

## 黄芪有效部位不同提取分离方法的比较

于海瑶<sup>1</sup>, 肖秋生<sup>2</sup>, 洪建飞<sup>2</sup>, 王艳萍<sup>2</sup>, 陈正爱<sup>1</sup>, 刘莹<sup>1</sup>, 王贺雷<sup>3</sup>, 郭玉香<sup>4</sup> (1 延边大学基础医学院, 吉林 延吉 133000; 2 中国人民解放军第 208 医院, 吉林 长春 130062; 3 吉林大学第一医院, 吉林 长春 130021; 4 吉林省人民医院, 吉林 长春 130021)

**摘要** 目的: 对 3 种粒径的黄芪, 采用 4 种不同的方法提取黄芪多糖及黄芪总皂苷, 优选最佳粒径和提取方法。方法: 对超微粉、200 目细粉、饮片 3 种粒径的黄芪, 分别采用水醇双提法、纤维素酶法、氧化钙溶液法、超声波法进行提取, 用超滤法与 D<sub>21</sub> 大孔吸附树脂法进行分离, 分别比较黄芪多糖及黄芪总皂苷的得率。结果: 黄芪超微粉用超声波法提取黄芪多糖得率最高, 达到 1.73%; 采用黄芪饮片用超声波法提取黄芪总皂苷得率最高, 达到 1.82%。结论: 超声波提取方法对提取黄芪多糖和黄芪总皂苷的得率较其它方法都有较大的提高。黄芪的粒径越小对黄芪多糖提取得率越高, 但对黄芪总皂苷的提取, 随粒径减小而得率减少。

**关键词** 黄芪多糖; 黄芪总皂苷; 超声波提取法; 超微粉; 超滤法

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)01-0020-04

## Comparison of different extraction and separation methods on the effective sections of Radix Astragali

YU H aiyao<sup>1</sup>, XIAO Q iu2sheng<sup>2</sup>, HONG Jian2fei<sup>2</sup>, WANG Yan2ping<sup>2</sup>, CHEN Zhen2ai<sup>1</sup>, LIU Y ing<sup>1</sup>, WANG H e2lei<sup>3</sup>, GUO Yu2xiang<sup>4</sup> (1. School of Basic Medicine Sciences, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. The 208th Hospital of PLA, Changchun 130062, China; 3. First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China; 4. People's Hospital of Jilin, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT** Objective To select optimal diameter of the powder of Radix Astragali and extraction method by four methods of extracting astragalus polysaccharide and total astragalus saponins in three Radix Astragali powders of different diameter. Methods The water-alcohol extraction, cellulase degradation technology, calcarea solution technology, ultrasonic waves technology were used to three Radix Astragali powders of different diameter respectively. The astragalus polysaccharide and total astragalus saponins were separated with combined techniques hollow fiber membrane and D<sub>21</sub> macro absorbing resin. According to the contents of astragalus polysaccharide and total astragalus saponins, the extraction methods were compared. Results The most effective way of extracting astragalus polysaccharide was the ultrasonic waves technology with the yield rate of 1.73%, while the most effective method of distilling total astragalus saponins was ultrasonic waves technology on prepared slice of herbal drug with the yield of 1.82%. Conclusion Ultrasonic waves technology was a much better way of extracting both astragalus polysaccharide and total astragalus saponins. The shorter the diameter of Radix Astragali powder, the higher the yield of extracting astragalus polysaccharide. The yield of extracting total astragalus saponins turned out contrary.

**KEY WORDS** astragalus membranaceus polysaccharide, total saponins of astragalus, ultrasonic waves, superfine comminution, ultrafiltration, D<sub>21</sub> macro absorption resin, HPLC-ELSD

黄芪 (*Radix Astragali*) 为多年生草本豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根, 是传统的中材, 具有补气固表、利尿排毒、排脓、敛疮生肌等多种功效。其含有多糖、总皂苷、黄酮、氨基酸、微量元素等。近代药理研究证明, 黄芪多糖和黄芪总皂苷为其中的主要成分, 有着广泛的药理作用<sup>[1-2]</sup>。

