

## 黄芪皂苷的提取及含量测定

王培培<sup>1,2</sup>, 许杜娟<sup>2\*</sup>, 夏泉<sup>2</sup>

(1. 安徽医科大学药学院, 合肥 230032; 2. 安徽医科大学第一附属医院药剂科  
国家中医药管理局中药化学三级实验室, 合肥 230022)

[摘要] 目的: 研究黄芪药材中黄芪皂苷的提取工艺及含量测定。方法: 采用 70% 乙醇回流提取, 水饱和正丁醇萃取, D101 大孔吸附树脂富集纯化黄芪总皂苷, 硅胶柱层析分离不同的皂苷组分; 采用薄层色谱法 (TLC)、高效液相-示差检测器法 (HPLC-RID) 进行皂苷类成分的鉴定和含量测定。结果: 从黄芪总皂苷中分离出六种黄芪皂苷化合物 (AS- ~AS- ), 其中 AS- 部分经鉴定主要含皂苷, 质量分数为 29.4%, AS- 部分经鉴定主要含皂苷, 质量分数为 22.82%。其余 4 个部分有待于进一步鉴定。结论: 此法能较好的分离和纯化黄芪皂苷, TLC 和 HPLC-RID 法操作简便, 可作为黄芪皂苷的鉴定和含量测定方法。

[关键词] 黄芪皂苷; 提取; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1, R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0027-04

## The extraction and determination the contents of astragaloside

WANG Pei-pei<sup>1,2</sup>, XU Du-juan<sup>2\*</sup>, XIA Quan<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 23003, China;

2. Department of Pharmacy, Third-Grade pharmaceutical Chemistry Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 23002, China)

**[Abstract] Objective:** Study on extracting technology and assay of astragaloside in Astragalus. **Method:** 70% ethanol circumfluence extraction was used. Total astragaloside was enriched and purified by extraction refine through water saturated of n-butanol and D101 microporous adsorption resin. Different components of astragaloside were isolated by silica gel laminar analysis. Identification by using TLC method and determination the contents by using HPLC-RID Method. **Result:** Six compounds were isolated from total astragaloside (AS- ~AS- ), and 29.4% astragaloside was identified in AS- part. AS- which content is 22.82% is mainly contained Astragaloside by identification. The rest four compounds are required to be identified. **Conclusion:** The method can be used for astragaloside, HPLC-RID method can be used to determine the content of astragaloside.

**[Key words]** astragaloside; extraction; HPLC; assay

[收稿日期] 2009-08-18

[基金项目] 安徽省自然科学基金(070413067); 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2007B149)

[通讯作者] \* 许杜娟, Tel: (0551) 2922442; E-mail: xudujuan6365@ yahoo. com. cn

蒲葶颗粒化学成分复杂, 选用 254 nm 检测时有阴性干扰。通过 190 ~600 nm 扫描, 大黄素甲醇溶液在 202, 254, 291 和 452 nm 处有最大吸收。经试验研究, 在 291 nm 进样测定, 基线平稳, 图谱分离较好, 且阴性对照无干扰, 故选择 291 nm 为测定波长。

因何首乌中所含大黄素有游离型及结合型, 采用加热回流酸水解测定总大黄素, 并对提取溶剂乙醇的浓度、回流时间、酸水解时间进行了考察, 优选出了最佳的样品处理方法。

### [参考文献]

- [1] 蒋晔, 郝晓花, 冯玉梅, 等. RP-HPLC 非水相测定牛黄解毒软胶囊中的大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量[J]. 中成药, 2005, 27(9): 1036.
- [2] 吕武清, 龙新华. 中成药中的药材薄层色谱鉴别[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 45, 325.
- [3] 郭丹, 陈娜娜, 晏媛, 等. 高效液相色谱法测定常通口服液中大黄素的含量[J]. 中国药房, 2003, 14(5): 296.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 17

黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*( Fisch. ) Bge. 或蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*( Fisch. ) Bge. var. *mongholicus*( Bge. ) Hsiao 的干燥根及根茎, 其主要含有皂苷类、多糖类、黄酮类等有效成分。

有报道从黄芪及其同属植物中共分离出四十余种三萜皂苷。其中膜荚黄芪中有乙酰黄芪苷 (Acetylastragaloside )、黄芪皂苷 (Astragaloside ~ )、异黄芪苷 (Isoastragaloside ~ )、黄芪皂苷乙 (Astramembrannin )、环黄芪醇 (Cycloastragenol) 和大豆皂苷 (Soyasaponin ) 等成分<sup>[1]</sup>。本实验研究通过从黄芪药材中提取分离皂苷类成分, 为今后进一步开展药理学研究提供物质基础。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100Series 高效液相色谱仪配备示差检测器, Agilent ChemStation 色谱工作站; CTG-10 提取器(湖南省衡阳市药物机械厂); TU-1800SPC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); AB135-S 电子分析天平( Mettler Toledo ); RE-52 旋转蒸发器 (上海青浦沪西仪器厂); ZK-82B 真空干燥箱(上海市实验仪器总厂); UV-8 三用紫外仪(无锡科达仪器厂)。

