

糙叶五加叶中总黄酮的纯化工艺研究

罗 姣¹, 李 芝¹, 张斌贝¹, 高大林¹, 邹亲朋², 刘向前^{1*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 长沙博海生物科技有限公司, 湖南 长沙 410205

摘要: **目的** 研究优化糙叶五加叶总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺。**方法** 以处理后的总黄酮的质量分数和总黄酮得率为考察指标, 采用单因素实验结合响应曲面设计法进行纯化工艺优化研究。**结果** D101 型大孔吸附树脂对糙叶五加叶总黄酮有较好的吸附和洗脱效果, 其最佳的纯化工艺条件为色谱柱的径高比为 1 : 10, 25.0 g D101 大孔树脂的上样量为 750 mg, 溶剂体系为 50%乙醇, 洗脱体积流量为 5 mL/min, 洗脱体积为 130 mL。在此最佳优化条件下, 糙叶五加叶总黄酮的理论质量分数为 75.69%, 实际质量分数达到 75.87%; 总黄酮得率为 30.13%。**结论** D101 型大孔吸附树脂宜于纯化糙叶五加叶中的总黄酮, 且响应面法能有效地优化其纯化工艺。

关键词: 糙叶五加; 总黄酮; 大孔吸附树脂; 响应曲面设计法; 纯化; 单因素实验; 吸附; 洗脱

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)22 - 4661 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.011

Purification of total flavonoids from leaves of *Acanthopanax henryi*

LUO Jiao¹, LI Zhi¹, ZHANG Bin-bei¹, GAO Da-lin¹, ZOU Qin-peng², LIU Xiang-qian¹

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

2. Changsha Broad-Ocean Bio-Science & Technique Co., Ltd., Changsha 410205, China

Abstract: **Objective** To optimize the purification technology of total flavonoids from the leaves of *Acanthopanax henryi* by macroporous resin. **Methods** Using the purity and yield of total flavonoids as indexes, the single factor experiment combined with response surface methodology (RSM) was used to optimize the purification technology. **Results** It showed that D101 macroporous resin had good adsorption and desorption effects. The optimal purification conditions were as follows: diameter height ratio was 1 : 10, the loading amount was 750 mg each 25 g D101 macroporous resin, the flow rate was 5 mL/min, and eluted by 130 mL 50% ethanol. Under the proposed conditions, the experimental purity of total flavonoids reached 75.87%, which was well matched with the predictive purity of 75.69%. And the yield of total flavone was 30.13%. **Conclusion** The results proved that D101 macroporous resin can purify the total flavonoids from the leaves of *A. henryi* and RSM could optimize the purification technology effectively.

Key words: *Acanthopanax henryi* (Oliv.) Harms; total flavonoids; macroporous resin; response surface methodology; purification; single factor experiment; adsorption; desorption

糙叶五加 *Acanthopanax henryi* (Olive.) Harms 又名亨利五加, 为五加科五加属植物, 主要分布于湖南、四川、甘肃、浙江等地, 资源丰富, 是中国特有的植物, 并列入 2009 年版《湖南省中药材标准》。民间以其根皮入药^[1-2]。其味辛, 性温, 具有祛风除湿、强壮筋骨、活血去瘀、利水消肿的功效, 常用于风湿痹痛、筋骨痿软、脾肾阳虚、体虚乏力

等病症^[3-4]。

作为湖南省的一种特产药用经济作物, 糙叶五加现已在娄底和安化地区进行林产经济规范化种植, 开展糙叶五加叶的研究有利于更好地开发利用湖南的药用植物, 为发展湖南中医药经济提供可靠理论依据。本团队对糙叶五加叶的研究发现, 其中以芦丁 (rutin) 为代表的黄酮类成分量极高^[5-6]。芦

收稿日期: 2017-06-17

基金项目: 湖南省自然科学基金重点资助项目 (11JJ2042); 湖南省中药学“十二五”重点学科建设项目; 湖南中医药大学药物分析学“十二五”校级重点学科建设项目; 长沙市科技计划项目 (kq1701119)

