

基于响应曲面法的乳香有效部位提取纯化工艺优化研究

缪晓冬, 汤书婉, 宿树兰*, 尚尔鑫, 钱大玮, 段金廛*

南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 对乳香中乳香酸类成分提取纯化工艺进行优选。**方法** 采用 UPLC-TQ/MS 检测, 以乳香中 13 个乳香酸 (3-羰基甘遂-8,24-二烯-21-酸、3 α -乙酰甘遂-7,24-二烯-21-酸、3-羟基甘遂烷-8,24-二烯-21-酸、乙酰 11 α -甲氧基- β -乳香酸、3 α -羟基甘遂烷-7,24-二烯-21-酸、11-酮基乳香酸、3-*O*-乙酰基- α -乳香酸、3 α -乙酰氧基-羊毛甾-8,24-二烯-21-酸、3 β -乙酰氧基-5 α -8,24-羊毛甾二烯-21-酸、3-乙酰基-11-酮基- β -乳香酸、3-乙酰基甲氧基甘遂-8,24-二烯-21-羧酸、 α -乳香酸、 β -乳香酸) 的提取量及浸膏得率为评价指标, 通过单因素及响应曲面法考察提取方法、提取溶剂、料液比、提取时间及提取次数对乳香提取工艺的影响; 采用碱溶酸沉法纯化乳香提取物, 并对纯化工艺参数进行单因素和正交试验考察, 确定最佳纯化工艺。**结果** 以 95%乙醇 20 倍量回流提取 4 次, 每次 62 min 为最佳提取工艺; 以碱液 pH 为 12~13 溶解, 在 0~4 °C 用酸液 pH<2 酸沉 30 min 为最佳纯化工艺, 乳香酸类成分纯度可达 73.87%。**结论** 此优选的提取纯化工艺稳定可行, 适用于乳香有效成分的提取纯化, 为其物质基础研究提供科学依据。

关键词: 乳香; 乳香酸; 提取纯化; 响应曲面; 碱溶酸沉; UPLC-TQ/MS; 3-羰基甘遂-8,24-二烯-21-酸; 3 α -乙酰甘遂-7,24-二烯-21-酸; 3-羟基甘遂烷-8,24-二烯-21-酸; 乙酰 11 α -甲氧基- β -乳香酸; 3 α -羟基甘遂烷-7,24-二烯-21-酸; 11-酮基乳香酸; *O*-乙酰- α -乳香酸; 3 α -乙酰氧基-羊毛甾-8,24-二烯-21-酸; 3 β -乙酰氧基-5 α -8,24-羊毛甾二烯-21-酸; 3-乙酰基-11-酮基- β -乳香酸; 3-乙酰基甲氧基甘遂-8,24-二烯-21-羧酸; α -乳香酸; β -乳香酸

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)05-1214-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.018

Optimization of extraction and purification process of effective components of *Olibanum* based on response surface method

MIAO Xiao-dong, TANG Shu-wan, SU Shu-lan, SHANG Er-xin, QIAN Da-wei, DUAN Jin-ao

Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae/Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To optimize the extraction and purification process of the boswellic acids components in the frankincense.

Methods The extraction amount and extract yield of 13 boswellic acids (3-oxotirucall-8,24-dien-21-oic acid, 3 α -acetoxy-tirucall-7,24-dien-21-oic acid, 3-hydroxytirucall-8,24-dien-21-oic acid, acetyl 11 α -methoxy- β -boswellic acid, 3 α -hydroxy tirucall-7,24-dien-21-oic acid, 11-keto-boswellic acid, 3-*O*-acetyl- α -boswellic acid, 3 α -acetyloxy-lanosta-8,24-dien-21-oic acid, 3 β -acetoxy-5 α -lanosta-8,24-dien-21-oic acid, 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid, 3-acetyloxy-tirucall-8,24-dien-21-oic acid, α -boswellic acid, β -boswellic acid) in frankincense were detected by UPLC-TQ/MS, the extraction method was investigated by single factor and response surface, the extraction solvent, ratio of solid to liquid, extraction time and extraction times were investigated on the extraction process, and the extract was purified by alkali dissolving acid precipitation method and the purification process parameters were investigated by single factor and orthogonal test to determine the best purification process. **Results** The optimum condition for the extraction of the

收稿日期: 2019-09-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973885); 教育部优秀人才计划项目 (NCET-13-0873); 江苏省方剂高技术研究重点实验室开放课题资助项目 (FJGJS-2015-12)

作者简介: 缪晓冬 (1994—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药化学与分析。E-mail: miaoxiaodong94111@163.com

***通信作者** 宿树兰 (1974—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源化学及方剂功效物质基础研究。E-mail: sushulan@njucm.edu.cn
段金廛 (1956—), 男, 教授, 博士生导师, 中国自然资源学会中药及天然药物资源专业委员会主任委员, 国家“973”计划首席科学家。E-mail: dja@njucm.edu.cn

frankincense is that twenty times of 95% ethanol for four times reflux extraction and 62 min for each time. Optimum purification process was as following: Dissolve in lye pH 12—13, and the solution was precipitated at 0—4 °C with pH < 2 for 30 min. The purity of boswellic acids was 73.87%. **Conclusion** The optimized extraction and purification process is stable and feasible, which is suitable for the extraction and purification of effective fraction of frankincense and beneficial to give full play to the medicinal value of frankincense and provide scientific basis for material basis research of frankincense.

Key words: *Olibanum*; boswellic acids; extraction and purification; response surface; alkali-solution and acid-isolation; UPLC-TQ/MS; 3-oxotirucall-8,24-dien-21-oic acid; 3 α -acetoxy-tirucall-7,24-dien-21-oic acid; 3-hydroxytirucall-8,24-dien-21-oic acid; acetyl 11 α -methoxy- β -boswellic acid; 3 α -hydroxy tirucall-7,24-dien-21-oic acid; 11-keto-boswellic acid; 3-O-acetyl- α -boswellic acid; 3 α -acetyloxy-lanosta-8,24-dien-21-oic acid; 3 β -acetoxy-5 α -lanosta-8,24-dien-21-oic acid; 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid; 3-acetyloxy-tirucall-8,24-dien-21-oic acid; α -boswellic acid; β -boswellic acid

乳香 *Olibanum* 为橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw. 及同属植物 *B. bhaw-dajiana* Birdw. 树皮渗出的树脂, 分为索马里乳香和埃塞俄比亚乳香。乳香辛温香窜, 善透窍以理气, 能于血中行气、舒筋活络、消肿止痛, 以行气活血为主^[1], 且具有治疗骨关节炎、类风湿性关节炎、风湿、跌打损伤等药效^[2]。临床上乳香也常与没药相须为用, 具有活血化瘀、消肿生肌之功效^[3]。目前已报道的乳香中的乳香酸类成分主要有五环三萜类、四环三萜类、大环二萜类等, 研究表明乳香酸类化合物在抗炎、抗肿瘤等方面发挥着重要作用^[4-8]。

本研究在前期工作^[9-13]基础上, 通过 UPLC-TQ/MS 联用技术对乳香中的乳香酸类成分进行含量测定, 以 13 种乳香酸类化合物为评价指标, 采用单因素实验及响应曲面法优选乳香中乳香酸的最佳提取工艺, 同时利用碱溶酸沉对其进行纯化, 以期提高乳香酸的提取率, 为乳香的物质基础研究提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Acqumity UPLC 系统 (包括四元泵溶剂系统, 在线脱气机和自动进样器)、Xevo 质谱检测器、MassLynx 4.1 质谱工作站软件, 美国 Waters 公司; KQ-250E 型超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; Anke GL-16GII 型离心机, 上海安亭科学仪器厂; EPED 超纯水系统, 南京易普达易科技发展有限公司; Sartorius BT125D 电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; 戴生高速万能粉碎机, 永康市九顺莹商贸有限公司。

