(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102641326 A
(43)申请公布日 2012.08.22

(21)申请号 201210154465.3

(22)申请日 2012.05.17

(71)申请人 中南大学
地址 410083 湖南省长沙市岳麓区麓山南路932号

(72)发明人 程泽能 蔡凝芳 袁玉 云筠筠 张弘 王霆

(74)专利代理机构 长沙市融智专利事务所 43114
代理人 袁靖

(51)Int.Cl.
A61K 36/481(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61K 125/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 3 页

(54)发明名称

一种黄芪提取物及其制备和应用方法

(57)摘要

本发明提供了一种黄芪提取物及其制备和应用方法；该提取物以中药黄芪为原料提取而成，其中含有毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷的质量百分比分别为0.66%~0.73%，0.36%~0.42%，34.6%~36.9%。本发明提取物的制备方法以该提取物中的毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷含量、水分含量、炽灼残渣量、重金属含量为指标进行优化得到。本发明可更好的控制黄芪提取物的质量，保证用药安全性，深度开发质量可控、物质基础明确的黄芪药物，以顺应中药现代化的要求。

CN 102641326 A

1. 一种黄芪提取物，其特征在于：是以黄芪为原料提取得到的，所述的黄芪提取物含有毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷，质量百分比分别相应为 0.66%~0.73%，0.36%~0.42%，34.6%~36.9%。

2. 根据权利要求 1 所述的黄芪提取物，其特征在于：所述的黄芪来源于豆科植物蒙古黄芪(Radix Astagali)或膜荚黄芪(Astragalus membranaceus(Fisch.)Bunge)的干燥根。

3. 根据权利要求 1 所述的黄芪提取物，其特征在于：所述的黄芪提取物的水分不超过 5.0%、炽灼残渣量不超过 0.5%、重金属含量 0.01‰。

4. 权利要求 1-3 任意一项所述的黄芪提取物的应用方法，其特征在于，用于制备治疗慢性阻塞性肺疾病的药剂。

5. 一种黄芪提取物的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

取黄芪的干燥根，粉碎，依次用其 10-12，7-9 倍体积量的 80% 乙醇各回流提取 1 次，每次 1h；合并两次黄芪醇提液，回收乙醇并浓缩至含 0.4-0.8g 生药 $\cdot ml^{-1}$，再以 0.8-1.2ml $\cdot min^{-1}$ 速度通过 D-101 大孔树脂；上样量不超过 3.6g 生药 $\cdot ml^{-1}$ 树脂，依次用 4-6 倍柱体积纯水，4-6 倍柱体积 15-25% 乙醇洗脱，弃去，然后用 5-7 倍柱体积 60-95% 乙醇洗脱，收集 60-95% 乙醇洗脱部分，洗脱液减压回收溶剂；干燥，粉碎，即得。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

取黄芪的干燥根，粉碎，依次用其 12，9 倍体积量的 80% 乙醇各回流提取 1 次，每次 1h；合并两次黄芪醇提液，回收乙醇并浓缩至含 0.6g 生药 $\cdot ml^{-1}$，再以 1ml $\cdot min^{-1}$ 速度通过 10g D-101 大孔树脂，上样量不超过 3.6g 生药 $\cdot ml^{-1}$ 树脂，依次用 5 倍柱体积纯水，5 倍柱体积 20% 乙醇，6 倍柱体积 80% 乙醇洗脱，收集 80% 乙醇洗脱部分，洗脱液减压回收溶剂，60℃干燥，粉碎，即得。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的制备方法，其特征在于，所述的黄芪提取物含有毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷，质量百分比分别相应为 0.66%~0.73%，0.36%~0.42%，34.6%~36.9%。

8. 根据权利要求 5 或 6 所述的制备方法，其特征在于：所述的黄芪来源于豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根。

9. 根据权利要求 5 或 6 所述的制备方法，其特征在于：所述的黄芪提取物的水分不超过 5.0%、炽灼残渣量不超过 0.5%、重金属含量 0.01‰。

一种黄芪提取物及其制备和应用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种黄芪提取物，具体地，是以中药黄芪为原料的提取物及其制备方法和制备治疗慢性阻塞性肺疾病药剂的用途；属于药物领域。

背景技术

[0002] 慢阻肺，即慢性阻塞性肺部疾病（chronic obstructive pulmonary diseases，COPD），其定义为具有气流阻塞特征的慢性支气管炎和（或）肺气肿。在我国，COPD 是肺心病的主要基础病，每年由于 COPD 造成的死亡可达 100 万人。其危害相当严重。

[0003] 目前用于治疗 COPD 的化学药物均属于单一靶点作用的制剂，主要是减轻疾病症状，尚无延缓慢阻肺病程、或抑制小气道及肺实质炎症的有效治疗手段出现。市场上现有产品补肺活血胶囊（BFHX）经多年临床使用证明，对于慢阻肺有着显著疗效。其药方组成为黄芪、赤芍和补骨脂三味传统中药。君药是黄芪，黄芪（Radix Astragali）为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根，它是一味重要的中药，具有补气开阳，益卫固表，利尿消肿，敛疮生肌等功效，在我国运用有几千年的历史。中药及其复方制剂多成分、多靶点和整合协同作用的特点，使得补肺活血胶囊在慢阻肺这一缓慢进程性疾病的治疗方面凸显出优势。

[0004] 虽然补肺活血胶囊临床使用有效，但其制备流程为将水提醇沉液浓缩成浸膏后混合赤芍粉末制粒灌装胶囊，生产工艺十分粗糙。且提取物的形态为浸膏，造成制剂的稳定性较差。因此，我们拟对补肺活血胶囊进行深度开发，对其进行物质基础研究，生产工艺优化，提高质量标准。前期预试验结果显示，黄芪一味药材单煎，与赤芍、补骨脂三味药材合煎出的主要成分相同，因此本发明单独研究黄芪一味药材，后期再合并赤芍、补骨脂的研究结果，深度开发补肺活血胶囊。

[0005] 目前口服给药是中药治疗的主要方式，中药或其活性提取物口服后，经消化道、肠道菌群作用，生成一种由中药固有成分及其代谢产物组成的混合物，有的直接被排泄，有的被选择性吸收，经体内各种药物代谢酶作用进入血液，通过血液运输到各个器官组织或靶点，才能真正起效。由此可见，不论中药含有多少成分，只有吸收进入血液的成分才有可能成为有效成分（外用药及直接刺激胃肠道药物除外）。因此，本研究采用大鼠在体单向灌流模型，研究灌流液中黄芪提取物主要成分减少情况。采用大鼠体内模型，研究灌胃给药后入血成分、尿液排泄成分。结合以上两种模型比较分析黄芪提取物被吸收成分，确定为黄芪的物质基础。筛选出能反映黄芪物质作用基础的指标成分，可更好的控制该药物的质量，保证用药安全性，深度开发质量可控、物质基础明确的黄芪药物，以顺应中药现代化的要求。目前尚无针对本发明标准的黄芪提取物及其制备和应用方法的报道。

发明内容

[0006] 为了解决上述问题，本发明的目的是提供一种黄芪提取物及其制备和应用方法。

[0007] 一种黄芪提取物，是以黄芪为原料提取得到的，所述的黄芪提取物含有毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷，质量百分比分别相应为 0.66%~0.73%，0.36%~0.42%，

34.6%~36.9%。

[0008] 所述的黄芪来源于豆科植物蒙古黄芪(Radix Astagali)或膜荚黄芪(Astragalus membranaceus(Fisch.)Bunge)的干燥根。

[0009] 所述的黄芪提取物的水分不超过5.0%、炽灼残渣量不超过0.5%、重金属含量0.01‰。

[0010] 所述的黄芪提取物用于制备治疗慢性阻塞性肺疾病的药剂。包括以黄芪提取物为主要有效成分与多种医用辅料(赋型剂,稀释剂,香味剂、甜味剂、润滑剂等)配合,制成多种剂型的药物使用,如冻干粉针,注射液,大输液,片剂,胶囊,颗粒剂以及口服液等。

[0011] 一种黄芪提取物的制备方法,包括如下步骤:

