

响应面法优化淡竹叶总黄酮的大孔树脂纯化工艺

朱俊访 李 博

(广东食品药品职业学院, 广州, 510520)

摘要 目的:探讨响应面法优化淡竹叶总黄酮大孔树脂纯化工艺。方法:比较四种大孔树脂对淡竹叶总黄酮的吸附和解吸性质,筛选合适的树脂,采用响应面法优化纯化工艺。结果:通过实验数据分析,较佳纯化工艺条件为上样液质量浓度 0.12 g/mL,乙醇体积分数 75%,洗脱液用量 6BV。结论:通过响应面法优选的淡竹叶总黄酮大孔树脂纯化工艺稳定可行,预测性好。

关键词 淡竹叶;总黄酮;大孔树脂;响应面法

Optimization of Purification Technology Using Macroporous Resin for Total Flavonoids from Lophatherum Gracile with Response Surface Method

Zhu Junfang, Li Bo

(Guangdong Food and Drug Vocation College, Guangzhou 510520, China)

Abstract Objective: To optimize purification technology using macroporous resin for total flavonoids from lophatherum gracile with response surface method. **Methods:** Compare the adsorption and desorption properties of four macroporous resin on total flavonoids of lophatherum gracile. Select the appropriate resin to optimize purification process with response surface method. **Results:** According to the analysis of experimental data, it was better to optimize purification process with the mass concentration 0.12 g/mL of sample solution, volume fraction 75% of ethanol and eluent dosage 6BV. **Conclusion:** It was stable and feasible with good predictability to optimize the macroporous resin purification process for total flavonoids from lophatherum gracile with response surface method.

Key Words Lophatherum gracile; Total flavonoids; Macroporous resin; Response surface method

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.04.039

中药淡竹叶为禾本科植物淡竹叶 (*Lophatherum gracile* Brongn.) 的干燥茎叶,性寒,味甘、淡,归心、胃、小肠经,有清热除烦,利尿的功效,用于热病烦渴,小便赤涩淋痛,口舌生疮等症^[1-4]。淡竹叶主要含有黄酮、三萜类、多糖、酚性成分、氨基酸、有机酸及多种微量元素,其中黄酮为主要有效成分^[5-8]。本实验以淡竹叶总黄酮为对象采用大孔树脂进行纯化,通过响应面法对工艺进行优化,为淡竹叶总黄酮的进一步开发和利用提供科学依据。

1 资料

1.1 仪器 电子天平:AUY120,岛津;分光光度计:UV2600,尤尼科仪器有限公司

1.2 受试药物 淡竹叶(市售),干燥后粉碎过 60 目筛备用;大孔树脂:D101、AB-8、S-8(天津光复精细化工)DA-201;郑州勤实科技有限公司;试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 标准曲线绘制 以芦丁为对照品,在 510 nm 下采用硝酸铝-亚硝酸钠法测定黄酮含量。准确称取标准品逐级稀释,精密吸取上述稀释液 2 mL,置 50 mL 量瓶,并以 80% 乙醇补充至 12.0 mL,加入 5% NaNO₂ 溶液 1.5 mL,混匀,放置 6 min 后加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1.5 mL,混匀,6 min 后再加入 4% NaOH 溶液 20 mL,混匀,用水定容。得到浓度为 0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.03 mg/mL、0.04 mg/mL、0.05 mg/mL、0.06 mg/mL 的芦丁溶液,以阴性对照为空白,于 510 nm 波长处测吸光度,得到回归方程 $y = 11.023x + 0.0295$, $R^2 = 0.9992$ ^[9]。

2.2 上柱液制备 取淡竹叶 50 g,粉碎过 50 目筛,石油醚脱脂,80 °C 水浴下以 500 mL 80% 乙醇回流提取 2 h,将提取液浓缩离心,加水定容至 250 mL,调节 pH 值为 6.0,得竹叶黄酮供试液(相当于 0.2 g

