

Plackett-Burman 联用正交设计 优选长叶胡颓子总三萜酸纯化工艺

杨代竹¹, 李玉山^{2*}

(1. 湖北民族学院附属民大医院, 湖北 恩施 445000; 2. 湖北民族学院, 湖北 恩施 445000)

[摘要] 目的: 优选长叶胡颓子总三萜酸的大孔吸附树脂纯化工艺。方法: 采用 UV 测定总三萜酸含量。通过动态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号; 以总三萜酸含量为指标, 通过单因素试验筛选纯化工艺的影响因素, Plackett-Burman 试验筛选主要影响因素。以总三萜酸含量和浸膏得率的综合评分为指标, 选取乙醇体积分数、洗脱剂用量、醇碱比为考察因素, 通过正交试验优选长叶胡颓子总三萜酸的富集工艺。结果: 长叶胡颓子总三萜酸的最佳纯化工艺为洗脱剂用量 4 BV, 醇碱比 1:5, 乙醇体积分数 80%, 洗脱流速 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 总三萜酸质量分数达 75%, 浸膏收率达 22%。结论: 利用 Plackett-Burman 试验设计联用正交试验优选的纯化工艺稳定、简便易行, 为长叶胡颓子三萜酸的开发利用提供实验依据。

[关键词] 长叶胡颓子; 总三萜酸; Plackett-Burman; 正交试验; 纯化工艺; 单因素试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0018-03

[doi] 10.11653/syfj2013230018

Optimization of Purification Technology for Total Triterpenoid Acids from *Elaeagnus bockii* Diels by Plackett-Burman Combined with Orthogonal Test

YANG Dai-zhu¹, LI Yu-shan^{2*}

(1. Affiliated Minda Hospital of Hubei University For Nationalities, Enshi 445000, China;

2. Hubei University For Nationalities, Enshi 445000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification process of total triterpenoid acids from *Elaeagnus bockii* by macroporous resin. **Method:** The content of total triterpenoid acids was determined by UV. Type of macroporous resin was screened by dynamic adsorption-elution test; With the content of total triterpenoid acids as index, influence factors were selected by single factor tests, main factors were investigated by Plackett-Burman. Taking composite score of the content of total triterpenoid acids and extract yield as index, $L_9(3^4)$ orthogonal test was applied to optimize purification process of total triterpenoid acids with ethanol concentration, alcohol amount, ratio of ethanol and 1% sodium hydroxide as factors. **Result:** Optimum purification process conditions were as follows: eluent amount 4 BV, ratio of 80% ethanol and 1% NaOH (1:5), flow rate $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; The mass fraction of total triterpenoid acids was 75%, extract yield was more than 22%. **Conclusion:** This optimized process was simple and stable to provide experimental basis development and utilization of total triterpenoid acids from *E. bockii* with high precision and predictability.

[Key words] *Elaeagnus bockii*; total triterpenoid acids; Plackett-Burman; orthogonal test; purification process; single factor test

长叶胡颓子资源丰富, 主要分布在长江流域及以南地区^[1], 主要用于治疗支气管哮喘、感冒咳嗽、

[收稿日期] 20130504(018)

[基金项目] 湖北省卫生计生厅科研基金项目(JX2C42)

[第一作者] 杨代竹, 学士, 中级职称, 从事临床基础研究, Tel:0718-8437479, E-mail:2833617729@qq.com

[通讯作者] *李玉山, 学士, 高级实验师, 从事基础医学研究, Tel:0718-8437479, E-mail:1902097263@qq.com

肠炎、风湿性关节炎、腰腿痛、腹泻、痢疾、跌打、淤积、肺病等^[1-3],其根茎或根、叶、果实均可供药用或食用,具有极大的开发价值^[4]。长叶胡颓子的化学成分主要包括黄酮、三萜类、甾体类、蒽醌类等化合物,其中三萜酸类成分主要为熊果酸、齐墩果酸类^[5],二者通过诱导癌细胞凋亡和坏死,在抑制胃癌、肠癌、肝癌等消化系统肿瘤细胞增殖方面具有极大研究价值^[6]。目前尚无长叶胡颓子三萜酸工艺研究的报道。本实验通过 Plackett-Burman 筛选影响总三萜酸富集的主要因素,基于综合评分法利用正交设计优选总三萜酸的纯化工艺。

