

大孔树脂吸附法对黄芪皂苷Ⅳ富集纯化工艺的研究

高 越¹,李 翔²,朱臻宇²,柴逸峰^{1*}

(1.第二军医大学药学院,上海 200433;2.第二军医大学药学院药物分析学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**进行黄芪药材中黄芪皂苷Ⅳ的富集纯化工艺研究,为大规模制备黄芪皂苷Ⅳ提供借鉴。**方法:**建立高效液相色谱-质谱检测器(HPLC-MSD)测定黄芪皂苷Ⅳ含量的方法。对多种不同型号大孔树脂的吸附能力进行了筛选,同时考察确定了其吸附容量;通过对不同比例的乙醇溶液进行最佳洗脱液和洗脱量的选择。**结果:**HPLC-MSD测定方法学考察结果良好。工艺筛选最终确定吸附能力最强的D101型作为纯化工艺的大孔树脂,同时确定黄芪皂苷Ⅳ的吸附容量为0.42 mg/g,洗脱液为5倍量70%乙醇。**结论:**D101型大孔树脂对黄芪皂苷Ⅳ的精制程度效果较好,能提高黄芪皂苷Ⅳ的纯度,并为分析总皂苷的组成提供保证。

[关键词] 黄芪;黄芪皂苷Ⅳ;大孔树脂;色谱法;高效液相

[中图分类号] R 282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0334-03

Study on enrichment and purification of astragalosides Ⅳ from *Radix astragali* with macroporous resins

GAO Yue¹,LI Xiang²,ZHU Zhen-yu²,CHAI Yi-feng^{1*} (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the enrichment and purification method of astragaloside Ⅳ from *Radix astragali* with macroporous resin, so as to lay a foundation for the large scale production of astragaloside Ⅳ. **Methods:** A HPLC-MSD method was established to determine the content of astragaloside Ⅳ in *Radix astragali*. The adsorption ability and capability of different macroporous resins were investigated. The optimal alcohol concentration and capability of alcohol for elution were also confirmed through the determination of astragaloside Ⅳ in the eluted solution. **Results:** HPLC-MSD achieved satisfactory results in determination of astragaloside Ⅳ. D101 was proven to be the most potent macroporous resin; its adsorption capability of astragaloside Ⅳ was 0.42 mg/g when the elution solution was 5 folds of 70% alcohol. **Conclusion:** D101 macroporous resin can be used to effectively enrich and purify astragaloside Ⅳ, laying a foundation for analyzing the constituents of total astragalosides.

[KEY WORDS] *Radix astragali*; astragaloside Ⅳ; macroporous resin; chromatography, high performance liquid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 334-336]

中药黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效^[1]。现代药理研究表明,黄芪皂苷是黄芪药效物质基础的重要组成部分之一,在抗衰老、调节免疫功能、保护心肌和大脑缺血等多方面具有显著作用^[2]。

目前,已有文献^[3~5]报道采用大孔树脂进行黄芪皂苷Ⅳ富集纯化的研究,但是大多都未进行树脂筛选、吸附容量的确定及洗脱液选择等方面的研究,且检测方法无法有效保证测定结果的准确性。《中国药典》(2005版)^[1]采用甲醇回流提取、正丁醇萃取、氨试液处理、大孔树脂吸附除杂等步骤对黄芪药材进行前处理,过程繁琐,不适合大规模制备黄芪皂苷Ⅳ,而且采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)进行含量测定的灵敏度也较差,需要对样品溶液进行浓缩,可导致待测溶液成分变化,影响测定结果的准确性。

本试验通过系统研究,选择适合黄芪皂苷Ⅳ纯化的大孔吸附树脂,并对制备条件进行优化。同时采用高效液相色

谱-质谱检测器(HPLC-MSD)测定药材中黄芪皂苷的含量,样品溶液经稀释后可直接分析,能保证检测灵敏度和结果的可靠性。

1 仪器和材料

Agilent 1100LC/MSD 高效液相色谱仪;低压四元梯度泵;四极杆质谱检测器;在线脱气机;自动进样器;柱温箱;ChemStation 色谱工作站。上海淀久 DJ-04 药材粉碎机;METTLER AE240 电子天平。黄芪药材由上海华宇药业有限公司提供经本院生药学教研室陈万生副教授鉴定为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.。黄芪皂苷Ⅳ

