

- α -平滑肌肌动蛋白和 Smad3 表达的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 18(4):233-235.
- [4] BaeMA, Rhee SD, JungWH, et al. Selective inhibition of activated stellate cells and protection from carbon tetrachloride-induced liver injury in rats by a new PPARgamma agonist-KR62776 [J]. Arch Pharm Res. 2010, 33(3): 433-442.
- [5] 李林蔚, 周景华, 刘华生. 柴胡桂枝汤对肝纤维化大鼠 FN、 α -SMA 表达的影响[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(2):265-267.
- [6] 刘华生, 刘洋, 周景华. 柴胡桂枝汤对肝纤维化大鼠 TNF- α 、CTGF 表达的影响[J]. 中医药学报, 2011, 39(6):35-37.
- [7] 周荣佼, 王金燕, 孙健, 等. 老年缺血性脑卒中患者颈动脉斑块性质与血脂、细胞纤维结合蛋白和同型半胱氨酸水平的关系[J]. 郑州大学学报(医学版), 2014, 49(6):876-878.
- [8] Reob F, Matern S. Fibronectin-a key substance in pathogenesis of liver-cirrhosis Leber Magen Darm, 1993, 23(6):239.
- [9] 程多智, 谭莹, 赵颖, 等. PA、FN、ADA、CHE 和 51-NT 联合检测在肝脏疾病中的应用[J]. 河北医药, 2013, 35(20):3102-3103.
- (本文编辑:张文娟 本文校对:韩立民 收稿日期:2018-09-03)

正交设计优选葛根超声加热提取工艺[※]

郭爱灵^{1,2} 姚斯琪¹ 姚涛¹ 潘斯庆¹ 周刘华¹ 常跃兴^{1,2*}

(1 安徽理工大学医学院药理学系, 安徽 淮南 232001; 2 安徽理工大学医学前沿实验中心, 安徽 淮南 232001)

摘要:目的 正交设计优选皖南野生葛根超声加热提取工艺。方法 以葛根总黄酮和葛根素为考察指标, 采用单因素考察和正交试验设计对皖南野生葛根超声加热提取工艺进行优化。结果 在考察因素变化范围内, 总黄酮和葛根素均随超声温度增加而增加, 随超声时间延长而增加, 乙醇浓度为 60% 时出现极值, 在液料比为 10:1 处出现极值; 正交试验结果表明, 四因素对总黄酮和葛根素提取率影响大小顺序为超声温度 > 乙醇浓度 > 超声时间 > 液料比。结论 皖南野生葛根最佳超声加热提取工艺参数为乙醇浓度为 60%, 超声温度为 60℃, 超声时间为 60 min, 液料比为 5:1。

关键词: 超声加热提取工艺; 葛根; 总黄酮; 葛根素

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2019.02.043

文章编号:1672-2779(2019)-02-0107-04

Optimization of Ultrasonic Heating Extraction Process of Puerariae Lobatae Radix by Orthogonal Design

GUO Ailing^{1,2}, YAO Siqi¹, YAO Tao¹, PAN Siqing¹, ZHOU Liuhua¹, CHANG Yuexing^{1,2*}

(1. Pharmacy Department, Medical College, Anhui University of Science and Technology, Anhui Province, Huainan 232001, China; 2. Center for Frontier Laboratory of Medicine, Anhui University of Science And Technology, Anhui Province, Huainan 232001, China)

Abstract: Objective To optimize the ultrasonic heating extraction process of wild Puerariae Lobatae Radix in southern Anhui province by orthogonal design. **Methods** With the total flavonoids and puerarin as the indexes in the experiment, the single factor and orthogonal experimental design were used to optimize the ultrasonic heating extraction process of wild Puerariae Lobatae Radix in southern Anhui province. **Results** In the designated range of factors, the contents of the total flavonoids and puerarin increased equally with the rising of ultrasonic temperature, the expanding of ultrasonic time, and their appeared respectively in 60% of ethanol concentration and in ratio of 10:1 of solid-liquid ratio; the Results of orthogonal test showed that The influence factors in the order of impacting the extraction rates of total flavonoids and puerarin are from the large to the small as ethanol concentration, ultrasonic temperature, ultrasonic time and solid-liquid ratio. **Conclusion** The optimum extraction parameters of wild Puerariae Lobatae Radix in southern Anhui province by orthogonal design were 60% of ethanol concentration, 60℃ of ultrasonic temperature, 60 min of ultrasonic time, and 5:1 of liquid ratio.