1 材料

LD-500 型粉碎机(郑州华通机械厂),UV 1100 型紫外分光光度计(杭州科博仪器有限公司),BS124S 型电子天平(上海美谱达仪器有限公司),R-201 型旋转蒸发仪(瑞士布奇公司),DHG9030 型电热鼓风干燥箱(南京沃环科技实业有限公司)。熊果酸对照品(成都植标化纯有限公司,批号 20110512,纯度 > 98%),长叶胡颓子(采自湖北恩施州巴东县野三关,经湖北民族学院李玉山鉴定为胡颓子科胡颓子属长叶胡颓子 *Elaeagnus bockii* Diels 的果实),水为重蒸水,所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总三萜酸粗品的制备 称取适量胡颓子药粉,加 10 倍量含 1% NaOH 的 50% 乙醇溶液超声提取 2 次,过滤,残渣加 10 倍量 95% 乙醇热回流提取 2 次,过滤,合并滤液,加酸水进行酸化($\text{pH} \leq 3$),静置 12 h,过滤,沉淀用水洗至近中性,沉淀物用 95% 乙醇溶解,加入 3% 活性炭,热回流 30 min,过滤,滤液回收乙醇至干,于 45 °C 真空干燥,即得(质量分数 15%)。

2.2 总三萜酸的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取熊果酸对照品约 10 mg,置于 25 mL 量瓶中,加无水乙醇定容,摇匀,即得 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品溶液。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密量取对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mL, 分别置于具塞试管中,挥去溶剂,各加入 5% 香草醛-冰乙酸混合溶液 0.4 mL 和高氯酸 1 mL,于 60 °C 水浴 15 min,冰浴冷却,加冰乙酸 5 mL,摇匀,于 545 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.019X - 0.174$ ($r = 0.9992$),线性范围 12.5 ~ 62.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 纯化工艺优选

2.3.1 大孔吸附树脂筛选 称取等量总三萜酸粗品 5 份,分别用 75% 乙醇溶解并配成一定质量浓度的样品溶液。称取 5 种不同型号(D-101, X-5, XDA-5, S-8, XP-10)的大孔吸附树脂各 20 g,通过湿法装入树脂柱中,将等量的上述样品溶液分别经过 5 种大孔树脂进行动态吸附,用水冲洗树脂柱,收集所有冲洗液,定容,计算总三萜酸吸附率分别为 96.5%, 97.4%, 74.5%, 79.6%, 82.9%。将吸附的成分用 95% 乙醇洗脱,洗脱液定容至 25 mL,计算洗脱率分别为 93.7%, 98.1%, 82.7%, 81.4%, 95.5%, 综合考虑,选取 X-5 型大孔树脂。

2.3.2 影响因素筛选 选取乙醇体积分数、洗脱剂用量、醇碱比、碱水质量分数、洗脱流速、径高比、上样体积 7 个可能影响洗脱效果的因素进行单因素试验考察。以总三萜酸含量和浸膏收率为考察指标,确定各因素的合适范围,结果初步确定了各影响因素的试验范围,乙醇体积分数 60% ~ 80%,乙醇用量 4 ~ 8 BV,醇碱比 5:1 ~ 1:5,碱水质量分数 0.5% ~ 2%,洗脱流速 1 ~ 3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,径高比 1:15 ~ 1:25,上样体积 20 ~ 40 mL。

2.3.3 Plackett-Burman 试验设计筛选主要影响因素 在单因素试验基础上,选用 Plackett-Burman 试验设计,考察影响总三萜酸含量的显著性因素。选取 7 个试验因素(乙醇体积分数、洗脱剂用量、醇碱比、碱水质量分数、洗脱流速、径高比、上样体积)和 4 个空白因素,共计 12 次试验,确定每个因素高、低 2 个水平,因素水平见表 1。运用 Design expert 8.0 软件设计试验并进行数据处理,以 K 因素为误差项进行方差分析,各因素的 P 值分别为 0.001 03, 0.002 11, 0.001 22, 0.015 49, 0.057 53, 0.041 78, 0.061 41, 0.077 33, 0.088 05, 0.062 19, 其中 $P < 0.05$ 的因素为主要影响因素,各因素对总三萜酸含量影响的显著性顺序为 $A > C > B > D > F > E > G$ 。

2.3.4 正交试验设计 根据 Plackett-Burman 试验设计结果,选择乙醇体积分数、洗脱剂用量、醇碱比为考察因素,运用 SPSS 统计软件,以总三萜酸含量和浸膏得率为综合评价指标,权重系数分别为 0.7, 0.3,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

由极差分析可知,各因素对纯化工艺的影响次序为 $A > B > C$ 。方差分析结果表明乙醇体积分数对纯化工艺具有极显著影响,洗脱剂用量为显著性影响因素,醇碱比则影响不显著。结合单因素试验及生产实际考虑,确定长叶胡颓子总三萜酸的最佳

表 1 长叶胡颓子总三萜酸纯化工艺 Plackett-Burman 设计因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 洗脱剂用量/BV	C 醇碱比	D 碱水质量分数/%	E 洗脱流速/mL·min ⁻¹	F 径高比	G 上样体积/mL
-1	60	4	5:1	0.5	1	1:15	20
1	80	8	1:5	2.0	3	1:25	40

