

正交试验法优选泽兰迷迭香酸超声提取工艺*

聂其婷[▲] 徐曼 吴昊 刘伟 李弘 任强[△]

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘要 目的 通过正交试验法,优选泽兰(*Lycopus Lucidus Turcz*)中迷迭香酸的超声提取工艺。方法 建立 HPLC-DAD 法测定泽兰中迷迭香酸含量的分析方法。以提取物中迷迭香酸的含量作为考察指标。采用单因素试验和正交试验考察提取溶剂、浓度、料液比、功率及提取时间对提取效率的影响,确定最佳提取工艺,并进行验证试验。**结果** 最佳提取条件为:50% 乙醇,功率 198 W,料液比 1:15,提取时间 30 min。验证试验表明此工艺条件下,泽兰中迷迭香酸的提取率为 0.41% (RSD=0.11%, n=3)。**结论** 优选后的提取工艺提取效率高,稳定性好,对今后提取、分离泽兰中迷迭香酸奠定基础。

关键词 泽兰;迷迭香酸;高效液相色谱仪;正交试验

中图分类号:R282.4 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2016)02-073-04

The optimization of the ultrasonic extraction of rosmarinic acid from *Lycopus Lucidus Turcz* using orthogonal test

NIE Qiting, XU Man, WU Hao, LIU Wei, LI Hong, REN Qiang

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical College, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To optimize the extraction of rosmarinic acid from *Lycopus Lucidus Turcz* using the orthogonal test. **Methods** A method of HPLC-DAD was developed for determination of rosmarinic acid in *L. Lucidus Turcz*. The content of rosmarinic acid in the extract was used as the index of investigation. Then, the single factor test and orthogonal test were applied to investigate the influence of solvent, concentration, ratio of material to liquid, power and extraction time on the extraction progress, and the optimal extraction process was determined. **Results** Optimal extraction conditions were as follows: ethanol concentration 50%, microwave power 198 W, ratio of material to liquid (1:15), extracting for 30 min. Validation test showed that average extraction rate of rosmarinic acid was 0.41% (RSD=0.11%, n=3). **Conclusion** The optimized extraction had high extraction efficiency and good stability which is useful for extraction and separation of rosmarinic acid in *L. Lucidus Turcz*.

Keywords: *Lycopus Lucidus Turcz*; Rosmarinic acid; HPLC-DAD; Orthogonal test

泽兰为唇形科植物毛叶地瓜儿苗(*Lycopus Lucidus Turcz*)干燥的地上部分,被收录于 2010 年版中国药典一部。泽兰分布于我国大部分地区,具有活血调经,祛瘀消痈,利水消肿的功效,用于月经不调,经闭,痛经,产后瘀血腹痛,疮痈肿毒,水肿腹水^[1]。药理研究表明,泽兰具有免疫、抑菌、抗癌、抗氧化、抗炎及抗抑郁等^[2-5]药理作用。化学成分

研究表明,泽兰主要含有酚酸类和黄酮类化学成分^[6-10],其中迷迭香酸含量较高。迷迭香酸具有抑菌、抗炎、抗病毒和抗抑郁等药理作用。为更好地利用泽兰中的迷迭香酸,本实验对迷迭香酸的提取工艺进行了研究。

1 实验材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪 Shimadzu LC-20AT,配有双泵,SIL-20A 自动进样器,CTI-20AC 柱温箱,SPD-

* [基金项目] 济宁医学院博士启动基金(JY14QD 05)

▲ [作者简介] 聂其婷,济宁医学院 2011 级学生

△ [通信作者] 任强, E-mail: renqiangimm@gmail.com

M20A 检测器, LC solution 数据处理工作站; TSKgel ODS-100V (150mm × 4.6 mm, 3.0 μm) 色谱柱; 电子天平 (准确至千分之一, 北京赛多利斯科学仪器有限公司); KQ-500DB 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 溶剂过滤器 (天津津腾公司); 循环水真空泵 (郑州科创仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

泽兰 (*Lycopus Lucidus Turcz*) 购自日照紫光大药房, 由济宁医学院中药教研室王建安副教授鉴定为真品。迷迭香酸对照品购于春秋生物公司 (纯度大于 98%)、无水乙醇 (分析纯)、甲醇 (分析纯)、乙腈 (色谱级) 购于 Burdick & Jackson 公司, 去离子水, 购于杭州娃哈哈有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: TSKgel ODS-100V (150mm × 4.6 mm, 3.0 μm); 流动相: A 为水 (0.1% 冰醋酸), B 为乙腈, 梯度洗脱 0 ~ 30 min 10% ~ 50%; 30 ~ 32 min 50% ~ 95%; 32 ~ 38 min 95%; 38 ~ 40 min 95% ~ 10%; 40 ~ 46 min 10%; 流速 1.0 ml/min, 柱温: 30℃, 检测波长设为 328 nm。

