

黄芪中免疫活性成分的不同提取方式比较

陈燕瑞, 曾以旺, 王少平, 代龙*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:** 优选黄芪中免疫活性成分的提取工艺。**方法:** 以黄芪甲苷和黄芪总多糖提取量、干浸膏得率为综合评价指标, 通过单因素试验考察水提法、1% NaOH 温浸法、1% CaO 煎煮法对黄芪中免疫活性成分提取效率的影响。采用 HPLC 测定黄芪甲苷含量, 流动相乙腈-水(30:70), 空气泵压力 0.4 MPa, ELSD 漂移管温度 105 °C, 载气流速 2.7 L·min⁻¹; 利用 UV 测定黄芪总多糖含量, 检测波长 489 nm。**结果:** 3 种提取方式的黄芪甲苷提取量分别为 0.826, 1.016, 0.842 mg·g⁻¹, 黄芪总多糖提取量分别为 14.49, 5.82, 17.04 mg·g⁻¹, 干浸膏得率无显著性差异。**结论:** 采用水提法能达到较好的提取效果, 同时生产成本较低, 适用于黄芪中免疫活性成分的工业大生产。

[关键词] 黄芪; 黄芪甲苷; 总多糖; 提取方法; 干浸膏得率

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0042-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160042

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140627.0947.106.html>

[网络出版时间] 2014-06-26 10:31

Comparison of Different Extraction Methods for Immunologically Active Components in Astragali Radix

CHEN Yan-rui, ZENG Yi-wang, WANG Shao-ping, DAI Long*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of immunologically active components in Astragali Radix. **Method:** Taking extracting amounts of astragaloside and total polysaccharides from Astragali Radix, dry extract yields as comprehensive evaluation index, methods of 1% NaOH soaking, 1% CaO boiling and water extraction were investigated by single factor test. HPLC was adopted to determine the content of astragaloside with mobile phase of acetonitrile-water (30:70), air pump pressure of 0.4 MPa, ELSD drift tube temperature at 105 °C and carrier gas flow rate of 2.7 L·min⁻¹; the content of total polysaccharides from Astragali Radix was determined by UV, detection wavelength was set at 489 nm. **Result:** By extracting of these three kinds of methods, extracting amounts of astragaloside were 0.826, 1.016, 0.842 mg·g⁻¹, extracting amounts of total polysaccharides were 14.49, 5.82, 17.04 mg·g⁻¹, respectively; but dry extract yield had no significant difference. **Conclusion:** Water extraction process could achieve better extraction effect by comparing with the other two methods, it could reduce production costs for industrial mass production of immunologically active components in Astragali Radix.

[Key words] Astragali Radix; astragaloside; total polysaccharides; extraction method; dry extract yield

黄芪性温,味甘,具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌之功效^[1],其提高机体免疫力的主要

[收稿日期] 20131222(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09103002-021)

[第一作者] 陈燕瑞,在读硕士,从事中药制剂工艺及质量标准研究,Tel:15275170372,E-mail:chyr2012@126.com

[通讯作者] *代龙,教授,从事中药新药开发及新剂型研究,Tel:0531-68684868,E-mail:shouyaodruglab@163.com

药效成分为黄芪总多糖和黄芪甲苷^[2]。目前常采用水、1%氢氧化钠溶液、1%氧化钙等煎煮提取黄芪中有效成分,但均只选择了一种成分的提取率作为考察指标,同时未对各提取方式进行比较。本实验以黄芪甲苷和黄芪总多糖提取量、浸膏得率为综合评价指标,通过单因素试验考察不同提取方式对黄芪免疫活性成分提取效果的影响,为该药味活性成分的充分利用提供参考。

1 材料

LC-2010A型高效液相色谱仪(日本岛津公司),DZF-6020型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司),ABI135-S型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。黄芪购于安国药材市场,经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 干燥根;D-无水葡萄糖、黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为0781-200311,20090408),乙腈为色谱纯,水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同提取液的制备

