

大孔吸附树脂同时纯化雪松松针中的莽草酸和总黄酮

刘东彦¹, 张莉霞², 杜瑞琴³, 石晓峰^{1,2*}, 马趣环¹, 范彬¹, 沈薇¹, 王新娣¹

1. 甘肃省医学科学研究院, 甘肃 兰州 730050

2. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730030

3. 甘肃省肿瘤医院, 甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 优选大孔吸附树脂同时纯化雪松松针中莽草酸和总黄酮的最佳工艺。方法 以雪松松针中莽草酸和总黄酮的质量分数为评价指标, 考察了6种树脂的纯化效果; 以上样质量浓度、上样体积流量、上样量、水洗脱用量、乙醇质量浓度和乙醇洗脱用量考察了最佳树脂的纯化能力; 在单因素实验的基础上, 采用正交试验法, 通过综合评分优选最佳的纯化工艺。结果 XAD 7HP树脂对雪松松针中莽草酸和总黄酮的纯化效果最佳, 水洗脱部分为莽草酸, 乙醇洗脱部分为总黄酮, 其最佳的纯化工艺为上样液中莽草酸的质量浓度 11.59 mg/mL 和总黄酮的质量浓度 6.96 mg/mL、上样体积流量 8 BV/h、上样量 2.0 mL/g; 水洗脱用量为上样液加 4 BV 的水洗液、70%的乙醇洗脱 4 BV。纯化后莽草酸的质量分数由 19.25%提升到 28.98%, 总黄酮的质量分数由 11.92%提升到 54.45%。结论 优选的纯化工艺稳定、可行, 为工业化生产雪松松针中莽草酸和总黄酮提供参考。

关键词: 雪松松针; 大孔吸附树脂; 莽草酸; 总黄酮; 纯化工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)24-5136-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.013

Simultaneous purification of shikimic acid and total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* by macroporous adsorption resin

LIU Dong-yan¹, ZHANG Li-xia², DU Rui-qin³, SHI Xiao-feng^{1,2}, MA Qu-huan¹, FAN Bin¹, SHEN Wei¹, WANG Xin-di¹

1. Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China

2. Gansu University of TCM, Lanzhou 730030, China

3. Gansu Provincial Cancer Hospital, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To research the simultaneous purification process of shikimic acid and total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don. **Methods** Taking the purity of shikimic acid and total flavonoids as the evaluation indicator, the purification effect of six macroporous resins were evaluated. Orthogonal design $L_9(3^4)$ and single factor experiments were employed to optimize the purification conditions by comprehensive scoring. The purification capacity of the best resin was investigated by the sample mass concentration, the volume flow of the sample, the ratio of the resin to the drug, the amount of water for washing, the concentration of ethanol, and the elution of ethanol. **Results** XAD 7HP macroporous resin offered better purification effect of shikimic acid and total flavonoids from pine needles of *C. deodara* than other macroporous resins. The optimum purification condition was confirmed as follows: The concentration of shikimic acid in the sample was 11.59 mg/mL, and total flavonoids concentration was 6.9 mg/mL; The flow rate was 8 BV/h, and the sample volume was 2.0 mL/g; The shikimic acid was eluted with loading capacity and 4 BV of water; The total flavonoids was eluted with 4 BV of 70% ethanol successively. The purity of shikimic acid can be increased from 19.25% to 28.98%, and the purity of total flavonoids can be increased from 11.92% to 54.45%. **Conclusion** The optimized purification process is stable, feasible and suitable for pilot enrichment of shikimic acid and total flavonoids from pine needles of *C. deodara*.

Key words: pine needles of *Cedrus deodara*; macroporous resin; shikimic acid; total flavonoids; purification technology; orthogonal test

收稿日期: 2017-08-01

基金项目: 兰州市2016年第二批科技计划项目(2016-2-65); 兰州市人才创新创业项目(2014-RC-62); 甘肃省科技支撑计划项目(1204FKCA152)

作者简介: 刘东彦(1987—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0931)2302684 E-mail: liudongyanliu@163.com

*通信作者 石晓峰, 男, 主任药师, 教授, 研究方向为天然药物化学及中药制剂研究。Tel: (0931)2302664 E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

