

Box-Behnken 设计响应面法优化黑果枸杞 总黄酮纯化工艺

艾克山·吾拉木, 马建宝, 赵一帆, 肖岑宇, 努尔曼古丽, 夏依达木·巴合提亚尔,
古丽巴哈尔·卡吾力*

(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 应用 Box-Behnken 设计响应面法优化黑果枸杞总黄酮纯化工艺条件及相关参数。**方法** 考察 6 种大孔吸附树脂静态、动态吸附和解吸性能, 用单因素试验分别对上样浓度、上样体积、上样 pH、洗脱液浓度、洗脱液体积和洗脱流速进行考察, 以黑果枸杞总黄酮纯化后含量为指标, 再从 6 个单因素中选出对解吸附试验影响最显著的 3 个因素进行三因素三水平 Box-Behnken 设计响应面实验。**结果** NKA-9 型大孔树脂为纯化黑果枸杞总黄酮的最佳树脂, 最佳纯化工艺条件为总黄酮提取液浓度为 4 mg/mL, pH 为 4.0, 按 5 BV 进行上样, 再用 3 VB 的 80%乙醇在 2 mL/min 流速下进行洗脱, 黑果枸杞总黄酮含量可以从 4.54%提高到 43.19%。**结论** 此工艺对黑果枸杞总黄酮的纯化效果较好, 工艺简单且稳定性良好, 适用于工业化生产。

关键词: 黑果枸杞; 总黄酮; 纯化工艺; 响应面法

Study on purification of total flavonoids from *Lycium ruthenicum* Murr. by Box-Behnken design response-surface methodology

AIKESHAN Wu-La-Mu, MA Jian-Bao, ZHAO Yi-Fan, XIAO Cen-Yu, NUERMANGULI,
XIAYIDAMU Ba-He-Ti-Ya-Er, GULIBAHAER Ka-Wu-Li*

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

ABSTRACT: Objective Application of Box-Behnken design response surface methodology to optimize the purification conditions and related parameters of total flavonoids from *Lycium ruthenicum* Murr. **Methods** Static, dynamic adsorption and desorption properties of six macroporous adsorption resins were studied. The sample concentration, volume, pH, eluent concentration, eluent volume and eluting flow rate were investigated by single factor test. Taking the purified content of total flavonoids of *Lycium ruthenicum* Murr. as the index, the 3 factors that had the most significant effect on the desorption test were selected from 6 single factors to carry out the three-factor and three-level Box-Behnken design response surface experiment. **Results** NKA-9 macroporous resin was the best resin for the purification of total flavonoids from *Lycium ruthenicum* Murr.. The optimum purification conditions were as follows: the concentration of total flavonoids was 4 mg/mL, pH was 4.0, the sample was added at 5 BV, and eluted with 80% ethanol of 3 VB at the flow rate of 2 mL/min, the content of total flavonoids of *Lycium ruthenicum*

基金项目: 中药新药研发培育项目(2016-02-12)

Fund: Supported by the Research and Development of New Chinese Medicines Project (2016-02-12)

*通讯作者: 古丽巴哈尔·卡吾力, 副教授, 主要研究方向为新药与新剂型。E-mail: guli5573@163.com

*Corresponding author: GULIBAHAER Ka-Wu-Li, Associate Professor, School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: guli5573@163.com

Murr. could be increased from 4.54% to 43.19%. **Conclusion** This process has good purification effect on total flavonoids of *Lycium ruthenicum* Murr.. It's simple and stable, and also suitable for industrial production.

KEY WORDS: *Lycium ruthenicum* Murr.; total flavonoids; purification process; response-surface methodology

1 引言

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)为茄科植物枸杞属多年生多棘刺灌木,其果实内含黄酮类、氨基酸、水溶性维生素及糖类等多种营养成分,中医主要用于清肺降火、明目益精、降血脂、停经和尿道结石等^[1,2]。黄酮类化合物具有抗衰老、抗氧化、抗菌、抗病毒和抗心血管疾病等药理作用,在现代医药、食品、保健和食品添加剂领域中有着极高的应用价值和开发前景^[3]。

大孔吸附树脂是一类选择性好、吸附量大、耐高温的有机高分子聚合物吸附剂,近年来主要用于天然产物和中草药有效成分的分离纯化工艺中^[4]。Box-Behnken 设计-响应面法是一种通过多项式模型准确、快速、有效地确定多因子系统的一种统计学方法和集数学法相结合的常用试验设计法^[5]。

目前,黑果枸杞总黄酮的提取工艺和其粗提物降脂活性和抗氧化活性已经得以研究,但对于其纯化物的制备研究较少。本研究通过确认黑果枸杞总黄酮的最佳纯化工艺参数来制备其纯化物,以期在黑果枸杞总黄酮成分后续的开发与研究提供一定的理论基础。

2 材料与方

2.1 材料与试剂

黑果枸杞采摘于新疆塔里木盆地,经新疆医科大学药学院生药学教研室教授帕丽达·阿不力孜鉴定为黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)的果实。

芦丁对照品(批号:100080-201707,中国药品生物制品检定所);无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、亚硝酸钠、硝酸铝(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);D101、AB-8、HPD100、HPD300、NKA-2、NKA-9型大孔吸附树脂(批号:1126C011,北京索莱宝科技有限公司)。

2.2 仪器及设备

KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HWS-24型数显电热恒温水浴锅(上海-恒科技有限公司);EYELAN-1100型旋转蒸发仪、SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);T6新世纪紫外可见分光光度计(济南思卓医疗器械有限公司);HY-5型回旋震荡器(金坛市医疗仪器厂);JM-B5003型电子天平(余姚市纪铭重校验设备有限公司);雷磁PHSJ-3F型实验室pH计(上海雷磁仪器厂)。

2.3 实验方法

2.3.1 黑果枸杞总黄酮的制备与含量测定

(1) 黑果枸杞总黄酮的制备^[6,7]