生药/mL)。

2.3 大孔树脂预处理 大孔树脂用 95% 乙醇浸泡 24 h,再用 95% 乙醇冲洗,至流出液加蒸馏水无白色混浊、无异味,继续用蒸馏水洗至无醇味,备用。

3 结果

3.1 树脂静态吸附考察 准确称取已处理的 4 种 (AB-8、S-8、D101、D201) 大孔树脂 20 g,分别置于 250 mL 具塞三角瓶中,分别精密吸取 10 mL 供试液,加水稀释至 100 mL,振荡吸附 24 h,滤过,滤液吸取 2 mL 按 2.1 项下方法测定。滤渣水洗,抽滤,用滤纸吸干,准确加入 80% 乙醇 100 mL,振荡解吸 24 h,滤过,滤液吸取 2 mL 按 3.1 项下方法测定,其余滤液置水浴挥干,恒重^[10-11]。结果见表 1,可以看出 D101 型树脂对淡竹叶黄酮具有较佳的吸附和洗脱效果。

表 1 4 种树脂对总黄酮的影响

树脂	吸附率%	解吸率%	黄酮含量%
AB-8	75.2	89.0	20.22
S-8	80.0	44.7	24.01
D101	80.0	85.9	28.03
D201	67.9	91.9	17.57

3.2 动态吸附单因素试验

3.2.1 上样液质量浓度的影响 取处理好的 D101 大孔树脂 20 g,取 0.2 g/mL、0.4 g/mL、0.6 g/mL 的样品溶液,按 2 BV/h 的体积流量通过树脂柱,测定不同上样体积条件下流出液黄酮含量,直到吸附饱和和出现泄漏点,绘制泄露曲线。见图 1。质量浓度为 0.2 g/mL 和 0.4 g/mL 的上样液均在 2 BV (40 mL) 达到泄漏点,0.6 g/mL 的上样液在 1.5BV (30 mL) 达到泄漏点,且质量浓度为 0.2 g/mL 的上样液吸附率最高,因此初步决定上样体积为 2 BV。

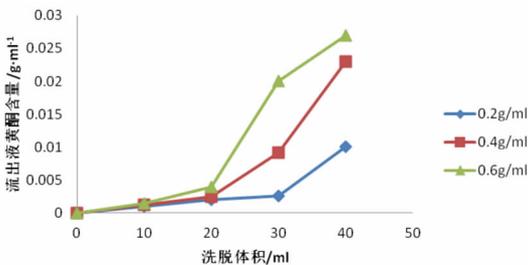


图 1 上样液质量浓度对树脂吸附效果的影响

3.2.2 洗脱液乙醇体积分数的影响 取处理好的 D101 大孔树脂 20 g,吸附 2 BV 0.2 g/mL 的样品溶液,用 2BV 蒸馏水洗脱,再分别用 35%、50%、65%、80%、95% 的乙醇,以 2 BV/h 的流速洗脱,绘制吸附曲线。见图 2。当洗脱液乙醇的体积分数大于

65%,洗脱率增加比较缓慢,因此初步决定较优乙醇体积分数为 80%。

3.2.3 洗脱液乙醇用量的影响 取处理好的 D101 大孔树脂 20 g,吸附 2BV 0.2 g/mL 的样品溶液,用 2BV 蒸馏水洗脱,再分别用 1、2、4、6、8、10 BV 体积分数为 80% 的乙醇,以 2 BV/h 的流速洗脱,绘制吸附曲线。见图 3。当洗脱液用量超过 2BV (40 mL) 体积后,再增加用量洗脱率增加缓慢,因此初步确定较优洗脱液用量为 4BV (80 mL)。

