

# 正交试验优化黄芪甲苷 制备环黄芪醇的工艺研究

廖 然<sup>1</sup> 谢 伟<sup>2</sup>

(1. 南华大学附属南华医院药剂科, 湖南 衡阳 421000; 2. 陕西步长制药有限公司, 陕西 西安 710075)

**摘要:**目的 建立一种制备较高纯度的环黄芪醇的方法, 并进行制备工艺优化。方法 以黄芪甲苷为前体化合物, 经过氧化→还原→水解→萃取, 从而获得环黄芪醇。对各环节中影响环黄芪醇产率的因素进行正交试验优化各参数。结果 影响环黄芪醇提取率的因素主次顺序为还原反应液与  $\text{H}_2\text{SO}_4$  质量比例>黄芪甲苷与  $\text{KIO}_4$  比例>水解反应时间>黄芪甲苷与  $\text{BH}_4\text{Na}$  比例, 最佳制备条件组合为黄芪甲苷与  $\text{KIO}_4$  摩尔比为 1/10, 黄芪甲苷与  $\text{BH}_4\text{Na}$  摩尔比为 1/2, 还原反应液与  $\text{H}_2\text{SO}_4$  质量比为 1/300, 水解反应时间为 48 h。结论 该制备工艺稳定可靠, 产率较高, 易于产业化推广。

**关键词:**环黄芪醇; 制备工艺; 正交试验

中图分类号: R 284.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-0571(2015)05-0188-03

DOI: 10.13424/j.cnki.mtcm.2015.05.069

黄芪是常用中药材之一, 生用可益卫固表, 利水消肿, 托毒生肌; 炙用则补中益气。黄芪皂苷甲亦称为黄芪甲苷, 是从黄芪中分离得到的一种重要的具有多种药理活性的皂苷类化合物<sup>[1]</sup>。在治疗心脑血管疾病, 抗衰老、抗炎镇痛、免疫调节等方面均具有广泛的生物活性作用。但由于黄芪皂苷的相对分子质量较大、具有溶解惰性等原因使其在体内的相对生物利用度不足, 从而限制了其作为药物的开发和推广<sup>[2]</sup>。而环黄芪醇为黄芪甲苷的苷元, 具有相对较小的分子质量和较强的亲脂性, 有利于生物膜渗透和胃肠道吸收而达到更好的生物利用度<sup>[3]</sup>。目前国内对环黄芪醇的相关报道较少, 主要为生理活性方面研究<sup>[4-5]</sup>, 对环黄芪醇制备方法报道极少。本研究以黄芪甲苷为前体化合物制备环黄芪醇, 并用正交试验优化制备工艺, 以期获得操作简便、条件温和的环黄芪醇制备方法, 最终为其大规模的生产提供技术支持。

## 1 材料

ME54E 型电子天平(梅特勒托利多仪器(上海)有限公司), R202-2 型旋蒸仪(武汉超杰实验仪器有限公司), Agilent 1200 高效液相色谱仪(G1311A 型四元泵, G4218A 蒸发光散射检测器, Agilent 1200 化学工作站 B.03-01)。

黄芪甲苷(陕西慧科植物开发有限公司, 批号: HKI016-201407,  $\text{HPLC} \geq 10\%$ ), 环黄芪醇标准品(大连美仑生物技术有限公司, 批号: MB6694-201408,  $\text{HPLC} \geq 98\%$ ), 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 环黄芪醇的含量测定

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱: Eclipse XDB-C<sub>18</sub>-USP L1 (4.6 mm×150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ , 安捷伦); 流动相: 乙腈-水 (43 : 57); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; ELSD 参数: 漂移管温度: 105  $^{\circ}\text{C}$ , 氮气流速: 2.75 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

