

Box-Behnken 设计优化金雀花中总黄酮纯化工艺研究

古丽斯坦·阿不来提, 周梦宇, 姚军^{*}(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 研究大孔吸附树脂纯化金雀花中总黄酮的工艺条件。方法 以乌鲁木齐石人沟采集的金雀花为原料, 以超声提取的方法得到总黄酮粗提物, 对比 7 种大孔吸附树脂对金雀花中总黄酮的吸附-解吸效果, 采用 Box-Behnken 设计优化总黄酮纯化工艺, 以树脂的吸附率和解吸率为指标, 考察进样液浓度、进样体积、进样流速、洗脱液、洗脱体积、洗脱流速等因素对纯化效果的影响。结果 筛选得到 AB-8 型大孔吸附树脂为最适树脂, 并获得最佳吸附条件和解吸条件, 吸附条件: 进样浓度为 $1.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、进样体积为 2.8 BV、进样流速为 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 解吸条件: 洗脱液浓度为 70%、洗脱体积为 2.0 BV、洗脱流速为 $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在此条件下的总黄酮百分含量从 1.72% 提高到了 22.95%, 纯度升高了 13.3 倍。结论 本纯化工艺操作简便、可行, 为金雀花中总黄酮的进一步研究提供了实验依据。

关键词: 金雀花; 总黄酮; 大孔吸附树脂; 纯化工艺

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)15-1892-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.15.008

引用本文: 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.

Study on Purification Process of Total Flavonoids from *Caragana Altaica* by the Box-Behnken Design

GULISITAN Abulaiti, ZHOU Mengyu, YAO Jun^{*}(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the process condition of purification the total flavonoids from *Caragana altaica* by macroporous adsorption resin. **METHODS** The *Caragana altaica* which collected from Shirengou in Urumqi were used as raw materials to obtain the crude flavonoids by ultrasonic extraction. The adsorption and desorption effects of seven macroporous resin on the total flavonoids in *Caragana altaica* were compared and optimized by Box-Behnken design. The flavonoid purification process, based on the adsorption rate and desorption rate of the resin, investigated the effects of factors such as the concentration of injection solution, injection volume, injection flow rate, the eluent, elution volume and the elution flow rate on the purification effect. **RESULTS** The AB-8 macroporous adsorption resin was selected as the optimum resin, and the optimal adsorption conditions and desorption conditions were obtained. The adsorption conditions were as followings: the injection concentration was $1.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the injection volume was 2.8 BV. The sample flow rate was $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; desorption conditions: the eluent concentration was 70%, the elution volume was 2.0 BV, and the elution flow rate was $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The content under this condition increased from 1.72% to 22.95%, and the purity increased by 13.3 times. **CONCLUSION** The purification process is simple and feasible, and provides experimental basis for the further study of total flavonoids in *Caragana altaica*.

KEYWORDS: *Caragana altaica*; total flavonoids; macroporous adsorption resin; purification process

金雀花(*Caragana sinica*)又名金孔雀, 是阿尔泰锦鸡儿(*Caragana altaica* Kom. Pojark)的干燥成熟花。锦鸡儿属植物分布广泛, 全世界有 100 余种, 我国现已查明的锦鸡儿属植物有 66 种, 主要分布在我国新疆、甘肃、西藏、内蒙古、山西、陕西、四川、河北、宁夏、青海等地^[1]。锦鸡儿属植物在传统中药、藏药、蒙药民族药中被广泛使用^[2-5], 由于其药用部位多为根, 木质部心材, 茎和全草, 采药过程对野生锦鸡儿属植物造成了不

同程度的破坏, 随之而来的土地沙漠化和水土流失使生态环境进一步恶化, 这对我国西北地区的影响尤为严重。

目前, 黄酮类成分在抗炎、抗肿瘤、抗艾滋病、抗高血压与预防骨质疏松和心血管疾病等方面已取得一定的研究成果^[6-7]。本课题组前期以卡托普利为对照研究了总黄酮粗提物对肾性高血压的作用效果, 发现高剂量的粗提物有一定的降压效果, 但低剂量时效果不明显, 推测锦鸡儿属植

基金项目: 新疆地产中药民族药新药研发培育项目(2017-02-03)

作者简介: 古丽斯坦·阿不来提, 女, 硕士生 Tel: 13325532742
E-mail: 18999250641 E-mail: xydyaojun@163.com

