

响应面法优化吴茱萸五加叶柚皮苷纯化工艺

肖 珊, 罗 姣, 张斌贝, 高大林, 刘向前*

湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 利用响应面设计法优化聚酰胺树脂纯化吴茱萸五加 *Acanthopanax evodiaefolius* 叶中柚皮苷的工艺。方法 对上样质量浓度、上柱样用量、洗脱体系、洗脱剂用量、体积流量 5 个因素进行单因素考察, 并使用响应曲面设计法优化筛选出聚酰胺树脂纯化吴茱萸五加叶中柚皮苷的最优工艺条件。**结果** 吴茱萸五加叶中的柚皮苷的最优纯化工艺条件为上柱样质量浓度为 4.0 mg/mL, 上样量体积为 3.5 BV, 洗脱体系为 30% 甲醇, 洗脱剂用量为 3.0 BV, 洗脱体积流量为 8.0 BV/h。在该条件下, 柚皮苷质量分数由 5.08% 提高到 56.12%, 得率为 41.69%。再经一步重结晶后质量分数达到 90% 以上, 符合医药原料要求。**结论** 聚酰胺树脂对吴茱萸五加叶中柚皮苷的纯化效果好, 操作简单, 效率高, 稳定性好, 可用于工业推广。

关键词: 响应面法; 聚酰胺树脂; 吴茱萸五加; 柚皮苷; 纯化; 单因素实验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)04-0868-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.012

Optimization of purification technology of naringin from leaves of *Acanthopanax evodiaefolius* by response surface methodology

XIAO Shan, LUO Jiao, ZHANG Bin-bei, GAO Da-lin, LIU Xiang-qian

School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective Response surface methodology was used to optimize the purification process of naringin from *Acanthopanax evodiaefolius* leaves by polyamide resin. **Methods** The optimum technological conditions for the purification of naringin in the leaves of *Acanthopanax evodiaefolius* were screened by single factor investigation and response surface design with five factors, including the concentration of sample, sample loading, the elution system, the amount of eluent, and the flow rate. **Results** The optimum purification conditions of naringin in the leaves of *A. evodiaefolius* were as follow: the concentration of the sample was 4.0 mg/mL, the sample volume was 3.5 BV, the elution system was 30% methanol, the eluant volume was 3.0 BV, and the elution flow rate was 8.0 BV/h. Under this condition, the purity of naringin was improved from 5.08% to 56.12%, and the yield was 41.69%. And mass fraction reached more than 90% after recrystallization, which met the requirements of pharmaceutical raw materials. **Conclusion** Purification of naringin from the leaves of *A. evodiaefolius* by polyamide resin chromatography has the advantages of good purification effect, simple operation, high efficiency, and good stability, which can be used for industrial production.

Key words: response surface method; polyamide resin; *Acanthopanax evodiaefolius* Franch; naringin; purification; single factor experiment

吴茱萸五加 *Acanthopanax evodiaefolius* Franch 为五加科 (Araliaceae) 五加属 *Acanthopanax* Miq. 植物, 广泛分布于我国长江流域以及长江以南地区, 且为五加属唯一的乔木品种。其根皮有祛风除湿、理气化痰作用; 主治风湿痹痛、腰膝酸痛、水肿、跌打损伤、劳伤咳嗽、哮喘^[1]。苗药亦将其叶用于

皮肤病的治疗^[2-3]。本课题组前期研究发现柚皮苷是其叶的主要成分^[4], 且甲醇提取物的质量分数高达 5.08%。柚皮苷 (naringin, Nar) 是一种天然的双氢黄酮类化合物, 是中药化橘红、骨碎补、枳实、枳壳的主要活性成分^[5]。文献调研也表明柚皮苷具有良好的抗氧化、降血糖、保护内皮细胞、抗炎活性^[6-10]

收稿日期: 2018-10-30

基金项目: 湖南中医药大学生物工程重点学科资助 (校行科字 [2018] 3 号)

作者简介: 肖 珊, 女, 在读硕士, 研究方向为中药及天然药物活性成分研究。Tel: 18373134709 E-mail: 2849690327@qq.com