本研究用 3 种粒径的黄芪, 即超微粉 (粒径 15 μm 以下, 上海大闻生物科技公司粉碎, 复旦大学分析测试中心电镜室分析)、200 目细粉和饮片, 每种粒径分别采用不同方法进行提取, 使用相同的方法分离, 探讨其对黄芪提取物中总皂苷及多糖含量的影响。筛选黄芪最佳粒径和最佳提取方法。据有关文献报道<sup>[3]</sup>, 多糖分子量多在 1~5 万左右, 而皂苷分子量在 1 000 以下, 故考虑用超滤法将黄芪水提液进行分离, 截留得到 60 000 以上为多糖部分和 6 000 以下为皂苷部分, 并结合 D<sub>21</sub> 型大孔吸附树脂

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672672)

作者简介: 于海瑶 (1984), 女, 硕士生。Tel (0431) 86988180 E-mail yuhaoyaol@126.com

吸附,得到高含量的黄芪多糖及黄芪总皂苷粗品。

## 1 仪器、材料与试剂

1.1 仪器 1100型高效液相色谱仪 2000 ES型蒸发光散射检测器(美国 Agilent公司); Cary 50 Conc型紫外分光光度计(美国 VARIAN公司); HP28452 A型紫外分光光度计(美国惠普公司); 5500 LV型扫描式电子显微镜(日本 JEOL公司); CQX25206型超声波清洗器(上海必能信超声有限公司); RE252型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SHB20型循环水式多用真空泵(郑州长城科贸有限公司); ZK282 B型真空干燥箱(上海市实验仪器总厂); TP10220型中空纤维膜过滤器(天津膜天膜工程技术有限公司)。

1.2 材料 黄芪购于吉林省北药药材加工有限公司,经嘉兴医学院王俊博士鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao的干燥根。D<sub>2</sub>型大孔吸附树脂,购于山东鲁抗医药(集团)股份有限公司。

1.3 试剂 蒸馏水,实验室自制;黄芪甲苷对照品购于中国药品生物制品检定所(生产批号:200711);氧化钙购于沈阳市试剂五厂(生产批号:0611081);葡萄糖对照品购于东北制药总厂(生产批号:200721);纤维素酶购于天津市利华酶制剂技术有限公司(生产批号:200721);乙醇、硫酸、五氧化二磷、蒽酮,均为 AR级。

## 2 提取与分离方法

2.1 水醇双提法<sup>[4]</sup> 称取黄芪超微粉 100 g 10倍量的水回流提取 120 min,药渣再加入 8倍量水回流提取 60 min,合并水提液,用中空纤维膜过滤器进行超滤,超滤液截留 50 000~6 000分子量部分,浓缩,加入 95%乙醇至醇浓度达 80%,沉淀多糖(水层弃去),真空干燥后得多糖粗品;6 000分子量以下部分超滤液保留待用。水提后的药渣用 8倍量和 6倍量 70%乙醇分别回流提取 2次,第 1次为 90 min,第 2次为 60 min。合并两次醇提液,过滤,回收乙醇,再合并超滤后 6 000分子量以下超滤液,浓缩,上 D<sub>2</sub>型大孔吸附树脂,用 0%~80%乙醇溶液梯度洗脱,洗脱液减压浓缩,真空干燥得黄芪总皂苷粗品。

2.2 超声波提取法<sup>[5]</sup> 称取黄芪超微粉 100 g 加 20倍量水超声提取 80 min,水提液超滤(步骤同 2.1方法处理得多糖粗品)。水超声提取后的药渣再用 20倍 80%乙醇超声提取 80 min,提取液回收乙醇,与超滤后 6 000分子量以下的水提液合并,浓缩,之后同 2.1(自上 D<sub>2</sub>型大孔吸附树脂)处理得到黄芪

总皂苷。

2.3 氧化钙溶液提取法<sup>[6]</sup> 称取黄芪超微粉 100 g 用 pH 9~10的 CaO水溶液回流提取 60 min @4次(每次 7倍量水),合并提取液,调 pH至 6.5左右,提取液浓缩,超滤(超滤液同 2.1方法处理得多糖粗品)。以下步骤同 2.1(自水提后的药渣)提取黄芪总皂苷。

