

江南卷柏提取物脱脂工艺优选

殷丹^{1,2}, 雷磊¹, 陈科力^{1*}

- (1. 湖北中医药大学 省部共建中药资源和中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065;
2. 武汉生物工程学院, 武汉 430415)

[摘要] 目的: 优选江南卷柏提取物的石油醚脱脂工艺, 为该植物的资源开发与利用提供参考。方法: 以穗花杉双黄酮提取量和浸膏得率为评价指标, 通过正交试验考察石油醚用量、提取时间和提取次数对脱脂工艺的影响。采用 HPLC 测定穗花杉双黄酮含量, 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~5 min, 25% A; 5~12 min, 25%~35% A; 12~17 min, 35%~45% A; 17~25 min, 45%~50% A; 25~40 min, 50%~55% A; 40~45 min, 55%~70% A; 45~50 min, 70%~100% A; 50~55 min, 100% A; 55~60 min, 100%~25% A), 检测波长 330 nm。结果: 最佳脱脂工艺为加 6 倍量石油醚回流提取 2 次, 每次 1 h; 穗花杉双黄酮提取量 72.77 mg, 浸膏得率 11.04%。结论: 该脱脂工艺稳定可行, 适用于江南卷柏提取物的纯化。

[关键词] 江南卷柏; 穗花杉双黄酮; 脱脂工艺; 浸膏得率

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0024-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240024

Optimization of Degreasing Technology of Extracts from *Selaginella moellendorffii*

YIN Dan^{1,2}, LEI Lei¹, CHEN Ke-li^{1*}

- (1. Key Laboratory of Resource and Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine,
Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
2. Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan 430415, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize degreasing technology of extracts from *Selaginella moellendorffii* with petroleum ether, which provides a reference to development and utilization of the plant resources. **Method:** Taking extraction amount of amentoflavone and yield of extract as evaluation indexes, effects of the amount of petroleum ether, extraction time and frequency on degreasing technology were investigated by orthogonal design. The content of amentoflavone was determined by HPLC, mobile phase consisted of acetonitrile (A) -water (B) for gradient elution (0-5 min, 25% A; 5-12 min, 25%-35% A; 12-17 min, 35%-45% A; 17-25 min, 45%-50% A; 25-40 min, 50%-55% A; 40-45 min, 55%-70% A; 45-50 min, 70%-100% A; 50-55 min, 100% A; 55-60 min, 100%-25% A) and detection wavelength at 330 nm. **Result:** Optimum technology conditions were as follows: degreased twice with 6 times the amount of petroleum ether for 1 h per time; extraction amount of amentoflavone was 72.77 mg, yield of extract was 11.04%. **Conclusion:** This degreasing technology is rational and stable, which is available for purification of extracts from *S. moellendorffii*.

[Key words] *Selaginella moellendorffii*; amentoflavone; degreasing process; extract yield

[收稿日期] 20140522(006)

[基金项目] 湖北省科技攻关计划项目(2006AA301B01); 湖北省教育厅项目(B20104604); 武汉市市属高等学校科学研究项目(2009K105)

[第一作者] 殷丹, 博士, 讲师, 从事中药资源及其活性研究, Tel:027-89645560, E-mail: yd410@126.com

[通讯作者] * 陈科力, 教授, 从事中药资源、品质及其活性研究, Tel:027-68890106, E-mail: kelichen@126.com

江南卷柏是卷柏科植物江南卷柏 *Selaginella moellendorfi* Hieron 的干燥全草,具有清热凉血的功效,临床应用广泛^[1]。以其为原料制成的江南卷柏片又名白云山紫癜清,对特发性血小板减少性紫癜疗效显著^[2]。研究表明江南卷柏抗肿瘤^[3-4]、抗病毒^[5-6]的有效成分主要为黄酮类化合物,且以穗花杉双黄酮为主。由于该药材醇提液中含有大量叶绿素等脂溶性杂质,影响了大孔树脂的纯化工艺,致使总黄酮的回收率与纯度降低^[7]。故本实验选择石油醚为脱脂溶剂,采用正交试验优选醇提物干膏的脱脂工艺,为江南卷柏的资源开发与利用提供参考。