*通信作者 刘向前, 男, 博士生导师, 教授。Tel: 13308439949 E-mail: lxq0001cn@163.com

以及抗过敏的作用^[11]，对杂环胺类物质等有致突变作用，同时对金黄色葡萄球菌等细菌和某些真菌也有抑制作用^[12]。其还有抗肿瘤、抗病毒、镇静、镇痛、解痉、治疗胃溃疡、降血胆固醇等作用，且能改善微循环和软组织细胞功能，可用于心脑血管疾病的治疗^[13-16]。因柚皮苷具有减少脂质合成和抗氧化的作用，如将柚皮苷添加在畜禽饲料中可提高畜禽抗氧化性能和调控脂肪代谢，进而影响肉品质，因此柚皮苷在饲料方面有一定的应用前景^[17]。同时柚皮苷还可以作为天然色素、风味改良剂和苦味剂用于食品、饮料的生产，又可作为合成高甜度、无毒、低能量的新型甜味剂的原料。基于柚皮苷的多样且良好的生物、药理活性，吴茱萸五加叶资源丰富且柚皮苷含量高，因此对吴茱萸五加叶中柚皮苷的分离纯化进行研究，开发柚皮苷新的天然植物来源，具有很好的应用前景。

聚酰胺树脂是由酰胺聚合而成的一类高分子物质，它对黄酮类化合物具有较强的吸附性能，主要通过氢键和范德华力吸附，且其容量大，适合于制备性分离^[18-19]。相较于传统的分离方法，具有步骤较少，效率高、纯化效果佳等优点。聚酰胺树脂纯化吴茱萸五加叶中柚皮苷的研究未见报道。本研究首次采用聚酰胺树脂纯化吴茱萸五加叶中的柚皮苷，在单因素实验的基础上，采用响应面设计法对纯化工艺进行优化，得到最佳纯化工艺，为进一步开发吴茱萸五加叶提供研究基础，也为柚皮苷提供了一个新的物质来源。

1 试药与仪器

药材于 2015 年 6 月采自湖南，经湖南中医药大学刘向前教授鉴定为五加科五加属植物吴茱萸五加 *Acanthopanax evodiaefolius* Franch 的叶，阴干后备用，标本（编号 201506）保存于湖南中医药大学药学院。

柚皮苷对照品，实验室自制，经 HPLC 测定质量分数 $\geq 97\%$ ；聚酰胺树脂，天津波鸿树脂科技有限公司；氢氧化钠、冰醋酸，天津市大茂化学试剂厂；甲醇、石油醚、乙腈，天津恒兴化学试剂有限公司；各试剂均为分析纯。

AUW-20D 精密电子天平，日本岛津公司；HH-S 型恒温水浴锅、SHZ-D (III) 型循环水式真空泵，巩义市予华仪器有限责任公司；DZ-1BCII 型真空干燥箱、WGL-125B 型鼓风干燥箱，天津泰斯特仪器有限公司；分液漏斗（5 L）；RED-201D 旋转蒸发

仪，巩义市予华仪器有限公司；KQ-250DE 超声波清洗仪，昆山市超声波仪器有限公司；Agilent 1200 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；BCD-260TM 型冰箱，青岛海尔股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 吴茱萸五加叶甲醇提取物浸膏的脱脂处理

称取干燥的吴茱萸五加叶 5.6 kg，用甲醇（料液比 1 : 5）回流提取 3 次，每次 3 h，合并提取液，减压浓缩至适当体积，置于水浴锅上蒸至无醇味，得浸膏 672.3 g。取该浸膏 672.3 g，用 2 L 蒸馏水充分分散，再用 2 L 石油醚进行萃取处理，共 12 次。萃取后静置 1 h，待其充分分层后，将水层和石油醚层分别倒出。将水层置于旋转蒸发器中进行浓缩，浓缩后蒸干大量水分后，干燥后称定质量，得到浸膏 400.2 g。

2.2 色谱条件^[20-22]

色谱柱为 Kromasil C₁₈ (50 mm × 4.6 mm, 5 μm)，流动相为乙腈-水 (20 : 80)；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 283 nm；柱温 30 °C；理论塔板数以柚皮苷计不少于 2 400。对照品与供试品的色谱图见图 1。

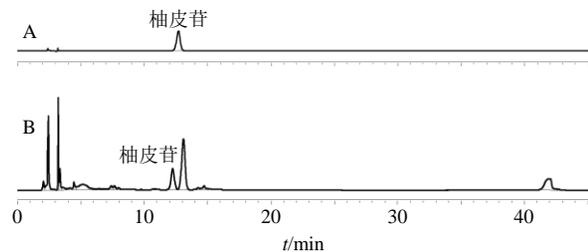


图 1 对照品 (A) 及供试品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC diagram of reference substance (A) and test substance (B)

2.3 对照品溶液的配制

精密称取柚皮苷对照品 4.0 mg，置于 25 mL 量瓶中，用无水甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得到质量浓度为 0.16 mg/mL 的柚皮苷对照品溶液。

