

# 响应面法优化康定鼠尾草中迷迭香酸提取工艺

迟晓峰 董琦 胡风祖\*

中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室 西宁 810008

**摘要:** 利用单因素实验和响应面法优化康定鼠尾草中迷迭香酸提取工艺。采用高效液相色谱法测定迷迭香酸含量,以提取率为参考指标。通过单因素实验筛选出料液比、提取时间和乙醇浓度三个主要因素,通过 Box-Behnken 设计方案,建立迷迭香酸提取得率的二次回归方程,得到优化组合条件。最佳提取条件为乙醇浓度 40%,液固比 15:1,提取时间 50 min。最佳提取条件下,迷迭香酸提取得率为 12.30 mg/g。优化得到的康定鼠尾草中迷迭香酸的提取工艺合理,操作可行,质量稳定。

**关键词:** 康定鼠尾草; 迷迭香酸; 响应面法

中图分类号: R915

文献标识码: A

## Optimization of Extraction Technology for Rosmarinic Acid from *Salvia prattii* Hemsl. by Response Surface Analysis

CHI Xiao-feng, DONG Qi, HU Feng-zu\*

Key Laboratory of Tibetan Drug Research, the Chinese Academy of Sciences Northwest Institute of Plateau Biology of Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

**Abstract:** The extraction technology for rosmarinic acid from *Salvia prattii* Hemsl. was optimized by single factor tests and response surface analysis. The content of rosmarinic acid was determined by HPLC and the extraction yield of rosmarinic acid was used as the investigation index. In order to obtain the maximum of extraction yield of rosmarinic acid, three main factors including ratio of solid to liquid, extraction time and concentration of ethanol were selected through single factor tests and further optimized using response surface analysis with Box-Behnken design. As a result, a quadric regression equation for predicting the yield of rosmarinic acid was established. The optimal extraction conditions were determined to be: 1:15 as ratio of solid to liquid, 40% of alcohol as extraction solvent and extract for 50 min. Under these conditions, the extraction yield of rosmarinic acid was 12.30 mg/g. The optimal extraction condition was proved to be stable and feasible for the extraction of rosmarinic acid from *S. prattii*.

**Key words:** *Salvia prattii* Hemsl.; rosmarinic acid; response surface analysis

康定鼠尾草 (*Salvia prattii* Hemsl.) 为唇形科鼠尾草属植物,产四川西部、西北部、青海省南部;分布于海拔 3750 ~ 4000 m 的山坡草地上<sup>[1]</sup>。迷迭香酸 (rosmarinic acid, Ros A 分子式  $C_{18}H_{16}O_8$ ) 是由一份子咖啡酸和一分子 3,4-二羟基苯基乳酸 (即丹参素) 的缩合物,为有活性的水溶性的多酚类化合物。迷迭香酸具极强的清除体内自由基的活性和抗氧化作用<sup>[2]</sup>; 抗血栓作用<sup>[3]</sup>; 以及抑制 HIV-1 逆转录酶的活性<sup>[4]</sup>。初步实验发现,康定鼠尾草中迷迭香酸含量较高,有较大开发利用价值,因此,本实验采用

响应面分析法对主要因素进行优化,确定较优的提取工艺方法,为大批量生产提供科学的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

康定鼠尾草根采自青海省玉树自治州,经中国科学院西北高原生物研究所陈世龙研究员鉴定为唇形科植物康定鼠尾草 (*Salvia prattii* Hemsl.)。迷迭香酸对照品由上海同田生物技术有限公司提供,甲醇为色谱纯和优级纯,  $H_3PO_4$ 、无水乙醇,均为分析纯。

美国 Waters 515 型高效液相色谱仪; 二元梯度泵, Waters 2996 紫外检测器, EMPOWER 色谱工作站; KQ-100E 型超声波清洗器 (昆山超声仪器科技

收稿日期: 2013-04-22

修改日期: 2013-09-05

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-EW-J-26)

