张仁延,陈江,等. 中药荆芥的单萜类化合物[J]. 中草药,2002,33(1):8-11.

[8] 吴婷,丁安伟,张丽. 荆芥现代研究概况[J]. 江苏中医药,2004,25(10):64-67.

[9] 张改先. 荆芥穗的化学成分、药理作用及临床应用[J]. 山西职工医学院学报,2011,21(1):57-58.

[10] 权美平. 荆芥挥发油药理作用的研究进展[J]. 现代食品科技,2013,29(6):1459-1462.

[11] 石钺,石任兵,刘斌,等. 银翘散抗流感病毒有效部位

群中黄酮类成分研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(5):320-323.

[12] 石钺,石任兵,刘斌,等. 银翘散抗流感病毒有效部位群中总黄酮的含量测定[J]. 北京中医药大学学报,2001,34(2):44-45.

[13] 耿榕徽,杨宇杰,张东阁,等. 荆芥穗药材中胡薄荷酮的提取方法研究[J]. 北方药学,2014,11,(3):44-45.

[14] 黄慧莲,林涛,叶耀辉,等. 优化荆芥穗挥发油提取分离及质控方法[J]. 江西中医学院学报,2011,23(4):31-33.

[15] 李学森,黄静,施红林,等. 荆芥挥发性成分的提取方法研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(2):792-794.

[16] 戴静波,张雅娟,周俊慧. 荆芥挥发油的气相色谱指纹图谱[J]. 中国药师,2014,17(4):560-562.

[17] 张丽,邵霞,于生,等. 荆芥穗挥发油的顶空气相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药,2012,43(9):1767-1769.

[18] 刘巨涛,李延禄,张占金. 东北裂叶荆芥中的4种黄酮成分[J]. 空军医高专学报,1998,20(4):190-193.

[19] 黄志宏,蒋东旭,赖小平. 大孔吸附树脂法富集纯化荆芥穗总黄酮的工艺研究[J]. 中药材,2010,33(9):1476-1480.

[20] 刘荣霞,叶敏,果德安,等. 中药质量控制研究的思路与方法[J]. 中国天然药物,2006,4(5):332-337.

[21] 吴伟,崔光华,陆彬. 实验设计中多指标的优化:星点设计和总评“归一值”的应用. [J]. 中国药学杂志,2000,35(8):530-533.

[22] Abu-Izza K A, Garcia-Contreras L, Lu D R. Preparation and evaluation of sustained release AZT-loaded microspheres; Optimization of the release characteristics using response surface methodology [J]. J Pharm Sci, 1996,85(2):144-149.

[责任编辑 刘德文]