雪松是松科 (Pianaceae) 雪松属 *Cedrus* Trew 植物的统称, 包括雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don、黎巴嫩雪松 *C. libani* A. Rich.、短叶雪松 *C. brevifolia* (Hook. f.) A. Henry 和北非雪松 *C. atlantica* (Endl.) G. Manetti ex Carriere。而松针为松科植物的多个品种的针状叶, 全世界松科植物共有 10 个属 230 余种, 我国松树有 10 个属 120 余种, 雪松是可供药用的 13 种松树之一, 其针叶资源丰富, 药用历史悠久, 具有抗肿瘤、抗氧化、改善记忆、抗菌及抗病毒、毒杀蚊虫等多种功效^[1-2]。本课题组前期对雪松松针进行了系统的研究, 发现雪松松针中含有大量的莽草酸^[3-6]和黄酮类化合物^[7-10], 而莽草酸是广泛存在于高等植物和微生物中莽草酸途径的中间产物, 具有抗肿瘤和对心脑血管系统的作用, 在生物合成中也扮演着重要的角色, 还是抗禽流感药物磷酸奥司米韦 (商品名达菲) 以及二噁霉素、乙二醛酶抑制剂等抗肿瘤药物的重要合成原料^[11]; 多种黄酮类化合物是高效、天然、毒副作用较小的抗肿瘤药物, 还具有消炎、抑菌、调血脂和抗衰老等多种生物功效^[12-13], 研究发现雪松松针总黄酮对人宫颈癌 HeLa 细胞株、人胃癌 MKN45 细胞株、人肺癌 A549 细胞株、人肝癌 HepG2 细胞株及人胶质瘤 SHG44 细胞株均有选择性抑制作用, 且对 HepG2 细胞增殖抑制作用最显著, 当雪松松针总黄酮质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对其抑制率为 $(50.94 \pm 6.11) \%$ ^[14]。笔者曾建立了雪松松针总黄酮的富集纯化工艺^[15], 通过大孔吸附树脂可得到质量分数大于 50% 的雪松松针总黄酮; 确定了雪松松针中莽草酸的纯化方法: 水提-醇沉-大孔吸附树脂柱色谱-硅胶柱色谱-重结晶。可见, 大孔吸附树脂在纯化雪松松针总黄酮和莽草酸中起到非常重要的作用。因此, 为了实现雪松松针的高值化利用, 本实验在前期研究的基础上, 筛选了同时纯化雪松松针中莽草酸和总黄酮的最佳树脂, 并对最佳树脂进行

了单因素试验考察, 在此基础上, 采用正交试验法, 通过综合评分优选最佳树脂纯化雪松松针中莽草酸和总黄酮的最佳纯化工艺, 以期工业化生产雪松松针中的莽草酸和总黄酮提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; UV-1800 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; AE260 万分之一分析天平, 瑞士 Mettler 公司; CP 225 型十万分之一电子天平, 德国赛多利斯公司; QL-901 旋涡混合器, 海门市麒麟医药仪器厂; RE-5299 旋转蒸发仪, 巩义市予华仪器有限公司; HH-4 型数显恒温水浴锅, 北京科伟永兴仪器有限公司; DZHW 调温电热套, 北京市永兴明医疗仪器厂; YC-10 型多功能提取罐, 上海雅程仪器设备有限公司; SK3310LHC 超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司。

雪松松针于 2015 年 6 月采自甘肃省陇南市徽县境内, 原植物经甘肃省医学科学研究院何福江研究员鉴定为雪松属植物雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don。莽草酸对照品, 昆明科翔生物科技有限公司, 质量分数 > 98%, 批号 0435-200907; 芦丁对照品, 批号 100080-200707, 质量分数 91.7%, 中国食品药品检定研究院。D101 树脂, 天津市海光化工有限公司; AB-8、HPD722 树脂, 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; XAD1180、XAD 7HP、XAD761 树脂, 北京慧德易有限公司; 不同型号树脂的理化性能参数见表 1。其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备^[16]

称取新鲜雪松松针 100 g, 首次加入 13 倍量水, 第 2 次加 10 倍量水, 回流提取, 每次 2 h, 合并水提液, 浓缩, 依次用 70%、85% 乙醇醇沉 2 次, 减压回收乙醇, 浸膏分散于水中, 定容至 500 mL 量瓶中, 作为雪松松针莽草酸和总黄酮粗提液, 备用。