将原材料经清洗,干燥至恒重,粉碎并过60目筛,用索氏提取器进行脱脂处理,干燥后采用水浴提取法提取黑果枸杞总黄酮,工艺参数为:(乙醇体积分数为80%)料液比1:15(g/mL)、提取时间为60min、提取温度为70℃。将提取液减压浓缩后留取少量用于含量测定,剩余的备用。

(2) 标准曲线的绘制^[8]

精密称取105℃干燥至恒重的芦丁对照品25.00mg,置于100mL的容量瓶内,用体积分数为70%的乙醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得到对照品溶液(含芦丁0.25mg/mL)。精密吸取对照品溶液0.0(空白对照)、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0mL,分别置于25mL容量瓶中,各加5%NaNO₂溶液0.7mL,摇匀后静置6min,再加入10%Al(NO₃)₃溶液0.7mL,摇匀后静置6min,再加入4%NaOH溶液5mL,最后用体积分数70%乙醇稀释至刻度,摇匀并静置10min。

取对照品溶液1mL于25mL容量瓶内,按标准曲线的制作方法,在紫外分光光度计上进行全波长扫描,发现其在510nm处有最大吸收峰。因此,确定510nm为测定波长。以芦丁对照溶液的浓度设为横坐标(X)、吸光度设为纵坐标(Y),绘制标准曲线。

(3) 总黄酮含量的测定^[9]

取浓缩后的总黄酮提取液0.5mL置于25mL的容量瓶中,加入5%NaNO₂溶液0.7mL,摇匀放置5min,加10%Al(NO₃)₃溶液0.7mL,摇匀放置5min,加4%NaOH溶液5mL,最终加70%乙醇溶液至刻度并摇匀放置15min后以相应的试剂为空白对照,在510nm处测定吸光度(平行测3次求平均值),得出来的值带入标准曲线,利用公式(1)求出黑果枸杞中总黄酮的含量。

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

式中: C_X 表示样品浓度,mg/mL; D 表示稀释倍数,mL; W 表示称取的质量,g。

2.3.2 大孔吸附树脂的预处理^[10]

将6种大孔吸附树脂用95%乙醇溶液浸泡24h,再用蒸馏水反复洗涤至无乙醇味,然后用5%HCl溶液浸泡4h,用蒸馏水洗至中性,再用5%NaOH溶液浸泡4h,用蒸馏水洗至中性,按照湿法装柱,用洗耳球轻敲柱壁,使柱中气泡完全排出,后用蒸馏水洗2~3次,至流出液澄清。

2.3.3 大孔吸附树脂的筛选

(1) 静态吸附-解吸实验

准确称取干燥的已处理好的 6 种大孔树脂各 2.0 g, 置于 50 mL 磨口具塞三角瓶中, 加入黑果枸杞总黄酮粗提液 20 mL。塞进瓶口置于回旋振荡器上, 在室温下以 90 r/min 的转速吸附 24 h, 充分吸附后取 1 mL 上层清液测定总黄酮浓度, 并按照公式(2)和(3)分别计算出 6 种不同树脂的吸附量和吸附率^[11]。

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

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

式中: Q_1 为吸附量, mg/g; E 为吸附率, %; C_0 、 C_1 分别为样液中总黄酮的浓度、吸附后溶液中总黄酮的浓度, mg/mL; V_1 为样液积, mL; M 为树脂质量, g。

将充分吸附黑果枸杞总黄酮的大孔树脂抽滤风干后加入 20 mL 95%乙醇在室温下以 90 r/min 的转速解吸 24 h, 充分解吸后取 1 mL 上层清液测定总黄酮浓度, 并按照公式(4)和(5)分别计算出 6 种不同树脂的解吸量和解吸率。

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

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

式中: Q_2 为解析量, mg/g; D 为解吸率, %; C_2 为解吸液中总黄酮浓度, mg/mL; V_2 为解吸液体积, mL; M 为树脂质量, g。

(2) 动态吸附-解吸实验

取 6 支规格一样, 带筛网和阀门的玻璃柱, 按湿法装柱法分别装入 6 种不同型号的大孔吸附树脂适量, 静置半天。等柱床稳定后按 2 BV 进行上样, 静置若干小时等样品溶液充分被大孔树脂吸附以后收集吸附液, 并在最大波长 510 nm 处测吸光度, 并按公式(3)、(5)计算吸附率和解吸率。

(3) 静态吸附动力学考察

在 50 mL 具塞磨口三角瓶中加入优选的树脂 2.0 g(用滤纸吸干), 加入黑果枸杞总黄酮粗提液 20 mL, 置回旋振荡器上, 在室温下以 90 r/min 的转速进行吸附, 分别在吸附 0、30、60、120、240、360、480 和 600 min 后去 5 mL 上清液, 按照 2.3.1 测定上清液中总黄酮含量, 依据公式(1)计算优选的大孔吸附树脂的吸附量, 并以树脂对黑果枸杞总黄酮的单位吸附量(mg/g)为纵坐标, 以吸附时间(min)为横坐标绘制大孔吸附树脂静态吸附动力学曲线^[12]。

2.3.4 大孔吸附树脂的单因素考察

通过静态吸附-解吸实验和动态吸附-解吸实验将优选的 NKA-9 型大孔树脂湿法装柱, 通过预实验结果控制上样流速 2 mL/min, 以上样体积、上样浓度、上样 pH、洗脱液体积、洗脱液浓度、洗脱流速等为考察因素进行试验。

(1) 上样体积的考察

将优选的吸附树脂进行湿法装柱, 控制上样流速

2 mL/min、上样浓度为 2.0 mg/mL、上样 pH 为 5, 分别以 4、5、6、7、8、9 BV 的上样液体积进行上样吸附。收集流出液于 510 nm 处测吸光度, 按公式(2)、式(3)计算吸附量与吸附率, 绘制曲线。选取最优上样体积进行余下因素筛选。

