

大孔树脂同时分离纯化淫羊藿中淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ的工艺优选

任桂友, 刘海萍, 王爽, 李琼, 曾锐*
(西南民族大学民族医药研究院, 成都 610041)

[摘要] 目的: 建立大孔树脂同时分离纯化淫羊藿中淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ的工艺条件。方法: 以淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ的吸附容量、洗脱率为评价指标, 通过静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号, 采用单因素试验优选淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ的吸附和洗脱条件。结果: 选用DM301型大孔吸附树脂, 最佳吸附条件为上样液质量浓度 $7.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 上样液流速 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; 淫羊藿苷洗脱条件为加45%乙醇4 BV以 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行洗脱; 淫羊藿次苷Ⅱ洗脱条件为加60%乙醇5 BV以 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行洗脱; 淫羊藿苷、淫羊藿次苷Ⅱ纯度分别达56.23%, 67.41%。结论: 建立的工艺条件可同时分离纯化淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ, 且稳定性好、收率较高、生产成本低, 适宜于规模化生产推广。

[关键词] 大孔树脂; 淫羊藿; 淫羊藿苷; 淫羊藿次苷Ⅱ; 分离纯化工艺; 静态吸附-洗脱试验

[中图分类号] R284.2; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0005-03

[doi] 10.11653/syfj2014020005

Optimization of Separation and Purification Technology for Icarin and Icarisid II from Epimedii Folium by Macroporous Adsorption Resin

REN Gui-you, LIU Hai-ping, WANG Shuang, LI Qiong, ZENG Rui*
(Ethnic Medicine Institute of Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology of icariin and icariside II from Epimedii Folium by macroporous adsorption resin. **Method:** Taking adsorption capacity and desorption rate of icariin and icariside II as indexes, macroporous resin models were screened by static adsorption-elution test, single factor tests were adopted to investigate adsorption and elution conditions. **Result:** DM301 macroporous resin was the most suitable one for purification of icariin and icariside II, its optimum adsorption conditions were as follows: the concentration of sample solution $7.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, sample flow rate $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; Elution conditions of icariin was eluting with 4 BV 45% ethanol at $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; Elution conditions of icatiside II was eluting with 5 BV 60% ethanol at $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; Under these conditions, purities of icariin and icariside II were 56.23% and 67.41%, respectively. **Conclusion:** These established process conditions could be adopted to separate and purify icariin and icariside II at the same time with good stability, high yield and low production cost, which were suitable for industrial production.

[Key words] macroporous resin; Epimedii Folium; icariin; icariside II; separation and purification process; static adsorption-elution test

[收稿日期] 20130619(002)

[基金项目] 国家“十二五”科技部支撑计划项目(2012BAI27B07);西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2014SZ51)

[第一作者] 任桂友,在读硕士,从事药物制剂、药物分析的研究, Tel:13540108836, E-mail:506189795@qq.com

[通讯作者] *曾锐,博士,副教授,从事药物制剂、药物分析及民族药学研究, Tel:028-85522315, E-mail:Mackzeng@gmail.com

淫羊藿苷为淫羊藿的单体成分之一,具有改善心血管系统、调节内分泌、增强免疫力、性激素样等作用,同时在抗肿瘤、抗肝毒等方面有积极的治疗作用^[1-2]。淫羊藿次苷 II 是近年从淫羊藿中新开发的单体物质,该成分除具有和淫羊藿苷部分相同的药理作用(健骨、性激素样等)外,其改善血管内皮细胞功能尤胜于淫羊藿苷,此外还具有抑制脂质过氧化等抗氧化作用^[3]。目前尚无采用同一大孔树脂分离纯化淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 的研究报道。在前期研究基础上^[3-7],本试验选用煎煮提取工艺,利用静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号,通过单因素试验优选大孔树脂纯化工艺,实现了同一树脂分离纯化淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II,为淫羊藿药材资源的充分利用与工业化生产提供参考。

1 材料

2695/2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),ESJ200-4 型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司),800 型离心机(江苏金坛市正基仪器有限公司)。淫羊藿苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110737-200415),宝藿苷 I(淫羊藿次苷 II)对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 UST-11062309),淫羊藿(购于亳州药材市场,经西南民族大学民族医药研究院刘圆教授鉴定为小檗科植物朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 的干燥叶),D101,DM301,DM-130,AB-8 型大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司),乙腈为色谱纯,水为自制去离子水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿提取液的制备 称取淫羊藿药材 500 g,加 20 倍量水浸泡 1 h,煎煮 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,静置 12 h,取上清液于 60 °C 减压浓缩成浸膏,加 95% 乙醇至含醇量达 60%,静置,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,减压浓缩,制成含淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 总质量浓度约 8.0 g·L⁻¹ 的样品溶液。

