

表 1 大鼠 ig 给药后阿魏酸的药动学参数 (n=10)
Table 1 Pharmacokinetic parameter of ferulic acid
in rats after ig administration (n=10)

药动学参数	单位	数值
A	mg/L	4 987 ± 8 220
α	min ⁻¹	0 263 ± 0 477
B	mg/L	1 309 ± 1 580
β	min ⁻¹	0 002 73 ± 0 001 27
K_a	min ⁻¹	0 489 ± 0 609
V_c/F	L/kg	4 793 ± 3 131
$T_{1/2\alpha}$	min	12 62 ± 12 17
$T_{1/2\beta}$	min	305 04 ± 137 93
$T_{1/2K_a}$	min	6 54 ± 8 69
K_{21}	min ⁻¹	0 070 5 ± 0 085 7
K_{10}	min ⁻¹	0 008 05 ± 0 008 60
K_{12}	min ⁻¹	0 187 ± 0 386
AUC	min · mg · L	498 89 ± 482 45
CL/F	mL/min	6 38 ± 3 64
T_{max}	min	22 39 ± 28 71
C_{max}	mg/L	1 504 ± 1 076

3 讨论

阿魏酸为弱酸,在酸性条件下更易被有机溶剂提取完全。曾试用血浆供试品沉淀蛋白直接进样,血浆样品酸化后乙醚或醋酸乙酯提取等方法进行样品处理。实验结果表明,血浆供试品酸化后用醋酸乙酯提取的杂质含量少且阿魏酸提取效率高。本实验所建立的方法可测定复方制剂给药后体内的阿魏酸浓度,方法回收率高,3个浓度下测得的回收率均大于95%;精密度好,日内RSD小于3.0%,日间RSD小于5.3%。方法灵敏,阿魏酸的最小检测浓度为0.2 mg/L,故本法适用于阿魏酸的血液浓度测定及药动学研究。

阿魏酸单体及单方中的阿魏酸在不同动物及人

体的药动学已有报道^[3~5],多为一室模型,iv,ig或po给药后血药浓度下降迅速, $T_{1/2}$ 较短,均小于1h。复方中阿魏酸po后体内的分布与代谢为二室模型^[6]。实验结果表明,阿魏酸以方剂口服液形式进入大鼠体内后,自胃肠道吸收迅速,ig给药后平均22min即达血药浓度峰值,随后阿魏酸在大鼠体内迅速分布,其药-时曲线符合二室模型, $T_{1/2\alpha}$ 为12.6min, $T_{1/2\beta}$ 为305min,与文献报道^[6]川芎单方中阿魏酸的 $T_{1/2\beta}$ 11.5min比较,明显延长,提示复方制剂中多种成分可能对阿魏酸在大鼠体内的药动学过程有显著影响。

给药后5h阿魏酸的血液浓度已低于最低检出浓度,接近平均峰浓度的1/10,基本符合新药药动学研究对采血时程的要求。

References

- [1] Guo T, Ma J W, Ding L X, et al. Studies on Xinshu Oral Liquid [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1997, 32(1): 21-23.
- [2] Meng J R. Permanent catheterization of the jugular vein and hepatic portal vein in rats and its application [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1987, 22(5): 326-327.
- [3] Chang M X, Xu L Y, Tao J S, et al. Studies on metabolism and pharmacokinetics of ferulic acid in mice [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1993, 18(5): 300-302.
- [4] Chang M X, Xu L Y, Tao J S, et al. Studies on pharmacokinetics of ferulic acid in Chuanxiong in rabbits [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1996, 31(1): 43.
- [5] Shang G W, Huang X, Jiang Y P, et al. Pharmacokinetics of ferulic acid in healthy after administering a single dose of clinical decoction of Chuanxiong [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1996, 12(6): 38-40.
- [6] Shang G W, Jiang Y P, Huang X, et al. Determination of free ferulic acid in serum of volunteers healthy after administering Compound Chuanxiong Decoctions by RP-HPLC [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1997, 32(12): 761-764.

多指标综合评分法优选葛根提取工艺

张 彤, 徐莲英, 陶建生, 姚震宇*

(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要: 目的 优选葛根提取工艺。方法 采用正交试验法考察乙醇提取葛根的各影响因素,以多指标综合评分法进行数据分析,优选工艺条件。结果 葛根乙醇提取的最佳条件为:80%乙醇提取两次,第一次12倍量乙醇,提取1h,第二次10倍量乙醇提取30min。结论 采用综合评分法优选葛根提取工艺能较好地保证制剂的质量。

关键词: 葛根; 葛根素; 总黄酮; 正交试验; 综合评分法

中图分类号: R 284.2; R 286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)01-0038-03

* 收稿日期: 2003-04-26

基金项目: 上海市教委基金资助(01QN80, 02CZ24)

