

# 黄芪中皂甙·黄酮和多糖综合利用的工艺研究

赵海燕 沙瀛 陈羊东 (北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏银川 750021)

**摘要** [目的] 探索从黄芪中同时获取皂甙、黄酮和多糖的工艺条件。[方法] 根据皂甙、黄酮和多糖3种有效成分溶解度的差异, 先用乙醇回流法提取黄芪中的皂甙和黄酮, 再用蒸馏水提取药渣中的黄芪多糖。对乙醇提液中的黄芪皂甙和黄酮, 采用D280阴离子交换树脂进行分离纯化。[结果] 黄芪皂甙的最佳提取条件为: 浓度70%乙醇作为溶剂, 液固比7:1, 78℃提取3次, 每次100 min; 黄芪黄酮的最佳提取条件为: 浓度80%乙醇作为溶剂, 液固比7:1, 78℃提取4次, 每次80 min; 黄芪多糖的最佳提取条件为: 以蒸馏水为溶剂, 液固比16:1, 100℃提取3次, 提取2 h。D280阴离子交换树脂分离黄芪黄酮和皂甙的最佳条件: 醇提液减压浓缩、调pH值至8.0后上柱, 收集流出液和浓度0.1% NaOH淋洗液得到皂甙, 用浓度80%乙醇和10% NaOH 80%乙醇洗脱得到黄酮。[结论] 黄芪皂甙、黄酮和多糖在上述同一工艺流程中被提取分离, 可综合利用黄芪中的有效成分。

**关键词** 黄芪; 皂甙; 黄酮; 多糖; 分离

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)05-02051-03

**Study on the Techniques for Comprehensive Utilization of Saponins, Flavonoids and Polysaccharides in Astragalus**

ZHAO Hai-yan et al (School of Biological Sciences and Technology, North University for Ethnic, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract** [Objective] The study aimed to explore the technologic conditions for getting saponins, flavonoids and polysaccharides in Astragalus at the same time. [Method] According to the difference on solubility of 3 kinds of effective components, the saponins and flavonoids in Astragalus were firstly extracted by the method of circumfluence with ethanol as solvent and the residue of ethanol-extraction was then used to extract polysaccharides by distilled water. The flavonoids and saponins in ethanol extracting fluid were isolated and purified by anion-exchange resin D280. [Result] The optimum conditions for extracting saponins from Astragalus were as following: with 70% ethanol as solvent, liquid-solid ratio of 7:1, extracting 3 times at 78℃ and 100 min for each time; The optimum conditions for extracting flavonoids from Astragalus were as following: with 80% ethanol as solvent, liquid-solid ratio of 7:1, extracting 4 times at 78℃ and 80 min for each time; The optimum conditions for extracting polysaccharides from Astragalus were as following: distilled water as solvent, liquid-solid ratio of 16:1, extracting 3 times at 100℃ and 2 h each time. The optimum conditions for separating saponins and flavonoids by D280 anion-exchange resin were as following: the ethanol extracting fluid was concentrated and loaded onto the chromatography column of after adjusting pH value to 8.0. The saponins were obtained by collecting outflow and leaching fluid of 0.1% NaOH; The flavonoids were obtained by eluting the column with 80% ethanol and 80% ethanol containing 10% NaOH sequentially. [Conclusion] The saponins, flavonoids and polysaccharides in astragalus could be extracted and isolated in the same process flow by using combined techniques mentioned above and the effective components in astragalus could be used compressively.