作者简介: 罗 姣, 女, 在读硕士, 研究方向为中药及天然药物活性成分研究。Tel: 15307481656 E-mail: 744561218@qq.com

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

丁又名芸香苷,属于黄酮苷类物质,具有维生素P样作用,能降低毛细血管通透性和脆性,临床上用于高血压的辅助治疗和用于防治因维生素P缺乏所致的出血症^[7]。此外糙叶五加中含有的槲皮素、山柰酚等黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌等作用^[8]。但传统加工通常将糙叶五加的叶弃除,这不仅造成了极大的资源浪费,也会增加生产成本和工序。若能将糙叶五加的叶有效利用,不仅能减少浪费,保护环境,更能充分利用资源。

近年来,大孔吸附树脂在医药领域(特别是天然药物纯化)中广为应用,是精制中药功效成分的一种有效方法^[9]。本实验首次采用大孔树脂^[10-11]对糙叶五加叶总黄酮进行纯化富集,通过对不同树脂的静态吸附和解吸实验,优选出对糙叶五加叶总黄酮具有高吸附分离性能的树脂,并运用单因素实验结合响应曲面设计法优化糙叶五加叶总黄酮纯化工艺,为糙叶五加叶总黄酮的纯化提供实验方法并为大生产中的应用提供技术参数。

1 试药与仪器

糙叶五加叶,2012年11月采自湖南省娄底,阴干。经湖南中医药大学药学院刘向前教授鉴定为糙叶五加 *Acanthopanax henryi* (Oliv.) Harms 的叶。

芦丁对照品,中国食品药品检定研究院,批号110752-200511,质量分数 $\geq 98\%$;D101、AB-8、HPD-100大孔树脂,天津光复精细化工研究所;X-5大孔树脂,郑州勤实科技有限公司;NKA-9大孔树脂,天津波鸿树脂科技有限公司;浓盐酸,成都科龙化工试剂厂;亚硝酸钠、氯化铝、氢氧化钠,天津市大茂化学试剂厂;甲醇、乙醇,天津恒兴化学试剂有限公司;各试剂均为分析纯。

UV-1750型紫外可见分光光度计、AUW-220D电子分析天平,日本岛津公司;SHZ-D(III)型循环水式真空泵、RE-201D型旋转蒸发仪、HH-S型恒温水浴锅、ZF-7型三用紫外分析仪,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、FW-117型中草药粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司;KQ-250DE型数控超声波清洗器,昆山市超声波仪器有限公司;BCD-206TM型电冰箱,青岛海尔股份有限公司;多歧管冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 总黄酮粉末的制备^[11]

取糙叶五加叶1.2 kg,粉碎,过40目筛,用95%

乙醇(料液比1:5)回流提取3次,每次3 h,合并提取液,回收乙醇,得浓缩至无醇味的浸膏。以蒸馏水充分分散,置于1 000 mL分液漏斗中,以每体积400 mL石油醚萃取,共萃取5次;将水层放置于恒温水浴锅上蒸至140 mL,放入冷冻干燥机12 h,得到总黄酮干燥粉末134.685 g,备用。

精密称取总黄酮粗粉180.8 mg,经亚硝酸钠-亚硝酸铝-氢氧化钠法显色,于紫外-可见分光光度法测定吸光度(A)值,根据“2.4”项标准曲线,计算得糙叶五加叶粗粉的总黄酮得率约34.08%。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取总黄酮干燥粉末2.50 g,充分溶解后,倒入500 mL量瓶中,用蒸馏水定容,即得质量浓度为5.0 mg/mL的供试品溶液。后续供试品溶液按此方法配制。

2.3 测定波长的选择

吸取芦丁对照品和供试品溶液各1.0 mL,按“2.4”项下方法从“加5% NaNO_2 1 mL”起,配制显色溶液,在波长200~800 nm处扫描。结果表明,对照品和供试品的显色溶液均在510 nm处有最大吸收,因此选510 nm为测定波长。

2.4 线性关系考察^[12]

