

· 研究报告 ·

正交试验法优化车前子中槲皮素提取工艺

董岩, 梁鑫, 李莉, 徐涛, 许凤, 董巍 (齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] **目的** 研究从车前子中提取槲皮素的最佳条件。**方法** 以车前子作为提取槲皮素的原料,用高效液相色谱法(HPLC)进行提取条件的单因素试验,研究的因素包括超声功率、提取时间、甲醇比例、料液比例,以此为依据进行L₉(3⁴)正交试验,寻求最佳提取条件。**结果** 研究表明各因素对槲皮素提取效果的影响大小依次为料液比>超声功率>甲醇比例>提取时间,从车前子提取槲皮素的最佳条件是选择40%甲醇水溶液为提取剂,以1:40(g/ml)的料液比,在200W的超声功率下超声40min进行提取。**结论** 在优化后的提取条件下,槲皮素提取率达到0.79%,能简便、稳定且高效地从车前子中提取槲皮素。

[关键词] 车前子; 槲皮素; 正交试验; 高效液相色谱法

[中图分类号] R932 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)04-0351-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.014

Optimization of extraction process of quercetin from *Semen Plantaginis* by orthogonal test

DONG Yan, LIANG Xin, LI Li, XU Tao, XU Feng, DONG Wei (Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

[Abstract] **Objective** To search for the most effective condition of extracting quercetin from *Semen Plantaginis*. **Methods** Single factor experiments of extracting quercetin from Litchi *Semen Plantaginis* were carried out by HPLC. Ultrasonic power, extracting time, methanol percentage and solid/liquid ratio were selected as critical factors. Orthogonal array design L₉(3⁴) was carried out to search for the most efficient condition to extract quercetin. **Results** The influential factors for quercetin extraction were as follows, solid/liquid ratio>ultrasonic power>methanol percentage>extracting time. The most optimal condition was to use 40% methanol to extract for 40 min with 200 W ultrasonic power and a solid/liquid ratio of 1:40 (g/ml). **Conclusion** Under this optimal condition, the extraction yield of quercetin reached 0.79%. This condition offered a simple, stable and effective process to extract Quercetin from *Semen Plantaginis*.

[Key words] *Semen Plantaginis*, quercetin, orthogonal test, HPLC

车前子(*Semen Plantaginis*)为车前科植物车前(*Plantago asiatica* L.)或平车前(*P. depressa* Willd)的干燥成熟种子,具有清热利尿、渗湿通淋、明目、祛痰的功效^[1,2]。车前子中含有槲皮素、芹菜素、野苈黄素及其苷等多种黄酮类化合物^[3,4]。其中槲皮素是车前子的主要有效成分之一,它是一种天然的多羟基黄酮类化合物。现已证实,槲皮素具有抗炎、抗氧化、抗过敏、抗菌、抗病毒、抗癌等作用,此外,槲皮素对恶性肿瘤生长和转移也有很好的抑

制作用。因此,建立一种简便、高效的车前子中槲皮素的提取方法,对于车前子的研究和开发具有非常重要的意义。超声波提取法是在超声波作用下,提取药物有效成分的方法,在提取过程中无化学反应,被提取的物质保持原有生物活性,因超声波的机械作用、热力学作用、空化作用,与传统的煎煮法、浸渍法、渗漉法等常规提取方法相比,具有提取时间短、产率高等特点。由于在超声提取过程中溶剂、提取时间、提取温度等工艺条件会对提取效率造成影响,因此,为确定合理的超声提取工艺,本研究以槲皮素提取率为指标,通过单因素试验和正交试验法优化提取工艺,以期建立一种简便、高效的槲皮素的提取方法^[5-7]。

[基金项目] 黑龙江省教育厅基本科研业务费项目(2016-KYYWF-0860)

[作者简介] 董岩,硕士研究生,助教,研究方向:中药制剂的研究, Tel:13763590086, Email:dongyan00@hotmail.com

[通讯作者] 梁鑫,硕士研究生,讲师,研究方向:中药成分的分析, Tel:13766573218, Email:836009379@qq.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

依利特 LC-1000 型高效液相色谱仪(山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司);电子分析天平(十万分之一,上海越平科学仪器有限公司);DHG-101-4A 型电热恒温鼓风干燥箱(巩义市予华仪器有限责任公司);JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所)。

1.2 试药

车前子(齐齐哈尔市同仁堂药房,干燥粉碎);槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:10081-201610);甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂);磷酸(分析纯,北京红星化工厂);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 槲皮素含量分析方法的建立^[8-9]

