

谨以此文庆贺张玉奎院士七十华诞

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2011.00932

工业制备高效液相色谱法制备淫羊藿中的黄酮系列对照品

高明哲, 王莉, 彭杰, 肖红斌*

(中国科学院分离分析化学重点实验室, 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要:淫羊藿甙和朝藿定 A、B、C 是淫羊藿中重要的活性成分,本研究应用工业制备高效液相色谱从淫羊藿粗提物中分离制备了这 4 个成分。淫羊藿粗提物经大孔吸附树脂粗分离获得相应的组分后,利用工业制备高效液相色谱完成精制纯化。采用自装填 Chromatorex C₁₈ 制备柱(220 mm×77 mm, 10 μm),乙腈-水(26:74 或 30:70, v/v)为流动相进行洗脱,在 35 min 内,实现了这 4 种成分的基线分离及规模制备。从 300 g 粗提物(总黄酮含量约 20%)中获得淫羊藿甙 33 g、朝藿定 C 4.6 g、朝藿定 B 3.7 g 和朝藿定 A 0.6 g,产品纯度均达到 98% 以上。此方法通过两步分离即可实现这 4 种成分的完全分离,具有快速高效、产品纯度高的特点,适于淫羊藿中淫羊藿甙、朝藿定 A、B、C 系列对照品的规模制备。

关键词:工业制备;高效液相色谱;黄酮类化合物;淫羊藿甙;朝藿定 A、B、C;对照品;淫羊藿

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2011)09-0932-05

Preparation of flavonol glycoside reference standard series from *Epimedium brevicornum Maxim* using pilot-scale preparative high performance liquid chromatography

GAO Mingzhe, WANG Li, PENG Jie, XIAO Hongbin*

(CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: Icariin and epimedins A, B, C are a series of active flavonol glycoside in *Epimedium brevicornum Maxim*. A pilot-scale preparative high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed to purify the four flavonol glycosides as reference standards from the crude extract of *Epimedium brevicornum Maxim*. After the crude extract containing ~20% flavonols was enriched using macropore resin, the obtained target fractions were subjected to pilot-scale preparative HPLC purification. With the aid of a self-packed pilot-scale preparative column (220 mm×77 mm, 10 μm), the 4 target compounds were separated well within 35 min in a single chromatographic run by the elution with acetonitrile-water (26:74 or 30:70, v/v). By repetitive injection of the enriched target fraction onto the preparative column, 33 g icariin as well as 4.6 g epimedin C, 3.7 g epimedin B, and 0.6 g epimedin A were obtained from 300 g crude extract. The purities of all products were greater than 98%. This pilot-scale preparative HPLC technique and the two step separation technology for 4 target compounds are quite useful for the production of the reference standard series with good purity like icariin, epimedins A, B, C standards due to its high performance, rapid separation and more amounts of products obtained.

Key words: pilot-scale preparation; high performance liquid chromatography (HPLC); flavonol glycosides; icariin; epimedins A, B, C; reference standard series; *Epimedium brevicornum Maxim*

* 通讯联系人:肖红斌,博士,研究员,主要从事中药药效物质的高效分离、分析检测。Tel: (0411)84379756, E-mail: hbxiao@dicp.ac.cn.

基金项目:国家重大新药创制课题(2009ZX09502-023)、国家“十二五”计划项目(2011ZX11307)和中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-YW-R-209).

收稿日期:2011-07-28

中药化学对照品是药品检测中使用的参比物质,用于确定中药的真伪和评价药品质量的优劣。我国现行中药质量控制采用单一化合物含量测定的方法进行质量控制;而更加符合中医药理论的多指标成分的质量控制方法也在推广,如 2005 年出版的《香港中药材标准》中规定采用人参皂苷 Rb1、Rc、Rf、Rg1、F11 和 Re 等 6 种活性成分进行人参质量控制;采用黄芪皂苷 IV 等 5 个特征指纹峰进行黄芪指纹图谱鉴别^[1]。中药材单成分、多成分和指纹图谱质量控制都需要大量的中药化学对照品。