E-mail: 897574176@qq.com *通信作者: 姚军, 男, 博士, 教授,

物的花也可能是其重要的药用部位。如果花与其他药用部位的药效一致或优于其他药用部位,那么可以将花作为锦鸡儿属植物的主要药用部位。这样,不仅能够减少对锦鸡儿属药用植物资源的破坏,而且可以避免过度开采带来的环境问题。因此,本实验在金雀花总黄酮提取工艺确定的基础上,通过筛选,应用 AB-8 型大孔吸附树脂纯化金雀花中总黄酮,并通过 Design-Expert 软件,采用 Box-Behnken 设计方法,探索最佳纯化工艺,为金雀花资源的综合利用和后期药理研究提供实验依据。

1 材料与仪器

金雀花采于新疆乌鲁木齐市石人沟蝴蝶谷,新疆医科大学药学院帕丽达·阿不力孜教授鉴定为豆科锦鸡儿属植物阿勒泰锦鸡儿 *Caragana altaica* Kom. Pojark 的干燥成熟花。芦丁对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:Y19N7S25244;纯度:98%);AB-8 型、D101 型大孔吸附树脂(天津市光复精细化工研究所);NKA-9 型、X-5 型大孔吸附树脂(上海摩速科学器材有限公司);NKA-2 型、DM-130 型、HPD-300 型大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司);无水乙醇、盐酸、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠等均为分析纯。

OSB-2100 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);T6-新世纪型紫外可见分光光度计(北京慧龙环科环境仪器有限公司);AB135-S 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TS-2102C 型恒温培养振荡仪器(上海天呈实验仪器制造有限公司);玻璃层析柱(30 mm×330 mm)。

2 方法

2.1 总黄酮的提取

按文献[8]所制定的工艺条件提取金雀花中的总黄酮,即称取 40.0 g 金雀花粉末,设定超声功率为 300 W,水浴温度控制在 60~65 °C,乙醇体积分数为 60%,料液比为 1:50,超声提取时间为 50 min,抽滤后减压,浓缩滤液,得粗提物,备用。

2.2 总黄酮的含量测定^[9]

2.2.1 标准曲线的绘制 称取干燥恒重的芦丁对照品 20.09 mg,用 70%乙醇定容至 100 mL 量瓶中,得到浓度 0.200 9 mg·mL⁻¹ 的芦丁对照品储备溶液。精密吸取系列对照品溶液分别置于量瓶中,

加入 5% NaNO₂ 溶液 0.40 mL,静置 6 min,再加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.40 mL,摇匀,静置 6 min,最后加入 5.00 mL 4% NaOH 溶液,用 70%乙醇溶液定容到 10 mL,摇匀,静置 10 min,在 510 nm 处测定吸光度。以芦丁对照溶液的浓度为横坐标(C)、吸光度为纵坐标(A)绘制标准曲线。得到回归方程为: $A=13.865C-0.002$ ($R^2=0.999\ 9$) 在浓度为 0.020 09~0.052 23 mg·mL⁻¹ 内线性良好。

2.2.2 粗提物的含量测定 将已提取好的滤液,取 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶中,按“2.2.1”项下方法测定吸光度,平行操作 3 次,计算总黄酮粗提物百分含量为(1.72±0.02)%,RSD=1.16%。

2.2.3 纯化后总黄酮含量测定 将已纯化收集的总黄酮浓缩干燥,取若干置于量瓶中,溶解,按“2.2.1”项下方法测定吸光度,计算总黄酮百分含量(计算见式 1)。

$$\text{百分含量}(\%) = \frac{C_x \times D \times 10^{-3}}{W} \times 100\% \quad (1)$$

其中: C_x 表示样品浓度(mg·mL⁻¹); D 表示稀释倍数(mL); W 表示称取的质量(g)。

2.3 大孔吸附树脂的预处理与再生^[10]

将 7 种不同型号的大孔树脂用无水乙醇浸泡 24 h,用二次蒸馏水淋洗至流出液无浑浊为止,再用 5%的盐酸浸泡 3~4 h,用水洗至中性,最后用 5%的氢氧化钠溶液浸泡 3~4 h,用水洗至中性备用。

