

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.003

Box - Behnken 设计优化蔷薇红景天总黄酮提取纯化工艺*

帕提曼·肖开提,穆巴热科·吾普尔,刘阳,王新玲[△]

(新疆医科大学药学院,新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 优选蔷薇红景天中总黄酮的提取及纯化工艺。方法 采用 Box - Behnken 响应面法,以提取物中总黄酮含量为指标,考察提取溶剂体积分数、提取时间、提取次数、物料比等因素对提取工艺的影响;以总黄酮纯度为指标,考察样品溶液质量浓度、进样流速、洗脱液浓度、洗脱液体积等因素对纯化效果的影响。结果 最佳提取工艺为 70% 乙醇,提取 60 min,物料比 1:40;蔷薇红景天总黄酮提取物中的黄酮平均含量为 56.97%;最佳纯化工艺为上样液质量浓度 2.003 5 mg/mL、洗脱液体积分数 90%、洗脱液体积 2 BV;纯化后,总黄酮平均纯度为 82.83%,总黄酮含量比提取物的总黄酮含量提高了 26%。结论 实测值与理论预测值相符性良好,响应面法优化得到的蔷薇红景天总黄酮提取及纯化工艺参数条件可靠,具有一定的实际应用价值。

关键词:蔷薇红景天;总黄酮;Box - Behnken 响应面法;提取工艺;纯化工艺

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)11-0008-06

Extraction and Purification of Total Flavonoids from *Rhodiola rosea* by the Box - Behnken Design

Patiman XIAOKAITI, Mubareke WUPUER, LIU Yang, WANG Xinling

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830011)

Abstract: Objective To optimize the extraction and purification of total flavonoids from *Rhodiola rosea*. **Methods** Box - Behnken response surface methodology was used to investigate the effects of solvent concentration; taking the total flavonoids content in the extract as an index, the extraction time, extraction times and material ratio on the extraction process were investigated; with purity of total flavonoids as an index, the effects of sample concentration, flow rate, eluent concentration and eluent volume on purification efficiency were investigated. **Results** The optimal extraction process was 70% ethanol concentration, 60 min extraction time and 1:40 material ratio. Under these conditions, the content of total flavonoids from *Rhodiola rosea* is 56.97%; the best purification process was 2.003 5 mg/mL of the sample solution, 90% of the eluent and 2 BV of the eluent. The purity of total flavonoids after purification was 82.83%. After purification, the content of total flavonoids was 26% higher than that of extract. **Conclusion** The measured values are in good agreement with the theoretical predictions. The optimal extraction and purification parameters of total flavonoids from *Rhodiola rosea* by response surface methodology are reliable and have certain practical application value.

Key words: *Rhodiola rosea*; total flavonoids; Box - Behnken Response Surface Method; extraction technology; purification technology

蔷薇红景天 *Rhodiola rosea* L. 为景天科 Crassulaceae 红景天属 *Rhodiola* L. 多年生草本植物。据统计,全世界有 90 种红景天属植物,我国目前有 73 种,多分布于东北、甘肃、四川、云南、贵州、新疆等地区^[1]。《新疆药用植物志》记载,新疆蔷薇红景天主要分布于天山山脉海拔 1 600 ~ 2 700 m 的高寒地区^[2]。红景天属植物的主要成分有红景天苷、苷元酪醇、黄酮类、没食子酸与苷、草质素及其苷类。其中,红景天黄酮类化合物具有抗病毒、抗肿瘤、强心、降压、降低胆固醇、止咳祛痰、保肝等作用^[3]。黄酮类化合物是植物中含量最丰富的一类,迄今已在植物中鉴定出数千种黄酮类化合物。随着关于黄酮类化合物对人类健康有益认识的加深,富含黄酮类化合物植物的提纯越来越受到关注,且黄酮类成分已在抗炎、抗肿瘤、抗高血压与心血管疾病等方面取得了一定的研究成果^[4]。本研究中通过 Box - Behnken 响应面

分析法,以提取物中总黄酮含量为考察指标,对新疆蔷薇红景天总黄酮的提取工艺进行研究;在已确定的提取工艺基础上,通过筛选,应用 HPD - 600 型大孔吸附树脂来纯化蔷薇红景天总黄酮,并通过 Design - Expert 8.06 软件,优化工艺条件,为新疆蔷薇红景天资源的开发利用和后期研究提供科学的试验依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:HH - S4 型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);EYELA 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司,东京理化器械株独资工厂);KQ - 250DV 型数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司,功率为 150 W,频率为 50 Hz);New classic MF 型电子天平(Mettler Toledo 公司,精度为万分之一);T6 型新世纪紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);HY - 5 型回旋振荡器(金坛市医疗仪器厂)。