作者简介: 张 彤(1972—),男,浙江省杭州市人,副教授,1993年毕业于南京大学化学专业,获理学学士学位,1996年—2003年获上海中医药大学医学学士、硕士、博士学位,现为上海中医药大学教学实验中心副主任,目前研究工艺对中药有效成分的影响,并在多项新药的研制中负责工艺优选和质量标准的制定。Tel: (021) 51322318, 51322315 E-mail: zhangtdnj@sohu.com

Applying grading methods of synthesizing multiple guidelines to optimizing extract technology for Radix Puerariae

ZHANG Tong, XU Lian-ying, TAO Jian-sheng, YAO Zhen-yu

(School of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Key words: *Radix Puerariae*; puerarin; total flavones; orthogonal test; grading methods

葛根始载于《神农本草经》，被列为中品。为豆科野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *P. thansoni* Benth. 的干燥根。目前，在我国为药食两用的植物。它具有解肌退热、生津止渴、透发麻疹、升阳止泻的功能。葛根中主要含有葛根素(puerarin)、大豆苷(daidzin)和大豆苷元(daidzein)等异黄酮类有效成分。葛根在制成制剂前一般要提取有效成分，而提取工艺是否合理将直接影响制剂的难易及疗效的发挥。目前常用的提取方法为水煎、醇提法^[1-3]，通常以葛根素或总黄酮为指标进行工艺优选。本实验采用正交试验优选葛根醇提取工艺，以葛根素、总黄酮含量以及浸膏得率为指标，综合评分优选工艺条件。

1 材料和仪器

葛根药材购于上海雷允上药业西区有限公司中药饮片供应站，经上海中医药大学药教研室鉴定为豆科植物野葛 *P. lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根。流动相用甲醇为色谱纯，其余均为分析纯；葛根素对照品购于中国药品生物制品检定所。

HP 1100 型高效液相色谱仪(美国惠普公司)，HP 8453 紫外分光光度计(美国惠普公司)。

2 方法和结果

2.1 葛根素含量的 HPLC 测定^[4]：色谱条件：色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈ 柱(20 mm × 4.6 mm, 5 μm) (大连依利特科学仪器有限公司)，检测波长为 250 nm，柱温为室温，流动相为甲醇-水(25 : 75)，流速为 1.0 mL/min。理论塔板数按葛根素峰计算应不低于 4 000。

精密称取葛根素对照品 8.42 mg 置 10 mL 量瓶中，以甲醇溶解定容。以此为母液，依次配成 0.021 0, 0.042 1, 0.084 2, 0.168, 0.337 mg/mL 5 个浓度梯度的对照品溶液。分别吸取上述对照品溶液各 5 μL，按上述色谱条件进行测定。以峰面积积分值为纵坐标，葛根素对照品浓度为横坐标，绘制标准曲线。计算得回归方程： $Y = 1.6 + 20\,870.7X$ ， $r = 0.999\,96$ 。葛根素在 0.021 0~0.337 mg/mL 时峰面积积分值与浓度线性关系良好。

2.2 葛根总黄酮含量的 UV 测定^[3]：精密称取葛根

素对照品 8.23 mg 置 10 mL 量瓶中，以甲醇溶解定容。以此为母液，依次配成 2.06, 4.12, 6.18, 8.24, 10.3 ng/mL 5 个浓度梯度的对照品溶液。分别测定 250 nm 处的吸光度值。以吸光度值为纵坐标，葛根素对照品浓度为横坐标，绘制标准曲线，计算得回归方程： $Y = 69.597X + 0.014\,63$ ， $r = 0.999\,8$ 。总黄酮以葛根素计在 0.002 1~0.010 3 mg/mL 线性关系良好。

2.3 浸膏得率的测定：取葛根的提取液 50 mL，置已干燥至恒重的 100 mL 蒸发皿中，水浴蒸干后，置烘箱内 105℃ 干燥 3 h，取出置干燥器内冷却 30 min，迅速精密称定质量。

2.4 不同提取方法比较：取葛根饮片 20 g 置 800 mL 烧杯中，加 200 mL 水，浸泡 30 min，煮沸 1 h，纱布滤过，药渣用 160 mL 水再煮沸 30 min，纱布滤过，合并两次的滤液，作为水煎提取液。取 3 份 20 g 的葛根饮片，置 500 mL 圆底烧瓶中，分别以 30%，60%，90% 乙醇 200 mL 回流提取 1 h，纱布滤过，药渣再用 160 mL 溶剂再回流提取 30 min，纱布滤过，合并两次滤液，作为乙醇回流提取液。结果见表 1。可见，从葛根总黄酮和葛根素的提取率来看，以 60% 乙醇为溶剂的提取率较高。

表 1 不同提取方法比较结果

Table 1 Comparison by different extracting methods

提取方法	总黄酮提取率/%	葛根素提取率/%	浸膏得率/%
水煎提取	7.67	3.59	29.20
30% 乙醇提取	7.30	3.39	22.12
60% 乙醇提取	13.20	4.33	23.94
90% 乙醇提取	6.52	3.25	15.84

