

正交试验优选葛根醋制工艺

刘计权, 刘亚明*, 刘必旺, 李慧峰, 续云芸, 曲志强
(山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] 目的: 优选葛根最佳醋制工艺。方法: 以 HPLC 测定葛根素、大豆苷、大豆苷元含量为指标, 考察辅料用量、闷润时间、文火炒制时间 3 个因素, 采用正交试验对葛根的最佳醋制工艺进行优选。结果: 葛根的最佳醋制工艺为取葛根一定量, 加入 20% 醋闷润 0.5 h, 文火炒制 30 min。结论: 优选出的葛根醋制工艺稳定可行, 重现性好。

[关键词] 葛根; 醋制; 葛根素; 大豆苷; 大豆苷元

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0003-04

Optimization of Vinegar Technology for *Pueraria lobata* by Orthogonal Design

LIU Ji-quan, LIU Ya-ming*, LIU Bi-wang, LI Hui-feng, XU Yun-yun, QU Zhi-qiang
(Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize vinegar technology of *Pueraria lobata*. **Method:** By taking the

[收稿日期] 20111115(011)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI07B05); 山西省卫生厅计划项目(20100223); 山西省食品与药品管理监督局项目(2011003B); 太原市科技局项目(20110115)

[第一作者] 刘计权, 博士研究生, 讲师, 从事中药材质量控制的研究, Tel: 0351-2272269, E-mail: Liujiquan2008@163.com

[通讯作者] *刘亚明, 博士, 教授, 博导, 从事中医药物质基础的研究, Tel: 0351-2272163, E-mail: Liuyaming66@yahoo.com.cn

肤中蓄积量分别为 26.624, 30.781, 36.679, 42.246, 18.597, 28.532 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (每克皮肤中所含葛根素的量)。且随氮酮用量的增加, 皮肤中蓄积量增多。在 24 h 除去供试膏体后, 供试皮肤还可释放出一定量的葛根素, 其释放量的多少与皮肤中葛根素的蓄积量有关。葛根素蓄积量越大, 24 h 除药后释放量越大。

3 讨论

葛根素在经皮吸收过程中可能与角质层中的角蛋白发生结合或吸附, 在皮肤内产生蓄积, 蓄积的主要部位是角质层。这可能使葛根素在皮肤内形成贮库, 停止给药后仍能保持药物释放一段时间。多次给药时葛根素在皮肤中的蓄积情况还需研究报道。蓄积于皮肤中的葛根素在在体时能够通过皮肤中的血管吸收而进入血液循环, 所以葛根素累积渗透量和在皮肤中的蓄积量之和越大, 在体吸收量可能越多。氮酮作为促渗剂其作用机制当前研究报道有 3 个方面^[5]: ①与脂质作用: 氮酮可破坏角质层脂质, 增加角质层间细胞的流动性, 降低药物的扩散阻力;

②与角质细胞内基质相互作用: 氮酮可作用于细胞内脂质, 使扩散阻力减少; ③水化机制: 氮酮可增加角质细胞的含水量, 促进水溶性药物的经皮吸收。氮酮及其复合应用系统对葛根素的促透机制是否与以上 3 个方面有关有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 张超, 吕华瑛. 正交试验法筛选骨平巴布膏的基质处方[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(4): 39.
- [2] 朱倩云, 李筱青, 李成网. 氮酮对如意金黄乳膏体外透皮吸收的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 24.
- [3] 张海燕, 程岚, 袁子民, 等. 山葛降脂分散片中葛根素在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 169.
- [4] 崔福德. 药剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 472.
- [5] 侯雪梅, 李国栋, 李卫华. 化学促渗剂及机制的探讨[J]. 上海医药, 2008, 29(5): 232.

[责任编辑 全燕]

content of puerarin, daidzin and daidzein as indexes, three factors of the amount of vinegar, moistening time, slow fire frying time were investigated, optimum vinegar technology of *P. lobata* was optimized by orthogonal test. **Result:** Optimum vinegar technology was as follows: took a certain amount of *P. lobata*, added 20% vinegar to moisten 0.5 h, slow fire frying time was 30 min. **Conclusion:** This optimized technology was stable, feasible and reproducible.