*基金项目:新疆医科大学人才引进专项[10-01040060150];新疆维吾尔自治区自然科学基金[2016D01C160]。

第一作者:帕提曼·肖开提,女,硕士研究生,初级药师,研究方向为天然药物开发,(电子信箱)2609957834@qq.com。

[△]通信作者:王新玲,女,博士研究生,副教授,研究方向为天然药物活性成分与开发,(电子信箱)365021216@qq.com。

试药:蔷薇红景天购于新疆伊犁,品种由新疆医科大学药学院胡君萍教授鉴定为正品,标本保留在新疆医科大学药学院天药/生药教研室;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100080-200707)。

2 方法与结果

2.1 黄酮含量测定(硝酸铝-亚硝酸钠法)^[5]

2.1.1 对照品溶液制备

取干燥至恒重的芦丁对照品 2.5 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的溶液,即得。

2.1.2 测定波长选择

取芦丁对照品 5.72 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中溶解,精密吸取 1 mL,芦丁溶液置 10 mL 容量瓶中;加 5% 亚硝酸钠溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,再加 70% 乙醇溶液至刻度,摇匀,放置 15 min,采用紫外-可见分光光度法,在 200~800 nm 波长区间扫描。结果对照品溶液在 510 nm 波长处有最大吸收,故选用 510 nm 为测定波长。

2.1.3 蔷薇红景天总黄酮制备及含量测定

取 2.0 g 蔷薇红景天药材粉末,精密称定,按提取条件加热回流提取一定时间后,趁热过滤,减压浓缩至 10 mL 容量瓶中,作为待测溶液。取蔷薇红景天总黄酮提取物适量,依法操作,于 510 nm 波长处测定吸光度,依据标准曲线计算出相应的黄酮含量。

2.1.4 方法学考察

精密度试验:准确吸取对照品溶液 1.5 mL,置 10 mL 容量瓶中,按拟订方法测定吸光度,重复测定 6 次。结果的 RSD 为 0.22% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取红景天总黄酮提取物 19.56 mg,精确称定,置 10 mL 容量瓶中,按拟订方法分别于 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 时测定吸光度。结果的 RSD 为 1.91% ($n=6$),表明供试品溶液在 2 h 内稳定。

重复性试验:取红景天总黄酮提取物共 6 份,精密称定,平行制备 6 份提取液,各 0.5 mL,置 10 mL 容量瓶中,按拟订方法测定吸光度。结果的 RSD 为 0.86% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:准确称取已知含量(5.1084 mg/mL)的蔷薇红景天粉末 9 份,各 1 g,制备供试品溶液,再分别精确加入芦丁对照品,混匀,按拟订方法进行测定,计算得回收率为 100.58%, RSD 为 1.97% ($n=9$),表明方法稳定可行。详见表 1。

2.2 提取工艺优化

2.2.1 单因素考察

提取溶剂体积分数:取蔷薇红景天药材粉末 1 g,精

表 1 蔷薇红景天总黄酮加样回收试验结果($n=9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
5.1508	4.12	9.32	101.19		
5.1482	4.12	9.43	103.93		
5.1493	4.12	9.38	102.67		
5.1585	5.14	10.32	100.42		
5.1242	5.14	10.28	100.31	100.58	1.97
5.1304	5.14	10.22	99.02		
5.1380	6.15	11.18	98.24		
5.1232	6.15	11.36	101.41		
5.1324	6.15	11.16	98.01		

密称定,加入 20 mL 不同体积分数的 10% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇,加热回流提取 1 h,过滤并浓缩,低温干燥,按拟订方法测定提取物中黄酮含量。结果测得含量依次为 16.73%, 33.51%, 38.00%, 46.25%, 39.26%, 故选择 70% 乙醇为最佳提取溶剂体积分数。

提取时间:取蔷薇红景天药材粉末 1 g,精密称定,加入 20 mL 70% 乙醇,加热回流提取 30, 60, 90, 120, 150 min,过滤并浓缩,低温干燥,按拟订方法测定提取物中黄酮含量。结果测得含量依次为 36.14%, 41.25%, 39.38%, 39.20%, 41.96%, 考虑到周期问题,故初步确定最佳提取时间为 60 min。