将实验中使用过的树脂用无水乙醇洗脱至无色,再用 5%盐酸浸泡 3~4 h,用水洗至中性,最后用 5%的氢氧化钠浸泡 3~4 h,用水洗至中性,树脂获得再生。

2.4 大孔吸附树脂的吸附-解吸试验

2.4.1 树脂的静态吸附试验 准确称取经预处理好的 7 种干树脂 2.00 g,装入锥形瓶中,加入已知浓度的金雀花总黄酮粗提液 40 mL,在室温下振荡(每分钟 140 次)24 h,充分吸附后,取上层清液测定总黄酮的浓度,计算不同树脂的吸附量和吸附率。

$$Q_1 = \frac{(C_0 - C_1) \times V_1}{M} \quad (2)$$

$$E_1 = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (3)$$

其中, Q_1 表示树脂的吸附量(mg·g⁻¹); E_1 表示吸附率(%); C_0 表示初始浓度(mg·mL⁻¹); C_1 表示吸附液浓度(mg·mL⁻¹); V_1 表示初始体积(mL); M 表示树脂质量(g)。

2.4.2 树脂的静态解吸试验 取各吸附饱和的树脂, 加入无水乙醇 40 mL, 在室温下振荡(每分钟 140 次)24 h, 充分解吸附后, 取上层清液测定总黄酮的浓度, 计算不同树脂的解吸量和解吸率:

$$Q_2 = \frac{C_2 \times V_2}{M} \quad (4)$$

$$E_2 = \frac{C_2 \times V_2}{Q_1 \times M} \times 100\% \quad (5)$$

其中: Q_2 表示树脂的解吸量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); E_2 表示解吸率(%); C_2 表示解吸液浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); V_2 表示解吸液体积(mL); M 表示树脂质量(g)。

2.5 吸附条件的筛选

2.5.1 进样液浓度的选择 将经过预处理的 40 g AB-8 大孔树脂进行湿法装柱($30 \text{ mm} \times 330 \text{ mm}$), 先用二次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。选择不同浓度的粗提物(浓度为 0.265 7, 0.525 5, 0.945 6, 1.340 1, 1.599 0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按 2 BV 柱床体积, 以 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速进行进样, 收集流出液, 测吸光度, 按式 2 和式 3 计算树脂吸附量和吸附率, 绘制曲线。

2.5.2 进样流速的选择 将经过预处理的 40 g AB-8 大孔树脂进行湿法装柱($30 \text{ mm} \times 330 \text{ mm}$), 确保树脂被冲洗干净且无气泡, 将浓度为 0.870 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 体积为 2 BV 的总黄酮粗提液, 以不同流速(流速为 1, 2, 3, 4, 5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)进行进样, 收集流出液, 测吸光度, 按式 2 和式 3 计算树脂吸附量和吸附率, 绘制曲线。

2.5.3 进样体积的选择 将经过预处理的 40 g AB-8 大孔树脂进行湿法装柱($30 \text{ mm} \times 330 \text{ mm}$), 将浓度为 0.911 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的总黄酮粗提液, 选择不同体积(体积为 1, 2, 3, 4, 5, 6 BV), 以 3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速进行进样, 收集流出液, 测吸光度, 按式 2 和式 3 计算树脂吸附量和吸附率, 绘制曲线。

2.6 洗脱条件的筛选

2.6.1 洗脱液的选择 取 AB-8 饱和树脂 2.00 g, 分别用体积分数为 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 的乙醇 40 mL, 在室温下振荡($140 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$)24 h, 充分解吸附后, 取上层清液测定总黄酮浓度, 按式 5 计算树脂解吸率, 绘制曲线。

2.6.2 洗脱体积的选择 将经过预处理的 AB-8 大孔树脂装到层析柱内, 将浓度为 0.931 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的总黄酮粗提液, 以 2 BV 的柱床体积、3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速进样, 进行树脂吸附, 再分别用 70% 的乙

醇溶液以 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 BV 的柱床体积, 3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速进行洗脱, 收集洗脱液, 测吸光度, 按式 5 计算树脂解吸率, 绘制曲线。

2.6.3 洗脱流速的选择 将经过预处理的 AB-8 大孔树脂装到层析柱内, 将浓度为 0.897 8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的总黄酮粗提液, 以 2 BV 的柱床体积、3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速进样, 进行树脂吸附, 再分别用 2 BV 柱床体积的 70% 乙醇溶液, 以不同流速(流速为 1, 2, 3, 4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)进行洗脱, 收集洗脱液, 测吸光度, 按式 5 计算树脂解吸率, 绘制曲线。

