



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101891782 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 24

(21) 申请号 201010206046. 0

(22) 申请日 2010. 06. 23

(71) 申请人 吉林大学

地址 130000 吉林省长春市人民富锦路  
1266 号

申请人 中国科学院长春应用化学研究所

(72) 发明人 刘忠英 刘志强 丁一迪

(74) 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任  
公司 22001

代理人 马守忠

(51) Int. Cl.

C07H 17/07(2006. 01)

C07H 1/08(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

(54) 发明名称

朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法

(57) 摘要

本发明提供了朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法,用高速逆流色谱法从朝鲜淫羊藿叶的粗提物中分离淫羊藿次苷 I 的单体。首先选择预先平衡好的两相溶剂中的一相为固定相,并将其充满螺旋管柱,然后使螺旋管柱在一定的转速下高速旋转,同时以一定的流速将流动相泵入柱内。在体系达到流体动力学平衡后,将待分离的样品注入体系,其中组分将依据其在两相中分配系数的不同实现分离。通过用 PLC 检测,淫羊藿次苷 I 的纯度可以达到 99% 以上,方法简便且效率高。

1. 朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法,其特征在于,其步骤和条件如下:

a 按体积比为 3 : 7 : 3 : 7 ~ 6 : 4 : 6 : 4 分别称量正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水于分液器中,充分震荡,静置,放置过夜;

b 以澄清的上相为固定相,下相为流动相,以 0.5 ~ 10mL/min 的流速使固定相充满螺旋管柱,然后螺旋管柱以 1300 ~ 1600rpm/min 的速度旋转,稳定 1 ~ 30min 后,以 0.5 ~ 5.0mL/min 的速度泵入流动相,使体系达到流体动力学平衡;

c 根据高速逆流色谱的进样系统选择进样体积,以 1.0 ~ 10mg/mL 的溶液浓度进样,下相溶解淫羊藿次苷 I 的粗提物,检测器波长为 272nm,温度为 10 ~ 40℃;所述的下相体积不得少于 3mL;

d 第一个出现的大峰不是淫羊藿次苷 I,第二个出现的峰为淫羊藿叶中提取的淫羊藿次苷 I,溶液颜色呈荧黄色,经过冷冻干燥,得淫羊藿次苷 I 单体粉末;

步骤 c 中所述的淫羊藿次苷 I 粗提物是根据以下方法所得:

1) 称量朝鲜淫羊藿叶 100,用 1500mL 的体积浓度为 70%乙醇回流 4 小时,滤出乙醇提取液,将回流过的药渣用 1000mL 的体积浓度为 70%乙醇回流提取 2 小时,滤出乙醇提取液,合并两次滤液;

2) 滤液在 50℃下减压蒸出溶剂,得到的提取物,该提取物中所含的水分不多于其质量的 5%;

3) 将步骤 2) 中所得到的提取物用 200mL 无水乙醇溶解,加入浓盐酸,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸体积 mL 为 :0.1,在 50℃水浴加热 15 小时,室温放置过夜,过滤;

4) 滤液在 50℃减压浓缩至原体积的 20%,加入 200mL 蒸馏水析出沉淀,沉淀在 50℃下用体积浓度为 20%乙醇溶液洗涤,50℃下真空干燥,得淫羊藿次苷 I 粗提物的粉末。

2. 如权利要求所述的朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法,其特征在于,所述的正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比为 3 : 7 : 3 : 7。

3. 如权利要求所述的朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法,其特征在于,所述的正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比为 4 : 6 : 4 : 6。

4. 如权利要求所述的朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法,其特征在于,所述的正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比为 5 : 5 : 4.5 : 5.5。

5. 如权利要求所述的朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法,其特征在于,所述的正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比 = 6 : 4 : 6 : 4。

## 朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于天然药物化学领域,涉及用高速逆流色谱法从朝鲜淫羊藿叶的粗提物中分离淫羊藿次苷 I 的单体的分离方法。

### 背景技术

[0002] 淫羊藿是近几年天然药物研究的热点之一。其主要成分淫羊藿苷的体内过程有较充分的研究 (YE L K, CHEN J M, LIU S H, et al. Pharmacokinetics of icariinin rats [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 1999, 34(1): 33-36, 而淫羊藿次苷 I 的体内过程研究却未见报道。从现有的研究成果看来,淫羊藿次苷 I 在酶水平上有很好的活性,极有希望成为治疗勃起功能障碍的有效药物。

