

正交设计优选益气化湿方中葛根素的水提工艺

王晓玉 (合肥工业大学生物与食品工程学院中草药与功能食品研究所, 安徽合肥 230009)

摘要 [目的] 优选益气化湿方中葛根素的水提工艺。[方法] 采用正交试验法, 以料液比、提取时间和提取次数为考察因素, 以干浸膏得率及方中葛根的主要活性成分葛根素的含量作为评价指标, 优选益气化湿方的最佳水提工艺。[结果] 以葛根素为指标所优选出的益气化湿方的最佳水提工艺为 $A_3B_2C_2$, 即料液比为 1:12 (W/V, g/ml, 下同), 提取时间为 1.5 h, 提取次数为 2 次。[方法] 该工艺提取的有效成分葛根素含量及干浸膏得率均较高, 稳定可行、易操作。

关键词 益气化湿方; 葛根素; 正交试验; 水提工艺

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)18-07770-03

Water Extraction Technology of Puerarin in Yiqi Huashi Formula by Orthogonal Design

WANG Xiao-yu (Institute of TCM and Functional Foods, School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract [Objective] To optimize the water extraction technique for puerarin in Yiqi Huashi formula. [Method] By using orthogonal test, with solid-liquid ratio, extraction time and extraction times as investigation factors, dry extract yield and puerarin content as evaluation indicators, the optimum water extraction technique was obtained. [Result] The results showed the optimum extraction technology was $A_3B_2C_2$, namely solid-liquid ratio 1:12 (W/V, g/ml, the same as follows), extraction time 1.5 h, extraction times 2. [Conclusion] The optimized water extraction technology was stable, feasible and with high yield of dry extract.

Key words Yiqi Huashi formula; Puerarin; Orthogonal test; Water extraction technology

益气化湿方是治疗糖尿病的临床经验方, 由葛根 (RADIX PUERARIAE)、丹参 (RADIX ET RHIZOMA SALVIAE MILTIORRHIZAE)、半夏 (RHIZOMA PINELLIAE) 和薏苡仁 (SEMEN COICIS) 等药组成, 在临床上取得了良好的疗效。试验以 TLCS 测定药效成分葛根素含量为指标, 采用正交试验设计, 对益气化湿方的水提工艺进行考察, 优选益气化湿方中葛根素的水提工艺, 以期对益气化湿方的下一步新药开发提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。 益气化湿方处方药材, 购自安徽省中医院中药房。

1.1.2 主要仪器。 CAMAG TCL SCANNER 3 型扫描仪、CAMAG NANOMAT4 型点样仪和定样毛细管, 均购自瑞士 CAMAG 公司; BP211D 十万分之一电子天平, 购自德国塞多利斯公司; HH-S 型水浴锅, 购自巩义市英峪予华仪器厂; 薄层硅胶 G 板, 购自青岛海洋化工厂分厂; 调温电热器, 购自上海浦东新区电理仪器厂。

1.1.3 主要试剂。 葛根素对照品, 购自中国药品生物制品检定所, 批号: 110752-200912; 其他试剂均为分析纯, 市售。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备。 精密称取干燥至恒重的葛根素对照品 0.61 mg, 加无水甲醇溶解, 并定容至 1.0 ml, 即得葛根素对照品溶液 (0.61 mg/ml)。

1.2.2 供试品溶液的制备^[2]。分别精密量取 1~9 号提取液 20 ml 至 1~9 号蒸发皿中, 水浴蒸干, 加 40 ml 无水甲醇, 精密称重, 超声处理 30 min, 放冷, 再精密称重, 加适量无水

甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 20 ml, 蒸干, 加无水甲醇溶解, 定容至 1.0 ml 容量瓶中, 即得供试品溶液。