2.7 Box-Behnken 响应面试验优化

在单因素考察结果的基础上, 采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 Box-Behnken 响应面试验设计, 以树脂的吸附率和解吸率为响应值, 设计 3 因素 3 水平试验方案, 对纯化工艺进行优化, 见表 1。

表 1 吸附和解吸试验自变量因素与水平

Tab.1 Factors and levels of independent variables in adsorption and desorption tests

因素		水平		
		-1	0	1
吸附	A 进样液浓度/mg·mL ⁻¹	0.5	0.9	1.3
	B 进样体积/BV	2.0	3.0	4.0
	C 进样流速/mL·min ⁻¹	2.0	3.0	4.0
解吸	A 乙醇体积分数/%	60	70	80
	B 洗脱体积/BV	1.5	2.0	2.5
	C 洗脱流速/mL·min ⁻¹	2.0	3.0	4.0

3 结果与分析

3.1 大孔吸附树脂类型的确定

根据静态吸附、解吸试验, 计算不同树脂的吸附量、吸附率与解吸量解吸率, 见表 2, AB-8 型树脂对金雀花总黄酮的吸附量、吸附率、解吸率均较其余 6 种大。因此考虑用 AB-8 型大孔吸附树脂为理想树脂。

表 2 7 种树脂的性质、吸附量、吸附率及解吸率

Tab. 2 Properties, adsorption capacity, adsorption rate and desorption rate of the 7 resins

树脂型号	极性	吸附量 $Q_1/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	吸附率 $E_1/\%$	解吸量 $Q_2/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	解吸率 $E_2/\%$
D101	非极性	0.614	58.7	0.322	52.4
NKA-9	极性	0.618	59.1	0.382	61.8
AB-8	弱极性	0.646	61.7	0.492	76.2
DM-130	弱极性	0.594	56.7	0.398	66.9
X-5	非极性	0.622	59.5	0.425	68.3
HPD-300	非极性	0.626	59.7	0.436	69.7
NKA-II	极性	0.568	54.2	0.375	66.1

3.2 吸附条件的确定

由图 1 可知,随着浓度的升高,吸附率逐渐上升。当浓度为 $0.945\ 6\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1.340\ 1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时吸附率趋于平稳,浓度为 $1.599\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时稍微下降。因此最佳上样浓度可选 $1.0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (与吸附量的影响趋势一致)。

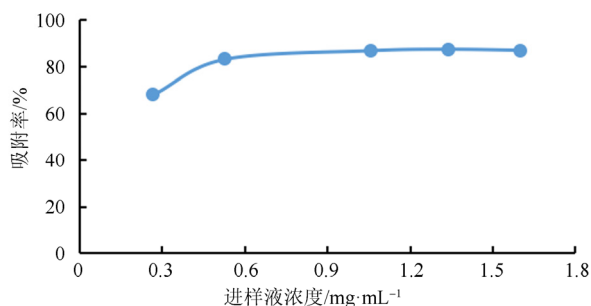


图 1 进样液浓度对吸附率的影响

Fig. 1 Effect of injection concentration on adsorption rate

由图 2~3 可知,随着进样体积的增加吸附率随之降低,但吸附量先上升后下降,当进样体积为 3 BV 时吸附率较高而吸附量最高,可能是当进样体积少时树脂的吸附能力强,而体积增加到一定量时树脂达到饱和状态,多余的量无法吸附所导致的。因此选择 3 BV 为最佳进样体积。