淫羊藿是一味使用历史悠久的中药,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效,其活性成分为黄酮类化合物,包括淫羊藿甙(icariin)、朝藿定(epimedin)A、B、C(见图 1)等。《中国药典》(2010 年版)规定以淫羊藿甙为对照进行总黄酮和淫羊藿甙含量的测定,以朝藿定 C 为对照进行巫山淫羊藿含量的测定^[2]。目前,中国食品药品检定研究院仅可以提供含量测定用的淫羊藿甙和朝藿定 C 对照品,缺少其他黄酮类化学对照品用于系统的质量控制。淫羊藿中的黄酮类成分可以通过硅胶柱色谱、逆流色谱等多种方法制备^[3-9],其中反相液相色谱分离制备淫羊藿黄酮类成分已有文献报道,但所得产物的纯度低,仅可以作为定性鉴别用^[8],或仅进行单一化合物的制备,不能同时完成系列对照品的制备^[9]。本研究采用制备型反相高效液相色谱法(RP-HPLC),在 35 min 的分离时间内完成淫羊藿中 4 种黄酮类对照品的分离,制备获得了纯度大于 98% 的淫羊藿甙和朝藿定 A、B、C 对照品。本方法高效快速,所得产品纯度高,适于淫羊藿黄酮系列对照品的制备。

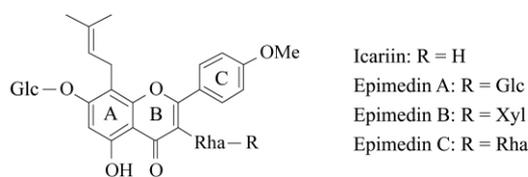


图 1 淫羊藿中 4 种黄酮类成分的结构

Fig. 1 Structures of four flavonol glycosides in *Epimedium brevicornum Maxim*

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Varian Load & Lock 动态轴向加压装柱系统; Varian 218 恒流泵(美国 Varian 公司); Waters 486 紫外检测器(美国 Waters 公司); Rheodyne 3725i 进样阀(配 20 mL 定量环); Waters 2695 液相色谱仪(美国 Waters 公司); Thermo-Fisher TSQ 质谱仪

(美国 Thermo-Fisher 公司); 上海申生 1001 型旋转蒸发器。实验数据通过 JS-3070 工作站(大连江中分离科学技术公司)采集并处理。

制备柱的装填:在 550 g 10 μm 的 Chromatorex C₁₈ 填料中加入甲醇配制成 300 g/L 的匀浆液,超声脱气 2 次,每次 10 min。超声脱气时摇动匀浆液避免填料沉降。将处理好的匀浆液倒入预先安装好柱头压缩活塞的柱管中,迅速安装柱尾密封后,在 7 MPa (1 000 psi) 下压缩,即获得制备柱。

总黄酮类含量为 20% 的淫羊藿提取物(西安小草植物科技有限公司);淫羊藿甙、朝藿定 C 对照品(供含量测定用,中国食品药品检定研究院),乙腈(色谱纯,美国 Thermo Fisher 公司);实验用水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 样品分析

取少量淫羊藿提取物用甲醇溶解配制成质量浓度为 1 g/L 的溶液,采用高效液相色谱-紫外检测/质谱法(HPLC-UV/MS)测定提取物的组成。

HPLC 条件: Hypersil C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 大连依利特分析仪器有限公司);流动相:乙腈-水(30:70, v/v);流速:1 mL/min;检测波长:254 nm;进样量:10 μL 。

MS 条件:电喷雾电离(ESI)源,正离子模式检测;氮气作为夹套气和辅助气,夹套气压力为 276 kPa (40 psi),辅助气流量为 20 au,加热毛细管温度为 300 $^{\circ}\text{C}$,雾化温度为 400 $^{\circ}\text{C}$,喷雾电压为 4.5 kV,粒子扫描范围为 m/z 300~1 200,进样分流比为 1:4。

1.3 样品粗分离

将 300 g 淫羊藿提取物用乙醇溶解后,上样至 HPD-100 大孔吸附树脂柱(850 mm \times 80 mm)进行样品粗分离,依次用水、30% (v/v, 下同)乙醇水溶液、40% 乙醇水溶液、50% 乙醇水溶液洗脱;分别收集 40% 乙醇水溶液和 50% 乙醇水溶液的洗脱液,减压浓缩,获得组分 I 和组分 II。将两组分分别用甲醇溶解配制成质量浓度为 30 g/L 的溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用于样品的精分离。

