

• 药剂与工艺 •

响应面法优选葛根超微粉的制备工艺及活性成分测定研究

孔馨逸¹, 刘妍如^{1*}, 唐志书^{1*}, 王梅², 吕杨¹, 张遥遥¹, 董娇¹, 宋忠兴¹, 钱大玮³

1. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083

2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000

3. 南京中医药大学药学院, 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 建立葛根中 8 种主要黄酮类成分 UPLC 同时测定法, 研究超微粉碎技术对葛根黄酮类成分含量的影响, 确定葛根超微粉的生产工艺。方法 采用响应面设计方法对葛根粉碎技术中的粉碎时间、投药量和初始粒度 3 个因素进行考察, 以粒径分布 (D_{90} 、 D_{50}) 和 UPLC 法测定的不同粒径葛根粉 (10~40、40~65、300 目) 中 8 个黄酮类活性成分 (3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素和芒柄花素) 的含量数据, 共 10 个指标作为响应因子进行葛根超微粉碎技术评价研究。结果 葛根中 8 种黄酮类化合物分别在 75.8~242.7、205.6~658.0、147.3~417.3、10.2~163.3、11.3~182.0、1.2~18.8、0.25~4.00、0.35~5.37 $\mu\text{g/mL}$ 与色谱峰峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率为 98.86%、99.25%、99.90%、100.17%、100.21%、101.40%、100.73%、101.42%, RSD 均小于 3.0%, UPLC 同时测定结果显示, 相较于其他粒径葛根粉, 葛根超微粉 (300 目) 黄酮类含量更高。响应面法优选结果显示超微粉的最佳工艺参数条件为在粒径为 80 目 [$(180.0 \pm 7.6) \mu\text{m}$], 通过 5 号筛时, 投药量为 247 g, 粉碎时间为 26 min。结论 响应面法优选的葛根超微粉碎工艺简便, 准确度较高, 得到的超微粉黄酮含量更高。该工艺可以为葛根超微粉碎技术提供参考。

关键词: 葛根; 超微粉; 3'-羟基葛根素; 葛根素; 3'-甲氧基葛根素; 大豆苷; 染料木苷; 大豆苷元; 染料木素; 芒柄花素; 响应面法; 超高效液相色谱法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)13-2993-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.007

Optimization of ultrafine powders preparation process from *Puerariae Lobatae Radix* by response surface method and multiple isoflavonoids determination

KONG Xin-yi¹, LIU Yan-ru¹, TANG Zhi-shu¹, WANG Mei², LV Yang¹, ZHANG Yao-yao¹, DONG Jiao¹, SONG Zhong-xing¹, QIAN Da-wei³

1. Shaanxi Province Drug Discovery Center of Innovation, Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

2. The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

3. Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization of Jiangsu Province, Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medical Formula Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish simultaneous determination method of eight main flavonoids from *Puerariae Lobatae Radix* (PLR) by using UPLC, and to study the effect of ultrafine grinding technology on the content of flavonoids in PLR for optimizing its production process. **Methods** Response surface method was used to investigate the crushing time, sampling capacity, and initial

收稿日期: 2018-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81501229); 陕西省科技厅“科技新星”培养计划 (2017KJXX-71); 陕西省科技统筹创新工程计划项目 (2015KTZDSF02-05-02); 陕西省创新药物研究中心 (2017YWZX-01)

作者简介: 孔馨逸 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂。Tel: (029)38182207 E-mail: KongXinYi1994@126.com

*通信作者 唐志书, 男, 硕士生导师, 主要从事中药制剂制备技术的研究。Tel: (029)38185060 E-mail: tzs6565@163.com

刘妍如, 女, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药物质基础研究。Tel: (029)38182207 E-mail: yanzi_2203@aliyun.com

particle size in the superfine pulverizing technology of PLR. Using the particle size distribution (D_{50} , D_{90}), and the content of eight flavonoids (3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, daidzin, genistin, daidzein, genistein, and formononetin) from PLR powders with various particle sizes (10—40, 40—65, 300 mesh) determined by UPLC, we selected these 10 elements as the response factors to evaluate the ultrafine powders technology for PLR. **Results** Eight flavonoids from PLR had a good linear relationship with the linear range of 75.8—242.7, 205.6—658.0, 147.3—417.3, 10.2—163.3, 11.3—182.0, 1.2—18.8, 0.25—4.00, 0.35—5.37 $\mu\text{g/mL}$, and the average recovery ranged from 98.86%, 99.25%, 99.90%, 100.17%, 100.21%, 101.40%, 100.73%, and 101.42%. In addition, the repeatability, stability, and precision RSD were all less than 3%. UPLC result showed that, compared with the PLR powders with other particle sizes, the ultrafine powder of PLR (300 mesh) had a higher flavonoids contents. Results of response surface method showed the optimized preparing parameters of PLR ultrafine powder technology as follows: 80 mesh [$(180 \pm 7.6) \mu\text{m}$] of particle size, 247 g of sampling amount, and 26 min of crushing time. **Conclusion** Optimization of ultrafine powders process from PLR by response surface method is simple and accurate, which can obtain PLR ultrafine powder with higher content of flavonoids. This process can provide reference for the ultrafine grinding technology of PLR.