[**Key words**] *Pueraria lobata*; stir-frying with vinegar; puerarin; daidzin; daidzein

中药葛根为豆科植物野葛的干燥根,具有解肌退热、生津止渴、透疹、升阳止泻、通经活络、解酒毒等功效^[1],现代药理及临床研究证明,其还具有降血糖、降血脂、改善血液黏度等作用,且无明显毒副作用^[2-4],常用于治疗高血压、冠心病、心绞痛、心肌梗死等症^[5-6],因此葛根复方制剂在临床上的应用不断拓展^[7-9]。关于葛根的炮制,早在宋代王怀隐、唐慎微等就提出了醋制^[10],《中国药典》2010 年版中收录的炮制方法为切制^[11],切制也是民间用药传统的炮制方法。现代研究认为葛根醋制后,葛根素的含量较切制品高^[11-13],但关于葛根醋制工艺的研究未见报道。葛根素、大豆苷、大豆苷元是葛根的主要有效活性成分^[14-16],本文以葛根中的葛根素、大豆苷和大豆苷元为指标性成分,对葛根的醋制工艺进行了研究,以期筛选出葛根的最佳醋制工艺,为葛根醋制品在临床上的应用提供科学依据。

1 仪器与试药

E2695 高效液相色谱仪(515 泵,2996 紫外检测器,美国 Waters),FA2014 型电子分析天平(北京中仪宇盛科技有限公司)。

葛根素(批号 110752-200912)、大豆苷(批号 111738-200501)、大豆苷元(批号 111502-200402)等对照品购自中国药品生物制品检定所,甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。醋(山西水塔老陈醋股份有限公司)。

葛根药材购自北京同仁堂药店(产地为广西),经山西中医学院牛燕珍老师鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 醋制工艺设计 选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行最佳醋制工艺考察,以辅料用量(A)、闷润时间(B)、文火炒制时间(D)作为考察因素,每个因素设 3 个水平,各因素水平表见表 1。

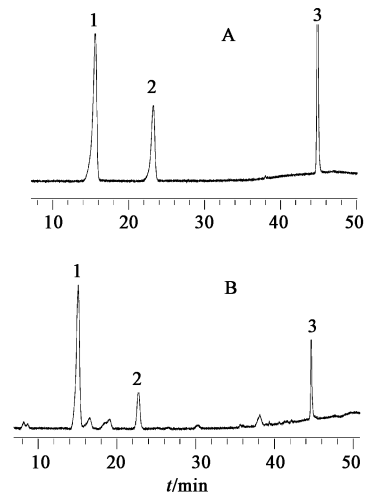
2.2 葛根醋制品的制备 取大小均一的净葛根饮片 9 份,每份 100 g,按正交试验设计表,加入不同比例的醋拌匀,闷润一定时间,用文火炒制一定的时间,取出放凉,用高效液相色谱仪进行测定。

表 1 葛根醋制工艺正交试验因素水平

水平	A 醋用量 /%	B 闷润 时间/h	D 炒制 时间/min
1	10	0.5	10
2	20	1.0	20
3	30	1.5	30

2.3 葛根素、大豆苷、大豆苷元的含量测定

2.3.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~20 min 45% A, 20~25 min 50% A, 25~30 min 60% A, 30~40 min 75% A; 40~45 min 80% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温室温,检测波长 250 nm。对照品和供试品 HPLC 色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 葛根素; 2. 大豆苷; 3. 大豆苷元

图 1 葛根 HPLC

2.3.2 溶液的制备 对照品溶液的制备:分别精密称取葛根素、大豆苷、大豆苷元对照品适量,置于 50 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制成葛根素(0.205 6 g·L⁻¹)、大豆苷(0.096 0 g·L⁻¹)、大豆苷元(0.059 8 g·L⁻¹)的混合对照品溶液备用。

供试品溶液的制备:称取葛根粉末(过 3 号筛)约 0.1 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 50 mL,称重,加热回流提取 30 min,