(2) 上样浓度的考察

将优选的吸附树脂进行湿法装柱, 以 2.3.4(1)中所确定的上样体积, 控制上样流速 2 mL/min、上样 pH 为 5, 分别以 1、2、3、4、5、6 mg/mL 浓度的总黄酮进行上样吸附。收集流出液于 510 nm 处测吸光度, 按公式(2)、式(3)计算吸附量与吸附率, 绘制曲线。选取最优上样浓度进行余下因素筛选。

(3) 上样 pH 值的考察

将优选的吸附树脂进行湿法装柱, 控制上样流速 2 mL/min, 以 2.3.4(1)中所确定的上样体积和 2.3.4(2)中所确定的上样浓度, 分别以 pH 为 3、4、5、6、7、8 的上样溶液值进行吸附。收集流出液于 510 nm 处测吸光度, 按公式(2)、(3)计算吸附量与吸附率, 绘制曲线, 再选取最优上样 pH 值进行余下因素筛选。

(4) 洗脱液体积的考察

将优选的吸附树脂进行湿法装柱, 控制上样流速 2 mL/min, 以 2.3.4(1)中所确定的上样体积、2.3.4(2)中所确定的上样浓度和 2.3.4(3)中所确定的上样 pH 进行吸附, 收集流出液并算出吸附率; 以浓度为 95%乙醇为洗脱液、洗脱流速为 4 mL/min, 分别以 2、3、4、5、6、7 BV 的洗脱液进行洗脱, 收集洗脱液于 510 nm 处测吸光度, 按公式(4)、(5)计算解吸量与解吸率, 绘制曲线, 再选取最优洗脱液体积进行余下因素筛选。

(5) 洗脱液浓度的考察

将优选的吸附树脂进行湿法装柱, 控制上样流速 2 mL/min, 以 2.3.4(1)中所确定的上样体积、2.3.4(2)中所确定的上样浓度和 2.3.4(3)中所确定的上样 pH 进行吸附, 收集流出液并算出吸附率; 以 2.3.4(1)中所确定的洗脱体积、洗脱流速为 4 mL/min, 分别以 70%、75%、80%、85%、90%、95%浓度的乙醇作为洗脱液进行洗脱, 收集洗脱液于 510 nm 处测吸光度, 按公式(4)、(5)计算解吸量与解吸率, 绘制曲线, 再选取最优洗脱液浓度进行余下因素筛选。

(6) 洗脱流速的考察

将优选的吸附树脂进行湿法装柱, 控制上样流速 2 mL/min, 以 2.3.4(1)中所确定的上样体积、2.3.4(2)中所确定的上样浓度和 2.3.4(3)中所确定的上样 pH 进行吸附, 收集流出液并算出吸附率; 以 2.3.4(4)中所确定的洗脱体积和 2.3.4(5)中所确定的洗脱液浓度, 分别以 1、2、3、4、5、6 mL/min 的流速进行洗脱, 收集洗脱液于 510 nm 处测吸光度, 按公式(4)、(5)计算解吸量与解吸率, 绘制曲线, 选取最优洗脱流速。

2.3.5 响应面试验设计

(1) 试验设计

通过单因素试验, 选出对黑果枸杞总黄酮纯化工艺

影响最显著的 3 个因素, 应用 Design-Expert 8.0.6 软件设计 3 因素 3 水平(共 17 个试验点, 零点实验重复 5 次)的响应面试验, 利用响应面试验结果, 确定黑果枸杞纯化的最优提取条件, 试验因素与水平见表 1。

表 1 因素与水平
Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(上样浓度, mg/mL)	B(洗脱液浓度, %)	C(洗脱液体积, BV)
-1	3	75	2
0	4	80	3
1	5	85	4

(2) 最佳工艺条件的验证实验

根据所得到的模型, 根据实际工作需要调整最佳纯化工艺条件, 并在此条件下重复 3 次实验进行验证, 计算 RSD。

3 结果与分析

3.1 黑果枸杞总黄酮的制备与含量测定

按照方法 2.3.1 提取黄酮, 以芦丁对照溶液的浓度设为横坐标(X)、吸光度设为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 得到线性回归方程: $Y=11.634X-0.0034$, $r^2=0.9991$, 线性关系良好。利用公式(1)求出黑果枸杞中总黄酮的含量。测得黑果枸杞总黄酮粗提物的百分含量为 4.54%, RSD=1.16%。

3.2 大孔吸附树脂的筛选

3.2.1 静态吸附-解吸实验

通过表 2 可知, AB-8、NKA-2、NKA-9 型大孔吸附树脂 3 种树脂对黑果枸杞总黄酮的吸附量与解吸量高于 HPD-100、HPD-300、D-101 型大孔吸附树脂, 但吸附率与解吸率明显低与于后 3 个树脂。D-101 型大孔吸附树脂虽

然解吸率较高, 但其吸附率低与其它树脂。AB-8 型大孔吸附树脂吸附量较高, 但解吸量却是 6 种树脂里最低的。故综合考虑, 本试验选取了各项吸附与解吸指标较平稳、且较高的 NKA-9 型大孔吸附树脂为理想树脂, 并用于进行后续试验。

3.2.2 动态吸附-解吸实验

通过图 1 可知, 6 种大孔吸附树脂树脂的动态吸附实验中, NKA-9 型大孔吸附树脂的吸附率与解吸率比其他 5 种树脂都高, 且其吸附率与解吸率相当, 差异不悬殊。综合考虑, NKA-9 型大孔吸附树脂为理想树脂。

综合考虑静态吸附、解吸实验和动态吸附、解吸实验的实验结果, NKA-9 型大孔吸附树脂对黑果枸杞总黄酮具有良好的吸附能力和较高的吸附速率, 且易于解吸, 是黑果枸杞总黄酮分离纯化的理想树脂。最终选 NKA-9 型大孔吸附树脂进行单因素试验。

