

响应面分析法优化乳白香青中绿原酸提取工艺

王 瑛^{1,2}, 张本印¹, 牛江进^{1,2}, 张 琳^{1,2}, 陶燕铎¹, 梅丽娟¹, 王启兰^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810008;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:以乳白香青为原料, 确定乳白香青中绿原酸最佳提取的工艺条件。在单因素实验的基础上, 运用Box-Behnken中心组合实验设计, 建立绿原酸提取得率的二次回归模型, 确定乳白香青中绿原酸的优化工艺条件为: 提取温度为41℃, 液料比为31:1(mL/g), 甲醇浓度为66%(v/v), 绿原酸的得率为5.2796(mg/g), 接近于模型预测值5.3295(mg/g)。

关键词:乳白香青, 绿原酸, 响应面分析法, 提取工艺

Optimization of extraction technology of chlorogenic acid from *Anaphalis lactea* Maxim. by response surface methodology

WANG Ying^{1,2}, ZHANG Ben-yin¹, NIU Jiang-jin^{1,2}, ZHANG Lin^{1,2}, TAO Yan-duo¹,
MEI Li-juan¹, WANG Qi-lan^{1*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to promote the extractability of chlorogenic acid from *Anaphalis lactea* Maxim., we established a quadric regression equation for predicting the yield of chlorogenic acid on the basis of one-factor tests, according to Box-Behnken design. The result showed that the optimum conditions for the extraction of chlorogenic acid were as follows: extraction temperature 41℃, ratio of material to solvent 31:1(mL/g), Methanol concentration 66%(v/v). Under these conditions, the chlorogenic acid yield was up to 5.2796(mg/g) which was well matched with the predictive extracting yield 5.3295(mg/g).

Key words: *Anaphalis lactea* Maxim.; chlorogenic acid; RSM; extraction process

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)02-0238-04

乳白香青 (*Anaphalis lactea* Maxim.) 属菊科香青属多年生草本植物, 主要分布于青海东部、甘肃南部及四川西北部, 为常用藏药, 全草用药, 具有活血散瘀、祛风湿、消痞瘤、平肝潜阳、祛痰、平喘及外用止血、治风寒感冒、胃溃疡等功效^[1-4]。绿原酸是乳白香青中主要的生物活性物质之一, 化学名称为3-咖啡酰奎尼酸, 分子式为C₁₆H₁₈O₉^[5]。绿原酸具有较强的生理活性, 如抗肿瘤、抗氧化^[6-8]、抗病毒^[9]、消炎^[10]、解毒、利胆、降压降血脂和升高白细胞及显著增加胃肠蠕动和促进胃液分泌等药理作用^[11-13], 对大肠杆菌、金色葡萄球菌、肺炎球菌和病毒有较强的抑制作用^[14-15]。绿原酸作为极具生物活性的天然物质, 目前已被广泛应用于医药、食品、日化等行业。我国虽然拥有富含绿原酸的金花、杜仲等丰富的自然资源, 国内外对绿原酸的需求仍然较大。但截至目前, 国内外文献还没有对乳白香青中绿原酸提取工艺研究报道。鉴于

响应面法在优化反应条件、研究各因素之间相互作用的过程中具有直观、简便的特点, 如张崑等^[16]就响应面法与正交实验对骨素酶解工艺做了对比, 结果发现响应面法得出的最优工艺所得的水解度比正交实验得出的最优工艺所得水解度高出15.4%。将响应面法用于乳白香青绿原酸提取工艺的优化和结果分析, 对开发和利用乳白香青资源有重要意义。本研究在单因素实验的基础上选择提取温度、液料比、甲醇百分含量3个主要因素, 用绿原酸标准品HPLC法绘制标准曲线, 以绿原酸得率为指标, 采用响应面法对乳白香青中绿原酸提取工艺进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乳白香青 2011年8月采自青海省门源县仙米林场(N37°23'~37°50', E101°46'~102°39'之间), 经中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟高级工程师鉴定为乳白香青 (*Anaphalis lactea* Maxim.); 绿原酸标准品 购自中国药品生物制品检定所; 试剂 除高效色谱流动相用色谱纯外, 其余均为分析纯; 色谱用水 超纯水。

