

大孔树脂纯化淫羊藿中朝藿定与淫羊藿苷工艺研究

兰 海, 刘欣妍, 余 玲, 莫诺兰, 张 燕, 郭子右, 吴 清*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: **目的** 考察大孔树脂纯化淫羊藿中朝藿定与淫羊藿苷的最佳工艺条件, 并且对最佳工艺富集部位进行初步表征。**方法** 以朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿苷为检测指标, 采用静态吸附实验对 5 种大孔树脂进行筛选, 通过动态吸附实验考察上柱液质量浓度、最大上样量、上样体积流量、水洗体积、除杂乙醇及洗脱乙醇体积分数、除杂乙醇及洗脱乙醇体积、径高比来优选最佳工艺条件, 最后以 UPLC-Q-TOF/MS、HPLC、紫外分光光度法对最佳工艺富集部位进行表征。**结果** 确定最佳大孔树脂型号为 AB-8, 柱径高比为 1:7, 以生药 0.5 g/mL 的淫羊藿上柱液上样 6 BV, 以 6 BV/h 的体积流量进行动态吸附, 以 5 BV 水和 5 BV 20%乙醇除杂, 以 6 BV 50%乙醇洗脱, 除杂及洗脱体积流量均为 6 BV/h。纯化后总黄酮质量分数为 63.29%, 朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿苷总量为 40.48%, 朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿苷质量分数分别为 1.63%、2.52%、16.36%、5.51%、14.46%。**结论** 经验证实验, AB-8 型大孔树脂纯化淫羊藿中朝藿定与淫羊藿苷的工艺稳定、合理、可行。经化学表征, 富集部位主要为黄酮类成分, 且黄酮类成分中以朝藿定与淫羊藿苷为主, 表明最佳纯化工艺可以用于此类成分的纯化富集。

关键词: 淫羊藿; 大孔吸附树脂; 朝藿定 A1; 朝藿定 A; 朝藿定 B; 朝藿定 C; 淫羊藿苷; UPLC-Q-TOF/MS

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)17-4473-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.015

Purification process of epimedin and icariin from *Epimedium Folium* by macroporous resin

LAN Hai, LIU Xin-yan, YU Ling, MO Nuo-lan, ZHANG Yan, GUO Zi-you, WU Qing

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: **Objective** To investigate the best technological conditions for the purification of epimedin and icariin from *Epimedium Folium* by macroporous resin, and preliminarily characterize the purification fraction of the best technological conditions. **Methods** Five kinds of macroporous resins were screened by static adsorption experiment with the content of epimedin A1, epimedin A, epimedin B, epimedin C and icariin as indexes. The best purification conditions were optimized by the concentration of upper column solution, the maximum sample volume, the upper column flow rate, the volume of water washing, the concentration of removing impurity ethanol and elution ethanol, the volume of removing impurity ethanol and elution ethanol, the column diameter-height ratio through dynamic adsorption experiment. Finally, UPLC-Q-TOF/MS, HPLC and ultraviolet spectrophotometry were used to characterize the purification fraction of the best technological conditions. **Results** The best macroporous resin was AB-8, column diameter-height ratio was 1:7, 6 BV of upper column solution (crude drug 0.5 g/mL) was used for dynamic adsorption at a flow rate of 6 BV/h, 5 BV of water and 5 BV of 20% ethanol were used for impurity removal, and 6 BV of 50% ethanol was used for elution. The flow rate of impurity removal and elution was 6 BV/h. After purification, the total flavonoids content was 63.29%, the total content of epimedin A1, A, B, C and icariin was 40.48%, the content of epimedin A1, epimedin A, epimedin B, epimedin C and icariin was 1.63%, 2.52%, 16.36%, 5.51% and 14.46%, respectively. **Conclusion** The purification process of epimedin and icariin from *Epimedium Folium* by AB-8 macroporous resin is stable, reasonable and feasible. The chemical characterization indicated that the purification fraction was mainly flavonoids, mainly consisting of epimedin and icariin. The optimized purification process can be used for the purification and enrichment of such ingredients.

收稿日期: 2020-04-23

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目 (7192109)

作者简介: 兰 海, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: lanhai_master@163.com

*通信作者 吴 清, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: qwu@vip.sina.com

Key words: *Epimedii Folium*; macroporous adsorption resin; epimedin A1; epimedin A; epimedin B; epimedin C; icariin; UPLC-Q-TOF/MS

淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 为小檗科淫羊藿属 *Epimedium* Linn. 植物, 其性辛、甘、温, 归肝、肾经, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效^[1-2]。随着对淫羊藿化学成分和药理作用研究的不断深入, 除主要活性成分淫羊藿苷外, 朝藿定因含量高、活性强而逐渐受到关注, 淫羊藿中淫羊藿苷及朝藿定 A、B、C 等占淫羊藿黄酮类成分的 40%~50%^[3-4]。淫羊藿苷对神经、骨骼、心血管、免疫、生殖系统疾病都具有一定的治疗作用^[5-7], 朝藿定 A、B、C 均具有抗骨质疏松^[8-11]、抗肿瘤^[12]、雌激素样^[13]等活性, 此外, 实验室前期研究还发现朝藿定与淫羊藿苷对奥沙利铂损伤的周围神经具有明显的保护作用^[14]。因此, 朝藿定与淫羊藿苷是淫羊藿中重要的药效活性成分, 本研究富集此类成分以期进一步研究其神经保护作用, 以及为研究开发淫羊藿新制剂奠定基础。