2.4 供试品溶液的配制

精密称取 170.8 mg 吴茱萸五加叶甲醇提取物脱脂浸膏，置于 50 mL 棕色量瓶中，用无水甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，过 0.45 μm 的微孔滤膜，即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密量取柚皮苷对照品溶液 1、5、10、15、20 μL，分别注入高效液相色谱仪中，分析时间为 15 min，测定其峰面积，以柚皮

昔对照品进样量为横坐标, 所对应的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。线性方程为 $Y=785\ 340\ 561.5 X-23\ 323.546\ 3$, $r=0.999\ 8$ 。柚皮昔在 0.16~2.40 μg 有良好的线性关系。

2.5.2 吴茱萸五加叶浸膏柚皮昔含量测定 取 3 批样品, 按“2.4”项方法配制供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下, 分别精密吸取供试品溶液与对照品溶液各 10 μL , 注入高效液相色谱仪中, 记录峰面积并计算含量。实验所测得质量分数分别为 5.10%、5.09%、5.05%, RSD 值为 0.52%。

2.6 聚酰胺树脂的选取

2.6.1 树脂的预处理 将聚酰胺树脂用 95% 甲醇浸泡过夜, 使其充分溶胀, 将泡好的聚酰胺树脂装入玻璃柱后, 继续用 95% 甲醇在柱上流动清洗, 直至流出液与水混合不成白色浑浊为止, 然后用大量蒸馏水冲洗至大孔树脂无醇味。用 5% NaOH 溶液浸泡树脂过夜, 以 8.0 BV/h 的体积流量进行冲洗后, 再用蒸馏水以同样的体积流量冲洗至中性。然后用 5% 醋酸溶液浸泡树脂过夜, 以 8.0 BV/h 的体积流量进行冲洗后, 再用蒸馏水以相同体积流量洗至中性。最后用 95% 甲醇浸泡, 储存备用, 用时再用蒸馏水冲洗至无醇味, 抽滤, 干燥即得聚酰胺树脂粉末。

2.6.2 聚酰胺树脂的静态吸附率测定 精密称定“2.6.1”项中 3 份已处理好的干燥聚酰胺树脂粉末 10.0 g, 分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中。再精密称取 400 mg 吴茱萸五加叶甲醇提取物脱脂浸膏, 置于 100 mL 的棕色量瓶中, 用无水甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 4.0 mg/mL 的样品。然后分别在 3 份聚酰胺树脂中加入样品 1.0 BV, 震荡 24 h 后, 吸取上清液 1.0 mL, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 测定上清液中柚皮昔的含量, 计算各聚酰胺树脂的静态吸附率^[23]。

$$\text{吸附率} = (C_0 - C_1) / C_0$$

C_0 为吸附前柚皮昔质量浓度, C_1 为吸附后柚皮昔质量浓度

2.6.3 解吸率测定 将“2.6.2”项中饱和的树脂用 1.0 BV 蒸馏水冲洗, 抽滤后置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇溶液 1.0 BV, 静置 12 h, 测定解吸液中柚皮昔的含量, 并计算解吸率。

$$\text{静态解吸率} = C_2 / (C_0 - C_1)$$

C_2 为解吸后柚皮昔浓度

2.6.4 聚酰胺树脂型号的选择 根据静态吸附和解吸附实验结果, 由表 1 可知, 各型号的聚酰胺树脂对吴茱萸五加叶中柚皮昔吸附效果差别不大, 聚

表 1 聚酰胺树脂的选择

Table 1 Selection of polyamide resin

| 树脂型号 | 吸附率/% | 解吸率/% | 质量分数/% |
|--------------|-------|-------|--------|
| 聚酰胺 30~60 目 | 93.89 | 87.57 | 43.42 |
| 聚酰胺 60~80 目 | 93.77 | 79.26 | 38.54 |
| 聚酰胺 80~100 目 | 94.02 | 95.29 | 48.46 |

酰胺树脂 80~100 目解吸率最好, 综合分析, 选择聚酰胺树脂 80~100 目可作为纯化吴茱萸五加叶中柚皮昔最佳聚酰胺树脂型号。

2.7 单因素实验

2.7.1 上样液质量浓度对聚酰胺树脂纯化吴茱萸五加叶中柚皮昔的影响 精密称取 5 份 10.0 g 的干燥聚酰胺树脂粉末, 用 95% 甲醇浸泡过夜, 再通过湿法装柱, 然后用蒸馏水替换冲洗, 待用。分别精密称取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g 吴茱萸五加叶甲醇脱脂浸膏于 50 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 超声溶解 30 min, 制成质量浓度分别为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL 的上样液, 上样体积为 1.0 BV, 以 8.0 BV 的吸附体积流量上样, 静态吸附 2 h 后, 用 1.0 BV 的水洗除去上样液残留并收集, 测定吸附后残留液中柚皮昔的含量, 再用 2.0 BV 50% 甲醇溶液进行洗脱, 洗脱体积流量均为 8.0 BV/h, 收集解吸液, 在“2.2”项色谱条件下, 对解吸液中的柚皮昔含量进行测定, 将剩余解吸液干燥浓缩后称定固体质量, 计算解吸率和质量分数, 结果如表 2 所示。随着上样液质量浓度的增加, 解吸率呈现下降趋势, 而质量分数出现先增大后缓慢减少的趋势, 综合考虑, 选择 4.0 mg/mL 为最佳上样液质量浓度。