[0012] 取黄芪的干燥根,粉碎,依次用其10-12,7-9倍体积量的80%乙醇各回流提取1次,每次1h;合并两次黄芪醇提液,回收乙醇并浓缩至含0.4-0.8g生药·ml^{-1},再以0.8-1.2ml·min^{-1}速度通过D-101大孔树脂;上样量不超过3.6g生药·ml^{-1}树脂,依次用4-6倍柱体积纯水,4-6倍柱体积15-25%乙醇洗脱,弃去,然后用5-7倍柱体积60-95%乙醇洗脱,收集60-95%乙醇洗脱部分,洗脱液减压回收溶剂;干燥,粉碎,即得。

[0013] 优选包括如下步骤:

[0014] 取黄芪的干燥根,粉碎,依次用其12,9倍体积量的80%乙醇各回流提取1次,每次1h;合并两次黄芪醇提液,回收乙醇并浓缩至含0.6g生药·ml^{-1},再以1ml·min^{-1}速度通过10g D-101大孔树脂,上样量不超过3.6g生药·ml^{-1}树脂,依次用5倍柱体积纯水,5倍柱体积20%乙醇,6倍柱体积80%乙醇洗脱,收集80%乙醇洗脱部分,洗脱液减压回收溶剂,60℃干燥,粉碎,即得。

[0015] 所述的黄芪提取物含有毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷,质量百分比分别相应为0.66%~0.73%,0.36%~0.42%,34.6%~36.9%。

[0016] 所述的黄芪来源于豆科植物蒙古黄芪(Radix Astagali)或膜荚黄芪(Astragalusmembranaceus(Fisch.)Bunge)的干燥根。

[0017] 所述的黄芪提取物的水分不超过5.0%、炽灼残渣量不超过0.5%、重金属含量0.01‰。

[0018] 本发明提供了一种黄芪提取物,以中药材黄芪为原料提取而成。本发明采用大鼠在体单向灌流模型,研究灌流液中黄芪提取物主要成分减少情况。采用大鼠体内模型,研究灌胃给药后入血成分、尿液排泄成分。结合以上两种模型比较分析黄芪提取物被吸收成分,即:毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷。并以这些成分及其含量作为标准;根据其优化提取工艺和富集纯化工艺,最终获得精制而成的本发明提取物,同时水分含量、炽灼残渣量、重金属含量也作为标准,在优化提取工艺和富集纯化工艺时考虑。本发明可更好的控制该药物的质量,保证用药安全性,深度开发质量可控、物质基础明确的黄芪药物,以顺应中药现代化的要求。

附图说明

[0019] 图1为黄芪提取物色谱图;

[0020] 图2为大鼠灌胃黄芪后血浆HPLC典型图谱(a空白血浆,b含药血浆);

[0021] 图3大鼠灌胃黄芪后尿液HPLC典型图谱(a空白尿样,b含药尿样);

[0022] 图 4 为黄芪提取物指纹图谱。

[0023] 以下通过实施例形式的具体实施方式，对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

具体实施方式

[0024] 实施例 1：大鼠在体肠灌流方法研究黄芪吸收

[0025] 1 试验材料

[0026] 1.1 试验仪器

[0027] Agilent 1200- 紫外检测器；Agilent TC-C_{18}(250×4.6mm，5μm)；JA2003H 型千分之一天平(上海精密科学仪器有限公司)；CP225D 型十万分之一电子天平(Sartorious)；TD24-WS 低速台式离心机(湘仪离心机有限公司)；KL-RO-10 型艾柯超纯水机(台湾艾柯)；WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)；MTN-2800D 氮气吹干仪（天津奥特赛恩斯仪器有限公司)；DDB-320 型电子蠕动泵（上海之信仪器有限公司）；紫外分光光度计(型号：UV-2450)。

[0028] 1.2 试验试剂与药品

[0029] 毛蕊异黄酮对照品：上海同田生物技术有限公司；纯度≥ 98%；芒柄花素对照品：上海同田生物技术有限公司；纯度≥ 98%；黄芪甲苷对照品：中国药品生物制品鉴定所；纯度≥ 95%；乙腈：美国 Tedia 公司生产，色谱纯。

[0030] 1.3 实验动物

[0031] SD 大鼠，体重 200+20g，中南大学湘雅医院实验动物中心提供。

[0032] 2 试验方法

[0033] 2.1 在体肠灌流实验测定黄芪提取液在大鼠全肠段的吸收

[0034] 2.1.1 溶液的配制

[0035] 2.1.1.1 黄芪提取液的制备

[0036] 称取一定量的黄芪，粉碎，加入 10 倍量的水煎煮 1h，过滤，分离药液药渣，在药渣中加入 8 倍量的水继续煎煮 1h，合并两次煎煮的药液，浓缩得浸膏。用纯水溶解，得黄芪提取物溶液(约含生药 2g·ml^{-1})。

[0037] 2.1.1.2 在体肠灌流液的配制

[0038] 分别称取氯化钠 7.8g，葡萄糖 1.4g，碳酸氢钠 1.37g，氯化钙 0.37g，氯化钾 0.35g，磷酸二氢钠 0.32g，氯化镁 0.02g，加适量蒸馏水溶解，加水稀释至 1000ml，超声混匀，即得 Kreb-Ringer’s 营养液(K-R 液)。

[0039] 2.1.1.3 含酚红 K-R 液的配制

[0040] K-R 液的配制同 1.2.1.1.2。称取酚红约 20mg，用 1000ml K-R 液溶解，得含酚红约为 20mg·L^{-1} 的 K-R 液。

[0041] 2.1.2 黄芪提取物在肠灌流液中的稳定性考察

[0042] 大鼠实验前禁食而不禁水 12h，麻醉后固定，沿腹中线打开腹腔，将肠段的两端各插入塑料管，并结扎固定，用 37℃生理盐水将各肠段内容物冲洗干净，用线扎紧后将胶管通过蠕动泵，先将 K-R 液以较快的速度泵入肠段，使肠段内充满 K-R 液，后将流速降低至

0.2ml·min^{-1},同时开始计时,1h 后于出口处收集空白灌流液。取 9.0ml 的空白灌流液,加入 1.0ml 黄芪提取液(制备方法同 2.1.1.1),涡旋混匀,置 37℃水浴,并于 0h,1h,2h,3h 分别取样。测定供试液中各主要峰峰面积的变化来考察黄芪提取液在肠灌流液中的稳定性。

[0043] 2.1.3 大鼠在体肠灌流试验

[0044] 大鼠实验前禁食而不禁水 12h,麻醉后固定,沿腹中线打开腹腔,将肠段的两端各插入塑料管,并结扎固定,用 37℃生理盐水将各肠段内容物冲洗干净。再取 50ml 用 K-R 液配制的供试药液(5ml 黄芪提取液加入到 45mlK-R 液中,黄芪提取液制备方法同 2.1.1.1),先将药液以较快的速度泵入肠段,使肠段内充满药液,后将流速降低至 0.2ml·min^{-1},同时开始计时,1h 后于出口处收集灌流液。

[0045] 2.1.4 样品测定方法

[0046] 2.1.4.1 灌流液中酚红的测定

[0047] 灌流液中的酚红浓度采用紫外分光光度法进行测定,于 558nm 处测定吸光度。灌流流出液中药物成分峰峰面积用下式校正:$C_{校正}=C_{实测}\times(C_{酚红(进)}/酚红_{(出)})$

[0048] 2.1.4.2 灌流液中黄酮类成分的测定

[0049] 黄酮类成分的测定采用高效液相色谱法进行测定。

[0050] 色谱条件:色谱柱为 AgilentTC-C18(250×4.6mm,5μm);柱温:30℃;流动相乙腈(A):水(B):0min,A:B=5:95;15min,A:B=5:95,60min,A:B=55:45;70min,A:B=90:10;75min,A:B=5:95;80min,A:B=5:95;流速:1.0ml·min^{-1};UV 检测波长:203nm;进样量:20μl。

[0051] 样品处理方法:含药灌流液置 1.5ml 的 EP 管里,12000r·min^{-1} 高速离心 10min,取上清液进样。

[0052] 2.1.4.3 灌流液中黄芪总皂苷的测定

[0053] 黄芪总皂苷采用紫外分光光度法进行测定,UV 检测波长:544nm。

[0054] 标准溶液的配制:精密称取 5.01mg 黄芪甲苷对照品,置于 10ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度(每 1ml 储备液中约含黄芪甲苷 500μg)。