2.2 色谱条件 Dikma C₁₈ 色谱柱(4.5 mm × 150 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 7 min,30% A;7 ~ 8 min,30% ~ 45% A;8 ~ 20 min,45% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 270 nm。

2.3 标准曲线的绘制 精密称取适量淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 对照品,分别加甲醇制成质量浓度为 0.112,0.015 3 g·L⁻¹ 的对照品溶液,分别精密吸取 10,12,14,16,18 μL 进样,按 2.2 项下色谱条件测

定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得淫羊藿苷、淫羊藿次苷 II 回归方程分别为 $Y = 7 \times 10^{-7} X + 0.279$ ($R^2 = 0.998 9$), $Y = 5 \times 10^{-7} X + 0.037$ ($R^2 = 0.997 4$),线性范围分别为 1.12 ~ 2.06,0.153 ~ 0.275 4 μg。

2.4 大孔树脂型号筛选 取已处理的 4 种(D101,DM301,DM-130,AB-8 型)大孔树脂各 1 g,分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中,各精密加入淫羊藿提取液 20 mL,静置 24 h,测定滤液中淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 总含量,计算各树脂的吸附量分别为 130.50,143.01,135.58,138.38 mg·g⁻¹。将上述 4 种静态吸附后的树脂过滤,滤纸吸干,用 60% 乙醇溶液 50 mL 洗脱,滤过,回收乙醇,以乙酸乙酯 50 mL 萃取 10 min,回收乙酸乙酯,加入适量 60% 乙醇溶解,滤过,测定滤液中淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 总含量,计算洗脱率分别为 82.12%,88.55%,84.78%,85.35%,故选择 DM301 型大孔树脂。

吸附量 = $(C_{\text{吸附前}} - C_{\text{吸附后}}) \times V_{\text{上样液}} / \text{树脂干重}$;

洗脱率 = $C_{\text{洗脱液}} \times V_{\text{洗脱液}} / (C_{\text{吸附前}} - C_{\text{吸附后}}) \times V_{\text{上样液}} \times 100\%$

2.5 大孔树脂吸附条件优化 选用 5.5 cm × 80 cm 玻璃柱,以 DM301 型大孔树脂填充至高度 46 cm 处,即 1 BV 约 450 mL。

2.5.1 上样液质量浓度 配制含淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 质量一致但总质量浓度分别为 6.03,6.45,7.01,7.45,8.00 g·L⁻¹ 的上样液,以 3 BV·h⁻¹ 的流速过柱,收集流出液,计算淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 的总吸附率分别为 84.63%,86.15%,87.52%,88.47%,87.24%,故选用上样液质量浓度 7.45 g·L⁻¹。

2.5.2 吸附流速 取质量浓度为 7.45 g·L⁻¹ 的上样液 5 份,每份 50 mL,分别以 1,2,3,4,5 BV·h⁻¹ 的流速过 DM301 型树脂柱,收集流出液,测定淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 总含量,计算吸附率分别为 88.94%,88.32%,87.47%,85.05%,82.71%,考虑到随流速增加,上样液与大孔树脂接触时间减少,吸附率降低,而流速太慢又浪费时间,故上样液流速选择 3 BV·h⁻¹。

2.6 大孔树脂洗脱条件考察

2.6.1 洗脱剂浓度 取吸附饱和的 DM301 型大孔树脂,选择体积分数分别为 30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70% 的乙醇溶液各 4 BV 作为洗脱剂,于 1.5 BV·h⁻¹ 的流速下进行洗脱,收集洗脱液,按 2.2 项下色谱条件测定,计算淫羊藿苷洗

脱率分别为 41.37% , 54.62% , 76.93% , 88.15% , 73.18% , 24.52% , 8.65% , 2.37% , 1.03% , 淫羊藿次苷Ⅱ洗脱率分别为 0% , 0% , 0% , 0% , 12.13% , 45.84% , 83.67% , 74.51% , 67.32% 。故选用 45% 乙醇洗脱淫羊藿苷,60% 乙醇洗脱淫羊藿次苷Ⅱ。

2.6.2 洗脱流速 取吸附饱和的 DM301 型大孔树脂,加 45% 乙醇和 60% 乙醇各 4 BV 洗脱,洗脱流速分别为 0.5,1,1.5,2,2.5 BV·h⁻¹,收集洗脱液,按 2.2 项下色谱条件测定,计算淫羊藿苷洗脱率依次为 88.64% , 88.35% , 87.82% , 86.47% , 85.03% , 淫羊藿次苷Ⅱ的洗脱率分别为 83.54% , 83.17% , 82.76% , 81.12% , 79.85% , 综合考虑,两种成分的洗脱流速均选择 1.5 BV·h⁻¹。