Keywords: ultrasonic heating extraction process; radix puerariae; extraction process; total flavonoids; puerarin

在医药工业大生产中葛根提取率直接影响其资源利用率, 制剂生产效率及经济效益^[1]。葛根提取技术见于报道的有传统浸提法^[2]、煎煮法、加热回流法^[3-4]、半仿生提取法^[5]、微波辅助提取法^[6]、超声波辅助提取法^[7]、超声波-微波辅助提取法^[8], 以及用超声波和热回流联合提取法等^[9]。前期实验表明, 可采用超声波辅助提取法

替代加热回流法对野葛样品进行处理^[10]。本文进一步采用超声加热提取方法, 以主要活性成分葛根总黄酮和葛根素 (puerarin, 1)^[11]含量为指标, 对该提取工艺参数进行单因素考察和正交设计优选, 以探讨葛根最佳提取工艺。

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Plus C 18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm, 北京迪马欧泰科技发展中心); UV1902 型紫外可见分光光度计 (上海棱光技术有限公司); KQ-100 DE 型超声波清

※ 基金项目: 安徽理工大学引进人才基金项目 [No.11079]; 安徽理工大学大学生创新创业训练计划项目 [No.201610361317]

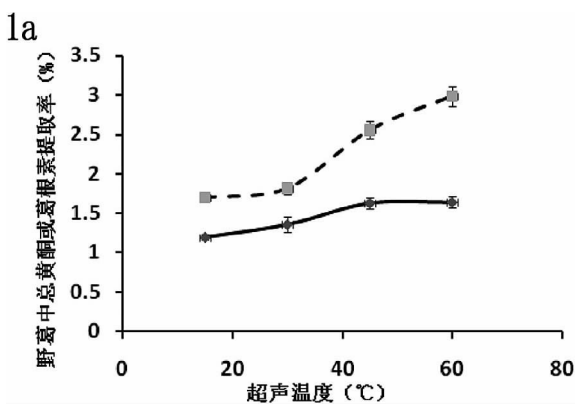
* 通讯作者: yxchang@aust.edu.cn

洗器(工作频率为40 kHz,最大超声功率为100 W,昆山超声仪器有限公司);MS105DU型十万分之一天平(梅特勒托利多国际贸易有限公司);BSM 220.4型分析天平(上海精卓电子科技有限公司);DE-100 G型多功能小型粉碎机(浙江红景天工贸有限公司)。甲醇(色谱纯,美国Merk公司);水(超纯水);葛根(采自于安徽省芜湖市芜湖县境内山坡,趁鲜切成5 μm见方的小块,干燥备用,经山东中医药大学药学院李峰教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根);葛根素对照品(批号为110752-201514,供含量测定用,购于中国药品生物制品检定研究院);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 单因素考察 根据中药提取原理及其影响因素,本文首先以总黄酮提取率(%)和葛根素提取率(%)为指标选取超声温度、超声时间、乙醇浓度以及液料比对皖南野生葛根超声加热提取工艺单因素进行考察。总黄酮提取率(%)和葛根素提取率(%)采用文献^[4]报道的方法,经方法学验证均符合含量测定要求。