**2.1.2 标准曲线绘制** 精密称取环黄芪醇对照品 5 mg, 加乙腈定容于 25 mL 容量瓶中, 作为储备液。精密吸取适量储备液, 加乙腈分别稀释成 0.20, 0.40, 0.80, 1.60, 3.20, 6.40, 12.80, 25.60 mg·L<sup>-1</sup> 的系列溶液, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标得到回归方程  $Y = 32514X - 209$  ( $R^2 = 0.9998$ ), 线性范围为 0.20 ~ 25.60 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.1.3 供试品溶液配制** 称取减压浓缩后所得环黄芪醇粗品 0.5 mg, 加乙腈定容于 10 mL 容量瓶中, 即得。

**2.1.4 精密度试验** 分别精密量取 0.20, 1.60,

25.60 mg · L<sup>-1</sup> 共 3 个质量浓度的环黄芪醇对照品溶液,于 1 d 内重复测定 5 次,计算日内精密度 RSD 分别为 0.98 % ,1.35 % ,1.23 % 。表明仪器精密度良好。

2.1.5 加样回收试验 取已知含量的环黄芪醇

粗品 9 份,每份 0.5 mg,每 3 份为一组。分别加入环黄芪醇对照品 0.5,5.0,10.0 mg,加乙腈定容于 10 mL 容量瓶中,按照 2.1.1 项下色谱条件测定,计算低、中、高浓度的加样回收率,见表 1,结果表明该方法稳定可靠。

表 1 环黄芪醇含量测定的加样回收率试验

| 称样量(mg) | 样品中量(mg) | 加入量(mg) | 测得量(mg) | 回收率(%) | 平均值(%) | RSD(%) |
|---------|----------|---------|---------|--------|--------|--------|
| 0.5004  | 0.4758   |         | 0.9790  | 100.4  |        |        |
| 0.5001  | 0.4751   | 0.5     | 0.9662  | 97.88  | 99.24  | 1.29   |
| 0.5011  | 0.4762   |         | 0.9746  | 99.41  |        |        |
| 0.5008  | 0.4759   |         | 5.4951  | 101.8  |        |        |
| 0.5006  | 0.4761   | 5.0     | 5.4910  | 100.9  | 100.4  | 1.72   |
| 0.5011  | 0.4762   |         | 5.4795  | 98.51  |        |        |
| 0.5001  | 0.4751   |         | 10.482  | 100.4  |        |        |
| 0.5006  | 0.4763   | 10.0    | 10.474  | 98.49  | 98.96  | 1.25   |
| 0.5013  | 0.4768   |         | 10.472  | 98.03  |        |        |

2.2 工艺基本流程 工艺流程为:氧化→还原→水解→萃取,具体操作如下:

取 800 mg 黄芪甲苷作为原料,加入水配置成 0.01 mol/L 的黄芪甲苷悬浊液,加 HCl 调节悬浊液的 pH 至 4,向悬浊液中加入 KIO<sub>4</sub> 在 20 ℃ 下避光反应 48 h,然后加入乙二醇终止氧化,随后加 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 至 7,减压浓缩至无醇味,加入等体积正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇萃取部分,水洗 2 次,取正丁醇部分,蒸去正丁醇,得到氧化产物。

在氧化产物中加入 30 % 的甲醇水溶液分散成悬浊液,其中加入的 30 % 甲醇水溶液与黄芪甲苷的质量比为 1 : 1;然后加入 BH<sub>4</sub>Na 作为还原剂,还原反应 24 h 后,加入 50 % 乙酸至反应液 pH 至 5 终止反应,即得还原产物。

在还原反应液加入适量 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,在 50 ℃ 下静置反应 24 h。

向水解后的反应液中加入 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,调 pH 至 7,再用与反应液等体积乙酸乙酯萃取 3 次,合并乙酸乙酯萃取液,减压浓缩至干,得环黄芪醇粗品。

将环黄芪醇粗品用适量的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-丙酮溶解后,然后置于 10 ℃ 条件下放置 24 h,析晶,过滤干燥。

