

星点设计-响应面法优选枳实总黄酮的
大孔吸附树脂纯化工艺

马丽,陈家仪,陈稚,梁巧文,曹骋,曾元儿*
(广州中医药大学,广州 510006)

[摘要] 目的:优选枳实总黄酮的大孔树脂纯化工艺。方法:选择吸附时间、乙醇体积分数、洗脱用量为自变量,总黄酮吸附-洗脱率为因变量,在单因素试验基础上,采用星点设计-响应面法优选大孔树脂纯化工艺。结果:选择 AB-8 型大孔树脂,最佳纯化工艺为上样液质量浓度 3.5 g·L⁻¹,pH 6.0,上样量 0.6 BV,上样速率 1 BV·h⁻¹,水洗用量 1 BV,洗脱速率 2 BV·h⁻¹,吸附时间 77 min,乙醇体积分数 88%,洗脱剂用量 2.4 BV;枳实总黄酮吸附-洗脱率达 93.0%,与预测值(92.4%)偏差较小。结论:采用星点设计-响应面法优选的大孔树脂纯化工艺条件稳定可行,预测性好。

[关键词] 枳实;总黄酮;星点设计-效应面法;大孔吸附树脂;纯化工艺;单因素试验

[中图分类号] R284.2;R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)08-0033-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080033

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000030.html>

[网络出版时间] 2014-02-07 15:14

Optimization of Purification Process for Total Flavonoids in
Aurantii Fructus Immaturus with Macroporous Resin by
Central Composite Design-Response Surface Methodology

MA Li, CHEN Jia-yi, CHEN Zhi, LIANG Qiao-wen, CAO Cheng, ZENG Yuan-er*
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification process of total flavonoids in Aurantii Fructus Immaturus by macroporous resin. **Method:** Independent variables were adsorption time, ethanol concentration and eluent volume, while dependent variables was adsorption-elution rate of total flavonoids, central composite design-response surface methodology was adopted to optimize purification technology on the basis of single factor tests. **Result:** AB-8 macroporous resin was selected, optimum purification process were as follows: added 0.6 BV of sample solution with concentration of 3.5 g·L⁻¹ and pH 6.0, sample rate 1 BV·h⁻¹, adsorption time 77 min, water consumption 1 BV, elution rate of 2 BV·h⁻¹, eluted with 2.4 BV of 88% ethanol. Adsorption-elution rate of total flavonoids was up to 93.0%, which had a small deviation with the predicted value of 92.4%. **Conclusion:** Optimized purification technology was stable and feasible with high predictability.

[Key words] Aurantii Fructus Immaturus; total flavonoids; central composite design-response surface methodology; macroporous absorption resin; purification technology; single factor test

枳实功效化痰散痞、破气消积,药理研究表明其 具有调节胃肠运动、调节子宫机能、抗氧化、抗血栓

[收稿日期] 20130731(001)

[基金项目] 广东省大学生创新实验项目(1057211030)

[第一作者] 马丽,在读硕士,从事中药制剂质量标准研究,Tel:18312059049,E-mail:57086813@qq.com

[通讯作者] *曾元儿,教授,博士,从事中药制剂质量标准研究,Tel:13610008608,E-mail:zengyuaner@163.com

和降血脂等作用^[1-3],黄酮类化合物为主要活性成分之一。大孔树脂为一种有机高聚吸附剂,具有选择性吸附有机化合物的能力,应用于黄酮类成分富集纯化的效果较好^[4-6]。星点设计是在二水平析因设计的基础上增加了中心点和极值点,具有试验次数低、试验精密度高等优势。本实验以枳实总黄酮吸附-洗脱率为评价指标,采用星点设计-响应面法优选枳实总黄酮的大孔树脂纯化工艺,为枳实总黄酮的开发提供参考。

1 材料

AEG-220 型电子分析天平(日本岛津仪器有限公司),HH. SY21-NI8 型二列八孔电热恒温水浴锅(北京精科华瑞仪器有限公司),PHS-25 型数显 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),Genesys™2 型紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)。