大孔吸附树脂具有吸附速度快、选择性强、易再生、机械强度大等优点, 尤其适合分离纯化黄酮类成分^[15]。目前, 尚未见朝藿定与淫羊藿苷类成分的大孔树脂纯化工艺研究报道, 且关于淫羊藿总黄酮的大孔树脂纯化工艺研究, 仅以淫羊藿苷为考察指标, 指标较为单一, 而本研究采用多指标能更好的反映大孔树脂对朝藿定与淫羊藿苷有效成分群的吸附性能。朝藿定类成分与淫羊藿苷结构相似且极性相近, 因此, 本研究以 5 种具有重要生理活性的代表性成分(朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿苷)为指标, 采用大孔吸附树脂法对此类成分进行纯化富集。

1 仪器与材料

Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 美国赛默飞公司; UH 5300 紫外可见分光光度计, 日本日立高新技术有限公司; 液相色谱串联质谱仪, Waters UPLC-SYNAPT G2-Si Q-TOF/MS; BT 125D 型电子分析天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; RE-501 旋转蒸发仪、SHB-III 循环水式多用真空泵, 北京神泰伟业仪器设备有限公司; KQ-300VDE 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; BZF 50 型真空干燥箱, 上海 Boxun 公司; TDL-5-A 离心机, 上海安亭科学仪器厂。

淫羊藿药材, 北京三和药业有限公司, 批号

63820401, 经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定为小檗科淫羊藿属植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的干燥叶; 对照品朝藿定 A1(批号 140147-77-9, 质量分数 98%)、朝藿定 A(批号 110623-72-8, 质量分数 98%)、朝藿定 B(批号 110623-73-9, 质量分数 98%)、朝藿定 C(批号 110642-44-9, 质量分数 98%)、淫羊藿苷(批号 110642-44-9, 质量分数 98%), 上海源叶生物科技有限公司; 大孔树脂 D101、AB-8、HPD-400、HPD-600、HPD-826, 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 甲醇、乙腈, 色谱纯, Sigma 公司; 甲酸, 色谱纯, Fisher 公司; 液相用水, 娃哈哈纯净水; 串联质谱仪用水, 屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法同时测定淫羊藿中 5 种指标成分含量

2.1.1 混合对照品储备液的制备 取朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 甲醇配制混合对照品储备液(朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿苷质量浓度分别为 53.94、58.20、145.20、150.61、136.57 $\mu\text{g/mL}$)。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称定富集部位提取物约 8 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱为 Capcell Pak C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~34 min, 25%乙腈; 34~35 min, 25%~41%乙腈; 35~45 min, 41%~25%乙腈; 45~60 min, 25%乙腈; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量为 1 mL/min; 进样量为 10 μL ; 检测波长为 270 nm。此色谱条件下, 供试品和混合对照品溶液的色谱图如图 1 所示, 朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿苷保留时间分别为 17.993、21.208、24.203、27.487、31.868 min; 分离度均大于 1.5, 理论塔板数均大于 6 000, 满足样品分析检测要求。

2.1.4 线性关系考察 精密量取混合对照品储备液 0.5、1、2、4、6、8、10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得一系列质量浓度的混合对照品溶液。按“2.1.2”项下色谱条件进行含量测定。以响应值为纵坐标(Y), 样品质量浓度为横坐标(X), 进行线性回归, 得回归方程分别为朝藿

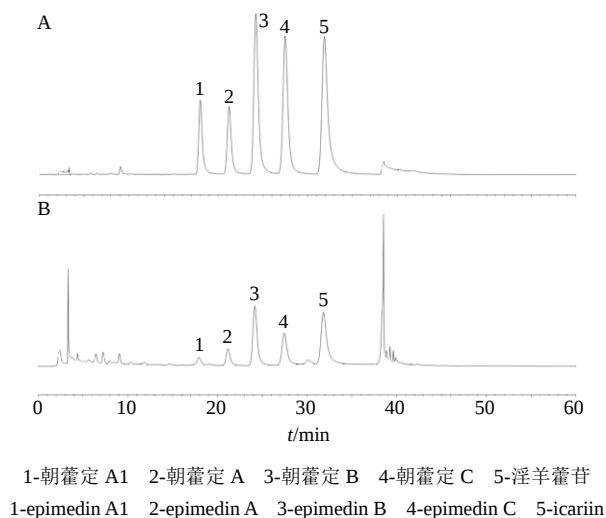


图 1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and sample (B)

定 A1 $Y=0.2877X-0.1533$, $r^2=0.99901$, 线性范围 $2.70\sim53.94\text{ }\mu\text{g/mL}$; 朝藿定 A $Y=0.2708X-0.1468$, $r^2=0.99921$, 线性范围 $2.91\sim58.20\text{ }\mu\text{g/mL}$; 朝藿定 B $Y=0.2916X-0.0209$, $r^2=0.99905$, 线性范围 $7.11\sim145.20\text{ }\mu\text{g/mL}$; 朝藿定 C $Y=0.2603X-0.2426$, $r^2=0.99953$, 线性范围 $7.53\sim150.61\text{ }\mu\text{g/mL}$; 淫羊藿苷 $Y=0.3573X-0.5132$, $r^2=0.99922$, 线性范围 $6.83\sim136.57\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 UPLC-Q-TOF/MS 分析富集部位的成分