精密称取于120℃减压干燥至恒定质量的芦丁对照品25.0 mg,用甲醇充分溶解后,置于25 mL量瓶中,定容,摇匀。从中精密量取10.0 mL溶液,置于50 mL量瓶中,定容,摇匀。得0.2 mg/mL芦丁对照品溶液。精密吸取芦丁对照品溶液1、2、3、4、5、6 mL,分别置于6只25 mL量瓶中;加5% NaNO_2 1 mL,摇匀,静置6 min;加10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 1 mL,摇匀,静置6 min;加4% NaOH 10 mL,摇匀,静置15 min,加水至刻度,摇匀。按上述方法以甲醇为参照,配制相同的空白溶液。按紫外-可见分光光度法(UV-Vis),在510 nm波长处测定 A 值,以 A 值为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,得到回归方程 $A=0.011\ 3\ C+0.039\ 2$, $R^2=0.999\ 4$ 。结果表明,芦丁在15.78~60.42 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度与 A 值呈良好的线性关系。

2.5 大孔树脂的选取

2.5.1 树脂的预处理 将新购的D101、AB-8、NKA-9、X-5、HPD-100大孔树脂用95%乙醇浸泡24 h后,充分溶胀。将泡好的大孔树脂装入玻璃色谱柱中,用95%乙醇冲洗至流出液加水(1:5)混合后不呈白色浑浊为止,并用蒸馏水冲洗至大孔树

脂无醇味。用 5% HCl 浸泡大孔树脂 12 h 后, 以 4 BV/h 的体积流量冲洗。且用蒸馏水以同样体积流量冲洗至中性。然后用 4% NaOH 浸泡大孔树脂 12 h, 以 4 BV/h 的体积流量冲洗。随后用蒸馏水同样体积流量冲洗至中性。最后用 95% 乙醇浸泡, 储存备用。用时用蒸馏水水洗至无醇味, 抽滤, 以吸水纸吸去树脂表面水分, 即可。

2.5.2 大孔吸附树脂静态吸附率的测定 精密称定“2.5.1”项中处理好的 5 种大孔吸附树脂各 25.0 g(滤纸吸干树脂表面的水分), 分别置入 250 mL 具塞锥形瓶中, 各精密加入“2.2”项的供试品溶液 60 mL (5.0 mg/mL), 摇床震荡 48 h 后, 精密吸取上清液 1.0 mL, 按“2.4”项下“加 5% NaNO₂ 1 mL”起依法测定上清液中总黄酮的量, 按下式计算各型号树脂的静态吸附率^[13]。

$$\text{吸附率} = (C_0 - C_1) / C_0$$

C_0 为吸附前总黄酮质量浓度 (mg/mL), C_1 为吸附后总黄酮质量浓度 (mg/mL)

2.5.3 解吸率测定 将“2.5.2”项中吸附饱和的大孔树脂用 100 mL 蒸馏水洗涤, 抽滤, 再分别将其置于 250 mL 具塞锥形瓶中, 各精密加入 80 mL 75% 乙醇, 静置 24 h, 精密吸取上层解吸液, 按“2.4”项下“加 5% NaNO₂ 1 mL”起依法测定解吸液中的总黄酮的量, 计算各大孔吸附树脂的静态解吸率。

$$\text{解吸率} = C_2 / (C_0 - C_1)$$

C_2 为解吸附后总黄酮质量浓度 (mg/mL)

2.5.4 大孔吸附树脂的选择 根据静态吸附实验与解吸附实验的结果 (表 1) 可知, D101 型大孔吸附树脂对糙叶五加叶总黄酮的吸附效果最好, HPD-100、AB-8、X-5、NKA-9 型大孔吸附树脂次之; 而在解吸附实验中, NKA-9 型大孔吸附树脂的解吸附效果最好。D101 型大孔吸附树脂的吸附率最高, 但其解吸率稍弱。综合分析, D101、X-5、NKA-9

表 1 5 种大孔吸附树脂对糙叶五加叶总黄酮的吸附率与解吸率

树脂型号	吸附率/%	解吸率/%
D101	84.36	75.59
AB-8	76.33	66.83
X-5	73.81	82.36
HPD-100	80.29	76.38
NKA-9	73.82	84.98

型大孔吸附树脂的吸附率和解吸附率都比较高, 相比较于 X-5、NKA-9 型大孔吸附树脂, D101 型大孔吸附树脂更加常见且经济实惠, 更适合工业方面的大规模的生产运用。综合考虑, 本实验选择 D101 型大孔吸附树脂作为纯化糙叶五加总黄酮的最佳大孔吸附树脂型号。