[0055] 标准曲线的制备:精密量取 0.15,0.30,0.45,0.60,0.75ml 黄芪甲苷标准溶液,放入具塞试管中,分别加入无水乙醇至 0.75ml,再加入 0.75ml8% 的香草醛试剂,于冰浴中加入 7.5ml72% 的硫酸,混合摇匀,放入 62℃水浴中加热 20min,取出冷却后,摇匀,在波长 544nm 处测吸光度,制定标准曲线,得回归方程 $y=0.01077x+0.02458$($r^2=0.99579$)

[0056] 样品处理方法:取含药灌流液 10ml,加入 20ml 水饱和的正丁醇萃取,共萃取 3 次,合并正丁醇液,用 20ml 氨试液洗涤 3 次,分离出正丁醇层,将其蒸干后,用 10ml 无水乙醇溶解,得样品,将样品稀释 20 倍后,取 0.5ml 样品稀释液,加入 0.5ml8% 的香草醛试剂,于冰浴中加入 5ml72% 的硫酸,混合摇匀,放入 62℃水浴中加热 20min,取出冷却后,摇匀,在波长 544nm 处测吸光度。

[0057] 3 试验结果

[0058] 3.1 黄芪提取液指纹图谱的建立

[0059] 通过全波长扫描,对不同波长下的色谱图进行分析比较,结果在 203nm 波长下各峰分离良好,峰数目也比较多,故选择 203nm 作为检测波长。2.1.3.2 色谱条件下进样,得到黄芪指纹图谱,共有 8 个特征峰(见图 1)。

[0060] 3.2 肠灌流试验结果可见 8 个黄酮类成分和黄芪总皂苷吸收入血，根据对照品比对，可初步判断其中 2 个黄酮类成分分别为毛蕊异黄酮和芒柄花素。

[0061] 实施例 2：黄芪入血成分研究

[0062] 1 试验材料

[0063] 1.1 试验仪器

[0064] Agilent 1200- 紫外检测器；Agilent TC-C_{18}(250×4.6mm，5μm)；JA2003H 型千分之一天平（上海精密科学仪器有限公司）；CP225D 型十万分之一电子天平（Sartorious）；TD24-WS 低速台式离心机（湘仪离心机有限公司）；KL-RO-10 型艾柯超纯水机（台湾艾柯）；WH-2 微型旋涡混合仪（上海沪西分析仪器厂）；MTN-2800D 氮气吹干仪（天津奥特赛恩斯仪器有限公司）；紫外分光光度计（型号：UV-2450）。

[0065] 1.2 试验试剂与药品

[0066] 毛蕊异黄酮对照品：上海同田生物技术有限公司；纯度≥ 98%；芒柄花素对照品：上海同田生物技术有限公司；纯度≥ 98%；黄芪甲苷对照品：中国药品生物制品鉴定所；纯度≥ 95%；乙腈：美国 Tedia 公司生产，色谱纯。

[0067] 1.3 实验动物

[0068] SD 大鼠，体重 200+20g，中南大学湘雅医院实验动物中心提供。

[0069] 2 试验方法

[0070] 2.1 供试品溶液制备

[0071] 黄芪提取物的制备同实施例 1 中的 2.1.1.1，用尽可能少的水溶解制得的浸膏，得供试品溶液（含生药约 2.8g·ml^{-1}），作为待灌胃的样品溶液。

[0072] 2.2 血浆样品的采集

[0073] 取大鼠 9 只，禁食，自由饮水，每只大鼠给予 2.5ml 的供试品溶液，灌胃 1h 后脱椎处死，心脏取血，每 3 只大鼠的血样合并在一起，共得三份血样。高速离心（12000r·min^{-1}）10min，分离出血浆样品。

[0074] 2.3 血样中黄酮类成分的测定

[0075] 黄酮类成分血的测定采用高效液相色谱法进行测定。

[0076] 色谱条件：色谱柱为 AgilentTC-C18(250×4.6mm，5μm)；柱温：30℃；流动相乙腈（A）：水（B）：0min，A:B=5:95；15min，A:B=5:95，60min，A:B=55:45；70min，A:B=90:10；75min，A:B=5:95；80min，A:B=5:95；流速：1.0ml·min^{-1}；UV 检测波长：203nm；进样量：20μl。

[0077] 样品处理方法：1.0ml 血浆样品中加入 4ml 乙酸乙酯，涡旋混合 2min 后，2500r·min^{-1} 离心 5min，吸取上层溶液，在下层溶液中再加入 4ml 乙酸乙酯，同样方法处理，合并两次萃取液，于 60℃下氮气吹干，残渣溶解于 50μ160% 甲醇的复溶液中，进样量 20μl。

[0078] 3 试验结果

[0079] 黄芪提取物中的 8 个黄酮类成份均在大鼠灌胃给药后的血浆中出现（见图 2）。

[0080] 实施例 3：黄芪入尿成分研究

[0081] 1 试验材料

[0082] 1.1 试验仪器

[0083] Agilent 1200-紫外检测器;Agilent TC-C_{18}(250×4.6mm,5μm);JA2003H 型千分之一天平(上海精密科学仪器有限公司);CP225D 型十万分之一电子天平(Sartorious);TD24-WS 低速台式离心机(湘仪离心机有限公司);KL-RO-10 型艾柯超纯水机(台湾艾柯);WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);MTN-2800D 氮气吹干仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);3700M071 型代谢笼(Tecniplast 公司);紫外分光光度计(型号:UV-2450)。

[0084] 1.2 试验试剂与药品

[0085] 毛蕊异黄酮对照品:上海同田生物技术有限公司;纯度≥98%;芒柄花素对照品:上海同田生物技术有限公司;纯度≥98%;黄芪甲苷对照品:中国药品生物制品鉴定所;纯度≥95%;乙腈:美国 Tedia 公司生产,色谱纯。

[0086] 1.3 实验动物

[0087] SD 大鼠,体重 200+20g,中南大学湘雅医院实验动物中心提供。

[0088] 2 试验方法

[0089] 2.1 供试品溶液制备

[0090] 黄芪提取物的制备实施例 1 中的 2.1.1.1,用尽可能少的水溶解制得的浸膏,得供试品溶液(含生药约 2.8g·ml^{-1}),作为待灌胃的样品溶液。

[0091] 2.2 尿样的采集

[0092] 取大鼠 3 只,禁食,自由饮水,每只大鼠给予 2.5ml 的供试品溶液,灌胃后收集 0～24h 尿样。

[0093] 2.3 尿样中黄酮类成分的测定

[0094] 黄酮类成分血的测定采用高效液相色谱法进行测定。

[0095] 色谱条件:色谱柱为 AgilentTC-C18(250×4.6mm,5μm);柱温:30℃;流动相乙腈(A):水(B):0min,A:B=5:95;15min,A:B=5:95,60min,A:B=55:45;70min,A:B=90:10;75min,A:B=5:95;80min,A:B=5:95;流速:1.0ml·min^{-1};UV 检测波长:203nm;进样量:20μl。

[0096] 样品处理方法:1.0ml 尿样中加入 4ml 乙酸乙酯,涡旋震荡 2min 后,2500r·min^{-1} 离心 5min,吸取上层溶液,在下层溶液中再加入 4ml 乙酸乙酯,同样方法处理,合并两次萃取液,于 60℃下氮气吹干,残渣溶解于 50μ160% 甲醇的复溶液中,进样量 20μl。另取大鼠空白尿样,处理方法同上。

[0097] 3 试验结果

[0098] 黄芪提取物中的 4 个黄酮类成份在大鼠灌胃给药后的尿样中出现(见图 3)。

[0099] 实施例 4:本发明黄芪提取物的制备

[0100] 根据实施例 1 和 2 的结果以毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪甲苷为指标成分优化黄芪的提取工艺和纯化工艺。得到的最佳工艺如下:

