

星点设计-响应面法优化大孔树脂纯化藤茶总黄酮的工艺^Δ

柳庆龙^{1*},李煌¹,林珠灿¹,徐伟^{1#},沙玫¹,陈阿虹¹,周厚荣²(1.福建中医药大学药学院,福州 350122;2.福建西岸生物科技有限公司,福州 350002)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0942-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.24

摘要 目的:优化大孔树脂纯化藤茶总黄酮的工艺。方法:以载药量、解吸率、回收率、纯化率等为指标对纯化藤茶总黄酮的4种大孔树脂进行筛选;采用单因素试验和星点设计-响应面法优化纯化工艺中洗脱剂的质量分数、吸附时间、洗脱剂流量及其pH等因素的水平,并进行验证试验。结果:确定以D-101大孔树脂为纯化树脂;最优纯化工艺为上样液质量浓度2 mg(以浸膏质量计)/ml、上样液体积1.1倍柱体积(BV)、洗脱剂乙醇质量分数86.0%、吸附时间36.7 min、洗脱剂流量3.81 BV/h、洗脱剂pH 7;总黄酮的质量分数从66.83%提高至验证试验中的85.00%(RSD=0.15%,n=3),且与预测值(85.08%)接近。结论:采用星点设计-响应面法优化的大孔树脂纯化藤茶总黄酮的工艺条件可行,且稳定性较好。

关键词 D-101树脂;纯化;藤茶;总黄酮;星点设计-响应面法

Optimization of the Purification Technology of Total Flavones in *Ampelopsis grossedentata* with Macroporous Resins by Central Composite Design-Response Surface Methodology

LIU Qinglong¹, LI Huang¹, LIN Zhucan¹, XU Wei¹, SHA Mei¹, CHEN Ahong¹, ZHOU Hourong²(1.College of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China; 2.Fujian West Coast Biotechnology Co., Ltd., Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the purification technology of total flavones from *Ampelopsis grossedentata* with macroporous resins. METHODS: 4 kinds of macroporous resins for the purification of total flavones from *A. grossedentata* were screened by using drug-loading amount, desorption rate, recovery and purification rate as indicators. Single factor test and central composite design-response surface methodology were used to optimized eluant mass fraction, adsorption time, flow rate of eluant, eluant pH and other factors of purification technology, and validation test was also conducted. RESULTS: D-101 macroporous resin was the best. The optimal condition was as follows as the concentration of sample solution 2 mg (by extract weight)/ml, the volume of sample solution 1.1 BV, ethanol 86.0%, adsorption time 36.7 min, flow rate of eluant 3.81 BV/h, pH 7. In validation test, mass fraction of total flavones increased from 66.83% to 85.00% in validation test (RSD=0.15%, n=3), and were close to predicted value (85.08%). CONCLUSIONS: Central composite design-response surface methodology is feasible and stable for the optimization of purification technology of total flavones from *A. grossedentata* with macroporous resins.

KEYWORDS D-101 macroporous resin; Purification; *Ampelopsis grossedentata*; Total flavonoids; Central composite design-response surface methodology

藤茶,又名显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W T Wang,在福建、广东、广西、贵州、云南等均有分布^[1-2]。其味甘、淡,性凉,有效成分主要为黄酮类物质及多糖等^[3]。现代药理研究表明藤茶中总黄酮具有降血糖、抗氧化、抗炎、抗菌、增强免疫、调节免疫等作用^[4-6]。本试验拟采用大孔树脂对藤茶总黄酮进行纯化以得到较高纯度的总黄酮,主要内容包括对不同的大孔树脂进行筛选,然后再采用优选出的树脂进行纯化工艺优化。

1 材料

1.1 仪器

UV-9600 紫外分光光度计[北京瑞利分析仪器(集团)公司];XS105 万分之一电子分析天平(上海奕宇电子科技有限公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

藤茶(桂林平乐瑶乡永康汉方茶业开发有限公司,批号:20130819;经福建中医药大学药学院杨成梓副教授鉴定为广

(15):31.