2.6 单因素实验

2.6.1 径高比对 D101 型大孔树脂纯化糙叶五加叶总黄酮的影响 将精密称取的 25.0 g D101 大孔吸附树脂分别装入径高比为 1:3、1:5、1:10、1:13、1:16 玻璃色谱柱, 取“2.2”项中配制好的供试品溶液 100 mL, 以 5 mL/min 的体积流量分别上柱, 上样后静态吸附 4 h, 用 50% 乙醇 120 mL, 以相同的体积流量洗脱, 收集洗脱液, 测定体积 (V), 精密吸取洗脱液 1.5 mL, 按“2.4”项下“加 5% NaNO₂ 1 mL”起依法测定 A 值。测定后将洗脱液浓缩干燥, 称定质量并记录, 并计算总黄酮质量分数和总黄酮得率。

$$\text{总黄酮质量分数} = (A - 0.0392) DV / 0.0113 M_1$$

$$\text{总黄酮得率} = (A - 0.0392) DV / 0.0113 M_0$$

D 为稀释倍数, V 为解吸液体积 (mL), M_0 为上样品质量 (g), M_1 为解吸液浓缩干燥后浸膏质量 (g)

从表 2 可以看出, 随着径高比的增加, 大孔吸附树脂的吸附率和解吸率呈现不断上升的趋势, 在径高 1:10 之后, 大孔吸附树脂吸附率的上升趋势渐缓, 总黄酮质量分数在径高比为 1:10 时达到最高值 74.10%。综合考虑, 选取径高比 1:10 为最佳径高比。

2.6.2 乙醇溶剂系统对 D101 型大孔树脂纯化糙叶五加叶总黄酮的影响 将精密称取的 25.0 g D101 大孔吸附树脂装入径高比为 1:13 的玻璃色谱柱, 取“2.2”项中配制好的供试品溶液 100 mL, 以 5

表 2 径高比对 D101 大孔吸附树脂纯化糙叶五加叶总黄酮的影响

径高比	吸附率/%	解吸率/%	处理后总黄酮质量分数/%	总黄酮得率/%
1:3	87.45	82.42	57.60	24.57
1:5	89.29	84.99	68.30	25.86
1:10	91.77	87.05	74.10	27.23
1:13	92.19	89.84	71.20	28.23
1:16	93.16	97.47	69.30	30.95

mL/min 的体积流量分别上柱,上样后静态吸附 4 h,分别用 10%、30%、50%、70%、95%乙醇为洗脱溶剂 120 mL,以相同的体积流量洗脱,收集洗脱液,测定体积,精密吸取洗脱液 1.5 mL,按“2.4”项下“加 5% NaNO₂ 1 mL”起依法测定 *A* 值。测定后将洗脱液浓缩干燥,称定质量并记录,计算总黄酮质量分数和总黄酮得率。

从表 3 可以看出,随着乙醇体积分数的增加,大孔吸附树脂的解吸率呈不断上升的趋势,当乙醇体积分数>50%,解吸率的上升趋势逐渐趋向于平缓。总黄酮质量分数随着乙醇体积分数的增加呈现先上升再下降的趋势,且在 50%乙醇时总黄酮的质量分数最高,达到 72.42%。综合考虑,本实验选择 50%乙醇作为最佳的乙醇溶剂系统。

表 3 洗脱溶剂对 D101 大孔吸附树脂纯化糙叶五加叶总黄酮的影响

Table 3 Effect of ethanol concentration on purity of total flavonoids by D101 resin

乙醇/ %	吸附率/ %	解吸率/ %	处理后总黄酮 质量分数/%	总黄酮 得率/%
10	92.30	0.81	16.83	0.26
30	91.82	51.40	72.05	16.08
50	92.09	88.38	72.42	27.74
70	92.90	96.07	68.01	30.41
95	92.63	96.74	60.21	30.54

2.6.3 洗脱体积对 D101 型大孔树脂纯化糙叶五加叶总黄酮的影响 将精密称取的 25.0 g D101 大孔吸附树脂装入径高比为 1:13 的玻璃色谱柱,取“2.2”项中配制好的供试品溶液 100 mL,以 5 mL/min 的体积流量分别上柱,上样后静态吸附 4 h,分别取洗脱体积为 40、80、120、160、200 mL 50%乙醇,以相同的体积流量洗脱,收集洗脱液,测定体积,精密吸取洗脱液 1.5 mL,按“2.4”项下“加 5% NaNO₂ 1 mL”起依法测定 *A* 值。测定后将洗脱液浓缩干燥,称定质量并记录,计算总黄酮质量分数和总黄酮得率。