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~8 min, 10%~26% 乙腈; 8~12 min, 26% 乙腈; 12~14 min, 26%~30% 乙腈; 14~20 min, 30%~39% 乙腈; 20~22 min, 39% 乙腈; 22~26 min, 39%~44% 乙腈; 26~30 min, 44%~80% 乙腈; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量为 0.2 mL/min; 进样量为 2 μL 。

2.2.2 质谱条件 ESI 离子源, 采用正、负离子模式; 离子源温度和去溶剂化温度分别为 110、400 $^{\circ}\text{C}$; 毛细管电压分别为 3.0、2.5 kV; 氮气体积流量 800 L/h; 扫描范围 m/z 50~1 800; 采样频率及间隔分别为 0.10、0.02 s; 碰撞能量为 20~50 eV。采用 Waters MassLynx V4.1 软件对原始数据进行处理。

2.3 紫外分光光度法测定富集部位总黄酮含量

2.3.1 对照品溶液的配制 精密称取淫羊藿苷对照品适量, 甲醇配制成 35.02 $\mu\text{g/mL}$ 淫羊藿苷对照品溶液。

2.3.2 线性关系考察 参考《中国药典》2015 年版方法测定总黄酮含量^[1], 精密吸取淫羊藿苷对照品溶液 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 得一系列质量浓度的淫羊藿苷对照品溶液。按上述方法制备空白溶液, 在 270 nm 处测定供试品与对照品溶液吸光度 (A) 值, 以 A 值为纵坐标 (Y), 淫羊藿苷对照品质量浓度为横坐标 (X), 作标准曲线并进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.0412X-0.0629$, $r^2=0.99921$, 表明淫羊藿苷在 7.00~17.51 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4 大孔树脂纯化工艺研究

2.4.1 上柱液的制备 取淫羊藿药材 (带柄干燥叶片, 未粉碎) 适量, 加 40 倍量 70% 乙醇超声 1 h, 抽滤, 滤液 60 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至生药 0.2 g/mL, 浓缩液于 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 即得。

2.4.2 大孔树脂的预处理 将大孔吸附树脂用 95% 乙醇煮沸 20 min, 滤过, 并于 95% 乙醇浸泡 24 h 后, 备用。

2.4.3 树脂型号筛选 采用静态吸附实验, 测定比吸附量及解析率筛选最佳树脂型号。称取经预处理的 D101 (非极性)、AB-8 (弱极性)、HPD-400 (中极性)、HPD-600 (极性)、HPD-826 (氢键) 大孔吸附树脂各 2 g (湿质量) 于锥形瓶中, 各加入 100 mL 生药 0.2 g/mL 的淫羊藿上柱液, 室温吸附 24 h, 期间振摇数次, 抽滤至干得吸附后溶液, 定容至 500 mL, HPLC 法测定朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分剩余量, 计算吸附量 (吸附量=上样量-剩余量) 及比吸附量 (比吸附量=吸附量/树脂质量), 结果见表 1。

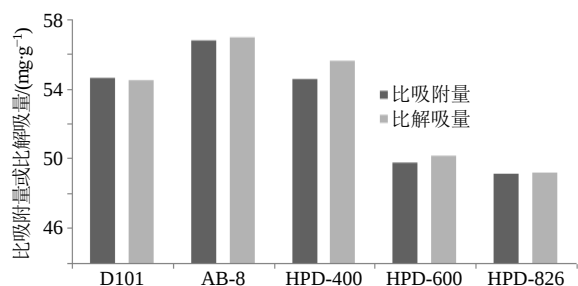
吸附后的树脂加入 100 mL 70% 乙醇, 室温浸泡 24 h, 期间振摇数次, 抽滤至干, 得解析液定容至 500 mL, HPLC 法测定朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的解析量, 并计算解析率 (解析率=解析量/吸附量), 结果见表 2 及图 2。结果表明, 不同极性大孔吸附树脂对朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分均有一定的吸附能力, 其中 D101 (非极性)、AB-8 (弱极性)、HPD-400 (中极性) 型大孔吸附树脂对 5 种成分的吸附能力强于 HPD-600 (极性) 及 HPD-826 (氢键) 型大孔吸附树脂, 且 AB-8 型大孔吸附树脂对 5 种成分的吸附能力最好; D101 型大孔吸附树脂对朝藿定 A1 的解析能力较弱, 其他极性大孔吸附树脂对 5 种成分均能达到基本完全解析。因此, 综合不同极性大孔吸附树脂的吸附及解析效果, 选择 AB-8 型

表 1 大孔吸附树脂对朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的静态吸附量和静态比吸附量 ($n = 2$)Table 1 Static adsorption capacity of epimedin and icariin by macroporous adsorption resin ($n = 2$)