\* 通讯作者 Tel: 86-971-6132750; E-mail: hufz@nwipb.ac.cn

有限公司); MOLELEMENT 元素型超纯水机(上海摩勒生物科技有限公司)。

## 1.2 迷迭香酸的测定

### 1.2.1 标准溶液的配制

准确称取迷迭香酸标准品 2.29 mg,用甲醇溶解,定容于 10 mL 的容量瓶,其质量浓度为 0.229 mg/mL。

### 1.2.2 色谱条件

LiChrospher C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm i. d., 5 μm);流动相:甲醇:水(0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) = 40:60;紫外检测波长:330 nm;流速:1 mL/min;进样量:10 μL;柱温:30 °C。

### 1.2.3 样品测定

分别制备不同的康定鼠尾草供试品,精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,测定样品中迷迭香酸的含量。样品和对照品的 HPLC 色谱图见图 1。

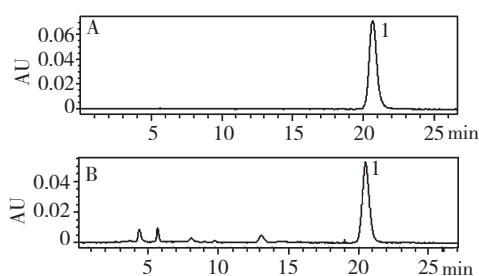


图 1 样品与对照品色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance and samples

A: 对照品(reference substance); B: 康定鼠尾草(*S. prattii*); 1: 迷迭香酸(rosmarinic acid)

## 1.3 单因素实验

在进行响应面分析之前,先通过单因素实验选出对康定鼠尾草中迷迭香酸提取得率具有显著影响的因素,并确定其实验水平。本文考察不同乙醇浓度、液料比、提取时间和提取次数对康定鼠尾草中迷迭香酸提取得率的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 迷迭香酸测定方法学考察

#### 2.1.1 精密度实验

准确吸取混合标准溶液 10 μL,重复进样 5 次,测得各标准峰面积,计算 RSD 值为:0.93%。实验表明,在该条件下精密度良好。

#### 2.1.2 重现性实验

精密吸取同一批样品溶液,进样 6 次,测定样品

中迷迭香酸的量。测得各峰面积,计算 RSD 值为:1.19%。实验表明,迷迭香酸的测定结果重现性良好。

#### 2.1.3 稳定性实验

取同一批供试品溶液,按含量测定法分别在 0、4、8、12、24 h 进样,测定样品中迷迭香酸的含量。测定各目的峰面积,计算 RSD 为:0.87%。实验表明,供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

#### 2.1.4 回收率实验

准确称取 0.500 g 的样品 9 份,取 1.2.1 述标准溶液依次加 50、100、150 μL 于每 3 份样品中,按样品的测定方法提取及测定。以 9 次测定的平均值计算回收率分别为:100.3%,RSD 为 1.9%。

## 2.2 单因素实验结果

### 2.2.1 乙醇浓度对迷迭香酸提取得率的影响

设定液料比 15:1、超声 60 min、温度 20 °C、提取次数为两次的条件下,不同乙醇浓度对迷迭香酸得率的影响。结果表明,随着乙醇浓度的提高,迷迭香酸得率呈上升趋势,当乙醇浓度达到 40% 时迷迭香酸得率最大,之后随着浓度的增加,得率反而降低。因此选择 40% 左右乙醇浓度作为较佳的提取溶剂。

### 2.2.2 液料比对迷迭香酸提取得率的影响

设定乙醇浓度 40%、超声 60 min、温度 20 °C、提取次数为两次的条件下,不同液料比对迷迭香酸得率的影响。结果表明,迷迭香酸得率随着溶剂量的增加而增加,这是由于溶剂用量增加,药材与溶剂接触面增加,有利于扩散速度的提高。在液料比达到 15:1 后,迷迭香酸含量提取得率基本保持不变。由此确定迷迭香酸提取的液料比以 15:1 为宜。

### 2.2.3 提取时间对迷迭香酸提取得率的影响

设定乙醇浓度 40%、液料比 15:1、温度 20 °C、提取次数为两次的条件下,不同超声时间对迷迭香酸得率的影响。结果表明,超声 10 ~ 50 min 内迷迭香酸得率呈上升趋势,然后随时间的延长含量基本不变。由 Fick 扩散定律可知得率与提取时间呈正比,在一定条件下,超声时间越长得率越高;但时间太长会使扩散次数降低,反而影响迷迭香酸的得率,因此,本实验选择超声时间为 50 min。