放冷,称定质量,70%乙醇补足失重。摇匀,过滤,取续滤液过0.45 μm的微孔滤膜过滤,备用。

2.3.3 线性关系考察 分别精密吸取过0.45 μm微孔滤膜的混合对照品溶液1,3,6,9,12,15 μL,注入液相色谱仪,按2.3.1色谱条件进行测定,记录葛根素、大豆苷、大豆苷元峰面积值,以进样量为横坐标,以葛根素、大豆苷、大豆苷元对照品峰面积值为纵坐标,作标准曲线图,计算回归方程。葛根素: $Y_1 = 3.88 \times 10^6 X_1 + 1.97 \times 10^4$ ($r = 0.9996$),线性范围0.2056 ~ 3.0840 μg;大豆苷: $Y_2 = 4.28 \times 10^6 X_2 - 1.85 \times 10^4$ ($r = 0.9993$),线性范围0.0960 ~ 1.4400 μg;大豆苷元: $Y_3 = 1.84 \times 10^6 X_3 - 2.44 \times 10^3$ ($r = 0.9989$),线性范围0.0598 ~ 0.8970 μg。

2.3.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液10 μL,按2.3.1色谱条件测定,重复进样6次,记录所测峰面积的积分值,葛根素、大豆苷、大豆苷元RSD分别为1.09%,2.15%,2.81%。表明精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取新制备的同一供试品溶液,于制备后室温分别放置0,2,4,6,8,10 h,精密吸取10 μL,按照上述色谱条件测定峰面积积分值,葛根素、大豆苷、大豆苷元RSD分别为2.04%,1.98%,2.22%,表明供试品溶液在10 h内稳定性良好。

2.3.6 重复性试验 取同一批醋制葛根药材粉末约0.1 g,共6份,按2.3.2项供试品溶液制备方法分别制备6份供试品溶液,精密吸取10 μL,按上述色谱条件测定峰面积积分值,葛根素、大豆苷、大豆苷元RSD分别为1.88%,2.46%,2.28%,表明重复性良好。

2.3.7 回收率试验 称取已知含量的醋葛根药材粉末约0.05 g,共6份,精密称定,于每份样品中分别精密加入葛根素、大豆苷、大豆苷元对照品适量,按2.3.2项制备样品溶液,按上述色谱条件进行测定,结果见表2。

表2 葛根素、大豆苷、大豆苷元加样回收率试验

检测指标	样品平均含量/mg	加入量/mg	平均测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
葛根素	2.4073	2.0560	4.4347	99.36	1.85
大豆苷	0.2509	0.2880	0.5386	99.94	2.04
大豆苷元	0.1051	0.1196	0.2225	99.02	2.37

2.3.8 样品含量测定 按2.3.2项下方法制备供试品溶液,分别对9批葛根醋制品进行测定。结果见表3,4。

表3 葛根醋制工艺正交试验安排(C为空白项)

No.	A	B	C	D	葛根素/%	大豆苷/%	大豆苷元/%	综合加权*
1	1	1	1	1	5.0924	0.4622	0.1858	5.7405
2	1	2	2	2	4.8342	0.5494	0.1666	5.5503
3	1	3	3	3	3.6546	0.3532	0.1483	4.1561
4	2	1	2	3	2.2678	0.3597	0.2078	2.8354
5	2	2	3	1	5.0437	0.5460	0.1509	5.7407
6	2	3	1	2	4.4193	0.5024	0.1058	5.0276
7	3	1	3	2	4.0518	0.2666	0.1688	4.4873
8	3	2	1	3	3.5699	0.4001	0.1496	4.1197
9	3	3	2	1	4.7307	0.4580	0.2502	5.4391
K_1	5.149	4.354	4.963	5.640				
K_2	4.535	5.137	4.608	5.022				
K_3	4.682	4.874	4.795	3.704				
R	0.614	0.782	0.354	1.936				

注:*表示葛根素、大豆苷及大豆苷元三者含量之和。

结果显示因素D的水平变化对试验结果有显著影响,确定为3水平;因素A,B对结果无显著影响,遵循均匀润透和提高效率的原则,确定因素A为2水平,因素B为1水平。最终确定葛根醋制的