Key words: *Puerariae Lobatae Radix*; ultrafine powder; 3'-hydroxy puerarin; puerarin; 3'-methoxy puerarin; daidzin; genistin; daidzein; genistein; formononetin; response surface methodology; UPLC

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 收载于《中国药典》2015 年版一部, 具有解肌退热、生津止渴、透疹、通经活络等功效^[1]。葛根的主要化学成分为异黄酮, 包括 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、大豆苷元等^[2]。现代临床药理研究表明葛根具有降低血压、减慢心率、降低心肌耗氧量、扩张冠状血管、改善正常和缺血心肌的代谢、抗心律失常、降血糖、调血脂的作用^[3-7]。

葛根素由于其自身化学结构的特点, 在水中的溶解度仅为 0.46%, 而且据有关葛根素口服在动物或人体的药动学研究表明, 葛根素口服自胃肠道吸收较快, 但吸收程度差, 生物利用度低^[8-10]。因此本实验采用超微粉碎的技术将葛根制成溶解度较高、吸收较好的超微粉。中药经过超微处理后, 它可将原生药材从传统粉碎工艺得到中心粒径 150~200 目粉末 (75 μm 以下) 提高到现在的中心粒径为 5~10 μm , 对于一般药材在该细度条件下, 细胞破壁率 $\geq 95\%$ 。其粒度更加细微均匀, 比表面积增加, 药物能更好地分散、溶解在胃肠液里, 与胃肠黏膜的接触面积增大, 更易被胃肠道吸收, 从而大大提高了生物利用度^[11-14]。

Box-Behnken 设计是用来评价因素指标和因素间非线性关系的一种试验设计方法^[15], 具有试验次数相对较少, 评价准确的优点, 广泛用于中药材粉碎工艺优化。UPLC 技术与传统 HPLC 技术相比具有显著缩短分析时间, 改善分离效果, 提高灵敏度和分辨率, 减少溶剂消耗的特点。近年来采用 HPLC 等色谱技术, 已经对葛根中大部分黄酮类成分进行了含量分析, 但采用 UPLC 对葛根中多成分的分析

还少见报道^[16-18]。因此本研究采用 UPLC 法同时对葛根中 8 种黄酮类成分进行含量测定, 作为响应面法优化超微粉碎工艺的评价指标, 从多成分含量角度评价粉碎工艺, 对工艺进行优化。

1 仪器与材料

1.1 仪器

鑫博得高速万能粉碎机 FW-1000AD, 天津鑫博得仪器有限公司; 细胞级超微粉碎机, 济南天宇专用设备有限公司; Mastersizer3000 马尔文激光粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; Waters Acquity UPLC H-Class System, 配备 Acquity UPLC QSM、Acquity UPLC Sample、Manager FTN、Acquity UPLC PDA Detector 以及 Empower 2 工作站, 美国 Waters 公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 十万分之一电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司。

1.2 材料

对照品芒柄花素 (批号 X3440010)、大豆苷元 (批号 52300050) 购自上海安谱实验科技股份有限公司; 对照品 3'-羟基葛根素 (批号 HH148457198)、3'-甲氧基葛根素 (批号 HA06010698) 购自宝鸡辰光生物有限公司; 对照品葛根素 (批号 110752-200410)、染料木苷 (批号 111709-201702)、染料木素 (批号 111704-201302)、大豆苷 (批号 111738-201603) 购自中国食品药品检定研究院; 各对照品质量分数均大于 98%。葛根药材, 产地广西, 批号 20170601, 购自陕西兴盛德药业有限责任公司, 经陕西中医药大学陕西省中药资源产业化协同创新中心张琳教授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 超微粉体的制备

分别称取葛根切片,经粉碎机粉碎成过1号筛(10目)、3号筛(50目)、6号筛(100目)的粉末,再按不同粉碎参数将过不同筛号的粉末置于细胞级超微粉碎机中进行相应的粉碎,备用。

2.2 葛根中8种黄酮类化合物含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Acquity UPLC BEH C₁₈柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为0.1%磷酸水溶液-乙腈,梯度洗脱条件:0~10 min, 10%~100%乙腈;10~13 min, 100%~10%乙腈;13~15 min, 10%乙腈;体积流量0.2 mL/min;进样量为2 μL;柱温35 °C;检测波长254 nm。

2.2.2 混合对照品储备液的制备 分别取3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素、芒柄花素对照品适量,精密称定,加入1:1的甲醇水制成质量浓度分别为28.19、28.40、29.52、30.90、26.10、30.20、29.80、31.60 μg/mL的混合对照品储备液,于4 °C保存。