$$\text{解吸率} = C_2 V_2 / (C_0 V_0 - C_1 V_1)$$

$$\text{质量分数} = C_2 V_2 / M$$

V_1 为吸附后残余体积, V_2 为解吸液体积, M 为剩余解吸液干燥浓缩后的固体质量

2.7.2 上样液用量对聚酰胺树脂纯化吴茱萸五加叶中柚皮昔的影响 将精密称取的 5 份 10.0 g 干燥聚

表 2 上样液质量浓度考察

Table 2 Concentration of sample solution

| 上样液质量浓度/(mg·mL ⁻¹) | 解吸率/% | 质量分数/% |
|--------------------------------|-------|--------|
| 2.0 | 99.19 | 15.99 |
| 4.0 | 95.29 | 48.46 |
| 6.0 | 79.69 | 41.15 |
| 8.0 | 78.67 | 36.11 |
| 10.0 | 66.19 | 32.48 |

酰胺树脂粉末按照“2.7.1”项方法装入玻璃柱，蒸馏水替换冲洗，待用。分别配制质量浓度为 4.0 mg/mL 的上样液 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5 BV 进行上样，吸附体积流量 8.0 BV/h，静态吸附 2 h 后，分别用 1.0 BV 水洗，再用 1.0 BV 50% 甲醇溶液洗脱，洗脱体积流量均为 8.0 BV/h，测定吸附残余液和解吸液中柚皮苷含量，计算解吸率和质量分数。结果如表 3 所示。解吸率随上样样品体积的增加，呈现先下降然后趋于平缓再快速下降，而质量分数缓慢增加，在上样体积为 2.5 BV 时达到最大后下降，综合考虑选择 2.5 BV 为最佳上样液用量。

表 3 上样液用量考察

Table 3 Investigation of sample loading

| 上样液体积/BV | 解吸率/% | 质量分数/% |
|----------|-------|--------|
| 0.5 | 99.33 | 25.08 |
| 1.5 | 96.55 | 42.06 |
| 2.5 | 97.01 | 46.20 |
| 3.5 | 97.20 | 43.13 |
| 4.5 | 90.00 | 42.88 |

2.7.3 洗脱体系对聚酰胺树脂纯化吴茱萸五加叶中柚皮苷的影响 按照“2.7.1”项方法将 5 份聚酰胺树脂进行上柱处理，共配制质量浓度为 4.0 mg/mL 的上样液 12.5 BV，平行分为 5 份后进行上样，以 8.0 BV/h 的体积流量吸附，静置 2 h 后，1.0 BV 的体积流量进行水洗，再分别用 10%、30%、50%、70%、90% 甲醇溶液进行洗脱，洗脱体积为 1.0 BV，洗脱体积流量均为 8.0 BV/h，测定吸附残余液和解吸液中柚皮苷含量，计算解吸率和质量分数，结果如表 4 所示。解吸率和纯度均随甲醇体积分数的增加而增大，在洗脱体积分数为 50% 时质量分数达到最大值，解吸率也达到了较大值，两者随后趋于平稳，故选择 50% 的甲醇溶液为最佳洗脱体系。

2.7.4 洗脱剂用量对聚酰胺树脂纯化吴茱萸五加

表 4 洗脱体系的考察

Table 4 Investigation of elution system

| 洗脱体系 | 解吸率/% | 质量分数/% |
|--------|-------|--------|
| 10% 甲醇 | 3.84 | 5.86 |
| 30% 甲醇 | 14.27 | 12.66 |
| 50% 甲醇 | 70.67 | 30.39 |
| 70% 甲醇 | 70.83 | 27.30 |
| 90% 甲醇 | 75.74 | 27.30 |

叶中柚皮苷的影响 按照“2.7.1”项方法将五份聚酰胺树脂进行上柱处理，共配制质量浓度为 4.0 mg/mL 的上样液 12.5 BV，平行分为 5 份后进行上样，以 8.0 BV/h 的体积流量吸附，静置 2 h 后，1.0 BV 体积流量进行水洗，再分别用 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 BV 50% 甲醇溶液进行洗脱，洗脱体积为 1.0 BV，洗脱体积流量均为 8.0 BV/h，测定吸附残余液和解吸液中柚皮苷含量，计算解吸率和质量分数，结果如表 5 所示。解吸率和质量分数均随洗脱剂用量的增加而增大，然后急剧下降。在洗脱剂用量为 4.0 BV 时有最大值，故选择 4.0 BV 甲醇溶液为最佳洗脱剂用量。