枳实产地为江西新干,经本校生药学教授张丹雁鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果;色谱柱(20 mm × 250 mm,自制),柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 10722-200610),DM130,DM301,AB-8, NKA-9, D101 型大孔吸附树脂(南开大学化工厂),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 检测波长的确定 以甲醇溶液为空白对照,将柚皮苷对照品的甲醇溶液于 200 ~ 400 nm 进行紫外扫描,结果发现在 283 nm 处有最大吸收。

2.2 总黄酮的含量测定 精密称定适量柚皮苷对照品,加 70% 乙醇制成 63.3 mg·L⁻¹的对照品溶液。精密移取该对照品溶液 0.1,0.5,1.0,2.0,4.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加 70% 乙醇定容,摇匀,于 283 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $A = 0.028C + 0.014$ ($r = 0.9994$),线性范围 0.633 ~ 25.32 mg·L⁻¹。精密称取枳实原药材中粉(过 60 目筛)40 mg,加 70% 乙醇稀释并定容,摇匀,过滤,取续滤液,于 283 nm 处测定 A,计算枳实药材中总黄酮质量分数为 40%。

2.3 上样液的制备 称取枳实药材中粉适量,加 25 倍量 80% 乙醇于 90 ℃ 加热回流提取 2 次,每次 103 min,滤过,合并续滤液,减压浓缩,将浓缩物蒸干,干燥至恒重,得枳实提取物,加水定容至一定体积,摇匀,即得。

2.4 总黄酮纯化工艺优选

2.4.1 单因素试验 以总黄酮的吸附率和洗脱率为评价指标,考察 5 种大孔树脂(DM130,DM301,AB-8,NKA-9,D101 型)对纯化工艺的影响,结果显

示 AB-8 型大孔树脂对枳实总黄酮具有较高的吸附-洗脱性能。径高比 1:8 的湿态 AB-8 型大孔树脂可处理上样液(总黄酮质量浓度约 3.5 g·L⁻¹,pH 6.0)18 mL 而不发生泄漏,且具有较好洗脱率。考察大孔树脂的吸附性能和洗脱效果,确定上样速率 1 BV·h⁻¹(1 BV = 30 mL),水洗除杂用量 1 BV,洗脱速率控制在 2 BV·h⁻¹为宜。

2.4.2 星点设计-效应面法 在单因素试验基础上,选择吸附时间、乙醇体积分数、洗脱液用量为自变量,总黄酮吸附-洗脱率为因变量,每个因素取 5 个水平,精密量取上样液(总黄酮质量浓度约 3.5 g·L⁻¹,pH 6.0)18 mL,共 60 份(重复试验 3 次,取平均值),按相应工艺条件进行纯化,因素水平编码见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 枳实总黄酮大孔树脂纯化工艺星点试验因素水平

水平	X_1 吸附时间	X_2 乙醇体积	X_3 洗脱剂用量
	/min	分数/%	/mL
-1.732	30	60	30
-1	42.68	67.4	42.68
0	60	77.5	60
1	77.32	87.6	77.32
1.732	90	95	90

表 2 枳实总黄酮大孔树脂纯化工艺星点试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	总黄酮吸附-洗脱率/%
1	77.32	67.4	42.68	87.4
2	77.32	87.6	77.32	92.4
3	77.32	87.6	42.68	85.6
4	77.32	67.4	77.32	88.7
5	60	60	60	85.0
6	90	77.5	60	91.8
7	60	77.5	90	84.0
8	42.68	87.6	42.68	88.5
9	60	77.5	60	85.8
10	60	77.5	60	85.7
11	60	95	60	93.0
12	60	77.5	30	75.0
13	60	77.5	60	88.0
14	42.68	67.4	77.32	82.8
15	30	77.5	60	92.0
16	42.68	87.6	77.32	91.1
17	42.68	67.4	42.68	83.7
18	60	77.5	60	89.3
19	60	77.5	60	89.6
20	60	77.5	60	90.1