物料比:取蔷薇红景天药材粉末 1 g,精密称定,分别按 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70 的物料比加入 70% 乙醇,加热回流提取,将提取液过滤并浓缩,低温干燥,取滤液按拟订方法测定提取物中黄酮含量。结果测得含量依次为 35.36%, 36.68%, 36.86%, 43.82%, 42.49%, 41.95%, 40.54%, 故选择物料比为 1:40。

提取次数:取蔷薇红景天药材粉末 1 g,精密称定,用已筛选的提取溶剂浓度、提取时间、物料比分别提取 1, 2, 3 次,将提取液过滤浓缩,低温干燥,按拟订方法测定提取物中的黄酮含量。结果测得含量依次为 39.16%, 42.85%, 39.66%, 故初步确定提取次数为 2 次。

2.2.2 响应面法优化试验设计

试验设计:根据单因素试验结果,固定提取次数 2 次,选取乙醇体积分数(因素 A)、提取时间(因素 B)和物料比(因素 C)为自变量,以蔷薇红景天提取物总黄酮含量(Y)为响应值,利用 Design-Expert 8.06 软件中的 Box-Behnken 进行响应面中心组合设计,优化提取工艺。试验因素与水平见表 2,响应面设计方案见表 3。

方差分析:试验结果见表 3。数据采用 Design-Expert 8.06 软件进行多元模拟拟合分析,得到以蔷薇红景天提取物中黄酮含量为目标函数的二次回归方程 $Y=53.47+2.05A+1.96B+0.73C+2.09AB-2.19AC+$

表2 响应面法优化提取工艺试验因素与水平

水平	因素 A(%)	因素 B(min)	因素 C
-1	50	30	1:30
0	70	60	1:40
1	90	90	1:50

表3 响应面法优化提取工艺试验设计与结果

序号	因素 A	因素 B	因素 C	含量(%)	序号	因素 A	因素 B	因素 C	含量(%)
1	0	1	1	50.91	10	0	0	0	51.41
2	0	-1	1	46.10	11	0	0	0	50.55
3	1	1	0	52.03	12	-1	1	0	43.11
4	0	-1	-1	46.53	13	1	0	1	47.05
5	-1	0	-1	43.03	14	1	-1	0	42.03
6	1	0	-1	50.87	15	-1	0	1	47.98
7	0	0	0	56.60	16	-1	-1	0	41.47
8	0	1	-1	45.78	17	0	0	0	54.09
9	0	0	0	54.71					

1.39BC - 4.45A² - 4.36B² - 1.78C²。回归方程方差分析见表4。可见,响应面模型 F 值为 7.02, $P < 0.01$ 回归模型极显著,失拟项为 0.689 5, $P > 0.05$ 表示不显著,表明此模型以实际情况拟合很好。 $R^2 = 0.900 2$, $R_{adj}^2 = 0.771 9$, $R_p^2 = 0.438 4$,表明预测值与实测值间具有高度相关性,模型方程能很好地反映真实的试验值。由表3可见,该模型中一次项 A 和 B 对该模型的影响显著($P < 0.05$);二次项中, A² 和 B² 对模型的影响极显著($P < 0.01$);交互项 AB, AC, BC 无显著性。表明乙醇体积分数与提取时间对蔷薇红景天总黄酮提取物含量的影响显著,但各因素间无影响。由响应面结果得到各因素对总黄酮提取物含量的影响大小依次为因素 A > 因素 B > 因素 C,即乙醇体积分数 > 提取时间 > 物料比。

表4 响应面法优化提取工艺试验方差分析结果

方差来源	平均和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	307.55	9	34.17	7.02	0.008 8 ^{**}
A	33.58	1	33.58	6.90	0.034 1 [*]
B	30.81	1	30.81	6.33	0.040 1 [*]
C	4.25	1	4.25	0.87	0.381 4
AB	17.47	1	17.47	3.59	0.100 1
AC	19.23	1	19.23	3.95	0.087 3
BC	7.73	1	7.73	1.59	0.248 1
A ²	83.56	1	83.56	17.16	0.004 3 ^{**}
B ²	79.94	1	79.94	16.41	0.004 9 ^{**}
C ²	13.41	1	13.41	2.75	0.141 0
残差	34.09	7	4.87		
失拟项	9.60	3	5.55	0.52	0.689 5
纯误差	24.49	4	6.12		
总误差	341.64	16			