2.2.3 供试品溶液的制备 取葛根药材按“2.1”项下方法制备成超微粉,精密称定各超微粉0.5 g,加入沸水搅拌均匀,超声(300 W, 50 Hz)处理10 min,过0.22 μm水系微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素、芒柄花素混合对照品储备液0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 mL,分别置于10 mL量瓶中,加1:1的甲醇水稀释至刻度,摇匀,得系列混合对照品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件分析,以对照品峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程分别为3'-羟基葛根素 $Y=3\times 10^7 X+102\ 618$, $r=0.999\ 5$,线性范围75.8~242.7 μg/mL;葛根素 $Y=3\times 10^7 X+701\ 053$, $r=0.999\ 3$,线性范围205.6~658.0 μg/mL;3'-甲氧基葛根素 $Y=2\times 10^7 X+324\ 982$, $r=0.999\ 3$,线性范围147.3~417.3 μg/mL;大豆苷 $Y=3\times 10^7 X+47\ 994$, $r=0.999\ 2$,线性范围10.2~163.3 μg/mL;染料木苷 $Y=4\times 10^7 X+203\ 649$, $r=0.999\ 2$,线性范围11.3~182.0 μg/mL;大豆苷元 $Y=7\times 10^7 X+3\ 482.4$, $r=0.999\ 7$,线性范围1.2~18.8 μg/mL;染料木素 $Y=4\times 10^7 X+2\ 077.7$, $r=0.999\ 6$,线性范围0.25~4.0 μg/mL;

芒柄花素 $Y=4\times 10^6 X+689.58$, $r=0.999\ 0$,线性范围0.35~5.73 μg/mL;结果表明各黄酮类成分在相应质量浓度范围内线性关系良好。

2.2.5 仪器精密度试验 取3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素、芒柄花素质量浓度分别为28.19、28.40、29.52、30.90、26.10、30.20、29.80、29.80 μg/mL的混合对照品溶液重复进样6次,测得8种黄酮类成分峰面积的RSD为0.09%~0.70%,保留时间RSD为0.13%~1.00%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 方法精密度试验

(1) 日内精密度:取同批的供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,进样量为2 μL,测得各成分峰面积的RSD为0.16%~2.39%,保留时间的RSD为0.11%~1.70%,结果表明日内精密度良好。

(2) 日间精密度:取同批的供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件,每天连续进样6次,进样3 d,进样量为2 μL,测得各成分峰面积的RSD为0.01%~1.83%,保留时间的RSD为0.21%~1.81%,结果表明日间精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 精密称取样品,按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,室温下放置,并按“2.2.1”项下色谱条件于0、4、8、12、18、24 h进样测定。测得各成分峰面积的RSD分别为0.48%~1.97%,保留时间的RSD为0.14%~1.64%,结果表明样品在24 h内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 精密称取样品6份,按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2.1”项下色谱条件进样分析并记录峰面积。测得3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素、芒柄花素各峰峰面积的RSD为0.06%~2.64%,表明重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 分别精密称取8个黄酮类成分对照品,配成3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素、芒柄花素质量浓度分别为712.50、1 580.00、1 040.00、392.50、393.00、48.00、9.00、1.25 μg/mL的混合对照品溶液。精密称取已测知8个黄酮类成分含量的葛根样品约0.5 g,按“2.2.3”项下方法制备成体积分别为0.5 mL的3份供试品溶液。根据样品中已知黄酮类成分含有量的80%、100%、120%,分别向上述供试品溶液加入上述混合对照品溶液

0.4、0.5、0.6 mL。按“2.2.1”项下色谱方法进样，进样量为 2 μL，记录不同黄酮类成分的信号强度。测得各成分平均加样回收率为 98.86%、99.25%、99.90%、100.17%、100.21%、101.40%、100.73%、101.42%，RSD 分别为 0.233%、0.251%、0.214%、0.163%、0.780%、0.245%、0.322%、0.176%。

2.3 超微粉碎工艺参数优化

2.3.1 影响因子设计 根据投药量、初始粉末粒度和粉碎时间对黄酮类成分的影响因素，以粒径分布 (D_{90} 、 D_{50} ，颗粒累积分布为 90%、50% 的粒径) 和 UPLC 法测定的不同粒径葛根粉中 8 个黄酮类活性成分 (3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素和芒柄花素) 的含量数据，共 10 个参数作为响应因子。以各因素无相互作用且对设计结果干扰少作为设计前提，采用 Design-Expert Version 8.0.7 统计软件，以响应曲面法对粉碎参数进行优化，以确定最优的粉碎方法。

选择投药量 (100~900 g, A)、原粉末初始粒度 (10~200 目, B) 及粉碎时间 (0~36 min, C) 作为考察因素，分别进行了单因素实验，结果显示当粉碎时间在 4~12 min 时， D_{90} 有明显的减小趋