1.4 样品的精分离

组分 I 的色谱制备条件 自装填的 Chromatorex C₁₈ 柱(220 mm \times 77 mm);流动相:乙腈-水(26:74, v/v);流速:160 mL/min;检测波长:270 nm;进样量:10 mL。

组分 II 的色谱制备条件 流动相:乙腈-水(30:70, v/v);其他色谱条件同组分 I 的制备。

多次进样,收集目标化合物所在流分,减压浓缩

后,置于烘箱内干燥,获得目标化合物。

2 结果与讨论

2.1 样品分析

提取物的化学组成决定了中药化学对照品的制备可行性和生产成本。理想的样品应具有获得容易、价格适当、组成简单、目标成分含量高、杂质含量少等特点。以原药材为原料可以保证样品的来源,但需要大量简单的提取工作;以提取物为原料则可以减少这种简单的提取工作,节省时间,提高效率。比较了多家公司不同提取物的化学组成,其中西安小草植物科技有限公司产的含量为 20% 的淫羊藿提取物含有全部 4 个目标成分,故选择其作为原料进行后续的对照品制备工作。图 2 为含量为 20% 的淫羊藿提取物样品的 HPLC-MS 总离子流图,以淫羊藿甙为对照,测得淫羊藿甙和朝藿定 A、B、C 的含量分别为 15%、2%、1.5%、0.3%。

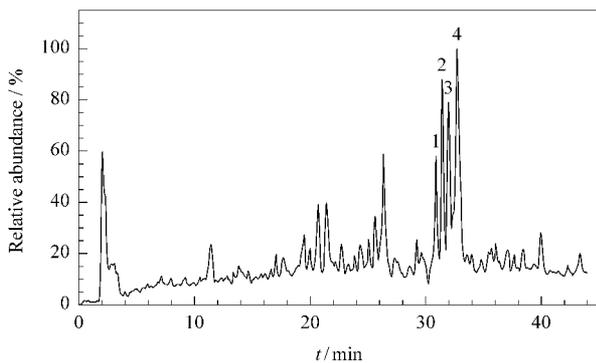


图 2 淫羊藿粗提物的总离子流图

Fig. 2 Total ion current chromatogram of the crude extract of *Epimedium brevicornum Maxim*

Peak identifications: 1. epimedin A; 2. epimedin B; 3. epimedin C; 4. icariin.

2.2 样品粗分离

黄酮苷化合物为中强极性化合物,大孔吸附树脂是此类成分常用的分离材料,具有吸附容量大、抗污染能力强的特点,故实验选择 HPD-100 型大孔吸附树脂柱进行淫羊藿黄酮苷的粗分离^[10]。

将 20% 淫羊藿提取物上样后,用不同含量的乙醇水溶液洗脱,HPLC 分析各洗脱液的组成,发现:40% 乙醇水溶液的洗脱液(组分 I)主要含有淫羊藿甙和朝藿定 A、B、C,50% 乙醇水溶液的洗脱液(组分 II)主要含有淫羊藿甙及朝藿定 C,其他洗脱液中为杂质成分。通过大孔吸附树脂柱可有效地将粗提物分段,获得适宜的组分用于后阶段的精分离。

2.3 样品精分离

朝藿定 A、B、C 和淫羊藿甙 4 个化合物的结构

非常接近,区别仅在于 B 环相连取代基的不同:朝藿定 A 只比淫羊藿甙多一个葡萄糖残基,与朝藿定 B、C 也分别仅为一个单糖残基类型的差异。因此,对这 4 个化合物的分离条件的要求较高,采用常规的制备方法无法同时完成 4 个化合物的分离。实验中对采用工业高效制备柱分离的色谱条件、收集区间进行了优化,最终确定了 1.4 节中所述的制备型 HPLC 条件,在此条件下,4 个化合物达到了满意的分离。通过连续进样,从 300 g 淫羊藿提取物中共获得淫羊藿甙 33 g、朝藿定 C 4.6 g、朝藿定 B 3.7 g 和朝藿定 A 0.6 g。

2.3.1 制备型色谱柱的制备

色谱柱是进行色谱分离的核心部件,采用高效柱可以经过较少的分离步骤即可获得高纯度的产品;反之,使用低性能的色谱柱可能经过多步分离也难以获得满意的产品。实验中采用 10 μm 高效填料装填内径为 77 mm 的制备柱,对装填过程中的匀浆溶剂、匀浆液浓度、装填压力等参数进行了优化。