2.6.3 洗脱剂用量 取吸附饱和的 DM301 型大孔树脂,加 45% 乙醇和 60% 乙醇于 1.5 BV·h⁻¹ 的流速洗脱,洗脱剂用量分别为 1,2,3,4,5 BV,收集洗脱液,按 2.2 项下色谱条件测定,计算淫羊藿苷洗脱率分别为 52.68% , 59.81% , 68.42% , 79.73% , 88.46% , 88.75% , 淫羊藿次苷Ⅱ洗脱率依次为 50.72% , 58.43% , 65.69% , 72.45% , 78.51% , 83.25% , 表明随洗脱剂用量的增加,洗脱率逐渐增大,而增长率逐渐减小,故综合洗脱率及生产成本考虑,选择淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ的洗脱剂用量分别为 4,5 BV。

2.7 淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ的纯化 量取质量浓度为 7.45 g·L⁻¹ 的上样液 50 mL,以 3 BV·h⁻¹ 的流速通过已处理好的 D301 型大孔树脂柱,饱和吸附 24 h 后,用水洗脱至流出液呈无色,分别加 45% 乙醇 4 BV 和 60% 乙醇 5 BV 以 1.5 BV·h⁻¹ 的流速进行洗脱,分别收集 45% 乙醇和 60% 乙醇洗脱液,回收乙醇,各加乙酸乙酯 100 mL 萃取 10 min,弃水层,回收乙酸乙酯,分别加入 45% 乙醇和 60% 乙醇各 50 mL,超声(200 W)处理 3~5 min,滤过,取上清液,冷藏过夜,析出沉淀,过滤,干燥,按 2.2 项下色谱条件测定,结果 45% 乙醇洗脱液中淫羊藿苷洗脱率 88.46% , 干燥沉淀中淫羊藿苷质量分数达 56.23% ;60% 乙醇洗脱液中淫羊藿次苷Ⅱ洗脱率 83.38% , 干燥沉淀中淫羊藿次苷Ⅱ质量分数 67.41% 。

3 讨论

乙醇洗脱液经乙酸乙酯萃取和 60% 乙醇超声提取,不需精细纯化,只需初步纯化和中度纯化^[8] 便可将淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ的洗脱率提高至 > 80% ,同时纯度得以提高,可减少病人服药量或减少服药次数,提高患者顺应性。

采用同一分离方法中对淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ进行分离纯化,简化了工艺流程,充分利用了药材资源。在整个分离过程中,均未采用二氯甲烷等对人体有害溶剂。大孔树脂是一种具有较强吸附能力的高分子聚合物,可应用于黄酮单体成分的富集纯化,具有吸附容量大、速度快、使用寿命长、可再生等特点,易于工业化生产。分别对淫羊藿采用水煎煮提取和水醇回流提取^[3,9-10],结果发现 2 种方法中淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ的提取率差异不大,故选择水煎煮法进行提取,以简便操作、节约成本。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:306.
- [2] 包宇,杨建雄,孙润广. 淫羊藿苷与淫羊藿次苷Ⅱ的体外抗氧化作用[J]. 吉林大学学报:医学版,2012,38(3):423.
- [3] 曾锐,刘海萍,瞿燕,等. 从淫羊藿中同时提取分离淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ的方法[P]. 中国:201210345102.8,2012-09-18.
- [4] 张利民. 淫羊藿提取物及其生产工艺[P]. 中国:03141371.4,2003-12-10.
- [5] 南京宇道科技开发有限公司. 一种淫羊藿提取物及制备方法、制剂和用途[P]. 中国:200710133883.3,2009-04-29.
- [6] 葛淑兰,田景振. 大孔吸附树脂对淫羊藿总黄酮的分离纯化工艺研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(5):365.
- [7] 金向群,刘永刚,随志刚,等. D140 大孔树脂分离纯化淫羊藿黄酮的研究[J]. 中成药,2004,26(11):872.
- [8] 周国宝. 淫羊藿总黄酮提取及纯化工艺研究[D]. 上海:华东理工大学,2012.
- [9] 赵大洲. 淫羊藿总黄酮的提取工艺、质量标准研究及分离鉴定[D]. 青岛:中国海洋大学,2005.
- [10] 葛淑兰. 淫羊藿的提取纯化工艺优选[J]. 中华临床医学杂志,2004,5(1):40.

【责任编辑 仝燕】