势，在 12~28 min 时，粉体的 D_{90} 随着时间的增加，减小趋势逐渐减慢，在 28 min 之后，趋势趋于平缓；当投药量为 100~300 g 时，随着投药量的增大， D_{90} 增长缓慢，但当投药量大于 200 时， D_{90} 增幅明显变大，当投药量大于 800 g 时， D_{90} 的增长趋势又逐渐变缓；当初始粒度为 10~50 目时， D_{90} 随着初始粒度的减小而减小的趋势明显，当初始粒度为 50~100 目时， D_{90} 减小趋势逐渐减慢，当初始粒度为 100~200 目时， D_{90} 减小趋势趋于平缓。综上所述，选择粉碎时间 (8、20、32 min)、投药量 (200、500、800 g)、初始粒度 (10、50、100 目) 作为响应面法优化粉碎工艺的各因素及水平，因子设计见表 1。

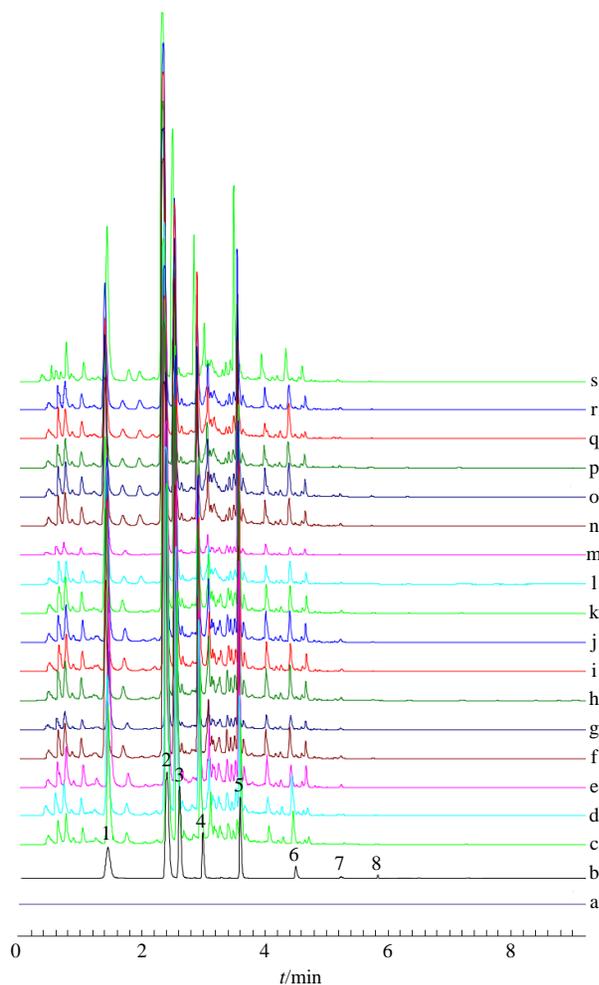
2.3.2 粉体粒径 D_{90} 、 D_{50} 的测定 将按不同实验方案制成的超微粉体样品置于激光粒径仪进样口，测出粉末粒径 D_{90} 、 D_{50} ，结果见表 1。

2.3.3 样品定量测定 取根据响应面设计制备的 17 批葛根超微粉供试品，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进行含量测定，记录色谱图 (图 1)，按外标法计算超微粉样品中 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素和芒柄花素的质量分数，结果见表 1。

表 1 葛根超微粉碎工艺响应面试验设计及结果

Table 1 Response surface experimental design and results of *Puerariae Lobatae Radix* ultrafine powder

序号	A/g	B/目	C/min	$D_{50}/\mu\text{m}$	$D_{90}/\mu\text{m}$	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)							
						3'-羟基葛根素	葛根素	3'-甲氧基葛根素	大豆苷	染料木苷	大豆苷元	染料木素	芒柄花素
1	500 (0)	50 (0)	20 (0)	15.7	93.3	16.33	44.90	35.65	11.31	10.15	0.98	0.15	0.10
2	800 (1)	50	8 (-1)	19.4	158.0	12.71	38.15	30.91	10.58	6.38	1.06	0.07	0.01
3	200 (-1)	50	8	18.1	166.0	13.03	40.78	27.46	7.70	8.08	0.92	0.13	0.12
4	500	50	20	16.8	102.0	16.58	43.65	35.37	11.49	9.27	1.12	0.16	0.13
5	500	100 (1)	32 (1)	17.1	85.9	17.11	44.50	36.91	10.46	9.71	1.12	0.17	0.11
6	500	50	20	17.0	101.0	16.59	43.65	35.37	11.50	9.26	1.12	0.16	0.13
7	500	10 (-1)	8	48.2	1050.0	5.96	22.39	11.90	3.37	3.33	0.45	0.01	0.02
8	800	10	20	45.9	530.0	10.84	37.31	21.72	6.37	5.98	0.82	0.08	0.07
9	500	100	8	17.7	117.0	12.67	40.86	27.30	7.47	7.92	0.87	0.12	0.11
10	500	50	20	15.8	107.0	16.38	45.42	34.51	9.93	10.32	1.18	0.23	0.23
11	200	50	32	17.9	91.1	12.11	42.56	30.93	11.02	5.88	1.23	0.15	0.14
12	800	50	32	17.2	103.0	15.35	40.29	32.80	9.23	10.28	1.16	0.18	0.50
13	500	10	32	18.9	169.0	12.63	39.91	26.46	7.41	7.80	0.89	0.14	0.09
14	200	100	20	16.0	84.6	17.96	45.88	38.16	12.85	11.82	1.24	0.06	0.23
15	500	50	20	16.9	108.0	15.20	44.50	32.79	9.65	9.36	0.96	0.17	0.04
16	200	10	20	16.9	87.1	16.04	44.04	34.95	9.72	10.73	0.99	0.15	0.09
17	800	100	20	19.8	178.0	13.08	38.64	32.65	11.41	7.12	1.35	0.18	0.18