表 1 不同型号树脂的理化性能参数

Table 1 Physical parameters of different types of adsorptive macroporous resins

型号	极性	基材	比表面积/ $(\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1})$	特征孔径/nm	粒径/ μm
XAD 1180	非极性	苯乙烯-二乙烯苯	500	40.0	350~600
D101	非极性	苯乙烯-二乙烯苯	400	10.0~11.0	300~1 250
AB-8	弱极性	丙烯酸	480~520	13.0~14.0	300~1 250
HPD 722	弱极性	苯乙烯-二乙烯苯	485~530	13.0~14.0	300~1 250
XAD 7HP	弱极性	丙烯酸	500	45.0	560~710
XAD 761	强极性	酚醛	200	60.0	560~760

2.2 HPLC法定量测定雪松松针中莽草酸^[4-5]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (10:90), 检测波长 217 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μL; 柱温 30 ℃。该条件下供试品中莽草酸分离度好, 莽草酸的出峰时间 4.2 min, 该峰与其相邻色谱峰的分度度>1.5, 理论塔板数以莽草酸峰计不小于 4 000, 色谱图见图 1。

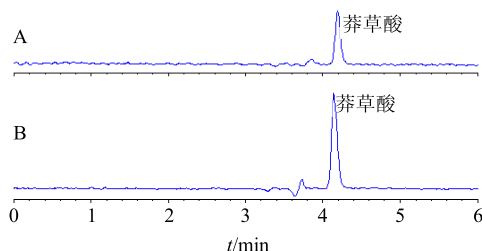


图1 莽草酸对照品 (A) 和供试品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of shikimic acid reference (A) and sample (B)

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取莽草酸对照品 0.5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容, 配制成质量浓度为 50 μg/mL 的对照品溶液。依次精密量取以上莽草酸对照品溶液 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 置 1 mL 量瓶中, 用流动相定容, 摇匀, 得到质量浓度为 2.5、5、10、20、30、40、50 μg/mL 的系列质量浓度的莽草酸对照品溶液。依上述色谱条件分别进样 20 μL 进行测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线。得线性回归方程 $Y=47.204X-11.905$, $R^2=0.9992$, 结果表明莽草酸在 2.5~50.0 μg/mL 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.3 样品测定 精密吸取供莽草酸定量测定的样品溶液 20 μL, 注入 HPLC 色谱仪, 记录色谱图, 测定莽草酸的峰面积, 计算莽草酸的质量分数。

2.3 UV法定量测定雪松松针中的总黄酮^[17]

2.3.1 标准曲线的绘制 精密称取芦丁对照品 10 mg, 加 40%乙醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 摇匀, 制成质量浓度为 0.183 mg/mL 的芦丁对照品溶液。依次精密量取上述芦丁对照品溶液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 至 10 mL 具塞比色管中, 依次加入 40%乙醇溶液至 5 mL, 摇匀, 加 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min。再加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min, 最后加 4% NaOH 溶液 4 mL, 用 40%乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置 15 min, 以 40%乙醇为空白, 在 510 nm 处测定吸光

度 (A)。以 A 值为纵坐标, 芦丁质量浓度 (C) 为横坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得线性回归方程 $A=0.0012C+0.0048$, $R^2=0.9993$ 。结果表明, 芦丁在 4.575~54.900 μg/mL 与 A 值呈良好线性关系。

2.3.2 样品测定 精密吸取供总黄酮定量测定的样品溶液 0.1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 按上述方法操作测定 A 值, 计算样品中总黄酮的质量分数。

2.4 不同型号吸附树脂筛选研究

2.4.1 树脂预处理 参考文献报道的方法^[18], 将新购买的各型号大孔吸附树脂用 95%乙醇浸泡 24 h 后, 湿法装柱, 继续用乙醇冲柱, 不时检查流出液, 至与水混合不呈白色浑浊为止, 然后以大量蒸馏水洗至无醇味, 备用。

