

序软件进行拟合。对各种模型的处理结果进行比较,选择其中残差平方和(SUM)值最小、拟合度( $r^2$ )最佳、AIC 值最小者定为所测药物的最佳室型。结果表明本法测定的杠柳毒苷在小体内符合二室代谢模型, $C_{(t_0)}$ 为 1.39  $\mu\text{g/mL}$ , $t_{1/2\alpha}$ 为 2.04 min, $t_{1/2\beta}$ 为 13.9 min,CL 为 0.0314 L/min,AUC<sub>0-60</sub>为 30.84 mg/L·min,MRT<sub>0-60</sub>为 8.20 min,VRT<sub>0-60</sub>141.0 min<sup>2</sup>。

### 3 讨论

3.1 前处理方法的选择:本实验根据杠柳毒苷的理化性质及极性对血浆预处理方法进行了研究,主要进行了液液萃取、沉淀蛋白和固相萃取 3 种方法的摸索。

液液萃取法中考察了叔丁基甲醚-二氯甲烷(2:1)、醋酸乙酯-丙酮(5:1)、醋酸乙酯-乙醇(15:1,8:1,5:1)、醋酸乙酯-异丙醇(20:1,10:1,5:1)、氯仿-异丙醇(95:5,9:1,5:1,1:1)、氯仿-正丁醇(9:1)、二氯甲烷-异丙醇(10:1,5:1,3:1),结果回收率均不能达到要求。

沉淀蛋白法中考察了甲醇、乙腈、甲醇-乙腈(1:1)为沉淀剂的方法。结果乙腈沉淀蛋白后,杠柳毒苷的提取回收率仅 60%。以甲醇为沉淀剂,提取回收率虽然较高(约 80%),但干扰峰较多,不稳定。以甲醇-乙腈(1:1)为沉淀剂,提取回收率可达 80%,干扰较少。实验初期曾经甲醇-乙腈(1:1)沉淀的方法作为血浆预处理方法并进行了方法学验证,方法定量限 0.1  $\mu\text{g/mL}$ 。小鼠尾静脉注射杠柳毒苷中剂量(1 mg/kg)后,于不同时间点采血进行测定。结果此方法给药 40 min 后杠柳毒苷已经低于定

量限,无法满足更低剂量的研究。

最后采用沉淀蛋白-固相萃取法,选择反相 C<sub>18</sub> 型固相萃取小柱进行实验,其上样量、洗脱溶剂用量及成本方面都较合适,即 1 mL 上样液,1 mL 40% 甲醇洗杂质、100% 甲醇 1 mL 两次洗脱杠柳毒苷和地高辛,每次 0.5 mL,每处理 5 个样品换一个固相萃取小柱。结果回收率符合药动力学研究要求。

3.2 色谱柱的选择:使用了 Tiahe C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ ),结果血浆中检测杠柳毒苷时杂峰很多,回收率很低。改用窄径柱 Agilent C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm,3.5  $\mu\text{m}$ )测定,色谱图中仍然有干扰峰。最后选用色谱柱 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>柱(150 mm×4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ )及保护柱 Agilent Zorbax C<sub>18</sub>柱(12.5 mm×4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ ),结果表明,血浆中检测杠柳毒苷的最低定量限可以达到测定要求,并且杂峰较少,符合要求。

3.3 流动相比比例的选择:方法建立初期,流动相采用乙腈-水(27:73),有杂峰干扰且峰型不好,改流动相比比例为乙腈-水(23:77)以减少样品出峰处的干扰,但出峰时间太长。最后选择流动相为乙腈-水(25:75),色谱图中样品峰型较好且无干扰峰出现,符合要求。

#### 参考文献:

- [1] Sakuma S, Kawanishi S, Shoji J. Constituents of Chinese crude drug "Wujiapi". VI. On the structure of glucoside E of Beiwujiapi [J]. *Chem Pharm Bull*, 1972, 20(3):469.
- [2] 董波,万玉,李婷.益气强心饮治疗慢性心力衰竭 34 例分析[J]. *中医药学刊*, 2004, 22(6):1132.
- [3] 张援虎,陈东林.峨嵋杠柳化学成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18:772-774.
- [4] 李玉红,高秀梅,张伯礼,等.香加皮提取物对离体心脏功能的影响[J]. *辽宁中医学院学报*, 2005, 7(4):396-397.

