

引用本文:韩雪,李莉,刘佳倪,等.正交试验优化神香草中的迷迭香酸和蒙花苷提取工艺[J].安徽医药,2023,27(2):251-254.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.02.009.



◇药物分析◇

## 正交试验优化神香草中的迷迭香酸和蒙花苷提取工艺

韩雪,李莉,刘佳倪,刁娟娟

作者单位:新疆医科大学药学院,新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830011

通信作者:李莉,女,教授,博士生导师,研究方向为新疆特色药用植物研究,Email:llxjmu@163.com

基金项目:国家重点研究专项计划(2018YFC1708303)

**摘要:** 目的 优化神香草中的迷迭香酸和蒙花苷提取条件,确定最佳的提取工艺。方法 在单因素试验的基础上,采用超声法提取神香草中的迷迭香酸和蒙花苷,选取提取溶剂、料液比、提取时间、提取次数为主要考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对迷迭香酸和蒙花苷提取工艺进行优化。结果 确定最佳提取条件,平行操作3次,神香草中迷迭香酸和蒙花苷的最佳提取工艺为提取溶剂为60%甲醇、料液比为1:20、提取时间为20 min、提取次数为1次。结论 该方法操作便捷、快速,适用于神香草中的迷迭香酸和蒙花苷的提取。

**关键词:** 神香草属植物; 工艺学,制药; 单因素; 正交试验; 迷迭香酸; 蒙花苷

### Orthogonal test to optimize the extraction process of rosmarinic acid and buddleoside in *Hyssopus officinalis*

HAN Xue, LI Li, LIU Jiani, DIAO Juanjuan

Author Affiliation: School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region 830011, China

**Abstract:** **Objective** To optimize the extraction process of rosmarinic acid and buddleoside from *Hyssopus officinalis*, and to determine the best extraction method. **Methods** Based on a single-factor test, an ultrasonic method was used to extract rosmarinic acid and buddleoside from *Hyssopus officinalis*. The extraction solvent, material-to-liquid ratio, extraction time, and extraction times were selected as the main investigating factors, and the  $L_9(3^4)$  orthogonal test was used to optimize the extraction process of rosmarinic acid and buddleoside. **Results** The optimum extraction conditions were determined and operated three times in parallel. The optimal extraction process for rosmarinic acid and buddleoside in *Hyssopus officinalis* was 60% methanol as the extraction solvent, 1:20 material-to-liquid ratio, 20 min extraction time, and one extraction time. **Conclusion** This method is convenient, rapid, and suitable for the extraction of rosmarinic acid and buddleoside from *Hyssopus officinalis*.

**Key words:** Hyssopus plant; Technology, pharmaceutical; Single factor; Orthogonal test; Rosmarinic acid; Buddleoside

神香草为唇形科(Labiatae)神香草属(*Hyssopus L.*)硬尖神香草,嫩芽可以用来制茶,其茶具有帮助脂肪分解、消化的功效,叶也常常被用于烹调食物<sup>[1]</sup>。神香草挥发油中主要含有蒎烯、蒎烯、蒎烯酮等成分<sup>[2-6]</sup>,被广泛应用于化妆品、化工及食品香料等行业。此外神香草应用最普遍的是其药用价值,是维吾尔民间常用中药材,也是寒喘祖帕颗粒和罗欧咳祖帕的主要成分之一,野生神香草主要生长在新疆的阿勒泰等地,收载于《中国植物志》<sup>[7]</sup>、中华人民共和国卫生部药品标准等,主治功能为化痰、止咳、祛风寒、杀菌,用于治疗咳嗽、头疼、哮喘及寒性引起的感冒<sup>[8-9]</sup>。部颁标准中只记载神香草的形状等特征,对其鉴别检查、含量测定均无明确规定。相关文献报道,神香草中含有丰富的化学成分,主要包括挥发油、萜类、黄酮、酚酸、多糖等<sup>[10-14]</sup>,其中

