



薄叶卷柏总黄酮的纯化工艺研究

袁桥玉, 郭 群, 万军梅

(武汉职业技术学院 生物工程学院, 湖北 武汉 430074)

摘 要:建立了一种大孔树脂分离纯化薄叶卷柏中总黄酮的工艺。通过静态、动态吸附及解吸试验,以吸附率和解吸率为主要指标考察各因素对纯化工艺的影响。优选的纯化工艺为:以D-101型大孔树脂为吸附剂,上样液质量浓度 $3.910\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,上样流速为 $2\text{BV}/\text{h}$,最佳上样量为 $19.55\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,水洗至洗脱液无色,再以 $6\text{BV}50\%$ 乙醇洗脱总黄酮,洗脱流速为 $3\text{BV}/\text{h}$ 。所得提取物中总黄酮纯度达 70.55% ,收率为 87.04% 。该优选工艺稳定可行,适用于薄叶卷柏总黄酮的纯化分离。

关键词:薄叶卷柏;大孔吸附树脂;总黄酮;纯化工艺

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2016) 01-0088-03

88

薄叶卷柏是卷柏科植物薄叶卷柏 *Selaginella delicatula* (Desv.) Alston 的全草,别名山柏枝、山扁柏、地柏、岩卷柏、地柏桠、石上柏、四叶柏、独立金鸡。全草供药用,有清热解毒,活血,祛风的功效。主治肺热咳嗽或咯血,肺病;急性扁桃体炎,乳腺炎;烫火伤;月经不调,跌打损伤;小儿惊风,麻疹,荨麻疹等^[1-3],主要分布于长江以南地区。薄叶卷柏中主要含有 Amentoflavone、Robustaflavone、Hinokiflavone 类双黄酮类成分,具有抗肿瘤活性^[4-5]。本研究采用大孔吸附树脂法纯化薄叶卷柏中总黄酮,以总黄酮的含量以及总黄酮的收率为考察指标,为确定卷柏总黄酮的纯化工艺提供实验依据。

一、仪器与材料

Lambda35 型紫外-可见分光光度计(PE 公司);FA2004 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);SHA-B 恒温水浴振荡器(北京成萌伟业科技有限公司);卷柏药材,购自亳州药材市场,由湖北中医药大学药学院陈科力教授鉴定为卷柏科植物薄叶卷

柏 *Selaginella delicatula* (Desv.) Alston 的全草;穗花杉双黄酮对照品(自制,纯度 98.8%);大孔树脂 D-101 型(沧州宝恩吸附材料科技有限公司),大孔树脂 AB-8 型、NKA-9 型(南开大学化工厂),所用化学试剂均为分析纯。

二、方法与结果

(一)薄叶卷柏总黄酮的含量测定

1.对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的穗花杉双黄酮对照品 5.20mg ,置于 100mL 量瓶中,用甲醇溶解,定容,制成质量浓度为 $0.052\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照溶液,摇匀,备用。

2.标准曲线的绘制

精密量取对照品溶液 1.0 、 2.0 、 3.0 、 4.0 、 5.0mL ,置 25mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,以甲醇为空白溶剂,照紫外-可见分光光度法,于 330nm 处测定吸光度。以对照品的质量浓度 X 为横坐标,吸光度 A (Y 值)为纵坐标,建立回归方程: $y=23.97x+0.0026$, $r=0.9997$,结果表明,穗花杉双黄酮在 $2.08-$

收稿日期:2015-11-29

作者简介:袁桥玉(1981-),女,湖北宜都人,硕士,武汉职业技术学院生物工程学院讲师,研究方向:天然药物活性成分研究。

10.40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好线性关系。

3.上样液的制备

称取 100g 薄叶卷柏,加 10 倍量 85%乙醇回流提取 3 次,每次 1h,过滤,合并提取液,减压回收乙醇得粗提液,备用。

4.总黄酮的含量测定

精密吸取 0.1mL 粗提液于 50mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度处,摇匀,再分别吸取 5mL 稀释液于 10mL 量瓶中,在 330nm 处测定吸光度,测得粗提液中总黄酮浓度为 7.82 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 为 2.17%(n=3)。

(二)大孔树脂筛选研究

1.大孔树脂的预处理

取适量树脂,用 95%乙醇浸泡 24h 后,除去树脂碎片和杂物。以乙醇湿法装柱,继续用乙醇冲柱,不时检查流出液,至与水混合不呈白色浑浊为止,然后以大量蒸馏水洗至无醇味,备用。

2.静态吸附-解吸实验

精密称取已预处理好的 3 种型号树脂各 3 份,每份 2g,置 100mL 具塞锥形瓶中,精密加入样品液 20mL 后于恒温水浴振荡器中振摇 12h,静置,滤过,测定滤液中总黄酮质量浓度 C1。将滤出的各树脂另置于 100mL 具塞锥形瓶中,精密加入 95%乙醇 20mL,其余操作同上,得解吸后的滤液,测定解吸液中总黄酮的质量浓度 C2,结果见表 1。