### 2.2.4 提取次数对迷迭香酸提取得率的影响

设定乙醇浓度 40%、液料比为 15:1、超声 60 min、温度 20 °C 的条件下,不同提取次数对迷迭香酸得率的影响。结果表明,提取两次后,迷迭香酸含量

提取得率基本保持不变。由此确定迷迭香酸提取的次数以两次为宜。

### 2.3 响应面实验及其结果

#### 2.3.1 响应面方案设计

根据单因素初筛试验结果, 分别确定乙醇浓度、液料比、提取时间为因素, 每个因素三个水平进行实验, 因素水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 因素及水平安排表

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

水平 Level	X <sub>1</sub> / 料液比 Solid to liquid ratio	X <sub>2</sub> / 提取时间 Extraction time	X <sub>3</sub> / 乙醇浓度 Ethanol concentration
-1	10	40	20
0	15	50	40
1	20	60	60

#### 2.3.2 响应面分析结果

取康定鼠尾草干燥根, 精密称定, 由 Box-Behnken 设计方案所得的试验条件进行试验, 实验结果见表 2。

采用 Design-Expert7.0 软件对表 2 结果进行响应面回归分析, 得拟合方程  $Y = -77.77817 + 0.75745 \times X_1 + 0.38609 \times X_2 + 1.49770 \times X_3 - 0.00075875 \times X_1 \times X_2 + 0.0008375 \times X_1 \times X_3 - 0.0016125 \times X_2 \times X_3 - 0.00777042 \times X_1^2 - 0.00122385 \times X_2^2 - 0.094698 \times X_3^2$ , 对该方程的回归分析和方差如表 3 所示。

由表 3 可以看出, 方程的因变量和自变量之间线性关系明显, 该模型和失拟项均显著, 并且该模型的  $R^2 = 0.9897$ , 表明该二次回归得到的迷迭香酸提取率模型与实际拟合较好, 符合度为 98.97%, 表明使用该方程模拟实际的三因素三水平的分析是可行的。同时由 F 值得大小可以推断, 在所选择的实验范围内, 3 个因素对迷迭香酸提取率影响的排列顺序为: 乙醇浓度 (X<sub>3</sub>) > 提取时间 (X<sub>2</sub>) > 料液比 (X<sub>1</sub>)

表 2 Box-Behnken 设计方案及响应值

Table 2 Box-Behnken design and response values

编号 No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	迷迭香酸提取率 Extraction yield of rosmarinic acid (mg/g)
1	-1	-1	0	12.30
2	-1	1	0	4.80
3	1	-1	0	4.36

4	1	1	0	9.35
5	0	-1	-1	12.27
6	0	-1	1	9.99
7	0	1	-1	11.36
8	0	1	1	9.87
9	-1	0	-1	9.24
10	1	0	-1	10.81
11	-1	0	1	4.78
12	1	0	1	10.04
13	0	0	0	11.38
14	0	0	0	10.71
15	0	0	0	4.63

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression equation

参数 Parameter	自由度 df	平方和 SS	均方 MS	F 值 F value	P 值 (Prob > F) P value
X <sub>1</sub>	1	6.133	11.133	87.908	0.0018
X <sub>2</sub>	1	7.021	7.021	70.906	0.0037
X <sub>3</sub>	1	16.035	6.035	90.446	0.0003
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	1	4.971	6.971	108.103	0.0022
X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>	1	7.557	6.557	62.310	0.0018
X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>	1	8.914	8.914	76.619	0.0059
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	7.746	7.746	71.873	0.0053
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	10.210	12.210	96.103	0.0025
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	19.543	12.543	72.124	0.0005
Model	9	79.693	8.47	74.477	0.0070
Lack of fit	3	0.162	0.018	0.12	0.9024
Pure error	4	1.656	0.44		
Cor. Total	16	86.249			
R <sup>2</sup>		0.9897			

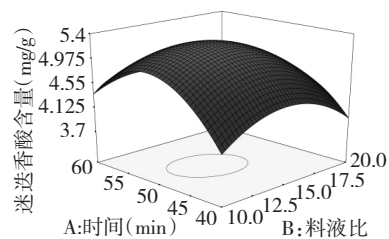


图 2 时间和料液比对迷迭香酸得率的影响

Fig. 2 Response surface plot showing the effects of extraction time and solid-liquid ratio on extraction yield of rosmarinic acid

