

大孔树脂法对蒙古黄芪提取物中总皂苷精制工艺优选

包晓华, 王青虎*, 奥·乌力吉 那音台 阿拉木斯
(内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028000)

[摘要] 目的: 优选蒙古黄芪提取物中总皂苷的精制工艺。方法: 以蒙古黄芪总皂苷为指标, 紫外分光光度法测定其含量, 单因素试验考察吸附容量、洗脱溶剂及其用量; 选取上样量、吸附时间和洗脱流速为考察因素, 采用正交试验法优选其洗脱条件。结果: 优选的精制工艺为上柱溶液 5 mL 加 10 mL 水混匀, 上柱, 吸附时间 1.0 h, 加 10 倍量水洗脱, 5 倍量 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 洗脱流速 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。洗脱液减压回收至干, 于 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥后总固体物中总皂苷纯度达到 87.63%。结论: 该优选工艺简单可行, 能较好地纯化蒙古黄芪总皂苷。

[关键词] 大孔树脂; 蒙古黄芪; 总皂苷; 精致工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0055-03

Optimization of Purification Technology for Total Saponins from *Astragalus membranaceus* by Macroporous Resin

BAO Xiao-hua, WANG Qing-hu*, AO · WULIJI Nayintai-alamusi
(College of Traditional Mongolian Medicine, Inner Mongolia University
for the Nationalities, Tongliao 028000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize refining process of total saponins from extracts of *Astragalus membranaceus*. **Method:** With total saponins from *A. membranaceus* as index, the content of it was determined by UV spectrophotometry, adsorption capacity, kind and its amount of elution solvent were investigated by single factor test; Sample quantity, adsorption time and elution flow velocity were chosen as factors, elution conditions were optimized by orthogonal test. **Result:** optimized refining process was: mixed with 5 mL sample solution and 10 mL water, on column, adsorption time 1.0 h, eluted with 10 times the amount of water and 5 times the amount of 70% ethanol, collected eluent, elution flow velocity $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Eluent was decompressed recovery to dried, purity of total saponins was up to 87.63% after drying at $105 \text{ }^\circ\text{C}$. **Conclusion:** This optimized technology was simple and feasible, it could be better to purify total saponins from *A. membranaceus*.

[Key words] macroporous resin; *Astragalus membranaceus*; total saponins; refining process

蒙古黄芪, 蒙名混其日, 别名沙日-萨日德玛, 主要分布于内蒙古、山西、甘肃、黑龙江, 具有补气固表、托毒生肌、利水退肿等功效^[1]。其主要含有皂苷、多糖和黄酮类化合物^[2-5], 现代药理研究结果表明, 黄芪皂苷具有降压、抗病毒、保护心肌、减轻心肌缺血再灌注损伤作用^[6-8]。王鑫等^[9]以黄芪总皂苷为考察指标, 对黄芪提取工艺进行研究, 得到最佳工

艺为加 12, 10, 10 倍量 60% 乙醇提取 3 次, 每次提取 1.5 h。钱琳等^[10]以黄芪甲苷浸出量为评价指标, 采用正交试验法优化黄芪中黄芪甲苷的水提工艺, 得最佳提取工艺为回流提取 3 次, 加水量分别为 10, 8, 8 倍, 提取时间 2.0, 1.5, 1.5 h。本文按文献^[10]的提取工艺得到蒙古黄芪提取物, 采用 D₁₀₁ 型大孔树脂对提取物中总皂苷的精制工艺条件和参数进行优选, 为工业化生产提供参考依据。

1 材料

蒙古黄芪采集于蒙古国, 经内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药生药教研室主任布和巴特尔教授鉴定

[收稿日期] 20120618(010)

[通讯作者] * 王青虎, 博士, 从事有效成分提取和质量标准研究, Tel: 0475-8314242, E-mail: wqh693@163.com

为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,批号 20120312,并保存于内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药化学教研室。UV-2501PC 型紫外-可见分光光度计(日本岛津),玻璃柱(2.20 cm × 30 cm),AUW200D 型电子分析天平(日本岛津),D101 型大孔树脂(天津市光复精细化工研究所),黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110781-200613),试验试剂均为分析纯。

2 方法与结果^[11-12]