**Key words** Astragalus; Saponins; Flavonoids; Polysaccharides; Isolation

黄芪是豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。黄芪性甘, 微温, 具有补气固表、利尿排毒、排脓、敛疮生肌的功效<sup>[1]</sup>。对黄芪化学成分的研究, 始于20世纪50年代初期。迄今为止, 已从黄芪类中药中分离出了几十种活性成分, 主要有效成分为黄酮类、皂甙类、多糖类及氨基酸类<sup>[2]</sup>。其中黄芪多糖具有提高机体免疫功能、调节血糖、改善糖、脂代谢紊乱等作用<sup>[3-5]</sup>; 黄芪皂甙具有强心、降压、抗肿瘤、降低糖尿病大鼠血糖和促进胰岛素分泌等作用<sup>[6-8]</sup>; 黄芪黄酮对化学物诱导的DNA损伤具有保护作用<sup>[9]</sup>, 对药物所致的肝损伤也有明显的防护作用<sup>[10]</sup>, 还具有清除自由基<sup>[11]</sup>和免疫调节<sup>[12]</sup>等药理作用。目前, 黄芪有效成分的提取主要采用醇提法和水提法, 黄芪类制剂多以水煮醇沉, 取上清液部分或取醇沉部分, 对药用资源的浪费比较严重。黄芪皂甙类化合物的提取方法主要有水提法<sup>[13]</sup>、醇提法<sup>[14]</sup>、萃取法<sup>[14-15]</sup>、树脂吸附法<sup>[16-17]</sup>和超临界CO<sub>2</sub>法<sup>[14,18]</sup>。这些方法所用的提取剂大都是乙醇和甲醇。由于黄芪皂甙和黄芪黄酮都是易溶于乙醇和甲醇的化合物, 上述方法同时将2种成分提取出来, 但未将2种成分分开。国内外虽有将这3种有效成分其中2种分离的范例, 但尚未见将3种成分同步分离的报道。笔者研究了提取过程中各主要部分中多糖、皂甙和黄酮的含量情况, 探索从黄芪中同时获取3种有效成分的方法, 旨在为黄芪有

效成分的综合利用提供科学依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 黄芪购自银川市古方药品公司, 经鉴定为蒙古黄芪。仪器设备: 电子分析天平, 高速万能粉碎机, 回流提取装置, UV754N型紫外分光光度计, 旋转蒸发器, 循环水式多用真空泵, 数控自动部分收集器, 恒流泵, 数显恒温水浴锅等。

试剂: D280树脂购自南开大学化工厂; 芦丁和黄芪甲甙标准品购自中国药品生物制品检定所, 葡萄糖标准品(AR级)购自北京化学试剂公司; 香草醛、亚硝酸钠、氢氧化钠、无水乙醇、甲醇、硫酸等均为分析纯。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 测定方法。

(1) 黄芪总黄酮的测定方法。以芦丁为标准品, 按照已报道的方法制作黄芪黄酮的标准曲线<sup>[19]</sup>, 计算出回归方程为:  $Y = 11.584x - 0.0122$ , 相关系数  $r = 0.9991$ 。测定吸光值, 由回归方程求出待测样品总黄酮浓度。

(2) 黄芪皂甙的测定方法。以黄芪甲甙为标准品, 按照已报道的方法制作黄芪皂甙的标准曲线<sup>[20]</sup>, 计算出回归方程为:  $Y = 16.733x - 0.0179$ , 相关系数  $r = 0.9994$ 。吸取待测皂甙溶液, 用蒸馏水稀释数倍后吸取0.5 ml 稀释液, 加0.5 ml 浓度8%香草醛试剂, 置于冰浴中缓缓加入5 ml 浓度72%硫酸, 摇匀, 放入62℃水浴中, 保温20 min, 取出置于冷水浴中冷却, 摇匀, 于波长526 nm处测定吸光值, 按照回归方程计算出样品中的皂甙含量。

(3) 黄芪多糖的测定方法。采用苯酚-硫酸法<sup>[20]</sup>绘制出葡萄糖的标准曲线, 并计算出回归方程为:  $Y = 14.204x -$

基金项目 北方民族大学校级科研项目(2004 Y030) 资助。

作者简介 赵海燕(1963-), 女, 河北赵县人, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中草药有效成分化学与药理学研究。