[0003] 淫羊藿次苷 I 是淫羊藿苷的体内代谢产物之一, Lenoble 等 (LENOBLE R, RICHHEIMER S, BAILEY D T, et al. Compositions comprising icariside I and anhydroicaritin and methods for making the same: PCT, WO 02/13842 A1 [P] 120022022211) 报道了淫羊藿次苷 I 对 PDE-25 酶具有很好的抑制作用, IC<sub>50</sub> 为 0.133mg/L, 显示了其在治疗勃起功能障碍方面的作用。

[0004] 目前,国外有采用柱色谱法分离提取淫羊藿次苷 I 的报道 (Lenoble, et al. "Compositions comprising icariside I and anhydroicaritin and methods for making the same" Unit States Patent 2002(6399579))。柱色谱分离纯化黄酮类化合物存在由不可逆吸附导致产率低的缺点,而且分离过程十分耗时、耗力,不利于黄酮类化合物的大量分离提取。

[0005] 目前无人用高速逆流色谱 (HSCCC) 技术分离淫羊藿次苷 I。

### 发明内容

[0006] 为了消除因为柱色谱分离纯化黄酮类化合物存在由不可逆吸附导致产率低,而且分离过程十分耗时、耗力,不利于黄酮类化合物的大量分离提取的缺点。本发明提供了朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法。

[0007] 高速逆流色谱 (HSCCC) 与高效液相色谱 (HPLC) 最大的不同在于其柱分离系统。高速逆流色谱包括储液罐、泵、螺旋管分离柱、检测器、色谱工作站或数据采集软件或记录仪以及馏分收集器等组成部分,其分离原理为液液萃取。

[0008] 首先选择预先平衡好的两相溶剂中的一相为固定相,并将其充满螺旋管柱,然后使螺旋管柱在一定的转速下高速旋转,同时以一定的流速将流动相泵入柱内。在体系达到流体动力学平衡后 (即开始有流动相流出时),将待分离的样品注入体系,其中组分将依据其在两相中分配系数的不同实现分离。分离效果与所选择的溶剂系统、固定相和流动相的选择、洗脱方式、流动相的流速、仪器的旋转的方向和转速、样品浓度和进样方式以及柱温等都有密切关系。因而,在采用逆流色谱分离时,在操作方法和工作程序等方面都有许多独特之处。常用的检测器有紫外-可见光检测器 (UV-VIS),此外还有蒸发光散射检测器

(ELSD) 以及质谱检测器等。

[0009] 高速逆流色谱 (HSCCC) 分离方法在植物药物活性成分分离中的优势主要体现在同一台仪器可用于不同极性的物质的分离,且制备量大,分离效率高,操作灵活。可以实现多种形式的梯度洗脱过程,如 pH 梯度、极性梯度等,还可以进行正向洗脱或反向洗脱,甚至可以使两相溶剂同时双向流动,实现真正连续的逆流色谱过程。

[0010] 本发明提供了朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法,其方法和步骤如下:

[0011] a 按体积比为 3 : 7 : 3 : 7 ~ 6 : 4 : 6 : 4 分别称量正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水于分液器中,充分震荡,静置,放置过夜;

[0012] b 以澄清的上相为固定相,下相为流动相,以 0.5 ~ 10mL/min 的流速使固定相充满螺旋管柱,然后螺旋管柱以 1300 ~ 1600rpm/min 的速度旋转,稳定 1 ~ 30min 后,以 0.5 ~ 5.0mL/min 的速度泵入流动相,使体系达到流体动力学平衡;

[0013] c 根据高速逆流色谱的进样系统选择进样体积,以 1.0 ~ 10mg/mL 的溶液浓度进样,下相溶解淫羊藿次苷 I 的粗提物,检测器波长为 272nm,温度为 10 ~ 40°C ;所述的下相体积不得少于 3mL ;