2.1.1 超声温度 精密称取5 g葛根备用药材,按照液料比为10:1加入60%乙醇,浸泡30 min后分别在设定加热温度为15, 30, 45, 60 ℃下,超声提取30 min。提取液自然冷却以60%乙醇补足损失的重量,振摇后过滤,弃去初滤液,取续滤液适量稀释后在250 nm吸收波长处测定吸光度,并代入回归方程计算总黄酮含量;取续滤液1 mL置于10 mL容量瓶,以20%乙醇定容至刻度线,振摇,在2.1项色谱条件下进样20 μL,代入回归方程计算葛根素含量。结果如图1a所示。



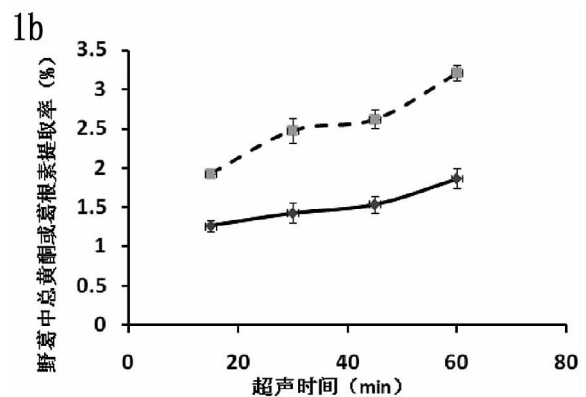
n=3,虚线为总黄酮随单因素变化曲线,实线为葛根素随单因素变化曲线

图1 超声温度对皖南野葛中总黄酮及葛根素提取率的影响

从图1a可见,随着超声温度的增加,总黄酮提取率呈增加趋势,而葛根素提取率在45 ℃时最高;提取

温度30 ℃以下对总黄酮提取率影响不大,30 ℃以后随温度增加总黄酮提取率增幅较大,而提取温度对葛根素提取率增幅影响不大。

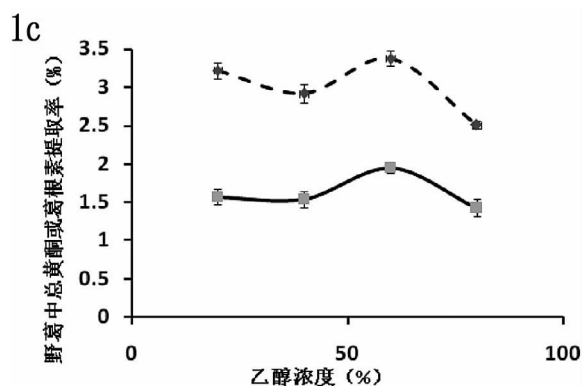
2.1.2 超声时间 精密称取5 g葛根备用药材,按照液料比为10:1加入60%乙醇,浸泡30 min后在设定加热温度为45 ℃下分别超声提取15, 30, 45, 60 min。提取液后续处理及含量测定同2.2.1项下操作,结果如图1b所示。从图1b可见,随着超声时间的延长,总黄酮和葛根素提取率均有增加的趋势,且增幅变化较大,而超声时间对总黄酮提取率比对葛根素提取率提高较为显著。



n=3,虚线为总黄酮随单因素变化曲线,实线为葛根素随单因素变化曲线

图2 超声时间对皖南野葛中总黄酮及葛根素提取率的影响

2.1.3 乙醇浓度 精密称取5 g葛根备用药材,按照液料比为10:1分别加入20%, 40%, 60%, 80%乙醇,浸泡30 min后在设定加热温度为45 ℃下超声提取60 min。提取液后续处理及含量测定同2.2.1项下操作,结果如图1c所示。从图1c可见,乙醇浓度对总黄酮和葛根素提取率及其增幅均有较大,且总黄酮和葛根素提取率在60%处均出现最大值。