树脂型号	吸附量/mg						比吸附量/(mg·g ⁻¹)					
	朝藿定 A1	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	总量	朝藿定 A1	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	总量
D101	4.20	9.71	35.66	26.25	33.41	109.23	2.10	4.85	17.83	13.13	16.70	54.61
AB-8	4.29	10.02	36.93	27.02	35.33	113.59	2.14	5.01	18.47	13.51	17.66	56.79
HPD-400	4.09	9.71	35.73	26.35	33.23	109.11	2.05	4.86	17.86	13.17	16.61	54.55
HPD-600	3.77	8.69	32.33	23.53	31.19	99.51	1.89	4.34	16.17	11.77	15.59	49.76
HPD-826	3.59	8.49	31.56	23.35	31.24	98.23	1.80	4.24	15.78	11.68	15.62	49.12

表 2 大孔吸附树脂对朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的静态解析率和静态比解析量 ($n = 2$)Table 2 Static desorption ratio of epimedin and icariin by macroporous adsorption resin ($n = 2$)

树脂型号	静态解析率/%						静态比解析量/(mg·g ⁻¹)					
	朝藿定 A1	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	总量	朝藿定 A1	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	总量
D101	79.98	102.60	100.86	97.15	102.52	99.83	1.68	4.98	17.98	12.75	17.12	54.52
AB-8	98.18	103.07	101.52	97.92	100.23	100.28	2.11	5.16	18.75	13.23	17.71	56.95
HPD-400	99.81	111.24	101.90	97.41	103.00	101.90	2.04	5.40	18.20	12.83	17.11	55.60
HPD-600	101.53	102.83	100.73	96.62	103.30	100.77	1.92	4.47	16.28	11.37	16.11	50.14
HPD-826	105.60	104.51	100.89	95.74	100.71	100.09	1.90	4.44	15.92	11.18	15.73	49.16

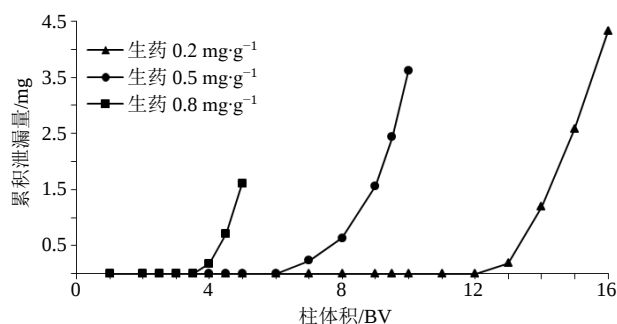
图 2 大孔吸附树脂对朝藿定及淫羊藿 5 种成分加和的静态吸附及解析效果比较 ($n = 2$)Fig. 2 Comparison of static adsorption and desorption effects of macroporous adsorption resin on addition of five components ($n = 2$)

大孔吸附树脂进行下一步研究。

2.4.4 上柱液质量浓度及最大上样量考察 取处理好的大孔树脂 10 mL, 湿法装柱 ($\Phi = 1.2$ cm), 照“2.4.1”项下方法制备质量浓度分别为生药 0.2、0.5、0.8 g/mL 的淫羊藿上柱液, 3 种质量浓度的上柱液以 3 BV/h 的体积流量进行动态吸附。质量浓度为生药 0.2 g/mL 的实验组, 每 1 BV 收集 1 次柱后流出液; 质量浓度为生药 0.5 g/mL 的实验组, 每 1 BV 收集 1 次柱后流出液, 收集 9 BV 后, 每 0.5 BV 收集 1 次; 质量浓度为生药 0.8 g/mL 的实验组, 每 1 BV 收集 1 次柱后流出液, 收集 2 BV 后, 每 0.5 BV 收集 1 次; 采用高效液相色谱法测定上样液及流出液

中朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的总量并计算累积泄漏量及最大上样量时的吸附量, 绘制泄漏曲线, 确定上柱液质量浓度及最大上样量。

由不同质量浓度上柱液的泄漏曲线 (图 3) 可知, 质量浓度为生药 0.2 g/mL 时最大上样量为 12 BV, 质量浓度为生药 0.5 g/mL 时最大上样量为 6 BV, 质量浓度为生药 0.8 g/mL 时最大上样量为 3.5 BV。不同质量浓度上柱液最大上样时的吸附量见图 4, 最大吸附量随质量浓度的增大而减低, 可能与随着上柱液质量浓度增大, 黏稠度增大不易充分吸附有关, 但质量浓度为生药 0.5 g/mL 时的最大吸附量与质量浓度为生药 0.2 g/mL 时无显著性差异。因此, 从节约时间等角度考虑, 确定上柱液质量浓度为生

图 3 不同质量浓度上柱液的泄漏曲线 ($n = 2$)Fig. 3 Leakage curve of upper column solution with different mass concentrations ($n = 2$)

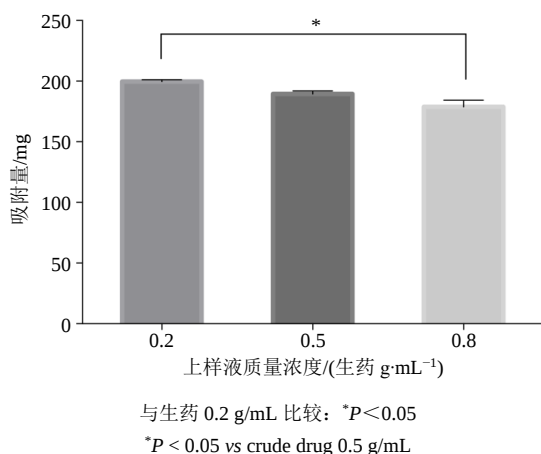


图 4 不同质量浓度上柱液最大上样量时的吸附量 (n = 2)
Fig. 4 Adsorption capacity of maximum sample loading amount of upper column solution at different mass concentrations (n = 2)