[0014] d 第一个出现的大峰不是淫羊藿次苷 I,第二个出现的峰为淫羊藿叶中提取的淫羊藿次苷 I,溶液颜色呈荧黄色,经过冷冻干燥,得淫羊藿次苷 I 单体粉末;

[0015] 步骤 c 中所述的淫羊藿次苷 I 粗提物是根据以下方法所得:

[0016] 1) 称量朝鲜淫羊藿叶 100,用 1500mL 的体积浓度为 70%乙醇回流 4 小时,滤出乙醇提取液,将回流过的药渣用 1000mL 的体积浓度为 70%乙醇回流提取 2 小时,滤出乙醇提取液,合并两次滤液;

[0017] 2) 滤液在 50°C 下减压蒸出溶剂,得到的提取物,该提取物中所含的水分不多于其质量的 5% ;

[0018] 3) 将步骤 2) 中所得到的提取物用 200mL 无水乙醇溶解,加入浓盐酸,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸体积 mL 为 :0.1,在 50°C 水浴加热 15 小时,室温放置过夜,过滤;

[0019] 4) 滤液在 50°C 减压浓缩至原体积的 20%,加入 200mL 蒸馏水析出沉淀,沉淀在 50°C 下用体积浓度为 20%乙醇溶液洗涤,50°C 下真空干燥,得淫羊藿次苷 I 粗提物的粉末;称重为 5.6760 克。

[0020] 有益效果:本发明提供的朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 单体的分离方法,能够从朝鲜淫羊藿叶粗提物中分离出淫羊藿次苷 I 单体,方法简便且效率高。通过 HPLC 检测,淫羊藿次苷 I 的纯度可以达到 99% 以上,如附图 5 淫羊藿次苷 I 液相图和附图 6 淫羊藿次苷 I 的质谱图所示。

#### 附图说明

[0021] 图 1 为实施例 1 的高速逆流色谱以 272nm 检测,正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水的体积比为 3 : 7 : 3 : 7,进样溶液浓度 7.0mg/mL,螺旋管分离柱转速为 1300rpm/min 时的峰形图。

[0022] 图 2 为实施例 2 的高速逆流色谱以 272nm 检测,正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水的体积比为 4 : 6 : 4 : 6,进样溶液浓度 10mg/mL,螺旋管分离柱转速为 1550rpm/min 时的

峰形图。

[0023] 图 3 为实施例 3 的高速逆流色谱以 272nm 检测,正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水的体积比为 5 : 5 : 4.5 : 5.5,进样溶液浓度 8.0mg/mL,螺旋管分离柱转速为 1600rpm/min 时的峰形图。

[0024] 图 4 为实施例 4 的高速逆流色谱以 272nm 检测,正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水的体积比为 6 : 4 : 6 : 4,进样溶液浓度 1.0mg/mL,螺旋管分离柱转速为 1300rpm/min 时的峰形图。

[0025] 图 5 为实施例 5 的高速逆流色谱中 36-46min 时所接溶液的高效液相色谱图。

[0026] 图 6 为实施例 6 的高效液相色谱中 36-46min 时所接溶液的质谱图。

## 具体实施方式

[0027] 实施例 1

[0028] a 按体积比为 3 : 7 : 3 : 7 分别量取正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水于 1000mL 分液漏斗中,充分震荡,静置,放置过夜;

[0029] b 以澄清的上相为固定相,下相为流动相,以 10mL/min 的流速使固定相充满螺旋管柱,然后螺旋管柱以 1600rpm/min 的速度旋转,稳定 30min 后,以 5.0mL/min 的速度泵入流动相,使体系达到流体动力学平衡;

[0030] c 根据高速逆流色谱的进样系统选择进样体积,以 8.0mg/mL 的溶液浓度进样,下相 5mL 溶解淫羊藿次苷 I 粗提物,检测器波长为 272nm,温度为 40℃。

[0031] d 第一个出现的大峰不是淫羊藿次苷 I,第二个出现的峰为朝鲜淫羊藿叶中提取的淫羊藿次苷 I。溶液颜色呈荧黄色,经过冷冻干燥,得淫羊藿次苷 I 单体粉末。结果见图 1。

[0032] 步骤 c 中所述的淫羊藿次苷 I 粗提物是根据以下方法所得:

[0033] 1) 称量朝鲜淫羊藿叶 100 克,用 1500mL 的体积浓度为 70%乙醇回流 4 小时,滤出乙醇提取液,将回流过的药渣用 1000mL 的体积浓度为 70%乙醇回流提取 2 小时,滤出乙醇提取液,合并两次滤液;

[0034] 2) 滤液在 50℃下减压蒸出溶剂,得到提取物,提取物中所含水分不多于其质量的 5%;

[0035] 3) 将所述的粗提物用 200mL 无水乙醇溶解,加入浓盐酸,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸体积 mL 为:0.1,在 50℃水浴加热 15 小时,室温放置过夜,过滤;

[0036] 4) 滤液在 50℃减压浓缩至原体积的 20%,加入 200mL 蒸馏水析出沉淀,沉淀在 50℃下用体积浓度为 20%乙醇溶液洗涤,50℃下真空干燥,得淫羊藿次苷 I 粗提物粉末;称重 5.6760 克。

[0037] 实施例 2、3 和 4 都是按照实施例 1 的步骤进行,条件如下表 1 所示:

[0038] 表 1

[0039]

实 施 例	体 积 比	固 定 相 流 速 (mL/min)	转 速 (rpm)	样 品 溶 液 浓 度 (mg/mL)	稳 定 时 间 (min)	进 样 体 积 (mL)	温 度 (°C)	流 动 相 流 速 (mL/min)	结 果
2	4 : 6 : 4 : 6	8.0	1550	10.0	20	6.0	20	5.0	图 2
3	5 : 5 : 4.5 : 5.5	5.0	1600	9.0	30	5.0	30	2.0	图 3
4	6 : 4 : 6 : 4	0.5	1300	1.0	1	3.0	10	0.5	图 4

[0040] 注：体积比为正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比。

[0041] 实施例 5

[0042] 将高速逆流色谱在 36-46min 时所接的溶液冷冻干燥，称量 1.010mg 粉末于 5mL 的容量瓶中，甲醇定溶。取 5 $\mu$ L 溶液所作的高效液相色谱图。结果如图 5。

[0043] 高效液相的条件:波长 272nm,流速:1mL/min,柱温:30℃,色谱柱:Alltima HP C185  $\mu$ m(250 $\times$ 4.6mm)

[0044] 梯度洗脱:

[0045]

时间 (min)	0	10	20	25	30	35
比例(乙腈:水) (%)	15	30	40	60	100	15

[0046] 实施例 6

[0047] 将高速逆流色谱在 36-46min 时所接的溶液冷冻干燥,称量 1.010mg 粉末于 5mL 的容量瓶中,甲醇定溶。对上述溶液进行质谱检测,结果如图 6。

[0048] 质谱条件:Finnigan MAT LCQ™ 离子阱电喷雾质谱仪扫描范围为 m/z 0-1000,喷雾电压 5.0kV,金属毛细管温度设为 200℃。