1-3'-羟基葛根素 2-葛根素 3-3'-甲氧基葛根素 4-大豆苷
5-染料木苷 6-大豆苷元 7-染料木素 8-芒柄花素
1-3'-hydroxy puerarin 2-puerarin 3-3'-methoxy puerarin
4-daidzin 5-daidzein 6-daidzein 7-genistein 8-formononetin

图 1 空白溶剂 (a)、混合对照品 (b) 和 17 个批次的葛根超微粉 (c~s)

Fig. 1 UPLC chromatograms of blank solution (a), mixed standards solution (b), and 17 batches of *Puerariae Lobatae Radix* ultrafine powder (c~s)

2.4 响应面法优化超微粉碎工艺参数

各指标 P 值及模型拟合相关方程分别为 $D_{50} = 15.51 + 3.89 A - 3.66 B - 7.37 C - 0.50 AB - 5.89 AC + 6.75 BC + 0.40 A^2 + 1.31 B^2 + 8.66 C^2$ ($P = 0.0513$); $D_{90} = 80.84 + 63.11 A - 119.12 B - 171.32 C + 4.98 AB - 79.49 AC + 200.37 BC - 54.14 A^2 + 81.41 B^2 + 193.23 C^2$ ($P = 0.0752$); 3'-羟基葛根素 = $14.26 - 0.90 A + 1.60 B + 1.81 C$ ($P = 0.0961$); 葛根素 = $44.83 - 2.37 A + 2.96 B + 3.28 C + 0.090 AB - 0.25 AC - 3.21 BC + 0.29 A^2 - 4.27 B^2 - 3.65 C^2$ ($P = 0.0956$); 3'-甲氧基葛根素 = $31.21 - 1.68 A + 3.69$

$B + 4.73 C$ ($P = 0.0415$); 大豆苷 = $11.01 - 0.44 A + 1.11 B + 1.91 C - 1.17 AB + 0.39 AC - 0.19 BC + 0.88 A^2 - 2.03 B^2 - 1.81 C^2$ ($P = 0.0187$); 染料木苷 = $9.80 - 0.85 A + 0.96 B + 1.09 C + 1.52 AB - 0.16 AC - 0.60 BC - 0.15 A^2 - 1.87 B^2 - 0.74 C^2$ ($P = 0.2699$); 大豆苷元 = $1.09 + 5.015 \times 10^{-3} A + 0.14 B + 0.18 C - 0.052 AB + 0.068 AC - 0.043 BC + 0.14 A^2 - 0.12 B^2 - 0.14 C^2$ ($P = 0.0038$); 染料木素 = $0.18 + 5.184 \times 10^{-3} A + 0.035 B + 0.016 C + 0.022 AB + 0.048 AC - 0.014 BC - 0.020 A^2 - 0.022 B^2 - 0.039 C^2$ ($P = 0.0316$); 芒柄花素 = $0.11 - 0.034 A + 0.016 B + 0.045 C$ ($P = 0.0573$)。从 D_{50} 、 D_{90} 及各成分质量分数项的 ANOVA 分析结果中可以看出, 投药量对各项均无显著性差异; 粉碎时间对大豆苷 ($P = 0.0431 < 0.05$)、大豆苷元 ($P = 0.0034 < 0.05$)、染料木素 ($P = 0.0122 < 0.05$) 的含量有显著性差异; 初始粒径对 D_{50} ($P = 0.0129 < 0.05$)、 D_{90} ($P = 0.0219 < 0.05$)、葛根素 ($P = 0.0485 < 0.05$)、3'-甲氧基葛根素 ($P = 0.0129 < 0.05$)、大豆苷 ($P = 0.0038 < 0.05$)、大豆苷元 ($P = 0.0007 < 0.05$)、芒柄花素 ($P = 0.0320 < 0.05$) 的含量均有显著性差异, 如图 2 所示。