$$R^2 = 0.900 2, R_{adj}^2 = 0.771 9, R_p^2 = 0.438 4$$

注: * 为影响显著($P < 0.05$), ** 为极显著($P < 0.01$), $P > 0.05$ 为不显著。表8同。

响应面分析:图1至图3可直观反映两变量交互作用的显著程度,圆形表示两因素交互作用不显著,椭圆形表示两因素交互作用显著。由图1可见, A, B, C 3 因素交互作用显著。随着乙醇体积分数的增加,提取物中黄酮含量随之增加,随后黄酮含量有下降趋势,当乙醇体积分数为 70% 和提取时间为 60 min 时,其值最大。响应面的坡度较陡,等高线为椭圆形,表明乙醇体积分数与提取时间交互作用较强,对提取物中黄酮含量的影响较大;乙醇体积分数的曲面相对于提取时间较陡,表明乙醇体积分数对提取物中黄酮含量的影响比提取时间

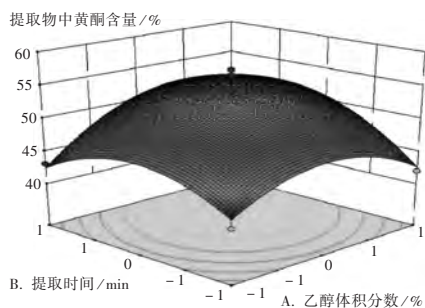


图1 乙醇体积分数与提取时间对提取物中总黄酮含量的响应曲面及等高线图

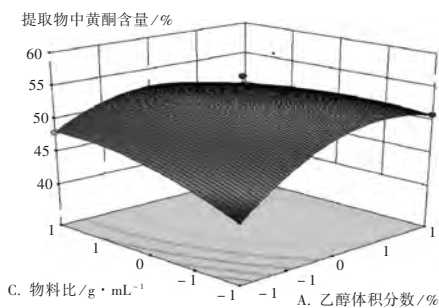


图2 乙醇体积分数与物料比对提取物中总黄酮含量的响应曲面及等高线图

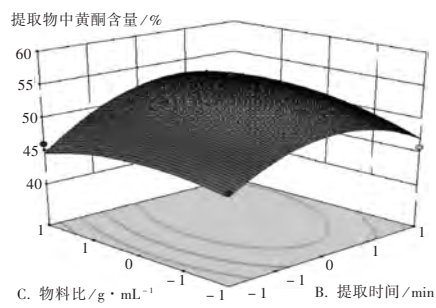


图3 提取时间与物料比对提取物中总黄酮含量的响应曲面及等高线图

大(因素 A > 因素 B);当乙醇体积分数增加到一定程度后,其增加趋势不太明显,其中物料比的变化对提取物中黄酮含量的影响对于其他因素最小。可见,对黄酮含量的影响显著程度为因素 A > 因素 B > 因素 C,与方差分析结果一致。

2.2.3 最佳条件预测及验证试验

通过 Design - Expert 8.06 软件进行数据分析得到最佳提取工艺为:溶剂体积分数 69.89%,提取时间 58.08 min,料液比 1:40,提取物中总黄酮含量的理论值为 56.15%。根据实际情况确定最佳提取工艺条件为 70% 乙醇、提取 60 min、物料比(1:40)。在此条件下,取 3 份药材,精密称定,进行验证试验,测定蔷薇红景天提取物中黄酮的含量。结果 3 批样品中总黄酮含量分别为 56.38%,57.70%,56.82%,平均含量为 56.97%,RSD 为 1.18%,表明优化提取工艺稳定、可控。

2.3 纯化工艺筛选

2.3.1 树脂型号筛选

预处理与再生:将大孔树脂用无水乙醇充分浸泡 24 h,用蒸馏水淋洗至流出液与水(1:5)混合无浑浊为止,再用 5% 盐酸浸泡 4~6 h,用水洗至中性,最后用 5% 氢氧化钠溶液浸泡 4~6 h,用水洗至中性,备用^[6]。