表 5 溶剂体积的考察

Table 5 Investigation of solvent volume

| 洗脱剂用量/BV | 解吸率/% | 质量分数/% |
|----------|-------|--------|
| 1.0 | 24.56 | 14.03 |
| 2.0 | 56.20 | 23.05 |
| 3.0 | 82.78 | 30.85 |
| 4.0 | 93.07 | 35.87 |
| 5.0 | 29.78 | 11.41 |

2.7.5 洗脱体积流量对聚酰胺树脂纯化吴茱萸五加叶中柚皮苷的影响 按照“2.7.1”项方法将 5 份聚酰胺树脂进行上柱处理，共配制质量浓度为 4.0 mg/mL 的上样液 12.5 BV，平行分为 5 份后进行上样，吸附速度与洗脱速度保持一致，静置 2 h 后，先用 1.0 BV 体积流量进行水洗，再用 4.0 BV 50% 甲醇溶液洗脱，洗脱体积流量分别控制在 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 BV/h，测定吸附残余液和解吸液中柚皮苷含量，计算解吸率和质量分数，结果如表 6 所示。解吸率随洗脱体积流量的增加，呈现先增加然后减小的趋势，而质量分数先缓慢增加，在洗脱体积流量为 8.0 BV/h 时达到最大后下降，综合考虑选择 8.0 BV/h 为最佳洗脱体积流量。

表 6 洗脱体积分数的考察

Table 6 Investigation of elution velocity

| 洗脱剂体积分数/(BV·h ⁻¹) | 解吸率/% | 质量分数/% |
|-------------------------------|-------|--------|
| 2.0 | 65.38 | 14.03 |
| 4.0 | 65.93 | 24.23 |
| 6.0 | 67.81 | 25.03 |
| 8.0 | 66.58 | 25.33 |
| 10.0 | 66.41 | 25.09 |

2.8 响应面设计法

2.8.1 试验设计 根据单因素实验结果结合响应面分析法^[21], 分别选择上柱样品质量浓度 (A)、洗脱体系 (B)、洗脱剂用量 (C) 这 3 个对吴茱萸五加叶中柚皮苷的质量分数影响较大的因素作为自变量, 以吴茱萸五加叶中柚皮苷的质量分数作为因变量 (Y), 利用 Design-Expert.8.05b 软件设计出 3 因素 3 水平的响应面实验, 得到 17 个实验点的响应面分析实验, 实验方案与结果见表 7。

2.8.2 实验结果 运用 Design-Expert.8.05b 软件对数据进行分析, 得到的以柚皮苷纯度为因变量 Y 以

A、B、C 3 个自变量进行的多元二次响应面回归模型为 $Y=39.66+4.09 A-4.12 B-2.80 C-2.00 AB-2.20 AC-2.61 BC-2.11 A^2+4.45 B^2+3.15 C^2$ 。各因素的方差分析见表 8。在实验设计范围中, 该回归模型 ($P=0.002 4<0.01$) 显著, 有统计学意义; 失拟误差 $P=0.136 4>0.05$ 不显著, 说明模型可以用来对试验进行拟合。A、B、C 三者的 P 值均小于 0.01, 表明对柚皮苷纯度的影响极为显著, 各影响因素大小顺序为 C、B、A、AB、AC、BC。各因素相互影响呈线性关系, $r=0.932 9$, $R_{adj}=0.201 6$, $R_{pred}=0.201 6$, 说明模型拟合较好, 试验操作可靠性高。