酚酸类成分迷迭香酸具有杀菌、抗炎、调节免疫及抗衰老的功效<sup>[15-16]</sup>。蒙花苷属于黄酮类化合物,可以抗菌消炎<sup>[17-18]</sup>、并对慢性气管炎有一定疗效。前期课题组证实迷迭香酸和蒙花苷抗炎平喘的作用,同时又可以与市场中常出现的混淆品大苞荆芥加以区分,因此将迷迭香酸和蒙花苷作为本次实验的指标成分。正交试验设计是分式析因设计的方法之一,在研究多因素多水平的同时是寻求二者较优组合的一种简单、高效、迅速的方法<sup>[19]</sup>。

本研究自2021年3—5月结合单因素试验的结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化神香草中迷迭香酸和蒙花苷的提取工艺,并采用高效液相色谱法测定神香草中的主要成分迷迭香酸及蒙花苷的含量,为后续研究提供最优工艺条件,对其质量控制提供前期基础。

## 1 仪器与药材试剂

**1.1 仪器** 数控超声波清洗器(KQ500DE, 昆山市超声仪器有限公司), 电子天平(AL-104, 梅特勒-托利多仪器有限公司), 分析天平(AB135-S,  $d=0.01/0.1$  mg, Mettler-TeLedo), 高效液相色谱仪(日本岛津, LC-2AT), 色谱柱(Sepax HPLC<sub>18</sub>, 4.6 mm×250 mm 5  $\mu$ m)。

**1.2 药材与试剂** 磷酸、乙腈均为色谱级; 甲醇为分析级; 迷迭香酸(批号 111871-201706, 中国食品药品研究院), 纯度>98%; 蒙花苷(批号 20210606, 北京索莱宝科技有限公司), 纯度>98%。

本次实验用的神香草药材产地主要为新疆各地区、州, 由新疆医科大学药学院帕丽达教授鉴定, 为正品硬尖神香草(*Hyssopus officinalis*)。

## 2 溶液的制备

**2.1 对照品混合溶液的制备** 取迷迭香酸、蒙花苷对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成每 1 毫升各含 10  $\mu$ g 的混合溶液, 即得。

**2.2 供试品溶液的制备** 取神香草粉末, 精密称定 0.5 g, 于具塞锥形瓶中, 精密吸取 60% 甲醇 10 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 20 min, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

## 3 色谱方法的建立

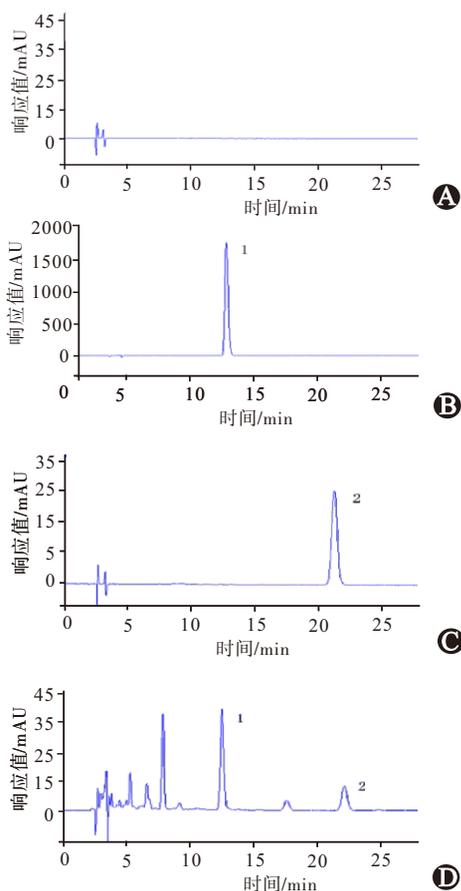
色谱柱为 C<sub>18</sub> 柱; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 磷酸, 按乙腈(A):0.1% 磷酸(B)为(25:75)等度洗脱; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30  $^{\circ}$ C; 进样体积为 10  $\mu$ L; 检测波长为 330 nm。理论塔板数按迷迭香酸和蒙花苷计算均不得低于 2 000, 见图 1。