表 2 长叶胡颓子总三萜酸纯化工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 洗脱剂用量/BV	C 醇碱比
1	60	4	5:1
2	70	6	1:1
3	80	8	1:5

表 3 长叶胡颓子总三萜酸纯化工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	浸膏 得率 /%	总三萜酸 质量分数 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	12.20	56.22	0.44
2	1	2	2	2	15.36	48.21	0.53
3	1	3	3	3	9.31	66.35	0.32
4	2	1	2	3	12.31	45.09	0.83
5	2	2	3	1	10.08	42.21	0.77
6	2	3	1	2	9.22	63.36	0.68
7	3	1	3	2	18.24	65.21	0.75
8	3	2	1	3	22.64	68.24	0.87
9	3	3	2	1	21.34	75.46	0.75
K ₁	0.69	0.78	0.73				
K ₂	0.61	0.74	0.74				
K ₃	0.92	0.70	0.75				
R	0.23	0.09	0.02				

表 4 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.158	2	0.079	253.964	<0.01
B	0.023	2	0.011	36.571	<0.05
C	0.007	2	0.003	10.750	>0.05
D(误差)	0.001	2	0.000		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

纯化工艺为 A₃B₁C₃, 即乙醇体积分数 80%, 洗脱剂用量 4 BV, 醇碱比 1:5。按优选的工艺条件进行 3 次验证试验, 结果总三萜酸质量分数达 75%, 纯度较提取液提高了近 5 倍, 浸膏收率达 22%, RSD 2.58%, 表明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

已有研究表明长叶胡颓子果实水煎液能有效抑制大鼠结肠炎炎症反应^[7], 可预防高脂蛋白血症、心血管内膜细胞及心肌组织的损伤^[8], 同时能增强荷瘤鼠细胞免疫功能^[9], 对心血管系统疾病、糖尿病具有预防保健作用^[10]。胡颓子果实中熊果酸能增强小鼠免疫反应^[11], 同时果实水煎液对胃癌细胞 SGC-7901 增殖具有显著抑制作用^[12], 长叶胡颓子中主要三萜酸类成分为熊果酸和齐墩果酸, 二者在

防治消化系统肿瘤方面具有独特疗效。

分别选取齐墩果酸和熊果酸作为对照品, 于 200 ~ 800 nm 进行全波长扫描, 结果显示熊果酸对照品和供试品溶液分别在 548, 545 nm 处有最大吸收, 而齐墩果酸对照品和供试品溶液的最大吸收波长差别 > 10 nm, 故选择熊果酸作为对照品, 并于 545 处测定吸光度。Plackett-Burman 是针对优选因素主效应进行的试验设计, 正交设计的极差分析和方差分析均显示乙醇体积分数为主要影响因素, 洗脱剂用量和醇碱比为次要影响因素, 与 Plackett-Burman 试验筛选因素的显著性顺利吻合。

[参考文献]

- [1] 陈新. 川渝地区长叶胡颓子属药用植物资源研究[J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24(2): 40.
- [2] 赵鑫. 长叶胡颓子(长叶胡颓子科), 短肋羽扇(蕁綱: 羽蕁科)和假柴龙树(茶茱萸科)的化学成分和生物活性[D]. 上海: 华东师范大学, 2006.
- [3] 郭明娟, 江洪波, 田祥琴, 等. 胡颓子叶的化学成分[J]. 华西药理学, 2008, 23(4): 381.
- [4] 吴彩霞, 邢煜君, 曹乃锋, 等. 宜昌胡颓子根挥发性成分的 HS-SPME-GC-MS 研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 53.
- [5] 娄方明. 长叶胡颓子与中华青荚叶化学成分研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [6] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸的抗消化系统肿瘤作用[J]. 上海医药, 2011, 32(12): 606.
- [7] 赵智博, 张雨辰, 刘建萍, 等. 大叶胡颓子茎的抗菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(17): 8989.
- [8] 李玉山. 长叶胡颓子对高脂血症模型大鼠血脂、血液流变和心肌酶谱的影响[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(3): 56.
- [9] 伍杨, 邓明会. 长叶胡颓子对荷瘤鼠细胞免疫功能影响[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(5): 576.
- [10] 李玉山, 李田, 谭志鑫, 等. 长叶胡颓子降血糖、血脂及抗脂质过氧化作用的研究[J]. 安徽医药, 2005, 9(7): 489.
- [11] 伍杨, 邓明会, 林平. 胡颓子熊果酸对小鼠免疫功能的影响[J]. 四川中医, 2006, 24(3): 35.
- [12] 林平, 李玉山, 廖泽云, 等. 胡颓子多糖对小肠辐射损伤的保护作用[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(13): 1541.

[责任编辑 全燕]