

正交试验优选九龙藤总黄酮纯化工艺

孙瑶¹, 李春风², 林炜鑫¹, 简洁^{1*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541004)

[摘要] **目的:** 优选 D101 型大孔树脂纯化九龙藤总黄酮的工艺条件, 为该成分的工业制剂开发提供参考。 **方法:** 以总黄酮纯度及回收率为评价指标, 在单因素试验基础上, 采用正交试验考察上样液质量浓度、洗脱剂浓度、洗脱速度及上样液 pH 对九龙藤总黄酮大孔树脂纯化工艺的影响。采用 UV 测定黄芩苷含量, 检测波长 278.5 nm。 **结果:** 最佳纯化工艺为上样液质量浓度 15.5 g·L⁻¹, 上样液 pH 2~3, 最大上样量 16.85 mg·g⁻¹, 上样速度 0.125 BV·h⁻¹, 径高比 1:6, 加 60% 乙醇 4 BV 以 1 BV·h⁻¹ 洗脱。总黄酮纯度 48.95%, 回收率 96.08%。 **结论:** 优选的纯化工艺稳定可行, 有效提高了九龙藤总黄酮纯度及回收率, 适用于九龙藤总黄酮的纯化。

[关键词] 九龙藤; 总黄酮; D101 型大孔树脂; 黄芩苷

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1; R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0029-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014220029

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.0954.007.html>

[网络出版时间] 2014-10-10 9:54

Orthogonal Design for Optimizing Purification Process of Total Flavonoids from *Bauhinia championii*

SUN Yao¹, LI Chun-feng², LIN Wei-xin¹, JIAN Jie^{1*}

(1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification process of total flavonoids from *Bauhinia championii* by D101 macroporous resin and provide a reference for preparations development of these components. **Method:** With purity and recovery of total flavonoids as indexes, based on single factor tests, orthogonal design was used to optimize purification process by taking eluent concentration, elution rate, pH and concentration of sample solution as factors. UV was employed to determine the content of baicalin with detection wavelength at 278.5 nm. **Result:** Optimal purification process was as following: the concentration of sample solution 15.5 g·L⁻¹, pH of sample solution 2-3, the maximum sample volume of 16.85 mg·g⁻¹, sampling rate of 0.125 BV·h⁻¹, diameter and height ratio of 1:6, eluted by 4 BV of 60% ethanol with elution speed of 1 BV·h⁻¹. Under this process, purity and recovery were 48.95% and 96.08%, respectively. **Conclusion:** This optimized purification process is stable, feasible and suitable for purifying total flavonoids from *B. championii*, which can effectively improve its purity and recovery.

[Key words] *Bauhinia championii*; total flavonoids; D101 macroporous resin; baicalin

九龙藤为广西特色药材, 别名过岗龙、过江龙 等, 富含黄酮类成分^[1-2], 具有镇痛消炎、抗感染、抗

[收稿日期] 20140528(002)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053148)

[第一作者] 孙瑶, 硕士, 从事天然药物成分分离及心血管药理研究, Tel:18377332520, E-mail:350911315@qq.com

[通讯作者] *简洁, 博士, 教授, 从事天然药物成分分离及心血管药理研究, Tel:0773-2295141, E-mail:jianjielucky@yahoo.com.cn

血小板聚集等药理活性^[3],说明有效分离、纯化黄酮类活性成分对九龙藤的开发利用具有重要意义。徐伟等^[4]采用 AB-8 型大孔树脂纯化九龙藤总黄酮,但总黄酮纯度仅 5.25%,不利于进一步的活性研究。为有效提高总黄酮纯度,在前期研究基础上^[5],本实验选用 D101 型大孔树脂,以总黄酮纯度及回收率为评价指标,采用正交试验优化九龙藤总黄酮的纯化条件,为九龙藤资源的充分利用提供参考。

1 材料

UV2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司)。九龙藤饮片购自柳州市神农中药饮片厂,批号 20110320,经桂林市药检所吴潇副主任药师鉴定豆科植物龙须藤 *Bauhinia championii* 的藤茎;九龙藤总黄酮粗品(自制^[5]),黄芩苷对照品(纯度 $\geq 98\%$,成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-11101403),D101 型大孔树脂(国药集团化学试剂有限公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 九龙藤总黄酮的含量测定