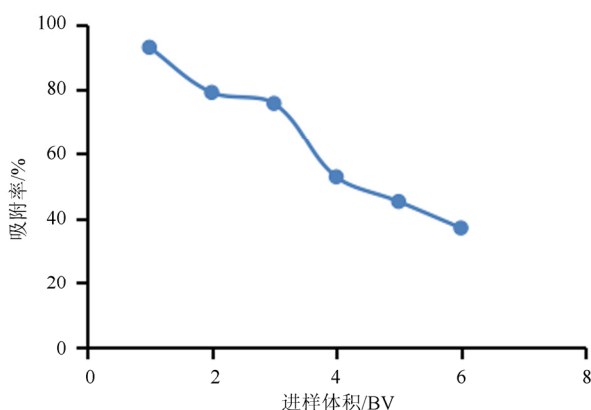


图 2 进样体积对吸附率的影响

Fig. 2 Effect of injection volume on adsorption rate

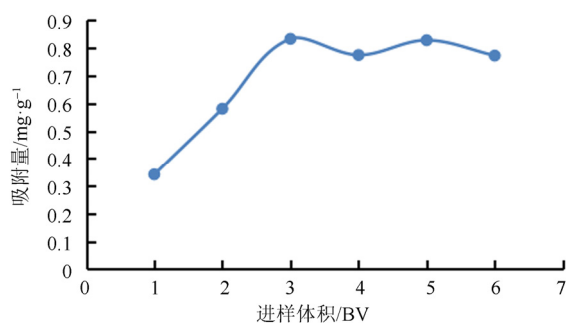


图 3 进样体积对吸附量的影响

Fig. 3 Effect of injection volume on adsorption capacity

由图 4 可知,随着流速的加快,吸附率先上升,后下降,当进样流速为 $3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时吸附率最高。因此最佳进样流速为 $3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (与吸附量的影响趋势一致)。