## 微波提取黄芪中多糖的工艺研究

许海燕,杨义芳,黄春跃

(上海医药工业研究院,上海 200040)

**摘要:**目的 优选提取黄芪中多糖的最佳方法和工艺参数。方法 比较微波、超声、碱水、酶法、加热回流提取黄芪,对其中最佳的微波提取法的工艺条件分别进行了单因素和正交试验研究,以最佳工艺条件为基础进行放大实验。结果 黄芪多糖的最佳提取工艺为微波提取,控温 70  $^{\circ}\text{C}$ ,提取 3 次,每次 10 min。该工艺条件同样适用于放大实验,与小试试验的条件一致。结论 优选的黄芪多糖微波提取法工艺稳定可行。

**关键词:**黄芪;多糖;微波提取;正交试验

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)10-1496-04

收稿日期:2008-01-05

作者简介:许海燕(1979-),女,湖南省邵东县人,上海医药工业研究院中药研究室 2003 级硕士,研究方向为中药制剂。

Tel:(021)62479808-464 E-mail:swalxh@yahoo.com.cn

黄芪是豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 或蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根, 是重要的益气中药。黄芪的有效成分之一黄芪多糖具有提高人体免疫功能、抗肿瘤、抗辐射损伤、调节血糖、抗衰老等作用。常用的提取黄芪多糖的方法为加热回流法<sup>[1]</sup>, 此外还有微波<sup>[2]</sup>、碱水<sup>[3]</sup>、纤维素酶<sup>[4]</sup>提取黄芪多糖的报道。本实验考察了热回流、微波提取、碱水提取、纤维素酶提取和超声提取黄芪多糖, 并进一步对其中最优点的微波提取法进行了研究, 以期为黄芪多糖的工业化生产寻求最佳的工艺路线。

## 1 材料和仪器

黄芪为栽培品, 产于山西浑源, 为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根。所用试剂均为国产分析纯。

NJL07—3 型实验专用微波炉、NJC03—2 型微波提取设备(南京杰全), KQ—250DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), BüCHI V—800 旋转蒸发仪(瑞士), UV-VIS—8500 型紫外分光光度仪(上海天美科学仪器有限公司), LXJ—11B 型低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂)。

## 2 方法和结果

### 2.1 黄芪多糖的测定<sup>[5]</sup>

2.1.1 对照品溶液的制备: 精密称取 105 ℃ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 50 mg, 加水溶解并定容至 100 mL, 精密吸取 10 mL, 稀释定容至 100 mL, 摇匀, 即得 0.05 mg/mL 葡萄糖对照品溶液。

2.1.2 标准曲线的绘制: 分别精密吸取 0.05 mg/mL 葡萄糖对照品溶液 0.00、0.50、0.80、1.10、1.40、2.00 mL 置 25 mL 具塞试管中, 加水至 2.00 mL, 分别加 4% 苯酚溶液 1.00 mL, 混匀, 迅速加入硫酸 7.0 mL, 摇匀, 于 40 ℃ 水浴中保温 30 min, 取出, 置冰水浴中 5 min, 取出, 以第一份为空白, 照分光光度法在 490 nm 波长处测定吸光度值, 绘制标准曲线。经回归得线性方程为  $A=0.0585C+0.0057$ ,  $r=0.9996$ , 结果表明葡萄糖在 0~0.1 mg 与吸光度呈良好的线性关系。

2.1.3 黄芪多糖提取率和质量分数的测定: 取黄芪多糖粗品加水溶解, 定容至 250 mL。精密量取 5 mL, 稀释定容至 200 mL, 取续滤液按 2.1.2 项下方法操作, 测定吸光度值, 由线性方程求得质量浓度, 按黄芪多糖提取率=药材中黄芪多糖质量/药材质

量×100%, 计算黄芪多糖提取率。

精密量取黄芪多糖粗品溶液 150 mL, 置于已干燥至恒重的蒸发皿中 60 ℃ 水浴挥干水分, 置 60 ℃ 真空干燥箱中减压干燥 8 h, 取出置干燥器中放冷 20 min, 称定质量, 计算黄芪多糖粗品中多糖的质量分数。

### 2.2 不同提取方法的比较

2.2.1 超声提取法: 精密称取黄芪粉末(20目)10 g, 加水 120 mL 超声提取 3 次, 每次 20 min。

2.2.2 微波提取法: 精密称取黄芪粉末(20目)10 g, 加水 120 mL 微波低火提取 3 次, 每次 20 min。

2.2.3 酶提取法: 精密称取黄芪粉末(20目)10 g, 加纤维素酶 0.4 g、pH 4.4 HAc-NaAc 缓冲液 60 mL, 置 50 ℃ 水浴中保温 24 h。加水 60 mL, 调 pH 6~7, 加热回流 3 次, 每次 1.5 h, 第 2 次和第 3 次的加水量均为 120 mL。