高压匀浆法是高效柱的主要装填方法,异丙醇、甲醇、丙酮等溶剂都可用来配制匀浆液。试验中比较了异丙醇、甲醇、丙酮/二氧六环 3 种溶剂的匀浆效果,其中丙酮/二氧六环配制匀浆液的稳定性最好,匀浆液可在较长时间内呈混悬状态;而用异丙醇和甲醇配制的匀浆液的稳定性稍差,沉降相同时间后,异丙醇匀浆液较甲醇匀浆液更容易恢复至混悬状态。比较 3 种匀浆液装填的色谱柱,发现不同匀浆液装填的色谱柱的性能接近,但异丙醇、丙酮/二氧六环所装填的制备柱在使用前需进行溶剂置换,过程复杂,而用甲醇作为匀浆液组成简单、价格低廉,故本实验选择甲醇作为溶剂进行匀浆液装填。

分析型 HPLC 柱的装填过程中匀浆液的填料质量浓度通常为 70~140 g/L,在此浓度范围内,填料颗粒可以均匀分散不聚集,装填过程阻力低,容易获得高效柱。本实验中使用工业制备柱装柱系统,受最大匀浆体积的固定限制,使用此类稀匀浆液所装填的制备柱的柱长过短,无法满足实际分离的要求。为了获得适宜的柱长,需要提高匀浆液的浓度。在最大允许匀浆体积(1.9 L)范围内,比较了不同匀浆液浓度对柱长、柱效的影响,发现采用 300 g/L 的匀浆液可以装填获得满意柱长和性能的色谱柱。

装柱压力高有利于形成均匀紧密的柱床,但高压会导致填料破碎,故反相色谱制备柱珍贵填料的装填过程既要考虑柱床的均匀紧密性,又要考虑重复装填对填料性能变化的影响。此外,工业制备色谱柱的装填压力还与装柱系统的可耐受压力有关。

本实验所使用的装柱机的最大装柱压力为 7 MPa (1 000 psi),在此压力以下比较了不同装填压力对所装填的色谱柱性能的影响,结果表明 7 MPa 压力下所装填的色谱柱性能最好,且填料多次压缩后,破碎很少,可以重复利用,故选择在此压力装填色谱柱。采用 10 μm Chromatorex 填料先后装填两根内

径为 77 mm 的制备柱,所装填的制备柱的性能与分析柱的性能比较见表 1。由此可见,采用相同的填料所装填的制备柱与分析柱的色谱性能接近,有利于从分析分离放大到制备分离。采用相同的装填方法装填的制备柱 1 与制备柱 2 的性能没有明显的改变,保证了分离过程的重复性。

表 1 自制的制备色谱柱与分析色谱柱的性能比较

Table 1 Comparison of self-packed preparative columns and an analytical column

Column	Particle size/ μm	i. d./mm	Length/mm	Efficiency/(N/m)	A_s
Analytical column	10	4.6	250	37000	1.08
Preparative column 1	10	77	220	35000	1.11
Preparative column 2	10	77	220	35000	1.16

2.3.2 制备色谱条件的优化

以朝藿定 A、B、C 及淫羊藿甙为目标,在分析型 HPLC 柱上进行制备分离方法的开发,优化固定相、流动相、进样量和检测波长等参数,获得满意的分离效果后放大到工业制备 HPLC 柱上。在放大过程中,将色谱填料、样品浓度、流动相洗脱方式、检测波长等作为不变因素保持一致,将柱内径、样品量、流动相流速、检测池体积等作为可变因素,根据制备规模来调整,具体实验参数按照放大公式计算获得^[11-13]。

实验中使用的工业高效制备柱为自装填的色谱柱,由用户根据填料对样品的选择性选择适宜的填料装填。通过比较样品在 Microsorb、Calesil 和 Chromatorex 分析柱上的分离情况选择填料。结果显示样品在 Calesil 分析柱上的分离效果不好,朝藿定 C 与淫羊藿甙没有达到基线分离;在 Microsorb 和 Chromatorex 分析柱上的分离效果接近,4 个化合物都可以达到基线分离;由于 Chromatorex 填料的价格具有优势,故选择其作为填料装填制备柱。