Δ 基金项目:福建省科技计划项目(No.2015Y0060);福建省中青年教育科研基金项目(No.JA15254);福建中医药大学重点学科项目(No.X2014139)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物成分与活性。E-mail:1036800805@qq.com

通信作者:副教授。研究方向:天然药物成分与活性。E-mail:xwftcm@sina.com

[12] 毛佳蕾,钱晓萍,刘宝瑞.蛇床子素的提取及其体外抗肿瘤活性的研究进展[J].现代肿瘤医学,2014,22(3):726.

[13] 阴旗俊,孙海峰.蛇床子素的药理作用和作为生物农药的研究[J].中医药信息,2009,26(2):13.

[14] 保志娟,戴琳,苗兆涛,等.紫外分光光度法测定厚朴酚及厚朴酚的解离常数[J].云南大学学报,2004,26(1):66.

(收稿日期:2015-07-21 修回日期:2015-10-15)

(编辑:刘萍)

西藤茶);二氢杨梅素对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号: MUST-14013108,纯度: >99%);试剂均为分析纯。

1.3 树脂

大孔树脂 NKA-9(极性)、AB-8(弱极性)、D-101(非极性)、HPD-100(非极性)(均购于沧州宝恩化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 藤茶中总黄酮的含量测定^[7]

2.1.1 藤茶中总黄酮的提取 取干燥藤茶 191.37 g,用6倍量70%乙醇加热回流提取2次,每次1 h。弃去药渣,合并提取液,旋蒸,回收乙醇得浸膏,干燥得干浸膏59.6423 g。

2.1.2 标准曲线的绘制及方法学考察 精密称取干燥的二氢杨梅素对照品0.00821 g,用无水乙醇溶解,并定容于50 ml量瓶作为贮备液。用移液管分别移取贮备液0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1 ml,置于10 ml量瓶中,分别加入5% AlCl₃ 3 ml,再用无水乙醇进行定容,294 nm波长下测其吸光度^[8]。以吸光度(y)与质量浓度(x)回归得线性方程: $y=0.0468x+0.0003$ ($r=0.9993$),表明二氢杨梅素检测质量浓度线性范围为3.28~16.42 μg/ml。依法进行精密度与准确度试验,结果精密度试验 RSD=1.1% ($n=5$),准确度试验中平均方法回收率为99.86% ($n=6$)。

2.1.3 总黄酮质量分数的测定 取干浸膏3份(0.03321、0.03451、0.03621 g),用95%乙醇溶解,定容至50 ml;吸取1 ml,加入5 ml的5% AlCl₃溶液,用95%乙醇定容至50 ml,测定其吸光度,计算总黄酮的质量分数(总黄酮质量与浸膏质量的比值)。结果3份干浸膏中总黄酮的质量分数分别为67.3%、66.5%、66.8%,平均值为66.83%。

2.2 大孔树脂的预处理^[9]

用95%的乙醇浸泡树脂48 h,然后用蒸馏水洗至无醇味(通过酒精计测量其质量分数在5%以下);再用1 mol/L的NaOH浸泡8 h,然后用蒸馏水洗至中性;再用1 mol/L HCl浸泡8 h后,用蒸馏水洗至中性。

2.3 树脂纯化总黄酮的静态吸附性能考察

2.3.1 树脂载药量 精密称取已经处理过的4种干树脂(NKA-9、AB-8、D-101、HPD-100)各10 g置于250 ml锥形瓶中,加入干浸膏1 g,加入100 ml的95%乙醇溶解,在室温条件下振荡、静置、吸附。按照“2.1.2”项下方法,分别测定不同放置时间(0.5、1、2、4、6、8、10、12 h)后溶液的吸光度,计算出树脂的载药量[载药量=(吸附前总黄酮的质量-吸附后总黄酮的质量)/树脂的质量],结果见表1。

表1 4种树脂静态吸附性能考察结果

Tab 1 Properties of static adsorption of 4 kinds of macroporous resin

树脂类型	载药量,mg/g							
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
NKA-9	120.15	195.24	256.35	276.38	280.33	281.50	280.22	280.31
AB-8	110.21	198.42	243.23	262.85	278.20	279.70	280.15	280.45
HPD-100	105.20	182.50	233.52	256.78	264.32	265.13	265.20	265.22
D-101	130.51	202.32	270.34	280.45	285.33	286.45	286.70	286.90