结果表明,用 D-101 型大孔树脂纯化分离黄酮,吸附率和解吸率最高,综合考虑 3 种树脂的吸附与解吸

表 1 3 种大孔树脂的静态吸附与解吸性能

树脂类型	极性	吸附量(mg/g)	吸附率(%)	解吸率(%)
D-101	非极性	19.74	84.16	89.57
AB-8	弱极性	18.89	80.52	83.15
NKA-9	极性	17.95	76.53	80.23

注:吸附量=(C0-C1) V1/m,吸附率=(C0-C1)/C0,解吸率=C2/(C0-C1),式中 C0 为吸附前样液中总黄酮质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),C1 为吸附后样液中总黄酮质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),C2 为解吸后样液中总黄酮质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),V1 为吸附液体积 (mL),m 为树脂质量(g)。

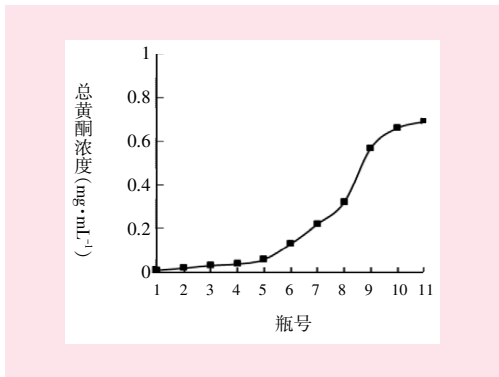


图 1 动态吸附曲线

性能,选择 D-101 型大孔树脂进一步优化纯化工艺。

(三)上样液浓度的确定

取 6 份各 20mL 预处理的 D-101 大孔树脂装柱,分别将总黄酮质量浓度为 0.782 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、2.346 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、3.910 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、5.474 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、7.038 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试液,以 2BV/h 流速上 D-101 树脂柱,进行动态吸附。结果吸附率分别为 76.96%、82.73%、86.57%、87.08%、87.95%。质量浓度在 0.782 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ~3.910 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,吸附率迅速增加,但在质量浓度高于 3.910 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后,吸附率增加幅度不大。且上样液质量浓度过高容易造成树脂内部过饱和堵塞树脂孔隙而影响吸附和解吸附。因此,上样溶液中总黄酮质量浓度为 3.910 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 较适宜。

(四)上样液流速的确定

取 4 份各 20mL 预处理的 D-101 大孔树脂装柱,将质量浓度为 3.910 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液分别以 1BV/h、2BV/h、3BV/h、4BV/h 的不同流速通过树脂柱进行动态吸附,考察不同流速时总黄酮的吸附率,结果吸附率分别为 87.54%、83.17%、75.13%、68.67%。由结果可以看出,吸附率随流速的增大而下降。主要是因为样品液中黄酮还未较好吸附即被洗脱,因 1BV/h 和 2BV/h 流速相比,吸附率差别不大,综合考虑生产效率,确定上样流速为 2BV/h。

(五)上样量的确定

取 20mL 预处理的 D-101 大孔树脂装柱,将浓度为 3.910 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品溶液。110mL 以 2BV/h 流速上样,10mL/瓶收集流出液,测定每瓶流出液中总黄酮的浓度,绘制动态吸附曲线如图 1。

由图 1 可知,当上样量达到 100mL 时,流出液的浓度已基本不变,表明此时树脂在本实验条件下已经达到吸附饱和,故本实验取最佳上样量为 100mL。根据提取中总黄酮的含量可知最佳上样量为 19.55 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 树脂。

(六)洗脱剂浓度的确定

取 20mL 预处理的 D-101 大孔树脂装柱,将质量浓度为 3.910 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品溶液加入大孔吸附树脂柱中,控制流速为 2BV/h,进行吸附。然后分别以 80ml 10%、30%、50%、70%乙醇洗脱,每 10mL 收集一份,测定每份中总黄酮的含量,以总黄酮的含量为纵坐标,以瓶号为横坐标,绘制洗脱曲线如图 2。

洗脱曲线显示:总黄酮主要集中在 50%~70%乙醇洗脱液中,且 50%乙醇洗脱能力最强。因此,选择 50%乙醇作为洗脱剂。

(七)洗脱剂体积的确定

取 20mL 预处理的 D-101 大孔树脂装柱,将质量浓度为 3.910 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液以 2BV/h 的流速上样。然后分别以 160ml 50%乙醇洗脱,每 20mL 收集一份,测定每份中总黄酮的含量,以总黄酮的含量为纵坐标,以洗脱液体积 (BV) 为横坐标,绘制

