

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.20.003

葛根中葛根素与大豆苷元超声提取工艺研究

崔颖¹, 刘馨湄¹, 才凤²

(1. 辽宁省中医药研究院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 辽宁省食品检验检测院, 辽宁 沈阳 110015)

摘要:目的 优化葛根的超声提取工艺。方法 采用正交试验法,以水为溶剂,以葛根素、大豆苷元为考察指标,对葛根超声提取工艺中的溶剂用量、单次提取时间及提取次数进行优化。结果 葛根素进样量线性范围为0.024~0.160 μg;稳定性的RSD为1.00% (n=6);精密度的RSD为0.76% (n=6);重复性的RSD为0.80% (n=6);回收率为99.87%,RSD为0.70% (n=6)。大豆苷元进样量线性范围为0.03~0.20 μg;稳定性的RSD为1.10% (n=6);精密度的RSD为0.76% (n=6);重复性的RSD为0.90% (n=6);回收率为100.32%,RSD为1.80% (n=6)。最佳超声提取工艺为加8倍量水,提取3次,每次30 min。结论 该方法简便,准确,专属性强,工艺重复性好,适于规模化生产。

关键词:葛根;含量测定;超声提取工艺;正交设计;葛根素;大豆苷元

中图分类号:R932;R284.2

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)20-0007-03

Study on the Ultrasonic Extraction Process of Puerarin and Daidzein in *Puerariae Lobatae Radix*

Cui Ying¹, Liu Xinmei¹, Cai Feng²

(1. Liaoning Academy of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, China 110034; 2. Liaoning Institute for Food Control, Shenyang, Liaoning, China 110015)

Abstract: **Objective** To optimize the ultrasonic extraction process of *Puerariae lobatae Radix*. **Methods** With the water as solvent, puerarin and daidzein as indexes, the amount of solvent, single extraction time and extraction times in the ultrasonic extraction process of *Puerariae lobatae Radix* were optimized by orthogonal test. **Results** The puerarin showed a good linear relationship in the range of 0.024 - 0.160 μg, the RSD of stability was 1.00% (n=6), the RSD of precision was 0.76% (n=6), the RSD of repeatability was 0.80% (n=6), the recovery rate was 99.87%, RSD was 0.70% (n=6). The daidzein showed a good linear relationship in the range of 0.03 - 0.20 μg, the RSD of stability was 1.10% (n=6), the RSD of precision was 0.76% (n=6), the RSD of repeatability was 0.90% (n=6), the recovery rate was 100.32%, RSD was 1.80% (n=6). The best ultrasonic extraction process was as follows: eight times the amount of water, extracting 3 times, each time 30 min. **Conclusion** This method is simple, accurate with strong specificity and good repeatability, which is suitable for large-scale production.

Key words: *Puerariae lobatae Radix*; content determination; ultrasonic extraction process; orthogonal test; puerarin; daidzein

葛根为豆科野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth. 的干燥根,为临床常用中药,《本草纲目》载其性凉、气平、味甘,具清热、降火、排毒功效。民间用葛根退热生津。葛根含12%的黄酮类化合物,如葛根素、大豆黄酮苷、花生素等营养成分,还含有蛋白质、氨基酸、糖和人体必需的铁、钙、铜、硒等矿物质,是老少皆宜的名贵滋补品,有“千年人参”之美誉^[1-2]。传统的提取方法有冷浸法、加热回流法、水煎煮法、渗漉法等^[3-10],但其提取速度慢、耗能,无法充分利用葛根活性物质,造成资源浪费。本试验中采用低温超声裂解法破碎细胞,加速有效成分进入溶剂,缩短提取时间,减少高温对提出成分的影响,并将有效物质释放出来,以最大限度地提高利用率。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LGJ-12型冷冻干燥机(北京松源华兴科技有限公

司);RE-2000E型旋转蒸发仪(河南巩义市予华仪器有限公司);BS224S型分析天平(德国赛多利斯仪器有限公司);JY98-ⅢDN型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);LC-10P型高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

1.2 试药

葛根药材(亳州春雷药材有限公司);葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号为752-200508);大豆苷元对照品(中国食品药品检定研究院,批号为110752-200511)。所用试剂均为分析纯,供试液均按2010年版《中国药典》附录配制。

2 方法与结果

2.1 药材鉴定

葛根为豆科野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth. 的干燥根,经辽宁省中医药研究院主任药师刘景文鉴定,符合2010年《中国药典(一部)》^[11]葛根项下有关规定。