2.1.1 色谱条件

色谱柱:SinoChrom ODS-BP 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1% 磷酸(53:47);检测波长:360 nm;柱温:20 °C;流速:1.0 ml/min。

2.1.2 标准曲线的绘制

精密称取对照品槲皮素 8 mg,置 50 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,即得对照品储备溶液。分别取槲皮素对照品储备溶液 2、4、6、8、10 ml,置于 10ml 容量瓶中,用甲醇溶液定容,摇匀,即得对照品系列溶液。进样量 20 μl,按照 HPLC 法绘制槲皮素标准曲线,在 360 nm 检测波长下测定槲皮素峰面积,以质量浓度 $C(\text{mg/ml})$ 对峰面积(A)进行线性回归,得回归方程,

$$A = 1495.3C + 9.65, r = 0.9999$$

结果表明质量浓度在 0.032~0.16 mg/ml 之间有良好的线性关系。

2.1.3 精密度试验

分别取对照品系列溶液的中浓度溶液 20 μl,重复进样 6 次,分别测定峰面积。RSD 为 1.35%,表明仪器精密度良好。

2.1.4 稳定性试验

将供试品用体积分数为 40% 的甲醇水溶液为提取剂,以 1:40 的料液比,在 200 W 的超声功率下超声 40 min 进行提取,减压浓缩至 10 ml。将其用甲醇定容至 50 ml,于室温下储存,于 0、2、4、6、8、16、24 h 后分别取溶液 20 μl 进样测定。各个测定值的 RSD 为 3.12%,表明供试品提取液在 24 h 内基本稳定。

2.1.5 重复性试验

分别称取同一批样品 5 份,依法进行测定含量。

结果槲皮素含量的 RSD 为 1.4% ($n=5$),表明方法重复性好。

2.1.6 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品 6 份,分别加入槲皮素对照品,依法测定并计算回收率(表 1)。由表 1 可知,本方法的回收率符合要求。

表 1 加样回收率试验结果

样品含量 ($C_s/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	加入量 ($C_b/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	测得量 ($C_m/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.702 0	0.701 0	1.394	98.7	98.6	0.34
0.706 0	0.701 0	1.395	98.3		
0.701 0	0.701 0	1.396	99.1		
0.712 0	0.701 0	1.401	98.3		
0.713 0	0.701 0	1.405	98.7		
0.715 0	0.701 0	1.403	98.2		

2.2 车前子中槲皮素提取工艺的优化

2.2.1 提取方法

精确称取车前子粉末 1.0 g 于锥形瓶中,用适量的各种体积分数甲醇水溶液浸泡过夜后在不同超声功率下超声一定时间进行提取,将提取液过滤,滤液减压浓缩成约 10 ml。

2.2.2 车前子中槲皮素提取率的测定

取“2.2.1”项得到的浓缩液,用甲醇定容至 50 ml,按“2.1.1”项下的色谱条件,以 HPLC 法测定峰面积值(A),代入“2.1.2”项得到的标准曲线求出浓度,计算提取液中槲皮素的质量。按照下列公式计算槲皮素的提取率:

$$\text{提取率} = \frac{\text{提取液中槲皮素质量}}{\text{车前子质量}} \times 100\%$$

2.2.3 单因素试验^[10]

以车前子中槲皮素的提取率为指标,考察不同的甲醇体积分数、料液比、超声时间、超声功率等因素对提取率的影响。

甲醇体积分数对提取率的影响:在超声功率 200 W、料液比为 1:40、超声时间 40 min 的条件下,考察不同体积分数的甲醇水溶液对槲皮素提取率的影响,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,随着甲醇体积分数增大槲皮素的提取率随之增大,在甲醇体积分数为 40% 时达到最大,此后提取率下降。因此,后续试验选用 40% 甲醇水溶液为提取剂。