[0101] 取黄芪的干燥根,粉碎,依次用 12,9 倍量 80% 的乙醇各回流提取 1 次,每次 1h。合并两次黄芪醇提液,回收乙醇并浓缩至适量(含 0.6g 生药·ml^{-1}),取黄芪提取液(0.6g 生药·ml^{-1})以 1ml·min^{-1} 速度通过 10gD-101 大孔树脂,上样量不超过 3.6g 生药·ml^{-1} 树脂,然后依次用 5 倍柱体积纯水,5 倍柱体积 20% 乙醇,6 倍柱体积 80% 乙醇洗脱,收集 80% 乙醇洗脱部分,洗脱液减压回收溶剂,60℃干燥,粉碎,即得。

[0102] 黄芪提取工艺优化

[0103] 药材对提取溶剂的吸收

[0104] 称取 30g 黄芪药材，粉碎后，逐步加入含水乙醇回流，所用溶剂量为 300ml 时，药材润透，滤出提取溶剂，测得体积约为 210ml，由此可知，药材与吸收的溶剂体积比为 1 :3。提取溶剂的选择

[0105] 水提、20% 乙醇、40% 乙醇、60% 乙醇、80% 乙醇、100% 乙醇提取液经测定，20%、40%、60%、80% 乙醇提效果均比原先水提工艺得到的目标成分成分含量高，其中 80% 乙醇提效果最佳，40%、60% 乙醇提效果也较好。

[0106] 确定回流次数

[0107] 将黄芪药材回流提取 3 次，第一次加入 12 倍量 80% 乙醇，后两次均加入 9 倍量 80% 乙醇，每次提取 1h，测定黄芪总皂苷的提取率，三次结果分别为 2.78%，0.64%，0.06%，第 3 次提取率仅占总提取率的 1.72% ；测定毛蕊异黄酮的提取率，第 1 次提取率为 0.014%，第 2，3 次提取率很低，可以忽略不计 ；测定芒柄花素的提取率，第 1 次提取率为 0.006%，第 2，3 次提取率很低，可以忽略不计。因此，提取 2 次已经可以较充分提取出黄芪的目标成分。

[0108] 黄芪纯化工艺优化研究

[0109] 大孔树脂的筛选

[0110] 大孔吸附树脂技术在黄酮类、皂苷类化学成分分离纯化方面的应用比较成熟，常用于黄酮、皂苷的型号主要是 D101，AB-8。同时 AB-8 大孔树脂有较好的除杂能力（除蛋白、鞣质、多糖等），因此拟通过静态吸附试验，筛选 D101、AB-8、DM-130 型号的树脂中的一种，作为分离纯化黄芪黄酮和皂苷类成分效果较好的树脂。

[0111] 准确量取已经处理好的各种类型的大孔树脂各取已处理好的 D-101，AB-8 和 DM-130 大孔树脂各 2g，分别加入黄芪提取液溶液（含生药 0.5g •ml^{-1}）10ml，每 5min 振摇一次，2h 后分别取树脂吸附后的溶液，测定毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷的含量，计算树脂对其吸附率。

[0112] 将静态吸附的树脂抽干，加 10ml80% 乙醇解吸，每 5min 振摇一次，2h 后分别取解吸液，测定毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷的含量，计算树脂对其解吸率。

[0113] 考察黄芪提取液浓度对吸附的影响

[0114] 准确量取已经处理好的 D-101 大孔树脂各 10g，装柱，另取 10ml 含生药 1g •ml^{-1} 的黄芪样品液，稀释至合适的浓度（含生药 0.2g • ml^{-1}，0.4g • ml^{-1}，0.6g • ml^{-1}，0.8g • ml^{-1}），上样，将已吸附好的树脂先用纯水洗至流出液无色，用 90% 的乙醇洗脱，分别收集解吸液，定容至 60ml。测定吸附前溶液和解吸液中毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷的含量，计算其洗脱百分比。洗脱百分比 = 解吸液中有效成分的量 / 上样液中有效成分的量 ×100%。

[0115] 考察黄芪提取液上样流速对吸附的影响

[0116] 准确量取已经处理好的 D-101 大孔树脂各 10g，装柱，另取 10ml 含生药 0.6g •ml^{-1} 的黄芪提取液，以不同的流速通入树脂柱，将已吸附好的树脂先用纯水洗至流出液无色，然后用 90% 的乙醇洗脱，分别收集解吸液，定容至 60ml。测定吸附前溶液和解吸液中黄芪总皂苷，毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量，计算其洗脱百分比。洗脱百分比 = 解吸液中有效成分的量 / 上样液中有效成分的量 ×100%。

[0117] 考察最大上样量

[0118] 准确量取已处理好的 D-101 大孔树脂 10g，湿法装柱，量取黄芪上样液（含生药

0.6g•ml^{-1}),上柱,调节流出液的流速约为 1.0ml•min^{-1},收集流出液,每 10ml 收集一份。测定每份流出液中毛蕊异黄酮,芒柄花素和黄芪总皂苷的含量。

[0119] 洗脱液浓度对洗脱的影响

[0120] 将已经吸附好的树脂先用纯水洗至流出液无色后,依次以 4 倍柱体积的 20%,40%,60%,80%,95% 乙醇分次洗脱树脂柱,收集各浓度梯度的洗脱流出液,测定流出液中毛蕊异黄酮,芒柄花素和黄芪总皂苷的含量。

[0121] 洗脱液用量考察

[0122] 将已经吸附好的树脂先用纯水洗至流出液无色后,用 20% 的乙醇洗脱 5 倍柱体积,弃去,然后依次以整数倍的柱体积洗脱液 80% 乙醇分次洗脱树脂柱,收集各段洗脱液,测定洗脱液中黄芪总皂苷,毛蕊异黄酮,芒柄花素的含量。

[0123] 试验结果

[0124] D101 树脂对毛蕊异黄酮的吸附解吸效果较佳,不同型号大孔树脂对毛蕊异黄酮的吸附解吸比较见表 1。

[0125] 表 1 不同型号大孔树脂对毛蕊异黄酮的吸附解吸比较

[0126]

树脂型号	吸附量(μg·g^{-1})	吸附率(%)	解吸量(μg·g^{-1})	解吸率(%)
D-101	93.3	75.8	85.4	90.6
AB-8	74.7	60.1	64.7	86.5
DM-130	63.4	50.9	54.2	85.5

[0127] D101 树脂对芒柄花素的吸附解吸效果较佳,不同型号大孔树脂对毛蕊异黄酮的吸附解吸比较见表 2。

[0128] 表 2 不同型号大孔树脂对芒柄花素的吸附解吸比较

[0129]

树脂型号	吸附量(μg·g^{-1})	吸附率(%)	解吸量(μg·g^{-1})	解吸率(%)
D-101	31.5	76.8	28.5	90.4
AB-8	26.7	64.9	21.6	80.5
DM-130	22.7	55.1	15.6	68.7

[0130] D101 树脂对黄芪总皂苷的吸附解吸效果较佳,不同型号大孔树脂对毛蕊异黄酮的吸附解吸比较见表 3。

[0131] 表 3 不同型号大孔树脂对黄芪总皂苷的吸附解吸比较

[0132]

树脂型号	吸附量(mg·g^{-1})	吸附率(%)	解吸量(mg·g^{-1})	解吸率(%)
D-101	18.1	73.9	17.7	97.8
AB-8	18.0	73.4	16.1	89.4
DM-130	15.5	63.1	13.1	84.5

[0133] 样品液浓度对吸附的影响

[0134] 在所选浓度范围内,随着浓度的增大,洗脱百分比也随着缓慢增加,但当上样液浓

度大于0.6g生药•ml^{-1}时，洗脱百分比有所下降。故在所选浓度范围内，上样液浓度以0.6g生药•ml^{-1}左右为宜，结果见表4。

[0135] 表4样品液浓度对D-101树脂吸附的影响

[0136]

吸附液浓度（g生药·ml^{-1}）	毛蕊异黄酮洗脱百分比（%）	芒柄花素洗脱百分比（%）	黄芪总皂苷洗脱百分比（%）
0.2	61.5	72.2	62.3
0.4	66.8	82.4	66.1
0.6	91.1	94.6	74.6
0.8	87.8	91.4	68.0