表 7 响应面设计与结果

Table 7 Response surface design and results

| 试验号 | A/BV | B/% | C/BV | Y/% | 试验号 | A/BV | B/% | C/BV | Y/% |
|-----|-----------|---------|-----------|-------|-----|-----------|---------|-----------|-------|
| 1 | 1.50 (-1) | 50 (0) | 5.00 (1) | 37.86 | 10 | 3.50 (1) | 50 (0) | 3.00 (-1) | 48.87 |
| 2 | 2.50 (0) | 50 (0) | 4.00 (0) | 40.40 | 11 | 2.50 (0) | 50 (0) | 4.00 (0) | 40.10 |
| 3 | 2.50 (0) | 50 (0) | 4.00 (0) | 40.47 | 12 | 1.50 (-1) | 50 (0) | 3.00 (-1) | 39.03 |
| 4 | 2.50 (0) | 50 (0) | 4.00 (0) | 36.71 | 13 | 2.50 (0) | 30 (-1) | 5.00 (1) | 50.88 |
| 5 | 1.50 (-1) | 30 (-1) | 4.00 (0) | 38.49 | 14 | 1.50 (-1) | 70 (1) | 4.00 (0) | 33.64 |
| 6 | 2.50 (0) | 30 (-1) | 3.00 (-1) | 51.29 | 15 | 2.50 (0) | 70 (1) | 5.00 (1) | 38.03 |
| 7 | 2.50 (0) | 50 (0) | 4.00 (0) | 40.63 | 16 | 3.50 (1) | 30 (-1) | 4.00 (0) | 50.35 |
| 8 | 2.50 (0) | 70 (1) | 3.00 (-1) | 48.87 | 17 | 3.50 (1) | 70 (1) | 4.00 (0) | 41.51 |
| 9 | 3.50 (1) | 50 (0) | 5.00 (1) | 37.96 | | | | | |

表 8 响应面二次回归方程分析

Table 8 Analysis of response surface two times regression equation

| 方差来源 | 均方和 | 自由度 | 离差平方和 | F 值 | P 值 | 方差来源 | 均方和 | 自由度 | 离差平方和 | F 值 | P 值 |
|------|--------|-----|--------|-------|---------|----------------|--------|-----|-------|-------|---------|
| 模型 | 539.39 | 9 | 59.93 | 10.81 | 0.002 4 | A ² | 18.83 | 1 | 18.83 | 3.40 | 0.107 9 |
| A | 134.07 | 1 | 134.07 | 24.18 | 0.001 7 | B ² | 83.39 | 1 | 83.39 | 15.04 | 0.006 1 |
| B | 135.88 | 1 | 135.88 | 24.50 | 0.001 7 | C ² | 41.85 | 1 | 41.85 | 7.55 | 0.028 6 |
| C | 62.83 | 1 | 62.83 | 11.33 | 0.012 0 | 残差 | 38.82 | 7 | 5.55 | | |
| AB | 15.96 | 1 | 15.96 | 2.88 | 0.133 6 | 失拟项 | 27.78 | 3 | 9.26 | 3.35 | 0.136 4 |
| AC | 19.45 | 1 | 19.45 | 3.51 | 0.103 3 | 误差 | 11.04 | 4 | | | |
| BC | 27.25 | 1 | 27.25 | 4.91 | 0.062 2 | 总离差 | 578.21 | 16 | | | |

2.8.3 响应面图分析 Design-Expert 8.05b 软件得到的响应面三维图见图 2, 观察曲面的倾斜度确定两者对响应值的影响程度, 从图 2 中可以看出洗脱体系和洗脱剂用量所构成的曲面较为陡峭, 说明两者对柚皮苷纯度的交互作用显著, 其他因素之间的交互作用较弱。

2.8.4 最优纯化条件 根据响应面分析结果与得到的二次回归方程, 利用软件 Design-Expert.8.05b 得到了使柚皮苷纯度最大的最佳条件: 上样量体积

为 3.5 BV, 洗脱体系为 30%, 洗脱剂用量为 3.0 BV, 预测柚皮苷的质量分数可达到 57.76%。

2.8.5 最优条件验证 精密称取 3 份 10.0 g 的干燥聚酰胺树脂粉末, 用 95% 甲醇浸泡过夜, 再通过湿法装柱, 然后用蒸馏水替换冲洗, 待用。在上柱样质量浓度为 4.0 mg/mL, 上样量体积为 3.5 BV, 洗脱体系为 30%, 洗脱剂用量为 3.0 BV, 洗脱体积流量为 8.0 BV/h 的条件下进行相应操作。按照最优工艺优化后, 得到的柚皮苷质量分数分别为 56.12%、