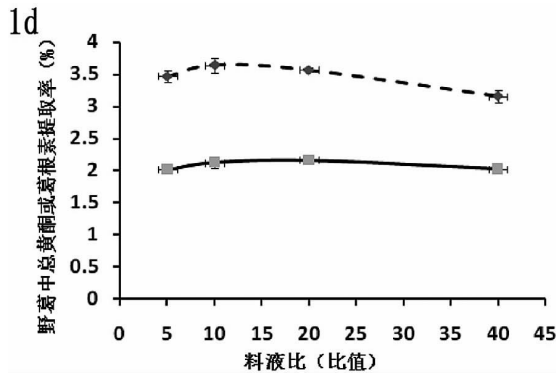


n=3,虚线为总黄酮随单因素变化曲线,实线为葛根素随单因素变化曲线

图3 乙醇浓度对皖南野葛中总黄酮及葛根素提取率的影响

2.1.4 液料比 精密称取5 g葛根备用药材,分别按照液料

比为 5:1, 10:1, 20:1, 40:1 加入 60% 乙醇, 浸泡 30 min 后在设定加热温度为 45 °C 下超声提取 60 min。提取液后续处理及含量测定同 2.2.1 项下操作, 结果如图 1d 所示。从图 1d 可见, 随着提取溶剂与药材比例的增加, 总黄酮和葛根素提取率均有先增加后减小的趋势, 且在液料比 10:1 处出现最大值。



n=3, 虚线为总黄酮随单因素变化曲线, 实线为葛根素随单因素变化曲线

图4 料液比对皖南野葛中总黄酮及葛根素提取率的影响

2.1.5 单因素考察极差分析 以不同水平为考察指标, 对各单因素不同水平总黄酮提取率 (%) 和葛根素提取率 (%) 最大值与最小值之差, 即极差进行统计, 结果见表 1。

表1 皖南野生葛根超声加热提取工艺单因素考察极差分析 (%)

提取率	超声温度极差	超声时间极差	乙醇浓度极差	液料比极差
总黄酮	1.29	1.28	0.76	0.24
葛根素	0.60	0.44	0.53	0.15

从以上结果分析, 超声温度对总黄酮提取率 (%) 和 1 提取率 (%) 影响均最大, 以总黄酮提取率 (%) 为指标, 四因素影响大小顺序为超声温度>超声时间>乙醇浓度>液料比; 以葛根素提取率 (%) 为指标, 四因素影响大小顺序为超声温度>乙醇浓度>超声时间>液料比。

2.2 正交实验设计 为优选皖南野生葛根超声加热提取工艺, 根据正交试验设计方法原则和单因素实验考察结果, 分别设定超声温度 30, 45, 60 °C, 超声时间 30, 45, 60 min, 乙醇浓度 40%, 60%, 80%, 液料比 5:1、10:1、20:1, 四因素三水平选用 (L₉3⁴) 表进行实验, 因素水平表见表 2。

表2 皖南野生葛根超声加热提取工艺正交设计

水平	A(超声温度/°C)	B(超声时间/min)	C(乙醇浓度/%)	D(液料比)
1	30	30	40	5/1
2	45	45	60	10/1
3	60	60	80	20/1

2.2.1 正交试验极差分析 9 次实验总黄酮提取率 (%)、

葛根素提取率 (%) 实验结果, 以及采用 SPSS 23.0 软件处理所得极差分析结果均见表 3。

表3 皖南野生葛根超声加热提取工艺正交实验极差分析结果

实验次数	A	B	C	D	总黄酮提取率 (%)	葛根素提取率 (%)
1	1	1	1	1	5.11	2.49
2	1	2	3	2	3.47	1.87
3	1	3	2	3	5.78	2.91
4	2	1	3	3	3.73	2.03
5	2	2	2	1	6.20	2.89
6	2	3	1	2	7.14	3.07
7	3	1	2	2	6.60	3.02
8	3	2	1	3	6.57	3.01
9	3	3	3	1	5.74	3.06
总黄酮K ₀ (%)	14.36	15.44	18.82	17.04		
总黄酮K ₁ (%)	17.07	16.23	18.58	17.21		
总黄酮K ₂ (%)	18.91	18.66	12.94	16.09		
总黄酮R(%)	4.55	3.22	5.65	0.95		
葛根素K ₀ (%)	7.27	7.54	8.57	8.44		
葛根素K ₁ (%)	7.99	7.77	8.82	7.96		
葛根素K ₂ (%)	9.09	9.04	6.96	7.95		
葛根素R(%)	1.82	1.50	1.86	0.49		

