

淫羊藿苷分离方法的研究^{*}

梁 冉,周 乐^{*},刘洪英,王改玲
(西北农林科技大学生命科学院,陕西杨凌 712100)

摘 要: 以淫羊藿甲醇粗提物为原料,以研究规模化分离提纯淫羊藿苷的方法为目的,研究了 4种分离方法的分离效果和可行性。结果表明最佳的分离方法为:用 30%乙醇对淫羊藿甲醇粗提取物进行超声波辅助提取两次,提取液直接流经聚酰胺柱,并用相同溶剂洗柱,浓缩洗脱液至小体积后依次用氯仿和乙酸乙酯分别萃取,乙酸乙酯萃取物中淫羊藿苷的含量为 60%,淫羊藿苷的总收率为 74.11%。经 60%乙醇重结晶一次,得 90.94%含量的淫羊藿苷,总收率为 36.30%。该方法工艺简单,生产成本低,产品收率高,纯度好,是工业化生产淫羊藿苷的理想方法。

关键词: 淫羊藿; 淫羊藿苷; 黄酮苷; 分离

中图分类号: Q 621.16 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2005)02-0141-04

Study on Separation and Purification of Icariin of *Herba Epimedii*

LIANG Ran, ZHOU Le^{*}, LIU Hong-ying and WANG Gai-ling
(College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract To research the industrial methods of isolating icariin from methanol extract of *Herba Epimedii*, four separation methods were designed and tested. The results showed the optimum conditions are as follows. The methanol extract was extracted with 30% ethanol by ultrasonic twice, extract liquid outflowed via polyamide column, outflow were extracted with trichloromethane and ethyl acetate, respectively. The content of Icariin in ethyl acetate extract was 60%, total isolated yield of 74.11%. 90.94% Icariin was obtained after ethyl acetate extract was recrystallized with 60% ethanol once, the total isolated yield of 36.30%. Because this method was easy to operate and has high isolated yield, it was ideal method for industrial production.

Key words *Herba Epimedii*; Icariin; Flavonoid; Separation

淫羊藿 (*Herba Epimedii*)别名仙灵脾,为小檗科淫羊藿属植物^[1],是中国传统的益补中药,具有补肾壮阳、强筋健骨、祛风除湿之功效^[2],常用于治疗阳痿、腰膝无力以及慢性气管炎、神经衰弱和心脑血管疾病^[3]等症。研究表明淫羊藿苷 (Icariin)是其主要活性成分,它是一种 8-异黄酮苷类化合物,具有增加冠脉流量和脑血流量,促进抗体生成,促进 DNA合成以及雄激素样作用^[4]。目前,淫羊藿苷的市场需求正在日益增加,尤其是

中等含量和高含量的产品需求很大,但是关于淫羊藿苷工业化生产的方法研究却一直属于空白。为此,笔者希望通过本研究,为淫羊藿苷的工业化生产提供一种简便易行的分离方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

淫羊藿甲醇粗提物 (含 Icariin 22.78%, HPLC)为自制品, Icariin 标品 (97.22%, HPLC)

^{*} 收稿日期: 2005-01-10 修回日期: 2005-02-22

作者简介: 梁 冉 (1980-),女,在读硕士,主要从事植物化学成分研究

^{*} 通讯作者: 周 乐 (1965-),男,教授,硕士生导师,主要从事天然产物化学及仿生合成化学研究 E-mail: betterz@163.com

为美国 Sigma化学公司产品。

大孔吸附树脂 LSA-30(西安深蓝公司),聚酰胺 14~ 30目(中国医药集团上海化学试剂公司),GF254薄层层析硅胶(青岛海洋化工有限公司)。HPLC用甲醇为色谱纯试剂(天津科密欧化学试剂开发中心),工业乙醇为 95%乙醇,无水乙醇、氯仿和乙酸乙酯均为分析纯试剂。

日本 Jasco 高效液相色谱仪, HF-500B超声循环提取机, BC-R201B旋转蒸发器, KQ-250超声波清洗器, W FH-203三用紫外分析仪, DHG-9075A型电热恒温鼓风干燥箱, FA-1004电子分析天平,不同型号玻璃层析柱

1.2 方法

1.2.1 淫羊藿苷的分离纯化 据淫羊藿苷的结构和理化性质,本研究共设计了 4种分离方案

方法一(M1): 本方法由 5个单元除杂过程组成。

M1-A(溶剂提取): 取淫羊藿甲醇粗提物 17 g(含 Icarin 3.8726 g),用 100 mL无水乙醇超声提取两次,每次 40 min, 50℃,合并两次提取液,减压浓缩至干,称重 测定 Icarin 含量,计算 Icarin回收率和除杂率。

