

# 正交试验优化葛根中葛根素的闪式提取工艺

李宝红<sup>1,2</sup>, 吴君<sup>3</sup>, 程怡<sup>1\*</sup>, 田圆<sup>2</sup>, 王家平<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广东医学院, 广东 东莞 523808;  
3. 山东中医药高等专科学校, 山东 烟台 264199)

**[摘要]** 目的: 优选葛根中葛根素的闪式提取工艺。方法: 在单因素试验基础上, 以葛根素提取率为评价指标, 采用正交试验法考察乙醇体积分数、料液比、提取电压、提取时间对葛根中葛根素提取工艺的影响。采用 HPLC 测定葛根素含量, 流动相甲醇-水(25:75), 检测波长 250 nm。结果: 最佳提取工艺为加 15 倍量 50% 乙醇于 90 V 提取 2 min; 葛根素提取率 37.42 mg·g<sup>-1</sup>, 转移率 88.89%。结论: 优选的工艺稳定可行、重复性好、提取时间短, 可作为葛根中葛根素的工业化生产工艺参数。

**[关键词]** 葛根; 葛根素; 闪式提取法; 乙醇回流法; 超声法

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0027-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020027

**Optimization of Flash Extraction Technology of Puerarin from Puerariae Lobatae Radix by Orthogonal Test** LI Bao-hong<sup>1,2</sup>, WU Jun<sup>3</sup>, CHENG Yi<sup>1\*</sup>, TIAN Yuan<sup>2</sup>, WANG Jia-ping<sup>2</sup> (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China; 3. Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264199, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize flash extraction process of puerarin from Puerariae Lobatae Radix. **Method:** Based on single tests, taking extracting rate of puerarin as index, orthogonal test was adopted to optimize flash extraction process with ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction voltage and time as factors. HPLC was employed to determine the content of puerarin with mobile phase of methanol-water (25:75) and detection wavelength at 250 nm. **Result:** Optimum extraction technology was as following: extracted 2 min with 15 times the amount of 50% ethanol at 90 V. Under these conditions, extracting rate of puerarin was 37.42 mg·g<sup>-1</sup> and its transfer rate was 88.89%. **Conclusion:** This optimized process is stable and reproducible with short extracting time, it can be used as process parameters for industrial production of puerarin from Puerariae Lobatae Radix.

**[Key words]** Puerariae Lobatae Radix; puerarin; flash extraction technology; ethanol refluxing method; ultrasonic method

葛根习称野葛, 秋、冬二季采挖, 趁鲜切成厚片或小块<sup>[1]</sup>, 始载于《神农本草经》<sup>[2]</sup>, 具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻等功效, 用于治疗外感发热头痛、项背强痛、口渴、麻疹不透等。葛根中主要有效成分为葛根素、大豆苷元、大豆苷等异黄酮类化合物。葛根素有降血糖、血压、血脂的作用, 可舒张平滑肌, 保护脑功能、视网膜, 抑制癌细胞增殖及耐药, 刺激血液循环, 保护垂体后叶素引起的急性心肌出血; 临床用于治疗冠心病心绞痛、心肌梗死、胃黏膜

保护、眼压升高、视网膜病变、酒精中毒、骨质疏松、糖尿病、突发性耳聋、肥胖症<sup>[3-5]</sup>。目前葛根素的提取常采用水提法、渗滤法、乙醇回流法、微波辅助法、超声波法等<sup>[6-7]</sup>。本实验采用闪式提取法, 通过单因素试验和正交试验优选葛根中葛根素的闪式提取工艺, 为葛根素工业提取法的探索和葛根资源的综合开发提供参考。

## 1 材料

JHBE-50 型闪式提取器(河南金鼎科技发展有

**[收稿日期]** 20140821(006)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(2012010009166)

**[第一作者]** 李宝红, 博士, 副研究员, 从事药物载体与控制释放研究, Tel:0769-22896555, E-mail: gdmcli@126.com

**[通讯作者]** \* 程怡, 教授, 博士生导师, 从事药物载体及其新型给药系统研究, Tel:020-39358041, E-mail: vip.chengyi@gzhtcm.edu.cn

限公司), DCM-150 型中药粉碎机(江阴市翔飞粉体工程机械有限公司), BP211D 型电子分析天平[德国赛多利斯(上海)分公司], XS225A 型分析天平(瑞士普利赛斯化学工业公司), LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津, SPD-20A 型紫外检测器), AR224CN 型电子天平[美国奥豪斯仪器(上海)公司], 100-800 型烘箱[德国 Memmert(上海)贸易有限公司]。