料液比对提取率的影响:以 40% 甲醇水溶液为提取剂,在超声功率 200 W、超声时间 40 min 的条件下,选择不同的料液比进行提取,考察料液比对槲

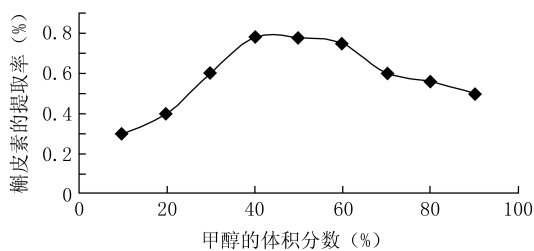


图1 不同体积分数甲醇溶液对车前子中槲皮素提取率的影响

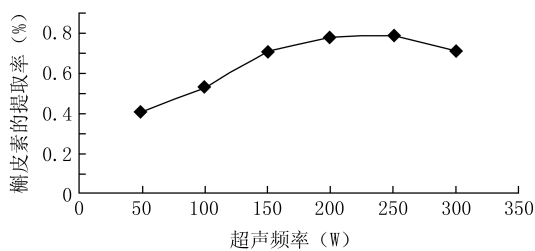


图4 超声功率对车前子中槲皮素提取率的影响

皮素提取率的影响,结果如图2所示。

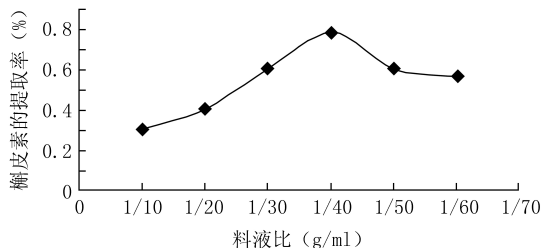


图2 料液比对车前子中槲皮素提取率的影响

由图2可知,随着料液比增加,槲皮素提取率先增大,当增大到1:40时到达最大,随后开始减小。因此选用1:40的料液比进行提取。

超声时间对提取率的影响:以40%甲醇水溶液为提取剂,在超声功率200 W、料液比1:40的条件下,选择不同的超声时间进行提取,考察超声时间对槲皮素提取率的影响,结果如图3所示。

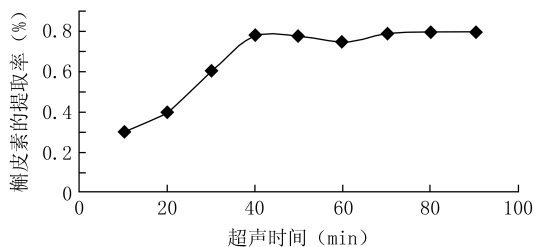


图3 超声时间对车前子中槲皮素提取率的影响

由图3可知,随着超声时间延长,槲皮素提取率在40 min以前快速上升,之后几乎维持不变。考虑到随着时间延长,超声过程不断产热,会影响槲皮素稳定性,同时从节约能源角度考虑,后续试验选择超声时间为40 min。

超声功率对提取率的影响:以40%甲醇水溶液为提取剂,在料液比1:40、超声时间40 min条件下,选择不同超声功率进行提取,考察超声功率对槲皮素提取率的影响,结果如图4所示。

由图4可知,随着超声功率的升高,槲皮素提取率总体呈上升趋势,但当超声功率大于200 W以

后,提取率上升趋势变缓,当功率达到300 W后提取率反而降低。通常,功率增大有利于提高植物有效成分提取率。但超声功率过高,容易导致活性物质失效。因此,超声功率不宜超过300 W。

2.2.4 正交试验

综合单因素试验结果,确定甲醇体积分数、料液比、超声时间、超声功率为主要影响因素,以槲皮素提取率为判断指标,选用L9(3⁴)正交表进行试验,因素与水平安排见表2,试验结果见表3。

表2 正交试验因素、水平表

水平	A因素 (甲醇体积分 数,%)	B因素 (超声时间, t/min)	C因素 (料液比, g/ml)	D因素 (超声功率, p/W)
1	40	30	1/30	150
2	50	40	1/40	200
3	60	50	1/50	250

表3 超声法提取车前子中槲皮素的正交实验结果

编号	A因素	B因素	C因素	D因素	槲皮素提取率(%)
1	1	1	1	1	0.59
2	1	2	2	2	0.78
3	1	3	3	3	0.62
4	2	1	2	3	0.74
5	2	2	3	1	0.59
6	2	3	1	2	0.63
7	3	1	3	2	0.60
8	3	2	1	3	0.61
9	3	3	2	1	0.71
K ₁	0.663	0.643	0.610	0.630	
K ₂	0.653	0.660	0.743	0.670	
K ₃	0.640	0.653	0.603	0.657	
R	0.023	0.017	0.140	0.040	