1.2.3 色谱条件。 吸附剂为硅胶 G 板, 展开剂为三氯甲烷-甲醇-水 (14:5:0.5, V/V/V); 预饱和 30 min。

1.2.4 检测波长的选择。 将对照品溶液和供试品溶液在“1.2.3”色谱条件下, 于 200~700 nm 波长扫描, 选择最佳测定波长。

1.2.5 方法学考察。 (1) 线性关系的考察。分别精密吸取葛根素对照品液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 μ l, 点于同一硅胶 G 板, 各 3 个点, 以三氯甲烷-甲醇-水 (14:5:0.5, V/V/V) 为展开剂, 预饱和 30 min, 展开, 取出, 晾干, 通过薄层扫描仪扫描得峰面积, 以葛根素浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标作图, 计算回归方程。 (2) 精密度试验。精密吸取葛根素对照品溶液 1.0 μ l, 点于同一硅胶 G 板 ($n=6$), 按“1.2.3”项下色谱条件, 展开, 取出, 晾干, 扫描测定峰面积, 计算 RSD。 (3) 稳定性试验。精密吸取 5 号供试品溶液, 点在同一硅胶 G 板 ($n=3$), 按“1.2.3”项下色谱条件, 展开, 取出, 晾干, 扫描得峰面积, 并在室温下放置, 每隔 1 h 测 1 次, 共 7 次, 计算 RSD。 (4) 重现性试验。精密量取 5 号煎煮液 6 份, 按“1.2.2”方法制成供试品溶液, 按“1.2.3”项下色谱条件, 展开, 取出, 晾干, 扫描得峰面积, 计算 RSD。 (5) 加样回收率试验。精密量取已知 5 号煎煮液 6 份, 分别精密加入相当于已知对照品量 100% 的葛根素对照品溶液, 按“1.2.3”方法制成供试品溶液, 按“1.2.3”项下色谱条件展开, 取出, 晾干, 扫描得峰面积, 计算葛根素的平均回收率和 RSD。

1.2.6 正交试验设计^[1]。在已有的提取工艺基础上, 选择料液比、提取时间和提取次数 3 个因素进行考察, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 设计正交试验因素水平, 按处方称取药材, 共 9 份, 按因素水平表 (表 1) 方案提取, 以干浸膏得率、葛根素含量为评价指标, 优选最佳提取条件。

作者简介 王晓玉 (1979-), 女, 安徽淮北人, 主管药师, 博士研究生, 从事食品生物技术, E-mail: kane.wang@sohu.com。

收稿日期 2013-06-06

表 1 正交因素水平设计

水平	因素			
	料液比 A//g/ml	提取时间 B//h	提取次数 C	空白 D
1	8	1.0	1	-
2	10	1.5	2	-
3	12	2.0	3	-

1.2.7 干浸膏得率的测定。称取处方药材适量,置 2 000 ml 圆底烧瓶中,按表 1 设计选择不同的提取次数、料液比和提取时间进行煎煮,煎煮液静至过夜,吸取上清液浓缩定容至 100 ml,共得到 1~9 号提取液,标注为提取液 1~9 号;分别量取 1~9 号提取液 20 ml 至已精密称定的干燥至恒重的 1~9 号蒸发皿中,水浴蒸干,在干燥器中加热至恒重,称重,计算干浸膏得率。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择 图 1 表明,葛根素在 275 nm 处有最大吸收,且在 400 nm 处有最小吸收,故选用 $\lambda_s = 275$ nm, $\lambda_R = 400$ nm。

2.2 方法学考察 (1)线性关系的考察。计算得线性回归方程为 $Y = 4\,367.437 + 7\,688.623X$, $R = 0.998\,2$,表明葛根素