1.2 试剂与材料

超纯水经易普达超纯水制备系统自制; 乙腈为色谱纯, 购自德国默克公司; 乙醇、甲醇、盐酸、NaOH、Na₂CO₃、NaHCO₃ 等化学试剂均为分析纯,

购自南京良纬生物科技有限公司。

1.3 药品

乳香批号 171010, 产自广西, 购自苏州市天灵中药饮片公司。炮制方法为醋制, 经南京中医药大学段金廛教授鉴定, 本品为橄榄科植物乳香 *Boswellia carterii* Birdw. 树皮渗出的树脂。

乳香酸对照品 3-羧基甘遂-8,24-二烯-21-酸 (**1**, 批号 18032302, 质量分数 $\geq 98\%$)、3 α -乙酰甘遂-7,24-二烯-21-酸 (**2**, 批号 15698198, 质量分数 $\geq 98\%$)、乙酰 11 α -甲氧基- β -乳香酸 (**4**, 批号 15687198, 质量分数 $\geq 98\%$)、3 α -羟基甘遂烷-7,24-二烯-21-酸 (**5**, 批号 15695198, 质量分数 $\geq 98\%$)、11-酮基乳香酸 (**6**, 批号 18032113, 质量分数 $\geq 98\%$)、3-乙酰基-11-酮基- β -乳香酸 (**10**, 批号 18032706, 质量分数 $\geq 98\%$), 均购自南京良纬生物科技有限公司; 乳香酸对照品 3-羟基甘遂烷-8,24-二烯-21-酸 (**3**, 批号 20150520, 质量分数 $\geq 95\%$)、3-O-乙酰基- α -乳香酸 (**7**, 批号 20150515, 质量分数 $\geq 98\%$)、3 α -乙酰氧基-羊毛甾-8,24-二烯-21-酸 (**8**, 批号 20150519, 质量分数 $\geq 98\%$)、3 β -乙酰氧基-5 α -8,24-羊毛甾-21-酸 (**9**, 批号 20150527, 质量分数 $\geq 98\%$)、 α -乳香酸 (**12**, 批号 20150522, 质量分数 $\geq 95\%$)、 β -乳香酸 (**13**, 批号 20150504, 质量分数 $\geq 98\%$), 均购自宝鸡辰光生物科技有限公司; 乳香酸对照品 3-乙酰基甲氧基甘遂-8,24-二烯-21-羧酸 (**11**), 质量分数 $\geq 95\%$, 实验室自制。

2 方法与结果

2.1 乳香中乳香酸类成分含量测定

2.1.1 供试品溶液制备 取药材粉末约 5 g, 精密称定, 按照不同提取因素及纯化因素提取后, 补足减少的质量, 混匀, 取提取液适量, 滤过, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 稀释 20 倍, 即得供试品溶液。

2.1.2 混合对照品溶液制备 精密称定乳香酸对照品适量,用甲醇溶解,配制成 1 mg/mL 的单一对照品溶液,分别取一定量的单一对照品溶液于 10 mL 量瓶中,并用甲醇定容至刻度,制成混合对照品溶液,其中含 **1~13** 分别为 52.4、34.0、40.8、36.5、38.8、41.6、53.2、44.0、25.9、47.2、34.0、41.2、50.4 μg/mL。

2.1.3 UPLC-TQ/MS 分析条件

(1) 色谱条件: Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 30 ℃; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 2 μL; 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱: 0~1 min, 90%乙腈; 1~3 min, 91%乙腈; 3~9 min, 92%乙腈; 9~12 min, 95%乙腈; 12~14 min, 90%乙腈; 14~15 min, 90%乙腈。

(2) 质谱条件: 采用电喷雾正、负离子源 (ESI⁺/ESI⁻), 多反应检测 (MRM 方式), 氦气体积流量 35 arb, 辅助气体积流量 15 arb, 毛细管温度 275 ℃, 喷雾电压 3.5 kV, 管透镜电压水平 65%, 毛细管电压 35 V, 扫描范围 *m/z* 100~1 000。二级质谱分析: 裂解模式: 高能诱导解离 (HCD); 隔离宽度 2.0 (*m/z*); 归一化碰撞能量 35 V; 激活时间 30 ms; 碰撞气为高纯氮气。主要质谱检测参数见表 1, 混合对照品及样品提取离子流色谱图见图 1。

2.1.4 线性关系考察 取混合对照品溶液, 分别稀释 2、4、10、20、40、100、200、400、1 000 倍, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 依次进样分析, 以峰面

积积分值为纵坐标 (*Y*), 对照品的质量浓度为横坐标 (*X*), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果分别为 **1** $Y=1\,505.1\,X+218.30$, $r=0.995\,5$, 线性范围 0.131~2.620 μg/mL; **2** $Y=6\,237.6\,X-196.19$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.085~8.500 μg/mL; **3** $Y=1\,170.5\,X+80.946$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.102~20.400 μg/mL; **4** $Y=89.219\,X+41.403$, $r=0.995\,8$, 线性范围 0.036~4~18.200 μg/mL; **5** $Y=231.34\,X+52.366$, $r=0.999\,2$, 线性范围 0.194~19.400 μg/mL; **6** $Y=13\,794\,X+4\,709.1$, $r=0.998\,1$, 线性范围 0.104~20.800 μg/mL; **7** $Y=27.255\,X+31.865$, $r=0.997\,7$, 线性范围 0.133~53.200 μg/mL; **8** $Y=2\,066.2\,X-440.74$, $r=0.991\,1$, 线性范围 0.110~4.400 μg/mL; **9** $Y=2\,209.4\,X+564.67$, $r=0.993\,8$, 线性范围 0.128~6.400 μg/mL; **10** $Y=1\,158.3\,X-546.16$, $r=0.999\,2$, 线性范围 1.330~26.600 μg/mL; **11** $Y=1\,835.3\,X+278.21$, $r=0.996\,8$, 线性范围 0.085~3.400 μg/mL; **12** $Y=1\,245.4\,X+13.079$, $r=0.999\,1$, 线性范围 0.412~4.120 μg/mL; **13** $Y=6\,859.1\,X+316.52$, $r=0.996\,6$, 线性范围 0.126~5.040 μg/mL。

2.1.5 精密度试验 取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录各对照品色谱峰。结果见表 2, 各主要色谱峰峰面积的 RSD 均小于 5.1%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 按“2.1.1”项下方法, 平行制备 6 份乳香供试品溶液, 依次进样测定, 记录样品

表 1 13 种化合物主要质谱检测参数

Table 1 Main parameters of 13 compounds detected by mass spectrometry

成分	出峰时间/min	相对分子质量	MRM 转换 (<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞电压/eV	离子模式
1	3.93	453	453.393→339.324	70	32	ESI ⁻
2	3.94	454	455.479→437.426	14	8	ESI ⁺
3	3.93	454	455.479→437.424	14	14	ESI ⁺
4	3.98	454	455.479→409.404	16	22	ESI ⁺
5	4.34	456	457.479→439.425	18	12	ESI ⁺
6	2.54	471	469.330→391.294	60	36	ESI ⁻
7	5.29	498	497.479→439.492	55	22	ESI ⁻
8	5.32	498	497.479→437.423	54	34	ESI ⁻
9	5.90	498	497.479→437.425	54	32	ESI ⁻
10	3.65	512	513.479→95.060	40	42	ESI ⁺
11	3.96	454	453.354→371.276	70	30	ESI ⁻
12	5.58	456	455.415→409.405	50	22	ESI ⁻
13	6.18	456	455.415→377.356	44	30	ESI ⁻