2.4 纤维素酶提取法<sup>[7]</sup> 称取黄芪超微粉 100 g 加入 10倍量的水,回流提取 120 min,过滤,滤液备用,药渣再加入 8倍量水,加入纤维素酶(60 U/g生药),酶处理时间 90 min后(50℃保温),迅速升温灭活酶,继续回流提取 90 min,合并两次提取液,提取液浓缩,超滤(超滤液同 2.1方法处理得多糖粗品)。以下步骤同 2.1(自水提后的药渣)提取黄芪总皂苷。

2.5 黄芪细粉与饮片中总皂苷提取均照(2.1~2.4)项下提取。

## 3 含量测定

### 3.1 黄芪甲苷

3.1.1 色谱条件 色谱柱:大连依利特 C<sub>18</sub>柱(250 mm @4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(35:65);流速:0.7 mL/min;气体流速:2.7 mL/min;柱温:35.0℃;进样量:20 μL;漂移管温度:110.0℃。

3.1.2 对照品溶液的制备 准确称取黄芪甲苷对照品 5.64 mg 加甲醇定容,制成浓度为 0.564 mg/mL的溶液,即得。

3.1.3 供试品溶液的制备 精密称取黄芪皂苷粗品适量,用甲醇溶解并定容至 10 mL,作为供试品溶液。

3.1.4 精密度试验 精密吸取(3.1.2)项下对照品溶液,重复进样 6次,以 6次测定的峰面积计算,相对标准差为 1.07%,说明仪器精密度良好。

3.1.5 稳定性试验 取(3.1.3)项下供试品分别于 0.2、4、8、12、24 h以液相色谱仪测定,以各样品峰面积计算,相对标准差为 1.12%,表明样品在 24 h内稳定。

3.1.6 重现性试验 精密称取各黄芪总皂苷样品适量,分别制成 5份供试品溶液,按(3.1.3)项下处理并测定,由结果计算得相对标准差为 1.49%,说明本试验重现性良好。

3.1.7 回收率试验 取同一组试验已知含量的样品 9份,分别按样品中黄芪甲苷含量的 80%、100%、120%加入一定量的对照品溶液,各制备 3份供试品溶液。按(3.1.3)项下处理后分别测定黄芪甲苷的含量,得到平均回收率为 99.9%,相对标准差

为 1.31%。

3.1.8 样品含量测定 取各组样品,按(3.1.3)项下方法制备供试品溶液,分别吸取不同体积黄芪甲苷对照品溶液与供试品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,用蒸发光散射检测器检测,以外标两点法计算含量。结果见表 1。

### 3.2 黄芪多糖<sup>[8]</sup>

3.2.1 供试品溶液的制备 称取黄芪多糖粗品适量,加蒸馏水溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,作为供试品溶液。

3.2.2 最大吸收波长的选择 精密称取葡萄糖对照品 10 mg 加水溶解并定容至 100 mL,精密量取葡萄糖对照品溶液 0.16 mL,加水定容至 2 mL,加入 0.12% 蒽酮-浓硫酸溶液 4 mL (精密取蒽酮 0.12 g 定容于 100 mL 浓硫酸中),混匀。另以未加葡萄糖的溶液为参比,于 HP28452A 型紫外分光光度计上,从 500~700 nm 范围内扫描。测得葡萄糖对照品溶液的最大吸收波长为 625 nm。

3.2.13 线性关系考察 精密量取(3.2.12)项下葡萄糖对照品溶液 0.12、0.14、0.16、0.18、1 mL 至 10 mL

容量瓶中加水定容,按蒽酮-浓硫酸比色法操作,显色 60 min 后于 625 nm 处测吸收度 A,以 A 为纵坐标,对照品的体积为横坐标,得回归方程为,  $Y = 0.13725X + 0.0025$ ,  $r = 0.9998$ 。浓度在 0.002~0.101 mg/mL 呈线性关系。

