

正交试验-多元回归法优化葛根的乙醇提取工艺

刘丽华, 杨志强

天津中新药业集团股份有限公司第六中药厂, 天津 300401

摘要:目的 优化葛根药材中葛根素的提取工艺。方法 采用乙醇为溶媒提取葛根药材, 以葛根素转移率和出膏率为指标, 运用正交试验及多元回归分析多指标综合优化葛根药材的提取条件。结果 葛根提取的最佳条件为: 90%乙醇提取两次, 每次6倍量乙醇, 提取时间为2 h。葛根素的转移率为89.85%, 浸膏得率为14.92%。结论 该数据处理方法优化葛根提取工艺结果准确、高效, 具有一定的推广价值。

关键词: 葛根; 葛根素; 正交试验; 多元回归

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)03-0331-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.017

Optimization of extract technology with alcohol for *Puerariae Radix* by orthogonal test - multiple regression method

LIU Li-hua, YANG Zhi-qiang

Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Corporation Ltd No.6 Traditional Chinese Medicine Factory, Tianjin 300401, China

Abstract: Objective To seek the best way for extracting puerarin from *Puerariae Radix*. **Methods** *Puerariae Radix* was extracted by ethanol, using the transfer rate of puerarin and extract rate as indexes. Based on the orthogonal test combined with multi-variable regression analysis to make sure the best way for extracting puerarin from *Puerariae Radix*. **Results** *Puerariae Radix* should be extracted by 90% ethanol twice with six times of ethanol and 2 h each time. The transfer rate of puerarin was 89.85% and extract rate was 14.92%. **Conclusion** The analytical method of the orthogonal data is accurate and efficient to optimize the preparation of puerarin from *Puerariae Radix*.

Key words: *Puerariae Radix*; puerarin; orthogonal test; multiple regression

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *P. thomsonii* Benth. 的干燥根。现代化学、药理研究结果认为葛根中以葛根素为代表的异黄酮类成分具有改善心脑血管血液循环, 扩张冠状动脉, 降血压, 降血糖等作用, 是葛根中的主要有效成分。现在市场上出现了许多以葛根为主药的新药, 如葛根素葡萄糖注射液、愈风宁心滴丸、通脉滴丸等。在制成制剂前一般都要提取其有效成分, 目前常用的提取方法为水煎、醇提法, 通常以葛根素或总黄酮为指标进行工艺优选^[1-3]。对葛根提取工艺的考察多采用正交试验设计。正交试验设计中, 对于单指标试验用直观分析法可简便、快速得出结果, 而对多指标试验采用多元回归法得到的结果更为准确。王新春等^[4]采用正交设计结合多元回归考察了

大黄的提取工艺, 结果回归分析所得结果优于其他方法。本研究采用正交试验结合多元回归优选葛根的醇提取工艺, 以葛根素提取转移率和出膏率为指标进行综合评价, 优化过程兼顾各因素和水平的权重, 结果更为精确、可靠, 同时建立的数学模型可以反映出各指标随各因素的变化趋势, 可有效地提高正交数据的利用效率, 得到的优化结果也更为理想。

1 材料和仪器

1100 型高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司)。野葛饮片购于河北金木药业有限公司, 葛根素质量分数为 3.59%, 经天津第六中药厂药物研究所鉴定为野葛 *Pueraria lobata* (wild) Ohwi 的根; 葛根素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110752-

收稿日期: 2013-03-15

作者简介: 刘丽华 (1964—), 女, 河北昌黎人, 高级工程师, 从事中药分析和药物新品研发工作。Tel: (022) 26951951 E-mail: tjlyliu@163.com

200912), 甲醇 (GR, 天津康科德科技有限公司), 水为二次纯化水。均匀设计 2.10 软件 (农业部特种经济动植物及产品质量监督检验测试中心编程)。

2 方法和结果

2.1 葛根素的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件: Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (25:75); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 250 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 30 °C。在此条件下葛根素的保留时间约在 14 min。