3.2.3 静态吸附动力学考察

从图 2 可以看出来, NKA-9 型大孔吸附树脂对黑果枸杞总黄酮提取物的吸附量随着时间逐渐增多。当吸附时间达到 60 min 以后吸附量趋于平稳, 在 480 min 达到最大的吸附量。此时, 大孔树脂对总黄酮的吸附量达到饱和状态。在后续的单因素试验中将吸附时间定为 60 min, 以达到较稳定、较高的吸附效率。

3.3 大孔吸附树脂的单因素考察

以优选出来的 NKA-9 型大孔吸附树脂为研究对象, 考察 6 种单因素实验条件对纯化工艺的影响。

3.3.1 上样体积的选择

由图 3 可以看出, 吸附率随着上样体积的增加呈先增加后减少的趋势。可能由于在低上样体积时, 树脂对黄酮的吸附作用使其难以完全解吸, 造成洗脱不彻底, 黄酮的回收率较低, 当上样体积过大时, 树脂未能对黄酮完全吸附, 并在洗脱过程中造成泄漏损失。当上样体积为 5 VB 时, 吸附率最高, 为 81%, 所以样品的上样体积应控制在 5 VB 为最佳。

表 2 6 种大孔吸附树脂的物理性能、吸附量、解吸量、吸附率及解吸率

Table 2 Physical properties, adsorption capacity, desorption capacity, adsorption rate and desorption rate of 6 macroporous adsorption resins

树脂型号	极性	平均孔径/Å	吸附量 Q_1 /(mg/g)	解吸量 Q_2 /(mg/g)	吸附率 E /%	解吸率 D /%
D101	非极性	90-100	14.74	13.56	41.63	73.20
AB-8	弱极性	130-140	27.38	7.38	51.60	26.95
HPD100	非极性	85-90	17.54	10.88	43.84	62.03
HPD300	非极性	50-55	16.50	9.48	43.02	57.45
NKA-9	极性	155-165	29.14	15.80	52.99	54.22
NKA-2	极性	145-155	28.44	10.88	52.44	38.30

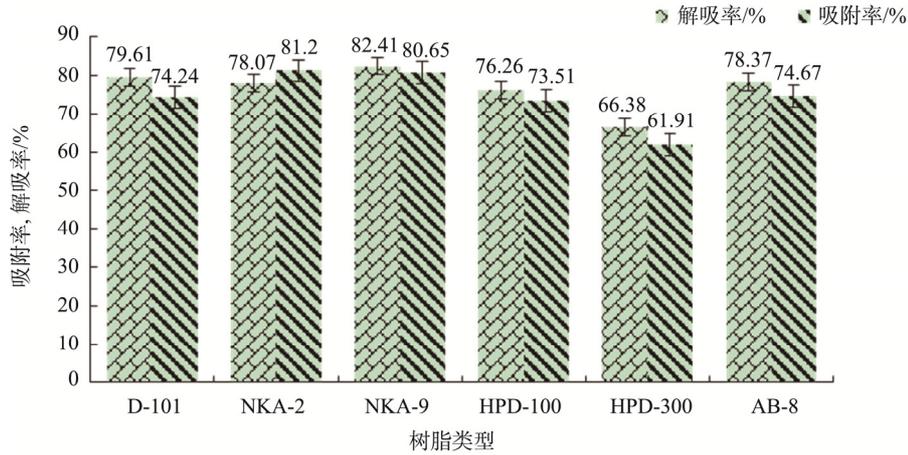


图 1 树脂的动态吸附率与解吸率

Fig.1 Adsorption rate and desorption rate of resins in dynamic state

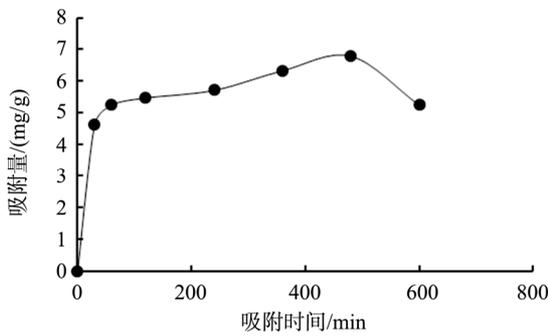


图 2 NKA-9 型大孔吸附树脂静态吸附动力学曲线

Fig.2 Static adsorption dynamic curves of NKA-9 macroporous resin

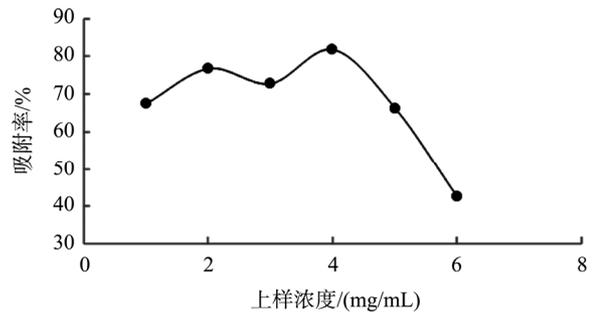


图 4 上样浓度对吸附率的影响

Fig.4 Effect of sample concentration on adsorption rate

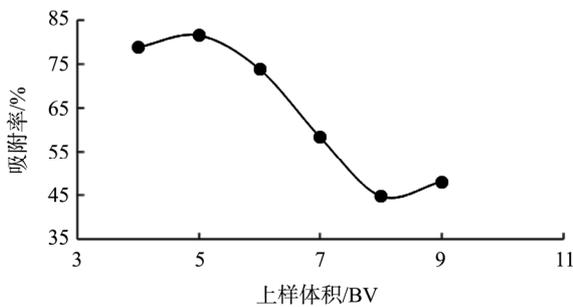


图 3 上样体积对吸附率的影响

Fig.3 Effect of sample volume on adsorption rate

3.3.2 上样浓度的选择

由图 4 可以看出, 上样浓度太低或太高时吸附率相对而言比较低的。可能是因为太高浓度或太低浓度都会影响大孔树脂的单位吸附量。此时, 与总黄酮竞争吸附的杂质增加, 总黄酮在树脂内扩散能力降低。当上样浓度为 4 mg/mL 时, 大孔树脂吸附率最高, 为 82%, 故总黄酮浓度为 4 mg/mL 为最佳上样浓度。