2.1.1 对照品的选择 采用 TLC 初步鉴定九龙藤总黄酮,展开剂为三氯甲烷-甲醇-甲烷(6:2:0.15),结果显示九龙藤总黄酮中包含黄芩苷成分,故选择黄芩苷作为总黄酮含量测定的指标成分。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取黄芩苷对照品适量,加甲醇制成 4.65,9.3,13.95,18.6,23.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,以甲醇作空白对照,于 278.5 nm 处测定吸光度(A)^[5],以质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 64.988C + 0.019$ ($r = 0.9998$)。

2.1.3 供试品溶液的制备和测定 精密称取九龙藤总黄酮粗品 10 mg,加水配制 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,按 2.1.2 项下方法检测,代入回归方程计算总黄酮含量。

2.2 动态-静态吸附试验

2.2.1 大孔树脂预处理与装柱 参考文献[6]的方法处理 D101 型大孔树脂。

2.2.2 静态吸附动力学曲线的测定^[7] 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时,取 D101 型大孔树脂用量 2 g,湿法装柱,加入总黄酮质量浓度 15.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液 25 mL,以树脂与母液接触时为 0 时刻,每隔一定时间取样 0.5 mL,测定流出液中总黄酮含量,计算树脂的吸附量,以吸附时间为横坐标,吸附率为纵坐标,绘制静态吸附速率曲线,见图 1。结果显示最初吸附量随吸附时间

的增加,至 8 h 后吸附量基本接近,故确定吸附时间 8 h,上样速度 0.125 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

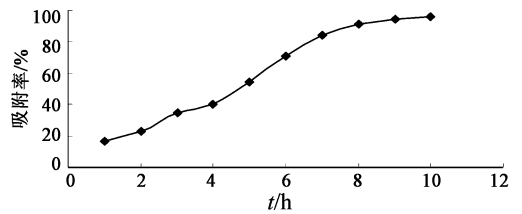


图 1 D101 型大孔树脂对九龙藤总黄酮的静态吸附速率曲线

2.2.3 动态泄漏曲线绘制 称取湿树脂 23 g 装柱(1.5 cm \times 30 cm),精密吸取 15.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 上样液 60 mL 上柱,控制流速 0.1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (相当于 0.125 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$),定量收集流出液,按 2.1.2 项下方法测定样品液和洗脱液中总黄酮含量,以上样量为横坐标,总黄酮质量浓度为纵坐标,绘制泄漏曲线,见图 2。结果发现上样液从第 25 mL 时开始明显泄漏,当上样量为 30 mL 时,D101 型树脂已达吸附饱和,为避免总黄酮的泄漏损失,控制上样液不超过 25 mL,即湿树脂 1 g 最多吸附总黄酮 16.85 mg。

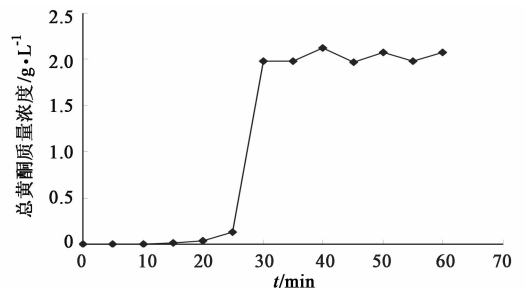


图 2 九龙藤总黄酮通过 D101 型大孔树脂的泄露曲线

2.3 单因素试验考察

2.3.1 洗脱剂浓度 取 D101 型湿树脂 23 g 及 15.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上样液 20 mL 各 4 份,按确定的吸附条件上样,分别用 H_2O_2 及 20%,40%,60%,80% 的乙醇溶液各 200 mL 洗脱,流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,收集洗脱液,浓缩,真空干燥,按 $C_1V_1/m \times 100\%$ 计算总黄酮纯度分别为 31.59%,44.43%,48.75%,34.94%,按 $C_1V_1/C_0V_0 \times 100\%$ 计算回收率依次为 33.15%,72.33%,97.34%,97.15%,式中 C_0 为上样液中总黄酮质量浓度, V_0 为上样液体积, C_1 为洗脱液中总黄酮质量浓度, V_1 为洗脱液体积, m 为纯化后总黄酮干物质质量,故确定选择 60% 乙醇为洗脱溶剂。

