

葛根提取工艺研究

白海波, 李 波, 宋子荣 (海南药物研究所有限公司, 浙江 杭州 310009)

摘要: 目的: 优选葛根提取过程中的有关工艺参数。方法: 以葛根素含量为指标, HPLC 法为测定方法, 提取率为评价标准, 采用重复正交实验法优化提取工艺。结果: 乙醇浓度、提取时间、提取次数均对提取率有显著的影响, 溶剂倍量影响不大。结论: 葛根最佳提取工艺条件为加 8 倍量 70% 乙醇, 回流提取 3 次, 每次 1.5h。

关键词: 葛根; 葛根素; 重复正交实验法

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)06-0014-02

葛根的主要有效成分为葛根异黄酮类化合物, 以葛根素含量为最高。本品习用解肌退热, 生津止渴, 透疹发斑, 用于外感发烧、头痛、口渴等病症。其有效成分的提取用乙醇作溶剂的为多, 一方面是由于水提工艺提取的葛根素含量低^[1], 一方面有研究资料表明体内、体外抗菌作用、体外抗病毒作用与葛根素含量呈正相关性, 水提工艺无论水提时间长短对药物效果影响不大, 而采用乙醇提取工艺对药物的活性产生显著影响^[2]。因此, 本文利用 HPLC 对葛根提取工艺进行较为全面的研究。

1 仪器、试剂及色谱条件

岛津 LC-10AT 色谱仪, SPD-10A 检测器, CLASS-VP 色谱工作站, 葛根(购自华东医药有限公司), 葛根素对照品(中国药品生物制品鉴定所, 供含量测定用, 批号 0752-9806), 所用试剂除流动相用色谱纯外, 均采用分析纯。

色谱条件, 瑞士 SPHERIGEL C₁₈ 柱, 150 × 4.6mm; 柱温: 30℃; 流速: 1ml/min; 流动相: 乙腈: 水 (12: 88); 进样量: 20μl; 检测波长: 252nm; 灵敏度: 0.0500AUFS。

2 方法与结果

2.1 水提、醇提工艺的比较

2.1.1 工艺条件 精密称取葛根二份, 每份 10.0g, 分别加水和 70% 乙醇 100ml, 提取 1h, 药渣继续提取, 重复操作共 5 次, 分别合并水提液和醇提液并定容至 500ml。

2.1.2 含量测定 将提取液 10 倍稀释, HPLC 法测定葛根素含量, 色谱条件见上。提取液水浴挥干均得棕黄色固体, 称量, 结果见表 1。

表 1 葛根水提、醇提工艺比较

| 工艺 | 样本数 | 葛根素含量(mg) | 提取液中固形物重量(g) | 葛根素中固形物含量(%) | 葛根素提取率(%) |
|----|-----|-----------|--------------|--------------|-----------|
| 水提 | 2 | 373.1 | 1.6574 | 22.5 | 93.5 |
| 醇提 | 2 | 387.6 | 1.1004 | 35.2 | 97.1 |

根据以上实验结果, 醇提所得葛根素含量高, 且固形物重量低, 所以乙醇为溶剂进行提取效果较好。

2.2 葛根乙醇提取工艺 为确定葛根乙醇提取工艺, 采用正交实验进行优选。在制备工艺研究中, 主要以葛根素浸出率为考察指标。因此必须先测定葛根药材中葛根素的含量。

2.2.1 葛根药材中葛根素的含量测定 精密称取葛根粉末 10.0g, 加 70% 乙醇 200ml, 加热回流提取 5 次, 每次 2h, 放冷, 定容至 1000ml, 过滤。按 HPLC 方法测定, 葛根素含量为 39.9mg/g。

2.2.2 重复正交实验法 以葛根素浸出率为指标, 进行 L₉(3⁴) 的正交实验, 正交因素、水平见表 2, 相同条件提取试验重复三次。

表 2 正交实验因素、水平表

| 水平 | 因素 | | | |
|----|---------|--------|---------|---------|
| | A | B | C | D |
| | 乙醇浓度(%) | 溶剂量(倍) | 提取时间(h) | 提取次数(次) |
| 1 | 60 | 8 | 0.5 | 1 |
| 2 | 70 | 10 | 1 | 2 |
| 3 | 80 | 12 | 1.5 | 3 |