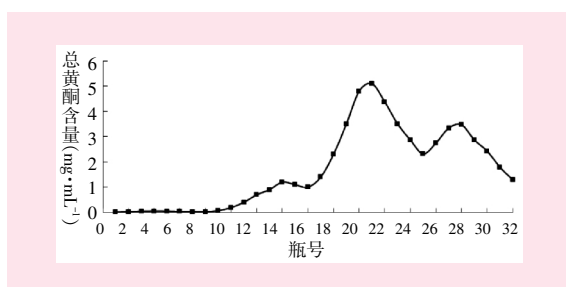


图2 洗脱曲线

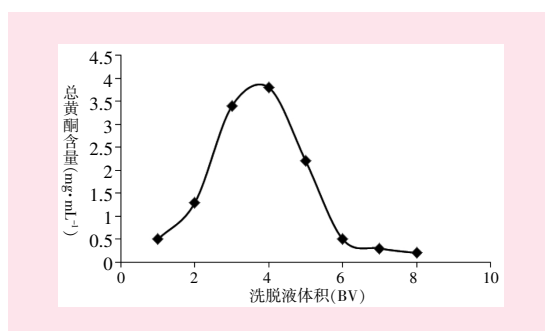


图3 50%乙醇洗脱曲线

洗脱曲线如图3。

结果显示,用50%乙醇洗脱,6BV的洗脱剂即可基本将黄酮完全洗脱。因此,本实验确定最佳洗脱剂的用量为6BV。

(八)洗脱剂流速的确定

取20mL预处理的D-101大孔树脂装柱,将质量浓度为 $3.910\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液以2BV/h的流速上样。120ml 50%乙醇分别以1BV/h、2BV/h、3BV/h、4BV/h的流速洗脱,收集洗脱液。测定洗脱率分别为90.53%、87.93%、86.25%、70.28%。可见,随着流速的增加,洗脱溶剂对总黄酮的洗脱率逐渐降低,2BV/h和3BV/h的洗脱率差别不大,综合考虑,确定最佳洗脱流速为3BV/h。

(九)最佳工艺验证试验

为验证优选工艺的可行性,按照已优选的最佳工艺条件:称取3份预处理后的D-101型大孔树脂,每份20mL,装柱,再取3份质量浓度为 $3.910\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 供试液,每份100mL,以2BV/h流速上样,水洗至洗脱液无色,120mL 50%乙醇洗脱总黄酮,洗脱流速3BV/h,进行3次平行试验,得到的50%乙醇洗脱液浓缩至干,称质量。经测定计算得总黄酮的质量分数和收率,结果总黄酮质量分数分别为70.26%、72.08%、69.32%,收率分别为85.72%、88.25%、87.16%。结果表明在上述工艺条件下D-101型大孔树脂对薄叶卷柏总黄酮的吸附纯化稳定,该提取工艺合理,方案可行。

三、讨论

经对分离纯化工艺参数进行考察,确定了薄叶卷柏中总黄酮的纯化工艺为:质量浓度为 $3.910\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的上样液,以2BV/h的流速上样,上样量为 $19.55\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,水洗至无色,6BV 50%乙醇洗脱总黄酮,洗脱流速为3BV/h。经纯化后的样品,总黄酮的含量达70.55%。该优选工艺稳定可行,可作为分离纯化薄叶卷柏中总黄酮的有效方法。

参考文献:

- [1] 丁恒山.中国药用孢子植物[M].上海:上海科学技术出版社,1982:48.
- [2] 谢宗万.全国中草药汇编(下册)第二版[M].北京:人民卫生出版社,1996:713.
- [3] 广西壮族自治区中医药研究所.广西药用植物名录[M].南宁:广西人民出版社,1986:3.
- [4] Lin LC.Cytotoxic Biflavonoids from *Selaginella delicatula* [J].J.Nat.Prod.,2000,63(5):627.
- [5] Silva GL, et al. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*[J].Phytochemistry,1995,(40):129-134.

[责任编辑:郭群]

The Research of Purification Process of Total Flavonoids from *Selaginella Delicatula*

YUAN Qiao-yu GUO Qun WAN Jun-mei
(Wuhan Polytechnic, Wuhan430074, China)

Abstract: The paper sets out to optimize the purification technology of total flavonoids from the *Selaginella delicatula* by Macro porous resin. The technological conditions of purification are examined by static and dynamic adsorption and desorption experiments, taking the adsorption rate and desorption rate as the main index. D-101 macroporous resin is found to have good adsorption and desorption effects. The optimal purification conditions are as follows: the column liquid concentration is $3.910\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; the adsorption rate is at 2BV/h, with the loaded amount of $19.55\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; the sample is eluted by water and 50% ethanol of 6BV at a flow rate of 3BV/h. The concentration of total flavonoids rises to 70.55% after the purification, and the yield reaches 87.04%. This optimized process is stable, feasible and suitable for separation and purification of total flavonoids from *Selaginella delicatula*.

Key words: selaginella delicatula; macroporous adsorption resin; total flavonoids; purification technology