3.2.4 稳定性试验 取供试品溶液 0.1 mL 按蒽酮-浓硫酸法显色后,在 625 nm 处每隔一段时间测定吸收度 A,在显色 30 min 后, A 趋于稳定,时间约 3 h。因此试验采用蒽酮-浓硫酸比色法测定,显色时间为 60 min,测定时间应在 1~3 h 之间完成。结果: 1~3 h 之间稳定。

3.2.5 回收率试验 精密称定已知含量的黄芪多糖 5 份,每份 8 mg 分别加入对照品溶液(含葡萄糖 8 mg),按(3.2.2)项下方法处理并测定,得平均回收率为 99.186%,相对标准差为 0.94%。

3.2.16 样品含量测定 精密量取各组样品,按(3.2.11)项下供试品溶液制备,按蒽酮-浓硫酸法显色 60 min 后于 625 nm 测定吸收度 A,由回归方程计算含量。结果见表 1。

表 1 黄芪不同粒径不同提取方法对有效部位含量的影响

粒径	水醇双提法	CaO 水溶液法	超声波法	纤维素酶法
超微粉 (< 15 μm)				
多糖粗品 (g)	1.7401	2.1311	2.5152	1.8051
多糖含量 (%)	61.0	51.8	68.8	45.4
总皂苷粗品 (g)	0.8796	1.1148	1.7117	1.1666
总皂苷含量 (%)	56.0	55.5	67.6	54.7
黄芪甲苷 (%)	0.0883	0.0961	0.0455	0.0431
细粉 (200 目)				
多糖粗品 (g)	1.2762	1.6008	1.8820	1.3632
多糖含量 (%)	55.9	49.5	58.9	45.1
总皂苷粗品 (g)	1.1888	1.2104	1.7555	1.6248
总皂苷含量 (%)	67.0	58.7	69.3	56.4
黄芪甲苷 (%)	0.0317	0.0432	0.0411	0.0410
饮片				
多糖粗品 (g)	1.0038	1.2731	1.3237	1.0177
多糖含量 (%)	52.1	46.4	54.8	46.1
总皂苷粗品 (g)	2.0816	2.4086	2.8773	2.3706
总皂苷含量 (%)	62.8	60.1	63.4	58.0
黄芪甲苷 (%)	0.0266	0.0257	0.0432	0.0413

### 3.3 黄芪总皂苷<sup>[9]</sup>

3.3.1 对照品溶液的制备 精称黄芪甲苷对照品 5.64 mg 用甲醇定容到 10 mL 容量瓶中。

3.3.2 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.11、0.12、0.13、0.14、0.15 mL,分别注入具塞试管中,水浴蒸干,各加入 9% 香草醛溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.18 mL,65℃ 水浴中加热 15 min 后取出,冷却至室

温,各加冰醋酸至 5 mL,30 min 内在 580 nm 的波长处测定吸收度。以吸收度 A 为纵坐标,对照品浓度为横坐标,得回归方程为,  $Y = 0.100322X - 0.0103616$ ,  $r = 0.9993$ 。结果表明,黄芪甲苷进样量在 5.614~28.210 μg 之间呈良好的线性关系。

3.3.13 样品含量测定 精密量取各组样品溶液

(下转第 47 页)

剂和升压药。因此,术前必须备妥抢救药物及设备,有麻醉师全程监护的条件下是比较安全和理想方法。

结果表明,局部麻醉组镇痛的总有效率明显低于静脉麻醉组,但明显高于对照组,阴道出血量无明显增多,不良反应少,手术中患者处于清醒状态,可以配合医生的操作,减少风险。安全性高,同时节省费用,减轻患者经济负担,较静脉麻醉组占有一定的优势,尤其适合于无全麻监护条件及麻醉师全程监护条件下的无痛人流术,可在经济条件落后地区及基层乡镇卫生院推广应用。