静态吸附与静态解吸考察:取预处理好的 6 种大孔吸附树脂各 1 g,精密称定,置 50 mL 具塞三角瓶中,加入总黄酮粗提物制备的溶液 20 mL(总黄酮质量浓度为 5.230 8 mg/mL),密闭,室温回旋振荡吸附(每分钟 120 次)24 h,充分吸附后,过滤,吸取滤液按含量测定方法测定总黄酮的含量,计算不同大孔树脂的吸附量和吸附率;将吸附饱和的树脂晾干后,加入 20 mL 70% 乙醇,回旋振荡(每分钟 120 次)24 h 解吸附,过滤,吸取滤液按含量测定方法测定总黄酮的含量,计算不同树脂的解吸附量和解吸附率。

2.3.2 大孔吸附树脂类型确定

根据静态吸附、解吸的考察,计算 6 种树脂的吸附量、吸附率、解吸量与解吸率,详见表 5。可见,HPD600 型树脂对蔷薇红景天总黄酮的指标均较其余 5 种好,故确定用 HPD600 型大孔吸附树脂为理想树脂。

表 5 6 种树脂的性质、吸附量、吸附率及解吸率

树脂型号	极性	吸附量(Q ₁ ,mg/g)	吸附率(E,%)	解吸量(Q ₂ ,mg/g)	解吸率(D,%)
NKA-9	极性	85.73	81.94	60.47	70.53
AB-8	弱极性	71.53	68.38	46.05	64.37
D101	非极性	59.30	56.68	39.16	66.04
HPD100	非极性	69.78	66.70	45.83	65.68
HPD500	弱极性	86.08	82.29	49.06	56.99
HPD600	极性	91.57	87.53	57.88	63.21

2.4 纯化工艺优化

2.4.1 单因素考察

总黄酮上样液质量浓度:将经过预处理的 5 g HPD600 型大孔树脂进行湿法装柱。用蒸馏水冲洗树脂除去水溶性杂质,确保树脂被冲洗干净且无气泡,取 6.071 2 mg/mL 的总黄酮粗提液,加水稀释至 0.514 0,1.032 1,1.517 8,2.003 5,2.489 2,3.035 6,3.521 3 mg/mL,按 2 BV 个表现体积(1 BV 为 1 个树脂床体积),以 1 mL/min 的流速上样,收集流出液,在最大波长处测定吸光度,计算树脂吸附量和吸附率。当质量浓度为 2.003 5 mg/mL 时吸附率最高,可达 86.14%,故上样质量浓度选择 2.003 5 mg/mL。

进样流速:将经过预处理的 5 g HPD600 型大孔树脂进行湿法装柱。将质量浓度为 2.003 5 mg/mL、体积为 2 BV 的总黄酮粗提液,以 0.5,1.0,1.5,2.0,3.0 mL/min 流速进行进样,收集流出液,在最大波长处测定吸光度,计算树脂吸附量和吸附率。初步确定进样流速为 1.5 mL/min。

样品溶液体积:将经过预处理的 5 g HPD600 型大孔树脂进行湿法装柱。将质量浓度为 2.003 5 mg/mL 的总黄酮粗提液,选择不同体积(1,2,3,4,5,6 VB),以最佳流速 1.5 mL/min 进样,收集流出液,在最大波长处测定吸光度,计算树脂吸附量和吸附率。当上样体积为 2 BV 时,吸附率最高。故选择 2 BV 为进样体积。

上样液 pH:将经过预处理的 5 g HPD600 型大孔树脂进行湿法装柱。取 6 份质量浓度为 2.003 5 mg/mL 的蔷薇红景天总黄酮粗提液 15 mL,分别调节其 pH 为 3,4,5,6,7,8,以 2 BV 柱床体积,1.5 mL/min 的流速进样,收集流出液,在最大波长处测定吸光度,计算树脂吸附量。结果选择 pH=4 为上样 pH。

洗脱液体积分数:将经过预处理的 5 g HPD600 型大孔树脂进行湿法装柱。将质量浓度为 2.003 5 mg/mL、体积为 2 BV 的总黄酮粗提液以最佳流速 1.5 mL/min 进样,进行树脂吸附,先水洗之无色(弃去水洗部分),再分别用 50%,60%,70%,80%,90%,100% 乙醇以 1.5 BV 的柱床体积,1 mL/min 的流速进行洗脱,收集洗脱液,在最大波长处测定吸光度,计算树脂解吸附量和解吸率。当乙醇体积分数增加到 90% 时,洗脱率最高可达 62.2%。故选用 90% 乙醇进行洗脱。