3.3.3 上样 pH 值的选择

由图 5 可以看出, 样品 pH 对吸附率的影响并不大, 随着上样 pH 的增大, 吸附率大致呈先增再降到最后处于平稳的趋势。由于黄酮分子中含有大量的酚羟基, 故酸性条件有助于提高树脂上的吸附位点与黄酮间的结合能力。当样品 pH 接近总黄酮本身的 pH 即为 4 时, 树脂吸附率最高, 为 78%。所以上样 pH 应为 4。

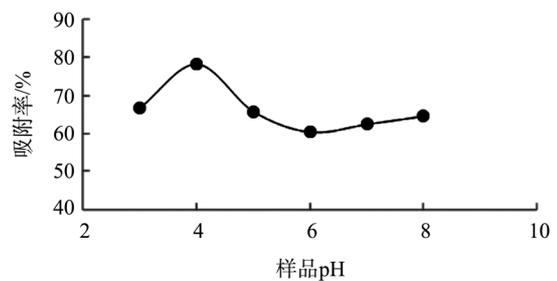


图 5 上样 pH 值对吸附率的影响

Fig.5 Effect of sample pH on adsorption rate

3.3.4 洗脱液体积的选择

由图 6 可以看出, 洗脱液的体积对树脂的解吸率的影

响较为显著,波动较大。在洗脱液体积为 3 BV 时,解吸率最高,为 70%,此时树脂中黄酮类化合物洗脱较干净。而洗脱液体积超过 3 BV 时,洗脱较完全,也会洗脱出少量杂质,导致解吸液中总黄酮含量变低,影响树脂的解吸率。故选取 3 BV 的洗脱液最为适宜。

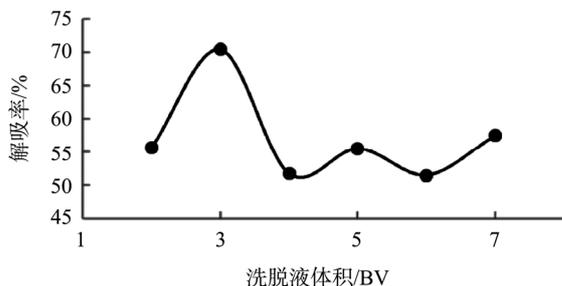


图 6 洗脱液体积对解吸率的影响

Fig.6 Effect of eluent volume on desorption rate

3.3.5 洗脱液浓度的选择

由图 7 可以看出,随着洗脱液浓度的上升,解吸率明显上升,此树脂对黑果枸杞总黄酮的吸附性较强。黑果枸杞总黄酮中的糖苷键类化合物和一些多酚结构在水溶液中极性较低,容易被乙醇洗脱出来。洗脱液浓度过低致使洗脱不完全,且洗脱液浓度过高,也会将一些杂质一起洗脱出来。当洗脱液为 80%乙醇时解吸率最高,为 63%,因此确定洗脱液浓度为 80%最为适宜。

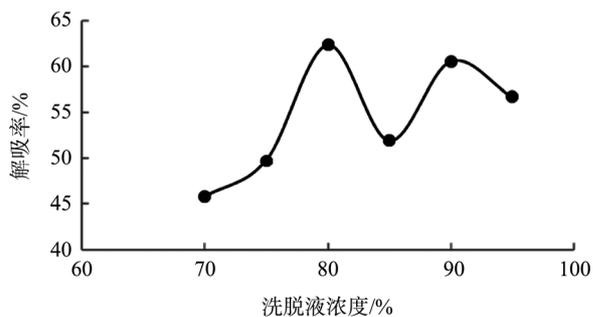


图 7 洗脱液浓度对解吸率的影响

Fig.7 Effect of eluent concentration on desorption rate

3.3.6 洗脱流速的选择

由图 8 可以看出,随着洗脱流速的增加,解吸率降低,这是因为在洗脱液体积相同的条件下,洗脱流速过大,洗脱液还未充分解吸树脂上吸附的黄酮就已经流出柱外,因此,洗脱流速越小越好,但流速过低将导致整个解吸过程缓慢,影响生产效率。当洗脱流速在 2 mL/min 时解吸率最高,为 67%。当洗脱流速超过 2 mL/min 时,解吸率逐渐下降。因此确定洗脱流速为 2 mL/min 时最为适宜,且与上样液流速一致,便于实验操作,减少调节流速时产生的误差。

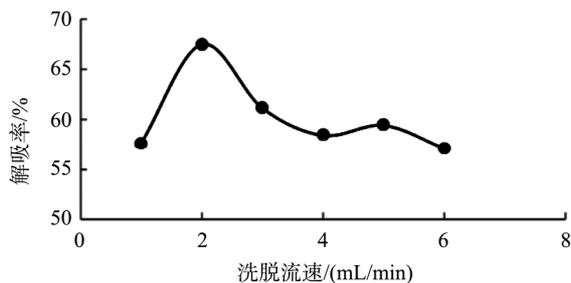


图 8 洗脱流速对解吸率的影响

Fig.8 Effect of flow rate on desorption rate

3.4 响应面试验结果

3.4.1 响应面试验设计及结果

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,在单因素试验基础上,选取了影响较显著的上样浓度(A)、洗脱液浓度(B)和洗脱液体积(C)3 个因素为自变量,以黑果枸杞纯化后的百分含量(Y)为响应值,设计的 3 水平 3 因素方案及结果见表 3。