根据各指标响应曲面图 (图 2) 及模型拟合相关方程, 可知, 随着投药量的增大, D_{50} 、 D_{90} 随之增大, 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素和芒柄花素的含量随之减小, 超过 500 g 时, 大豆苷元出现上升趋势, 染料木素出现下降趋势; 当超过 570 g 时, D_{90} 逐渐趋于平稳, 大豆苷出现小幅度上升趋势。随着粉碎时间的延长, D_{50} 、 D_{90} 逐渐减小, 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素和芒柄花素的含量随之增大, 当时间超过 23~25 min 时, 葛根素、大豆苷和 大豆苷元含量出现小幅度下降, 含量随粉碎时间的增大而减小; 当时间超过 26 min 时, D_{90} 及染料木素逐渐趋于平稳。随之初始粒径的减小, D_{50} 、 D_{90} 逐渐降低, 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素和芒柄花素的含量随之增大, 但当超过 65 目时, 染料木素出现下降趋势; 超过 70 目时, 葛根素及大豆苷出现下降趋势; 当粒径大于 73 目时, D_{90} 有小幅度上升趋势; 超过 75 目时, 大豆苷元出现下降趋势; 超过 80 目时, 染料木苷逐渐趋于平稳。

从总体上来说, 3 因素交互作用对 3'-甲氧基葛

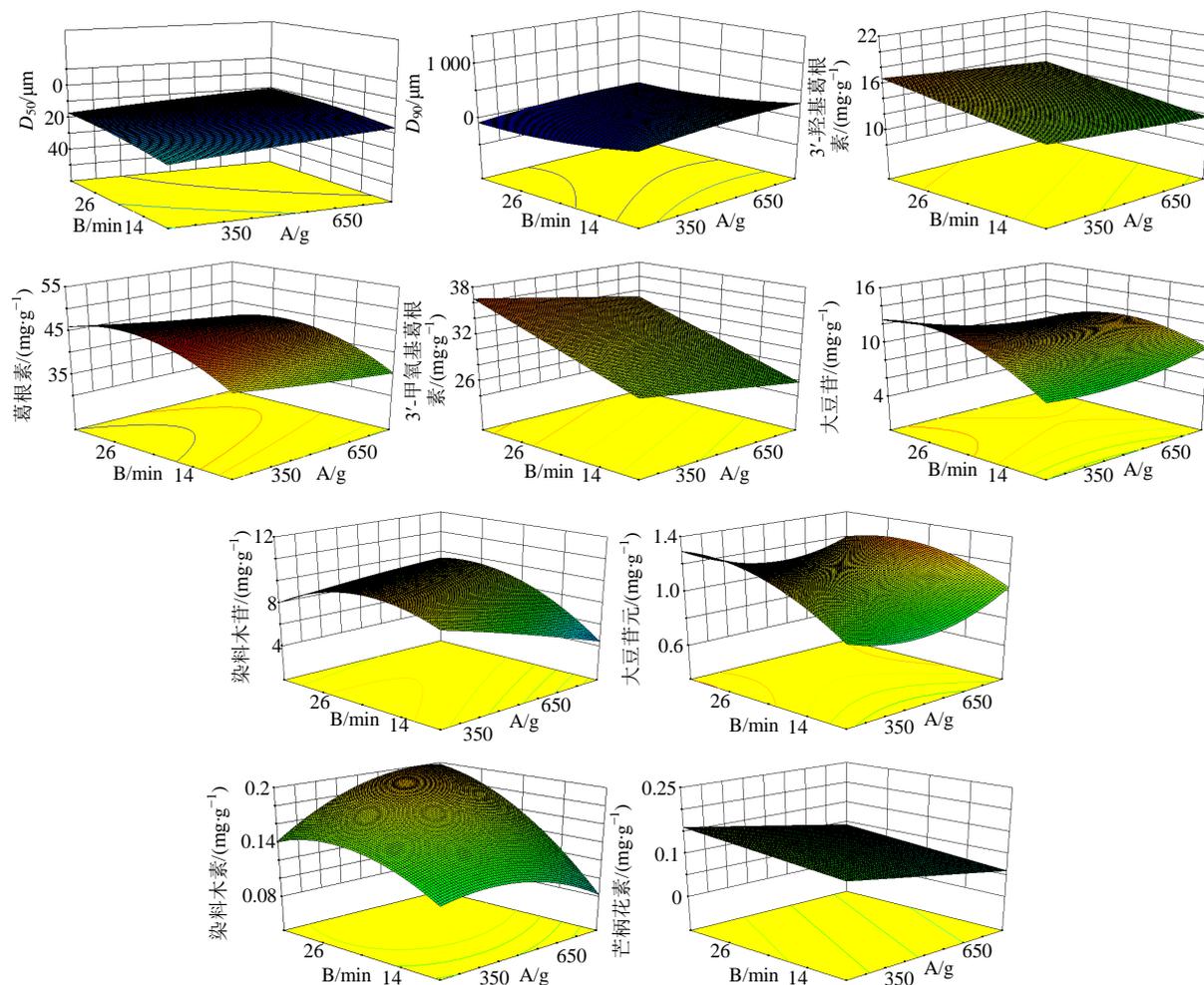


图 2 各响应因素试验响应曲面分析图

Fig. 2 Response surface plots for ten response factors including D_{50} , D_{90} , 3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, daidzin, genistin, daidzein, genistein, and formononetin