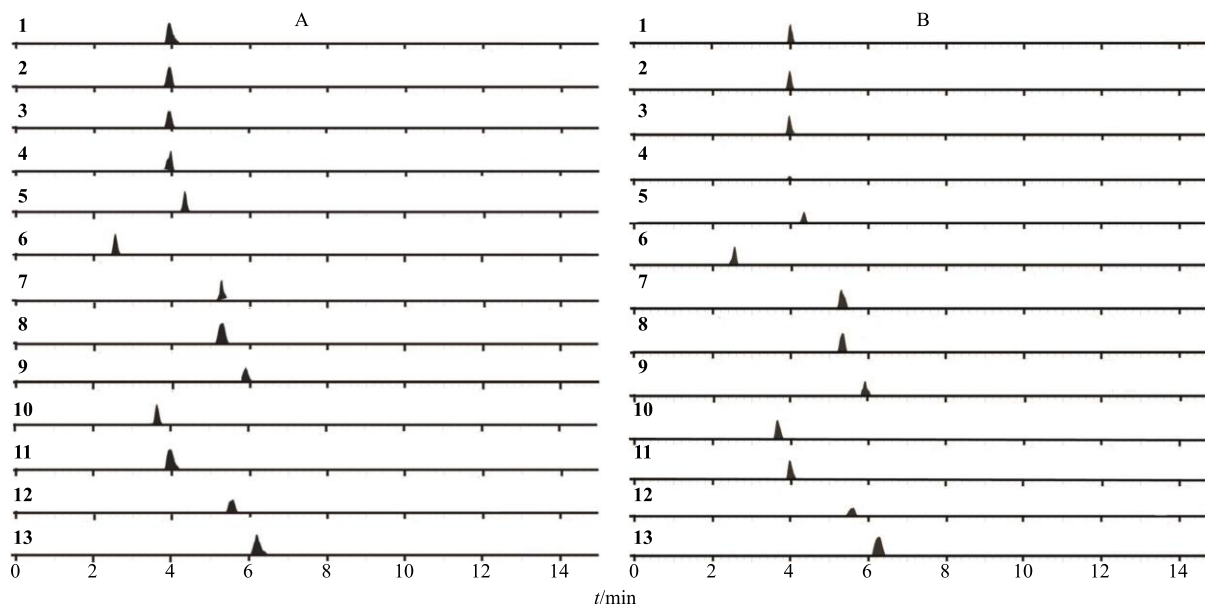


图 1 混合对照品溶液 (A)、样品 (B) 提取离子流色谱图

Fig. 1 LC-MS of chromatograms of total ion flow of mixed reference solution (A) and sample (B)

表 2 各成分的精密性、稳定性、重复性及加样回收率试验结果 ($n=6$)

Table 2 Results of precision, stability, repeatability and recovery of 13 compounds ($n=6$)

成分	RSD/%			加样回收率/%	
	精密性	稳定性	重复性	均值	RSD/%
1	2.1	4.5	2.2	93.1	2.7
2	2.6	3.2	1.9	90.2	3.6
3	1.9	4.5	1.6	97.5	4.1
4	3.1	4.7	2.3	102.1	2.7
5	1.7	5.2	3.6	89.4	3.6
6	1.3	5.1	4.3	103.1	2.4
7	3.6	5.8	4.7	90.4	3.9
8	4.3	4.3	2.4	84.3	3.7
9	5.1	3.9	3.2	101.4	2.1
10	0.7	2.6	1.3	102.5	2.8
11	2.4	3.7	1.7	96.1	1.6
12	2.1	2.9	3.5	84.7	2.7
13	2.6	3.1	4.3	99.5	3.6

中各待测物色谱峰面积, 计算含量。结果见表 2, 各含量的 RSD 均小于 4.7%, 表明方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录各标准品色谱峰。结果见表 2, 各含量的 RSD 均小于 5.8%, 表明供试品溶液在 24 h 内化学性质稳定。

2.1.8 加样回收率试验 取乳香样品 6 份, 精密加

入与样品中各成分等量的对照品, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定并计算各指标成分的回收率。结果见表 2, 各指标成分的平均加样回收率为 84.3%~103.1%, RSD 为 1.6%~4.1%。

2.1.9 样品测定方法 取药材粉末约 5 g, 精密称定, 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1.3”项下色谱条件测定各指标成分含量, 计算其提取率, 提取率=提取液中指标成分含量×提取液体积/药材质量。

取 1 mL 药液于离心管中, 离心管质量为 A , 离心浓缩得干浸膏后质量为 B , 样品总体积为 V , 生药量为 M , 则干浸膏得率= $(B-A)V/M$ 。

2.2 乳香酸有效部位提取工艺单因素考察研究

以各指标成分提取率以及干浸膏得率为考察指标, 单因素考察提取方法、提取溶剂、料液比、提取时间、提取次数对乳香酸类成分提取率和干浸膏得率的影响。

2.2.1 提取方法考察

(1) 超声提取: 取药材粉末约 5 g, 精密称定, 以料液比为 1:8, 95%乙醇超声 (300 W, 50 kHz) 提取 1 次, 提取时间为 1 h, 测定指标成分含量, 平行 3 份, 取平均值。

(2) 乙醇回流提取: 取药材粉末约 5 g, 精密称定, 以料液比为 1:8, 95%乙醇回流提取 1 次, 提取时间为 1 h, 测定指标成分含量, 平行 3 份, 取平均值。

(3) 水煎煮: 取药材粉末约 5 g, 精密称定, 以料液比为 1:8, 水煎煮 1 次, 提取时间为 1 h, 测定指标成分含量, 平行 3 份, 取平均值。

提取方法考察结果见表 3。结果表明, 乙醇回流法较超声法效果好, 故选择乙醇回流提取法。

2.2.2 提取溶剂乙醇体积分数考察 取药材粉末约

5 g, 精密称定, 以料液比为 1:8, 乙醇(20%、40%、60%、80%、95%) 回流提取 1 次, 提取时间为 1 h, 平行制备 3 份, 测定指标成分含量和干浸膏得率, 取平均值, 结果见表 4。表明乳香酸在 95%乙醇时溶出较多, 且干浸膏得率较 80%乙醇变化不大, 故选择 95%乙醇作为提取溶剂。

表 3 不同提取方法对乳香酸类成分提取率和干浸膏得率的影响 ($n=3$)

Table 3 Effects of different extraction methods on extraction yield of boswellic acids and dry extract yield ($n=3$)

提取方法	指标成分提取率/(mg·g ⁻¹)														干浸膏
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	总量	得率/%
水煎煮	0.008	0.037	0.006	0.031	0.038	0.011	0.018	0.026	0.003	0.070	0.063	0.014	—	0.323	22.776
乙醇回流提取	0.623	0.513	0.393	0.219	1.359	0.111	0.334	0.052	0.054	0.925	0.721	1.841	0.661	7.809	51.923
超声提取	0.540	0.480	0.345	0.181	1.324	0.108	0.159	0.441	0.082	0.881	0.454	1.343	0.843	7.181	54.718