1 材料

BP-211D 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司),P680 系列高效液相色谱仪(美国戴安公司)。穗花杉双黄酮对照品^[8](自制,经 HPLC 测定纯度 > 99.0%),江南卷柏醇提物干膏^[9](自制,经 UV 测定总黄酮纯度 > 17.42%),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 穗花杉双黄酮的含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 330 nm,流速 1 mL · min⁻¹,进样量 10 μL,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 25% A; 5 ~ 12 min, 25% ~ 35% A; 12 ~ 17 min, 35% ~ 45% A; 17 ~ 25 min, 45% ~ 50% A; 25 ~ 40 min, 50% ~ 55% A; 40 ~ 45 min, 55% ~ 70% A; 45 ~ 50 min, 70% ~ 100% A; 50 ~ 55 min, 100% A; 55 ~ 60 min, 100% ~ 25% A),柱温 30 ℃。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取减压干燥至恒重的穗花杉双黄酮对照品,加甲醇超声溶解并定容至 10 mL 量瓶中,得 120 mg · L⁻¹对照品溶液。

2.1.3 精密度试验 取对照品溶液,按 2.1.1 项下方法连续进样 5 次,计算穗花杉双黄酮峰面积的 RSD 1.6%,表明仪器精密度良好。

2.1.4 线性关系考察 精密移取穗花杉双黄酮对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 29.477X - 0.709$ ($r = 0.9999$),线性范围 0.24 ~ 1.20 μg。

2.1.5 供试品溶液的制备 称取醇提物干膏 1.0 g,加一定量石油醚回流提取,过滤。取残渣 0.1 g,加甲醇溶解并定容至 100 mL 量瓶中,即得。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液适量,分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果穗花

杉双黄酮峰面积的 RSD 0.9%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称取醇提物干膏 5 份,每份 1.0 g,按 2.1.5 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果穗花杉双黄酮峰面积的 RSD 3.1%,表明本方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取醇提物干膏 6 份,每份 1.0 g,各精密加入穗花杉双黄酮对照品适量,按 2.1.5 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算回收率,见表 1,表明该方法准确可靠。

表 1 江南卷柏中穗花杉双黄酮含量测定加样回收率试验

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
70.53	1.72	72.19	96.5	98.9	2.3
68.46	1.72	70.21	101.7		
72.48	1.74	74.16	97.7		
69.71	1.76	71.40	98.3		
68.87	1.75	70.63	102.3		
67.14	1.74	68.81	97.1		

2.2 浸膏得率的测定 取残渣置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,置烘箱内 105 ℃ 干燥 3 h,取出置干燥器内,冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算浸膏得率。

2.3 脱脂工艺优化 在预试验基础上,选择石油醚用量、提取时间和提取次数为考察因素,每个因素取 3 个水平,以穗花杉双黄酮提取量和浸膏得率为指标,称取江南卷柏醇提物干膏 1.0 g,共 9 份,采用正交试验优化脱脂工艺,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。结果表明各因素对脱脂工艺的影响顺序为 $A > B > C$ 。方差分析表明因素 A 对脱脂效果影响较大,其他因素则均无显著性影响。综合生产成本等考虑,确定最佳脱脂工艺为 $A_1B_1C_1$,即加 6 倍量石油醚回流提取 2 次,每次 1 h。

2.4 验证试验 称取江南卷柏醇提物干膏 1.0 g,共 3 份,按优选的脱脂工艺条件进行验证试验,结果残渣穗花杉双黄酮提取量分别为 72.74, 72.68, 72.90 mg,浸膏得率分别为 10.98%, 11.03%, 11.12%,表明该脱脂工艺稳定可行。