## 4 样品处理方法

**4.1 单因素试验** 由于迷迭香酸是一种水溶性物质, 蒙花苷几乎不溶于水, 二者极性差异较大, 所以在实验过程中采用综合评分的方式评价迷迭香酸和蒙花苷提取效果, 且神香草中迷迭香酸含量高于蒙花苷的含量, 因此迷迭香酸权重系数占比高于蒙花苷的权重系数。

综合评分=迷迭香酸含量/迷迭香酸最高含量×0.6+蒙花苷含量/蒙花苷最高含量×0.4。

**4.1.1 提取方法的考察** 取神香草药材粉末(过筛)6份, 分为两组, 每组平行操作 3 次, 精密称定各 0.5 g, 于具塞锥形瓶中, 精密吸取 25 mL 甲醇, 称重, 每组分别采用加热回流和超声法提取(功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 补足减失的重量, 摇匀, 过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜, 取续滤液, 以迷迭香酸、蒙花苷的综合评分作为指标进行比较。结果显示, 超声



注: 1—迷迭香酸; 2—蒙花苷。

图1 对照品及神香草样品 330 nm 高效液相色谱图: A 为溶剂峰; B、C 为对照品色谱峰; D 为样品峰

法提取效果最佳。结果见表 1。

表 1 提取方法对测定结果的影响( $n=3$ )

提取方法	迷迭香酸/%		蒙花苷/%		综合评分/分
	含量	RSD	含量	RSD	
超声	0.132 0	0.833 3	0.064 1	1.777 2	2.977 5
加热	0.131 5	2.440 6	0.036 2	1.878 9	2.790 7

**4.1.2 提取溶剂的考察** 取神香草药材粉末(过筛)24份, 分为 8 组, 每组平行操作 3 次, 精密称定各 0.5 g, 于具塞锥形瓶中, 每组分别精密吸取 25 mL 甲醇、80% 甲醇、60% 甲醇、40% 甲醇、95% 乙醇、80% 乙醇、60% 乙醇、40% 乙醇, 称重, 超声法提取 30 min, 放冷, 补足减失的重量, 摇匀, 过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜, 取续滤液, 以迷迭香酸、蒙花苷的综合评分作为指标进行比较。结果显示, 提取溶剂为 60% 甲醇时提取效果最佳。见表 2。

**4.1.3 提取溶剂的用量的考察** 取神香草药材粉末(过筛)12份, 分为 4 组, 每组平行操作 3 次, 精密称定各 0.5 g, 于具塞锥形瓶中, 每组分别按料液比 1:10、1:20、1:50、1:100 精密吸取 60% 甲醇, 超声法

表2 提取溶剂对测定结果的影响( $n=3$ )

提取溶剂	迷迭香酸/%		蒙花苷/%		综合评分/分
	含量	RSD	含量	RSD	
甲醇	0.141 3	3.678 9	0.068 8	1.190 9	2.913 2
80% 甲醇	0.182 9	1.767 2	0.024 6	3.367 3	2.943 8
60% 甲醇	0.197 8	1.243 9	0.018 0	3.893 9	2.990 7
40% 甲醇	0.192 3	4.396 7	0.006 2	2.056 4	2.922 6
95% 乙醇	0.041 7	1.377 6	0.010 1	2.469 6	2.948 2
80% 乙醇	0.150 4	3.272 4	0.027 6	2.233 8	2.915 3
60% 乙醇	0.154 0	3.579 2	0.028 1	1.346 7	2.912 2
40% 乙醇	0.158 5	1.903 5	0.015 5	3.020 5	2.941 0

提取 30 min, 放冷, 补足减失的重量, 摇匀, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 以迷迭香酸、蒙花苷的综合评分作为指标进行比较。结果显示, 提取溶剂的加入量为 25 mL 提取效果最佳。结果见表 3。

表3 料液比对测定结果的影响( $n=3$ )