从表 4 可以看出,大孔吸附树脂的解吸率在洗脱体积为 120 mL 时最高且接近 100%,说明洗脱体积为 120 mL 时树脂上吸附的黄酮已基本洗脱完;在大于 120 mL 时乙醇体积对解吸率的影响减小。总黄酮的质量分数在 120 mL 处最高,达到 71.91%。综合考虑选取 120 mL 为最佳洗脱体积。

表 4 洗脱液体积对 D101 大孔吸附树脂纯化糙叶五加叶总黄酮的影响

Table 4 Effect of elution volume on purity of total flavonoids by D101 resin

洗脱体 积/mL	吸附率/ %	解吸率/ %	处理后总黄酮 质量分数/%	总黄酮 得率/%
40	98.33	72.40	68.00	24.26
80	97.99	89.94	70.51	30.04
120	98.50	99.57	71.91	33.43
160	98.52	97.20	68.94	32.64
200	98.02	96.18	66.08	32.13

2.6.4 上样量对 D101 型大孔树脂纯化糙叶五加叶总黄酮的影响 将精密称取的 25.0 g D101 大孔吸附树脂装入径高比为 1:13 的玻璃色谱柱,上样量分别为 100 mL (500 mg)、120 mL (600 mg)、140 mL (700 mg)、160 mL (800 mg)、180 mL (900 mg),以 5 mL/min 的体积流量分别上柱,上样后静态吸附 4 h,用 50%乙醇 120 mL,以相同的体积流量洗脱,收集洗脱液,测定体积,精密吸取洗脱液 1.5 mL,按“2.4”项下“加 5% NaNO₂ 1 mL”起依法测定 *A* 值。测定后将洗脱液浓缩干燥,称定质量并记录,计算总黄酮质量分数和总黄酮得率。

从表 5 可以看出,大孔吸附树脂在上样量 500~900 mg 时其吸附率相似,说明实验中最大的上样量 900 mg 仍不能使 25.0 g D101 大孔吸附树脂达到吸附饱和,上样量在 700 mg 时解吸率最高,但 700 mg 之后解吸率趋势明显下降,表明从 700 mg 开始,糙叶五加叶中的总黄酮没有被洗脱完全。而总黄酮的质量分数呈先上升后下降的趋势,在上样量为 700 mg 时总黄酮的质量分数最高,达到 75.01%。综合考虑,选择 700 mg 糙叶五加叶总黄酮为最佳上样量。

表 5 上样量对 D101 大孔吸附树脂纯化糙叶五加叶总黄酮的影响

Table 5 Effect of loading amount on purity of total flavonoids by D101 resin

上样量/ mg	吸附率/ %	解吸率/ %	处理后总黄酮 质量分数/%	总黄酮 得率/%
500	99.86	98.61	73.52	33.56
600	99.82	99.82	74.92	33.96
700	99.82	99.86	75.01	33.97
800	99.76	74.13	55.88	25.20
900	99.63	72.67	54.47	24.67

2.6.5 洗脱体积流量对 D101 型大孔树脂纯化糙叶五加叶总黄酮的影响 将精密称取的 25.0 g D101 大孔吸附树脂装入径高比为 1:13 的玻璃色谱柱, 取“2.2”项中配制好的供试品溶液 100 mL, 以 1、5、10、15、20 mL/min 的体积流量分别上柱, 上样后静态吸附 4 h, 用 50%乙醇 120 mL, 以相同的体积流量洗脱, 收集洗脱液, 测定体积, 精密吸取洗脱液 1.5 mL, 按“2.4”项下“加 5% NaNO₂ 1 mL”起依法测定 A 值。测定后将洗脱液浓缩干燥, 称定质量并记录, 计算总黄酮质量分数和总黄酮得率。

从表 6 可以看出, 在洗脱体积流量为 5 mL/min 时, D101 型大孔吸附树脂的解吸率达到最高, 且总黄酮的质量分数在洗脱体积流量为 5、10 mL/min 时相近。全面综合考虑, 选取 5 mL/min 为最佳体积流量。

