

响应面优化野艾蒿二咖啡酰奎尼酸的高效提取

钱媛媛¹, 陈育如¹, 杨凤平¹, 柯小红¹, 闫 莽¹, 唐 超²

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏省微生物与基因组学重点实验室, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

(2. 滇虹药业集团股份有限公司, 云南 昆明 650106)

[摘要] 采用响应面优化野艾蒿二咖啡酰奎尼酸的提取工艺. 考察乙醇浓度、温度、时间、料液比 4 个重要因素对二咖啡酰奎尼酸得率的影响. 在乙醇浓度 72%、温度 53 ℃、提取时间 102 min、料液比 1:54 (g/mL) 条件下, 二咖啡酰奎尼酸的提取率为 91%, 得率达 3.30%; LC/MS 等方法对野艾蒿中二咖啡酰奎尼酸的定量结果表明, 野艾蒿中二咖啡酰奎尼酸由 3,5-diCQA、4,5-diCQA 和 1,5-diCQA 组成, 其含量分别为 14.2、10.5 和 8.3 mg/g, 因而野艾蒿是一种二咖啡酰奎尼酸含量丰富的材料.

[关键词] 野艾蒿, 二咖啡酰奎尼酸, 提取, 响应面, LC/MS

[中图分类号] TS202.3 [文献标志码] A [文章编号] 1672-1292(2015)01-0073-05

Optimization Extraction of Dicafeoylquinic Acids from *Artemisia lavandulaefolia* DC. Using Response Surface Methodology

Qian Yuanyuan¹, Chen Yuru¹, Yang Fengping¹, Ke Xiaohong¹, Yan Mang¹, Tang Chao²

(1. School of Life Science, Jiangsu Engineering and Technology Research Centre for Microbiology Resource, Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomic, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. Dihon Pharmaceutical Group Co., LTD, Kunming 650106, China)

Abstract: Response surface methodology is applied to optimize the extraction conditions of diCQAs from *Artemisia lavandulaefolia* DC. The combined effects of independent variables (ethanol concentration, extraction temperature, extraction time, solid-liquid ratio) are studied and the optimal extraction conditions are as follows: ethanol concentration 72%, extraction temperature 53 ℃, extraction time 102 min, solid-liquid ratio 1:54 g/mL. Under these conditions, the yield of diCQAs is 3.30% and the extraction yield is 91%. The content of diCQAs (3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 1,5-diCQA) are 14.2 mg/g, 10.5 mg/g and 8.3 mg/g respectively, which are identified by LC/MS. *A. lavandulaefolia* DC. is the materials that rich in dicafeoylquinic acids.

Key words: *Artemisia lavandulaefolia* DC., dicafeoylquinic acids, extraction, response surface methodology, LC/MS

野艾蒿(*Artemisia lavandulaefolia* DC.)是菊科蒿属植物,资源丰富,具抗菌、消炎、抗氧化、抗过敏等多种生物活性^[1],这些活性主要是来自黄酮、多酚类等成份^[2]. 本研究发现野艾蒿中咖啡酰奎尼酸类的含量丰富.

咖啡酰奎尼酸是性能优良的天然酚酸类物质^[3],有抗菌、抗病毒^[4]、保肝利胆^[5,6]、降压降脂、清除自由基^[7,8]、抗肿瘤^[9]等作用,是目前的研究热点之一. 咖啡酰奎尼酸类物质提取的传统原料主要是杜仲叶、金银花、咖啡豆等. 这些资源因有的是国家保护植物或只限于叶、花、果等生物量小的部位而无法成为大宗资源,而野艾蒿分布广,生物量大,全株可用,因而在成本和资源量方面有巨大的优势^[10].

响应面试验设计方法是利用合理的试验设计并通过试验得到的一定数据,采用多元二次回归方程拟合因素与响应值的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种方法^[11]. 与传统的正交实验设计法相比,具有高效、全面和回归方程精确度高等优势. 本工作在发现野艾蒿含丰富的咖啡酰奎尼酸类物质的基础上,用响应面法对其高效提取分离进行了研究.

收稿日期:2014-09-22.

通讯联系人:陈育如,博士,教授,研究方向:天然产物与药物. E-mail:chenyuru@njnu.edu.cn.