表 4 不同乙醇体积分数对乳香酸类成分提取率和干浸膏得率的影响 ($n=3$)

Table 4 Effects of ethanol volume fraction on extraction rate of boswellic acids and yield of dry extract ($n=3$)

乙醇/ %	指标成分提取率/(mg·g ⁻¹)														干浸膏 得率/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	总量	
20	0.005	—	—	—	0.011	—	0.014	—	—	0.008	0.023	—	—	0.061	20.338
40	—	—	—	—	0.005	—	0.019	0.009	—	0.007	0.015	0.011	0.022	0.087	27.840
60	0.085	0.142	0.037	0.217	0.373	0.114	0.212	0.178	0.028	0.613	0.207	0.176	0.184	2.566	29.683
80	0.227	0.098	0.274	0.170	1.059	0.138	0.640	—	0.088	0.912	0.637	1.022	0.461	5.725	51.680
95	0.596	0.477	0.334	0.191	1.234	0.071	0.321	0.371	0.058	0.803	0.556	1.443	0.676	7.129	55.437

2.2.3 料液比的考察 取药材粉末约 5 g, 精密称定, 以 95%乙醇回流提取 1 次, 提取时间为 1 h, 考察不同料液比 1:6、1:8、1:10、1:12、1:15, 平行制备 3 份, 测定指标成分含量和干浸膏得率, 取平均值, 结果见表 5。在料液比 1:15 时乳香酸含量和干浸膏得率最高, 故料液比选择 1:15。

2.2.4 提取时间的考察 取药材粉末约 5 g, 精密称定, 以料液比为 1:8, 95%乙醇回流提取 1 次, 考察不同提取时间 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h, 平行制备 3 份, 测定指标成分含量和干浸膏得率, 取平均

值, 结果见表 6。表明乳香酸随提取时间变化不大, 在 1.5 h 时乳香酸总量最高, 故提取时间选择 1.5 h。

2.2.5 提取次数的考察 取药材粉末约 5 g, 精密称定, 以料液比为 1:8, 95%乙醇回流提取, 提取时间为 1 h, 考察提取次数 1、2、3、4 次, 平行制备 3 份, 测定指标成分含量和干浸膏得率, 取平均值, 结果见表 7。表明乳香酸在提取 4 次时乳香酸总量最高, 故选择提取次数为 4 次。

故以测定 13 种乳香酸类成分提取率和干浸膏得率为考察依据, 结果用 15 倍量的 95%乙醇回流

表 5 料液比对乳香酸类成分提取率和干浸膏得率的影响 ($n=3$)

Table 5 Effects of solid-liquid ratio on extraction yield of boswellic acids and dry extract yield ($n=3$)

料液比	指标成分提取率/(mg·g ⁻¹)														干浸膏
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	总量	得率/%
1∶6	0.432	0.294	0.235	0.141	0.954	0.048	0.479	0.022	0.068	0.614	0.432	1.566	1.417	6.703	56.701
1∶8	0.584	0.431	0.351	0.186	1.160	0.068	0.587	0.023	0.106	0.864	0.621	1.600	1.615	8.196	57.360
1∶10	0.728	0.531	0.450	0.337	1.405	0.104	0.729	0.030	0.095	1.136	0.821	1.482	0.888	8.734	56.003
1∶12	0.831	0.655	0.531	0.406	1.637	0.115	0.727	0.050	0.118	1.384	0.911	2.064	0.920	10.349	60.717
1∶15	1.029	0.895	0.715	0.592	1.854	0.179	0.849	0.056	0.161	1.809	1.153	2.417	1.637	13.346	67.202

表 6 提取时间对乳香酸类成分提取率和干浸膏得率的影响 ($n=3$)Table 6 Effects of extraction time on extraction yield of boswellic acids and dry extract ($n=3$)

提取	指标成分提取率/(mg·g ⁻¹)														干浸膏
时间/h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	总量	得率/%
1.0	0.779	0.487	0.372	0.174	0.595	0.392	0.854	0.710	0.211	0.032	0.908	0.825	0.780	7.120	52.081
1.5	0.588	0.441	0.351	0.187	1.269	0.100	0.624	0.530	0.128	0.899	0.665	1.481	0.866	8.130	57.278
2.0	0.609	0.520	0.407	0.206	1.169	0.110	0.732	0.620	0.087	0.943	0.552	1.333	0.951	8.240	56.640
2.5	0.199	0.528	0.420	0.223	1.235	0.113	0.783	0.580	0.197	0.954	0.546	1.517	0.752	8.047	56.003
3.0	0.189	0.087	0.403	0.201	1.220	0.114	0.768	1.300	0.235	0.948	0.639	1.083	0.321	7.508	55.837

表 7 提取次数对乳香酸类成分提取率和干浸膏得率的影响 ($n=3$)Table 7 Effects of extraction times on extraction yield of boswellic acids and dry extract yield ($n=3$)

提取	指标成分提取率/(mg·g ⁻¹)														干浸膏
次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	总量	得率/%
1	0.608	0.435	0.348	0.177	1.362	0.098	0.383	0.216	0.083	0.845	0.522	1.146	0.908	7.133	52.882
2	1.239	1.024	0.697	0.400	2.153	0.223	0.566	0.613	0.028	1.769	1.175	2.332	1.232	13.452	59.836
3	1.790	1.637	1.082	0.760	2.667	0.364	0.104	0.574	0.386	2.665	1.721	2.670	3.436	19.856	59.280
4	2.165	1.703	1.247	0.930	2.806	0.423	0.111	0.683	0.216	3.344	2.407	4.645	2.157	22.837	65.598

提取 4 次, 每次 1.5 h。

2.3 乳香酸有效部位提取工艺 Box-Behnken 响应曲面实验

2.3.1 响应面实验设计及结果 应用 Design Expert 8.0.6 软件进行响应面设计, 在单因素试验的基础上, 以乳香中乳香酸类成分提取率为响应值, 利用

Box-Behnken 响应面法设计提取溶剂乙醇体积分数 (A)、料液比 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 4 因素 3 水平 (-1、0、+1) 共 29 组试验, 考察因素水平、试验设计及结果见表 8。

2.3.2 模型的建立及其显著性检验 利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 8 试验数据进行多元回归拟

表 8 Box-Behnken 响应面试验因素水平、实验设计与结果 ($n=3$)Table 8 Box-Behnken test factors levels, experimental design and results ($n=3$)

试验号	A/%	B	C/h	D	提取率/(mg·g ⁻¹)		试验号	A/%	B	C/h	D	提取率/(mg·g ⁻¹)	
					实测值	预测值						实测值	预测值
1	80 (-1)	1 : 10 (-1)	2 (0)	3 (0)	19.83	20.48	16	87.5	1 : 20	3	3	35.72	32.94
2	95 (+1)	1 : 10	2	3	23.62	23.46	17	80	1 : 15	1	3	26.15	29.43
3	80	1 : 20 (+1)	2	3	42.51	33.76	18	95	1 : 15	1	3	33.03	32.40
4	95	1 : 20	2	3	37.02	36.73	19	80	1 : 15	3	3	23.60	24.81
5	87.5 (0)	1 : 15 (0)	1 (-1)	2 (-1)	23.20	23.82	20	95	1 : 15	3	3	26.30	27.79
6	87.5	1 : 15	3 (+1)	2	20.26	19.21	21	87.5	1 : 10	2	2	22.27	14.87
7	87.5	1 : 15	1	4 (+1)	39.79	38.01	22	87.5	1 : 20	2	2	27.48	28.15
8	87.5	1 : 15	3	4	27.50	33.40	23	87.5	1 : 10	2	4	23.73	29.07
9	80	1 : 15	2	2	16.83	20.02	24	87.5	1 : 20	2	4	45.60	42.34
10	95	1 : 15	2	2	19.69	23.00	25	87.5	1 : 15	2	3	20.82	28.61
11	80	1 : 15	2	4	35.58	34.22	26	87.5	1 : 15	2	3	25.62	28.61
12	95	1 : 15	2	4	42.71	37.19	27	87.5	1 : 15	2	3	32.53	28.61
13	87.5	1 : 10	1	3	29.04	24.28	28	87.5	1 : 15	2	3	28.10	28.61
14	87.5	1 : 20	1	3	32.79	37.55	29	87.5	1 : 15	2	3	25.36	28.61
15	87.5	1 : 10	3	3	22.97	19.67							