2.3 正交试验设计 经过前期实验已经确定了基本工艺参数,进一步以原料(黄芪甲苷)与氧化剂(KIO<sub>4</sub>)比例,原料(黄芪甲苷)与还原剂(BH<sub>4</sub>Na)比例,还原反应液与 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 质量比例,水解反应时间等为考察因素,萃取后所得环黄芪醇质量分数为指标,按照 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验,因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4,对环黄芪醇产率有显著性影响的因素进行单因素分析见图 1。

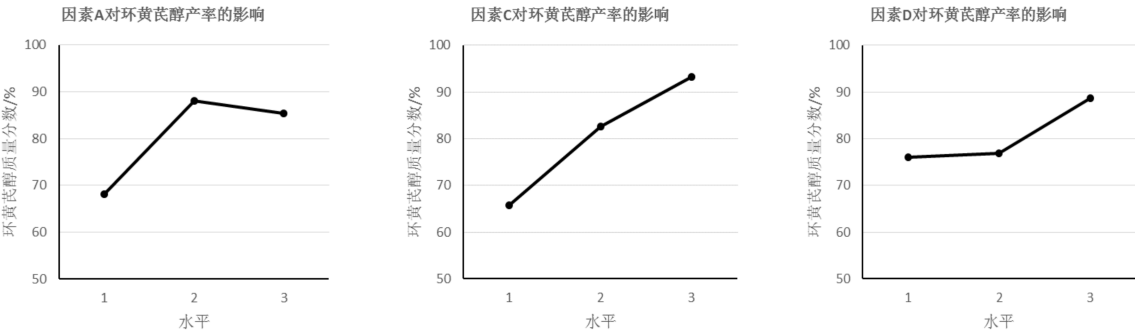


图 1 单因素对环黄芪醇产率影响

| 表 2 环黄芪醇制备工艺正交试验因素水平 |                              |                                |                                             |          |
|----------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|----------|
| 水平                   | A 黄芪甲苷与 KIO <sub>4</sub> 摩尔比 | B 黄芪甲苷与 BH <sub>4</sub> Na 摩尔比 | C 还原反应液与 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 质量比 | 水解反应时间/h |
| 1                    | 1/5                          | 1/1                            | 1/100                                       | 24       |
| 2                    | 1/10                         | 1/2                            | 1/200                                       | 36       |
| 3                    | 1/15                         | 1/3                            | 1/300                                       | 48       |

| 表 3 环黄芪醇制备工艺正交试验安排及直观分析 |       |       |       |       |             |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| No.                     | A     | B     | C     | D     | 环黄芪醇质量分数(%) |
| 1                       | 1     | 1     | 1     | 1     | 47.85       |
| 2                       | 1     | 2     | 2     | 2     | 68.86       |
| 3                       | 1     | 3     | 3     | 3     | 87.60       |
| 4                       | 2     | 1     | 2     | 3     | 97.39       |
| 5                       | 2     | 2     | 3     | 1     | 98.35       |
| 6                       | 2     | 3     | 1     | 2     | 68.41       |
| 7                       | 3     | 1     | 3     | 2     | 93.43       |
| 8                       | 3     | 2     | 1     | 3     | 81.17       |
| 9                       | 3     | 3     | 2     | 1     | 81.73       |
| K <sub>1</sub>          | 68.10 | 79.56 | 65.82 | 76.01 |             |
| K <sub>2</sub>          | 88.09 | 82.83 | 82.66 | 76.91 |             |
| K <sub>3</sub>          | 85.44 | 79.26 | 93.16 | 88.72 |             |
| R                       | 20.00 | 3.57  | 27.33 | 12.71 |             |

| 表 4 制备工艺方差分析 |         |   |       |       |
|--------------|---------|---|-------|-------|
| 方差来源         | SS      | f | F     | p     |
| A            | 707.69  | 2 | 30.08 | <0.05 |
| B(误差)        | 23.52   | 2 |       |       |
| C            | 1140.76 | 2 | 48.49 | <0.05 |
| D            | 301.59  | 2 | 12.82 | >0.05 |