甲醇-水流动相体系的成本低廉,是首选的反相色谱制备流动相,但在甲醇-水体系下,4 个化合物在 Chromatorex C_{18} 制备柱上无法获得满意的分离,其中朝藿定 A、B 峰重叠严重,小进样量下也无法达到基线分离;而以乙腈-水作为制备流动相体系,4 个化合物可以实现分离。因此本实验选择乙腈-水流动相体系。

制备色谱以分离获得大量的单成分为目的,通过不断加大进样量来寻找保证分离效果前提下的最大过载进样量。在样品质量浓度为 30 g/L 条件下,考察了不同进样体积(5~12 mL)对分离度的影响。实验结果表明,5~12 mL 进样体积范围内,随着进样体积的增大,目标成分与干扰成分的分辨率逐渐降低,峰重叠加重;大于 10 mL 后,目标成分与干扰成分重叠严重,无法选取适当的切割位置确保目标

成分的纯度。因此,本实验选择进样体积为 10 mL。

与分析型色谱分离相比较,制备型色谱所选择的检测波长并不一定是目标成分的最大吸收波长,选择一个可以监测到目标成分和干扰成分分离的波长更加合适,这样可以降低平头峰对观察流分收集的影响。黄酮类化合物的最大紫外吸收波长为 254 nm,但在该波长下,目标化合物在样品进样很少的情况下即表现为平头峰,化合物监测困难,无法准确地确定目标物流分的切割位置,所以本实验选择在 270 nm 检测波长下监测完成制备分离。图 3 为组分 I 中黄酮类系列对照品的制备色谱图,图 4 为组分 II 中黄酮类系列对照品的制备色谱图。

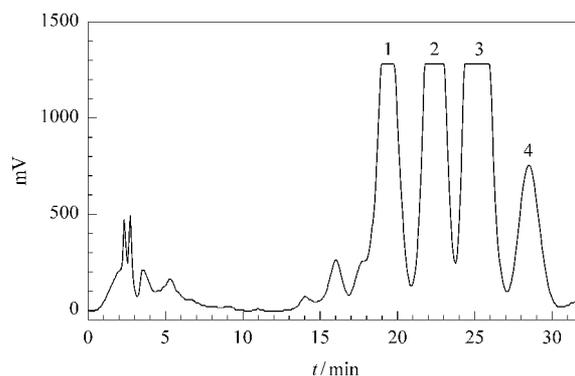


图 3 淫羊藿粗提取物粗分离得到的组分 I 的制备色谱图
Fig. 3 Preparative chromatogram of the fraction I obtained from the crude separation of the extract of *Epimedium brevicornum Maxim*

1. epimedin A; 2. epimedin B; 3. epimedin C; 4. icariin.

2.3.3 流分收集区间的确定

产品的纯度除了受到色谱分离条件的影响外,还受到流分收集区间的影响。宽的目标流分收集区间可以提高回收率,但产物纯度可能受到影响;窄的目标流分收集区间可以提高产物纯度但回收率低。合理的收集区间应兼顾二者。实验中借助计算机模拟流出曲线^[14],结合具体的流分纯度的 HPLC 分析结果,确定适宜的收集区间,以保证制备效果。本实

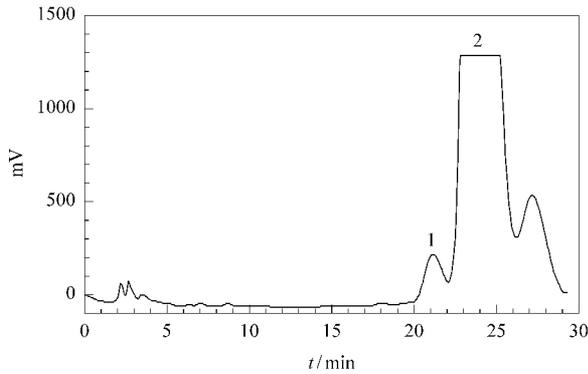


图 4 淫羊藿粗提物粗分离得到的组分 II 的制备色谱图
 Fig. 4 Preparative chromatogram of the fraction II obtained from the crude separation of the extract of *Epimedium brevicornum Maxim*
 1. epimedin C; 2. icariin.