2.1 黄芪总皂苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 2.00 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 1.8 mL, 分别置于 10 mL 具塞刻度试管中,水浴蒸干,冷却,加 5% 香草醛-冰乙酸溶液 0.2 mL 及高氯酸 0.8 mL,混匀,于 60 °C 水浴加热 15 min。取出,冰水冷却至室温,加冰乙酸至刻度,充分混匀,以“0 mL”具塞刻度试管中的溶液为空白,于 560 nm 波长处测定吸收度(A)。以黄芪甲苷质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.0025C + 0.0182$ ($r = 0.9997$)。黄芪甲苷在 400 ~ 3 600 μg 具有良好线性关系。

2.1.3 上柱溶液的制备 称取蒙药黄芪 200 g,分别加 12, 10, 10 倍量 60% 乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h。共得称取提取物 50.46 g,加水溶解,转移置 200 mL 量瓶中,加水至刻度,混匀,即得。

2.1.4 样品测定 吸取过柱流出液一定量,减压回收溶剂,照标准曲线制备项下方法自“加 5% 香草醛-冰乙酸溶液 0.2 mL 及高氯酸 0.8 mL”起,依法测定 A,并用回归方程计算。

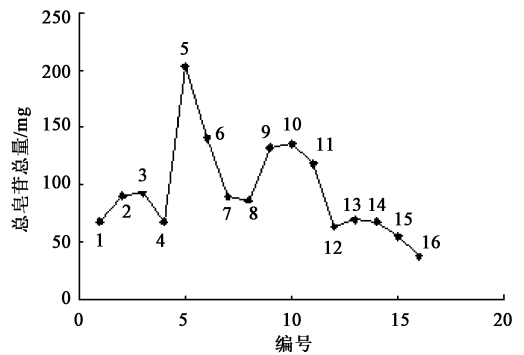
2.2 大孔树脂吸附影响因素的测定

2.2.1 大孔树脂的处理 将大孔树脂用乙醇浸泡 2 d,上柱,用乙醇洗至流出液与水(1:1)混合不产生浑浊现象为止,抽滤,树脂自然晾干至无乙醇味。称取处理过的大孔树脂 10.0 g,以水湿法装柱(2.20 cm × 30 cm),备用。

2.2.2 吸附容量的测定 吸取上柱溶液 5 mL,加水 10 mL,混匀,上柱,预吸附 1 h,流出液重吸附 1 次,加水洗至流出液不显 molish 反应,依次用体积分数为 50%, 70%, 90% 的乙醇梯度洗脱,流速 4 mL·min⁻¹,洗至无皂苷检出,洗脱液置 300 mL 量瓶中,定容至刻度,平行 3 份。测定总皂苷含量,计

算吸附容量 17.71 mg·g⁻¹。

2.2.3 洗脱溶剂的选择 按 2.2.2 项下方法上柱,吸附 0.5 h,加水洗至流出液不显 Molish 反应,依次用体积分数为 30%, 50%, 70%, 90% 的乙醇溶液各 100 mL 梯度洗脱,流速 4 mL·min⁻¹,分别收集洗脱液,每份 25 mL,共 16 份。以收集洗脱液先后编号,测定含量,计算。以收集瓶编号为横坐标,总皂苷总量为纵坐标绘制洗脱曲线,见图 1。



1~4. 30% 乙醇收集液; 5~8. 50% 乙醇收集液; 9~12. 70% 乙醇收集液; 13~16. 90% 乙醇收集液

图 1 不同体积分数乙醇对黄芪总皂苷总量的影响

由图 1 可知,黄芪总皂苷主要集中在 50% 乙醇和 70% 乙醇洗脱液中,占全部醇洗脱液中总皂苷的 90% 以上,二者所占百分比无显著差异,但 50% 乙醇洗脱的解吸速度比 70% 乙醇快,70% 乙醇洗脱的总皂苷纯度高,故确定洗脱溶剂为加水洗去水溶性杂质,用 70% 乙醇洗脱,收集 70% 乙醇洗脱液。

2.2.4 洗脱溶剂用量考察 在确定吸附容量和洗脱溶剂的基础上,吸取上柱溶液 5 mL,加水 10 mL,混匀,上柱,预吸附 0.5 h,流速 4 mL·min⁻¹,加水洗脱至流出液不显 molish 反应,分别用 20% 乙醇 100 (条件 1), 200 (条件 2), 300 (条件 3) mL 洗脱,加 70% 乙醇 200 mL 洗脱,分段收集(100, 50, 50 mL)。洗脱液减压回收溶剂,真空干燥,称定总固体物质量,并测定其总皂苷含量,结果见表 1。

