

## · 中药工业 ·

正交试验法优选陈皮橙皮苷超声提取工艺<sup>△</sup>杨晶<sup>1</sup>, 张琳<sup>1</sup>, 赵梓邯<sup>1</sup>, 侯俊玲<sup>1\*</sup>, 王文全<sup>1,2,3\*</sup>, 崔洁<sup>2</sup>, 王文端<sup>1</sup>

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

3. 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102)

**[摘要]** 目的: 优选陈皮中橙皮苷的超声提取工艺。方法: 通过单因素试验和正交试验对提取工艺进行优化设计, 采用高效液相测定橙皮苷的含量, 考察甲醇体积分数、超声时间、超声温度、液料比对橙皮苷提取量的影响。结果: 影响陈皮橙皮苷提取量各因素的先后次序为甲醇体积分数 > 超声温度 > 超声时间 > 液料比。最佳提取工艺条件为甲醇体积分数 100%, 超声温度 70 ℃, 超声时间 60 min, 液料比 80:1。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 具有方便、高效、节约成本等优点。

**[关键词]** 陈皮; 超声提取; 橙皮苷; 正交试验

Optimizing Ultrasonic Extraction of Hesperidin from Citri Reticulatae Pericarpium  
Based on Orthogonal Experiments Design

YANG Jing<sup>1</sup>, ZHANG Lin<sup>1</sup>, ZHAO Zhihan<sup>1</sup>, HOU Junling<sup>1\*</sup>, WANG Wenquan<sup>1,2,3\*</sup>, CUI Jie<sup>2</sup>, WANG Wenduan<sup>1</sup>

(1. College of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medicinal Sciences and  
Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;3. Lab of Engineering Research Center of GAP for Chinese Crude Drugs,  
Ministry of Education, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrasonic extraction of hesperidin from Citri Reticulatae Pericarpium. **Methods:** The content of hesperidin was determined by HPLC. The effects of methanol concentration, ultrasonic time, ultrasonic temperature and liquid – material ratio on the content of hesperidin in extracts were investigated by single factor experiments and orthogonal experiments. **Results:** The decreasing order of importance of the four process conditions affecting hesperidin extraction was methanol concentration, ultrasonic temperature, ultrasonic time, liquid – material ratio. The orthogonal experimental results showed that the optimal conditions were methanol concentration 100%, ultrasonic temperature 70 ℃, ultrasonic time 60 min, liquid – material ratio 80:1. **Conclusion:** The optimized process is stable and reasonable, accurate and reliable. This optimum extraction process also had advantages of convenience, high efficiency and cost saving.

**[Keywords]** Citri Reticulatae Pericarpium; ultrasonic extraction; hesperidin; orthogonal experiments

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.8.025

陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮, 具有理气健脾、燥湿化痰的功能<sup>[1]</sup>, 用途较为广泛, 在许多中药复方制剂中均存在。橙皮苷药理活性广泛、稳定, 为陈皮主要活性物质<sup>[2]</sup>。国内外大量的研究表明, 橙皮苷具有抗氧

化<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>、降血脂<sup>[6]</sup>、抗过敏<sup>[7]</sup>等多种药理活性, 《中华人民共和国药典》也将陈皮中橙皮苷含量作为衡量陈皮质量的一项重要指标, 因此, 本实验将橙皮苷提取量作为优化提取工艺指标的标准。由于不同产地、不同品种的陈皮质量不一<sup>[8]</sup>,

<sup>△</sup> [基金项目] 国家中医药管理局行业专项项目(201107009-03)

\* [通信作者] 侯俊玲, 教授, 研究方向: 中药资源开发与利用; E-mail: mshj@126.com; 王文全, 教授, 研究方向: 中药资源开发与利用; E-mail: wwq57@126.com