合,得到提取率对提取溶剂乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)的2次多项回归模型为提取率 $=26.54+1.49 A+6.64 B-2.30 C+7.10 D-2.32 AB-1.05 AC+1.07 AD+2.25 BC+4.17 BD-2.34 CD+1.04 A^2+3.00 B^2+0.22 C^2+0.76 D^2$ 。

对所得模型进行显著性检验,结果见表9。可以看出,该回归模型的 P 值 <0.0001 ,表明该回归方程模型高度显著;失拟项 $P=0.88>0.6064$,表明失拟不显著。模型的相关系数(r^2)为0.8590,调整确定系数(r_{adj}^2)为0.7180,说明该模型能解释71.80%响应值的变化,即该模型与实际试验拟合程度良好,用该模型分析和预测乳香的提取是合适的。且回归模型中1次项A、C不显著,B、D均显著;2次项均显著;交互项AB、AC、AD、BC、CD不显著,BD显著。说明不同的提取工艺与乳香提取率之间不是简单的线性关系。

另外从 F 值可看出,单因素对提取的影响顺序为 $D>B>C>A$,即提取次数 $>$ 料液比 $>$ 提取时间 $>$ 提取溶剂乙醇体积分数。

2.3.3 响应面分析 通过 Design Expert 8.0.6 软件对各因素之间的交互作用进行响应面分析,绘制响应面曲线图,响应曲面陡峭程度越大,则对提取率影响也越大。结果见图2。

2.3.4 最佳工艺的确定 通过 Design Expert 8.0.6 软件分析,得到乙醇回流提取乳香中乳香酸类成分最佳工艺条件为93.33%乙醇,料液比为1:20,提取时间为1.03 h,提取次数为4次。在该条件下乳香酸类成分理论总量为52.31 mg/g,说明利用 Box-

Behnken 建立的模型是合理的。考虑到实际操作的可性,将工艺条件改为95%乙醇,料液比为1:20,提取时间为调整为62 min,提取次数为4次进行验证,重复3次,乳香酸类成分总量分别为45.64、45.37、46.13 mg/g, RSD 为0.84%,见表10,说明该模型得到的结果可靠。

2.4 乳香酸有效部位纯化工艺参数优化

2.4.1 碱溶条件考察

(1) 碱性溶液选择: 实验中常用的碱性溶液为碳酸钠、氢氧化钠、碳酸氢钠溶液,拟定1%碳酸钠溶液、1%氢氧化钠溶液、1%碳酸氢钠溶液,根据溶解度和溶液碱性以及溶解后颜色变化选择。实验过程中发现1%碳酸氢钠基本不溶解乳香浸膏,1%氢氧化钠碱性过高,溶解后颜色偏深,故选择了1%碳酸钠溶液。

(2) 超声溶解: 取乳香干浸膏约1 g,精密称定,加1%碳酸钠溶液调节pH值为11~12,超声(300 W, 50 kHz)溶解30 min,滤过,取滤液在常温条件下加5%盐酸溶液调节pH值为2~4进行酸沉,析出沉淀,滤过,水洗至中性,取滤渣干燥,得纯化产物,粉碎,取适量纯化产物用甲醇溶解,测定指标成分含量,计算纯化产物中乳香酸类成分总质量分数和纯化产物得率。

总质量分数=纯化产物中指标成分总量/纯化产物质量
纯化产物得率=纯化产物质量/干浸膏质量

(3) 常温溶解: 取乳香干浸膏约1 g,精密称定,加1%碳酸钠溶液调节pH值为11~12,常温放置30 min,滤过,取滤液在常温条件下加5%盐酸溶液调节pH值为2~4进行酸沉,析出沉淀,滤

表9 响应面2次模型方差分析

Table 9 ANOVA for response surface quadratic model

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 427.120	14	102.940	6.100	0.000 9	极显著	A^2	7.000	1	7.000	0.420	0.527 9	
A	26.610	1	26.610	1.590	0.227 6		B^2	58.480	1	58.480	3.500	0.082 4	
B	528.810	1	528.810	31.650	$<0.000 1$	极显著	C^2	0.330	1	0.330	0.019	0.891 0	
C	63.710	1	63.710	3.810	0.071 1		D^2	3.750	1	3.750	0.220	0.643 1	
D	604.640	1	604.640	36.190	$<0.000 1$	极显著	残差	233.930	14	16.710			
AB	21.530	1	21.530	1.290	0.275 4		失拟	161.200	10	16.120	0.890	0.603 0	不显著
AC	4.370	1	4.370	0.260	0.617 1		纯误差	72.200	4	18.180			
AD	4.560	1	4.560	0.270	0.609 6		总和	1 661.050	28				
BC	20.250	1	20.250	1.210	0.289 5		r^2	0.859 2					
BD	69.390	1	69.390	4.150	0.060 9		r_{adj}^2	0.718 3					
CD	21.860	1	21.860	1.310	0.271 9								