2.3.2 树脂纯化总黄酮解吸附静态参数 将上述4种已吸附饱和和后的树脂过滤、水洗、挥干,分别加入等体积的95%乙醇100 ml,置于250 ml锥形瓶中,振荡4 h,然后静置12 h,收集乙醇的洗脱液;取0.2 ml洗脱液定容至25 ml。测定洗脱液的吸光度,计算其中总黄酮质量(m_1);剩余洗脱液干燥,得其中总黄酮的质量(m_2)。计算过柱后总黄酮的质量分数($m_1/m_2 \times 100\%$)、回收率($m_2/M_1 \times 100\%$, M_1 为干浸膏质量)和解吸率($m_2/M_1 \times 100\%$, M_2 为载药量)。4种树脂各静态解吸附参数测定结果见表2。

表2 4种树脂静态解吸附参数测定结果

Tab 2 Parameters of static desorption of 4 kinds of macroporous resin

树脂类型	过柱后总黄酮质量分数, %	解吸率, %	回收率, %
NKA-9	69.72	95.31	58.91
AB-8	73.20	95.83	67.52
HPD-100	82.85	96.26	68.25
D-101	83.31	96.89	71.28

从表1和表2可以看出,4种树脂中,以D-101树脂的载药量、解吸率、回收率和过柱后总黄酮的质量分数值最高,故选其为纯化工艺的树脂。

2.4 D-101树脂的动态吸附性能考察

2.4.1 上样液浓度 取已处理好的5份等体积的D-101树脂(相当于10 g的干树脂),分别加入质量浓度为1、1.5、2、2.5、3 mg(以浸膏质量计)/ml的浸膏溶液400 ml,吸附30 min,收集过柱液。取过柱液0.2 ml,加入5% AlCl₃溶液3 ml,定容至25 ml,测定其吸光度,计算吸附量,结果分别为32.1、33.2、34.6、34.5、33.7 mg/g。结果表明,当上样液质量浓度在1~2 mg/ml时,随着上样液质量浓度增加,吸附量增加;但在上样液质量浓度为2~3 mg/ml时,随着上样液质量浓度增加,吸附量下降;当上样液质量浓度为2 mg/ml时,吸附量最大,故选其为上样液质量浓度。

2.4.2 上样液体积 取已经处理好的D-101树脂40 ml(相当于10 g的干树脂),取2 mg/ml上样液,以3倍柱体积(BV)/h的体积流量通过树脂,进行动态吸附,每4 ml接1个流份,共接16个流份,分别编号为1~16;每一流份取0.2 ml,加入5% AlCl₃溶液3 ml,然后加入95%乙醇定容至25 ml,测定吸光度,计算泄漏总黄酮的质量浓度,绘制泄漏曲线,结果见图1。

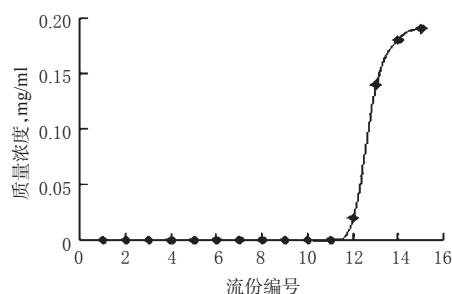


图1 总黄酮泄漏曲线

Fig 1 Dynamic leakage curve of total flavonoids

从图1可以得出,从12号流份(即上样液体积为48 ml)开始出现泄漏。因此上样液确定为44 ml,由前文所述10 g树脂的体积为40 ml,故上样液的体积为1.1 BV。

2.5 纯化工艺的单因素试验

2.5.1 不同洗脱剂质量分数 取已经处理好的5份等体积的D-101树脂(相当于10 g的干树脂),在上样液质量浓度为2 mg/ml、洗脱剂流量为3 BV/h、洗脱剂pH为7的条件下,先用2 BV蒸馏水洗脱,然后分别用50%、60%、70%、80%、90%的乙醇(洗脱剂)洗脱;采用FeCl₃溶液检验,洗脱至反应呈阴性,表示洗脱完成。收集洗脱液,取0.2 ml洗脱液,加入5% AlCl₃溶液5 ml,定容至25 ml,测定其吸光度,计算吸附量、过柱后总黄酮的质量分数、回收率和纯化率[纯化率=(过柱前总黄酮的质量分数-过柱后总黄酮的质量分数)/过柱前总黄酮的质量分数 $\times 100\%$],结果见表3。