2.2.4 加热回流法: 精密称取黄芪粉末(20目)10 g, 加水 120 mL, 加热回流 3 次, 每次 1.5 h。

2.2.5 碱水提取法: 加 pH 9~10 的 Ca(OH)<sub>2</sub> 水溶液 120 mL, 加热回流 3 次, 每次 1.5 h。

2.2.6 样品处理及结果: 提取液滤过, 滤液减压浓缩至 10 mL, 加 95% 乙醇 50 mL 醇沉, 离心, 沉淀加水 150 mL 溶解, 离心, 取上清液减压浓缩至 10 mL, 加 95% 乙醇 50 mL 醇沉, 离心即得沉淀黄芪多糖粗品, 测定多糖提取率和质量分数。各自在相同的条件下重复操作 2 次, 结果见表 1。可以看出, 微波提取的提取率和质量分数均明显高于其他 4 种方法。此外, 微波提取时间较短, 比加热回流法缩短了 7~8 倍, 故选择微波来提取黄芪多糖。

表 1 提取方法的比较

Table 1 Comparison of extracting methods

提取方法	提取率/%	质量分数/%
酶提取	6.76	40.18
加热回流	9.12	45.64
碱水提取	7.37	40.34
超声提取	1.72	24.86
微波提取	12.98	61.34

2.3 微波提取条件的优化: 影响微波提取多糖工艺的因素很多, 包括浸泡时间、物料粒度、加水量、提取温度、提取时间、提取次数等。本实验首先对浸泡时间、物料粒度和提取时间进行了单因素考察, 在此基础上采用正交试验设计选取最佳提取条件。

2.3.1 浸泡时间的单因素考察: 固定提取温度为 70 ℃, 提取时间为 10 min, 提取次数为 2 次, 比较了

浸泡 4 h 和未浸泡的效果。结果浸泡 4 h 时黄芪多糖的提取率和质量分数分别为 7.90%、56.69%，未浸泡时黄芪多糖的提取率和质量分数分别为 7.62%、62.95%。与未浸泡相比，浸泡 4 h 后提取率无显著差异，质量分数稍有下降，故选择不浸泡。

2.3.2 粒度的单因素考察：固定提取温度为 70 ℃，提取时间为 10 min，提取次数为 2 次，考察粒度对提取的影响。结果粗颗粒和 20 目颗粒的黄芪多糖的提取率分别为 8.41%、8.33%。可见粗颗粒和 20 目颗粒提取率无显著性差异，故选择粗颗粒。

2.3.3 提取时间的单因素考察：固定提取温度为 70 ℃，提取次数为 1 次，考察提取时间对提取的影响，结果提取 2、5、10 min 时，黄芪多糖的提取率和质量分数分别为 2.90%、56.05%；3.26%、60.63%；3.94%、71.00%。可见提取 10 min 所得多糖质量分数大大高于提取 5 min 和 2 min 的，提取率也为最高。

2.3.4 正交实验设计：在单因素考察的基础上进行正交试验考察。选择提取温度(A)、提取时间(B)、提取次数(C)，每因素各取 3 个水平，见表 2。选用粗颗粒的黄芪药材进行微波提取，提取液浓缩后醇沉两次，即得黄芪多糖。在平行操作下进行正交试验，以多糖的提取率和质量分数为评价指标对微波提取工艺条件进行优化，结果见表 3。对结果进行统计学处理，方差分析结果见表 4。

表 2 因素与水平

Table 2 Factors and levels

水平	因素		
	A/℃	B/min	C/次
1	50	10	2
2	60	20	3
3	70	30	4

以质量分数为评价指标时，各因素对提取效果的影响程度依次为 A(提取温度)>C(提取次数)>B(提取时间)，其中 A 因素对提取的影响有显著性差异，最佳工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>；以提取率为评价指标时，各因素对提取效果的影响程度同样依次为 A(提取温度)>C(提取次数)>B(提取时间)，这 3 种因素对提取的影响均无显著性差异，最佳工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>。综合上述两项考察指标，B<sub>1</sub> 和 B<sub>3</sub>、C<sub>2</sub> 和 C<sub>3</sub> 差别均不大，从节约成本考虑，确定最佳提取工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>，即在 70 ℃ 条件下提取 3 次，每次 10 min。