2.5 乙醇提取工艺优选：以上试验表明选取 60% 乙醇提取较为合适。在整个提取过程中，提取所用乙醇的浓度和量以及提取时间对葛根有效成分的影响较大，故采用正交试验进一步优选醇提的最佳条件。按 L₉(3⁴) 正交表进行试验，因素水平见表 2。

称取葛根各 20 g，按 L₉(3⁴) 正交试验设计表的条件进行试验。提取液滤过后合并，分别测葛根素、葛根总黄酮、浸膏得率，并进行多指标综合评分。评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化，再给出不同的权重。葛根素和总黄酮的权重系数设

为 0.4。在有效成分明显的前提下,浸膏得率越高则纯度越低,因此设负权重系数为-0.2。以综合值进行统计分析,结果见表 3 和 4。其中综合评分 $Y = 0.4X_1 \times 100/130.2 + 0.4X_2 \times 100/51.03 - 0.2X_3 \times 100/0.2604$ 。

表 2 正交试验因素水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal test					
水平	因 素				
	A 乙醇	B 乙醇加入量/倍		C 提取时间/min	
	浓度/%	第一次	第二次	第一次	第二次
1	60	8	6	60	30
2	70	10	8	60	60
3	80	12	10	90	60

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 3 Result of $L_9(3^4)$ orthogonal test							
编号	A	B	C	D	总黄酮	葛根素	浸膏得
					提取率 (误差) $X_1/\%$	提取率 $X_2/\%$	率 $X_3/\%$
1	1	1	1	1	10.64	4.639	0.2317
2	1	2	2	2	9.417	3.825	0.2388
3	1	3	3	3	11.64	5.103	0.2604
4	2	1	2	3	10.78	3.977	0.2210
5	2	2	3	1	9.821	3.988	0.2528
6	2	3	1	2	13.02	4.111	0.2446
7	3	1	3	2	10.46	4.243	0.1992
8	3	2	1	3	9.495	4.163	0.1914
9	3	3	2	1	10.41	4.634	0.2132
I	147.59	148.67	151.79	145.20			
II	142.77	129.69	139.82	144.10			
III	149.13	161.13	147.87	150.18			
R	6.36	31.44	11.97	6.08			

表 4 正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal test					
方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	7.38	2	3.66	1.05	
B	167.09	2	83.55	23.90	< 0.05
C	24.84	2	12.42	3.55	
误差	6.99	2	3.49		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.0$

直观分析表明,以综合评分为标准,在所选因素水平范围内,乙醇的加入量对葛根的提取效果影响最大,乙醇浓度影响较小,而提取时间影响最小。方差分析表明,因素 B (乙醇的加入量) 为主要影响因

素,具有显著性,因素 A 和 C 不显著。故选取最佳提取条件为 $A_3B_3C_1$, 即 80% 乙醇提取两次,第 1 次 12 倍量 1 h,第 2 次 10 倍量 30 min。

2.6 验证试验: 根据筛选得到的最佳工艺 $A_3B_3C_1$, 进行正交验证试验,得葛根总黄酮提取率为 10.3%、葛根素提取率为 4.62%、浸膏得率为 20.9% ($n = 3$)。

3 讨论

葛根主要含有葛根素、大豆苷和大豆苷元等异黄酮类有效成分,都具有增加脑血流、改善微循环等功效,以单一指标成分进行工艺优选与中药多组分、多靶点的作用特点有一定的距离。本实验以葛根素、总黄酮含量以及浸膏得率为指标,综合评分优选提取工艺条件,符合减小服用剂量、提高疗效要求,可以较好的保证制剂的质量。

用多指标正交试验进行工艺优选时,首先要解决指标间量纲不一致和指标间的矛盾问题。然后针对指标间的重要性差异给出各指标权重,综合评分后再进行统计分析。应用多指标综合评分法时,如何设置指标的权重,需要根据具体情况具体分析。在有效成分明确的前提下,浸膏得率越高则纯度越低,因此本实验设为负权重系数;如果指标成分不明确,以浸出物多少来代表有效成分时,浸膏得率的权重系数应相应增大,并设为正权重系数。这样进行方差分析的,优先出的工艺条件更加合理。

References:

[1] Wang CL, Xue H, Luo HS. Studies on extracting technology for *Pueraria* total flavones [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1995, 17(6): 6-8.

[2] Xu XG, Lu FY, Sui XM, et al. Optimization of the extracting technology for *Pueraria lobata* by orthogonal test [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(9): 780-781.

[3] Deng TH, Xu YJ, Liu ZM, et al. The preparation of Yufeng Ningxin Oral Liquid and its quantitative determination of total flavones [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1998, 15(4): 291-292.

[4] Zhang Y, Wang J, Yang SJ, et al. Determination of purarin in *Pueraria* from different areas by HPLC [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(12): 1059.

更正:

2003 年第 34 卷增刊第 32 页:“孕马尿甾体成分的研究”一文第一作者张兰兰的单位为中国科学院新疆理化技术研究所,现在天津天士力集团中药研究所工作。