2.1.1 水提取液 称取黄芪粗粉50 g,加10倍量水煎煮1 h,滤过;药渣加8倍量水煎煮2次,每次1 h,滤过;合并滤液,离心($3\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min,下同),上清液减压浓缩至50 mL,备用。

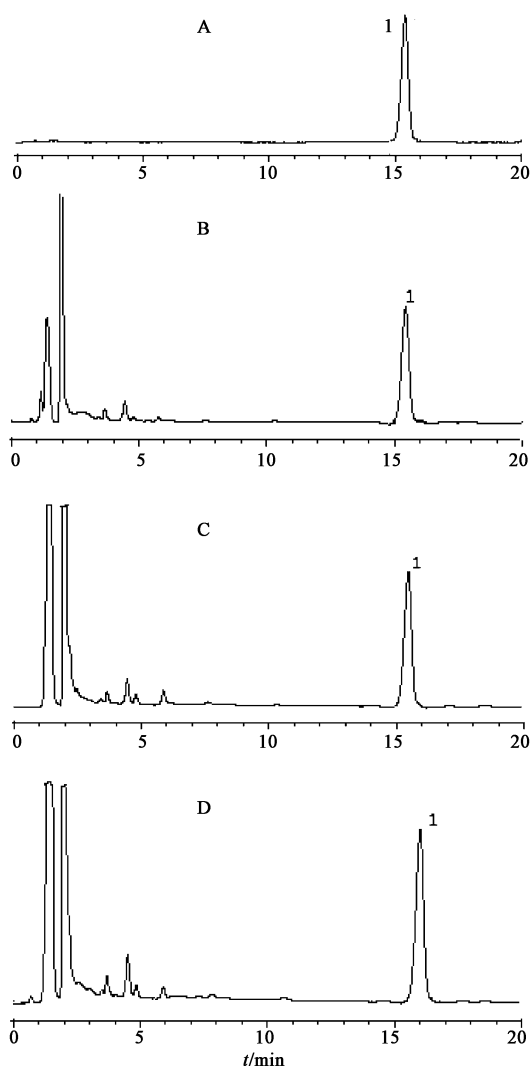
2.1.2 1% NaOH 温浸提取液 称取黄芪粗粉50 g,加10倍量1% NaOH于70℃温浸1 h,滤过;药渣加8倍量1% NaOH于70℃温浸提取2次,每次1 h,滤过,合并滤液;离心,上清液加稀盐酸调节pH7,减压浓缩至50 mL,备用。

2.1.3 1% CaO 煎煮提取液^[3] 称取黄芪粗粉50 g,加10倍量1% CaO煎煮1 h,滤过;药渣加8倍量1% CaO煎煮2次,每次1 h,滤过;合并滤液,离心,上清液减压浓缩至50 mL,加20% H₂SO₄调节pH7,冷藏过夜,离心,取上清液,备用。

2.2 黄芪甲苷的含量测定^[4-5]

2.2.1 色谱条件 Kromasil 100-5 C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相乙腈-水(30:70),柱温35℃,流速1.0 mL·min⁻¹,空气泵压力0.4 MPa,ELSD漂移管温度105℃,载气流速2.7 L·min⁻¹,见图1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品12.53 mg,置25 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。



A. 对照品;B. 水提取液;C. 1% NaOH 提取液;

D. 1% CaO 提取液;1. 黄芪甲苷

图1 不同黄芪提取液 HPLC

2.2.3 供试品溶液的制备 精密移取不同提取液各10 mL,分别转移至分液漏斗中,用水饱和和正丁醇振摇提取4次,每次40 mL,弃去水液,合并正丁醇提取液;加氨试液洗涤2次,每次40 mL,弃去氨试液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 标准曲线的制备 精密吸取2.2.2项下对照品溶液2,4,6,8,10 μL,按2.2.1项下色谱条件测定,以黄芪甲苷进样量的对数值为横坐标,峰面积积分值的对数值为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.620\ 6X + 6.607\ 2$ ($r = 0.999\ 8$),线性范围1.002 4~5.012 μg。