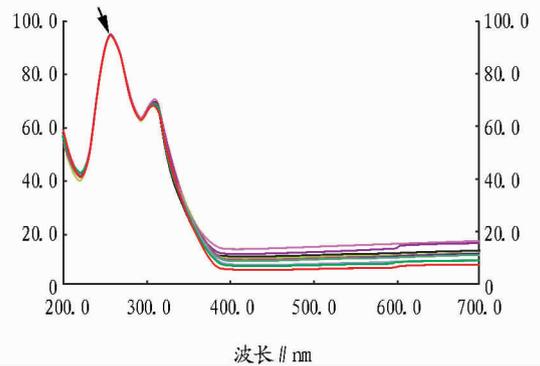


图 1 波长扫描图谱

在 0.305 ~ 1.830 μg 范围内与峰面积具有良好的线性关系(图 2~3)。(2)精密度试验。计算得峰面积的 RSD 为 2.169%,表明仪器的精密度良好。(3)稳定性试验。计算得峰面积的 RSD 为 1.64%,表明葛根素斑点至少在 6 h 内稳定。(4)重现性试验。计算得峰面积的 RSD 为 1.772% ($n = 6$),表明重现性良好。(5)加样回收率试验。计算得葛根素的平均回收率为 98.68%, RSD 为 1.978%,表明该方法准确可靠,可用于益气化湿方中葛根素的含量测定。

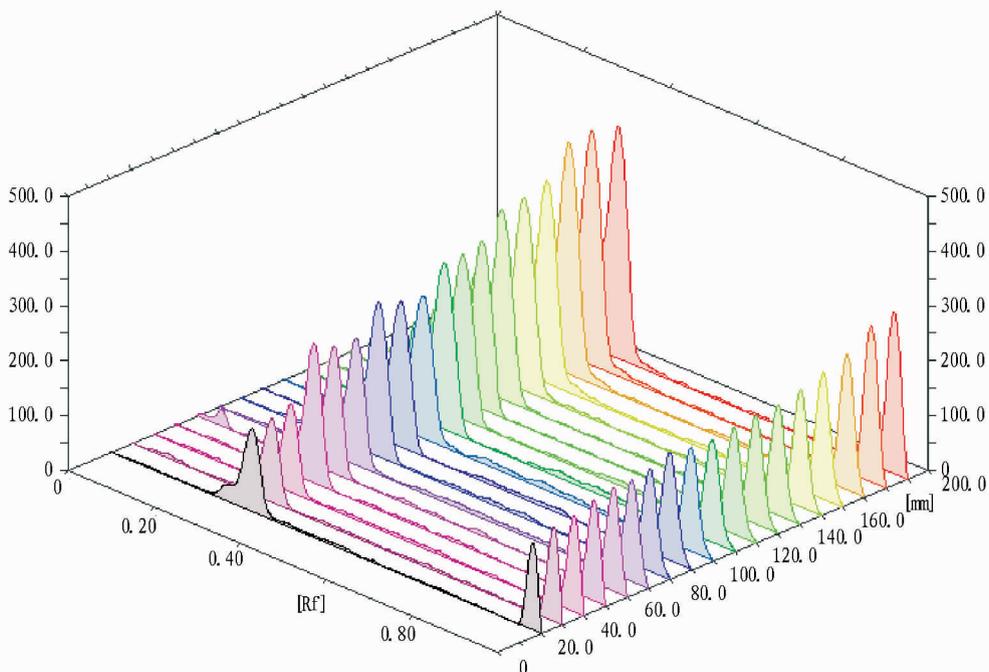


图 2 葛根素薄层扫描图谱

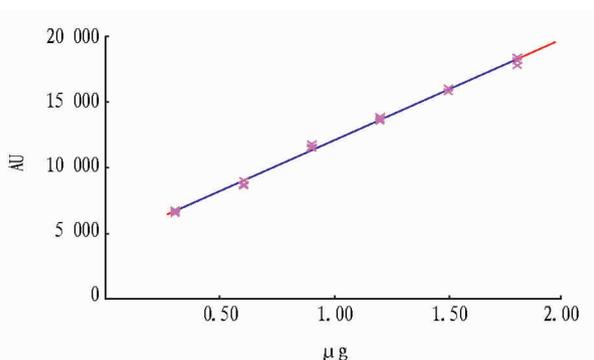


图 3 葛根素回归方程图谱

2.3 正交试验 由表 2 可知,以干浸膏得率为评价指标时,各因素的影响大小顺序为: $A > C > B$,即料液比 > 提取次数 > 提取时间,最优水平组合为 $A_3B_2C_2$;以葛根素含量为评价指标时,各因素的影响大小顺序为: $A > C > B$,即料液比 > 提取次数 > 提取时间,最优水平组合为 $A_1B_3C_3$ 。方差分析结果表明,A 因素对干浸膏得率有显著影响($P < 0.10$),而 B 和 C 因素对干浸膏得率无显著性影响($P > 0.10$);各因素对葛根素含量均无显著影响($P > 0.10$)。综合上述两项考察指标,优化最佳提取工艺组合为 $A_3B_2C_2$,即料液比为 1:12,煎煮 1.5 h,提取 2 次。