2.1.2 对照品溶液的制备 取葛根素对照品适量, 精密称定, 加 30%乙醇制成 40.0 μg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.3 线性范围考察 精密量取 1.0 mg/mL 葛根素对照品溶液, 分别稀释制备 10.0、20.0、40.0、80.0、120.0 μg/mL 溶液。各精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积。以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得回归方程 $A=89\ 036\ C-38\ 581$, $r=1.000$, 结果表明, 葛根素在 10.0~120.0 μg/mL 时, 进样浓度与峰面积值有良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验 精密量取 40.0 μg/mL 葛根素对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 重复进样 6 次, 测定峰面积值, 计算 RSD 值为 0.76%。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取正交试验 1 号试验滤液适量, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样, 依法测定, 结果其 RSD 值为 0.34%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.6 回收率试验 取含葛根素 2.72 mg/mL 的正交试验 1 号浓缩液 1 mL, 共取 6 份, 置 100 mL 量瓶中, 分别精密加入 0.9 mg/mL 葛根素对照品溶液 3 mL, 加 30%乙醇至刻度, 摇匀, 超声溶解, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液进行测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 100.3%, RSD 值为 1.02%。

2.2 评估指标的选取

以葛根素提取率、出膏率为指标对葛根的提取工艺进行优化。葛根素的转移率越高, 说明药材被充分提净, 在有效成分明显的前提下, 出膏率越低则葛根素的纯度越高, 同时出膏率少有利于制剂的稳定性。

取葛根提取液, 减压浓缩至 20 mL, 置已干燥至恒质量的 100 mL 蒸发皿中, 水浴蒸干后, 置烘箱内 110 °C 减压干燥 3 h, 取出置干燥器内冷却,

精密称定干膏质量, 根据出膏率=干膏质量/药材质量计算出膏率。

取葛根提取液适量, 减压浓缩至 100 mL。取浓缩液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀后滤过, 取滤液 20 μL 进样, 测定, 计算葛根素的质量, 根据提取率=葛根素的质量/(药材质量×3.59) 计算提取率。

2.3 正交试验设计

根据野葛中葛根素的理化性质以及预实验的考察, 影响因素主要有乙醇体积分数 (A)、乙醇倍数 (B) 以及提取时间 (C), 故因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水 平	因 素		
	A/%	B/倍	C/h
1	70	6	2
2	80	5	1.5
3	90	4	1

取野葛饮片 20 g, 切割成直径 1 cm 小块, 备用。采用 L₉(3⁴) 正交表进行设计, 野葛药材提取 2 次, 合并提取液, 计算葛根素的提取率和出膏率, 结果见表 2。

表 2 正交试验结果 (n=3)

Table 2 Results of orthogonal design tests (n=3)

试验号	A	B	C	提取率/%	出膏率/%
1	70	6	2	75.8	18.1
2	70	5	1.5	73.5	17.5
3	70	4	1	70.3	17.1
4	80	6	1.5	78.8	17.2
5	80	5	1	72.4	16.9
6	80	4	2	72.0	15.3
7	90	6	1	81.1	14.7
8	90	5	2	85.2	15.0
9	90	4	1.5	80.1	14.4

2.4 多指标综合分析

采用均匀设计 2.10 软件中的多元回归模型对正交试验结果进行多指标综合分析。对于上述两个指标建立两个回归模型, 采用逐步回归法对二次回归模型的各项进行筛选。显著性水平 $\alpha=0.05$, 引入变量的临界值 $F_{\alpha}=0.05$, 剔除变量的临界值 $F_{\alpha}=0.05$ 。

采用单纯形法对葛根素转移率进行分析, 拟建立回归模型: $Y_1=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_1^2+b_5X_1X_2+b_6X_1X_3+b_7X_2^2+b_8X_2X_3+b_9X_3^2$, 经筛选, 得回归方程 $Y_1=255.05-4.8936X_1-17.594X_3+0.0299X_1^2+0.38912X_1X_3+0.15348X_2^2+1.1061X_2X_3-5.3333X_3^2$, 复相关系数 $r=0.9999$, 其中 $b_i (i=1, 2, 3\cdots)$ 为各方程项系数, $X_i (i=1, 2, 3)$ 分别代表 3 个因素 (乙醇体积分数、溶剂倍数和提取时间) 的取值, $Y_i (i=1)$ 分别代表 2 个指标 (葛根素转移率和出膏率) 的取值。