最佳工艺为 $A_2B_1D_3$,即取一定量葛根,加入20%辅料(醋),闷润0.5 h,文火炒制30 min。

2.4 验证试验 根据正交试验所得的葛根最佳醋制工艺,制备3份醋葛根,每份200 g,按2.3.2项方

表 4 正交试验方差分析

方查来源	SS	f	MS	F	P
A	0.617 3	2	0.308 6	3.275 3	<0.05
B	0.951 5	2	0.475 7	5.048 2	
D	5.868 9	2	2.934 4	31.138 2	
C(误差)	0.188 4	2	0.094 2	1	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$, $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

法制备供试品溶液,在 2.3.1 项色谱条件下,精密吸取上述对照品溶液与各供试品溶液 10 μ L,对葛根素、大豆苷、大豆苷元的含量进行测定。结果葛根素、大豆苷及大豆苷元平均质量分数分别为 4.84%, 0.50%, 0.21%; RSD 分别为 0.66%, 2.63%, 2.29%。说明该结果稳定、可行。

3 讨论

实验对葛根素、大豆苷、大豆苷元对照品和样品溶液进行紫外全波长扫描,结果发现葛根素、大豆苷、大豆苷元分别在 249.5, 248.4, 248.4 nm 处有最大吸收,参照 2010 年版《中国药典》^[1],最终确定 250 nm 作为测定波长。

试验比较醋拌、醋拌高压蒸制、醋拌文火炒制和切制生品中药效成分的含量,结果表明不同方法炮制的葛根中药效成分的含量不同,其含量由大到小为醋拌文火炒制 > 醋拌 > 切制生品 > 拌醋高压蒸制,高压蒸制可能引起葛根中药效成分的破坏,导致含量下降。

从葛根样品色谱图上可以看出,葛根素之后有 2 个峰面积较大的组分,这 2 个组分很可能也是葛根中的主要功效成分,关于其结构及测定方法有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:312.

[2] 易红,杨华.葛根的品种产地和提取工艺研究概况

[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(11):60.

[3] 刘亚明,牛欣,刘光珍,等.复方葛根胶囊对实验性糖尿病、高脂血症模型血糖和血脂作用的实验研究[J].中国医药学报,2003,18(6):344.

[4] 刘亚明,赵丽娟,陈晓云,等.复方葛根胶囊治疗 107 例 2 型糖尿病临床观察[J].中华中医药杂志,2005,20(2):98.

[5] 郭宇洁,孟硕,徐辉,等.葛根素和葛根黄酮的药代动力学研究概述[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(6):82.

[6] 于林,陈宝田,谢炜,等.葛根提取物对大鼠退变颈椎间盘基质代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):163.

[7] 李燕燕,边宝林,杨健,等.葛根丹参胶囊成型工艺的研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(4):22.

[8] 王金萍,曾明,边佳明,等.葛根复方对创伤应激大鼠神经内分泌的调整作用[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(3):50.

[9] 陈丽红,唐于平,王强.葛根芩连配方颗粒提取工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(14):4.

[10] 丁安伟.中国传统工艺全集·中药炮制[M].郑州:大象出版社,2004:12,121.

[11] 刘舒平,王静竹,刘春生.HPLC 测定葛根炮制品中葛根素的含量[J].中国中药杂志,1998,23(12):723.

[12] 解统新.浅谈葛根炮制[J].山东中医杂志,2003,22(8):496.

[13] 于少军,王月敏,李绍华,等.葛根炮制前后化学成分的对比如[J].中国中药杂志,1992,17(9):534.

[14] Hayakaw J, Noda N, Yamada S, et al. Studies on physical and chemical quality evaluation of crude drug preparations [J]. Yakugaku Zasshi, 1984,104(1):50.

[15] 李国辉,张庆文,王一涛.葛根的化学成分研究[J].中国中药杂志,2010,35(23):3156.

[16] 裴莉昕,陈随清,纪宝玉,等.不同产地葛根药材的质量分析[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(10):24.

[责任编辑 仝燕]