[0137] 样品液流速对吸附的影响

[0138] 在较低流速时，树脂具有较大的吸附量，随着流速的增加，树脂的吸附量呈降低趋势，考虑到缩短时间，选择流速为1.0ml•min^{-1}，结果见结果见表5。

[0139] 表5样品液流速对D-101树脂吸附的影响

[0140]

流速（ml·min^{-1}）	毛蕊异黄酮洗脱百分比（%）	芒柄花素洗脱百分比（%）	黄芪总皂苷洗脱百分比（%）
0.5	94.2	93.9	76.9
0.8	85.7	87.8	72.3
1.0	81.6	69.0	66.4
1.2	64.4	61.1	59.7
1.5	58.5	52.6	53.3

[0141] 在上样体积超过6倍柱体积时，其泄露量开始显著增大，树脂在此时对提取液的吸附效率下降，因此，确定最大上样量为3.6g生药•ml^{-1}树脂，结果见结果见表6。

[0142] 表6黄芪提取液在D-101大孔树脂上的吸附

[0143]

生药量（$g \cdot ml^{-1}$）	毛蕊异黄酮浓度（$\mu g \cdot ml^{-1}$）	芒柄花素浓度（$\mu g \cdot ml^{-1}$）	黄芪总皂苷浓度（$mg \cdot ml^{-1}$）
0.6	0.932	1.165	7.314
1.2	1.401	1.273	8.196
1.8	1.973	1.897	9.321
2.4	1.645	1.531	9.013
3.0	1.861	1.637	10.112
3.6	3.962	3.054	18.256
4.2	4.018	3.611	18.374
4.8	5.190	3.723	19.731
5.4	5.488	3.857	19.847
6.0	5.955	3.752	20.113

[0144] 2.3.7 洗脱液浓度对洗脱的影响

[0145] 随着乙醇体积分数的增大，洗脱液中有效成分的含量逐渐增加，当乙醇浓度为 80% 时，洗脱液中的有效成分含量已经较大程度地降低，可以认为树脂上的皂苷已经基本洗脱完全结果见表 7。

[0146] 表 7D-101 树脂洗脱剂浓度考察

[0147]

乙醇浓度（%）	毛蕊异黄酮浓度（$\mu g \cdot ml^{-1}$）	芒柄花素浓度（$\mu g \cdot ml^{-1}$）	黄芪总皂苷（$mg \cdot ml^{-1}$）
20	3.289	0.738	0.056
40	83.561	26.902	1.235
60	20.036	13.983	1.057
80	1.734	5.487	0.986
95	-	3.140	0.013

[0148] 洗脱液浓度对洗脱的影响

[0149] 洗脱剂用量为 60ml 时，即 6 倍柱体积时，已基本将有效成分洗脱完毕，故选择洗脱剂的用量为 6 倍柱体积，结果见表 8。

[0150] 表 8 洗脱剂用量考察

[0151]

乙醇用量（ml）	毛蕊异黄酮浓度（$\mu g \cdot ml^{-1}$）	芒柄花素浓度（$\mu g \cdot ml^{-1}$）	黄芪总皂苷浓度（$mg \cdot ml^{-1}$）
10	34.933	13.593	1.109
20	64.955	30.219	3.375
30	22.949	10.375	1.171
40	8.792	4.286	0.510
50	3.250	1.917	0.120
60	2.199	1.475	0.016
70	1.118	0.930	0.012
80	0.844	0.809	0.009
90	0.591	0.667	0.007
100	-	0.532	-

[0152] 实施例 5：

[0153] 采用性状、鉴别、水分、炽灼残渣、重金属检查、含量测定等为指标。

[0154] 1 试验材料

[0155] 1.1 试验仪器

[0156] Agilent 1200- 紫外检测器；Agilent TC-C_{18}(250×4.6mm，5μm)；JA2003H 型千分之一天平(上海精密科学仪器有限公司)；CP225D 型十万分之一电子天平(Sartorious)；TD24-WS 低速台式离心机(湘仪离心机有限公司)；KL-RO-10 型艾柯超纯水机(台湾艾柯)；WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)；MTN-2800D 氮气吹干仪（天津奥特赛恩斯仪器有限公司)；DDB-320 型电子蠕动泵（上海之信仪器有限公司）；紫外分光光度计(型号：UV-2450)。

[0157] 1.2 试验试剂与药品

[0158] 毛蕊异黄酮对照品：上海同田生物技术有限公司；纯度≥ 98%；芒柄花素对照品：上海同田生物技术有限公司；纯度≥ 98%；黄芪甲苷对照品：中国药品生物制品鉴定所；纯度≥ 95%；乙腈：美国 Tedia 公司生产，色谱纯。

[0159] 2 试验方法

[0160] 2.1 鉴别

[0161] 2.1.1 薄层鉴别

[0162] 2.1.1.1 黄芪甲苷的薄层鉴别

[0163] 取黄芪提取物粉末 1g，加水 20ml 使其溶解，用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次，每次 20ml，合并正丁醇液；用水洗涤 2 次，每次 20ml，弃去水液，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇 0.5ml 使溶解，作为供试品溶液。另取黄芪甲苷对照品，加甲醇制成每 1ml 含 1mg 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法试验，吸取上述两种溶液，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷 - 甲醇 - 水(17:3:2)的下层溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10% 硫酸乙醇溶液，在 105℃加热至斑点显色清晰。

[0164] 2.1.1.2 芒柄花素的薄层鉴别

[0165] 取黄芪提取物粉末 0.2g，加甲醇 2ml 使溶解，作为供试品溶液。另取芒柄花素对照品，加甲醇制成每 1ml 含 1mg 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法试验，吸取上述两种溶液，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷 - 甲醇（30 :1）为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外灯（254nm）下检视。

[0166] 2.1.1.3HPLC 鉴别

[0167] 取黄芪提取物约 20mg，精密称定，置 10ml 容量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，得供试品溶液，过 0.45μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，进样分析。色谱条件为色谱柱：色谱柱 :AgilentTC-C18(250×4.6mm，5μm) ；柱温 :30℃ ；流动相乙腈（A）：水（B）:0min，A:B=5:95 ;10min，A:B=20:80，55min，A:B=55:45 ;60min，A:B=90:10 ;65min，A:B=5:95 ；70min，A:B=5:95 ;流速 :1.0ml·min^{-1} ;UV 检测波长 :203nm ;进样量 :20μl。

[0168] 2.2 水分检查

[0169] 根据《中国药典》2005 版一部附录 IXH 的第一法项下的规定，取黄芪提取物粉末约 2g，平铺于干燥至恒重的扁形称量瓶中，厚度不超过 5mm，精密称定，打开瓶盖在 100~105℃干燥 5h，将瓶盖盖好，移置干燥器中，冷却 30min，精密称定，再在上述温度干燥 1h，冷却，称重，至连续两次称重的差异不超过 5mg 为止。根据减失的重量，计算供试品中含水量（%）。

[0170] 2.3 炽灼残渣

[0171] 取黄芪提取物粉末约 1g，置已炽灼至恒重的坩埚中，精密称定，缓缓炽灼至完全炭化，放冷至室温 ;加硫酸 0.5ml 使湿润，低温加热至硫酸蒸气除尽后，在 500~600℃炽灼使完全灰化，移置干燥器内，放冷至室温，精密称定后，再在 700~800℃炽灼至恒重。

[0172] 2.4 重金属检查

[0173] 取黄芪提取物 1.0g，根据《中国药典》2005 版一部附录 IXE 重金属检查法第二法炽灼破坏，检查 3 批样品，并同时做空白试验，标准管含铅 0.01‰。

[0174] 2.5 含量测定

[0175] 2.5.1 毛蕊异黄酮、芒柄花素的含量测定

[0176] 2.5.1.1 色谱条件

[0177] 色谱柱 :AgilentTC-C18(250×4.6mm，5μm) ；柱温 :30℃ ；流动相乙腈（A）：水（B）:0min，A:B=5:95 ;10min，A:B=20:80，55min，A:B=55:45 ;60min，A:B=90:10 ;65min，A:B=5:95 ;70min，A:B=5:95 ;流速 :1.0ml·min^{-1} ;UV 检测波长 :203nm ;进样量 :20μl。