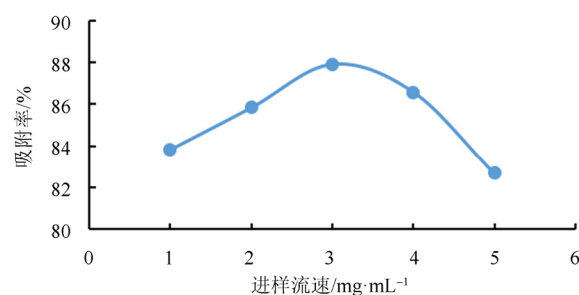


图 4 进样流速对吸附率的影响

Fig. 4 Effect of injection flow rate on adsorption rate

3.3 解吸条件的确定

由图 5 可知,乙醇体积分数为 70%和 100%时洗脱效果最好,与无水乙醇相比,70%乙醇的洗脱效果更好。因此,选 70%乙醇作为最佳洗脱剂。

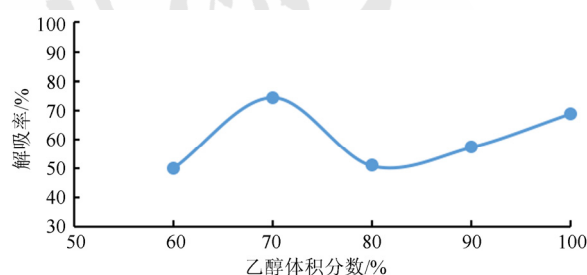


图 5 乙醇体积分数对解吸率的影响

Fig. 5 Effect of ethanol volume fraction on desorption rate

由图 6 可知,随着洗脱液体积的增加,解吸率逐渐上升,当柱床体积为 2 BV 时逐渐趋于平缓。因此,选 2 BV 为最佳洗脱体积。

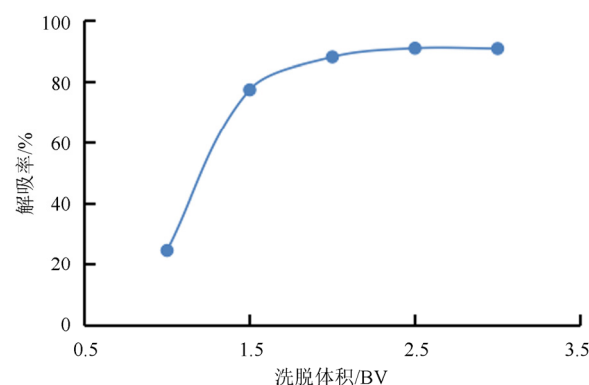


图 6 洗脱体积对解吸率的影响

Fig. 6 Effect of elution volume on desorption rate

由图 7 可知,洗脱流速越快,解吸率反而越差,但洗脱流速很慢时不利于大量纯化,前 3 min

的解吸率相差较小, 综合考虑, 选 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 作为最佳流速。

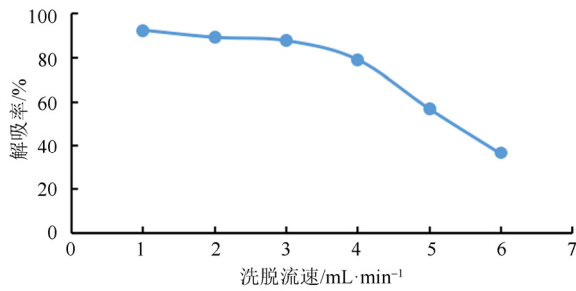


图7 洗脱流速对解吸率的影响
Fig. 7 Effect of elution flow rate on desorption rate

3.4 响应面试验结果及分析

在单因素试验结果的基础上, 利用 Design-Expert 8.0.6 软件, 以吸附率和解吸率作为响应指标, 得到响应面分析方案与结果。见表 3~4。

通过软件对表 3 和表 4 中的试验数据进行回归拟合分析, 可得到吸附率(R_1)和解吸率(R_2)与各因素水平间的二次多项式方程: $R_1=90.64+3.93A-2.04B-3.46C+2.37AB-2.77AC+1.40BC-4.10A^2-3.17B^2-4.77C^2$; $R_2=90.72+1.74A+2.28B+0.34C+1.57AB-0.05AC-1.17BC-9.86A^2-5.79B^2-4.96C^2$ 。

表3 吸附条件的响应面试验设计与结果
Tab. 3 Response surface test design and results of adsorption conditions

编号	A 进样液浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	B 进样体积/ BV	C 进样流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	E_1 吸附率/ %
1	1	0	1	80.0
2	0	1	1	77.7
3	1	1	0	88.0
4	1	0	-1	91.0
5	0	0	0	90.2
6	-1	-1	0	83.5
7	-1	0	1	78.1
8	0	0	0	90.5
9	0	1	-1	83.3
10	1	-1	0	87.0
11	0	0	0	91.2
12	0	-1	-1	90.5
13	-1	0	-1	78.0
14	-1	1	0	75.0
15	0	0	0	90.0
16	0	0	0	91.3
17	0	-1	1	79.3

表4 解吸条件的响应面试验设计与结果
Tab. 4 Response surface test design and results of desorption conditions

编号	A 乙醇洗脱 浓度/%	B 洗脱体积/ BV	C 洗脱流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	E_2 解吸率/ %
1	0	0	0	91.8
2	0	1	-1	82.3
3	-1	0	1	75.1
4	-1	0	-1	73.6
5	0	0	0	89.6
6	1	0	-1	76.8
7	1	1	0	82.0
8	0	0	0	90.8
9	0	1	1	79.9
10	1	0	1	78.1
11	1	-1	0	72.0
12	0	0	0	91.0
13	0	-1	-1	77.7
14	-1	-1	0	71.3
15	0	-1	1	80.0
16	0	0	0	90.4
17	-1	1	0	75.0

为了解释回归方程的有效性和各因素对吸附率和洗脱率的影响程度, 对回归方程进一步方差分析, 结果见表 5~6。

表5 吸附率模型回归方差分析
Tab. 5 Regression variance analysis of adsorption rate model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	545.94	9	60.66	67.89	<0.000 1
A	123.25	1	123.25	137.94	<0.000 1
B	33.21	1	33.21	37.17	0.000 5
C	95.91	1	95.91	107.34	<0.000 1
AB	22.56	1	22.56	25.25	0.001 5
AC	30.8	1	30.8	34.47	0.000 6
BC	7.84	1	7.84	8.77	0.021
A^2	70.61	1	70.61	79.02	<0.000 1
B^2	42.31	1	42.31	47.35	0.000 2
C^2	95.8	1	95.8	107.22	<0.000 1
残差	6.25	7	0.89		
失拟项	4.88	3	1.63	4.74	0.083 3
绝对误差	1.37	4	0.34		
总和	552.19	16			
$R^2_{\text{Adj}}=0.854 6 \quad R^2=0.974 1$					

表 6 解吸率模型回归方差分析

Tab. 6 Regression variance analysis of desorption rate model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	802.97	9	89.22	43.01	<0.000 1
A	24.15	1	24.15	11.64	0.011 3
B	41.41	1	41.41	19.96	0.002 9
C	0.91	1	0.91	0.44	0.528 7
AB	9.92	1	9.92	4.78	0.065
AC	0.01	1	0.01	4.82×10^{-3}	0.946 6
BC	5.52	1	5.52	2.66	0.146 8
A ²	409.35	1	409.35	197.34	<0.000 1
B ²	140.91	1	140.91	67.93	<0.000 1
C ²	103.59	1	103.59	49.94	0.000 2
残差	14.52	7	2.07		
失拟项	11.91	3	3.97	6.09	0.056 7
绝对误差	2.61	4	0.65		
总和	817.49	16			