2.7 响应面实验

结合单因素试验结果和响应面分析方法^[14-15],

分别选择洗脱溶剂系统 (A)、洗脱体积 (B) 和上样量 (C) 3 个因素作为自变量, 以糙叶五加叶总黄酮质量分数作为响应值, 设计 3 因素 3 水平响应面试验, 共 17 个实验点的响应面分析实验。因素和水平取值见表 7。试验方案与结果见表 7, 其中 12 个为析因试验, 5 个为中心试验。

表 6 洗脱体积流量对 D101 大孔吸附树脂纯化糙叶五加叶总黄酮的影响

Table 6 Effect of elution flow rate on purity of total flavonoids by D101 resin

洗脱体积流量/ (mL·min ⁻¹)	吸附率/ %	解吸率/ %	处理后总黄酮 质量分数/%	总黄酮 得率/%
1	99.96	83.55	62.3	28.46
5	99.78	92.49	71.8	31.45
10	95.39	92.48	72.3	30.06
15	90.91	87.72	68.1	27.18
20	85.77	79.59	57.4	23.27

表 7 响应曲面设计及结果

Table 7 Design and results of RSM

试验号	A/%	B/mL	C/mg	总黄酮质量分数/%	试验号	A/%	B/mL	C/mg	总黄酮质量分数/%
1	30 (-1)	160 (1)	700 (0)	70.66	10	70 (1)	160 (1)	700 (0)	66.24
2	30 (-1)	120 (0)	500 (-1)	67.64	11	70 (1)	120 (0)	500 (-1)	65.99
3	50 (0)	80 (-1)	500 (-1)	70.09	12	50 (0)	120 (0)	700 (0)	75.65
4	30 (-1)	120 (0)	900 (1)	69.90	13	50 (0)	120 (0)	700 (0)	75.01
5	50 (0)	120 (0)	700 (0)	76.18	14	50 (0)	120 (0)	700 (0)	75.44
6	30 (-1)	80 (-1)	700 (0)	67.76	15	50 (0)	160 (1)	500 (-1)	72.04
7	70 (1)	80 (-1)	700 (0)	65.37	16	50 (0)	160 (1)	900 (1)	72.54
8	50 (0)	120 (0)	700 (0)	74.99	17	70 (1)	120 (0)	900 (1)	66.79
9	50 (0)	80 (-1)	900 (1)	72.87					

2.7.1 二次响应面回归模型的建立与显著性检验 应用 Design.Expert 8.05b 软件对表 7 中的数据进行二次多元回归拟合, 得到糙叶五加叶中总黄酮质量分数的预测值 (Y) 对编码自变量溶剂系统 (A)、洗脱体积 (B)、上样量 (C) 之间的二次多项回归方程 $Y = 75.45 - 1.45 A + 0.67 B + 0.79 C - 0.51 AB - 0.36 AC - 0.57 BC - 6.13 A^2 - 1.82 B^2 - 1.75 C^2$, 对上述回归模型进行响应面二次回归方差分析, 结果见表 8。在本实验设计的范围内, 该回归模型极显著 ($P = 0.000 1 < 0.01$), 其回归模型的决定系数 $R = 0.990 8$, 校正决定系数 $R_{adj} = 0.979 1$, $R_{pred} = 0.915 5$, 失拟项 $P = 0.340 3 > 0.05$ 不显著, S/N 信噪比 23.275 远大于 4。说明该回归模型与实

验数据的拟合程度很高, 试验误差小, 表明利用响应面设计法优化糙叶五加叶总黄酮的纯化工工艺稳定可靠。

各实验因子的偏回归系数的检验结果表明, 回归模型中的 1 次项洗脱溶剂系统 (A) 和上样量 (C) 对总黄酮质量分数的线性效应均为极显著 ($P < 0.01$), 而洗脱体积 (B) 为显著 ($P < 0.05$); 二次项中交互项 B、C 项即洗脱体积和上样量对糙叶五加叶中总黄酮的质量分数的曲面效应影响较显著 ($P < 0.05$), 其他 2 个交互项影响均无前者显著, 表明各影响因素对 D101 型大孔吸附树脂纯化糙叶五加叶中总黄酮质量分数的影响并不是简单的线性关系。3 个因素中对糙叶五加叶中总黄酮的纯化影响