表3 洗脱剂不同质量分数时各指标比较

Tab 3 Comparison of each index with different mass fractions of elution

洗脱剂质量分数, %	过柱后总黄酮的质量分数, %	回收率, %	纯化率, %
50	72.00	72.78	4.40
60	75.12	73.23	8.37
70	83.71	72.34	21.58
80	83.92	71.39	21.89
90	83.13	70.67	20.74

从表3可知,洗脱剂的质量分数对总黄酮的回收率和纯化率都有影响,但在洗脱剂质量分数为70%~80%时,回收率和纯化率均较高且相差不大,故选择70%乙醇为洗脱剂。

2.5.2 不同吸附时间 取已经处理好的5份等体积的D-101树脂(相当于10g的干树脂),在上样液质量浓度为2mg/ml、洗脱剂为70%乙醇、洗脱剂流量为3BV/h、洗脱剂pH为7的相同条件下,分别吸附15、30、45、60、90min后,按“2.5.1”项下方法计算相关指标,结果见表4。

表4 吸附不同时间后各指标比较

Tab 4 Comparison of each index at different adsorption time

吸附时间, min	过柱后总黄酮的质量分数, %	回收率, %	纯化率, %
15	70.50	73.26	2.42
30	83.01	74.20	20.56
45	78.93	73.12	14.67
60	83.34	69.98	21.04
90	81.56	65.43	18.46

从表4可知,当吸附时间为30min时,回收率最大,且纯化率也较高,故选择吸附时间为30min。

2.5.3 不同洗脱剂流量 取已处理好的5份等体积的D-101树脂(相当于10g的干树脂),在上样液质量浓度为2mg/ml、洗脱剂为70%乙醇、吸附时间为30min、洗脱剂pH为7的条件下通过D-101树脂,分别选择洗脱剂流量为1、3、5、7、9BV/h进行洗脱,按“2.5.1”项下方法计算相关指标,结果见表5。

表5 洗脱剂不同流量时各指标比较

Tab 5 Comparison of each index with different flow rate of elution

流量, BV/h	过柱后总黄酮的质量分数, %	回收率, %	纯化率, %
1	79.32	73.56	15.24
3	83.43	73.45	21.21
5	82.13	72.34	19.32
7	81.14	70.78	17.88
9	80.23	67.23	16.56

从表5可知,洗脱剂流量为3BV/h时,回收率和纯化率都较高,故确定洗脱剂流量为3BV/h。

2.5.4 不同洗脱剂pH 取已经处理好的5份等体积的D-101树脂(相当于10g的干树脂),在上样液质量浓度为2mg/ml、洗脱剂为70%乙醇、吸附时间为30min、洗脱剂流量为3BV/h条件下,选择洗脱剂pH分别为3、5、7、9、11,通过D-101树脂,按“2.5.1”项下方法计算相关指标,结果见表6。

从表6可知,不同洗脱剂pH条件下回收率和纯化率均变化不大,从工业生产的简便性和经济性考虑,选择pH为7。

2.6 纯化工艺的星点设计-响应面法^[10-12]

2.6.1 试验设计 通过单因素考察结果可知, pH对总黄酮的纯化率几乎无影响;影响总黄酮纯化率的因素主要有洗脱剂质量分数(A)、吸附时间(B)、洗脱剂流量(C),且各自的较优

表6 洗脱剂不同pH时各指标比较

Tab 6 Comparison of each index with different pH value of elution

洗脱剂pH	过柱后总黄酮的质量分数, %	回收率, %	纯化率, %
3	84.12	72.31	22.84
5	84.32	72.52	22.47
7	84.24	72.64	22.30
9	84.45	72.12	22.65
11	84.46	72.13	22.67

水平分别为70%~90%、30~60min、3~7BV/h。根据星点设计的原理,每个因素设5个水平,分别用代码 $-α$ 、 -1 、 0 、 1 、 $α$ 表示,其中 $α=1.682$ 。因素与水平见表7。

表7 因素与水平

Tab 7 Factors and levels

因素	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
A, %	70	74.2	80	85.8	90
B, min	30	36.3	45	53.7	60
C, BV/h	3	3.85	5	6.15	7