$R^2_{Adj}=0.761\ 9\ R^2=0.959\ 4$

由表 5 可以看出, 各因素对吸附率的影响顺序依次: B(进样体积)<C(进样流速)<A(进样液浓度)。模型回归分析结果显示, 一次项、二次项、交互项中对大孔吸附树脂吸附金雀花中总黄酮影响除了 BC 是显著($P<0.05$)外其余都达到极为显著

水平($P<0.01$)。吸附模型极显著($P<0.01$), 失拟项 $P=0.083\ 3>0.05$ 不显著, 说明试验设计拟合度良好, 误差小; 同时校正决定系数 $R^2=0.974\ 1$, 说明试验可靠性较好, 因此此模型可用于分析和预测大孔吸附树脂吸附金雀花总黄酮的能力。

从表 6 可以看出, 解吸模型水平极其显著($P<0.01$), 失拟项 $P=0.056\ 7>0.05$, 影响不显著, 说明各因素之间拟合度达到良好水平, 设计可靠; 同时从校正系数 $R^2=0.959\ 4$ 可以看出, 试验的可靠性较好, 也表明该模型可以正确分析和预测影响大孔吸附树脂解吸能力的各因素与解吸率之间的关系。模型一次项中 B 对解吸率影响达到极显著($P<0.01$), A 的影响为显著($P<0.05$), 二次项中各因素对解吸率的影响都达到极显著($P<0.01$), 交互项为都不显著($P>0.05$)。各因素对解吸率的影响次序为: C(洗脱流速)<A(乙醇体积分数)<B(洗脱体积)。

为更直观地反映各因素对响应值的影响, 绘制了各因素交互作用的等值线与三维曲面图, 结果见图 8~9。由图显示各因素对响应值影响程度从大到小时响应曲面陡峭程度下降, 等值线性状逐渐接近圆形。

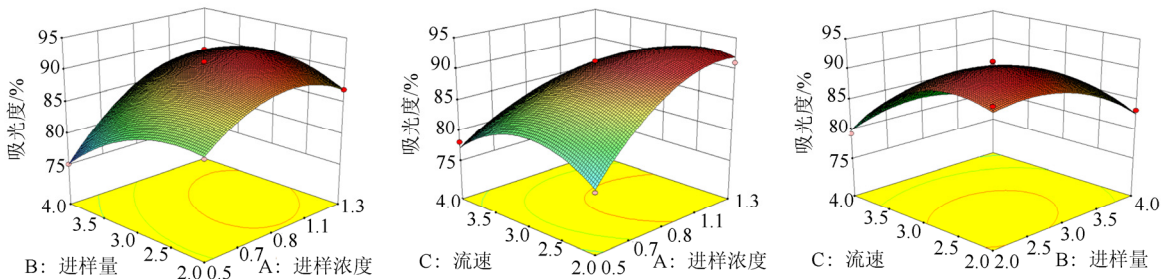


图 8 吸附条件各因素交互作用的响应面等值线及曲面图

Fig. 8 Response surface isolines and surfaces of the interaction of various factors under adsorption conditions

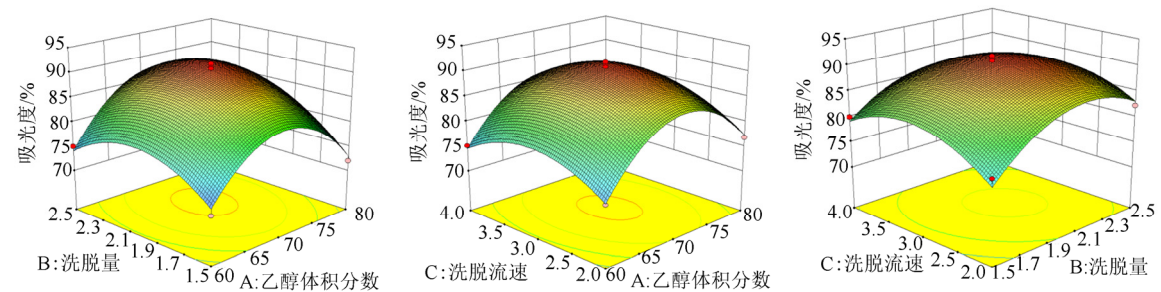


图 9 解吸条件各因素交互作用的响应面等值线及曲面图

Fig. 9 Response surface isolines and surfaces of the interaction of various factors in desorption conditions

