

# 黄芪有效部位的复合型纯化工艺

段立军, 孙博航\*

(沈阳药科大学中药学院 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的: 确定黄芪有效部位的复合型纯化工艺。方法: 采用正交试验设计法, 以多糖收率、多糖含量为指标, 优选了多糖醇沉和除蛋白工艺; 以单因素考察法优选了黄芪总皂苷的纯化工艺。结果: 总多糖最佳醇沉工艺为醇沉前生药量与浓缩液体积比 1:1, 醇沉温度 40 ℃, 加入 3 倍量 95% 的工业乙醇, 醇沉静置 18 h, 粗多糖除蛋白的最佳工艺为配制质量浓度为 15 g·L<sup>-1</sup> 的粗多糖溶液, 加入粗多糖溶液 1/3 体积的 Sevage 试剂, 连续脱除 2 次; 大孔树脂纯化黄芪总皂苷的最佳工艺为使用 D101 型树脂, 树脂-药材比为 5:2, 以 4BV 水洗除杂, 再以 4 BV 70% 乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱液, 蒸干即可。结论: 此法优选出的工艺可以实现黄芪总多糖、总皂苷的次序提取。工艺流程科学、经济, 可有效节约资源, 指导工业生产。

**[关键词]** 黄芪; 多糖; 总皂苷; 正交试验; 综合评分

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0025-04

## Complex Purification Technology of Effective Parts from Astragali Radix

DUAN Li-jun, SUN Bo-hang\*

(Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery, Ministry of Education, College of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize complex purification technology of effective parts from Astragali Radix. **Method:** The technology of polysaccharide alcohol precipitation and removing protein were optimized by orthogonal test with the yield and content of polysaccharide in the extract as index. Purification technology of total saponins from Astragali Radix was optimized by single factor test. **Result:** Optimum ethanol deposition technology was as follows: 3 times of 95% ethanol was added to the solution and keep still in 18 hours at 40 ℃ with the concentration of 1:1 (material: solution volume); The optimum technology of polysaccharide removing protein was as follows: one

**[收稿日期]** 20110126(001)

**[第一作者]** 段立军, 在读硕士研究生, 从事天然药物化学研究

**[通讯作者]** \* 孙博航, 副教授, 硕士生导师, 从事天然活性成分的纯化工艺和质量控制研究, Tel: 024-23986468, E-mail: sunbohanga@hotmail.com

积、总黄酮、Mr ≤ 1 000 的提取物的测定, 较通常以粗提物为最终产物, 不仅提取物得率大大降低, 可缩小服用剂量, 而且为选用现代药物新剂型提供了可能, 同时提高了技术含量。以 Mr ≤ 1 000 的提取物量为指标能体现中药整体、综合、客观、模糊的特点, 这是中药药效物质提取研究设计中一种新思路, 对中药现代化研究很有借鉴意义。

### [参考文献]

[1] 张兆旺. 中药药剂学专论[M]. 北京: 人民卫生出版社,

2009: 68.

[2] 张瑞亭, 张兆旺, 孙秀梅. 思维方式的转换与中药“半仿生提取法”[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(9): 542.

[3] 孙秀梅, 张兆旺. 用均匀设计优选麻杏石甘汤的半仿生提取法工艺条件[J]. 中成药, 2002, 24(12): 914.

[4] 季宇彬. 中药活性成分与药理应用[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2004: 604.

[责任编辑 全燕]

third volume of Sevage reagent was added into polysaccharide solution with the concentration of  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Total saponin purification optimum technology was as follows: D101 macroporous resin was used, the ratio of resin to drug was 5:2, eluted with 4 BV of water followed with 4 BV of 70% ethanol in D101 macroporous resin, collected ethanol eluate, evaporated. **Conclusion:** The polysaccharide and total saponins can be purified with the systemic method and it can be used of the full use of the material and industrial work.