2.4.2 大孔吸附树脂型号的考察 准确称取预处理好的 XAD 1180、D101、AB-8、HPD 722、XAD 7HP、XAD 761 大孔树脂各 10.0 g, 装入色谱柱中 (柱体积分约 7 mL), 分别取 5 mL 雪松松针莽草酸和总黄酮粗提液 (莽草酸质量浓度为 23.18 mg/mL、总黄酮质量浓度为 13.92 mg/mL) 以 8 BV/h 的体积流量上样, 待上样液流完后, 用 4 BV 水洗, 收集未吸附液和水洗液, 再用 4 BV 70%乙醇解吸附, 按“2.2”和“2.3”项下方法测定未吸附液和水洗液中莽草酸质量浓度和醇洗液中总黄酮质量浓度, 蒸干水液和醇液, 计算纯化后莽草酸和总黄酮的质量分数。由表 2 可知 6 种大孔吸附树脂纯化后莽草酸和总黄酮质量分数最高的树脂为 XAD 7HP 大孔吸附树脂, 故选该树脂做进一步的工艺考察。

$$\text{纯化后莽草酸的质量分数} = C_1 V_1 / m_1$$

$$\text{纯化后总黄酮的质量分数} = C_2 V_2 / m_2$$

C_1 为未吸附液和水洗液中莽草酸的质量浓度, V_1 为未吸附液和水洗液的体积, m_1 为未吸附液和水洗液蒸干后浸膏质量, C_2 为醇洗液中总黄酮的质量浓度, V_2 为醇洗液的体积, m_2 为醇洗液蒸干后浸膏质量

表2 6种大孔吸附树脂的考察

树脂型号	莽草酸质量分数/%	总黄酮质量分数/%
XAD 1180	30.27	52.55
D101	28.61	51.97
AB-8	30.23	48.76
HPD 722	30.27	52.55
XAD 7HP	35.73	58.79
XAD 761	30.73	54.23

2.5 XAD 7HP 大孔吸附树脂纯化莽草酸和总黄酮工艺的考察^[19-20]

2.5.1 上样质量浓度的考察 取预处理好的 XAD 7HP 型树脂各 10 g, 湿法装柱。再精密量取雪松松针莽草酸和总黄酮粗提液(莽草酸质量浓度为 23.18 mg/mL、总黄酮质量浓度为 13.92 mg/mL) 各 2.5、5.0、10.0、15.0 mL, 分别定容或浓缩至 10 mL, 得到莽草酸质量浓度依次为 5.80、11.59、23.18、34.77 mg/mL 和总黄酮质量浓度依次为 3.48、6.96、13.92、20.88 mg/mL 的 4 个样品溶液, 以 8 BV/h 的体积流量上样, 待上样液流完后, 用 4 BV 水洗, 收集未吸附液和水洗液。当样品溶液中莽草酸质量浓度为 34.77 mg/mL 和总黄酮质量浓度为 20.88 mg/mL 时, 水洗液中已出现明显黄色, 停止考察更大质量浓度。按“2.2”和“2.3”项下方法测定未吸附液和水洗液中莽草酸和总黄酮质量浓度, 蒸干未吸附液和水液, 计算莽草酸质量分数和总黄酮吸附率。由表 3 可知, 上样质量浓度对水洗液中莽草酸质量分数和总黄酮吸附率的影响规律一致, 当上样粗提液中莽草酸质量浓度为 23.18 mg/mL、总黄酮质量浓度为 13.92 mg/mL 时, 树脂的纯化效果较好。

表 3 上样质量浓度的考察

Table 3 Effect of sample concentration

上样质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		莽草酸质量分数/%	总黄酮吸附率/%
莽草酸	总黄酮		
5.80	3.48	31.11	98.53
11.59	6.96	32.93	98.88
23.18	13.92	35.78	99.13
34.77	20.88	33.18	98.77

2.5.2 上样体积分数的考察 取预处理好的 XAD 7HP 型树脂各 10 g, 3 份, 湿法装柱。精密量取 3 份雪松松针莽草酸和总黄酮粗提液(莽草酸质量浓度为 23.18 mg/mL、总黄酮质量浓度为 13.92 mg/mL) 各 10 mL, 分别以 4、8、12 BV/h 体积流量上样, 当以 12 BV/h 体积流量上样时, 水洗液中已出现明显黄色, 停止考察更大体积流量, 同法收集, 检测。由表 4 可知, 上样体积分数越大, 总黄酮的吸附率越小。因此, 控制上样体积分数在 8 BV/h 左右, 大孔树脂对雪松松针莽草酸和总黄酮纯化效果最好。