2.2.3 正交实验结果 精密量取上述样品溶液用 HPLC 仪进行测定, 以外标法计算葛根素含量, 并和测得的药材葛根素含量作比较, 计算葛根提取过程中葛根素的提取率(提取出的葛根素含量/药材中葛根素含量 × 100%)。计算结果及方差分析结果见表 3, 表 4。

表 3 葛根药材提取条件正交实验表

| 实验号 | A | B | C | D | 葛根素提取率 (%) | | | |
|---------|--------|-------|---------|---------|---------------------------|-------|-------|------------|
| | | | | | y_1 | y_2 | y_3 | Σy |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 48 | 50 | 44 | 142 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 76 | 71 | 78 | 225 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 95 | 93 | 93 | 281 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 91 | 94 | 90 | 275 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 68 | 73 | 70 | 211 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 71 | 77 | 73 | 221 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 93 | 90 | 91 | 274 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 80 | 76 | 78 | 234 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 67 | 60 | 64 | 191 |
| I_j | 648 | 691 | 597 | 544 | $G = \Sigma y_i = 2054$ | | | |
| II_j | 707 | 670 | 691 | 720 | $G^2 = 4218916$ | | | |
| III_j | 699 | 693 | 766 | 790 | $CT = G^2/27 = 156256.15$ | | | |
| 离均差平方和 | 227.63 | 36.07 | 1593.41 | 3570.07 | | | | |
| 误差平方和 | 124.67 | | | | | | | |

表 4 葛根药材提取因素方差分析

| 来源 | 离均差平方和 | 自由度 | 方差 | F 值 | 显著性 |
|----|---------|-----|---------|-------|------------|
| A | 227.63 | 2 | 113.82 | 16.43 | $P < 0.01$ |
| B | 36.07 | 2 | 18.04 | 2.60 | |
| C | 1593.41 | 2 | 796.7 | 115.0 | $P < 0.01$ |
| D | 3570.07 | 2 | 1785.03 | 257.7 | $P < 0.01$ |
| 误差 | 124.67 | 18 | 6.93 | | |

查方差分析表, $F_{0.05(2, 18)} = 3.55$, $F_{0.01(2, 18)} = 6.01$, 由上可见, 较佳提取条件应为 $A_2B_3C_3D_3$, 但本工艺中 B 因素为不显著因素, 且 3 水平值相近, 考虑

到工业生产中节约要求, 定溶剂倍量为 8 倍, 即每次加 70% 乙醇 8 倍量, 回流提取 3 次, 每次 1.5h。

2.3 最佳提取工艺的再验证 按上述优选的提取工艺条件即每次加 70% 乙醇 8 倍量, 回流提取 3 次, 每次 1.5h 进行提取试验, 结果葛根素的提取率为 98%, 表明优选出的工艺合理可行。

3 结果及讨论

3.1 从表 1 可以看出, 葛根的水提和醇提工艺对葛根素的提取有较大的差别, 醇提法不仅葛根素含量高, 而且提取液中总固形物的量少, 提高了单位质量药物中葛根素的百分率。

3.2 由于提取次数对葛根素提取率的影响最为显著, 为进一步优化醇提工艺, 我们进行了醇提次数的优选实验。发现两次醇提葛根素提取率为 93%, 已基本提取完全。考虑到工业生产中节约要求, 可以将提取次数改为 2 次。

3.3 正交实验设计方差分析, 误差平方和(1_误)可以从两个途径计算得出, 一是空列, 二是重复实验。本实验为三水平四因素试验, 用 $L_9(3^4)$ 正交表, 刚好将表格填满, 没有空列进行误差分析。因此, 我们采用重复正交实验法(三次重复), 以减少实验误差, 提高实验的精确程度^[3]。

参考文献:

- [1] 余建清, 雷嘉川, 赵霞, 等. 通脉冲剂制备工艺改进及含量测定的研究[J]. 中医药学报, 1998, 3: 53-54.
- [2] 王胜春, 胡咏武, 贺雪梅, 等. 正交试验制备工艺对柴葛冲剂药效学的影响[J]. 中成药, 1999, 21(2): 56-59.
- [3] 王仁安, 医学实验设计与统计分析[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000: 58-61.