[**Key words**] Astragali Radix; polysaccharide; total saponins; orthogonal test; synthetical mark

黄芪 (Astragali Radix) 为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 和蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. 的干燥根<sup>[1-2]</sup>, 主要分布于我国西北、华北和东北等地区, 为“补药之首”<sup>[3]</sup>。具有补气固表、托毒排脓、生肌、利尿的功效<sup>[4]</sup>。经前期研究表明, 黄芪中主要的活性成分为黄芪多糖、皂苷和黄酮类化合物<sup>[5]</sup>。在本课题组前期研究中, 分别建立了硫酸-蒽酮法测定黄芪多糖、高氯酸-香草醛法测定黄芪总皂苷含量的方法。并通过正交试验优选了黄芪总多糖和总皂苷的水提取工艺<sup>[6]</sup>。试验结果显示黄芪多糖  $10 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  可通过外标一点法计算含量, 黄芪总皂苷  $0.04 \sim 0.24 \text{ mg}$  可通过外标一点法计算含量。2 个方法精密度、重复性、30 min 稳定性和加样回收率均符合相关要求。通过综合评分法优化的水提取工艺为加入 12 倍量水, 浸泡 1.0 h, 煎煮 2.0 h; 加入 8 倍量水, 煎煮 1.5 h; 加入 6 倍量水, 煎煮 1 h。

在上述结果的基础上, 本研究通过正交试验设计考察了黄芪多糖的乙醇沉淀工艺和 Sevage 除蛋白的方法。此外, 通过单因素考察优选了大孔树脂法纯化制备黄芪总皂苷的方法。通过该复合型纯化工艺可实现黄芪总多糖、总皂苷的次序提取。且本工艺流程科学、经济, 可有效节约资源, 指导工业生产。

## 1 材料

UV-1700 型紫外-可见分光光度计 (日本 Shimadzu 公司), ESJ180-4 型电子天平 (沈阳龙腾电子称量仪器有限公司)。

中药黄芪 (购自沈阳童龄药材有限公司, 经沈阳药科大学孙启明教授鉴定为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao., 黄芪甲苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110781-200613), D-无水葡萄糖对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 11083200302, 供含量测定用), 硫酸、蒽酮、香草醛、冰醋酸、高氯酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 多糖的醇沉工艺考察** 考虑到传统中药企业仍使用醇沉法作为主要的纯化手段, 出于最大限度利用现有条件, 避免大规模设备改造、降低工业化生产难度的目的, 本研究采用醇沉法作为制备多糖的主要方法。优选了醇沉过程中生药量与浓缩液体积比、醇沉温度、乙醇加入量和静置时间 4 个因素, 每个因素选择 3 个水平进行  $L_9(3^4)$  正交设计, 以黄芪多糖收率和含量为评价指标, 采用综合评分法进行数据分析 (其权重系数分别为 0.2, 0.8)。各因素水平见表 1, 正交试验结果见表 2。

表 1 黄芪多糖醇沉工艺因素水平

水平	A 生药量与浓缩液 体积比/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	B 醇沉温度 / $^{\circ}\text{C}$	C 乙醇加入 量/倍	D 静置时间 /h
1	1:1.0	室温	3	6
2	1:1.5	40	4	12
3	1:2.0	60	5	18

综合直观分析的结果, 同时考虑省时、节能、经济, 确定最佳工艺组合为  $A_1B_2C_1D_3$ , 即生药量与浓缩液体积比 1:1, 醇沉温度  $40^{\circ}\text{C}$ , 加入 3 倍量 95% 的工业乙醇, 醇沉静置 18 h。

**2.2 Sevage 法除蛋白工艺考察** 本试验采用正交试验设计考察了 Sevage 法除蛋白过程中的 3 个因素 (多糖质量浓度、Sevage 试剂加入量、脱蛋白次数)。采用综合评分法, 以多糖保留率及蛋白脱除率为衡量指标 (两者的权重都为 0.5), 对试验结果进行统计分析, 优化黄芪多糖脱蛋白纯化工艺。试验因素水平见表 3, 正交试验结果见表 4。