表 3 响应面试验方案及试验结果

Table 3 Design and results of response surface experiment

序号	A 上样浓度/(mg/mL)	B 洗脱液浓度/%	C 洗脱液体积/BV	Y 百分含量/%
1	-1	0	1	25.85
2	1	-1	0	23.07
3	0	-1	1	25.62
4	0	1	-1	26.31
5	1	0	1	16.3
6	0	0	0	36.91
7	-1	0	-1	23.14
8	0	0	0	42.28
9	1	0	-1	26.93
10	0	0	0	35.52
11	-1	1	0	25.5
12	0	1	1	28.37
13	0	0	0	37.51
14	0	0	0	38.86
15	1	1	0	28.48
16	-1	-1	0	26.75
17	0	-1	-1	20.79

3.4.2 响应面方差分析

应用软件 Design-Expert 8.0.6 对试验结果进行方差分析,结果见表 4。通过统计学分析可以发现,模型显著检验

$P < 0.05$ 。该试验选用的模型极显著检验 $P < 0.01$ ，方差的失拟项不显著($P=0.3124 > 0.05$)，说明模型的选择是合适的。通过方程发现各种因素之间存在着一定的交互作用： A^2 、 B^2 、 C^2 项显著($P < 0.05$)，因子 A 、 B 、 C 、 AB 、 AC 、 BC 对黑果枸杞总黄酮纯化的影响不显著($P > 0.05$)。各因素对黑果枸杞总黄酮纯化的影响顺序为：洗脱液浓度(B) $>$ 上样浓度(A) $>$ 和洗脱液体积(C)。

三因子对响应值 Y 的影响可用以下多元二次方程：

$$Y=38.22-0.81A+1.55B-0.13C+1.66AB-3.34AC-0.69BC-7.24A^2-5.02B^2-7.92C^2 (r^2=0.9260)$$

通过 Design-Expert 8.0.6 软件对模型进行预测分析，得到最优纯化工艺为：上样浓度为 4.0 mg/mL、洗脱液体积 3 BV、洗脱液为 80%乙醇时，黑果枸杞总黄酮含量达到最大值，为 42.28%。

表 4 方差分析表
Table 4 ANOVA of regression analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	Pr > F	P
Model	739.63	9	82.18	9.73	0.0033	显著
A	5.22	1	5.22	0.62	0.4577	
B	19.31	1	19.31	2.29	0.1743	
C	0.13	1	0.13	0.016	0.9038	
AB	11.09	1	11.09	1.31	0.2896	
AC	44.49	1	44.49	5.27	0.0554	
BC	1.92	1	1.92	0.23	0.6482	
A ²	220.81	1	220.81	26.14	0.0014	
B ²	106.29	1	106.29	12.58	0.0094	
C ²	264.06	1	264.06	31.26	0.0008	
残差	59.13	7	8.45			
失拟项	32.73	3	10.91	1.65	0.3124	不显著
纯误差	26.4	4	6.6			
总和	798.76	16				
回归系数 r^2						0.9260
变异系数 CV/%						10.12

3.4.3 响应曲面分析

图 9-(A)与 9-(B)表示上样浓度和洗脱液浓度的交互作用对含量的影响，当上样浓度较低时，含量随着洗脱液的变化不明显，当上样浓度为 4 mg/mL 时，含量随洗脱液的变化明显增高。图 9-(C)与 9-(D)表示上样浓度和洗脱液体积的交互作用对含量的影响，二者的交互作用和对总黄酮含量的影响也是较明显的 $P=0.0554$ ，且在上样浓度为 4 mg/mL、洗脱液体积为 3 BV 时含量达到了最大值，由图可知当上样浓度不变时，洗脱液体积过高或过低都不利于黑果枸杞总黄酮的纯化。图 9-(E)与 9-(F)表示洗脱液浓度和洗脱液体积的交互作用对含量的影响，但二者的交互不明显 $P=0.6482$ 。

3.4.4 验证实验结果分析

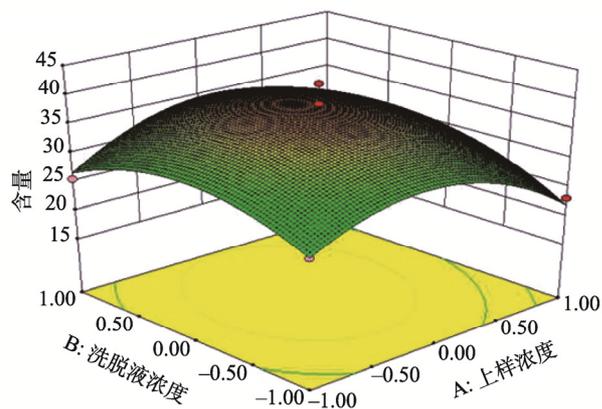
在上样体积 5 BV，上样流速与洗脱液流速均为 2 mL/min，pH 为 4 等条件的基础上，通过优化后的树脂纯化工艺制备得到的 3 批样品，含量基本稳定，平均值为 43.19%，RSD 值为 1.12%，表明响应面法优化得到的纯化工艺参数准确可靠，具有实际应用价值。

4 讨论与结论

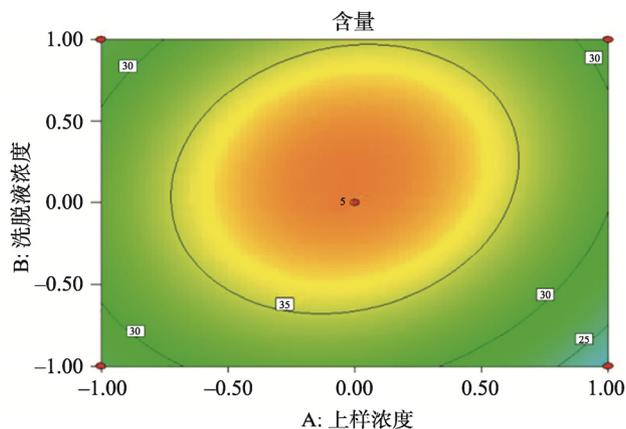
本实验通过考察 D101、AB-8、HPD100、HPD300、NKA-2、NKA-9 型等 6 种不同型号和极性的大孔吸附树脂对黑果枸杞总黄酮的动、静态吸附-解吸性能，并最终通过综合筛选来选出最佳大孔吸附树脂 NKA-9 进行单因素试验。