3 讨论

预试验发现直接以石油醚回流提取江南卷柏原药材,溶剂用量较大,脱脂效果较差,故本文将药材以乙醇回流提取制得干膏后再进行脱脂,缩小了体

表 2 江南卷柏提取物石油醚脱脂工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 石油醚用量 /倍	B 提取时间 /h	C 提取数 /次	D(空白)	残渣穗花杉 双黄酮/mg	浸膏得率 /%
1	6	1	2	1	70.30	10.89
2	6	1.5	3	2	71.93	10.72
3	6	2	4	3	72.56	10.94
4	8	1	3	3	66.49	10.55
5	8	1.5	4	1	66.55	10.63
6	8	2	2	2	60.68	10.81
7	10	1	4	2	64.30	10.04
8	10	1.5	2	3	67.68	10.36
9	10	2	3	1	61.01	10.52
穗花杉	K_1	214.79	201.09	198.66	197.86	
双黄酮	K_2	193.72	206.16	199.43	196.91	
	K_3	192.99	194.25	203.41	206.73	
	R	21.80	11.91	4.75	9.82	
浸膏得率	K_1	32.55	31.48	32.06	32.04	
	K_2	31.99	31.71	31.79	31.57	
	K_3	30.92	32.27	31.61	31.85	
	R	1.63	0.79	0.45	0.47	

表 3 脱脂工艺方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
穗花杉 A	102.19	51.10	23.59	<0.05
双黄酮 B	23.82	11.91	5.50	>0.05
C	4.33	2.17	1.00	>0.05
D(误差)	19.56	9.78		
浸膏得率 A	0.48	0.23	13.37	>0.05
B	0.11	0.06	3.22	>0.05
C	0.03	0.02	1.00	>0.05
D(误差)	0.04	0.02		

注： $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

积,节省了石油醚用量,脱脂效果明显。

江南卷柏总黄酮主要含穗花杉双黄酮,质量分数 >80%^[10],故选择穗花杉双黄酮为指标成分,采用 HPLC 进行含量测定,确保了方法的准确性。以残渣穗花杉双黄酮提取量和石油醚浸膏得率作为参考指标,既使得脂溶性杂质脱脂完全,又减少了穗花杉双黄酮的损失,确保了该工艺的科学合理。

[参考文献]

[1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[M]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:36,169.

[2] 吴攀,郑敏翠,李婉丽,等. 江南卷柏片联合西药治疗儿童慢性特发性血小板减少性紫癜临床观察[J]. 中医药导报,2009,15(12):31.

[3] 黎莉,陈科力,朱田密,等. 卷柏属 7 种药用植物的提取物抑制黄嘌呤氧化酶的活性研究[J]. 中药材,2007,30(4):445.

[4] 黎莉,陈科力,朱田密,等. 卷柏属 7 种药用植物的提取物对脂氧化酶的抑制作用[J]. 中国医院药学杂志,2006,26(12):1514.

[5] 殷丹,陈科力. 江南卷柏提取物的体外抗柯萨奇病毒实验[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(4):262.

[6] 殷丹,陈科力. 江南卷柏提取物体外抗单纯疱疹病毒 I 型的实验[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(5):349.

[7] 殷丹,陈科力. 大孔吸附树脂纯化江南卷柏总黄酮的工艺研究[J]. 药物分析杂志,2010,30(11):2040.

[8] 江雪平,陈科力. 江南卷柏中双黄酮类化合物的研究[J]. 中国药学杂志,2009,44(2):96.

[9] 殷丹,陈科力. 正交试验优选江南卷柏总黄酮提取工艺[J]. 中国药房,2010,21(15):1368.

[10] 范晓磊,万定荣,叶丛进,等. 卷柏属药用植物的 HPLC 指纹特征研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(20):2102.

[责任编辑 刘德文]