洗脱液体积:将经过预处理的 5 g HPD600 型大孔树脂进行湿法装柱。将质量浓度为 2.003 5 mg/mL 的总黄酮粗提液、以 2 BV 柱床体积、1.5 mL/min 的流速进样,进行树脂吸附,再用 90% 乙醇以 1,1.5,2,2.5,3,3.5 BV 的柱床体积、1 mL/min 的流速进行洗脱,收集

洗脱液,在最大波长处测定吸光度,计算树脂解吸量和解吸率。当洗脱液用量达2 BV时,洗脱率最高可达61.73%,解吸效果最好。故洗脱液的洗脱用量选择2 BV。

洗脱速度:将经过预处理的5 g HPD600型大孔树脂进行湿法装柱。将质量浓度为2.0035 mg/mL的总黄酮粗提液,以2 BV柱床体积、1.5 mL/min流速进样,进行树脂吸附,再分别用2 BV柱床体积的90%乙醇溶液,以1,2,3,4 mL/min的流速进行洗脱,收集洗脱液,依法测定吸光度,计算树脂解吸量和解吸率。洗脱流速为2 mL/min时洗脱效果最好,洗脱率可达63.87%。故洗脱流速选择2 mL/min。

2.4.2 响应面法优化试验设计

试验设计:在单因素试验结果的基础上,利用Design-Expert 8.0.6软件,以上样液质量浓度(因素A)、洗脱液体积分数(因素B)、洗脱液体积(因素C)为自变量,以纯度为响应指标,进行响应面分析。结果见表6和表7。

表6 响应面法优化纯化工艺试验因素与水平

水平	因素 A(mg/mL)	因素 B(%)	因素 C(BV)
-1	1.157 8	1.5	80
0	2.003 5	2.0	90
1	2.489 2	2.5	100

表7 响应面法优化纯化工艺试验设计与结果

序号	因素 A	因素 B	因素 C	纯度(%)	序号	因素 A	因素 B	因素 C	纯度(%)
1	1	0	-1	57.51	10	0	0	0	80.91
2	-1	0	1	56.58	11	-1	1	0	61.91
3	0	0	0	81.63	12	0	-1	-1	55.67
4	0	0	0	82.08	13	1	-1	0	60.23
5	-1	0	-1	47.58	14	0	1	1	62.12
6	0	-1	1	52.64	15	0	0	0	82.78
7	1	1	0	70.81	16	0	1	-1	66.34
8	1	0	1	58.71	17	-1	-1	0	59.98
9	0	0	0	78.28					

方差分析:通过软件对表7的试验数据进行回归拟合分析,得到纯度(Y)与各水平间的二次多项式方程 $Y = 81.14 + 2.65A + 4.08B + 0.37C + 2.16AB - 1.95AC - 0.30BC - 11.00A^2 - 6.90B^2 - 15.04C^2$ 。为解释回归方程的有效性和各因素对纯度的影响程度,对回归方程进行方差分析,结果见表8。可见,该回归模型是极显著的($P < 0.01$)。回归模型的决定系数(R^2)=0.972 4,校正决定系数(R_{adj}^2)=0.936 9, R_p^2 =0.640 5。失拟项($P = 0.640 5 > 0.05$)不显著,表明该回归模型与试验数据拟合程度高,误差小。故可用该模型分析红景天总黄酮的提纯效果。由表7可见,该模型中一次项因素A、因素B对该模型的影响显著($P < 0.05$),其中因素B为极显

著。二次项中 A^2, B^2, C^2 对模型的影响极显著($P < 0.01$);交互项AB, AC, BC无显著性。表明上样液质量浓度、洗脱液体积分数及洗脱液体积对蔷薇红景天总黄酮纯度的影响显著,但各因素间无影响。由响应面分析结果得各因素对总黄酮纯度的影响大小依次为因素B > 因素A > 因素C,即洗脱液体积分数 > 上样液质量浓度 > 洗脱液体积。