最新研究表明，黑果枸杞总黄酮中含有芦丁、槲皮素、木犀草素、山奈素和异鼠李素等黄酮类成分及其苷类，总含量黑果枸杞总黄酮含量的 37.14%^[13-15]。由于这些黄酮类化合物富含糖苷键和酚羟基^[16]，极性相对较高。另一方面 NKA-9 型大孔树脂也是一种极性树脂，因此更容易与黄酮类成分结合，有利于黑果枸杞中黄酮类物质的吸附^[17]。而 NKA-9 型树脂平均孔径较为其他树脂都大，洗脱液为极性较大的乙醇溶液，这些条件都有利于总黄酮类物质的解吸，便于洗脱纯化后的总黄酮^[18]。

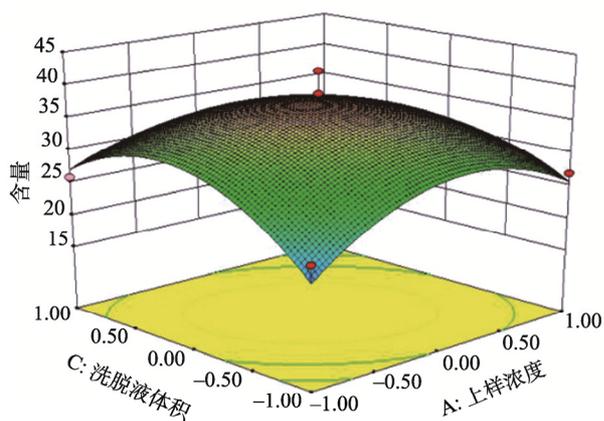
单因素试验主要考察上样体积、上样浓度和上样 pH 对黑果枸杞总黄酮吸附率的影响，洗脱液体积、洗脱液浓度和洗脱流速对黑果枸杞总黄酮解吸率的影响，并且最终从 6 个单因素中筛选出 3 个对纯化工艺影响最大的因素进行响应面优化实验。通过回归方程模拟预测最优纯化条件为：上样浓度 4.0 mg/mL、洗脱液体积 3 BV、洗脱液为 80%乙醇，在此工艺下黑果枸杞总黄酮含量从纯化前的 4.54% 提高到 43.19%，提高了将近 10 倍。综上，该纯化工艺操作简单、参数准确可靠、经济又环保，为黑果枸杞总黄酮后续的研究奠定了一定的基础。



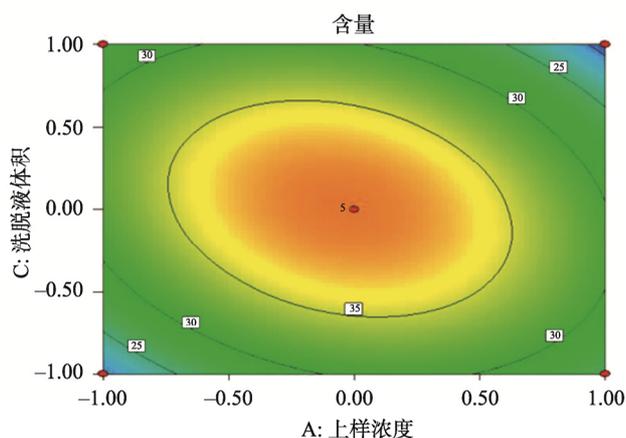
(A) $Y=f(A, B)$ 的响应曲面图



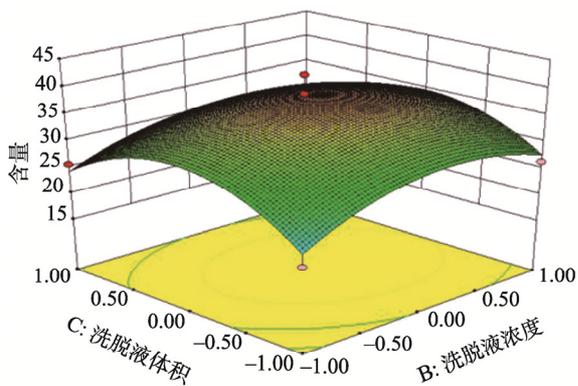
(B) $Y=f(A, B)$ 的等高线图



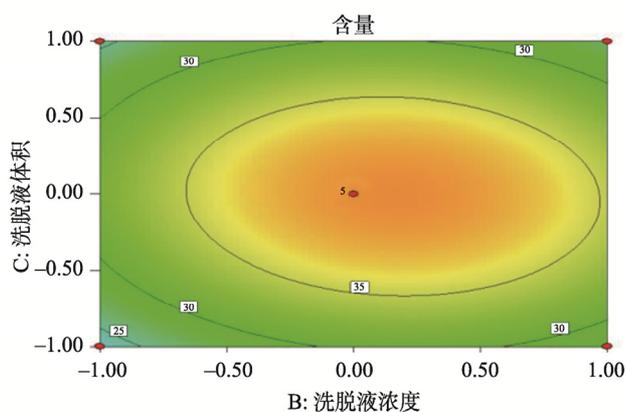
(C) $Y=f(A, C)$ 的响应曲面图



(D) $Y=f(A, C)$ 的等高线图



(E) $Y=f(B, C)$ 的响应曲面图



(F) $Y=f(B, C)$ 的等高线图

图 9 各因素交互影响的响应曲面图

Fig.9 Response surface diagram of the interaction of various factors

参考文献

[1] 高庆超, 常应九, 马蓉, 等. 黑果枸杞色素自然发酵过程中微生物群落的动态变化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 126-133.
Gao QC, Chang YJ, Ma R, et al. Dynamic changes in microbial community during natural fermentation of *Lycium Ruthenicum* Murr.

enzymes [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(13): 126-133.
[2] 杨冬彦, 赵庆生, 赵兵, 等. 黑果枸杞速溶粉营养成分分析及抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2019, 40(1): 203-207.
Yang DY, Zhao QS, Zhao B, et al. The nutritive compositions and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. instant powder [J]. Food Ind, 2019, 40(1): 203-207.