收稿日期 2008-12-03

0.006 3, 相关系数  $r = 0.999 4$ 。称取样品 50 mg, 定容于 50 ml 容量瓶, 制得样品液。吸取样品液 2 ml, 置 50 ml 容量瓶中定容, 摇匀。量取上述溶液 2 ml, 按制作标准曲线的方法操作, 并计算多糖得率。

**1.2.2 黄芪皂甙和黄酮的提取。**使用搅拌回流法提取黄芪黄酮和皂甙。准确称取数等份黄芪干燥细粉 50 g, 分别置于三口瓶中, 加入一定浓度的乙醇, 调节搅拌器转速到 800 r/min, 在水浴中恒温加热, 冷凝回流一定时间。3 500 r/min 离心取上清液, 药渣再次提取。合并上清液, 测定黄酮和皂甙的浓度, 得出某一单因素试验的最佳条件。该研究分别对乙醇浓度、液固比、回流时间、提取次数、温度条件进行单因素试验, 确定皂甙和黄酮提取的最佳试验条件。

**1.2.3 黄芪多糖的提取。**将醇提后所得药渣挥干乙醇, 用粉碎机粉碎, 使其均匀。准确称取一定量药渣, 利用搅拌回流装置进行水提。提取液经旋转蒸发浓缩至一定体积, 加入一定浓度乙醇。放置 12 h, 离心分离出沉淀。烘干沉淀, 分别测定其得率和纯度。该研究分别对不同水提温度、固液比、提取时间和提取次数进行试验, 确定从药渣中提取黄芪多糖的最佳试验条件。分别用浓度 60%、70%、80%、90% 的乙醇进行醇沉试验, 确定黄芪多糖的最佳醇沉条件。

**1.2.4 黄芪皂甙和黄酮的分离纯化。**乙醇提取液低温减压浓缩, 回收乙醇, 得到含有黄酮和皂甙的浓缩液。将浓缩液处理后上 D280 阴离子交换树脂。D280 树脂对中性的皂甙吸附较弱, 通过稀碱液的淋洗即可洗下来; 黄酮呈弱酸性, 该树脂对其吸附力强, 需要用极性较强的洗脱剂才能将其洗脱下来。根据文献资料, 黄酮的解吸主要采用高浓度 NaOH 的乙醇溶液。分别用浓度为 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇配制成含 10% NaOH 的洗脱液, 进行解吸试验, 确定不同浓度的乙醇溶液和含不同浓度 NaOH 的乙醇溶液对黄酮解吸能力的大小, 选定适合于黄酮解吸的洗脱剂, 然后通过动态的上柱及洗脱过程确定柱高对分离效果的影响, 在直径 2.5 cm 的层析柱中, 分别装入经过预处理的 D280 树脂至 7、9、11、13、15 cm 高。将从 10 g 生药材中提取得到的含皂甙和黄酮的提取浓缩液过柱。先用浓度 0.1% NaOH 溶液淋洗, 分布收集淋洗液, 测定黄芪皂甙和黄酮的含量, 确定淋洗液中主要成分, 并绘制洗脱曲线。之后分别用浓度 80% 乙醇和浓度 80% 乙醇-10% NaOH 溶液洗柱, 测定洗脱液中 2 种成分含量, 确定洗脱液中主要成分并绘制洗脱曲线。

## 2 结果与分析

**2.1 黄芪皂甙与黄酮的最佳提取条件** 通过对乙醇浓度、液固比、回流时间、提取次数、温度条件进行单因素试验, 确定皂甙的最佳提取条件为: 浓度 70% 乙醇作为溶剂, 液固比 7:1, 78℃ 提取 3 次, 每次 100 min; 黄酮的最佳提取条件为, 浓度 80% 乙醇作为溶剂, 液固比 7:1, 78℃ 提取 4 次, 每次 80 min。2 种成分同时提取时, 采用以下提取条件: 浓度 80% 乙醇、78℃、80 min、液固比 7:1, 提取 3 次, 在该条件下黄芪皂甙与黄酮的得率均较高, 且较经济。