导致陈皮的药效也参差不齐,常规情况下使用索氏提取法制备陈皮中的橙皮苷后对其进行含量测定,但索氏提取费时耗力,在大批量样品需要处理时不方便,所以探寻一种可替代索氏提取又能高效方便制备大批量陈皮橙皮苷的提取方法很有必要。由于超声波具有机械效应、空化效应等特点,溶剂能较快地进入药材固体颗粒,加快药材中的药效成分溶出<sup>[9]</sup>,该方法不仅提取率高而且操作方便,近年来被广泛应用于植物活性成分的提取<sup>[10-11]</sup>。本实验对超声提取橙皮苷的工艺条件进行了研究,旨在得到一种方便高效制备陈皮橙皮苷的方法。

## 1 仪器与试药

UltiMate 优谱佳 UHPLC (Thermo Scientific); KH-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); FW100 型高速万能粉碎机 (北京中兴伟业仪器有限公司); BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司)。

陈皮由河北美威药业股份有限公司提供,经北京中医药大学王文全教授鉴定为 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮,样品保存于北京中医药大学中药资源系标本室。橙皮苷对照品 (中国食品药品检定研究院,批号:110721-201316,纯度>98%); 甲醇为分析纯; 乙腈为色谱纯; 水为纯化水。

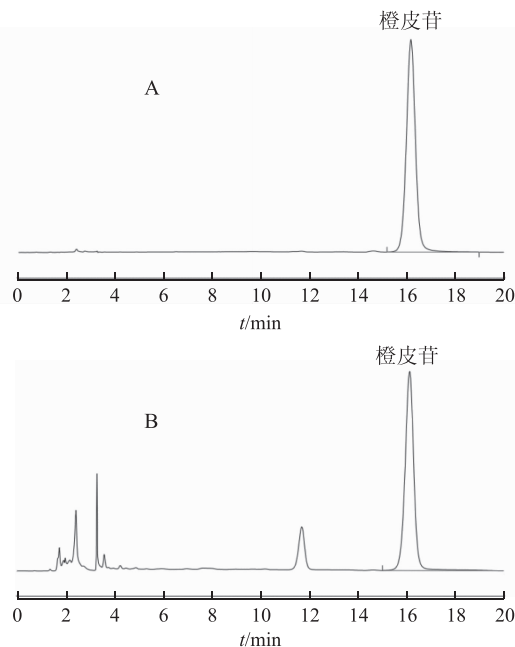
## 2 方法与结果

### 2.1 橙皮苷含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C<sub>18</sub> (2) 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 乙腈-水 (80:20); 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 283 nm; 进样量: 10 μL; 柱温 30 ℃; 理论塔板数以橙皮苷峰计算,不得低于 3000。供试品中橙皮苷的保留时间为 16.138 min,并且与其他组分分离良好。高效液相色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定橙皮苷对照品 8 mg,加甲醇超声溶解,定容至 50 mL 容量瓶,配制质量浓度为 0.16 mg·mL<sup>-1</sup> 的橙皮苷对照品溶液,注射器吸取 1.5 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,贮于液相小瓶,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取陈皮药材粉末 (过 40 目筛) 1.00 g,置 100 mL 锥形瓶中,加甲醇 80 mL,室温下超声提取 30 min,提取液 3000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,定容,注射器吸取 1.5 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,贮于液相小瓶,



注: A. 对照品; B. 供试品。

图 1 陈皮 HPLC 图

备用。

2.1.4 线性范围考察 精密吸取橙皮苷对照品溶液 2、4、6、8、10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定。以橙皮苷峰面积为纵坐标 (Y),橙皮苷的进样量为横坐标 (X),绘制标准曲线。结果表明,橙皮苷在 0.32 ~ 1.6 μg 线性关系良好,回归方程为  $Y = 4.0018X + 0.1401$  ( $r = 0.9994$ )。

2.1.5 精密度试验 吸取对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,结果橙皮苷平均峰面积为 40.37,峰面积 RSD 为 1.26%。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,结果橙皮苷的峰面积无显著变化,RSD 为 1.61%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称取陈皮样品粉末 1.00 g,依照 2.1.3 项下平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,结果橙皮苷平均峰面积为 36.29,RSD 为 1.26%。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取 0.50 g 已知橙皮苷含量的样品 9 份,分高中低 3 个水平,分别加入橙皮苷对照品溶液 0.8、1.0、2.0 mL,按 2.1.3 项下方法制备供试样品,按 2.1.1 项下色谱条件测定橙皮苷含量,橙皮苷平均回收率为 100.6%,RSD 为 1.44%。结果见表 1。