验确定的组分 I 中 4 个化合物的收集区间分别为 18.5~20.5 min、21.5~23.5 min、24~26.5 min 和 27.5~29.5 min; 组分 II 中 2 个化合物的收集区间分别为 20.5~21 min 和 22.5~25.5 min。

2.4 纯度分析

精密称取本方法制备的 4 种产品和食品药品检定研究院提供的朝藿定 C 和淫羊藿甙对照品各 10.0 mg, 用少量流动相分别溶解并定容至 10 mL, 按照 1.2 节的样品分析条件分析, 朝藿定 A 和朝藿定 B 采用面积归一化法测定, 朝藿定 C 和淫羊藿甙纯度检测采用外标法测定, 测得朝藿定 A 的纯度为 99.47%, 朝藿定 B 的纯度为 98.99%, 朝藿定 C 的纯度为 99.94%, 淫羊藿甙的纯度为 99.63%。

3 结论

规模化制备系列中药化学对照品是中药现代化的一个重要方面, 中药化学对照品的生产客观上需要高分辨、高通量的制备方法。本实验采用工业制备高效液相色谱法进行了淫羊藿中黄酮类化学对照品的生产, 通过优化柱的装填条件及色谱分离条件, 单次运行在 35 min 内可完成 4 个化合物的基线分离及规模制备; 通过累计进样, 从 300 g 粗提物(总黄酮含量约 20%) 中获得淫羊藿甙 33 g、朝藿定 C 4.6 g、朝藿定 B 3.7 g 和朝藿定 A 0.6 g, 且产品的

纯度均大于 98%。所建立的方法不仅具有快速、高效、适用范围广的特点, 而且由于高效液相色谱填料能重复利用, 单次运行获得多个化合物, 降低了中药化学对照品的分离成本, 十分适于高纯度中药系列化学对照品的规模制备。

参考文献:

- [1] Department of Health of Hong Kong Special Administrative Region. Hong Kong Chinese Material Medica Standards. Hong Kong: Department of Health of Hongkong Special Administrative Region (香港特别行政区卫生署. 香港中药材标准. 香港: 香港特别行政区卫生署), 2005
- [2] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China; Part I. Beijing: China Medical Science Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部. 北京: 中国医药科技出版社), 2010
- [3] Guo B L, Yu J G, Xiao P G. China Journal of Chinese Materia Medica (郭宝林, 余竟光, 肖培根. 中国中药杂志), 1996, 21(6): 353
- [4] Li W K, Xiao P G, Pan J Q, et al. Chinese Pharmaceutical Journal (李文魁, 肖培根, 潘景岐, 等. 中国药学杂志), 1996, 31(6): 332
- [5] Liu R M, Li A F, Sun A L, et al. J Chromatogr A, 2005, 1064: 53
- [6] Hu Y F, Zhu S (胡云峰, 朱升). CN, 200510061251.1. 2009-07-08
- [8] Wang X C, Zhou N, Feng Z X, et al (王晓春, 周宁, 冯泽熹, 等). CN, 200610201222.5. 2008-10-01
- [7] Wang C Z, Geng X D. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王超展, 耿信笃. 分析化学), 2005, 33(1): 106
- [9] Guo B L, Bian Q Y, Huang W H, et al (郭宝林, 卞庆亚, 黄文华, 等). CN, 200710002610.5. 2007-07-18
- [10] Zhang X Z. [PhD Dissertation]. Dalian: Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences (张晓哲. [博士学位论文]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所), 2004
- [11] Hostettman K, Marston A, Hostettman M. Preparative Chromatography Techniques. Zhao W M, Zhang T Y, transl. Beijing: Science Press (霍夫泰特曼 K, 马斯顿 A, 霍夫泰特曼 M. 制备色谱技术. 赵维民, 张天佑, 译. 北京: 科学出版社), 2000: 83
- [12] Majors R E. LCGC Asia Pacific, 2004, 7(3): 8
- [13] Gao M Z, Yuan X Y, Xiao H B. Chinese Journal of Chromatography (高明哲, 袁晓艳, 肖红斌. 色谱), 2008, 26(3): 362
- [14] Wang L X, Gao M Z, Xiao H B. Chinese Journal of Chromatography (王龙星, 高明哲, 肖红斌. 色谱), 2008, 26(4): 523