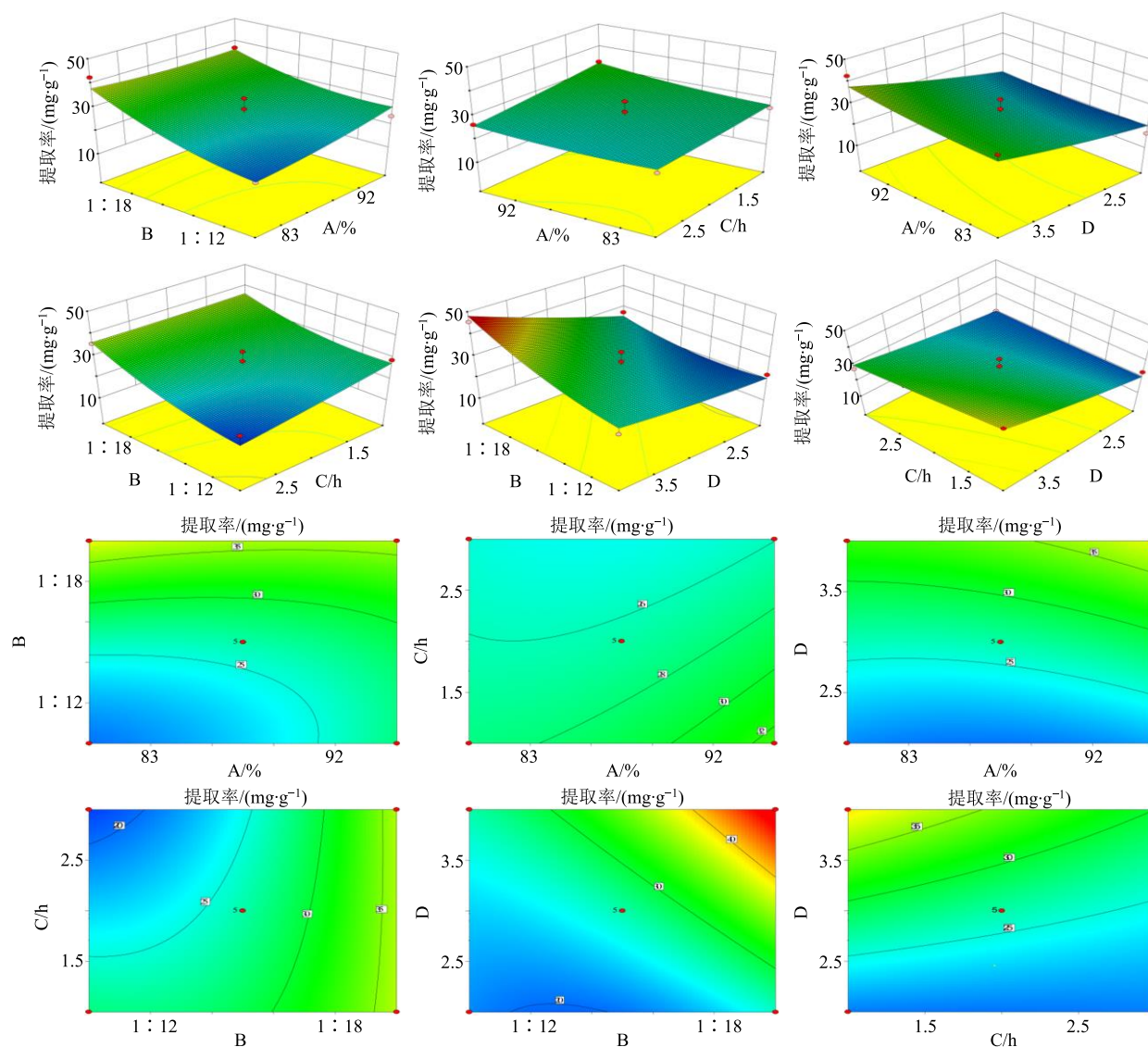


图 2 基于响应曲面法不同因素对提取率的影响

Fig. 2 Effects of different factors on extraction rate based on response surface method

表 10 基于最佳提取工艺的验证

Table 10 Validation based on optimal extraction process

提取 次数	指标成分提取率/(mg·g ⁻¹)													干浸膏 得率/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	总量
1	0.671	0.352	1.184	1.621	1.503	13.010	0.343	0.798	0.891	21.008	0.453	1.006	2.801	45.641
2	0.806	0.512	1.381	1.428	1.422	12.360	0.583	0.984	0.843	20.628	0.913	1.146	2.361	45.367
3	1.135	0.723	1.287	1.930	1.806	12.423	0.511	0.683	0.616	21.014	0.407	1.440	2.157	46.132

过，水洗至中性，取滤渣干燥，得纯化产物，粉碎，取适量纯化产物用甲醇溶解，测定指标成分含量。

(4) 加热至 60 ℃ 溶解：取乳香干浸膏约 1 g，精密称定，加 1% 碳酸钠溶液调节 pH 值为 11~12，加热至 60 ℃ 溶解 30 min，滤过，取滤液在常温条件下加 5% 盐酸溶液调节 pH 值为 2~4 进行酸沉，

析出沉淀，滤过，水洗至中性，取滤渣干燥，得纯化产物，粉碎，取适量纯化产物用甲醇溶解，测定指标成分含量。

碱溶条件考察结果见表 11。综合纯化产物中乳香酸类成分的总质量分数和纯化产物得率，且实验过程中发现常温和加热至 60 ℃ 不能完全溶解，故

表 11 不同碱溶条件对纯化后乳香酸类成分质量分数和纯化产物得率的影响 ($n=3$)Table 11 Effects of different alkali solution conditions on mass fraction of boswellic acids and yield of purified products after purification ($n=3$)

碱溶条件	指标成分质量分数/%													纯化产物	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	总量	得率/%
超声溶解	0.091	0.982	0.166	0.567	1.247	0.262	2.048	0.055	1.918	2.547	24.551	2.075	0.112	36.621	67.790
常温溶解	0.108	0.165	0.244	0.354	0.509	0.127	2.046	0.058	0.257	0.035	6.217	0.367	0.643	11.002	0.515
60 °C 溶解	0.641	4.311	0.334	2.310	2.526	2.168	1.809	0.997	0.398	11.616	2.122	3.778	4.430	37.441	25.841

选择超声溶解法。

2.4.2 碱液 pH 值考察

(1) 碱液 pH 11~12 溶解: 取乳香干浸膏约 1 g, 精密称定, 加 1% 碳酸钠溶液调节 pH 值为 11~12, 超声 (300 W, 50 kHz) 溶解 30 min, 滤过, 取滤液在常温条件下加 5% 盐酸溶液调节 pH 值为 2~4 进行酸沉, 析出沉淀, 滤过, 水洗至中性, 取滤渣干燥, 得纯化产物, 粉碎, 取适量纯化产物用甲醇溶解, 测定指标成分含量。

(2) 碱液 pH 12~13 溶解: 取乳香干浸膏约 1 g, 精密称定, 加 1% 碳酸钠溶液调节 pH 值为 12~13, 超声 (300 W, 50 kHz) 溶解 30 min, 滤过, 取滤液在常温条件下加 5% 盐酸溶液调节 pH 值为 2~4

进行酸沉, 析出沉淀, 滤过, 水洗至中性, 取滤渣干燥, 得纯化产物, 粉碎, 取适量纯化产物用甲醇溶解, 测定指标成分含量。

(3) 碱液 pH 13~14 溶解: 取乳香浸膏约 1 g, 精密称定, 加 1% 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 13~14, 超声 (300 W, 50 kHz) 溶解 30 min, 滤过, 取滤液在常温条件下加 5% 盐酸溶液调节 pH 值为 2~4 进行酸沉, 析出沉淀, 滤过, 水洗至中性, 取滤渣干燥, 得纯化产物, 粉碎, 取适量纯化产物用甲醇溶解, 测定指标成分含量。

碱液 pH 值考察结果见表 12。综合纯化产物中乳香酸类成分的总质量分数和纯化产物得率, 故选择 pH 为 11~12 的碱液溶解。

表 12 不同碱液 pH 值对纯化后乳香酸类成分质量分数和纯化产物得率的影响 ($n=3$)Table 12 Effects of pH value of different lye on mass fraction of boswellic acids and yield of purified products after purification ($n=3$)

碱液 pH 值	指标成分质量分数/%													纯化产物	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	总量	得率/%
pH 11~12	0.968	2.645	4.683	2.858	5.607	2.778	3.084	0.540	0.564	11.914	3.657	2.349	3.117	41.986	70.700
pH 12~13	0.270	0.396	0.282	0.491	1.223	0.225	1.115	0.494	0.081	2.530	2.046	3.127	0.544	12.599	69.637
pH 13~14	1.109	0.984	0.389	2.151	1.324	0.447	0.854	0.301	0.090	2.970	1.429	1.180	0.356	13.135	66.204