注:F<sub>0.05</sub>(2,2)=19.00

由直观分析可知,影响环黄芪醇产率的因素顺序为 C>A>D>B,确定的最佳制备条件为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>;方差分析结果表明,C 因素和 A 因素对环黄芪醇产率有显著的影响,D 因素对制备工艺有一定影响。进一步对因素 A,C 和 D 进行 LSD 法多重比较,并对各单因素进行分析,因素 A 在摩尔比为 1/5~1/15 的范围内,对环黄芪醇产率的影响呈现先上升后下降的趋势,因而说明 KIO<sub>4</sub> 加入量不宜过高;因素 C 在摩尔比为 1/100~1/300 的范围,对环黄芪醇的产率成正相关,即加入 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 越多,产率越高;水解时间为 24 h 与水解时间为 36 h,环黄芪醇产率无明显提高,但水解 48 h 时环黄芪醇的产率有较大提高,因而制备过程中水解反应时间应保持在 48 h 以上。综合考虑到节省试剂、生产效率和最终产率等因素,最终确定的制备工艺条件为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即黄芪甲苷与 KIO<sub>4</sub> 摩尔比为

1/10,黄芪甲苷与 BH<sub>4</sub>Na 摩尔比为 1/2,还原反应液与 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 质量比为 1/300,水解反应时间为 48 h。

**2.4 验证试验** 依据 2.2 中基本制备工艺,其中氧化反应过程黄芪甲苷与 KIO<sub>4</sub> 摩尔比为 1/10,还原反应过程中甲黄芪苷与 BH<sub>4</sub>Na 摩尔比为 1/2,水解反应过程中还原反应液与 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 质量比控制为 1/300,水解反应时间为 48 h,按优化的工艺条件验证试验,重复 3 次。结果环黄芪醇含量分别为 97.64%、96.51%、98.69%,说明优化的提取工艺条件稳定可行。

### 3 讨论

环黄芪醇为四环三萜类中环阿屯烷型。由于其耐酸性较差,在强酸性条件下,可转化为黄芪醇,所以目前多采用碱水解方式获取环黄芪醇。但是由于碱水解方式产率较低,限制了大规模生产。环黄芪醇在强酸性条件下发生消去反应而变成黄芪醇,只要控制酸度即可保证环黄芪醇的产率。因此,本研究尝试用酸水解法制备环黄芪醇。水解前进行氧化反应,通过氧化反应不仅能够对黄芪甲苷中的糖部分氧化使其开链,便于后续水解反应除去,同时又不影响苷元部分,从而提高环黄芪醇的产率。对黄芪甲苷水解过程中 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 加入量进行试验,黄芪甲苷与 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 质量比在 1/100~1/300 范围内,随 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 加入量增加环黄芪醇的产率增高,在该范围内副反应较少,能够获得纯度较高的环黄芪醇。该方法制备工艺简单,所用试剂价格低廉且反应条件较为温和,因而可应用于大规模生产。

### 参考文献

[1]段立军,孙博航.黄芪甲苷的研究进展[J].沈阳药科大学学报,2011,28(5):410-416.  
[2]石海莲,吴大正,胡之璧.黄芪皂苷甲的研究进展[J].中国药学杂志,2008,43(8):565-567.  
[3]JING Zhu,Stephanie Lee,Maurice K C Ho,et al. In vitro intestinal absorption and first-pass intestinal and hepatic metabolism of cycloastragenol, a potent small molecule telomerase activator[J]. Drug Meta Pharmacokinet, 2010, 25(5):479.  
[4]魏宝红,叶静,薛宝娟,等.环黄芪醇连续灌胃对大鼠肝脏 P450 酶活性的影响[J].中国新药杂志,2014,23(4):476-479.  
[5]刘晓亚.黄芪甲苷和环黄芪醇的体内外代谢研究[D].北京:北京中医药大学,2013:26-27.

(收稿日期:2014-12-12 编辑:文颖娟)