从表 3 极差分析结果看出, 乙醇浓度对总黄酮提取率 (%) 和葛根素提取率 (%) 影响均最大, 直观分析以总黄酮提取率 (%) 为指标最佳提取工艺为 C₁A₃B₃D₂, 四因素影响大小顺序为 C>A>B>D; 以葛根素提取率 (%) 为指标最佳提取工艺为 C₂A₃B₃D₁, 四因素影响大小顺序为 C>A>B>D。以上结果表明, 提取因素对总黄酮提取率 (%) 和葛根素提取率 (%) 影响大小顺序一致, 仅在因素 C (乙醇浓度/%) 和 D (液料比) 水平上有一定差异。

2.2.2 正交试验方差分析 正交试验 9 次实验总黄酮提取率 (%)、葛根素提取率 (%) 实验结果采用 SPSS 19.0 软件处理所得方差分析结果均见表 4~5。

表4 葛根中总黄酮含量测定正交实验方差分析

方差来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	50.955 ^a	8	6.369	47.105	**
A	16.428	2	8.214	60.749	**
B	6.162	2	3.081	22.785	**
C	27.521	2	13.760	101.766	**
D	0.844	2	0.422	3.122	

注: a. R² = 0.913; F_{0.05}(2, 2) = 19.00; F_{0.1}(2, 2) = 9.00 **为具有显著性差异

表5 葛根中葛根素含量测定正交实验方差分析

方差来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	0.001 ^b	8	9.702E ⁻⁵	32.642	**
A	0.000	2	0.000	50.854	**
B	0.000	2	6.430E ⁻⁵	21.635	**
C	0.000	2	0.000	54.262	**
D	2.270E ⁻⁵	2	1.135E ⁻⁵	3.818	

注: b. R² = 0.879; F_{0.05}(2, 2) = 19.00; F_{0.1}(2, 2) = 9.00 ; **为具有显著性差异

从表 4 和表 5 方差分析结果看, A (超声温度)、B (超声时间) 和 C (乙醇浓度) 对总黄酮提取率 (%) 和葛根素提取率 (%) 均有显著性影响, 且仍然是乙醇浓度对二者影响最大; D (液料比) 对总黄酮提取率 (%) 和葛根素提取率 (%) 均无显著性影响; A (超声温度)、B (超声时间) 和 C (乙醇浓度) 三因素对总黄酮提取率 (%) 和葛根素提取率 (%) 影响大小顺序均为 C>A>B。这与正交试验极差分析结果一致, 而与单因素考察实验结果极差分析不甚一致。

2.3 验证试验 根据正交实验结果对总黄酮提取最佳工艺 $C_1A_3B_3$ 和葛根素最佳提取工艺为 $C_2A_3B_3$ 进行验证, 结果见表 6。

表 6 葛根中总黄酮和葛根素最佳提取工艺验证实验结果表

提取率 (%)	$C_1A_3B_3$		$C_2A_3B_3$	
	均值	RSD (%)	均值	RSD (%)
总黄酮	7.19	3.00	7.32	2.70
葛根素	3.52	2.68	3.62	1.80

从表 6 结果可看出, 总黄酮最佳工艺 $C_1A_3B_3$ 和葛根素最佳提取工艺为 $C_2A_3B_3$ 总黄酮提取率 (%) 和葛根素提取率 (%) 均远高于正交设计 9 次实验最大值, 且重现性好, 表明提取工艺条件基本稳定。然而出现了总黄酮最佳工艺 $C_1A_3B_3$ 总黄酮提取率 (%) 比提取工艺为 $C_2A_3B_3$ 高 0.13% 的结果。