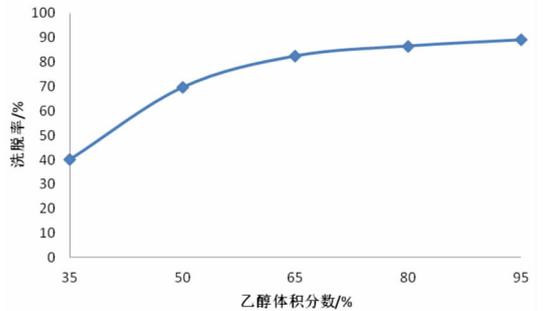


图 2 乙醇体积分数对树脂吸附效果的影响

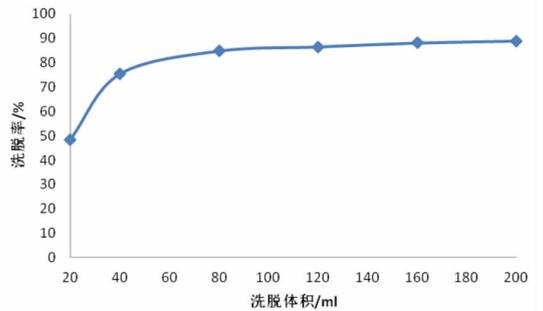


图 3 乙醇用量对树脂吸附效果的影响

3.3 效应面优化 D101 大孔树脂纯化工艺

3.3.1 试验设计 取处理好的 D101 大孔树脂 20 g,考察上样液质量浓度 (A)、洗脱液乙醇体积分数 (B) 及洗脱液用量 (C) 对黄酮洗脱率和纯度的影响,采用 DesignExpert 8.0 统计分析软件的响应面分析法安排试验,以获取最适工艺参数。采用 3 因素 3 水平的响应面分析法进行试验设计,因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3。对评价指标洗脱率和黄酮含量标准化为 0~1 之间的值,再求几何平均值得“总评归一值 (OD)”,以 OD 值为评价指标对纯化工艺进行优化^[12-16]。

表 2 因数水平设计表

实验因素	水平		
	-1	0	1
A-上样液质量浓度 (g · mL ⁻¹)	0.1	0.2	0.3
B-乙醇体积分数 (%)	65	80	95
C-乙醇用量 (BV)	2	4	6

表3 响应面分析试验设计及结果

	A	B	C	洗脱率	黄酮含量	OD
1	0	0	0	86.49%	34.80%	0.7120
2	-1	0	-1	83.36%	34.72%	0.4978
3	1	-1	0	80.30%	34.92%	0.0500
4	1	0	1	83.85%	36.01%	0.6025
5	0	-1	1	85.44%	35.56%	0.6971
6	0	0	0	87.18%	36.85%	0.8922
7	0	0	0	86.76%	34.93%	0.7368
8	0	1	1	89.96%	30.45%	0.3117
9	-1	1	0	88.83%	34.88%	0.8420
10	0	0	0	86.93%	34.31%	0.6994
11	-1	-1	0	83.98%	35.32%	0.5777
12	1	1	0	87.63%	29.84%	0.0000
13	1	0	-1	80.27%	35.23%	0.0000
14	0	0	0	85.84%	34.96%	0.6846
15	-1	0	1	86.52%	36.12%	0.8031
16	0	1	-1	87.19%	31.65%	0.4537
17	0	-1	-1	81.59%	32.44%	0.2375

3.3.2 模型拟合及方差分析 以OD值对各因素进行多元线性回归和二项式拟合,各项系数进行方差分析,得多元线性回归方程 $Y = 0.5175 - 0.2585A + 5.625 \times 10^{-3}B + 0.1531C$ ($R^2 = 0.5174, P = 0.0203$),虽然P值通过检验,但相关系数过小,模型拟合度不高,预测性较差。二项式拟合模型为 $Y = 0.7450 - 0.2585A + 5.6257 \times 10^{-3}B + 0.1532C - 0.0786AB + 0.0743AC - 0.1504BC - 0.1634A^2 - 0.2142B^2 - 0.1058C^2$ ($R^2 = 0.8949, P = 0.0104$),方程显著并相关系数较高,可作为分析及预测的模型。