2.2 供试品溶液的制备

取泽兰样品约 0.1 g, 精密称定, 置于 2 ml 离心管中, 精密加入 50% 乙醇溶液 2 ml, 称定重量, 密塞, 室温下静置 15 min 后, 在功率 198 W 下超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 乙醇补足减失的重量, 12000 r/min 转速离心 15 min 后取清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系的考察 取迷迭香酸标准品约 10 mg, 精密称定, 置于 10 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解稀释并定容至刻度, 摇匀, 得到约 1000 μg/ml 的对照品储备液。用甲醇溶液按一定比例稀释, 得到系列浓度的对照品标准曲线溶液 (25 μg/ml、50 μg/ml、100 μg/ml、125 μg/ml、250 μg/ml、500 μg/ml)。按浓度由低到高的“2.1”色谱条件进行 HPLC-DAD 色谱分析。以峰面积 Y 为纵坐标, 以浓度 X 为横坐标。按最小二乘法进行标准曲线的拟合, 得标准曲线线性回归方程和线性相关系数 R 值。得到迷迭香酸的回归方程 $Y = 13474X + 21712$, 线性相关系数 r 大于 0.999。表明迷迭香酸

在 25 ~ 500 μg/ml 浓度下有良好的线性关系。

2.3.2 精密度的试验 取“2.3.1”项下 1000 μg/ml 对照品溶液适量, 稀释至 100 μg/ml, 在 328 nm 的波长下重复测定 6 次峰面积。结果平均峰面积为 1352534, RSD 为 1.5%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性的试验 取同一份泽兰样品称取 5 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 按照“2.2”项下供试品溶液制备方法, 在“2.1”条件下进行测定, 结果平均峰面积为 1204172, RSD 为 1.8%, 表明该方法重复性良好, 符合含量测定要求。

2.3.4 加样回收率的试验 泽兰样品 5 份, 每份约 0.05 g, 精密称定, 按照泽兰样品中迷迭香酸实际含量 1: 1 的比例加入迷迭香酸标准品。加入 1 ml 迷迭香酸标准品 (100 μg/ml), 挥干溶剂, 再精密加入 50% 乙醇溶液 2 ml。按照“2.2”项下供试品溶液制备方法处理后, 在“2.1”条件下测定峰面积, 带入标准曲线, 结果显示, 平均回收率为 107%, RSD 为 1.6%, 表明该方法对迷迭香酸成分进行含量测定准确度较高。

2.4 单因素对超声提取泽兰中迷迭香酸的影响

2.4.1 提取溶剂的考察 取泽兰样品粉末 7 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 置于离心管中, 精密加入 2 ml 40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 甲醇浸泡 15 min, 60 W 功率下超声处理 30 min, 12000 r/min 离心后, 将供试品溶液, 按“2.1”条件进行 HPLC-DAD 分析。而后在相同条件下以不同浓度乙醇为提取溶剂, 进行 HPLC-DAD 分析。328 nm 波长下, 峰面积变化如图 1 所示。由实验数据可知, 在相同条件下, 乙醇的提取效果优于甲醇, 且甲醇有毒性。乙醇在 50% 浓度条件下产率最高。

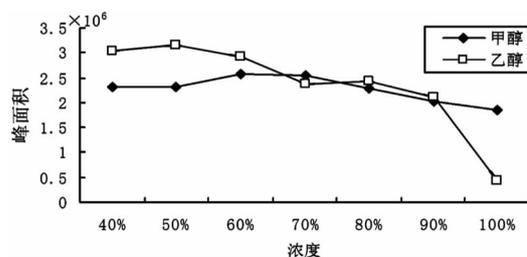


图 1 提取液对提取效率的影响

2.4.2 提取时间的考察 取泽兰粉末 4 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 精密加入 2 ml 50% 乙醇浸泡 15 min 后。在功率 60 W 条件下分别超声提取 10 min、20 min、30 min、60 min。12000 r/min 离心后按“2.1”条件进行 HPLC-DAD 分析。结果如图 2

所示,30 min 时产率最高且上升效果最明显。

2.4.3 提取功率的考察 取泽兰样品 4 份,每份约 0.1 g,精密称定,精密加入 2 ml 50 % 乙醇。浸泡 15 min 后,分别以 80 W、100 W、140 W、198 W 超声提取 20 min。12000 r/min 离心后按“2.1”条件进行 HPLC-DAD 分析。结果如图 3 所示,功率为 140 W 和 198 W 时产率较优,且上升幅度小。