2.5.3 最大上样量的考察 取预处理好的 XAD 7HP 型树脂 10 g, 湿法装柱。取雪松松针莽草酸和

表 4 上样体积分数的考察

Table 4 Effect of flow rate

上样体积分数/(BV·h ⁻¹)	莽草酸质量分数/%	总黄酮吸附率/%
4	31.84	99.12
8	35.78	99.13
12	29.57	97.87

总黄酮粗提液, 莽草酸质量浓度为 23.18 mg/mL、总黄酮质量浓度为 13.92 mg/mL, 以 8 BV/h 体积分数上样, 收集每 1 BV 的流出液和水洗液, 按“2.3”项下方法测定各收集液中总黄酮质量浓度, 计算总黄酮的吸附率。由图 2 可知, 随着收集流份数的增加, 总黄酮质量浓度不断上升, 当收集 4 BV 时, 总黄酮已经大量泄露, 因此, 确定最佳上样量为 3~4 BV, 按树脂计为 2.0~2.5 mL/g 较合适。

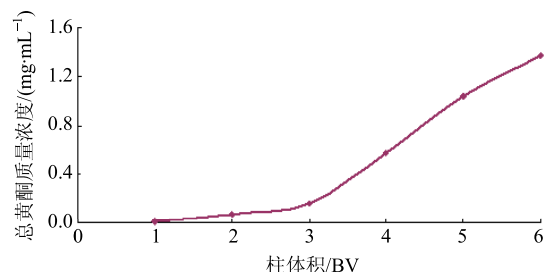


图 2 泄漏曲线

Fig. 2 Dynamic leakage curves

2.5.4 莽草酸水洗脱用量的考察 取预处理好的 XAD 7HP 型树脂各 10 g, 湿法装柱。取雪松松针莽草酸和总黄酮粗提液 25 mL (莽草酸质量浓度为 23.18 mg/mL、总黄酮质量浓度为 13.92 mg/mL), 以 8 BV/h 体积分数上样, 收集每 1 BV 的水液, 共收集 10 个柱体积的水液, 按“2.2”项下方法测定流出水液中莽草酸质量浓度。由图 3 可知, 当收集 9 BV 时, 莽草酸已洗脱完全, 因此确定水洗液体积为上样液加 4 BV 水液。

2.5.5 不同乙醇体积分数对总黄酮解吸的考察 取预处理好的 XAD 7HP 型树脂各 10 g, 5 份, 湿法装柱。取雪松松针莽草酸和总黄酮粗提液 25 mL (莽草酸质量浓度为 23.18 mg/mL、总黄酮质量浓度为 13.92 mg/mL), 以 8 BV/h 体积分数上样, 收集 8 BV 水洗液, 分别用 50%、60%、70%、80%、90%乙醇洗脱 4 BV, 按“2.3”项下方法测定醇洗液中总黄酮质量浓度。由图 4 可知, 随着乙醇体积分数的增大, 解吸液中总黄酮的质量浓度也相应变大, 当乙醇体积分数达到 70%以上时, 解吸液中总黄酮的质

