

# 正交试验优化溪黄草中咖啡酸和迷迭香酸的超声提取工艺

陈玲玲<sup>1</sup>, 朱德全<sup>1</sup>, 蔡月娥<sup>1</sup>, 黄松<sup>1,2\*</sup>, 陈建南<sup>1,2</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

**[摘要]** 目的: 优化溪黄草中咖啡酸与迷迭香酸的超声提取工艺。方法: 采用 HPLC 测定溪黄草中咖啡酸与迷迭香酸含量, 以咖啡酸与迷迭香酸提取率为指标, 在单因素试验基础上, 通过  $L_9(3^4)$  正交试验考察提取溶剂、料液比、提取时间对工艺的影响。结果: 最佳提取工艺条件为加 20 倍量 30% 乙醇超声提取 40 min。结论: 优选的工艺简单、经济、提取率高, 可为中药溪黄草的开发利用提供参考。

**[关键词]** 溪黄草; 咖啡酸; 迷迭香酸; 正交试验; 超声提取; HPLC

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0012-03

**[doi]** 10.11653/syjf2013120012

## Optimization of Ultrasonic Extraction Technology of Caffeic Acid and Rosmarinic Acid from *Isodon lophanthoides* by Orthogonal Test

CHEN Ling-ling<sup>1</sup>, ZHU De-quan<sup>1</sup>, CAI Yue-e<sup>1</sup>, HUANG Song<sup>1,2\*</sup>, CHEN Jian-nan<sup>1,2</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Institute of Mathematical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523808, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrasonic extraction technology of caffeic acid and rosmarinic acid from *Isodon lophanthoides*. **Method:** A HPLC method was established to determine the content of caffeic acid and rosmarinic acid in *I. lophanthoides*. With yield of caffeic acid and rosmarinic acid as indexes, based on single factor test, extraction technology was optimized by  $L_9(3^4)$  orthogonal test by screening extraction solvent, material-liquid ratio, extraction time as factors. **Result:** Optimal ultrasonic extraction conditions were as follows: extracted 40 min with 20 times the amount of 30% ethanol. **Conclusion:** This optimized extraction technology was simple and economical with high extraction rate, it could provide a reference for development and utilization of *I. lophanthoides*.

**[Key words]** *Isodon lophanthoides*; caffeic acid; rosmarinic acid; orthogonal test; ultrasonic extraction; HPLC

溪黄草性味苦、甘、寒, 归肝、胆经, 具有清热利湿、退黄、凉血散瘀的功效, 用于治疗湿热黄疸、湿热泻痢、跌打瘀痛、肠炎等症<sup>[1-2]</sup>。咖啡酸、迷迭香酸为溪黄草、线纹香茶菜及其变种均含有的共有水溶

性活性成分, 均具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗菌、抗血栓的药理作用。

超声提取分离是利用超声技术特有的性质和原理进行提取的新工艺。超声振动可使溶剂快速地进入固体物质中, 将物质中所含有机成分尽可能完全地溶于溶剂中。该技术已被广泛运用于中药有效成分的提取、分离与制备工艺中<sup>[3]</sup>。段志芳等<sup>[4]</sup>曾采用超声波法提取溪黄草总黄酮, 但未见超声波法提取溪黄草及其他药材中咖啡酸和迷迭香酸的相关报道。本实验采用超声提取技术从溪黄草中提取咖啡酸、迷迭香酸, 通过正交试验优化溪黄草中咖啡酸与

**[收稿日期]** 20121202(011)

**[基金项目]** 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2012BAI29B00)

**[第一作者]** 陈玲玲, 在读硕士, 从事中药新药开发研究, E-mail: llmchen@126.com

**[通讯作者]** \* 黄松, 博士, 副研究员, 从事中药新药开发研究, Tel: 020-32503212, E-mail: hsl318@yahoo.com.cn

迷迭香酸的提取工艺,为继续深入研究溪黄草提供实验依据。

## 1 材料

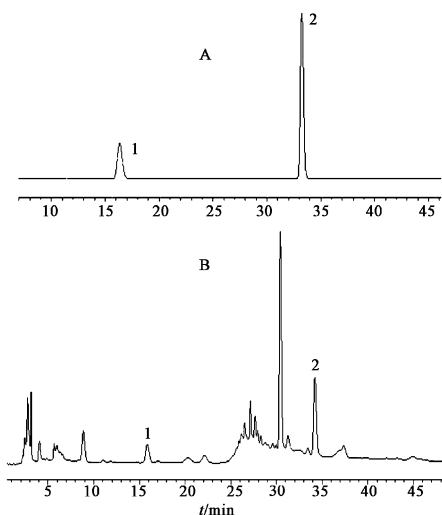
LDRO-250 型实验室专用超纯水机(重庆利迪现代水技术设备有限公司),KTS-DK98-II A 型电热恒温水浴锅(北京鸿睿天维科技有限责任公司),VGT-2013QTD 型超声清洗仪(固特国际(香港)集团有限公司),BP110s 型 1/万电子天平、CP2250 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司),UV-1 型高效液相色谱仪(日本岛津)。