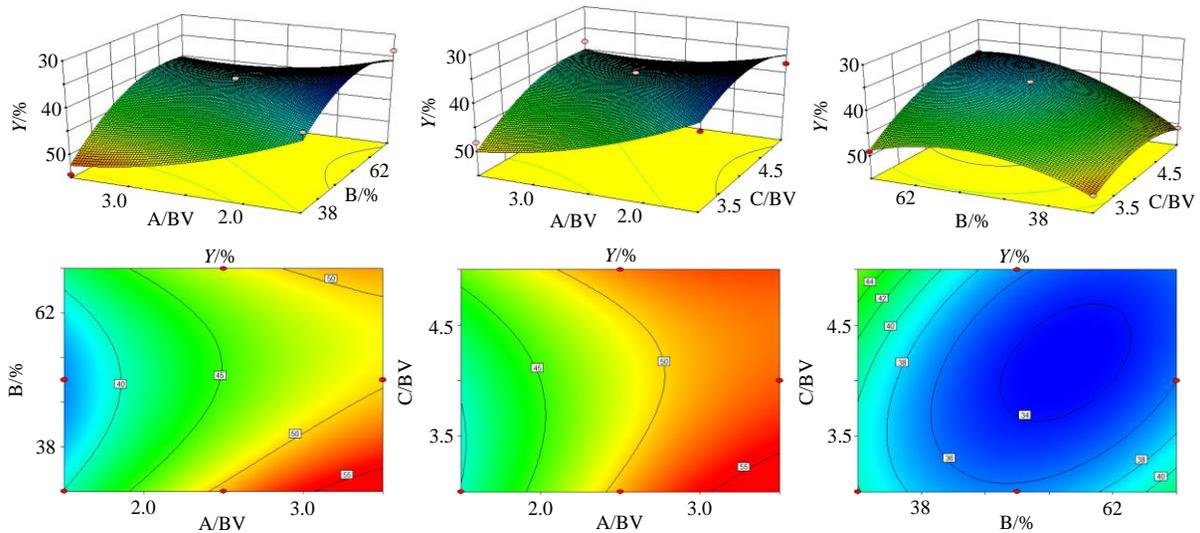


图 2 上样量 (A)、洗脱体积分数 (B) 和洗脱剂用量 (C) 交互作用对柚皮苷质量分数影响的响应面和等高线

Fig. 2 Response surface and contour of interrelated influence of sample loading (A), elution volume fraction (B), and eluent dosage (C) on purity of naringin

56.16%、56.08%。3 次验证实验柚皮苷质量分数的均值为 56.12%，接近理论预测值，误差仅为 1.64%。以上数据说明了聚酰胺树脂纯化柚皮苷工艺的可行性，且 3 次实验的 RSD 值为 0.071%，同时说明了该工艺的稳定性。采用该优化工艺得到的粗品只经一步重结晶后质量分数可达到 90% 以上，符合医药原料要求。

3 讨论

本实验首次采用聚酰胺树脂纯化吴茱萸五加叶中的柚皮苷，通过对上柱样质量浓度、上样量体积、洗脱体系、洗脱剂用量、洗脱体积流量这 5 种因素进行单因素实验，并采用响应面设计法研究了上柱样用量、洗脱体系、洗脱剂用量对纯化吴茱萸五加叶中柚皮苷的影响，得到最佳的纯化工艺条件：上柱样质量浓度为 4.0 mg/mL，上样量体积为 3.5 BV，洗脱体系为 30% 甲醇，洗脱剂用量为 3.0 BV，洗脱体积流量为 8.0 BV/h。在单因素实验中，分别得到的结果，在洗脱剂用量为 1.0 BV 的条件下，洗脱体系 50% 甲醇优于 30% 甲醇；在洗脱体系为 50% 甲醇条件下，洗脱剂用量 4.0 BV 优于 3.0 BV。与响应面设计法得出的最优条件有点差异。综合表 7 实验结果可知，响应面法给出最优条件下得到的柚皮苷纯度与单因素实验中的最佳条件下得到的柚皮苷纯度相比，30% 甲醇的洗脱体系与 3.0 BV 的洗脱剂用量优于 50% 甲醇的洗脱体系与 4.0 BV 的洗脱剂用量。因此综合响应面三维图分析结果得出洗脱体系和洗脱剂用量对柚皮苷质量分数的交互作用显著。

在此最佳条件下进行实验，柚皮苷质量分数从 5.08% 提高至 56.12%，得率为 41.69%。同时经一步重结晶后质量分数可达到 90% 以上。与同类柚皮苷纯化工艺中相比，如张磊等^[24]用 AB-8 树脂分离纯化骨碎补中的柚皮苷，实验结果由纯化前的 5.37% 提高至 17.44%；杨蕾等^[25]用大孔树脂纯化骨碎补中柚皮苷实验结果由纯化前的 4.26% 提高到 29.63%。相比其他树脂类填料，聚酰胺树脂对柚皮苷的富集更具有优势。其次与同类纯化工艺相比，本实验采用了甲醇作为洗脱剂。通过甲醇与乙醇 2 种洗脱剂对比实验，发现甲醇的黏性比乙醇低，不易造成柱子堵塞。利用聚酰胺树脂柱色谱对柚皮苷进行纯化同时结合响应面设计法进行优化，使柚皮苷的含量大幅度的提升，达到了预期的分离纯化效果。该工艺操作简单，效率高，稳定性好。得到的柚皮苷可通过进一步纯化，为柚皮苷天然品提供了一个新的药用来源。