M1-B(水溶): 加 250 mL水溶解浸膏,过滤,收集滤液并测定其中的 Icarin 含量,计算 Icarin回收率和除杂率

M1-C(聚酰胺柱层析): 将上述滤液上聚酰胺柱,依次用水、10%、20%、30%和 40%乙醇各 1 000 mL进行洗脱,分步收集,将各收集液分别减压浓缩至约 80 mL,分别进行 TLC检测,将含目标物部分(10%~ 30%)合并,得溶液I。测定其中的 Icarin 含量,计算 Icarin回收率和除杂率。

M1-D(溶剂萃取): 将溶液I 依次用氯仿萃取 3次(除去极性小的杂质)和乙酸乙酯萃取 3次,每次萃取剂的用量为待萃液体积的 2倍,合并乙酸乙酯相,浓缩后得 1.733 g黄色粉末 测定其中的 Icarin 含量,计算 Icarin回收率和除杂率

M1-E(重结晶): 将上述黄色粉末用 60%乙醇重结晶,得到淡黄色结晶 测定其中的 Icarin 含量,计算 Icarin回收率和除杂率

方法二(M2):

M2-A(溶剂提取): 同 M1-A 将无水乙醇提取液,减压浓缩至 70 mL

M2-B(醇沉): 将上述液加水稀释成 30%(V/V)乙醇溶液,滤去沉淀,收集滤液。

M2-C(聚酰胺柱层析): 将上述滤液上聚酰胺柱,上样完毕直接用 30%乙醇 800 mL洗脱,收集从上样开始的所有流出液和洗脱液,减压浓缩至约 250 mL,得溶液II。

M2-D M2-E 同 M1-D和 M1-E 其中经 M2-D处理后得 4.420 g黄色粉末,再经重结晶后得淡黄色结晶

方法三(M3):

M3-A M3-B M3-C 与方法二的 M2-A M2-B M2-C相同,得方法二中的溶液II。

M3-D(大孔吸附树脂处理): 将溶液II 用水适当稀释后上处理好的 LSA-30大孔吸附树脂柱,依次用水、10%、20%、30%、40%和 50%乙醇各 800 mL进行洗脱,分步收集, TLC检测,将含目标物的主要流份(30%和 40%)合并,减压浓缩,得 5.080 g黄色粉末。

M3-E 同 M1-E,得到淡黄色粉末。

方法四(M4): 本方法由 4个单元除杂过程组成。为了便于比较,4个过程依次编号为 M4-A M4-G M4-D M4-E

M4-A(溶剂提取): 用 30%乙醇代替无水乙醇,采用 M1-A的方法得 30%乙醇提取液。

M4-C(聚酰胺柱层析): 将上述 30%乙醇提取液直接上处理好的聚酰胺柱,上样完毕接着用 1500 mL 30%乙醇洗脱,收集所有柱流出液,减压浓缩至约 300 mL

M4-D M4-E 同 M1-D和 M1-E 其中经 M4-D处理后得 4.750 g黄色粉末,再经重结晶后得淡黄色结晶

1.2.2 检测方法 TLC定性分析采用 GF₂₅₄薄层硅胶板(0.7%聚乙烯醇为粘合剂, 105~ 110℃活化 25~ 30 min),展开剂为氯仿-甲醇(8:2),检识方法为:紫外光(254 nm, 365 nm)照射;碘缸显色;喷洒 5%浓硫酸-乙醇溶液

Icarin的 HPLC定量分析: 色谱条件^[5]为: Jasco PU-2080色谱泵, UV-2070紫外检测器, N2000色谱工作站, Inertsil ODS-C18色谱柱(4.6×250 mm);流动相为甲醇-水(85:15, V/V);流速 1.000 mL/min;检测波长 272 nm;柱温 30℃;进样量 20μL 采用归一法和外标法分别计算 Icarin的相对含量和绝对含量。

1.2.3 回收率和除杂率的计算 每步处理 Icarin的收率(%)=[处理后样品中 Icarin的量(g)/处理前样品中 Icarin的量(g)]×100%

总收率(%) = [(结晶量(g)× Icarin的百分含量) / 3.8726(g)× 100];单步除杂率(%) = [(处理前杂质量(g) - 处理后杂质量(g)÷ 处理前 Icarin的量(g) - 处理后 Icarin的量(g)) ÷ 处理前样品中杂质量(g)] × 100式中, 3.8726(g)为 17 g 甲醇粗提物中含有的 Icarin 量,杂质量(g)= 样品量(g) - 样品中 Icarin的量(g)