2.6.2 试验操作 取已经处理好的多份等体积的D-101树脂(相当于10g的干树脂),在上样液质量浓度为2mg/ml、洗脱剂pH为7的条件下,按表7各个因素所设置的水平,平行进行试验。按“2.5.1”项下方法计算过柱后总黄酮的质量分数(Y, %),结果见表8。

表8 星点试验设计及结果

Tab 8 Program and results of central composite design

序号	A	B	C	Y, %
1	1	1	-1	83.13
2	0	0	0	83.02
3	0	0	0	83.41
4	-1	1	-1	82.89
5	-1	-1	-1	83.65
6	0	0	0	83.36
7	1	-1	-1	85.19
8	0	0	-1.682	85.23
9	1	1	1	82.12
10	0	1.682	0	81.23
11	-1	-1	1	83.56
12	0	0	0	83.47
13	0	0	0	83.76
14	0	0	0	83.52
15	1	-1	1	84.27
16	0	-1.682	0	83.35
17	-1	1	1	81.39
18	-1.682	0	0	82.27
19	1.682	0	0	84.22
20	0	0	1.682	82.38

2.6.3 模型拟合 以Y为因变量,应用Design-Expert 8.0.6软件对所得数据进行响应面分析,对各个自变量二项式方程拟合。拟合方程: $Y=83.42+0.48A-0.78B-0.61C-0.025A^2-0.36B^2+0.17C^2-0.16AB-0.043AC-0.19BC$ ($R^2=0.929$)。各因素的方差分析结果见表9。

由表9可知,模型的 $P<0.05$,且失拟项 $P>0.05$,说明方程对试验的拟合程度较好。A、B、C因素的 P 均 >0.05 ,表明其对过柱后总黄酮的质量分数的影响极其显著,各因素影响大小顺序为B、C、A;AB、AC、BC各因素之间相互影响,且不呈简单的线性关系;曲线相关系数 $R^2=0.929$,说明模型拟合较好,试

表9 方差分析结果

Tab 9 Result of variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	3.09	1	3.09	20.69	0.001 1
B	8.39	1	8.39	56.12	<0.000 1
C	5.06	1	5.06	33.84	0.000 2
A ₂	0.009	1	0.009	0.06	0.811 3
B ₂	1.89	1	1.89	12.67	0.005 2
C ₂	0.43	1	0.43	2.89	0.120 2
AB	0.2	1	0.20	1.37	0.269 0
AC	0.014	1	0.014	0.097	0.762 3
BC	0.28	1	0.28	1.88	0.200 2
残余	1.5	10	0.15		
失拟项	1.2	5	0.24	4.13	0.073
纯误差	0.29	5	0.058		
总和	21.07	19			
模型	19.58	9	2.18	14.55	0.000 1

验操作可信。通过对曲线方程求导,可以得出最优条件:洗脱剂的质量分数为85.95%、吸附时间为36.7 min、洗脱剂流量为3.81 BV/h,预测过柱总黄酮质量分数最大值为85.08%。考虑到实际操作的方便性,经调整后的条件为洗脱剂的质量分数86.00%、吸附时间36.7 min、洗脱剂流量3.81 BV/h。

3个因素对总黄酮质量分数的响应面图分析见图2。

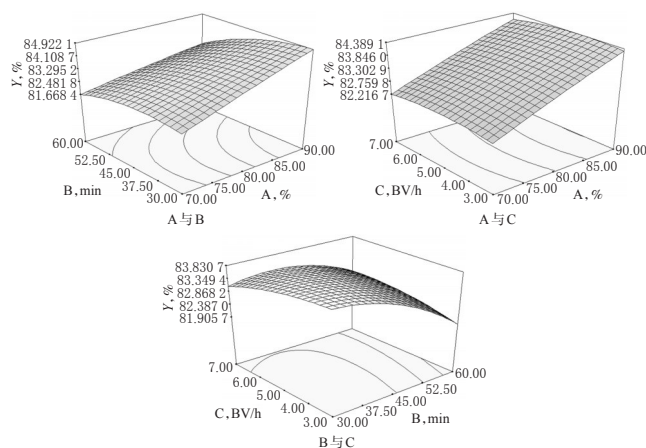


图2 各因素对总黄酮质量分数影响的响应面图

Fig 2 Response surface plot of the effects of factors on mass fraction of total flavonoids