表 8 响应面二次回归方差分析

Table 8 Analysis of variance for regression model

变异来源	均方和	自由度	平方和	F 值	P 值	变异来源	均方和	自由度	平方和	F 值	P 值
模型	225.95	9	25.11	84.20	0.000 1	A ²	158.00	1	158.00	529.87	<0.000 1
A	16.73	1	16.73	56.12	0.000 1	B ²	13.96	1	13.96	46.81	0.000 2
B	3.63	1	3.63	12.18	0.010 1	C ²	12.87	1	12.87	43.16	0.000 3
C	5.02	1	5.02	16.85	0.004 5	残差	2.09	7	0.30		
AB	1.03	1	1.03	3.45	0.105 4	失拟项	1.11	3	0.37	1.51	0.340 3
AC	0.53	1	0.53	1.79	0.223 1	误差	0.98	4	0.24		
BC	1.30	1	1.30	4.36	0.075 2	总离差	228.04	16			

最大的是洗脱溶剂系统，其次为上样量，最后为洗脱体积。

2.7.2 响应面分析及最优纯化条件的确定 借助 Design Expert 8.05b 软件所得响应面三维图及其等高线见图 1。由图 1 可知，洗脱体积与上样量所构成的曲面较为陡峭，其等高线呈椭圆形，说明二者对总黄酮质量分数的交互作用显著。而其余因素间的交互作用稍弱。

根据 Box-Behnken 实验所得的结果和二次多项回归方程，利用 Design Expert 8.05b 软件获得了总黄酮质量分数最高时的最佳优化条件：溶剂系统

为 47%乙醇，洗脱体积 127 mL，上样量 740 mg，预测得到糙叶五加叶总黄酮的质量分数可达到 75.69%。考虑到实际操作便利，将最佳工艺条件修正为溶剂系统 50%乙醇，洗脱体积 130 mL，上样量 750 mg，重复试验 5 次，计算出总黄酮质量分数分别为 75.91%、75.77%、75.80%、75.86%、76.01%，5 次试验的总黄酮质量分数平均值为 75.87%，与理论预测值误差仅为 0.18%，总黄酮得率为 30.13%。采用响应面设计法优化得到的纯化条件较为可靠，且利用 D101 大孔吸附树脂纯化糙叶五加叶中的总黄酮工艺具有一定的可行性与应用价值。