2.3.2 径高比 取 D101 型湿树脂 23 g,共 5 份,分别装于径高比 1:2,1:4,1:6,1:8,1:10 的树脂柱中,

加 60% 乙醇洗脱,其他条件同 2.3.1 项,计算总黄酮纯度分别为 39.62%, 43.32%, 48.07%, 46.22%, 43.94%, 回收率依次为 84.13%, 89.52%, 98.16%, 96.20%, 95.40%, 结果表明随着径高比的增加,总黄酮纯度及回收率增加,至径高比 1:6 时达峰值,故确定径高比 1:6。

2.3.3 洗脱流速 取 D101 型湿树脂 23 g,共 4 份,装于径高比 1:6 的树脂柱中,分别加 60% 乙醇以 0.5,1,3,5 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速洗脱,其他条件同 2.3.1 项,计算总黄酮纯度分别为 42.82%, 47.66%, 39.33%, 33.16%, 回收率依次为 89.41%, 97.34%, 94.93%, 67.68%, 故确定洗脱流速 1 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.3.4 上样液 pH 取 D101 型湿树脂 23 g,共 5 份,取 pH 1~2, 2~3, 3~4, 5~6, 7~8 的样品溶液过柱,按确定的条件洗脱,计算总黄酮纯度分别为 38.65%, 45.04%, 47.11%, 35.20%, 33.60%, 回收率依次为 85.83%, 94.35%, 94.73%, 71.10%, 68.74%, 结果表明当 $\text{pH} > 5$ 时, D101 型大孔树脂对九龙藤总黄酮的富集能力差,致大量黄酮流失,确定上样液 pH 3~4。

2.3.5 上样液质量浓度 取 7.75, 15.5, 31, 62, 77.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上样液,按确定的工艺条件洗脱,计算总黄酮纯度分别为 38.13%, 47.91%, 30.64%, 29.74%, 30.17%, 回收率依次为 90.25%, 99.85%, 97.74%, 92.23%, 73.92%, 故确定上样液中总黄酮质量浓度 15.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.6 洗脱剂用量 按确定的工艺条件吸附,加水 200 mL 除杂质,分别加 60% 乙醇 1, 2, 3, 4, 5, 6 BV 洗脱,计算总黄酮洗出量依次为 4.80, 12.51, 119.38, 150.47, 11.36, 0.49 mg, 结果发现加 60% 乙醇 4 BV 洗脱时,总黄酮洗脱总量约 95%, 故确定洗脱剂用量 4 BV。

2.4 正交试验设计 在单因素试验基础上,以总黄酮纯度及回收率为评价指标,选择上样液质量浓度、洗脱剂浓度、洗脱速度及上样液 pH 为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验^[8] 优选九龙藤总黄酮纯化工艺,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

由直观分析可知,以总黄酮纯度为指标时,各因素对纯化工艺的影响顺序为 $A > B > D > C$; 以极差最小的 C 因素为误差项进行方差分析,结果显示各因素均无显著性影响,选择最佳纯化工艺 $A_2B_2C_1D_2$ 。以回收率为指标时,各因素对纯化工艺的影响顺序为 $A > C > B > D$; 以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果显示因素 A 具有显著

表 1 九龙藤总黄酮纯化工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D 洗脱	总黄酮/%	
	上样液 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	上样液 pH	洗脱剂 /%	速度 / $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$	纯度	回收率
1	10.33	1~2	50	0.5	40.67	70.37
2	10.33	2~3	60	1.0	46.71	77.14
3	10.33	3~4	70	2.0	36.35	85.79
4	15.50	1~2	60	2.0	48.69	91.09
5	15.50	2~3	70	0.5	50.72	94.97
6	15.50	3~4	50	1.0	48.07	92.67
7	23.25	1~2	70	1.0	43.32	98.62
8	23.25	2~3	50	2.0	47.45	80.37
9	23.25	3~4	60	0.5	40.05	95.67
纯度	K_1	123.73	132.68	136.19	131.44	
	K_2	147.48	144.88	135.45	138.10	
	K_3	130.82	124.47	130.39	132.49	
	R	23.75	20.41	5.06	5.61	
回收率	K_1	282.73	274.13	279.38	268.43	
	K_2	274.65	264.08	267.90	261.24	
	K_3	233.30	252.47	243.40	261.01	
	R	49.43	21.66	35.98	7.42	