2.4.3 酸沉条件考察

(1) 常温酸沉 30 min: 取乳香干浸膏约 1 g, 精密称定, 加 1% 碳酸钠溶液调节 pH 值为 11~12, 超声 (300 W, 50 kHz) 溶解 30 min, 滤过, 取滤液在常温条件下加 5% 盐酸溶液调节 pH 值为 2~4 酸沉 30 min, 析出沉淀, 滤过, 水洗至中性, 取滤渣干燥, 得纯化产物, 粉碎, 取适量纯化产物用甲醇溶解, 测定指标成分含量。

(2) 0~4 °C 酸沉 30 min: 取乳香干浸膏约 1 g, 精密称定, 加 1% 碳酸钠溶液调节 pH 值为 11~12, 超声 (300 W, 50 kHz) 溶解 30 min, 滤过, 取滤液加 5% 盐酸溶液调节 pH 值为 2~4 进行酸沉, 在 0~4 °C 条件下酸沉 30 min, 析出沉淀, 滤过, 水

洗至中性, 取滤渣干燥, 得纯化产物, 粉碎, 取适量纯化产物用甲醇溶解, 测定指标成分含量。

(3) 常温酸沉 15 min+0~4 °C 酸沉 15 min: 取乳香干浸膏约 1 g, 精密称定, 加 1% 碳酸钠溶液调节 pH 值为 11~12, 超声 (300 W, 50 kHz) 溶解 30 min, 滤过, 取滤液加 5% 盐酸溶液调节 pH 值为 2~4 进行常温酸沉 15 min 后再 0~4 °C 酸沉 15 min, 析出沉淀, 滤过, 水洗至中性, 取滤渣干燥, 得纯化产物, 粉碎, 取适量纯化产物用甲醇溶解, 测定指标成分含量。

酸沉条件考察结果见表 13, 综合纯化产物中乳香酸类成分的总质量分数和纯化产物得率, 故选择 0~4 °C 酸沉。

表 13 不同酸沉条件对纯化后乳香酸类成分质量分数和纯化产物得率的影响 ($n=3$)

Table 13 Effects of different acid precipitation conditions on mass fraction of boswellic acids and yield of purified products after purification ($n=3$)

酸沉条件	指标成分质量分数/%													纯化产物	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	总量	得率/%
常温酸沉 30 min	4.825	5.006	2.517	3.380	1.466	1.766	2.612	1.449	0.393	11.551	9.977	8.635	4.128	55.939	86.132
0~4 ℃酸沉 30 min	5.961	5.141	1.468	3.588	3.814	2.173	2.446	1.157	0.288	12.250	29.002	1.361	2.700	69.176	82.896
常温酸沉 15 min+ 0~4 ℃酸沉 15 min	2.024	3.540	2.249	1.987	2.420	1.171	2.606	1.042	0.568	8.300	14.038	1.349	2.001	42.123	55.569

2.4.4 酸液 pH 值考察

(1) 酸液 pH<2: 取乳香干浸膏约 1 g, 精密称定, 加 1%碳酸钠溶液调节 pH 值为 11~12, 超声 (300 W, 50 kHz) 溶解 30 min, 滤过, 取滤液在常温条件下加 5%盐酸溶液调节 pH<2 进行酸沉, 析出沉淀, 滤过, 水洗至中性, 取滤渣干燥, 得纯化产物, 粉碎, 取适量纯化产物用甲醇溶解, 测定指标成分含量。

(2) 酸液 pH 2~4: 取乳香干浸膏约 1 g, 精密称定, 加 1%碳酸钠溶液调节 pH 值为 11~12, 超声 (300 W, 50 kHz) 溶解 30 min, 滤过, 取滤液在常温条件下加 5%盐酸溶液调节 pH 值为 2~4 进行酸沉, 析出沉淀, 滤过, 水洗至中性, 取滤渣干燥, 得纯化产物, 粉碎, 取适量纯化产物用甲醇溶解, 测定指标成分的量。

(3) 酸液 pH 4~6: 取乳香干浸膏约 1 g, 精密称定, 加 1%碳酸钠溶液调节 pH 值为 11~12, 超声 (300 W, 50 kHz) 溶解 30 min, 滤过, 取滤液在常温条件下加 5%盐酸溶液调节 pH 值为 4~6 进行酸沉, 析出沉淀, 滤过, 水洗至中性, 取滤渣干燥, 得纯化产物, 粉碎, 取适量纯化产物用甲醇溶解, 测定指标成分的量。

酸液 pH 值考察结果见表 14。综合纯化产物中乳香酸类成分的总质量分数和纯化产物得率, 故选择酸液 pH 值为 2~4 进行酸沉。

2.5 乳香酸纯化工艺正交试验

2.5.1 正交试验设计及结果 在乳香酸纯化单因素试验的基础上, 采用正交试验考察碱液 pH 值、酸液 pH 值、酸沉条件。根据正交设计助手软件, 以碱液 pH 值 (A)、酸液 pH 值 (B)、酸沉条件 (C) 作为 3 个考察因素, 分别选取 3 个水平进行正交试验, 利用极差分析及方差分析, 以确定最佳纯化工艺条件。正交试验因素水平、设计及结果见表 15。

2.5.2 模拟方差分析及最佳工艺的确定 对正交试验所得的结果进行方差分析, 试验方差分析结果见表 16。影响乳香中乳香酸类成分的总质量分数的各因素主次关系为 B>A>C, 即酸液 pH>碱液 pH>酸沉条件。经方差分析, 各因素对乳香中乳香酸类成分的总质量分数无显著影响 ($P>0.05$)。由此可得最佳纯化工艺为 A₂B₁C₃。综合考虑大生产实际操作的可能性及经济性, 采用 A₂B₁C₂, 即碱液 pH 值为 12~13、酸液 pH<2、酸沉条件为 0~4 ℃静置 30 min。用此工艺进行验证, 重复 3 次, 3 组试验纯化的乳香酸类成分总质量分数分别为 70.82%、68.32%、70.05%, RSD 为 1.84%, 这说明该纯化条件稳定可靠。

3 讨论

乳香作为中医临床常用的中药, 乳香酸是其主要的活性成分, 乳香酸因其紫外吸收差, 不适用一般的分析仪器; UPLC-TQ/MS 联用技术具有灵敏度

表 14 不同酸液 pH 值对纯化后乳香酸类成分质量分数和纯化产物得率的影响 ($n=3$)

Table 14 Effects of pH value of different acid solution on mass fraction of boswellic acids and yield of purified products after purification ($n=3$)

酸液 pH 值	指标成分质量分数/%													纯化产物	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	总量	得率/%
pH<2	3.012	2.740	2.538	2.000	2.482	1.366	2.959	0.511	0.678	7.673	6.291	2.345	0.124	34.717	73.597
pH 2~4	3.037	2.935	1.978	1.743	2.196	1.484	2.496	1.011	0.653	8.230	20.213	2.717	6.710	55.404	76.892
pH 4~6	2.405	2.719	1.413	1.636	2.940	1.013	1.723	0.680	0.076	6.690	7.651	0.135	0.052	29.130	56.565

表 15 正交试验因素水平、试验设计及结果 ($n=3$)Table 15 Orthogonal test factor level, experimental design and results ($n=3$)