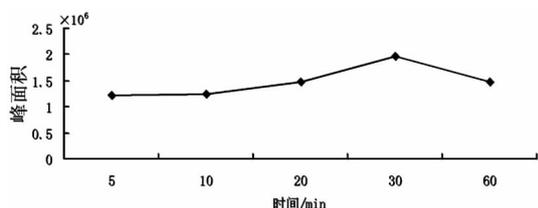


图 2 时间对提取效率的影响

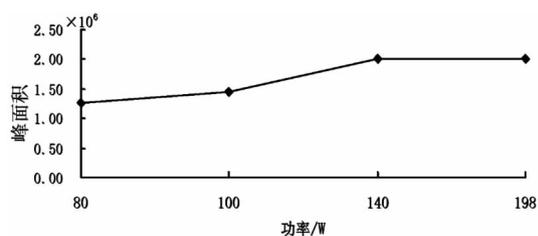


图 3 功率对提取效率的影响

2.4.4 料液比的考察 取泽兰样品 4 份,每份约 0.1 g,精密称定,按料液比为 1:50、1:30、1:15、1:10,加入适量 50 % 乙醇。室温下浸泡 15 min 后,以 60 W 功率超声提取 30 min。12000 r/min 离心后,按“2.1”进行 HPLC-DAD 分析,结果如图 4 所示。结果显示,料液比为 1:15 时提取效率最高。因而选择 1:15 为最优料液比。

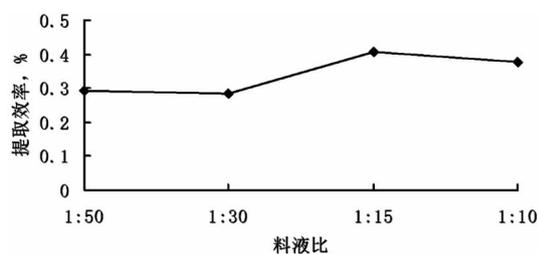


图 4 不同料液比对提取效率的影响

2.5 正交试验

2.5.1 因素水平设计 基于单因素试验结论,为更好的筛选出超声提取泽兰中迷迭香酸的最优条件,选择乙醇浓度(A)、时间(B)、功率(C)、料液比(D)四种因素,以迷迭香酸的提取效率为唯一指标,设计 L(3⁴) 正交试验,正交试验的因素水平表如表 1 所示。

表 1 因素水平表

超声波提取法 L9(3 ⁴) 因素水平表				
水平	A(乙醇浓度/%)	B(时间/min)	C(功率/W)	D(料液比 g/ml)
1	30	15	100	1:50
2	50	30	140	1:30
3	70	45	198	1:15

2.5.2 正交样品溶液的制备 分别称取泽兰样品 9 份,按 L9(3⁴) 正交表进行样品前处理,按“2.1”条件进行 HPLC-DAD 分析。

2.5.3 正交试验结果 用 L9(3⁴) 正交表进行正交试验研究,试验结果见表 2,并以迷迭香酸的提取率为指标进行极差 R 分析,各因素对泽兰中迷迭香酸提取效率的影响程度大小顺序依次为 A > C > B > D。影响含量的因素从大到小依次为乙醇浓度、料液比、功率、时间。其中料液比对提取效率影响不显著。

方差分析和 F 检验如表 3 所示,因素 A 对提取率有显著性影响;因素 B、C 对提取率的影响没有统计学意义;因素 D 影响不显著。基于节约成本、提高效率、生产方便等方面考虑,D 水平选择为 1:15。最终得最优工艺为 A₂B₂C₃D₃,即泽兰于 50 % 乙醇料液比 1:15,超声功率 198 W 下提取 30 min 提取效率最优,结果见表 3。

表 2 正交试验结果表

编号 NO	因素				迷迭香酸 提取效率/%
	A	B	C	D	
①	1	1	1	1	0.27
②	1	2	2	2	0.28
③	1	3	3	3	0.29
④	2	1	2	3	0.33
⑤	2	2	3	1	0.40
⑥	2	3	1	2	0.37
⑦	3	1	3	2	0.36
⑧	3	2	1	3	0.39
⑨	3	3	2	1	0.33
K ₁	0.840	0.960	1.029	0.999	
K ₂	1.101	1.071	0.939	1.011	
K ₃	0.990	0.990	1.050	1.011	
k ₁	0.280	0.320	0.343	0.333	
k ₂	0.367	0.357	0.313	0.337	
k ₃	0.330	0.330	0.350	0.337	
R	0.087	0.036	0.037	0.004	