对于出膏率, 同样采用单纯形法分析, 拟建立回归模型 $Y_2=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_1^2+b_5X_1X_2+b_6X_1X_3+b_7X_2^2+b_8X_2X_3+b_9X_3^2$, 经筛选得回归方程 $Y_2=-6.7667+0.50333X_1+5.85X_2-9.7333X_3-0.0033X_1^2-0.0567X_1X_2+0.11333X_1X_3-0.05X_2^2$, 复相关系数 $r=0.9991$ 。

根据上述 2 个指标的多元回归模型, 采用软件中多指标实验优化方案的“多指标 II 型”进行优化, 采用单纯形法计算。优化方案的参数设置见表 3。

表 3 试验优化的参数设置

Table 3 Parameter setting of test optimization

项 目	下限	上限	方向	权重
乙醇体积分数	70	90	0	0
溶剂量	4	6	-1	0.1
提取时间	1	2	-1	0.1
转移率	69.362	95	1	0.5
浸膏得率	10	18.033	-1	0.3

其中上/下限为设定值, 方向是指因素 (指标) 的数值期望方向, 当期望该因素 (指标) 取最大值时取 1, 反之取 -1, 当对因素 (指标) 的方向无要求时取 0。权值大小依据实际情况由其重要性决定。将上述参数代入线性加权和的表达式

$$\sum_{i=1}^{m+n} (\pm 1) \frac{F_i - F_{\text{mid}_i}}{F_{\text{max}_i} - F_{\text{min}_i}} P_i \quad (\text{其中 } F_{\text{max}_i}, F_{\text{min}_i}, F_{\text{mid}_i} \text{ 分别代表}$$

上/下限设定值及其中间值, F_i 代表该因素或指标的表达式或者函数模型, ± 1 为数值期望方向), 求其最大值。此时各因素的取值即为最优条件。采用单纯形法计算, 得优化结果, 乙醇体积分数为 90%, 溶剂量为 6 倍, 提取时间为 1.91377 h, 约为 2 h。将优化结果带入上述 2 个回归模型, 对结果进行预

测, 葛根素的转移率为 $(88.86 \pm 0.42)\%$, 浸膏得率为 $(15.13 \pm 0.32)\%$ 。

2.5 优化结果复核

按照优化条件提取葛根药材, 参照方法测定葛根素的转移率和出膏率, 重复 3 次, 结果葛根素的平均提取转移率为 89.85%, 浸膏得率为 14.92%, 二者的实际值与预测值基本一致。

3 讨论

葛根素为野葛中主要的异黄酮类有效成分, 具有增加脑血流、改善微循环等功效, 常用作含葛根药物的含量控制指标。葛根素提取率的高低说明该工艺对药材的提取是否完全; 同时浸膏得率也是药材提取的重要指标, 出膏量过大, 使葛根素的含量降低, 影响制剂的质量。因此以单一指标对提取工艺进行优选通常所得结果不能令人满意, 本实验采用正交设计结合多元回归模型多指标综合优化葛根的提取工艺, 由于方案兼顾了各因素和指标对试验结果的影响, 因此优化结果更加理想。

在使用正交设计结合多元回归模型进行工艺优选时, 首先要根据各因素指标的重要性设定相应的权重和方向, 需要根据具体情况具体分析。实验中葛根素的转移率为最重要的指标, 因此设定为 0.5; 而浸膏得率越高, 则纯度降低, 设为负权重系数; 此外, 从成本考虑, 希望提取溶剂用量较少、提取时间更短, 分析时都设为负权重系数, 并给出相应的权重值, 这样使优化的结果更符合实际生产中的需要。

由于该方法的实质是数学建模, 同样适用于其他实验设计的应用, 具有一定的推广价值。但是通过模型预测的试验结果与真实结果可能会存在一定的偏差, 这需要在实际中加以校正。

参考文献

- [1] 张新广, 王冬梅. 葛根素提取工艺的研究 [J]. 中药材, 2004, 27(9): 680-682.
- [2] 杨红, 杨红琳. 用薄层色谱法对水和乙醇作葛根成分提取溶剂的比较研究 [J]. 华西药学杂志, 1994, 9(1): 35-38.
- [3] 徐新刚, 路富玉, 隋晓春, 等. 正交试验优选葛根提取工艺 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(9): 780-781.
- [4] 王新春, 侯世祥, 李瑞雪, 等. 正交实验数据的极差分析与多元线性回归对比对大黄提取工艺优化影响 [J]. 中药材, 2002, 10(5): 742-746.