收稿日期: 2012-07-27 * 通讯联系人

作者简介: 王瑛(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然药化。

基金项目: 国家科技攻关项目(0713351614); 国家自然科学基金(31101012)。

Agilent 1200型液相色谱仪 美国安捷伦仪器有限公司; XS105DU型电子天平 瑞士梅特勒托利多; DFY-300型高速万能粉碎机 温岭市林大机械有限公司; HH-6型数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; UPT-I-57型优普超纯水机 成都超纯水科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 材料预处理 将乳白香青置于通风避光处阴干至恒重,用中药粉碎机粉碎成细粉,过八十目筛,备用。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex ODS (150.0mm×4.6mm, 35μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.3%磷酸 (13:87, V/V); 检测波长为327nm; 柱温为25℃; 流速为1.0mL/min; 进样量为10μL。

1.2.3 绿原酸标准曲线的绘制 精密称取绿原酸对照品2.4mg, 置于10mL容量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 得0.24mg/mL的对照品储备液。在液相中绿原酸标准品进样量分别为5、8、10μL, 以绿原酸标准品的质量为纵坐标, 以峰面积为横坐标绘制标准曲线。计算得线性回归方程为: $y=0.0004x-0.0088$, $r=0.9998$, 如图1所示。结果表明, 峰面积与绿原酸标准品的质量线性关系良好。绿原酸对照品色谱图及乳白香青样品色

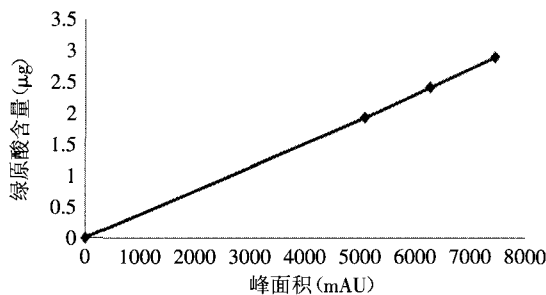


图1 绿原酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of chlorogenic acid

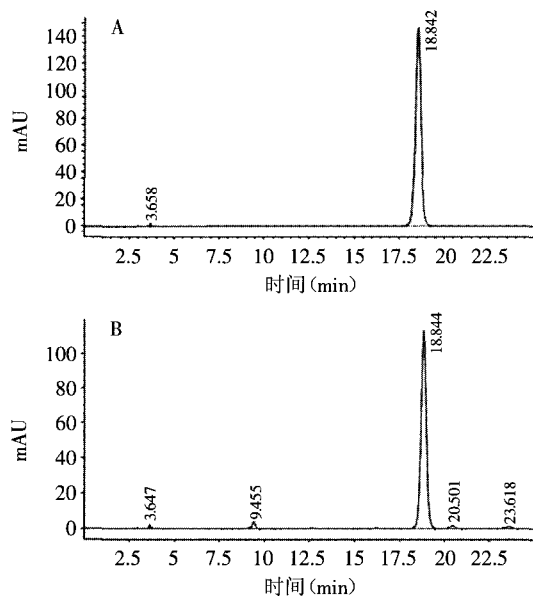


图2 绿原酸对照品(A)及乳白香青样品(B)HPLC图
Fig.2 HPLC chromatogram of chlorogenic acid reference substance (A) and samples (B) of *Anaphalis lactea* Maxim.

谱图如图2所示。

1.2.4 单因素实验设计 在进行响应面分析之前, 先通过单因素实验选出对乳白香青绿原酸提取率有影响的因素, 并确定其实验水平。参考相关文献, 本文称取1.00g乳白香青粉末, 考察了不同的液料比 (10:1~50:1)、提取温度 (30~90℃)、甲醇提取浓度 (45~95%)、超声时间 (5~30min) 对绿原酸提取率的影响。

1.2.5 响应面法实验设计与数据分析方法 根据 Box-Behnken 实验设计原理, 选择影响乳白香青绿原酸得率 (Y) 的3个主要影响因素: 提取温度 (A)、液料比 (B)、甲醇浓度 (C) 进行组合。以-1, 0, 1代表自变量水平, x_i 为自变量的编码值; X_i 为自变量的真实值; 其关系为 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 。其中, X_0 为实验中心点处自变量的真实值; ΔX 为自变量的变化步长^[7]。实验因素及水平编码见表1。