1 材料、设备与方法

1.1 材料与试剂

野艾蒿(*Artemisia lavandulaefolia* DC.), 采自江苏南京; 干燥至恒重粉碎备用。

1,5-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸标准品(成都普瑞法科技开发有限公司); 乙醇、乙酸(国药集团化学试剂有限公司), 分析纯。

1.2 方法

1.2.1 HPLC 分析

Ultimate AQ-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相 A: 0.05% 乙酸水(pH 3.0), 流动相 B: 乙腈; 流速: 0.6 mL/min; 检测波长: 327 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL. 洗脱梯度为 88% A ~ 70% A (0 ~ 15 min), 70% A ~ 60% A (15 ~ 25 min), 60% A ~ 88% A (25 ~ 35 min)。

1.2.2 LC/MS 分析

Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS 液质联用仪, 电喷雾电离(ESI) 接口; 负离子模式监测; 加热毛细管温度 320 °C; 扫描范围 m/z 50~800; 吹扫气压力 45 psi; 雾化电压 3.5 kV; 一级质谱碰撞能量 5 eV, 二级质谱碰撞能量为 5 eV 和 15 eV, HPLC 条件同 1.2.1。

1.2.3 咖啡酰奎尼酸提取的单因素实验

准确称取野艾蒿样品 0.2 g, 按料液比加入不同浓度的乙醇溶液, 在不同提取温度、提取时间下进行浸提。提取液稀释后经 0.45 μm 滤膜过滤, 使用 HPLC 分析。二咖啡酰奎尼酸的提取率(%) = 二咖啡酰奎尼酸提取量(g)/样品中二咖啡酰奎尼酸含量(g)×100(以多次提取的含量之和作为样品二咖啡酰奎尼酸的含量), 得率(%) = 二咖啡酰奎尼酸量(g)/样品重量(g)×100。

1.2.4 二咖啡酰奎尼酸提取的响应面法优化

根据 Box-Beknhen 中心组合实验设计原理, 选取乙醇浓度、温度、时间、料液比为自变量, 野艾蒿二咖啡酰奎尼酸得率为响应值, 设计四因素三水平实验, 因素及水平如表 1 所示。

表 1 响应面的因素和水平

Table 1 Factors and levels of the response surface

水平	因素			
	乙醇浓度 A/%	提取温度 B/°C	提取时间 C/min	料液比 D/(g/mL)
-1	60	40	90	1:40
0	70	50	100	1:50
1	80	60	110	1:60

1.2.5 响应面法优化的统计分析

数据分析采用 SPSS17 软件, 回归分析采用 Design Expert software version 8.0.5 软件。

2 结果与讨论

2.1 二咖啡酰奎尼酸提取的单因素实验

2.1.1 乙醇浓度对提取率的影响

由图 1(a) 可见, 对乙醇浓度的单因素实验结果表明, 70% 乙醇浓度提取时, 二咖啡酰奎尼酸的得率达到最大值; 增大乙醇浓度至 80% 时, 二咖啡酰奎尼酸的得率无明显增加, 却增加了野艾蒿中色素等组分的溶出, 使后期分离复杂化。

2.1.2 温度对提取的影响

由图 1(b) 可见, 提取二咖啡酰奎尼酸的温度以 50 °C 较为适合, 温度低时提取不完全, 温度过高时容易导致目标物分解。

2.1.3 时间对提取的影响

由图 1(c) 可见, 二咖啡酰奎尼酸的提取量在 40~80 min 时增加较快, 在 80~120 min 时的增加量趋于平稳。从提取量及时效考虑, 100 min 为适宜时间。

2.1.4 料液比对提取的影响

由图 1(d)可见,当料液比小于 1:50 时,咖啡酰奎尼酸的提取量呈上升的趋势;料液比再提高后,提取液中目标物的浓度下降. 因此,料液比选为 1:50 g/mL.