表 3 方差分析表

方差来源	偏差平方和	自由度	F	F 检验临界 $\alpha = 0.10$	P
A	0.011	2	3.112	0.3110	<0.05
B	0.001	2	0.444	0.3110	>0.05
C	0.003	2	0.446	0.3110	>0.05
D	0.001	2	0.001	0.3110	>0.05
误差	0.030	8			

2.6 验证试验

为进一步验证优选方法的可靠性,按优选得到的工艺条件进行验证试验,结果 3 份样品迷迭香酸的平均提取率为 0.41%,RSD 为 0.11%。由此可知,在最优试验工艺条件下,迷迭香酸含量相近,表明该工艺稳定。

3 讨论

迷迭香酸的极性相对较大,在 50% 乙醇溶液提取条件下,可保证提取效率较高,稳定性更好。而提取方法方面,超声提取法比加热回流提取方法更为便捷,且提取效果良好,所以采用超声波提取法。通过对供试品溶液进行 HPLC-DAD 分析,而后以迷迭香酸标准品为对照品,对其中的迷迭香酸进行定量分析,使得分析结果较为准确,能够较好的确定泽兰中迷迭香酸含量。确定好分析条件后,首先进行单因素实验,确定温度、时间、功率、料液比对提取效率的影响,粗略优选出一系列条件。进而,根据正交试验进一步以浓度、时间、功率、料液比四种因素水平设计 $L9(3^4)$ 的正交试验。最终确定出超声提取泽兰中迷迭香酸含量的最优条件为:料液比为 1:15 以 50% 浓度乙醇在 198 W 功率下超声提取 30 min。本实验建立的方法操作简便,具有良好的稳定性、精确度和重现性。能够较好地对待泽兰中的迷迭香酸进行定性、定量分析。对今后泽兰中主要有效成份的鉴定以及迷迭香酸的提取生产有积极意义。

(上接第 72 页)

参考文献:

- [1] 张秋生,戈文鲁,兰迎春.论医学人文教育视野中的美学教育[J].医学与哲学,2012,33(3):66-67,73
- [2] 彭加勒.科学与方法[M].沈阳:辽宁教育出版社,2000:7-8.

参考文献:

- [1] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科出版社,2010:212.
- [2] Yang X, Lv Y, Tian L, et al. Composition and systemic immune activity of the polysaccharides from an herbal tea (*Lycopus lucidus* Turcz) [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(10):6075-6080. DOI:10.1021/jf101061y.
- [3] Yu J Q, Lei J C, Zhang X Q, et al. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel [J]. Food Chem, 2011, 126(4):1593-1598. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.12.027.
- [4] Lu Y H, Huang J H, Li Y C, et al. Variation in nutritional compositions, antioxidant activity and microstructure of *Lycopus lucidus* Turcz. root at different harvest times [J]. Food Chem, 2015, 183(15):91-100. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.03.033.
- [5] Murata T, Watahiki M, Tanaka Y, et al. Hyaluronidase inhibitors from Takuran, *Lycopus lucidus* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2010, 58(3):394-397.
- [6] Malik A, Yuldashev M P. Flavonoids of *lycopus lucidus* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2002, 38(1):104-105. DOI:10.1023/A:1015762605965.
- [7] Malik A, Yuldashev M P, Obid A, et al. Flavonoids of the aerial part of *lycopus lucidus* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2002, 38(6):612-613. DOI:10.1023/A:1022667611501.
- [8] 孙连娜,陈万生,陶朝阳,等.泽兰化学成分的研究(II)[J].解放军药学报,2004,20(3):172-174.
- [9] 王涛,李超,濮社班,等.泽兰的化学成分研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):83-85. DOI:10.3969/j.issn.1005-9903.2012.05.026.
- [10] 孙连娜,陈万生,陶朝阳,等.泽兰化学成分的研究(I)[J].第二军医大学学报,2004,25(9):1029-1030.
- [11] 李艳芝,付英杰,王建安,等.枸骨叶中芦丁的提取及含量测定.济宁医学院学报,2014,37(2):88-90. DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.02.004

(收稿日期 2015-12-16)

- [3] 康齐力.在审美教育中提升医学生道德人格[J].中国医学伦理学,2008,21(6):112-113. DOI:10.3969/j.issn.1001-8565.2008.06.049.
- [4] 王卫平.关于高等医学院校实施医学审美教育的几点思考[J].中国高等医学教育,2004,3:26-27. DOI:10.3969/j.issn.1002-1701.2004.03.013.

(收稿日期 2015-01-09)