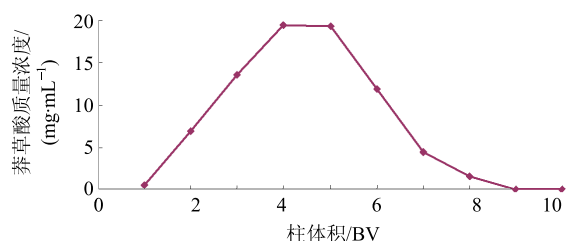


图3 莽草酸水洗脱用量的考察

Fig. 3 Investigation of water eluting volumes

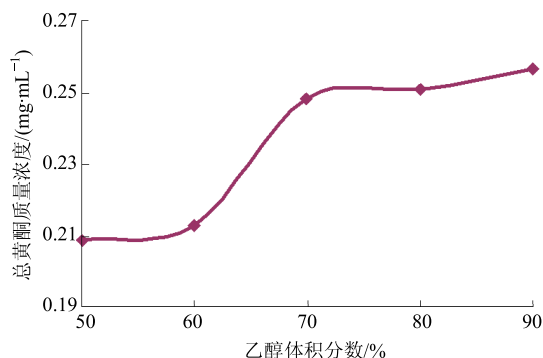


图4 不同乙醇体积分数对总黄酮解吸的影响

Fig. 4 Effect of different ethanol concentrations on desorption of flavonoids

量浓度变化较小, 趋于平衡, 因此, 本实验选择乙醇体积分数 70% 较合适。

2.5.6 乙醇用量的考察 取雪松松针莽草酸和总黄酮粗提液 25 mL (莽草酸质量浓度为 23.18 mg/mL、总黄酮质量浓度为 13.92 mg/mL), 以 8 BV/h 体积流量上样, 收集 8 BV 水洗液, 再 70% 乙醇解吸, 收集每 1 BV 的解析液, 按“2.3”项下方法测定解析液中总黄酮质量浓度, 计算解吸附总黄酮量。由图 5 可知, 当 70% 乙醇洗脱 4 BV 后, 总黄酮已洗脱完全, 因此确定乙醇洗脱体积为 4 BV。

2.6 正交试验^[21-22]

在单因素实验的基础上, 控制最佳上样体积流量、莽草酸水洗脱用量和乙醇洗脱用量, 以影响纯

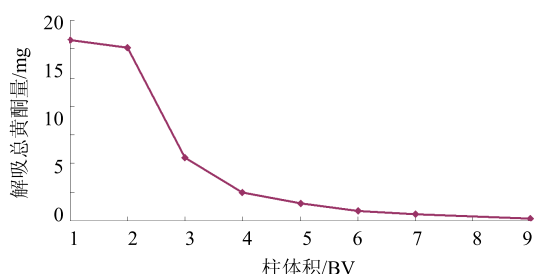


图5 乙醇洗脱用量对总黄酮解吸的影响

Fig. 5 Effect of ethanol elution volumes on desorption of flavonoids

化工艺的最主要因素上样质量浓度(A)、上样量(B)和乙醇体积分数(C)为考察因素, D 为误差项, 以雪松松针中莽草酸和总黄酮的质量分数为评价指标, 每个考察因素选择 3 个水平, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表进行试验, 试验因素和水平见表 5, 按表 6 分别精密吸取 9 份相应浓度莽草酸和总黄酮粗提液, 经 XAD 7HP 型树脂纯化, 分别按“2.2”和“2.3”项下方法测定水洗液中莽草酸的质量分数和 70% 乙醇洗液中总黄酮的质量分数, 采用综合评分法, 将莽草酸和总黄酮中最大质量分数定为 100%, 权重系数各占 0.5, 计算得到综合评分, 实验结果及直观分析见表 6, 方差分析见表 7。

表5 正交试验因素和水平

Table 5 Factors and levels of orthogonal test

水平	A/(mg·mL ⁻¹)		B/(mL·g ⁻¹)	C/%
	莽草酸	总黄酮		
1	11.59	6.96	2.0	50
2	23.18	13.92	2.5	70
3	34.77	20.88	3.0	90

由表 6 直观分析可知, 影响纯化工艺的各因素作用的顺序为 $A > B > C$, 即上样质量浓度 > 上样量 > 乙醇体积分数, 最佳纯化工艺为 $A_1B_1C_1$ 。由表 7 方差分析可知, A 因素对莽草酸和总黄酮的纯化有显著差异 ($P < 0.05$), B、C 因素的影响小, 无显著差异 ($P > 0.05$), 综合单因素乙醇体积分数考察结果, 最终确定为 $A_1B_1C_2$, 即最优的纯化工艺为上样液中莽草酸的质量浓度 11.59 mg/mL 和总黄酮的质量浓度 6.9 mg/mL、上样体积流量 8 BV/h、上样量 2.0 mL/g; 水洗脱用量为上样液加 4 BV 的水洗液及 70% 的乙醇洗脱 4 BV。