表1 加样回收率试验结果 ( $n=9$ )

| No. | 样品取<br>样量/g | 样品含<br>量/mg | 加入量/<br>mg | 测得量/<br>mg | 回收率<br>(%) | 平均回收<br>率(%) | RSD<br>(%) |
|-----|-------------|-------------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| 1   | 0.503 2     | 17.258 4    | 0.128 0    | 17.389 3   | 102.3      | 100.6        | 1.44       |
| 2   | 0.504 5     | 17.302 8    | 0.128 0    | 17.430 5   | 99.8       |              |            |
| 3   | 0.502 1     | 17.220 5    | 0.128 0    | 17.347 1   | 98.9       |              |            |
| 4   | 0.503 6     | 17.272 0    | 0.160 0    | 17.434 7   | 101.7      |              |            |
| 5   | 0.505 6     | 17.340 6    | 0.160 0    | 17.498 5   | 98.7       |              |            |
| 6   | 0.501 9     | 17.213 7    | 0.160 0    | 17.373 2   | 99.7       |              |            |
| 7   | 0.502 3     | 17.227 4    | 0.192 0    | 17.423 4   | 102.1      |              |            |
| 8   | 0.503 4     | 17.265 1    | 0.192 0    | 17.460 2   | 101.6      |              |            |
| 9   | 0.503 6     | 17.272 0    | 0.192 0    | 17.467 6   | 101.9      |              |            |

## 2.2 单因素试验考察

2.2.1 甲醇体积分数考察 精密称取 1.00 g 陈皮粉末 6 份, 置于 100 mL 锥形瓶中, 分别加入 50%、60%、70%、80%、90%、100% 甲醇各 80 mL, 室温下超声提取 30 min, 提取液  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心,  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件进行测定。平行操作 3 次。结果见图 2。

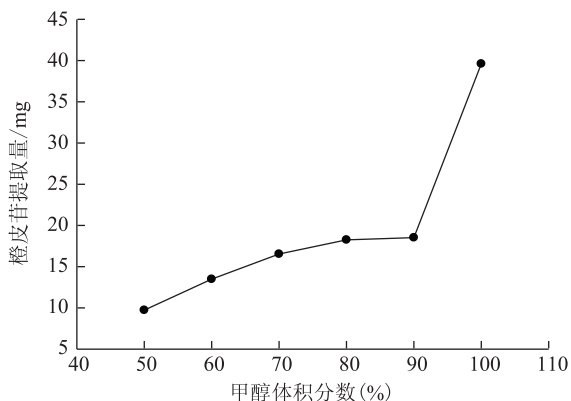


图2 甲醇体积分数对陈皮橙皮苷提取量的影响

由图 2 可看出, 随着甲醇体积分数的增加, 橙皮苷的提取量呈上升趋势, 但是甲醇体积分数在 50%~90% 时, 提取量增长比较缓慢, 而体积分数在 90%~100% 时提取量迅速增高。这可能是因为橙皮苷极性较小, 难溶于水易溶于有机溶剂<sup>[12]</sup>。故选择甲醇体积分数 80%、90%、100% 作为正交试验的 3 个水平。

2.2.2 超声温度考察 精密称取 1.00 g 陈皮粉末 6 份, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 100% 甲醇 80 mL, 分别于 30、40、50、60、70 °C 下超声提取 30 min, 提取液  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心,  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件进行测定。平行操