表1 Box-Behnken设计因素水平及编码

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

因素	编码值	水平		
		-1	0	1
A 提取温度(℃)	x_1	30	40	50
B 液料比(mL/g)	x_2	20:1	30:1	40:1
C 甲醇浓度(%)	x_3	55%	65%	75%

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 液料比对绿原酸提取率的影响 设定甲醇浓度为70%, 提取温度为50℃, 考察液料比对绿原酸提取率的影响。设计液料比为10:1、20:1、30:1、40:1、50:1。结果如图3所示。当液料比为30:1时, 绿原酸提取率基本不再增加。再增加液料比, 绿原酸提取率基本稳定, 但同时会增加生产成本。

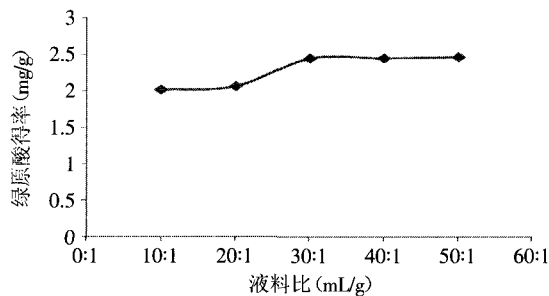


图3 液料比对绿原酸提取率的影响

Fig.3 Effect of liquid to solid ratio on extraction rate of chlorogenic acid yield

2.1.2 提取温度对绿原酸提取率的影响 设定液料比20:1, 乙醇体积分数为70%, 考察提取温度对绿原酸提取率的影响。设计提取温度为30、40、50、60、70、80、90℃。结果如图4所示, 绿原酸提取率温度升高而增加, 当温度升高至40℃, 绿原酸提取率最高; 40~60℃时绿原酸提取率平稳; 随后提取率急剧降低。

2.1.3 甲醇浓度对乳白香青中绿原酸提取率的影响

设定液料比20:1, 提取温度50℃, 考察甲醇浓度对绿原酸提取率的影响。设计甲醇体积分数为45%、55%、65%、75%、85%、95%, 结果如图5所示。绿原酸

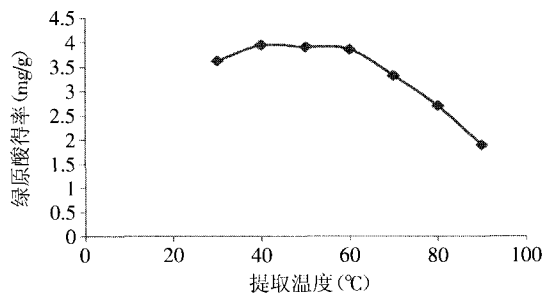


图4 不同温度对绿原酸提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on extraction rate of chlorogenic acid

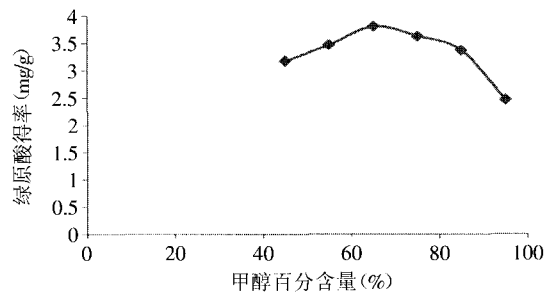


图5 甲醇浓度对绿原酸提取率的影响

Fig.5 Effect of methanol concentration on extraction rate of chlorogenic acid

提取率随甲醇浓度增加而增加,当甲醇体积分数为65%时,绿原酸提取率最高,甲醇浓度大于65%时,绿原酸提取率下降。

2.2 响应面法实验数据分析

对乳白香青中绿原酸提取工艺进行响应面分析,其具体实验方案及结果见表2,方差分析结果见表3。

采用Design-Expert 8.05软件对各因素进行回归拟合,得到绿原酸得率回归方程:

$$Y=5.26+0.18A+0.38B+0.17C+0.094AB+0.13AC+0.23BC-0.46A^2-0.54B^2-0.48C^2-0.080A^2B。$$

表2 Box-Behnken实验因素水平及设计方案和结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

实验号	A	B	C	Y 绿原酸得率(mg/g)
1	-1	-1	0	3.8356
2	1	-1	0	4.0912
3	-1	1	0	4.2402
4	1	1	0	4.872
5	-1	0	-1	4.0002
6	1	0	-1	4.0259
7	-1	0	1	4.3526
8	1	0	1	4.8924
9	0	-1	-1	4.0456
10	0	1	-1	4.3482
11	0	-1	1	3.6708
12	0	1	1	4.8752
13	0	0	0	5.2557
14	0	0	0	5.254
15	0	0	0	5.2539
16	0	0	0	5.2706
17	0	0	0	5.2644