表 1 不同洗脱条件下蒙古黄芪的总皂苷测定

No.	20% 乙酸 洗脱量/mL	70% 乙醇洗脱量/mg(洗脱率/%)			总固体物 /mg
		100 mL	50 mL	50 mL	
1	100	158.96(87.05)	16.18(8.86)	2.63(1.44)	182.6
2	200	161.16(93.81)	3.56(2.07)	1.08(0.63)	171.8
3	300	157.76(91.56)	3.37(1.96)	0.66(0.52)	172.3

由表 1 结果可知,3 种洗脱条件所得到总固体物无明显差异,总皂苷含量均 > 75%,考虑到条件 2 和条件 3 比条件 1 有较大提高,但条件 2 和条件 3 相

差不大,故确定蒸馏水用量为 200 mL。同时前 100 mL 70% 乙醇洗脱率均 > 90%,故确定 70% 乙醇用量为 100 mL。

2.3 正交试验优化精制工艺 根据大孔树脂吸附影响因素的测定结果,发现上样量、吸附时间、洗脱流速对洗脱影响较大。本试验采用正交试验法,以上样量、吸附时间、洗脱流速为考察因素,每个因素选择 3 个水平,因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3。

表 2 蒙古黄芪总皂苷提取物精制工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C
	上样量/mL	吸附时间/h	洗脱流速/mL·min ⁻¹
1	5 + 5 水	0.5	2
2	5 + 10 水	1.0	4
3	5 + 15 水	1.5	6

表 3 蒙古黄芪总皂苷提取物精制工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总皂苷总量/mg
1	1	1	1	1	79.56
2	1	2	2	2	89.36
3	1	3	3	3	70.36
4	2	1	2	3	90.56
5	2	2	3	1	91.60
6	2	3	1	2	100.2
7	3	1	3	2	73.16
8	3	2	1	3	86.36
9	3	3	2	1	71.96
K ₁	79.76	82.09	88.71	81.04	
K ₂	95.12	89.11	84.96	87.57	
K ₃	77.16	80.84	78.37	88.43	
R	17.96	8.27	10.33	6.53	

由直观分析可知,各因素的主次顺序为 C > B > A,最佳精制工艺为 A₂B₂C₁。即上柱量为上柱溶液 5 mL 加 10 mL 水,混匀,上柱,吸附时间 1.0 h,洗脱流速 2 mL·min⁻¹。

2.4 验证试验 按最佳精制工艺进行 3 次验证试验,测得洗脱液中黄芪总皂苷平均含量 87.63%,与预测值接近,说明该方法稳定可行。

3 讨论

通过预试验可知,加水洗脱至流出液不显 Molish 反应,再用 20% 乙醇洗脱,不仅洗脱液中总皂苷没有洗出,且大大提高了洗脱液中总皂苷的纯度。

D101 型大孔树脂能有效的分离纯化蒙古黄芪中总皂苷,工艺简单可行,精制固体物中总皂苷的质量分数可达 87.63%,且成本低,可供蒙药厂大生产应用。

[参考文献]

- [1] 布和巴特儿. 蒙药手册[M]. 沈阳:辽宁民族出版社, 1986:224.
- [2] 卞云云,管佳,毕志明,等. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2006,41(16):1217.
- [3] 郑善根,吴弢,王峥涛. 各层岩黄芪根化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(17):2350.
- [4] 郑善松,王峥涛. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 上海中医药大学学报,2011,25(5):89.
- [5] Li Q, Jiang J Q. The chemical constituents study of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao[J]. Pharm Today, 2010, 20(11):32.
- [6] 杜敏捷,王辰,曹大德,等. 慢性阻塞性肺疾病合并肺间质纤维化的病理学研究[J]. 中华结核和呼吸杂志,1999,22(1):30.
- [7] Rubjo M L, Sanchez-Cifuentes M V, Ortega M, et al. N-acetylcysteine prevents cigarette smoke induced small airways alterations in rat [J]. Eur Respir J, 2000, 15(3):505.
- [8] Flaherty K R, Martinez F J. Cigarette smoking in interstitial lung disease: concepts for the internist [J]. Med Clin North Am, 2004, 88(6):1643.
- [9] 王鑫,张振秋,吕佳,等. 黄芪提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):17.
- [10] 钱琳,邓楠. 黄芪提取工艺研究[J]. 中国现代医学杂志,2009,19(11):1605.
- [11] 杨军宣,吴天娇,尹蓉莉,等. 正交设计法优化酸枣仁皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):63.
- [12] 卢君蓉,傅超美,陈秀薇,等. 二母颗粒中知母水提工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):31.

[责任编辑 全燕]