2.6.4 验证试验 取已经处理好的3份等体积的D-101树脂(相当于10 g的干树脂),在上样液质量浓度为2 mg/ml、上样液体积为1.1 BV、洗脱剂质量分数为86.0%乙醇、吸附时间为36.7 min、洗脱剂流量为3.81 BV/h、洗脱剂pH为7的条件下进行相应操作,结果见表10。

表10 纯化总黄酮工艺的验证试验结果

Tab 10 Validation test result of purification technology of total flavonoids

试验号	浸膏溶液中总黄酮的质量分数, %	平均值	过柱后总黄酮的质量分数, %	平均值
1	67.20	66.83%	84.88	85.00%
2	66.50	(RSD=0.52%)	85.14	(RSD=0.15%)
3	66.80		84.99	

按最优工艺纯化后,总黄酮的质量分数从平均值66.83%

提高至85.00%,且与预测值接近,说明模型可行;3次试验的RSD为0.15%,说明工艺稳定性较好。

3 讨论

工艺优化的设计方法常用的有均匀化设计、正交设计和星点设计等,虽然前2种试验次数较少,但是存在着较大的弊端。首先,均匀化设计和正交设计是基于线性设计的,不适用于二次以上的多项式模型,所选择的最优条件下测得的实际值与预测值相差较大。其次,均匀化设计和正交设计受所选线性模型的限制,只能指出某一因素的取值方向,无法求出极值,往往选择的极值均接近于自变量的极大值或极小值。而星点设计试验精度更高、模型预测值更准,故本试验采用星点设计-响应面法进行大孔树脂纯化藤茶总黄酮的工艺优化。

本试验采用D-101大孔树脂对藤茶总黄酮进行富集纯化。而D-101大孔树脂的分离原理主要有两类:(1)范德华引力或氢键;(2)大孔树脂的多孔结构而使其对分子大小不同的物质具有筛选作用。在试验中,洗脱剂pH对总黄酮的纯化影响并不显著,分析可能是D-101大孔树脂在纯化总黄酮的过程中,大孔树脂的分子筛作用为主导,而范德华力或氢键的作用非常微弱所致。所以当黄酮从游离态变化为离子态时,D-101的吸附能力变化不大,故不同洗脱剂pH下结果差异很小。

(致谢:本试验在福建省科技厅福建省中药学重点实验室中完成,特此感谢!)

参考文献

- [1] 中国高等植物研究所.中国高等植物图鉴:补编:第2册[M].北京:北京出版社,1979:154-158.
- [2] 刘建新,周天达.藤茶的生药学研究[J].中草药,1999,30(6):459.
- [3] 钟正贤,覃洁萍.广西藤茶总黄酮保肝作用的实验研究[J].广西科学,2002,1(9):57.
- [4] 覃骊兰.藤茶的化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2008,42(6):94.
- [5] 罗祖友,付晓芳,吴谋成.藤茶的研究进展[J].食品科学,2005,26(8):513.
- [6] 易诚.显齿蛇葡萄研究进展[J].经济林研究,2004,22(3):51.
- [7] 何桂霞,杨伟丽,裴刚,等.藤茶不同采收时期及不同部位的总黄酮考察[J].湖南中医学院学报,2004,24(1):13.
- [8] 何桂霞,裴刚,周天达,等.显齿蛇葡萄中总黄酮和二氢杨梅素的含量测定[J].中国中药杂志,2000,25(7):39.
- [9] 贾存勤,李阳春,屠鹏飞,等.D-101型大孔吸附树脂预处理方法的研究[J].中草药,2006,37(2):193.
- [10] 刘艳杰,项荣武.星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J].中国现代应用药学,2007,24(6):455.
- [11] 薛桂蓬,宋选宗,满尔哈巴·海如拉,等.星点设计-响应面法优化维药刺山柑果生物碱提取工艺[J].中国药房,2015,26(1):96.
- [12] 李晓斌,陈振斌,杨咏,等.响应面分析法优化槐叶中黄酮类化合物的提取工艺[J].中国药房,2015,26(7):960.

(收稿日期:2015-06-01 修回日期:2015-09-21)

(编辑:刘萍)