

## RP-HPLC制备色谱法分离黄芪甲苷

张 鉴<sup>1</sup>,张振海<sup>2</sup>,余增亮<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院等离子体研究所生物工程中心,安徽 合肥 230031; 2. 天津科器公司,天津 300100)

中图分类号: R927.2

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2001)12-1087-02

黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge为常用中药,具有益气固表,利尿托毒等功效<sup>[1]</sup>,黄芪甲苷(astragaloside IV)是其主要活性成分之一,常作为指标性成分用于黄芪药材和制剂的质量监控<sup>[2,3]</sup>。本文研究了采用 RP-HPLC制备色谱的方法从黄芪药材中分离制备黄芪甲苷单体,满足常规分析检测的需求

## 1 仪器与试剂

实验仪器: Waters 600高效液相色谱仪;色谱工作站: MILLINUM 32(3.05.01版);检测器: 410示差折光检测器;分析柱: SymmetryShield™ C<sub>18</sub>色谱柱(3.9 mm×150 mm, 5μm);进样器: Rheodyne7725型, 10μL进样环

制备柱: μBondpak™ C<sub>18</sub>(7.8 mm×300 mm, 15μm);制备泵: ZSB型;流量调节仪: TLIII;进样环: 500μL,天津科器公司产;馏分收集器: BSZ-160型,上海青浦沪西仪器厂。

试剂均为色谱纯和分析纯,氧化铝为柱层析用,100~200目。

## 2 实验条件和方法

2.1 实验条件: 分析色谱柱: SymmetryShield™ C<sub>18</sub>(3.9 mm×150 mm, 5μm),流动相: 甲醇-水(70:30),流速: 1 mL/min,检测灵敏度: 1024,柱温: 32℃,进样量: 10μL

制备色谱柱: μBondpak™ C<sub>18</sub>(7.8 mm×300 mm, 15μm),流动相: 甲醇-水(45:55),流速: 5 mL/min,柱温: 25℃,进样量: 500μL,馏分收集器步速: 0.5分格

2.2 黄芪甲苷样品溶液制备: 将黄芪药材减压烘干至恒重,粉碎后过50目筛,称取700g置于5L烧瓶中,加入3L乙醚分3次回流脱脂后,置于60℃水浴中用挥去残留乙醚。

从脱脂后药材中加入3L乙醇,60℃水浴加热

回流提取2h,过滤后经超速离心机离心(10000 r/min),将上清液在60℃水浴条件下减压旋转蒸发,回收乙醇,得到黄芪浸膏。

取40g浸膏加纯水超声溶解,用水饱和的正丁醇于分液漏斗(500 mL)中萃取4次,每次150 mL,合并4次正丁醇萃取液,用氨试液(80 mL浓氨水加水配成200 mL)洗涤2次,每次100 mL,弃去碱水层后,用正丁醇饱和的纯水洗液3次,弃去洗液,将正丁醇层在60℃旋转蒸发仪上减压回收至干。

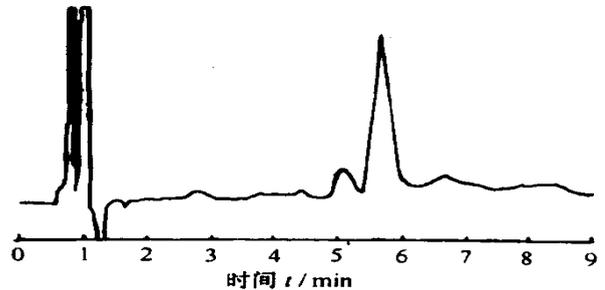


图 1 黄芪制备色谱用样品 HPLC检测图

(黄芪甲苷含量约为 80%)

以150 mL 50%甲醇-水溶解残余物,调节溶液以1 mL/min的速度通过中性氧化铝柱(柱层析用,100~200目,柱长约25 cm,内径2 cm),并继续用50%甲醇-水溶液40 mL冲柱,合并洗脱液,减压浓缩至干,用甲醇溶解,作为制备色谱用进样溶液,见图1

2.3 制备色谱分离: 将所得黄芪制备色谱用样品溶液每次进样500μL,馏分收集器设定步速为0.5分格,根据检测结果收集相应格数流出液,冷冻干燥后得到制备目标产物黄芪甲苷。制备谱图见图2(阴影区为应收集目标产物的峰及相应时间),目标产物黄芪甲苷 HPLC检测图见图3

## 3 结果和讨论

制备色谱和分析色谱在准备进样用的样品时有

\* 收稿日期: 2001-06-14

作者简介: 张鉴(1971-),男,陕西西安人,中国科学院合肥分院等离子体所生物工程中心博士生,研究方向:天然产物和发酵产物活性成分的研究及基因工程产品的分离纯化。Tel 0551-5591602 E-mail shangxi@mail.hf.ah.cn