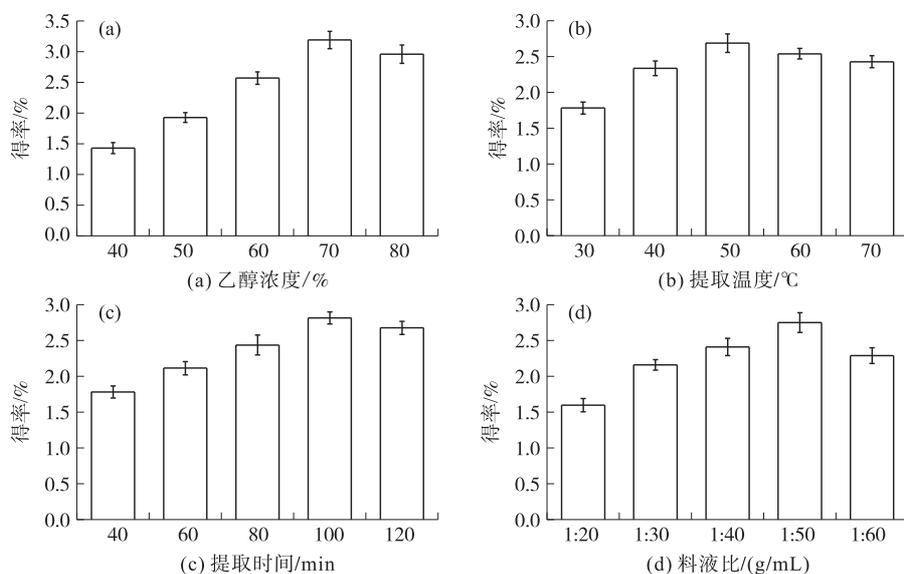


图 1 不同因素对咖啡酰奎尼酸提取得率的影响

Fig. 1 Effect of different variables on the yield of diCQAs

2.2 响应面法的条件优化

根据表 1 的响应面因素和水平设计,共设计 29 组实验(其中 24 组为分析实验,5 组为中心实验). 结果如表 2 和 3 所示. 经 Design-Expert 8.0 软件的多元回归拟合,建立的多元二次回归模型为:

$$Y = 3.25 + 0.35A + 0.10B + 0.052C + 0.060D - 0.078AB - 0.010AC - 0.037AD - 0.017BC + 0.29BD + 0.030CD - 0.90A^2 - 0.41B^2 - 0.18C^2 - 0.15D^2$$

表 2 Box-Beknhen design 设计及结果

Table 2 Box-Beknhen design and extraction results

序号	因素				得率/%	序号	因素				得率/%
	A	B	C	D			A	B	C	D	
1	-1	-1	0	0	1.45	16	0	1	1	0	2.79
2	1	-1	0	0	2.32	17	-1	0	-1	0	1.71
3	-1	1	0	0	1.74	18	1	0	-1	0	2.34
4	1	1	0	0	2.30	19	-1	0	1	0	1.97
5	0	0	-1	-1	2.91	20	1	0	1	0	2.56
6	0	0	1	-1	2.83	21	0	-1	0	-1	2.75
7	0	0	-1	1	2.97	22	0	1	0	-1	2.47
8	0	0	1	1	3.01	23	0	-1	0	1	2.28
9	-1	0	0	-1	1.72	24	0	1	0	1	3.15
10	1	0	0	-1	2.57	25	0	0	0	0	3.23
11	-1	0	0	1	1.93	26	0	0	0	0	3.25
12	1	0	0	1	2.63	27	0	0	0	0	3.27
13	0	-1	-1	0	2.52	28	0	0	0	0	3.20
14	0	1	-1	0	2.73	29	0	0	0	0	3.29
15	0	-1	1	0	2.65						

由表 3 可见,模型的 $p < 0.01$,表明该模型拟合极显著,在统计学上是有意义的;模型失拟项 $p > 0.05$,不显著,表明该模型对实验结果拟合良好. $R^2 = 0.9903$, $R^2_{Adj} = 0.9807$,说明该模型只有 1.93% 的变异不能用模型解释;而相关系数和校正系数较近,表明该模型的拟合度高,实验误差小. 该模型可作为野艾蒿二咖啡酰奎尼酸得率与提取工艺参数的合适数学模型进行提取的预测.

表 3 回归模型系数的显著性检验结果

Table 3 Results of significance test of regression coefficient

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	7.68	14	0.55	102.57	<0.000 1
残差	0.075	14	5.347×10^{-3}		
失拟项	0.070	10	6.998×10^{-3}	5.74	0.053 5
纯误差	4.880×10^{-3}	4	1.220×10^{-3}		
总误差	7.75	28			

图 2 是该模型产生的响应面. 在这 4 个变量中, 当分析其中 2 个变量关系时另 2 个变量固定在 0 水平. 由图 2(a) 可见, 当乙醇浓度为 72.0%、温度为 51.4 °C 时, 二咖啡酰奎尼酸的得率达到最大值; 随着乙醇浓度和温度的进一步升高, 得率有所下降. 图 2(b) ~ (d) 结果显示乙醇浓度与提取时间、乙醇浓度与料液比、温度和时间的相互作用是不显著的. 图 2(e) 显示的提取温度和料液比之间的相互作用是显著的, 当提取温度为 52.9 °C、料液比为 1:54.8 (g/mL) 时, 二咖啡酰奎尼酸的得率达到最大值. 当提取时间和料液比在适当值时, 得率达到最大值(见图 2(f)), 但 2 个因素间的相互作用是不显著的.