2.4 微波提取条件的放大：在小试数据的基础上，进行放大实验，采用 NJC03—2 型微波提取设备对

表 3 正交试验结果

Table 3 Result of orthogonal test

试验号	A	B	C	质量分数/%	提取率/%
1	1	1	1	50.70	7.49
2	1	2	2	66.54	9.25
3	1	3	3	62.40	10.43
4	2	1	2	66.78	15.29
5	2	2	3	59.33	10.19
6	2	3	1	72.56	11.72
7	3	1	3	87.14	14.00
8	3	2	1	78.74	12.86
9	3	3	2	73.28	13.49
质	K <sub>1</sub>	179.65	204.62	202.00	
量	K <sub>2</sub>	198.67	204.62	206.60	
分	K <sub>3</sub>	239.16	208.24	208.88	
数	R	59.52	3.62	6.89	
提	K <sub>1</sub>	27.17	36.78	32.07	
取	K <sub>2</sub>	37.21	32.31	38.03	
率	K <sub>3</sub>	40.34	35.64	34.62	
	R	13.17	4.47	5.96	

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

指标	方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
质量分数	A	615.98	2	307.99	211.29	** P<0.01
	B(误差)	2.92	2	1.46		
	C	8.20	2	4.10	2.81	
提取率	A	31.57	2	15.78	8.78	
	B(误差)	3.60	2	1.80		
	C	5.96	2	2.98	1.66	

$F_{0.05}(2,2)=19.0$   $F_{0.01}(2,2)=99.0$

投料量为 2 kg 黄芪药材进行提取，考察提取时间和提取次数的影响，结果见表 5、6。以提取 4 次的提取率为 100%，3 次即提取出 97.06%，从节约成本的角度考虑，选择提取 3 次，每次 10 min，与小试试验的条件一致。

### 3 讨论

在微波萃取前加水浸泡黄芪药材，使水分子深入细胞内部，微波辐射时细胞内外同时加热，有利于目标成分的萃取，但同时一些杂质也容易被萃取出来。在本实验条件下，浸泡 4 h 使提取率从 7.62% 升高到 7.9%，同时质量分数从 62.95% 下降到 56.69%，综合考虑，选择不浸泡。

按确定的试验工艺试生产 3 批，每批投料量为 2 kg 黄芪药材，结果见表 7，表明该工艺稳定可行。

从理论上说，药材的粉碎度越高，与浸出溶剂的接触面越大，扩散面也越大，故扩散速度越快，萃取

表 5 提取时间对提取效果的影响

Table 5 Effect of extracting times on extract rate

提取次数/次	提取时间/min	提取率/%
2	10	6.24
2	20	6.73
2	30	8.38
2	40	8.87
3	10	8.41
3	20	8.51
3	30	9.92
3	40	8.33

表 6 10 min 提取次数对提取效果的影响

Table 6 Effect of extracting times in ten minutes on extract rate

提取次数/次	提取率/%	相对提取率/%
1	3.94	45.59
2	6.24	72.13
3	8.41	97.16
4	8.65	100.00

效果越好。但粉碎度太高,加大后续处理如过滤的难度,考虑到工业化生产的实际情况,本实验仅比较了粗颗粒和 20 目两种粒度,提取率无明显差异。

微波穿透厚度一般为 2~3 cm。本实验中放大实验的提取率和质量分数都低于小试,可能是因为

表 7 放大工艺试生产

Table 7 Production with magnified technology

批次	提取率/%	质量分数/%
1	9.32	59.04
2	9.34	63.37
3	9.44	60.55

小试设备容器小,微波辐射能完全穿透,放大设备容器较大,微波辐射只能部分穿透。可以考虑加大搅拌强度或改变容器形状来解决此问题。

微波提取的提取率和质量分数都明显高于普通水煎法,原因是否是因为微波提取使细胞壁破裂,有效成分更易流出有关;微波提取是否会影响多糖结构和连接方式进而影响药效,有待进一步研究。

感谢中国医学科学院药用植物研究所赵永华博士对黄芪药材进行的鉴定工作。

参考文献:

[1] 倪 艳,苏 强. 黄芪多糖水煎提取工艺的优化试验研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(5):284-286.  
 [2] 王 莉,刘志勇,鲁建江,等. 黄芪多糖的微波提取及含量测定[J]. 中医药学报,2001,29(6):35-36.  
 [3] 李红民,黄仁泉,王亚洲. 提高黄芪多糖提取收率的工艺研究[J]. 西北大学学报,2000,30(6):509-510.  
 [4] 闫巧娟,韩鲁佳,江正强. 纤维素酶法提取黄芪多糖[J]. 中草药,2005,36(12):1804-1807.  
 [5] 中国药典[S]. 一部. 2005.