由直观分析可知,  $C_1$  与  $C_2$  的差异较小, 考虑到简化工业化生产的操作过程, 综合考虑到省时、节能、经济, 确定最佳工艺组合为  $A_1B_1C_1$ , 即质量浓度为  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的粗多糖溶液, 加入粗多糖溶液 1/3 体积的 Sevage 试剂, 连续脱除 2 次, 效果较好。

**2.3 总皂苷纯化工艺考察** 黄芪水提取液经乙醇沉淀后, 乙醇溶液经浓缩除醇, 残渣加入适量水溶解, 通过大孔树脂纯化制备黄芪总皂苷。大孔树脂

表2 黄芪多糖醇沉工艺正交试验

No.	A	B	C	D	多糖收率/%	多糖含量/%	综合评分
1	1	1	1	1	7.29	58.45	94.64
2	1	2	2	2	5.60	58.35	89.87
3	1	3	3	3	5.56	58.05	89.38
4	2	1	2	3	4.74	53.05	80.75
5	2	2	3	1	4.64	60.00	89.35
6	2	3	1	2	3.12	60.60	85.94
7	3	1	3	2	4.48	43.10	67.33
8	3	2	1	3	4.49	62.65	92.32
9	3	3	2	1	3.31	45.35	66.99
$K_1$	91.30	80.91	90.97	83.66			
$K_2$	85.35	90.51	79.20	81.05			
$K_3$	75.55	80.77	82.02	87.48			
R	15.75	9.74	11.76	6.44			

表3 Sevice 法除蛋白因素水平

水平	A 多糖液质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	B 试剂加入量 /多糖液量	C 脱蛋白次数
1	15.0	1/3	2
2	7.5	1/4	4
3	5.0	1/5	6

表4 Sevice 法除蛋白正交试验

No.	A	B	C	多糖保留率/%	蛋白脱除率/%	综合评分
1	1	1	1	36.50	74.46	93.71
2	1	2	2	32.13	79.11	91.07
3	1	3	3	33.10	77.97	91.59
4	2	1	2	37.64	70.91	92.93
5	2	2	3	31.19	72.94	85.96
6	2	3	1	32.00	69.86	85.05
7	3	1	3	36.90	71.45	92.32
8	3	2	1	39.12	65.05	91.11
9	3	3	2	33.68	71.76	88.40
$k_1$	92.12	92.99	89.96			
$k_2$	87.98	89.38	90.80			
$k_3$	90.61	88.35	89.96			
R	4.14	4.64	0.84			

使用量 10 g,装柱直径 1 cm,柱高 13 cm,洗脱流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.3.1 大孔吸附树脂种类的选择** 考察不同树脂的饱和吸附量和静态洗脱率(图1)。试验结果表明

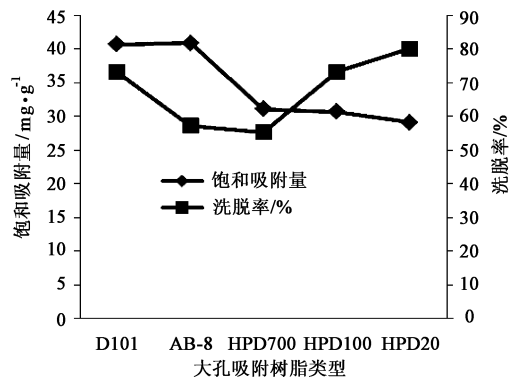


图1 不同树脂的饱和吸附量及洗脱率

静态吸附时,D101,AB-8型树脂对黄芪总皂苷吸附性较好;而在静态洗脱试验中D101型树脂吸附的总皂苷较AB-8易洗脱,洗脱率达73.2%,故选择D101型树脂。

**2.3.2 洗脱溶剂的确定** 考察不同体积分数的乙醇对吸附了总皂苷的D101树脂的洗脱情况(图2)。试验结果表明使用70%乙醇洗脱固形物得率和皂苷含量较高。95%和无水乙醇洗脱时,虽然得率和含量略有增大,但增幅较小。综合考虑2项指标,确定选择70%乙醇为洗脱溶剂。