### 2.2 黄芪皂甙与黄酮的分离纯化结果

**2.2.1 黄酮解吸液的选择结果。**由图 1 可知, 黄酮的解吸率随乙醇浓度的增加而增大, 乙醇浓度达到 80% 后不再明显增

加, 故选用含 10% NaOH 的浓度 80% 乙醇溶液作为洗脱液, 可对黄酮达到很好的解吸效果。

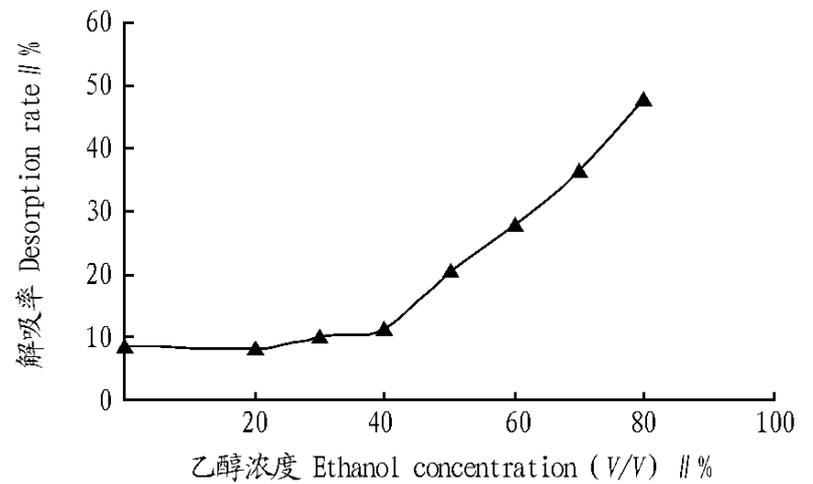


图1 乙醇浓度对黄酮解吸效果的影响

Fig.1 The effects of ethanol concentration on the desorption of flavonoids

**2.2.2 不同装柱长度对分离效果的影响。**试验结果表明, 在柱高小于 11 cm 时, 黄酮和皂甙的洗脱峰有部分重叠, 分离效果差; 柱高为 13 cm 时皂甙和黄酮可以完全分离。柱高再增加, 虽然达到了分离目的, 但会使洗脱体积增大, 洗脱较为困难, 因此选用 13 cm 高的 D280 树脂对 10 g 生药提取液的分离纯化效果最好。