黄芪产于甘肃, 购自国投药业安徽有限公司, 批号: 080623; 经安徽中医学院药用植物学教研室刘守金教授鉴定为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*( Fisch. ) Bge.; 黄芪皂苷 标准品(中国药品生物制品检定所, 批号 0781-200210); 黄芪皂苷 标准品(上海中药标准化研究中心提供, 批号 07-1015); 硅胶高效 G 板(青岛海洋化工厂); 柱层析用硅胶(青岛海洋化工集团); D101 树脂(天津友昌工贸有限公司); 乙醇、正丁醇、乙酸乙酯、甲醇为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水。

### 2 实验方法与结果

**2.1 黄芪总皂苷的提取与分离** 黄芪药材 5 kg, 置于 CTG-10 提取器中, 用 70% 乙醇回流提取 2 次, 第 1 次加 10 倍量, 第 2 次加 8 倍量, 每次 1 h。合并提取液, 减压回收乙醇, 浓缩至 10 L。水饱和的正丁醇 (1:1) 萃取 3 次, 合并正丁醇部分, 回收正丁醇萃取液浓缩至约 1 L。

**2.2 黄芪总皂苷的富集与纯化** 浓缩后的萃取液缓慢加到已处理好的 D101 树脂柱 (7.5 cm × 95 cm, 树脂高度 64 cm) 上, 先以 4 倍柱体积的蒸馏水洗

脱, 以除去糖类成分, 继以 4 倍柱体积的 70% 乙醇洗脱, 收集 70% 醇洗脱液, 置旋转蒸发器上浓缩, 水浴蒸干后称重, 蒸干后称重得总皂苷 6.5 g。

**2.3 黄芪皂苷的分离与提取** 称取 300 g 硅胶装柱 (4.2 cm × 100 cm, 硅胶高度 78 cm), 将 “2.2” 制备的黄芪总皂苷, 加少量甲醇溶解后装柱, 分别以不同比例的乙酸乙酯-甲醇 (100:25, 100:30) 洗脱, 每 50 mL 收集一流份, 经薄层色谱检测, 合并相同部分, 浓缩蒸干, 称重, 依次得 AS- ~ AS- 部分。结果见表 1。

表 1 硅胶柱层析分离的黄芪皂苷组分

皂苷组分	洗脱剂 (乙酸乙酯-甲醇)	流份合并	质量/mg
AS-	100:25	40 ~ 57 号	71.9
AS-	100:30	58 ~ 73 号	52.5
AS-	100:30	75 ~ 89 号	124.7
AS-	100:30	90 ~ 95 号	36.1
AS-	100:30	96 ~ 107 号	192.7
AS-	100:30	108 ~ 117 号	101.9

**2.4 薄层色谱法鉴别黄芪皂苷** 称取黄芪皂苷和 标准品各 1.0 mg, 加 1 mL 甲醇溶解, 摇匀, 即得黄芪皂苷 和 浓度均为 1 mg · mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。称取黄芪总皂苷 10 mg; AS- ~ AS- 5 mg, 分别用 1 mL 甲醇溶解, 作为供试品溶液。硅胶高效 G 板用 0.3 mol · L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液浸泡, 115 °C 活化 3 h 备用。取供试品溶液和对照品溶液各 10 μL, 点于薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水 (6:3:1:1) 放置过夜的下层溶液为展开剂, 展距 15 cm, 展开, 取出, 吹干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 置烘箱中 105 °C 加热至斑点显色清晰, 同时置紫外光灯 (365 nm) 下检视, 见图 1。结果表明 AS- 部分主要含有皂苷 ; AS- 部分主要含有皂苷 ; AS- 、AS- 部分除含有少量皂苷 外, 还含有其他组分; AS- 、AS- 部分也含有未被鉴定的成分。

### 2.5 黄芪总皂苷含量测定<sup>[2]</sup>

**2.5.1 对照品溶液的制备** 精密称取黄芪皂苷标准品 5.0 mg, 置于 10 mL 的量瓶中, 用无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得。

**2.5.2 标准曲线的制备** 精密吸取对照品溶液 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 和 0.5 mL, 置具塞试管中, 加无水乙醇补足体积至 0.5 mL, 再分别加入 8% 的香草醛无水乙醇试液 0.5 mL 和 72% 的硫酸 5.0 mL



图 1 黄芪皂苷薄层色谱图  
( ~ 为分离的组分)