根素 ($P=0.041\ 5 < 0.05$)、大豆苷 ($P=0.018\ 7 < 0.05$)、大豆苷元 ($P=0.003\ 8 < 0.05$) 和染料木素 ($P=0.031\ 6 < 0.05$) 的含量有显著影响。

根据上述筛选结果,在设计水平内对响应因子 D_{50} 、 D_{90} 做最小值运算,对各含量做最大值运算,以 5 次重复试验验证因子分析结果,得到最终优化粉碎工艺为投药量为 247.26 g,粉碎时间为 25.68 min,初始粒径为 76.31 目。结合实际操作,将最终工艺优化为投药量为 247 g,粉碎时间为 26 min,初始粒径为 80 目。

2.5 验证试验

取同一批次葛根药材,平行 3 份,按确定的优化的粉碎工艺进行粉碎,按照“2.2.3”项下方法制备样品并进行粉体粒径和 8 种黄酮类成分含量的测定,表 2 结果表明测得各指标均与理论值较为接近,RSD 值较小,表明经该试验模型优化得到的粉碎工

艺稳定、可行,且重现性良好,可以为葛根超微粉碎技术提供参考。

优选出来的超微粉较普通粉相比,各有效成分的含量均有明显的升高,3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素的含量相比普通粉升高了 51.68%、39.65%、54.37%、68.47%、53.16%、63.49%、71.53%,芒柄花素在普通粉中并未测到,在超微粉中质量分数为 0.16 mg/g。因此说明经过超微粉碎技术的处理,对各有效成分的溶出有较为明显的促进作用。

3 讨论

3.1 色谱条件和样品处理方法的选择

由于待测样品成分较多,分别对流动相(水、0.1%甲酸水溶液、0.1%磷酸水溶液)、进样量(2~10 μL)等多种影响谱峰分离的因素进行考察。结果显示,0.1%磷酸水溶液对各成分的分度及峰形影

表 2 最佳条件预测及验证实验结果

Table 2 Optimal condition prediction and experimental results

样品	$D_{50}/\mu\text{m}$	$D_{90}/\mu\text{m}$	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)							
			3'-羟基葛根素	葛根素	3'-甲氧基葛根素	大豆苷	染料木苷	大豆苷元	染料木素	芒柄花素
优选超微粉	17.80	85.68	16.48	46.98	36.54	14.99	10.15	1.26	0.14	0.16
普通粉	44.70	830.00	8.05	28.68	16.73	4.70	4.74	0.47	0.04	—
预期值	17.70	84.51	16.65	47.52	36.66	14.91	10.13	1.28	0.13	0.17
RSD/%	0.59	3.11	0.81	1.12	0.46	0.93	0.59	3.09	3.61	4.44

响较为明显,因此选用 0.1%磷酸水溶液-乙腈作为流动相。采用水提和醇提 2 种方法对样品进行处理,虽醇提中可以测到鹰嘴豆芽素 A,但主要的黄酮类成分以水提取中的含量较高,综合考虑,故采取水提的方法对样品进行处理。

3.2 粒径及各成分含量变化分析

本实验选择 D_{50} 、 D_{90} 及 8 种黄酮类化合物作为评价指标,是因为 D_{50} 、 D_{90} 可以较为直观表现出粉碎工艺对粒径的影响。黄酮类化合物作为葛根中的主要药理活性成分,选择其中含量较高的 8 种化合物作为评价指标,从多成分含量角度,更能准确地表现出粉碎工艺对有效成分含量的影响。

本实验结果表明,粒径并非随着粉碎时间增加、投药量减少、初始粒径减小而一味减小,因为粉碎到一定时间,其粒径不再随粉碎时间的延长而变小,比表面积也不再增大,主要是由于颗粒尺寸越来越小,引起表面能增大,植物细胞质中水等物质在颗粒表面形成羟基层,减少了表面静电排斥作用,伴随羟基间的范德华引力、氢键的产生使团聚不可避免^[19-20]。

8 种黄酮类化合物中 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素,芒柄花素的含量随着粉碎时间增加、初始粒径的减小而增加,随投药量的增加而减小,结果表明葛根经过超微粉碎,促使细胞壁破裂,使有效成分溶出增加。葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷及染料木素的含量随着粉碎时间的增加、初始粒径的减小而增加,随投药量的增加而减小,但时间增加到一定程度时出现转折。国海东等^[21]研究表明,当温度低于 60 °C 时,葛根素含量基本不变,比较稳定;当温度达到 80 °C 时,葛根素含量开始下降,随着时间延长,剩余含量越少;当加热温度为 100 °C 时,葛根素含量迅速下降,10 h 后剩余含量百分比已低于 90%。葛根素含量的变化考虑可能是因为随着时间的增加,粉碎机内部温度升高,部