2.4.3 模型拟合 采用 SPSS 19.0 软件对表 2 中数据进行多元线性回归和二项式拟合,得多元线性拟合方程 $Y = 63.485 + 0.032X_1 + 0.204X_2 + 0.105X_3$ ($r = 0.565$),二项式拟合方程为 $Y = 76.732 - 0.072X_1 - 0.375X_2 + 0.535X_3 + 0.005X_1^2 + 0.004X_2^2 - 0.009X_3^2 - 0.008X_1X_2 + 0.003X_1X_3 + 0.006X_2X_3$ ($r = 0.952$)。采用 Design-Expert V. 8.0.5b 软件对模型数据进行 ANOVA 分析,结果发现模型拟合具有显著性差异,失拟性 $F = 0.71$,提示该模型与纯误差的发生无显著关系,即该拟合模型具有可行性。

2.4.4 工艺优化与预测 将因素 X_1 设为中值,绘制三维曲面及等高线,见图 1~3。采用 Design-Expert 软件对方程进行求导,结果显示当吸附时间 77.32 min,乙醇体积分数 87.6%,洗脱用量 71.94 mL 时,总黄酮吸附-洗脱率的预测最大值达 92.4%,结合生产实际考虑,最终选取纯化工艺为吸附时间 77 min,乙醇体积分数 88%,洗脱用量 72 mL。

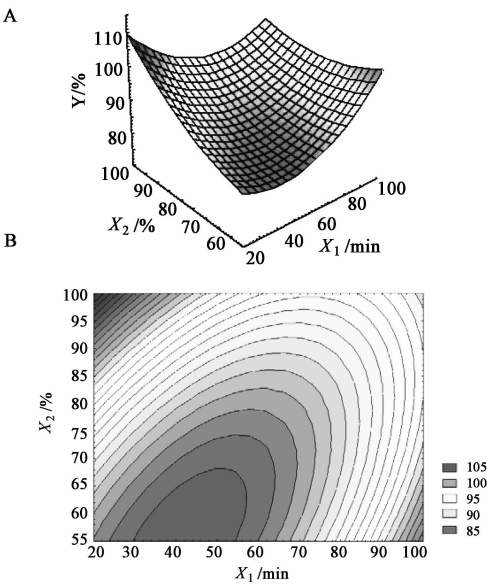


图 1 吸附时间和乙醇体积分数对枳实总黄酮纯化工艺的响应曲面(A)及等高线(B)

2.4.5 验证试验 精密量取上样液 0.6 BV,共 3 份,按优选的工艺条件纯化枳实总黄酮,计算总黄酮洗脱率分别为 90.0%,93.9%,95.0%,与预测值偏差依次为 2.6%,1.6%,2.8%,将纯化的洗脱液蒸干,测定总黄酮纯度达 79%,说明模型预测性良好。

3 讨论

枳实中黄酮类成分主要包括柚皮苷、橙皮苷等,其中柚皮苷质量分数约占 10%^[7],故选择其作为考

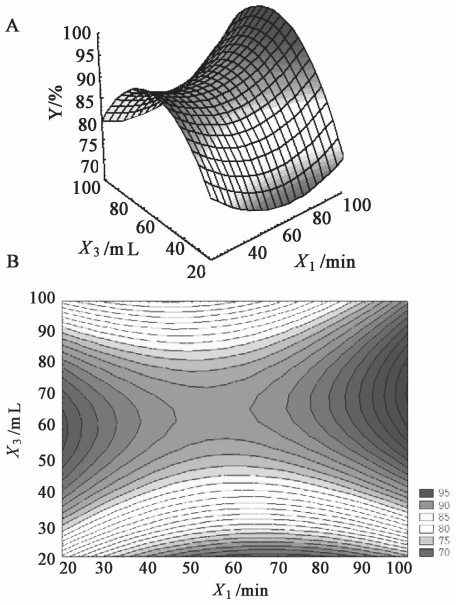


图 2 吸附时间和洗脱剂用量对枳实总黄酮纯化工艺的响应曲面(A)及等高线(B)