药 0.5 g/mL, 最大上样量为 6 BV。

2.4.5 上样体积流量考察 取处理好的大孔树脂 10 mL, 湿法装柱, 6 BV 的生药 0.5 g/mL 的淫羊藿上柱液分别以 3、4、5、6、7 BV/h 的体积流量进行动态吸附试验, 收集最后 1 BV 的流出液, 经高效液相色谱法测定朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的总量, 判断是否出现泄漏。结果显示, 当体积流量达到 7 BV/h 时开始出现泄漏。从节约时间的角度考虑, 确定上样体积流量为 6 BV/h。

2.4.6 水洗体积考察 根据确定的最佳上样条件进行动态吸附, 然后用高纯水以 6 BV/h 的体积流量洗脱 14 BV 以洗除糖等杂质, 每 1 BV 收集 1 次水洗液, 干燥后测定固体去除量, 同时采用高效液相色谱法测定水洗液中朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的总量判断有无泄露。高效液相色谱显示水洗液中不含朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分, 说明高纯水不能将 5 种成分洗脱下来, 高纯水可以作为除杂溶剂, 且由图 5 可知, 水洗除去的杂质主要集中在前 5 BV, 所以确定水洗体积为 5 BV。

2.4.7 除杂乙醇及洗脱乙醇体积分数考察 根据确定的最佳上样条件和水洗条件进行动态吸附和水洗, 再依次用 10%、20%、30%、40%、50%、60%乙醇各洗脱 3 BV, 体积流量为 6 BV/h, 分别测定各浓度乙醇洗脱液中朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的洗脱量, 计算洗脱率及累积洗脱率。

不同体积分数乙醇对朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的洗脱率及累计洗脱率见表 3, 说明 10%、20%乙醇基本不能将 5 种成分洗脱下来, 可以作为除杂

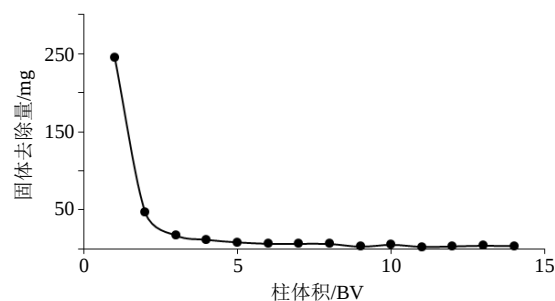


图 5 不同柱体积高纯水洗脱的固体去除量 (n = 2)

Fig. 5 Solid removal of high purity water elution in different column volumes (n = 2)

表 3 不同体积分数乙醇对朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的洗脱能力 (n = 2)
Table 3 Elution capacity of epimedin and icariin by ethanol at different concentrations (n = 2)

乙醇/%	洗脱量/mg	洗脱率/%	累积洗脱率/%
10	0.385 4	0.22	0.22
20	1.685 8	0.96	1.18
30	9.886 4	5.64	6.82
40	69.361 5	39.54	46.36
50	83.531 5	47.62	93.98
60	6.805 6	3.88	97.86

溶剂。由于 20%乙醇除杂能力强于 10%乙醇, 且除杂过程中目标成分几乎无损失, 所以选择 20%乙醇作为除杂溶剂。此外, 目标成分主要集中在 40%及 50%乙醇洗脱液中, 且 50%乙醇的洗脱能力强于 40%乙醇, 因此选择 50%乙醇作为洗脱溶剂。

2.4.8 除杂乙醇体积考察 根据确定的最佳上样条件和水洗条件进行动态吸附和水洗, 分别以 20%乙醇除杂 5、10、15 BV, 然后用 50%乙醇洗脱 5 BV, 体积分数为 6 BV/h, 收集洗脱液, 60 °C 减压干燥并测定出膏量, 干膏经甲醇复溶后, 采用高效液相色谱法测定并计算富集物中朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的总量, 结果见表 4。结果显示, 随除杂体积的增加, 洗脱率降低, 目标成分的损失增加, 且除杂体积对目标成分的含量基本无影响, 故确定除杂

表 4 除杂乙醇体积考察 (n = 2)

Table 4 Investigation on volume of removing impurity ethanol (n = 2)

除杂乙醇体积/BV	出膏量/mg	洗脱率/%	总量/%
5	438.6	82.93	41.08
10	388.6	70.90	39.64
15	346.9	63.82	39.97

乙醇体积为 5 BV。

2.4.9 洗脱乙醇体积考察 根据确定的最佳上样条件和水洗条件进行动态吸附和水洗, 20%乙醇除杂 5 BV, 然后用 50%乙醇洗脱, 流速为 6 BV/h, 每 1 BV 收集 1 次洗脱液, 高效液相色谱法测定洗脱液中朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的总量, 并计算累积洗脱率, 绘制洗脱曲线。