表2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	干浸膏得率//%	葛根素含量//mg
1	1	1	1	1	3.52	23.166
2	1	2	2	2	11.32	25.846
3	1	3	3	3	5.03	28.614
4	2	1	2	3	15.51	21.774
5	2	2	3	1	18.02	20.740
6	2	3	1	2	8.41	20.723
7	3	1	3	2	16.77	20.286
8	3	2	1	3	10.53	20.526
9	3	3	2	1	17.94	18.648
干浸膏得率 k_1	6.623	11.933	7.487	13.160	最优	
葛根素含量 k_2	13.980	13.290	14.923	12.167	$A_3B_2C_2$	
交互作用 k_3	15.080	10.460	13.273	10.357		
R	8.457	2.830	7.436	2.803		
葛根素含量 k_1	25.875	21.742	21.472	20.851	最优	
交互作用 k_2	21.079	22.371	22.089	22.285	$A_1B_3C_3$	
交互作用 K_3	19.820	22.662	23.213	23.638		
R	6.055	0.920	1.741	2.787		

2.4 验证试验 按处方比例称取药材,根据正交优化后的水提工艺即料液比为1:12,煎煮1.5 h,提取2次,进行干浸膏得率和葛根素含量测定,平行操作3份,结果见表4。由表4可知,该工艺条件稳定可行、有效成分得率较高且重复性较好。

表3 最佳水提工艺条件的验证

试验号	干浸膏得率//%	平均浸膏得率//%	葛根素含量//mg	平均葛根素含量//mg
1	16.72		22.37	
2	17.03	16.86	22.28	22.20
3	16.84		21.96	

3 结论与讨论

益气化湿方为复方汤剂,药味较多,成分复杂。葛根为方中的君药,葛根素是葛根中的主要活性成分,含量较高,其

化学名为8- β -D-葡萄吡喃糖-4',7-二羟基异黄酮,相对分子量为416,具有降血糖等多种药理作用^[3-4],故选用葛根中葛根素作为益气化湿方的评价指标。TLCS是指用选定波长的光照射薄层板,对可吸收紫外光或可见光(或经激发后能发射荧光)的斑点进行扫描,获得扫描图谱及积分数据,广泛用于药品的鉴别、杂质检查或含量测定。尤其对于成分复杂的中药,TLCS是定性定量测定有效成分的一个非常有效的常规方法^[5]。

试验采用正交试验法优选益气化湿方的水提工艺,结果的准确性关键在于试验操作的平行性。如何解决所用平行性的问题,是减误差的重要因素。例如,煎煮时使用恒温加热装置,浓缩时采用水浴加热,提取时采用连续操作,避免2次提取时间间隔过长,制备供试品时精密称重与补重以及煎煮液静置时间的长短等因素均有可能对结果造成影响。

试验操作过程中,A因素为主要影响因素,C为次要影响因素,B因素基本不影响考察指标,说明料液比的多少直接影响益气化湿方的浸膏得率和葛根素含量。因此,在实际提取过程中,尤应注意料液比。试验优化了益气化湿方的水提工艺,为该汤剂下一步制订合理的生产工艺提供了依据。