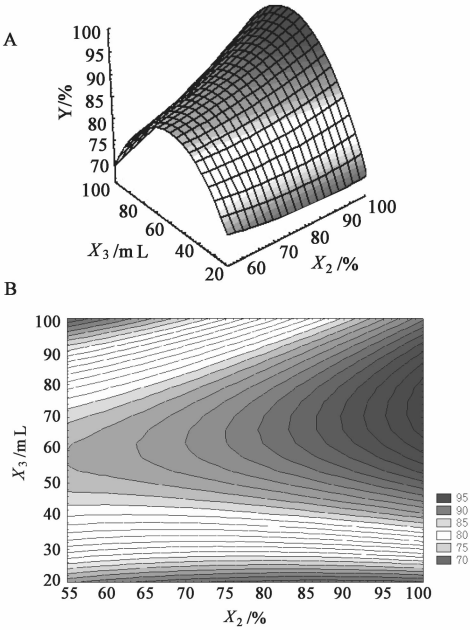


图 3 乙醇体积分数和洗脱剂用量对枳实总黄酮纯化工艺的响应曲面(A)及等高线(B)

察指标。采用大孔树脂纯化枳实总黄酮,具有操作简单、污染小、吸附时间短、解析率高等优点,具有一定的推广价值。由模型的方差分析可知,吸附时间对总黄酮解析率的影响最小,乙醇体积分数的影响最大。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:230.

Box-Behnken 效应面法优化菊花提取工艺

张建萍*

(郑州市骨科医院,郑州 450052)

[摘要] 目的:优选菊花的提取工艺条件。方法:选择提取时间、乙醇体积分数、加醇量为自变量,木犀草素、芹菜素、绿原酸得率的总评“归一值”为因变量,采用 Box-Behnken 效应面法优选菊花的醇提工艺并对该工艺进行预测分析。结果:最佳提取工艺为加 12 倍量 80% 乙醇提取 110 min;木犀草素、芹菜素、绿原酸平均得率分别为 1.64% ,0.94% ,3.95% ,实测 OD = 0.979 6(RSD 1.83%),与预测值(0.981 6)的偏差 0.204% 。结论:优选的提取工艺稳定可行且可预测性强。

[关键词] 菊花;木犀草素;芹菜素;绿原酸;Box-Behnken 效应面设计法

[中图分类号] R284.2;R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)08-0036-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080036

Optimization of Extraction Process of Chrysanthemi Flos by
Box-Behnken Response Surface Methodology

ZHANG Jian-ping*

(Zhengzhou Orthopaedics Hospital, Zhengzhou 450052, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Chrysanthemi Flos. **Method:** Based on single factor test, taking extracting time, ethanol concentration and amount as independent variables, overall desirability (OD) of yield of luteolin, apigenin and chlorogenic acid as dependent variable, Box-Behnken response surface methodology was applied to optimize extraction conditions. **Result:** Optional extraction process was as follows: extracted 110 min with 12 times the amount of 80% ethanol; Average yields of luteolin, apigenin and chlorogenic acid were 1.64% , 0.94% and 3.95% , respectively, deviation between the measured value (0.979 6) and the predicted value (0.981 6) of OD was 0.204% . **Conclusion:** This optimized extaction technology was simple and reliable with high predictability.

[Key words] Chrysanthemi Flos; luteolin; apigen; chlorogenic acid; Box-Behnken response surface methodology

[收稿日期] 20131013(002)

[基金项目] 济南军区后勤科研计划项目(CJN10L067)

[通讯作者] * 张建萍,副主任中药师,从事临床中药学和制剂研究,Tel:15037180772,E-mail:zjp0507@126.com

[2] 张红,孙明江,王凌. 枳实的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材,2009,32(11):1787.

[3] 朱玲,杨峰,唐德才. 枳实的药理研究进展[J]. 中医药学报,2004,32(2):64.

[4] 景怡,景荣琴,任远,等. AB-8 大孔吸附树脂分离纯化玉米须中总黄酮的研究[J]. 中医药学报,2010,38(1):75.

[5] 程文明,张明,李俊,等. 大孔树脂纯化野菊花总黄酮的工艺研究[J]. 中成药,2011,33(9):1508.

[6] 谢燕贤. 大孔树脂分离纯化苦参总黄酮提取工艺研究[J]. 中国医院用药评价与分析,2010,10(6):528.

[7] 黄爱华,陈海丰,曾元儿. 不同规格枳实中柚皮苷的含量考察[J]. 中药新药与临床药理,2008,19(2):130.

[责任编辑 全燕]