#### (上接第 22页)

0.2 mL,照标准曲线的制备项下的方法自注入具塞试管中0起,依法测定吸收度,从标准曲线上读出供试品溶液中总皂苷的含量,即得,结果见表 1。

#### 4 结果

从表 1可知:<sup>1</sup> 黄芪多糖:黄芪超微粉用超声波法提取所得黄芪多糖产量及含量最高,分别达到 21515.2 g和 6818%,黄芪多糖得率也最高,达到 1173%;<sup>2</sup> 黄芪总皂苷:黄芪饮片用超声波法提取所得黄芪总皂苷产量最高,达到 21877.3 g 含量为 6314%,因此得率也最高,达到 1182%;黄芪细粉用超声波法提取所得黄芪总皂苷含量最高,达到 6913%,然而产量低于饮片,故得率比饮片低。» 水醇双提法的多糖和总皂苷产量虽低于其它方法,但含量高于氧化钙水溶液法、纤维素酶法,由此推断氧化钙水溶液法、纤维素酶法虽然可以提高黄芪多糖和黄芪总皂苷的产量,但不能使其含量提高。可能与氧化钙水溶液、纤维素酶的化学成分有关。

#### 5 讨论

中药的提取必须保持中药多成分起效的特点,保留有效成分,尽可能去掉非有效成分,兼顾体积与疗效。本研究将 3种粒径的黄芪,每种粒径分别用水醇双提法、纤维素酶法、氧化钙溶液法、超声波法进行提取,并结合中空纤维膜超滤技术与 D<sub>21</sub>大孔吸附树脂相结合进行分离。通过结果可知,不同的提取方法(与分离方法相结合),可以不同程度的提高黄芪多糖及黄芪总皂苷的得率。黄芪超微粉与超

#### 参考文献:

- [1] 庄心良,曾因明,陈伯奎.现代麻醉学[M].第3版,北京:人民卫生出版社,2003:481
- [2] 李丽,田粉梅,冯仰伟,等.异丙酚在人工流产术中的应用[J].泰山医学院学报,2006,27(2):167.
- [3] 胡春艳,朱丽敏,王锐齐.安定、平痛新、利多卡因、阿托品联合应用无痛人流产 86例临床观察[J].中国医药卫生,2005,6(3):29
- [4] 谭白桦,程宝英,陈久均.异丙酚联合芬太尼、阿托品施行无痛人流术的临床观察[J].中国医学理论与实践,2005,15(6):886.

收稿日期:2007206218

声波法结合,所得黄芪多糖得率较高,其原因可能是当超微粉超声处理后,通过超声波震荡,细胞壁发生破裂,细胞内部的多糖易于溶出,多糖得率提高;但随着黄芪的粒径减小,黄芪总皂苷的得率在减少,由此判断,可能黄芪总皂苷化学性质不稳定,在粉碎过程中可能温度升高以及与空气接触时间过多,导致其成分被破坏。通过本研究我们认为超微粉碎对某些中药材的成分提取率可能增加,但对另外一些化学成分的提取率可能减少,所以超微粉碎技术对中药材的提取,应在试验的基础上进行选择。

#### 参考文献:

- [1] 黄乔书,吕归宝,李雅臣,等.黄芪多糖的研究[J].药学报,1982,17(3):200
- [2] 马海英,赵志涛,王丽娟,等.薯蓣皂苷元和黄芪总皂苷抗血脂作用比较[J].中国中药杂志,2002,27(7):528
- [3] 韩鲁佳,阎巧娟,江正强,等.黄芪多糖及皂甙提取工艺研究[J].农业工程学报,2000,16(5):118
- [4] 吴立明.正交试验法考察黄芪的提取工艺[J].中国中医药信息杂志,2003,10(11):126
- [5] 江蔚新,于翔宇,石慎华,等.黄芪茎中有效成分提取方法的研究[J].哈尔滨商业大学学报,2004,20(3):273
- [6] 李红民,黄仁泉,王亚洲.提高黄芪多糖提取收率的工艺研究[J].西北大学学报,2000,30(6):509
- [7] 阎巧娟,韩鲁佳,江正强.纤维素酶法提取黄芪多糖[J].中草药,2005,36(12):1804
- [8] 杨莉,王志华,陶健生.黄芪中黄芪多糖含量测定方法的比较[J].中国医药工业杂志,2005,36(9):562
- [9] 石忠峰,陈蔚文,李卫民,等.大孔吸附树脂纯化黄芪总皂苷的研究[J].中草药,2005,36(9):1322

收稿日期:2007209203