[0178] 2.5.1.2 溶液配制

[0179] 毛蕊异黄酮对照品溶液的配制 :精密称取毛蕊异黄酮对照品 10.05mg 于 5ml 称量烧杯内，用少量甲醇溶解后转移至 25ml 容量瓶内，用甲醇洗涤烧杯 5 次，充分转移至容量瓶内，待全部溶解后，用甲醇定容至刻度线，得到毛蕊异黄酮的储备液，浓度约为 400μg·ml^{-1}。

[0180] 芒柄花素对照品溶液的配制 :精密称取芒柄花素对照品约 10.03mg 于 5ml 称量烧杯内，配置操作同上，得到芒柄花素的储备液，浓度约为 400μg·ml^{-1}。

[0181] 供试品溶液的制备 :取黄芪提取物约 20mg，精密称定，置 10ml 容量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

[0182] 2.5.1.3 线性范围

[0183] 用移液管精密吸取毛蕊异黄酮和芒柄花色储备液一定量，甲醇逐一稀释配制浓度分别为 3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 μg·ml^{-1} 的一系列毛蕊异黄酮，芒柄花素标准溶液。以上溶液均置于 4° C 冰箱内贮存备用。将上述不同浓度对照品溶液注入液相色谱仪，按前述色谱条件分别测定其峰面积。以对照品浓度(X)为横坐标，峰面积积分值(Y)为纵坐标，绘制标准曲线。

[0184] 2.5.1.4 精密度试验

[0185] 取低，中，高三个浓度的毛蕊异黄酮和芒柄花素对照品溶液(12.5 μg·ml^{-1}、50 μg·ml^{-1}、100 μg·ml^{-1})，每个浓度平行制备 5 份，进样测定，求算不同浓度下的 RSD。

[0186] 2.5.1.5 稳定性试验

[0187] 取本品一份照供试品溶液的制备方法制备供试液，在 0，4h，8h，12h，24h 时进样，共 5 次，测定其峰面积积分值，计算 RSD。

[0188] 2.5.1.6 重复性试验

[0189] 按供试品溶液的制备方法，取同一批样品 5 份，制备样品溶液，进样测定，求算 RSD。

[0190] 2.5.1.7 加样回收率试验

[0191] 按供试品溶液的制备方法制得供试品溶液，在一定量的供试品溶液中分别加入适量低，中，高三个浓度的毛蕊异黄酮和芒柄花素对照品溶液(12.5 μg·ml^{-1}、50 μg·ml^{-1}、100 μg·ml^{-1})，进样分析，测定含量，计算回收率。

[0192] 2.5.2 黄芪总皂苷的含量测定

[0193] 2.5.2.1 溶液的配制

[0194] 黄芪甲苷对照品溶液的配制：精密称取黄芪甲苷对照品约 5.96mg 于 5ml 称量烧杯内，用少量甲醇溶解后转移至 10ml 容量瓶内，用甲醇洗涤烧杯 5 次，充分转移至容量瓶内，待全部溶解后，用甲醇定容至刻度线，得到黄芪甲苷的储备液，浓度约为 500 μg·ml^{-1}。

[0195] 供试品溶液的制备：取黄芪提取物约 20mg，精密称定，置 50ml 容量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

[0196] 2.5.2.2 线性范围

[0197] 精密量取 0.15，0.30，0.45，0.60，0.75ml 黄芪甲苷标准溶液，放入具塞试管中，分别加入无水乙醇至 0.75ml，再加入 0.75ml18% 的香草醛试剂，于冰浴中加入 7.5ml72% 的硫酸，混合摇匀，放入 62℃水浴中加热 20min，取出冷却后，摇匀，在波长 544nm 处测吸光度，制定标准曲线。

[0198] 2.5.2.3 精密度试验

[0199] 取低，中，高三个浓度的黄芪甲苷对照品溶液(16.667 μg·ml^{-1}、25.000 μg·ml^{-1}、33.333 μg·ml^{-1})，每个浓度平行制备 5 份，测定吸光度，求算不同浓度下的 RSD。

[0200] 2.5.2.4 稳定性试验

[0201] 取本品一份照供试品溶液的制备方法制备供试液，在 0，15min，30min，45min，60min 时进样，共 5 次，测定吸光度，计算 RSD。

[0202] 2.5.2.5 重复性试验

[0203] 按供试品溶液的制备方法，取同一批样品 5 份，制备样品溶液，测定吸光度，求算 RSD。

[0204] 2.5.2.6 加样回收率试验

[0205] 按供试品溶液的制备方法制得供试品溶液，在一定量的供试品溶液中分别加入适量（400μl 供试品溶液中加入 100μl 对照品溶液）低，中，高三个浓度的黄芪甲苷对照品溶液（16.667μg·ml^{-1}、25.000μg·ml^{-1}、33.333μg·ml^{-1}），测定吸光度，计算回收率。

[0206] 3 试验结果

[0207] 3.1 性状

[0208] 本品为浅棕黄色至棕黄色的粉末；味微甜。

[0209] 3.2 鉴别

[0210] 3.2.1 黄芪甲苷的薄层鉴别

[0211] 供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，日光下显相同的棕褐色斑点；紫外灯（365nm）下显相同的的荧光斑点。

[0212] 3.2.2 芒柄花素的薄层鉴别

[0213] 供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

[0214] 3.2.3HPLC 鉴别

[0215] 供试品溶液进样后，有 8 个特征色谱峰，如图 4。

[0216] 3.3 水分检查

[0217] 三批黄芪提取物样品平均水分含量为 2.50%，水分测定结果见表 3-1。

[0218] 表 3-1 水分测定结果

[0219]

样品编号	水分含量(%)	平均水分含量(%)
1	2.80	
2	2.50	2.50
3	2.20	

[0220] 3.4 炽灼残渣

[0221] 三批黄芪提取物样品平均炽灼残渣为 0.26%，结果见表 3-2。

[0222] 表 3-2 炽灼残渣检查结果

[0223]

样品编号	炽灼残渣(%)	平均值(%)
1	0.22	
2	0.25	0.26
3	0.30	

[0224] 3.5 重金属检查

[0225] 三批黄芪提取物样品重金属含量均符合要求，结果见表 3-3。

[0226] 表 3-3 重金属检查结果

[0227]

样品编号	重金属含量
1	<0.01‰
2	<0.01‰
3	<0.01‰

[0228] 3.6 含量测定

[0229] 3.6.1 标准曲线

[0230] 待测物峰面积(吸光度)比值(y)与待测物理论浓度(x)之间存在很好的线性相关性。毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪甲苷的标准曲线分别为 Y=108.604907X-45.330988,(r^2=0.99988)、Y=122.724295X-2.878868(r^2=0.99985) 和 Y=0.0108x+0.0203(r^2=0.9964)。毛蕊异黄酮和芒柄花素在和 3.125 ～ 200μg·ml^{-1} 范围内线性均良好,黄芪总皂苷在 8.333 ～ 41.667μg·ml^{-1} 范围内线性均良好,测定结果见表 3-4、表 3-5 和表 3-6。

[0231] 表 3-4 毛蕊异黄酮标准曲线的制备

[0232]

对照品浓度（μg·ml^{-1}）	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
峰面积	296	631	1285	2666	5334	10944	22016

[0233] 表 3-5 芒柄花素标准曲线的制备

[0234]

对照品浓度（μg·ml^{-1}）	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
峰面积	377	777	1537	3110	6089	12333	23990

[0235] 表 3-6 黄芪总皂苷标准曲线的制备

[0236]

对照品浓度（μg·ml^{-1}）	8.333	16.667	25.000	33.333	41.667
吸光度	0.119	0.187	0.289	0.386	0.469

[0237] 3.6.2 精密度

[0238] 毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷的精密度见表 3-7、表 3-8 和表 3-9。结果表明,三种待测物精密度良好,符合样品测定方法学要求。

[0239] 表 3-7 毛蕊异黄酮精密度试验

[0240]

样品浓度（μg·ml^{-1}）	12.5	50	100
峰面积	1236	5090	10525
	1272	5074	10456
	1267	5111	10491
平均值	1258	5092	10491
RSD（%）	1.55	0.36	0.33