2.7 雪松松针中莽草酸和总黄酮同时纯化工艺验证试验

根据上述考察结果, 最终确定选用 XAD 7HP 型大孔树脂进行纯化, 上样液中莽草酸的质量浓度 11.59 mg/mL 和总黄酮的质量浓度 6.9 mg/mL, 上样体积流量为 8 BV/h, 上样量为每克树脂 2.0 mL 上样液, 水洗脱用量为上样液加 4 BV 的水洗液, 70% 乙醇洗脱 4 BV。实验重复 3 次, 收集水洗液和醇洗液, 按“2.2”和“2.3”项下方法测定水洗液中莽草酸质量浓度和醇洗液中总黄酮质量浓度, 将水液和乙醇液减压浓缩并冷冻干燥, 计算纯化后莽草酸和总黄酮的质量分数, 结果见表 8。结果表明, 3 次重

表 6 正交试验结果

Table 6 Result of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	莽草酸质量分数/%	总黄酮质量分数/%	综合评分
1	1	1	1	1	26.914 4	52.747 7	98.150 0
2	1	2	2	2	27.948 5	45.980 4	93.585 2
3	1	3	3	3	27.262 6	44.292 9	90.758 5
4	2	1	2	3	25.952 1	47.286 3	91.251 5
5	2	2	3	1	24.838 9	43.112 2	85.303 3
6	2	3	1	2	22.765 5	47.673 6	85.917 8
7	3	1	3	2	23.651 8	43.064 1	83.134 0
8	3	2	1	3	21.829 0	47.459 2	84.039 2
9	3	3	2	1	19.232 5	45.376 3	77.419 6
K_1	282.493 7	272.536 5	268.107 0	260.872 9			
K_2	262.473 6	262.927 7	262.257 3	262.637 0			
K_3	244.592 8	254.095 9	259.195 8	266.050 2			
R	37.900 9	18.440 6	8.911 2	5.177 3			

表 7 方差分析结果

Table 7 Result of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	239.667 3	2	51.893 0	$P < 0.05$
B	56.709 5	2	12.278 8	
C	13.666 8	2	2.959 1	
误差(D)	4.618 5			

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

表 8 验证试验 ($n = 3$)

Table 8 Result of verification test ($n = 3$)

编号	纯化前		纯化后	
	莽草酸/%	总黄酮/%	莽草酸/%	总黄酮/%
1	19.25	11.92	29.02	54.49
2			29.30	53.98
3			28.61	54.89
平均值			28.98	54.45

复性试验的数值接近, 纯化后莽草酸的质量分数由 19.25% 提升到 28.98%, 总黄酮的质量分数由 11.92% 提升到 54.45%, 说明该工艺稳定、质量可控。

3 讨论

本实验通过水回流提取雪松松针, 提取液浓缩, 乙醇醇沉, 除去了大量的多糖和鞣质类杂质, 醇沉液经大孔吸附树脂纯化时, 莽草酸在未吸附液和水洗脱部分, 总黄酮在乙醇洗脱部分, 达到了同时富集纯化莽草酸和总黄酮的目的。大孔吸附树脂水洗脱部分为莽草酸, 但也有少量未吸附总黄酮,

因此本实验设计考察莽草酸质量分数和总黄酮吸附率。

莽草酸为白色粉末, 化学名为 3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-羧酸, 结构中含有羟基和羧基, 极性大, 易溶于水。而黄酮类化合物多为黄色固体, 上样前雪松松针莽草酸和总黄酮粗提液颜色很深, 但经大孔吸附树脂最优工艺纯化后, 得到的莽草酸目标液基本无色, 虽然莽草酸的质量分数提升不多, 但对进一步的纯化莽草酸起到了非常重要的作用。

近年来, 大孔吸附树脂在富集纯化方面广泛应用^[18,23], 其型号众多, 用途各异, 本实验在前期实验^[14]的基础上, 考察了 XAD1180、D101、AB-8、HPD722、XAD 7HP、XAD761 大孔树脂对雪松松针莽草酸和总黄酮的纯化效果, 发现弱极性树脂 XAD 7HP 的纯化效果最好, 与前期研究结果一致。雪松松针莽草酸和总黄酮粗提液经 XAD 7HP 大孔树脂最优工艺纯化, 莽草酸的质量分数由 19.25% 提升到 28.98%, 总黄酮的质量分数由 11.92% 提升到 54.46%。该工艺稳定、可行, 为雪松松针中莽草酸和总黄酮的富集纯化提供有益的参考方法, 为进一步研究应用雪松松针中莽草酸和总黄酮提供参考。