洗脱曲线(图 6)显示 50%乙醇洗脱 4 BV 时累计洗脱率大于 70%, 50%乙醇洗脱 6 BV 时累积洗脱率大于 80%。为进一步考察洗脱乙醇体积对富集物中 5 种成分含量的影响, 用 50%乙醇分别洗脱 4、6、8、10 BV, 体积流量为 6 BV/h, 收集洗脱液, 60 °C 减压干燥并测定出膏量, 干膏经甲醇复溶后, 采用高效液相色谱法测定并计算富集物中朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的总量, 结果见表 5。结果显示, 50%乙醇洗脱 4 BV 的洗脱率明显低于 6、8、10 BV, 而洗脱 6、8、10 BV 的洗脱率没有明显差异, 说明洗脱 6 BV 可以将目标成分基本洗脱下来, 再增加洗脱体积, 洗脱率改变不大, 且洗脱不同体积对 5 种成分的总量没有影响, 故确定 50%乙醇洗脱体积为 6 BV。

2.4.10 柱径高比考察 取处理好的大孔树脂 8、10、11、12、13.5 mL, 湿法装柱 ($\Phi=1.2$ cm), 径高比分别为 1:6、1:7、1:8、1:9、1:10, 生药 0.5 g/mL 的淫羊藿上柱液 6 BV, 以 6 BV/h 的体积流量进行动态吸附, 然后以 5 BV 的水和 5 BV 的

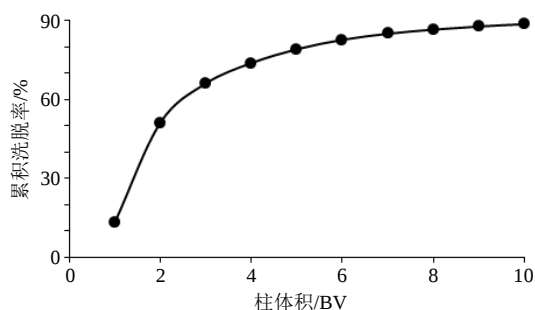


图 6 50%乙醇洗脱曲线 ($n=2$)

Fig. 6 Ethanol (50%) elution curve ($n=2$)

表 5 洗脱乙醇体积考察 ($n=2$)

Table 5 Investigation on volume of elution ethanol ($n=2$)

洗脱乙醇体积/BV	出膏量/mg	洗脱率/%	总量/%
4	444.3	72.70	39.98
6	522.5	89.04	39.86
8	507.5	84.73	39.32
10	520.3	86.56	40.66

20%乙醇除杂, 最后以 50%的乙醇洗脱 6 BV, 除杂及洗脱体积流量均为 6 BV/h, 收集洗脱液, 60 °C 减压干燥并测定出膏量, 干膏经甲醇复溶后, 采用高效液相色谱法测定并计算富集部位中朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的总量, 分别为 40.23%、40.52%、39.90%、40.31%、39.56%。由结果可知不同径高比对含量的影响不大, 其中径高比为 1:7 时含量最高, 确定径高比为 1:7。

2.5 验证实验

取处理好的大孔树脂 10 mL, 湿法装柱 ($\Phi=1.2$ cm), 质量浓度为生药 0.5 g/mL 的淫羊藿上柱液 6 BV 以 6 BV/h 的体积流量进行动态吸附, 然后以 5 BV 的水和 5 BV 的 20%乙醇除杂, 最后以 50%乙醇洗脱 6 BV, 除杂及洗脱体积流量均为 6 BV/h, 收集洗脱液, 60 °C 减压干燥并测定出膏量, 干膏经甲醇复溶后, 采用高效液相色谱法测定并计算富集部位中朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的总量, 进行验证实验, 结果见表 6。结果显示, 平均洗脱率达 88.91%, 朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分的平均总量达 40.64%, 该工艺重复性良好。

表 6 验证实验 ($n=3$)

Table 6 Verification test ($n=3$)

试验号	出膏率/%	洗脱率/%	总量/%
1	1.77	89.04	39.93
2	1.76	88.74	40.78
3	1.74	88.96	41.21
平均值	1.76	88.91	40.64
RSD/%	0.01	0.13	0.53

2.6 最佳工艺富集部位的化学表征

2.6.1 最佳工艺富集部位的 UPLC-Q-TOF/MS 成分分析 通过 UPLC-Q-TOF/MS 分析最佳工艺富集部位的主要成分, 得到富集部位的正、负离子 BPI 色谱图(图 7)。通过文献查阅^[16-17], 并且对其裂解规律进行分析, 对其中的主要成分进行归属, 定性鉴别了富集部位中的 9 个成分, 结果见表 7。

2.6.2 最佳工艺富集部位中朝藿定 A1、A、B、C 和淫羊藿苷及总黄酮含量测定 根据已建立的朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿苷、总黄酮含量测定方法对富集部位朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿苷、总黄酮进行含量测定, 结果见表 8。富集部位的总黄酮质量分数为 63.29%, 朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分总量为 40.48%, 朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿

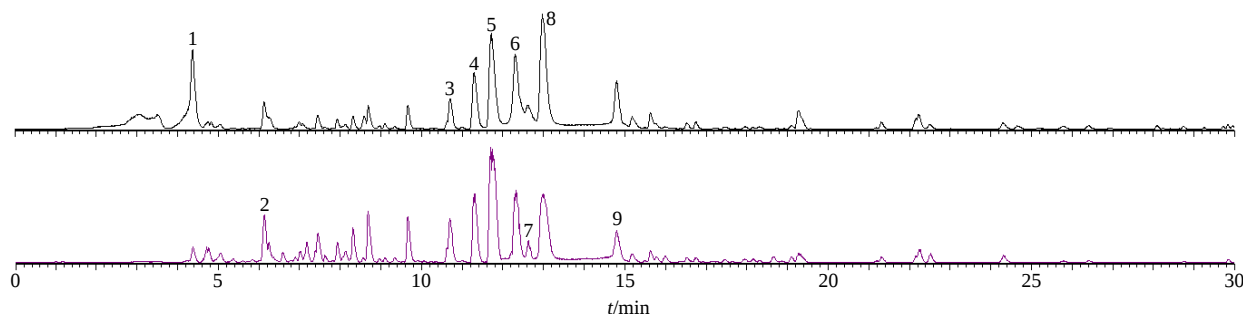


图 7 富集部位的正离子 (A) 及负离子 (B) 的 BPI 色谱图

Fig. 7 BPI chromatogram of positive (A) and negative (B) ions of enrichment fraction

表 7 富集部位的 UPLC-Q-TOF/MS 成分分析

Table 7 Components detected by UPLC-Q-TOF at enrichment fraction

编号	t_R/min	离子	MS	MS ²	分子式	化合物
1	4.37	$[\text{M}+\text{H}]^+$	342.183 9	297、265、237、165	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4$	木兰花碱
2	6.14	$[\text{M}-\text{H}]^-$	463.092 9	463、301	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	金丝桃苷
3	10.67	$[\text{M}+\text{H}]^+$	839.364 4	677、531、369、313	$\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{20}$	朝藿定 A1
4	11.30	$[\text{M}+\text{H}]^+$	839.351 7	677、531、369、313	$\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{20}$	朝藿定 A
5	11.71	$[\text{M}+\text{H}]^+$	809.342 7	677、531、369、313	$\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_{20}$	朝藿定 B
6	12.33	$[\text{M}+\text{H}]^+$	823.351 6	677、531、369、313	$\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{19}$	朝藿定 C
7	12.63	$[\text{M}+\text{FA}-\text{H}]^-$	867.280 3	659、513、367	$\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{19}$	宝藿苷 VI
8	12.97	$[\text{M}+\text{H}]^+$	677.284 1	531、369、313	$\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$	淫羊藿苷
9	14.80	$[\text{M}+\text{FA}-\text{H}]^-$	865.261 2	657、513、367	$\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{O}_{19}$	anhydroicaritin-3-O-rhamnoside (1-2)-furan acid-7-O-glucoside

表 8 富集部位朝藿定 A1、A、B、C、淫羊藿苷及总黄酮质量分数 ($n=2$)

Table 8 Content of epimedin A1, A, B, C, icariin and total flavonoids at enrichment fraction ($n=2$)

批次	质量分数/%					
	朝藿定 A1	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	总黄酮
1	1.53	2.52	15.78	5.69	13.70	62.64
2	1.60	2.86	16.37	6.14	14.24	63.70
3	1.59	2.59	16.19	6.08	14.04	63.09
4	1.65	2.09	16.35	5.28	14.56	63.09
5	1.65	2.88	16.56	4.83	14.87	65.06
6	1.77	2.19	16.89	5.02	15.35	62.18
平均值	1.63	2.52	16.36	5.51	14.46	63.29

苷的质量分数分别为 1.63%、2.52%、16.36%、5.51%、14.46%，综合 UPLC-Q-TOF 成分分析结果，说明富集部位主要为黄酮类成分，且黄酮类成分中以朝藿定与淫羊藿苷为主，表明优选的最佳纯化工艺可以用于此类成分的纯化富集。

3 讨论

淫羊藿中除淫羊藿苷外，仍有多种成分具有较强的药理作用，仅淫羊藿苷的含量并不能完全反映

淫羊藿药材的质量，近年来的研究主要将朝藿定 A、B、C 及淫羊藿苷作为质量控制指标成分，以求科学、客观的反映淫羊藿药材内在质量^[18-21]，而且实验室前期研究发现朝藿定与淫羊藿苷对奥沙利铂损伤的周围神经具有明显的保护作用，因此，研究朝藿定和淫羊藿苷类成分的纯化工艺对淫羊藿的进一步研究与开发是十分必要的。

大孔吸附树脂型号众多，所以在筛选时应综合

多种指标对多种型号的树脂进行比较,选出适合目标成分分离纯化目的的树脂^[22]。因此,本研究以朝藿定 A1、A、B、C 及淫羊藿苷 5 种成分的吸附量、比吸附量及解析率为指标,对极性不同的 D101、AB-8、HPD-400、HPD-600 和 HPD-826 树脂进行筛选,最终优选得到 AB-8 型大孔吸附树脂对目标成分的吸附及解析能力均较好。

对于同样浓度的溶液,吸附流速过大,成分来不及与树脂吸附,就会提前泄露,导致树脂吸附量降低,而吸附流速过小则会大大增加吸附时间,在实际应用中应综合考虑吸附效果和工作效率确定最佳吸附体积流量^[23]。因此,本研究选择先在较小的体积流量下考察最大上样量,再根据最大上样量确定不会发生泄漏的最大上样体积流量,从而在保障树脂吸附效果的同时提高工作效率。