表3 回归统计分析结果

Table 3 Regression analysis

项	平方和	自由度	均方	F值	p值
Model	5.17678	9	0.575198	23.92012	0.0002
A	0.263865	1	0.263865	10.97306	0.0129
B	0.906127	1	0.906127	37.68212	0.0005
C	0.234989	1	0.234989	9.772247	0.0167
AB	0.035382	1	0.035382	1.471376	0.2645
AC	0.066075	1	0.066075	2.747776	0.1414
BC	0.203311	1	0.203311	8.454864	0.0227
A ²	0.885735	1	0.885735	36.8341	0.0005
B ²	1.234517	1	1.234517	51.33852	0.0002
C ²	0.984111	1	0.984111	40.92514	0.0004
残差	0.168326	7	0.024047		
失拟项	0.168112	3	0.056037	1045.53	0.1001
纯误差	0.000214	4	5.36E-05		
总离差	5.345106	16			

注:p<0.05,显著;p<0.01,极显著。

模型的可靠性可从方差分析及相关系数来考察(见表3)。结果表明对绿原酸提取量所建立的二次多项模型具有显著性。因而该模型拟合程度比较好,实验误差小,可以用此模型对甲醇提取乳白香青中绿原酸的提取量进行分析和预测。模型方程回归系数及其显著性检验(见表3)。结果表明,一次项A、C显著,B极显著;二次项A²、B²和C²极显著;交互项AB、AC不显著,BC显著。

2.3 响应面分析和因素间的交互影响

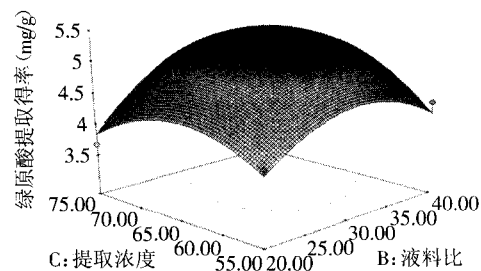
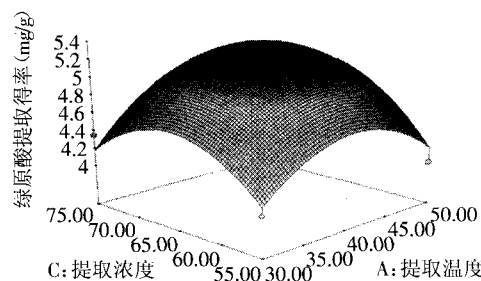
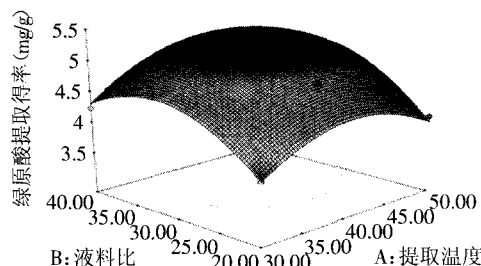


图6 AB、AC和BC分别对绿原酸提取率影响的响应面图

Fig.6 The response surface of AB, AC and BC on extraction rate of chlorogenic acid

根据拟合模型绘制乳白香青绿原酸的响应面图,可直观地看出响应面的最高点,即参数范围内的极值以及因素间的相互作用对响应值的影响,依次可以确定最佳工艺参数范围。Design-Expert 8.05软件处理后三维响应面图见图6。

通过模型方程所作的响应曲面图,可直观地描述各因素对响应值(绿原酸含量)的影响和各个因素间的交互作用。由图6可以看出,响应曲面均是开口向下的凸面,等高线近似为圆形,其中心位于所考察区域内,说明在考察的区域范围内存在响应值的极大值,同时响应面为突出的曲面,即简单的一次线性方程难以解析。