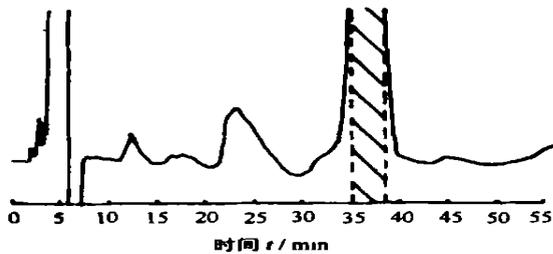


图2 黄芪甲苷 HPLC制备色谱图

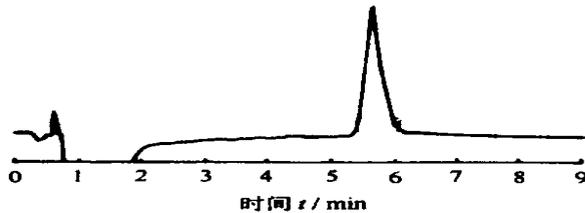


图3 目标产物黄芪甲苷 HPLC检测图

一些区别: 准备分析用样品时, 要求方法的回收率尽量接近 100%。制备色谱的样品虽也有提取率高低的问题, 但更注重样品溶液中目标分离产物的含量, 杂质越少, 制备时相对所得目标产物越多, 制备效率越高。两者也有相似之处, 即尽量避免在前处理时, 由于酸碱或加热等原因造成目标分离分析成分的分解。

由于加热或药材长时间浸泡, 会造成黄芪甲苷受到破坏或与其他成分发生反应而使结构改变。所以本实验控制溶剂减压蒸发时水浴温度在 60℃, 回流提取 2 h

用乙醚洗涤, 主要是为了脱去一些脂溶成分和一些杂质峰的干扰, 对黄芪甲苷含量和结构并无影

响, 洗涤后在加入甲醇之前要减压水浴挥干乙醚

氧化铝同时对黄酮类和皂苷类有吸附作用, 在准备分析用样品时, 不宜使用, 但应用于制备色谱样品则是可以的, 因为通过氧化铝柱后, 虽然皂苷类略有损失, 但可以很好除去黄酮类和色素类成分, 明显的提高了洗脱液中黄芪甲苷的含量。

文献中高效液相色谱法大多采用紫外检测, 但由于黄芪甲苷仅在 200 nm 左右有弱的末端吸收, 色谱图中噪音对结果影响较大, 灵敏度较差, 采用示差折光检测, 谱图清晰, 峰位准确, 制备时易于判断, 收集目标产物

实验中考虑到普通实验室在进行制备实验时, 没有大流量高效液相色谱制备泵, 本文研究了流动相流速为 5 mL/min 时多种制备色谱流动相的条件, 实验结果表明在甲醇-水 (45: 55) 的条件下, 目标产物分离较为完全, 单元分离时间也较为合适

本文研究了通过反相高效液相制备色谱从黄芪药材中提取、分离黄芪甲苷单体的完整方法, 采用反相高效液相色谱制备的黄芪甲苷经四谱 (核磁共振、红外光谱、紫外光谱、质谱) 共同检测, 并同文献数据对照, 确定纯度达到 98%, 符合标准物质的质量要求

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 (下册) [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [2] 王宝琴, 苏健, 鲁静. 黄芪甲苷的检测在中药质控中的应用 [J]. 中国中药杂志, 1996, 21(3): 1613.
- [3] 田丰, 邓英杰. HPLC法测定黄芪中的黄芪甲苷含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(1): 43.

## 动物中药可溶性蛋白凝胶电泳图谱的研究

陈振江<sup>1</sup>, 陈科力<sup>1</sup>, 邹菁<sup>2\*</sup>

(1. 湖北中医学院 药理学系, 湖北 武汉 430061; 2. 武汉化工学院, 湖北 武汉 430071)

中图分类号: 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)12-1088-03

动物胶和蛇类中药属贵重药材, 经煎煮浓缩而成的胶均为部分水解的胶质蛋白, 难以用传统的方法加以区分。我们采用凝胶电泳系列技术对下列动物药进行鉴别研究。

### 1 实验材料

- ① 乌梢蛇 *Zoocys dhumnacles* (cantor); ② 蕲蛇 *Agkistrodon acutus* Guenther 为蝮科动物五步蛇;
- ③ 水赤链游蛇 *Natrix annulari*; ④ 龟胶; ⑤ 鹿角胶;
- ⑥ 猪皮胶 (自制); ⑦ 伪品胶; ⑧ 鲜王浆 A (湖北扬子江蜂业公司); ⑨ 鲜王浆 B (湖北崇阳, 1999. 11); ⑩

\* 收稿日期: 2000-12-13  
基金项目: 湖北省教委自然科学基金项目 (98B03)