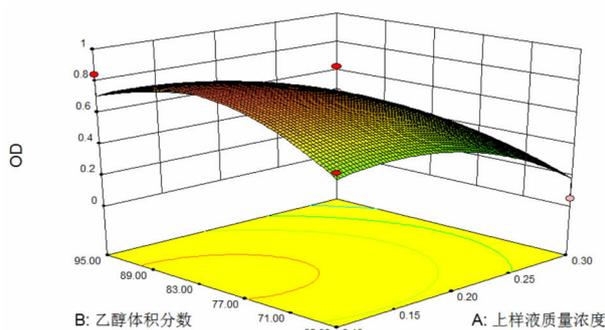


图4 上样液质量浓度与乙醇体积分数对OD值的交互影响

3.3.3 最佳工艺条件预测与验证 根据回归方程,做响应面图(图4~6),分析上样液质量浓度、乙醇体积分数和洗脱液用量对总黄酮提前的影响。根据拟合方程结果显示,淡竹叶总黄酮大孔树脂纯化的最佳工艺条件为:上样液质量浓度 0.12 g/mL,乙醇体积分数 75%,洗脱液用量 5.96 BV。按最佳工艺条件进行3次验证试验,实测计算的OD值平均值为0.8932,与预测值的相对误差为3.31%。OD值的预测值与实测值相对误差较小,表明建立模型可

靠,具有良好的预测性。

4 讨论

本实验采用响应面法优化淡竹叶总黄酮的大孔树脂纯化工艺,通过静态吸附试验筛选出D101型树脂,最终确定较优的纯化条件为上样液质量浓度 0.12 g/mL,乙醇体积分数 75%,洗脱液用量 6 BV。分析实验结果得出上样液浓度、洗脱液的浓度和用量对黄酮纯化有不同程度的影响,其中洗脱液的用量影响最显著,各因素间存在不同程度的交互作用。效应面的优化结果与试验值差异小,对大孔树脂纯化淡竹叶总黄酮的纯度,具有一定的推广应用价值。

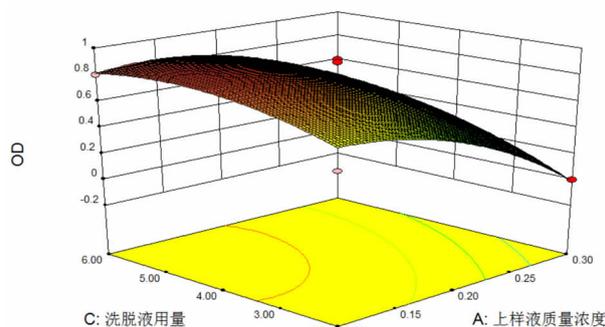


图5 上样液质量浓度和洗脱液用量对OD的交互作用

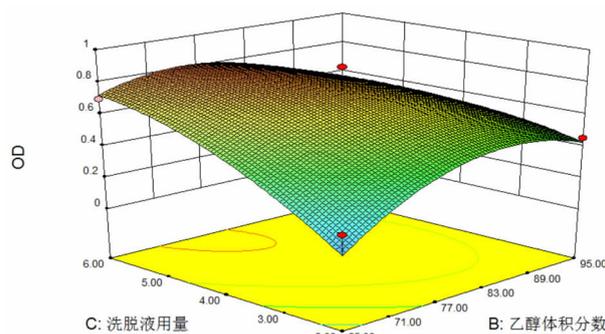


图6 乙醇体积分数和洗脱液用量对OD值的交互影响

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:2253-2254.
- [2] 黄赛金,尹爱武,龚灯,等. 淡竹叶多糖的抗衰老作用研究[J]. 现代食品科技,2015,31(11):51-55.
- [3] 邵莹,吴启南,周婧,等. 淡竹叶黄酮对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2013,29(2):241-247.
- [4] 付彦君,陈靖. 淡竹叶提取物对实验性高脂血症大鼠血脂的影响[J]. 长春中医药大学学报,2013,29(16):965-966.
- [5] 薛月芹,宋杰,叶素萍,等. 淡竹叶中黄酮苷的分离鉴定及其抑菌活性的研究[J]. 华西药学杂志,2009,24(3):218-220.
- [6] 殷婕,鄢云霞,吴启南,等. 淡竹叶的化学成分研究[J]. 西北药学杂志,2010,25(6):413-414.
- [7] 邵莹,吴启南,谷巍,等. 淡竹叶红外光谱的多级鉴定与分析[J]. 中国中药杂志,2014,39(9):1644-1649.