咖啡酸、迷迭香酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110885-200102,111871-201102),狭基线纹香茶菜[南轩药业,经广州中医药大学新药开发研究中心陈建南教授鉴定为为唇形科香茶菜属植物线纹香茶菜 *Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) Hara. 的干燥地上部分],甲醇、乙腈为色谱醇,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定

**2.1.1 色谱条件** Dikma Diamonsil (2)  $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m),流动相乙腈(A)-0.3% 磷酸(B)梯度洗脱(0 ~ 17 min, 12% A; 17 ~ 20 min, 12% A ~ 25% A; 20 ~ 50 min, 25% A),流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 329 nm,柱温室温,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 咖啡酸; 2. 迷迭香酸

图 1 狭基线纹香茶菜 HPLC

**2.1.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取咖啡酸、迷迭香酸对照品 2.27, 10.96 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 制成 0.227, 1.096 g · L<sup>-1</sup> 的混合溶液, 即得。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取本品(过四号筛)

1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 20 mL, 称定质量, 超声提取 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.1.4 标准曲线的绘制** 精密吸取混合对照品溶液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 进样 3 次, 每次 20  $\mu$ L, 以进样质量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程  $Y_{\text{咖啡酸}} = 4.0 \times 10^6 X - 101\ 826$  ( $r = 1.00$ ),  $Y_{\text{迷迭香酸}} = 2.0 \times 10^6 X - 134\ 274$  ( $r = 0.999\ 6$ ), 咖啡酸、迷迭香酸依次在 0.045 4 ~ 0.908 0, 0.219 2 ~ 4.384 0  $\mu$ g 呈良好线性关系。

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液 20  $\mu$ L, 按 2.1.1 项下色谱条件进行 HPLC 分析, 平行测定 5 次, 结果咖啡酸与迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.63%, 0.29%, 表明仪器精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液, 于 0, 4, 8, 12, 24 h 各进样 20  $\mu$ L, 结果咖啡酸与迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.63%, 0.29%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.1.7 重复性试验** 精密称取同一样品 5 份, 每份 1.0 g, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 进样 20  $\mu$ L, 结果咖啡酸与迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 1.74%, 0.90%, 表明该方法重复性较好。

**2.1.8 加样回收率试验** 取已知含量的同一溪黄草药材粗粉(咖啡酸 0.168 5 mg · g<sup>-1</sup>) 6 份, 各约 0.30 g, 精密称定, 分别精密加入咖啡酸(0.227 g · L<sup>-1</sup>) 0.40 mL; 取已知含量的同一溪黄草药材粗粉(迷迭香酸 0.959 8 mg · g<sup>-1</sup>) 6 份, 各约 0.20 g, 精密称定, 分别精密加入迷迭香酸对照品溶液(1.096 g · L<sup>-1</sup>) 0.40 mL, 按 2.1.3 项下方法制备供试液, 计算加样回收率。结果咖啡酸的平均回收率 98.06%, RSD 0.79%; 迷迭香酸的平均回收率 99.63%, RSD 1.60%。

### 2.2 单因素试验考察

**2.2.1 提取溶剂** 取溪黄草粉末(过四号筛) 1.0 g 置 100 mL 具塞锥形瓶中。固定料液比 1:20, 提取时间 20 min, 提取温度为超声自然水温, 分别选取体积分数为 30%, 50%, 70%, 80%, 95% 的乙醇进行超声提取。结果迷迭香酸提取量分别为 1.496, 1.785, 1.802, 1.832, 0.890, 咖啡酸依次为 0.298, 0.203, 0.201, 0.196, 0.176, 故选择 50% 乙醇。

**2.2.2 料液比** 取溪黄草粉末(过四号筛) 1.00 g, 置 100 mL 具塞锥形瓶中。固定乙醇体积分数

50%, 提取时间 20 min, 提取温度为超声自然水温, 分别选取料液比 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 进行超声提取。结果迷迭香酸提取量分别为 2.887, 3.125, 3.264, 3.359, 3.276 g, 咖啡酸依次为 0.226, 0.269, 0.326, 0.332, 0.359, 故选择料液比 1:20。