料液比	迷迭香酸/%		蒙花苷/%		综合评分/分
	含量	RSD	含量	RSD	
1:10	0.100 8	1.605 5	0.033 2	2.975 7	2.944 8
1:20	0.130 7	0.688 3	0.047 9	5.627 7	2.943 7
1:50	0.133 1	0.592 9	0.064 0	3.430 2	2.957 0
1:100	0.113 5	0.979 5	0.061 2	3.695 6	2.942 1

**4.1.4 超声处理时间的选择** 取神香草药材粉末(过筛) 12 份, 分为 4 组, 每组平行操作 3 次, 精密称定各 0.5 g, 于锥形瓶中, 精密吸取 60% 甲醇 25 mL, 采用超声法分别提取 10、15、20、30 min, 放冷, 补足减失的重量, 摇匀, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 以迷迭香酸、蒙花苷的综合评分作为指标进行比较。结果显示, 提取时间为 20 min 提取效果最佳。结果见表 4。

表4 提取时间对测定结果的影响( $n=3$ )

提取时间/min	迷迭香酸/%		蒙花苷/%		综合评分/分
	含量	RSD	含量	RSD	
10	0.091 2	1.709 0	0.050 1	2.915 4	2.942 4
15	0.103 5	2.099 6	0.054 8	3.175 3	2.923 4
20	0.096 9	0.779 8	0.053 9	2.770 5	2.965 7
30	0.106 6	2.503 2	0.056 4	2.349 3	2.926 2

**4.1.5 提取功率的考察** 取神香草药材粉末(过筛) 12 份, 分为 4 组, 每组平行操作 3 次, 精密称定各 0.5 g, 于锥形瓶中, 精密吸取 60% 甲醇 25 mL, 超声功率分别为 150、250、350、500 W 提取 20 min, 放冷, 补足减失的重量, 摇匀, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 以迷迭香酸、蒙花苷的综合评分作为指标进行比较。结果显示, 提取功率为 350 W 提取效果相对较好。结果见表 5。

表5 提取功率对测定结果的影响( $n=3$ )

提取功率/W	迷迭香酸/%		蒙花苷/%		综合评分/分
	含量	RSD	含量	RSD	
150	0.085 4	1.996 1	0.046 0	3.263 2	2.933 8
250	0.096 5	1.509 4	0.047 9	2.480 5	2.943 5
350	0.098 1	1.362 4	0.055 5	1.728 4	2.972 3
500	0.100 2	1.040 4	0.054 0	2.303 5	2.951 1

**4.1.6 提取次数的选择** 取神香草药材粉末(过筛) 9 份, 分为 3 组, 每组平行操作 3 次, 精密称定各 0.5 g, 于具塞锥形瓶中, 精密吸取 60% 甲醇 25 mL, 采用超声法分别提取 1、2、3 次(20 分/次), 放冷, 补足减失的重量, 摇匀, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 以迷迭香酸、蒙花苷的综合评分作为指标进行比较。结果显示, 提取 2 次时提取效率最高, 为提取方法操作方便简单, 故选择提取次数为 2 次。见表 6。

表6 提取次数对测定结果的影响( $n=3$ )

提取次数/次	迷迭香酸/%		蒙花苷/%		综合评分/分
	含量	RSD	含量	RSD	
1	0.093 1	1.245 5	0.056 5	2.721 4	2.961 0
2	0.116 0	2.070 6	0.068 8	2.919 6	3.024 8
3	0.118 2	2.024 4	0.073 3	1.652 2	3.018 9

**4.2 提取工艺重复正交试验** 结合单因素试验的结果, 以神香草中迷迭香酸和蒙花苷两种成分含量的综合评分作为考察指标, 选择对迷迭香酸、蒙花苷提取效果影响较大的提取溶剂(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为考察因素, 每个因素选取 3 个水平, 按照  $L_9(3^4)$  正交表进行重复性正交试验, 确定其最优提取工艺。神香草因素水平见表 7, 试验安排及结果见表 8, 方差分析结果见表 9。