[0241] 表 3-8 芒柄花素精密度试验

[0242]

样品浓度（μg·ml^{-1}）	12.5	50	100
峰面积	1558	6106	12632
	1530	6045	12230
	1529	6067	12249
平均值	1539	6073	12370
RSD（%）	1.07	0.51	1.83

[0243] 表 3-9 黄芪总皂苷精密度试验

[0244]

样品浓度（μg·ml^{-1}）	16.667	25.000	33.333
吸光度	0.189	0.286	0.387
	0.185	0.285	0.384
	0.184	0.288	0.385
平均值	0.186	6073	12370
RSD（%）	1.61	0.67	0.52

[0245] 3.6.3 稳定性

[0246] 稳定性试验结果见表 3-10、表 3-11。结果表明，三种待测物稳定性良好，符合样品测定方法学要求。

[0247] 表 3-10 供试品稳定性试验（毛蕊异黄酮、芒柄花素）

[0248]

进样时间（h）	0	4	8	12	24	平均值	RSD(%)
毛蕊异黄酮峰面积	1456	1370	1344	1382	1390	1388	2.68
芒柄花素峰面积	901	926	880	872	877	891	2.51

[0249] 表 3-11 供试品稳定性试验（黄芪总皂苷）

[0250]

进样时（min）	0	15	30	45	60	平均值	RSD(%)
吸光度	0.145	0.147	0.149	0.146	0.142	0.146	1.78

[0251] 3.6.4 重复性

[0252] 重复性试验结果见表 3-12、表 3-13 和表 3-14。结果表明，三种待测物重复性良好，符合样品测定方法学要求。

[0253] 表 3-12 毛蕊异黄酮重复性试验

[0254]

样品号	称样量（mg）	峰面积	平均值	RSD（%）
1	20.13	1358		
2	20.16	1373		
3	19.78	1371	1370	0.58
4	19.89	1370		
5	20.06	1380		

[0255] 表 3-13 芒柄花素重复性试验

[0256]

样品号	称样量（mg）	峰面积	平均值	RSD（%）
1	20.13	878		
2	20.16	882		
3	19.78	905	884	1.35
4	19.89	878		
5	20.06	877		

[0257] 表 3-14 黄芪总皂苷重复性试验

[0258]

样品号	称样量（mg）	吸光度	平均值	RSD（%）
1	20.13	0.143		
2	20.16	0.144		
3	19.78	0.140	0.144	1.80
4	19.89	0.147		
5	20.06	0.145		

[0259] 3.6.5 加样回收率

[0260] 考察待测物毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷的加样回收率，结果见表 3-15、表 3-16 和表 3-17。

[0261] 表 3-15 毛蕊异黄酮加样回收率试验

[0262]

含毛蕊异黄酮量(μg)	加入对照品量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
6.482	1.250	7.615	90.64		
6.482	1.250	7.634	92.16	92.03	1.44
6.482	1.250	7.648	93.28		
6.482	5.000	10.813	86.62		
6.482	5.000	10.838	87.12	86.93	0.31
6.482	5.000	10.834	87.04		
6.482	10.000	15.196	87.14		
6.482	10.000	15.438	89.56	88.52	1.41
6.482	10.000	15.367	88.85		

[0263] 表 3-16 芒柄花素加样回收率试验

[0264]

含芒柄花素量(μg)	加入对照品量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
3.561	1.250	4.764	96.24		
3.561	1.250	4.791	98.40	97.31	1.11
3.561	1.250	4.777	97.28		
3.561	5.000	8.045	89.68		
3.561	5.000	8.120	91.18	89.96	1.23
3.561	5.000	8.012	89.02		
3.561	10.000	12.508	89.47		
3.561	10.000	12.473	89.12	89.75	0.91
3.561	10.000	12.628	90.67		

[0265] 表 3-17 黄芪总皂苷加样回收率试验

[0266]

含黄芪总皂苷量(μg)	加入对照品量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
54.400	20.000	72.397	90.00		
54.400	20.000	72.454	90.27	90.63	0.96
54.400	20.000	72.725	91.63		
54.400	30.000	81.069	88.90		
54.400	30.000	81.989	91.96	90.48	1.69
54.400	30.000	81.571	90.57		
54.400	40.000	92.898	96.25		
54.400	40.000	92.913	96.28	96.01	0.46
54.400	40.000	92.599	95.50		

[0267] 3.6.6 不同批次黄芪中毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷的含量测定

[0268] 按正文规定方法制备各供试品溶液，按上述色谱条件测定，计算含量，结果见表 3-18。

[0269] 表 3-18 不同批次黄芪毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪总皂苷的含量测定结果

[0270]

	样品编号		
	1	2	3
毛蕊异黄酮含量(%)	0.67	0.66	0.73
平均含量(%)		0.69	
RSD(%)		5.49	
芒柄花素含量(%)	0.36	0.39	0.42
平均含量(%)		0.39	
RSD(%)		7.69	
黄芪总皂苷含量(%)	35.2	34.6	36.9
平均含量(%)		35.6	
RSD(%)		3.35	

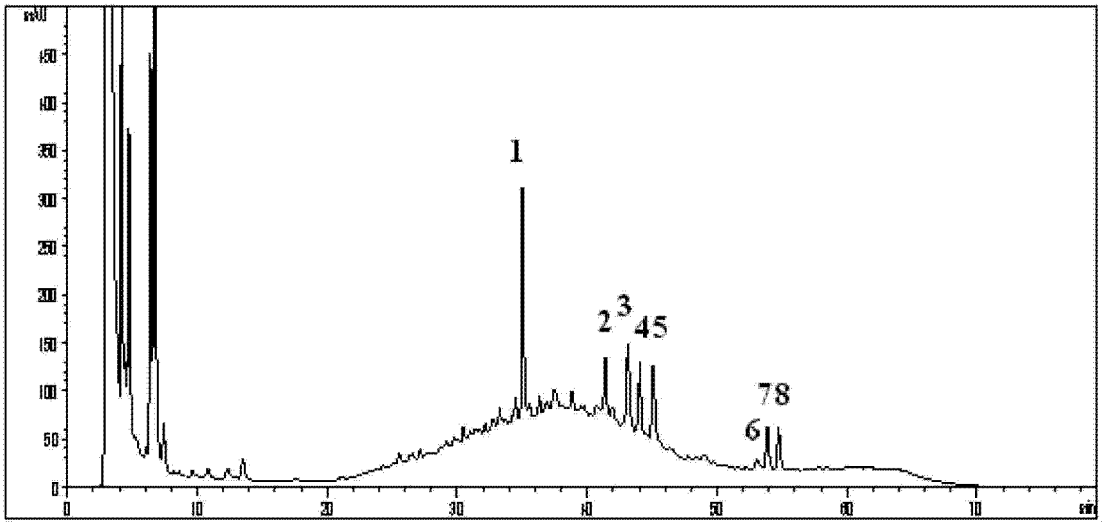
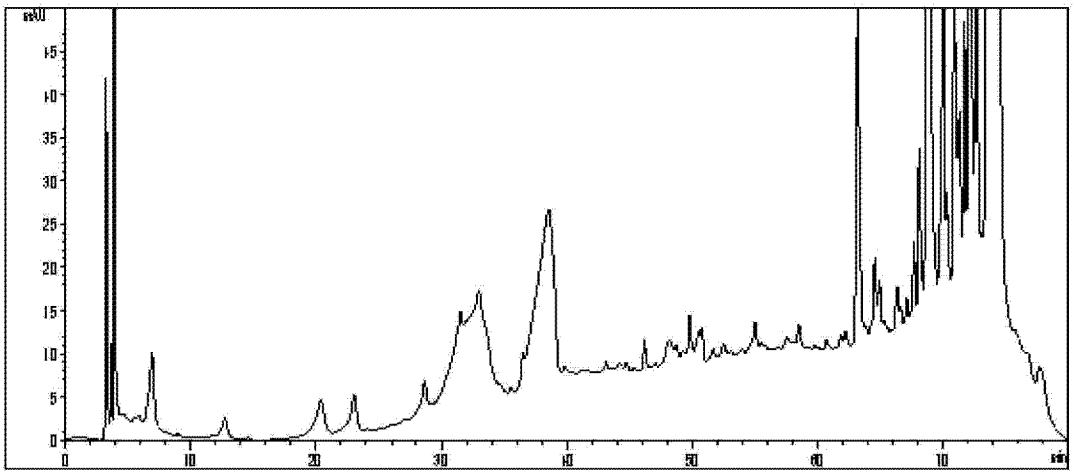
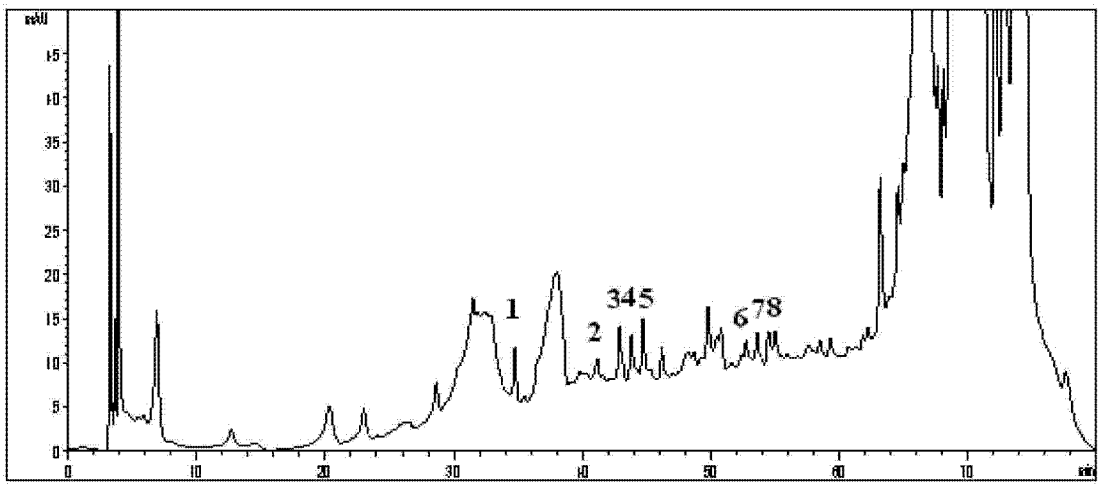