作 3 次。结果见图 3。

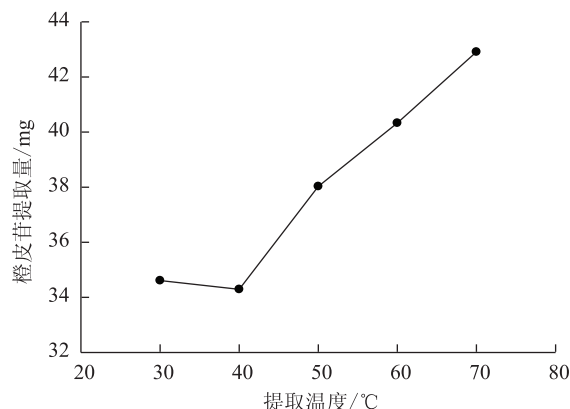


图3 超声温度对陈皮橙皮苷提取量的影响

由图 3 可看出, 在 30~40 °C, 温度对橙皮苷的提取量基本没有影响, 但在 40~70 °C 随着提取温度的增加, 橙皮苷的提取量呈比较明显的上升趋势, 可见在一定范围内, 温度越高提取越充分。由于甲醇的沸点较低, 70 °C 时甲醇已经处于沸腾状态, 所以 70 °C 设定为最高提取温度。为了得到较高的提取率, 故选择 50、60、70 °C 作为正交试验提取温度的 3 个水平。

2.2.3 超声时间考察 精密称取 1.00 g 陈皮粉末 6 份, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 100% 甲醇 80 mL, 分别于室温下超声提取 10、20、30、40、50、60 min, 提取液  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心,  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件进行测定。平行操作 3 次。结果见图 4。

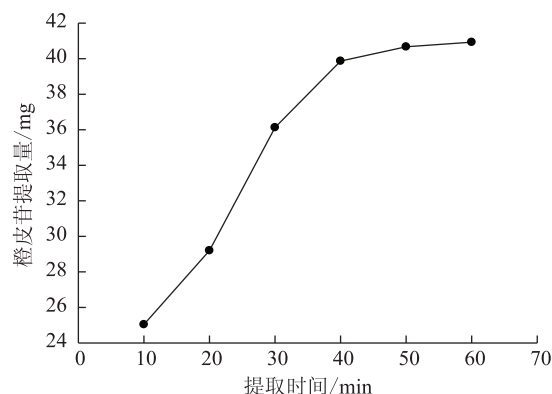


图4 超声时间对陈皮橙皮苷提取量的影响

由图 4 可看出, 在 10~40 min 时, 随超声时间的延长橙皮苷提取量迅速增加, 40 min 之后趋于平缓, 说明超声 40 min 时, 陈皮中的橙皮苷已大部分溶出。为了得到较高的提取率, 故选择超声时间 40、50、60 min 作为正交试验的 3 个水平。

2.2.4 液料比考察 精密称取 1.00 g 陈皮粉末 6 份, 置于 100 mL 锥形瓶中, 分别加入 100% 甲醇 50、60、70、80、90 mL, 室温下超声提取 30 min, 提取液 3000 r·min<sup>-1</sup> 离心, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件进行测定, 平行操作 3 次。结果见图 5。

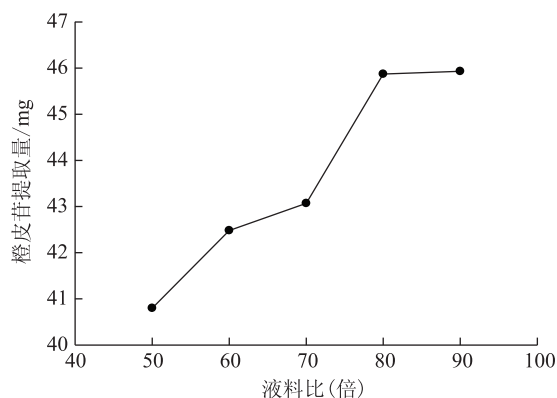


图5 液料比对陈皮橙皮苷提取量的影响

由图 5 可看出, 随着提取溶剂的增加, 橙皮苷的提取量呈现较明显的上升趋势, 到 80 倍溶剂量时橙皮苷提取量的增长趋于平缓, 可见在一定范围内, 溶剂量越多, 橙皮苷提取越充分。为了得到较高的提取率选择 70 倍、80 倍、90 倍量的甲醇作为正交试验的 3 个水平。