2.5.9 样品含量测定 取5个产地小白蒿炮制品(炒白蒿)各2份,同上制备供试品溶液,精密吸取10 μ L,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定。结果样品中绿原酸的平均含量为0.064 mg/g(0.0064%),RSD为1.5%,结果见表8和图3、4。

3 讨论

小白蒿虽是常用蒙药材,但一直没有质量标准。借此小白蒿饮片标准的建立的机会,可完善了其药材质量标准。以止血有效物质绿原酸为目标成分,建立了小白蒿、炒白蒿的薄层鉴别方法和高效液相色谱法含量测定方法。该法简单易行,分离效果理想,灵敏度高,专属。经精密度等方法学考察证明稳定可靠,重现性好。可作为小白蒿药材、小白蒿饮片和炒白蒿的质量标准。绿原酸作为炒白蒿的含量测定指标具有较强的专属性。

参考文献

- [1] 奇玲, 罗达尚. 中国少数民族传统医学大系[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2000: 313-317.
- [2] 罗布桑. 蒙药学[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2006: 138-139.

- [3] 毕力夫. 蒙药炮制文献研究[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2007: 35-37.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 52.
- [5] 颜虹, 徐勇勇. 医药统计学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 219-220.
- [6] 毕力夫. 蒙药质量标准化研究(下)[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2007: 567-570.
- [7] 罗岳北. 紫外分光光度法测定蒲公英中总有机酸的含量[J]. 科协论坛, 2008(6): 63-64.
- [8] 马莹莹, 李英杰, 刘雅静, 等. 分光光度法测定蒙药材多叶棘豆中槲皮素的含量[J]. 内蒙古民族大学学报, 2010, 25(1): 26-27.
- [9] 张婉, 谢坤, 楼彩霞, 等. 蒙药阿给(冷蒿)炒炭前后无机元素含量及溶出率的变化[J]. 中国药物与临床, 2008, 8(11): 852.
- [10] 廖琦, 杨继家, 张艺, 等. 民族药铁棒锤砂炒炮制品的质量标准研究[J]. 中国药房, 2013, 24(11): 1007-1009.
- [11] 聂翠琴. HPLC 在绿原酸和黄芩苷制剂中含量测定的应用[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.
- [12] 周莲. 金银花叶中绿原酸的提取、纯化及抑菌性质研究[D]. 重庆: 重庆工商大学, 2014.

(2015-05-11 收稿 责任编辑: 张文婷)

(上接第 717 页)

- [8] 赵慧男, 陈梅, 范春林, 等. 淡竹叶中一个新的黄酮碳苷[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 247-249.
- [9] 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.
- [10] 初阳, 杨倩. 淡竹叶中竹叶黄酮的纯化工艺研究[J]. 医药导报, 2012, 31(5): 648-650.
- [11] 王东方, 王庆忠, 曹慧. 淡竹叶有效成分提取及生物活性研究[J]. 南方农业学报, 2015, 46(6): 1034-1037.

- [12] 张海容, 白娟, 魏增云, 等. 超声萃取-响应面法优化淡竹叶多糖提取方法研究[J]. 化学研究与应用, 2013, 25(3): 303-310.
- [13] 周洪伟, 郝丽静, 杨勇, 等. 星点设计-效应面法优化玄参提取工艺[J]. 世界中医药, 2012, 7(5): 455-457.
- [14] 赵永恒, 周毅生, 王嵩, 等. 星点设计-效应面法优化龙须藤的大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9): 36-40.
- [15] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(8): 530.

(2015-10-15 收稿 责任编辑: 张文婷)