表7 正交试验因素水平表

水平	因素			
	提取溶剂(A)	料液比(B)	提取时间(C)	提取次数(D)
1	100% 甲醇	1:20	15 min	1 次
2	80% 甲醇	1:50	20 min	2 次
3	60% 甲醇	1:100	30 min	3 次

各因素水平的变化对实验结果大小的影响可以通过各因素、水平的极差 R 值的大小直观反映, 极差值越大影响越大, 反之越小。因此由表 8 分析结果中可以直观看出四个因素对迷迭香酸和蒙花苷提取率影响的显著性依次是:  $B > C > A > D$ , 料液比在本次试验中是影响提取的最重要因素, 其次是提取时间、提取溶剂, 提取次数影响最小, 最佳提取工艺为  $A_1B_1C_1D_1$ , 即提取溶剂 100% 甲醇溶液、料液比 1:20、提取时间 15 min、提取次数 1 次。从表 9 方差

表8  $L_9(3^4)$ 正交试验安排及结果( $n=27$ )

编码	因素				综合 评分/分
	A (提取溶剂)	B (料液比)	C(提取时 间/min)	D(提取 次数/次)	
1	1(100% 甲醇)	1(1:20)	1(15)	1(1)	2.978 8
2	1(100% 甲醇)	2(1:50)	2(20)	2(2)	2.943 7
3	1(100% 甲醇)	3(1:100)	3(30)	3(3)	2.890 1
4	2(80% 甲醇)	1(1:20)	2(20)	3(3)	2.959 9
5	2(80% 甲醇)	2(1:50)	3(30)	1(1)	2.912 3
6	2(80% 甲醇)	3(1:100)	1(15)	2(2)	2.913 2
7	3(60% 甲醇)	1(1:20)	3(30)	2(2)	2.934 7
8	3(60% 甲醇)	2(1:50)	1(15)	3(3)	2.936 9
9	3(60% 甲醇)	3(1:100)	2(20)	1(1)	2.914 4
K1	8.812 6	8.873 4	8.828 9	8.805 5	
K2	8.785 4	8.792 9	8.818 0	8.791 6	
K3	8.786 0	8.717 7	8.737 1	8.786 9	
R	0.027 2	0.155 7	0.091 8	0.018 6	

表9 正交试验方差分析表

因素	SS值	f值	S值	F值	P值
A(提取溶剂)	0.000 2	2.000 0	0.000 1	2.579 5	>0.05
B(料液比)	0.004 0	2.000 0	0.002 0	64.814 5	<0.05
C(提取时间)	0.001 7	2.000 0	0.000 8	26.887 5	<0.05
D(提取次数)	0.000 1	2.000 0	0.000 0	1.000 0	>0.05

分析结果可知,因素B(料液比)、因素C(提取时间)差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而因素A(提取溶剂)、D(提取次数)差异无统计学意义。A因素兼顾药材中迷迭香酸和蒙花苷的提取率,由于二者极性差异较大,迷迭香酸含量高于蒙花苷,因此选择60%甲醇最合适,结合直观分析和方差分析应该选择 $A_3B_1C_2D_1$ ,即提取溶剂60%甲醇溶液、料液比1:20、提取时间20 min、提取次数1次。

**4.3 最佳提取工艺条件验证** 按上述神香草最佳提取工艺 $A_3B_1C_2D_1$ ,即提取溶剂60%甲醇溶液、料液比1:20、提取时间20 min、提取次数1次条件进行3次平行验证试验,结果见10。

表10 验证试验结果/%

编号	迷迭香酸			蒙花苷		
	含量	平均含量	RSD	含量	平均含量	RSD
1	0.180 5			0.029 8		
2	0.176 6	0.177 7	1.386 5	0.030 2	0.029 8	1.307 0
3	0.176 0			0.029 5		