参考文献

- 王军辉,查学强,姜绍通.发酵酸奶制作工艺优化的探讨[J].合肥工业大学学报:自然科学版,2008(7):1029-1033.
- 国家药典委员会.中华人民共和国药典.2010年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010.
- 齐凤琴,吴军凯,于丹,等.葛根素治疗糖尿病并发症的药理作用及机制[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2012,28(3):267-270.
- 潘振宇,包兆胜,吴仲敏,等.葛根素对糖尿病心肌细胞的保护及其机制研究[J].分子细胞生物学报,2009,42(2):137-144.
- 吴琼诗,李光耀.薄层扫描法测定归芪颗粒中黄芪甲苷含量的不确定度[J].中成药,2010,32(9):1533-1536.
- LI Z R, HAN S Q, ZHUANG X M. Study on the Extraction Technology of Puerarin from RADIX PUERARIAE by Ultrasonic and Microwave Assisted Extraction[J]. Medicinal Plant, 2011, 2(5): 54-56.
- 田春雨,薄海美,喇孝瑾,等.正交设计法优选双益降糖方中葛根素的提取工艺[J].河北联合大学学报(医学版),2013(2):158-159.
- 杨海玲,覃葆,宋永龙,等.不同炮制方法对梔子中梔子苷含量的影响[J].安徽农业科学,2011,39(32):19755-19757.
- 阴健,郭力弓.中国现代研究及临床应用(1)[M].北京:学苑出版社,1993:471.
- 贾玉杰,姜妙娜,裴德恺,等.援梔子对大鼠出血性坏死性胰腺炎早期内脏血流的影响[J].中国中药杂志,1993,18(7):431.
- KAZUO TORIIZUKA, HIROKO KAMIKI, NORIKO (YOSIKAWA) OHMURA, et al. Anxiolytic effect of Gardeniae Fructus-extract containing active ingredient from Kamishoyosan (KSS), a Japanese traditional Kampon-medicine[J]. Life Sciences, 2005, 77(24): 3010-3020.
- 张学兰,刘玉荣.炮制对梔子部分成分及解热作用的影响[J].中药材,1995,18(3):136-139.
- 游伟良,平其能,孙敏捷,等.梔子苷的药理学研究新进展[J].药学进展,2012,36(4):158-162.
- 郭曙军,赵志英.梔子苷的药理作用及其作用机制研究进展[J].包头医学院学报,2013(2):111-113.
- ZHU J X, ZHU Y Y, LUO G M, et al. Research on the Effect of FRUCTUS GARDENIAE Extract on Reducing Uric Acid in Hyperuricemia Mice and Its Action Mechanism[J]. Medicinal Plant, 2012, 3(2): 51-53.
- 胡琪,饶力群,唐忠海,等.响应面分析法优化梔子黄色素提取工艺条件[J].湖南农业科学,2012(5):81-84.
- 王钢力,陈德昌,赵淑杰.梔子属植物化学成分研究进展[J].中国中药杂志,1996,21(Z):67-69.
- 付小梅,周光雄,赖学文,等.梔子类药材的研究概况及展望[J].中国野生植物资源,2001,21(5):23-25.
- 秦国伟,范芝芸,徐任生,等.抗生育植物梔子花化学成分的研究[J].有机化学,1989(9):263.
- KIM H J, KIM E J, SEO S H, et al. Vanillic acid glyco side and quinic acid derivatives from Gardeniae Fructus[J]. J N at P rod, 2006, 69(4): 600-603.
- 毕志明,周小琴,李萍,等.梔子果实的化学成分研究[J].林产化学与工业,2008,28(6):67-69.
- 付小梅,俞桂新,王峥涛.梔子的化学成分[J].中国天然药物,2008,6(6):418-420.
- 任强,孙丽华,刘新民,等.梔子的化学成分及抗白血病活性研究[J].广东药学院学报,2009,25(2):141-143.
- 陈红,肖永庆,李丽,等.梔子化学成分研究[J].中国中药杂志,2007,32(11):1041-1043.
- STANKEVICIENE D, URBONAS V. Biochemical characteristics of Lithuanian edible mushrooms[J]. Liet TSR Mokslu Akad Darb Ser C (Russian), 1987, 4: 97-101.
- 王孝涛.历代中药炮制法汇典(古代部分)[M].南昌:江西科学技术出版社,1986:330-331.

(上接第7760页)