由表3可以看出,在影响超声法提取车前子中槲皮素的四个因素(甲醇体积分数、超声时间、料液比、超声功率)中,根据极差值R,各因素对车前子槲

皮素提取率影响的主次顺序为 $C > D > A > B$, 即料液比影响最大, 其次为超声功率。由此可确定最佳工艺条件为 $A_1 B_2 C_2 D_2$, 即用体积分数为 40% 的甲醇水溶液为提取剂, 以 1:40 的料液比, 在 200 W 的超声功率下超声 40 min 进行提取。

2.2.5 最佳工艺条件验证

精确称取车前子粉末(过 40 目筛)1.0 g 于锥形瓶中, 用 40 ml 体积分数为 40% 的甲醇溶液浸泡过夜后, 于 200 W 功率下超声 40 min, 将提取液过滤, 滤液减压浓缩成约 40 ml, 按“2.2.2”项方法计算提取率, 重复试验 3 次, 提取率分别为 0.78%、0.79%、0.79%。结果显示, 该工艺条件有很好的重现性。以本试验所确定的工艺条件, 溶剂消耗量小, 提取时间短, 相对于文献^[11]报道的 0.645% 总黄酮提取率更具有专属性和高效性。

3 讨论

车前子中黄酮成分复杂, 有多个文献指出采用紫外分光光度法进行含量测定, 大部分黄酮类成分在 360 nm 处具有紫外吸收, 很难采用紫外法测定其中槲皮素含量, 因此, 本文采用了 HPLC 法进行分离后于 360 nm 进行检测, 结果表明本实验所建立的方法灵敏度高、重现性好、简便可靠, 可作为定量分析方法, 为今后进一步研究利用车前子中槲皮素这一有效成分提供了科学依据。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版(一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015, 50-51.
 - [2] 季大洪, 肖振宇. 中药车前研究与概况[J]. 药学实践杂志, 2001, 19(7): 361-362.
 - [3] ANNE BS. The traditional uses chemical constituents and bio-logical activities of plantago major L[J]. Journal of Ethno-pharmacology, 2000, 71: 1-21.
 - [4] 高明哲, 张惠, 林立, 等. 车前子苷的提取分离[J]. 辽宁中医学院学报, 2003, 5(2): 157-157.
 - [5] 王将, 郑亚军, 冯翠萍. 杏仁皮中槲皮素类化合物抗氧化性的研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(1): 78-81.
 - [6] 王桃云, 陈鹏, 董五科, 等. 超声波提取豆类总槲皮素优化工艺与抗氧化性研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(6): 114-117.
 - [7] 刘艳辉. 超声辅助萃取车前草槲皮素的工艺研究[J]. 粮油加工, 2009, 6: 133-135.
 - [8] 曹学松, 王锦军, 黄兆文. 车前子中槲皮素、木犀草、山柰酚、芹菜素的含量测定[J]. 中国药业, 2009, 18(12): 33-34.
 - [9] 钟瑞建, 俞燕, 丁剑虹, 等. 车前子中车前素的 TLC 鉴别及 HPLC 含量测定[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 715-718.
 - [10] 陈卓君, 欧阳效兴, 周捷, 等. 正交试验法优化怀枝果皮原花青素提取工艺[J]. 今日药学, 2016, 26(3): 165-168.
 - [11] 贲永光, 丘泰球, 李康, 等. 超声强化溶剂提取车前草中总槲皮素的研究[J]. 声学技术, 2009, 28(2): 133-136.
- [收稿日期] 2017-11-29 [修回日期] 2018-03-05
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 333 页)

- [7] 蔡华丹, 张慧芹, 续畅, 等. 茵陈蒿汤水提物和醇提物活性组分的差异及对 D-GaLN 诱导大鼠急性肝损伤预防作用的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 10(19): 216-220.
- [8] 窦志华, 罗琳, 侯金燕, 等. 茵陈蒿汤保肝退黄药效部位筛选[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(10): 2371-2373.
- [9] 史亚军, 王昌利, 赵海峰, 等. 星点设计-效应面法优选止鼾颗粒成型工艺[J]. 中成药, 2014, 9(36): 1863-1866.

- [10] 王永香, 米慧娟, 张传力, 等. Box-Behnken 响应面法优化热毒宁注射液金银花和青蒿(金青)的醇沉工艺研究[J]. 中草药, 5(46): 671-678.
 - [11] 李喜香, 刘效栓, 刘维忠, 等. 姜石肠炎康颗粒醇沉工艺的星点设计-效应面法优化[J]. 时珍国医国药, 2016, 8(27): 1887-1891.
- [收稿日期] 2017-12-03 [修回日期] 2018-05-14
[本文编辑] 陈盛新