## 5 讨论

单因素试验表明,各个因素在相互不影响的情况下提取神香草中迷迭香酸和蒙花苷的最佳条件为100%甲醇溶液、料液比1:50、提取功率350 W、

提取时间为20 min、提取次数2次。但在实际操作过程中各个因素存在相互影响的情况,考虑实际生产过程中所消耗时间和资源成本等系列问题,本次实验选取操作简便、快捷迅速的超声提取法,故在超声提取的基础上,选取4个因素分别为提取溶剂、提取功率、提取时间和提取次数作为考察指标。正交试验结果表明,提取溶剂的加入量是影响提取效果的占比重要的因素,其次为提取时间、提取溶剂,提取次数是最小的影响因素。

## 参考文献

- [1] 陈军. 神香草的用途与栽培技术要点[J]. 林业实用技术, 2014(10):66-68.
- [2] 吕红红, 周凡, 马小琴. 神香草挥发油化学成分的GC-MS研究概述[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(4):615-616, 封3.
- [3] 郝宇薇, 刘婧怡, 姚婷玉, 等. 硬尖神香草挥发油提取工艺研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20(3):37-40.
- [4] 蔡晓翠, 买买提·艾力, 王新堂, 等. 硬尖神香草的化学成分研究[J]. 中药材, 2021, 44(4):848-852.
- [5] 吴晓菊, 杨清香, 徐效圣, 等. 亚临界萃取神香草精油的工艺研究[J]. 食品工业, 2015, 36(4):99-101.
- [6] 买买提江·阿布都瓦克, 夏木西努尔·艾克拜尔, 海白尔·火加艾合买买提, 等. 维吾尔医常用药材硬尖神香草花正己烷部位化学成分GC-MS分析[J]. 中国民族医药杂志, 2017, 23(3):33-35.
- [7] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志:第六十六卷[M]. 北京:科学出版社, 1977:243.
- [8] 袁凤娟, 胡梦颖, 哈木拉提·哈斯木, 等. 神香草提取物防治支气管哮喘的作用机制[J]. 中成药, 2017, 39(4):809-812.
- [9] 马小娟, 马志兴, 于文燕, 等. 神香草对哮喘小鼠体内Tfh细胞的改善作用[J]. 西部医学, 2020, 32(12):1744-1748.
- [10] 刘丹, 朱小涛, 向瑾, 等. 神香草倍半萜类化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50(5):1049-1054.
- [11] ABDEL-MEGEED RM, NEWARY SAEL, KADRY MO, et al. *Hyssopus officinalis* exerts hypoglycemic effects on streptozotocin-induced diabetic rats via modulating GSK-3 $\beta$ , C-fos, NF- $\kappa$ B, ABCA1 and ABGA1 gene expression[J]. J Diabetes Metab Disord, 2020, 19(1):483-491.
- [12] 张亚杰, 康雨彤, 贺金华, 等. 硬尖神香草三萜类化学成分研究[J]. 中药材, 2020, 43(2):347-349.
- [13] 戎晓娟, 严欢, 韩阳, 等. 神香草水提物的主成分分析及含量测定[J]. 中国药房, 2015, 26(6):808-810.
- [14] FURUKAWA M, MAKINO M, OHKOSHI E, et al. Terpenoids and phenethyl glucosides from *hyssopus cuspidatus* (labiateae) [J]. Phytochemistry, 2011, 72(17): 2244-2252.
- [15] 任志清, 李会珍, 张志军, 等. 不同品种紫苏叶迷迭香酸的提取及其生物活性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(1):92-100.
- [16] 王音. 迷迭香酸对三种常见细菌抑菌活性的研究[J]. 太原师范学院学报(自然科学版), 2020, 19(2):71-74.
- [17] 吴亚军, 苏洁, 黄浦俊, 等. 蒙花苷对TNF- $\alpha$ 诱导的血管内皮细胞炎症损伤及TLR4/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路的影响[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5):637-643.
- [18] 许韩婷, 苏洁, 吴亚军, 等. 蒙花苷对脂多糖诱导的血管内皮细胞炎症损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1):29-32.
- [19] 王玄静. 正交试验设计的应用及分析[J]. 兰州文理学院学报(自然科学版), 2016, 30(1):17-22.

(收稿日期:2021-10-11, 修回日期:2021-12-05)