参考文献

- [1] 刘东彦, 石晓峰. 药用松针的研究进展 [J]. 中药材, 2012, 35(10): 1701-1705.
- [2] 白朝辉, 石晓峰, 刘东彦, 等. 雪松松针的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国药师, 2012, 15(12):

- 1791-1793.
- [3] 雷艳萍, 石晓峰, 白朝晖, 等. 雪松不同部位中莽草酸的含量分析 [J]. 中国药房, 2015, 26(6): 803-805.
- [4] 李 师, 刘东彦, 石晓峰, 等. 雪松松针正丁醇部位化学成分的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2602-2606.
- [5] 王东东, 石晓峰, 李 冲, 等. 7 种松柏科植物中莽草酸的含量测定 [J]. 中国药房, 2011, 22(7): 616-618.
- [6] 刘东彦, 石晓峰, 李 冲, 等. 雪松松针中莽草酸的分离及其纯度检查 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2011, 28(7): 637-640.
- [7] 刘东彦, 石晓峰, 王东东, 等. 雪松松针黄酮类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 631-633.
- [8] Liu D Y, Shi X F, Wang D D, *et al.* A new flavonoid in pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(1): 5-6.
- [9] Liu D Y, Shi X F, Wang D D, *et al.* Two new myricetin glycosides from pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *CNC*, 2011, 47(5): 704-707.
- [10] 刘东彦, 石晓峰, 李 冲, 等. 雪松松针醋酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1921-1924.
- [11] 张军民, 石晓峰. 天然产物莽草酸的研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(2): 109-112.
- [12] 李湘洲, 栾芳菲, 张 胜, 等. 黄酮类化合物的抗肿瘤和抗血管生成作用研究进展 [J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 199-201.
- [13] 吴 方, 余陈欢, 俞文英, 等. 基于 microRNAs 的石荠苎总黄酮抗流感病毒性肺炎作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1149-1154.
- [14] Shi X F, Liu D Y, Zhang J M, *et al.* Extraction and purification of total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* contribute to anti-tumor *in vitro* [J]. *BMC Complem Altern M*, 2016, 16(1): 245-253.
- [15] 刘东彦, 石晓峰, 胡鹏斌, 等. 大孔吸附树脂富集纯化雪松松针总黄酮工艺的优化 [J]. 中成药, 2017, 39(2): 308-311.
- [16] 刘东彦, 张莉霞, 石晓峰, 等. 雪松松针中莽草酸和多糖的提取工艺研究 [J]. 中药材, 2017, 40(8): 1915-1917.
- [17] 胡鹏斌, 韩 涛, 刘东彦, 等. 雪松松针中总黄酮及 4 种指标成分的含量测定方法研究 [J]. 中国药房, 2015, 26(3): 381-383.
- [18] 何春喜, 余泽义, 何毓敏, 等. 竹节参总皂苷的大孔吸附树脂纯化与离子交换树脂脱色工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1146-1152.
- [19] 罗春梅, 黄志芳, 汤依娜, 等. 附子水溶性生物碱提取纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2415-2424.
- [20] 孙 静, 刘洁琼, 黎伟华, 等. 陕产黄花油点草总黄酮部位纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1275-1279.
- [21] 于鹤云, 刘汉清, 刘 嘉, 等. D-101 型大孔吸附树脂纯化黄蜀葵花总黄酮的工艺研究 [J]. 中成药, 2014, 36(3): 520-525.
- [22] 钟方丽, 金龙哲, 王晓林, 等. 大孔吸附树脂纯化黄芪茎总黄酮的工艺及其抗氧化性 [J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2017, 38(2): 88-94.
- [23] 董双双, 袁 悦, 杨志伟. 大孔吸附树脂在黄酮类化合物分离纯化中的应用 [J]. 精细与专用化学品, 2016, 24(11): 29-32.