通过Design-Expert 8.05软件分析各因素对乳白香青中绿原酸得率的影响得出结论,甲醇提取乳白香青绿原酸的最佳条件为提取温度41.33℃、甲醇浓度66.33%和液料比31.33:1。在此条件下绿原酸提取量可达5.3295mg/g。为检验响应面法的可靠性,采用上述最优提取条件进行乳白香青中绿原酸甲醇提取实验,同时考虑到实际操作的情况,将乳白香青绿原酸最佳提取条件修正为提取温度41℃、甲醇浓度66%、液料比31:1,实际测得的绿原酸含量为5.2796mg/g,与理论预测值基本吻合。因此,采用响应面法优化得到的乳白香青中绿原酸甲醇提取工艺参数基本准确可靠,具有一定的实用价值。

3 结论与讨论

乳白香青成分复杂,采用紫外分光光度法测定^[18]时杂质干扰严重,无法对其活性成分绿原酸进行定量分析。本实验参考文献[19]采用HPLC法并进行优化,以乙腈-0.3%磷酸溶液(13:87)为流动相,分离度好、重现性好、操作简便、数据可靠,可用于乳白香青中绿原酸含量的质量控制。

本文在单因素实验的基础上,采用响应面法对乳白香青绿原酸提取工艺进行了优化,结果表明,各因素指标之间的关系不是简单的线性关系,而是二次关系。从本次实验数据所绘制的曲面图可以看出,提取温度、液料比、甲醇浓度3个因素对乳白香青中绿原酸成分提取率的效应趋势,液料比对考察指标影响较大,提取温度与提取浓度对考察指标的影响较小。通过回归方程优化得乳白香青中绿原酸的最佳提取工艺为:提取温度41℃,料液比31:1,甲醇浓度为66%,此条件下乳白香青中绿原酸平均提取得率为5.2796mg/g,高于优化前的提取率3.8356mg/g。响应面法优化乳白香青中绿原酸提取率比优化前提高了27.40%。回归分析和验证实验结果表明,采用响应面法优化乳白香青中绿原酸的提取工艺条件,得到的绿原酸提取工艺流程具有实际应用价值。

参考文献

- [1] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京:民族出版社,1997.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1996.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(32)卷[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [4] 袁彦平,刘兆平,金东庆. 乳白香青治疗气管炎的动物实验研究[J]. 中国比较医学杂志,2004,14(6):388.
- [5] Chun O K, Kim D-O. Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums[J]. Food Research International, 2004, 37:337-342.
- [6] Padda M S, Picha D H. Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes[J]. Scientia Horticulturae, 2008, 119(1):17-20.
- [7] Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 403:136-138.
- [8] Xiang Z N, Ning Z X. Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle[J]. LWT, 2008, 41:1189-1203.
- [9] Wang G F, Shi L P, Ren Y D, et al. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro[J]. Antiviral Research, 2009, 83:186-190.
- [10] Han T, Li H L, Zhang Q Y, et al. Bioactivity-guided fractionation for anti-inflammatory and analgesic properties and constituents of *Xanthium strumarium* L.[J]. Phytomedicine, 2007, 14:825-829.
- [11] Cho A S, Jeon S M, Kim M J, et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48:937-943.
- [12] Pietraforte D, Castelli M, Metere A, et al. Salivary uric acid at the acidic pH of the stomach is the principal defense against nitrite-derived reactive species: Sparing effects of chlorogenic acid and serum albumin[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2006, 41:1753-1763.
- [13] Park S, Hahm K B, Oh T Y, et al. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2004, 49(3):384-394.
- [14] 梅林, 刘凌云, 程正学, 等. 金银花及其制剂含药血清中绿原酸HPLC紫外光谱测定和抑菌活性研究[J]. 激光杂志, 2007, 28(4):95-96.
- [15] Zhao MM, Wang HY, Yang B, et al. Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity[J]. Food Chemistry, 2010, 120:1138-1142.
- [16] 张崧, 王卫, 张佳敏, 等. 响应面法和正交实验对骨素酶解工艺优化的比较[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(7):53-56.
- [17] 王燕, 罗文谦, 张志琪, 等. 响应表面优化法及其在天然产物成分提取中的应用[J]. 安康学院学报, 2009, 21(1):77-81.
- [18] 钟方晓. 高效液相及紫外分光光度法测定金银花中绿原酸和异绿原酸含量方法学比较[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(3):212.
- [19] 于俊林, 孙仁爽, 吕红, 等. 金银忍冬和黄花忍冬花及花蕾中绿原酸的HPLC法测定[J]. 中草药, 2008, 39(11):1738-1739.