第一作者:崔颖,女,大学本科,助理研究员,研究方向为中药学,(电子信箱)13998399291@163.com。

△通信作者:才凤,女,硕士研究生,高级工程师,研究方向为中药药品等新药研究及食品、保健食品检测,(电子信箱)47548597@qq.com。

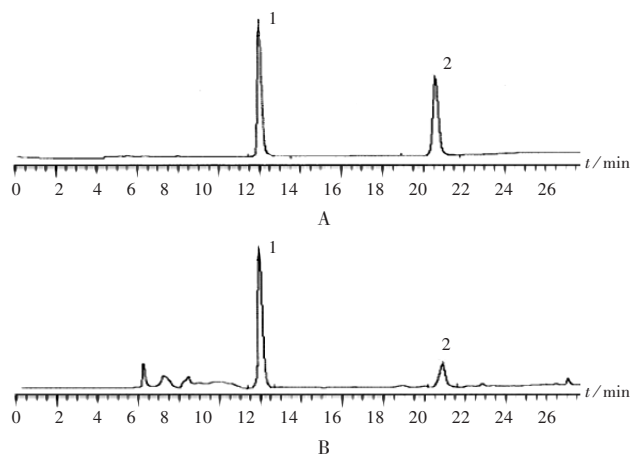
2.2 葛根素及大豆苷元含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Spherigel C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水, 梯度洗脱(梯度洗脱条件见表1); 检测波长: 250 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 mL; 柱温: 30 ℃。理论板数按葛根素峰计不低于4000。色谱图见图1。

表1 梯度洗脱条件

时间(min)	甲醇(%)	水(%)	时间(min)	甲醇(%)	水(%)
0	23	77	25	50	50
13	23	77	27	23	77
15	50	50			



1. 葛根素 2. 大豆苷元

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

2.2.2 溶液制备

精密称取葛根素对照品和大豆苷元对照品适量, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制得每1 mL含葛根素8 μg和大豆苷元10 μg的混合溶液, 作为对照品溶液。

取本品粉末(过3号筛)0.1 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入50%甲醇50 mL, 称定质量, 超声处理15 min, 放冷, 称定质量, 用50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察: 分别精密量取对照品溶液3, 5, 10, 15, 20 μL进样, 按2.2.1项下色谱条件测定峰面积, 以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X, μg)为横坐标进行线性回归, 得葛根素回归方程 $Y = 37\,700\,889X + 7\,451$, $R = 0.9997$ ($n = 5$), 进样量线性范围为0.024 ~ 0.160 μg; 大豆苷元回归方程为 $Y = 674\,583X - 403.6$, $R = 0.9997$ ($n = 5$), 进样量线性范围为0.03 ~ 0.20 μg。

精密度试验: 精密吸取同一对照品溶液20 μL, 连续进样6次。结果的RSD为0.76% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 精密吸取同一供试品溶液, 分别于0,

2, 4, 6, 8, 12 h时进样, 测定峰面积。结果葛根素和大豆苷元峰的RSD分别为1.00%和1.10% ($n = 6$), 表明供试品溶液在12 h内稳定。

重复性试验: 精密称取6份样品, 依法制得供试品溶液, 进样测定。结果葛根素和大豆苷元峰面积的RSD分别为0.80%和0.90% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

回收率试验: 称取已知含量供试品粉末6份, 每份0.05 g, 精密称定, 加葛根素对照品0.18 mg, 大豆苷元对照品0.25 mg, 按2.2.1项下色谱条件测定并计算。结果葛根素和大豆苷元的回收率分别为99.87%和100.32%, RSD分别为0.70%和1.80% ($n = 6$)。

2.2.4 样品含量测定

精密吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 结果葛根素含量为40 mg/g, 大豆苷元含量为1.06 mg/g。

2.3 提取工艺正交试验

取野葛药材300 g, 破碎备用。根据野葛中葛根素的理化性质, 以水作为溶剂进行超声提取, 按 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验, 采用高效液相色谱法^[12-14], 以葛根素、大豆苷元为考察指标, 以加水量(因素A)、提取时间(min)(因素B)、提取次数(因素C)为考察因素, 优选葛根超声提取最佳工艺。因素水平表见表2, 试验结果见表3,

表2 因素水平表

水平	因素A(倍)	因素B(min)	因素C(次)
1	8	10	1
2	6	20	2
3	4	30	3

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果分析表

序号	因素			含量	
	A	B	C	葛根素(g)	大豆苷元(mg)
1	1	1	1	10.96	243.6
2	1	2	2	13.00	305.1
3	1	3	3	15.88	386.7
4	2	1	2	10.67	211.8
5	2	2	3	11.81	256.2
6	2	3	1	10.45	204.2
7	3	1	3	8.39	175.8
8	3	2	1	5.60	118.2
9	3	3	2	9.35	216.3
K_1	13.280	10.007	9.003		
K_2	10.977	10.137	11.007		
K_3	7.780	11.893	12.027		
SS_j	5.500	1.886	3.024		
K'_1	311.800	210.400	188.667		
K'_2	224.067	226.500	244.400		
K'_3	170.100	269.067	272.900		
SS'_j	141.700	58.667	84.233		

表4 方差分析表

来源	葛根素				大豆苷元			
	平方和	自由度	均方	F 值	平方和	自由度	均方	F 值
因素 A	45.774	2	2 409.158	19.000	30 688.429	2	140.922	19.000
因素 B	6.662	2	350.632	19.000	5 512.909	2	25.315	19.000
因素 C	14.194	2	747.053	19.000	11 013.709	2	50.575	19.000
误差	0.020	2			217.770	2		