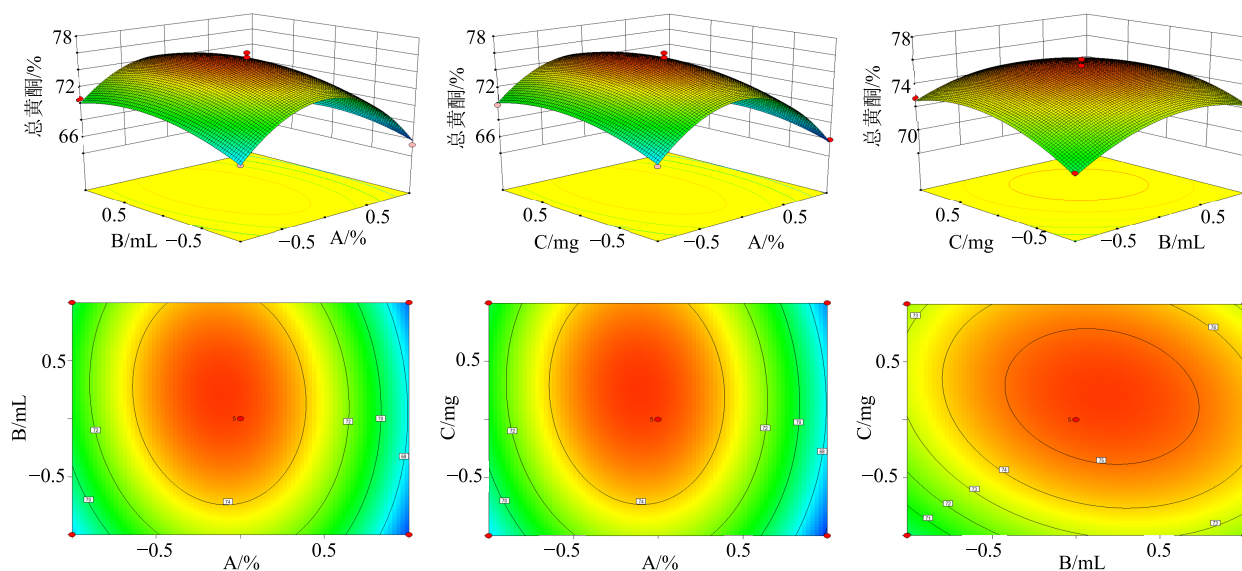


图 1 溶剂系统 (A)、洗脱体积 (B) 和上样量 (C) 交互作用对总黄酮质量分数影响的响应面和等高线

Fig. 1 Response surface and contour of interrelated influence of ethanol concentration (A), elution volume (B), and loading amount (C) to purity of total flavonoids

3 结论

本实验在单因素实验的基础上，结合响应面分析法分别研究了洗脱溶剂系统、洗脱体积、上样量及其相互间的作用对 D101 大孔吸附树脂纯化糙叶

五加叶总黄酮的影响，结果显示洗脱溶剂系统对总黄酮的质量分数影响最大，各因素间的交互作用对富集总黄酮的影响并不完全相同。

结合 D101 大孔吸附树脂纯化糙叶五加叶总黄

酮的单因素试验和响应面实验结果和分析, 根据实际实验情况, 得到最佳纯化工艺: 色谱柱的径高比为1:10, 25.0 g D101 大孔树脂的上样量为750 mg, 溶剂体系为50%乙醇, 洗脱体积流量为5 mL/min, 洗脱体积为130 mL。在此最佳条件下进行实验, 糙叶五加叶中总黄酮的质量分数达到75.87%, 总黄酮得率为30.13%。该工艺操作简单、重复性好, 且富集纯化效果良好, 可作为糙叶五加叶总黄酮的有效富集方法, 在糙叶五加叶总黄酮工艺中有一定的推广应用价值, 也为湖南特产药用植物糙叶五加的开发利用提供依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第54卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 湖南省食品药品监督管理局编. 湖南省中药材标准2009年版 [M]. 长沙: 湖南科技出版社, 2010.
- [3] 冯 胜, 刘向前, 张伟兰, 等. RP-HPLC法测定糙叶五加不同部位中刺五加苷B和E [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1144-1146.
- [4] 倪 娜, 刘向前. 五加科五加属植物的研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1895-1900.
- [5] 邹亲朋. 两种五加属植物叶中抗 HMGB1 三萜活性成分研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [6] Zhang X D, Liu X Q, Kim Y H, et al. Chemical constituents and their acetyl cholinesterase inhibitory and antioxidant activities from leaves of *Acanthopanax henryi*: Potential complementary source against Alzheimer's disease [J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(5): 606-616.
- [7] 黄尚荣. 药用芦丁化学成分提取方法及其药理学研究进展 [J]. 现代农业科技, 2009(23): 100-101.
- [8] 陈 勇, 邹亲朋, 刘向前. RP-HPLC测定糙叶五加不同药用部位中槲皮素和山柰酚 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4): 310-312.
- [9] 王国军, 唐 辉, 张淑兰, 等. 大孔树脂纯化核桃隔膜总黄酮的工艺研究 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2688-2692.
- [10] 于 宁, 何承辉, 邢建国, 等. 大孔吸附树脂分离纯化香青兰提取液工艺研究 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 599-605.
- [11] 杨立琛, 李 荣, 姜子涛. 大孔吸附树脂纯化花椒叶总黄酮的研究 [J]. 中国调味品, 2012, 37(7): 30-35.
- [12] 中国药典 [S]. 一部, 2015.
- [13] 吴 博, 刘春梅, 刘 冰, 等. 益智总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1321-1325.
- [14] 朱俊访, 李 博. 响应面法优化淡竹叶总黄酮的大孔树脂纯化工艺 [J]. 世界中医药, 2016, 11(4): 715-717.
- [15] 周 欣, 陈华国, 黄志金, 等. 响应面法优选虎耳草抗前列腺癌活性部位提取工艺 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1768-1773.