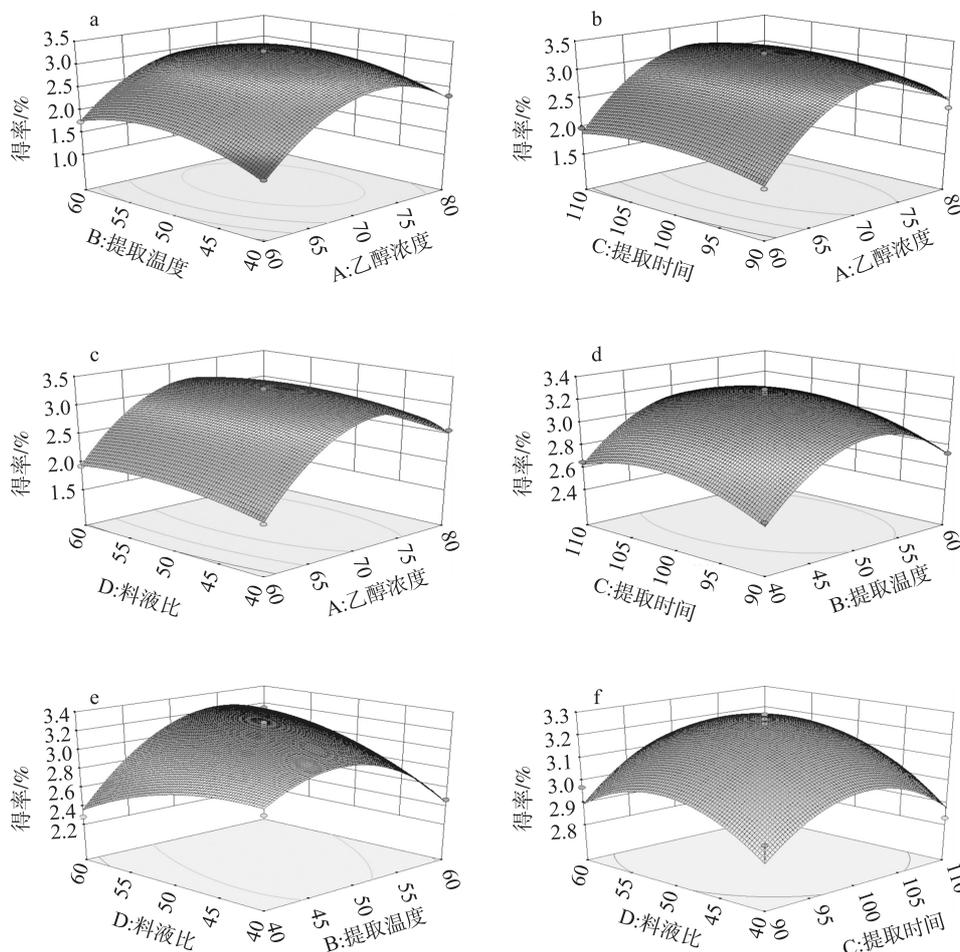


图 2 不同因素影响二咖啡酰奎尼酸得率的响应面

Fig. 2 Response surface (3D) showing the effects of variables on the yield of diCQAs

乙醇浓度、提取温度的 $p < 0.01$, 表明乙醇浓度和提取温度对野艾蒿二咖啡酰奎尼酸的提取含量影响达极显著水平; 料液比、提取时间的 $p < 0.05$, 表明料液比、提取时间对野艾蒿二咖啡酰奎尼酸的提取含量影响达显著水平. 影响野艾蒿二咖啡酰奎尼酸提取的各因素按影响大小排序依次为乙醇浓度 > 提取温度 > 料液比 > 提取时间.

通过回归模型预测的野艾蒿中二咖啡酰奎尼酸提取的最佳工艺条件为: 乙醇浓度 72%、提取温度 53 °C、提取时间 102 min、料液比 1:54 (g/mL). 验证性实验结果表明, 在最佳条件下, 二咖啡酰奎尼酸的得率达到 3.30%, 符合预测值.