**2.2.3 洗脱结果。**试验结果表明, 用浓度 0.1% NaOH 淋洗的洗脱液中主要成分为皂甙(图 2), 而用浓度 80% 乙醇和 10% NaOH 80% 乙醇淋洗的洗脱液中主要成分为黄酮(图 3)。

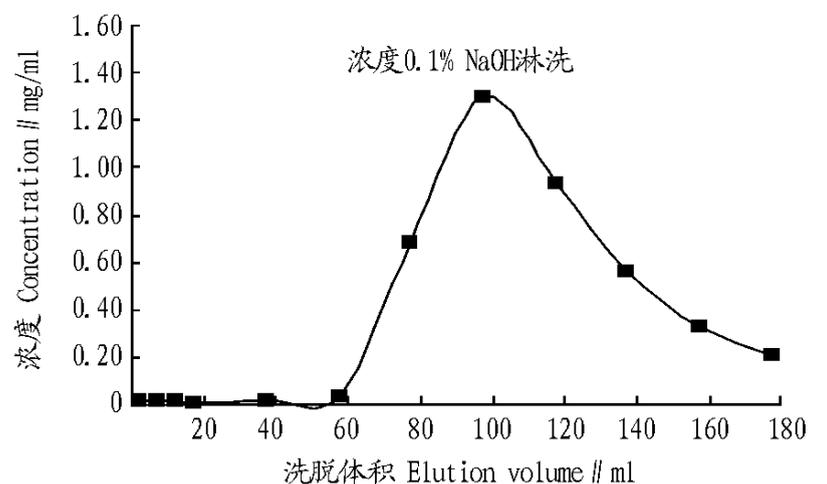


图2 上柱和淋洗过程中皂甙的流出曲线

Fig.2 The effluent curve of saponins during loading and leading processes

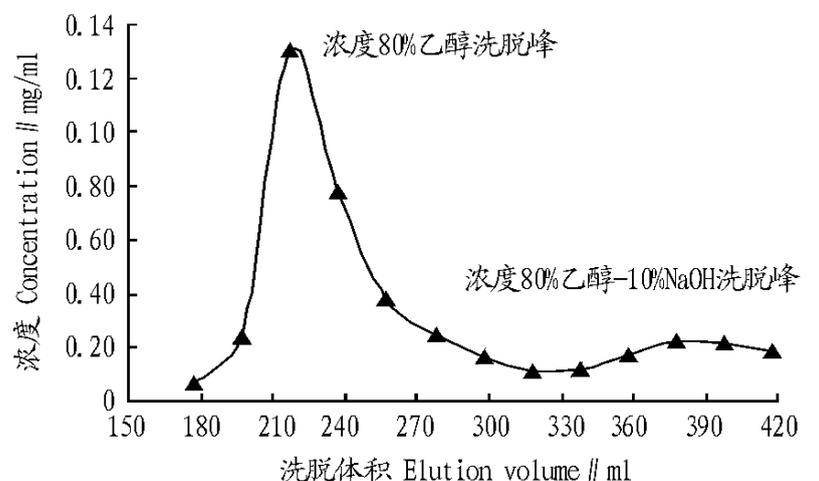


图3 黄酮的洗脱曲线

Fig.3 The elution curve of flavonoids

**2.3 黄芪多糖的提取分离结果** 通过对水提温度、液固比、提取时间和提取次数进行试验, 确定黄芪多糖的最佳提取条件为: 提取温度 100℃, 液固比 16:1, 提取时间 2 h, 提取 3 次。

醇沉试验确定黄芪多糖的最佳醇沉浓度为 70% 乙醇。在该条件下, 所得多糖纯度最大, 且成本较低。

**2.4 黄芪中皂甙、黄酮和多糖的最佳利用工艺** 根据试验结果, 确定黄芪中皂甙、黄酮和多糖 3 种有效成分综合利用的工艺路线见图 4。

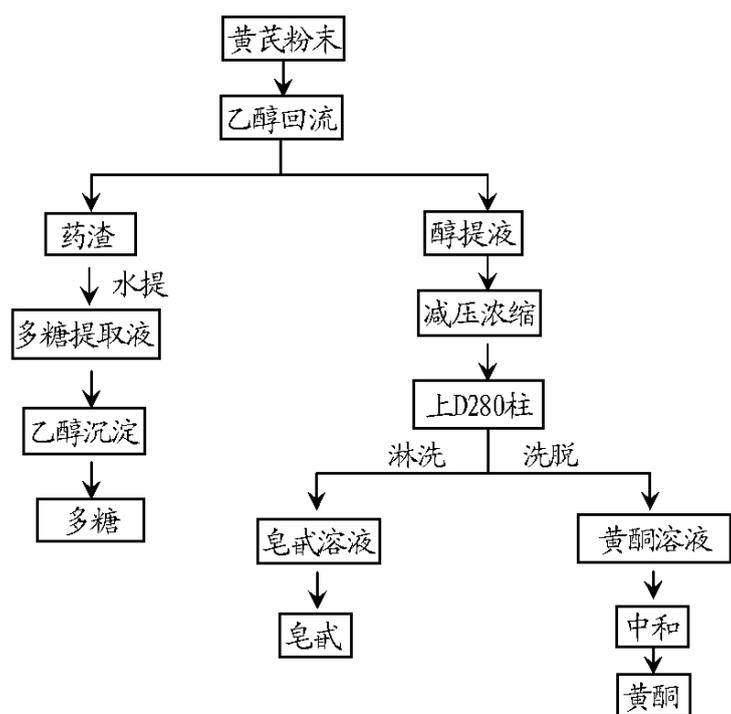


图4 黄芪中皂甙、黄酮和多糖综合利用的工艺路线

**Fig.4 The technologic route of the comprehensive utilization of saponins, flavonoids and polysaccharides in *Astragalus membranaceus***