由于本实验富集的目标成分主要集中在 50% 乙醇洗脱液中的中等极性成分,故水洗可以除去大极性的糖类等杂质,多数研究采用 Molish 反应判断水洗的终点,但在前期预实验中发现水洗至第 20 BV 时, Molish 反应仍呈阳性,并不适合本研究水洗终点的判断。水洗的目的是除去非目标成分的杂质,故本研究在确定水洗不能洗脱下目标成分的前提下,以水洗的固体除去量,即杂质去除量为指标,考察水洗体积。

大孔吸附树脂对目标成分分离纯化的效果主要受 2 个方面影响,一是目标成分与大孔树脂本身的性质,二是大孔吸附树脂应用过程中的药液质量浓度、除杂及洗脱溶剂种类和用量、径高比等工艺参数^[24]。大量研究均采用目标成分的解析率为指标对上述影响因素进行考察,而本研究为获得纯度(含量)较高的目标成分,故除解析率外,还选择了洗脱部位中目标成分的含量为指标,对大孔树脂纯化富集过程中的主要工艺参数进行考察。

由实验结果可知,对于本研究富集的目标成分,仅除杂及洗脱溶剂种类对洗脱部位目标成分含量有影响,而除杂及洗脱溶剂体积、径高比在一定范围内无影响。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Reb L, Guo M Y, Pang X H. Identification and classification of medicinal plants in *Epimedium* [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(3): 249-254.
- [3] Chen X J, Guo B L, Li S P, et al. Simultaneous

determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1163(1/2): 96-104.

- [4] Zhang H F, Yang T S, Li Z Z, et al. Simultaneous extraction of epimedin A, B, C and icariin from *Herba Epimedii* by ultrasonic technique [J]. *Ultrason Sonochem*, 2008, 15(4): 376-385.
- [5] 尤旭,赵海霞,杨思琪,等.淫羊藿苷激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(12): 2915-2921.
- [6] 路宇仁,陈映冰,崔元璐,等.淫羊藿苷药理作用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(17): 209-220.
- [7] Chen X J, Tang Z H, Li X W, et al. Chemical constituents, quality control, and bioactivity of *Epimedium Folium* (Yinyanghuo) [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(5): 783-834.
- [8] 蒋俊,崔莉,孙娥,等.基于淫羊藿黄酮类化合物的体内代谢阐述其抗骨质疏松药效物质基础 [J]. *中草药*, 2014, 45(5): 721-729.
- [9] 詹扬,韦英杰,孙娥,等.二维斑马鱼模型联合色谱技术评价朝藿定 A 及其代谢物宝藿苷 I 抗骨质疏松活性 [J]. *药学报*, 2014, 49(6): 932-937.
- [10] 詹扬,韦英杰,王长梅,等.基于斑马鱼模型评价微量淫羊藿苷和朝藿定 B 的抗骨质疏松活性 [J]. *中国药理学杂志*, 2014, 49(1): 30-35.
- [11] 黄冕,冯晶,钟再选,等.相同摩尔浓度下淫羊藿苷及朝藿定 C 单体在斑马鱼骨质疏松模型中的活性研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(8): 986-990.
- [12] 王婷,张金超,陈瑶,等.6 种淫羊藿黄酮抗氧化和抗肿瘤活性的比较 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(8): 715-718.
- [13] Islam M N, Kim U, Kim D H, et al. High-performance liquid chromatography-based multivariate analysis to predict the estrogenic activity of an *Epimedium koreanum* extract [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(5): 923-927.
- [14] Lin H M, Lin L F, Xia Z Z, et al. Neuroprotective effects and UPLC-Q-TOF/MS-based active components identification of external applied a novel Wen-Luo-Tong microemulsion [J]. *Artif Cell Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(8): 1981-1991.
- [15] 刘丹,吴叶红,李玮桓,等.大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用 [J]. *中草药*, 2016, 47(15): 2764-2770.
- [16] 马文娟,姚广哲,贾琪,等.UPLC-Q-TOF-MS/MS 法定性分析淫羊藿中的化学成分 [J]. *中药材*, 2019,

- 42(7): 1554-1559.
- [17] Wang Y Q, Guo Z M, Jin Y, *et al.* Identification of prenyl flavonoid glycosides and phenolic acids in *Epimedium koreanum* Nakai by Q-TOF-MS combined with selective enrichment on “click oligo (ethylene glycol)” column [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(3): 606-616.
- [18] 袁 航, 曹树萍, 陈抒云, 等. 淫羊藿的化学成分及质量控制研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3630-3640.
- [19] 欧阳慧子, 何 俊. 淫羊藿化学成分分析及其药代动力学研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(3): 219-227.
- [20] 于 霄, 宋 静, 熊志立, 等. 一测多评法测定淫羊藿中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3310-3313.
- [21] 张华峰, 高 翔, 卢大炎, 等. HPLC 法同时测定淫羊藿中朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷的含量 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(2): 198-201.
- [22] 宋 丹, 张永文. 试谈中药提取工艺中使用大孔吸附树脂纯化的研究要求与评价 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(7): 745-749.
- [23] 刘江波. 大孔吸附树脂分离纯化黄酮类化合物的规律性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [24] 陈佳亮. 大孔吸附树脂在中药分离纯化应用中影响因素研究 [D]. 北京: 北京工业大学, 2012.