试验号	A	B	C	D (误差)	总质量分数/%
1	11~12 (1)	<2 (1)	常温酸沉 30 min (1)	(1)	58.98
2	11~12 (1)	2~4 (2)	0~4 °C 酸沉 30 min (2)	(2)	17.71
3	11~12 (1)	4~6 (3)	常温酸沉 15 min+0~4 °C 酸沉 15 min (3)	(3)	34.98
4	12~13 (2)	<2 (1)	0~4 °C 酸沉 30 min (2)	(3)	73.87
5	12~13 (2)	2~4 (2)	常温酸沉 15 min+0~4 °C 酸沉 15 min (3)	(1)	67.40
6	12~13 (2)	4~6 (3)	常温酸沉 30 min (1)	(2)	27.90
7	13~14 (3)	<2 (1)	常温酸沉 15 min+0~4 °C 酸沉 15 min (3)	(2)	45.10
8	13~14 (3)	2~4 (2)	常温酸沉 30 min (1)	(3)	37.71
9	13~14 (3)	4~6 (3)	0~4 °C 酸沉 30 min (2)	(1)	35.12
K_1	111.67	177.95	124.59	161.50	
K_2	169.17	122.82	126.70	90.71	
K_3	117.93	98.00	147.48	146.56	
R	57.50	79.95	22.89	70.79	

表 16 正交试验方差分析

Table 16 Analysis of variance by orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
A	663.441 7	2	0.714 8	$P>0.05$
B	1 116.372 4	2	1.202 7	$P>0.05$
C	106.690 3	2	0.114 9	$P>0.05$
D (误差)	928.183 4	2		

$$F_{0.05}(2,2)=19.00$$

高、分离效果好且定量准确的特点,适用于无紫外吸收的化合物的定量测定,故选择 UPLC-TQ/MS 联用技术对乳香酸类成分进行含量测定。通过测定乳香中 13 个乳香酸类成分,对乳香中乳香酸类成分的提取纯化工艺进行了系统研究,以期获得高纯度的乳香酸类成分。对乳香酸类成分进行富集以及提取工艺优化研究,可为其生物活性和作用机制研究奠定基础。

目前提取工艺研究的方法主要有超临界 CO_2 萃取法、水蒸气蒸馏法、亚临界流体萃取法、微波提取法等,而响应曲面法是一种稳定可靠、应用范围较广的统计方法,通过考察各因素之间的交互作用减少实验次数,可高效地优选出最佳条件。近年来该方法已经被广泛应用于中药有效成分的提取工艺优化^[14-16]。故本实验采用单因素实验优选乳香的提取方法,作为响应曲面试验的因素水平;通过 Box-Behnken 响应曲面法考察提取溶剂、料液比、提取时间及提取次数对乳香提取工艺的影响,筛选最佳提取工艺。结果发现,采用 95%乙醇回流提取 62

min, 提取次数为 4 次,料液比为 1:20 时乳香酸总提取率为 45.37%,干浸膏得率为 56.78%。提示,采用最佳的提取条件可最大限度的将乳香中的有效成分提取完全,从而减少药材浪费,发挥其临床适应症的疗效。

乳香具有多种药理活性,且主要与其乳香酸类成分和挥发油等有关。研究发现 11-酮基-乳香酸衍生物可以诱导乳腺癌和宫颈癌细胞凋亡^[17]。四环三萜和五环三萜类的乳香酸可作为微粒体前列腺素 E_2 合酶-1 的抑制剂,发挥抗炎作用^[18]。乳香挥发油可促进透皮吸收,具有促血流^[19]等作用。乳香水提取物通过调节 TRPV1 减轻小鼠的神经痛^[20]。本研究旨在对乳香酸类成分富集工艺的研究,由于乳香酸显酸性,故选择碱溶酸沉的方法纯化,该方法简便易行^[21]。

通过单因素优选碱液 pH 值、酸液 pH 值与酸沉条件确定正交试验的因素水平,从而获得最佳纯化工艺参数。结果发现,当碱液 pH 值为 12~13、酸液 pH 值<2、酸沉条件为 0~4 °C、静置 30 min 时乳香酸的质量分数高达 73.87%。表明采用碱溶酸沉的方法对乳香酸进行纯化是可行的。

本研究采用 UPLC-TQ/MS 联用技术同时测定乳香中 13 个乳香酸类成分的含量,结合干浸膏的得率综合评价乳香酸的提取纯化工艺,可为乳香的综合利用提供依据,但其生物活性仍需进行深入研究。

参考文献

[1] 李俊,蒋庚太.《医学衷中参西录》应用乳香、没药

- 探析 [J]. 中医文献杂志, 2000 (1): 14.
- [2] 陈 婷, 宿树兰, 钱叶飞, 等. 乳香-没药配伍前后汤液理化参数变化与化学成分的关联分析 [J]. 中成药, 2012, 34(8): 1529-1536.
- [3] 王 峰, 华会明, 王淑美. 乳香的化学成分 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1293-1296.
- [4] 常允平, 韩英梅, 张俊艳. 乳香的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 52-59.
- [5] 梁 慧, 倪兆成, 颜美秋, 等. 乳香超微粉的制备工艺及理化性质研究 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1321-1326.
- [6] 马 隽. 乳香提取物对 SD 大鼠周围神经损伤后修复及 GAP-43 表达的影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- [7] 孙 妍, 商庆辉. 乳香中三萜类化合物和药理活性的研究进展 [J]. 环球中医药, 2016, 9(5): 616-620.
- [8] 蔡红蝶, 宿树兰, 周 卫, 等. 乳香属药用植物中乳香酸类化学成分、生物活性及其作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2175-2181.
- [9] 王艳艳, 王团结, 宿树兰, 等. 乳香、没药对配伍挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(2): 31-34.
- [10] 蒋海峰, 宿树兰, 欧阳臻, 等. 乳香、没药提取物及其配伍对血小板聚集与抗凝血酶活性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 160-165.
- [11] 宿树兰, 王团结, 段金廛. 常用树脂类药材资源分布及化学成分与药理活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(2): 109-114.
- [12] 陈 婷, 宿树兰, 段金廛, 等. 乳香-没药配伍前后化学成分溶出变化及其对 LPS-诱导的巨噬细胞产生 NO 的影响 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 179-185.
- [13] 项 想, 潘承蓉, 高茹梦, 等. 基于 UPLC-TQ/MS 联用技术分析乳香配伍没药后对乳香中化学成分溶出的影响 [J]. 药物分析志, 2018, 38(4): 590-597.
- [14] 张珊珊, 全 帅, 赵艳敏, 等. 白花败酱草总黄酮提取工艺优化及抗腹泻活性研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(6): 1092-1098.
- [15] 袁堂丰, 瞿利民, 郭 婕. 响应面法优化罗汉松总二萜提取及抗氧化研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39(6): 114-120.
- [16] 孙爱萍, 孙 萍, 李 娜. 蟾酥中蟾毒配基类成分的提取纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 611-617.
- [17] Csuk R, Barthel-Niesen A, Barthel A. *et al.* 11-Ketoboswellic acid derived amides and monodesmosidic saponins induce apoptosis in breast and cervical cancers cells [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 100: 98-105.
- [18] Verhoff M, Seitz S, Paul M, *et al.* Tetra- and pentacyclic triterpene acids from the ancient anti-inflammatory remedy Frankincense as inhibitors of microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(6): 1445-1451.
- [19] 朱小芳, 罗晶, 管咏梅, 等. 乳香没药挥发油对川芎体外透皮吸收的影响及其皮肤血流促透机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 680-685.
- [20] Hu D, Wang C, Li F, *et al.* A combined water extract of frankincense and myrrh alleviates neuropathic pain in mice via modulation of TRPV1 [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 1-11.
- [21] 李湘利, 刘 静, 梁宝东, 等. 微波辅助碱溶酸沉法提取芡实蛋白的工艺优化及其抗氧化性 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(24): 206-211.