2.3 提取物的液质联用分析结果

LC/MS 鉴定野艾蒿中的二咖啡酰奎尼酸, 一级质谱显示的质荷比均为 515, 二级质谱存在 m/z 191、173、179、135 特征离子碎片(1,5-diCQA 二级质谱图如图 3 所示). m/z 191 和 m/z 173 是奎尼酸的特征碎片离子峰, m/z 191 是 m/z 353 失去咖啡酰基团形成的, m/z 173 是 m/z 353 失去咖啡酰基团和一分子水形成的; m/z 179 是咖啡酸的特征碎片离子峰, 是 m/z 353 失去奎尼酸基团形成的; m/z 135 是咖啡酸的裂解产物. 除了碎片种类的不同外, 碎片丰度比也存在差异, 根据这些特征碎片, 对比文献[12-14], 确定这 3 种物质分别是 1,5-CQA、3,5-CQA、4,5-CQA, 含量分别为 8.3、14.2 和 10.5 mg/g.

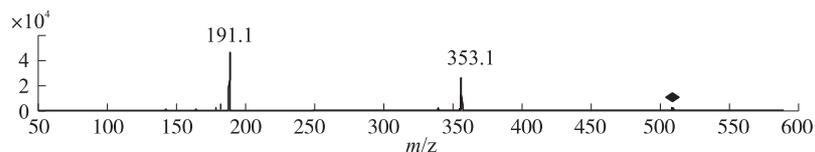


图3 1,5-二咖啡酰奎尼酸的二级质谱图

Fig. 3 MS² spectra of 1,5-diCQA

3 结论

在单因素实验的基础上,采用响应面优化法对野艾蒿二咖啡酰奎尼酸的提取进行了研究,建立了二次多项式回归模型,各因素影响次序为:乙醇浓度>提取温度>料液比>提取时间,得到最适提取条件为乙醇 72%,温度 53 ℃,时间 102 min,料液比 1:54(g/mL),得率达 3.30%。经 LC/MS 鉴定,野艾蒿中二咖啡酰奎尼酸由 1,5-diCQA、3,5-diCQA、4,5-diCQA 组成,含量分别为 8.3、14.2 和 10.5 mg/g。实验结果表明,响应面法适用于野艾蒿中二咖啡酰奎尼酸提取的优化,为野艾蒿中有效活性成分提取分离提供了有效的技术支撑。

[参考文献](References)

- [1] Cha J D, Hwa Y, Kim J Y. Essential oil and 1,8-cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2010, 19(1): 185-191.
- [2] Bao X L, Yuan H H, Wang C Z, et al. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98(1): 1 236-1 243.
- [3] 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(2): 186-190.
- [4] Li Y L, But P P H, Ooi V E C. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.) Frodin[J]. *Antiviral Research*, 2005, 68(1): 1-9.
- [5] Shi H T, Dong L, Jiang J, et al. Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway[J]. *Toxicology*, 2013, 303: 107-114.
- [6] Ji L L, Jiang P, Lu B, et al. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2013, 24(11): 1 911-1 919.
- [7] Yun N, Kang J W, Lee S M. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2012, 23(10): 1 249-1 255.
- [8] Yuan X Y, Gao M Z, Xiao H B, et al. Free radical scavenging activities and bioactive substances of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) leaves[J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(1): 10-14.
- [9] Cinkilic N, Cetintas S K, Zorlu T, et al. Radioprotection by two phenolic compounds; Chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 53: 359-363.
- [10] 陈育如, 钱媛媛, 柯小红, 等. 一种从野艾蒿中制备咖啡酰奎尼酸的方法: 中国, CN201310424422.7[P]. 2014-02-12
Chen Yuru, Qian Yuanyuan, Ke Xiaohong, et al. A method to prepare caffeoylquinic acids from *Artemisia lavandulaefolia* DC: China, CN201310424422.7[P]. 2014-02-12. (in Chinese).
- [11] Wu S H, Gong G L, Wang Y Y, et al. Response surface optimization of enzyme-assisted extraction polysaccharides from *Dictyophora indusiata*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 61: 63-68.
- [12] Zhang J Y, Zhang Q, Li N, et al. Diagnostic fragmentation-based and extension strategy coupled to DFIs intensity analysis for identification of chlorogenic acids isomers in Flos Lonicerae Japonicae by HPLC-ESI-MSⁿ[J]. *Talanta*, 2013, 104: 1-9.
- [13] Karioti A, Bolognesi L, Vincicieri F F, et al. Analysis of the constituents of aqueous preparations of stachys recta by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 53(1): 15-23.
- [14] Clifford M N, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53: 3 821-3 832.

[责任编辑:严海琳]