摇匀, 立即放入 62 °C 恒温水浴中, 保温 20 min 后, 置冷水浴中冷却至室温, 于 540 nm 波长处测吸光度。同时以随行试剂作空白。以吸光度 ( $Y$ ) 为纵坐标, 黄芪皂苷 的浓度  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $X$ ) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。其中黄芪皂苷 对照品的浓度范围为 4.167 ~ 41.667  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 回归方程为  $Y=0.0211X-0.0309$  ( $r=0.9979$ ), 说明黄芪皂苷 在此浓度范围内呈良好的线性关系。

**2.5.3 供试品溶液的制备** 精密称取黄芪总皂苷约 10 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 作为供试品溶液。精密吸取供试品溶液 0.2 mL, 照“2.5.2 标准曲线的制备”项下方法处理并测定吸光度。结果得出黄芪总皂苷质量分数为 321.7  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 占黄芪总量 0.13%。

## 2.6 高效液相色谱法

**2.6.1 色谱条件** Zorbax XDB-C<sub>8</sub> (4.6 mm × 1.50 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相乙腈: 水 = 34: 66; 柱温 25 °C; 示差检测器光学单元温度 32 °C; 流速 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**2.6.2 对照品溶液的制备** 取“2.4.1”项下的对照品溶液适量, 分别加甲醇稀释成浓度为 0.5, 0.25, 0.125, 0.063 和 0.032  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  对照品溶液。按上述色谱条件, 分别进样 10  $\mu\text{L}$ 。以峰面积为纵坐标, 对照品溶液的质量数 ( $\mu\text{g}$ ) 为横坐标, 进行线性回归。其中黄芪皂苷 在 0.35 ~ 5.6  $\mu\text{g}$  线性关系良好, 回归方程为  $Y=7977.2X-690.77$  ( $r=0.9998$ ); 黄芪皂苷 在 0.33 ~ 5.25  $\mu\text{g}$  线性关系良好, 回归方程为  $Y=6570.7X+2115.8$  ( $r=0.9998$ )。

**2.6.3 供试品溶液的制备与测定** 精密称取 AS- ~ AS- 各 1 mg, 加 1 mL 甲醇溶解, 取 20  $\mu\text{L}$ , 注

入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积, 由回归方程计算各组分中皂苷 和 的含量, 结果见表 2 和图 2。

表 2 黄芪皂苷质量分数测定

皂苷分离 组分	皂苷		皂苷	
	含量 / mg		占黄芪总皂苷百分比 / %	
AS-	0.120	—	29.4	—
AS-	—	—	—	—
AS-	—	0.162	—	22.82
AS-	—	—	—	—
AS-	—	—	—	—
AS-	—	—	—	—

注: “—”表示未检出

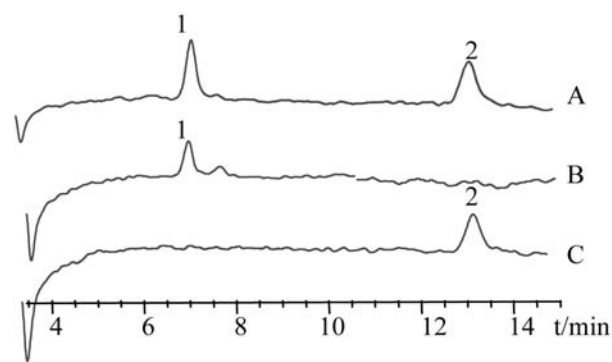


图 2 黄芪皂苷 HPLC 图

A. 混标溶液; B. AS- ; C. AS- ; 1. 皂苷 ; 2. 皂苷

**2.6.5 精密度试验** 取浓度为 0.125  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液, 重复进样 5 次, 每次 10  $\mu\text{L}$ , 记录峰面积并计算 RSD 值。结果为黄芪皂苷 RSD 0.47% ( $n=5$ ), 黄芪皂苷 RSD 0.37% ( $n=5$ ) 表明精密度良好。

**2.6.6 重复性试验** 取供试品 AS- 5 份, 分别制备各供试品溶液, 照上述色谱条件进行测定, 记录峰面积并计算 RSD 值。结果为样品 AS- RSD 0.19% ( $n=5$ ) 表明重复性良好。

**2.6.7 回收率试验** 精密称取 5 份 AS- , AS- 样品 1.0 mg, 分别制备各供试品溶液。其中 AS- 样品溶液中加入浓度为 0.125  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的皂苷 对照品溶液 0.5 mL, AS- 样品溶液中加入浓度为 0.125  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的皂苷 对照品溶液 0.5 mL, 依法操作, 测定, 计算加样回收率。见表 3。

## 3 讨论

黄芪总皂苷提取工艺采用了目前常用的醇提法结合正丁醇萃取和大孔树脂及硅胶柱层析进行纯化, 可以得到含量较高的总皂苷。

薄层色谱条件选择时比较了 G 板、高效 G 板、经  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  处理的 G 板和高效 G 板, 同时也比较了