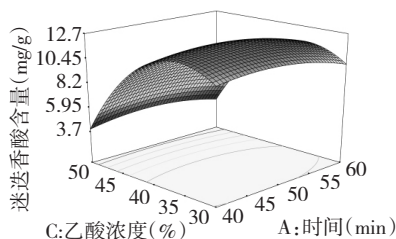


图3 时间和乙醇浓度对迷迭香酸得率的影响

Fig. 3 Response surface plot showing the effects of extraction time and ethanol concentration on extraction yield of rosmarinic acid

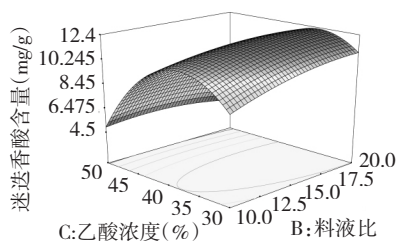


图4 料液比和乙醇浓度对迷迭香酸得率的影响

Fig. 4 Response surface plot showing the effects of solid-liquid ratio and ethanol concentration on extraction yield of rosmarinic acid

响应面图形是响应值对各因素 (X1、X2、X3) 所构成的三维空间的曲面图,从图2~4上可形象地看出各因素交互作用对响应值的影响。比较图2~4可知,乙醇浓度对迷迭香酸得率的影响最为显著,表现为曲线较陡,乙醇浓度最佳值在40%左右;而时间和料液比次之,表现为曲线较为平滑,其最佳响应值分别在50 min和15:1左右。

#### 2.4 最优条件的确定

通过回归模型预测的迷迭香酸提取的最佳工艺

条件为:乙醇浓度38.44%,液固比15.56:1,时间50.57 min,在此条件下,迷迭香酸理论上可达12.37 mg/g。

考虑到实际操作的可行性,将迷迭香酸的提取条件在回归方程得到的理论值基础上修正为:乙醇浓度40%,液固比15:1,提取时间50 min。

### 3 结论

本实验以康定鼠尾草根为原料,对迷迭香酸进行了超声提取工艺的研究。采用响应面分析法对乙醇浓度、液固比、超声时间进行优化,确定提取溶液为40%乙醇、液固比15:1、提取50 min,在此条件下迷迭香酸提取效果最佳,迷迭香酸得率可达12.30 mg/g。通过该提取工艺的研究,为工业生产迷迭香酸提取物提供科学的参考依据。

#### 参考文献

- 1 Flora of China, Chinese Academy of Sciences Editorial Commission (中国科学院中国植物志编委会). Flora of China (中国植物志). Beijing: Science Press, 1977. Vol 66, 70-71.
- 2 Huang ZS (黄治森), Zhang JT (张均田). Antioxidant properties of three water-solubility components from *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1992, 27: 96-100.
- 3 Petersen M, Simmonds MS. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 2003, 62: 121-125.
- 4 Hooker CW, Lott WB, Harrich D. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. *J Virol*, 2001, 75: 3095-3104.

(上接第1722页)

- 21 Zhang ZR *et al.* The targeting of 14-succinate triptolide-lysosome conjugate to proximal renal tubular epithelial cells. *Biomaterials* 2009, 30: 1372-1381.
- 22 Li Z *et al.* Design and synthesis of novel C14-hydroxyl substituted triptolide derivatives as potential selective antitumor agents. *J Med Chem* 2009, 52: 5115-5123.
- 23 Xu F *et al.* Design synthesis and biological evaluation of novel water-soluble triptolide derivatives: Antineoplastic activity

against imatinib-resistant CML cells bearing T315I mutant Bcr-Abl. *Bioorg Med Chem* 2010, 18: 1806-1815.

- 24 Aoyagi Y *et al.* Semisynthesis of C-ring modified triptolide analogues and their cytotoxic activities. *Bioorg Med Chem Lett* 2006, 16: 1947-1949.
- 25 Aoyagi Y *et al.* Fluorination of triptolide and its analogues and their cytotoxicity. *Bioorg Med Chem Lett* 2008, 18: 2459-2463.