参考文献

- [1] Huang W C, Li Z, Li X J, et al. Chemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxic activity of the liposoluble constituents from different parts of *Acanthopanax evodiaefolius* by the herbal Blitzkrieg extractor [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(2): 406-411.
- [2] Lin Q Y, Jin L J, Ma Y S, et al. *Acanthopanax senticosus* inhibits nitric oxide production in murine macrophages *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phyther Res*, 2007, 21(9): 879-883.
- [3] Won J H, Park S Y, Nam S G, et al. Inhibition of

- lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide and cyclooxygenase-2 by chiisanoside via suppression of nuclear factor-kappa B activation in RAW 264.7 macrophage cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(10): 1919-1924.
- [4] 李小军, 黄玮超, 李芝, 等. 吴茱萸五加叶化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2748-2751.
- [5] 张羽飞, 孟娜娜, 李厚忠, 等. 柚皮苷对糖尿病大鼠心肌病氧化应激及内质网应激的影响 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 596-602.
- [6] 张羽飞, 孟娜娜, 李厚忠, 等. 柚皮苷对糖尿病大鼠心肌纤维化及 STAT3 磷酸化水平的影响 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(1): 48-54.
- [7] Alam M A, Subhan N, Rahman M M, *et al.* Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action [J]. *Adv Nutr*, 2014, 5(4): 404-417.
- [8] Bharti S, Rani N, Krishnamurthy B, *et al.* Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: A review [J]. *Planta Med*, 2014, 80(6): 437-451.
- [9] 孟娜娜, 白里雪, 李鑫鑫, 等. 柚皮苷对糖尿病及其并发症作用机制的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(4): 560-565.
- [10] 马信龙, 孙晓雷, 杜育任, 等. 微应变环境下柚皮苷对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3200-3205.
- [11] Lin S P, Hou Y C, Tsai S Y, *et al.* Tissue distribution of naringenin conjugated metabolites following repeated dosing of naringin to rats [J]. *Biomedicine*, 2014, 4(3): 1-6.
- [12] 金元宝, 刘萍, 刘小根, 等. 柚皮苷的生物活性研究进展 [J]. 中国现代医药杂志, 2018, 20(3): 92-97.
- [13] Tripoli E, La G M, Giammanco S, *et al.* Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review [J]. *Food Chem*, 2007, 104(2): 466-479.
- [14] 夏侯国论, 刘霞, 丁冶春, 等. 柚皮苷-稀土配合物的合成及抗肿瘤活性的研究 [J]. 赣南医学院学报, 2014, 28(11): 812-818.
- [15] 杨文静, 王璐, 孙锐. 不同浓度柚皮苷对人宫颈癌 HeLa 细胞体外增殖及其 COX-2 表达影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(8): 1200-1203.
- [16] 贺敏, 秦建设, 吕武宾, 等. 柚皮苷对胃溃疡大鼠血清及胃黏膜组织中 SOD 和 NO 水平的影响 [J]. 重庆医学, 2017, 46(2): 230-232.
- [17] 吴泳江, 王敬, 王琪, 等. 柚皮苷的生物学功能及在畜禽生产中的应用 [J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(7): 9-13.
- [18] Krutzkaya J R, Fernando B, Omar N M C, *et al.* Hypoglycemic antihyperglycemic and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 23(161): 36-45.
- [19] Wu K, Liang T, Duan X, *et al.* Anti-diabetic effects of puerarin, isolate from *Pueraria lobata* (Willd.), on streptozotocin-diabetogenic mice through promoting insulin expression and ameliorating metabolic function [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60(10): 341-347.
- [20] 严晓丽, 闫倩倩, 刘晓政, 等. 高效液相色谱法测定枳壳中新橙皮苷及柚皮苷 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(21): 161-166.
- [21] 彭玲娜, 丁野, 孙辉, 等. HPLC 法同时测定胃痛丸中柚皮苷、新橙皮苷的含量 [J]. 中国药师, 2017, 20(6): 1112-1114.
- [22] 汪秀月. 高效液相色谱法测定骨刺片中柚皮苷含量 [J]. 中国药业, 2016, 25(4): 77-78.
- [23] 罗姣, 李芝, 张斌贝, 等. 糙叶五加叶中总黄酮的纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4661-4667.
- [24] 张磊, 李辉敏. AB-8 树脂分离纯化骨碎补中的柚皮苷 [J]. 九江医学, 2009, 24(1): 45-46.
- [25] 杨蕾, 柏艳柳, 王永, 等. 大孔树脂纯化骨碎补中柚皮苷的工艺 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(23): 1950-1990.