方差分析结果见表4。影响水提效果的因素顺序为 $A > C > B$ 。查表得 $F_{0.05(2,2)} = 19.00$, $F_{0.01(2,2)} = 99.00$, 方差分析结果表明,因素A、因素B、因素C具有显著性意义,表明本试验设计较有意义。结合R水平,得出葛根素、大豆苷元最佳提取工艺为 $A_1B_3C_3$,即加8倍量水,每次提取30 min,提取3次。

2.4 验证试验

称取药材5份,精密称定,按最佳提取条件进行提取、浓缩,分别测定葛根素、大豆苷元总量。结果见表5。得出的数据与正交试验直观分析得出的结论相吻合,本试验中确定的水提工艺可行、稳定、合理。

表5 最佳工艺验证试验结果

成分	1	2	3	4	5	$\bar{X}$
葛根素(g)	15.97	16.02	15.94	16.12	16.20	16.05
大豆苷元(mg)	390.40	401.80	410.20	421.60	415.80	407.96

2.5 葛根收率

将2.4项下的5份提取液合并,经旋转蒸发仪适当浓缩,利用冷冻干燥技术^[15]进行干燥,温度为 -60°C ,预冻4 h,然后在程序升温曲线条件下干燥28 h,即得。计算葛根的收率为52.4%,程序升温曲线见图2。

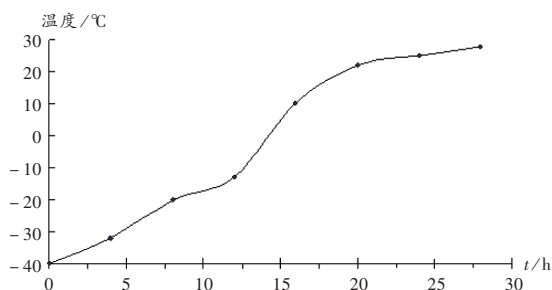


图2 葛根的程序升温曲线

3 讨论

通过单因素和正交试验,优化了超声提取的工艺条件,确定最佳提取工艺为加8倍量水,提取3次,每次提取30 min。该试验以水溶液为提取剂,成本低廉,工艺操作简单,且提取过程中未加入任何有毒物质,因此安全性较高,适于工业化生产。

关于葛根药材成分提取的研究报道很多,提取过程中影响因素很多,优化时所考虑的影响因素不同,各因素水平也不相同,同时各因素间又相互影响,因而在提

取过程中要综合考虑各种因素,以保证最佳提取工艺优化的确定性。结合文献研究和预试验,本研究中以水为提取溶剂,并以低温超声的提取方式进行提取,以葛根主要化学成分和活性成分葛根素、大豆苷元的含量作为考察指标,专属性强,并采用正交试验,确定最佳提取工艺。优选的工艺简单、稳定、可行,可控性良好。本研究中采用低温冷冻干燥技术对葛根提取物进行干燥,不但脱水较彻底,且干燥后的多肽成分性质稳定,便于长时间贮存,能更好地控制温度,保护活性成分。

参考文献:

- [1] 郑皓. 葛根的研究与开发现状[J]. 氨基酸和生物资源, 2006,28(2):24-26.
- [2] 陈银霞,武占全. 葛根的化学成分、药理研究和用途研究[J]. 科技信息,2011(30):200.
- [3] 王亚红,曲小姝,祝波,等. 葛根素提取及纯化工艺研究现状[J]. 天津化工,2008,22(6):11-13.
- [4] 王翊臻,潘洪平. 优选葛根提取工艺的实验研究[J]. 医学文选, 2004,23(1):4-6.
- [5] 刘敏彦,董超,高秀强,等. 中药葛根提取工艺研究[J]. 中国药业,2008,17(3):24-25.
- [6] 王美东,李常行,孙钦美. 葛根提取工艺的正交设计试验[J]. 齐鲁药事,2005,24(1):45-46.
- [7] 易红,杨华. 葛根的品种产地和提取工艺研究进展概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(11):60-63.
- [8] 王广峰,付海波. 葛根素提取工艺的研究[J]. 黑龙江科技信息, 2012,27(8):7.
- [9] 国振双,李梅,冯云生. 微波法提取葛根黄酮的研究[J]. 齐齐哈尔大学学报,2003,19(4):14-15.
- [10] 公衍玲,黄山,于慧荣. 葛根提取方法的比较研究及其工艺优化[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版),2009,30(5): 415-417.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2010:312-313.
- [12] 黄贵平. RP-HPLC法测定心痛平颗粒中葛根素的含量[J]. 现代中药研究与实践,2005,19(6):47-49.
- [13] 邹翔,曲中原. RP-HPLC法测定湖南粉葛中葛根素的含量[J]. 黑龙江医药,2011,24(4):519-520.
- [14] 张泓,黄庆文,王守农,等. 高效液相色谱法测定冠脉通片中葛根素含量研究[J]. 内蒙古中医药,2010,29(8):41.
- [15] 白秀娟. 醇溶性冻干鹿茸提取物提取方法:中国, 03132527.0[P]. 2004-03-17.

(收稿日期:2017-12-28;修回日期:2018-05-05)