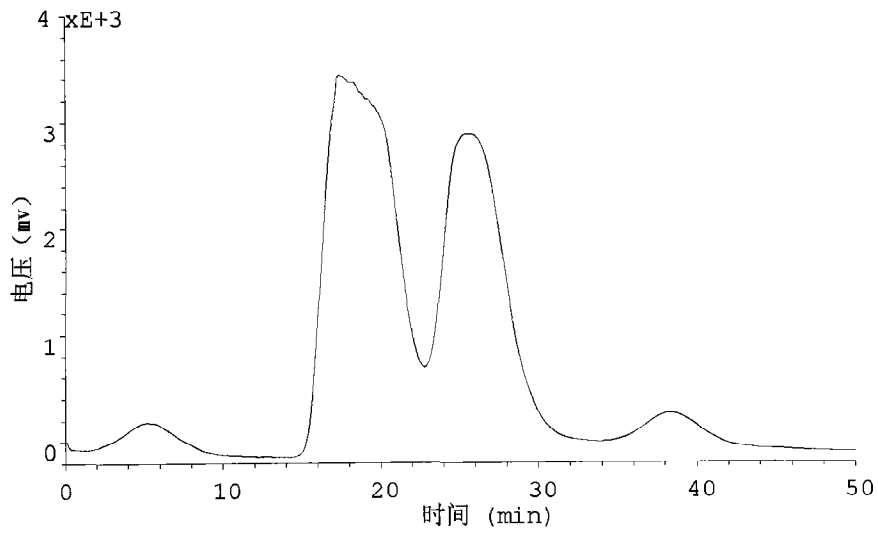


图 1

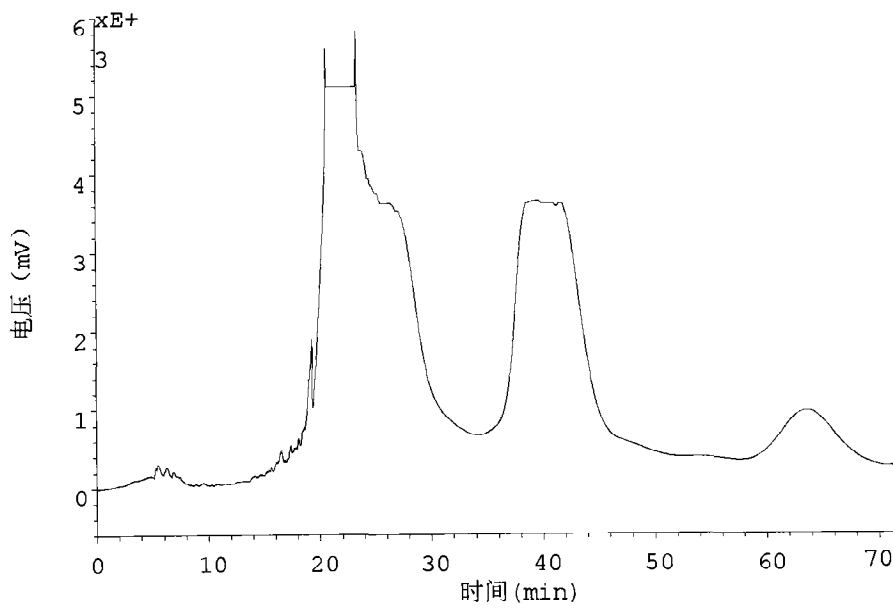


图 2



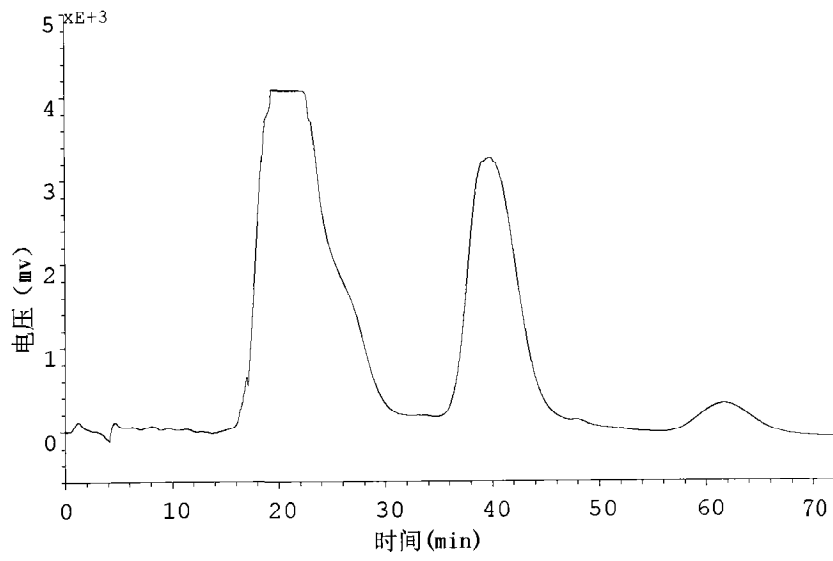


图 3