**2.3.3 乙醇最佳洗脱量的确定** 用50 g药材和10 g D101型大孔吸附树脂,考察了1~5倍保留体积(BV)的70%乙醇对D101大孔吸附树脂的洗脱情况(图3)。试验结果表明4 BV乙醇累积洗脱黄芪总皂苷,已基本洗尽。故确定使用70%乙醇洗脱应不少于4 BV。

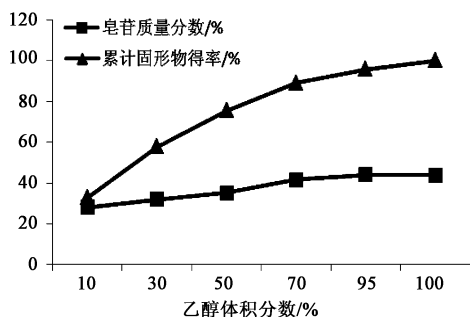


图 2 不同体积分数乙醇洗脱

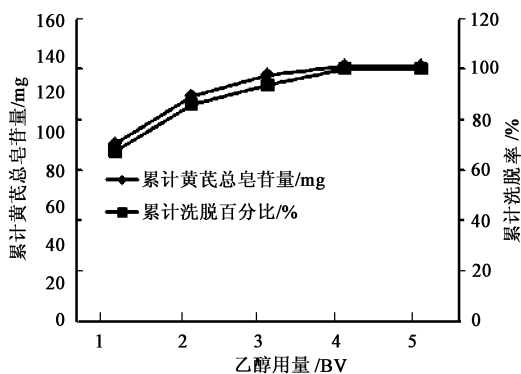


图 3 洗脱剂用量考察

**2.3.4 最佳上样量的确定** 使用 200 g 药材, 提取浓缩并定容至 400 mL, 从中分别吸取 6, 8, 10, 12, 15 mL, 上样(10 g 树脂), 静置 30 min。用 4 BV 蒸馏水洗脱, 收集并测定洗脱液中总皂苷的含量, 计算最佳上样量, 试验结果见图 4。结果在 8 mL 上样量前后, 未吸附的黄芪总皂苷含量出现显著性差异, 推测 8 mL 上样量为临界值。故确定最佳上样量为  $m_{\text{树脂}} : m_{\text{药材}} = 5 : 2$ 。

### 3 讨论

本研究采用单因素法考察筛选了大孔树脂纯化

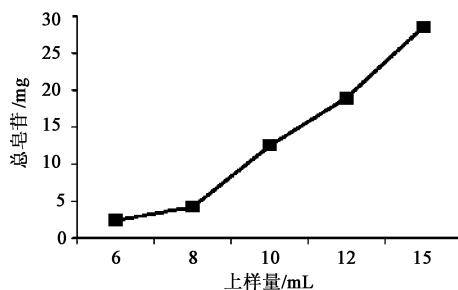


图 4 总皂苷泄漏曲线

黄芪总皂苷的工艺: 黄芪水提取液经乙醇沉淀后, 乙醇溶液经浓缩除醇, 残渣加入适量水溶解, 通过 D101 型大孔吸附树脂, 树脂-药材比为 5:2, 以 4 BV 水洗除杂, 再以 4 BV 70% 乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱液, 蒸干既得。

此法优选出的工艺可以实现黄芪总多糖、总皂苷的次序提取。且本工艺流程科学、经济, 可有效节约资源, 指导工业生产。

### [参考文献]

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员. 中国植物志. 第 42 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1967: 241.
- [2] 中国医学科学院药物研究所. 中药志. 第二分册[M]. 北京: 上海科学技术出版社, 1959: 12.
- [3] 赵永华. 黄芪[M]. 北京: 中国医药出版社, 2001: 1.
- [4] 星塔, 喻正坤. 黄芪成分和药理活性研究进展[J]. 上海医药, 1995(2): 23.
- [5] 何侃, 王惠康. 近年来黄芪及其同属近缘植物的化学成分研究进展[J]. 药学学报, 1988, 23(11): 873.
- [6] 罗毅, 刘刚, 周本宏, 等. 综合评价法优选黄芪的水煎提工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(11): 667.

[责任编辑 仝燕]