

# 用均匀设计优化黄芪皂苷提取工艺

钱大玮<sup>1</sup>, 朱玲英<sup>1</sup>, 段金赓<sup>1</sup>, 鞠建明<sup>1</sup>, 邵文豪<sup>2</sup>

(1 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028; 2 南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

**摘要:**目的: 探讨黄芪最佳提取工艺。方法: 采用均匀设计优选, 以黄芪甲苷为检测指标。结果: 最佳提取条件为: 加入 8 倍量 85% 乙醇, 提取 3 次每次 1 小时。结论: 优选的黄芪提取工艺方法简便可靠, 适合工业化生产。

**关键词:** 黄芪; 黄芪甲苷; 提取; 均匀设计法

中图分类号: R283.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)06-0001-03

## Optimizing the Extracting Process for Radix Astragali with Uniform Design

QIAN Da-wei, ZHU Ling-ying, DUAN Jin-ao, JU Jian-ming, SHAO Wen-hao

(1 Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;

2 Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China)

**Abstract:** Objective: To explore the optimum extracting technique of Radix Astragali. Method: The extraction process was investigated using uniform design, with the content of astragaloside IV as the detecting index. Conclusion: This process is simple, reliable and suitable for industrialized production. Results: The extracting process were optimized as follows: the drug was extracted 3 times for a hour with eight fold volume of 85% ethanol.

**Key words:** Radix Astragali; Astragaloside IV; Extraction process; Uniform design

黄芪为常用中药, 具有补气固表, 利尿托毒, 排脓, 敛疮生肌等功效, 其主要有效成分为皂苷、多糖、黄酮等<sup>[1]</sup>。目前有关黄芪有效成分含量测定的报导较多<sup>[2,3]</sup>, 而不同提取工艺对有效成分影响的报导较少。为更好地发挥黄芪的药用功效, 本文探讨了黄芪的提取工艺。以黄芪甲苷为检测指标, 采用 HPLC-ELSD 法测定<sup>[4]</sup>, 考察了不同提取工艺对其含量的影响, 筛选确定了黄芪皂苷类成分的提取工艺。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Waters2695 高效液相色谱仪、Alltech ELSD-2000 蒸发光散射检测器、Empower 色谱工作站 Millipore Milli-Q 纯水器、Mettler 万分之一及十万分之一电子天平、KQ-250E 型医用超声波清洗器。

**1.2 试剂** 对照品黄芪甲苷(批号 0781-200109 中国药品生物制品检验所提供); 乙腈: HPLC 级 (TEDIA); 其它试剂: 分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定方法的建立

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱: Alltima C<sub>18</sub> (4.6 × 250

mm 5μm), 柱温: 30℃, 流动相: 乙腈-水(36:64), 流速: 1.0mL/min, 漂移管温度: 110℃, 空气流速: 2.3mL/min。在此条件下, 黄芪甲苷峰与相邻峰达到基线分离。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取黄芪甲苷对照品适量, 加甲醇溶解分别制得 101.6μg/mL、508.0μg/mL 的对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 精密量取提取液 10mL, 用水饱和正丁醇萃取 4 次, 每次 20mL, 合并正丁醇液, 用 40% 氨水洗涤 2 次, 每次 20mL, 弃去氨水, 正丁醇液再用蒸馏水洗涤 2 次, 每次 20mL, 弃去水液, 正丁醇液于水浴蒸干, 残渣用甲醇溶解并转移至 5mL 量瓶中, 用甲醇定容, 滤过(0.45μm), 即得。

**2.1.4 线性范围** 分别取黄芪甲苷对照品溶液(1.016mg/mL) 2μL、4μL、8μL、12μL、16μL、18μL 注入液相色谱仪按上述色谱条件进行测定, 测得峰面积, 以对照品量(μg) 的对数为横坐标(X), 对照品峰面积(A) 的对数为纵坐标(Y), 进行回归计算, 得回归方程为:  $Y = 1.76X + 4.58$ , 相关系数  $r = 0.9996$ 。结果显示黄芪甲苷对照品在进样量 2.0321μg~18.288μg 时呈良好线性。

**2.1.5 精密度测试** 将黄芪甲苷对照品溶液

(508.0 $\mu$ g/mL)连续重复进样 6 次,每次 20 $\mu$ L,峰面积的 RSD% 为 1.1%,结果显示仪器的精密度良好。

## 2.2 提取工艺优选

**2.2.1 因素水平选择** 根据文献报道及预试验结果,选择乙醇提取,影响乙醇提取的主要因素有乙醇浓度、加入乙醇量、提取时间、提取次数,前三个因素取六个水平,提取次数取三个水平,选用 U6(6<sup>3</sup> × 3)均匀设计表<sup>[5]</sup>。选用黄芪甲苷含量为指标进行评价,筛选最佳提取工艺。均匀试验表表头设计见表 1。

表 1 均匀试验因素水平表

因素 水平	A 乙醇浓度 (%)	B 加乙醇量 (倍)	C 提取时间 (min)	D 提取次数 (次)
1	15	4	20	1
2	30	6	40	2
3	45	8	60	3
4	60	10	80	
5	75	12	100	
6	90	14	120	