葛根购自广州南北行中药饮片有限公司, 批号 140225E214, 经广州中医药大学鉴定教研室张丹雁教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* 的干燥块根。葛根素对照品(批号 MUST11052401, 成都曼斯特生物科技有限公司), 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 对照品溶液** 精密称取葛根素对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得  $1.34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  储备液。精密吸取该储备液 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 即得。

**2.1.2 供试品溶液** 将葛根 1 kg 于  $60^\circ\text{C}$  干燥 3 h, 粉碎, 过 40 目筛, 精密称取约 20 g 已过筛葛根粉末, 加 10 倍量 30% 乙醇浸泡 20 min, 于 90 V 闪式条件下提取 1 min, 抽滤, 用少量 30% 乙醇溶解并定容至 500 mL, 精密吸取 1 mL 定容至 10 mL 量瓶中, 经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 即得。药材中葛根素质量分数  $42.10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

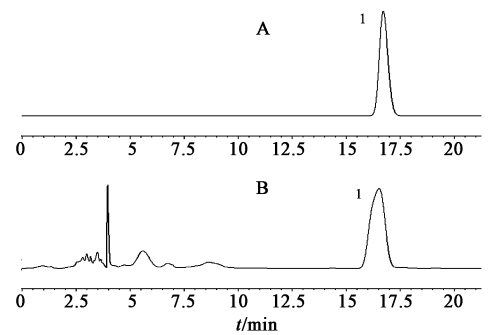
### 2.2 方法学考察

**2.2.1 色谱条件** Inertile ODS-OP 色谱柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ ), 流动相甲醇-水 (25:75), 检测波长 250 nm, 流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温  $30^\circ\text{C}$ , 进样量  $10 \mu\text{L}$ 。理论板数按葛根素峰面积计算不低于 3 000, 见图 1。

**2.2.2 标准曲线的制备** 取 2.1.1 项下对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程  $Y = 2.9 \times 10^5 X - 2.5 \times 10^3$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围  $0.268 \sim 2.68 \mu\text{g}$ 。

**2.2.3 精密密度试验** 取葛根素对照品溶液适量, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算 RSD 0.2%, 表明仪器精密密度良好。

**2.2.4 稳定性试验** 取葛根供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 按 2.2.1 项下色谱条件进样, 计算



A. 对照品; B. 供试品; 1. 葛根素

图 1 葛根提取液 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Puerariae Lobatae Radix* extract

葛根素峰面积的 RSD 1.3%, 说明供试品溶液在 10 h 内稳定。

**2.2.5 重复性试验** 精密称取过 40 目筛的葛根粉末约 20 g, 按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算葛根素质量分数  $32.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 1.1%, 表明该方法重复性良好。

**2.2.6 加样回收率试验** 取已知葛根素含量的葛根样品共 6 份, 精密称定, 各精密加入葛根素对照品 16 mg, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以外标法定量, 计算回收率  $98.78\% \sim 102.66\%$ , RSD 1.4%, 表明该方法准确可靠。

### 2.3 单因素试验考察

**2.3.1 乙醇体积分数** 精密称取过 40 目筛的葛根粉末约 20 g, 共 4 份, 分别加入 10 倍量 30%, 50%, 80%, 95% 的乙醇溶液, 于 100 V 闪式提取 1 min, 抽滤, 加少量相应体积分数乙醇溶解并定容至 500 mL, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算葛根素提取率分别是  $30.21, 36.31, 20.26, 18.24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 表明当乙醇体积分数达 50% 时, 葛根素提取率达到最大。

**2.3.2 提取时间** 精密称取过 40 目筛的葛根粉末约 20 g, 共 4 份, 各加入 10 倍量 50% 乙醇, 分别在 100 V 闪式提取 1, 1.5, 2, 3 min, 按 2.3.1 项下方法处理, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算葛根素提取率分别为  $35.12, 35.85, 37.12, 37.19 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 故选择提取时间 2 min。

**2.3.3 提取电压** 精密称取过 40 目筛的葛根粉末约 20 g, 共 4 份, 各加入 10 倍量 50% 乙醇, 分别在 80, 90, 100, 110 V 闪式提取 2 min, 按 2.3.1 项下方法处理, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算葛根素提取率分别为  $36.18, 37.11, 37.26, 37.31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 故

确定闪式提取电压 90 V。

**2.3.4 料液比** 精密称取过 40 目筛的葛根粉末约 20 g,共 4 份,分别加入 10,15,20,25 倍量 50% 乙醇于 90 V 闪式提取 2 min,按 2.3.1 项下方法处理,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算葛根素提取率分别为 35.23,36.31,37.26,37.31 mg·g<sup>-1</sup>,故确定料液比 1:15。