### 3 结论

(1) 黄芪皂甙的最佳提取条件为: 浓度 70% 乙醇作为溶剂, 采用 7:1 的液固比, 78℃ 提取 3 次, 每次 100 min。

(2) 黄芪黄酮的最佳提取条件为: 浓度 80% 乙醇作为溶剂, 采用 7:1 的液固比, 78℃ 提取 4 次, 每次 80 min。

(3) 黄芪多糖的最佳提取条件为: 以蒸馏水为溶剂, 提取温度 100℃, 液固比 16:1, 提取时间 2 h, 提取 3 次。黄芪多糖的最佳分离条件为: 采用浓度 70% 乙醇对水提液中的多糖进行沉淀。采用上述条件, 所得多糖纯度高, 且成本较低。

(4) 黄芪黄酮和皂甙分离的最佳条件为: 含有黄芪黄酮和皂甙的醇提液减压浓缩, 浓缩液用浓度 1 mol/L 的 NaOH 调 pH 值为 8.0 后过滤, 以 0.5 ml/min 的流速上 D280 阴离子

交换树脂柱。收集流出液和浓度 0.1% NaOH 淋洗液, 其中富含皂甙; 之后用浓度 80% 乙醇和浓度 10% NaOH 80% 乙醇洗脱, 收集液为黄酮。对从 10 g 生药材中所得的醇提液, 用 13 cm 高、直径为 2.5 cm 的 D280 离子交换树脂层析柱, 可使黄芪黄酮和皂甙完全分离。

(5) 在黄芪黄酮的洗脱过程中, 用浓度 80% 乙醇和浓度 10% NaOH 80% 乙醇洗脱出现 2 个洗脱峰, 后一个洗脱峰的产物在 269 nm 有强吸收, 可能是异黄酮类物质。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005:212.
- [2] 段亚丽, 谢梅冬. 黄芪化学成分及其有效成分黄芪甲苷含量测定的研究现状[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(3): 35-38.
- [3] 吴建新, 蒋莹, 严永清. 黄芪、当归及其配伍对大鼠血小板聚集和血小板中 cAMP、cGMP 的影响[J]. 中药药理与临床, 1992, 8(1): 16-18.
- [4] 叶红英, 俞茂华, 颜贻谦, 等. 黄芪多糖对 STZ 糖尿病大鼠物质代谢和心功能的影响[J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(5): 357-358.
- [5] 李先荣, 董彦敏, 程林忠, 等. 黄芪多糖冲剂治疗 II 型糖尿病的临床研究[J]. 山西中医, 1995, 11(1): 16-17.
- [6] 马洪喜, 李冬梅. 黄芪皂甙对糖尿病大鼠血清激素水平的影响[J]. 微量元素与健康研究, 2003, 20(4): 5-6.
- [7] 徐先祥, 彭代银, 刘青云. 黄芪皂甙类成分对心血管系统的作用[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(2): 128-129.
- [8] 石富胜, 杨正国, 狄桂萍, 等. 黄芪皂甙对烧伤患者血管内皮细胞及其功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(10): 750-751.
- [9] 汪德清, 田亚平, 宋淑珍, 等. 黄芪总黄酮抗突变作用实验研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1164-1167.
- [10] 汪德清, 田亚平. 黄芪总黄酮抗肝损伤作用初探[J]. 中国中西医结合杂志, 2005(5): 149-151.
- [11] 汪德清, 沈文梅, 田亚平, 等. 黄芪的三种提取成分对氧自由基作用的影响[J]. 中国药理学通报, 1994(2): 129-132.
- [12] 焦艳, 闻杰, 于晓红, 等. 膜荚黄芪茎叶总黄酮对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(6): 356-358.
- [13] 张峻. 正交实验法优选黄芪水提工艺的实验研究[J]. 基层中药杂志, 1999, 13(3): 13-15.
- [14] 阎巧娟, 韩鲁嘉. 黄芪皂甙的提取分离方法[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(6): 61-65.
- [15] 李洲, 廖史书, 雷文. 制药工业中溶剂萃取技术的机制和应用发展方法[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(2): 89-93.
- [16] 汪正强, 韩鲁嘉, 阎巧娟, 等. 树脂吸附法提取黄芪皂甙[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(6): 66-68.
- [17] 刘遵峰, 刘雪萍, 梁晓勇, 等. 黄芪总黄酮和总甙的提取与分离[J]. 南开大学学报, 2003, 36(3): 22-25.
- [18] 刘云, 唐玉海. 超临界流体技术在医学工业中的应用[J]. 西北药学杂志, 1999, 14(2): 82-83.
- [19] 鲁建江, 王莉, 刘志勇, 等. 微波技术辅助测定黄芪中总黄酮和多糖的含量[J]. 中成药, 2003, 25(3): 246-248.
- [20] 韩鲁佳, 阎巧娟, 江正强, 等. 黄芪多糖及皂甙提取工艺研究[J]. 农业工程学报, 2000, 16(5): 119-121.