**2.2.2 样品的制备及测定** 将黄芪饮片粉碎,过 20 目筛,精密称取 6 份,每份 30.0g,按均匀试验条件进行提取,每次提取后用 200 目筛网过滤,滤液合并回收乙醇并浓缩定容至 100mL(每毫升 0.3g 生药),取此液按 2.1.3 方法制备供 HPLC 分析的供试液,按 2.1.1 条件测定黄芪甲苷的含量,结果见表 2。

表 2 均匀试验结果表(n=2)

试验号	A 乙醇浓度 (%)	B 加乙醇量 (倍)	C 回流时间 (min)	D 回流次数 (次)	C ( $\mu$ g/ml)
1	1(15)	2(6)	3(60)	2(2)	183.76
2	2(30)	4(10)	6(120)	1(1)	173.67
3	3(45)	6(14)	2(40)	3(3)	244.56
4	4(60)	1(4)	5(100)	1(1)	196.97
5	5(75)	3(8)	1(20)	3(3)	244.00
6	6(90)	5(12)	4(80)	2(2)	223.88
D			0.3581		

**2.2.3 结果处理** 利用 SPSS 8.0 统计软件进行逐步回归计算,求得回归方程为:

$$Y = 154.69 + 6.536D^2 + 0.494A \quad (R = 0.980, F = 36.535)$$

由回归方程可知,提取次数(D)对黄芪甲苷的提取率起决定作用,提取次数越多黄芪甲苷的提取率越高,因此选择提取次数为 3 次。乙醇浓度对黄芪甲苷的提取率有一定影响,乙醇浓度增大,黄芪甲苷的提取率也增大,但考虑到实际生产中不易回收得

到很高浓度的乙醇,而且通过回归方程对 95% 乙醇和 85% 乙醇黄芪甲苷的提取率进行比较,其结果的差距并不大,因此选择 85% 的乙醇即可。其余因素对黄芪甲苷提取率的影响不显著。

根据实验结果,在保证黄芪甲苷的提取率的前提下,考虑到实际生产,尽可能节能降耗,拟确定黄芪乙醇提取条件为加入 8 倍量 85% 乙醇,提取 3 次每次 1 小时,按回归方程计算,预测提取液的浓度为 255.50 $\mu$ g/mL。

**2.2.4 验证试验** 称取黄芪粗粉(20 目)3 份,每份 30.0 克。根据已选择工艺提取,按 2.1.4 项对样品进行处理,即得验证试验供试品。按 2.1.7 项进行测定。结果见表 3。

表 3 黄芪乙醇提取验证试验结果表

编号	C( $\mu$ g/ml)	C <sub>平均</sub> ( $\mu$ g/ml)
1	269.006	
2	259.096	261.48
3	256.338	

验证结果与均匀试验预测的结果基本接近,由此表明均匀试验所得出的工艺条件是稳定、可靠、可行的。按《中国药典》2000 年版一部黄芪项下含量测定前处理方法制备供试液,经 HPLC 测定实验所用药材中黄芪甲苷含量为 0.934mg/g,按优化后确定的工艺对药材进行提取,其黄芪甲苷的含量为 0.872mg/g,黄芪甲苷的转移率为 93.4%。说明所确定的提取工艺对黄芪甲苷的转移率较高,工艺合理。

## 3 讨论

**3.1** 中药提取受很多因素的影响,我们初步考察了乙醇浓度、溶剂用量、回流时间、提取次数 4 个因素对黄芪甲苷提取率的影响。乙醇浓度、溶剂用量、回流时间可以选择 6 个水平,提取次数在实际生产中一般不需要太多,选择提取三次,因素在选择均匀设计表时,选用了混合水平 U6(6<sup>3</sup> × 3)均匀设计表。

**3.2** 本实验利用逐步回归所建立的方程,能很好地拟合提取过程,预测提取结果,所选定的条件通过方程计算的提取率与实验所得的提取率很接近。

**3.3** 在中药提取中,若考虑提取溶剂的浓度时,采用均匀设计方法可使实验数较少而考察的溶剂浓度较多,均匀设计方法在这种情况下是一个较好的实验设计方法。

**3.4** 黄芪中所含皂苷类成分专属性较强,其中黄芪甲苷是黄芪中具有代表性的活性成分。目前含黄芪

制剂多以黄芪甲苷作为质控评价指标,且文献报道较多。本文以黄芪甲苷为指标,筛选黄芪的提取工艺是合理的。

**3.5** 文献报导黄芪甲苷的含量测定方法较多,根据样品的不同,处理方法各有差异。文中采用正丁醇萃取,氨水试液洗涤,纯化效果较好,处理简单。适用于含黄芪制剂的含量测定。

#### 参考文献:

[1] 阴健,郭力弓. 中药现代研究与临床应用(1)[M]. 北京:

学苑出版社,1993. 592.

[2] 潘飞,冯毓秀. 黄芪类药用植物皂苷类成分分析[J]. 中国中药杂志,1995,20(7): 391-393.

[3] 钱广生,刘三康. HPLC 测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量[J]. 华西药学杂志,2002,17(1): 41-42.

[4] 汪红,王强. HPLC-ELSD 法测定黄芪及其注射液中黄芪皂苷的含量[J]. 中国药学杂志,2002,37(4): 298-300.

[5] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社,1994. 149.