[基金项目] 上海市科委科技攻关项目(02419125);上海市科委重大项目(2403DZ19548)。Supported by Fund for Tackling the Key Project of Shanghai Science and Technology Committee(02419125) and Fund of Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (2403DZ19548)。

[作者简介] 高 越,助教。

* Corresponding author. E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

对照品(批号:0781-9807)购自中国药品生物制品检定所。D101、DM301 和 DA201 型大孔吸附树脂购自天津农药股份有限公司(批号:101-5516,301-2725,210-4296);SIPI 905 和 SIPI 1300 型购自上海医药工业研究院(批号:0064992);AB-8 型购自天津光复精细化工研究所(批号:0324870)。乙腈为色谱纯,乙醇为分析纯,水为纯化水。

2 方法和结果

2.1 黄芪皂苷Ⅳ的含量测定

2.1.1 色谱分析条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(32:68),流速 1.0 ml/min,柱后分流比为 8:2,柱温为室温。MSD 参数:大气压电离-电喷雾电离源(API-ESI),负离子检测模式,选择离子监测:黄芪皂苷Ⅳ[M-H]⁻,m/z=783.5,干燥气(N₂)流速为 9.0 L/min,雾化气压力为 30 psi(1 psi=703.07 Pa),干燥气温度为 350℃,裂解电压为 110 V,毛细管电压为 3 500 V。溶液进样前均经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.1.2 样品溶液的制备 称取黄芪药材 1 kg,粉碎后过 40 目筛,60℃干燥至恒重,以 10 倍量的 70%乙醇加热回流提取 4 h,减压回收溶剂后得浸膏,以 1 L 水溶解,得到每 1 ml 含 1 g 黄芪药材的样品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密称取黄芪皂苷Ⅳ对照品适量,加甲醇制成浓度为 693.0 μg/ml 的对照贮备液。精密量取对照贮备液 0.5 ml 置于 10 ml 量瓶中,加甲醇制成黄芪皂苷Ⅳ34.65 μg/ml 的对照品溶液。分别精密量取对照品溶液 0.05、0.5、1.0、1.5 和 2.0 ml,置于 5 ml 量瓶中,以甲醇稀释至刻度,摇匀,得不同浓度的溶液,按 2.1.1 色谱分析条件取 10 μl 分别进样。以对照品溶液的浓度为横坐标(X),峰面积值为纵坐标(Y)进行线性回归处理,回归方程为 Y=117 105 X + 4 813.9,r=0.999 7,在 0.346 5~13.86 μg/ml 的范围内呈良好线性关系。

2.1.4 精密度试验 取浓度为 6.930 μg/ml 的对照品溶液,在 1 d 之内连续进样 5 次,以及连续 5 d 分别进样,进行日内和日间精密度考察,其峰面积的 RSD 分别为 0.85%和 1.26%(n=5)。

2.1.5 稳定性试验 分别在 0、3、6、12、18、24、36 和 48 h 测定经稀释后样品溶液(浓度约为 3 mg/ml)中黄芪皂苷Ⅳ的峰面积,进行稳定性考察,结果显示 48 h 内黄芪皂苷Ⅳ的峰面积 RSD 为 0.95%(n=8)。

2.1.6 回收率试验 精密称取已知含量的黄芪药材粗粉 3 份,分别精密加入对照品溶液适量,按 2.1.2 项下方法操作,测定经稀释后样品溶液并计算黄芪皂苷Ⅳ的平均加样回收率为 99.31%,RSD 为 0.59%(n=3)。

2.1.7 最低检测限 将黄芪皂苷Ⅳ对照品溶液稀释进样,以信噪比为 3:1 确定其最低检测限为 0.034 65 μg/ml。

2.2 大孔树脂富集纯化黄芪皂苷Ⅳ的工艺考察

2.2.1 大孔树脂的预处理 取不同型号大孔树脂用 10 倍

体积量 95%乙醇浸泡 24 h,湿法装柱,继用 95%乙醇冲洗,至洗脱液加适量纯化水混合无白色浑浊现象,最后用大量纯化水洗至无醇味,备用。

2.2.2 不同型号树脂的比较 分别取上述 6 种大孔树脂经预处理后,沥干水分,称取 15 g 于烧杯中,各加入同一黄芪样品溶液 20 ml 和纯化水 180 ml,振荡 1 h,每隔 5 min 取样,以 HPLC-MSD 测定稀释后溶液中黄芪皂苷Ⅳ含量的变化。结果表明 6 种吸附树脂对黄芪皂苷Ⅳ的吸附均在 15 min 内即可达到平衡,其吸附能力的顺序是:D101>SIPI 905>SIPI1300>AB-8>DM 301>DA 201。