分有效成分分解,致使含量出现下降趋势。而其他几种成分也为黄酮类成分,与葛根素具有类似的化学结构,考虑含量的变化也与粉碎时间增大、温度升高有关。

总的来说,经过超微粉碎之后的葛根超微粉,相比普通葛根粉,各有效成分含量均有明显的增高,说明经过超微粉碎后,细胞壁破碎,使得有效成分溶出增加,与文献报道相符。

4 结论

本实验采用 UPLC 法同时测定葛根中 8 种黄酮类化合物的含量,与 D_{50} 、 D_{90} 同时作为响应面的评价指标,优化粉碎工艺,从多成分含量角度评价粉碎工艺,能更准确的表现出粉碎工艺中各因素对各成分含量的变化,为后续研究提供了可靠的基础。

参考文献

- [1] 尤春雪,张振秋,李峰,等. HPLC 波长切换技术对葛根中 8 种成分的测定及指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 616-621.
- [2] 付爱珍,吴学芹,董娟,等. 葛根正丁醇部位的化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 484-486.
- [3] Ji B, Zhao X, Yu P, et al. Simultaneous determination and pharmacokinetics of fourteen bioactive compounds in rat plasma by LC-ESI-MS/MS following intravenous injection of Gegen-Sanqi compatibility solution [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1068/1069(1): 164-172.
- [4] 程京艳. 基于葛根功能主治的药效组分研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [5] Luo C F, Yuan M, Chen M S, et al. Metabolites of puerarin identified by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Similar metabolic profiles in liver and intestine of rats [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(3/4): 363-370.
- [6] Loutchanwoot P, Vortherms T, Jarry H. Evaluation of *in vivo* estrogenic potency of natural estrogen-active chemical, puerarin, on pituitary function in

- gonadectomized female rats [J]. *Life Sci*, 2016, 165(8): 75-82.
- [7] 张 磊. 小檗碱与葛根素的合成以及急性毒性、相关药效学研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [8] 张 焦, 王 帆, 王计瑞, 等. 葛根素纳米晶自稳定 Pickering 乳液的制备可行性研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(1): 75-84.
- [9] Tang T T, Hu X B, Liao D H, *et al.* Mechanisms of microemulsion enhancing the oral bioavailability of puerarin: comparison between oil-in-water and water-in-oil microemulsions using the single-pass intestinal perfusion method and a chylomicron flow blocking approach [J]. *Int J Nanomed*, 2013, 2013(1): 4415-4426.
- [10] 赵 庭, 贾运涛, 张良珂. 载葛根素聚乙烯亚胺/海藻酸钠自组装纳米粒的制备及性能研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(17): 3523-3528.
- [11] 李 耿. 克服溶血的复方葛根素注射剂生物评价研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
- [12] Tan Z, Hai W U, Liu F, *et al.* Effect of ultra-micro powder qiweibaishusan on the intestinal microbiota and enzyme activities in mice [J]. *Acta Ecol Sin*, 2012, 32(21): 6856-6863.
- [13] 梁兆昌, 褚洪标, 肖 琳, 等. 杜仲超微粉体理化特性及体外溶出性能研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(11): 1609-1614.
- [14] Dickmann R S, Strasburg G M, Romsos D R, *et al.* Particle size, surface area, and amorphous content as predictors of solubility and bioavailability for five commercial sources of ferric orthophosphate in ready-to-eat cereal [J]. *Nutrients*, 2016, 8(3): 129-142.
- [15] 万 丹, 张水寒, 肖 娟, 等. Box-Behnken 设计-效应面法优选酒黄连炮制工艺 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(4): 341-345.
- [16] Rathore M S, Shekhawat N S. Micropropagation of *Pueraria tuberosa* (Roxb. ex Willd.) and determination of puerarin content in different tissues [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2009, 99(3): 327-334.
- [17] 王 迪, 吴亿晗, 李 维, 等. 一测多评法测定葛根芩连丸中 7 种指标成分 [J]. *中草药*, 2017, 48(21): 4453-4459.
- [18] 吴 锋, 鲁建丽, 豆久锋, 等. HPLC 法同时测定心可舒丸中丹参素、原儿茶醛及葛根素 [J]. *中草药*, 2012, 43(9): 1770-1772.
- [19] 李 婷, 郑彩美, 张 彤, 等. 葛根总黄酮提取物的含量测定研究 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(5): 1088-1090.
- [20] 王冕堂, 李 梅, 柳召刚, 等. 超细粉体的团聚机理和表征及消除 [J]. *中国粉体技术*, 2008, 14(3): 46-51.
- [21] 国海东, 蒋 艳, 上官新晨, 等. 葛根素的稳定性研究 [J]. *食品科技*, 2014, 39(11): 229-232.