J Gerontol, 1956, 11: 298-300.

(上接第 2050 页)

### 3 结论与讨论

(1) 乙醇浓度是影响槐花提取物清除 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子的最关键因素, 其中对清除羟自由基和 DPPH 自由基能力的影响分别达到显著和极显著水平。

(2) 槐花中清除 DPPH 自由基的活性物质的最佳提取工艺为: 以 50% 乙醇为提取溶剂, 预处理时间 12 h, 提取时间 1 h。

(3) 槐花中清除羟自由基活性物质的最佳提取工艺为: 以 30% 乙醇为提取溶剂, 预处理时间 12 h, 提取时间 2 h。

(4) 槐花中清除超氧阴离子活性物质的最佳提取工艺为: 以 50% 乙醇为提取溶剂, 预处理时间 0 h, 提取时间 2 h。

### 参考文献

- [1] 熊皓平, 杨伟丽, 张友胜, 等. 天然植物抗氧化剂的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(5): 75-79.
- [2] HARMAND. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry[J]. J Gerontol, 1956, 11: 298-300.
- [3] SOHAL R.S. Oxidative stress hypothesis of aging[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(5): 573-574.
- [4] MITLER R, VANDERAUWERA S, COLLERY M, et al. Reactive oxygen gene network of plants[J]. Trends Plant Sci, 2004, 9: 490-498.
- [5] 田云, 卢向阳, 何小解. 天然植物抗氧化剂清除氧自由基特性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 123-125.
- [6] 李姚姚, 原思通, 肖永庆. 中药槐花化学成分、药理作用及炮制研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(6): 77-82.
- [7] 潘英明, 梁英, 朱志仁, 等. 槐花米抗氧化成分的提取及其活性研究[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(2): 41-44.
- [8] 丁利君, 吴振辉, 蔡创海. 槐花中黄酮类物质提取工艺的研究[J]. 农业工程学报, 2002, 18(1): 142-144.
- [9] BRAND WILLIAMS W, CUVEIHER ME, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. Technology, 1995, 28: 25-30.
- [10] 刘骏. 结晶紫分光光度法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. 武汉工业学院学报, 2005, 24(2): 53-55.
- [11] CONSTANINE NG, STANLEY KR. Superoxide dismutases[J]. Plant Physiology, 1977, 59: 309-314.
- [12] MONAGOMERY D.C. Design and analysis of experiments[M]. 4th ed. New York: Wiley, 1996: 627-631.