表8 优化纯化工艺回归方程分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	2 059.80	9	228.86	27.40	0.000 1**
A	56.23	1	56.23	6.73	0.035 7*
B	133.33	1	133.33	15.96	0.005 2**
C	1.08	1	1.08	0.13	0.728 8
AB	18.70	1	18.70	2.23	0.178 2
AC	15.21	1	15.21	1.82	0.219 2
BC	0.35	1	0.35	0.04	0.842 7
A^2	509.52	1	509.52	61.00	0.000 1**
B^2	200.63	1	200.63	24.02	0.001 8**
C^2	952.49	1	952.49	114.04	<0.000 1**
残差	58.46	7	8.35		
失拟项	46.41	3	15.47	5.13	0.073 9
绝对误差	12.04	4	3.01		
总和	2 118.27	16			

$$R^2 = 0.972\ 4, R_{adj}^2 = 0.936\ 9, R_p^2 = 0.640\ 5$$

响应面分析:由图4至图6可见,随上样液质量浓度和洗脱液体积分数的增加,总黄酮纯度先增加后减少,当洗脱液体积为90%、上样液质量浓度为2.003 5 mg/mL时,达到最大值;响应面的坡度较陡,等高线为椭圆形,表明上样液质量浓度与洗脱液体积分数交互作用较强,对总黄酮纯度的影响较大;总黄酮纯度随着上样液质量浓度和洗脱液浓度的增加先增加后减少,当上样液质量浓度为2.003 5 mg/mL、洗脱液体积为2 BV时,总黄酮纯度达到响应值最高点;响应面的坡度较陡,等高线为圆形,表明上样液质量浓度与洗脱液体积交互作用较弱,对总黄酮纯度的影响较小;当洗脱液体积分数为90%、洗脱液体积为2 BV时总黄酮纯度达到响应面最高点;响应面的坡度平缓,等高线为椭圆形,表明洗脱液体积分数与洗脱液体积交互作用较弱;故由响应面图可见,洗脱液体积分数(因素B)对纯度的影响最显著,其次是上样液质量浓度(因素A),影响较小的是洗脱液体积(因素C),与方差分析结果相符。

2.4.3 最佳条件预测及验证试验

通过Design-Expert 8.06软件进行数据分析得到的最佳纯化工艺为:上样质量浓度1.92 mg/mL,洗脱液体积分数89.99%、洗脱液体积2.16 BV,纯度理论值为81.99%。考虑实际情况,最后确定红景天总黄酮纯化工艺条件为:洗脱液体积2 BV,上样液质量浓度