2.3 黄芪总多糖的含量测定^[6]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取105℃干燥

至恒温重的无水葡萄糖对照品 10.02 mg,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密移取清膏 5 mL,加入 95% 乙醇使醇沉浓度达 40%,放置过夜,离心(3 500 r·min⁻¹, 15 min),弃去沉淀,上清液加入 95% 乙醇使醇沉浓度达 80%,放置过夜,离心(4 500 r·min⁻¹, 15 min),弃去上清液,沉淀用水溶解并定容至 250 mL,精密移取 10 mL,加水定容至 100 mL,即得。

2.3.3 标准曲线的制备 分别精密吸取对照品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL,分别置于 10 mL 具塞刻度试管中,各加水至 2 mL,精密加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,充分混合后迅速贴壁精密加入浓硫酸 5.0 mL,迅速振摇 2 min,置沸水浴中 15 min,以“0 mL”具塞试管中溶液为空白,于 489 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程式 $A = 0.0105C + 0.254 (r = 0.9992)$,线性范围 8.512 ~ 51.072 μg。

2.4 干浸膏得率的测定 精密移取各提取液 10 mL 至蒸发皿中,于 80 °C 水浴蒸干,105 °C 干燥 3 h,取出,置干燥器内冷却 30 min,迅速称重,计算干浸膏得率,结果见表 1。

表 1 不同黄芪提取液的含量测定

提取液	黄芪甲苷 提取量/mg·g ⁻¹	黄芪总多糖 提取量/mg·g ⁻¹	干浸膏 得率/%
水	0.826	14.49	33.60
1% NaOH	1.016	5.82	32.20
1% CaO	0.842	17.04	33.94

2.5 样品测定 精密量取各提取液适量,分别按 2.2.3 和 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,置于 10 mL 具塞刻度试管中,按 2.2.1 项下色谱条件测定黄芪甲苷含量,按 2.3.3 项下自“各加水至 2 mL”起依法显色,于 489 nm 处测定 A,计算黄芪总多糖含量,结果见表 1。

3 讨论

黄芪甲苷和黄芪总多糖均为黄芪中提高机体免疫力的药效学成分^[7-9],因此最大程度提取出有效的药效成分,不仅秉持中药可持续利用的理念,也是

对中药的多效利用。由表 1 可知,1% NaOH 温浸提取有利于提高黄芪甲苷的提取效率,但该法提取的黄芪总多糖含量明显低于其他方式,同时工艺流程中涉及使用碱液,不仅对仪器设备具有腐蚀性,而且会造成环境污染,不适用于工业大生产。1% CaO 溶液煎煮提取和水提取黄芪甲苷含量相较差异不显著,但前者提取的总多糖含量明显高于后者,同时 1% CaO 煎煮提取液在减压浓缩时易爆沸,不利于浓缩,并且操作步骤涉及酸碱,比水提取复杂,进一步增加了生产成本,故从工业生产成本和环保等角度考虑,采用水提取法最适合用于黄芪工业大生产。

[参考文献]

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2006:2809.

[2] Kajimura K, Takagi Y, Ueba N, et al. Protective effect of Astragali Radix by intraperitoneal injection against Japanese encephalitis virus infection in mice [J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(6):855.

[3] 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:自然科学版, 2000, 30(6):509.

[4] 李峰, 裴俊俊, 张爱均, 等. HPLC-ELSD 法对肺癆片中黄芪甲苷的含量测定[J]. 山东中医药大学学报, 2007, 31(6):507.

[5] 房方, 陆逸林, 毛春芹, 等. HPLC-ELSD 法测定养心颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2007, 24(5):408.

[6] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9):550.

[7] 张峰, 高鹏, 彭俊华. 黄芪多糖及黄芪甲苷对巨噬细胞吞噬结核杆菌作用的研究[J]. 西北国防医学杂志, 2005, 26(6):434.

[8] 魏炳栋, 于维, 陶浩, 等. 黄芪多糖对 1~14 日龄肉仔鸡生长性能、脏器指数及抗氧化能力的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(3):486.

[9] 张蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21):3203.

[责任编辑 刘德文]