### 2.3 正交试验优化

在单因素试验的基础上, 以橙皮苷的提取量为评价指标, 选取影响陈皮橙皮苷提取效果各因素中有意义的水平做正交试验, 对结果进行方差分析, 以确定最佳的提取条件。采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表, 选取超声温度(A)、超声时间(B)、甲醇体积分数(C)、液料比(D)为考察因素, 各选取 3 个水平进行试验。因素水平表见表 2, 实验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4。

由直观分析可知, 各因素影响陈皮中橙皮苷提取量的排序为 D > A > B > C。方差分析表明, 因素 A、B、C 各水平之间无显著性差异, 而因素 D 各水

表2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验因素水平

| 水平 | 因素       |            |         |             |
|----|----------|------------|---------|-------------|
|    | A 超声温度/℃ | B 超声时间/min | D 液料比/倍 | C 甲醇体积分数(%) |
| 1  | 50       | 40         | 70      | 80          |
| 2  | 60       | 50         | 80      | 90          |
| 3  | 70       | 60         | 90      | 100         |

表3 正交试验设计与结果分析

| No.            | A      | B      | C      | D      | 橙皮苷含量/mg |
|----------------|--------|--------|--------|--------|----------|
| 1              | 1      | 1      | 1      | 1      | 17.77    |
| 2              | 1      | 2      | 2      | 2      | 21.23    |
| 3              | 1      | 3      | 3      | 3      | 40.30    |
| 4              | 2      | 1      | 2      | 3      | 40.30    |
| 5              | 2      | 2      | 3      | 1      | 26.14    |
| 6              | 2      | 3      | 1      | 2      | 24.97    |
| 7              | 3      | 1      | 3      | 2      | 31.9     |
| 8              | 3      | 2      | 1      | 3      | 45.14    |
| 9              | 3      | 3      | 2      | 1      | 36.11    |
| K <sub>1</sub> | 26.433 | 29.990 | 29.293 | 26.673 |          |
| K <sub>2</sub> | 30.470 | 30.837 | 32.547 | 26.033 |          |
| K <sub>3</sub> | 37.717 | 33.793 | 32.780 | 41.913 |          |
| R              | 11.284 | 3.803  | 3.487  | 15.880 |          |

表4 方差分析

| 因素 | SS      | f | MS      | F      | P     |
|----|---------|---|---------|--------|-------|
| A  | 196.122 | 2 | 98.061  | 8.604  |       |
| B  | 23.924  | 2 | 11.962  | 1.050  |       |
| 误差 | 22.795  | 2 | 11.398  | 1.000  |       |
| D  | 484.842 | 2 | 242.421 | 21.270 | <0.05 |

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ ;  $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$ ; 因各项中因素 C 离均差平方和最小, 将其作为误差项处理。

平之间差异则有显著性。从直观分析表可以看出, C<sub>2</sub>C<sub>3</sub>水平下橙皮苷提取量几乎没有差异, C<sub>2</sub>水平还可节省一定量的溶剂, 综合考虑, 确定超声提取陈皮中橙皮苷的最佳工艺条件为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 即 70 ℃ 下 80 倍量 100% 甲醇超声提取 60 min。

### 2.4 验证实验

精密称取 3 份陈皮粉末各 1.00 g, 分别置于 100 mL 锥形瓶中, 按优选的 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 工艺条件进行提取, 按 2.1.1 项下的色谱条件测定橙皮苷的提取量, 结果为 45.182、45.389、45.804 mg, 均值 45.829 mg, RSD 为 0.95%, 说明该工艺稳定、重复性较好。

### 2.5 不同工艺提取效果比较

精密称取陈皮粉末 1.00 g, 加乙醚 80 mL 索氏提取至无色, 弃去乙醚, 药渣挥干, 加甲醇 80 mL, 索氏提取至无色<sup>[13]</sup>, 取 1 mL 甲醇提取液定容于 10 mL 容量瓶, 进样前 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 重复 3 次, 按 2.1.1 项下的色谱条件测定橙皮苷的提取量, 结果为 45.549、45.632、46.306 mg, 均值