通过软件 Design-Expert 8.0.6 分析计算得出最佳进样条件为：进样浓度为 $1.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、进样体积为 2.78 BV、进样流速为 $2.43 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，在此条件下的最大理论吸附率为 93.05%；考虑实际操作可行性可将进样体积调为 2.8 BV、进样流速改为 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；在此条件下进行验证试验，平行 3 次，平均值为 $(92.78 \pm 0.27)\%$ ， $\text{RSD}=0.29\%$ 。最佳解吸条件为：洗脱液浓度为 71.05%、洗脱体积为 2.11 BV、洗脱流速为 $3.01 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，在此条件下的理论解吸率 91.05%；为操作方便将乙醇体积分数改为 70%、洗脱体积修改为 2 BV、洗脱流速为 $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；利用优化条件进行验证试验，平行 3 次，平均值为 $(90.95 \pm 0.13)\%$ ， $\text{RSD}=0.14\%$ 。吸附率与解吸率的理论值与实际值相差不大，因此，通过该回归分析优化得到的树脂吸附和解吸参数有效、可靠。

在此优化的吸附解吸条件下进行纯化后测得的总黄酮百分含量为 22.95%，测得的粗提物百分含量为 1.72%，通过优化纯化条件将金雀花总黄酮含量提高了 13.3 倍。

4 讨论

响应面法考虑了试验随机误差，计算比较简便，是解决实际问题的有效手段；与正交试验相比，响应面法在实验条件寻优过程中，可以连续地对试验的各个水平进行分析，结果精准、可靠，而正交实验只能对一个个孤立的实验点进行分析，数据可靠性较低。

大孔吸附树脂之所以能得到广泛应用，主要是它能解决其他常用吸附剂难以解决的问题，具有吸附容量大、吸附速度快、易解吸、易再生等优点；它对有机物选择性好，不受无机盐类及其他强离子、低分子存在的影响；它的品种多，不同品种可吸附多种有机化合物。

根据树脂的吸附性能和被吸附物质的性质，本实验选用了 AB-8、NKA-9、NKA-2、DM130、D101、X-5、DHP300 等 7 种不同型号的大孔吸附

树脂，通过比较其吸附-解吸效果，确定了 AB-8 型大孔吸附树脂为最适树脂，通过单因素试验考察了进样液浓度、进样流速、进样体积、洗脱液浓度、洗脱体积、洗脱流速对金雀花中总黄酮吸附率和解吸率的影响，应用响应面法优化吸附和解吸参数，获得最佳工艺条件得到了最佳工艺条件：进样浓度为 $1.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、进样体积为 2.8 BV、进样流速为 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；洗脱液浓度为 70%、洗脱体积为 2.0 BV、洗脱流速为 $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。该纯化工艺操作简便，可靠，很大程度上提高了金雀花中总黄酮的含量。适用于金雀花中总黄酮的初步纯化，为金雀花中总黄酮的进一步研究提供物质基础。

REFERENCES

- [1] NIU X W. The distribution and description of *Caragana* Fabr. in China [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*(西北植物学报), 1999, (5): 107-133.
- [2] 江纪武. 药用植物辞典[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2005: 139-1141.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 藏药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 90, 320.
- [4] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 131-132.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 蒙药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 79, 95.
- [6] JAKHAR R, PAUL S, PARK Y R, 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.
- [7] YANG N, JIA X B, ZHANG Z H, et al. Advance in studies on anti-cancer activity and mechanism of flavonoids [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2015, 40(03): 373-381.
- [8] GULISITAN A, DILIMULATI M, YAO J. Ultrasonic extraction process, antioxidant activity and chemical constituents of total flavonoids from flowers and leaves of *caragana altaica* [J]. *J Xinjiang Med Univ*(新疆医科大学学报), 2018, (1): 92-96, 101.
- [9] 中国药典. 一部[S]. 2015: 396-397.
- [10] 周光姣, 周亚球. 浅析大孔吸附树脂[J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(4): 589-590.

收稿日期: 2018-11-11

(本文责编: 曹粤锋)