- [3] Zhu Q, Jia WZ, Zhang YJ. Research advances on structural modification of flavonoids [J]. Bull Ferment Sci Technol, 2016, 45(1): 50–54.
- [4] Qi XL, Peng X, Huang YY, *et al.* Green and efficient extraction of bioactive flavonoids from *Equisetum palustre* L. by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation method combined with macroporous resin enrichment [J]. Ind Crops Prod, 2015, 70: 142–148.
- [5] 叶松华, 冯夏珍, 王晓燕, 等. Box-behken 设计优化黄刺玫果总黄酮纯化工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2017, (10): 73–79.
Ye SH, Feng XZ, Wang XY, *et al.* Study on purification of total flavonoids from fruit of *Rosa xanthina* Lindl with the Box-behken design [J]. Chin Food Addit, 2017, (10): 73–79.
- [6] 艾克山·吾拉木, 谭扬扬, 古丽巴哈尔·卡吾力. 黑果枸杞中总黄酮的降脂活性研究[J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(8): 1063–1067.
Ehsan Gh, Tan YY, Gulbahar K. Study on the lipid-lowering activity of Total flavonoids in *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. J Xinjiang Med Univ, 2019, 42(8): 1063–1067.
- [7] 古丽巴哈尔·卡吾力, 高晓黎, 常占瑛, 等. 黑果枸杞总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(22): 213–217.
Gulbahar K, Gao XL, Chang ZY, *et al.* Optimization of extraction process and antioxidant activity of total flavonoids in *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. Jiangsu Agric Sci, 2017, 45(22): 213–217.
- [8] 古丽巴哈尔·卡吾力, 常占瑛, 谢湘云, 等. 黑果枸杞总黄酮固体分散体的制备[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 182–187.
Gulbahar K, Chang ZY, Xie XY, *et al.* preparation process of total flavonoid solid dispersions from black fruit *Lycium barbarum* [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(23): 182–187.
- [9] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of people's republic of China (Vol. 1) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
- [10] 陈建中, 葛水莲, 管立峰, 等. 响应面优化大孔吸附树脂分离纯化茼蒿总黄酮[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(11): 115–120.
Chen JZ, Ge SL, Zan LF, *et al.* Purification of total flavonoids from *Chrysanthemum coronarium* L. with macroporous resins by response surface analysis [J]. Food Ferment Ind, 2015, 41(11): 115–120.
- [11] Wu SH, Wang YY, Gong GL, *et al.* Adsorption and desorption properties of macroporous resins for flavonoids from the extract of Chinese wolfberry (*Lycium barbarum* L.) [J]. Food Bioprod Process, 2015, 93: 148–155.
- [12] 张世明, 姜艳玲, 周洪雷, 等. 响应面法优化鬼针草叶总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 30(5): 21–27.
Zhang SM, Jiang YL, Zhou HL, *et al.* Optimization of macroporous resin purification techniques of flavonoids from bidens leaves by using responsesurface methodology [J]. J Liaoning Univ of Tradi Chin Med, 2017, 30(5): 21–27.
- [13] Peng Q, Xu QS, Yin H, *et al.* Characterization of an immunologically active pectin from the fruits of *Lycium ruthenicum* [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 64: 69–75.
- [14] Chen SS, Zeng Z, Hu N, *et al.* Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. fruit using response surface methodology [J]. Food Chem, 2018, 242: 1–8.
- [15] 张晶, 杨慧海, 刘芳芳, 等. 黑果枸杞的化学成分、药理作用及栽培技术的研究现状[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(7): 673–678.
Zhang J, Yang HH, Liu FF, *et al.* Research Progress of chemical constituents、 pharmacological activity and cultivation techniques of *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. J Food Sci Biotechnol, 2018, 37(7): 673–678.
- [16] 苗修港, 余翔, 张贝贝, 等. NKA-9 大孔树脂纯化香椿叶黄酮类物质工艺优化[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 32–38.
Miao XG, Yu X, Zhang BB, *et al.* Purification of flavonoids from toona sinensis leaves with nka-9 macroporous resin [J]. Food Sci, 2016, 37(8): 32–38.
- [17] 罗磊, 姬清华, 马丽苹, 等. NKA-9 大孔树脂对绿豆皮黄酮的纯化研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 157–167.
Luo L, Ji QH, Ma LP, *et al.* Studies on purification of total flavonoids from mung bean hull using nka-9 macroporous resin [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2019, 19(6): 157–167.
- [18] 李大龙, 崔恩权, 李兴国, 等. 大孔树脂分离纯化黑穗醋栗叶片总黄酮的研究[J]. 中国食品添加剂, 2017, (6): 99–104.
Li DL, Cui EQ, Li XG, *et al.* Study on the separation and purification of total flavonoids from black currant leaves by macroporous resins [J]. Chin Food Addit, 2017, (6): 99–104.

(责任编辑: 王欣)

作者简介



艾克山·吾拉木, 硕士, 主要研究方向为
新药与新剂型。

E-mail: 1298855837@qq.com



古丽巴哈尔·卡吾力, 副教授, 主要研
究方向为
新药与新剂型。

E-mail: guli5573@163.com