45.448 mg, RSD 为 1.25%。将该结果与 2.4 项下超声提取的结果相比较可看出,传统索氏提取法与超声提取法得到的橙皮苷提取量基本一致。

### 3 结论和讨论

在单因素考察以甲醇为溶剂超声提取橙皮苷的实验前,笔者曾用不同浓度的乙醇对陈皮超声提取,发现 60% 乙醇条件下,陈皮中的橙皮苷超声提取率最高,但提取率仅有甲醇为溶剂时的二分之一,原因有可能是橙皮苷与甲醇极性较近,因而易溶于甲醇。

超声提取陈皮橙皮苷时,影响橙皮苷提取率的因素大小顺序为甲醇体积分数 > 超声温度 > 超声时间 > 液料比,其中甲醇体积分数对橙皮苷的提取率有显著性影响,超声温度、超声时间、液料比对橙皮苷的提取率没有显著性影响。正交试验最后优选出的超声提取工艺:超声温度 70 ℃、超声时间 60 min、甲醇体积分数 100%、液料比 80:1。与常规的索氏回流提取法相比,该工艺对陈皮橙皮苷提取率没有显著影响,不需高温加热,安全系数高,提取一次仅需 60 min,相对索氏提取法提取一次需耗时 8 h,该提取方法大大节省了时间,另外该方法不需乙醚萃取,操作简便。验证实验也表明,该超声工艺重复性较好。因此,该超声提取工艺可代替索氏回流提取,作为一种简单易行、省时高效制备大批量陈皮样品橙皮苷的有效途径。

### 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,2015.
- [2] 张恒,饶坤林,向韩. 橙皮苷药理活性研究进展[J]. 中南药学,2016,14(10):1097-1100.
- [3] K B Kalpana, M Srinivasan, Venugopal P Menon, et al. Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane [J]. Mol Cell Biochem,2009,323(3):21-29.
- [4] Ratana Banjerdpongchai, Benjawan Wudtiwai, Patompong Khaw-on, et al. Hesperidin from Citrus seed induces human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis via both mitochondrial and death receptor pathways [J]. Tumor Biol, 2016,37(8):227-237.
- [5] Gowrikumar Saiprasad, Palanivel Chitra, Ramar Manikandan, et al. Hesperidin alleviates oxidative stress and down-regulates the expressions of proliferative and inflammatory markers in azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis in mice [J]. Inflamm Res, 2013, 62(7):425-440.
- [6] Wilcox LS, Borradaile N M, Edebreu L, et al. Secretion of hepatocyte apo B is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression by of ACAT2 and MTP [J]. J Lipid Res, 2001, 42(5):725-734.
- [7] Tadashi Fujita, Takehumi Shiura, Megumi Masuda, et al. Anti-allergic effect of a combination of Citrus unshiu unripe fruits extract and prednisolone on picryl chloride-induced contact dermatitis in mice [J]. J Nat Med, 2008, 62(3):202-206.
- [8] 胡志军,陈建秋. HPLC 测定不同基原陈皮药材中橙皮苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):95-98.
- [9] 张吉祥,欧来良. 正交试验法优化超声提取枣核总黄酮[J]. 食品科学,2012,33(4):18-21.
- [10] 黄晓玲,郑兆广,封亮,等. 正交试验优化板蓝根总生物碱的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(09):66-68.
- [11] 邵舒蕊,赵志刚,侯俊玲,等. 均匀设计法优化丹参中 4 种活性成分的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014,20(10):8-12.
- [12] 耿敬章,钱英,张志健,等. 超声波辅助提取橘皮中橙皮苷[J]. 中国食品添加剂,2010,13(3):63-68.
- [13] 孙冬梅,毕晓黎,胥爱丽,等. HPLC 法测定不同产地陈皮药材中橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2009, 15(11):1-3.

(收稿日期 2016-11-30)