3 讨论

3.1 液料比对提取工艺的影响 无论从正交实验极差分析和方差分析结果看, D (液料比) 对总黄酮提取率 (%) 和葛根素提取率 (%) 影响不甚明显。结合实际生产, 为节约材料、简化工艺并利于后续浓缩干燥操作将 D (液料比) 均可设定为 5:1。

3.2 单因素考察极差、正交实验极差及正交实验方差对比 正交实验方差分析结果与正交试验极差分析结果基本一致, 而与单因素考察实验结果极差分析不甚一致。这可能是因为单因素极差分析只是简单地将最值进行加减, 而正交试验方差和极差分析则是对多组数据的影响进行综合评价, 通过最佳工艺验证也可证明正交试验结果的可靠性; 对多因素多水平仅对单因素考察具有一定的局限性, 需要加以正交设计实验、均匀设计实验以及响应面设计实验等进一步验证。

3.3 正交试验极差分析与方差分析 正交试验极差分析结果与方差分析基本一致, 同时使用方差分析和极差分析对正交实验数据进行分析可使二者相互印证, 增加了实验结果的可信度。

3.4 正交试验优选工艺与验证实验 总黄酮最佳工艺 $C_1A_3B_3$

总黄酮提取率 (%) 比提取工艺为 $C_2A_3B_3$ 高 0.13%, 这可能是因为总黄酮对不同水平的乙醇浓度不慎敏感, 这从正交试验不同水平乙醇浓度对总黄酮含量影响结果, 特别是 40% 和 60% 这 2 个浓度的结果可以看出。

3.5 粉碎粒度对提取工艺的影响 为与葛根提取大生产相适应并便于过滤, 实验过程中采用药材不粉碎而直接考察其提取工艺, 实验结果与以前样品处理方法所得结论有所不同^[10], 可能是因为粉碎粒度对葛根总黄酮和葛根素提取率的影响有很大关系, 而且也会影响其他提取参数对葛根总黄酮和葛根素提取率的影响, 这需要进行进一步验证和考察。

参考文献

- [1] 王赛君, 伍振峰, 杨明, 等. 中药提取新技术及其在国内的转化应用研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8):1360-1367.
- [2] 陈训, 段林东, 赵良忠. 葛根全原粉中葛根素的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(36):13018-13020.
- [3] 吴轶, 刘文惠, 黄芳, 等. 葛根总黄酮与葛根素提取工艺优化及增强结肠炎大鼠抗氧化能力[J]. 现代食品科技, 2017, 33(10):117-126.
- [4] 时晓妮, 贺志龙, 顾健, 等. 基于 5 种葛根异黄酮组分综合评价法优选葛根提取工艺[J]. 现代中药研究与实践, 2016, 30(3):49-52.
- [5] 王京龙, 郑丹丹, 王磊. 均匀设计法优化葛根半仿生提取工艺[J]. 中成药, 2017, 39(5):1084-1087.
- [6] 王辉, 刘长路. 微波辅助乙醇提取葛根素技术研究[J]. 绿色科技, 2015, 6(9):308-309.
- [7] 陈帅, 王慧竹, 薛健飞. 响应面法优化超声提取野葛茎中葛根素的工艺[J]. 广东农业科学, 2015, 42(4):60-66.
- [8] 范蕴芳, 胡碧纯, 陈慧, 等. 超声-微波辅助提取葛根异黄酮工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(12):5495-5497.
- [9] 彭菊艳, 王俊儒, 张义英, 等. 葛根有效成分的含量测定与提取工艺优化[J]. 陕西农业科学, 2005, 51(3):52-54.
- [10] 常跃兴, 郭爱灵, 陈铎葆, 等. 样品处理方法对皖南葛根和粉葛中总黄酮和葛根素含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(11):78-81.
- [11] 楚纪明, 马树运, 李海峰, 等. 葛根有效成分及其药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2015, 17(2):142-146.
- [12] 郭超峰, 夏猛, 银胜高, 等. 合欢花总黄酮的抗抑郁作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13):225-228.

(本文编辑:张文娟 本文校对:邓云 收稿日期:2018-09-05)

中醫美歲