## 蜂胶 HPLC 指纹图谱的研究

王小平<sup>1,3</sup>,林 励<sup>1\*</sup>,潘建国<sup>2</sup>,卢占列<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学,广东 广州 510400; 2. 广州市宝生园有限公司,广东 广州 510400;

3. 陕西中医学院,陕西 咸阳 712046)

**摘要:**目的 用高效液相色谱法建立蜂胶指纹图谱。方法 采用迪马公司 Diamonsil(钻石)C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),甲醇-0.4%磷酸水为流动相,梯度洗脱,体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 283 nm,柱温为 25℃。结果 10 批蜂胶样品得到的指纹图谱有 13 个共有峰,通过与对照品的保留时间比较,4、7、12、13 号峰分别为芦丁、槲皮素、白杨素和高良姜素。方法学考察结果表明,稳定性试验、重现性试验所得指纹图谱的相似度均大于 0.95,芦丁、槲皮素、白杨素、高良姜素保留时间和峰面积的 RSD 均小于 2%。结论 所建立的蜂胶 HPLC 指纹图谱分析方法准确、可靠,重现性好,能够用于控制蜂胶的质量和真伪的鉴别,为更好的控制蜂胶的内在质量提供了科学依据。

**关键词:**蜂胶; 指纹图谱; 芦丁; 槲皮素; 白杨素; 高良姜素; 高效液相色谱

中图分类号:R286.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2008)10-1499-03

蜂胶是意大利蜂 *Apis mellifera* L. 从植物芽苞 和树干处采集的树胶,混入意大利蜂上颚腺分泌物

收稿日期:2007-12-08

基金项目:广州市科技计划项目(2005Z-E0101)

作者简介:王小平(1976-),女,陕西宝鸡人,广州中医药大学博士研究生,主要从事中药资源开发利用及新药研究。

Tel:(020)35622208 E-mail:wangxiaoping323@126.com

\* 通讯作者 林 励 Tel:13802914007

# 微波提取黄芪中多糖的工艺研究

作者: [许海燕](#), [杨义芳](#), [黄春跃](#)  
作者单位: [上海医药工业研究院, 上海, 200040](#)  
刊名: [中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)  
英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)  
年, 卷(期): 2008, 39(10)  
被引用次数: 5次

## 参考文献(5条)

1. 倪艳;苏强 [黄芪多糖水煎提取工艺的优化试验研究](#) 1998(05)
2. 王莉;刘志勇;鲁建江 [黄芪多糖的微波提取及含量测定](#)[期刊论文]-[中医药学报](#) 2001(06)
3. 李红民;黄仁泉;王亚洲 [提高黄芪多糖提取收率的工艺研究](#)[期刊论文]-[西北大学学报\(自然科学版\)](#) 2000(06)
4. 闫巧娟;韩鲁佳;江正强 [纤维素酶法提取黄花多糖](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2005(12)
5. [中国药典\(一部\)](#) 2005

## 引证文献(5条)

1. 王再幸, 赵景辉, 赵伟刚, 李荣峰, 陈立志, 赵明忠, 郭崇民, 张慧丽, 潘扬 [高压脉冲电场快速提取黄芪多糖工艺的研究](#)[期刊论文]-[特产研究](#) 2009(2)
2. 哈斯额尔顿, 那音台, 春光, 杨宝喜, 王青虎 [蒙药小白蒿多糖含量测定](#)[期刊论文]-[中国中医药资讯](#) 2010(1)
3. 向丽, 周铁军, 叶迎春, 王光西 [青果多酚超声波醇提工艺条件的研究](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2012(2)
4. 董玲玲, 黄鑫, 齐阳光, 冯海 [酶解—微波法提取黄芪多糖的工艺研究](#)[期刊论文]-[浙江工业大学学报](#) 2011(5)
5. 刘明言, 王帮臣 [用于中药提取的新技术进展](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2010(2)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zcy200810018.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200810018.aspx)