**2.2.3 提取时间** 称取溪黄草粉末(过四号筛) 1.0 g 置 100 mL 具塞锥形瓶中。固定乙醇体积分数 50%, 料液比 1:20, 提取温度为超声自然水温, 分别超声提取 20, 40, 60, 80 min, 结果迷迭香酸提取量分别为 1.578, 1.605, 1.722, 1.625 g, 咖啡酸依次为 0.178, 0.182, 0.193, 0.192 g, 故选择超声时间 60 min。

**2.3 正交试验** 选取超声时间、加醇量、乙醇体积分数为考察因素, 每个因素取 3 个水平, 进行  $L_9(3^4)$  正交试验, 以咖啡酸和迷迭香酸含量的总和为指标, 确定最佳提取工艺条件。因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 溪黄草中咖啡酸与迷迭香酸的超声提取工艺正交试验因素水平

水平	A 超声时间/min	B 加醇量/倍	C 乙醇体积分数/%
1	20	10	30
2	40	20	50
3	60	30	70

表 2 溪黄草中咖啡酸与迷迭香酸的超声提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	咖啡酸 /%	迷迭香酸 /%	综合评分
1	20	10	30	0.015	0.272	1.484
2	20	20	50	0.016	0.274	1.526
3	20	30	70	0.016	0.267	1.518
4	40	10	50	0.019	0.316	1.786
5	40	20	70	0.019	0.327	1.789
6	40	30	30	0.023	0.310	1.941
7	60	10	70	0.016	0.316	1.666
8	60	20	30	0.019	0.318	1.795
9	60	30	50	0.022	0.329	1.930
$K_1$	4.527	4.936	5.220			
$K_2$	5.516	5.110	5.241			
$K_3$	5.392	5.390	4.973			
R	0.329	0.152	0.089			

注:综合评分 = 咖啡酸/最大值 + 迷迭香酸/最大值。

由直观分析可知, 各因素对溪黄草提取工艺的影响顺序为  $A > B > C$ 。方差分析表明 A 因素为影响超声提取的显著因素, B, C 因素的影响则无统计学意义。结合生产成本及提取率等考虑, 确定最佳超声提取工艺为  $A_2B_2C_1$ , 即加 20 倍量 30% 乙醇超

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	P
A	0.190	2	104.281	<0.05
B	0.039	2	18.901	>0.05
C	0.018	2	7.991	>0.05
D(误差)	0.002	2		

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

声提取 40 min。

**2.4 验证试验** 精密称取溪黄草粗粉(过四号筛) 3 份, 每份 1.00 g, 按优选的提取工艺提取。结果测得提取液中咖啡酸得率分别为 0.022%, 0.022%, 0.022%; 迷迭香酸得率分别为 0.374%, 0.374%, 0.362%。

### 3 讨论

流动相尝试使用了 15% 乙腈-0.3% 磷酸, 18% 乙腈-0.3% 磷酸, 20% 乙腈-0.3% 磷酸, 40% 甲醇-0.3% 磷酸, 35% 甲醇-0.3% 磷酸进行等度洗脱, 结果发现等度洗脱对分离溪黄草中咖啡酸和迷迭香酸的效果不是非常理想, 故选用乙腈-0.3% 磷酸进行梯度洗脱。

曾考察提取次数对溪黄草中咖啡酸与迷迭香酸提取率的影响, 结果显示提取 1 次和 2 次相差不大。本实验采用超声波法提取, 具有耗能低、省时、提取率高等优点, 为节省生产成本、降低能耗和工业合理化生产提供实验依据。

### [参考文献]

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第 1 册[M]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 204.
- [2] 陈建南, 赖小平, 刘念. 广东溪黄草的基源植物调查及商品鉴定[J]. 中药材, 1996, 19(2): 73.
- [3] 郭孝武. 超声技术在中草药成分提取中的应用[J]. 中草药, 1993, 24(10): 548.
- [4] 段志芳, 梁盛年, 谭细雪. 溪黄草黄酮的超声波法提取与活性研究[J]. 应用化工, 2007, 36(3): 232.
- [5] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 1996: 886.
- [6] 谢兴亮, 盛艳梅. 溪黄草的研究进展[J]. 医药导报, 2011, 30(4): 494.
- [7] Sun W J, Sheng J F. Concise hand book for natural active products [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Sciences and Technology Publishing House, 1998: 268.
- [8] 王琿, 张振伙. HPLC 波长切换法同时测定迷迭香中咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 116.

[责任编辑 全燕]