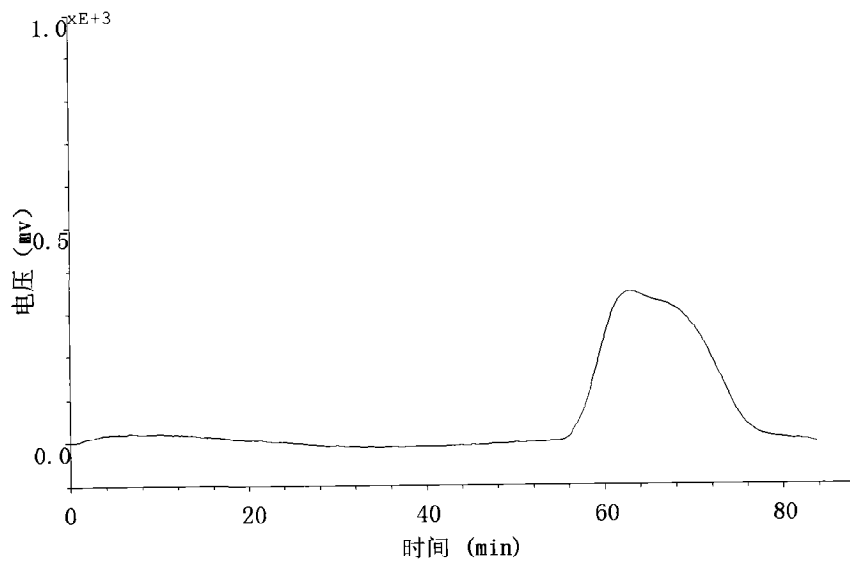


图 4

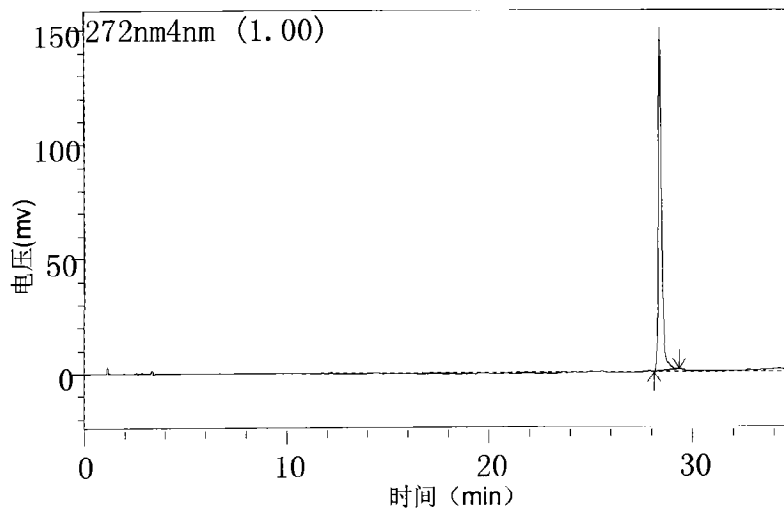


图 5

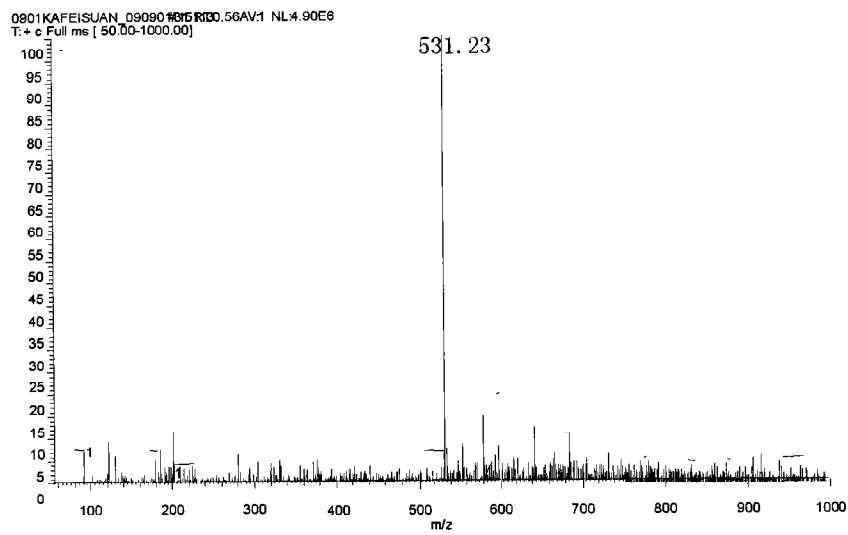


图 6