2.2.3 吸附容量的确定 精密量取样品溶液 15 ml 上 D101 型大孔树脂柱(1.5 cm×15 cm,湿树脂 15 g),控制流速 1 ml/min,过柱液流出后重吸附 1 次,以纯化水冲洗,收集过柱液,平行操作 3 次,按 2.1.1 色谱分析条件测定稀释后溶液中黄芪皂苷Ⅳ的含量,计算吸附容量(吸附容量为单位质量湿大孔树脂吸附黄芪皂苷Ⅳ的质量),结果表明其吸附容量为 0.42 mg/g。

2.2.4 洗脱液的选择 精密量取样品溶液 50 ml 上 D101 型大孔树脂柱(湿树脂 100 g),控制流速 1 ml/min,过柱液流出后重吸附 1 次,依次用纯化水、30%、50%、70%、95%乙醇各 250 ml 洗脱,按 2.1.1 色谱分析条件测定稀释后溶液中黄芪皂苷Ⅳ的含量。

表 1 不同浓度乙醇的洗脱结果

Tab 1 Elution results of ethanol at different concentrations

Solvent	Weight (m _B /g)	Astragaloside Ⅳ (ρ _B /mg·ml ⁻¹)	Content (%)
H ₂ O	4.678	-	-
30% ethanol	1.866	-	-
50% ethanol	0.282	0.014 8	1.31
70% ethanol	0.207	0.074 0	8.94
95% ethanol	0.115	-	-

- : Not detected

结果表明,黄芪皂苷Ⅳ主要集中在 70%乙醇洗脱液中,50%乙醇虽能洗出部分黄芪皂苷Ⅳ,但洗脱能力弱,且含量较低,其余洗脱液中均未检测到黄芪皂苷Ⅳ,故确定 70%乙醇为洗脱液,并可用于产品制备。

3 讨论

《中国药典》(2005 版)采用氨试液对样品溶液进行处理,可以解离黄芪皂苷Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分子中糖上的乙酰基,形成黄芪皂苷Ⅳ,从而增加产量达到富集的目的。但这种做法的结果将无法有效区分各种黄芪皂苷化合物之间的比例关系。

在采用 HPLC-MSD 测定 70%乙醇洗脱液时,可以发现 m/z 为 868.3、826.4 和 783.5 的色谱峰,经初步的质谱解析,确认它们为黄芪皂苷Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的分子离子峰^[6],其色谱峰面积均大于黄芪皂苷Ⅳ。因尚未得到相应对照品暂时无法确定其具体含量,现已开展对照品的制备研究,这也是黄芪皂

苷Ⅳ在 D101 型大孔树脂上的吸附容量偏低的可能原因。

本实验采用 D101 型大孔树脂进行了黄芪皂苷Ⅳ的提取工艺研究,具有吸附快、吸附容量大、洗脱率高等优点,而且方法操作简单,树脂再生方便,为工业化生产提供了良好的提示。

[参 考 文 献]

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:212-213.
[2] 林琦,陆阳,陈泽乃. 黄芪属植物皂苷类成分研究进展[J]. 国外医药·植物药分册,2002,17:143-146.

[3] 吴永平,曹园,曹正中. 黄芪活性成分最佳提取工艺探讨[J]. 时珍国医国药,2001,12:876-877.
[4] 滕兴隆,常洋,裴福成. 大孔吸附树脂对黄芪总皂苷分离纯化的研究[J]. 黑龙江医药,2002,15:340-341.
[5] 贾晓斌,陈彦,蔡宝昌,等. 黄芪皂苷纯化工艺研究[J]. 中成药,2003,25:866-868.
[6] 王惠康,何侃,凌罗庆. 内蒙黄芪化学成分的研究(Ⅱ)[J]. 中草药,1989,20:6-8.

[收稿日期] 2005-11-07 [修回日期] 2006-02-21

[本文编辑] 尹茶