2 结果与分析

表 1是 Icarin在 4种分离方法过程中的含量变化,表 2反映的是每种方法的单步处理的 Icarin回收率和除杂率情况。从表 1和表 2可以

看出经 M1-A M2-A M3-A处理后 Icarin的相对含量没有变化,且收率高达 95.6%,绝对含量提高了 11.24%,说明无水乙醇不仅能够选择性地有效溶出 Icarin,而且还能选择性地溶出对 272 nm光有吸收的其它物质。结合本步的除杂率 32.7%,说明除去的是在 272 nm没有吸收的杂质,如糖、无机盐等物质。与前 3种方法不同,方法四采用的溶剂是 30%乙醇。结果表明 Icarin的相对含量、除杂率和绝对含量均较前 3种方法低,但收率却很高(96.12%),这说明本步操作虽然除去杂质质量较少,但 Icarin的损失也小。

表 1 4种方法分离过程中淫羊藿苷的含量变化

Table 1 The content change of icarinn during four purification methods													
方法 Methods	淫羊藿苷相对含量 % Relative content of Icarinn						淫羊藿苷绝对含量 % Absolute content of Icarinn						晶体量 /g Crystal
	原料 Material	A	B	C	D	E	原料 Material	A	B	C	D	E	
M1	40.35	40.35	37.00	4.53	63.20	94.10	22.78	34.25	32.21	38.27	58.08	90.30	0.5048
M2	40.35	40.35	34.76	45.89	63.76	92.08	22.78	34.25	30.52	43.46	59.05	90.01	1.1288
M3	40.35	40.35	34.76	44.26	53.86	90.51	22.78	34.25	30.52	42.14	49.60	89.00	0.9445
M4	40.35	37.35	—	41.39	65.08	92.91	22.78	24.52	—	31.18	60.42	90.94	1.5460

表 2 4种方法分离过程中除杂率和淫羊藿苷收率的比较

Table 2 Removing impurity rate and isolated yield of icarrin of four separation methods											
方法 Methods	除杂率 % Removing impurity rate					淫羊藿苷收率 % Isolated yield of icarinn					淫羊藿苷总收率 % Total isolated yield
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	
M1	39.27	36.00	57.96	50.90	93.03	95.60	49.19	56.15	98.53	45.29	11.77
M2	39.27	19.30	34.20	52.75	93.76	95.60	81.35	97.48	89.08	38.93	26.24
M3	39.27	19.30	40.88	36.79	95.96	95.60	81.35	98.01	85.42	33.36	21.72
M4	15.34	—	33.45	77.69	91.82	96.12	—	92.02	83.67	48.99	36.30

M-B是用水(M1)溶目标物或稀醇(M2)沉淀第一步溶出物中的杂质,该步处理只涉及 M1、M2和 M3,其中 M2和 M3的处理方法相同。由表 1和表 2来看,在 Icarin相对含量和绝对含量方面,两种不同溶剂处理的差异很小,但均较处理前有轻微降低。这说明本步除杂过程中有一定量的 Icarin没有被溶出或被沉淀掉了,这一点也可由二者的 Icarin回收率较低反映出来。在除杂率方面,M1的水溶效果接近 M2醇沉的 2倍,但 M1的 Icarin损失量很大,其回收率仅为 49.19%,远低于 M2或 M3的 81.35%。

比较 M1-C和 M2-C(或 M3-C或 M4-C)的处理结果,可以看出经聚酰胺柱处理后 Icarin相对含量和绝对含量均得到提高,其中相对含量及相对含量的增加值基本相同,M2-C和 M3-C的绝对含量的增幅明显较 M1-C和 M4-C为大。在

除杂率方面,M1-C远高于其它方法,但其回收率也远低于其它方法,仅为 56.15%,其它方法的回收率都在 90%以上。从这一点上来说,用 30%的乙醇水溶液上样并用 30%的乙醇洗脱优于用水溶液上样和梯度洗脱。尽管后者的除杂率很高,但聚酰胺对 Icarin的吸附力很强,其洗脱比较困难,Icarin的色带不集中,导致其损失也大,这也符合聚酰胺的一般吸附规律。

在第四步处理中,除了 M3-D采用大孔树脂处理外,其它方法都是采用溶剂萃取。试验结果显示,M3-D处理后的 Icarin的相对含量和绝对含量均较溶剂萃取法低约 10个百分点,除杂率低 10%~ 4%,而 Icarin的回收率却没有 M1-D和 M2-D高,这说明溶剂萃取的效果要好于大孔树脂处理的效果。尤其值得提及的是 M4-D,虽然其除杂率高达 77.69%,但其 Icarin的回收率仍保