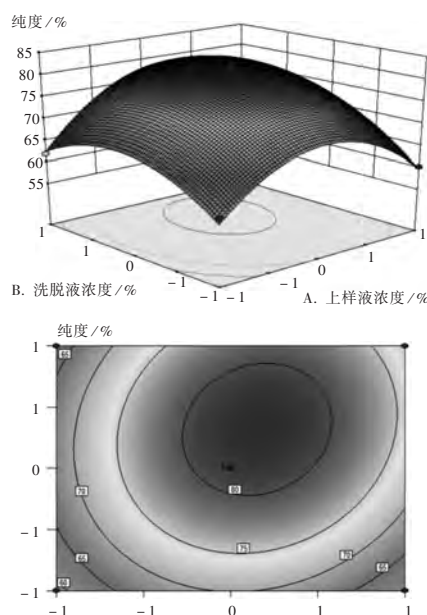


图4 洗脱液体积分数与上样液浓度对总黄酮纯度影响的响应曲面及等高线

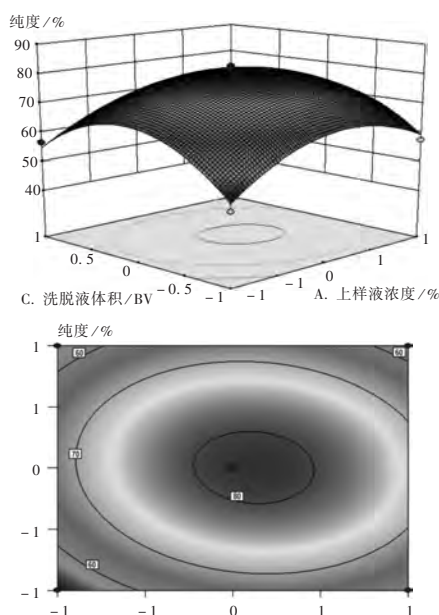


图5 洗脱液体积与上样液浓度对总黄酮纯度影响的响应曲面及等高线

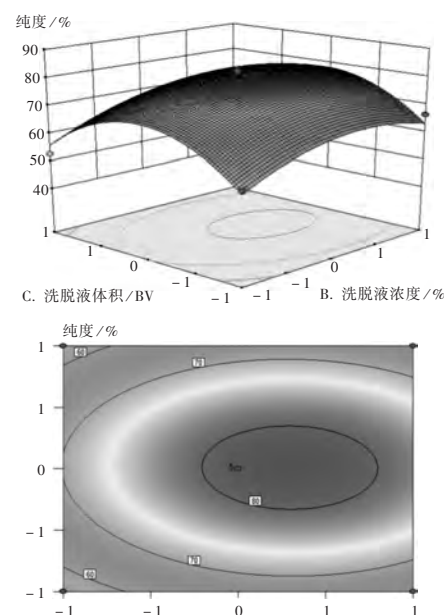


图6 洗脱液体积与洗脱液体积分数对总黄酮纯度影响的响应面及等高线

2.003 5 mg/mL, 洗脱液体积分数 90%。在此工艺条件下, 重复试验 3 次进行验证, 结果 3 批次红景天总黄酮纯度分别为 82.18%, 83.60%, 82.72%, 平均 82.83%, RSD 为 0.87 ($n=3$), 表明利用此方法纯化总黄酮有现实意义。

3 讨论

响应面法具有检测精确度高、可靠、试验所需次数少、能反映因素和预测值之间关系等优点, 因此近几年来, 其在中药提取及纯化中得到了广泛应用^[7-8]。

近 20 年来, 吸附性大孔树脂的快速发展使得其用途不断扩大, 主要应用于糖的精制、气体吸附、药理活性天然产物的分离和富集, 以及其他生物制品的纯化。使用大孔树脂的吸附过程由于其独特的吸附性能和其他优点而引起了关注^[9]。

本试验中用单因素试验对影响蔷薇红景天总黄酮提取物含量的乙醇体积分数、提取时间、物料比等因素进行了筛选, 发现其对蔷薇红景天总黄酮提取物含量具有显著影响。在此基础上, 再利用 Box - Behnken 的中心组合设计原理, 对蔷薇红景天总黄酮的提取工艺进行了优化, 得最优提取工艺条件为: 70% 乙醇, 提取 60 min, 物料比 1:40; 在此条件下, 蔷薇红景天总黄酮提取物中的平均含量为 56.97%, 与理论预测值相符。

建立一种高效的大孔树脂吸附对红景天提取物中总黄酮的分离纯化方法。对 6 种大孔树脂 (NKA-9, AB-8, D101, HPD100, HPD500, HPD600) 进行了比较和评价, HPD600 型在所测试的树脂中表现出最好的吸附容量和解吸率, 故选择 HPD600 型。通过单因素试验控制不同变量, 初步得出上样液质量浓度、上样液体积、洗脱液体积分数、洗脱液体积分数、pH、上样流速、洗脱流速的适宜范围, 通过响应曲面法优化, 最终得到最佳

纯化工艺为上样液质量浓度 2.003 5 mg/mL、洗脱液体积分数 90%, 洗脱液体积为 2 BV; 此条件下, 纯化后总黄酮平均纯度为 82.83%。通过响应曲面法优化红景天总黄酮提取及纯化工艺, 建立可靠的二次回归模型, 对于红景天总黄酮的提取、纯化有一定的参考意义。

参考文献:

- [1] 吕伟彤. 近十年红景天植物化学成分研究概况[J]. 化工设计通讯, 2018, 44(3): 249.
- [2] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 31.
- [3] 冯媛媛, 陈存. 红景天黄酮类化合物及药理活性研究进展[J]. 中药材, 2014, 37(4): 700-705.
- [4] JAKHAR R, PAUL S, PARK YR, et al. 3, 5, 7, 3', 4' - Pentamethoxyflavone, a quercetin derivative protects DNA from oxidative challenges: potential mechanism of action[J]. J Photochem Photobiol B Biol, 2014(131): 96-103.
- [5] 王萌萌, 谢典, 周育芳, 等. 山慈菇中总黄酮的提取工艺优化[J]. 中国药房, 2019, 30(14): 1949-1952.
- [6] 古丽斯坦·阿不来提, 周梦宇, 姚军. Box - Behnken 设计优化金雀花中总黄酮纯化工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(15): 1892-1898.
- [7] 康哲民. 基于响应面法的结构可靠性分析及应用[D]. 南宁: 广西科技大学, 2019.
- [8] 彭晓霞, 路莎莎. 响应面优化法在中药研究中的应用和发展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 296-299.
- [9] HOU MY, HU WZ, XIU ZL, et al. Efficient enrichment of total flavonoids from Pteris ensiformis Burm. extracts by macroporous adsorption resins and in vitro evaluation of antioxidant and antiproliferative activities[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 30: 1138.

(收稿日期: 2019-11-20)