**2.4 正交试验** 精密称取过 40 目筛的葛根药材 9 份,每份 20 g,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验设计,在单因素试验基础上,选择乙醇体积分数、提取时间、料液比为考察因素,以葛根素提取率为评价指标,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 A > D > B > C。以极差最小的 C 因素为误差项进行方差分析,结果表明因素 A 对葛根素提取率的影响达显著水平,其他因素则均无显著性影响,选择最佳提取工艺组合 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>,即乙醇体积分数 50%,提取时间 2 min,提取电压 90 V,料液比 1:15。

表 1 葛根中葛根素提取工艺正交试验分析  
Table 1 Orthogonal test analysis of extraction process of puerarin from Puerariae Lobatae Radix

No.	A 乙醇体积分数/%	B 提取时间/min	C 提取电压/V	D 料液比	葛根素/mg·g <sup>-1</sup>
1	30	1.0	90	1:10	31.93
2	30	1.5	100	1:15	34.38
3	30	2.0	110	1:20	35.09
4	50	1.0	100	1:20	36.94
5	50	1.5	110	1:10	36.26
6	50	2.0	90	1:15	37.29
7	80	1.0	110	1:15	20.62
8	80	1.5	90	1:20	20.51
9	80	2.0	100	1:10	20.26

表 2 葛根素提取工艺方差分析  
Table 2 Variance analysis of extraction process of puerarin

方差来源	SS	MS	F	P
A	227.42	227.46	473.71	<0.01
B	0.83	0.83	1.72	>0.05
C(误差)	0.48	0.48	1.00	
D	1.76	1.75	3.66	>0.05

注: F<sub>0.05</sub>(2,2) = 19, F<sub>0.01</sub>(2,2) = 99。

**2.5 验证试验** 精密称取过 40 目筛的葛根粉末约 20 g,共 5 份,按最佳闪式提取工艺进行验证试验,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算葛根素提取率 37.42 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 1.5%,转移率 88.89%,说明优选的工艺条件稳定可靠。

### 3 讨论

葛根作为黄酮类化合物,具有毒性低、安全范围

广、药源丰富、价格低廉,已被开发成各种药用制剂和保健食品,具有提高免疫力、增强心肌收缩力、保护心肌细胞、降低血压、抗血小板聚集等作用,可用于治疗冠心病、心绞痛、糖尿病并发症等疾病。但葛根素的作用机制尚未明确,在治疗疾病过程中会引起不良反应<sup>[8]</sup>,故本文拟通过优选葛根素的提取方式以找出更适合于工业化生产的工艺条件。

闪式提取器的电机电压是控制闪式提取器转数的重要参数(最高 15 000 r·min<sup>-1</sup>对应电机电压 250 V),根据预试验及提取其他药材的经验,闪式提取电压一般选择 90~120 V,提取电压 >120 V 时药材成分基本提取完全,本文结果表明闪式提取电压 90 V 时,葛根素已基本提取完全,从保护电机的角度看,选择提取电压 90 V。

张庭等<sup>[6]</sup>通过 HPLC 考察不同提取方法对葛根中葛根素提取率的影响,结果发现采用超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取法提取时,葛根素总量和纯度均高于其他提取方法,但转移率和出膏率很低。而醇加热回流法的葛根素总量、纯度仅次于超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取法,且转移率和出膏率为 4 种方法中最高的。采用本文相同料液比的 50% 乙醇于 80 °C 回流提取 3 次,每次 60 min,计算葛根素提取率 32.29 mg·g<sup>-1</sup>,虽然提取率相当但相当费时。曾荣华等<sup>[7]</sup>比较了超声法与常规回流法,葛根素提取率基本相同,但溶剂用量较多且提取时间相对较长。考虑到提取数 1 次时,葛根素转移率即可达 88.89%,且工业化生产需考虑生产成本,故本文未对提取次数进行考察。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:312-313.

[2] 孙星衍,孙冯翼,吴普,等. 神农本草经[M]. 太原:山西科学技术出版社,2010:115-116.

[3] 尹丽红,李艳枫,孟繁琳. 葛根的化学成分、药理作用和临床应用[J]. 黑龙江医药,2010,23(3):371-372.

[4] 宋卉,李银花,郑晖,等. 葛根素的药理作用与临床研究进展[J]. 现代医药卫生,2011,27(19):2936-2937.

[5] 李天星,李新民. 中药葛根的研究进展[J]. 湖南中医杂志,2013,29(8):151-153.

[6] 张庭,吴丽华,肖丹,等. 不同提取方法对葛根中葛根素提取率的影响[J]. 云南中医中药杂志,2013,34(5):62-63.

[7] 曾荣华,李金华,刘翠红. 多功能超声波提取机强化提取葛根素的研究[J]. 中国实用医药,2007,2(16):1-2.

[8] 张环宇,李大伟,史彩虹. 葛根素的临床应用研究进展[J]. 现代药物与临床,2012,27(1):75-78.

[责任编辑 刘德文]