表 2 纯化工艺方差分析

指标	方差来源	SS	MS	F	P
纯度	A	99.098	49.549	14.917	>0.05
	B	70.312	35.156	10.584	>0.05
	C(误差)	6.643	3.322		
	D	8.548	4.274	1.287	>0.05
回收率	A	421.233	210.617	19.523	<0.05
	B	80.432	40.216	3.728	>0.05
	C	217.035	108.517	10.059	>0.05
	D(误差)	21.576	10.788		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

性影响,其他因素则无显著性影响,选择最佳纯化工艺 $A_2B_1C_1D_1$ 。综合考虑,最终确定选择纯化方案 $A_2B_2C_2D_2$,即上样液质量浓度 15.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,上样液 pH 2~3(原液 pH 3~4),上样量 $< 16.85 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,上样速度 0.125 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$,径高比 1:6,加 60% 乙醇 4 BV 以 1 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 洗脱。

2.5 验证试验 精密取总黄酮质量浓度 15.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上样液 20 mL,共 3 份,按最佳纯化工艺操作,计算总黄酮纯度分别为 49.92%, 47.45%, 49.49%, 回收率依次为 95.33%, 95.06%, 97.86%, 表明优选的纯化工艺稳定可行。

3 讨论

九龙藤总黄酮样品与黄芩苷对照品在相同比移值处均出现斑点,揭示九龙藤总黄酮中含有黄芩苷成分,故本文选择黄芩苷作为指标成分测定九龙藤总黄酮含量。前期试验^[5]对 D101, AB-8 这两种型号大孔吸附树脂进行筛选,确定选择 D101 型大孔树脂为分离材料并初步探究其工艺参数。本文采用单因素试验^[9-11]筛选影响九龙藤总黄酮纯化效率的主要因素,通过正交试验优化纯化条件,有效提高了九龙藤总黄酮的纯度及回收率,为该成分的工业化生产及后期相关作用机制研究提供实验依据。

[参考文献]

[1] 白海云,詹庆丰,夏增华,等. 九龙藤化学成分研究(I)[J]. 中国中药杂志,2005,30(1):42.
[2] 白海云,詹庆丰,夏增华,等. 九龙藤化学成分研究(II)[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(4):312.
[3] 张玉琴,徐伟,李煌,等. 龙须藤研究进展[J]. 亚太传统医药,2012,8(8):207.
[4] 徐伟,张淑玲,洪振丰,等. 大孔吸附树脂分离纯化龙

须藤总黄酮的工艺研究[J]. 广东药学院学报,2009,25(2):144.
[5] 林炜鑫,高杰,简洁,等. 大孔树脂纯化九龙藤总黄酮工艺研究[J]. 时珍国医国药,2013,23(3):646.
[6] 刘江波,傅婷婷,吕秀阳. 大孔树脂分离纯化三叶青总黄酮的工艺研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(4):287.
[7] 史万忠,刘瑾,吕海阳,等. 大孔吸附树脂纯化补肾方中总黄酮的工艺研究[J]. 中成药,2009,31(7):1024.
[8] 张志东,林少珠,吴晓松. 正交试验优化桑寄生黄酮的提取工艺[J]. 中药材,2012,35(5):810.
[9] 刘安军,刘慧慧,郭丹青,等. 大孔吸附树脂分离纯化枸杞叶总黄酮的研究[J]. 现代食品科技,2011,28(3):292.
[10] 王永,王世华,安军永,等. 大孔树脂分离纯化独一味总黄酮的工艺研究[J]. 中国药业,2012,21(5):25.
[11] 柯小温,陈磊,宋洪涛,等. 大孔树脂与 ZTC 联用纯化白子草总黄酮的研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(9):1219.

[责任编辑 刘德文]

欢迎订阅 2015 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊(2013 年扩刊版)”、“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创建于 1995 年 10 月,主要设置栏目:学术专论、综述、工艺与制剂、化学与分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘等。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,242 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655,欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfx_2010@188.com,网址:www.syfxzz.com。