图 1

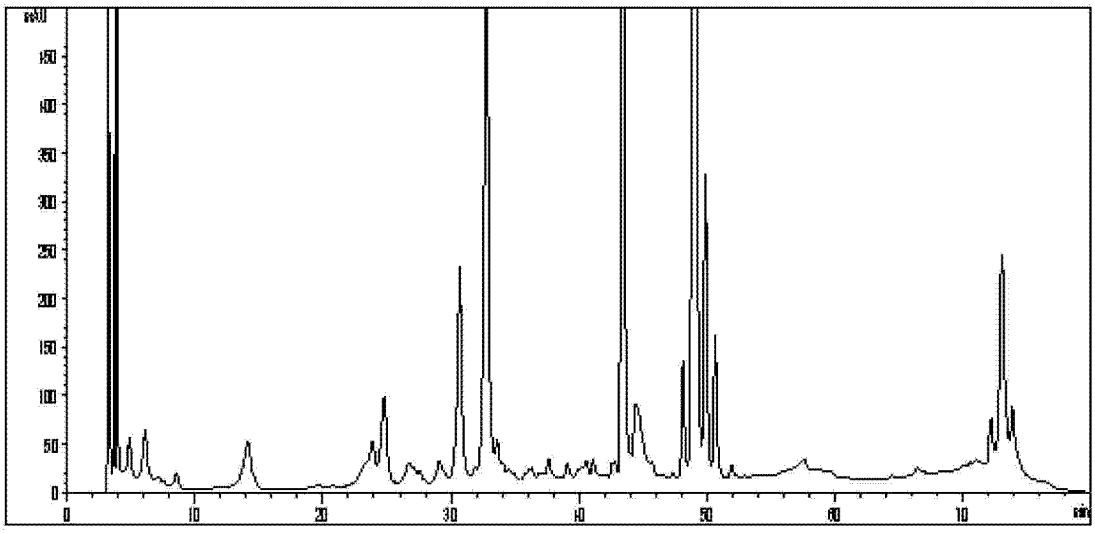


(a)

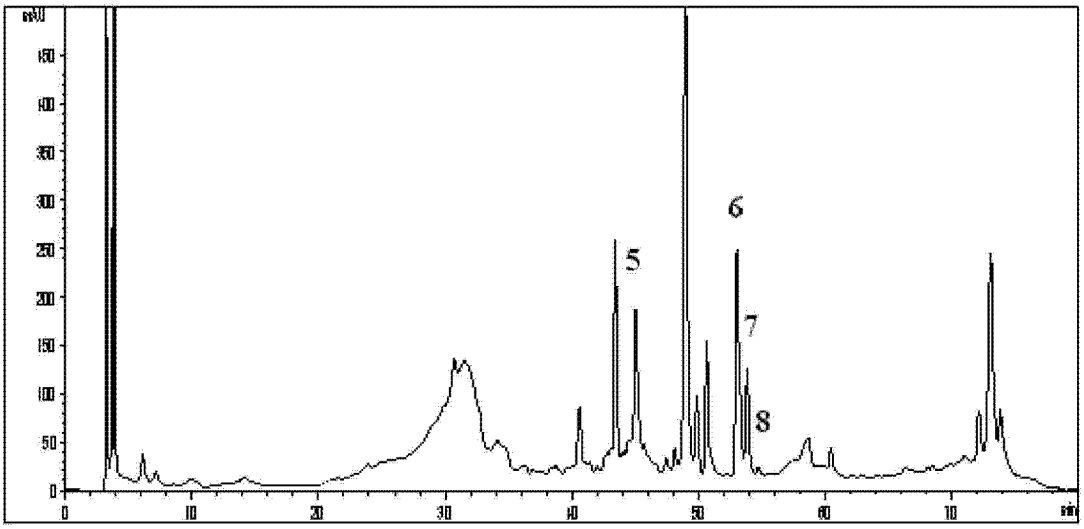


(b)

图 2


mAU
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50
60
70
min

(a)


mAU
150
100
50
0
5
6
7
8
0
10
20
30
40
50
60
70
min

(b)

图 3

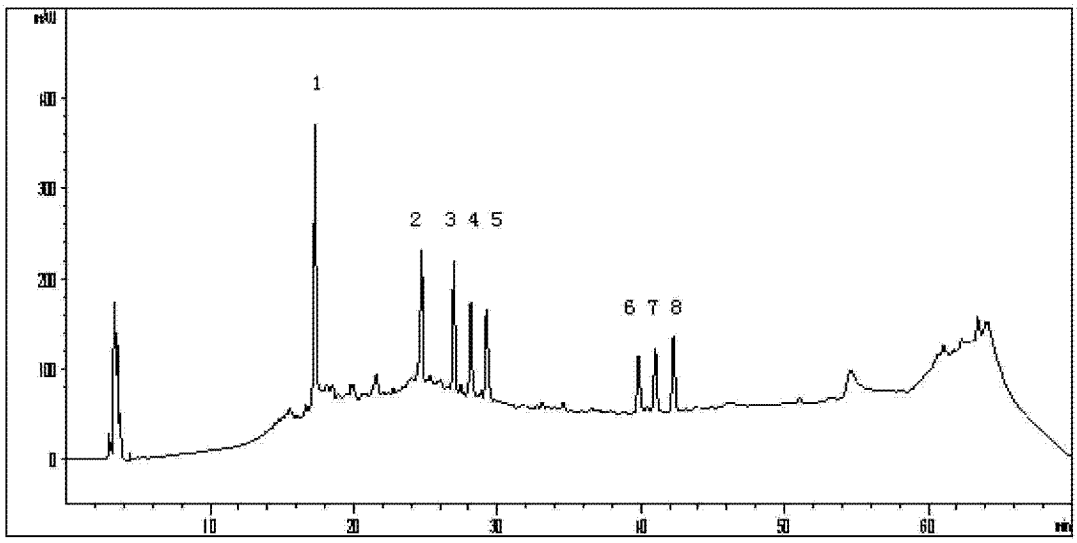


图 4