持了较高水平 (83. 67%),其 Icarin的相对含量和绝对含量均为 4种方法中最高的,其中绝对含量已达 60% 以上。到 M-D为止, Icarin的总回收率分别为 25. 99% (M1) 67. 40% (M2) 52. 99% (M3)和 74. 11% (M4),说明 M4方法最好, M2次之。

重结晶 (M-E)的结果显示, 4种方法的除杂率、 Icarin的相对含量和绝对含量均差异不大,但在 Icarin回收率即结晶析出率方面, M3-E和 M4-E则高于其它两种方法约 10个百分点。这可能是由于各方法的前处理不同导致待结晶样品中所含的杂质类型不同,从而引起 Icarin结晶的难易及晶体的析出率也不同。

从最后得到的结晶量和总回收率来看, 4种方法的由高到低的次序均为: M4> M2> M3> M1,其中 M3和 M4的 Icarin总回收率分别约为 26% 和 36%。结晶后各自母液中含有的 Icarin量分别为: 0. 55 g (M1)、 1. 59 g (M2)、 1. 68 g (M3)和 1. 46 g (M4),这表明 M3和 M4的重结晶母液尚有很大程度可重复利用和回收的价值。

3 结论与讨论

从操作工艺、运行成本、除杂效率、目标物回收率和终产品的纯度等几个方面对 4种方法进行综合评价, M4具有操作过程少,工艺简单,运行成本低,目标物回收率高,产品纯度好等优点,可作为规模化生产 Icarin的优选方法。灵活使用该方法可方便地获得 Icarin含量为 30%、60% 和 90%规格的产品。其次 M2也是一个可供选择的不错方法。M3由于使用了价格不菲的大孔树脂及采用了比较繁琐的梯度洗脱,因此该方法应用价值不大。M1由于 Icarin的收率很低也不适宜于规模化生产。

M1-B操作实际上是为 M1-C配制上样液,因此采用了水作为溶剂。尽管采取了超声助溶处理,但仍有多量未溶物,其中含有较多的水溶性较差的 Icarin,这可能是导致目标物收率低的主要原因。在 M2-B和 M3-B中改用醇沉法 (30% 乙醇),不仅除去了约 20%的杂质,还保持了较高的 Icarin收率。正是基于这一结果,笔者在 M4-A

中直接采用了 30%乙醇作为提取溶剂,结果证明该处理的效果并不逊色于 M1-A中的无水乙醇处理。如果考虑到成本问题, M4-A还要优于 M1-A。

从 M1-D、M2-D和 M4-D的试验结果可以看出,该步处理是每种方法中效果最好的一个单元操作,但也是对最后试验结果影响最大的一步。萃取过程中极易发生乳化,且乳化层中还含有一定量的目标物。为了防止乳化和提高萃取的选择性,笔者曾采取在萃取前向待萃取液中加入一定量氯化钠,氯仿萃取前对萃取液进行碱化,乙酸乙酯萃取前再对萃取液进行酸化处理等措施,获得了满意的效果。

参考文献:

[1] 叶丽卡,陈济民. 淫羊藿的药理进展 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(5): 293~ 294.

[2] YE Li-ka, CHEN Ji-min. Advances in pharmacological studies on Herba Epimedii [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2001, 26(5): 293~ 294.

[3] 马慧萍,贾正平. 淫羊藿总黄酮提取分离工艺研究 [J]. 华西药学杂志, 2002, 17(1): 1~ 3.

[4] MA Hui-ping, JIA Zheng-ping. Studies on extraction and separation of total flavonoid of Herba Epimedii [J]. WCF PS, 2002, 17(1): 1~ 3.

[5] 王昌利,宋小妹,武新华,等. 淫羊藿总黄酮提取分离工艺研究 [J]. 中成药, 1996, 18(5): 281~ 283.

[6] WANG Chang-li, SONG Xiao-mei, & WU Xin-hua, ect. Syudy on extracting processes for total flavone of Herba Epimedii [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 1996, 18(5): 281~ 283.

[7] 李文魁,林新. 近年来国内淫羊藿研究概况 [J]. 西北药学杂志, 1995, 10(3): 138~ 141.

[8] LI Wen-kui, LI Xin. Studies on domestic general situation of icariin in recent years. Northwest Journal of Pharmacology, 1995, 10(3): 138~ 141.

[9] 王旭东,姚晨,鲁方平. 淫羊藿提取物中淫羊藿苷含量的 HPLC测定 [J]. 中草药, 2003, 34(8): 717~ 708.

[10] WANG Xu-dong, YAO Chen, LU Fang-ping. Research on content of icariin from Herba Epimedii by HPLC. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2003, 34(8): 717~ 708.